

网络出版时间:2022-8-16 15:31 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220816.0831.002.html

青蒿琥酯通过 FABP5 调节 PI3K/AKT 通路影响 肝癌细胞的增殖和迁移

王清森^{1,2}, 吴静^{1,2,3}, 周家伟^{1,2}, 刘亚锋^{1,2}, 成安琪^{1,2}, 胡东^{1,2,3}

摘要 目的 基于网络药理学与生物信息学探寻青蒿琥酯(ART)治疗肝细胞癌(HCC)的潜在靶点、通路及相关机制。**方法** 通过 PharmMapper 数据库筛选 ART 的潜在作用靶点,构建 PPI 网络并进行可视化分析。从 TCGA 数据库下载 424 例 HCC 样本数据,筛选潜在靶点基因的数据信息,并分析差异表达的靶点基因;利用单-多因素 COX 回归分析,筛选关键靶点基因;用分子对接软件对 ART 和关键靶点基因进行分子对接;用网络数据库 GEPIA2 对关键靶点基因进行差异表达和生存分析;通过 R 语言进行 KEGG 通路富集分析;通过 MTS 实验、划痕实验验证 ART 对肝癌细胞增殖和迁移的影响;qPCR 和 Western blot 验证 FABP5 在肝癌细胞中的表达,Western blot 验证 PI3K/AKT 通路蛋白变化水平。**结果** 通过网络药理学筛选出 282 个潜在靶点基因,最终筛选出 3 个关键靶点基因;FABP5 在 HCC 中的生存分析有显著的统计学意义($P < 0.01$);分子对接显示 ART 和 FABP5 的结合能最高;通路富集分析表明 FABP5 主要富集在 PI3K/AKT 信号通路;细胞实验验证 ART 能抑制 FABP5 的表达水平,ART 可以调节 PI3K/AKT 通路,ART 能抑制肝癌细胞的增殖和迁移。**结论** ART 可能通过抑制 FABP5 调节 PI3K/AKT 通路进而影响肝癌细胞的增殖和迁移,FABP5 可能作为 ART 治疗 HCC 的新靶点基因。

关键词 网络药理学;青蒿琥酯;肝细胞癌;分子对接;肿瘤细胞增殖和迁移

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1367-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.005

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是发

病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一^[1],许多国家的发病率和死亡率还在持续上升^[2]。多项研究^[3-4]提出了包含年龄、性别和肿瘤分级等在内的预后因素,用于预测 HCC 患者的生存状态,但目前 HCC 的发病机制仍未完全阐明。近年来,靶向药物治疗 HCC 获得了很多突破性进展,索拉非尼、青蒿琥酯(artemisinin, ART)、吉非替尼等都体现出了治疗 HCC 的潜力^[5-6]。但目前 HCC 全身治疗药物的疗效仍不能让人满意,这需要更加深入地研究 HCC 发生发展机制,探寻药物的新靶点。前期研究^[7]表明 ART 可以联合索拉非尼抑制 HCC 的进展,该研究通过网络药理学和生物信息学对 ART 治疗 HCC 的潜在靶点和详细分子机制进行深入探讨,并通过实验证明 ART 的详细作用机制及通路,为临床治疗 HCC 提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料 SK-HEP-1 细胞为安徽理工大学医学院常规保存;ART(大连美仑生物技术有限公司);DMEM 培养基、胰酶和优质胎牛血清(美国 Gibco 公司);6 孔细胞培养皿(美国 Corning 公司);TRIzol 试剂、逆转录试剂盒(赛默飞世尔科技中国有限公司);荧光定量 PCR 试剂盒(武汉爱博泰克生物科技有限公司);引物由生工生物工程(上海)有限公司合成;RIPA 裂解液、5×SDS 上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术公司);PVDF 膜和 ECL 曝光液(美国 Millipore 公司);FABP5 兔单克隆抗体(美国 CST 公司, #39926T),PI3K 兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司, #ab32089),p-PI3K 兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司, #ab278545),AKT 兔单克隆抗体(美国 CST 公司, #4685S),p-AKT 兔单克隆抗体(美国 CST 公司, #4060T), β -actin 兔多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司, #AC026);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(赛默飞世尔科技中国有限公司, #C31460)。MTS 试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司, #G3580]。高速台式冷冻离心机(德国

2021-12-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81971483、81672445);安徽省高校协同创新项目(编号:GXXT-2020-058);安徽理工大学 2021 年研究生创新基金项目(编号:2021CX2126)

作者单位:安徽理工大学¹ 医学院、² 省职业健康安全工程实验室、³ 工业粉尘防控与职业安全健康教育重点实验室,淮南 232001

作者简介:王清森,男,硕士研究生;

吴静,女,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wujing8008@126.com;

胡东,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: dhu@aust.edu.cn

Eppendorf 公司,型号:centrifuge 5417R);酶标仪(美国 Agilent 公司,型号:Epoch 2);梯度基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司,型号:Hema 9600);实时荧光定量 PCR 仪(赛默飞世尔科技中国有限公司,型号:Quantstudio 3);凝胶成像仪(英国 Amersham 公司,型号:ImageQuant 800);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司,型号:DMI8)。

