

常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞的抑制作用及基于生物信息学的机制探讨

卫阳飞^{1,2,3}, 王硕¹, 陈涛^{1,2}, 闫淑萍^{1,2}, 李佩佩^{1,2}, 李洪梅^{1,2}, 申诚¹, 马玉梅⁴,
宋志博^{1,2}, 李艾静^{1,2}, 李玉林^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810000;

2. 中国科学院大学, 北京 100000;

3. 河西学院甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室, 甘肃张掖 734000;

4. 青海卫生职业技术学院, 西宁 810000)

[摘要] 目的:研究常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞的抑制作用及机制。方法:通过噻唑蓝(MTT)比色法、苏木素-伊红(HE)染色、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色、平板克隆形成实验、划痕实验、流式细胞术测定细胞凋亡和细胞周期等,从不同角度研究了常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞的抑制作用,进一步利用Pharm Mapper、UniProt、Swissdock、STRING和Metascape等在线平台,进行靶点筛选、基因注释、分子对接验证、蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建、基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,探讨其作用机制。结果:与空白组比较,常春藤皂苷B(15、30、60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可显著降低HGC-27胃癌细胞存活率($P<0.01$),呈浓度和时间依赖性,常春藤皂苷B低于120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对正常细胞GES-1无增殖抑制作用;与空白组比较,常春藤皂苷B(30、60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可诱导HGC-27胃癌细胞胞质空泡的形成和细胞核变形固缩,抑制其迁移能力($P<0.01$),诱导HGC-27胃癌细胞凋亡和细胞周期阻滞($P<0.05$, $P<0.01$);当常春藤皂苷B 10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对HGC-27胃癌细胞独立生存能力和增殖能力有抑制作用($P<0.01$)。其作用靶点可能与驱动蛋白样蛋白KIF11、3',5'-环磷酸鸟苷特异性磷酸二酯酶、胱天蛋白酶-3、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Chk1)、原癌基因酪氨酸蛋白激酶、表皮细胞生长因子受体和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)8等相关,机制可能与癌症通路中的MAPK信号通路和幽门螺旋杆菌感染的上皮细胞信号通路中的黏附连接、局部连接、癌症中的蛋白聚糖通路等相关。结论:常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞具有抑制作用,可能是多靶点多通路协同作用的结果。

[关键词] 常春藤皂苷B; HGC-27胃癌细胞; 抑制作用; 生物信息学; 作用机制

[中图分类号] R22;R2-031;R285.5;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0050-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221028 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220325.1420.004.html>

[网络出版日期] 2022-03-29 9:26

Inhibitory Effect of Hederasaponin B on Gastric Cancer HGC-27 Cells and Its Mechanism Based on Bioinformatics

WEI Yangfei^{1,2,3}, WANG Shuo¹, CHEN Tao^{1,2}, YAN Shuping^{1,2}, LI Peipei^{1,2}, LI Hongmei^{1,2},
SHEN Cheng¹, MA Yumei⁴, SONG Zhibo^{1,2}, LI Aijing^{1,2}, LI Yulin^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810000, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100000, China; 3. Key Laboratory of Hexi

Corridor Resources Utilization of Gansu, Hexi University, Zhangye 734000, China;

4. Qinghai Institute of Health Sciences, Xining 810000, China)

[收稿日期] 2021-12-11

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82174052);甘肃省高等学校创新能力提升项目(2019A-102)

[第一作者] 卫阳飞,在读博士,助理研究员,从事天然药物化学及药理药效学研究,E-mail:wyfhxy@163.com

[通信作者] *李玉林,博士,研究员,从事藏药标准化与新药研发及特色生物资源研究与开发,E-mail:liyulin@nwipb.cas.cn

[Abstract] Objective: To investigate the inhibitory effect of hederasaponin B on gastric cancer HGC-27 cell and the mechanism. **Method:** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, hematoxylin-eosin (HE) staining, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, colony formation assay, scratch assay, and flow cytometry were employed for the analysis of apoptosis and cell cycle. Thereby, the inhibitory effect of hederasaponin B on gastric cancer HGC-27 cell was investigated. Then the Pharm Mapper, UniProt, Swissdock, STRING, and Metascape were used for target screening, gene annotation, molecular docking, protein-protein interaction (PPI) network construction, Gene Ontology (GO) term and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis to explore the mechanism. **Result:** Hederasaponin B (15, 30, 60, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) can significantly reduce the survival rate of HGC-27 cell ($P<0.01$) in a time-dependent and dose-dependent manner compared with the blank group. It had no significant toxicity to normal GES-1 cell at concentration below 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with the blank group, hederasaponin B (30, 60, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) induced cytoplasmic vacuolization, and nuclear deformation and karyopyknosis, inhibited the migration of HGC-27 cell ($P<0.01$), and brought about the apoptosis ($P<0.05$, $P<0.01$) and cell cycle arrest of HGC-27 cell ($P<0.05$, $P<0.01$). Hederasaponin B (10, 20, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) also suppressed the independent survival ability and proliferation ability of HGC-27 cell ($P<0.01$). The possible action targets were kinesin-like protein KIF11, cGMP-specific 3, 5 cyclic phosphodiesterase, caspase-3, serine/threonine protein kinase Chk1, proto-oncogene tyrosine protein kinase, epidermal growth factor receptor, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) 8. The mechanism may be related to MAPK signaling pathway (pathways in cancer), adhesion connection, focal adhesion and proteoglycans in cancer (epithelial cell signaling pathways in *Helicobacter pylori* infection). **Conclusion:** Hederasaponin B exerts significant inhibitory effect on gastric cancer HGC-27 cell through multiple targets and multiple pathways.

