

罗汉果山萘酚抑制HepG2细胞增殖潜在分子机制的探析

柯飞燕^{1,2} 张定国¹ 罗贵钊² 伍志伟^{1,2*}

(¹伊犁师范大学生物科学与技术学院, 伊宁 835000; ²桂林医学院基础医学院, 桂林 541199)

摘要 利用网络药理学—分子对接结合细胞实验探讨罗汉果抑制肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的潜在分子机制。应用中药系统药理学数据库(TCMSP)筛选罗汉果活性成分与靶点, Genecards数据库检索肝细胞癌相关靶点, 二者靶点经Venny平台取交集, 得到罗汉果治疗肝细胞癌的潜在靶点。以潜在作用靶点为基础, 利用DAVID数据库进行基因功能和通路(GO/KEGG)富集分析后, 采用Cytoscape软件构建罗汉果治疗肝细胞癌的“药物—成分—疾病—靶点”和“药物成分—靶点—通路—疾病”网络图, 经生物分子功能注释系统数据库和Cytoscape软件获得核心作用靶点。选择药物活性成分(山萘酚)和关键靶点, 运用AutoDock Vina软件进行分子对接。以山萘酚为实验药物、HepG2为研究对象, 采用CCK-8法筛选其抑制HepG2细胞增殖的有效浓度, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot检测潜在作用靶点的蛋白表达水平。筛选出罗汉果有效成分11个、作用靶点77个, 肝细胞癌的疾病靶点7 773个, 二者共有靶点62个; GO与KEGG功能富集分析得到275个生物功能单位和87条信号通路; 筛选出罗汉果抑制肝癌细胞增殖的潜在核心靶点p65、JNK1、Caspase-3、AKT1等10个; 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上的罗汉果山萘酚能显著降低HepG2细胞的增殖活性和提高细胞凋亡率, 显著上调p65、Caspase-3表达水平和下调JNK1、AKT1表达水平。罗汉果山萘酚具有抑制肝癌细胞增殖和促进其凋亡的活性, 然而罗汉果具有多成分、多靶点、多通路的功效和作用特点, 提示罗汉果治疗肝细胞癌的机制较为复杂。

关键词 网络药理学; 细胞增殖; 山萘酚; 肝癌; HepG2

Study on the Potential Molecular Mechanism of Kaempferol from *Siraitia Grosvenorii* in Inhibiting HepG2 Cell Proliferation

KE Feiyan^{1,2}, ZHANG Dingguo¹, LUO Guizhao¹, WU Zhiwei^{1,2*}

(¹College of Biological Science and Technology, Yili Normal University, Yining 835000, China;

²School of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Exploring the potential molecular mechanism of *Siraitia grosvenorii* in inhibiting HCC (hepatocellular carcinoma) by network pharmacology molecular docking combined with cell experiment. The TCMSP database was used to screen the active components and targets of *Siraitia grosvenorii*, and the Genecards database was used to search the relevant targets of hepatocellular carcinoma. The potential targets of *Siraitia grosvenorii* for the treatment of hepatocellular carcinoma were obtained by intersection of these two targets on the Venny platform.

收稿日期: 2024-03-25

接受日期: 2024-04-28

伊犁师范大学高层次人才科研启动基金(批准号: 2022RCYJ08)和广西壮族自治区大学生创新创业训练计划项目(批准号: S202210601099)资助的课题

*通信作者。Tel: 0999-8996985, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

Received: March 25, 2024

Accepted: April 28, 2024

This work was supported by the Yili Normal University High Level Talent Research Launch Fund (Grant No.2022RCYJ08) and the Guangxi Zhuang Autonomous Region College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program Project (Grant No.S202210601099)

*Corresponding author. Tel: +86-999-8996985, E-mail: wzhiwei@aliyun.com

DAVID database was used to enrich analysis for gene function and their working pathways (GO/KEGG) of potential action targets, and the “drug component-disease-target” and “drug component-target-pathway-disease” network maps of *Momordica grosvenorii* for the treatment of hepatocellular carcinoma were established by Cytoscape software. The core targets were obtained through the database of biological molecular function annotation system and the software of Cytoscape. Molecular docking between proposed drug active products (kaempferol) and key targets was performed in AutoDock Vina software. Using naphthol as the experimental drug and HepG2 as the research object, CCK-8 method was used to screen the concentration of kaempferol inhibiting HepG2 cell proliferation; flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, and Western blot was used to analyze protein levels of potential targets identified through screening. Totally 11 active components and 77 related targets of *Siraitia grosvenorii* and 7 773 disease targets of hepatocellular carcinoma and 62 common targets were screened. Totally 275 biological functions and 87 signal pathways were obtained by functional enrichment analysis of GO and KEGG. Ten potential core targets of *Siraitia grosvenorii* for the treatment of hepatocellular carcinoma were screened, such as p65, JNK1, Caspase-3 and AKT1. Kaempferol above 20 $\mu\text{g/mL}$ could significantly reduce the proliferation activity of HepG2 cells, increase its apoptosis rate, and significantly up regulate p65, Caspase-3 expression levels and down regulate JNK1 and AKT1 expression levels in HepG2 cells. Kaempferol isolated from *Siraitia grosvenorii* has the activity in inhibiting the proliferation and promoting apoptosis of liver cancer cells. However, *Siraitia grosvenorii* has the efficacy and characteristics of multi-component, multi-target, and multi-pathway, which reveals that the mechanism of *Siraitia grosvenorii* in the treatment of hepatocellular carcinoma is more complex.

Keywords network pharmacology; cell proliferation; kaempferol; liver cancer; HepG2

肝癌的发生和发展与人类生活方式和机体内平衡密切相关。近年来,由于人们饮食结构的改变和生态环境的影响,肝癌的发病率和死亡率逐年上升^[1]。其中,肝细胞癌约占肝癌总数的75%以上,肝细胞型肝癌是发病率最高的一种病理类型^[2-3]。目前,肝细胞癌的治疗手段以局部消融、手术切除或肝移植为主,但其预后效果并非令人满意^[4-5]。同时,肝细胞癌的发病机制较为复杂,受到环境、遗传、病原、饮食等多重因素的影响^[6]。因此,依据肝细胞癌发生、发展的机制,寻找治疗肝细胞癌的新靶点、新通路已成为目前研究的热点。

罗汉果属葫芦科多年生藤类植物,是我国特有的道地药材和甜味植物,主要集中种植于广西壮族自治区桂林市辖区。《中药志》中记载,罗汉果味甘、性凉,具有清热解毒、润肠通便、润肺止咳等功效^[7]。此外,依其化学组成和结构,罗汉果提取物具有潜在的抗肿瘤活性。已有研究表明,罗汉果醇通过调节p21、Bcl-2、Caspase-3、Bax、Survivin等基因表达水平诱导肺癌细胞A549等肿瘤细胞的凋亡,进而发挥抗肿瘤活性^[8-9];罗汉果中三萜皂苷类主要成分——罗汉果皂苷V亦可通过阻断AKT1介导的NF- κ B和C/EBP δ 活化、ROS生成以及AP-1/HO-1表达而发挥抗炎作用^[10],从