1.2 方法

1.2.1 ART 靶点预测 从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载药物 ART 的 3D 结构,将药物 3D 结构上传到 PharmMapper(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)数据库(PharmMapper 数据库是基于药物的效应基团的立体结构来筛选其潜在的特异性靶标,找到药物分子-潜在靶标之间最佳的映射姿势,是重要的计算靶靶服务器^[8]),运行得到 CSV 格式结果文件。将所得到的靶点基因导入 UniProt 数据库,限定物种为“human”,将检索得到的所有蛋白靶标校正为 UniProt ID,并得到靶标蛋白所对应的基因名。

1.2.2 药物-靶点相互作用网络构建 把所有 ART 对应的靶点基因导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),限定物种“Homo sapiens”,并以置信度 ≥ 0.8 ,隐藏离散的点,得到潜在作用靶点与药物互作关系。随后在 Cytoscape 3.6.1 软件中将药物-靶点互作网络可视化。

1.2.3 TCGA 数据库分析 从癌症基因组图谱数据库(TCGA,<https://portal.gdc.cancer.gov/>)下载 50 例 HCC 癌旁样本和 374 例 HCC 样本的 RNA 测序数据集以及相应的临床数据。提取靶点基因在 HCC 中的表达量,用 R 包(limma 和 pheatmap)提取差异表达基因,做出基因差异表达热图和火山图。对差异表达基因进行 COX 单因素和多因素回归分析,筛选关键靶点基因。

1.2.4 分子对接 从 ZINC(<http://zinc.docking.org/>)数据库下载 ART 的 mol2 格式文件。从 PDB 数据库下载靶标的晶体结构,并运用 PyMOL 软件进行预处理,包括去除水分子、加氢等。利用 Auto Dock Tools 软件将靶标晶体结构转换为 pdbqt 格式文件,并导入 ART 的 mol2 格式文件,随后进行分子对接^[9]。通过结合能评价 ART 和靶点的结合活性,最后运用 PyMOL 软件使对接文件可视化。

1.2.5 GEPIA2 数据库验证 从 GEPIA2 数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)验证关键靶点基因在肝癌组织和正常组织中的表达,并对关键

靶点基因进行预后分析。

1.2.6 靶点通路富集分析 利用 R 包(clusterProfiler)对获得的靶标进行 KEGG 通路分析,进一步研究 ART 作用于 HCC 细胞的分子机制。

1.2.7 划痕实验 收集处于对数生长期的 SK-HEP-1 细胞,以 5×10^5 个/ml 分别接种于细胞培养皿中,对照组加 DMSO,实验组加 100 $\mu\text{mol/L}$ ART,直至 90% 融合,用 10 μl 无菌枪头比着直尺用力划横线;无菌 PBS 轻轻冲洗细胞 3 次,洗去脱落的细胞,加入无血清培养基,继续培养 24、48 h,分别于 0、24、48 h 拍摄图像。

1.2.8 MTS 实验 收集处于对数生长期的 SK-HEP-1 细胞,以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔。待细胞贴壁后,实验组加入 100 $\mu\text{mol/L}$ ART,对照组加入 DMSO,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中分别培养 24、48、72 h 后,向每孔加入 20 μl MTS 继续培养 4 h。然后再用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度,该实验重复 3 次。

1.2.9 实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA 成分,逆转录获得 cDNA,存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。使用 SYBR Green 试剂盒在荧光定量 PCR 仪上进行 qRT-PCR 检测。使用 GAPDH 作为内参基因。FABP5 上游引物为 5'-TGAAGGAGCTA GGAGTGGGAA-3',下游引物为 5'-TGCACCATCTG-TAAAGTTGCAG-3',产物长度 212 bp;GAPDH 上游引物为 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3',下游引物为 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGAATG-3',产物长度 101 bp。实验重复 3 次。实验中样本基因的 Ct 值通过 GAPDH 的 Ct 值均一化,即 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{样本}} - \text{Ct}_{\text{内参}}$,样本基因 mRNA 相对丰度值以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示。

1.2.10 蛋白提取与 Western blot 实验 将未处理和加 ART 处理的 SK-HEP-1 细胞加 RIPA 裂解液提取总蛋白,等量的细胞总蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后,转印至 PVDF 膜。转膜后于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 1 h,分别孵育 anti-FABP5(1 : 1 000),anti-p-PI3K(1 : 2 000),anti-PI3K(1 : 1 000),anti-p-AKT(1 : 2 000),anti-AKT(1 : 1 000),anti- β -actin(1 : 50 000)一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。隔天洗膜后,室温孵育辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1 : 20 000)1 h。洗膜后采用 ECL 发光液成像系统检测。采用 ImageJ 软件进行图像分析, β -actin 为内参。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0.1 版本

进行统计学分析。每一个实验至少经过 3 次重复验证,使用两样本 t 检验方法分析比较两组间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物作用靶点的获取 通过 PharmMapper 数据库得到 ART 的靶点基因,ART 靶点基因 299 个。根据 UniProt 数据库查询到的蛋白质,对 ART 的作用靶点进行注释,筛去 UniProt 数据库中不包含的作用靶点,最终获得 ART 的靶点数为 282 个。

