·实验研究·

基于网络药理学和生物信息学及实验探讨雷公藤红素抑制肝癌细胞的作用机制*

范孟杨，杜晓丹，徐柳清，王耀辉，赵培源，段凯旋，李怡豪，刘喜红✉，杨丽萍

河南中医药大学，河南 郑州 450046

摘要：目的：基于网络药理学和生物信息学筛选雷公藤红素（celastrol，Cel）抗肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）的核心靶点，并通过体外细胞实验探讨其抑制 HepG2 细胞增殖和迁移的作用机制。方法：通过 Swiss Target Prediction、BATMAN－TCM、ETCM 数据库预测 Cel 的作用靶点；从 TCGA 数据库下载 HCC 基因表达谱及临床数据，筛选差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）。将 DEGs 与药物靶点取交集，利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，采用最小绝对收缩和选择算子（least absolute shrinkage and selection operator，LASSO）回归和随机森林（random forest，RF）两种机器学习算法筛选候选基因，通过 Sangerbox、GEPIA、HPA 在线数据库进行生存分析与差异表达验证，得到核心基因；利用分子对接分析 Cel 与核心基因的结合能力。最后，采用 CCK－8 法、克隆形成实验、划痕实验和 Western blot 检测 Cel 对 HepG2 细胞增殖、迁移及核心基因蛋白表达的影响。结果：Cel 抗 HCC 靶点 53 个，经 LASSO 和 RF 算法筛选并结合生存分析与差异表达分析，最终确定胸苷酸合成酶（thymidylate synthase，TYMS）、组织蛋白酶 A（cathepsin A，CTSA）、基质金属蛋白酶 9（matrix metalloproteinase 9，MMP9）为 Cel 抗 HCC 的核心基因。分子对接显示，MMP9、TYMS、CTSA 与 Cel 有较好的结合趋势。与 0 μmol·L^{-1} 相比，2、3 μmol·L^{-1} Cel 可显著抑制 HepG2 细胞增殖与迁移（$P<0.01$），并显著降低 TYMS、CTSA、MMP9 蛋白表达水平（$P<0.05$）。结论：Cel 可能通过下调 TYMS、CTSA、MMP9 蛋白表达，从而抑制 HepG2 细胞的增殖和迁移。

关键词：雷公藤红素；肝癌细胞；网络药理学；生物信息学；细胞增殖；细胞迁移
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2026.09.304
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2026)09－1987－09

Action Mechanism of Celastrol Inhibiting Liver Cancer Cells Based on Network Pharmacology, Bioinformatics, and Experimental Approach

FAN Mengyang, DU Xiaodan, XU Liuqing, WANG Yaohui, ZHAO Peiyuan,
DUAN Kaixuan, LI Yihao, LIU Xihong, YANG Liping

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046

Abstract: Objective: This study aimed to identify the core targets of celastrol (Cel) against hepatocellular carcinoma (HCC) using network pharmacology and bioinformatics, and to explore its mechanism in inhibiting HepG2 cell proliferation and migration through in vitro experiments. Methods: Cel targets were predicted using the Swiss Target Prediction, BATMAN, and ETCM databases. HCC gene expression profiles and clinical data were downloaded from the TCGA database, and differentially expressed genes (DEGs) were screened. The intersection of DEGs and drug targets was taken, and a protein－protein interaction (PPI) network was constructed using Cytoscape

*基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（82004108）；河南省科技攻关项目（202102310180）；河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目（2023GGJS081）；河南中医药大学研究生科研创新类项目（2022KYCX019，2023KYCX054）

作者简介：范孟杨（1997－），男，河南漯河人，医学硕士，研究方向：中医药防治肿瘤。
✉通信作者：刘喜红，医学博士，副教授，硕士研究生导师，研究方向：中医药防治肿瘤。E－mail：lxhong423@163.com

3. 9. 1. LASSO regression and random forest (RF) machine learning methods were used to screen candidate genes. Survival analysis and differential expression validation were performed using the Sangerbox, GEPIA, and HPA online databases to identify core genes. Molecular docking was used to assess Cel's binding ability with the core genes. Finally, CCK－8 assays, colony formation, scratch assays, and Western blot were used to examine the effects of Cel on HepG2 cell proliferation, migration, and expression of core gene proteins. Results: There are 53 HCC targets for Cel. After screening with LASSO and RF algorithms, combined with survival analysis and differential expression analysis, thymidylate synthase (TYMS), cathepsin A (CTSA), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were identified as the core genes for Cel against HCC. Molecular docking showed that MMP9, TYMS, and CTSA have good binding tendencies with Cel. Compared with 0 μmol · L^{-1}, 2 and 3 μmol · L^{-1} Cel significantly inhibited the proliferation and migration of HepG2 cells ($P < 0.01$), and significantly reduced the protein expression levels of TYMS, CTSA, and MMP9 ($P < 0.05$). Conclusion: Celastrol may inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells by downregulating the protein expression of TYMS, CTSA, and MMP9.

Key words: celastrol; liver cancer; network pharmacology; bioinformatics; cell proliferation; cell migration

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和致死率均居高位,严重威胁患者的生命安全[1]。HCC 通常在肝功能受损之后出现,起病隐匿、进展迅速,临床预后较差[2]。目前,手术切除仍是早期 HCC 最有效的治疗手段,但对肝功能受损及晚期患者的疗效有限[3];化疗和放疗虽可一定程度抑制肿瘤进展,但易产生耐药性和严重的不良反应[4]。近年来,一些口服药物被广泛用于 HCC 的治疗,但这些药物仍然存在一定的不良反应[5]。因此,亟须开发低毒高效的新型抗 HCC 药物。

雷公藤红素(celastrol, Cel)是从中药雷公藤根部提取的五环三萜类化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗肥胖等多种生物活性[6]。研究表明,Cel 在肺癌、脑胶质瘤、胃癌、肾癌等多种肿瘤中均显示出显著的抗癌活性[7-9]。在中医药治疗原发性肝癌的研究中,Cel 已成为重要的候选药物分子,并取得了较好的治疗效果[10],但其抗 HCC 的具体作用机制尚未阐明。本研究借助网络药理学和生物信息学方法系统筛选 Cel 抗 HCC 的核心靶点,并结合体外细胞实验进行验证,以期为临床治疗 HCC 提供新思路。