炎性通路抑制肝癌的进程。近年来,随着罗汉果活性成分、结构和功能研究的不断深入,其抗肿瘤活性已成为目前研究的热点,但其有效活性成分及其机制依然不清。因此,本研究以罗汉果为研究对象,依托网络药理学、Genecards、DAVID等数据库平台,采用CCK-8、流式细胞术、Western blot等检测方法,通过对罗汉果活性成分与靶点的筛选、肝癌相关靶点的检索、“成分-靶点-疾病-通路”之间的复杂网络体系的构建及细胞实验等,拟探讨罗汉果抗肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)可能的潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 罗汉果抑制肝细胞癌的网络药理学-分子对接分析

1.1.1 活性成分分析及靶点的筛选 以“罗汉果”为关键词,以药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 为参数,应用中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)筛选罗汉果药效成分^[11]。应用

PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)检索罗汉果药效成分的分子结构和化学表达式。以Probability ≥ 0.7 为筛选参数,依据其二维和三维结构相似性在TCMSP数据库、STITCH数据库(<http://stitch.embl.de/>)和Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中精确预测药效成分调控的靶点。对上述三库预测获取靶点进行汇总,去除重复项后,筛选出罗汉果活性成分靶点。应用Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org>)进行靶点蛋白和基因信息的校正,筛选得到物种为“*Homo sapiens*”的罗汉果活性成分潜在作用靶点。

1.1.2 肝细胞癌疾病靶点的获取 以“Hepatocellular carcinoma”为关键词,应用OncoDB.hcc(<http://oncodb.hcc.ibms.sinic.edu.tw/>)和Genecards数据库(<https://www.genecards.org>)检索与肝细胞癌相关的疾病靶点,合并疾病靶点数据和去除重复项,通过Uniprot数据库对疾病靶点进行靶点-基因转换。

1.1.3 罗汉果治疗肝细胞癌靶点的预测 应用Venny平台(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将罗汉果药效成分作用靶点与肝细胞癌的疾病靶点取交集和绘制Venn图,筛选出罗汉果治疗肝细胞癌的潜在作用靶点。

1.1.4 药物-成分-疾病-靶点网络构建 依据罗汉果药效成分及其潜在作用靶点、肝细胞癌相关疾病靶点,应用Cytoscape 3.8.2软件构建“药物-成分-疾病-靶点”关联网络图。

1.1.5 药物-疾病靶点蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI)网络构建及关键靶点筛选 限定物种为“*Homo sapiens*”,以置信度得分 >0.9 为筛选条件,应用生物分子功能注释系统STRING数据库(<https://www.string-db.org>)分析罗汉果药物成分和肝细胞癌交集靶点之间的相互关系;运用Cytoscape软件构建和分析蛋白互作PPI网络图;采用Network Analyzer工具分析PPI中节点度值和确定核心作用靶点。

1.1.6 罗汉果治疗肝细胞癌的蛋白模块分析 以Cytoscape软件中的MCODE插件为蛋白模块筛选工具,以节点得分 $=0.2$ 、degree $=2$ 、 k -core $=2$ 、最大深度 $=100$ 为参数,从PPI中获取关键蛋白模块^[12]。

1.1.7 GO功能和KEGG通路富集分析 以 $P \leq 0.05$ 为显著性筛选标准,限定物种为“*Homo sapiens*”,应用DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)分析关键蛋白模块,GO富集分析关键蛋白模块的功能,KEGG

富集分析关键蛋白模块的相关信号通路。运用WPS软件Excel表格绘制GO富集分析图,OmicShare软件(<http://www.omicshare.com/tools/>)绘制KEGG富集气泡图^[13]。

1.1.8 主要活性成分-核心靶点-关键通路-疾病网络图构建 为了系统地解释罗汉果抗肝细胞癌的作用机制,将上述分析筛选得到的罗汉果主要活性成分、活性成分与肝细胞癌共同核心靶点、关键信号通路及相关疾病数据应用WPS Excel分类处理后,输入Cytoscape 3.8.2软件构建药物化合物-靶点-通路-疾病网络图。

1.1.9 分子对接分析 通过上述分析后,选取山萘酚(MOL000422)为抑制肝癌细胞增殖的研究药物,在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载其2D结构,在PDB(Protein Data Bank)蛋白数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载潜在作用靶点。应用Chem 3D 22.0和Open Babel 2.4.1对其进行格式转换和构象优化,所得分子经AutoDock Tools 1.5.7处理后,采用AutoDock Vina软件将配体分子分别与潜在靶点进行虚拟对接。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞 人肝癌细胞株HepG2和正常细胞株LO2由本实验室留存。细胞接种于含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和1%青/链霉素的DMEM完全培养基中,在5% CO₂、37 °C和饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 试剂与仪器 DMEM培养液、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青/链霉素双抗购自美国Gibco公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、CCK-8检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; Anti-AKT1(phospho S473)、Anti-NF- κ B p65、Anti-JNK1、Anti-Caspase-3、Anti- β actin单克隆抗体及Goat Anti-Rabbit IgG(HRP)二抗购自英国Abcam公司; 山萘酚由本实验室采用超声辅助回流法提取、硅胶吸附和柱层析纯化获得,其纯度为98.21%。

CO₂培养箱购自日本三洋电机株式会社;凝胶成像分析系统、多功能酶标仪、Western blot检测系统购自美国Bio-Rad公司;冷冻离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司;流式细胞仪购自美国BD公司。

1.2.3 细胞毒性实验 将LO2和HepG2细胞分别以 5×10^4 个/mL的浓度接种于96孔板,100 μ L/孔,于37 °C、95%湿度和5% CO₂条件下培养24 h(细胞完

全贴壁),加入含不同浓度(0、10、20、40、60、80 $\mu\text{g/mL}$)山萘酚的完全培养基(每个浓度5个复孔),分别培养24、48、72 h后,应用CCK-8试剂盒检测不同药物浓度对HepG2和LO2细胞活力的影响,具体操作参照CCK-8试剂盒说明书。

1.2.4 药物作用浓度的筛选 将浓度为 5×10^4 个/mL的对数期HepG2细胞接种于96孔板,100 μL /孔,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、95%湿度和5% CO_2 条件下培养24 h(细胞完全贴壁),分别加入含0、10、15、20、25、30、35、40、45 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚的完全培养基(每个浓度5个复孔),继续培养24 h后,应用CCK-8试剂盒检测不同药物浓度对HepG2细胞活力的影响,具体操作参照CCK-8试剂盒说明书。

