

# 积雪草苷调控 PIK3C3/DYNC2H1/TUB 减轻转化生长因子- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞活化

曹 策, 杨丽丽, 宋鉴书, 刘子馨, 李 磊, 付建华, 刘建勋\*

中国中医科学院西苑医院基础医学研究所 中药药理北京市重点实验室 国家中医心血管病临床医学研究中心, 北京 100091

**摘要:** 目的 探究积雪草苷抑制转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 诱导的心肌成纤维细胞活化的作用机制。方法 采用 TGF- $\beta$ 1 诱导建立心肌成纤维细胞活化模型, 给予积雪草苷处理后, 采用 CCK-8 法检测积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞活力的影响; 采用免疫荧光检测积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞活化的影响; 采用划痕实验检测积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞迁移能力的影响。通过 GEO 数据库筛选纤维化相关转录组数据, 对差异表达基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 采用分子对接和分子动力学模拟检测积雪草苷与核心靶点的结合能力。通过 qRT-PCR 检测积雪草苷对核心靶点 mRNA 表达的影响, 采用 ELISA 试剂盒检测积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞上清液中软骨寡聚蛋白 (cartilage oligomeric protein, COMP) 和甘露糖结合凝集素 2 (mannose-binding lectin 2, MBL2) 水平的影响。结果 积雪草苷显著抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞活化 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 并提高细胞迁移能力 ( $P < 0.01$ )。GEO 数据库筛选出 542 个差异表达基因, 主要影响 MHC II 类蛋白复合物结合、浓缩染色体、超分子纤维组织等生物功能和吞噬体、细胞黏附分子、哮喘等信号通路。分子对接结果显示, 积雪草苷与吞噬体通路中的磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 3 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3, PIK3C3)、动力蛋白细胞质 2 重链 1 (dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1, DYNC2H1)、微管蛋白 (tubulin, TUB) 结合密切。分子动力学模拟结果显示, 积雪草苷可以促进 PIK3C3 的结构稳定。qRT-PCR 结果显示, 积雪草苷显著下调 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ )。ELISA 结果显示, 积雪草苷显著降低 COMP 和 MBL2 的释放 ( $P < 0.01$ )。结论 积雪草苷可以通过抑制 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的表达, 抑制吞噬体的形成, 进而减少 COMP、MBL2 等促纤维化因子的释放, 降低心肌成纤维细胞活化, 减轻 TGF- $\beta$ 1 诱导的细胞损伤。

**关键词:** 积雪草苷; 心肌成纤维细胞; 转化生长因子- $\beta$ 1; 纤维化; 吞噬体; PIK3C3; DYNC2H1; TUB

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)14-5108-11

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.14.016

## Asiaticoside attenuates transforming growth factor- $\beta$ 1-induced activation of cardiac fibroblasts via modulation of PIK3C3/DYNC2H1/TUB

CAO Ce, YANG Lili, SONG Jianshu, LIU Zixin, LI Lei, FU Jianhua, LIU Jianxun

National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of asiaticoside (ASS) in inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced activation of cardiac fibroblasts. **Methods** A cardiac fibroblasts activation model was established by TGF- $\beta$ 1 induction. After treatment with ASS, CCK-8 method was used to detect the effect of ASS on viability of TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblast. Immunofluorescence was used to detect the effect of ASS on activation of TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblasts. Scratch assay was used to detect the effect of ASS on migration ability of TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblasts. Fibrosis-related transcriptomic data were

收稿日期: 2025-03-28

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (82030124); 国家自然科学基金重点资助项目 (82174015); 中国中医科学院西苑医院能力提升项目 (XYZX0303-03)

作者简介: 曹 策, 博士研究生, 研究方向为心血管药理。Tel: 15556387331 E-mail: caoce1@foxmail.com

\*通信作者: 刘建勋, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理研究。E-mail: liujx0324@sina.com

screened from GEO database, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on differentially expressed genes, molecular docking and molecular dynamics simulation were used to detect the binding ability of ASS to core targets. The effect of ASS on mRNA expressions of core targets was detected by qRT-PCR, and the effect of ASS on levels of cartilage oligomeric protein (COMP) and mannose binding lectin 2 (MBL2) in supernatant of TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblasts was detected by ELISA. **Results** ASS significantly inhibited TGF- $\beta$ 1-induced activation of cardiac fibroblasts ( $P < 0.05, 0.01$ ), and increased cell migration ability ( $P < 0.01$ ). The GEO database identified 542 differentially expressed genes, which mainly affected biological functions such as MHC class II protein complex binding, chromosome condensation and supramolecular fibrous tissue, as well as signaling pathways such as phagosomes, cell adhesion molecules and asthma. The molecular docking results showed that ASS closely bind to phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3 (PIK3C3), dynein cytoplasmic heavy chain 1 (DYNC2H1) and tubulin (TUB) in phagosome pathway. The molecular dynamics simulation results showed that ASS could promote the structural stability of PIK3C3. qRT-PCR results showed that ASS significantly down-regulated the mRNA expressions of *PIK3C3*, *DYNC2H1* and *TUB* ( $P < 0.01$ ). ELISA results showed that ASS significantly reduced the release of COMP and MBL2 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** ASS could inhibit the expressions of PIK3C3, DYNC2H1 and TUB, suppress the formation of phagosomes, reduce the release of pro-fibrotic factors such as COMP and MBL2, decrease myocardial fibroblast activation, and alleviate TGF- $\beta$ 1-induced cell damage.

**Key words:** asiaticoside; cardiac fibroblasts; transforming growth factor- $\beta$ 1; fibrosis; phagosome; PIK3C3; DYNC2H1; TUB

心力衰竭是一种由心脏结构和功能障碍引起的复杂综合征,其特征是间质纤维化、心室重塑和心室顺应性降低<sup>[1]</sup>。成年哺乳动物的心脏再生能力有限,因此,受伤后的修复过程至关重要,涉及炎症细胞浸润、坏死心肌细胞的去除以及毛细血管富集肉芽组织的形成。纤维化瘢痕将取代肉芽组织,以求维持心肌结构和功能的完整性。纤维化被定义为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白在间质中的过度沉积,这是对慢性炎症的基本病理反应。ECM蛋白沉积最初具有保护作用,对伤口愈合和组织再生至关重要<sup>[2]</sup>。然而,在过度 and 持续的组织损伤中,病理性心脏重塑以及随后的ECM沉积会导致器官结构扭曲,并显著影响心脏功能<sup>[3]</sup>。因此如何抑制心力衰竭之后的过度心肌纤维化是治疗的关键环节之一。

