

基于网络药理学与分子对接技术探讨固脾消积饮对肝癌 HepG2.2.15细胞焦亡的影响

翦慧颖¹, 郜文辉¹, 谭小宁², 柳卓², 张振¹, 李可心¹, 曾普华^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] 目的:以半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)介导的细胞焦亡为基础,采用网络药理学及分子对接技术筛选中药复方固脾消积饮中抗肿瘤的活性成分,通过体外实验探讨该方干预肝癌 HepG2.2.15 细胞焦亡的分子机制。方法:利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选中药复方固脾消积饮的化合物及靶点,并获取对应的基因 Symbol;从 GeneCards 数据库、在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库、PharmGKB 数据库、TTD 数据库搜集 Caspase-1 的靶点,运用 Cytoscape 构建化合物-基因靶点调控网络;采用 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析,采用基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析预测该方有效成分对 Caspase-1 的作用机制,应用 AutoDock Vina 进行分子对接验证。制备固脾消积饮含药血浆,体外培养肝癌 HepG2.2.15 细胞;将 HepG2.2.15 细胞分为空白血浆组、VX-765 组、VX-765+含药血浆组、含药血浆组,使用 15% 含药血浆干预 48 h 后,免疫荧光染色法检测细胞膜表面 GSDMD-N 的表达及分布情况,检测 HepG2.2.15 细胞上清乳酸脱氢酶(LDH)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)的释放情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中特征蛋白 Caspase-1、消皮素 D-N 端(GSDMD-N)的表达水平。结果:网络药理学筛选得到丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)、蛋白激酶 B1(Akt1)、丝裂原活化蛋白激酶 8(MAPK8)、V-Jun 肉瘤病毒癌基因同源物(JUN)、TP53 为主要作用靶点,化合物 7-hydroxy-5,8-dimethoxy-2-phenyl-chromone、黄芩素、鼠李素、芥苳黄酮、异鼠李黄素、7-O-methylisomucronulatol、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、木犀草素、槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、黄芩苷为主要活性成分,GO 富集分析涉及氧化应激反应、对金属离子的反应、与泛素-类蛋白连接酶结合、磷酸酶结合等多个生物过程,KEGG 通路富集分析涉及 MAPK、核转录因子(NF)- κ B、p53、低氧诱导因子-1(HIF-1)等信号通路,分子对接表明靶点与成分具有较好结合性。体外实验表明,与空白血浆组相比,VX-765 组的 GSDMD-N 荧光信号减少减弱,LDH、IL-1 β 、IL-18 的释放量均减少,Caspase-1、GSDMD-N 的表达显著下调($P < 0.01$);固脾消积饮含药血浆组的 GSDMD-N 荧光信号增加增强,LDH、IL-1 β 、IL-18 的释放量显著增加,Caspase-1、GSDMD-N 的表达显著增高($P < 0.01$)。结论:固脾消积饮通过多靶点多通路调控 Caspase-1 以诱导肝癌 HepG2.2.15 细胞发生焦亡。

[关键词] 固脾消积饮; HepG2.2.15; 细胞焦亡; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0159-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220318

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220114.1047.002.html>

[网络出版日期] 2022-01-14 17:14

Effect of Gupi Xiaoji Decoction on Pyroptosis of HepG2.2.15 Cells Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

JIAN Hui-ying¹, GAO Wen-hui¹, TAN Xiao-ning², LIU Zhuo², ZHANG Zhen¹, LI Ke-xin¹, ZENG Pu-hua^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

[收稿日期] 2021-10-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074425);全国青年岐黄学者人才项目;湖南省重点研发项目(2021SK2006);湖南省自然科学基金项目(2021JJ30417);抗肿瘤中药创制技术湖南省工程研究中心项目