2.2 药物-靶点相互作用网络构建 将药物靶点整合后,导入 STRING 数据库中,限定物种“Homo sapiens”,设置置信度 ≥ 0.8 ,隐藏离散的点,得到 162 个潜在靶点蛋白,565 条相互作用关系。下载 PPI 信息,将文件导入 Cytoscape 软件中可视化,得到药物-靶点相互作用网络(图 1)。

2.3 HCC 中关键靶点基因筛选 从 TCGA 下载的 HCC 数据中提取 ART 靶点基因的数据,获得 278 个

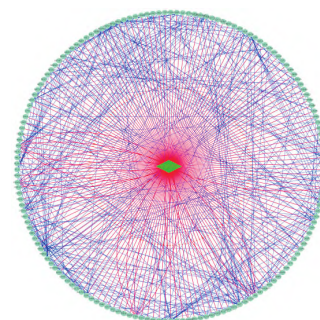


图 1 药物-靶点 PPI 交互网络

中间绿色菱形为药物,外周深绿色椭圆形为药物潜在靶点,红线表示药物-蛋白相互作用,蓝线表示蛋白-蛋白相互作用

靶点基因,用 R 包分析 278 个靶点基因在 HCC 中的差异表达水平,筛选出 37 个差异表达靶点基因(图 2A),上调基因和下调基因(图 2B)。接着对 37 个差异表达基因进行单因素和多因素 COX 回归分析,单因素筛选出 6 个差异表达靶点基因,多因素筛选出 3 个差异表达靶点基因(图 2C、D)。

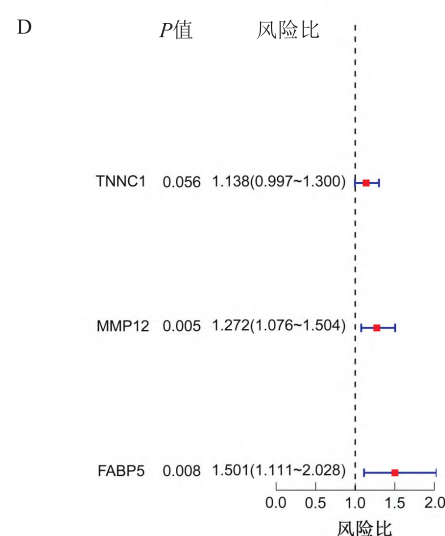
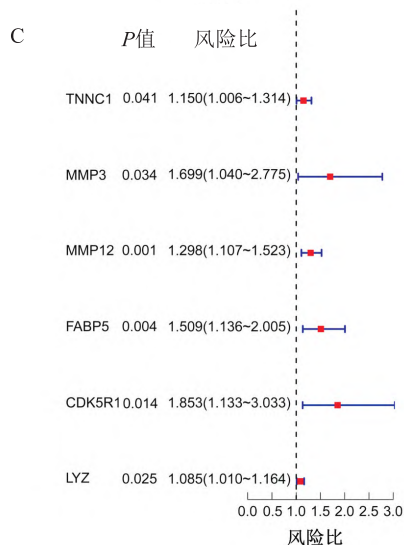
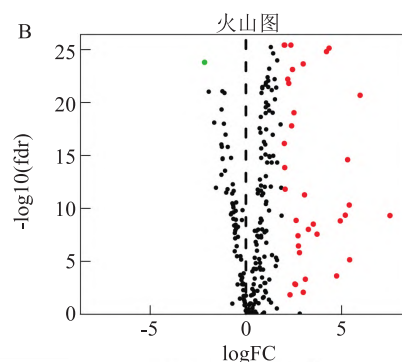
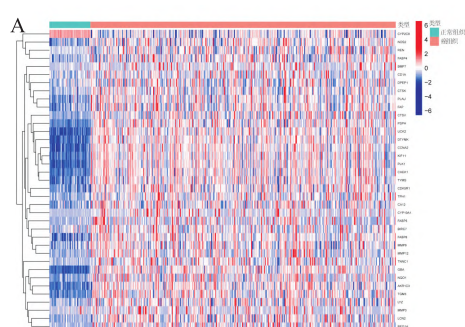


图 2 HCC 中差异表达基因分析

A: 37 个差异表达基因的热图; B: 上调基因和下调基因的火山图, 其中红色代表上调基因, 绿色代表下调基因, 黑色代表无差异表达的基因; C: 单因素 COX 回归分析; D: 多因素 COX 回归分析

2.4 FABP5 的结合能最高 利用 Auto Dock Tools 软件将 ART 和对应的 3 个靶点基因分别进行分子对接。可以看出 ART 与 FABP5 的结合能最大,ART 最有可能与 FABP5 结合(表 1,图 3)。

表 1 ART 与关键靶点蛋白对接结果

靶点名称	蛋白库名称	结合能(kcal/mol)
FABP5	5hz5	-8.77
MMP12	3fl7	-8.16
TNNC1	1j1d	-5.52

2.5 FABP5 在肝细胞癌中更具有预后价值 GEPIA2 数据库分析发现 LIHC 患者中,FABP5 在癌组织中的表达量显著高于正常组织且差异有统计学意义(图 4A)。MMP12 在癌组织中的表达量也高于正常组织但差异无统计学意义(图 4B)。TNNC1 在正常组织中高表达,但差异无统计学意义(图 4C)。GEPIA2 数据库预后分析发现 FABP5 高表达与患者总生存率(overall survival, OS)低显著相关($P = 0.0011$)(图 4D)。MMP12($P = 0.0220$)(图 4E)、TNNC1($P = 0.0095$)(图 4F)高表达与患者 OS 低也相关,但 FABP5 更显著。