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 以全草入药,其性味苦、辛,性寒,具有清热利湿、解毒消肿、退黄通淋、活血止痛的功效,临床上用于湿热黄疸、痈疮肿毒、跌打损伤、咽喉肿痛等。目前研究中,大多将积雪草用于肺纤维化,通过抑制胶原蛋白、成纤维细胞生长因子等的产生降低纤维化<sup>[4]</sup>。此外,积雪草还具有抗炎作用,可以降低白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、前列腺素 E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) 水平和环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 活性<sup>[4-5]</sup>。但积雪草在冠心病

的纤维化中应用较少,有待进一步研究。因此本研究以积雪草的活性成分积雪草苷为研究对象,采用免疫荧光和划痕实验检测心肌成纤维细胞活化和迁移能力,并采用 GEO 数据库获取纤维化转录组数据,通过基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析,筛选出纤维化的关键靶点和通路,通过将积雪草苷与通路靶点进行分子对接确定核心靶点,随后采用 qRT-PCR 和 ELISA 法进行验证,明确积雪草苷抗心肌纤维化的具体作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

大鼠心肌成纤维细胞 (批号 1B0Y3784KT) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

积雪草苷 (批号 110892-202006, 纯度 91.2%) 购自中国食品药品检定研究院;大鼠心肌成纤维细胞完全培养基 (批号 WH01112306SP05)、0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA, 批号 WH1022U121) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司;转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1, 批号 20240223S)、软骨寡聚蛋白 (cartilage oligomeric protein, COMP) ELISA 试剂盒 (批号 20240213) 购自武汉菲恩生物科技有限公司;甘露糖结合凝集素 2 (mannose-binding lectin 2, MBL2) ELISA 试剂盒 (批号 Mar 2024) 购自酶联生物科技有限公司;

CCK-8 试剂盒 (批号 TR689) 购自日本 DOJINDO 公司; 胎牛血清 (批号 10099-141) 购自美国 Invitrogen 公司; 葡萄糖 (批号 G6152-500G) 购自美国 Sigma 公司;  $\alpha$ -SMA 抗体 (批号 6) 购自美国 CST 公司。

### 1.3 仪器

371 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、IEC CL31R 型冷冻高速离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); Bio-Medical 型超低温保存箱 (海尔集团); TH4-200 型倒置显微镜 (日本 Olympus 株式会社); SYNERGY4 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); BSA224S-CW 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); HVE-50 型高压蒸汽消毒器 (日本 HIRAYAMA 公司); BHC-1300IIA/B3 型生物安全柜 (江苏苏净集团); Incucyte® 活细胞成像分析系统 (德国赛多利斯公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞分组、造模与给药

待大鼠心肌成纤维细胞融合度达到 80% 时, 使用 0.25% 胰蛋白酶进行消化与传代, 采用大鼠心肌成纤维细胞完全培养液重悬, 调节细胞数至  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于细胞培养瓶或 96 孔板内。设置对照组、模型组和积雪草苷 (1、5、10  $\mu$ mol/L) 组。给药组在造模的同时给予药物。待培养瓶细胞基本融合时, 弃去旧培养基, PBS 清洗 3 遍, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组加入含 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 的 DMEM 完全培养基, 给药组加入含不同浓度积雪草苷和 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 的 DMEM 完全培养基, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 16 h。

### 2.2 CCK-8 测定细胞活力

取正常生长的心肌成纤维细胞, 以  $4 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 设置对照组、模型组和积雪草苷 (1、5、10、20、40、80、160、320、640  $\mu$ mol/L) 组, 每组 6 个复孔。按“2.1”项下方法处理, 另设置空白孔 (不接种细胞不加药物), 每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L, 将培养板置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 免疫荧光检测 $\alpha$ -SMA 表达

取正常生长的心肌成纤维细胞细胞培养在合适的载玻片或培养皿中, 按“2.1”项下方法进行分组及给药后, 加入多聚甲醛, 室温固定 30 min; 加入 Triton X-100 通透 10 min, PBS 清洗 3 次, 加入

一抗, 4  $^{\circ}$ C 摇床中孵育过夜; PBS 清洗 3 次, 加入二抗, 室温避光孵育 1 h。滴加含 DAPI 染料的封片剂后, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

### 2.4 细胞划痕实验

取正常生长的心肌成纤维细胞细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 Imagelock 板中, 待细胞长满后使用 Incucyte® 活细胞成像分析系统配套的划痕器进行划痕, PBS 清洗 3 次, 按“2.1”项下方法进行分组及给药, 分别于 0、24、48 h 将 Imagelock 板置于 Incucyte® 活细胞成像分析系统中进行图像拍摄, 采用系统自带的 Scratch Wound 进行数据分析, 计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 24/48 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

### 2.5 GEO 数据库获取纤维化数据

从 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 查找并下载转录组数据, 使用 DESeq2 算法进行数据处理。交集靶点导入 STRING 网络平台 (<https://string-db.org/>), 设置物种“homo sapiens”, 置信度 > 0.9, 将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 根据度值筛选核心靶点。

### 2.6 GO 和 KEGG 富集分析

将 PPI 分析得到的靶点导入 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/>) 处理, 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析, 获取生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 及信号通路。

### 2.7 分子对接

选定 KEGG 通路富集分析中最为显著的通路基因与积雪草苷进行分子对接。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载通路蛋白受体文件, 从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载积雪草苷配体文件, 采用 AutoDock 1.5.6 进行分子对接, 使用 PyMOL 将结果进行可视化处理。

### 2.8 分子动力学模拟

使用 AlphaFold3 建模磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 3 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3, PIK3C3) 结构, 采用 GROMACS 进行化合物-靶标复合物的分子动力学模拟 (molecular dynamics simulation, MDs)。蛋白质使用 CHARMM36 力场进行模拟, 并使用 TIP3P 水模型填充水分子, 为了中和系统, 随机向模拟盒中添加氯离子和钠离子。

系统首先使用最陡下降算法进行能量最小化,然后在等温等容(NVT)下进行500 ps平衡,在等温等压状态(NPT)下进行1 000 ps平衡。最后,对复合物进行100 ns的MD。使用GROMACS和VMD进行结构分析和可视化。

### 2.9 qRT-PCR检测PIK3C3、动力蛋白细胞质2重链1(dynein cytoplasmic 2 heavy chain 1, DYNC2H1)和微管蛋白(tubulin, TUB) mRNA表达

按“2.1”项下方法进行分组及给药后,收集细胞,采用Trizol法提取细胞总RNA,按照试剂盒说明书合成cDNA,进行qRT-PCR分析。引物由武汉赛维尔生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
PIK3C3	F: CCTGTAAGAACTCAACTGGCTAA	103
	R: TACATCTCGTGTGAGTCTTTGGGTC	
DYNC2H1	F: CTCAGGCCATGGAGAAGTACAAC	190
	R: CCTGACTTGAAGAGGAGGATTGC	
TUB	F: CGAGCCTCCTTACTTCCCAC	176
	R: CTTTTCCTGCCAAAACCATCAC	
GAPDH	F: AGAAGGTGTTCTCTTGGCG	138
	R: CTTCTGAGGGTTGACGCCATT	