1　材料

1.1　细胞　人肝癌细胞 HepG2 购自广州赛库生物科技有限公司,货号:CC0101。

1.2　试剂　Cel(美国 Sigma 公司,货号:C0869,纯度≥99%);DMEM 基础培养基、0.25% 胰蛋白酶、青霉素－链霉素混合液(美国 Gibco 公司,批号:8123122、145394、145394);PBS、TBST、电泳液、转膜液、30% 丙烯酰胺溶液、β－Actin(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:GP2009041819、GC2305002、GC2305003、GC2304008、G2004、AC2111014);10% 胎牛血清(美国 Corning 公司,批号:26219003);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 细胞快速裂解液、PMSF 溶液、5×蛋白质上样缓冲液、蛋白定量 BSA 标准品(北京索莱宝科技有限公司,批号:20220C、20220425、20200820、20220507、20220510);分离胶、浓缩胶、吐温－20(北京普利莱基因技术有限公司,批号:2022C1DB1004、202002FB1003、2020N0BA1007);化学发光 A 液、B 液、PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号:19304A4、19304B4、R0HB74434);胸苷酸合成酶(thymidylate synthase, TYMS)、组织蛋白酶 A(cathepsin A, CTSA)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00046411、00125053、00123973);山羊抗兔抗体、山羊抗小鼠抗体(深圳欣博盛生物科技有限公司,批号:0109、3618);CCK－8 试剂盒[东仁化学科技(上海)有限公司,批号:SX536];结晶紫染液(上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:C11640836);异丙醇(天津富宇精细化工有限公司,批号:20220501);4% 多聚甲醛(中国白鲨公司,批号:71032700)。

1.3　仪器　CO_2 恒温培养箱、酶标仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司,型号:371、3001);电子显微镜(厦门麦克奥迪实业集团有限公司,型号:AE200);电泳仪(美国伯乐公司,型号:1658033);高速冷冻离心机(美国贝克曼公司,型号:64R);全自动化学发光分析仪(上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope 6100);高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:D1624R);生物安全柜(青岛海尔生物医疗股份有限公司,型号:HR40－ⅡA2)。

2　方法

2.1　网络药理学与生物信息学分析

2.1.1　Cel 靶点筛选　在 PubChem(https://pub-

chem. ncbi. nlm. nih. gov/compound/12413)数据库中检索雷公藤红素(Celastrol)的 SMILES 结构式;分别在 Swiss Target Prediction(http://www. swisstargetprediction. ch)、BATMAN - TCM(http://bionet. ncpb. org. cn/batman - tcm)和 ETCM(http://www. tcmip. cn/ETCM)数据库中预测 Cel 的作用靶点;利用 UniProt(https://www. uniprot. org)数据库将靶点蛋白统一转换为对应基因,合并去重后得到 Cel 的作用靶点。

2.1.2　HCC 差异基因筛选　从癌症基因组图谱(TCGA,https://portal. gdc. cancer. gov)数据库下载 HCC 患者的基因表达谱和临床数据。利用 R 4.2.2 软件 limma 包筛选差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),筛选条件为$|\log_2 FC| > 1$ 且 $P < 0.05$,采用 ggplot2 和 pheatmap 包绘制火山图和热图。

2.1.3　蛋白互作网络构建　将 Cel 作用靶点与 HCC 的 DEGs 导入 Venny 2.1 在线网站(https://bioinfogp. cnb. csic. es/tools/venny)取交集,以获得 Cel 抗 HCC 的潜在作用靶点。将交集靶点提交至 STRING 数据库(https://cn. string - db. org)构建蛋白质 - 蛋白质相互作用(protein - protein interaction,PPI)网络,并通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络可视化分析。

2.1.4　富集分析　利用 R 软件的 clusterProfiler 包对交集靶点进行基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析,物种属性选择“Homo sapiens”,以 $P < 0.05$ 为筛选阈值,使用 ggplot2 包将其结果可视化为气泡图。

2.1.5　机器学习筛选候选基因　最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator,LASSO)回归利用参数 lambda 值来调整复杂程度,增加的 lambda 值会对具有较多变量的线性模型施加更高的惩罚,这导致所选基因的数量减少,从而在结果中产生更简洁且更具代表性的关键基因集。采用 LASSO 回归算法进行特征选择以筛选 Cel 抗 HCC 的基因,通过 R 包 glmnet 进行 10 倍交叉验证确定最佳 I 值。利用 R 软件 Random Forest 包对交集靶点进行随机森林(random forest,RF)分析,以 $P < 0.05$ 为筛选条件;利用 Venny 2.1(https://bioinfogp. cnb. csic. es/tools/venny)工具将 LASSO 回归和 RF 获得的基因取交集,得到候选基因。

2.1.6　核心基因筛选与验证　利用 Sangeerbox(http://sangerbox. com/home. html)在线网站对候选基因进行生存分析,筛选 $P < 0.05$ 的基因。通过 GEPIA 数据库(http://gepia. cancer - pku. cn)分析候选基因在正常肝组织和 HCC 组织中 mRNA 的差异表达,筛选条件为:$|\log_2 FC| > 1$,$P < 0.01$,选择 LIHC(肝细胞癌)数据集绘制箱式图,筛选出具有统计学差异的基因。将生存分析和差异分析筛选的基因取交集即为核心基因。利用 HPA 数据库(https://www. proteinatlas. org)检索核心基因,得到各基因在 HCC 组织和正常组织中的免疫组化图谱,对核心基因进一步验证。

2.1.7　分子对接　利用 RCSB PDB 数据库(https://www. rcsb. org)下载核心基因对应蛋白的三维结构,在 PubChem 数据库下载 Cel 的 SDF 格式结构文件。将蛋白与化合物结构文件上传 CB - Dock2 网站(https://cadd. labshare. cn/cb - dock2),以 AutoDock Vina(https://vina. scripps. edu)为基础进行分子对接模拟计算。

