

· 论著 · 一次研究 ·

基于网络药理学探究水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭及铁死亡的影响



丁厚伟, 盛 华, 张 平, 陈美惠

南京大学医学院附属金陵医院(东部战区总医院)药剂科(南京 210014)

【摘要】目的 研究水飞蓟宾对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭及铁死亡的影响，并基于网络药理学实验验证其调控机制。**方法** 水飞蓟宾干预 HepG2 细胞后，采用 CCK-8 法检测细胞活力；Hochest 染色检测细胞凋亡水平；细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力；DCFH-DA 探针检测细胞活性氧 (ROS) 水平；JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位；FerroOrange 探针检测细胞 Fe^{2+} 水平。在线数据库获取水飞蓟宾、肝癌和铁死亡靶点，对交集靶点进行蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络分析，以及 GO 和 KEGG 富集分析；水飞蓟宾单独干预及其联合低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 抑制剂 GN44028 处理后，采用 Western Blot 检测细胞中 HIF-1 α 和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的蛋白表达水平。**结果** 水飞蓟宾对 HepG2 细胞的半数抑制浓度为 $87.97 \mu\text{mol/L}$ ，抑制作用呈现剂量依赖性。与空白 HepG2 细胞比较，水飞蓟宾能促进细胞凋亡，显著抑制细胞划痕愈合能力 ($P < 0.05$)，减少迁移和侵袭细胞数量 ($P < 0.05$)，提升细胞 ROS 和 Fe^{2+} 水平，诱导细胞线粒体膜电位极化。水飞蓟宾、肝癌和铁死亡的交集靶点为 HIF-1 α 、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、神经母细胞瘤 RAS 病毒同源物 (NRAS)、磷脂酰肌醇 3- 激酶催化亚基 α (PIK3CA)、端粒酶逆转录酶 (TERT)、碳酸酐酶 IX (CA9)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)、多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 1 (PARP-1) 和磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (PGD)。与空白 HepG2 细胞比较，水飞蓟宾能显著增加细胞 HIF-1 α 表达，降低 GPX4 表达 ($P < 0.05$)。GN44028 能逆转水飞蓟宾诱导 HepG2 细胞中 Fe^{2+} 浓度的升高、GPX4 表达及细胞活力的降低。**结论** 水飞蓟宾能抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和侵袭，诱导凋亡和铁死亡，这一作用可能与其激活 HIF-1 α 进而抑制 GPX4 表达有关。

【关键词】 水飞蓟宾；肝癌；细胞增殖；细胞凋亡；细胞迁移；细胞侵袭；铁死亡；网络药理学

【中图分类号】 R285.5

【文献标识码】 A

Investigating the effects of silibinin on proliferation, apoptosis, migration, invasion, and ferroprelation of HepG2 hepatocellular carcinoma cells based on network pharmacology

DING Houwei, SHENG Hua, ZHANG Ping, CHEN Meihui

Department of Pharmacy, Jinling Hospital, Affiliated Hospital of Medical School, Nanjing University General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210014, China

Corresponding author: CHEN Meihui, Email: meifazi1234@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of silibinin on proliferation, apoptosis, migration, invasion and ferroptosis of liver cancer HepG2 cells, and to verify the regulatory mechanisms of ferroptosis based on network pharmacology and experimental validation. Methods Following silibinin intervention in HepG2 cells, cell viability was assessed using CCK-8 assay, apoptosis levels were measured using Hoechst staining, cell migration and invasion capabilities were evaluated through scratch assays and Transwell assays, ROS level was measured using DCFH-DA probe, mitochondrial membrane potential was assessed using JC-1 staining, and Fe²⁺ levels were detected by FerroOrange probe. Online databases were used to obtain silibinin, liver cancer, and ferroptosis targets, with subsequent analysis of intersecting targets through PPI network analysis, GO and KEGG enrichment analysis. After intervention with silybin alone and treatment with GN44028, Western Blot was used to detect the protein expression levels of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and glutathione peroxidase 4 (GPX4). Results The semi-inhibitory concentration of silibinin for inhibiting HepG2 cell was 87.97 μmol/L, with a dose-dependent inhibitory effect. Compared to control HepG2 cells, silibinin promoted cell apoptosis, significantly inhibited cell scratch closure ability ($P<0.05$), reduced the number of migrating and invading cells ($P<0.05$), elevated intracellular ROS and Fe²⁺ levels, and induced mitochondrial membrane potential polarization. The intersecting targets of silibinin, liver cancer, and ferroptosis were identified as HIF-1α, mTOR, SRC, NRAS, PIK3CA, TERT, CA9, MAPK14, PARP-1, and PGD. Compared to control HepG2 cells, silibinin significantly increased the expression of HIF-1α in cells and decreased the expression of GPX4 ($P<0.05$). GN44028 can reverse the increase in Fe²⁺ concentration, the reduction in GPX4 expression, and the decrease in cell viability induced by silibinin in HepG2 cells. Conclusion Silibinin can inhibit the proliferation, migration, and invasion of HepG2 cells, induce apoptosis and ferroptosis, which may be related to its activation of HIF-1 α and subsequent inhibition of GPX4 expression.

【Keywords】 Silibinin; Liver cancer; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell migration; Cell invasion; Ferroptosis; Network pharmacology

肝癌是一种常见的恶性肿瘤，也是肿瘤相关死亡的主要原因。肝癌在全球范围内发病率和死亡率均居高不下，每年有超过 90 万新发病例和超过 80 万死亡病例^[1]。我国是肝癌的高发国家之一，该疾病对人民生命健康与生活质量构成了严重威胁^[2]。目前，肝癌治疗措施主要包括手术切除、肝移植、放化疗、靶向药物治疗以及局部治疗方法，如消融治疗和介入治疗等。然而，上述干预措施存在多方面的局限性，例如手术切除会受到肿瘤位置和肝功能状态的限制，放化疗可能引起明显的毒副作用等。此外，肝移植需要合适的供体，并且术后管理风险较高^[3]。因此，寻找新的肝癌治疗方法至关重要。

恶性肿瘤的重要特征之一是细胞增殖失控，而药物诱导细胞死亡则是其抗肿瘤作用的重要途径^[4]。一些天然药物成分如紫杉醇和长春新碱等，可通过抑制肿瘤细胞有丝分裂而诱导细胞死亡，而积雪草酸和苍术酮则能够诱导肿瘤细胞凋亡^[5-7]。与经典的细胞凋亡不同，铁死亡是一种以细胞内脂质活性氧增多和亚铁离子过载为特征的新型程序性细胞死亡形式。铁死亡与肿瘤的发生