### 2.10 ELISA检测细胞上清液中COMP和MBL2水平

按“2.1”项下方法进行分组及给药后,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书检测COMP和MBL2水平。

### 2.11 统计学分析

用SPSS 26.00软件进行统计分析,用Graphpad Prism 9软件绘图。计量数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用t检验。

## 3 结果

### 3.1 心肌成纤维细胞的鉴定

通过Vimentin对心肌成纤维细胞进行标记(图1),结果显示心肌成纤维细胞阳性率>90%,符合实验要求。

### 3.2 积雪草苷减轻TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞损伤

如图2所示,与对照组比较,模型组细胞活力显著下降( $P < 0.01$ ),提示细胞受损严重;与模型

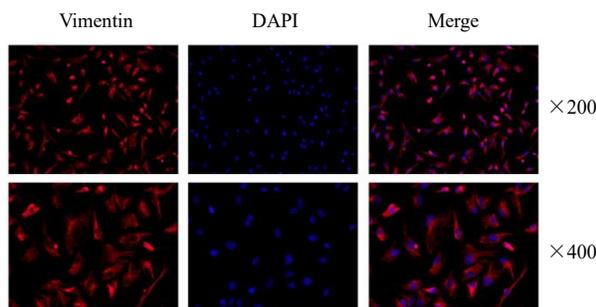
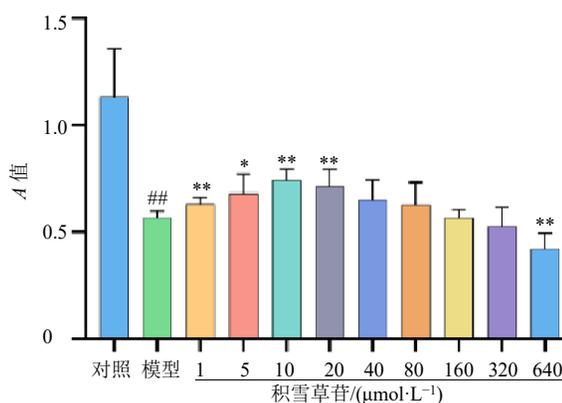


图1 心肌成纤维细胞的鉴定

Fig. 1 Identification of cardiac fibroblasts



与对照组比较: ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。  
## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group.

图2 积雪草苷对TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Effect of asiaticoside on viability of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组比较,1、5、10、20 μmol/L积雪草苷显著提高细胞活力( $P < 0.05, 0.01$ ),且在1~10 μmol/L浓度范围内呈剂量相关性,提示积雪草苷对TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞具有保护作用,选择1、5、10 μmol/L作为低、中、高浓度用于后续实验。

### 3.3 积雪草苷抑制TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞活化

如图3和表2所示,与对照组比较,模型组α-SMA荧光强度显著增加( $P < 0.01$ ),提示TGF-β1显著促进心肌成纤维细胞的活化;与模型组比较,积雪草苷(5、10 μmol/L)组α-SMA荧光强度显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ),提示积雪草苷对TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞活化具有抑制作用。

### 3.4 积雪草苷促进TGF-β1诱导的心肌成纤维细胞迁移

如图4和表3所示,与对照组比较,模型组划痕愈合率显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,积

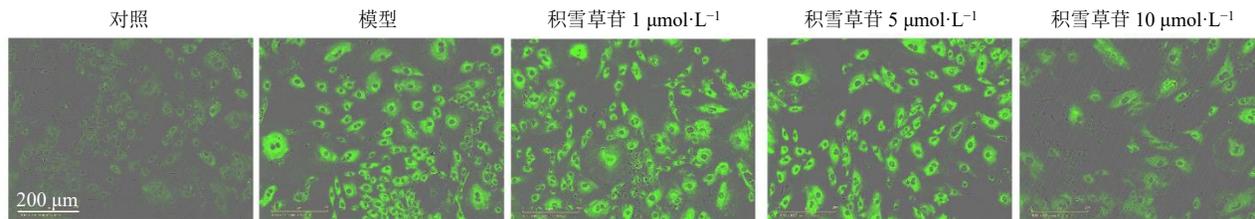


图3 积雪草苷对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化的影响 (×20)

Fig. 3 Effect of asiaticoside on activation of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts (× 20)

表2 积雪草苷对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of asiaticoside on activation of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	荧光强度/AU
对照	—	28.61±0.78
模型	—	85.36±6.23 <sup>##</sup>
积雪草苷	1	78.18±5.51
	5	68.28±4.53*
	10	56.63±3.38**

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同。

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group, same as below tables.

雪草苷 (1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组划痕愈合率显著升高 ( $P < 0.01$ )。

### 3.5 GEO 数据库获取纤维化转录组数据

从 GEO 数据库下载 GSE239653 数据集, 在本数据集的动物实验模型中, 研究方法为雄性 C57BL6 小鼠连续 11 d 注射异丙肾上腺素 (50 mg/kg), 诱导心脏纤维化, 通过 RNA 测序研究基因表达的变化。结果 (图 5) 显示, 相较于假手术组, 模型组有 271 个基因上调, 271 个基因下调。

