

# 基于 UHPLC-MS/MS、分子对接及细胞实验探讨健脾益气方对肝癌 PD-L1 和 PD-1 表达的影响

洪 静, 王 超\*, 孙姗姗, 宋树蕃, 卓少元\*

(广西中医药大学基础医学院, 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 广西 南宁 530200)

**摘要:** **目的** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS)、分子对接和体外细胞实验探讨健脾益气方对肝癌细胞的影响。**方法** 制备健脾益气方甲醇水溶液并采用 UHPLC-MS/MS 法分析鉴定中药活性成分。利用 Schrodinger 软件对鉴定出的所有活性成分及信号通路核心靶点白介素 6 (IL-6)、糖蛋白 130 (gp130)、酪氨酸激酶 1 (JAK1)、酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号转导蛋白及转录激活子 3 (STAT3)、程序性细胞死亡蛋白-1 (PD-1) 和程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 分别进行分子对接; 并用 Pymol 软件将各靶标蛋白结合能最低的活性成分对接模式进行可视化。采用健脾益气方含药血清干预人肝癌细胞株 HepG2 进行体外实验验证, 将 HepG2 细胞分为空白组, 模型组, 健脾益气方低、中、高剂量组 (5.25、10.5、21 g/kg), STAT3 抑制组 (C188-9, 4  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 gp130 抑制组 (SC144, 10  $\mu\text{mol/L}$ )。除空白组外, 模型组加入 IL-6 (50 ng/mL), 各给药组加入 IL-6 和相应药物进行干预。采用 CCK-8 法、Transwell 培养小室法、Annexin V+PI 双染色法分别检测各组细胞存活率、侵袭数和凋亡率, ELISA 法检测各组细胞培养液中 IL-6 水平, Western blot 法检测各组细胞中 gp130、磷酸化 JAK1 (p-JAK1)、磷酸化 JAK2 (p-JAK2)、磷酸化 STAT3 (p-STAT3)、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达。**结果** UHPLC-MS/MS 鉴定出健脾益气方 113 个活性成分。分子对接结果显示, 健脾益气方中有多个活性成分与 IL-6、gp130、JAK1、JAK2、STAT3、PD-1 和 PD-L1 靶点蛋白均分别存在分子结合位点且有较低结合能, 均小于 -5.0 kcal/mol。体外细胞实验显示, 与空白组比较, 模型组细胞侵袭数升高 ( $P<0.01$ ), 细胞凋亡率则降低 ( $P<0.01$ ); 培养液中 IL-6 水平升高 ( $P<0.01$ ); gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达均升高 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 除低剂量健脾益气方含药血清对细胞侵袭数的抑制和对细胞凋亡率的影响无明显变化外 ( $P>0.05$ ), 其它各药物干预组均可抑制模型细胞的增殖与侵袭能力, 促进细胞凋亡 ( $P<0.01$ ); 各药物干预组均可降低模型细胞培养液中 IL-6 水平 ( $P<0.01$ ); 并降低细胞中 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达 ( $P<0.01$ )。**结论** 健脾益气方可通过多成分调控肝癌细胞 IL-6/STAT3 炎症信号通路及其介导的 PD-L1 和固有 PD-1 的表达, 抑制肝癌细胞增殖侵袭, 促进细胞凋亡。

**关键词:** 健脾益气方; 肝细胞癌; UHPLC-MS/MS; 分子对接; IL-6/STAT3 信号通路; PD-1; PD-L1

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)06-2011-07

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.040

程序性细胞死亡蛋白-1 (programmed cell death protein1, PD-1) 及程序性细胞死亡配体 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1) 抑制剂是重要的免疫检查点抑制剂, 目前已成为包括肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 等多种类型肿瘤的一线治疗方案。虽然部分 HCC 患者可以对 PD-1/PD-L1 抑制剂治疗产生持久的反应, 但受益人数仍然较少, 有效率仍低于 20%<sup>[1]</sup>。因此深入研究 PD-1/PD-L1 在肿瘤中的分子机制, 以期使更多患者从中受益十分重要。在临床上, 中医药对于肿瘤治疗有着非常积极意义, 前期研究证实健脾益气方对肝癌微环境中众多炎症相关分

子如 IL-6<sup>[2]</sup>、STAT3<sup>[2-3]</sup>、Caspase-1<sup>[4]</sup>等, 以及免疫抑制相关分子如 GAL-3<sup>[5-6]</sup>、Vimentin<sup>[3,7]</sup>、HMGB-1<sup>[4,8]</sup>等均有明显调控作用。已有报道炎症分子 STAT3 在多种肿瘤中可上调 PD-L1 的表达<sup>[9]</sup>, 但这种调节是否在肝癌细胞中存在有待探讨。肿瘤细胞固有 PD-1 在肿瘤进程中也发挥着重要作用<sup>[10]</sup>, 其表达是否受 STAT3 调控也有待探讨。健脾益气方可干预 DEN 肝癌大鼠肝组织 IL-6/STAT3 表达<sup>[2]</sup>, 其能否干预人肝癌细胞该通路的表达, 并通过此干预肝癌细胞 PD-L1 和固有 PD-1 表达均不清楚。因此, 本研究在超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 分析和分子对接预

