

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250506001

华蟾素的主要活性成分通过激活巨噬细胞 cGAS-STING 信号通路抑制肝癌进展

俞诗涵¹, 张雪梅¹, 石佳¹, 郑文澜¹, 郑力铭¹, 刘浩¹, 冯海¹, 余卓²

1. 上海中医药大学附属曙光医院疫病研究所, 上海市中医临床重点实验室(上海 201203); 2. 上海中医药大学附属曙光医院肝病科(上海 201203)

【摘要】 **目的** 通过体内外模型阐明华蟾素主要活性成分——蟾毒灵、华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵和脂蟾毒配基的抗肝癌效应及其免疫调控机制。**方法** ①体外实验: 使用人 Huh7 和小鼠 Hepa1-6 肝癌细胞株, 采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测药物对细胞活力的影响, DNA 损伤及 γ -组蛋白 H2A 变体 X(γ -H2AX) 表达运用 DNA 定量试剂盒、彗星实验、免疫荧光及 Western blot 进行检测。通过建立肿瘤细胞(Huh7、Hepa1-6)上清液-巨噬细胞(人 THP-1、小鼠 RAW264.7)共培养体系, 采用 Western blot、酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒检测环磷酸鸟苷-腺苷合成酶(cGAS)-干扰素基因刺激蛋白(STING)信号通路蛋白表达及下游细胞因子的水平。②体内实验: 构建 Hepa1-6 原位肝癌模型, 用单个组分($n=5$)处理小鼠, 验证华蟾素的主要活性成分通过激活 cGAS-STING 信号通路抑制肿瘤生长。**结果** ①体外实验证实蟾毒灵、华蟾毒精、蟾毒它灵和华蟾毒它灵能够显著诱导肝癌细胞 DNA 损伤, 促进 γ -H2AX 的表达, 激活巨噬细胞内 cGAS-STING 信号通路, 增强 β 干扰素(IFN- β)分泌。②体内实验证实这些成分能激活 cGAS-STING 信号通路, 分泌 IFN- β , 显著抑制肿瘤生长。**结论** 蟾毒灵、华蟾毒精、蟾毒它灵和华蟾毒它灵通过激活 cGAS-STING 信号通路抑制肿瘤生长的免疫调节机制, 为肝癌的免疫治疗提供了一种有效的治疗策略。

【关键词】 肝癌; 华蟾素; 腺苷合成酶-干扰素基因刺激蛋白; 作用机制; 肿瘤免疫治疗; 中药研究

Main active components of Cinobufacini inhibit progression of hepatocellular carcinoma by activating cGAS-STING signaling pathway in macrophages

YU Shihan¹, ZHANG Xuemei¹, SHI Jia¹, ZHENG Wenlan¹, ZHENG Liming¹, LIU Hao¹, FENG Hai¹, YU Zhuo²

1. Institute of Infectious Diseases, Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Clinical Research, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Department of Liver Disease, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To elucidate the anti-hepatocellular carcinoma (HCC) effect and immunoregulatory mechanism of the main active components of Cinobufacini (Huachansu), including bufalin, cinobufagin, bufotalin, cinobufotalin and resibufogenin, using *in vitro* and *in vivo* models.

Methods ① *In vitro*: Human Huh7 and mouse Hepa1-6 HCC cells were treated with individual components. Cell viability was assessed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. DNA damage and γ -histone H2A variant X (γ -H2AX) expression were analyzed using DNA quantification kits, comet assays, immunofluorescence, and Western blot. A co-culture system of tumor cell (Huh7, Hepa1-6) supernatant and macrophages (human THP-1, mouse RAW264.7) was established. Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to measure protein expression of the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) -

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82222074, 82074154); 上海市教育发展基金会和上海市教委“曙光计划”项目(23SG38); 上海市青年拔尖人才计划(2020年); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(ZYYZDXK-2023060); 上海市中医临床重点实验室项目(20DZ2272200)

[作者简介] 俞诗涵, 女, 硕士研究生, 主要从事中西医结合防治肝癌研究工作

[通信作者] 余卓, 主任医师, 博士研究生导师;

E-mail: zhuoyu@shutcm.edu.cn

stimulator of interferon genes (STING) signaling pathway and the levels of downstream cytokines. ② *In vivo*: An orthotopic Hepa1-6 HCC model was established in C57BL/6 mice. Mice were treated with individual components ($n=5$) to verify validate tumor suppression via the cGAS-STING pathway. **Results** ① *In vitro*: Bufalin, cinobufagin, bufotalin and cinobufotalin significantly induced DNA damage, promoted γ -H2AX expression, activated the cGAS-STING pathway in macrophages and enhanced interferon- β (IFN- β) secretion. ② *In vivo*: These components activated the cGAS-STING pathway, secreted IFN- β , and significantly inhibited tumor growth. **Conclusion** Bufalin, cinobufagin, bufotalin, and cinobufotalin inhibit HCC growth by activating the cGAS-STING signaling pathway through immunoregulation, supporting their potential as immunotherapeutic strategies.

Keywords: hepatocellular carcinoma; Cinobufacini; cGAS-STING; mechanism of action; tumor immunotherapy; Chinese materia medica research

肝细胞癌是全球范围内第六大常见恶性肿瘤,在肿瘤相关死亡病因中位列第三^[1]。因肝癌晚期诊断、化学疗法(以下简称“化疗”)耐药,以及高复发率和转移率,导致患者预后不良,5年生存率仅为30%^[2]。因此,开发新的治疗策略迫在眉睫。近年来,通过调控肿瘤微环境增强抗肿瘤免疫反应的治疗策略受到了广泛关注,为肝癌治疗提供了新思路^[3]。

损伤相关分子模式(DAMPs)是指在细胞损伤或应激时产生的内源性分子,能够激活免疫系统,引起抗病原微生物、抗肿瘤等先天性或适应性免疫反应^[4]。其中,细胞损伤引起的自身断裂的双链DNA(dsDNA)分子就是一种重要的DAMP。断裂的dsDNA从受损的细胞中释放到细胞外,被邻近巨噬细胞等抗原呈递免疫细胞摄取,进入细胞后能够与细胞内的环磷酸鸟苷-腺苷合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)结合。cGAS是细胞内特异性DNA感受器,能够识别并结合细胞内源性和外源性dsDNA,激活巨噬细胞cGAS-干扰素基因刺激蛋白(stimulator of interferon genes, STING)信号通路,引起抗病原微生物,抗肿瘤等免疫反应。

cGAS-STING通路是由cGAS、STING以及下游信号分子组成的信号通路,在先天性和适应性免疫反应中发挥关键作用,尤其在肿瘤免疫监视中具有重要意义^[5]。cGAS识别DNA后,催化生成第二信使环鸟苷酸腺苷酸(cyclic GMP-AMP, cGAMP)。随后,cGAMP与STING结合并激活该蛋白,形成磷酸化STING(p-STING)。p-STING结合和激活TANK结合激酶1(TBK1),触发干扰素调节因子3(IRF-3)的转录。这些分子事件最终促进I型干扰素的表达,启动高效的抗肿瘤免疫应答,发挥免疫防御功能。鉴于此,筛选和鉴定调控该信号通路的生物活性物质,靶向干预cGAS-STING信号通路活性,被认为具