### 3.6 差异表达基因的 GO 富集分析

GO 富集分析结果 (图 6) 显示, 纤维化过程主

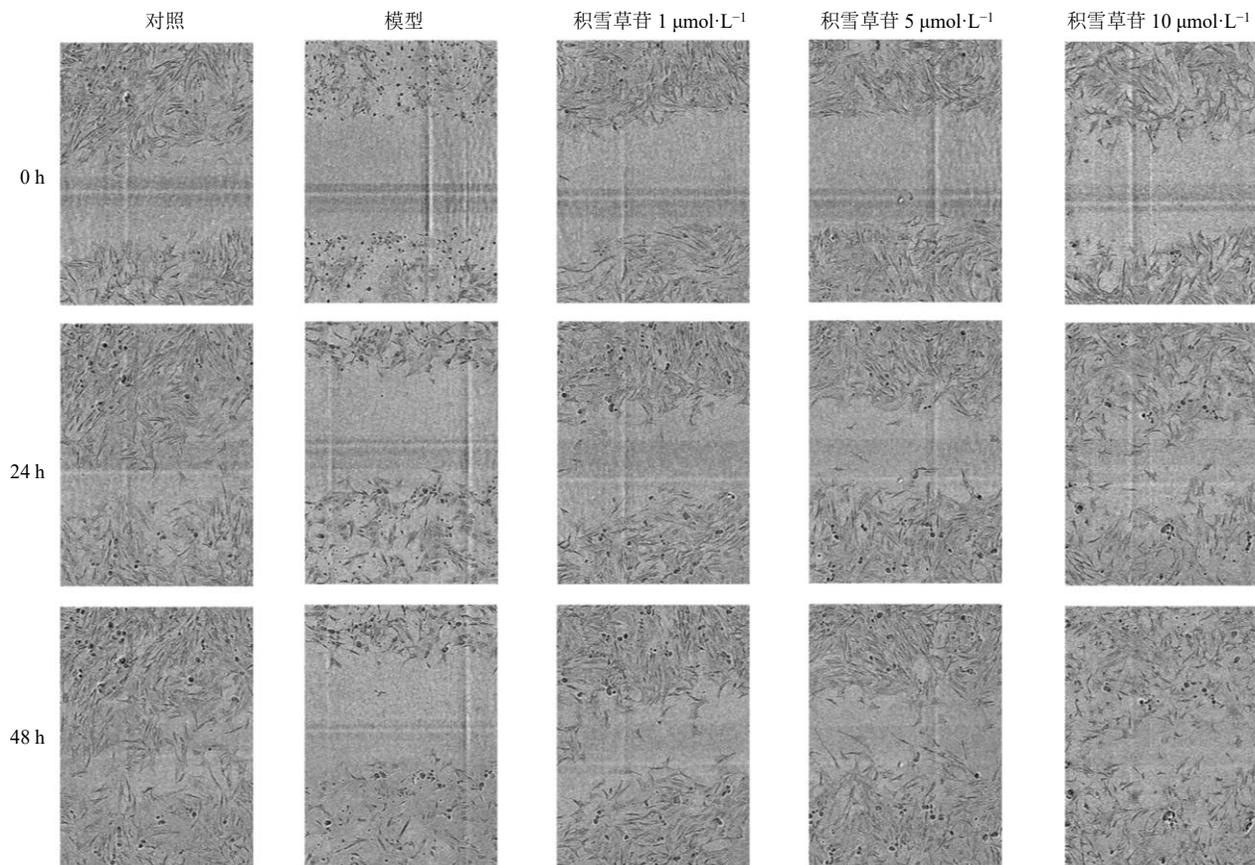


图4 积雪草苷对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞迁移的影响 (×10)

Fig. 4 Effect of asiaticoside on migration of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts (× 10)

表3 积雪草苷对 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

**Table 3 Effect of asiaticoside on migration of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )**

组别	浓度/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	划痕愈合率/%	
		24 h	48 h
对照	—	58.88±4.88	91.50±4.47
模型	—	29.88±3.31 <sup>##</sup>	51.50±4.69 <sup>##</sup>
积雪草苷	1	36.75±3.73 <sup>**</sup>	69.13±6.10 <sup>**</sup>
	5	41.00±8.14 <sup>**</sup>	73.75±6.41 <sup>**</sup>
	10	43.63±6.35 <sup>**</sup>	84.25±5.28 <sup>**</sup>

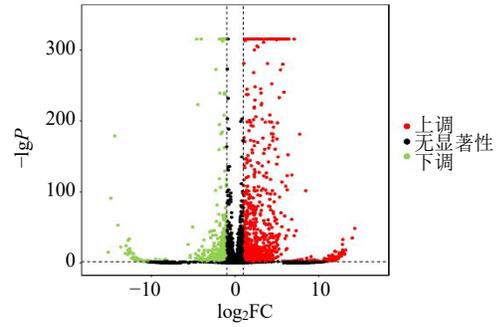


图5 模型组和假手术组差异表达基因的火山图  
Fig. 5 Volcano diagram of differentially expressed genes between model group and sham group

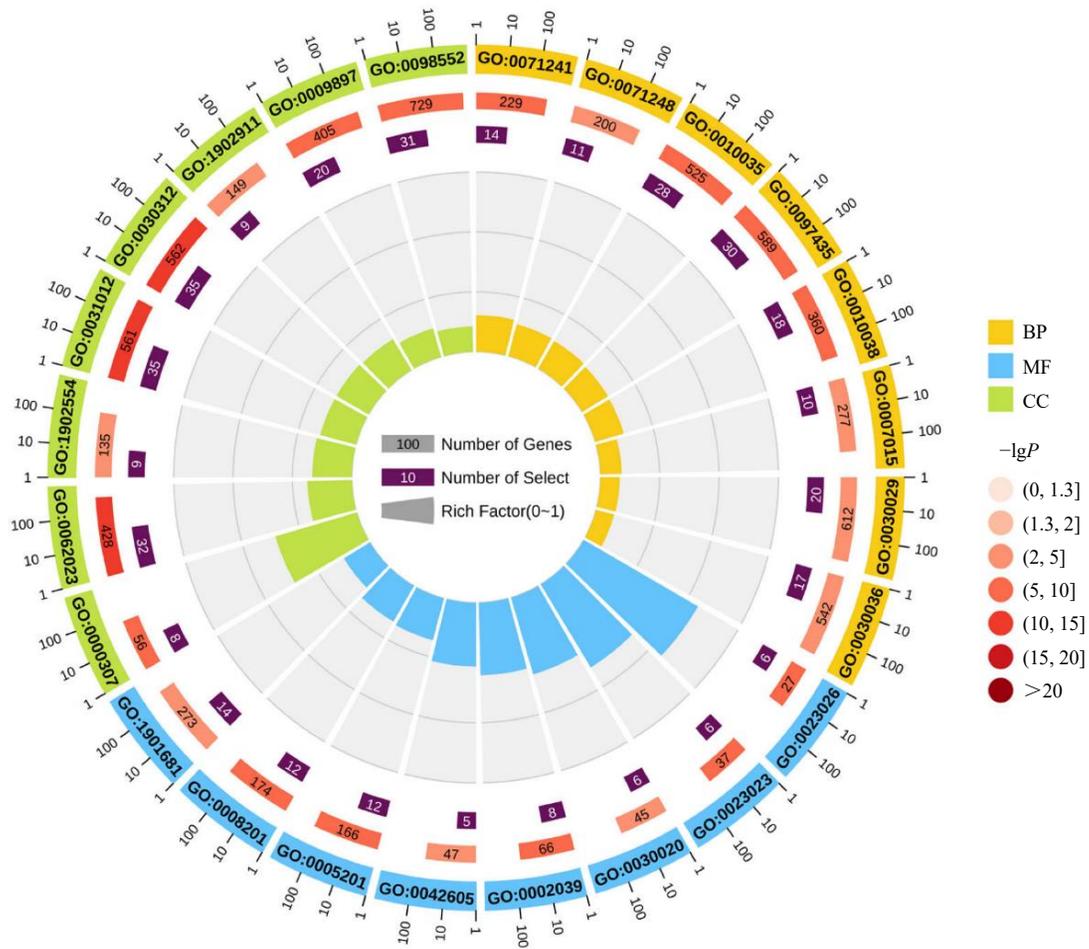


图6 GO 富集分析  
Fig. 6 GO enrichment analysis

要涉及 MHC II类蛋白复合物结合、浓缩染色体、超分子纤维组织等 BP。

### 3.7 差异表达基因的 KEGG 富集分析

将差异基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果见图 7, 共筛选得到 53 条信号通路 (以  $P < 0.01$  且  $FDR < 0.01$  为标准), 主要涉及吞噬体、细胞黏附分

