

基于计算机辅助药物设计的慈菇消脂方调控 HIF-1 α 信号通路干预 HSC-T6 细胞活化的作用及机制研究

任 真, 尹 硕, 王爱娣, 王 莉, 赵秀萍, 马燕花*

(甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 基于网络药理学及计算机辅助药物设计探讨慈菇消脂方 (Cigu Xiaozhi Formula) 对缺氧微环境下肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) HSC-T6 活性的影响, 预测并验证其可能作用的靶点及相关信号通路。通过中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSPP)、中医药百科全书在线数据库 (Encyclopaedia of Traditional Chinese Medicine, ETCM) 及中药分子机制的生物信息学分析工具 (Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine, BATMAN-TCM) 数据库检索筛选出慈菇消脂方的潜在活性成分及作用靶点, 并借助 Gene Cards 和 Pharm GK 数据库检索到的肝纤维化相关靶点进行交集整合, 获得慈菇消脂方治疗肝纤维化的潜在作用靶点。在 Omic Share 平台进行 GO (gene ontology) 富集分析和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析, 利用 Cytoscape 软件构建出“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络。利用 Auto Dock 软件对活性成分和靶点蛋白进行分子对接分析, 根据分子动力学模拟和结合自由能计算结果, 将 degree 值排名前 5 的活性成分进行对接打分, 对君药山慈菇活性成分豆甾醇和 β -谷甾醇进行分子对接。体外实验应用氯化钴 (CoCl₂) 诱导 HSC-T6 细胞构建缺氧模型, 通过 CCK-8 实验检测细胞活力, 确定 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 作用 24 h 为构建 HSC-T6 细胞缺氧模型的最佳作用时间和浓度。细胞划痕愈合实验和免疫荧光检测发现, 在缺氧状态下 HSC-T6 细胞被活化, 划痕愈合率显著升高, 活化标志蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 荧光信号显著增强, 而 6% 含药血清能抑制 HSC-T6 细胞活化, 细胞划痕愈合率显著降低, α -SMA 荧光信号显著减弱。进一步研究发现, 在缺氧状态下 HSC-T6 细胞中缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、 α -SMA 和刺猬信号通路 (hedgehog, Hh) 关键蛋白 Patched-1 (Ptch-1)、脑胶质瘤相关癌基因 1 (glioma related oncogene homology-1, Gli-1) 表达上调, 而 6% 含药血清可下调 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 蛋白表达; HIF-1 α 特异性阻断剂 YC-1 组和 Hh 信号通路特异性阻断剂环巴胺组 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 蛋白表达均显著下调。以上研究结果表明, HIF-1 α 和 Hh 信号通路参与 HSC-T6 细胞活化, 中药慈菇消脂方可抑制 HSC-T6 细胞活化, 其机制可能与抑制 HIF-1 α 表达和阻断 Hh 信号通路有关。综上所述, 中药慈菇消脂方通过直接作用于 HIF-1 α 和 Hh 信号通路抑制 HSC-T6 细胞活化, 从而发挥抗肝纤维化作用。实验方案经甘肃中医药大学动物实验伦理委员会批准, 所有程序均严格按照动物使用和护理的伦理原则进行。

关键词: 计算机辅助药物设计; 慈菇消脂方; 缺氧诱导因子-1 α ; 大鼠肝星状细胞; 刺猬信号通路; 肝纤维化
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-3049-10

Molecular mechanism of Cigu Xiaozhi formula interfering with HSC-T6 cell activation by regulating HIF-1 α signaling pathway based on computer aided drug design

REN Zhen, YIN Shuo, WANG Ai-di, WANG Li, ZHAO Xiu-ping, MA Yan-hua*

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract: In this study, we investigated the effect of Cigu Xiaozhi formula on HSC-T6 activity in hypoxic

收稿日期: 2022-11-10; 修回日期: 2023-04-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860821).

*通讯作者 Tel: 13893411954, E-mail: 617747928@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1206

microenvironment based on network pharmacology and computer-aided drug design, and predicted and verified its possible targets and related signaling pathways. The potential active components and targets of Cigu Xiaozhi formula were screened by searching Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Encyclopaedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) databases, and the liver fibrosis related targets retrieved from Gene Cards and Pharm GK database were integrated to obtain the potential targets of Cigu Xiaozhi formula in the treatment of liver fibrosis. GO enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis were performed on Omic Share platform, and Cytoscape software was used to construct the "potential active ingredient-key target-pathway" network. The active components and target proteins were subjected to molecular docking analysis by Auto Dock software. According to the results of molecular dynamics simulation and binding free energy calculation, the top 5 active components with degree were scored. The active components stigmasterol and β -sitosterol were subjected to molecular docking. CoCl_2 was used to induce HSC-T6 cells to construct hypoxia model *in vitro*. The cell viability was detected by CCK-8 assay, and the optimal time and concentration of hypoxia model of HSC-T6 cells was determined to be $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl_2 for 24 h. Under hypoxia condition, HSC-T6 cells were activated, the wound healing rate was significantly increased, and the fluorescence signal of activation marker protein α -smooth muscle actin (α -SMA) was significantly enhanced. However, 6% drug-containing serum could inhibit the activation of HSC-T6 cells, and the wound healing rate was significantly decreased, and the fluorescence signal of α -SMA was significantly weakened. Further studies showed that the expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), α -SMA and key proteins of Hedgehog (Hh) signaling pathway in HSC-T6 cells were up-regulated under hypoxia, while the expressions of HIF-1 α , α -SMA, Patched-1 (Ptch-1) and glioma related oncogene homology-1 (Gli-1) were down-regulated in 6% drug-containing serum group, the YC-1 group and the cyclopamine group. These results indicated that HIF-1 α and Hh signaling pathways were involved in the activation of HSC-T6 cells, and the traditional Chinese medicine Cigu Xiaozhi formula could inhibit the activation of HSC-T6 cells, and the mechanism may be related to the inhibition of HIF-1 α expression and the blocking of Hh signaling pathway. In conclusion, Cigu Xiaozhi formula can inhibit the activation of HSC-T6 cells by directly acting on HIF-1 α and Hh signaling pathway, and exert an anti-hepatic fibrosis effect. The animal experimental protocol has been reviewed and approved by Laboratory Animal Ethics Committee of Gansu University of Chinese Medicine, in compliance with the Institutional Animal Care Guidelines.

