

## 基于网络药理学探讨清肝化瘀颗粒治疗肝癌的作用机制

曹建<sup>1</sup>, 朱晓燃<sup>2</sup>, 杨振寰<sup>2</sup>, 索菲娅<sup>2</sup>, 姚树坤<sup>1,2,3\*</sup>

1. 北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191

2. 北京中医药大学, 北京 100029

3. 中日友好医院 消化内科, 北京 100029

**摘要:** **目的** 探讨清肝化瘀颗粒治疗肝癌的有效成分、作用靶点及可能作用机制。**方法** 通过中药与疾病数据库, 运用网络药理学工具筛选清肝化瘀颗粒治疗肝癌的主要有效成分与作用靶点, 分析作用靶点的分子机制, 构建“中药-成分-靶点-疾病”关系网络。采用体内外实验验证清肝化瘀颗粒核心有效成分苦参碱对肝癌细胞学行为的作用, 并检测苦参碱对核心靶点及主要信号通路的调节作用。**结果** 共筛选出清肝化瘀颗粒治疗肝癌的潜在作用靶点 86 个, 富集分析结果显示作用靶点共涉及生物过程 20 种, 细胞组成 15 种, 分子功能 20 种, 以及信号通路 20 条。利用构建的“中药-成分-靶点-疾病”网络发现清肝化瘀颗粒主要通过槲皮素、木犀草素及苦参碱对肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 及 G<sub>1</sub>/S 期特异细胞周期蛋白 D1 (G<sub>1</sub>/S-specific cyclin D1, CCND1) 等核心靶点参与细胞凋亡及细胞自噬等与肝癌有关的肿瘤生物学行为发挥治疗肝癌的作用。体外实验发现, 清肝化瘀颗粒有效成分苦参碱以剂量相关的方式抑制肝癌细胞的增殖, 促进肝癌细胞凋亡, 并能调节肝癌细胞氧化应激胁迫标志物, 同时可对 TP53、VEGFA 及 CCND1 等核心靶点的表达量进行调节。肝癌荷瘤裸鼠实验发现苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 荷瘤裸鼠具有抑瘤作用, 并诱导肝癌细胞凋亡, 同时能调节线粒体自噬及线粒体分裂 2 种线粒体稳态调节过程相关蛋白的表达量。**结论** 清肝化瘀颗粒治疗肝癌的主要机制包括以槲皮素、木犀草素及苦参碱为代表的多成分, 以 TP53、VEGFA 及 CCND1 为代表的多靶点, 以细胞凋亡、线粒体稳态及氧化应激为代表的多通路调节的系统性、协同性作用。

**关键词:** 网络药理学; 清肝化瘀颗粒; 肝癌; 苦参碱; 分子机制; 槲皮素; 木犀草素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)07-2039-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.021

## An exploration on mechanisms of Qinggan Huayu Granule in treating liver cancer based on network pharmacology

CAO Jian<sup>1</sup>, ZHU Xiao-ran<sup>2</sup>, YANG Zhen-huan<sup>2</sup>, SUO Fei-ya<sup>2</sup>, YAO Shu-kun<sup>1,2,3</sup>

1. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the main active compounds, molecular target genes, and target signal pathways of Qinggan Huayu Granule (清肝化瘀颗粒) treating liver cancer. **Methods** Based on multiple traditional Chinese medicine and disease databases, the network pharmacology tool was used to screen the main active compounds and action targets of Qinggan Huayu Granule treating liver cancer, analyze the biological functions of potential targets, and construct a network of “herb-ingredient-target-disease”. The *in vitro* and *in vivo* experiment was used to verify the effect of matrine, the core component of Qinggan Huayu Granule, on cytological behaviors of liver cancer cells. The regulation of matrine on the candidate target protein was also detected. **Results** A total of 86 potential targets for the treatment of liver cancer were screened by traditional Chinese medicine and disease databases. Through enrichment analysis of potential targets, there were 20 biological processes, 15 cellular components, 20 molecular functions, and 20 signaling pathways were yielded. Using “herb-ingredient-target-disease” network, it was found that