子、哮喘和自身免疫性甲状腺疾病等通路。

### 3.8 积雪草苷与差异表达蛋白结合密切

根据 KEGG 信号通路结果和文献查阅, 选定吞噬体信号通路中的 COMP、人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA) -B、HLA-DMB、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRB5、PIK3C3、TUBA4A、

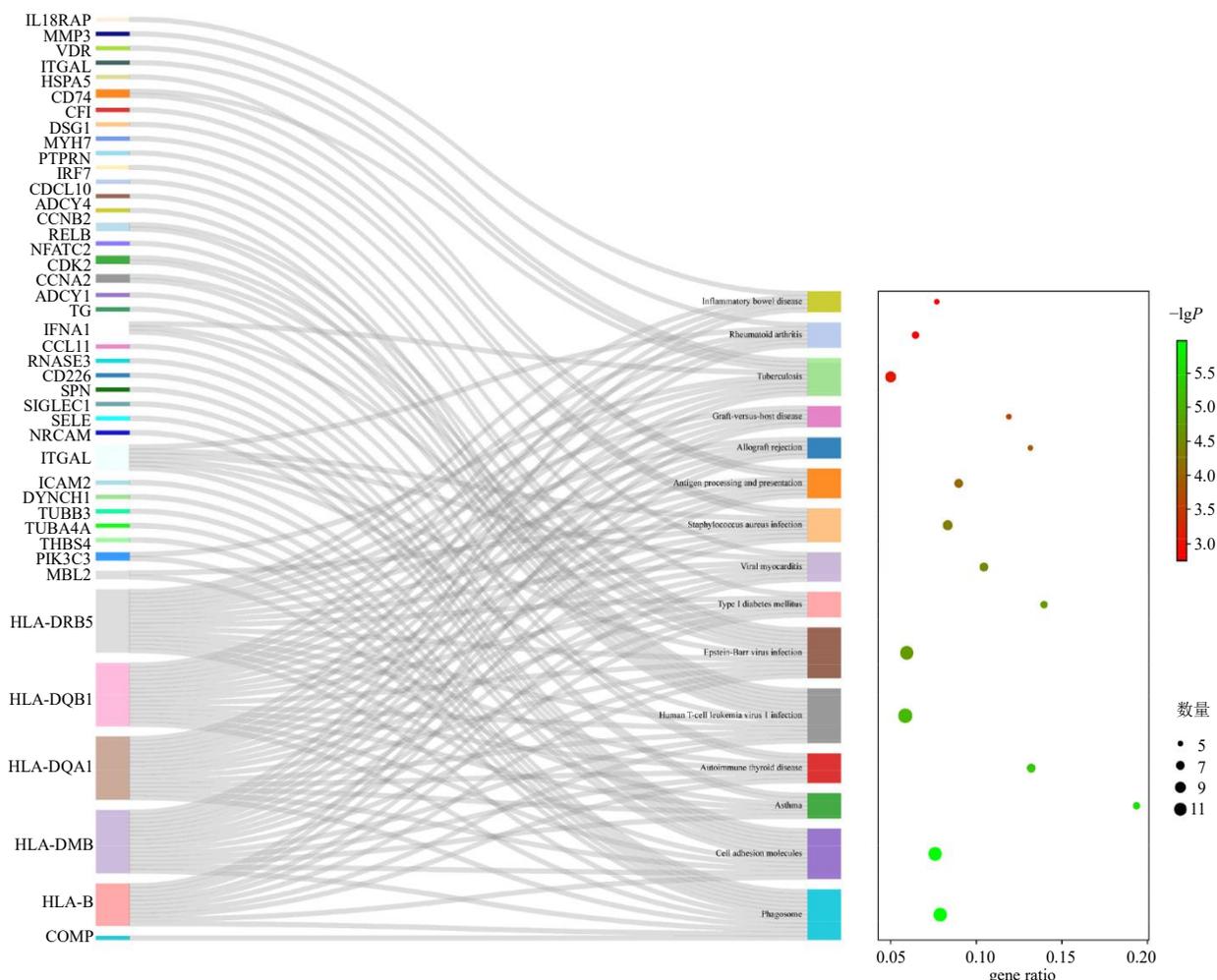


图 7 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis

TUBB3 和 DYNC2H1 共 10 个蛋白与积雪草苷进行分子对接，化合物和蛋白质的对接分数见表 4。图 8 为积雪草苷与 COMP、HLA-B、HLA-DMB、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRB5、PIK3C3、TUBA4A、TUBB3 和 DYNC2H1 共 10 个蛋白对接结果的可视化，结果显示积雪草苷可以与 COMP 在 GLU-49、ASN-79 形成氢键，与 HLA-B 在 LYS-80、GLU-86、ARG-29 形成氢键，与 HLA-DMB 在 LEU-76、LEU-72、ARG-73、ASN-41 形成氢键，与 HLA-DQA1 在 VAL-97 形成氢键，与 HLA-DMB1 在 TRP-178、GLI-179、GLU-181 形成氢键，与 HLA-DRB5 在 THR-93、GLN-156、VAL-97 形成氢键，与 MBL2 在 LYS-132、LEU-178、THR-167、GLU-169 形成氢键，与 PIK3C3 在 TYR-764、HIS-745 形成氢键，与 TUBB3 在 TYR-425、GLU-421 形成氢键，与 DYNC2H1 在 HIS-2595、PRO-2594、LYS-2801 形成氢键。

表 4 积雪草苷和靶点蛋白的对接结合能

Table 4 Docking combining energy fraction between asiaticoside and target protein

活性成分	靶点蛋白	结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )
积雪草苷	COMP	-7.29
	HLA-B	-7.05
	HLA-DMB	-6.69
	HLA-DQA1	-7.52
	HLA-DQB1	-7.56
	HLA-DRB5	-8.54
	MBL2	-8.92
	PIK3C3	-13.63
	TUBA4A	-10.13
	TUBB3	-9.42
	DYNC2H1	-9.81

1 kcal·mol<sup>-1</sup> = 4.182 kJ·mol<sup>-1</sup>.