有潜在的抗肝癌治疗价值^[6-7]。

中药华蟾素(Cinobufacini/Huachansu)是从蟾蜍科动物中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans* Cantor)或黑眶蟾蜍(*Bufo melanostictus* Schneider)中提取的干燥分泌物,具有抗肿瘤、免疫调节及镇痛等功效,已在晚期肝癌、胃癌、肺癌等实体瘤的辅助治疗中广泛应用^[8-10]。华蟾素的主要活性成分是以蟾毒灵(bufalin, BUF)、华蟾毒精(cinobufagin, CBG)、蟾毒它灵(bufotalin, BFTL)、华蟾毒它灵(cinobufotalin, CBFL)和脂蟾毒配基(resibufogenin, RFBG)为代表的蟾毒内酯类化合物^[11-12]。已有报道指出,华蟾素对肿瘤细胞有细胞毒作用^[13-14],可以直接诱导肿瘤细胞DNA损伤^[15],但其参与肿瘤微环境的调控机制还不完全清楚,需要进一步阐明。本研究通过体内体外实验探讨华蟾素主要活性成分的抗肝癌作用以及其潜在的分子机制,旨在为肝癌的免疫治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌细胞株Huh7、小鼠肝癌细胞株Hepa1-6、人单核细胞株THP-1和小鼠巨噬细胞株RAW264.7均由本实验室提供。

1.1.2 实验动物 25只4周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物生产许可证号:SYXK(京)2022-0052。动物使用许可证号:SYXK(沪)2025-0008。实验前7d,置于温度22℃、湿度55%、12h明暗循环条件下适应性饲养,其间自由摄取标准化饲料及饮用水。本动物实验方案获得上海中医药大学伦理委员会批准(伦理批准号:PZSHUTCM220725011)。

1.1.3 药物与试剂 达尔贝科改良鹰氏高糖培养基(DMEM)、罗斯韦尔·帕克纪念研究所1640培养

基(RPMI-1640)、青霉素/链霉素溶液、 β -巯基乙醇、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化液、4%多聚甲醛溶液(批号分别为CSP006、GP211004、DD2403028、CSP005、ZQ-1300、0103、CSP194),上海中乔新舟生物科技有限公司;胎牛血清(批号:FBS500-S),澳大利亚AusGeneX公司;BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBF(批号分别为HY-N0877、HY-N0421、HY-N0878、HY-N0880、HY-N0815),美国MedChemExpress公司;细胞计数试剂盒(CCK-8,批号:A311-01),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;荧光dsDNA定量试剂盒(批号:17650),美国AAT Bioquest公司;DNA损伤检测试剂盒(免疫荧光法)(批号:C2037S),上海碧云天生物技术股份有限公司;二辛可酸(BCA)蛋白定量试剂盒、蛋白分子量标准(Marker)、放射免疫沉淀试验(RIPA)裂解液、蛋白酶抑制剂(批号分别为ZJ102、WJ103、PC101、GRF101),上海雅酶生物医药科技有限公司;磷酸酶抑制剂(批号:4906837001),德国Merck公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号:IPVH00005),美国Millipore公司;极超敏增强化学发光(ECL)发光底物(批号:U10012),苏州科尤博生物科技有限公司;彗星实验试剂盒、Western blot γ -组蛋白H2A变体X(γ -H2AX)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号分别为ab238544、ab81299、ab8245),英国Abcam公司;Western blot 人源cGAS抗体、鼠源cGAS抗体、STING抗体、人源p-STING抗体、鼠源p-STING抗体、TBK1抗体、p-TBK1抗体、IRF-3抗体、p-IRF-3抗体(批号分别为66546、31659、13647、50907、72971、38066、5483、4302、29047),美国Cell Signaling Technology公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(批号:SA00001-2),武汉三鹰生物技术有限公司;酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒人源cGAMP、鼠源cGAMP(批号分别为J11293-B、J31034-B),江苏晶美生物科技有限公司;ELISA试剂盒人源 β 干扰素(IFN- β)、鼠源IFN- β (批号分别为SU-B10026、SU-B20334),泉州市科诺迪生物科技有限公司;免疫组化cGAS抗体、p-STING抗体(批号分别为TA7416、PQA3430),上海艾比玛特医药科技有限公司;异氟烷麻醉剂(批号:R510-22-10),深圳瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.1.4 主要仪器 -80 °C超低温冰箱(型号:TSX40086FA),美国Thermo Fisher Scientific公司;超净工作台、二氧化碳培养箱(型号分别为AC2-4S1-

TC、CLM-170B-8-CN),新加坡ESCO公司;酶标仪(型号:Synergy H1),美国BioTek公司;荧光显微镜(型号:Axioscope 5),德国ZEISS公司;NanoDrop微量分光光度计(型号:840-317500),美国Thermo Fisher Scientific公司;电泳/转膜仪、ChemiDoc MP成像系统(型号分别为1658033、12003154),美国Bio-Rad公司;超声破碎仪(型号:WM-1000T),上海微弥科技有限公司。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞培养 制备细胞完全培养基:Huh7细胞和Hepa1-6细胞用含有10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素的DMEM完全培养基培养;THP-1细胞用含有10%胎牛血清和1% β -巯基乙醇的RPMI-1640完全培养基培养;RAW264.7细胞用含有10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基培养。将冻存的细胞株放于37 °C的水浴中复苏后,离心并去除冻存液,将细胞接种于完全培养基中,置于37 °C、体积分数5% CO₂条件的细胞培养箱培养。当细胞在培养瓶中的覆盖率达80%时,用预冷PBS缓冲液润洗,用胰酶消化,终止消化后按1:2比例传代。将生长状态良好的细胞转移至培养板中,用于后续的实验研究。