[Keywords] hederasaponin B; gastric cancer HGC-27 cell; inhibitory effect; bioinformatics; mechanism

胃癌是消化系统中最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率在我国均居第2位^[1]。开发低毒高效的抗癌药物一直是抑制胃癌发展的迫切需求,近年来从植物药中提取药效部位或单体成分已成为新型抗肿瘤药物的重要来源。常春藤皂苷B是一种从植物药中分离到的天然活性三萜皂苷类成分,具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]、抗病毒^[4]、诱导 HeLa 细胞凋亡^[5]等作用,其可从毛茛科银莲花属植物多被银莲花 *Anemone raddeana*^[2]、林荫银莲花 *A. flaccida*^[3,5]和五加科常春藤属植物洋常春藤 *Hedera helix*^[4]等植物中分离到。唐古特铁线莲 *Clematis tangutica* 为毛茛科铁线莲属植物,收录于《部颁药品标准·藏药》(1995),具有破痞瘤集聚、增生胃火、活血通瘀等作用^[6]。本课题组前期研究发现常春藤皂苷B亦是唐古特铁线莲的主要皂苷类成分之一,通过分离该化合物并对其进行抗肿瘤作用的细胞筛选实验,结果表明常春藤皂苷B对人胃癌 HGC-27 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞和卵巢癌 SK-OV-3 细胞均具有抑制作用,其中对 HGC-27 胃癌细胞抑制作用最强^[7]。而常春藤皂苷B对 HGC-27 细胞的抑制作用研究目前还未见其他文献报道。胃癌的发生是多因素

共同参与、多阶段、多步骤的过程,直接摸索药物的作用靶点和信号转导途径是费时、费力且极具风险的。利用生物信息学方法分析已有疾病数据库,实现药物作用靶标的高通量快速筛选^[8-9],对快速揭示药物在疾病发生发展过程中的内在机制,解决天然药物因存在多靶点、协同作用等特点而造成的机制研究瓶颈,具有重要意义。本研究首先对常春藤皂苷B对 HGC-27 胃癌细胞的抑制作用进行了多角度研究,然后采用生物信息学方法对其发挥作用的可能靶点和机制进行了探讨,期望为后续深入研究其机制继而进行相关资源的开发利用提供一定参考和依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 常春藤皂苷B由本课题组从唐古特铁线莲全草中分离得到^[7],纯度 >98.5%; DMEM 培养基、0.25% EDTA-胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 8120157、2277235、2300015),RPMI 1640 培养基、青-链霉素溶液(以色列 BI 公司,批号分别为 2103012、1949071),噻唑蓝(MTT)、顺铂(美国 Sigma 公司,批号分别为 MKCL1832、MKCM2435),二甲基亚砜(DMSO)、

磷酸缓冲盐溶液(PBS)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为1209M037、20210710),膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒、结晶紫染色液、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(上海碧云天生物技术公司,批号分别为022021210312、011821210207、072920210207、071321210923、091620210127)。

1.2 细胞株 人胃未分化腺癌HGC-27细胞株,购自中国科学院上海细胞库(编号TCHu22);人正常胃黏膜上皮细胞GES-1,购自武汉普诺赛生物科技有限公司(编号CL-0563);均传至第3代用于后续实验。

1.3 仪器 Wultiskan型酶标仪、Heracell 150i型CO₂培养箱(美国Thermo Scientific公司),BSC-1804 II B2型生物安全柜(江苏苏净安泰有限公司),L500-A型离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),Ts2倒置相差显微镜、H600L荧光显微镜(日本Nikon公司),Flowsight流式细胞仪(德国Merck公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 HGC-27胃癌细胞采用RPMI 1640完全培养基培养,GES-1正常胃黏膜上皮细胞采用DMEM完全培养基培养,完全培养基均由基础培养基、10%血清和1%青-链霉素溶液组成。

2.2 MTT比色法检测HGC-27胃癌细胞存活率
以顺铂为阳性药,以GES-1细胞考察其对正常细胞的增殖抑制作用。选择对数生长期的细胞,以 8×10^3 个/孔接种于96孔培养板。设常春藤皂苷B和顺铂(15、30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组,其中设不加药组为空白组,每组5孔平行。当孔内细胞融合度达80%左右,吸走旧培养基,37℃,PBS洗涤后加入含药培养基,继续培养24~72 h后每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT溶液20 μL ,避光培养4 h,小心吸去上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,置于摇床上低速震荡15 min,使结晶物充分溶解,用自动酶标仪于540 nm处测定每孔吸光度 A 。细胞存活率= $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.3 HE和DAPI染色实验 取处于对数生长期的HGC-27胃癌细胞,按照 8×10^4 个/孔接种于放有细胞培养片的24孔板内,37℃、5% CO₂湿润培养箱培养24 h,向实验组加入常春藤皂苷B(0、30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每组设3个平行,作用24 h取出细胞爬片。分别进行HE染色和DAPI染色,显微镜

观察。

2.4 平板克隆形成实验 取处于对数生长期的HGC-27胃癌细胞,以500个/孔接种至35 mm小皿,37℃、5%CO₂湿润培养箱培养24 h,加入常春藤皂苷B(0、10、20、30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)含药培养基,同时设置24、48 h培养时间,每组3个平行。每隔2 d更换1次新鲜培养基,当培养皿中出现肉眼可见的克隆块时,终止培养,结晶紫染色,观察常春藤皂苷B对细胞克隆形成的影响。克隆形成率=克隆形成数/细胞接种数 $\times 100\%$ 。