和发展密切相关，肿瘤细胞通常表现出对铁的需求量增加，因为铁在维持肿瘤细胞增殖和代谢过程中起着重要作用^[8]。研究显示，葫芦素 B 通过诱导细胞铁死亡抑制肝癌细胞增殖^[9]。因此，诱导铁死亡是一种潜在的肿瘤治疗策略。

水飞蓟宾是从水飞蓟 (*Silybum marianum*) 种子中提取的一种黄酮类化合物，因其保肝作用备受关注，在医疗保健实践中得到广泛应用^[10]。长期以来，大量研究表明水飞蓟宾可通过多种途径改善肝病，包括酒精性肝炎、酒精性肝病、代谢性肝炎以及肝病常见终末期（肝硬化和肝癌）^[11]。据报道，水飞蓟宾可通过诱导细胞凋亡和阻滞细胞周期的方式来抑制肝癌细胞的增殖，展现出其抗肝癌作用^[12]。此外，已有证据表明水飞蓟宾能够调控肝细胞的铁死亡过程^[13]。然而，目前尚不清楚水飞蓟宾的抗肝癌作用是否与其调控铁死亡有关。因此，本研究旨在基于水飞蓟宾的抗肝癌特性，利用网络药理学方法探索水飞蓟宾在诱导肝癌细胞铁死亡过程中的潜在靶点，并进行实验验证，以期进一步揭示水飞蓟宾的抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Heracell Vios 160i CR 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); DMi1 和 DM IL LED 倒置显微镜(德国 Leica 公司); SpectraMax iD5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); FPSCAN-Chemlux 化学成像分析系统(美国伯乐公司)。

1.2 主要药物与试剂

水飞蓟宾(上海阿拉丁生化科技公司,货号:S109808,纯度≥98%);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 货号: ID9010)、RIPA 裂解液(货号: R0020)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号: PC0021)均购自北京索莱宝科技有限公司;多聚甲醛(货号: P804536)、Giemsa 染液(货号: G718198)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司;Matrigel 基底胶(上海源叶生物科技有限公司,货号: R32345);DEME 高糖培养基(上海泰坦科技股份有限公司,货号: C8459);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 货号: G8003)、CCK-8 试剂盒(货号: G4103)、Hoechst 33258 染液(货号: G1011)、DCFH-DA(货号: G1706)和 JC-1(货号: G1515)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; FerroOrange 试剂盒(日本同仁化学研究所,货号: F374); Transwell 板(美国康宁公司,货号: WG3422);低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α , 货号: AF1009)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4, 货号: DF6701)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 货号: AF7021)抗体及羊抗兔 IgG-HRP(货号: S0001)均购自江苏亲科生物公司; GN44028(美国 MCE 公司, 货号: HY-110266)。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞(武汉普诺赛生物公司,货号: CL-0103)在含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基和 37℃ 的 5% CO₂ 环境中培养,于细胞密度达到 70%~80% 时传代。

1.4 方法

1.4.1 细胞增殖检测

在 96 孔板中接种对数生长期的 HepG2 细胞,分别给予 10、20、40、60、80、100、200 μmol/L

水飞蓟宾,空白组不加细胞及培养基,以 0.1% DMSO 为对照,每组设置 3 个复孔。孵育 24 h 后,向每孔加入 10 μL CCK-8 工作液,继续孵育 2 h 后测定 450 nm 处的光密度(OD)值,计算细胞活力[%,(OD_{药物}-OD_{空白})/(OD_{对照}-OD_{空白})×100%]。此外,取对数生长期的 HepG2 细胞,随机分为 HIF-1 α 抑制剂组、水飞蓟宾组及联合组:分别给予 5 nmol/L GN44028、80 μmol/L 水飞蓟宾和 5 nmol/L GN44028+80 μmol/L 水飞蓟宾,以 0.1% DMSO 为空白对照,计算 24 h 细胞活力,检测步骤同前。

1.4.2 Hoechst 染色实验

在 24 孔板接种对数生长期的 HepG2 细胞,分别加入 40、60、80 μmol/L 水飞蓟宾干预,以 0.1% DMSO 为空白对照,孵育 24 h。随后每孔加入 200 μL Hoechst 33258 染液,孵育 20 min 后加入 PBS,置于荧光显微镜下观察,计算凋亡细胞数。

1.4.3 细胞划痕实验

在 6 孔板中接种对数生长期的 HepG2 细胞,孵育 24 h,移液器枪头划线处理,置于显微镜下观察(时刻 0)。分别加入 10、20、40 μmol/L 水飞蓟宾干预,以 0.1% DMSO 为对照,孵育 48 h 后再次置于显微镜下观察。实验重复 3 次,计算细胞划痕愈合率[%,(划痕距离_{0h}-划痕距离_{48h})/划痕距离_{0h}×100%]。

1.4.4 细胞迁移实验

在 24 孔板 Transwell 小室上层接种对数生长期的 HepG2 细胞,分别加入 10、20、40 μmol/L 水飞蓟宾干预,以 0.1% DMSO 为对照,小室下层加入完全培养基,孵育 48 h。随后 4% 多聚甲醛固定 30 min, Giemsa 染色 30 min,弃去小室上层细胞,置于显微镜下观察,计数小室下层细胞,拍照并计数,实验重复 3 次。

1.4.5 细胞侵袭实验

使用 1:8 稀释的 Matrigel 胶铺于 24 孔板 Transwell 小室膜上,在 37℃ 孵育 4 h 使其形成稳定凝胶。分别加入 10、20、40 μmol/L 水飞蓟宾干预,以 0.1% DMSO 为对照,后续实验步骤同“1.4.4”项。每组实验独立重复 3 次。

1.4.6 细胞活性氧水平检测

在 24 孔板中接种对数生长期的 HepG2 细胞,分别加入 40、60、80 μmol/L 水飞蓟宾干预,以

0.1% DMSO 为对照，孵育 24 h。每孔加入 250 μL 稀释后的 DCFH-DA 工作液，孵育 30 min。移除 DCFH-DA 工作液，加入 PBS，置于荧光显微镜下观察拍照，使用 Image J 1.8.0 软件计算细胞荧光强度。

1.4.7 细胞线粒体膜电位检测

在 24 孔板中接种对数生长期的 HepG2 细胞，分别加入 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预，以 0.1% DMSO 为对照，孵育 24 h，随后加入 JC-1 染色缓冲液洗涤，再加入培养基和 JC-1 染色工作液，混匀后孵育 15 min。孵育结束后，弃上清，加入 JC-1 染色缓冲液洗涤，置于荧光显微镜下观察拍照，使用 Image J 软件计算细胞荧光强度。