1.2.5 细胞凋亡检测 将对数期HepG2细胞以 5×10^4 个/mL的浓度接种于6孔板,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、95%湿度和5% CO_2 条件下培养24 h(细胞完全贴壁)后,分别加入含0、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚的完全培养基(每个浓度3个复孔),继续培养;24 h后收集细胞,应用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒检测细胞周期,具体操作参照试剂盒说明书。

1.2.6 相关蛋白表达水平的检测 将1 mL对数期HepG2细胞(1×10^4 个/mL)接种于25 cm^2 培养瓶,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和100%饱和湿度条件下培养24 h(待细胞完全贴壁)后,弃培养液,分别加入含0、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚的完全培养基,继续培养;24 h

后收集细胞,加入适量RIPA细胞裂解液提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度,具体操作参照试剂盒说明书;加入蛋白上样缓冲液,煮沸变性;应用SDS-PAGE凝胶电泳进行蛋白分离,分离蛋白转移至PVDF膜,以5%脱脂奶粉37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h,分别加入Anti-AKT1、Anti-NF- κB p65、Anti-JNK1、Anti-Caspase-3和Anti- β actin一抗(稀释浓度均为1:800),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;加入Goat Anti-Rabbit IgG(HRP)二抗(稀释浓度为1:1 000),室温孵育2 h,加入ECL化学发光液孵育,置于化学发光成像系统进行检测;应用Image Lab软件分析相关蛋白的表达水平。

2 结果与分析

2.1 罗汉果有效成分筛选及作用靶点预测

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TC-MSP)检索罗汉果有效成分,经筛选共有11个有效成分被纳入研究,见表1。将收集得到的罗汉果靶点删除重复项后,得到罗汉果有效成分作用靶点共77个。

2.2 罗汉果治疗肝细胞癌靶点预测分析

经TCMSP、Swiss Target Prediction和STITCH数据库筛选和预测罗汉果有效成分作用靶点,去除重复项后,获得潜在作用靶点77个。经OncoDB.hcc和Genecards数据库检索肝细胞癌治疗靶点,去除重复项后,获得7 773个肝细胞癌治疗靶点。应用Venny平台对罗汉果有效成分潜在作用靶点与肝细胞癌治疗靶点取交集,

表1 罗汉果有效成分信息表

Table 1 Information of active ingredients screened from *Siraitia grosynorii*

分子编号 MOL ID	分子名称 Molecule name	口服生物利用度/% Oral bioavailability /%	类药性 Drug likeness
MOL010070	11-oxo-mogroside II A1	37.63	0.22
MOL010072	11-oxo-mogroside II E	32.77	0.21
MOL010105	(S)-2-methylbutyl-4-(4-decyloxybenzylideneamino)	45.01	0.71
MOL010131	Mogroester	41.69	0.31
MOL001494	Mandenol	42.00	0.19
MOL001506	Supraene	33.55	0.42
MOL001749	ZINC03860434	43.59	0.35
MOL002140	Perlolyrine	65.95	0.27
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24
MOL009295	Flazin	94.28	0.39

得到罗汉果治疗肝细胞癌的潜在靶点62个(图1)。

2.3 药物-成分-疾病-靶点网络图

将罗汉果有效成分、肝细胞癌及其潜在治疗靶点数据导入Cytoscape 3.8.2软件中, 进行“药物-成分-疾病-靶点”关系网络绘制和分析, 结果表明, 罗汉果6个药效成分通过调控 62个靶点参与肝细胞癌的治疗(图2)。

2.4 PPI网络及核心靶点网络图构建

经STRING平台处理 62个潜在靶点后, 获得一个由 62个节点和 393条相互作用线组成的初级 PPI 网络图, 平均节点度为 12.7。将 STRING数据库得

到的数据导入 Cytoscape 3.8.2软件, 在节点得分为 0.2、度值为 2、*k*-core为 2、最大深度为 100的参数条件下, 运用 MCODE筛选到一个由 19个靶点组成的关键蛋白模块(图3)。应用 CytoHubba筛选得到最有意义的前 10个靶点: AKT1、TNF、MAPK8、JUN、PTGS2、CASP3、PPARG、HMOX1、AHR和RELA, 即为蛋白互作网络中的核心靶点(图4)。

2.5 潜在靶点的GO功能富集分析和KEGG通路富集分析

将 62个共同靶点上传至 DAVID数据库进行 GO 功能富集分析和 KEGG通路富集分析, 以 *P*<0.05为

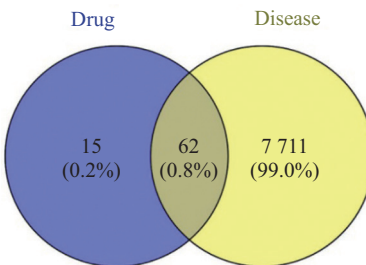


图1 罗汉果成分靶点与肝细胞癌靶点Venn图

Fig.1 Venn diagram of *Siraitia grosvenorii* component targets and hepatocellular carcinoma targets

