

蒙药古日古木—13含药血清通过Akt途径抑制肝癌细胞的增殖探析

李璇¹, 苏丽娅², 孙孟筱¹, 张海峰^{1*}

(1. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010050)

【摘要】目的 探讨蒙药古日古木—13中的有效成分对HepG2肝癌细胞的增殖迁移的抑制及其作用机制。方法 20只Wistar大鼠按照随机数表法分为空白、低、中、高剂量药物组,每日一次进行灌胃,一周后心尖取血,制备含药血清完成培养基处理HepG2肝癌细胞,利用IncuCyteZoom动态细胞成像系统筛选含药血清作用最适浓度,选择最适浓度的含药血清作用于划痕处理的细胞,观察其迁移情况。通过网络药理学确定药物成分和疾病的共同蛋白,确定关键作用通路。蛋白免疫印迹检测Akt、p-Akt、mTOR、P-mTOR蛋白表达。结果 IncuCyte分析结果显示中浓度的含药血清对HepG2增殖抑制最明显。IncuCyte显示细胞划痕后,中浓度组合含药血清处理的肝癌细胞迁移率下降,组间差异有统计学意义($P < 0.05$),抑制HepG2增殖。利用数据库筛选药物成分和疾病的共同靶点,Cytoscape平台分析出关键交叉蛋白是Akt,最后通过KEGG富集分析获得关联度较高的Akt相关信号通路。Western blot结果显示中浓度含药血清作用HepG2肝癌细胞48h后可以下调Akt、p-Akt、mTOR、P-mTOR蛋白表达量,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 经研究发现,蒙药古日古木—13有效成分对HepG2肝癌细胞的增殖和迁移都有抑制作用,作用时间在48h开始明显,Akt是最关键的蛋白靶点。

【关键词】蒙药古日古木—13;含药血清;肝癌细胞;Akt/mTOR信号通路;网络药理学

中图分类号: R471.5

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)03-0262-04

原发性肝癌是全球严重的恶性肿瘤之一,也是目前癌症相关死亡的第二大原因。更糟糕的是一旦出现临床症状,大多数患者已经处于晚期,生存率低、生活质量差,疾病负担难以承受。中国的情况尤为严峻,每年占全球肝癌新发病例和死亡人数的一半以上^[1]。目前,肝癌的治疗方法除了化疗、放疗、药物处理之外,还涉及手术摘除^[2]。然而化疗不适合大部分患者,而药物治疗产生的药物毒性不良反应容易影响预后疗效。近几年来蒙药发展迅速,其在临床上的应用也逐渐增多,古日古木—13是中国蒙药的一个传统药方,由众多成分组合而成。其包括红花、木香、栀子、麝香、麦冬、川楝子、牛黄、诃子、银朱、紫檀香、水牛角、丁香及莲子等十三味药材^[3]。目前,古日古木—13已经在临床上用于治疗肝脏相关疾病^[4]。本课题组前期对大鼠药物灌胃一周后心尖取血,得到的血清通过HPLC法检测出活性成分有鞣花酸和没食子酸^[5]。本实验通过确定含药血清是否对癌细胞的增殖迁移有抑制作用,构建

鞣花酸及没食子酸和肝癌疾病共同靶点的网络药理学框架,分析两种成分对疾病的作用通路,并探索其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

20只Wistar大鼠购于北京斯贝福公司(许可证号:SCXK(京)2019-0010),人肝癌细胞株HepG2为内蒙古医科大学附属医院临床研究中心实验室赠送,古日古木—13购于内蒙古蒙药股份有限公司,胎牛血清、DMEM高糖培养基、胰蛋白酶均购于美国Gibco公司,BCA试剂盒购于北京索莱宝公司,Akt、p-Akt、mTOR、P-mTOR抗体购于Abcam公司, β -actin抗体购于Proteintech公司,二抗购于Proteintech公司。

1.2 动物含药血清制备

药物磨碎后溶于1%吐温中,20只Wistar大鼠

收稿日期: 2022-03-05; 修回日期: 2022-05-25

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS08108); 2022年度内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(202201236)