1.4.8 细胞 Fe^{2+} 检测

在 24 孔板中接种对数生长期的 HepG2 细胞，分别加入 40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预，以 0.1% DMSO 为对照，孵育 24 h，加入 FerroOrange 工作液，孵育 30 min，置于荧光显微镜下观察拍照，使用 Image J 软件计算细胞荧光强度。此外，取对数生长期的 HepG2 细胞，分别给予 5 nmol/L GN44028、80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾和 5 nmol/L GN44028+80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾，以 0.1% DMSO 为空白对照，其余 Fe^{2+} 检测步骤同前。

1.4.9 水飞蓟宾靶点获取

通过 PubChem 平台 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取水飞蓟宾的 SMILES 编号，导入 SwissTargetPrediction 平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测水飞蓟宾靶点。将靶点信息导入 UniProt 平台 (<https://www.uniprot.org/>) 获取对应 ID。

1.4.10 肝癌靶点获取

通过 GeneCards 平台 (<https://www.genecards.org/>) 以“liver cancer”为关键词得到肝癌疾病靶点。

1.4.11 铁死亡靶点获取

通过 FerrDb 平台 (<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>) 以“ferroptosis”为关键词得到铁死亡激动、抑制及标志物靶点。

1.4.12 水飞蓟宾-肝癌-铁死亡交集靶点获取及分析

通过美吉生信云平台 (<https://cloud.majorbio.com/page/tools/>) 得到水飞蓟宾靶点、肝癌靶点和铁死亡靶点的交集靶点并进行 Venn 可视化。将交集靶点信息导入 STRING 平台 (<https://string-db.org/>)，物种选择 “Homo sapiens” 获取交集靶点蛋白质-蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络，随后导入 Cytoscape v3.9.1 进一步分析。利用 R 语言 Bioconductor 生物信息软件包 “clusterProfiler”，以 $P < 0.01$ 进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析，根据排序绘制条形图。

1.4.13 细胞相关蛋白 Western Blot 检测

收集 80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后的细胞，加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA，置于冰上裂解。在 4℃ 条件下，离心 (12 000 $\times g$, 10 min) 后收集上清液，BCA 定量。SDS-PAGE 凝胶按每孔 30 μg 蛋白量上样，随后电泳及转膜。封闭结束后，与稀释后的 HIF-1 α (稀释比例 1 : 1 000)、GPX4 (稀释比例 1 : 1 000) 和 GAPDH (稀释比例 1 : 10 000) 一抗 4℃ 孵育 12 h。孵育结束后，与对应的 HRP 标记的二抗 (稀释比例 1 : 10 000) 孵育 1 h。孵育结束后，滴加 ECL 显影液，置于化学发光成像系统中显影，结果导入 Image J 以 GAPDH 为内参计算各蛋白的相对表达。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据处理，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，采用 LSD-t 或 Dunnett's 检验进行事后两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水飞蓟宾对肝癌细胞的影响

2.1.1 水飞蓟宾对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

如图 1 所示，水飞蓟宾对 HepG2 细胞活力的抑制作用呈现一定浓度依赖性，其对 HepG2 细胞的半数抑制浓度为 87.97 $\mu\text{mol/L}$ ，故后续实验选择低于半数抑制浓度的水飞蓟宾进行。

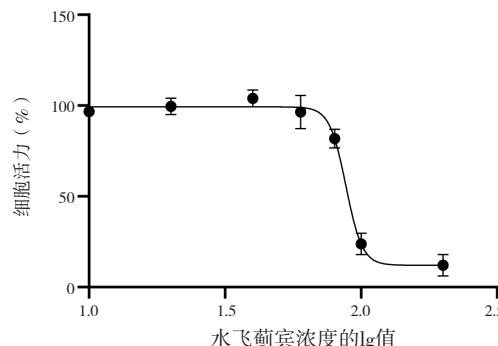


图1 水飞蓟宾对HepG2细胞活力的影响 ($n=3$)

Figure 1. Effect of silibinin on the vitality of HepG2 cells ($n=3$)

2.1.2 水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞凋亡的影响

如图2所示,与对照组相比,40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的水飞蓟宾干预后,HepG2细胞蓝色荧光明显加强,随着水飞蓟宾浓度的增加HepG2细胞凋亡数量逐渐增多。其中,经60和80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后细胞的凋亡数量显著增多($P<0.05$)。结果表明,水飞蓟宾具有诱导HepG2细胞凋亡的作用。

2.1.3 水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞迁移和侵袭的影响

如图3所示,与对照组相比,经20和40 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后细胞划痕愈合率明显降低,迁移和侵袭细胞数量明显减少($P<0.05$)。这些结果表明,水飞蓟宾能够有效抑制HepG2细胞迁移和侵袭。

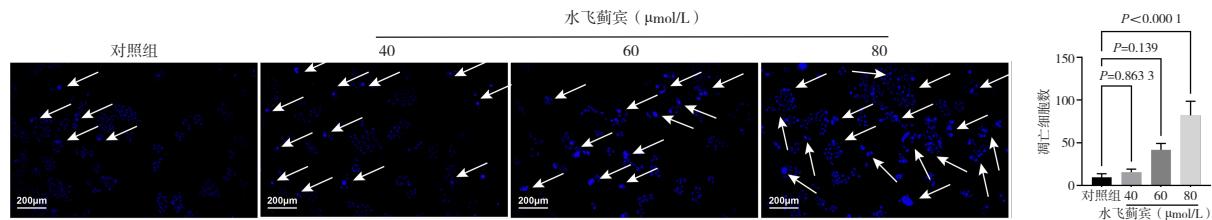


图2 水飞蓟宾对HepG2细胞凋亡的影响(10 \times , n=3)

Figure 2. Effect of silybinin on apoptosis of HepG2 cells (10 \times , n=3)