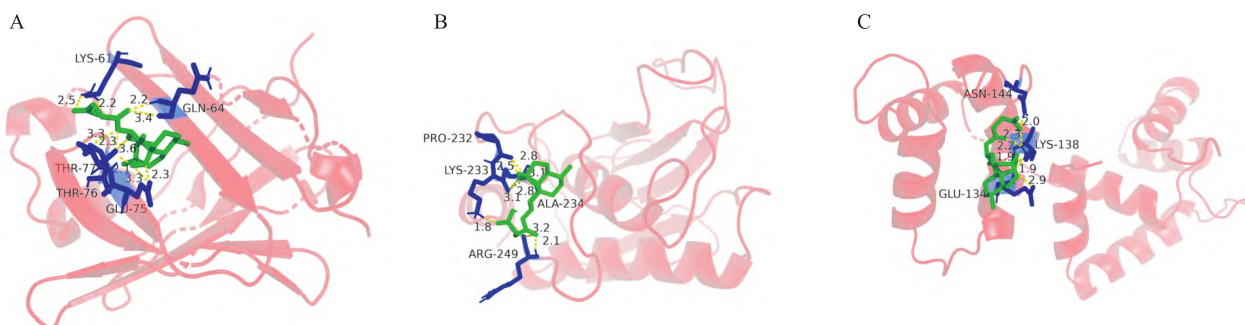


图 3 分子对接

A:ART 与 FABP5 对接;B:ART 与 MMP12 对接;C:ART 与 TNNC1 对接。红色为蛋白分子;绿色为 ART;蓝色为对接残基;黄色为氢键,数值表示氢键长短;氨基酸加数字表示某一位氨基酸;结合能为负值,负值的绝对值越大,结合能越大

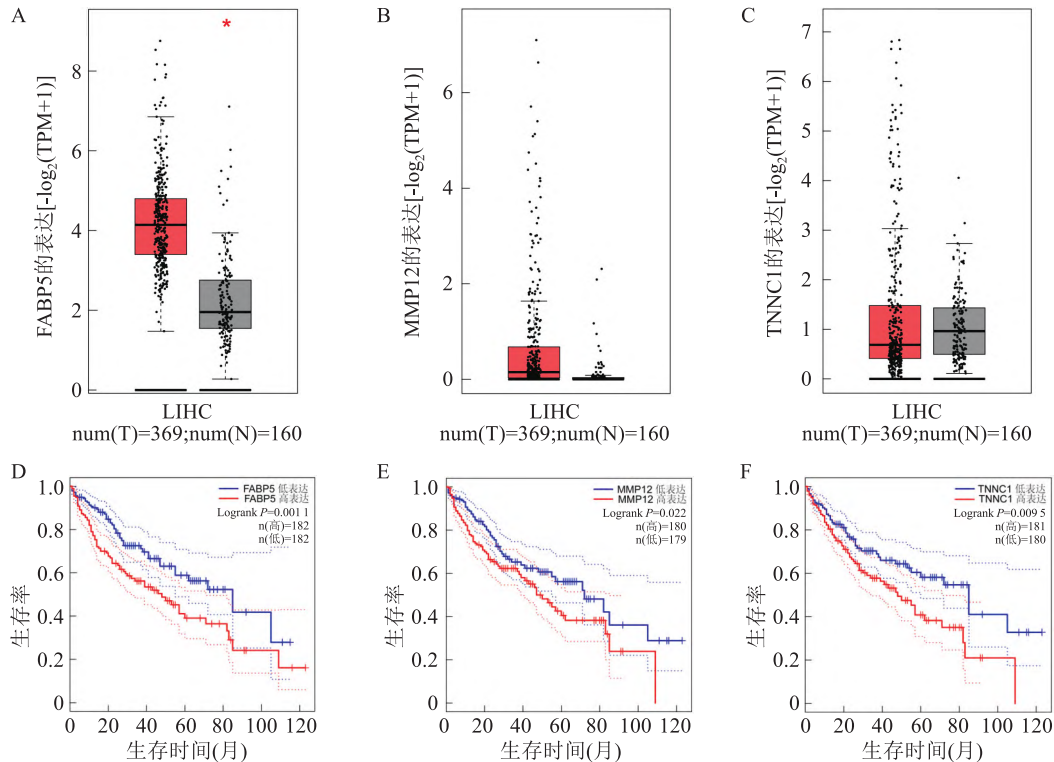


图 4 GEPIA2 数据库差异表达和生存分析

A:FABP5 在肝癌组织和正常组织内的差异表达;B:MMP12 在肝癌组织和正常组织内的差异表达;C:TNNC1 在肝癌组织和正常组织内的差异表达;红色代表肝癌组织,灰色代表正常组织,与肝癌组织比较; * $P < 0.05$;D:FABP5 表达与 LIHC 患者 OS 的关系;E:MMP12 表达与 LIHC 患者 OS 的关系;F:TNNC1 表达与 LIHC 患者 OS 的关系