2.2　体外细胞实验

2.2.1　细胞培养　HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素双抗的 DMEM 完全培养基,在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。当细胞生长融合度为 80% ~ 90% 时,用 0.25% 胰酶消化,按 1∶3 比例传代培养。

2.2.2　CCK - 8 法检测细胞增殖　将处于对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板,每孔 5×10^3 个,待细胞生长至 80% 融合度后,加入含不同浓度 Cel(1、2、3 $\mu mol \cdot L^{-1}$)的培养基,培养 24 h;空白组(0 $\mu mol \cdot L^{-1}$)不加细胞。每孔加入 10 μL CCK - 8 溶液,置于培养箱中孵育 30 min,在 450 nm 波长处检测光密度值,计算细胞活力。

2.2.3　克隆形成实验　将 HepG2 细胞以每孔 500 个的密度接种于 6 孔板中,培养 48 h 后加入 2 mL 等比例稀释的 Cel(0、0.003、0.006、0.009 $\mu mol \cdot L^{-1}$),24 h 后更换完全培养基,每 3 d 换液 1 次连续培养 14 d。每孔加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去固定液,再加入 2 mL 0.1% 结晶紫避光染色 30 min,PBS 清洗 3 次,晾干后拍照,采用 Image J 软件分析细胞团数。

2.2.4　划痕实验　HepG2 细胞以每孔 1.5×10^5 个的密度接种于 6 孔板中,培养 24 h,细胞密度为 80% ~90% 时进行划痕。将 0、1、2、3 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cel 依次加入 6 孔板中,每孔 2 mL,放置于培养箱中培养,分别在 0、24 h 时观察并拍照,采用 Image J 软

件测量细胞迁移面积，计算细胞迁移率。

2.2.5　Western blot 实验　将 HepG2 细胞以每孔 1.5×10^5 个的密度接种于 6 孔板中，培养 24 h，细胞密度达到 80% ~90%时，依次加入 0、1、2、3 μmol·L^{-1} Cel，每孔 2 mL，再培养 24 h 后收集细胞，PBS 清洗，胰酶消化后收集于 15 mL 离心管中。加入 RIPA 细胞裂解液和 PMSF，冰浴 20 min 后，加入相应的 5 × SDS 上样缓冲液。凝胶电泳后，转膜至 PVDF 膜，后加入脱脂牛奶封闭 1 h，TBST 清洗 3 次。加入一抗 β－Actin（1∶5 000）、TYMS（1∶5 000）、CTSA（1∶3 000）、MMP9（1∶3 000），4 ℃孵育过夜，次日 TBST 清洗 3 次后加入 HRP 标记二抗（1∶20 000），37 ℃孵育 1 h，TBST 清洗 3 次，滴加 100 μL 发光液，发光分析仪显影，Image J 软件分析蛋白灰度值。

2.3　统计学方法　采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计学分析，实验数据用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据符合正态分布且方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用独立样本 t 检验；若数据不符合正态分布，采用非参数秩和检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

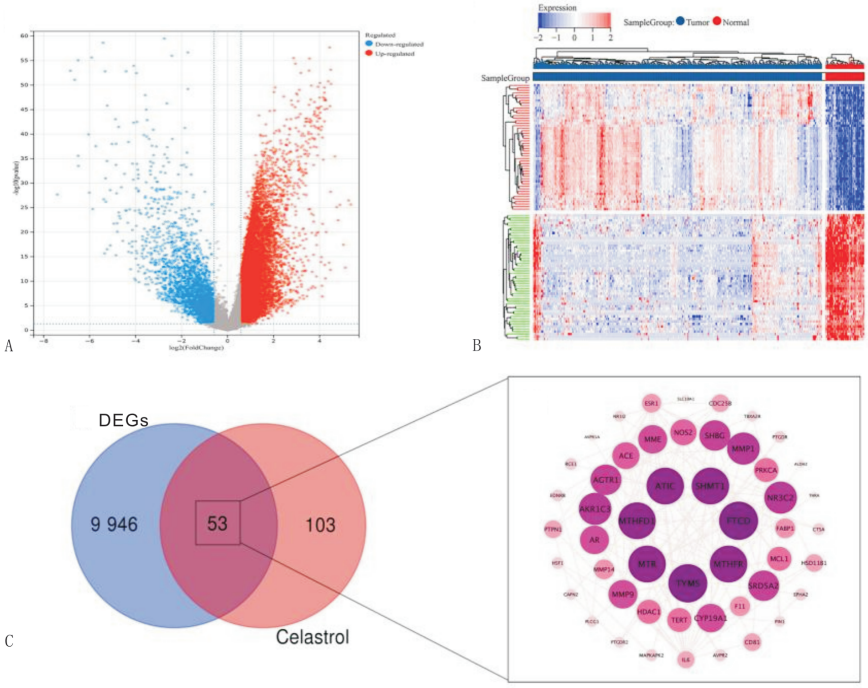
3　结果

3.1　网络药理学与生物信息学分析结果

3.1.1　Cel 作用靶点　通过 Swiss Target Prediction、BATMAN－TCM 和 ETCM 数据库分别检索到 Cel 潜在靶点 137、16、14 个，合并去重后得到 159 个潜在作用靶点。

3.1.2　HCC 差异基因　从 TCGA 数据库获得 364 个肿瘤组样本和 50 个正常组样本的表达谱数据，共涉及 58 398 个基因，得到 14 795 个 DEGs，其中上调基因 11 741 个，下调基因 3 054 个，见图 1A—1B。