1.2.2 细胞分组 ①华蟾素的主要活性成分对肝癌细胞活力检测实验:Huh7细胞和Hepa1-6细胞各分为31组,分别为对照组、BUF(10⁻² nmol/L)组、BUF(10⁻¹ nmol/L)组、BUF(10⁰ nmol/L)组、BUF(10¹ nmol/L)组、BUF(10² nmol/L)组、BUF(10³ nmol/L)组;CBG(10⁻² nmol/L)组、CBG(10⁻¹ nmol/L)组、CBG(10⁰ nmol/L)组、CBG(10¹ nmol/L)组、CBG(10² nmol/L)组、CBG(10³ nmol/L)组;BFTL(10⁻² nmol/L)组、BFTL(10⁻¹ nmol/L)组、BFTL(10⁰ nmol/L)组、BFTL(10¹ nmol/L)组、BFTL(10² nmol/L)组、BFTL(10³ nmol/L)组;CBFL(10⁻² nmol/L)组、CBFL(10⁻¹ nmol/L)组、CBFL(10⁰ nmol/L)组、CBFL(10¹ nmol/L)组、CBFL(10² nmol/L)组、CBFL(10³ nmol/L)组;RBF(10⁻² nmol/L)组、RBF(10⁻¹ nmol/L)组、RBF(10⁰ nmol/L)组、RBF(10¹ nmol/L)组、RBF(10² nmol/L)组、RBF(10³ nmol/L)组。②华蟾素的主要活性成分对肝癌细胞DNA断裂检测实验:Huh7细胞和Hepa1-6细胞各分为6组,分别为对照组、BUF(10⁻¹ nmol/L)组、CBG(10⁻¹ nmol/L)组、BFTL(10⁻¹ nmol/L)组、CBFL(10⁻¹ nmol/L)组、RBF(10⁻¹ nmol/L)组。③华蟾素的主要活性成分对巨噬

细胞内 cGAS-STING 信号通路检测实验: Huh7 细胞和 Hepa1-6 细胞各分为 5 组, 分别为对照组、BUF (10^{-1} nmol/L) 组、CBG (10^{-1} nmol/L) 组、BFTL (10^{-1} nmol/L) 组、CBFL (10^{-1} nmol/L) 组。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 CCK-8 法检测细胞活力 Huh7 细胞和 Hepa1-6 细胞以 3 000 个/孔接种于 96 孔板, 用不同浓度 (0 、 10^{-2} 、 10^{-1} 、 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 nmol/L) 的 BUF、CBG、BFTL、CBFL、RFBG 完全培养基培养 24 h, 每组 3 个复孔。加入 10% CCK-8 溶液, 避光孵育 4 h, 使用酶标仪测定 450 nm 光下的光密度 (OD) 值。使用 GraphPad Prism 软件计算半抑制浓度 (IC_{50}) 并进行统计学分析。

1.2.3.2 彗星实验检测 DNA 断裂 熔融状态的琼脂糖均匀铺到载玻片上, 制备琼脂糖基层。吸取 10 μ L 对照组、BUF (10^{-1} nmol/L) 组、CBG (10^{-1} nmol/L) 组、BFTL (10^{-1} nmol/L) 组、CBFL (10^{-1} nmol/L) 组、RFBG (10^{-1} nmol/L) 组的肿瘤细胞悬液 (10^5 个/mL) 滴加至琼脂糖基层表面。4 $^{\circ}$ C, 碱性条件下细胞裂解 30 min, 电泳分离 30 min。干燥玻片, 加入 DNA 染色剂, 室温孵育 15 min。使用荧光显微镜观察 DNA 拖尾状况, 并用 PS 软件统计分析。

1.2.3.3 免疫荧光 (IF) 实验检测 γ -H2AX 蛋白表达 按照 DNA 损伤检测试剂盒 (免疫荧光法) 的说明书步骤, Huh7 细胞和 Hepa1-6 细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% 曲拉通 X (Triton X)-100 透化 15 min, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 1 h, γ -H2AX 抗体 (1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗 (1:500) 避光孵育 1 h, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 复染核 15 min。荧光显微镜下观察。

1.2.3.4 Western blot 实验检测相关蛋白表达水平

6 孔板中的 Huh7 细胞、Hepa1-6 细胞、THP-1 细胞和 RAW264.7 细胞弃上清, 用 PBS 洗 2 遍, 放置于冰上, 加入 RIPA 细胞裂解液裂解 15 min, 用细胞刮刀刮下细胞, 离心收集蛋白, 用 BCA 法定量。取 10 μ L 蛋白在 10% 的十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 30 min, 电压为 220 V; 转膜至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 50 min, 电流为 400 mA。山羊血清作为封闭液, 在摇床上室温封闭 2 h。分别使用 γ -H2AX 抗体、cGAS 抗体、STING 抗体、p-STING 抗体、TBK1 抗体、p-TBK1 抗体、IRF-3 抗体、p-IRF-3 抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 含 Tween 20 的 Tris 缓冲液 (TBST) 洗膜后二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。

ECL 化学发光法显影, 化学发光成像系统检测目标条带灰度值。

1.2.3.5 ELISA 实验检测 cGAMP、IFN- β 蛋白分泌水平 按照 ELISA 试剂盒的说明书步骤, 将 BUF、CBG、BFTL、CBFL 处理后的 THP-1 细胞和 RAW264.7 细胞冰浴, 使用超声破碎仪 (功率 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次) 裂解细胞以检测 cGAMP 蛋白分泌水平; 收集 BUF、CBG、BFTL 和 CBFL 处理后 THP-1 细胞和 RAW264.7 细胞的上清液以检测 IFN- β 蛋白分泌水平。收集上述样本后, 加入包被抗原的 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。润洗 3 次后, 加入底物, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。终止反应后, 使用酶标仪测 450 nm 光下的 OD 值, 得出标准曲线, 计算出样本中 cGAMP、IFN- β 的含量, 进行统计学分析。

1.3 动物实验

1.3.1 分组与造模 采用 Hepa1-6 细胞系, 制备浓度为 5×10^7 个/mL 的单细胞悬液, 实验动物经异氟烷麻醉后, 正中开腹暴露肝叶, 使用微量注射器将 1×10^6 个肿瘤细胞精准注入肝包膜下。建模后第 4 天, 随机将动物分为 5 组 ($n=5$): BUF 组、CBG 组、BFTL 组、CBFL 组和对照组 (0.9% 氯化钠溶液)。

1.3.2 干预 各组动物每日腹腔注射 BUF (1 mg/kg)、CBG (1 mg/kg)、BFTL (1 mg/kg)、CBFL (1 mg/kg) 或 0.9% 氯化钠溶液, 连续干预 14 d, 其间系统记录生存状态。实验终点时, 所有动物眼眶采血后安乐死, 完整取出肝脏及肿瘤组织, 拍摄照片, 记录参数, 随机选取部分肿瘤组织经 4% 多聚甲醛溶液固定, 剩余组织液氮速冻后转移至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冷冻保存。