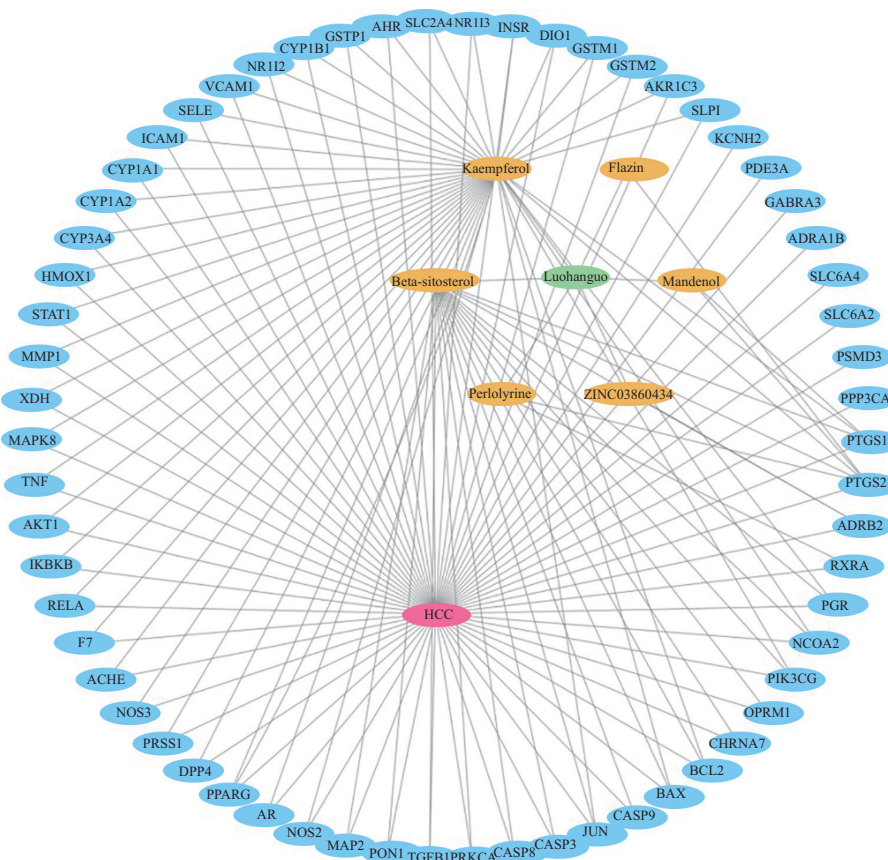


图2 罗汉果“药物-成分-疾病-靶点”网络图

Fig.2 “Drug-component-disease-target” network of *Siraitia grosvenorii*

筛选标准, 获得GO富集条目总数275条, 其中生物学过程(biological process, BP) 198条, 主要涉及有机环化合物反应、雌二醇的反应、脂多糖反应、缺氧反应、药物反应、凋亡过程正调控等; 细胞成分(cel-

lular component, CC) 25条, 主要涉及膜筏、内质网膜、胞质、胞外间隙、线粒体等; 分子功能(molecular function, MF) 52条, 其与血红素结合、酶结合、转录调控DNA结合、蛋白质同聚活性、转录因子结

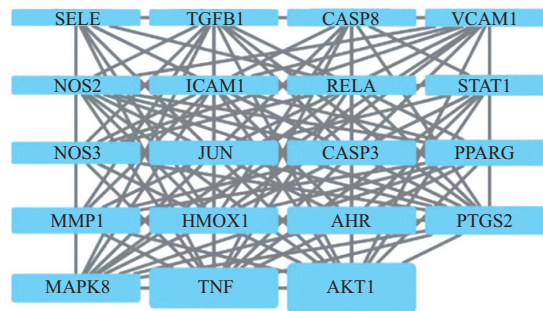


图3 罗汉果治疗肝细胞癌的关键蛋白交互模块

Fig.3 Key protein interaction module of *Siraitia grosvenorii* in the treatment of hepatocellular carcinoma

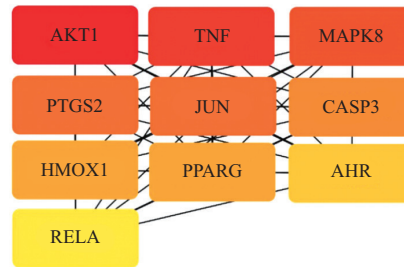


图4 罗汉果治疗肝细胞癌的核心靶点PPI网络

Fig.4 PPI network of the core target of *Siraitia grosvenorii* in the treatment of hepatocellular carcinoma

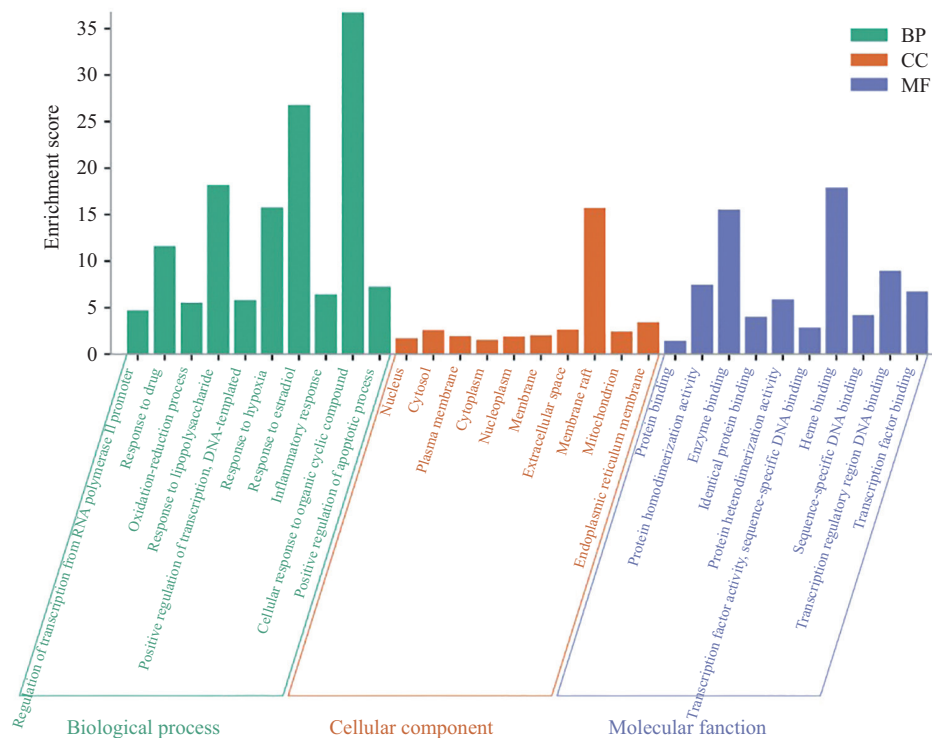


图5 GO功能富集分析柱状图

Fig.5 Histogram of GO function enrichment analysis

合等相关。均选择排名靠前的10个条目作图(图5)。KEGG通路富集分析获得87条通路, 主要涉及癌症信号通路(21个靶点占33%)、乙型肝炎信号通路(15个靶点占24%)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路(13个靶点占21%)、非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)信号通路(13个靶点占21%)等; 按基因数目排序选取前20条信号通路作气泡图, 见图6。

2.6 罗汉果有效成分-靶点-通路-疾病网络图

经Cytoscape 3.8.2软件分析, 获得药物化合物-靶点-通路-疾病网络图, 见图7所示, 5个罗汉果主要的

活性成分, 10个核心靶点, 20个KEGG信号通路节点间彼此紧密相互作用。

2.7 分子对接分析

罗汉果山萘酚配体分别与潜在作用靶点p65、Caspase-3、JNK1和AKT1四个受体经AutoDock Vina软件进行分子化合物虚拟对接结果表明(图8), 其结合自由能分别为-6.6、-7.8、-8.3和9.1 Kcal/mol。

2.8 细胞实验验证结果

2.8.1 细胞毒性分析 10 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚作用24 h后, HepG2细胞的增殖速度开始下降, 在20~80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制作用显著增强($P>0.05$ 或 $P>0.01$)(图9A); 而