### 3.9 分子动力学模拟分析积雪草苷对 PIK3C3 结构的影响

如图 9-A 所示，均方根偏差 (root mean square

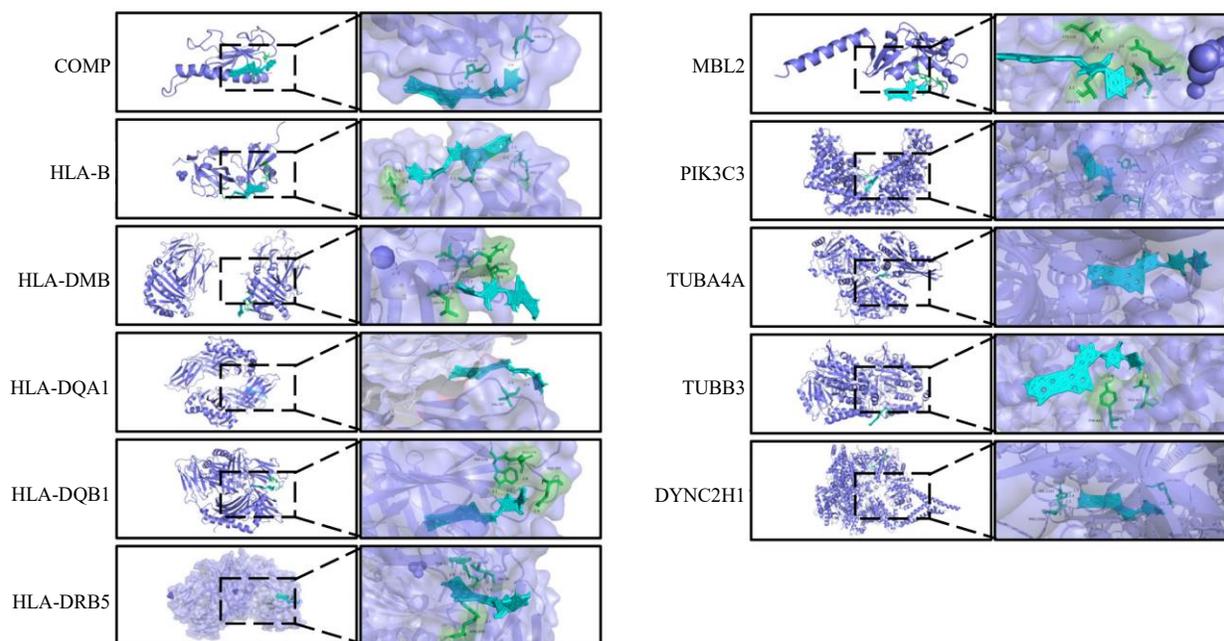
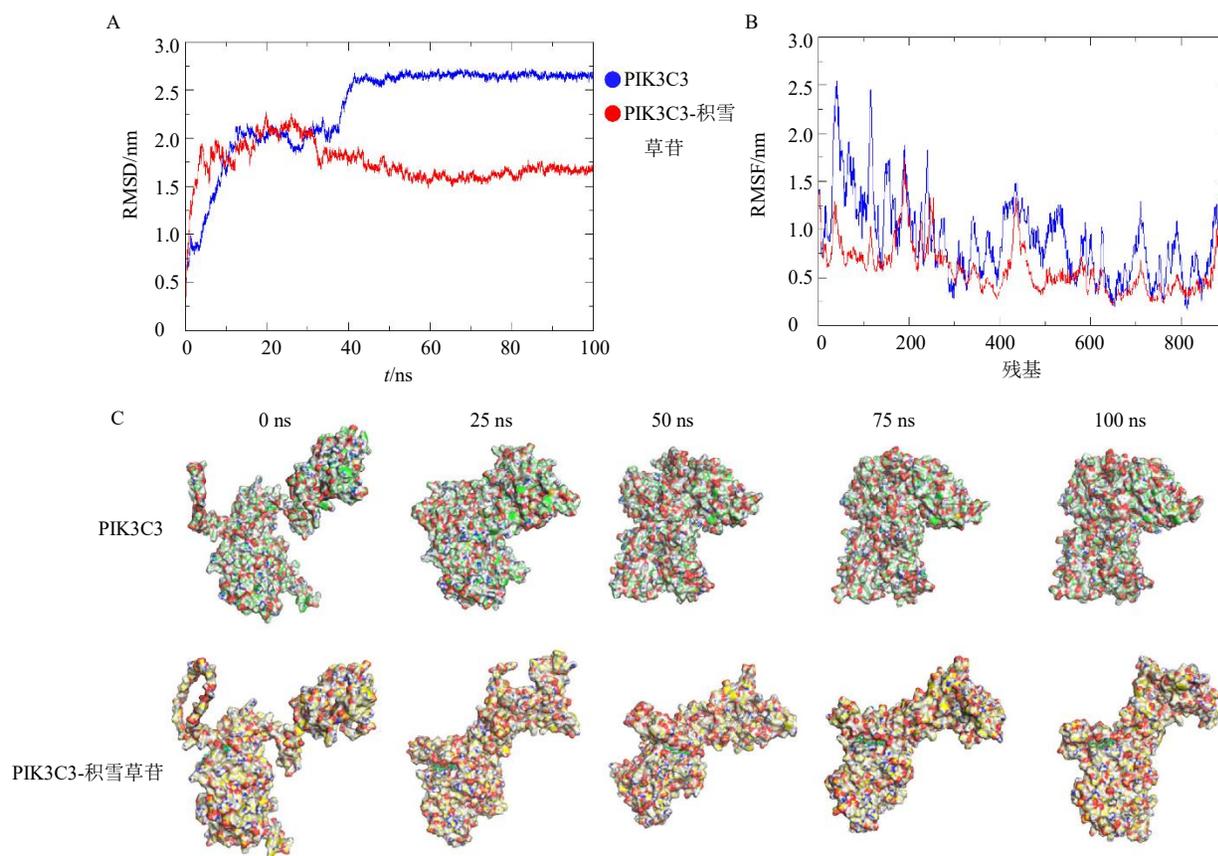


图 8 分子对接结果可视化

Fig. 8 Visualization of molecular docking results



A-RMSD 分析; B-RMSF 分析; C-构象动态演变。

A-RMSD analysis; B-RMSF analysis; C-dynamic evolution of conformation.