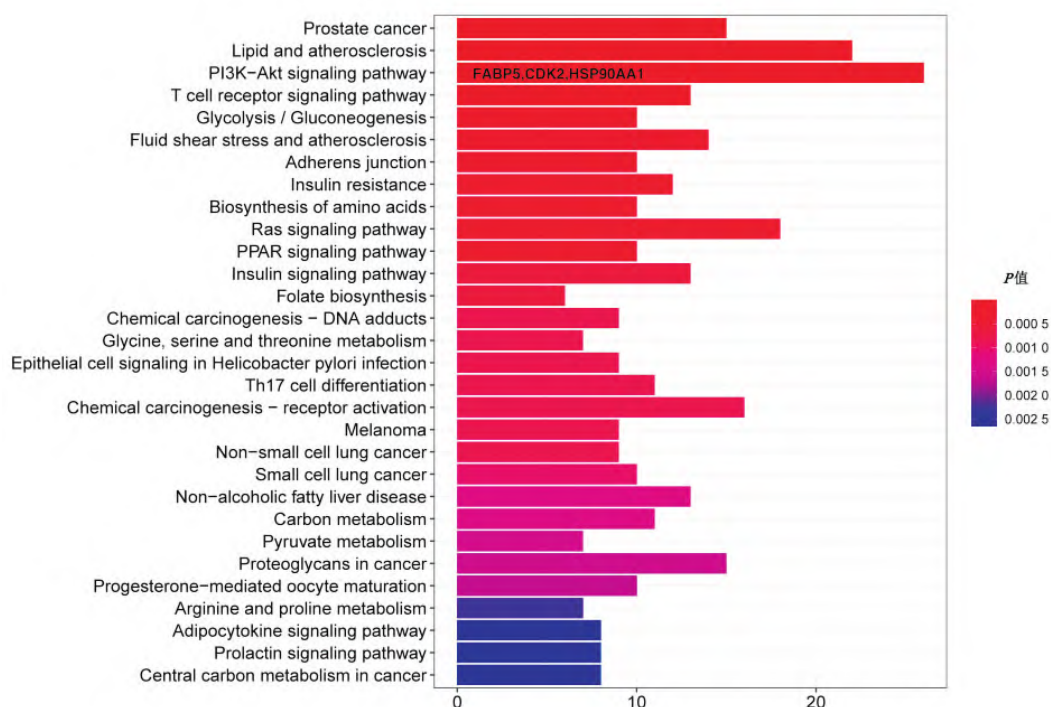


图5 靶点基因通路富集分析

2.6 靶点基因通路富集分析 将 ART 的靶点基因通过 R 语言进行 KEGG 通路分析,这些基因参与的主要通路包括 PI3K/AKT 信号通路、脂质和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis) 通路、前列腺癌 (prostate cancer) 通路,其中 FABP5 富集在 PI3K/AKT 信号通路(图 5)。

2.7 ART 可能通过 FABP5 抑制 PI3K/AKT 信号通路进而抑制肝癌细胞增殖和迁移 划痕实验显示,与对照组比较,SK-HEP-1 细胞加入 ART 刺激 48 h 后显著抑制细胞迁移(图 6A)。MTS 实验表明,与对照组比较,ART 组能显著抑制细胞增殖(图 6B)。qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,SK-HEP-1 细胞加入 ART 刺激 48 h 后, FABP5 表达水平下降(图 6C)。Western blot 结果显示,与对照组比较,SK-HEP-1 细胞加入 ART 之后, FABP5 的蛋白水平下降;p-PI3K 和 p-AKT 的磷酸化水平下降(图 6D)。

3 讨论

近年来,虽然靶向药物治疗 HCC 已经获得了突破性进展,但目前 HCC 全身治疗药物的效果仍不能让人满意。前期研究^[7]发现 ART 可以通过增强索拉非尼的药物敏感性,从而用于治疗 HCC,但 ART 是否可以治疗 HCC 以及其潜在靶标和机制仍不明确,需要进一步研究。

基于网络药理学具有对“药物-靶点-疾病”进行网络分析,从而系统找出药物与靶点之间的对应关系,并揭示多种药物协同作用的优势。已有大量研究^[10-12]利用生物信息学、网络药理学等方法筛选药物潜在靶点,并将药物与靶点进行分子对接后分析其详细作用机制。本研究借助网络药理学的方法,对 ART 的潜在靶点进行筛选,共筛选出 282 个靶点基因,利用 Cytoscape 软件将靶点基因进行可视化。随后,下载 TCGA 数据库中 HCC 测序数据,对靶点基因进行差异表达分析,单-多因素回归分析,筛选出 3 个关键靶点基因,分别是 TNNC1、MMP12、FABP5。有研究^[13]表明 TNNC1 在 HCC 中高表达,而 TNNC1 的高表达会促进肝癌细胞迁移。MMP12 可能通过增加肿瘤组织中 FOXP3⁺ Treg 的浸润水平,促进 HCC 的发生发展及免疫逃避^[14]。研究发现, FABP5 和多种肿瘤的发生发展密切相关,如 FABP5 可通过 PI3K/AKT 信号通路调节肾透明细胞癌细胞增殖^[15],促进肾癌细胞生长和转移^[16],影响肾癌的进展。FABP5 可通过调节肺内自然杀伤细胞的成熟控制肺癌细胞转移^[17]。FABP5 可促进前列腺癌细胞增殖^[18-19]。FABP5 在肝内胆管癌联合淋巴结转移中显著过表达,并参与体外细胞增殖和侵袭,表明 FABP5 可能与肝内胆管癌的进展有关^[20]。但是, FABP5 在肝癌中却鲜有研究。