注:白色箭头为凋亡细胞。

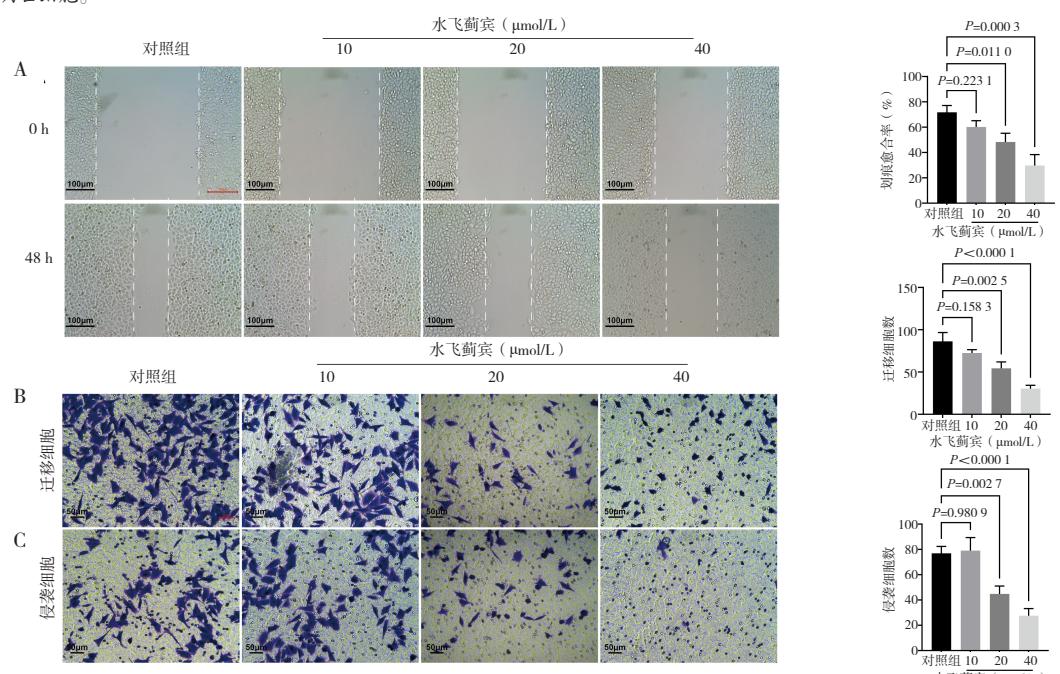


图3 水飞蓟宾对HepG2细胞迁移和侵袭的影响(n=3)

Figure 3. Effect of silybinin on migration and invasion of HepG2 cells (n=3)

注: A. 细胞划痕愈合实验(20 \times); B. Transwell迁移实验(40 \times); C. Transwell侵袭实验(40 \times)。

2.2 水飞蓟宾对肝癌铁死亡的作用

2.2.1 水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞中ROS水平的影响

如图4所示,与对照组相比,经60和80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后细胞的荧光强度明显增强($P<0.05$)。结果说明,水飞蓟宾能够促进HepG2细胞中ROS水平升高。

2.2.2 水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞线粒体膜电位的影响

铁死亡进展时,过多的游离铁离子可能会干扰线粒体的正常功能,影响线粒体膜电位的稳定性。如图5所示,与对照组相比,60、80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后,细胞红色荧光呈剂量依赖性减弱($P<0.05$),40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后,绿色荧光呈剂量依赖性增强($P<0.05$)。结果表明,水飞蓟宾能够诱导HepG2细胞线粒体膜电位坍塌。

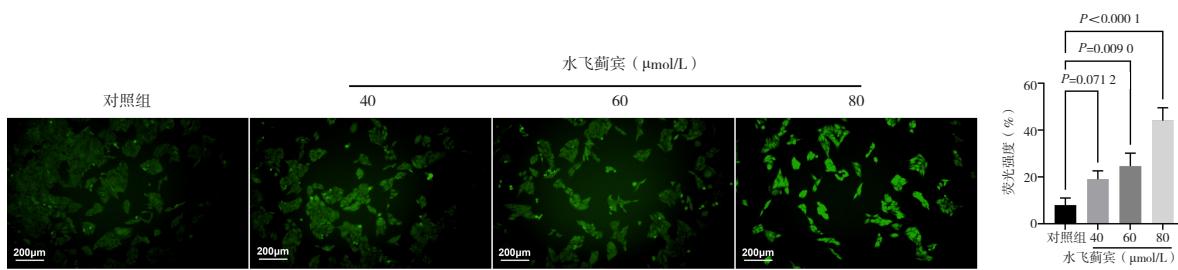


图4 水飞蓟宾对HepG2细胞中ROS水平的影响 (10×, n=3)
Figure 4. Effect of silibinin on ROS level of HepG2 cells (10×, n=3)

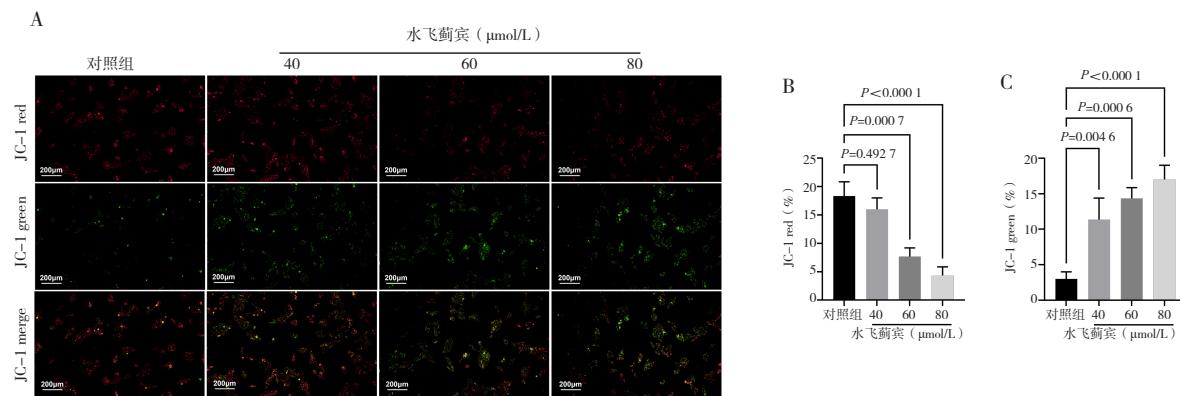


图5 水飞蓟宾对HepG2细胞线粒体膜电位的影响 (10×, n=3)

Figure 5. Effect of silibinin on mitochondrial membrane potential of HepG2 cells (10×, n=3)

注: A. 细胞荧光图; B. 细胞红色荧光定量分析; C. 细胞绿色荧光定量分析。

2.2.3 水飞蓟宾对肝癌HepG2细胞Fe²⁺水平的影响

Fe²⁺水平增高是铁死亡发生的标志之一。如图6所示,与对照组相比,40、60、80 μmol/L水飞蓟宾干预后,细胞红色荧光呈剂量依赖性加强,其中80 μmol/L水飞蓟宾干预组细胞的红色荧光显著性增加($P<0.05$)。结果表明,水飞蓟宾能够诱导HepG2细胞中Fe²⁺水平的升高。

2.2.4 水飞蓟宾-肝癌-铁死亡交集靶点分析

如图7A所示,获得水飞蓟宾靶点100个,肝癌靶点18 549个,铁死亡靶点484个,水飞蓟宾、肝癌和铁死亡的交集靶点有10个。如图7B和图7C所示,按度值排序,水飞蓟宾、肝癌和铁死亡的交集靶点为HIF-1α、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、非受体酪氨酸激酶(steroid receptor coactivator, SRC)、神经母细胞瘤RAS病毒同源物(neuroblastoma RAS viral oncogene homolog 1, NRAS)、磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基α(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA)、端粒酶逆转录

酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)、碳酸酐酶IX(carbonic anhydrase IX, CA9)、丝裂原活化蛋白激酶14(mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)、多聚(ADP-核糖)聚合酶1[poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1]和磷酸葡萄糖酸脱氢酶(phosphogluconate dehydrogenase, PGD)。结果表明,水飞蓟宾可能通过这10个靶点调控肝癌铁死亡。进一步通过GO及KEGG富集分析发现,交集靶点富集到多种生物功能及通路。如图8A所示,GO富集结果包括ATP代谢过程的调节(regulation of ATP metabolic process)、核苷酸代谢过程的调节(regulation of nucleotide metabolic process)、缺氧反应(response to hypoxia)、组蛋白激酶活性(histone kinase activity)等。如图8B所示,KEGG富集结果包括细胞衰老(cellular senescence)、自噬(autophagy-animal)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号通路(VEGF signaling pathway)、ErbB信号通路(ErbB signaling pathway)等。以上结果提示,水飞蓟宾诱导肝癌细胞的铁死亡可能与以上的途径相关。

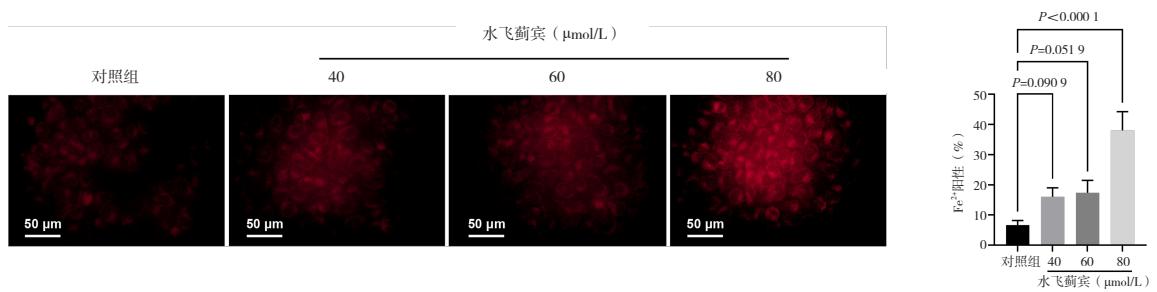


图6 水飞蓟宾对HepG2细胞Fe²⁺水平的影响 (×40, n=3)
Figure 6. Effect of silibinin on Fe²⁺ level of HepG2 cells (×40, n=3)

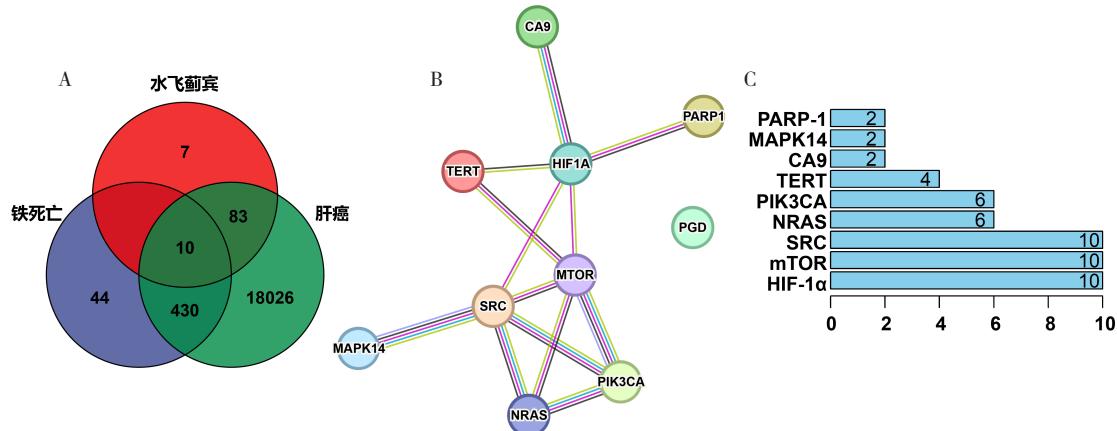


图7 水飞蓟宾调控肝癌铁死亡的网络药理学分析

Figure 7. Network pharmacological analysis of silibinin in regulating ferroptosis in liver cancer

注: A. Venn图; B. PPI网络; C. 度值排序。

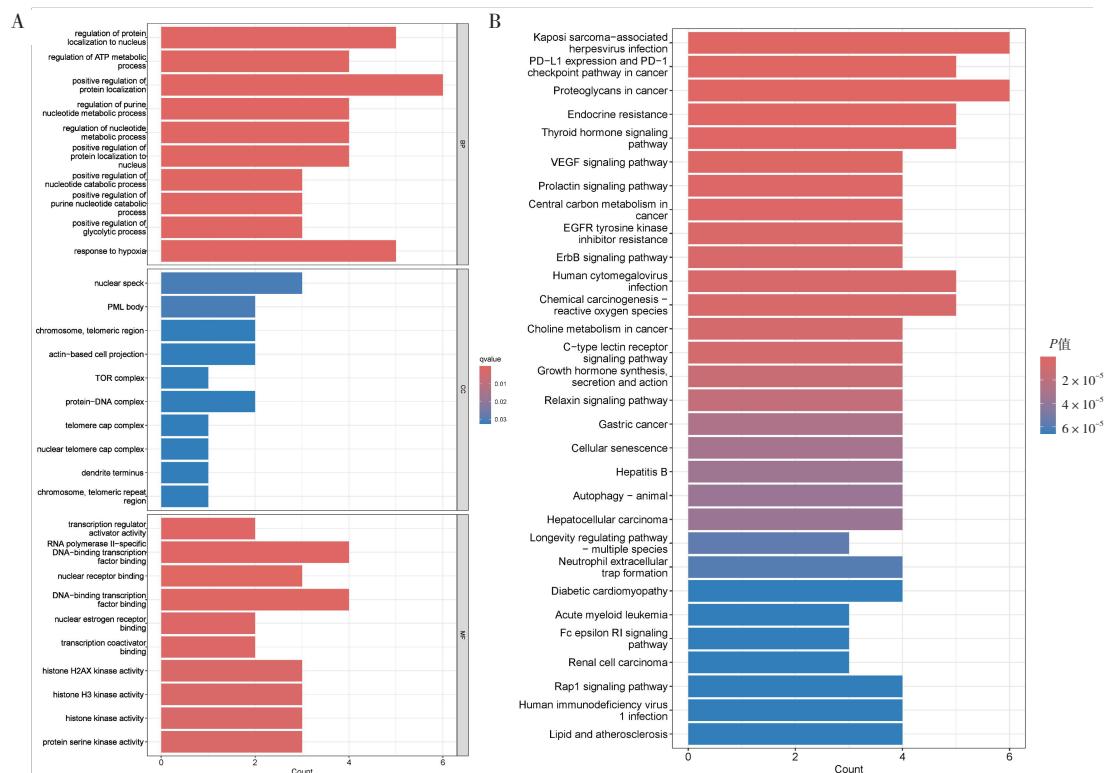


图8 水飞蓟宾调控肝癌铁死亡的富集结果

Figure 8. Enrichment result of silibinin in regulating ferroptosis in liver cancer