收稿日期: 2024-01-24

**基金项目:** 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81860824, 81660775); 广西中医药大学“桂派杏林拔尖人才”项目 (2022C004)

**作者简介:** 洪 静 (1987—), 女, 硕士, 从事肝癌的中医药防治研究。Tel: 15872217249, E-mail: 627930803@qq.com

**#共同第一作者:** 王 超 (1984—), 女, 博士, 主管技师, 从事肝癌的中医药防治研究。Tel: 18978180249, E-mail: wangc@gxtcmu.edu.cn

**\*通信作者:** 卓少元 (1980—), 男, 博士, 教授, 从事肝癌的中医药防治研究。Tel: 18100772530, E-mail: sherwin\_zhuo@126.com

测的基础上,以 IL-6 诱导的人肝癌细胞 HepG2 模型为对照,结合 C188-9 和 SC144 干预,深入研究健脾益气方对肝癌细胞 IL-6/STAT3 信号通路及其调控 PD-L1 和固有 PD-1 的影响,为该方的进一步临床应用奠定基础。

1 材料

- 1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 由广西中医药大学广西中药药效研究重点实验室惠赠。
- 1.2 动物 雄性 SD 大鼠 25 只,SPF 级,体质量 (200±20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004],饲养于广西中医药大学 SPF 级动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (桂) 2019-0001],环境温度 25 ℃,明暗交替 12 h/12 h,自由摄食饮水。本研究动物实验方案符合广西中医药大学伦理委员会标准 (伦理号 DW20210328-049)。
- 1.3 药物与试剂 健脾益气方 (白术 10 g、黄芪 30 g、白芍 15 g、薏苡仁 15 g、神曲 10 g、茯苓 15 g、法半夏 10 g) 饮片均购自广西中医药大学第一附属医院,经广西中医药大学中药鉴定教研室田慧教授鉴定质量合格。STAT3 抑制剂 (C188-9,批号 31595) 和 gp130 抑制剂 (SC144,批号 17412) 均购自美国 MedChemExpress 公司;人 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 0215102c2793,美国 Peprtech 公司);兔源 STAT3 多克隆抗体 (批号 00081195)、兔源 GAPDH 多克隆抗体 (批号 00078427)、鼠源 JAK1 单克隆抗体 (批号 100717765)、兔源 JAK2 多克隆抗体 (批号 00046735)、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 20000217)、鼠源 PD-1 单克隆抗体 (批号 1005152) 和鼠源 PD-L1 单克隆抗体 (批号 10010982) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔源 p-STAT3 单克隆抗体 (批号 18) 和兔源 gp130 单克隆抗体 (批号 5) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔源 p-JAK1 多克隆抗体 (批号 AE05123696) 购自山东奥博森生物药业股份有限公司;兔源 p-JAK2 多克隆抗体 (批号 2175732) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法

- 2.1 UHPLC-MS/MS 法分析健脾益气方中药活性成分 UHPLC-MS/MS 法检测健脾益气方中药活性成分委托清华大学药学院药学技术中心完成。主要流程如下:制备健脾益气方甲醇水溶液,上清过 0.22 μm 微孔滤膜后,经 UHPLC-MS/MS 分析。空白样品采用相同条件处理。使用 Compound discover 3.2 软件进行原始 Raw 质谱数据特征峰提取,特征峰元素匹配、分子式预测及同位素分布匹配的质量偏差均设置为 5 ppm 以内。采用 mzcloud 在线数据库和自建 mzVault 中药天然产物数据库进行特征峰鉴定,阳性结果筛选标准为质量偏差<5 ppm、符合同位素分布及 mzVault best match 数据库匹配得分>70 分。
- 2.2 分子对接 通过 PubChem 网站 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询并下载 113 个健脾益气方活性成分 SDF 格式的结构文件。登录 PDB 网站 (<https://www.rcsb.org/>),查询并下载 IL-6、gp130、JAK1、JAK2、
- 2012

- STAT3、PD-1 和 PD-L1 靶标蛋白 PDB 格式的结构文件。利用 Schrodinger 软件,导入健脾益气方活性成分的 SDF 文件和靶标蛋白的 PDB 文件,将 113 个健脾益气方活性成分与 7 个靶标蛋白分别进行分子对接。选取与各靶标蛋白分子对接结合能最低的前 3 个结果利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 制作热图;与靶标蛋白结合能最低的对接模式用 Pymol 软件进行可视化处理。
- 2.3 健脾益气方含药血清制备 参照文献 [11] 报道,选择 25 只雄性 SD 大鼠,适应性喂养 1 周后随机分为健脾益气方低、中、高剂量含药血清组和空白血清组,其中健脾益气方低、中、高剂量含药血清组各 5 只大鼠,分别灌胃给予低、中、高剂量的健脾益气方药液 (5.25、10.5、21 g/kg)<sup>[2-3,12]</sup>,每天给药 2 次,连续 3 d,于末次给药后 1 h 内腹主动脉采血,严格无菌操作,分离血清,过滤除菌后,于-20 ℃保存备用。空白血清组 10 只大鼠,除给予生理盐水代替健脾益气方之外,同健脾益气方含药血清组的方法进行制备。
- 2.4 细胞分组与给药 将人肝癌细胞 HepG2 分为空白组、模型组,健脾益气方低、中、高剂量组,STAT3 抑制组及 gp130 抑制组。取对数生长期 HepG2 细胞,用胰酶消化,接种于 6 孔板或 96 孔板,每组设 3 个复孔,完全培养基常规培养至细胞密度为 90% 后,空白组加入 15% 大鼠空白血清培养基<sup>[13-14]</sup>;模型组加入 15% 大鼠空白血清且含 50 ng/mL IL-6<sup>[15]</sup>的培养基;健脾益气方低、中、高剂量组分别加入 15% 健脾益气方低、中、高剂量含药血清且含 50 ng/mL IL-6 的培养基;STAT3 抑制组及 gp130 抑制组分别加入 15% 大鼠空白血清且含 50 ng/mL IL-6 及 4 μmol/L C188-9<sup>[16]</sup>或 10 μmol/L SC144<sup>[17]</sup>的培养基,各组细胞培养 24 h 后进行后续检测。
- 2.5 CCK-8 法检测细胞存活率 各组细胞给药培养后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续孵育 4 h,用酶标仪在 450 nm 波长处检测样品的吸光度 (OD) 值,计算各组细胞存活率。
- 2.6 Transwell 培养小室法检测细胞侵袭能力 每组设 3 个复室。制备含有基质胶的 Transwell 小室,在小室上层加入 100 μL 2.5×10<sup>5</sup>/mL 单细胞悬液,下层加入 700 μL 培养基,于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h;取出小室,经固定、染色、风干后,于显微镜下照相并计数。
- 2.7 Annexin V+PI 双染色法检测细胞凋亡率 严格按照细胞凋亡检测试剂盒进行操作,离心收集各组细胞,PBS 洗涤后悬浮于结合缓冲液,加入异硫氰酸胍 (FITC) 标记的 Annexin V 及 PI 混匀,反应后经流式细胞仪检测。
- 2.8 ELISA 法检测细胞培养液中 IL-6 水平 收集各组细胞培养液,严格按照试剂盒说明书进行操作。用酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值,根据标准曲线计算各组细胞培养液中 IL-6 水平。
- 2.9 Western blot 法检测细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达 各组细胞培养结束后,