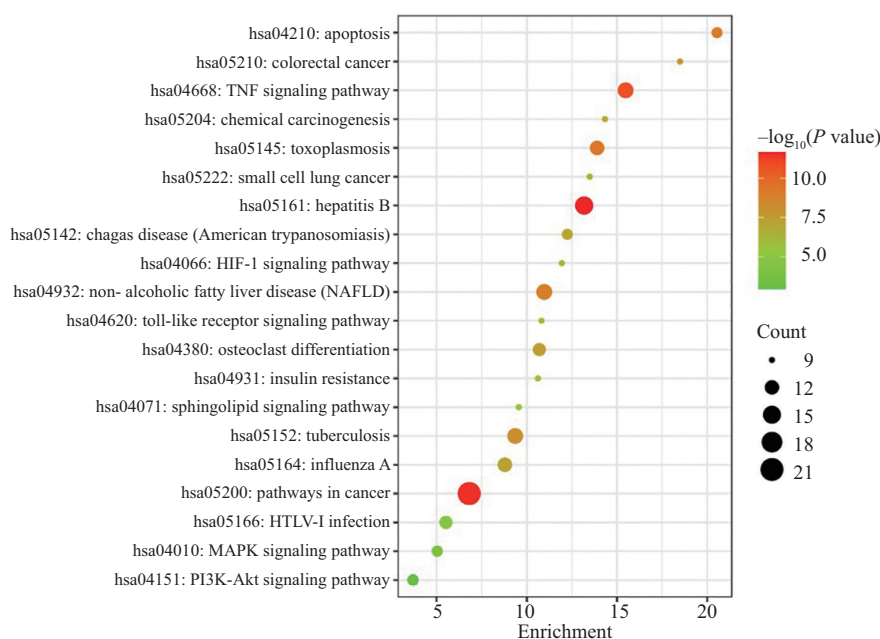


图6 KEGG功能富集分析气泡图

Fig.6 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis

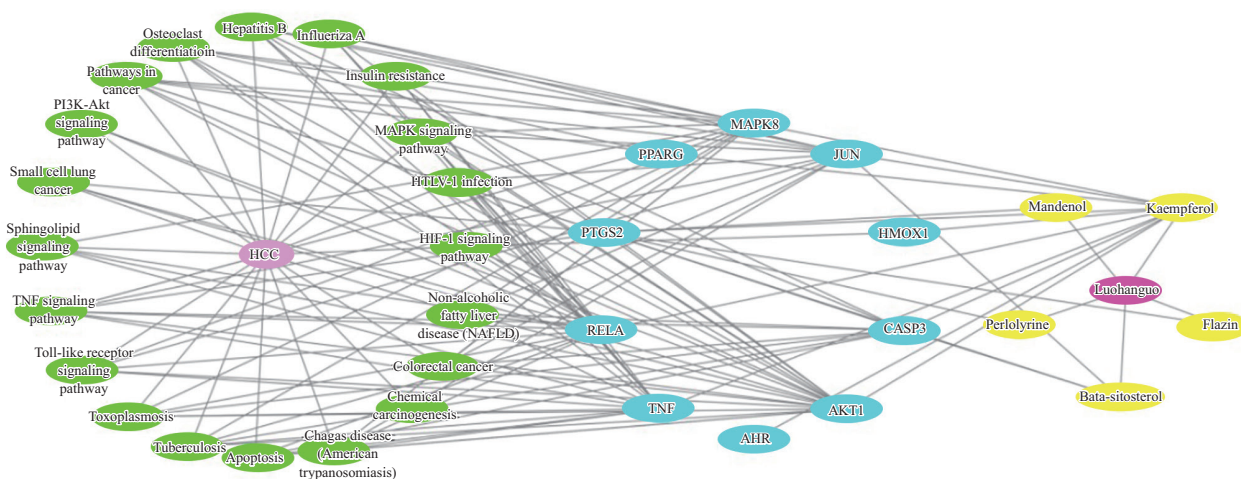


图7 罗汉果治疗肝细胞癌的有效成分-靶点-通路-疾病网络图

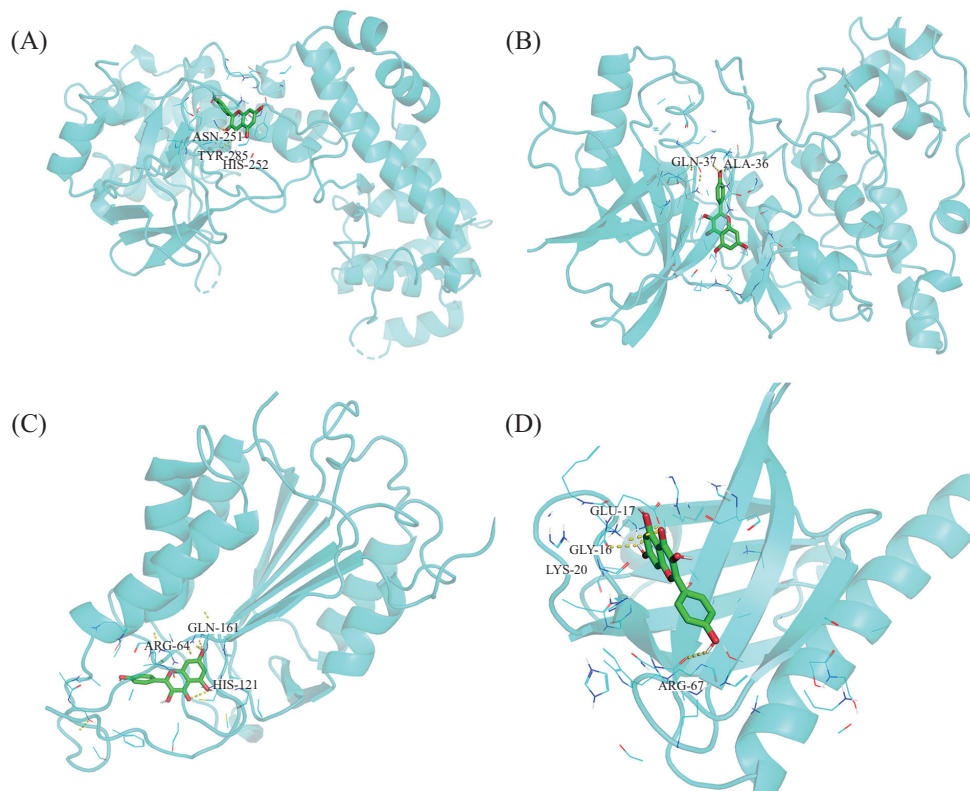
Fig.7 Network diagram of active component-target-pathway-disease of *Siraitia grosvenorii* in the treatment of HCC

对于LO2而言, 10 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚有促进增殖作用, 当浓度在40 $\mu\text{g/mL}$ 以上作用48 h后, LO2细胞增殖速度开始减缓, 且随着药物浓度和作用时间的增加, 抑制效果逐步增强(图9B)。这一结果提示, 为降低山萘酚对人体正常细胞毒性和提高其对肿瘤细胞的抑制率, 可以采用低浓度(0~45 $\mu\text{g/mL}$)和短时间(24 h)处理措施开展后续研究。