[第一作者] 翦慧颖,在读博士,从事原发性肝癌细胞焦亡的相关机制研究,E-mail:853776395@qq.com

[通信作者] *曾普华,博士,主任医师,博士生导师,从事原发性肝癌的中医药防治研究,E-mail:zph120@126.com

[Abstract] Objective: To screen the active antitumor components of Gupi Xiaoji decoction by network pharmacology and molecular docking based on the pyroptosis mediated by cysteinyl aspartate-specific protease 1 (Caspase-1) and explore its molecular mechanism in intervening in the pyroptosis of HepG2.2.15 cells through *in vitro* experiments. **Method:** The compounds and targets of Gupi Xiaoji decoction were screened out by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) to obtain the corresponding gene symbols. The targets of Caspase-1 were collected from GeneCards, online mendelian inheritance in man (OMIM), PharmGKB, and TTD, and the compound-gene target regulatory network was constructed by Cytoscape. The protein-protein interaction (PPI) network was established and analyzed by STRING. The mechanism of the effective components of Gupi Xiaoji decoction on Caspase-1 was predicted by gene ontology (GO) functional enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. The molecular docking was verified with AutoDock Vina. The plasma medicated with Gupi Xiaoji Decoction was prepared and HepG2.2.15 cells were cultured *in vitro*. HepG2.2.15 cells were divided into a blank plasma group, a VX-765 group, a VX-765+medicated plasma group, and a medicated plasma group. After 48 hours of intervention with 15% medicated plasma, the expression and distribution of gasdermin D-N (GSDMD-N) on the surface of the cell membrane were detected by immunofluorescence staining. The release of lactic dehydrogenase (LDH), interleukin (IL)-1 β , and IL-18 in the cell supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The expression of Caspase-1 and GSDMD-N was measured by Western blot. **Result:** The mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), MAPK1, protein kinase B1 (Akt1), MAPK8, V-Jun sarcoma virus oncogene homolog (JUN), and TP53 screened by network pharmacology were the main targets. The compounds 7-hydroxy-5, 8-dimethoxy-2-phenyl-chromone, wogonin, rhamnazin, moslosooflavone, isorhamnetin, 7-O-methylisomucronulatol, formononetin, calycosin, luteolin, quercetin, kaempferol, β -sitosterol, and baicalein screened by network pharmacology were the main active components of Gupi Xiaoji decoction. Go enrichment analysis showed that multiple biological processes were involved, including responses to oxidative stress and metal ions, ubiquitin-like protein ligase binding, and phosphatase binding. KEGG pathway enrichment analysis showed MAPK pathway, nuclear factor (NF)- κ B pathway, p53 pathway, and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) pathway were involved. Molecular docking showed that the targets had good binding with the components. *In vitro* experiments displayed that compared with the blank plasma group, the VX-765 group showed weakened GSDMD-N fluorescence signal, reduced release of LDH, IL-1 β , and IL-18, and declining expression of Caspase-1 and GSDMD-N ($P < 0.01$), and the medicated plasma group showed increased GSDMD-N fluorescence signal, increased release of LDH, IL-1 β , and IL-18, and up-regulated expression of Caspase-1 and GSDMD-N ($P < 0.01$). **Conclusion:** Gupi Xiaoji Decoction can induce the pyroptosis of HepG2.2.15 cells by regulating Caspase-1 through multiple targets and multiple pathways.

[Keywords] Gupi Xiaoji decoction; HepG2.2.15; pyroptosis; network pharmacology; molecular docking

原发性肝癌(以下简称“肝癌”)是世界范围内最常见并且恶性程度最高的肿瘤之一。在我国,男性肝癌的标化发病率高于全球平均水平,且全球近半数的肝癌新发病例都在中国^[1]。肝癌发病与多种因素有关,如肝炎病毒感染、酗酒、吸烟、环境污染、黄曲霉毒素等。其中乙型肝炎病毒(HBV)感染是肝癌的重要诱因,中国有半数以上的肝癌患者合并有乙型肝炎病毒(HBV)相关性肝炎病史^[2]。肝癌起

病隐匿、恶性程度高、进展快,往往发现时已达中晚期。目前临床肝癌诊疗中主要存在早期诊断难、侵袭转移率高、治疗缺乏针对性、源头创新药物少等问题,因此,寻找新的治疗方向势在必行。

细胞焦亡是一种由炎性小体引发的细胞程序性死亡,不同于凋亡与自噬,细胞焦亡发生时伴随炎症因子的释放。细胞焦亡已被证实与肝癌等多种肿瘤疾病相关^[3-5],细胞焦亡在肿瘤组织中处于

被抑制状态^[6],该现象阻止了癌细胞的死亡,加速了肿瘤向恶性程度进展^[7],被抑制的细胞焦亡可能是肝癌进展的原因之一。另外也有新的研究发现,肿瘤细胞发生焦亡时伴随的炎症反应可以引发强大的抗肿瘤免疫力,与免疫检查点抑制剂协同发挥抗肿瘤作用^[8]。

固脾消积饮系全国名中医潘敏求教授团队治疗原发性肝癌肝郁脾虚、瘀毒内结证的临床效验方,以四君子汤为基础方加减,方中以人参、黄芪、白术益气健脾,莪术化瘀散结,半枝莲清热解毒。课题组既往临床研究表明其具有调节免疫、稳定瘤体、抗复发和转移等作用^[9-11],实验研究提示该方能抑制人肝癌 HepG2 细胞和裸鼠移植瘤的生长,诱导肝癌细胞自噬和凋亡^[12-14],但其对肝癌细胞焦亡的影响作用尚不明确。结合我国肝癌患者多合并有 HBV 感染的流行病学背景,本研究整合了 HBV 全基因的人肝癌 HepG2.2.15 细胞株,结合网络药理学和分子对接技术,基于半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)介导的细胞焦亡探讨固脾消积饮对肝癌细胞焦亡的影响,以期为肝癌的治疗提供新的研究方向和思路。