3.1.3　疾病－药物交集靶点　将获取的 DEGs 和药物靶点导入 Venny 在线网站中，获得 53 个 Cel 抗 HCC 的靶点，见图 1C。



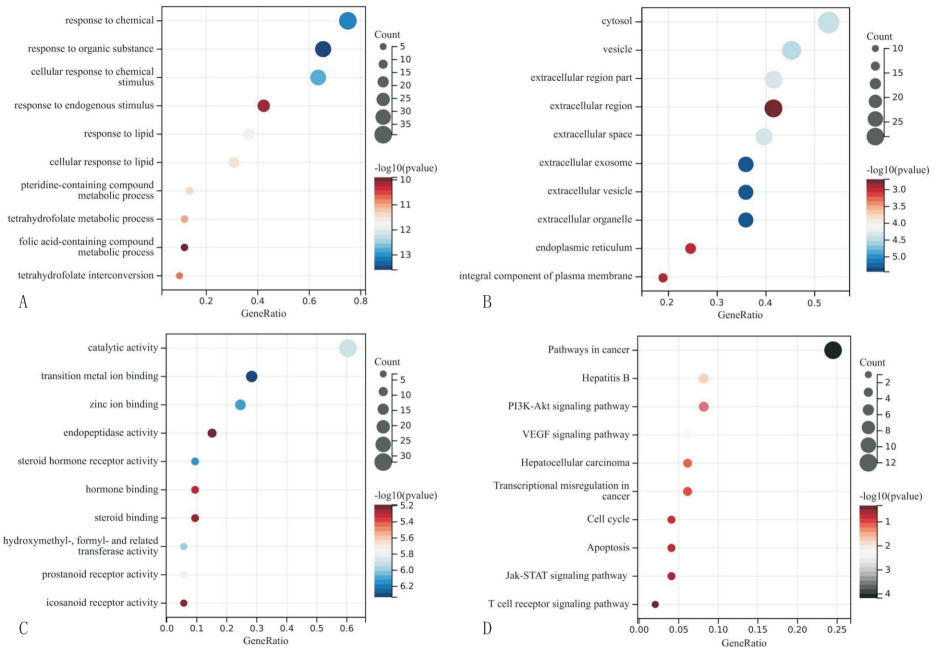
注：A：HCC 差异表达基因火山图；B：HCC 差异表达基因热图；C：交集靶点韦恩图，深色代表节点在网络中相对重要，浅色代表节点在网络中相对次要。

图 1　雷公藤红素抗 HCC 潜在靶点

3.1.4　GO 与 KEGG 分析　GO 富集分析显示，生物过程（biological process，BP）共 1 998 个，主要涉及对化学品的反应和对有机物的反应等；细胞组分（cellular component，CC）共 84 个，主要涉及胞浆等；分子功能（molecular function，MF）共 290 个，主要涉及催化活性、过渡金属离子结合等，见图 2A—2C。

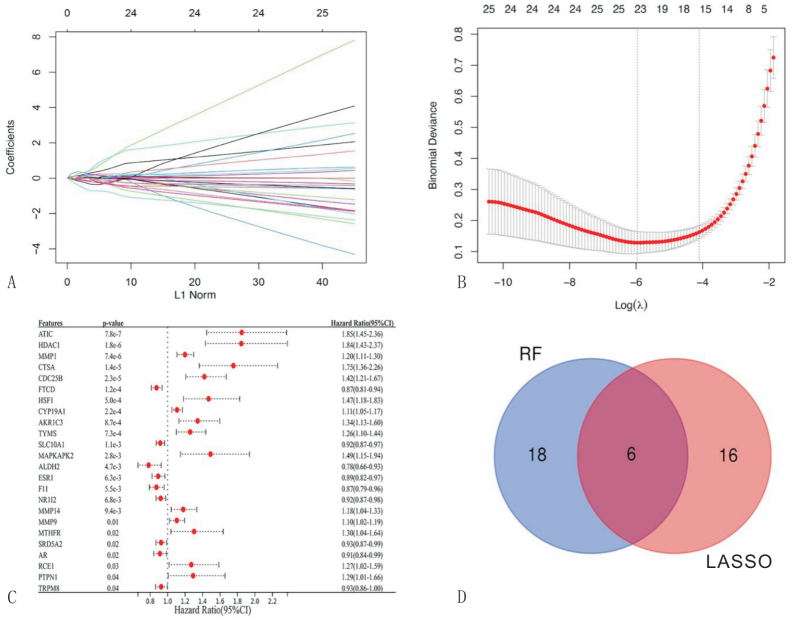
KEGG 分析得到 131 条通路，主要包括癌症、乙型肝炎、PI3K/AKT、VEGF、肝癌信号通路等，见图 2D。

3.1.5　机器学习筛选候选基因　LASSO 回归分析从 53 个交集靶点中筛选出 23 个特征基因；RF 算法筛选出 24 个特征基因。两种算法取交集后获得 6 个候选基因，见图 3。



