基于焦亡途径探索华蟾素调控肿瘤免疫应答的作用机制研究

吴慕云，张道荣，韩翠云，梅劲松，黄 刚，桂淑娟，龚 平*

安徽省皖南康复医院（芜湖市第五人民医院）肿瘤内科 安徽芜湖

【摘要】**目的** 明确华蟾素协同程序性死亡受体 1（PD-1）抑制剂调控肝癌肿瘤免疫应答的候选靶点，探究细胞焦亡通路抗肿瘤免疫潜在分子机制。**方法** 整合 TCGA-LIHC、GSE39791、GSE84402 三套肝癌转录组数据，筛选焦亡相关差异表达基因，结合 CTD 数据库匹配华蟾素作用候选靶点；体外以 THP-1 来源巨噬细胞、人外周血单个核细胞为模型，设置对照、单药及联合用药组，检测巨噬细胞极化、免疫抑制分子表达及免疫细胞功能。**结果** 获得 4 个华蟾素调控焦亡通路的候选基因 H2AX、HSP90AB1、TXNIP、TNF；多数据集验证提示 H2AX、HSP90AB1 在肝癌组织中均显著高表达，KEGG 富集显示候选基因主要富集于坏死性凋亡、白细胞介素-17（IL-17）等炎症免疫相关通路；体外实验证实华蟾素联合纳武利尤单抗显著促进 M1 型巨噬细胞极化、抑制 M2 型极化，下调巨噬细胞表面 CD155、PD-L1、Galectin-9 免疫抑制配体，调控 PBMC 细胞因子 mRNA 表达，且不损伤 PBMC 细胞活力。**结论** 华蟾素联合 PD-1 抑制剂可靶向焦亡相关候选基因，重塑巨噬细胞极化平衡，改善肿瘤免疫抑制微环境，发挥协同抗肿瘤免疫效应，可为肝癌中西医结合免疫治疗提供体外实验依据。

【关键词】华蟾素；PD-1 抑制剂；细胞焦亡；巨噬细胞极化；肝癌

【基金项目】芜湖市卫生健康委科研项目（WHWJ2023y067）

【收稿日期】2026 年 9 月 8 日 【出刊日期】2026 年 10 月 9 日 【DOI】10.12208/j.ijcr.20260511

Exploring the mechanisms of Cinobufagin in regulating tumor immune responses via the pyroptosis pathway

*Muyun Wu, Daorong Zhang, Cuiyun Han, Jinsong Mei, Gang Huang, Shujuan Gui, Ping Gong**

Department of Oncology, Anhui Wannan Rehabilitation Hospital (The Fifth People's Hospital of Wuhu), Wuhu, Anhui

【**Abstract**】**Objective** To identify candidate targets through which Cinobufagin synergizes with Programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitors to regulate tumor immune responses in liver cancer, and to explore the potential molecular mechanisms underlying anti-tumor immunity mediated by the pyroptosis pathway. **Methods** Three liver cancer transcriptome datasets including TCGA-LIHC, GSE39791 and GSE84402 were integrated to screen pyroptosis-related differentially expressed genes. The CTD database was used to match candidate targets of Cinobufagin. In vitro, THP-1-derived macrophages and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were applied as cell models. Control, monotherapy and combination groups were established to evaluate macrophage polarization, the expression of immunosuppressive molecules, and immune cell function. **Results** Four candidate genes (H2AX, HSP90AB1, TXNIP, and TNF) were identified as Cinobufagin targets involved in pyroptosis regulation. Validation across multiple datasets demonstrated that H2AX and HSP90AB1 were significantly overexpressed in liver cancer tissues. KEGG enrichment analysis revealed that these candidate genes were mainly enriched in inflammation- and immune-related pathways, such as necroptosis and Interleukin-17 (IL-17) signaling. In vitro experiments confirmed that the combination of Cinobufagin and nivolumab markedly promoted M1 macrophage polarization, suppressed M2 macrophage polarization, downregulated immunosuppressive ligands CD155, PD-L1, and Galectin-9 on macrophage surfaces, modulated the mRNA expression of cytokines in PBMCs, without impairing PBMC viability. **Conclusion** Cinobufagin combined with PD-1 inhibitors can target pyroptosis-related candidate genes, restore the balance of macrophage polarization, remodel the tumor immunosuppressive microenvironment, and exert synergistic anti-tumor immune effects. This study provides in vitro experimental evidence for integrated traditional Chinese and Western immunotherapy against liver cancer.