第一作者: 李璇(1996-),女,2019级在读硕士研究生。E-mail: 1210676691@qq.com

*通信作者: 张海峰,男,博士,教授,硕士研究生导师。研究方向: 脂肪肝相关研究。E-mail: 1980zhanghaifeng@163.com

(180~200 g)按随机数表法分为空白(PBS + 1%吐温80)、低、中、高剂量组,进行灌胃,1次/d,连续7 d,最后一次灌胃前禁食12 h,灌胃后1 h心尖取血离心,56 ℃水浴灭活后用滤器过滤除菌备用。将含药血清和DMEM高糖培养基按1:9比例配成完全培养基,4 ℃冰箱保存。

1.3 细胞培养

HepG2肝癌细胞培养在含胎牛血清的DMEM高糖培养基中,于37 ℃、5%CO₂培养箱中常规培养,取处于对数生长期细胞开展实验。

1.4 IncuCyte 测验细胞增殖能力

收集对数生长期HepG2肝癌细胞,密度调节至 3×10^4 个/mL,铺于96孔板,然后放入37 ℃、5%CO₂培养箱中培养24 h至细胞贴壁,弃去原培养液,将细胞分为NC(含胎牛血清完全培养基),空白、低、中、高剂量组,分别加入200 μL完全培养基。然后放置在IncuCyte活细胞动态成像系统,根据不同实验条件设置好分组并保存,孵育72 h,通过内置软件分析细胞在不同浓度的增殖迁移情况,确定含药血清最适浓度。

1.5 IncuCyte 检测细胞迁移能力

细胞铺板按照方法1.4操作,放入培养箱中培养24 h至细胞贴壁,弃去原培养液,用枪头均匀划出伤口痕迹。PBS洗去漂浮细胞后,将细胞分为NC组、中剂量组,分别加入200 μL完全培养基后置于IncuCyte活细胞动态成像系统,根据不同实验条件设置好分组并保存,孵育72 h,观察细胞迁移情况,HepG2肝癌细胞的伤口面积采用ImageJ软件测量。细胞迁移率=[1-(72 h的伤口面积/0 h的伤口面积)]×100%

1.6 通过网络药理学确定药物作用机制

利用Swiss Institute数据库和TCMSP数据库筛选鞣花酸和没食子酸的药效作用靶点, GeneCards数据库进行肝癌疾病靶点的筛选,对已获得的药物成分靶点和疾病靶点进行取交集筛选重叠交叉蛋白后,利用STRING平台进行蛋白互作网络分析,再利用Cytoscape得到节点度值,绘制柱形图^[6-8]。最后使用DAVID数据库分析靶点蛋白,做出KEGG富集分析,可知介导成分——疾病最关键的信号通路,绘制气泡图。

1.7 免疫印迹实验

取对数生长期HepG2肝癌细胞,将密度调节至 2×10^5 个/mL,并铺于6孔板,37 ℃、5%CO₂培养箱中培养24 h至细胞贴壁,弃去原培养液,将细胞分为

NC组、中剂量组,分别加入2 mL完全培养基(含胎牛血清完全培养基及中浓度古日古木—13含药血清完全培养基),放入培养箱中孵育24 h,48 h,72 h。加入RIPA裂解液提取细胞蛋白,和上样缓冲液按比例混合后放入沸水煮10 min,并根据BCA检测蛋白浓度计算上样量,于SDS-PAGE跑胶,PVDF转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,TBST洗膜后孵育β-actin、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR一抗在4 ℃冰箱过夜,二抗在室温下孵育1 h,TBST洗膜后,ECL显影拍照,使用ImageJ进行条带灰度分析。

1.8 统计学方法

利用ImageJ进行图片灰度分析,使用GraphPad Prism(9.0.0)进行统计分析,二组之间比较使用t检验,三组之间比较使用ANOVA检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 古日古木—13含药血清对HepG2肝癌细胞增殖的影响