2.8.2 药物浓度筛选分析 不同浓度山萘酚作用

24 h后, CCK-8检测结果如图9所示, 10 $\mu\text{g/mL}$ 以下的山萘酚对HepG2细胞增殖没有明显的抑制作用; 浓度增加至20 $\mu\text{g/mL}$ 以上后, 其抑制活性显著增强, 呈现明显的剂量依赖关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图10)。依据上述实验结果, 选择浓度为0、20、25和30 $\mu\text{g/mL}$ 的山萘酚进行HepG2细胞的后续实验。

2.8.3 山萘酚对HepG2细胞凋亡的影响 不同浓度山萘酚作用24 h的HepG2细胞凋亡检测显示, 对



A: 山萘酚与p65蛋白分子对接图; B: 山萘酚与JNK1蛋白分子对接图; C: 山萘酚与Caspase-3蛋白分子对接图; D: 山萘酚与AKT1蛋白分子对接图。

A: docking diagram of kaempferol and p65 molecule; B: docking diagram of kaempferol and JNK1 molecule; C: docking diagram of kaempferol and Caspase-3 molecule; D: docking diagram of kaempferol and AKT1 molecule.

图8 山萘酚与潜在作用靶点对接图

Fig.8 Docking diagram between kaempferol and potential targets of action

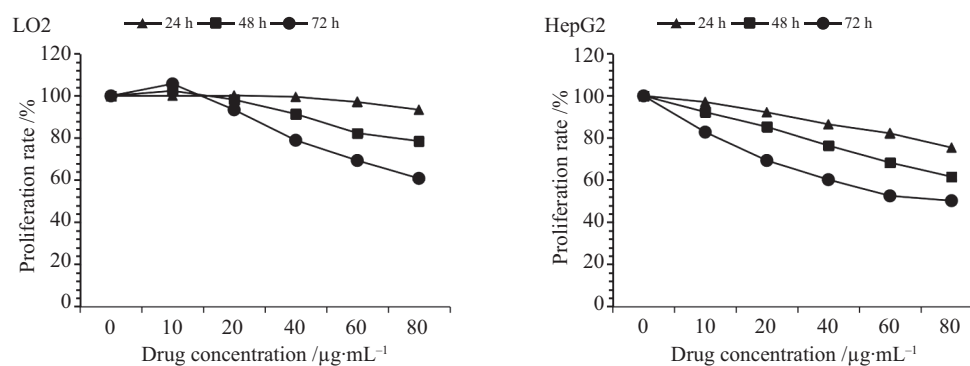
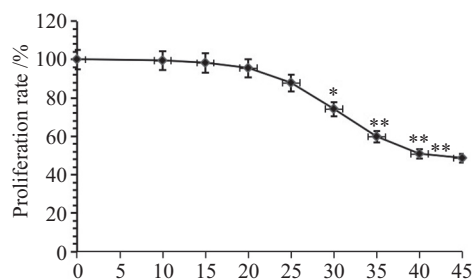


图9 山萘酚对LO2和HepG2细胞的毒性作用

Fig.9 Toxic effects of kaempferol on LO2 and HepG2 cells

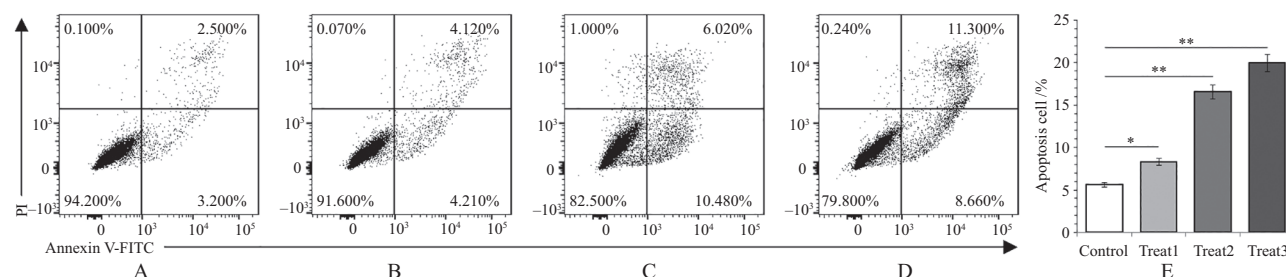


* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 与Control组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the Control group.

图10 CCK-8法检测不同浓度山萘酚对HepG2细胞增殖的影响

Fig.10 Effects of different concentrations of kaempferol on HepG2 cell proliferation



A: 对照组; B: 20 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; C: 25 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; D: 30 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; E: 统计分析结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A. Control group; B. Treat1 (20 $\mu\text{g/mL}$) group; C. Treat2 (25 $\mu\text{g/mL}$) group; D. Treat3 (30 $\mu\text{g/mL}$) group; E. statistical analysis. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图11 山萘酚对HepG2细胞凋亡的影响

Fig.11 Effect of kaempferol on HepG2 cell apoptosis

照组(图11A)总凋亡率为5.67%, 药物作用组分别为8.31%(20 $\mu\text{g/mL}$, Treat1, 图11B)、16.57%(25 $\mu\text{g/mL}$, Treat2, 图11C)和19.98%(30 $\mu\text{g/mL}$, Treat3, 图11D); 与对照组比较, 各药物处理组HepG2细胞凋亡率显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$, 图11E); Treat2与Treat3组间差异不明显($P>0.05$), 但与Treat1组间均存在显著性差异($P<0.01$)。

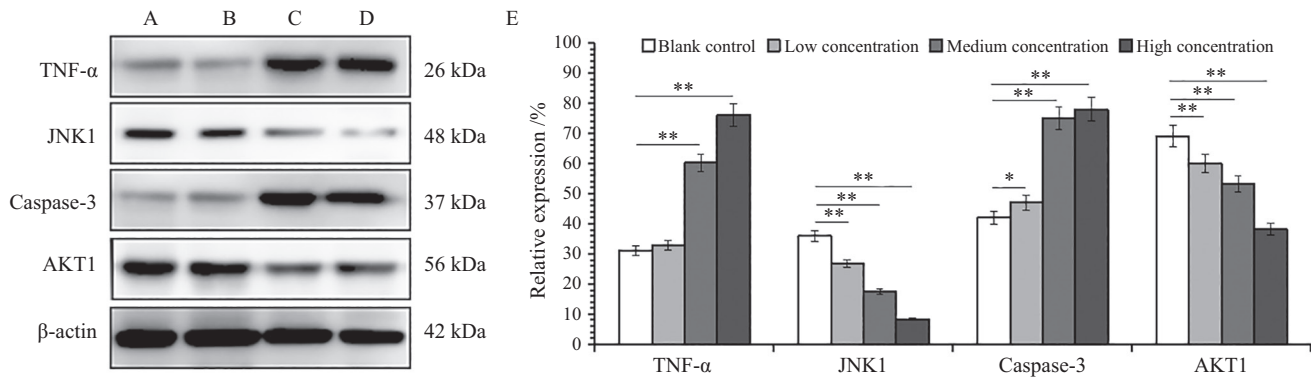
2.8.4 山萘酚对HepG2细胞中AKT1、RelA、JNK1和Caspase-3蛋白表达水平的影响 经Western blot检测分析显示, 经山萘酚干预后, HepG2细胞中p65表达水平在Treat2和Treat3组中显著上调($P<0.01$); JNK1、Caspase-3和AKT1表达水平在各药物组中均显著下调(图12)。