注: A. GO富集分析; B. KEGG富集分析。

2.2.5 水飞蓟宾对肝癌 HepG2 细胞 HIF-1 α 和 GPX4 蛋白表达的影响

如图 9 所示,与对照组相比,40 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后,细胞中 HIF-1 α 蛋白表达有升高趋势,60 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾干预后,细胞中 HIF-1 α 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。此外,与对照组比较,40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的水飞蓟宾干预后,细胞中 GPX4 蛋白表达呈剂量依赖性显著性降低 ($P<0.05$)。

进一步联合使用 HIF-1 α 抑制剂 GN44028, 验证

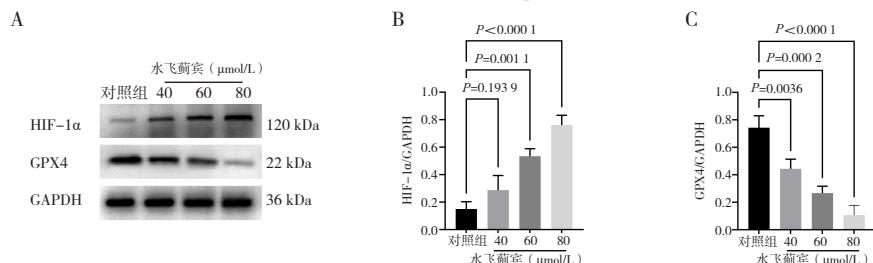


图9 水飞蓟宾对HepG2细胞HIF-1 α 、GPX4蛋白表达的影响 (n=3)

Figure 9. Effect of silibinin on HIF-1 α and GPX4 protein expression of HepG2 cells (n=3)

注: A. HIF-1 α 、GPX4蛋白条带图; B. HIF-1 α 蛋白表达定量图; C. GPX4蛋白表达定量图。

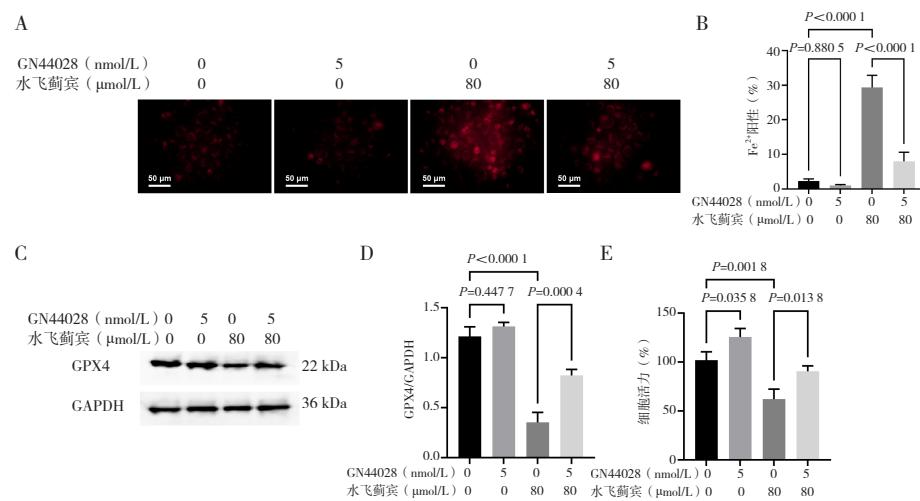


图10 HepG2细胞中Fe $^{2+}$ 水平、GPX4蛋白表达及活力 (n=3)

Figure 10. The Fe $^{2+}$ level, GPX4 protein expression and vitality of HepG2 cells (n=3)

注: A. 细胞Fe $^{2+}$ 染色图 (40 \times); B. Fe $^{2+}$ 染色定量分析图; C. GPX4蛋白条带图; D. GPX4蛋白表达定量图; E. 细胞活力定量分析图。

3 讨论

药物开发是一个耗时且高成本的项目,进行基于已明确安全性和毒性的药物的再研究具有许多优势^[14]。水飞蓟宾是一种临床用药,其片剂、胶囊以及注射剂广泛用于急性和慢性肝炎、早期肝硬化以及中毒性肝损害的辅助治疗^[15]。除了显著的肝病临床疗效之外,水飞蓟宾还表现出较高的安全性。结果显示,在小鼠中以 50 mg/kg 的剂量灌胃给药 16 周后,水飞蓟宾对肝脏和肾脏未

水飞蓟宾是否通过 HIF-1 α 激活 HepG2 细胞的铁死亡。如图 10A 和 10B 所示,与水飞蓟宾组相比,联合应用 GN44028 能够明显抑制水飞蓟宾诱导的 Fe $^{2+}$ 水平的升高 ($P<0.05$)。此外,如图 10C 和 10D 所示,与水飞蓟宾组相比,联合应用 GN44028 明显提高了 HepG2 细胞中 GPX4 蛋白表达 ($P<0.05$)。如图 10E 所示,与水飞蓟宾组相比,联合应用 GN44028 明显提高了 HepG2 细胞的活力 ($P<0.05$)。以上结果说明,水飞蓟宾通过激活 HIF-1 α 抑制 GPX4 表达从而诱导 HepG2 细胞的铁死亡。

出现病理学改变^[16]。因此,水飞蓟宾有望应用于治疗肝癌等终末期肝病。恶性增殖和远处转移是肿瘤恶性特征的重要表现之一。在本研究中,水飞蓟宾表现出对 HepG2 细胞增殖的剂量依赖性抑制。此外,水飞蓟宾能够诱导 HepG2 细胞凋亡,并抑制细胞迁移和侵袭。这些结果表明,水飞蓟宾具有明确的抗肝癌作用,这为其临床进一步应用提供依据。

肿瘤细胞通常表现出高代谢水平、抗氧化修饰和增加的铁摄取,以维持其无限生长^[17]。近年

来，铁代谢的改变已被证明在肝癌的发病机制中起着重要作用，铁死亡已被引入作为针对肝癌的可能治疗策略。临床数据初步显示，诱导肝癌铁死亡在肿瘤生长方面显现出一定效果^[18]。当铁死亡发生时，细胞内游离的铁离子能够触发大量ROS的产生，随后激活一系列下游细胞信号通路诱导细胞死亡。此外，铁离子过载能够直接影响线粒体内膜通道和转运蛋白，干扰离子平衡，进而导致线粒体膜电位坍塌^[19]。本研究中，水飞蓟宾能够升高HepG2细胞ROS和Fe²⁺水平，并诱导细胞线粒体膜电位坍塌，这些结果说明水飞蓟宾能够诱导肝癌HepG2细胞发生铁死亡。