Key words: computer aided drug design; Cigu Xiaozhi formula; hypoxia-inducible factor-1 α ; rat hepatic stellate cell; Hedgehog signaling pathway; hepatic fibrosis

肝纤维化 (liver fibrosis, LF) 是由各种慢性肝损伤引起的病理改变, 慢性肝病向肝硬化发展的必然中间环节, 是一种以细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 过度积累为特征的病理过程^[1], 细胞学基础是静止状态的肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 转化为活化表型的肌成纤维细胞, 活化的肌成纤维样细胞增多, ECM 大量沉积, 导致肝纤维化的发生^[2]。多种因素可引起 HSC 发生异常活化, 其中 HIF-1 α 发挥着重要作用^[3], HSC 中 ECM 的代谢能力与缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的升高直接相关。刺猬信号通路 (Hedgehog, Hh) 信号通路参与肝脏、肺脏、肾脏等多种脏器纤维化过程^[4], 当 Hh 信号通路被药物或基因阻断时, 可阻止 HSC 向成肌纤维母细胞过程中的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 使细胞保持静止状态或转向上皮细胞表型^[5]。研究发现, HIF-1 α 的增加可以促进声波刺

猬 (Sonic Hedgehog, Shh) 的自分泌, 进而激活缺氧微环境中的 Hh 信号通路^[6]。课题组前期研究发现, 慈菇消脂方可显著改善非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 大鼠肝脏脂肪变性; 体外实验表明, 慈菇消脂方含药血清具有降脂、抗炎、抗凋亡等作用^[7,8], 但其作用靶点和作用机制还有待进一步研究。本研究采用 CoCl_2 化学诱导缺氧法干预 HSC-T6 细胞, 制备缺氧模型, 慈菇消脂方含药血清进行干预, 利用计算机辅助药物设计 (computer aided drug design, CADD) 分析慈菇消脂方主要活性成分, 分子对接预测其可能作用靶点, 并通过细胞实验进行验证, 从而阐述慈菇消脂方抑制 HSC 活化的作用机制, 为中药治疗肝纤维化提供理论依据。

材料与方法

动物 SPF 级健康 SD 大鼠 20 只, 雌雄各半, 体质

量 (200 \pm 20) g, 由甘肃中医药大学动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2020-0001。饲养于温度 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C 左右、湿度 40%~70% 条件下, 明暗交替照明 12 h。本动物实验遵循甘肃中医药大学动物实验中心实验动物使用管理规定, 且通过甘肃中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号: 2021-258)。

细胞 大鼠肝星状细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司 (HSC-T6, CL-0116)。细胞培养条件: 将细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 2~3 天换液 1 次, 细胞 80% 融合度时传代, 按照 1:3 传代比例进行, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

药品与试剂 慈菇消脂方由山慈菇 (10 g)、法半夏 (15 g)、茯苓 (20 g)、柴胡 (12 g)、丹参 (20 g)、土鳖虫 (20 g)、薏苡仁 (30 g)、黄芩 (10 g)、泽泻 (15 g)、枸杞 (20 g)、生山楂 (20 g)、生首乌 (30 g)、决明子 (20 g) 和炙甘草 (10 g) 共 14 味中药组成, 购自甘肃中医药大学附属医院并通过药剂室鉴定。环靶胺 (批号: HY-17024) 购自 MCE 公司, 取 5 mg 环靶胺用 1.214 7 mL DMSO 配制成 10 mmol·L⁻¹ 母液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 使用时用细胞生长培养液配制成 10 μ mol·L⁻¹。YC-1 (HY-14927, MCE 公司), 取 5 mg YC-1 用 1.642 9 mL DMSO 配制成 10 mmol·L⁻¹ 的母液, -20 $^{\circ}$ C 保存, 使用时用细胞生长培养液配制成 10 μ mol·L⁻¹。CoCl₂ (批号: 20201225) 购自美国 Sigma 公司, 用天平称量 0.238 g CoCl₂, 用 10 mL 超纯水充分溶解, 混合后用 0.22 μ m 滤器缓慢过滤, 制得浓度为 100 mmol·L⁻¹ CoCl₂ 母液。将 CoCl₂ 母液用 DMEM 高糖培养基分别配置成 100、200、400、600 和 800 μ mol·L⁻¹ CoCl₂ 培养液。CCK-8 试剂盒 (批号: 40203) 购自上海翊圣生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: PC0020)、SDS-PAGE 凝胶试剂盒 (批号: P1200)、BSA (批号: 20210920)、抗荧光衰减封片剂 (批号: S2110) 购自北京索莱宝科技有限公司; HIF-1 α 抗体 (批号: GTX127309, 1:1 000)、脑胶质瘤相关癌基因 1 (glioma related oncogene homology-1, Gli-1) 抗体 (批号: GTX106207, 1:1 000)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (批号: GTX100034, 1:1 000) 购自 Gene Tex 公司; 山羊抗兔 IgG (批号: RS0002, 1:10 000)、山羊抗鼠 IgG (批号: RS0001, 1:10 000)、 β -actin 单克隆抗体 (批号: YM3028, 1:10 000)、抗 GAPDH 抗体 (批号: YM3215, 1:10 000) 购自 Immunoway 公司; 抗 Patched-1 (Ptch1) 抗体 (批号: Ab53715, 1:1 000) 购自 Abcam 公司。

仪器 酶标仪 (iMark, 美国 BioRad 公司); Western blot 转膜仪 (DYCZ-40G)、Western blot 电泳仪 (DYCZ-

25D)、Western blot 电源 (DYY-6D) (北京六一生物科技公司); 摇床 (SK-O180-E, SCILOGEX 公司); 倒置荧光显微镜 (IX53, Olympus 公司); 化学发光成像仪 (MiniChemi 610, 北京赛智科技有限公司); 高速冷冻离心机 (5424R)、高速低温台式离心机 (TGL-16) (Eppendorf 公司)。

数据库与软件 TCMS 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmssp.php>), ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/>), BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>), Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>), Cytoscape3.7.2 软件, Gene Cards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 PharmGK 数据库 (<https://www.pharmgkb.org/>), String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)。

慈菇消脂方中化学成分的收集和筛选 通过 TCMS、ETCM 及 BATMAN-TCM 数据库分别以“山慈菇”、“半夏”、“茯苓”、“柴胡”、“党参”、“薏苡仁”、“黄芩”、“泽泻”、“枸杞子”、“山楂”、“何首乌”、“决明子”、“甘草”、“土鳖虫”为关键词检索药物含有的化学成分。以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) \geq 30% 且类药性 (drug-likeness, DL) \geq 0.18 为标准, 借助 TCMS 数据库, 筛选出山慈菇、半夏、茯苓、柴胡、党参、土鳖虫、薏苡仁、黄芩、泽泻、枸杞子、山楂、何首乌、决明子和甘草中的活性成分。