*通讯作者：龚平

【**Keywords**】Cinobufagin; PD-1 inhibitors; Pyroptosis; Macrophage polarization; Liver cancer

肝癌是发病率、死亡率均较高的恶性肿瘤[1]。免疫检查点抑制剂为肝癌治疗带来突破，但存在耐药性。细胞焦亡对肿瘤免疫微环境具有双向调控作用，是肿瘤联合治疗极具潜力的干预靶点。华蟾素来源于中药蟾酥，具有免疫调节、抗炎等药理活性，已广泛用于多种肿瘤的辅助治疗[2]。本研究以细胞焦亡通路为切入点，整合生物信息学、网络药理学及体外细胞实验，解析华蟾素联合 PD-1 抑制剂调控肝癌肿瘤免疫的候选靶点与作用机制，为中医药联合免疫检查点抑制剂治疗肝癌提供实验支撑。

1 资料与方法

1.1 一般资料

生物信息学分析数据取自 TCGA 数据库 LIHC 队列，包含 374 例肝癌和 50 例癌旁正常组织转录组数据；GEO 数据库 GSE39791（72 对配对组织）、GSE84402（14 对配对组织）作为独立验证队列。所有数据集均经过标准化处理。

1.2 方法

本研究通过生物信息学与网络药理学筛选靶点：利用 R 语言 limma 包分析 TCGA-LIHC 数据集，以 |log2FC|>0.58、P<0.05 筛选差异表达基因，结合 GeneCards 数据库相关性评分>1 的焦亡基因取交集，获得焦亡相关差异基因。通过 STRING 数据库构建阈值 0.400 的蛋白互作网络，借助 Cytoscape 3.7.0 软件四种算法筛选核心基因；整合 CTD 数据库华蟾素作用靶点，交集得到候选基因，采用 clusterProfiler 包开展 P<0.05 的 GO、KEGG 富集分析并构建靶点-通路网络。细胞实验中，THP-1 细胞于专用培养基常规培养，经 100ng/mL 佛波酯诱导分化为 M0 巨噬细胞，分别以 γ-干扰素（IFN-γ）、IL-4 诱导 M1、M2 极化，设置空白、极化模型及单药、联合用药共 9 组巨噬细胞处理体系，另设置 4 组人外周血单个核细胞给药体系。实验采用免疫荧光检测巨噬细胞 CD86、CD206 阳性表达；流式细胞术检测细胞表面 PD-L1 等分子表达；实时荧光定量聚合酶链反应（qPCR）以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参，通过 2^（-Δ Δ Ct）法检测基因相对表达；噻唑蓝（MTT）法于 490nm 波长检测细胞活力，综合验证药物调控作用。

1.3 观察指标

①焦亡相关候选靶点与通路经多数据集、网络药理学筛选得到华蟾素-焦亡通路候选基因，验证其在肝癌中的表达特征，解析相关信号通路。

②巨噬细胞表型检测 M1/M2 极化标志物、CD155、PD-L1、Galectin-9 免疫抑制配体表达变化。

③外周血免疫细胞效应检测 PBMC 活力及细胞因子基因 mRNA 表达水平。

1.4 统计学方法

实验采用 SPSS22.0 软件，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组比较行单因素方差分析，组间两两比较选用 LSD-t 检验；生物信息学分析采用 R 语言完成，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学差异基因筛选结果

TCGA-LIHC 得到 6811 个差异表达基因（3521 个表达上调、3290 个下调），与焦亡基因取交集得到 190 个细胞焦亡相关差异表达基因（PRDEGs）。将 PRDEGs 导入 STRING 构建 PPI 网络筛选核心基因 19 个（TNF、IL1B、HSP90AA1、IFNG、TLR4、CXCL8、MMP9、CASP1、HSP90AB1、SIRT1、TLR2、PTGS2、IL18、NLRP3、EZH2、ICAM1、H2AC20、H2AX、DNMT1）。TNF、IL1B、HSP90AA1 是网络关键节点，多数核心基因呈正相关，提示在焦亡调控中存在协同作用。

2.2 网络药理学候选基因与富集分析

CTD 的 39 个华蟾素靶点与 PRDEGs 交集得到 4 个候选基因：H2AX、HSP90AB1、TXNIP、TNF。PPI 网络提示，HSP90AB1、TXNIP、TNF 存在蛋白互作。相关性热图提示 TXNIP 与 H2AX、HSP90AB1 呈负相关，其余基因之间多为正相关。GO 富集提示候选基因主要富集于蛋白质定位到细胞表面的正调控等。KEGG 富集主要涉及坏死性凋亡、IL-17、TNF 等信号通路。研究结果显示：TNF 处于网络枢纽位置。TCGA-LIHC 中 H2AX、HSP90AB1 肝癌组织表达高于正常组织（P<0.001），TXNIP 在肝癌中表达下调（P<0.01），GSE39791、GSE84402 同样证实 H2AX、HSP90AB1 在肝癌中高表达，可作为后续重点验证靶点。

2.3 体外实验结果

本研究成功构建巨噬细胞极化模型。研究结果显示：华蟾素与纳武利尤单抗单用可促进 M1 极化、抑制 M2 极化，联合用药协同效果最优。流式检测表明，极化诱导可上调巨噬细胞 CD155、PD-L1、Galectin-9 免疫抑制配体，联合用药可显著下调其表达（P<0.01）。qPCR 验证联合用药可显著上调 M1 促炎基因、抑制