1 材料

1.1 细胞及动物 HepG2.2.15 细胞(广州吉妮欧生物科技有限公司)。SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄各半,体质量 220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(湘)2019-0004。本动物实验经湖南省中医药研究院动物伦理委员会批准,批准号 2019-0071。所有实验动物的处理均遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物质量管理办法》实施。

1.2 药物及试剂 DMEM 培养基、青霉素/链霉素(双抗)溶液(普诺赛,批号分别为 PM15210、PB180120),胎牛血清(Gibco 公司,批号 A316081),VX-765(MedChemExpress 公司,批号 HY-13205),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A020-2-2),Human 白细胞介素(IL)-1 β 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(伊莱瑞特,批号 E-EL-H0149c),免疫荧光试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 SA00003-2);Caspase-1、IL-18、白细胞介素(IL)-1 β 、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(Abbkine 公司,批号分别为 ABP56678、ABP58918、ABP51611、A01021);消皮素 D-N 端(GSDMD-N)一抗(Abcam 公司,批号 ab-215203)。

1.3 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰公

司);TG16-WS 型高速离心机(湖南赛特湘仪公司);XDS-600C 型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);EIX808U 型酶标仪(美国 BioTek 公司);PS300B 型电泳仪,TE22 型转膜仪(美国 Hoefer 公司);pro 30 型脱色摇床(英国 Labnet 公司);GBox XRQ 型凝胶成像仪(中国 GeneCompany 公司)。

2 方法

2.1 固脾消积饮活性成分与靶点获取 运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)分别查找黄芪、人参、茯苓、白术、半枝莲、莪术,获取相应化合物。以生物利用度(OB) $\geq 30\%$,类药性(DL) ≥ 0.18 为条件进行化合物筛选。将 TCMSP 查找所得化合物对应的靶点信息输入 UniProt(<http://www.uniprot.org/>)获取靶点对应的基因 Symbol。

2.2 Caspase-1 基因获取 以“Caspase-1”为关键词,从基因数据库 GeneCards,在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM),PharmGKB,TTD 获得 Caspase-1 基因。与固脾消积饮靶点基因对比后筛选出二者的交集基因。

2.3 活性成分-靶点网络构建 获取交集基因后,采用 Cytoscape 3.8.0 软件对固脾消积饮方中具有靶点的化合物及其对应靶点构建可视化网络。

2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将固脾消积饮调控 Caspase-1 的靶点基因导入 STRING 11.0 数据库进行分析,分析模式设定为“Multiple proteins”物种限定为“Homo sapiens”。对数据进行预读后,设置置信度 ≥ 0.9 ,并隐藏孤立蛋白。并利用插件 CytoNCA 评估交叉点,以“中间中心度(BC),接近度中心度(CC),度中心度(DC)大于或等于中位数”为筛选条件获得核心基因。

2.5 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将固脾消积饮调控 Caspase-1 的 54 个靶点采用 R 语言中的“colorspace”“stringi”“ggplot2”包进行 GO 功能富集分析,设定阈值 $P < 0.05$;再用 R 语言中的“clusterProfiler”“org. Hs. eg. db”“enrichplot”“ggplot2”包进行 KEGG 通路富集分析。

2.6 分子对接 根据 2.4 项下筛选所得核心蛋白,筛选出对应最多的活性成分,通过 PubChem 下载其 2D 结构,导入 ChemBio3D 软件进行优化修饰;通过 PDB 网页(<http://www.rcsb.org/>)下载核心蛋白的受体文件,导入 PyMOL 软件去除小分子配体及水分子;将活性成分的小分子配体文件及蛋白的受体文

件导入 AutoDockTools 软件进行加氢,输出为 PDBQT 文件,导入 Auto Vina 软件进行分子对接,并获得靶蛋白与配体的最小结合自由能。

2.7 细胞培养 HepG2.2.15 细胞用含 10% 灭活胎牛血清,1% 双抗溶液(含 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)的完全培养基培养,置于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱内培养 1~2 d,当细胞在瓶底壁生长汇合面积达到 90%~95% 时进行传代。取对数生长期细胞进行实验。

2.8 固脾消积饮药物血浆制备 固脾消积饮(黄芪 30 g,白参 10 g,白术 15 g,茯苓 30 g,莪术 15 g,半枝莲 30 g),饮片购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,由湖南省中医药研究院附属医院中药师马荣丽鉴定均为正品。按比例配置好药材,适量冷水浸泡 30 min,大火煮沸后,转小火煎 30 min,趁热过滤,药渣再煎煮 1 次,两煎药液混合后过滤、去渣,再将药液浓缩至含生药 $1.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,滤纸粗滤, 4°C 保存。30 只 SD 大鼠,随机分为 2 组,药物组 20 只,空白组 10 只。药物组按相当于 70 kg 成人 $120 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 等效量换算^[15],即 $11.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,空白组用等体积生理盐水灌胃,在灌胃前 12 h 禁食不禁水,灌胃 2 次/d,连续 6 d 后于第 7 天第 1 次灌胃 1 h 后腹主动脉采血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 6 cm),收集含药血浆,合并同组动物血浆,置于 56°C 恒温水浴锅中水浴 30 min 灭活补体,灭活后用微孔滤膜过滤除菌,近期使用部分于 4°C 冰箱保存,其余于 -80°C 冰箱冻存。