靶标蛋白的筛选及药物-成分-靶点网络的构建 借助 TCMS 数据库, 将慈菇消脂丸中的活性成分进行检索, 查找出其对应的靶点, 运用 Uniprot 数据库查询靶点对应的基因名, 并进行去重。用 Cytoscape 3.7.2 软件构建、分析成分和靶点网络。

慈菇消脂方治疗肝纤维化潜在作用靶点的预测 在 Gene Cards 和 Pharm GK 数据库中以“hepatic fibrosis”为关键词检索肝纤维化相关的基因。将筛选得到的药物靶点与疾病靶点进行映射, 即获得慈菇消脂方治疗肝纤维化的潜在作用靶点。

蛋白互作网络 (protein-protein interactions, PPI) 网络构建与分析 将筛选得到的慈菇消脂方治疗肝纤维化的潜在作用靶点导入 String 数据库, 将物种限定为“homo sapiens”, 获得蛋白相互作用关系。将文件保存为 TSV 格式, 导入到 Cytoscape3.7.2 软件中, 利用 Cytoscape3.7.2 软件的“network analyzer”功能进行网络拓扑属性分析, 筛选高于平均值的 degree 与 betweenness centrality 值, 即得到关键靶点。

靶点的通路分析 将关键靶点导入 DAVID 数据库, 把物种定义为“homo sapiens”, 将所有靶基因名称

校正为官方名称,在 Omic Share 平台进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析。GO 富集分析选取生物过程 (biological processes, BP)、细胞功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cell composition, CC)。KEGG 通路分析将靶基因官方名称输入 KOBAS 平台,导出文件,按照 *P*-value 值进行升序,选择前 20 个数据,绘制气泡图进行可视化。

分子对接评价药物分子与 HIF-1 α 蛋白结合程度 利用 Auto Dock 软件分别对靶蛋白进行去水、加氢、设置为受体,中药小分子进行加氢、设置为配体等操作,并将中药小分子及靶蛋白格式转换为 pdbqt 格式。利用 Auto Dock Tools 对预先转化为 pdbqt 格式的小分子和靶点蛋白进行对接模拟计算,结合能小于 0 说明配体与受体可以在自然状态下结合,结合能小于 $-5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 证明分子与靶点对接较好,可作为药物治疗肝纤维化作用靶点的筛选依据。

含药血清制备 熬制中药,按成人与大鼠体表面积换算法,最终制备慈菇消脂方药液浓度为 $2.268 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。20 只雌雄各半的 SD 大鼠,随机分为两组,空白组和中药组,大鼠灌胃体积为 $1 \text{ mL}/100 \text{ g}$ 。空白组给予等剂量生理盐水灌胃,中药组给予中药灌胃,每日早晚各一次,连续给药 1 周,最后一次给药 1 h 后,无菌操作下,于心脏处采用一次性抗凝真空采血管取全血。全血于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2 h,以 $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后移液枪小心分离血清。同组混合分离的血清, $56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min,超净台上用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,保存备用于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。课题组前期实验中,通过 CCK-8 法筛选出中药慈菇消脂方对 HSC-T6 的最佳作用浓度为 6% 含药血清,因此,本实验中将上述除菌后的血清配制成 10 mL 含药血清浓度为 6% 的培养液备用 (0.6 mL 含药血清 + 0.4 mL 胎牛血清 + 9 mL 基础培养液)。

CoCl₂ 作用浓度与作用时间筛选 HSC-T6 细胞悬液接种于 96 孔板中,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,待细胞完全贴壁后,实验孔加入含不同浓度 CoCl₂ (0 、 100 、 200 、 400 、 600 、 $800 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的完全培养基 $100 \text{ }\mu\text{L}$,空白孔只加 $100 \text{ }\mu\text{L}$ 不含细胞的完全培养基,每组 3 个复孔。培养板置于培养箱中分别孵育 24 和 48 h 后,把 $10 \text{ }\mu\text{L}$ WST-8 试剂加入每孔,再继续孵育 2.5 h,使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值,计算细胞活力。

细胞分组与模型制备 HSC-T6 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养液,放置于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、95% O₂、100% 湿度的培养箱中培养,在 25.0 cm^2 (50 mL) 细胞培养瓶瓶底生长至 90% 时,用 0.25% 胰蛋

白酶-EDTA 消化液消化做传代处理,取 5~8 代对数期的细胞用于实验。细胞分为 5 组:对照组、缺氧组、环巴胺组、YC-1 组、6% 含药血清组。对照组用正常培养基培养,缺氧组依据参考文献^[9],采用 CoCl₂ 化学诱导缺氧法干预 HSC-T6 细胞,依据 CCK-8 结果用 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 诱导缺氧 24 h。各给药组 (环巴胺组: $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Hh 通路抑制剂环巴胺; YC-1 组: $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HIF-1 α 特异性抑制剂 YC-1; 含药血清组: 含 6% 慈菇消脂方血清) 预处理 24 h 后,立即给予 $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 进行缺氧处理 24 h。

细胞划痕愈合率测定 用记号笔画“丰”字在 6 孔板的背面,按 2.5×10^5 个/孔接种 HSC-T6 细胞,各组细胞在培养箱中培养 24 h 后,用 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 黄色枪头靠在尺子上,垂直于培养板划痕,保持同一强度,划痕方向一致。PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基,放入 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱培养,分别在 24 和 48 h 取样,拍照记录划伤区域,观察细胞迁移,并计算细胞划痕愈合百分比。

免疫荧光检测 HSC-T6 细胞中 α -SMA 的表达 将各组 HSC-T6 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h 后吸弃培养基, PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 4% 多聚甲醛 (PBS 配制) 常温固定 15 min, PBS 洗爬片 3 次,每次 5 min。滴加 3% BSA 均匀覆盖细胞,室温封闭 30 min,弃封闭液,玻片上滴加 $200 \text{ }\mu\text{L}$ 稀释后的一抗 (anti α -SMA 兔来源, $1:100$),置于湿盒中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。取出湿盒置于室温复温 30 min。PBS 洗 3 次,加入适量稀释好的二抗放于湿盒中 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 DAPI 孵育 5 min,对本标进行染核,洗去多余的 DAPI。最后在倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