M2 抗炎基因（P<0.01）。药物处理对 PBMC 活力无明显损伤，无细胞毒性。此外，联合用药可显著调控外周免疫因子表达，有效增强机体抗肿瘤免疫应答。

3 讨论

3.1 肝癌焦亡通路异常与免疫微环境失衡

细胞焦亡是促炎程序性死亡，以细胞膜穿孔、促炎因子释放为特征，影响肿瘤微环境中的炎症稳态。本研究得到 190 个肝癌焦亡相关差异基因，PPI 网络显示 TNF、IL1B 等促炎因子处于核心位置，提示肝癌组织焦亡通路表达紊乱。过度持续的焦亡可释放大量炎症介质，招募免疫抑制细胞，推动巨噬细胞 M2 极化，构建免疫抑制微环境，该炎症正反馈环路是 PD-1 抑制剂原发耐药的重要诱因。调控焦亡通路，重建炎症-免疫平衡，是克服肝癌免疫抵抗的重要方向[3]。

3.2 华蟾素调控焦亡候选靶点分子基础

本研究筛选出 H2AX、HSP90AB1、TXNIP、TNF 四个候选靶点。H2AX 是 DNA 损伤应答关键分子，处在焦亡上游；HSP90AB1 为热休克分子伴侣蛋白，间接调控焦亡活化；TXNIP 感知氧化应激，衔接氧化代谢与焦亡；TNF 为上游核心促炎因子，介导多条免疫通路[4]。4 个基因分别从 DNA 损伤应答、分子伴侣、氧化应激感知、促炎信号层面构成华蟾素调控焦亡的多靶点网络；富集得到的坏死性凋亡等通路均参与肿瘤免疫微环境重塑。

3.3 联合用药重塑巨噬细胞极化的免疫机制

肿瘤相关巨噬细胞（TAMs）是肿瘤微环境占比最高的固有免疫细胞，M1/M2 极化格局决定微环境免疫状态[5]。本研究证实华蟾素联合纳武利尤单抗协同促进 M1、抑制 M2 极化。推测机制：华蟾素作用焦亡相关靶点，抑制炎症小体过度活化，减少 M2 极化驱动；纳武利尤单抗阻断 PD-1 通路，解除巨噬细胞对 T 细胞免疫抑制。二者联用同步下调 CD155、PD-L1、Galectin-9 多重抑制配体，实现多免疫检查点干预，相比单一通路阻断更有效地解除巨噬细胞介导的免疫抑制，为效应 T 细胞活化浸润创造条件[6]。

3.4 外周免疫活化及临床转化意义

外周免疫细胞活化水平可反映机体抗肿瘤免疫状态。MTT 证明联合方案对 PBMC 无直接毒性[7]；联合用药上调 Th1 因子、下调 Th2 因子，提升抗肿瘤免疫能力，为临床安全性提供依据。华蟾素作为多靶点中药制剂，与免疫检查点抑制剂存在机制互补，可弥补单药免疫治疗应答率低的短板[8]。本研究从焦亡通路角度解析中西药联合作用，为肝癌中西医结合免疫治疗提供候选靶点，有助于后续开发精准联合策略。

4 小结

本研究结合生物信息学与体外实验，于分子、细胞层面证实华蟾素联合 PD-1 抑制剂可调控 H2AX、HSP90AB1 等焦亡相关候选基因，重塑巨噬细胞 M1/M2 极化平衡，下调多重免疫抑制配体，活化外周免疫细胞，发挥协同抗肿瘤免疫效应。本研究揭示细胞焦亡通路参与介导华蟾素免疫调节作用，为肝癌中西医结合免疫治疗提供新思路。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] Zhang Y, Wang Y, Li Y, et al. Cinobufagin: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and clinical use[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114778.

[3] Tang R, Xu J, Zhang B, et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 110.

[4] 陈晓洁.基于 DNA 损伤探究华蟾素胶囊及华蟾毒他灵抑制三阴性乳腺癌增殖的机制研究[D].济南：山东中医药大学,2026.

[5] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444.

[6] Wang X, Wang Y, Zhang Y, et al. Traditional Chinese medicine and cancer immunity: the role of active ingredients in regulating tumor immune microenvironment[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 733137.

[7] Olaechea A, Camacho Rubio C, Gómez-Melero S. Current Insights into the Role of Peripheral Blood Immune Cell Phenotypes in Resistance to Cancer Therapies. Oncol Res. 2026;34(10):6.

[8] 李悦悦.华蟾素通过 SREBP1 信号通路调节脂质代谢影响巨噬细胞极化抑制肝癌进展[D]. 合肥:安徽中医药大学,2024.

版权声明：©2026 作者与开放获取期刊研究中心（OAJRC）所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
OPEN ACCESS