2.5 划痕实验 在35 mm小皿背面沿其直径划平行的等距离直线(间隔7 mm,将每孔划分为5个区域)。取对数生长期的HGC-27细胞,以 2×10^5 个/皿接种于35 mm小皿。37℃、5% CO₂湿润培养箱培养24 h,用200 μL 枪头在皿底垂直划线,PBS清洗细胞3次去除漂浮的细胞,加入常春藤皂苷B(0、30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)含药培养基,分别于0、8、24、36、48 h在相同的位置拍照。利用Image J软件测量划痕宽度,计算细胞迁移率。迁移率= $(W_{0h} - W_{nh})/W_{0h} \times 100\%$, W_{0h} 为0 h划痕宽度, W_{nh} 为n h划痕宽度。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将处于对数生长期的HGC-27细胞以 2×10^5 个/皿接种于35 mm小皿,采用常春藤皂苷B(0、30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)分别处理24、48、72 h。按照Annexin V-FITC-PI染色试剂盒说明书所述操作方法,采用流式细胞术检测细胞凋亡。

2.7 流式细胞术检测对细胞周期的影响 将处于对数生长期的HGC-27细胞以 2×10^5 个/皿接种于35 mm小皿,正常培养24 h,无血清饥饿处理10 h,采用常春藤皂苷B(0、30、60、120 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理24 h,采用细胞周期检测试剂盒说明书操作方法检测药物对细胞周期的影响。采用流式细胞仪检测光散射现象,FlowJo VX软件分析细胞周期。

2.8 统计学分析 采用SPSS 20.0软件进行分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2.9 常春藤皂苷B抗胃癌作用靶点的筛选和注释
将常春藤皂苷B的化学结构保存为sdf格式,提交至Pharm Mapper服务平台(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/submitfile.html>)进行靶点预测,设置“Select Targets Set”为“Human Protein Targets”。以“tumor”“cancer”“gastric”“stomach”等关键词对预测结果进行筛选。按照归一化拟合值排序,选取排名前20位的靶点,利用UniProt数据平

台 (<https://www.uniprot.org/uploadlists>)^[10]对分子靶点进行蛋白和编码基因重注释,剔除空值匹配非编码条目。

2.10 药物靶标蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将2.9项下筛选得到的靶点提交至STRING平台 (<https://string-db.org>),“Multiple proteins”栏目中选择“Homo Sapiens”,生成药物作用靶标蛋白的PPI网络图,找出互作频率较高的作用靶点。

2.11 分子对接验证 选取 Pharm Mapper 筛选结果中排名前6位和PPI网络中互作频率较高的目标靶点,从蛋白数据库 (<http://www.rcsb.org>)中得到目标靶点的晶体结构,采用 Maestro 12.0 软件对蛋白进行预处理,除去其中的小分子配体和非蛋白分子,保存为pdb后缀的文件。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载常春藤皂苷B分子结构,保存为mol2格式。在 SwissDock 在线分子对接平台 (<http://www.swissdock.ch>)^[11-12]上传靶蛋白和小分子结构文件,进行分子对接验证。

2.12 药物靶标蛋白的基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 应用 Metascape 平台 (<http://metascape.org/gp/index.html>)^[13]对常春藤皂苷B抗胃癌相关靶点分别进行GO及KEGG富集分析。均设置 $P < 0.01$,最小计数为3,富集因子 > 1.5 。

GO及KEGG富集分析。均设置 $P < 0.01$,最小计数为3,富集因子 > 1.5 。

3 结果

3.1 常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞存活率的影响 当作用于HGC-27胃癌细胞时,与空白组比较,常春藤皂苷B可以显著降低HGC-27胃癌细胞的存活率 ($P < 0.01$),呈浓度和时间依赖性;与顺铂组比较,作用时间为24 h时,常春藤皂苷B组对HGC-27胃癌细胞存活率的抑制作用略弱于顺铂 ($P < 0.01$);作用时间为48、72 h, 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞存活率的抑制作用强于顺铂 ($P < 0.01$)。当作用于GES-1正常胃黏膜上皮细胞时,与空白组比较,低于120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,常春藤皂苷B对GES-1正常细胞存活率的影响差异无统计学意义;与顺铂组比较,不同作用时间不同浓度给药时,常春藤皂苷B对GES-1正常细胞存活率的抑制作用均显著弱于顺铂,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表1。后续相关研究中,选用30、60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷B开展研究;因常春藤皂苷B对克隆形成影响较大,选用10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷B进行该方面研究。

表1 常春藤皂苷B和顺铂对HGC-27胃癌细胞和GES-1正常胃黏膜上皮细胞生存率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of hederasaponin B and cisplatin on survival rates of gastric cancer HGC-27 cell and normal GES-1 cell ($\bar{x}\pm s, n=5$) %