图 9 积雪草苷和 PIK3C3 的分子动力学模拟

Fig. 9 Molecular dynamics simulation of asiaticoside and PIK3C3

deviation, RMSD) 分析结果显示, PIK3C3 在 40 ns 后 RMSD 稳定于 2.5 nm 左右, 结构趋于稳定; PIK3C3 结合积雪草苷后整体 RMSD 波动较小, 维持在 1.5~2.0 nm, 反映积雪草苷可以促进 PIK3C3 的结构稳定。均方根波动曲线 (root mean square fluctuation, RMSF) 通过残基均方根波动揭示分子局部稳定性, 结果表明 PIK3C3 与积雪草苷结合后残基动态波动显著降低 (图 9-B)。图 9-C 的构象动态演变呈现 0、25、50、75、100 ns 时 PIK3C3 是否结合积雪草苷的空间构象变化, 进一步直观显示积

雪草苷可以促进 PIK3C3 的结构稳定。

### 3.10 积雪草苷抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞活化关键基因 mRNA 的表达

通过 qRT-PCR 验证积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞中关键基因 mRNA 表达, 如表 5 所示, 与对照组比较, 模型组 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 积雪草苷 (1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 5 积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞 PIK3C3、DYNC2H1、TUB mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of asiaticoside on mRNA expressions of PIK3C3, DYNC2H1 and TUB in TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	mRNA 相对表达量		
		PIK3C3	DYNC2H1	TUB
对照	—	1.04 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.09	1.26 $\pm$ 0.22
模型	—	3.17 $\pm$ 0.49 <sup>##</sup>	3.61 $\pm$ 0.72 <sup>##</sup>	3.98 $\pm$ 0.65 <sup>##</sup>
积雪草苷	1	0.87 $\pm$ 0.09 <sup>**</sup>	1.12 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>	1.03 $\pm$ 0.35 <sup>**</sup>
	5	0.86 $\pm$ 0.17 <sup>**</sup>	0.84 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>	0.92 $\pm$ 0.32 <sup>**</sup>
	10	0.85 $\pm$ 0.23 <sup>**</sup>	0.84 $\pm$ 0.14 <sup>**</sup>	0.80 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>

### 3.11 积雪草苷抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞 COMP 和 MBL2 的释放

如表 6 所示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中 COMP 和 MBL2 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 积雪草苷 (5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞上清液中 COMP 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 积雪草苷 (1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞上清液中 MBL2 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 6 积雪草苷对 TGF- $\beta$ 1 诱导的心肌成纤维细胞 COMP 和 MBL2 释放的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 6 Effect of asiaticoside on release of COMP and MBL2 in TGF- $\beta$ 1-induced cardiac fibroblasts ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	COMP/ $(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	MBL2/ $(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照	—	57.63 $\pm$ 7.91	1 746.88 $\pm$ 400.75
模型	—	82.13 $\pm$ 6.85 <sup>##</sup>	4 754.13 $\pm$ 249.29 <sup>##</sup>
积雪草苷	1	78.25 $\pm$ 5.01	4 022.38 $\pm$ 511.98 <sup>**</sup>
	5	67.88 $\pm$ 7.88 <sup>**</sup>	3 548.88 $\pm$ 831.12 <sup>**</sup>
	10	66.13 $\pm$ 4.88 <sup>**</sup>	3 118.88 $\pm$ 363.34 <sup>**</sup>

## 4 讨论

心力衰竭与严重的组织坏死变化有关, 其中 I 型胶原的过度交联和沉积起着重要作用<sup>[6]</sup>。目前尚无药物能够有效抑制纤维化, 而如何能更好地评估心肌纤维化的生物标志物也是困难重重<sup>[7]</sup>, 因此,

心肌纤维化的关键靶点和药物的寻找和研发迫在眉睫。本研究通过给予 TGF- $\beta$ 1 建立了心肌成纤维细胞纤维化模型, 结果显示积雪草苷可以保护 TGF- $\beta$ 1 导致的心肌成纤维细胞损伤, 并且抑制其活化和伤口愈合。为了明确积雪草苷抑制心肌成纤维细胞活化的具体靶点和通路, 采用 GEO 数据库获取了异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化大鼠的高通量转录组数据。通过对比假手术组和模型组数据, 结果显示, 相较于假手术组, 模型组有 271 个基因上调, 271 个基因下调。将差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 结果显示主要涉及 MHC II 类蛋白复合物结合、浓缩染色体、超分子纤维组织等生物功能和吞噬体、细胞黏附分子、哮喘等信号通路。将积雪草苷与吞噬体信号通路中的 COMP、HLA-B、PIK3C3、TUBA4A 等 10 个蛋白进行分子对接, 结果显示积雪草苷与 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 具有良好的结合作用。从分子动力学模拟结果来看, PIK3C3 在模拟后期 RMSD 趋于稳定, 表明积雪草苷与 PIK3C3 结合后, 通过氢键、疏水作用等维持体系构象稳定; RMSF 分析中, PIK3C3 与 PIK3C3\_积雪草苷残基波动的差异能定位积雪草苷作用位点, 关键残基因结合被限制运动, 提示特异性相互作用; 构象动态演变表明 PIK3C3 特定区域随时间呈现收敛性构象调整, 推测积雪草苷通过诱导契合

模式结合，借助分子间作用力（如氢键、疏水堆积等）稳定蛋白构象，最终调控其功能。

PIK3C3/Vps34 是哺乳动物中的第Ⅲ类磷脂酰肌醇 3-激酶，能够磷酸化磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol, PI）产生磷脂酰肌醇三磷酸（phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P），是细胞吞噬的关键早期参与者<sup>[8]</sup>。溶酶体是细胞吞噬的重要物质，根据完成其生理功能的不同阶段可分为初级溶酶体、次级溶酶体和残体，其中次级溶酶体可以根据消化物质来源于外界或细胞本身而分为异噬溶酶体和自噬溶酶体。溶酶体的形成和延伸与 PIK3C3/Vps34 的关系极为密切<sup>[9-10]</sup>。动力蛋白细胞质分为 2 种，动力蛋白细胞质 1 沿微管移动膜细胞器、动核和病毒。它也是轴突逆向运输的马达，并参与有丝分裂纺锤体的组装和功能<sup>[11]</sup>。第 2 种动力蛋白细胞质 2 负责纤毛内运输的一部分，特别是将蛋白质复合物从纤毛和鞭毛的顶端运输到基部，这种运输发生在轴丝微管和鞭毛膜之间<sup>[12-13]</sup>。DYNC2H1 属于第 2 种细胞质动力蛋白 2，是一种强大的细胞质动力蛋白，该蛋白参与纤毛的逆行运输，并在鞭毛内运输中发挥作用，这是纤毛/鞭毛组装所需的过程。在大多数真核生物中，TUB 基因家