3 讨论与结论

近年来, 随着系统生物学研究领域的快速发展, 网络药理学也随之得到了进一步完善和补充。网络药理学是以疾病-基因-药物相互作用网络为基础, 系统地分析药物组分与疾病之间的互作关系, 结束了“一个药物、一个靶点、一种疾病”的研究模式, 开启了“多靶点、多成分”的新研究模式, 为中医药

的研究提供了新的研究思路和技术手段^[14-15]。

本文根据网络药理学检索出罗汉果11个有效成分, 包括山萘酚、 β -谷甾醇、罗汉果皂苷II E等。山萘酚是一种常见的黄酮类化合物, 目前应用于癌症化疗, 对肺癌、肝癌、结肠癌、口腔癌、膀胱癌、卵巢癌等有抑制作用^[16]。研究表明, 山萘酚通过下调miR-21和上调PTEN以及失活PI3K/AKT/mTOR信号通路来抑制HepG2细胞的增殖、迁移和侵袭^[17]。本实验研究中CCK-8细胞活力分析显示, 20~40 $\mu\text{g/mL}$ 山萘酚在24 h以内对正常肝细胞LO2有微弱的抑制作用, 但具有显著抑制HepG2细胞增殖的作用, 提示其可能对正常细胞的毒性作用较低, 具有选择性抑制肝癌细胞的功效。同时, 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上山萘酚能有效促进HepG2细胞过早凋亡, 提高HepG2细胞的凋亡率, 提示山萘酚可能通过细胞凋亡途径, 抑制HepG2细胞的增殖。亦有研究报道, β -谷甾醇可抑制由脂多糖/D-半乳糖胺诱导的小鼠急性肝损伤^[18], 罗汉果皂苷II E通过降低白细胞介素9(interleukin-9, IL-9)的水平来改善小鼠胰腺炎^[19]。由此可知, 罗汉果富含多种抗肿瘤活性成分, 但其作用机制不尽相同, 有待通过活性成分的分离和分子药理研究进一步探明其



A: 对照组; B: 20 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; C: 25 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; D: 30 $\mu\text{g/mL}$ 处理组; E: 统计分析结果; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: Control group; B: Treat1 (20 $\mu\text{g/mL}$) group; C: Treat2 (25 $\mu\text{g/mL}$) group; D: Treat3 (30 $\mu\text{g/mL}$) group; E: statistical analysis; * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图12 山萘酚对p65、JNK1、Caspase-3和AKT1表达水平的影响

Fig.12 Effect of Kaempferol on p65, JNK1, Caspase-3 and AKT1 expression levels

具体的作用机制。

根据GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,罗汉果可能通过转录因子结合、凋亡过程调控、酶结合、缺氧反应等生物过程及癌症通路、Hepatitis B信号通路、TNF信号通路等发挥抗肝细胞癌作用。已有研究表明PI3K/AKT通路与细胞增殖、凋亡、自噬和炎症相关,可通过PI3K/AKT/mTOR通路抑制肝癌的生长和侵袭,诱导肝癌细胞凋亡和自噬,增强抗肿瘤作用^[20]。本研究通过网络药理学分析共筛选获得罗汉果抗肝癌活性成分11个,作用关键靶点10个,选取抗癌作用靶点与通路相对一致的山萘酚为研究药物,增殖和凋亡途径中的关键分子RelA(p65)、JNK1、Caspase-3和AKT1为检测分子,验证山萘酚是否通过与上述关键分子的相互作用调控肝癌细胞的增殖和凋亡过程。

RelA又名p65,是NF- κ B家族的主要成员之一,具有特殊的反式激活结构,通过调控下游多种靶基因的转录活性参与细胞的增殖和凋亡过程^[21]。有研究表明,RelA结构域中存在与抑制因子I κ B结合的位点,当I κ B与核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)区结合后,覆盖了RelA上与其他因子的结合位点,使得RelA无法识别活化信号而处于失活状态并在细胞中大量积聚,从而抑制NF- κ B的活化,使其不能进入细胞核内,影响下游基因的表达,导致细胞增殖受限和促进细胞凋亡^[22]。本研究Western blot检测结果显示,与对照组相比,山萘酚组HepG2细胞中RelA表达水平显著增加,提示山萘酚可能通过上述方式抑制HepG2细胞的增殖,具体机制有待进一步研究。

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNKs)与p65蛋白在TNF- α 活化细胞凋亡信号通路中通过启动不同的下游靶基因来发挥互相拮抗的作用。JNK以肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)相关死亡区蛋白(TNFR associated death domain, TRADD)为桥梁,与Fas相关死亡域蛋白(Fas-associated with death domain protein, FADD)结合并激活半胱氨酰天冬氨酸特异蛋白8(Caspase-8),进而激活其他Caspase家族成员(Caspase-3、6和7),最终导致大量细胞凋亡^[23]。本研究中,山萘酚处理后JNK1的表达水平下降,而RelA/p65表达水平升高,揭示山萘酚可能通过JNK1和p65的互相拮抗发挥抗肿瘤活性。

PI3K/AKT信号通路是一条经典的细胞信号通路,在肿瘤细胞的发生、发展、转移中发挥重要的作用^[24]。PI3K可在血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、类胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等以及有丝分裂原的作用下活化,活化的PI3K在接受来自酪氨酸激酶受体和G蛋白偶联受体信号后,PI3K的p85亚基被募集到邻近质膜的部位并与p110亚基结合,将底物PIP2转化为PIP3,PIP3可与蛋白激酶B(serine/threonine kinase 1, AKT)的N-端PH结构域结合,将AKT从细胞质转移到细胞膜,并在磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(phosphoinositide dependent protein kinase 1, PDK1)辅助下,通过使AKT蛋白上的苏氨酸磷酸化位点(Thr308)和丝氨酸磷酸化位点(Ser473)磷酸化而使其激活^[25]。活化后的AKT可通过直接和间接途