1.3.3 检测指标与方法

1.3.3.1 一般情况 记录小鼠肝脏及肿瘤组织的质量, 采用卡尺记录肿瘤组织的长径 (L) 和横径 (W), 依据公式计算肿瘤体积 ($V=0.5 \times L \times W^2$)。

1.3.3.2 免疫组织化学 (IHC) 实验检测 cGAS、p-STING 蛋白表达水平 样本用 4% 多聚甲醛溶液固定组织, 经过石蜡包埋、切片、脱蜡、脱水处理, 抗原表位修复后, 5% BSA 封闭, cGAS 抗体、p-STING 抗体 (1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后, HRP 标记二抗 (1:500) 室温孵育; 加入二氨基联苯胺显色剂显色, 中性树脂胶封片。显微镜下观察。

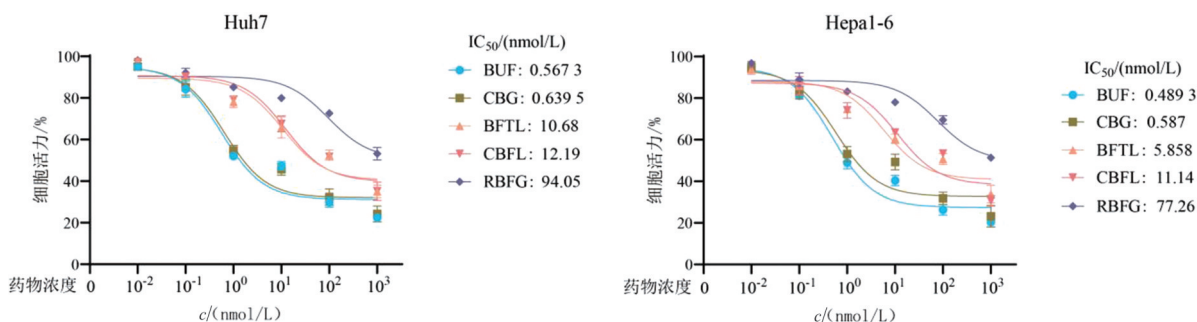
1.4 统计学方法 本研究运用 SPSS 25.0 与 GraphPad Prism 9 软件开展数据分析。对于满足正态性要求的连续性变量, 采用 $\bar{x} \pm s$ 进行数据表征。

在组间比较中,双样本数据经正态检验后选用 *t* 检验进行差异验证;针对多组别数据在满足正态性及方差齐性条件时,则通过单因素 ANOVA 模型实施多重比较。所有假设检验均采用双侧验证模式,当 $P < 0.05$ 时,判定差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞实验结果

2.1.1 华蟾素的主要活性成分抑制肝癌细胞活力



注:Huh7为人肝癌细胞株,Hepa1-6为小鼠肝癌细胞株,IC₅₀为半抑制浓度,BUF为蟾毒灵,CBG为华蟾毒精,BFTL为蟾毒它灵,CBFL为华蟾毒它灵,RBFG为脂蟾蜍配基。 $n=3, \bar{x} \pm s$ 。

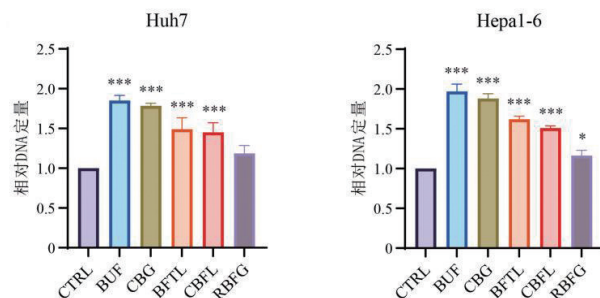
图1 不同浓度的BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG对Huh7和Hepa1-6细胞增殖活力的影响

2.1.2 华蟾素的主要活性成分促进肝癌细胞 DNA 断裂 为评价华蟾素的主要活性成分对肿瘤细胞内DNA的损伤作用,选取低于IC₅₀剂量(10⁻¹ nmol/L)的BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG,分别作用于Huh7和Hepa1-6细胞。24 h后,应用荧光试剂盒检测细胞上清液中dsDNA的水平。结果发现,与对照组相比,BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG能够促进肿瘤细胞释放dsDNA,差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.001$),见图2。同样彗星实验结果也显示,对照组没有出现“彗尾”,而各用药组中细胞则显著出现“彗尾”,表明华蟾素的主要活性成分能够引起细胞内DNA断裂,且BUF、CBG、BFTL、CBFL具有显著性差异($P < 0.001$),见图3A、B。

2.1.3 华蟾素的主要活性成分促进 γ -H2AX 的表达 免疫荧光检测发现,10⁻¹ nmol/L的BUF、CBG、BFTL、CBFL能够显著促进 γ -H2AX 的表达($P < 0.001$),且BUF的作用下, γ -H2AX 的表达最强,见图4A、B。Western blot也显示,BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG能够显著增加肿瘤细胞内 γ -H2AX 表达水平($P < 0.05, P < 0.001$),见图5A、B。这些结果表明,华蟾素的主要成分,特别是BUF、CBG、BFTL、CBFL能够有效促进 γ -H2AX 的表达。

2.1.4 华蟾素的主要活性成分通过损伤DNA激活巨噬细胞内cGAS-STING信号通路 检测华蟾素的

通过CCK-8实验评估华蟾素的主要活性成分对肝癌细胞Huh7、小鼠肝癌细胞Hepa1-6的活力影响。结果表明,BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG能够以剂量依赖的方式抑制肝癌细胞活力,IC₅₀分别是0.567 3 nmol/L、0.639 5 nmol/L、10.68 nmol/L、12.19 nmol/L、94.05 nmol/L(Huh7);0.489 3 nmol/L、0.587 nmol/L、5.858 nmol/L、11.14 nmol/L、77.26 nmol/L(Hepa1-6),见图1。

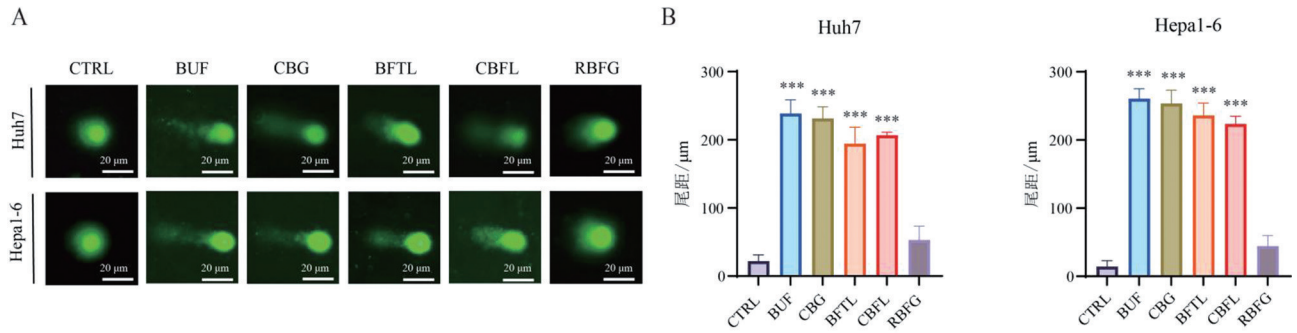


注:Huh7为人肝癌细胞株,Hepa1-6为小鼠肝癌细胞株。CTRL为对照,BUF为蟾毒灵,CBG为华蟾毒精,BFTL为蟾毒它灵,CBFL为华蟾毒它灵,RBFG为脂蟾蜍配基。与CTRL比较,* $P < 0.05, ***P < 0.001; n=3, \bar{x} \pm s$ 。