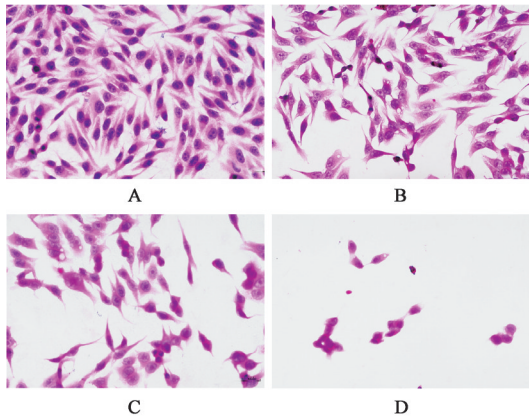
| 组别 | 浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | HGC-27胃癌细胞生存率 | | | GES-1正常胃黏膜上皮细胞生存率 | | |
|---------|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白组 | | 100.00±0.13 | 100.00±0.20 | 100.00±0.22 | 100.00±0.24 | 100.00±0.16 | 100.00±0.11 |
| 常春藤皂苷B组 | 15 | 75.68±1.24 ^{2,4)} | 60.50±2.18 ^{2,4)} | 48.34±1.09 ^{2,3)} | 99.85±0.26 ⁴⁾ | 99.86±2.24 ⁴⁾ | 100.00±0.12 ⁴⁾ |
| | 30 | 68.55±1.83 ^{2,4)} | 40.25±2.94 ^{2,3)} | 37.47±1.17 ²⁾ | 99.61±0.68 ⁴⁾ | 99.79±0.36 ⁴⁾ | 94.88±3.64 ⁴⁾ |
| | 60 | 29.40±1.94 ^{2,4)} | 8.45±2.43 ^{2,4)} | 9.10±0.76 ^{2,4)} | 96.91±2.14 ⁴⁾ | 94.62±2.37 ⁴⁾ | 93.55±2.77 ⁴⁾ |
| | 120 | 16.01±1.98 ^{2,4)} | 3.51±1.03 ²⁾ | 1.94±0.73 ²⁾ | 83.51±1.29 ^{2,4)} | 77.21±1.38 ^{2,4)} | 78.69±1.06 ^{2,4)} |
| 顺铂组 | 15 | 64.80±1.95 ²⁾ | 43.61±2.91 ²⁾ | 38.71±2.17 ²⁾ | 93.91±0.79 ²⁾ | 63.28±3.76 ²⁾ | 52.36±4.73 ²⁾ |
| | 30 | 39.86±2.25 ²⁾ | 30.35±1.32 ²⁾ | 37.96±2.04 ²⁾ | 73.59±1.76 ²⁾ | 31.86±2.34 ²⁾ | 21.83±1.75 ²⁾ |
| | 60 | 21.01±0.67 ²⁾ | 24.25±1.01 ²⁾ | 22.13±1.86 ²⁾ | 54.97±1.62 ²⁾ | 11.91±0.63 ²⁾ | 5.35±0.46 ²⁾ |
| | 120 | 2.13±0.74 ²⁾ | 1.75±0.96 ²⁾ | 1.10±0.94 ²⁾ | 6.54±2.77 ²⁾ | 2.23±1.01 ²⁾ | 1.40±0.82 ²⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与同等浓度顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2-表5同)

3.2 常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞的影响 空白组细胞结构完整,细胞质丰富,染色均匀,细胞核较大,核仁染色明显。常春藤皂苷B处理后,视野中细胞数目均随药物浓度增加而减少,且可见药物诱导细胞内胞质空泡的形成,分布于细胞质周边。随着药物浓度增高,细胞呈不规则形态,细胞核发生皱缩。空白组细胞核染色均匀,边缘光滑,形态

规则,核仁清晰。随着常春藤皂苷B浓度增高,细胞核逐渐变形至固缩。表明常春藤皂苷B对HGC-27细胞的细胞质和细胞核都发生了影响。见图1、图2。

3.3 常春藤皂苷B对HGC-27细胞独立生存能力和增殖能力的影响 克隆形成能力是反映细胞群体依赖性和增殖能力的重要指标,贴壁后的细胞不一



注: A. 空白组; B~D. 常春藤皂苷 B 组(30、60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
(图2,图4-图6同)

图1 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 细胞的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of hederasaponin B on HGC-27 cell (HE, $\times 200$)

定每个都可以增殖和形成克隆,而形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞。随着给药浓度的增加,克隆数目逐渐减少,每个克隆所包含的细胞数目也比空白组有所减少。与空白组比较,常春藤

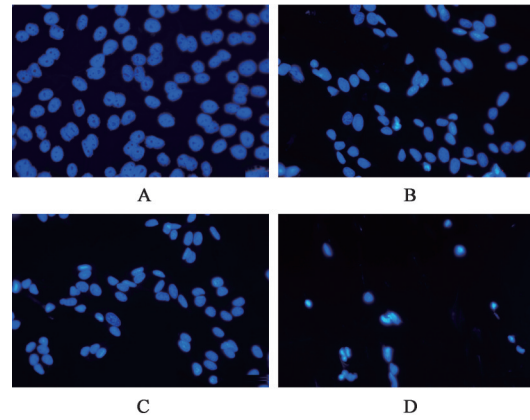
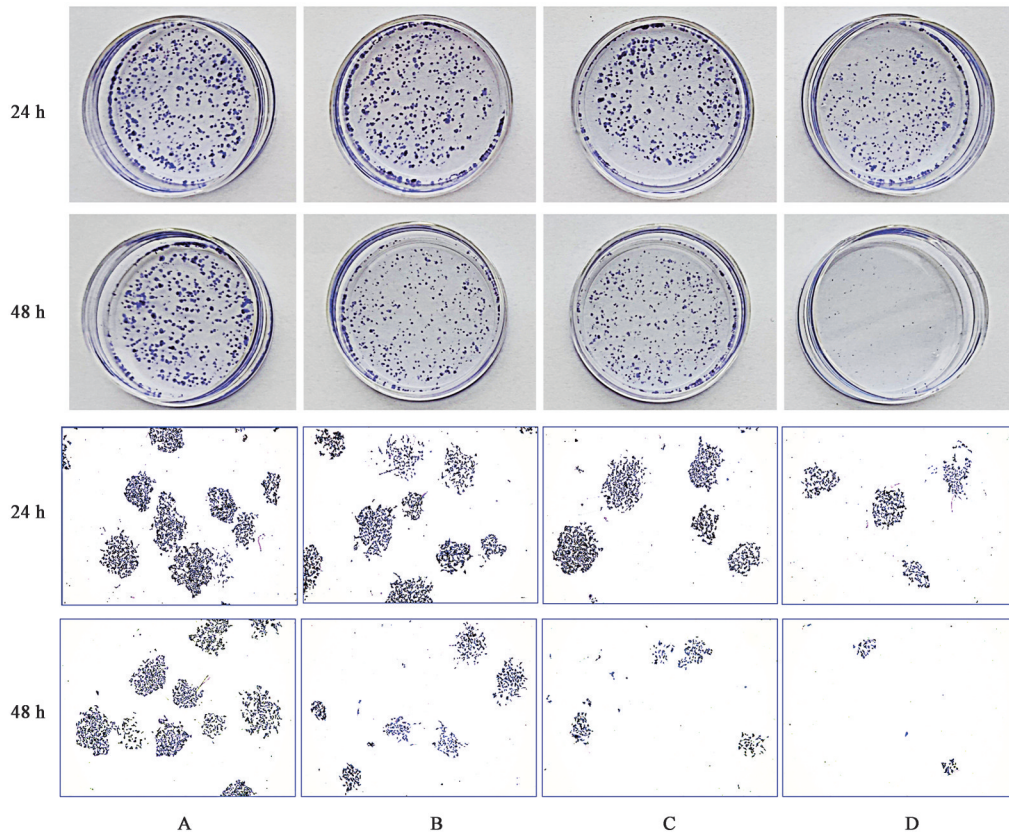