族产生微管蛋白的多种亚型，是细胞骨架的主要成分之一，并且在结构支持、细胞内转运和 DNA 分离等诸多过程中起着不可或缺的作用。HLA 是由 HLA 基因复合体所编码的产物，主要负责抗原的呈递作用<sup>[14-15]</sup>。COMP 为细胞外基质中的非胶原糖蛋白，通过其不同结构域与组织中的多种 ECM、细胞表面黏附分子、生长因子等相互作用，参与了多种疾病的发病过程，在腱和软骨等承重组织的 ECM 中含量丰富<sup>[16-18]</sup>。同时，COMP 也是健康人类皮肤的组成成分，并且在纤维化中被强烈诱导，与胶原蛋白 I 和装饰胶原蛋白 I 原纤维表面的 XII 胶原蛋白直接结合并具有很高的亲和力<sup>[19]</sup>。本研究结果显示，积雪草苷可以降低吞噬体信号通路中 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的 mRNA 表达和细胞上清液中 COMP、MBL2 的含量。表明积雪草苷可以通过调控 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 介导的吞噬体信号通路抑制 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化，减少 COMP、MBL2 的释放，减轻损伤（图 9）。本研究作为机制探索性研究，暂未纳入阳性对照药物以聚焦全新靶点的发现。未来将在药效学评价中引入经典抗纤维化药物（如氯沙坦），对比积雪草苷的作用强度与通路特异性，为临床转化提供更全面的数据支持。

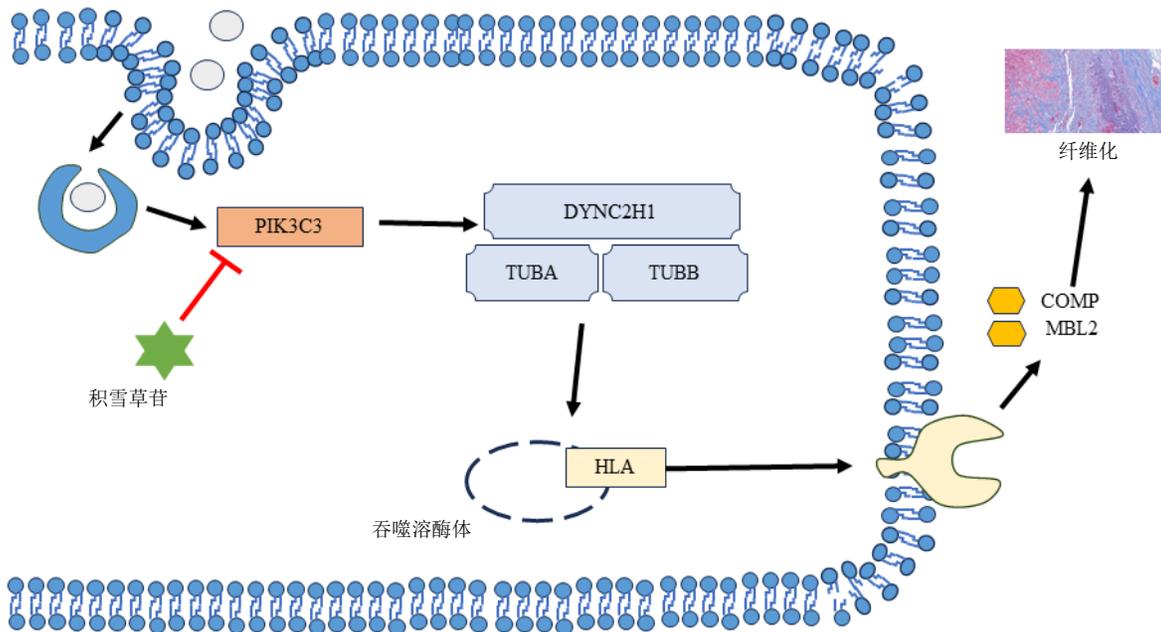


图 9 积雪草苷通过调控 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 抑制 TGF-β1 诱导的心肌成纤维细胞活化

Fig. 9 Asiaticoside inhibits activation of TGF-β1-induced cardiac fibroblasts by regulating PIK3C3, DYNC2H1 and TUB

综上，积雪草苷可以通过抑制 PIK3C3、DYNC2H1、TUB 的表达，抑制吞噬体的形成，进而减少 COMP、MBL2 等促纤维化因子的释放，抑

制心肌成纤维细胞的活化和迁移，减轻 TGF-β1 诱导的细胞损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] McMurray J J, Pfeffer M A. Heart failure [J]. *Lancet*, 2005, 365(9474): 1877-1889.
- [2] Sainio A, Järveläinen H. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109487.
- [3] Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis [J]. *Matrix Biol*, 2018, 68/69: 490-506.
- [4] Sun B J, Wu L L, Wu Y, *et al.* Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 568032.
- [5] Arribas-López E, Zand N, Ojo O, *et al.* A systematic review of the effect of *Centella asiatica* on wound healing [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(6): 3266.
- [6] Pfeffer M A, Claggett B, Assmann S F, *et al.* Regional variation in patients and outcomes in the treatment of preserved cardiac function heart failure with an aldosterone antagonist (TOPCAT) trial [J]. *Circulation*, 2015, 131(1): 34-42.
- [7] Bristow M R, Enciso J S, Gersh B J, *et al.* Detection and management of geographic disparities in the TOPCAT trial: Lessons learned and derivative recommendations [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2016, 1(3): 180-189.
- [8] Yang G, Song W Q, Postoak J L, *et al.* Autophagy-related protein PIK3C3/VPS34 controls T cell metabolism and function [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1193-1204.
- [9] Su H, Liu W. PIK3C3/VPS34 control by acetylation [J]. *Autophagy*, 2018, 14(6): 1086-1087.
- [10] Postoak J L, Song W Q, Wu L, *et al.* PIK3C3/VPS34 helps school T cells in the *Thymus* [J]. *Autophagy*, 2023, 19(6): 1890-1892.
- [11] Canty J T, Tan R, Kusakci E, *et al.* Structure and mechanics of dynein motors [J]. *Annu Rev Biophys*, 2021, 50: 549-574.
- [12] Allan V J. Cytoplasmic dynein [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(5): 1169-1178.
- [13] Vuolo L, Stevenson N L, Mukhopadhyay A G, *et al.* Cytoplasmic dynein-2 at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2020, 133(6): jcs240614.
- [14] Visentin J, Couzi L, Taupin J L. Clinical relevance of donor-specific antibodies directed at HLA-C: A long road to acceptance [J]. *HLA*, 2021, 97(1): 3-14.
- [15] He Y, Li J, Mao W, *et al.* HLA common and well-documented alleles in China [J]. *HLA*, 2018, 92(4): 199-205.
- [16] Cai X B, Li M L, Zhong Y, *et al.* COMP improves ang-II-induced atrial fibrillation via TGF- $\beta$  signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2023, 23(9/10): 305-316.
- [17] Schulz J N, Nüchel J, Niehoff A, *et al.* COMP-assisted collagen secretion: A novel intracellular function required for fibrosis [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(4): 706-716.
- [18] Posey K L, Hayes E, Haynes R, *et al.* Role of TSP-5/COMP in pseudoachondroplasia [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(6): 1005-1012.
- [19] Li C Y, Wang N, Schäffer A A, *et al.* Mutations in COMP cause familial carpal tunnel syndrome [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3642.

[责任编辑 李亚楠]