图2 BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG处理Huh7和Hepa1-6细胞上清液的dsDNA含量

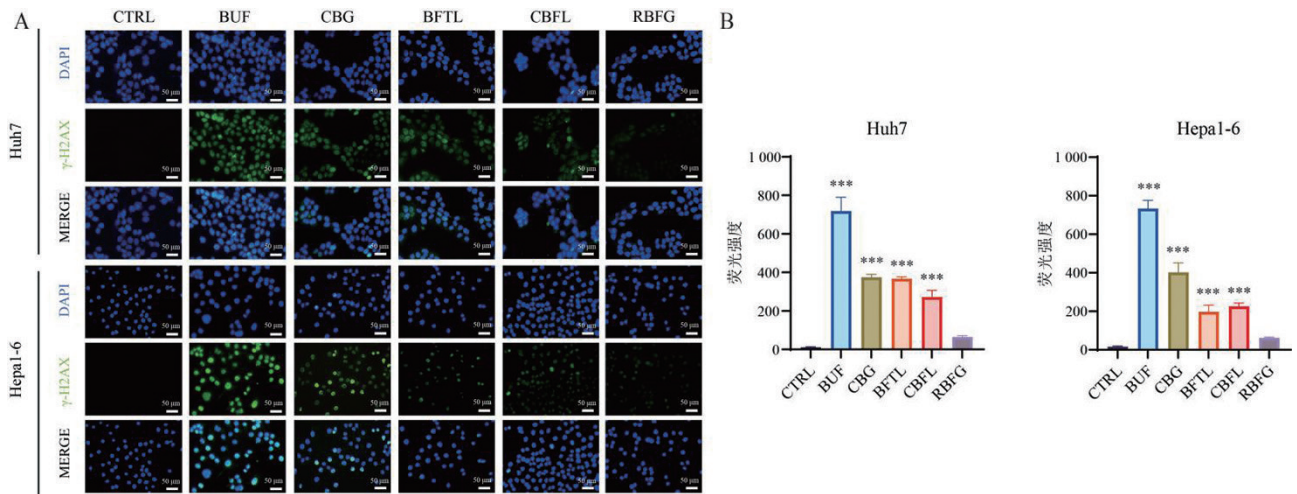
主要活性成分引起肿瘤细胞释放损伤的DNA对巨噬细胞内cGAS-STING信号通路的调控作用。将上述各处理组中的肿瘤培养上清液分别与巨噬细胞THP-1和RAW264.7共培养,应用Western blot方法检测细胞内cGAS-STING信号通路中各个蛋白分子的表达水平。结果显示,与对照组相比,BUF、CBG、BFTL、CBFL处理的细胞上清液能够显著上调巨噬细胞cGAS-STING通路的蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),见图6A、B。

使用ELISA检测巨噬细胞内cGAMP和上清液中IFN- β 的表达水平。如图7所示,与对照组相比,



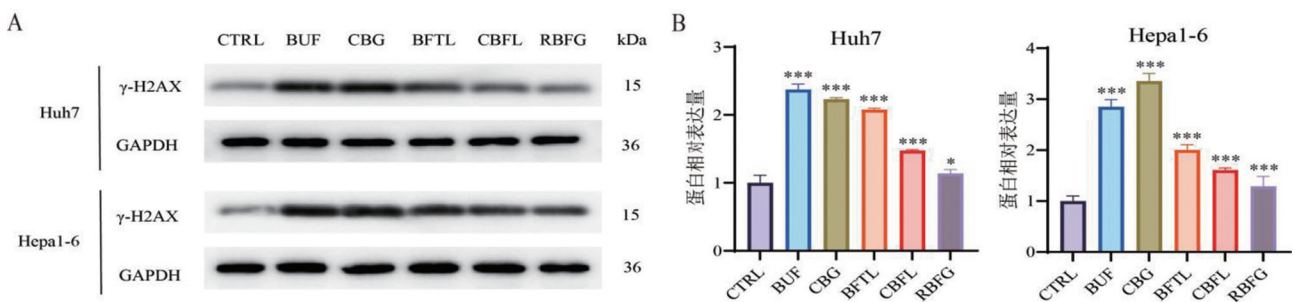
注:Huh7为人肝癌细胞株,Hepa1-6为小鼠肝癌细胞株,CTRL为对照,BUF为蟾毒灵,CBG为华蟾毒精,BFTL为蟾毒它灵,CBFL为华蟾毒它灵,RBFG为脂蟾蜍配基。A为彗星实验的代表性图像(标尺:20 μm),B为尾矩定量。与CTRL比较,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图3 BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG对Huh7和Hepa1-6细胞的彗星实验



注:Huh7为人肝癌细胞株,Hepa1-6为小鼠肝癌细胞株,DAPI为细胞核荧光染料染色细胞核的图像,γ-H2AX为磷酸化的组蛋白H2AX荧光染色的图像,MERGE为γ-H2AX和DAPI合并后的图像,CTRL为对照,BUF为蟾毒灵,CBG为华蟾毒精,BFTL为蟾毒它灵,CBFL为华蟾毒它灵,RBFG为脂蟾蜍配基。A为免疫荧光染色图($\times 200$),B为荧光强度比较。与CTRL比较,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图4 BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG对Huh7和Hepa1-6细胞γ-H2AX表达的影响



注:Huh7为人肝癌细胞株,Hepa1-6为小鼠肝癌细胞株。γ-H2AX为磷酸化的组蛋白H2A,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。CTRL为对照,BUF为蟾毒灵,CBG为华蟾毒精,BFTL为蟾毒它灵,CBFL为华蟾毒它灵,RBFG为脂蟾蜍配基。A为各组细胞的蛋白条带,B为各组细胞的蛋白相对表达量。与CTRL比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