网络药理学有利于理解药物的作用机制、药物相互作用及副作用，并预测药物的临床疗效，能够直接指导基础实验和临床研究^[20]。本研究中，水飞蓟宾、肝癌和铁死亡的交集靶点依次为HIF-1α、mTOR、SRC、NRAS、PIK3CA、TERT、CA9、MAPK14、PARP-1和PGD，这表明水飞蓟宾可通过这些靶点调控肝癌铁死亡。这些靶点中，HIF-1α、mTOR、PIK3CA、TERT、PARP-1和PGD与铁死亡进程密切相关。越来越多的研究证实，HIF-1α与铁死亡的发生发展具有密切的联系，可以通过多种途径干预铁死亡。缺氧是肿瘤微环境的一个关键特征，活化的HIF信号通路是肿瘤细胞适应缺氧的重要途径。HIF-1α是缺氧条件下的重要转录调节因子，其可通过HRE调控铁代谢相关基因的表达，并通过调控铁死亡过程促进肿瘤的发生和发展^[21]。HIF-1α可以与转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, TFRC)基因的启动子区域结合，启动TFRC的转录和表达，介导细胞对转铁蛋白-铁复合物的大量摄取，导致细胞内Fe²⁺水平显著升高，造成铁死亡^[22-23]。此外，有研究表明，HIF-1α可以通过调控SLC7A11的转录水平，降低GPX4表达介导铁死亡^[24]。PIK3CA编码PI3K的α亚基，进而调控PI3K/mTOR信号通路^[25]。据报道，PI3K/mTOR信号通路通过抑制下游分子真核翻译起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1)介导GPX4蛋白翻译，从而调控铁死亡^[26]。TERT是一种参与端粒维持的限速酶，其过表达已被证实能够调节细胞内ROS水平，从而影响铁死亡进程^[27]。在多种肿瘤中，PARP-1表达过度。PARP-1抑制剂能

够导致GPX4的抑制和脂质过氧化物的增加，从而最终诱导铁死亡^[28]。PGD是一种特异性铁死亡标志物，能够表征铁死亡的程度^[29]。这些靶点中，HIF-1α为最核心靶点，因此对其蛋白表达进行验证，结果发现水飞蓟宾有效促进HepG2细胞HIF-1α蛋白表达，并抑制了铁死亡标志物GPX4的表达。值得注意的是，HIF-1α抑制剂GN44028能够逆转水飞蓟宾对HepG2细胞Fe²⁺水平的升高及铁死亡标志物GPX4的降低。本文明确了水飞蓟宾通过激活HIF-1α抑制GPX4的表达，从而诱导肝癌HepG2细胞铁死亡的新途径。但网络药理学得出的其余关键靶点如PARP-1、TERT、PGD以及GO、KEGG富集得到的关键途径等在水飞蓟宾诱导肝癌HepG2细胞铁死亡中的作用与机制尚需进一步研究与确认。

综上，水飞蓟宾在抗肝癌HepG2细胞中表现出明显的作用，包括抑制细胞增殖、迁移和侵袭，以及诱导凋亡和铁死亡。其中，水飞蓟宾诱导铁死亡的机制与其激活HIF-1α表达相关。

参考文献

- 1 Foda ZH, Annapragada AV, Boyapati K, et al. Detecting liver cancer using cell-free DNA fragmentomes[J]. Cancer Discov, 2023, 13(3): 616–631. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0659.
- 2 陈建国, 张永辉, 陆建华, 等. 中国肝癌预防与筛查工作实践及防控挑战 [J]. 中国肿瘤, 2023, 32(11): 836–847. [Chen JG, Zhang YH, Lu JH, et al. Liver cancer prevention and screening in China: practices and challenges[J]. China Cancer, 2023, 32(11): 836–847.] DOI: 10.11735/j.issn.1004-0242.2023.11.A005.
- 3 Anwanwan D, Singh SK, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(1): 188314. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188314.
- 4 张静, 李静, 廉杰. 全球抗肿瘤药物专利信息情报分析 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(23): 2375–2384. [Zhang J, Li J, Hu, J. Patent information analysis of global antitumor drugs[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2023, 32(23): 2375–2384.] DOI: 10.3969/j.issn.1003-3734.2023.23.008.
- 5 王为兰, 刘晓颖, 刘福君, 等. 天然产物活性成分抗肝癌分子机制的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9):1606–1613. [Wang WL, Liu XY, Liu FJ, et al. Review on molecular mechanism of active components from natural products against hepatocellular carcinoma[J]. NatProd Res Dev, 2020, 32: 1606–1613.] DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.9.020.
- 6 陈曦, 李靖, 朱玲, 等. 积雪草酸联合奥沙利铂对结肠癌HCT116细胞凋亡、自噬和焦亡的调控作用研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(3): 274–280. [Chen X, Li J, Zhu L, et al. Effects of asiatic acid combined with oxaliplatin on the apoptosis,