Western blot 检测 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 的表达 收集各实验组细胞,每孔加入 0.5 mL RIPA 组织裂解液,提取各组细胞内总蛋白。根据蛋白定量试剂盒 (BCA 法) 说明书进行操作,测定蛋白质浓度。取 $120 \text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质样本加入 $30 \text{ }\mu\text{L}$ 5 \times SDS 加样缓冲液,煮沸 5 min 上样。蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 胶电泳 2 h 分离蛋白,电泳电流恒为 100 V 。SDS-PAGE 蛋白胶湿转 2 h 至 PVDF 膜;用 5% 脱脂奶粉进行常温封闭 3 h,加入 β -actin 单克隆抗体、GAPDH 抗体、Ptch1 抗体、HIF-1 α 抗体、Gli1 抗体、 α -SMA 抗体, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,分别加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h; TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 发光液显色,压片显影。扫描摄取图像,并采用 Image J 软件分析条带的灰度值,以 α -SMA 与 GAPDH 灰度值的比值, HIF-1 α 、

Ptch-1、Gli-1 与 β -actin 灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

统计学分析 应用 SPSS22.0 统计软件, 组间采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多重比较采用最小二乘法 (LSD 检验), 统计结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 有统计学意义。

结果

1 慈菇消脂方活性成分、靶点筛选及疾病靶点的收集

根据 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 的标准, 从 TCMSP 数据库中检索得出慈菇消脂丸的活性成分共 290 个, 其中山慈菇 3 个, 茯苓 15 个, 柴胡 17 个, 党参 21 个, 薏苡仁 9 个, 黄芩 36 个, 枸杞子 45 个, 山楂 9 个, 何首乌 4 个, 甘草 92 个, 决明子 14 个, 半夏 13 个, 泽泻 10 个, 土鳖虫 2 个。去掉重复后, 共获得 279 个活性成分。利用 TCMSP 数据库查询活性成分靶点信息, 筛选出对应靶点 275 个。最后利用 Uniprot 数据库对靶点基因进行标准化, 获得靶点基因 273 个。表 1 为慈菇消脂方中部分活性成分的基本信息。借助 GeneCards 及 PharmGK 数据库检索肝纤维化的靶点, 共得到 5 259 个靶点。运用 Omicshare 平台绘制韦恩图, 将慈菇消脂方活性成分对应的靶点与肝纤维化的靶点进行映射取交集, 共得到 214 个交叉靶点, 即为慈菇消脂方治疗肝纤维化

的潜在作用靶点。

2 PPI 网络构建与分析

将慈菇消脂方治疗肝纤维化的 42 个关键靶点导入到 Cytoscape3.7.2 软件中, 得到蛋白质相互作用网络 (图 1)。通过网络拓扑分析发现 HIF-1 α 、TP53、SERPINE1、CCND1、EGFR 等靶点是慈菇消脂丸治疗肝纤维化的关键靶点。HIF-1 α 可刺激纤维化基因与炎症基因表达, 启动脂肪组织纤维化进程。

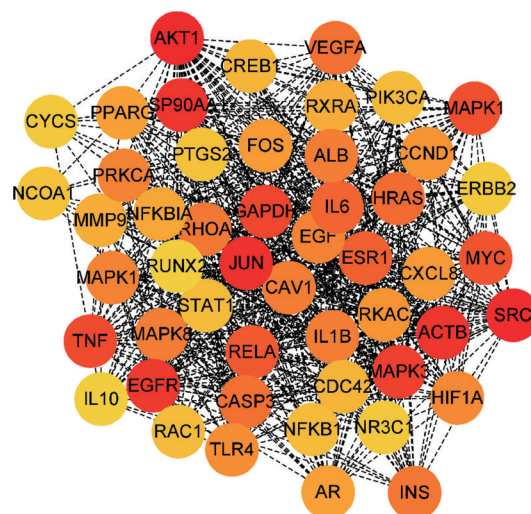


Figure 1 Protein-protein interactions (PPI) network diagram of key targets

Table 1 Basic information about the active ingredients of Cigu Xiaozhi formula. OB: Oral bioavailability; DL: Drug-likeness

Mol ID	Compound	OB/%	DL	Drug
MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75	Pseudobulbus Cremastrae seu Pleiones
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	
MOL001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	Pinelliae Rhizoma
MOL002670	Cavidine	35.64	0.81	
MOL000275	Trametenolic acid	38.71	0.80	Poria
MOL000276	7,9(11)-Dehydropachymic acid	35.11	0.81	
MOL001645	Linoleyl acetate	42.10	1.08	Radix Bupleuri
MOL002776	Baicalin	40.12	0.75	
MOL002140	Perlolryrine	65.95	0.27	Codonopsis Radix
MOL002879	Diop	43.59	0.39	
MOL000953	Cholesterol	37.87	0.68	Ground Beetle
MOL001323	Sitosterol alpha l	43.28	0.78	Coicis Semen
MOL001494	Mandenol	42.00	0.19	
MOL001689	Acacetin	34.97	0.24	Scutellariae Radix
MOL000173	Wogonin	30.68	0.23	
MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	Rhizoma Alismatis
MOL000830	Alisol B	34.47	0.82	
MOL001323	Sitosterol alpha l	43.28	0.78	Lycii Fructus
MOL003578	Cycloartenol	38.69	0.78	
MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	Crataegus Pinnatifida
MOL000098	Quercetin	46.43	0.28	
MOL008647	N-trans-Feruloyltyramine	86.71	0.26	Radix Polygoni Multiflori
MOL002268	Rhein	47.07	0.28	
MOL002281	Toralactone	46.46	0.24	Semen Cassiae
MOL000471	Aloe-emodin	83.38	0.24	
MOL001484	Inermine	75.18	0.54	Licorice
MOL001792	DFV	32.76	0.18	

3 药物-成分-靶点网络的构建与分析

借助 Cytoscape3.7.2 软件构建药物-成分-靶点相互作用网络。根据节点度值等特性对核心节点进行筛选,结果呈现出槲皮素、山柰酚、木犀草素、豆甾醇、汉黄芩素、柚皮素等活性成分在整个网络中发挥着关键作用,可能是慈菇消脂丸治疗肝纤维化的核心成分。