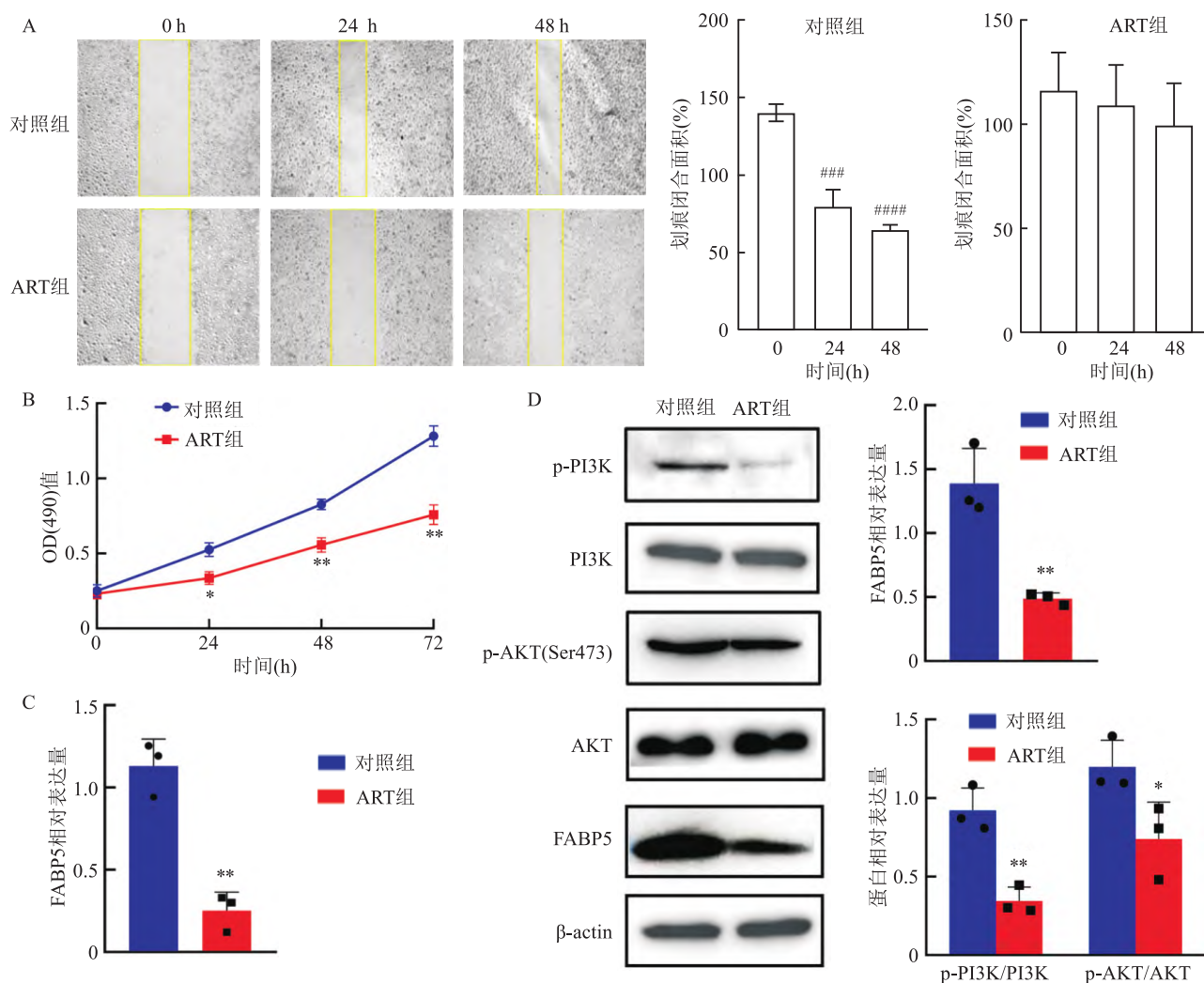


图6 ART对肝癌细胞增殖、迁移及对FABP5、p-PI3K、p-AKT表达水平的影响

A:细胞划痕实验 ×50;B:MTS实验;C:FABP5的相对表达量;D:FABP5的蛋白表达水平和ART对PI3K/AKT通路的影响;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与0 h组比较:### $P < 0.001$,#### $P < 0.0001$