注：A：BP；B：CC；C：MF；D：KEGG 通路。

图 2　GO 和 KEGG 富集气泡图



注：A：LASSO 回归系数轨迹图；B：LASSO 回归 10 倍交叉验证图；C：随机森林图；D：LASSO 与 RF 韦恩图。

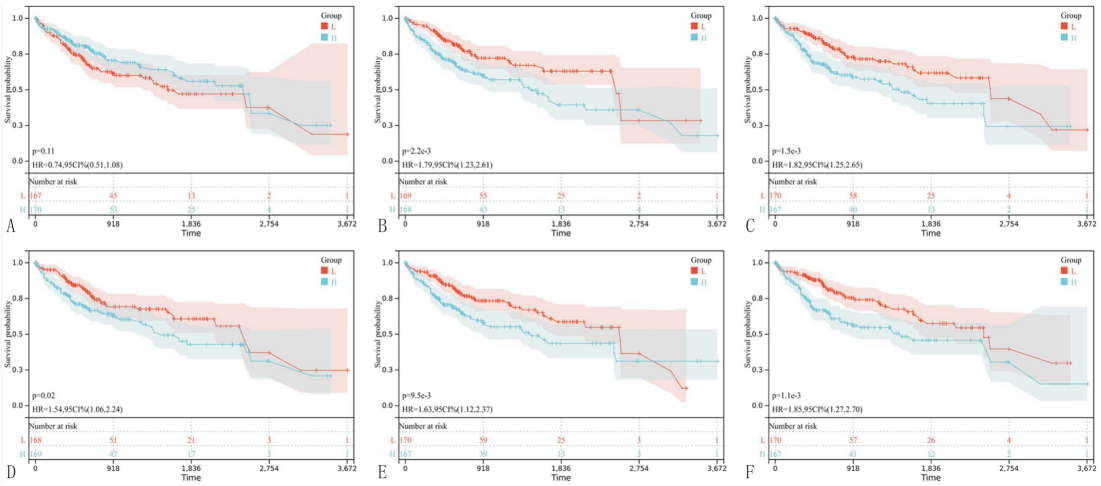
图 3　候选基因筛选

3.1.6　核心基因筛选与验证　生存分析显示，CTSA（$P=2.2\times10^{-3}$）、HSF1（$P=1.5\times10^{-3}$）、TYMS（$P=1.1\times10^{-3}$）、MMP9（$P=0.02$）、RCE1（$P=9.5\times10^{-3}$）5 个基因高表达与 HCC 患者预后不良相关，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；ALDH2（$P=0.11$）基因表达差异无统计学意义，见图 4。

GEPIA 数据库 mRNA 差异分析显示，与正常肝组织相比，HCC 组织中 *CTSA*、*TYMS*、*MMP9* mRNA 表达水平升高（$P<0.05$），*HSF1*、*RCE1*、*ALDH2* mRNA 表达水平的差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 5。结合生存分析与差异分析结果，CTSA、TYMS、MMP9 可能为 Cel 抗 HCC 的核心基因。

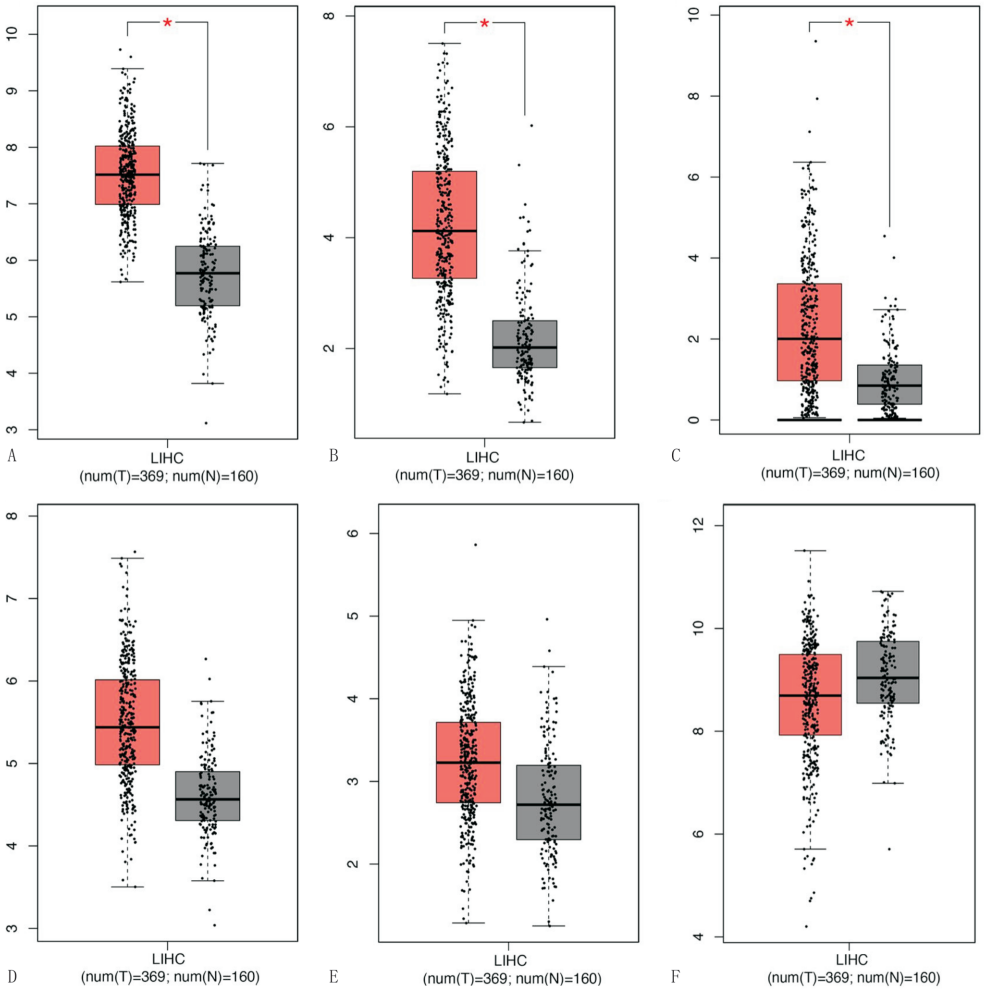
HPA 数据库中免疫组化结果显示，CTSA 蛋白在正常肝组织中呈现中等强度染色，而在 HCC 组织中呈现高强度染色；TYMS 蛋白在正常肝组织中呈现低强度染色，而在 HCC 组织中呈现中等强度染色，染色细胞比例超过 75%；MMP9 蛋白在正常肝组织中未见染色，而在 HCC 组织中呈现中等强度的染

色，见图 6。由此说明，与正常肝组织相比，HCC 组织中 CTSA、TYMS、MMP9 蛋白高表达，这与生存分析和差异分析的结果相一致。这些结果表明，*CTSA*、*TYMS*、*MMP9* 可能是 Cel 抗 HCC 的核心基因。



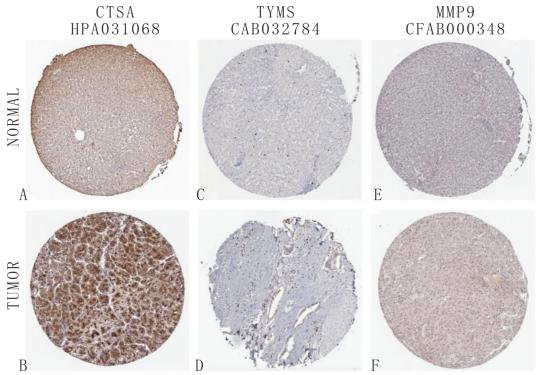
注：A－F 分别代表 ALDH2、CTSA、HSF1、MMP9、RCE1、TYMS 的生存分析结果；红色代表基因低表达，蓝色代表基因高表达。