图2 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 细胞的影响 (DAPI, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of hederasaponin B on HGC-27 cell (DAPI, $\times 200$)

皂苷 B 组(10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)HGC-27 细胞克隆形成率显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),呈时间和浓度依赖性。结果表明,常春藤皂苷 B 对 HGC-27 胃癌细胞的克隆形成,即细胞独立生存能力和增殖能力均具有抑制作用。见图3、表2。



注: A. 空白组; B~D. 常春藤皂苷 B 组(10、20、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图3 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 细胞克隆形成的影响 (倒置显微镜, $\times 40$)

Fig. 3 Effect of hederasaponin B on clone formation of HGC-27 cell (inverted microscope, $\times 40$)

3.4 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 细胞迁移能力的影响 与空白组比较,常春藤皂苷 B 组(30、60、

120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在8、24、36、48 h 均能抑制 HGC-27 肿瘤细胞的迁移($P < 0.01$)。结果表明,常春藤皂苷 B

表2 常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞克隆形成率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of hederasaponin B on cloning formation rates of gastric cancer HGC-27 cell ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | HGC-27胃癌细胞克隆形成率/% | |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 24 h | 48 h |
| 空白组 | | 94.95 \pm 1.04 | 92.73 \pm 1.35 |
| 常春藤皂苷B组 | 10 | 84.33 \pm 1.23 ²⁾ | 59.88 \pm 0.82 ²⁾ |
| | 20 | 66.32 \pm 1.26 ²⁾ | 46.34 \pm 1.17 ²⁾ |
| | 30 | 54.54 \pm 1.18 ²⁾ | 6.77 \pm 0.56 ²⁾ |

具有抑制HGC-27肿瘤细胞迁移的作用。见图4、表3。

3.5 常春藤皂苷B对HGC-27细胞凋亡的影响 与空白组比较,随着给药时间和浓度的增加,常春藤皂苷B诱导HGC-27胃癌细胞凋亡的作用逐渐增强($P<0.05$, $P<0.01$),呈现时间和浓度依赖性。结果表明常春藤皂苷B具有诱导HGC-27胃癌细胞凋亡的作用。见表4。

3.6 常春藤皂苷B对HGC-27细胞周期的影响 与空白组比较,常春藤皂苷B 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, G_0/G_1 期细胞明显升高($P<0.05$), S期和 G_2/M 期细胞明显降低($P<0.05$)。与空白组比较,常春藤皂苷B 60、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, G_0/G_1 期细胞显著增加($P<0.01$), G_2/M 期细胞随着常春藤皂苷B浓度的增加而逐渐