弃去培养液，PBS 清洗并刮下细胞，加入 RIPA 裂解液（含有 1% 蛋白磷酸酶抑制剂），振荡混匀，冰上充分裂解，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清备用。BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳分离，转膜，封闭液封闭；分别加入稀释的 GAPDH（1：10 000）、gp130（1：1 000）、JAK1（1：1 000）、p-JAK1（1：1 000）、JAK2（1：1 000）、p-JAK2（1：1 000）、STAT3（1：1 000）、p-STAT3（1：2 000）、PD-1（1：2 000）和 PD-L1（1：2 000）一抗，4 ℃孵育过夜；经 TBST 洗膜后加入稀释的二抗（1：5 000），室温孵育 1 h；经 TBST 洗膜后加入 ECL 显影液，经凝胶成像系统成像；采用 Image J 图像处理软件采集目的蛋白与 GAPDH 条带灰度值，以目

的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值表示目的蛋白相对表达量，磷酸化的蛋白与该蛋白总量灰度值的比值表示磷酸化蛋白的相对表达量。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 17.0 软件进行处理，正态分布的计量资料以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾益气方 UHPLC-MS/MS 分析 健脾益气方正离子模式和负离子模式下的总离子色谱图（TIC）见图 1。按照“2.1”项下的筛选标准，经手动确证和重复结果剔除后共获得 113 个化合物。部分化合物信息见表 1。