图 4　HCC 候选基因的生存分析图



注：A—F 分别代表 *CTSA*、*TYMS*、*MMP9*、*HSF1*、*RCE1*、*ALDH2* mRNA 表达水平；红色代表肝癌组织，黑色代表正常组织；＊$P<0.05$。

图 5　HCC 候选基因 mRNA 差异表达分析



注：A、C、E 代表正常肝组织中表达情况；B、D、F 代表 HCC 组织中 CTSA、TYMS、MMP9 表达情况。

图 6　CTSA、TYMS、MMP9 蛋白免疫组化染色图

3.1.7　分子对接验证　分子对接结果显示，Cel 与 3 个核心基因 MMP9（1gkd）、TYMS（1hvy）、CTSA（3bp4）均具有较好的结合活性，见表 1、图 7。

表 1　雷公藤红素与 3 个核心基因的分子对接结果

靶点	Vina 得分	空腔体积	中心坐标(x,y,z)	对接盒子尺寸(x,y,z)
MMP9	-7.7	795	-3,25,17	23,23,23
TYMS	-9.3	2 983	34,41,36	23,32,34
CTSA	-11.0	5 629	11,-7,-24	35,32,23

3.2　体外细胞实验结果

3.2.1　Cel 对 HepG2 细胞增殖与克隆的影响　CCK-8 实验显示，与空白组（0 μmol · L^{-1}）相比，2、3 μmol · L^{-1} Cel 组细胞存活率显著降低（$P<0.001$），并呈浓度依赖性，见表 2。

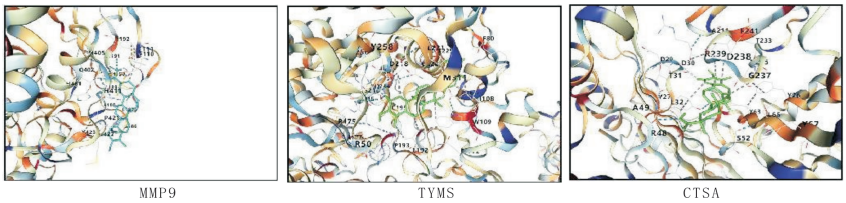


图 7　雷公藤红素与 3 个核心基因的分子对接结合模式图

与 0 h 相比，2 μmol · L^{-1} Cel 处理 12、24、48 h 后均能抑制 HepG2 细胞活性，且呈时间依赖性（$P<0.01$）。半数抑制浓度（IC_{50}）为 2 μmol · L^{-1}，最佳作用时间为 24 h，见图 8A。

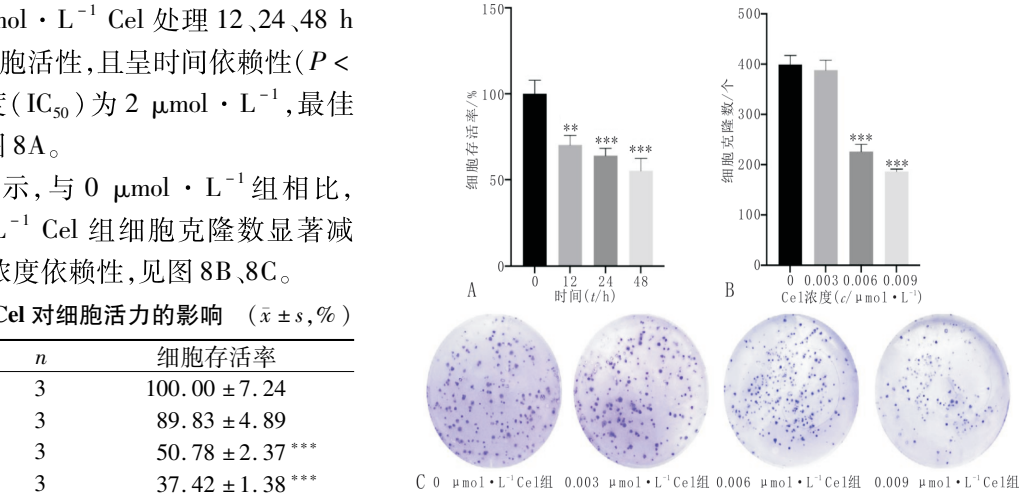
克隆形成实验显示，与 0 μmol · L^{-1} 组相比，0.006、0.009 μmol · L^{-1} Cel 组细胞克隆数显著减少（$P<0.001$），且呈浓度依赖性，见图 8B、8C。

表 2　不同浓度 Cel 对细胞活力的影响　（$\bar{x}\pm s$，%）

Cel 浓度（c/μmol · L^{-1}）	n	细胞存活率
0	3	100.00 ± 7.24
1	3	89.83 ± 4.89
2	3	50.78 ± 2.37***
3	3	37.42 ± 1.38***

注：与 0 μmol · L^{-1} 组比较，***$P<0.001$。

3.2.2　Cel 对 HepG2 细胞迁移的影响　划痕实验显示，与空白组（0 μmol · L^{-1}）相比，2、3 μmol · L^{-1} Cel 组细胞迁移率显著降低（$P<0.01$），见图 9、表 3。



注：A：不同时间 HepG2 细胞存活率比较；B：HepG2 细胞克隆数比较；C：细胞克隆实验染色图；与 0 μmol · L^{-1} 组比较，**$P<0.01$，***$P<0.001$。