利用IncuCyte内置软件,分析各浓度含药血清对肝癌细胞增殖的抑制情况,分析得结果图。不同浓度的含药血清处理HepG2肝癌细胞72 h后,空白、低浓度的含药血清对细胞增殖没有抑制作用,细胞汇合度上升。高、中浓度古日古木—13含药血清对HepG2肝癌细胞的增殖抑制明显低于NC对照组,细胞汇合度下降,且随着作用时间延长汇合度明显降低(见图1A)。从图中结果可看出中浓度组含药血清对肝癌细胞增殖的抑制效果在作用时间上明显优于高浓度组,所以后续实验选择中浓度古日古木—13含药血清处理HepG2肝癌细胞。

接着用中浓度古日古木—13含药血清处理HepG2细胞。IncuCyte表明,中浓度古日古木—13含药血清可抑制HepG2肝癌细胞迁移,含药血清处理细胞72 h后,HepG2肝癌细胞迁移率明显降低(见图1B)。

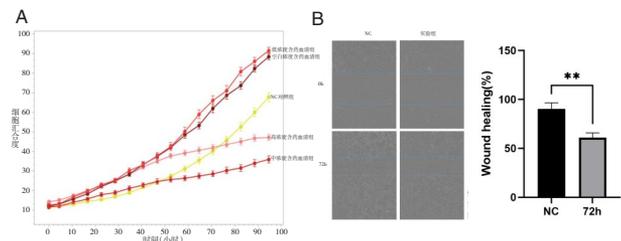


图1 A 不同浓度古日古木—13含药血清对作用HepG2肝癌细胞增殖的影响
B 细胞划痕后,采用中浓度含药血清处理细胞数据来自三次独立实验。**: $P < 0.05$ 。

2.2 网络药理学分析结果

本课题组前期通过液相色谱分析已验证古日古木—13 含药血清中含有鞣花酸及没食子酸两种成分,用数据库对两种成分及肝癌疾病进行靶点筛选整合出 68 种共同作用靶点,利用 STRING 构建“鞣花酸—没食子酸—靶点—肝癌”网络图及蛋白互作网络核心基因分布情况(图 2A 和图 2B)。并通过 Cytoscape 得到节点度值,节点度值越大,该靶点在生物网络中的重要性越高(图 2C),得到 Akt 蛋白是连接成分—疾病最重要的靶点。将共同蛋白通过 DAVID 数据库进行筛选,得到 51 条相关信号通路,分析制作 KEGG 富集分析图(展示前 15 条),颜色的区别代表不同 P 值大小^[9]。颜色越红, P 值越大,富集程度越显著,此通路越重要。原点的大小代表富集到此通路的基因数目多少。富集显著及程度高的信号通路是 Akt 相关信号通路(图 2D)。

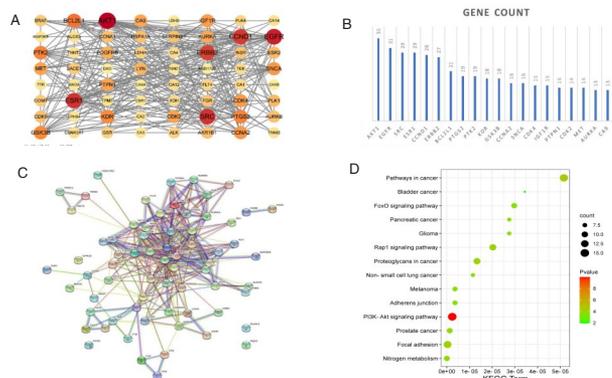


图 2 A 古日古木—13 治疗肝癌的成分—靶点—疾病网络分析图 B 节点度值 C 古日古木—13 治疗肝癌的靶蛋白互作网络图 D KEGG 富集分析图

2.3 古日古木—13 含药血清对 HepG2 肝癌细胞 Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达的影响

Western blot 结果表明不同时间下中浓度含药血清作用肝癌细胞产生的四种增殖蛋白表达的变化(图 3A),用 ImageJ 分析条带灰度值,与 NC 组比较,含药血清处理时间在 48 h 和 72 h 的 HepG2 肝癌细胞 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 显著降低(图 3B)。