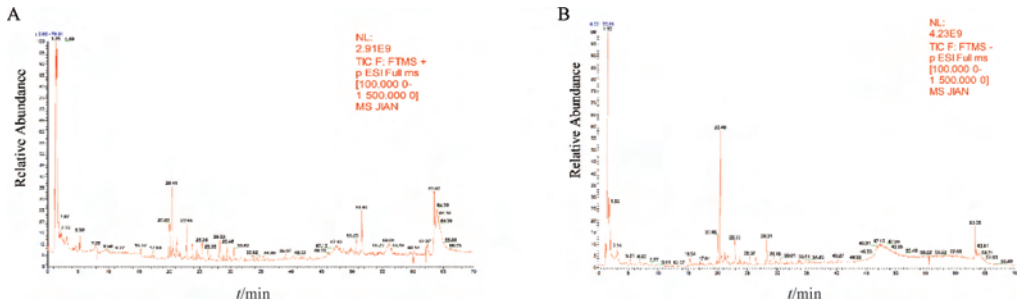


图 1 正离子模式（A）及负离子模式（B）下健脾益气方 TIC 图

表 1 健脾益气方部分鉴定化合物信息

| PubChem SID | 化合物中文名称                       | 化合物英文名称                                           | 质量偏差  | 分子量        | 保留时间/min | 匹配得分 |
|-------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|-------|------------|----------|------|
| 458804988   | 甘草苷元-7-O-β-D-芹糖-4'-O-β-D-葡萄糖苷 | liquiritigenin-7-O-β-D-apiosyl-4'-O-β-D-glucoside | 0.71  | 550.169 03 | 21.323   | 90.4 |
| 442813      | 芒柄花苷                          | ononin                                            | 0.87  | 430.126 76 | 23.773   | 88.9 |
| 10228095    | 6"-O-乙酰黄豆黄苷                   | 6"-O-acetylglycitin                               | 1.29  | 488.132 49 | 23.588   | 83.4 |
| 72276       | 表儿茶素                          | epicatechin                                       | 0.65  | 290.079 23 | 19.776   | 93.9 |
| 5280961     | 染料木素                          | genistein                                         | 1.19  | 248.070 85 | 27.290   | 85.0 |
| 9064        | (+)-儿茶素                       | (+)-catechin hydrate                              | 0.66  | 290.079 23 | 18.765   | 94.6 |
| 338         | 水杨酸                           | salicylic acid                                    | 0.53  | 138.031 77 | 23.304   | 84.1 |
| 9798666     | 隐绿原酸                          | cryptochlorogenic acid                            | 0.75  | 354.095 35 | 18.867   | 91.4 |
| 5492406     | 沙苑子苷                          | complanatuside                                    | 1.69  | 624.170 09 | 18.027   | 71.2 |
| 187808      | 黄豆黄苷                          | glycitin                                          | 1.02  | 446.121 75 | 25.920   | 76.8 |
| 11016019    | 香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷             | diosmetin-7-O-β-D-glucopyranoside                 | 0.51  | 462.116 45 | 20.171   | 72.0 |
| 5281810     | 射干苷                           | tectoridin                                        | 0.92  | 462.116 64 | 22.697   | 74.9 |
| 6303        | 虫草素                           | cordycepin                                        | -4.74 | 251.100 65 | 9.229    | 76.8 |
| 442664      | 维采宁Ⅱ                          | vicenin Ⅱ                                         | -1.87 | 594.157 36 | 19.572   | 82.1 |
| 65085       | 巴豆苷                           | isoguanosine                                      | 0.80  | 283.091 89 | 9.578    | 83.2 |
| 7428        | 没食子酸甲酯                        | methyl gallate                                    | 0.56  | 184.037 28 | 17.409   | 74.3 |
| 126         | 对羟基安息香醛                       | p-hydroxybenzaldehyde                             | -6.82 | 122.035 95 | 19.567   | 71.3 |
| 69600       | 4-甲氧基水杨醛                      | 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde                   | 1.14  | 152.047 52 | 20.884   | 73.5 |

3.2 分子对接 选择“3.1”项下鉴定的 113 个健脾益气方中药化合物以及 7 个靶标蛋白（IL-6、gp130、JAK1、JAK2、STAT3、PD-1、PD-L1）分别进行分子对接。与靶标蛋白分子对接结合能最低的前 3 个化合物结合能热图见图 2。结果显示，7 个靶标蛋白均存在多个与之对接良好的活性成分，且结合能小于-5.0 kcal/mol。分别与 7 个靶标蛋白结合能最低的分子对接模式见图 3。结果显示，（+）-儿

茶素（9064）与 IL-6 蛋白的 5 个氨基酸残基形成 6 个氢键，与 LYS（46）、ARG（104）2 个氨基酸残基形成 pi-cation 作用力，分子对接结合能为-6.818 kcal/mol（图 3A）；没食子酸甲酯（7428）与 gp130 蛋白的 2 个氨基酸残基形成 3 个氢键，分子对接结合能为-5.465 kcal/mol（图 3B）；虫草素（6303）与 JAK1 蛋白的 4 个氨基酸残基形成 5 个氢键，分子对接结合能为-8.857 kcal/mol（图 3C）；黄豆黄

苷 (187808) 与 JAK2 蛋白的 7 个氨基酸残基形成 7 个氢键, 分子对接结合能为-8.971 kcal/mol (图 3D); 水杨酸 (338) 与 STAT3 蛋白中 4 个氨基酸残基形成 5 个氢键, 分子对接结合能为 -5.94 kcal/mol (图 3E); 表儿茶素 (72276) 与 PD-1 蛋白中 3 个氨基酸残基形成 4 个氢键, 与 PHE (63) 形成 pi-pi stacking 作用, 分子对接结合能为 -6.384 kcal/mol (图 3F); 甘草苷元-7-*O*- $\beta$ -*D*-芹糖-4'-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 (458804988) 与 PD-L1 蛋白中 5 个氨基酸残基形成 6 个氢键, 分子对接结合能为-11.54 kcal/mol (图 3G)。

3.3 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞增殖、侵袭与凋亡的影响

与空白组比较, 模型组细胞存活率升高, 但差异无明显变化 ( $P>0.05$ ), 细胞侵袭数升高 ( $P<0.01$ ), 细胞凋亡率降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 除低剂量健脾益气方含药血清对细胞侵袭数和细胞凋亡率无明显影响外 ( $P>0.05$ ), 其它各药物干预组均可抑制模型细胞的增殖与侵袭能力 ( $P<0.01$ ), 促进细胞凋亡 ( $P<0.01$ ), 以 gp130 抑制组的干预效果最佳, 而在 3 个健脾剂量组中, 以中、低剂量健脾益气方含药血清的干预效果最佳, 见表 2、图 4~5。