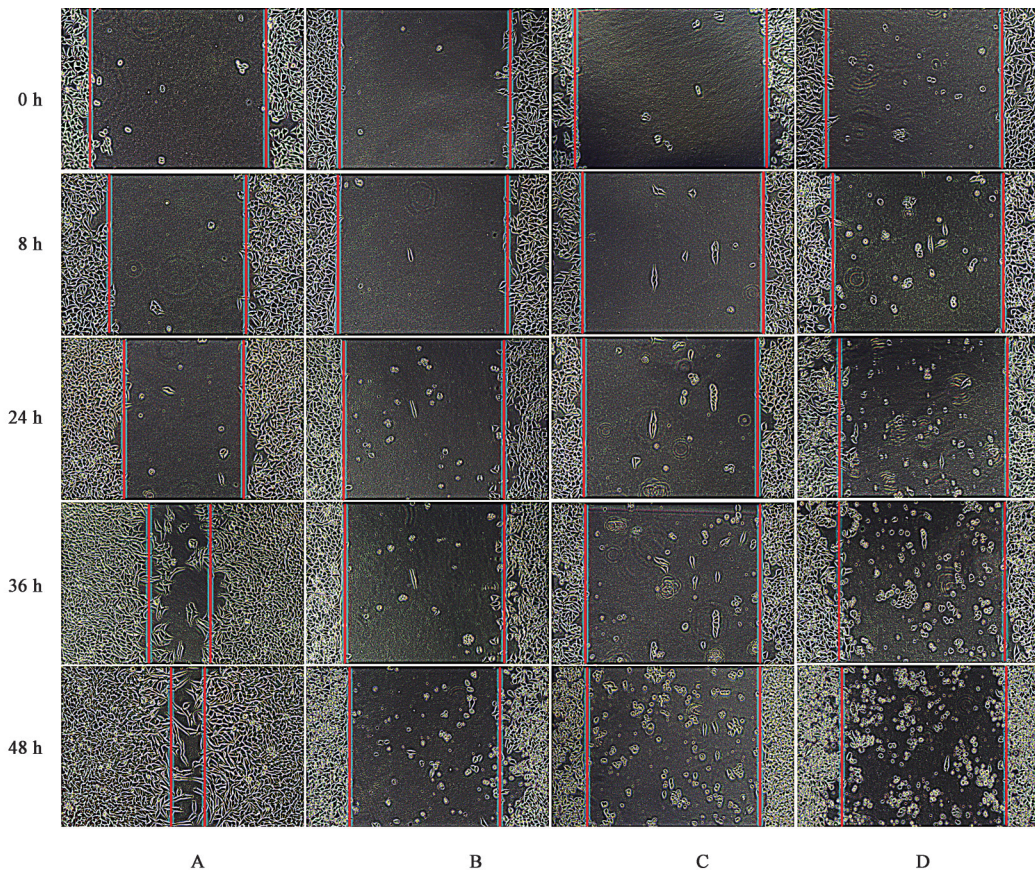


图4 常春藤皂苷B对HGC-27细胞迁移的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of hederasaponin B on HGC-27 cell migration (inverted microscope, $\times 100$)

表3 常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞迁移率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of hederasaponin B on mobility ratio of gastric cancer HGC-27 cell ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | HGC-27胃癌细胞迁移率/% | | | | |
|---------|---------------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | 0 h | 8 h | 24 h | 36 h | 48 h |
| 空白组 | | 0.00 \pm 1.61 | 22.22 \pm 0.93 | 32.10 \pm 0.54 | 65.74 \pm 0.93 | 79.63 \pm 0.93 |
| 常春藤皂苷B组 | 30 | 0.00 \pm 0.55 | 3.90 \pm 0.55 ²⁾ | 6.35 \pm 0.96 ²⁾ | 6.99 \pm 0.55 ²⁾ | 9.86 \pm 0.55 ²⁾ |
| | 60 | 0.00 \pm 1.03 | 5.56 \pm 1.36 ²⁾ | 6.90 \pm 0.89 ²⁾ | 7.02 \pm 0.89 ²⁾ | 7.49 \pm 1.35 ²⁾ |
| | 120 | 0.00 \pm 1.41 | 5.81 \pm 0.53 ²⁾ | 4.01 \pm 1.06 ²⁾ | 5.56 \pm 0.53 ²⁾ | 4.35 \pm 1.06 ²⁾ |

表 4 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 胃癌细胞早期和晚期凋亡总比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of hederasaponin B on proportions of early and late apoptosis of gastric cancer HGC-27 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 总凋亡率/% | | |
|-----------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 72 h |
| 空白组 | | 6.80±1.07 | 9.86±1.11 | 13.81±0.76 |
| 常春藤皂苷 B 组 | 30 | 13.33±2.06 ¹⁾ | 21.65±2.22 ²⁾ | 66.72±1.02 ²⁾ |
| | 60 | 13.91±0.66 ²⁾ | 36.78±1.33 ²⁾ | 79.59±0.63 ²⁾ |
| | 120 | 16.94±1.75 ²⁾ | 45.74±1.86 ²⁾ | 84.46±1.17 ²⁾ |

减少 ($P<0.01$); 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷 B 组基本已没有处于 G_2/M 期的细胞。结果表明常春藤皂苷 B

作用于 HGC-27 细胞后引起了 G_0/G_1 期阻滞。见表 5。

表 5 常春藤皂苷 B 对 HGC-27 胃癌细胞周期比例的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of hederasaponin B on distribution ratio of cell cycle of gastric cancer HGC-27 cell ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | G_0/G_1 | S | G_2/M | % |
|-----------|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| 空白组 | | 65.14±1.74 | 16.18±1.11 | 18.87±1.18 | |
| 常春藤皂苷 B 组 | 30 | 73.16±2.25 ¹⁾ | 12.45±0.85 ¹⁾ | 14.58±0.25 ¹⁾ | |
| | 60 | 92.53±1.16 ²⁾ | 2.94±0.45 ²⁾ | 4.66±0.77 ²⁾ | |
| | 120 | 92.75±2.14 ²⁾ | 7.33±0.14 ²⁾ | 0.00±0.13 ²⁾ | |

3.7 常春藤皂苷 B 抗胃癌作用的靶点预测 通过 Pharm Mapper 药效团匹配与潜在靶标识别平台对常春藤皂苷 B 抗胃癌作用的靶点进行了预测^[14-16], 基于 Pharm Mapper 的常春藤皂苷 B 抗胃癌作用靶点预测见增强出版附加材料。这些靶点的预测为后期机制研究提供了思路和方向。常春藤皂苷 B 与归一化拟合值排名前 6 位的预测靶点的结合情况: 与驱动蛋白样蛋白 KIF11 作用方式为常春藤皂苷 B 的 C-28 位酯键 O 作为氢键受体, 母核 E 环、29- CH_3 与靶点间存在疏水作用力; 与 3', 5'-环磷酸鸟苷特异性磷酸二酯酶作用方式为药物 C-3 位糖链中阿拉伯糖的 4-OH、鼠李糖的 2-OH 与靶点间存在疏水作用力, 六元环中的 O 作为氢键受体; 与胱天蛋白酶-3 作用方式为母核的 B 环, 23- CH_3 和靶点之间存在疏水作用力, C-28 位酯键的 O 作为氢键受体; 与固醇硫酸酯酶作用方式为药物母核的 B 环、C 环、23-OH 与靶点存在疏水作用力; 与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk1 作用方式为药物 C-3 位糖链中阿拉伯糖六元环的 O 作为氢键受体, 母核 26- CH_3 、27- CH_3 与靶点存在疏水作用力; 与雌激素受体作用方式为母核的 A 环、D 环和 27- CH_3 与靶点存在疏水作用力, C-3 糖苷键的 O 作为氢键受体。见图 5。