4 GO 富集分析和 KEGG 信号通路富集分析

将慈菇消脂方治疗肝纤维化的 42 个关键靶点基因官方名称输入到 OmicShare 平台中,共得到 GO 富集条目 4 848 个,其中包括 4 124 个 BP、392 个 MF 和 332 个 CC,GO 条目排名前 10 的数据进行柱状图的绘制(图 2)。慈菇消脂方主要参与对含氧化合物的反应、对含氧化合物的细胞反应、对脂质的反应、管发育、对化学刺激的细胞反应、对无机物的反应、对有机物质的细胞反应、分子功能的正向调节等生物学过程;涉及细胞器内腔、胞内细胞器腔、泡腔、细胞质囊泡腔、分泌颗粒、分泌颗粒腔、胞质部分、内膜系统、细胞质囊泡部分等细胞组分;参与酶结合、信号受体结合、同蛋白结合、转录因子结合、蛋白质二聚体活性、分子功能调节剂、蛋白激酶结合、磷酸酶结合、蛋白质异二聚体活性、生长因子受体结合等细胞功能。

KEGG 筛选得到 19 条信号通路进行分析(图 3)。晚期糖基化产物-晚期糖基化终末产物受体(advanced glycosylation end products-receptor for advanced glycation end products, AGEs-RAGE) 信号通路、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路、HIF-1 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated proretein kinase, MAPK) 信号通路等在慈菇消脂方治疗肝纤维

化中可能发挥重要作用。AGE-RAGE 信号通路是一个和糖尿病及其并发症联系相当密切的通路,可以激活并促进炎症反应、氧化应激,最终导致胰岛素抵抗及糖尿病其他并发症的发生。PI3K-AKT 信号通路广泛存在于各种生物细胞中,介导包括细胞生长、存活和迁移、肿瘤形成和血管生成等多种过程。MAPK 信号通路能够促进细胞增殖,抗凋亡。HIF-1 信号通路在缺氧条件下参与调节血管的生成、葡萄糖代谢及细胞的凋亡和自噬,并参与调节多条信号通路。本研究主要探讨缺氧状态下中药慈菇消脂方对活化 HSC-T6 的抑制作用及其机制是否通过调控 HIF-1 α /Hh 信号通路实现。

5 山慈菇活性成分与 HIF-1 α 蛋白的分子对接与可视化

将 degree 值排名前 5 的活性成分进行对接打分(表 2)。对君药山慈菇活性成分豆甾醇和 β -谷甾醇使用 AutoDock 软件进行分子对接。实验研究结果显示,豆甾醇和 β -谷甾醇均结合于原活性位点处,并且 2 个配体小分子的对接构象与原晶体构象叠合时,均方根偏差(RMSD)(通过 pymol 软件)计算均小于 2,说明对接结果是相对可靠的。将以上对接结果利用 pymol 软件绘图(图 4)。

6 CoCl₂ 对 HSC-T6 细胞活力的影响

利用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞增殖活力。与对照组比较,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 作用 24 h 细胞活力无显著变化,200、400、600 和 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 作用 24 h 细胞活力均显著下降($P < 0.05$),且具有浓度依赖性。不同浓度 CoCl₂ 作用 48 h 后细胞活力均较正常对照组显著下降($P < 0.05$)。根据 CCK-8 实验结果,选择

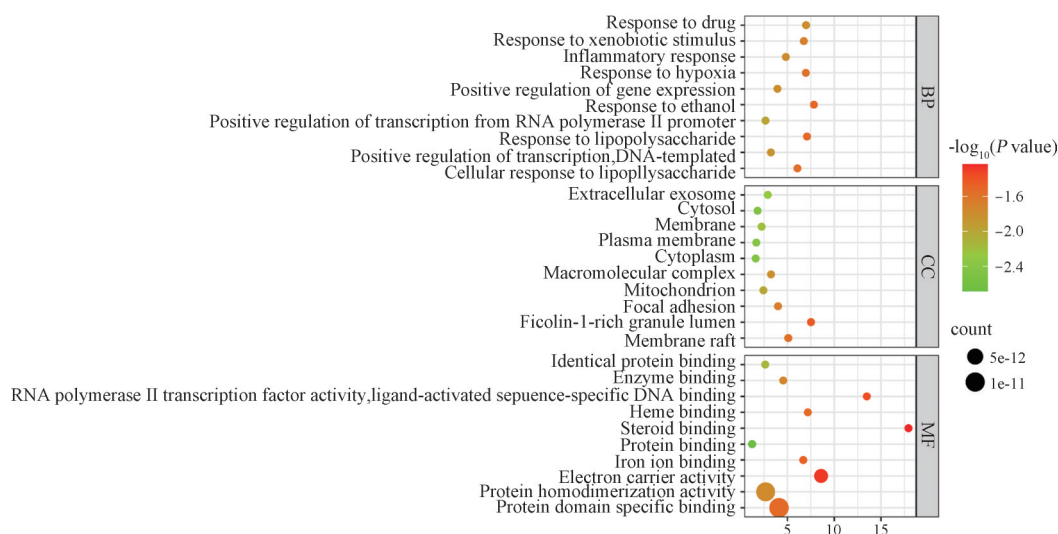


Figure 2 Gene ontology (GO) enrichment analysis of predicted target genes of Cigu Xiaozhi Formula against liver fibrosis. BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component

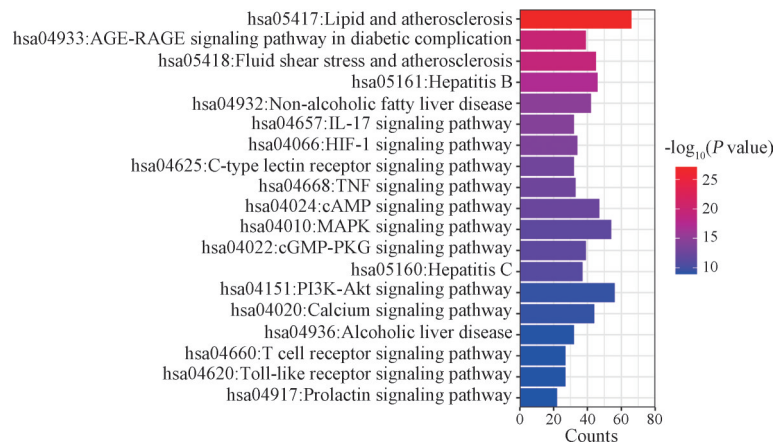


Figure 3 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of predicted target genes of Cigu Xiaozhi Formula against liver fibrosis

Table 2 Binding of active ingredients with HIF-1 α

MOLID	Active ingredient	Binding energy/kcal·mol ⁻¹
		HIF-1 α
MOL000098	Quercetin	-7.2
MOL000449	Stigmasterol	-7.9
MOL000422	Kaempferol	-7.0
MOL000358	β -Sitosterol	-8.3
MOL000354	Isorhamnetin	-7.4