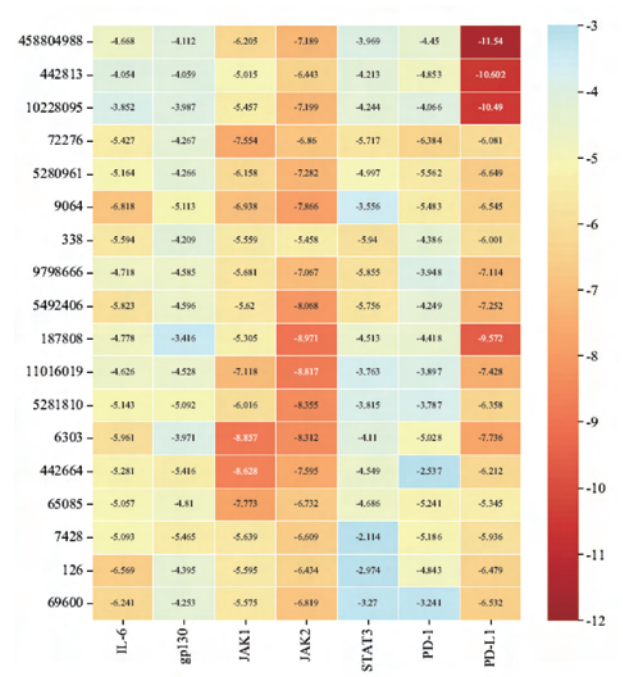
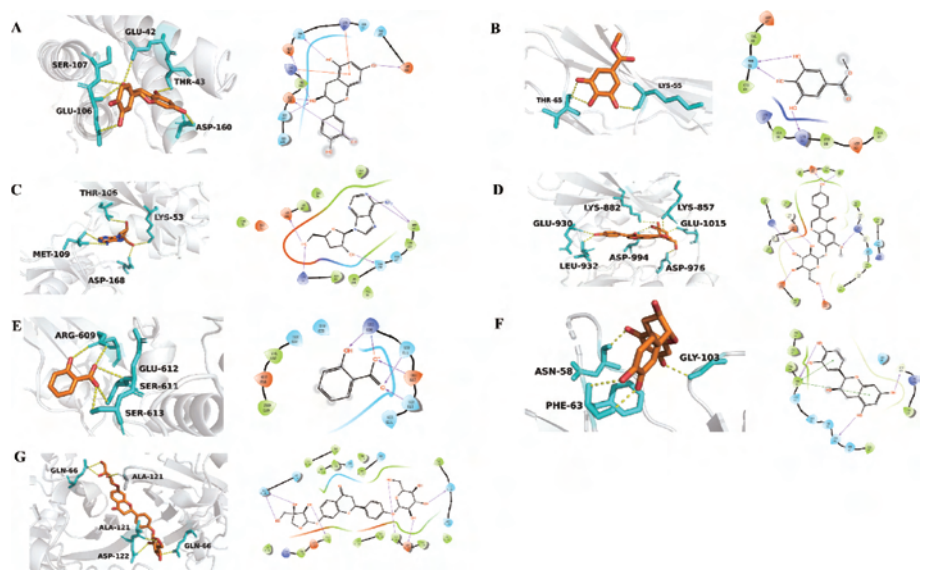


图 2 分子对接结合能热图

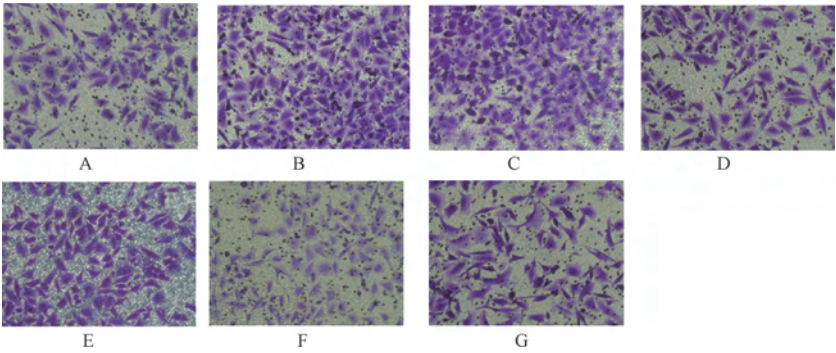


注: 各分图左侧为 3D 模式, 右侧为 2D 模式。在 3D 模式图中, 棕色表示活性成分, 蓝色表示与活性成分对接的氨基酸残基, 黄色表示氢键。

图 3 关键成分与关键靶标蛋白分子对接模式

| 表 2 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) |                |                  |                |
|------------------------------------------------------------|----------------|------------------|----------------|
| 组别                                                         | 细胞存活率/%        | 细胞侵袭数/个          | 细胞凋亡率/%        |
| 空白组                                                        | 100.000±8.209  | 102.000±7.810    | 12.317±0.352   |
| 模型组                                                        | 103.423±3.375  | 180.667±22.189** | 9.623±0.305**  |
| 健脾益气方低剂量组                                                  | 84.327±8.177## | 172.333±11.240   | 11.308±1.514   |
| 健脾益气方中剂量组                                                  | 82.351±3.212## | 116.333±11.930## | 16.235±0.602## |
| 健脾益气方高剂量组                                                  | 85.650±2.059## | 134.000±11.533## | 14.433±1.236## |
| STAT3 抑制组                                                  | 79.447±6.537## | 110.333±0.577##  | 25.760±2.000## |
| gp130 抑制组                                                  | 29.086±2.572## | 109.333±3.786##  | 29.492±1.217## |

注: 与空白组比较, \*\*  $P<0.01$ ; 与模型组比较, ##  $P<0.01$ 。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 为健脾益气方低、中、高剂量组，F 为 STAT3 抑制组，G 为 gp130 抑制组。