2.9 分组 本实验共设 4 组,①空白血浆组(空白血浆由 DMEM 稀释使其体积比为 20%),②VX-765 组(浓度为 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Caspase-1 抑制剂 VX-765^[16-17]),③VX-765+固脾消积饮含药血浆组(联合组,含药血浆由 DMEM 稀释使其体积比为 20%),④固脾消积饮含药血浆组(中药组)。每组设置 3~10 个复孔,均置于 $5\% \text{CO}_2$, 37°C 细胞培养箱中培养。

2.10 免疫荧光染色法检测 GSDMD-N 的表达及分布 取对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/孔的浓度接种至 6 孔板,共 4 孔,待细胞贴壁后根据实验分组进行不同处理;药物干预 24 h 后,加入 5% 牛血清白蛋白(BSA)液室温下封闭 1 h;封闭结束后加 GSDMD-N 一抗(1:1 000)于摇床上 4°C 环境下孵育过夜;PBS 清洗 3 次后加荧光二抗,放入暗盒于摇床上孵育 1 h;荧光二抗孵育结束后加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)稀释液进行核复染,放入暗盒于摇床上孵育 15 min;核复染结束后甘油封片,置于倒置荧光显微镜下观察 GSDMD-N 的

分布情况。

2.11 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞裂解情况 取对数生长期的 HepG2.2.15 细胞以 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/孔的浓度接种至 12 孔板,每组设置 3 个复孔,待细胞贴壁后,根据实验分组进行不同处理,药物干预 24 h 后,吸取细胞上清液,根据 LDH 试剂盒说明书进行样品测定,使用酶标仪测定波长 450 nm 处吸光度 A 。

2.12 ELISA 检测细胞上清中 IL-18, IL-1 β 的释放情况 取对数生长期的 HepG2.2.15 细胞,常规消化重悬后铺板,96 孔板每孔接种细胞 $5 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ 个,根据实验分组,每组设定 6 个复孔,细胞贴壁后,根据实验分组进行不同处理;药物干预 24 h 后收集每组细胞上清液,离心,使用 ELISA 试剂盒进行样品测定,计算 IL-1 β 、IL-18 的含量。

2.13 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白的表达水平 取对数生长期的 HepG2.2.15 细胞,接种于 60 mm 培养皿中,细胞生长贴壁后,根据实验分组进行不同处理;药物干预 48 h 后,消化收取细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度;取 $40 \mu\text{g}$ /孔蛋白进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电泳后用湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭室温封闭 2 h,加入稀释一抗(1:500)于摇床上 4°C 环境孵育过夜;TBST 洗 3 次,加入稀释二抗,室温下孵育 1 h;TBST 洗 3 次,加入 ECL 发光液,暗室内曝光显影,图像分析。

2.14 统计学处理 实验数据采用 SPSS 21.0 统计分析软件处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用多样本均数比较、单因素方差分析。检验水平采用 $\alpha=0.05$ 。绘图与数据分析使用软件 GraphPad Prism 7.0 进行。

3 结果

3.1 固脾消积饮活性成分及靶点 以 $\text{OB} \geq 30\%$, $\text{DL} \geq 0.18$ 为筛选条件,共获得固脾消积饮活性成分 98 种。转换后得到靶点基因 1 580 个,去除重复后得到靶点基因 225 个。

3.2 可视化网络构建 将固脾消积饮的靶点基因与 Caspase-1 的靶点基因对比后筛选出二者的 54 个交集基因,采用 Cytoscape 3.8.0 软件对固脾消积饮方中活性成分及其对应靶点构建可视化网络,见增强出版附加材料。

3.3 PPI 网络 将固脾消积饮调控 Caspase-1 的靶点基因导入 STRING 11.0 数据库进行分析,分析模

式设定为“Multiple proteins”物种限定为为“Homo sapiens”。对数据进行预读后,设置置信度 ≥ 0.9 ,并隐藏孤立蛋白,最后输出PPI网络,通过插件CytoNCA最终筛选出6个核心靶基因,丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14),丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1),蛋白激酶B1(Akt1),丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8),V-Jun肉瘤病毒癌基因同源物(JUN),TP53。见增强出版附加材料。