3.8 常春藤皂苷 B 抗胃癌作用靶点 PPI 网络的构建 常春藤皂苷 B 抗胃癌作用靶点的 PPI 网络图见增强出版附加材料, 线条越粗, 代表与其有关系的靶点越多。由此可知, 原癌基因酪氨酸蛋白激酶

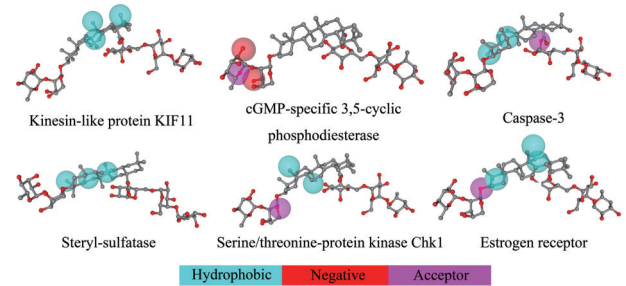


图 5 常春藤皂苷 B 与排名前 6 位作用靶标的药效团结合方式

Fig. 5 Combination of hederasaponin B with pharmacophores of targets ranked in top 6

(SRC), 表皮生长因子受体 (EGFR), 丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8) 等是互作频率较高的蛋白。

3.9 常春藤皂苷 B 相关靶点的分子对接验证 将常春藤皂苷 B 与 Pharm Mapper 筛选结果中归一化拟合值排名前 6 位和 PPI 网络中互作频率较高的目标靶点进行分子对接验证, 所有对接结合能均 < -7 , 表明常春藤皂苷 B 与生物信息学方法筛选到的目标靶点结合能力较强。常春藤皂苷 B 与目标靶点的分子对接验证见增强出版附加材料。

3.10 常春藤皂苷 B 抗胃癌作用靶点的 GO 分析 通过对常春藤皂苷 B 抗胃癌作用靶点进行 GO 分析, 结果表明其涉及的生物学进程主要包括: 节律行为、细胞对激素刺激的反应、上皮细胞分化、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶受体途径、上皮细胞增殖等; 分子功能主要体现在: ATP 酶结合、蛋白激酶活性、

跨膜受体蛋白激酶活性、细胞因子受体结合、内肽酶活性等;相关细胞成分主要为:膜筏、受体复合物、线粒体内膜等。常春藤皂苷B作用靶点的GO分析见增强出版附加材料。

3.11 常春藤皂苷B抗胃癌作用靶点的KEGG通路分析 通过对常春藤皂苷B抗胃癌作用靶点进行KEGG通路分析,结果表明其主要参与的通路为癌症通路(hsa05200,lgP=-10.365)和幽门螺旋杆菌感染的上皮细胞信号通路(hsa05120,lgP=-9.127);癌症通路中最有可能与MAPK信号通路(hsa04010,lgP=-7.339)相关,KEGG分析-癌症通路见增强出版附加材料;幽门螺旋杆菌感染的上皮细胞信号通路中最有可能与黏附连接(hsa04520,lgP=-8.738)、局部粘连(hsa04510,lgP=-6.775)、癌症中的蛋白聚糖(hsa05025,lgP=-6.732)等通路相关,KEGG分析-幽门螺旋杆菌感染的上皮细胞信号通路见增强出版附加材料。

4 讨论

肿瘤的发生发展是一个多步骤、多因素共同参与的过程,涉及到多种病理学和生物学改变,但几乎所有的肿瘤都具有一个共同的特征:失控性生长^[17]。肿瘤细胞的生存、增殖能力是决定肿瘤发生发展的关键因素,而肿瘤细胞迁移能力可以促进肿瘤的转移,是恶性肿瘤的生物学特征。本研究结果表明常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞生存、增殖和迁移等生物学行为均具有抑制作用。细胞凋亡异常继而发生凋亡受阻在大多数恶性肿瘤的发病学上占有重要地位,而肿瘤的发生发展,都涉及到一个共同的环节:细胞周期机制的破坏。通过对常春藤皂苷B作用于HGC-27胃癌细胞引起的凋亡和周期变化,结果表明常春藤皂苷B可能通过诱导HGC-27胃癌细胞凋亡和G₀/G₁期周期阻滞发挥抑制作用。

常春藤皂苷B是一种天然活性三萜类化合物。目前已有多篇文献报道了三萜皂苷类成分在胃癌治疗方面的作用。戴伟等^[18]研究表明从扬子铁线莲中提取的三萜类皂苷成分对人胃癌SGC-7901细胞株具有抑制增殖、诱导凋亡的作用,其机制与抑制胞核转录因子(NF)- κ B表达有关。XU等^[19]研究表明川断续皂苷PA通过影响p38/JNK和MAPK信号通路发挥诱导AGS人胃癌细胞自噬和凋亡的作用。HU等^[20]研究表明九节龙皂苷-I可通过调节酪氨酸蛋白激酶/信号传导和转录激活因子3(JAK/STAT3)信号通路抑制胃癌细胞的生长、转移和上皮

细胞间质转化。SACHAN等^[21]发现三萜皂苷afrocyclamin A可通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路促进癌细胞的凋亡。李为等^[22]研究表明人参皂苷Rg₃通过miR-125b/STARD13/NEU1信号通路影响了胃癌BGC-823细胞的侵袭和迁移。鉴于其作用机制的复杂性,在采用实验方法探索其作用靶点和机制之前对其进行生物信息学预测是十分必要的。