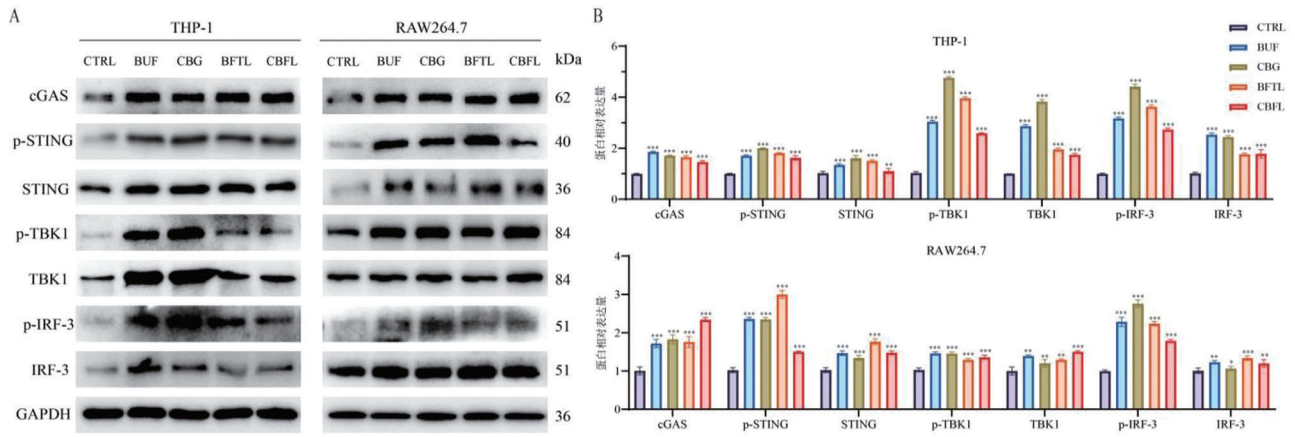
图5 BUF、CBG、BFTL、CBFL、RBFG对Huh7和Hepa1-6细胞γ-H2AX蛋白表达的影响

BUF、CBG、BFTL、CBFL处理后的cGAMP和IFN-β的水平显著增加($P < 0.001$),说明BUF、CBG、BFTL、CBFL能够诱导巨噬细胞中cGAS-STING信号通路活化,释放IFN-β,发挥抗肿瘤作用。以上数据表明,BUF、CBG、BFTL、CBFL诱导的肿瘤细胞释放的

损伤DNA能够显著激活巨噬细胞内cGAS-STING信号通路,引起生物学效应。

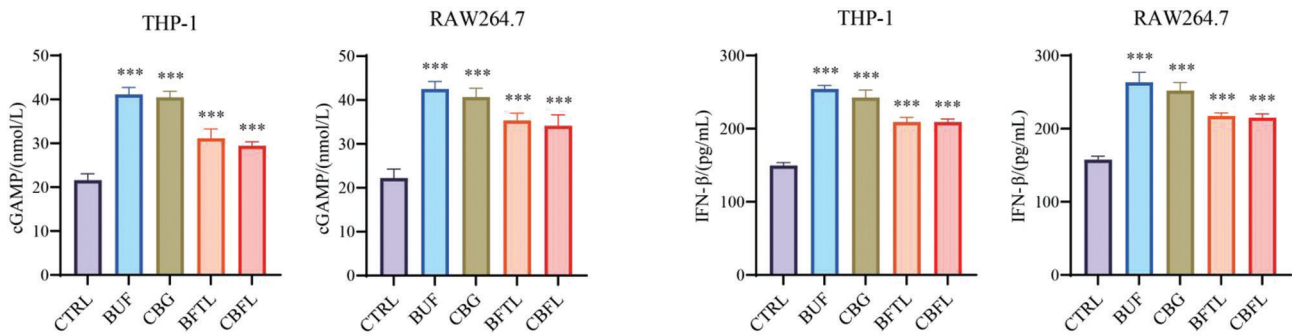
2.2 动物实验结果

2.2.1 华蟾素的主要活性成分抑制小鼠肝癌生长 为了验证华蟾素的主要活性成分的抗肝癌免疫调控



注:THP-1 为人单核细胞株,RAW264.7 为小鼠巨噬细胞株。CTRL 为对照,BUF 为蟾毒灵,CBG 为华蟾毒精,BFTL 为蟾毒它灵,CBFL 为华蟾毒它灵。cGAS 为环磷酸鸟苷-腺苷合成酶,p-STING 为磷酸化的干扰素基因刺激蛋白,STING 为干扰素基因刺激蛋白,p-TBK1 为磷酸化的 TANK 结合激酶 1,TBK1 为 TANK 结合激酶 1,p-IRF-3 为磷酸化的触发干扰素调节因子 3,IRF-3 为触发干扰素调节因子 3,GADPH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A 为各细胞株的蛋白条带,B 为各细胞株的蛋白相对表达量。与 CTRL 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图 6 巨噬细胞 THP-1 和 RAW264.7 中 cGAS-STING 信号通路相关蛋白表达



注:THP-1 为人单核细胞株,RAW264.7 为小鼠巨噬细胞株。cGAMP 为环鸟苷酸-腺苷酸,IFN- β 为 β 干扰素。CTRL 为对照,BUF 为蟾毒灵,CBG 为华蟾毒精,BFTL 为蟾毒它灵,CBFL 为华蟾毒它灵。与 CTRL 比较,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图 7 巨噬细胞中 cGAMP 和 IFN- β 水平

机制,在图 8A 小鼠原位肝癌模型中,分别腹腔给予 BUF、CBG、BFTL、CBFL 或 0.9% 氯化钠溶液治疗,14 d 后收集肝脏标本,检测肿瘤生长情况,见图 8B。结果发现,BUF、CBG、BFTL、CBFL 均能够显著降低肿瘤的质量和体积($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),见图 8C、D,表明 BUF、CBG、BFTL、CBFL 能够有效抑制肿瘤生长。