图 4 Transwell 技术检测各组 HepG2 细胞侵袭能力

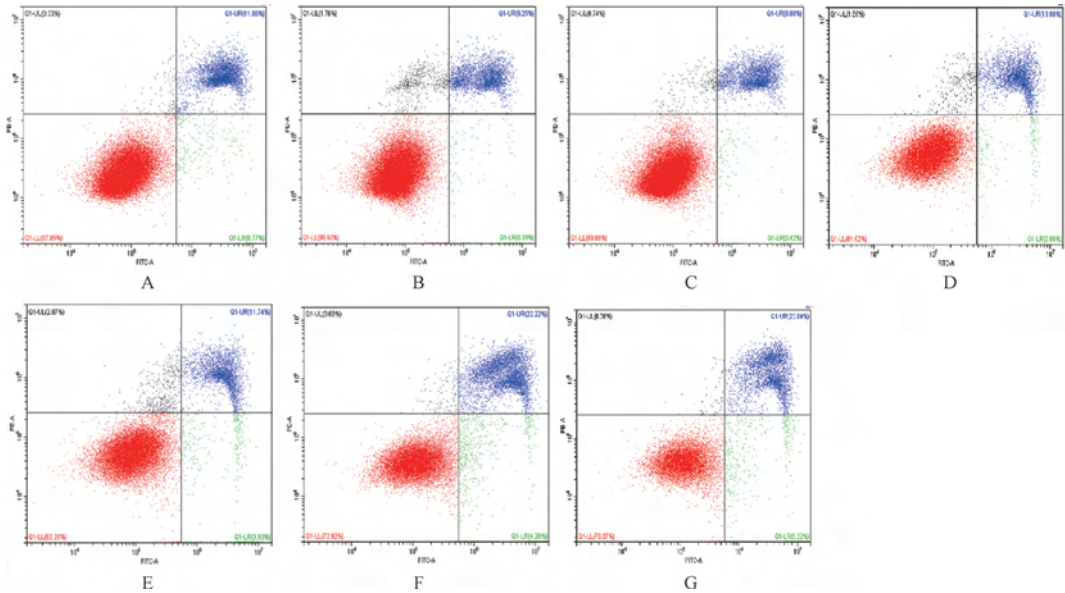


图 5 流式细胞技术检测各组 HepG2 细胞凋亡情况

3.4 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞培养液中 IL-6 水平的影响 与空白组比较，模型组细胞培养液中 IL-6 水平升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，各药物干预组细胞培养液中 IL-6 水平均降低 ( $P<0.01$ )，以 gp130 抑制组的降低幅度最大，且健脾益气方含药血清作用呈剂量依赖性，见表 3。

表 3 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞培养液中 IL-6 水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别        | IL-6/( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |
|-----------|-----------------------------------------|
| 空白组       | 27 545.117±1 728.535                    |
| 模型组       | 31 475.559±467.473 **                   |
| 健脾益气方低剂量组 | 28 002.574±1 871.983 ##                 |
| 健脾益气方中剂量组 | 27 973.727±1 528.501 ##                 |
| 健脾益气方高剂量组 | 25 053.426±1 959.989 ##                 |
| STAT3 抑制组 | 25 728.180±433.457 ##                   |
| gp130 抑制组 | 22 614.266±1 458.707 ##                 |

注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，##  $P<0.01$ 。

3.5 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、

PD-1 和 PD-L1 蛋白表达均升高 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，各药物干预组细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ )，以 STAT3 抑制组的效果最佳，且在 3 个健脾益气方干预组中，以健脾益气方高剂量组作用最佳，见表 4 和图 6。

4 讨论

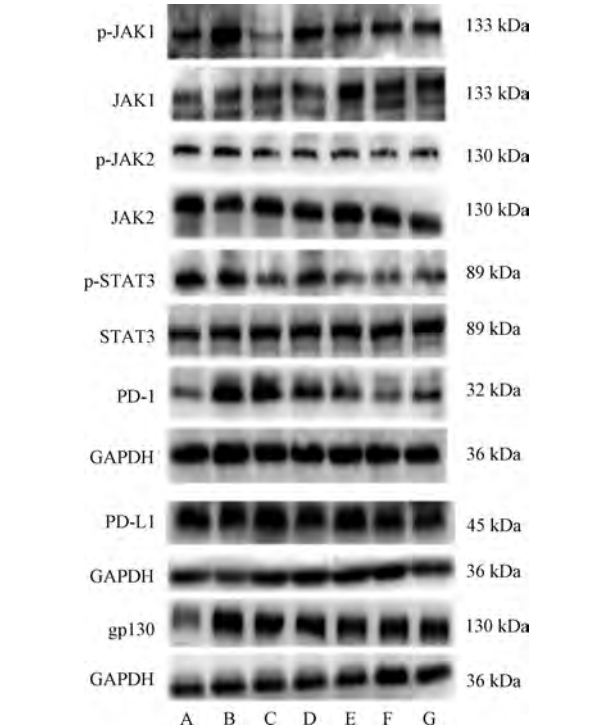
肝癌是全球常见难治的恶性肿瘤之一，发病率和死亡率一直居高不下<sup>[18-19]</sup>。现代医学认为肿瘤的发生发展与其微环境（tumor microenvironment, TME）密切相关；TME 是肿瘤细胞赖以生存的内环境，二者相互依赖，相互影响。慢性炎症和免疫抑制是 TME 的核心特征<sup>[20-21]</sup>，在促进肿瘤发生、发展及抗癌治疗反应中发挥关键作用，因此改善 TME 中免疫和炎症微环境是临床治疗肝癌的重要策略。前期研究证实健脾益气方对肝癌有良好的治疗作用，并能调控 TME 中众多炎症因子及免疫抑制相关分子<sup>[2-5]</sup>。

靶向炎症信号通路 IL-6/STAT3 的抑制剂以及以 PD-1 和 PD-L1 为代表的免疫检查点通路阻断剂的开发和应用为多种肿瘤包括肝癌的治疗提供了新的方向。在肝癌中过量表达的炎性细胞因子 IL-6，通过与其受体 IL-6R 结合，形成