径激活其底物衰老关键调节因子-雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、NF- κ B和抑制Forkhead家族转录因子表达,从而促进细胞周期加速和增殖^[26]。在本研究中,在山萘酚作用下AKT1表达水平下降,提示山萘酚可能通过负向调控AKT1抑制HepG2细胞的增殖。

综上所述,本文应用网络药理学-分子对接方法从理论水平分析和筛选出罗汉果治疗肝癌的活性成分山萘酚及其潜在的关键靶点(RelA/p65、JNK、Caspase-3和AKT1)和信号通路。经细胞验证实验表明,适宜浓度的山萘酚具有抑制HepG2增殖和促进其凋亡的活性,其分子机制可能是通过与癌症、乙型肝炎、肿瘤坏死因子等信号通路中关键分子的相互作用来实现的。然而网络药理学的数据分析显示,罗汉果具有多成分、多靶点、多通路的功效和作用特点,因此仅从一种或几种成分和部分通路中少数关键分子的粗浅分析尚不能全面系统地揭示其抑癌的具体机制。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33.
- [4] CHEN Z Q, XIE H, HU M M, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma [J]. Am J Cancer Re, 2020, 10(9): 2993-3036.
- [5] YANG J D, HAINAUT P, GORES G J, et al. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management [J]. Nat Rev Gastro Hepat, 2019, 16(10): 589-604.
- [6] 吴文龙, 王权成, 孟强, 等. 小檗碱对肝癌细胞活性与增殖能力的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志(WU W L, WANG Q C, MENG Q, et al. Effect and mechanism of berberine on the activity and proliferation of hepatoma cells [J]. Med J Chin PLA, 2023, 48(6): 653-62.
- [7] 梁业飞, 黄盼玲, 李叔惠, 等. 罗汉果皂苷对肥胖小鼠脂代谢的改善作用研究[J]. 中国畜牧兽医(LANG Y F, HUANG P L, LI S H, et al. Effect of mogrosides on lipid metabolism in obese mice [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(6): 2129-36.
- [8] 刘灿, 蔡天宇, 赵晓萌, 等. 罗汉果提取物诱导肺癌细胞A549凋亡的研究[J]. 中国药理学通报(LIU C, CAI T Y, ZHAO X M, et al. Apoptosis effect of Siraitia grosvenorii extracts on lung cancer cells A549 and its mechanisms [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2015, 31(9): 1310-4.
- [9] 符毓夏, 王磊, 李典鹏. 罗汉果醇抗肿瘤活性及其作用机制研究[J]. 广西植物(FU Y X, WANG L, LI D P, et al. Activity and mechanism of anticancer properties of mogrol [J]. Guihaia, 2016, 36(11): 1369-75.
- [10] LI Y, ZOU L Y, LI T, et al. Mogroside V inhibits LPS-induced COX-2 expression/ROS production and overexpression of HO-1 by blocking phosphorylation of AKT1 in RAW264.7 cells [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 2019, 51(4): 365-74.
- [11] 宋爱珍, 周杨, 尚春光, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨加味孔圣枕中丹治疗痴呆的分子机制[J]. 世界中医药(SONG A Z, ZHOU Y, SHANG C G, et al. Mechanism of modified Kong-sheng Zhenzhong pills in the treatment of dementia based on Network pharmacology and experimental validation [J]. World Chinese Medicine, 2023, 18(15): 2110-20.
- [12] 房立源, 李慧杰, 王志鹏, 等. 基于网络药理学研究二仙汤治疗乳腺癌的作用机制[J]. 中国医院用药评价与分析(FANG L Y, LI H J, WANG Z P, et al. Research on mechanism of Erxian Decoction in the treatment of breastcancer based on network pharmacology [J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China, 2021, 21(8): 908-14.
- [13] 章晓云, 张驰, 宋世雷, 等. 基于网络药理学和蛋白模块分析淫羊藿治疗骨关节炎的作用与机制[J]. 中国组织工程研究(ZHANG X Y, ZHANG C, SONG S L, et al. Mechanisms of Epimedium in the treatment of osteoarthritis based on network pharmacology and protein module [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2020, 24(17): 2660-6.
- [14] LEE W Y, LEE C Y, KIM Y S. The methodological trends of traditional herbal medicine employing network pharmacology methods [J]. Biomolecules, 2019, 9(8): 362.
- [15] ZHANG R Z, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional chinese medicine: review and assessment [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 123.
- [16] IMRAN M, SALEHI B, SHARIFI-RAD J, et al. Kaempferol: a key emphasis to its anticancer potential [J]. Molecules, 2019, 24(12): 2277.
- [17] ZHU G L, LIU X L, LI H J, et al. Kaempferol inhibits proliferation, migration, and invasion of liver cancer HepG2 cells by down-regulation of microRNA-21 [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2018, 32: 2058738418814341.
- [18] YIN Y X, LIU X F, LIU J P, et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/d-galactosamine- induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice [J]. Bioorg Med Chem lett, 2018, 28(9): 1525-33.
- [19] XIAO J, HUANG K, LIN H M, et al. Mogroside IIE inhibits digestive enzymes via suppression of interleukin 9/interleukin 9 receptor signalling in acute pancreatitis [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 859.
- [20] 靳宜静, 李堪董, 詹智晖, 等. 黄芩苷介导PI3K/AKT通路减轻脂多糖诱导的心肌细胞凋亡及炎症反应[J]. 中国细胞生物学学报(JIN Y J, LI K D, ZHAN Z H, et al. Baicalin mediates PI3K/AKT pathway to reduce the apoptosis and inflammation of cardiomyocytes induced by lipopolysaccharide [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45(9): 1293-301.
- [21] YUAN D, MA R, SUN T, et al. Knockdown of RSPH14 inhibits proliferation, migration, and invasion and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma via RelA [J]. Cancer Cell Int, 2022, 22:

- 129.
- [22] WU M, ZHANG Y. MiR-182 inhibits proliferation, migration, invasion and inflammation of endometrial stromal cells through deactivation of NF- κ B signaling pathway in endometriosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(3): 1575-88.
- [23] ZHAO W, LIN T, FANG Z, et al. NAT10 promotes the malignant progression of hepatocellular carcinoma through upregulating RelA/p65 acetylation [J]. *J Biol Reg Homeos Ag*, 2023, 37(6): 2935-46.
- [24] FATTABI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: epigenetics and beyond [J]. *Life Sciences*, 2020, 262: 118513.
- [25] YILMAZ S, DOĞANYIĞIT Z, OFLAMAZ A O, et al. Determination of Rutin's antitumoral effect on EAC solid tumor by AgNOR count and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Med Oncol*, 2023, 40(5): 131.
- [26] TLILI H, MACOVEI A, BUONOCORE D, et al. The polyphenol/saponin-rich *Rhus tripartita* extract has an apoptotic effect on THP-1 cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *BMC Complement Med*, 2021, 21(1): 1-13.