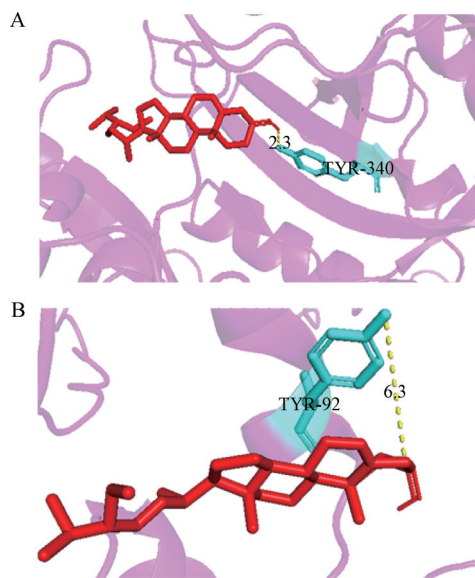


Figure 4 Molecular docking of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein with active constituents of Pseudobulb of Appendiculate Cremastra. A: β -Sitosterol and HIF-1 α ; B: Stigmasterol and HIF-1 α

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂ 作用 24 h 建立 HSC-T6 细胞缺氧模型 (图 5)。

7 CoCl₂ 对 HSC-T6 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验发现, 与对照组 [(17.7 \pm 1.2)%] 比较, 缺氧组 [(31.7 \pm 0.5)%] 细胞划痕治愈率明显增加,

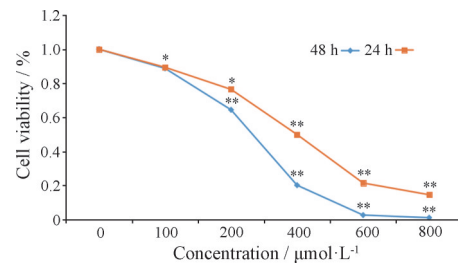


Figure 5 Effects of different concentrations of CoCl₂ on HSC-T6 cell proliferation after 24 h and 48 h treatment. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与缺氧组比较, YC-1 组 [(23.6 \pm 0.6)%]、环巴胺组 [(28.3 \pm 1.0)%]、6% 含药血清组 [(20.1 \pm 0.9)%] 细胞划痕治愈率明显降低 ($P < 0.01$)。与 6% 含药血清组比较, YC-1 组、环巴胺组细胞划痕治愈率明显增加 ($P < 0.01$), 表明慈菇消脂方能显著降低缺氧状态下 HSC-T6 细胞的划痕治愈率, 且作用优于 Hh 通路阻断剂和 HIF-1 α 特异性拮抗剂 (图 6)。

8 慈菇消脂方对 HSC-T6 细胞中 α -SMA 表达的影响

免疫荧光结果显示, 与正常对照组相比, 缺氧组 α -SMA 荧光表达上调 ($P < 0.01$)。慈菇消脂方含药血清干预后, α -SMA 荧光值显著下调 ($P < 0.01$), YC-1 和环巴胺干预后 α -SMA 荧光值则无明显差异, 表明缺氧能够活化 HSC-T6 细胞表达特异性标志物 α -SMA, 而 6% 慈菇消脂方含药血清能抑制活化的 HSC-T6 细胞表达 α -SMA (图 7)。

9 慈菇消脂方对 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 蛋白表达的影响

与对照组比较, 缺氧组 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$); 与缺氧组比较, YC-1 组、环巴胺组、6% 含药血清组 HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1

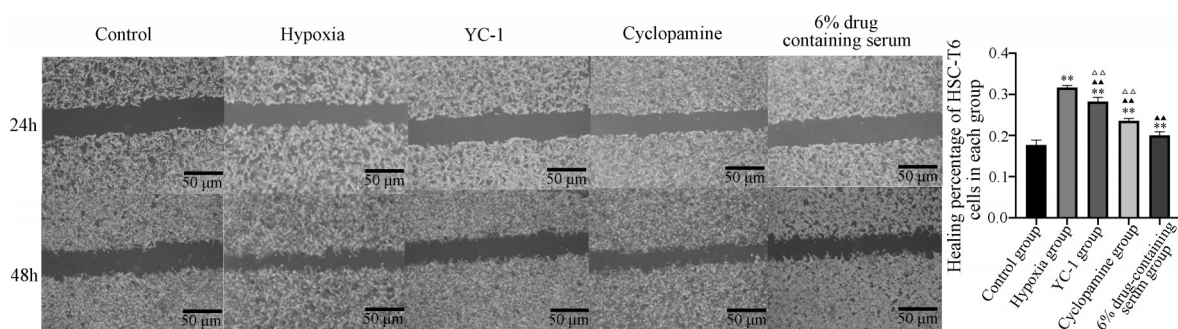


Figure 6 Healing percentage of HSC-T6 cells in each group ($\times 40$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs hypoxia group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 6% drug-containing serum group

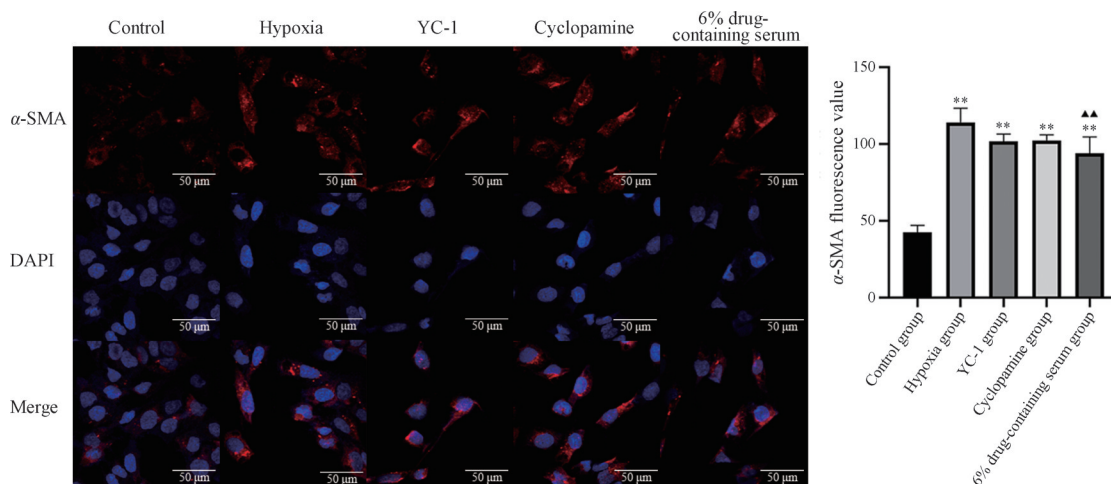


Figure 7 α -Smooth muscle actin (α -SMA) fluorescence intensity in different treatment groups ($\times 400$). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs hypoxia group