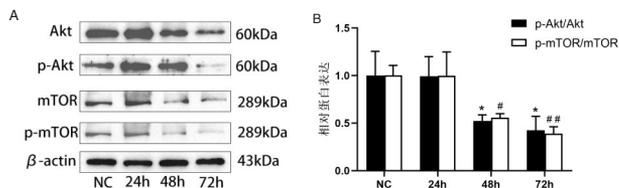


图 3 A Western Blot 分析中浓度含药血清对 HepG2 肝癌细胞 Akt/mTOR 信号通路影响 B 中浓度古日古木—13 含药血清处理 HepG2 肝癌细胞后 Akt/mTOR 信号通路蛋白的表达 数据来自三次独立实验。*、#: P < 0.05; ##: P < 0.01。

3 讨论

蒙药古日古木—13 具有疗效广、不良反应少等优点,目前在临床上已广泛用于肝脏类疾病的治疗,也可以和其他药物联合用于肝脏以外的疾病。Akt/mTOR 是一种细胞内信号转导通路,通过与其相关的上下游分子建立联系从而调节细胞周期、增殖、凋亡、代谢和血管的生成^[10]。在多种癌症类型中, Akt 通常处于高度激活状态, Akt(p-Akt) 的过表达也被认为是许多恶性肿瘤预后的不良指标,促进肿瘤细胞的增殖。mTOR 的主要作用是通过营养信号调节细胞生长和增殖。有临床数据表明肿瘤的分化、浸润深度以及淋巴结转移的程度都与的 mTOR/p-mTOR 的阳性表达有关^[11]。网络药理学是筛选药物疾病靶点和通过生物信息学分析预测可能的潜在机制的有效方法。通过“药—靶—病”交互网络的构建和可视化,分析揭示医药的复杂机制,该方法已在许多研究中成功应用于发现药物的复杂机制^[12]。其使用可视化算法软件捕捉生物系统、药物和疾病之间的数据,展示药物干涉疾病的网络及其对人体的协同效应。网络药理学还在提高药物质量控制、探索药物作用机制、新药开发及安全性、促进精准的临床应用等方面发挥着重要作用^[13]。Incucyte 活细胞成像是可以在培养箱中将细胞状态转为可视化的分析平台,可以减小人为操作对实验的误差,省时省力。目前广泛用于细胞生物学、药物筛选、肿瘤研究等领域。

课题组前期已证实古日古木—13 含药血清中存在鞣花酸及没食子酸两种成分。本实验将药物成分与疾病之间通过网络药理学建立联系,选择最关键的作用靶点,确定药物的作用机制。用含药血清处理肝癌细胞,一定时间内观察细胞的增殖情况,再通过细胞划痕实验验证药物是否可以抑制细胞迁移。运用网络药理学分析古日古木—13 含药血清有效成分对肝癌治疗的最关键的信号通路,最后通过 Western Blot 在蛋白层面上确定作用机制。通过 IncuCyte 分析结果表明古日古木—13 含药血清在 48 h 后开始抑制肝癌细胞的增殖及其迁移,并且随着时间延长,效果越来越明显。网络药理学分析结果表明 Akt 是关键的靶点蛋白。Western Blot 结果显示含药血清组 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 表达量随着作用时间延长比 NC 对照组 p-Akt/Akt 和 p-mTOR/mTOR 表达量明显下降(P < 0.05),说明含药血清对肝癌细胞增殖的抑制作用是通过 Akt/mTOR 信号通路实现的。(下转第 275 页)

如TGF- β 、IL-10和IL-4等,维生素D在体内的活性成分有上调抗炎因子的作用;从而达到免疫平衡调节作用^[9]。TNF- α 也是创面难愈合的重要炎症因子^[10,11]。本研究结果提示维生素D治疗组较常规治疗组可以降低MMP 9、TNF- α 、IL-6水平、提升创面组织中TIMP1水平,上述变化与维生素D剂量呈正相关($P < 0.05$),提示维生素D可以通过抑制创面炎症因子TNF- α 、IL-6的表达,降低MMP 9 mRNA、提高TIMP1 mRNA水平达到促进创面愈合,从而阐明维生素D促进创面愈合的可能机制。

总之,本研究证实维生素D能加快创面的愈合,下调创面炎症因子表达,降低创面炎症反应,从而为糖尿病足创面愈合提供了一种潜在的有益的治疗方法。本研究存在一定局限性,如每组动物例数较少、没有进一步阐明TNF- α 及IL-6对TIMP、MMP表达的影响,期待后续更多的关于维生素D与创面炎症通路的研究。