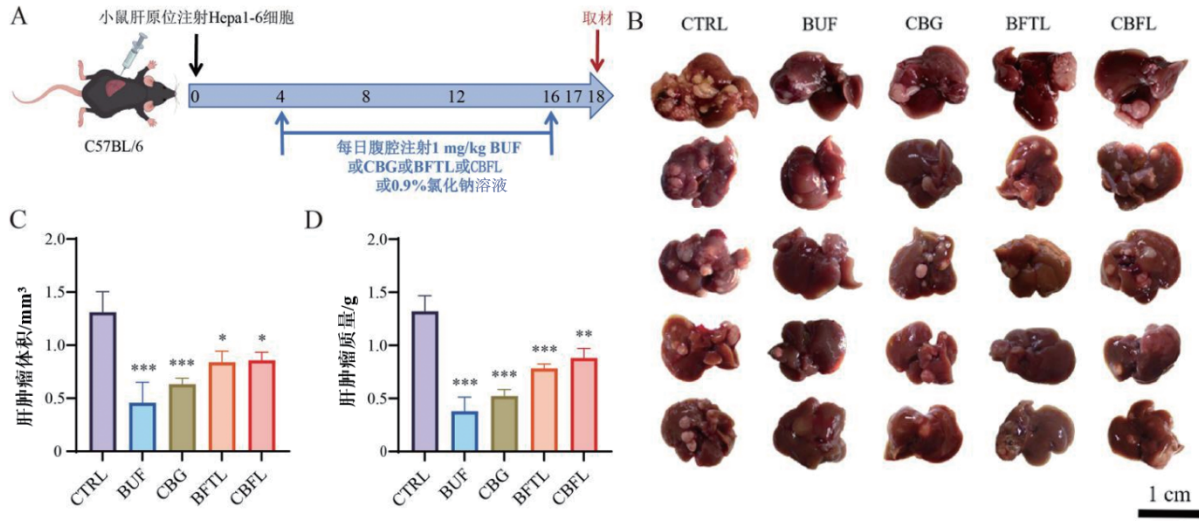
2.2.2 华蟾素的主要活性成分激活 cGAS-STING 信号通路 收集各处理组的肿瘤组织,应用 IHC 法检测 cGAS-STING 信号通路的活性。如图所示,BUF、CBG、BFTL、CBFL 治疗能上调小鼠肿瘤组织中的 cGAS 和 p-STING 的表达,见图 9。同时,ELISA 检测显示 BUF、CBG、BFTL、CBFL 组 IFN- β 表达水平显著增加($P < 0.001$),见图 10。由此表明,华蟾素的主要活性成分能够激活 cGAS-STING 信号通路,值得注意的是,BUF 对 cGAS-STING 信号通路的激活最强

烈。综上所述,BUF、CBG、BFTL、CBFL 通过诱导肿瘤细胞损伤释放 dsDNA,激活 cGAS-STING 信号通路,从而介导抗肿瘤免疫效应,抑制肿瘤生长。

3 讨论

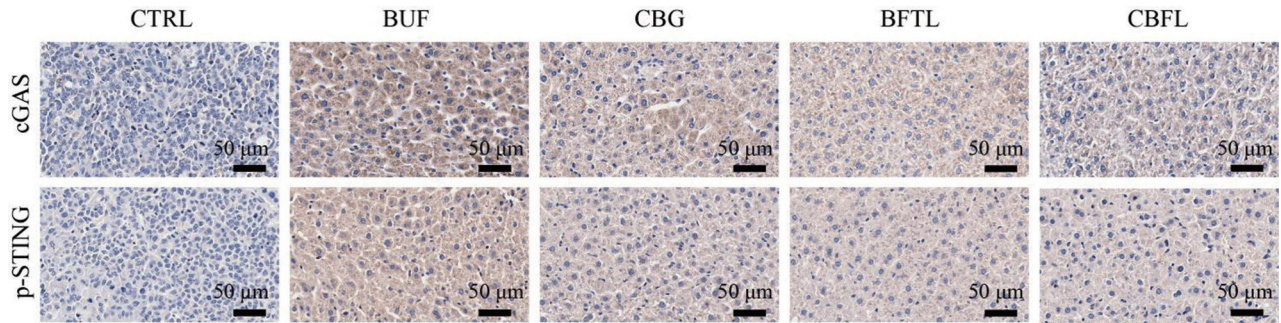
肝癌是常见的恶性肿瘤,可供选择的治疗方法有限。常用的化疗药物由于毒副作用以及容易产生耐药性而治疗效果不佳^[16]。新出现的靶向药物虽然可以延长部分患者的生存时间,但是长期使用引起的边际效应降低了药物的治疗效果^[17]。免疫检查点抑制剂的应用开创了肿瘤免疫治疗的模式,但是肝癌特有的免疫抑制微环境使得绝大多数患者对此类药物的应答较低,从而限制了治疗效果。因此,改善肿瘤微环境的免疫特性成为治疗肝癌的策略之一。

中药华蟾素具有细胞毒性,能够直接杀伤肿瘤细胞而用于临床肝癌治疗^[18],但具体机制还不清



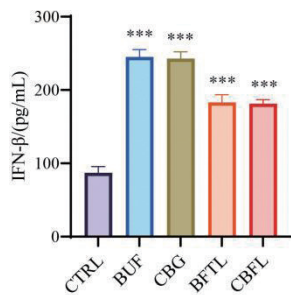
注: C57BL/6 为小鼠类型。A 为小鼠原位肝华蟾素的主要活性成分癌模型的造模方式, B 为不同治疗方法后小鼠肿瘤大小的直观图, C 为荷瘤小鼠的肝肿瘤体积统计学比较, D 为荷瘤小鼠的肿瘤质量统计学比较。CTRL 为对照, BUF 为蟾毒灵, CBG 为华蟾毒精, BFTL 为蟾毒它灵, CBFL 为华蟾毒它灵。与 CTRL 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。n=5, $\bar{x} \pm s$ 。

图 8 小鼠原位肝华蟾素的主要活性成分癌模型造模及成瘤情况



注: CTRL 为对照, BUF 为蟾毒灵, CBG 为华蟾毒精, BFTL 为蟾毒它灵, CBFL 为华蟾毒它灵, cGAS 为环磷酸鸟苷-腺苷合成酶, p-STING 为磷酸化干扰素基因刺激蛋白。

图 9 各组小鼠肝肿瘤组织中 cGAS、p-STING 的表达(免疫组织化学染色, $\times 40$)



注: IFN- β 为 β 干扰素, CTRL 为对照, BUF 为蟾毒灵, CBG 为华蟾毒精, BFTL 为蟾毒它灵, CBFL 为华蟾毒它灵。与 CTRL 比较, *** $P < 0.001$; n=5, $\bar{x} \pm s$ 。

图 10 各组小鼠肝肿瘤组织中 IFN- β 的水平

楚。cGAS 作为 DNA 感受器, 能够接收内源性和外源性 dsDNA, 刺激第二信使 cGAMP, 激活下游的 STING 信号通路, 触发 STING-TBK1-IRF-3 轴, 诱导 IFN- β 和促炎性细胞因子分泌, 激活抗肿瘤免疫应

答^[19]。而其他 DNA 损伤介导的抗癌策略, 如放射治疗、化疗直接引起 DNA 断裂, 通过细胞毒性杀伤肿瘤; PARP 抑制剂(如奥拉帕尼), 通过抑制碱基切除修复诱导合成致死效应, 依赖肿瘤细胞的同源重组缺陷^[20]。相比之下, cGAS-STING 通路能更好地整合 DNA 损伤应答与免疫激活, 通过重塑肿瘤免疫微环境发挥抗肿瘤作用^[21]。尽管已经证明 cGAS-STING 信号通路参与肿瘤免疫反应, 但是其具体的调控作用还不清楚。