图 8　Cel 对 HepG2 细胞增殖与克隆的影响

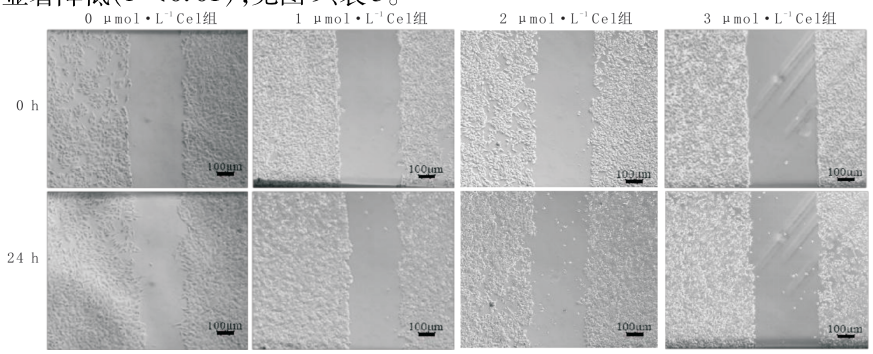


图 9　Cel 对 HepG2 细胞迁移的影响（40 ×）

表 3　不同浓度 Cel 对细胞迁移的影响　($\bar{x} \pm s$,%)

Cel 浓度(c/μmol·L^{-1})	n	细胞迁移率
0	3	13.71 ± 1.32
1	3	12.20 ± 2.39
2	3	5.86 ± 1.67**
3	3	4.08 ± 1.13***

注:与 0 μmol·L^{-1}组比较,** P < 0.01,*** P < 0.001。

3.2.3　Cel 对 HepG2 细胞 MMP9、TYMS、CTSA 蛋白表达的影响　Western blot 显示,与空白组(0 μmol·L^{-1})相比,2、3 μmol·L^{-1} Cel 组细胞 MMP9、TYMS 蛋白表达水平均降低(P < 0.001),1、2、3 μmol·L^{-1} Cel 组细胞 CTSA 蛋白表达水平均降低(P < 0.05),见图 10、表 4。

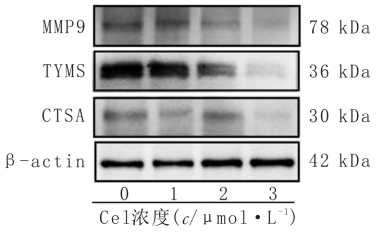


图 10　各组细胞 MMP9、TYMS、CTSA 蛋白条带图

表 4　各组细胞 MMP9、TYMS、CTSA 蛋白表达水平比较　($\bar{x} \pm s$)

Cel 浓度(c/μmol·L^{-1})	n	CTSA	TYMS	MMP9
0	3	1.07 ± 0.12	0.97 ± 0.02	1.10 ± 0.04
1	3	0.67 ± 0.07*	0.99 ± 0.07	0.98 ± 0.10**
2	3	0.76 ± 0.06*	0.60 ± 0.05***	0.58 ± 0.15*
3	3	0.43 ± 0.20***	0.34 ± 0.09***	0.37 ± 0.24***

注:与 0 μmol·L^{-1}组比较,* P < 0.05,** P < 0.01,*** P < 0.001。

4　讨论

HCC 具有发病率高、恶性程度高、侵袭与转移能力强、预后差等特点,严重影响患者的生存时间和生活质量[11]。研究表明,针对晚期 HCC 患者,手术治疗效果并不显著,因此迫切需要研发新的药物和治疗方案[12]。Cel 作为雷公藤的主要活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、神经保护和抗癌等多种药理活性[13-15]。Cel 主要通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭、诱导细胞凋亡、抑制自噬等途径抑制多种肿瘤进展,如结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤[16-19]等。但 Cel 治疗 HCC 的作用机制并未明确,因此需要进一步的研究。

本研究利用网络药理学筛选出 Cel 抗 HCC 的 53 个靶点,经过 LASSO 回归、RF 算法、生存分析及差异表达分析共筛选出 3 个核心基因,即 CTSA、TYMS、MMP9。HPA 数据库免疫组化结果提示,与正常肝组织相比,肝癌组织中 CTSA、TYMS、MMP9 蛋白呈高表达,提示三者可能是 Cel 抗 HCC 的核心靶点。CTSA 是一种溶酶体蛋白酶,被认为是 HCC 诊断和预后的重要生物标志物[20]。研究表明,敲低 CTSA 可显著抑制 HCC 细胞的增殖、侵袭和迁移[21]。此外,在乳腺癌、肺癌、前列腺癌等多种癌症中也发现了 CTSA 的过表达能够促进肿瘤细胞的增殖[22]。TYMS 是一种胸腺嘧啶合成酶,对 DNA 合成至关重要,其异常表达与多种肿瘤有关,被视为抗肿瘤药物的作用靶点,通过抑制 TYMS 表达可抑制 HCC 细胞增殖[23]。Cel 能够抑制 HCC 细胞的增殖、迁移,并有效降低 TYMS 蛋白的表达[24]。MMP9 是经典的转移诱导因子,在癌症的发生进展中发挥重要作用[25]。研究表明,Cel 能够抑制 MMP9 的表达,同时抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭,并促进细胞凋亡和细胞周期停滞[26]。Cel 可通过调控 NF-κB 信号通路抑制 MMP9 蛋白表达,进而抑制 HCC 细胞的侵袭和迁移[27]。近年来,多项研究表明,CTSA、TYMS、MMP9 蛋白表达越高,肝癌患者生存率越低[28-30]。本研究的生物信息学和体外实验结果与上述报道基本一致,CTSA、TYMS、MMP9 的高表达与 HCC 预后不良有关。Cel 可能通过抑制 CTSA、TYMS、MMP9 的表达,进而抑制 HepG2 细胞的增殖、迁移。本研究为阐明 Cel 治疗 HCC 的机制提供理论依据,并为开发抗 HCC 靶向药物提供新思路。

综上所述,Cel 可能通过下调 TYMS、CTSA、MMP9 蛋白表达,从而抑制 HepG2 细胞的增殖和迁移。

参考文献:

[1] Wen P Z, Wang R, Xing Y Q, et al. The prognostic value of the GPAT/AGPAT gene family in hepatocellular carcinoma and its role in the tumor immune microenvironment[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1026669.