参考文献

- [1]许樟荣.糖尿病足病防治的关键——解读2019国内外糖尿病足防治指南[J].中国临床新医学,2019,12(12):1259-1262
- [2]Hart J. Inflammation 2: its role in the healing of chronic wounds [J]. Wound Care, 2017, 11(5): 245-249
- [3]Morales E, Romieu I, Guerra S, et al. Maternal vitamin D status in pregnancy and risk of lower respiratory tract infections,

wheezing, and asthma in offspring[J]. Epidemiology, 2018, 23(1):64-71

- [4]倪程佩,周正宇.1,25(OH)₂D₃对2型糖尿病小鼠自噬与炎症反应的干预及其分子机制研究[D].苏州:苏州大学,2016
- [5]曹大勇,牛希华,夏成德,等.小鼠糖尿病全层皮肤缺损模型的建立[J/CD].中华损伤与修复杂志:电子版,2017,10(6):490-494
- [6]洪秀韬,陈凤玲,刘卉芳,等.2型糖尿病患者血清维生素D水平与单核巨噬细胞系统极化的相关性研究[J].中华诊断学电子杂志,2021,9(4):259-263
- [7]陶瑜,逢曙光.维生素D在2型糖尿病足溃疡治疗中的作用[J].医学综述,2018,24(22):4528-4532
- [8]Altieri B, Grant WB, Della CS, et al. Vitamin D and pancreas: the role of sunshine vitamin in the pathogenesis of diabetes mellitus and pancreatic cancer[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017, 57(16):3472-3488
- [9]Razzaghi R, Pourbagheri H, Momen HM, et al. The effects of vitamin D supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Diabetes Complications, 2019, 31(4):766-772
- [10]杨梅,钟晓卫.血清1,25(OH)₂D₃水平在糖尿病足创面愈合中的作用研究[J].糖尿病新世界,2020,23(8):176-178
- [11]纪永佳,陈彦香.维生素D免疫调节作用与抗菌肽作用的研究进展[J].当代医学,2018,24(6):166-169

(上接第264页)

参考文献

- [1]Deng Q, Liu W. The effect of social norms on physicians' intentions to use liver cancer screening: a cross-sectional study using extended theory of planned behavior[J]. Risk Manag Healthc Policy, 2022, 15(6):179-191
- [2]Rinninella E, Cerrito L, Spinelli I, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: current evidence and future perspectives[J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(3): 235-248
- [3]吴敏超,杨晨,韩乐,等.蒙药古日古木-13的研究进展[J].疾病监测与控制,2019,13(3):226-228
- [4]锡林其木格,吴玉小.古日古木-13味丸在蒙医临床中的应用[J].中国民族医药杂志,2020,26(7):72-73
- [5]吴敏超,李璇,段伟娜,等.蒙药古日古木-13含药血清对过氧化氢诱导的人Huh-7细胞损伤的保护作用[J].内蒙古医科大学学报,2021,43(2):147-151
- [6]Xu H, Zhang Y, Wang P, et al. A comprehensive review of integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional chinese medicine[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1379-1399
- [7]Barshir R, Fishilevich S, Iny ST, et al. GeneCaRNA: a comprehensive gene-centric database of human non-coding RNAs in the genecards suite[J]. J Mol Biol, 2021, 433(11): e166913

- [8]Szklaarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): 605-612
- [9]单成彬,薛佳,马超美.蒙药复方古日古木-7治疗肝脏疾病的网络药理学研究[J].内蒙古大学学报:自然科学版,2021,52(2):162-175
- [10]Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicines, 2021, 9(11):1639-1640
- [11]Popova NV, Jucker M. The role of mTOR signaling as a therapeutic target in cancer[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 1743-1744
- [12]Nogales C, Mamdouh ZM, List M, et al. Network pharmacology: curing causal mechanisms instead of treating symptoms [J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(2): 136-150
- [13]Jiao X, Jin X, Ma Y, et al. A comprehensive application: molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine[J]. Comput Biol Chem, 2021, 90(11): e107402