和 Gli-1 蛋白表达均显著下调 ($P < 0.01$); 与 6% 含药血清组比较, 缺氧+YC-1 组 Ptch-1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$), 表明缺氧能诱导活化 HSC-T6 表达 α -SMA 和 HIF-1 α , 缺氧能激活 HSC-T6 中 HIF-1 α /Hh 信号通路, HIF-1 α 抑制剂 YC-1 能下调 Hh 信号通路相关蛋白表达, 抑制 HSC-T6 细胞活化, 经 6% 慈菇消脂方含药血清干预后, HIF-1 α 、 α -SMA、Ptch-1 和 Gli-1 蛋白表达均显著下调, 提示含药血清可能通过调控 HIF-1 α /Hh 信号通路抑制 HSC-T6 细胞活化, 从而发挥抗肝纤维化作用 (图 8)。

讨论

慈菇消脂方属于院内制剂, 整体组方以解毒化痰、消脂降浊为主。君药山慈菇, 具有清热解毒、化痰祛瘀的功效, 主治痈肿疔毒、瘰疬结核等症。在我国, 山慈菇常与其他中药配伍治疗恶性肿瘤以及抗痛风治疗^[10,11]。肝纤维化属中医“胁痛”、“黄疸”、“积聚”等范畴。目前普遍认为肝纤维化生成的主要病因病机为湿热瘀毒。课题组前期的临床研究和基础研究^[12,13]均表

明该方具有一定降脂、抗肝纤维作用, 但其主要活性成分和作用靶点及具体机制尚不完全清楚。

CADD 是以计算机为工具的一种研究中中药复方的重要手段, 其根据配体-受体相互作用的原理, 通过各种理论计算方法以及分子构象模拟技术, 再根据数据库中收录的大量活性化合物构效关系的数据, 预测出具有药效的先导化合物。运用分子对接技术快速预测出中药有效成分的作用靶点, 有助于科学合理地解释传统中药的作用机制。本研究参考李梢《网络药理学评价方法指南》^[14], 对慈菇消脂方进行网络药理学分析。研究表明, 慈菇消脂方包含活性成分 279 个、成分靶点 275 个及关键靶点 42 个; GO 功能富集分析获得 4 848 个条目, KEGG 通路富集分析筛选得到 19 条信号通路。慈菇消脂方治疗肝纤维化具有多成分、多靶点、多途径相互作用的特点。分析药物-成分-靶点网络, 显示槲皮素、山柰酚、柚皮素、木犀草素、豆甾醇、汉黄芩素等活性成分在整个网络中发挥着关键作用。通过网络拓扑分析发现 HIF-1 α 、TP53、SERPINE1、CCND1、EGFR 等靶点是慈菇消脂丸治疗

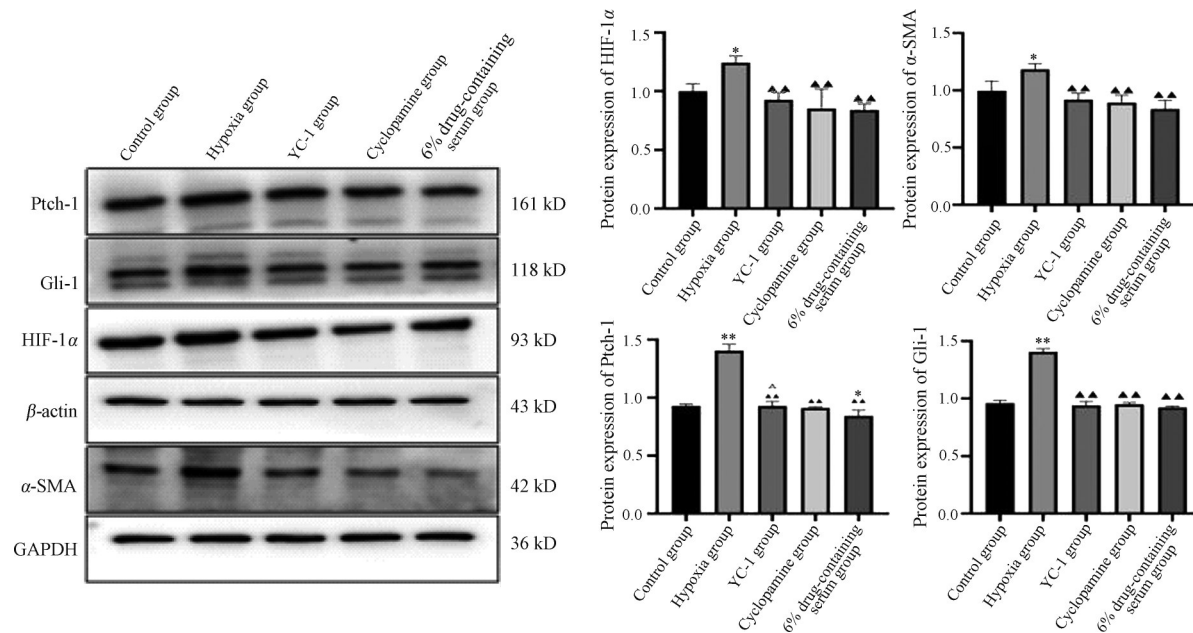


Figure 8 Effect of Cigu Xiaozhi Formula on HIF-1 α /Hh pathway in HSC-T6. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs hypoxia group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs 6% drug-containing serum group. Hh: Hedgehog; Ptch1: Patched-1; Gli-1: Glioma related oncogene homology-1

肝纤维化的关键靶点。HIF-1 α 可刺激纤维化基因与炎症基因表达,启动脂肪组织纤维化进程^[15]; TP53能调节细胞周期和避免细胞癌变发生; EGFR可调节细胞的增殖、分化、迁移与存活等多种生物学过程^[16]。君药山慈菇主要活性成分为豆甾醇和 β -谷甾醇,通过分子对接技术预测,均可与HIF-1 α 结合。