表 4 健脾益气方含药血清对 HepG2 细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

| 组别        | gp130/GAPDH    | p-JAK1/JAK1    | p-JAK2/JAK2    | p-STAT3/STAT3  | PD-1/GAPDH     | PD-L1/GAPDH    |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 空白组       | 0.772±0.044    | 1.149±0.072    | 0.418±0.008    | 0.968±0.005    | 0.450±0.036    | 0.517±0.015    |
| 模型组       | 1.338±0.013 ** | 1.581±0.118 ** | 0.623±0.016 ** | 1.142±0.055 ** | 0.917±0.025 ** | 0.617±0.042 ** |
| 健脾益气方低剂量组 | 1.090±0.041 ## | 0.884±0.011 ## | 0.384±0.015 ## | 0.657±0.033 ## | 0.843±0.015 ## | 0.453±0.006 ## |
| 健脾益气方中剂量组 | 1.059±0.009 ## | 1.125±0.123 ## | 0.409±0.033 ## | 0.880±0.061 ## | 0.603±0.031 ## | 0.537±0.025 ## |
| 健脾益气方高剂量组 | 1.058±0.037 ## | 0.744±0.033 ## | 0.385±0.019 ## | 0.618±0.029 ## | 0.507±0.012 ## | 0.457±0.021 ## |
| STAT3 抑制组 | 0.917±0.074 ## | 0.985±0.035 ## | 0.329±0.009 ## | 0.568±0.030 ## | 0.333±0.029 ## | 0.340±0.010 ## |
| gp130 抑制组 | 0.997±0.012 ## | 0.806±0.010 ## | 0.483±0.004 ## | 0.642±0.025 ## | 0.463±0.023 ## | 0.507±0.021 ## |

注：与空白组比较，\*\*  $P<0.01$ ；与模型组比较，##  $P<0.01$ 。



注：A 为空白组，B 为模型组，C~E 分别为健脾益气方低、中、高剂量组，F 为 STAT3 抑制组，G 为 gp130 抑制组。

图 6 各组 HepG2 细胞 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白电泳图

复合物，再结合膜蛋白 gp130，激活 JAK 激酶活性，使 STAT3 磷酸化，活化的 STAT3 启动下游信号，调控肝癌细胞增殖、侵袭、凋亡等过程<sup>[22]</sup>。有研究报道 STAT3 还与肿瘤细胞免疫抑制及耐药相关。例如在肺癌、膀胱癌等肿瘤细胞中 STAT3/p-STAT3 可上调 PD-L1 的表达<sup>[9,23]</sup>，JAK2/STAT3 信号也可以激活肝内胆管癌细胞中 PD-L1 的表达<sup>[24]</sup>，被激活的 JAK/STAT3 信号还可以调节耐药肺癌细胞中 PD-L1 的表达<sup>[25]</sup>。本研究则进一步证实了 IL-6/STAT3 途径可诱导肝癌细胞 PD-L1 的表达。肿瘤细胞固有 PD-1 是一种肿瘤抑制因子，是免疫治疗的潜在生物标记物。有研究报道，PD-1 在多种癌细胞的亚群中表达，并作为共抑制受体，起到免疫检查点的作用<sup>[26]</sup>。最近的研究表明，在肿瘤细胞中，PD-1 和 PD-L1 也是通过相互作用发挥功能的。例如肿瘤细胞内源性的 PD-1 通过结合配体 PD-L1，可抑制

2016

非小细胞肺癌（NSCLC）<sup>[27]</sup>和结肠癌<sup>[28]</sup>细胞中 AKT 和 ERK1/2 经典信号传导途径，从而抑制肿瘤细胞的生长。而本研究则证实肝癌细胞固有 PD-1 的表达同样受到 IL-6/STAT3 信号的调控。但 PD-1 和 PD-L1 在肝癌细胞的共表达有何意义，有待进一步研究。

健脾是中医临床防治肝癌的重要治法。本研究采用 UHPLC-MS/MS、分子对接和人肝癌细胞 HepG2 体外细胞实验探讨健脾益气方对肝癌细胞 IL-6/STAT3 及其调控 PD-L1 和 PD-1 的影响。结果显示，健脾益气方中含有隐绿原酸、虫草素、芒柄花苷、没食子酸甲酯等 113 种活性成分，其中多个活性成分与该信号通路中靶标蛋白（IL-6、gp130、JAK1、JAK2、STAT3、PD-1 和 PD-L1）均分别存在分子结合位点，通过氢键、pi-pi 等多种相互作用形成较低结合能，均小于-5.0 kcal/mol，提示健脾益气方对该通路多成分、多靶点的干预作用。进一步细胞实验结果显示，通过 IL-6 诱导 STAT3 炎症模型之后，HepG2 细胞侵袭能力增强，凋亡率降低；IL-6 水平及 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 蛋白表达均升高。各药物干预之后（STAT3 和 gp130 的抑制剂，健脾低、中、高剂量含药血清），除低剂量的健脾益气方含药血清对细胞侵袭数的抑制和对细胞凋亡率的影响差异无明显变化外，其它各药物干预组均可抑制模型细胞的增殖与侵袭能力、促进细胞凋亡，降低模型细胞培养液中 IL-6 的水平以及各组细胞中 gp130、p-JAK1、p-JAK2、p-STAT3、PD-1 和 PD-L1 的蛋白表达。表明健脾益气方可通过 IL-6/STAT3 来防止 PD-1 和 PD-L1 在肝癌细胞中的过度表达，抑制细胞增殖侵袭、促进细胞凋亡。