通过生物信息学手段分析得到的常春藤皂苷B抗胃癌作用靶点包括驱动蛋白样蛋白KIF11、3',5'-环磷酸鸟苷特异性磷酸二酯酶、胱天蛋白酶-3、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Chk1、表皮细胞生长因子受体、原癌基因酪氨酸蛋白激酶和MAPK8等。其中,驱动蛋白样蛋白KIF11是参与细胞有丝分裂的重要分子,其异常表达可以导致染色体不稳定、细胞分裂增殖异常,进而形成肿瘤^[23],胱天蛋白酶-3参与了细胞凋亡中胱天蛋白酶级联反应的激活,原癌基因酪氨酸蛋白激酶参与细胞增殖、分化和凋亡的调控,表皮生长因子受体参与控制细胞的生长和分化,这些靶点均与胃癌细胞的增殖和凋亡密切相关,可能是常春藤皂苷B发挥抑制HGC-27胃癌细胞增殖和凋亡作用的关键靶点;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Chk1参与因DNA损伤或DNA未复制而产生的检查点介导细胞周期阻滞,也可以在未受干扰的细胞周期中负调节细胞周期进程,是常春藤皂苷B诱导HGC-27胃癌细胞发生周期阻滞的可能靶点。KEGG分析结果提示,幽门螺旋杆菌感染的上皮细胞信号通路中的黏附连接、局部粘连等是常春藤皂苷B抑制HGC-27细胞迁移的可能原因。分子对接结果表明,上述靶点与常春藤皂苷B结合能力较强,进一步证实了预测结果的可靠性。

综上所述,常春藤皂苷B对HGC-27胃癌细胞具有显著抑制作用,其机制可能是多靶点、多通路协同作用的结果,后续将继续对其进行深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA-Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] XIN C, LU J C, HE W F, et al. Antiperoxidation activity of triterpenoids from rhizome of *Anemone raddeana* [J]. Fitoterapia, 2009, 80(2):105-111.
- [3] LIU Q, ZHU X Z, FENG R B, et al. Crude triterpenoid

- saponins from *Anemone flaccida* (Di Wu) exert anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats[J]. Chin Med-UK, 2015, 10(1):20-30.
- [4] SONG J H, YEO S G, HONG E H, et al. Antiviral activity of hederasaponin B from *Hedera helix* against enterovirus 71 subgenotypes C3 and C4a[J]. Biomol Ther, 2014, 22(1):41-46.
- [5] HAN L T, LI J, HUANG F, et al. Triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* induce apoptosis activity in HeLa cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(2):122-127.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 部颁药品标准·藏药[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995:86-86.
- [7] WEI Y F, CHEN T, WANG S, et al. Separation of a new triterpenoid saponin together with six known ones from *Clematis tangutica* (Maxim.) Korsh and evaluation of their cytotoxic activities [J]. Nat Prod Res, 2021, doi:10.1080/14786419.2021.1984468.
- [8] YAN B Z, LUO D, LI J C, et al. Molecular mechanism of Wutou Decoction in the treatment of osteoarthritis: A bioinformatics and molecular docking study[J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(7):7706-7718.
- [9] XIANG F, LI L M, LIN J L, et al. Network pharmacology and bioinformatics methods reveal the mechanism of Zao-Jiao-Ci in the treatment of LSCC [J]. J Oncol, 2021, doi:10.1155/2021/8862821.
- [10] 罗静初. UniProt蛋白质数据库简介[J]. 生物信息学, 2019, 17(3):131-144.
- [11] GROSDIDIER A, ZOETE V, MICHIELIN O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS[J]. J Comput Chem, 2011, 32(10):2149-2159.
- [12] GROSDIDIER A, ZOETE V, MICHIELIN O. Swiss Dock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(Web Server issue):270-277.
- [13] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, doi:10.1038/s41467-019-09234-6.
- [14] LIU X F, OUYANG S S, YU B, et al. PharmMapper Server: A web server for potential drug target identification via pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Web Server issue):609-614.
- [15] WANG X, PAN C X, GONG J Y, et al. Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. J Chem Inf Model, 2016, 56(6):1175-1183.
- [16] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1):356-360.
- [17] HANAHAN D, WEIHERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [18] 戴伟, 方申存, 刘平, 等. 铁线莲皂苷对人胃癌SGC-7901细胞增殖及NF- κ B表达的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2010, 30(8):1074-1078, 1104.
- [19] XU M Y, LEE D H, JOO E J, et al. Akebia saponin PA induces autophagic and apoptotic cell death in AGS human gastric cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2013, doi:10.1016/j.fct.2013.06.059.
- [20] HU J H, YANG D S, REN X Q, et al. Ardisinilioside I inhibits the growth, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of gastric cancer cells through the JAK/STAT3 signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 9(2):1801-1807.
- [21] SACHAN R, KUNDU A, JEON Y, et al. Afrocyclamin A, a triterpene saponin, induces apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer cells [J]. Phytomedicine, 2018, doi:10.1016/j.phymed.2018.10.012.
- [22] 李为, 刘伟, 邹君君. 人参皂苷Rg₃通过miR-125b/STARD13/NEU1信号通路对胃癌BGC-823细胞侵袭迁移的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22):138-142.
- [23] OUE N, SENTANI K, SAKAMOTO N, et al. Molecular carcinogenesis of gastric cancer: Lauren classification, mucin phenotype expression, and cancer stem cells[J]. Int J Clin Oncol, 2019, 24(7):771-778.

[责任编辑 张丰丰]