利用 Auto Dock Tools 软件对 ART 和 3 个关键靶点分别进行分子对接,结果显示 ART 和 FABP5 的结合能最大(-8.77),说明 ART 和 FABP5 蛋白的结合效能最高,提示 FABP5 可能是 ART 治疗 HCC 的潜在作用靶点。利用 GEPIA2 数据库对 3 个关键靶点基因在 HCC 中的表达及预后进行分析,发现只有 FABP5 具有差异和预后的双重特性,进一步证实 FABP5 在 HCC 的发生发展中起着关键作用。通过 KEGG 通路富集分析发现 FABP5 主要富集在 PI3K/AKT 通路,提示 ART 可能通过调节 PI3K/AKT 信号通路影响 HCC。细胞实验证实 ART 可以抑制 SK-HEP-1 细胞增殖和迁移,ART 可能是通过影响 FABP5 的表达水平,进而影响 PI3K/AKT 信号通路抑制肝癌细胞的增殖和迁移。

本研究也有局限性。首先,只在细胞水平上进行了验证,没有临床样本进行验证,需要更多前瞻性的真实数据来验证其临床实用性。其次,只证明了 ART 可能与 FABP5 结合,但它们结合的机制尚不清楚。

综上所述,筛选出 FABP5 可能作为 ART 的作用靶点, FABP5 为 PI3K/AKT 信号通路的上游。ART 通过抑制 FABP5 的表达抑制 PI3K/AKT 信号通路,进而抑制肝癌细胞的增殖和迁移。HCC 中 ART 与靶点基因之间的内在机制尚不清楚,值得进一步研究。

参考文献

- [1] Qiu Z X, Li H, Zhang Z T, et al. A pharmacogenomic landscape in

- human liver cancers[J]. Cancer Cell,2019,36(2):179-93.
- [2] 许 杨,尹 侃,李霄霞,等. 基于 TCGA 数据库的肝细胞癌自噬相关基因预后风险模型的建立[J]. 青岛大学学报(医学版),2021,57(1):1-7.
- [3] Roayaie S, Blume I N, Thung S N, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2009, 137(3):850-5.
- [4] 余微波,荣维淇,王黎明,等. 不同性别肝细胞癌术后患者的预后情况比较[J]. 中华肿瘤杂志,2014,36(4):303-8.
- [5] Yao X, Zhao C R, Yin H, et al. Synergistic antitumor activity of sorafenib and artesunate in hepatocellular carcinoma cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(12):1609-20.
- [6] Shao J J, Xu Z F, Peng X M, et al. Gefitinib synergizes with irinotecan to suppress hepatocellular carcinoma via antagonizing Rad51-Mediated DNA-Repair[J]. PLoS One, 2016, 11(1):e0146968.
- [7] Wu J, Liu S, Xing Y R, et al. Artesunate promotes sensitivity to sorafenib in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 519(1):41-5.
- [8] Wang X, Shen Y H, Wang S W, et al. Pharm Mapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1):W356-60.
- [9] Nipun T S, Khatib A, Ibrahim Z, et al. Characterization of α -glucosidase inhibitors from psychotria malayana jack leaves extract using LC-MS-based multivariate data analysis and in-silico molecular docking[J]. Molecules, 2020, 25(24):5885.
- [10] Zhou J W, Mu M, Xing Y R, et al. Identification of key genes in lung adenocarcinoma and establishment of prognostic mode[J]. Front Mol Biosci, 2020, 7:561456.
- [11] 叶静静,陈天兵. LncRNA SNHG9 敲除对胶质瘤细胞增殖影响及其作用机制的生物信息学探讨[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3):342-7.
- [12] 龙腾飞,张红雁,吴爱林,等. 基于 CGGA 数据库的 325 例胶质瘤患者 PSMB8 表达水平与临床特征的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(11):1833-7.
- [13] Ma F, Wang Z R, Qiang Y W, et al. LukS-PV inhibits hepatocellular carcinoma cells migration via the TNNC1/PI3K/AKT axis[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13:10221-30.
- [14] He M K, Le Y, Zhang Y F, et al. Matrix metalloproteinase 12 expression is associated with tumor FOXP3 + regulatory T cell infiltration and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 16(1):475-82.
- [15] Lv Q, Wang G M, Zhang Y N, et al. FABP5 regulates the proliferation of clear cell renal cell carcinoma cells via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2019, 54(4):1221-32.
- [16] Wu G Z, Xu Y K, Wang Q F, et al. FABP5 is correlated with poor prognosis and promotes tumour cell growth and metastasis in clear cell renal cell carcinoma[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 862:172637.
- [17] Yang S H, Kobayashi S, Sekino K, et al. Fatty acid-binding protein 5 controls lung tumor metastasis by regulating the maturation of natural killer cells in the lung[J]. FEBS Lett, 2021, 595(13):1797-805.
- [18] Senga S, Kawaguchi K, Kobayashi N, et al. A novel fatty acid-binding protein 5-estrogen-related receptor α signaling pathway promotes cell growth and energy metabolism in prostate cancer cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(60):31753-70.
- [19] Nitschke K, Erben P, Waldbillig F, et al. Clinical relevance of gene expression in localized and metastatic prostate cancer exemplified by FABP5[J]. World J Urol, 2020, 38(3):637-45.
- [20] Jeong C Y, Hah Y S, Cho B I, et al. Fatty acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in human intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4):1283-92.