3.4 GO功能富集分析 设定阈值 $P < 0.05$,进行生物学功能富集,确定GO富集总数为2120条,其中生物学过程(BP)2000条,主要涉及氧化应激反应、对金属离子的反应、对活性氧的反应等;细胞成分(CC)29条,涉及膜筏、膜微结构域、线粒体外膜等;分子功能(MF)91条,与泛素-类蛋白连接酶结合、泛素蛋白连接酶的结合、磷酸酶结合、细胞因子受体结合等有关。均取排名靠前的10个条目作图。见增强出版附加材料。

表1 固脾消积饮中13个化合物与核心靶点的结合能值

Table1 Binding energy value of 13 compounds in Gupi Xiaoji decoction with core targets

kcal·mol⁻¹

编号	名称	靶点					
		MAPK1	MAPK8	MAPK14	JUN	Akt1	TP53
MOL012250	7-hydroxy-5,8-dimethoxy-2-phenyl-chromone	-8.2	-9.0	-7.9	-5.7	-6.2	-6.4
MOL000173	黄芩素(wogonin)	-8.2	-9.4	-8.0	-5.4	-6.1	-6.5
MOL000351	鼠李素(rhamnazin)	-8.3	-9.4	-7.7	-5.3	-6.4	-7.3
MOL008206	芥苳黄酮(moslosooflavone)	-8.1	-9.6	-8.0	-5.7	-5.9	-6.6
MOL000354	异鼠李黄素(isorhamnetin)	-8.2	-9.1	-7.9	-5.4	-6.1	-7.1
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	-6.9	-7.8	-7.8	-5.1	-5.9	-6.1
MOL000392	芒柄花黄素(formononetin)	-8.1	-9.7	-7.6	-5.7	-6.9	-6.6
MOL000417	毛蕊异黄酮(calycosin)	-8.3	-9.7	-7.5	-5.5	-6.7	-6.6
MOL000006	木犀草素(luteolin)	-8.6	-9.9	-8.4	-5.6	-6.4	-7.0
MOL000098	槲皮素(querctin)	-8.4	-9.7	-8.1	-5.5	-6.2	-7.1
MOL000422	山柰酚(kaempferol)	-8.1	-9.3	-8.0	-5.5	-6.1	-6.7
MOL000358	β -谷甾醇(β -sitosterol)	-8.2	-10.4	-8.4	-5.3	-6.3	-6.0
MOL002714	黄芩苷(baicalein)	-8.3	-9.2	-9.1	-5.6	-6.8	-6.7

3.7 固脾消积饮含药血浆对GSDMD-N的表达及分布的影响 从4个组别的染色结果可以看出,底物蛋白GSDMD-N(绿色荧光)主要表达分布在细胞膜上,VX-765组荧光表达明显减弱减少,中药组显著增强增多,联合组GSDMD-N表达较VX-765组增加。见图1。

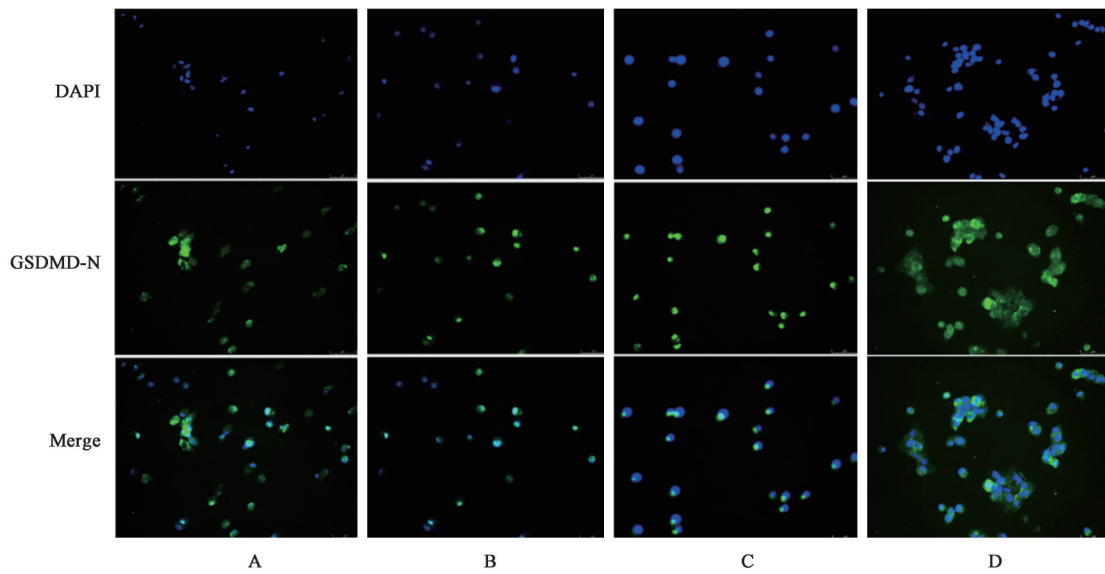
3.8 固脾消积饮含药血浆对细胞质中LDH释放的影响 经过不同处理后,HepG2.2.15细胞释放LDH的检测结果见表2。由结果可知,VX-765组LDH