- autophagy and pyroptosis of colon cancer HCT116 cells[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2022, 42(3): 274–280.] DOI: [10.13286/j.1001-5213.2022.03.09](https://doi.org/10.13286/j.1001-5213.2022.03.09).
- 7 金源源, 麦静怡, 平键, 等. 苍术酮对人肝癌细胞 MHCC97-H 增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(10): 1370–1376. [Jin YY, Mai JY, Ping J, et al. Effects and mechanisms of atractylone on proliferation, migration, invasion and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells MHCC97-H[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2023, 34(10): 1370–1376.] DOI: [10.19378/j.issn.1003-9783.2023.10.006](https://doi.org/10.19378/j.issn.1003-9783.2023.10.006).
- 8 Xu HJ, Ye D, Ren ML, et al. Ferroptosis in the tumor microenvironment: perspectives for immunotherapy[J]. Trends Mol Med, 2021, 27(9): 856–867. DOI: [10.1016/j.molmed.2021.06.014](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.06.014).
- 9 洪婷, 王依蕾, 曾海荣, 等. 葫芦素 B 诱导细胞铁死亡抑制肝癌 Huh-7 细胞增殖的机制 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(4): 638–645. [Hong T, Wang YL, Zeng HR, et al. Mechanism of cucurbitacin B suppresses proliferation of hepatocellular carcinoma Huh-7 cells via inducing ferroptosis[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2023, 39(4): 638–645.] DOI: [10.12360/CPB202103070](https://doi.org/10.12360/CPB202103070).
- 10 王兰清, 李国, 朱宝. 水飞蓟宾对非酒精性脂肪性肝病相关肝癌的保护作用及其作用机制 [J]. 解剖科学进展, 2023, 29(4): 423–426. [Wang LQ, Li G, Zhu B. Protective effect and mechanism of silibinin on non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma[J]. Progress of Anatomical Sciences, 2023, 29(4): 423–426.] DOI: [10.16695/j.cnki.1006-2947.2023.04.023](https://doi.org/10.16695/j.cnki.1006-2947.2023.04.023).
- 11 Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/silybin and chronic liver disease: a marriage of many years[J]. Molecules, 2017, 22(2): 191. DOI: [10.3390/molecules22020191](https://doi.org/10.3390/molecules22020191).
- 12 Wadhwa K, Pahwa R, Kumar M, et al. Mechanistic insights into the pharmacological significance of silymarin[J]. Molecules, 2022, 27(16): 5327. DOI: [10.3390/molecules27165327](https://doi.org/10.3390/molecules27165327).
- 13 Song XY, Liu PC, Liu WW, et al. Silibinin inhibits ethanol- or acetaldehyde-induced ferroptosis in liver cell lines[J]. Toxicol In Vitro, 2022, 82: 105388. DOI: [10.1016/j.tiv.2022.105388](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105388).
- 14 Wang WP, Dong XX, Liu Y, et al. Itraconazole exerts anti-liver cancer potential through the Wnt, PI3K/AKT/mTOR, and ROS pathways[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110661. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110661](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110661).
- 15 潘慧杰, 张碧华, 王洋, 等. 水飞蓟宾胶囊对比护肝片改善脂肪肝相关生化指标有效性和安全性的系统评价 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2022, 22(1):64–69. [Pan HJ, Zhang BH, Wang Y, et al. Systematic review of efficacy and safety of silibinin capsules and hughan tablets in improving fatty liver-related biochemical indicators[J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China, 2022, 22(1):64–69.] DOI: [10.14009/j.issn.1672-2124.2022.01.014](https://doi.org/10.14009/j.issn.1672-2124.2022.01.014).
- 16 Yan BF, Zheng X, Wang Y, et al. Liposome-based silibinin for mitigating nonalcoholic fatty liver disease: dual effects via parenteral and intestinal routes[J]. ACS Pharmacol Transl Sci, 2023, 6(12): 1909–1923. DOI: [10.1021/acspcl.3c00210](https://doi.org/10.1021/acspcl.3c00210).
- 17 Wu J, Wang Y, Jiang RT, et al. Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms[J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 276. DOI: [10.1038/s41420-021-00660-4](https://doi.org/10.1038/s41420-021-00660-4).
- 18 Liao H, Shi JY, Wen K, et al. Molecular targets of ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2021, 8: 985–996. DOI: [10.2147/JHC.S325593](https://doi.org/10.2147/JHC.S325593).
- 19 Ajoobabady A, Tang D, Kroemer G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and targeted therapy[J]. Br J Cancer, 2023, 128(2): 190–205. DOI: [10.1038/s41416-022-01998-x](https://doi.org/10.1038/s41416-022-01998-x).
- 20 何山, 欧水平, 叶林虎, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析川楝子致肝毒性机制 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(12): 2955–2964. [He S, Ou SP, Ye LH, et al. Hepatotoxicity mechanism of Toosendan Fructus based on network pharmacology and molecular docking techniques[J]. Drugs & Clinic, 2023, 38(12): 2955–2964.] DOI: [10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.007](https://doi.org/10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.007).
- 21 Lin ZH, Song JJ, Gao YK, et al. Hypoxia-induced HIF-1 α /lncRNA-PMAN inhibits ferroptosis by promoting the cytoplasmic translocation of ELAVL1 in peritoneal dissemination from gastric cancer[J]. Redox Biol, 2022, 52: 102312. DOI: [10.1016/j.redox.2022.102312](https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102312).
- 22 Wang K, Yu J, Luo Q, et al. siHIF-1 α -loaded micellar nanoparticles inhibit M1 macrophage activation to ameliorate chronic rhinosinusitis[J]. Free Radic Biol Med, 2025, 237: 403–418. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2025.05.433](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.05.433).
- 23 Chen BY, Pathak JL, Lin HY, et al. Inflammation triggers chondrocyte ferroptosis in TMJOA via HIF-1 α /TFRC[J]. J Dent Res, 2024, 103(7): 712–722. DOI: [10.1177/00220345241242389](https://doi.org/10.1177/00220345241242389).
- 24 蔡芸芝, 罗玲. 缺氧诱导因子 1 α 通过介导铁死亡影响动脉粥样硬化的机制研究 [J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2024, 32(3): 70–76. [Cai HZ, Luo L. Mechanism of hypoxia-inducing factor 1 α influencing atherosclerosis mediated by ferroptosis[J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2024, 32(3): 70–76.] DOI: [10.12114/j.issn.1008-5971.2024.00.014](https://doi.org/10.12114/j.issn.1008-5971.2024.00.014).
- 25 Reinhardt K, Stückrath K, Hartung C, et al. PIK3CA-mutations in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2022, 196(3): 483–493. DOI: [10.1007/s10549-022-06637-w](https://doi.org/10.1007/s10549-022-06637-w).
- 26 Zhang YL, Swanda RV, Nie LT, et al. mTORC1 couples cyst(e)ine availability with GPX4 protein synthesis and ferroptosis regulation[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):1589. DOI: [10.1038/s41467-021-21841-w](https://doi.org/10.1038/s41467-021-21841-w).
- 27 Dong H, Xia YY, Jin SL, et al. Nrf2 attenuates ferroptosis-mediated IIR-ALI by modulating TERT and SLC7A11[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(11): 1027. DOI: [10.1038/s41419-021-04307-1](https://doi.org/10.1038/s41419-021-04307-1).
- 28 Yunchu YC, Miyanaga A, Seike M. Integrative analysis of ferroptosis-related genes in small cell lung cancer for the identification of biomarkers and therapeutic targets[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2023, 28(6): 125. DOI: [10.31083/j.fbl2806125](https://doi.org/10.31083/j.fbl2806125).
- 29 Shi JY, Wu P, Sheng L, et al. Ferroptosis-related gene signature predicts the prognosis of papillary thyroid carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1): 669. DOI: [10.1186/s12935-021-02389-7](https://doi.org/10.1186/s12935-021-02389-7).

收稿日期: 2025 年 10 月 11 日 修回日期: 2025 年 11 月 24 日

本文编辑: 马琳璐 钟巧妮