Artesunate affects the proliferation and migration of HCC cells by regulating the PI3K/AKT pathway through FABP5

Wang Qingsen^{1,2}, Wu Jing^{1,2,3}, Zhou Jiawei^{1,2}, Liu Yafeng^{1,2}, Cheng Anqi^{1,2}, Hu Dong^{1,2,3}

(¹Dept of Medical College, ²Anhui Occupational Health and Safety Engineering Laboratory,

³Key Laboratory of Industrial Dust Control and Occupational Safety and Health, Ministry of Education, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001)

Abstract Objective To explore the potential targets, pathways and related mechanisms of artesunate (ART) in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) based on network pharmacology and Bioinformatics. **Methods** The potential targets of ART were screened through pharmpmapper database, PPI network was constructed and visual analysis was performed. The data of 424 HCC samples were downloaded from TCGA database, the data information of potential target genes were screened, and the differentially expressed target genes were analyzed. The key target genes were screened by univariate-multivariate COX regression analysis. Molecular docking software was used to conduct molecular docking between ART and key target genes. Differential expression and survival analysis of key

色氨酸-2,3-双加氧酶 2 上调介导犬尿氨酸代谢在大鼠佐剂性关节炎中的作用研究

贾成艳, 韩 萍, 王越业, 许 媛, 许和鹏, 陈阿圆, 魏 伟, 常 艳

摘要 **目的** 探究色氨酸-2,3-双加氧酶 2(TDO2)表达及其介导的犬尿氨酸(Kyn)代谢在大鼠佐剂性关节炎(AA)不同炎症阶段(包括初期、高峰期、缓解期)变化特点。**方法** 建立大鼠 AA 模型,各炎症阶段处死 AA 大鼠,HE 染色观察关节滑膜和肝脏病理学变化;免疫组化法检测关节滑膜组织和肝脏组织中 TDO2 表达;高效液相色谱法检测血清和肝脏中色氨酸(Trp)、Kyn 水平。**结果** 与正常组比较,AA 大鼠显示出与 RA 类似的临床表现和病理学特征。高峰期和缓解期大鼠关节滑膜和肝脏组织 TDO2 表达升高($P < 0.05$)。各炎症阶段 AA 大鼠血清 Trp 水平降低,初期 Kyn 水平升高($P < 0.01$);高峰期大鼠肝脏组织中 Trp 水平降低、Kyn 水平升高,Kyn/Trp 比值升高($P < 0.01$)。**结论** TDO2 可能在 AA

高峰期发挥重要作用,介导 Kyn 代谢参与 RA 发生和发展。

关键词 类风湿关节炎;佐剂性关节炎;色氨酸-2,3-双加氧酶 2;犬尿氨酸;色氨酸

中图分类号 R 593.22;R 349.18

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)09-1374-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.006

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种系统性自身免疫病,临床表现主要为慢性滑膜炎和关节软骨、骨损伤^[1]。早在 20 世纪学者们就发现 RA 患者血清、尿液和关节滑液中色氨酸(tryptophan, Trp)-犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)代谢产物水平升高^[2],RA 动物模型实验同样验证了类似的结果^[3],提示 Trp-Kyn 代谢可能参与 RA 发生发展和病理机制。

吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO)1、IDO2 和色氨酸-2,3-双加氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase 2, TDO2)是 Kyn 途径的 3 个重要限速酶,但三者具有底物特异性和表达特异性。IDO1 广泛表达于各个组织和细胞,其在 RA 中的作用存在争议,既表现为抗炎作用^[4-5],也表现为促炎作用^[6]。IDO2 与 IDO1 具有高度同源性,近年来发现 IDO2 可促进自身抗体产生,参与自身免疫性关节炎发生发展^[7]。TDO2 主要表达于肝脏,在多种

2021-11-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81573443、81673444、81973332);安徽省自然科学基金(编号:2108085MH320);安徽省自然科学杰出青年基金(编号:170808J10);安徽省高校重点科研平台协同创新项目(编号:GXXT-2020-065)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,安徽医科大学类风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:贾成艳,女,硕士研究生;

常 艳,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yychang@ahmu.edu.cn;

魏 伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn

target genes were performed using network database GEPIA2. KEGG pathway enrichment analysis was performed by R language. The effects of ART on the proliferation and migration of HCC cells were verified by MTS assay and scratch test. The expression of FABP5 in HCC cells was verified by qPCR and Western blot. Western blot was used to verify the protein changes of PI3K/AKT pathway. **Results** A total of 282 potential target genes were screened by network pharmacology. Finally, three key target genes were screened out. The survival analysis of FABP5 in HCC was statistically significant ($P < 0.01$). Molecular docking showed that ART and FABP5 had the highest binding energy. Pathway enrichment analysis showed that FABP5 was mainly enriched in PI3K/AKT signaling pathway. Cell experiments verified that ART could inhibit the expression level of FABP5, that ART could regulate the PI3K/AKT pathway, and that ART could inhibit the proliferation and migration of HCC cells. **Conclusion** FABP5 may regulate the PI3K/AKT pathway by inhibiting FABP5 and thus affect HCC cell proliferation and migration, and FABP5 may serve as a new target gene for ART therapy of HCC.

Key words network pharmacology; artesunate; hepatocellular carcinoma; molecular docking; tumor cell proliferation and migration