3.5 KEGG通路富集分析 将固脾消积饮调控Caspase-1的核心靶点获得KEGG通路富集分析,得到21条通路($P < 0.05$),见增强出版附加材料。固脾消积饮调控Caspase-1的核心靶点主要涉及MAPK信号通路、核转录因子(NF)- κ B信号通路,p53信号通路,低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等。

3.6 分子对接 筛选得到固脾消积饮中13个活性与PPI网络中的核心靶基因具有对应关系,分别是8-dimethoxy-2-phenyl-chromone、黄芩素、鼠李素、芥苳黄酮、异鼠李黄素、7-O-methylisomucronulatol、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、木犀草素、槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、黄芩苷。将以上13个化合物与核心靶点蛋白进行分子对接,以结合能判断其亲和力,结合能负值说明受体与配体具有亲和力,结合能小于-5.0 kcal·mol⁻¹(1 kcal \approx 4.186 kJ)说明亲和力较好。分子对接结果表明核心靶基因与固脾消积饮活性成分具有较好的亲和力。见表1。

释放量明显减少,含药血浆组LDH释放量显著升高。固脾消积饮可以通过诱导细胞发生焦亡而引起细胞膜破裂,释放LDH。

3.9 固脾消积饮含药血浆对使胞质中IL-18、IL-1 β 释放的影响 与空白血浆组比较,VX-765组的IL-18、IL-1 β 的释放量均降低为最低值($P < 0.01$),联合组及中药组释放量均升高($P < 0.01$)。说明VX-765通过下调焦亡相关分子Caspase-1的表达抑制了HepG2.2.15细胞焦亡的发生,引起细胞IL-18、



注:A. 空白血浆组;B. VX-765组;C. 联合组;D. 中药组(图2同)

图1 各固脾消积饮含药血浆对GSDMD-N的荧光染色(免疫荧光,×200)

Fig. 1 Immunofluorescence staining of GSDMD-N in each group (IF, ×200)

表2 固脾消积饮含药血浆对各组细胞LDH的释放量($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Release amount of LDH in Gupi Xiaoji decoction plasma ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	LDH U·L ⁻¹
空白血浆组		82.67±2.52
VX-765组	30 μmmol·L ⁻¹	74.33±4.04 ¹⁾
联合组	30 μmmol·L ⁻¹ +20%	88.33±3.21 ¹⁾
中药组	20%	103.00±3.61 ¹⁾

注:与空白血浆组比较¹⁾P<0.01(表3和表4同)

IL-1β的释放量减少,而固脾消积饮含药血浆可以诱导HepG2.2.15细胞发生焦亡,从而使HepG2.2.15细胞释放IL-18、IL-1β。见表3。

表3 固脾消积饮含药血浆IL-18、IL-1β的释放($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 release of IL-18 and IL-1β in Gupi Xiaoji decoction ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量	IL-18 ng·L ⁻¹	IL-1β ng·L ⁻¹
空白血浆组		29.86±1.73	4.96±0.46
VX-765组	30 μmmol·L ⁻¹	16.72±3.56 ¹⁾	2.35±0.20 ¹⁾
联合组	30 μmmol·L ⁻¹ +20%	34.08±4.52 ¹⁾	7.05±0.36 ¹⁾
中药组	20%	47.31±1.41 ¹⁾	9.82±0.40 ¹⁾

3.10 固脾消积饮含药血浆对细胞质中特征蛋白表达水平的影响 由结果可知,经抑制剂VX-765处理后,HepG2.2.15细胞中Caspase-1、GSDMD-N蛋白表达量都显著降低(P<0.01),经固脾消积饮含药血浆处理后,HepG2.2.15细胞中Caspase-1、GSDMD-N蛋白表达量都显著升高(P<0.01),说明

固脾消积饮含药血浆可以上调Caspase-1的蛋白表达,并诱导HepG2.2.15细胞发生焦亡。见表4,图2。

表4 固脾消积饮含药血浆细胞中Caspase-1、GSDMD-N蛋白的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Expression levels of Caspase-1, GSDMD-N proteins in Gupi Xiaoji decoction ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量	Caspase-1 /β-actin	GSDMD-N /β-actin
空白血浆组		0.37±0.06	0.24±0.01
VX-765组	30 μmmol·L ⁻¹	0.04±0.01 ¹⁾	0.02±0.01 ¹⁾
联合组	30 μmmol·L ⁻¹ +20%	0.48±0.05 ¹⁾	0.34±0.02 ¹⁾
中药组	20%	0.69±0.05 ¹⁾	0.55±0.06 ¹⁾