综上所述，在肝癌细胞中，PD-1 和 PD-L1 的表达均受到 IL-6/STAT3 信号通路的调控；健脾益气方可能通过（+）-儿茶素、没食子酸甲酯、虫草素、黄豆黄苷、水杨酸、表儿茶素和甘草苷元-7-O-β-D-芹糖-4'-O-β-D-葡萄糖苷等成分直接或间接调控肝癌细胞 IL-6/STAT3 炎症信号通路及其介导的 PD-L1 和固有 PD-1 的表达，从而干预肿瘤炎症和免疫微环境来有效防治肝癌。

参考文献：

[ 1 ] 余滢滢, 孟繁平, 王福生, 等. PD-1/PD-L1 免疫检查点抑制剂治疗肝细胞癌的临床试验研究进展[ J ]. 中国肿瘤生物治

疗杂志, 2021, 28(10): 1029-1036.

[ 2 ] 音金萍, 岳紫晨, 王 超, 等. 基于网络药理学探讨健脾益气方治疗 DEN 肝癌大鼠的分子机制及关键通路的验证[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(10): 917-927.

[ 3 ] 王 超, 音金萍, 蒋 筱, 等. 波形蛋白与肝细胞癌的关系及健脾益气方的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(10): 123-133.

[ 4 ] 乐 宁, 杨 琪, 音金萍, 等. 健脾益气方通过抑制 DEN 肝癌大鼠肝组织 NLRP3 炎性小体的激活影响血清炎症因子水平[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(6): 1350-1359.

[ 5 ] 胡 卫, 方肇勤, 梁 超, 等. 3 种不同中医治法对大鼠肝癌细胞半乳糖凝集素表达的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(16): 1401-1403; 1425.

[ 6 ] Curti B D, Koguchi Y, Leidner R S, *et al.* Enhancing clinical and immunological effects of anti-PD-1 with belapectin, a galectin-3 inhibitor [ J ]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(4): e002371.

[ 7 ] van Beijnum J R, Huijbers E J M, van Loon K, *et al.* Extracellular vimentin mimics VEGF and is a target for anti-angiogenic immunotherapy [ J ]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2842.

[ 8 ] Cazzato G, Colagrande A, Cimmino A, *et al.* HMGB1-TIM3-HO1: A new pathway of inflammation in skin of SARS-CoV-2 patients? A retrospective pilot study[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1219.

[ 9 ] 胡唯伟, 杨大松. 肿瘤中 PD-L1 表达调控的分子机制研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(21): 2634-2639.

[ 10 ] Zheng H, Ning Y, Zhan Y, *et al.* New insights into the important roles of tumor cell-intrinsic PD-1[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(10): 2537-2547.

[ 11 ] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.

[ 12 ] 王 超, 岳紫晨, 音金萍, 等. 健脾益气方对肝癌模型大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(19): 2342-2346.

[ 13 ] 卓少元, 谢金玲. 健脾益气方含药血清下调 Vimentin 蛋白水平对人肝癌细胞 SMMC-7721 的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 55-59.

[ 14 ] 卓少元, 谢金玲. 健脾益气方含药血清通过 Caspase-3/Vimentin 促进人肝癌 MHCC-97H 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 161-166.

[ 15 ] 音金萍, 卓少元. 阿魏酸对人肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(13): 1565-1571.

[ 16 ] Redell M S, Ruiz M J, Alonzo T A, *et al.* Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor[J]. *Blood*, 2011, 117(21): 5701-5709.

[ 17 ] Xu S, Grande F, Garofalo A, *et al.* Discovery of a novel orally active small-molecule gp130 inhibitor for the treatment of ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(6): 937-949.

[ 18 ] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志 ( 电子版 ), 2021, 13(3): 63-69.

[ 19 ] 曹梦迪, 王 红, 石菊芳, 等. 中国人群肝癌疾病负担: 多数据源证据更新整合分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1848-1858.

[ 20 ] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.

[ 21 ] 黄 波. 肿瘤微环境中免疫与炎症的调节[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(2): 111-115.

[ 22 ] Xu J, Lin H, Wu G, *et al.* IL-6/STAT3 is a promising therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 760971.

[ 23 ] 牟东云, 张艳金, 蒋立人, 等. p-STAT3、PD-L1 在膀胱尿路上皮癌中的表达及与临床病理特征的关系[J]. 重庆医学, 2023, 52(9): 1330-1333.

[ 24 ] 段家康, 张懿刚, 庞 青, 等. IL-17 通过 JAK2/STAT3 信号通路诱导 PD-L1 在肝内胆管癌细胞中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(24): 4265-4270.

[ 25 ] Shen M, Xu Z, Xu W, *et al.* Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway [ J ]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 149.

[ 26 ] Wang X, Yang X, Zhang C, *et al.* Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(12): 6640-6650.

[ 27 ] Chen X, Gao A, Zhang F, *et al.* ILT4 inhibition prevents TAM- and dysfunctional T cell-mediated immunosuppression and enhances the efficacy of anti-PD-L1 therapy in NSCLC with EGFR activation[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3392-3416.

[ 28 ] Wang X, Yang L, Huang F, *et al.* Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells[J]. *Immunol Lett*, 2017, 184: 7-14.