研究表明, HIF-1 α 在HSC活化中发挥着重要作用^[17]。体外实验研究发现,低氧分压、CoCl₂和脂多糖等因素能通过诱导HIF-1 α 合成促进HSC的活化^[18]。但是随着缺氧时间的延长, HIF-1 α 的表达水平不断提高, HSC的凋亡水平也不断提高^[19]。HIF-1 α 亦能通过激活MAPK-mTOR信号通路,诱导HSC发生自噬现象^[20]。Hh信号通路是胚胎期肝脏形成与形态发生有关的一个重要路径,在各种类型的肝脏损伤中也扮演重要的角色^[21,22]。Hh信号通路通过促进EMT参与肝脏、肺脏、肾脏等多种脏器纤维化进展^[23]。Grenz等^[24]在小鼠缺氧模型中发现Hh信号通路在缺氧条件下可被激活,并证实Hh为HIF-1 α 的下游基因。在人的小肠上皮细胞中,在缺氧情况下Hh信号通路中Gli1表达增加^[25]。本研究发现,在CoCl₂诱导的HSC-T6缺氧模型中, HIF-1 α 表达水平明显升高, HSC-T6活性增加,慈菇消脂方处理后, HIF-1 α 表达水平明显下降, HSC-T6活性减低。HIF-1 α 抑制剂YC-1干预后, HSC-T6活性减低, Hh信号转导通路相关蛋白表达下调。

综上所述,本研究证实慈菇消脂方含药血清可抑制缺氧状态下HSC的活性,从而减少细胞外基质的生成和纤维化。利用计算机预测并验证HIF-1 α 为慈菇消脂方的主要作用靶点,其机制可能通过HIF-1 α 参与抑制Hh信号通路相关蛋白表达而发挥作用,研究结果初步阐述慈菇消脂方抗肝纤维化的作用机制,为其开发应用及NAFLD的防治提供了一定的思路。

作者贡献: 马燕花负责实验设计、指导,论文修改;任真负责论文的生物信息学分析、数据分析和撰写论文;尹硕负责论文的整体实验;王爱娣、王莉、赵秀萍参与实验实施。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9: 875.
- [2] Kong DS, Zhang ZL, Chen LP, et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101600.
- [3] Hong F, Wan L, Liu J, et al. Histone methylation regulates HIF-1 signaling cascade in activation of hepatic stellate cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8: 406-415.
- [4] Machado MV, Diehl AM. Hedgehog signaling in liver pathophysiology [J]. *Hepatology*, 2018, 68: 550-562.
- [5] An ZX, He YL, Wang M, et al. Establishment of epithelial mesenchymal transformation model of primary hepatic stellate cells induced by transforming growth factor $\beta 1$ [J]. *Chin J Clin*

- Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2018, 34: 1634-1636.
- [6] Wei M, Ma R, Huang S, et al. Oroxylin A increases the sensitivity of temozolomide on glioma cells by hypoxia-inducible factor 1 α / hedgehog pathway under hypoxia [J]. J Cell Physiol, 2019, 234: 17392-17404.
- [7] Ma YH, Shi X, Han T, et al. Efficacy of Cigu Xiaozhi pill on non-alcoholic steatohepatitis-associated lipoapoptosis through stress-activated c-Jun N-terminal kinase signalling pathway [J]. J Tradit Chin Med (中国中医药信息志), 2019, 26: 55-59.
- [8] Mao ST, Yin S, Huo RQ, et al. Effect of serum containing Cigu Xiaozhi Pill on HepG2 cell lipid apoptosis [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2021, 43: 2198-2203.
- [9] Fan RH, Chen PS, Zhao D, et al. Hypoxia induced by CoCl₂ influencing the expression and the activity of matrix metalloproteinase-2 in rat hepatic stellate cells [J]. Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志), 2007, 15: 654-657.
- [10] Ji Y, Wu MH. Advances in studies on chemical constituents and antitumor mechanism of *Pleurotus officinalis* [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2018, 36: 596-598.
- [11] Sun J. Progress in the treatment of gout and hyperuricemia [J]. J China Prescrip Drug (中国处方药), 2019, 17: 28-29.
- [12] Ma YH, Shi X, Wu Y, et al. Effect of serum containing Cigu Xiaozhi Pills on expression of caspase-8, FasL and p-c-Jun in non-alcoholic fatty liver cell model [J]. Chin J Integr Tradit West Med (中国中西医结合杂志), 2020, 40: 85-90.
- [13] Yang SJ, Qiu XQ, Wang JY, et al. Clinical observation of treating 90 cases of phlegm-dampness internal obstruction syndrome of non-alcoholic fatty liver disease with Cigu Xiaozhi capsule [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig (中国中西医结合消化杂志), 2017, 25: 6-11.
- [14] World Federation of Chinese Medicine Societies. Network pharmacologic evaluation method guide [J]. World Chin Med (世界中药), 2021, 16: 527-532.
- [15] Feng Y, Zhao NQ, Wang L, et al. Research progress in adipose tissue fibrosis induced by hypoxia [J]. Prog Physiol Sci (生理科学展), 2019, 50: 267-272.
- [16] Schneider MR, Yarden Y. The EGFR-HER2 module: a stem cell approach to understanding a prime target and driver of solid tumors [J]. Oncogene, 2016, 35: 2949-2960.
- [17] Ba HZ, Liang ZH, Kim HS, et al. TGF- β 1 can be regulated by NDRG2 via the NF- κ B pathway in hypoxia-induced liver fibrosis [J]. Ann Transl Med, 2021, 9: 505.
- [18] Deng J, Huang Q, Wang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates autophagy to activate hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 454: 328-334.
- [19] Gong Y, Zou B, Peng S, et al. Nuclear GAPDH is vital for hypoxia-induced hepatic stellate cell apoptosis and is indicative of aggressive hepatocellular carcinoma behavior [J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 4947-4956.
- [20] Jin Y, Bai Y, Ni H, et al. Activation of autophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKC theta pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under hypoxic stress [J]. FEBS Lett, 2016, 590: 672-682.
- [21] Gao L, Zhang Z, Zhang P, et al. Role of canonical Hedgehog signaling pathway in liver [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14: 1636-1644.
- [22] Verdelho Machado M, Diehl AM. The hedgehog pathway in non-alcoholic fatty liver disease [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2018, 53: 264-278.
- [23] Guo RL, Xu CH. Research progress of Hedgehog signaling pathway in renal fibrosis [J]. Jilin Med Sci (吉林医学), 2020, 41: 1716-1718.
- [24] Grenz A, Clambey E, Eltzschig HK. Hypoxia signaling during intestinal ischemia and inflammation [J]. Curr Opin Crit Care, 2012, 18: 178-185.
- [25] Yang G, Yang XC, Chen GQ, et al. Role of Hedgehog signaling pathways in regulation of hypoxic intestinal epithelial barrier function [J]. Chin J Digest Surg (中华消化外科杂志), 2013, 12: 465-468.