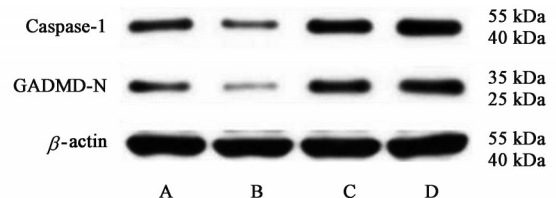


图2 固脾消积饮含药血浆细胞焦亡相关蛋白的表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of pyroptosis-related protein in Gupi Xiaoji decoction

4 讨论

细胞焦亡是由炎性小体引发的一种细胞程序性死亡,表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,导致细胞内容物释放。炎性小体由pro-Caspase-1与模式识别受体(NLRP1、NLRP3、NLRC4、AIM2)通过凋亡相关样斑点蛋白(ASC)相连接而成。

Caspase是一类具有相似结构、存在于细胞质中、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶,其中Caspase-1/4/5/11主要与细胞焦亡相关^[18]。消皮素蛋白是细胞焦亡的关键效应分子,已知的人类GSDMs基因有6个,GSDMA、GSDMB、GSDMC、GSDMD、GSDME和DFNB59。细胞焦亡的发生依赖于炎性半胱天冬酶(Caspase)和GSDMs蛋白家族,被激活的Caspase切割GSDMs蛋白,释放出其N端结构域,该结构域结合膜脂并在细胞膜上打孔,导致细胞渗透压的变化,进而发生胀大直至细胞膜破裂。目前,只有GSDMD诱导焦亡的机制比较明确,这也是细胞焦亡的经典途径。细胞焦亡时会释放炎症因子而伴随炎症反应,有观点认为细胞焦亡是一种成瘤机制而促进癌症的发生和进展^[19-20],尽管如此,外源性的焦亡反应的激活最近已经被证明可以引发强大的抗肿瘤活性^[19,21],有实验证明化疗药物如紫杉醇、顺铂可以引起肺癌细胞从凋亡向焦亡转变,从而抑制其增殖、转移^[22]。有研究表明通过构建一个生物正交系统,使药物从抗体-药物结合物中受控释放到小鼠体内,进入肿瘤细胞,实验发现只要有一小部分细胞发生焦亡,就足以激发炎症反应,改善肿瘤免疫微环境,进而激活强大的T细胞抗肿瘤免疫反应^[8]。由于肿瘤细胞对于凋亡具有固有抵抗能力,因此探寻和开发诱导肿瘤细胞焦亡的药物可能会为癌症患者提供更有效的治疗选择^[23]。

“固脾消积饮”系全国名中医、湖南省中医药研究院附属医院终身研究员潘敏求教授团队治疗肝癌的临床效验方,以四君子汤为基础方加减,有健脾理气、化痰解毒、攻毒散结之功效,组方富含人参皂苷、多糖、莪术醇、姜黄素、动物多肽毒素、糖蛋白等多种抗肿瘤活性成分。课题组既往研究表明,固脾消积饮能稳定瘤体、抗复发转移,对肝癌细胞的凋亡和自噬均有调节作用。本研究基于Caspase-1介导的细胞焦亡,通过网络药理学筛选得到固脾消积饮中可能靶向调控Caspase-1的6个基因,即MAPK1、MAPK8、MAPK14、Akt1、JUN、TP53,上述基因均与肝癌细胞的增殖、转移密切相关^[24-25],说明固脾消积饮可能通过调控Caspase-1介导的焦亡来抑制肝癌细胞的增殖和转移。分子对接技术筛选出13种潜在化合物,即7-hydroxy-5,8-dimethoxy-2-phenyl-chromone、黄芩素、鼠李素、芥苳黄酮、异鼠李黄素、7-O-methylisomucronulatol、芒柄花黄素、毛蕊异黄酮、木犀草素、槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、黄芩苷与PPI网络中的核心靶点具有对应关系,说明

这些活性成分可能在固脾消积饮调控Caspase-1的过程中起主要作用。其中,槲皮素可调节TP53以抑制肝癌细胞的增殖^[26],黄芩苷可作用于Caspase-1对神经退行性疾病模型小鼠产生神经保护的功效^[27],山柰酚可作用于Caspase-1相关的炎症小体产生神经保护作用,从而延缓帕金森疾病的进展^[28]。进一步通过GO功能富集分析发现,该方对Caspase-1的调控作用可能与氧化应激反应、线粒体外膜、与磷酸酶结合等有关,KEGG通路富集分析发现,该方对Caspase-1的调控作用涉及到MAPK、NF- κ B、p53、HIF-1等信号通路。网络药理学与分子对接结果表明固脾消积饮对Caspase-1具有调控作用,因此本研究展开体外实验,采用固脾消积饮的鼠含药血浆对肝癌HepG2.2.15细胞进行干预,结果表明固脾消积饮含药血浆上调Caspase-1的表达,增加HepG2.2.15细胞膜上GSDMD蛋白的分解切割,从而诱导HepG2.2.15细胞发生焦亡。