本研究证实, 华蟾素的主要活性成分——BUF、CBG、BFTL、CBFL 通过诱导肝癌细胞内 DNA 损伤, 使维持细胞 DNA 稳定的重要分子组蛋白 H2AX 磷酸化^[22-23], 释放断裂的 dsDNA, 识别和结合巨噬细胞内 cGAS 分子, 激活 cGAS-STING 信号通路, 促进 IFN- β 的分泌, 从而发挥抗肝癌免疫治疗作用。结

果发现, RFBG 对肝癌细胞活力的抑制作用显著弱于其他活性成分, 可能是由于 RFBG 分子结构的特异性, RFBG C14-C15 位有环氧基结构, 环氧基的存在使其分子构象更紧凑, 与 DNA 结合的亲和力较弱^[12]。本研究结果表明, 华蟾素的主要活性成分在低浓度时, 通过调节免疫反应激发抗肿瘤作用; 而其他研究^[24]显示, 华蟾素高剂量或长期使用, 反而可能因毒性代谢物累积加重肝肾负担、增加心律失常风险、引发消化道出血等不良反应。因此, 低剂量使用华蟾素, 通过激活免疫系统抑制肿瘤, 有望突破传统治疗的瓶颈, 实现更持久的抗肿瘤效果。

另外, 其他实验研究^[25]证实, 放射治疗会激活 cGAS-STING 信号通路, 促进人和小鼠肝癌细胞程序性死亡配体-1(PD-L1) 的表达, 增加肿瘤细胞对免疫检查点抑制剂的敏感性。本研究证实华蟾素的各主要活性成分能够通过促进损伤的肿瘤细胞释放 dsDNA, 激活 cGAS-STING 信号通路, 具有调控 PD-L1 表达的潜能, 预示华蟾素与抗 PD-L1 抗体联合应用, 能够提高抗 PD-L1 的治疗效果, 减少耐受性的增加, 延长治疗效果。相关的假设后续会做进一步的研究证实。

总之, 本研究探索了蟾毒灵抗肝癌的免疫调控机制, 揭示了 BUF、CBG、BFTL、CBFL 通过激活 cGAS-STING 信号通路发挥抗肝癌免疫应答的调控过程, 为肝癌的免疫治疗提供了新的策略。

参考文献:

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [3] RUF B, HEINRICH B, GRETEN T F. Immunobiology and immunotherapy of HCC: spotlight on innate and innate-like immune cells[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(1): 112-127.
- [4] MA M, JIANG W, ZHOU R. DAMPs and DAMP-sensing receptors in inflammation and diseases[J]. Immunity, 2024, 57(4): 752-771.
- [5] SAMSON N, ABLASSER A. The cGAS-STING pathway and cancer[J]. Nat Cancer, 2022, 3(12): 1452-1463.
- [6] LU C, RONG D, ZHANG B, et al. Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 130.
- [7] ZHENG J, MO J, ZHU T, et al. Comprehensive elaboration of the cGAS-STING signaling axis in cancer development and immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 133.
- [8] WU J, TANG G, CHENG C S, et al. Traditional Chinese medicine for the treatment of cancers of hepatobiliary system: from clinical evidence to drug discovery[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 218.
- [9] WU J, ZHANG D, NI M, et al. Effectiveness of Huachansu injection combined with chemotherapy for treatment of gastric cancer in China: a systematic review and Meta-analysis [J]. J Tradit Chin Med, 2020, 40(5): 749-757.
- [10] YANG T, WU C, LI P, et al. Efficacy and safety of Huachansu as an adjuvant therapy for non-small cell lung cancer: An overview of systematic reviews and Meta-analyses [J]. Integr Cancer Ther, 2024, 23: 15347354241237234.
- [11] QI F, LI A, INAGAKI Y, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(3): 342-349.
- [12] QI J, ZULFIKER A H M, LI C, et al. The development of toad toxins as potential therapeutic agents[J]. Toxins (Basel), 2018, 10(8): 336.
- [13] 孟昭阳, 赵娟, 朱琴芳, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨华蟾素注射液抗结直肠癌的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(17): 4755-4767.
- [14] 姜怡, 吴立波, 沈丽萍, 等. 中医综合维持治疗方案对晚期非小细胞肺癌患者血清中可溶性细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 的影响及其与预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(10): 757-762.
- [15] YANG A, WU Q, CHEN Q, et al. Cinobufagin restrains the growth and triggers DNA damage of human hepatocellular carcinoma cells via proteasome-dependent degradation of thymidylate synthase [J]. Chem Biol Interact, 2022, 360: 109938.
- [16] HUANG A, YANG X R, CHUNG W Y, et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 146.
- [17] FULGENZI C A M, CHEON J, D'ALESSIO A, et al. Reproducible safety and efficacy of atezolizumab plus bevacizumab for HCC in clinical practice: Results of the AB-real study[J]. Eur J Cancer, 2022, 175: 204-213.
- [18] YANG T, SHI R, CHANG L, et al. Huachansu suppresses human bladder cancer cell growth through the Fas/FasL and TNF-alpha/TNFR1 pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1): 21.
- [19] CARUSILLO A, MUSSOLINO C. DNA damage: from threat to treatment[J]. Cells, 2020, 9(7): 1665.
- [20] SHEN D, LUO J, CHEN L, et al. PARPi treatment enhances radiotherapy-induced ferroptosis and antitumor immune responses via the cGAS signaling pathway in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2022, 550: 215919.
- [21] MINCHOM A, AVERSA C, LOPEZ J. Dancing with the DNA

- damage response: next-generation anti-cancer therapeutic strategies [J]. Ther Adv Med Oncol, 2018, 10: 1758835918786658.
- [22] DU S, CHEN G, YUAN B, et al. DNA sensing and associated type 1 interferon signaling contributes to progression of radiation-induced liver injury[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(7): 1718-1728.
- [23] KUO L J, YANG L X. Gamma-H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks[J]. In Vivo, 2008, 22(3): 305-309.
- [24] CHENG C S, WANG J, CHEN J, et al. New therapeutic aspects of steroidal cardiac glycosides: the anticancer properties of Huachansu and its main active constituent Bufalin [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 92.
- [25] DU S S, CHEN G W, YANG P, et al. Radiation therapy promotes hepatocellular carcinoma immune cloaking via PD-L1 upregulation induced by cGAS-STING activation[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2022, 112(5): 1243-1255.

编辑:季春来

收稿日期:2025-05-06