[2] Torimura T, Iwamoto H. Treatment and the prognosis of hepatocellular carcinoma in Asia[J]. Liver Int, 2022, 42(9): 2042-2054.

[3] 吕敏玲,钟欣,李静,等. 杠柳甙元对人肝癌 Hep3B 细胞增殖、凋亡、迁移的调控作用及其机制研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(5): 340-346.

[4] Kim J, Byun H K, Kim T H, et al. Liver-directed concurrent chemoradiotherapy versus sorafenib in hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis[J]. Cancers,

2022,14(10):2396.
[5]Zhang G C, Liu J, Yu X N, et al. Bismuth - based mesoporous nanoball carrying sorafenib for computed tomography imaging and synergetic chemoradiotherapy of hepatocellular carcinoma[J]. Adv Healthc Mater,2020,9(21):e2000650.
[6]Shi J F,Li J X,Xu Z Y,et al. Celastrol:a review of useful strategies overcoming its limitation in anticancer application [J]. Front Pharmacol,2020,11:558741.
[7]Wang C,Dai S,Zhao X T,et al. Celastrol as an emerging anticancer agent: Current status, challenges and therapeutic strategies[J]. Biomed Pharmacother,2023,163:114882.
[8]Kashyap D,Sharma A,Tuli H S,et al. Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements [J]. Crit Rev Oncol Hematol,2018,128:70 - 81.
[9]Song J,He G N,Dai L. A comprehensive review on celastrol,triptolide and triptonide:Insights on their pharmacological activity, toxicity, combination therapy, new dosage form and novel drug delivery routes[J]. Biomedecine Pharmacother,2023,162:114705.
[10]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,2023,48(6):653 - 662.
[11]黄海福,付艳丽,符必谦,等. 参桃软肝方抑制人肝癌细胞 HepG2 活性的作用机制研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2023,25(7):2353 - 2364.
[12]Cai X,Peng S,Wang L,et al. Scutellaria baicalensis in the treatment of hepatocellular carcinoma:network pharmacology analysis and experimental validation[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2023,2023:4572660.
[13]Zhang C Y,Zhao M,Wang B W,et al. The Nrf2 - NLRP3 - caspase - 1 axis mediates the neuroprotective effects of Celastrol in Parkinson′s disease[J]. Redox Biol,2021,47:102134.
[14]Liang Q Q,Shi Z J,Yuan T,et al. Celastrol inhibits necroptosis by attenuating the RIPK1/RIPK3/MLKL pathway and confers protection against acute pancreatitis in mice[J]. Int Immunopharmacol,2023,117:109974.
[15]Wang X C,Chauhan G,Tacderas A R L,et al. Surface - modified inhaled microparticle - encapsulated celastrol for enhanced efficacy in malignant pleural mesothelioma[J]. Int J Mol Sci,2023,24(6):5204.
[16]Zhang X,Zhou J,Zhu Y P,et al. Quantitative chemical proteomics reveals anti - cancer targets of Celastrol in HCT116 human colon cancer cells[J]. Phytomedicine,2022,101:154096.
[17]Tan Q L,Liu Z Q,Gao X B,et al. Celastrol recruits UBE3A to recognize and degrade the DNA binding domain of steroid receptors[J]. Oncogene,2022,41(42):4754 - 4767.
[18]Zeng X H,Zhu X,Tian Q K,et al. Celastrol - conjugated chitosan oligosaccharide for the treatment of pancreatic cancer[J]. Drug Deliv,2022,29(1):89 - 98.
[19]Zhu Y J,Liu X H,Zhao P Y,et al. Celastrol suppresses glioma vasculogenic mimicry formation and angiogenesis by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Front Pharmacol,2020,11:25.
[20]Ding R L,Zhao C B,Jing Y X,et al. Basement membrane - related regulators for prediction of prognoses and responses to diverse therapies in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Med Genomics,2023,16(1):81.
[21]Sun W J,Wang J,Wang Z Q,et al. Combining WGCNA and machine learning to construct basement membrane - related gene index helps to predict the prognosis and tumor microenvironment of HCC patients and verifies the carcinogenesis of key gene CTSA[J]. Front Immunol,2023,14:1185916.
[22]Wang H X,Xu F F,Yang F,et al. Prognostic significance and oncogene function of cathepsin A in hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep,2021,11(1):14611.
[23]Wang L,Shi C Y,Yu J,et al. Correction:FOXM1 - induced TYMS upregulation promotes the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int,2022,22(1):384.
[24]Li S H,Hao L Y,Hu X Y,et al. A systematic study on the treatment of hepatitis B - related hepatocellular carcinoma with drugs based on bioinformatics and key target reverse network pharmacology and experimental verification[J]. Infect Agent Cancer,2023,18(1):41.
[25]Huang H. Matrix metalloproteinase - 9 (MMP - 9) as a cancer biomarker and MMP - 9 biosensors:recent advances [J]. Sensors,2018,18(10):3249.
[26]Zhang H,Mao Y X,Zou X M,et al. Triptonide inhibits growth and metastasis in HCC by suppressing EGFR/PI3K/AKT signaling[J]. Neoplasma,2023,70(1):94 - 102.
[27]Li H Y,Li Y,Liu D,et al. miR - 224 is critical for celastrol - induced inhibition of migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Physiol Biochem,2013,32(2):448 - 458.
[28]Luo L B,Wang X Y,Wang H X,et al. High cathepsin A protein expression predicts poor prognosis and tumor recurrence of hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy[J]. Am J Cancer Res,2022,12(8):3843 - 3856.
[29]Li S,Zhao J Y,Lv L L,et al. Identification and validation of TYMS as a potential biomarker for risk of metastasis development in hepatocellular carcinoma [J]. Front Oncol,2021,11:762821.
[30]Lin Y H,Liu Y C,Chen C Y,et al. LPAL2 suppresses tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by modulating MMP9 expression[J]. Cells,2022,11(16):2610.

收稿日期:2026 - 03 - 15
编辑:刘凯歌