综上所述,本研究采用网络药理学及分子对接技术筛选出中药复方固脾消积饮中有13个潜在化合物可能作用于6个核心靶基因,涉及多种细胞功能及信号通路,从而调控Caspase-1,体现了中药复方的“多成分、多靶点、多通路”的作用特点。体外实验证实固脾消积饮能诱导肝癌HepG2.2.15细胞发生Caspase-1介导的焦亡。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-14.
- [2] 赵杰,余海波,朱运海,等. 肝癌根治术前GGT、ALT/AST和术后临床病理特征与预后的关系[J]. 中华普通外科杂志,2019,34(4):328-331.
- [3] 陈勇,覃乐,叶晓雪,等. 细胞焦亡与肝脏疾病的相关性及中医药研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(21):232-241.
- [4] 黄鑫悦,晁旭,黄峰. 细胞焦亡在原发性肝癌进展中的作用研究进展[J]. 药物评价研究,2021,44(7):1535-1540.
- [5] 蒋世彬,赵增阳,张淑静,等. 细胞焦亡参与肿瘤发生分子机制的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2021,43(1):194-200.
- [6] QIU S, LIU J, XING F. 'Hints' in the killer protein gasdermin D: unveiling the secrets of gasdermins driving cell death[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(4): 588-596.
- [7] 殷宏振,郭化磊,裴颖,等. 细胞焦亡与原发肝癌研

- 究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2019, 35(8): 941-944.
- [8] WANG Q, WANG Y, DING J, et al. A bioorthogonal system reveals antitumour immune function of pyroptosis[J]. *Nature*, 2020, 579(7799): 421-426.
- [9] 曾普华, 郜文辉, 蒋益兰, 等. 益气化瘀解毒方加减联合化疗栓塞治疗中晚期原发性肝癌 37 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(6): 19-20.
- [10] 曾普华, 郜文辉, 潘敏求, 等. 益气化瘀解毒方加减联合鸦胆子油乳经血管介入治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(1): 18-21.
- [11] 张振, 郜文辉, 王亚琪, 等. 益气化瘀解毒方加减联合索拉非尼治疗原发性肝癌疗效研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(3): 322-324.
- [12] 曾普华, 郜文辉, 潘敏求, 等. 益气化瘀解毒方药对人肝癌 HepG2 细胞增殖和裸鼠移植瘤生长的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(1): 8-11.
- [13] 曾普华, 郜文辉, 潘敏求, 等. 益气化瘀解毒方对人肝癌裸鼠 HepG2 移植瘤 MVD、HIF1a、VEGF/KDR 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7): 1563-1565.
- [14] 郜文辉, 曾普华, 黄惠勇, 等. 益气化瘀解毒方对人肝癌细胞 MHCC97-H 迁移能力及趋化因子 CXCL12、CXCR4、CXCR7 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(7): 41-43.
- [15] 贺石林, 王键, 王净净. 中医科研设计与统计学: 中医科研设计与统计方法[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2001.
- [16] SHIMADA K, CROTHER T R, KARLIN J, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis[J]. *Immunity*, 2012, 36(3): 401-414.
- [17] ZHONG Z, LIANG S, SANCHEZ-LOPEZ E, et al. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2018, 560(7717): 198-203.
- [18] 张骞予, 黄志权. 焦亡及其与头颈部肿瘤关系的研究进展. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(1): 86-92.
- [19] DUNN J H, ELLIS L Z, FUJITA M. Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma[J]. *Cancer Lett*, 2012, 314(1): 24-33.
- [20] JANOWSKI A M, KOLB R, ZHANG W, et al. Beneficial and detrimental roles of NLRs in carcinogenesis[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 370.
- [21] XIA X, WANG X, CHENG Z, et al. The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-"host"[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9): 650.
- [22] ZHANG C C, LI C G, WANG Y F, et al. Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(3/4): 312-325.
- [23] TANGg R, XU J, ZHANG B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 110.
- [24] 万智双, 熊丁, 曹宸. miR-433-3p 靶向 MAPK8 对肝癌细胞 MHCC97H 增殖、凋亡和迁移的调控作用[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(1): 57-62.
- [25] 林晓彤, 黄重铭, 彭慧婷, 等. 基于网络药理学和分子对接探究斑蝥治疗肝癌的作用机制[J]. 中国医药导报, 2021, 18(23): 8-12, 197.
- [26] AHMED Y R, AMR A R, MOHAMED E S, et al. A methoxylated quercetin glycoside harnesses HCC tumor progression in a TP53/miR-15/miR-16 dependent manner[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(10): 1475-1480.
- [27] RUI W, LI S, XIAO H, et al. Baicalein attenuates neuroinflammation by inhibiting NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway in MPTP induced mice model of Parkinson's disease[J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2020, 23(11): 762-773.
- [28] HAN X, SUN S, SUN Y, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1860-1881.

[责任编辑 顾雪竹]