收稿日期: 2020-08-13

基金项目: 北京市科委 G20 工程创新研究十病十药研发项目 (Z171100001717008)

作者简介: 曹建 (1990—), 男, 博士研究生, 主要研究方向为中药单体抗肿瘤机制。Tel: (010)84206160 E-mail: caojian120@163.com

\*通信作者: 姚树坤, 博士生导师, 主任医师, 主要从事中西医结合抗肝癌的基础与临床。E-mail: shukun\_yao@163.com

Qinggan Huayu Granule regulated the biological behaviors of tumors related to liver cancer, such as apoptosis and autophagy, by mainly targets tumor protein p53 (TP53), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), G1/S-specific cyclin-D1(CCND1), and other hub genes through quercetin, luteolin, matrine and other active ingredients. *In vitro* experiments revealed that matrine could inhibit cell proliferation, promote apoptosis, and modulate the levels of molecular markers of oxidative stress in a dose-dependent manner in liver cancer cell model. At the same time, matrine can regulate expression of TP53, VEGFA, and CCND1 in protein level. *In vivo* experiments showed that matrine had a tumor suppression effect on HepG2 xenograft tumors in nude mice, and induced apoptosis of liver cancer cells. Meanwhile, matrine regulated the expression in protein levels of mitophagy and mitochondrial fission related molecules. **Conclusion** The main mechanism of Qinggan Huayu Granule in treating liver cancer was related to systematic synergy effect of multiple compounds as represented by quercetin, luteolin and matrine, multiple targets as represented by TP53, VEGFA and CCND1, multiple signal pathways as presented by the regulation effects of apoptosis, mitochondrial homeostasis and oxidative stress.

**Key words:** network pharmacology; Qinggan Huayu Granule; liver cancer; matrine; molecular mechanism; quercetin; luteolin

肝癌目前已经成为世界范围内第 6 大常见癌症, 其致死率位居全球第 4<sup>[1]</sup>。我国是肝癌大国, 在全球肝癌的发病中, 肝癌的发病率为 46.6%, 病死率为 47.1%<sup>[2]</sup>。在我国肝癌的年龄标准化的 5 年生存率仅为 12.1%<sup>[3]</sup>, 因此, 我国的肝癌防治工作在全球肝癌的防治工作中占据举足轻重的位置。肝癌起病隐匿, 致死率高, 大多数患者在发现时已进展至中晚期, 其发病率与死亡率之比接近 1, 在全世界范围内造成了广泛的医疗负担与社会负担<sup>[4]</sup>。外科手术切除目前仍是肝癌患者的最佳治疗手段, 但是这种治疗手段对肝癌患者所处的分期与肝脏功能要求较高, 且受到远期疗效与复发风险的局限<sup>[5]</sup>。因此, 继续探索与研发有效的肝癌治疗策略很有必要。

随着我国中医药学的发展, 传统中医药参与对癌症临床治疗的各个阶段<sup>[6]</sup>, 发挥着减轻治疗手段的毒副作用、提高癌症治疗效果、延长癌症患者生存期、提高癌症患者治疗后生存质量等重要作用<sup>[7-8]</sup>。清肝化瘀颗粒是本课题组将多年肝癌临证经验总结的经验方, 由黄芩、苦参、白术、莪术、白花蛇舌草、半枝莲、三棱及甘草 8 味中药组成<sup>[9]</sup>, 临床实践显示出较好的肝癌治疗效果<sup>[10]</sup>, 前期的临床前研究也揭示了其在抑制肝癌细胞增殖中可能的细胞学与分子生物学机制<sup>[11-12]</sup>。清肝化瘀颗粒组方有效成分众多, 作用靶点与靶信号通路相互作用机制复杂, 其在抑制肝癌中的具体分子机制尚待阐明。本研究利用网络药理学工具预测了清肝化瘀颗粒治疗肝癌的潜在有效成分、作用靶点及信号通路, 并通过体内外实验进一步验证了清肝化瘀颗粒主要有效成分苦参碱的作用及其对核心靶点的调节作用, 旨在揭示清肝化瘀颗粒在肝癌中发挥治疗效果的可能有效成分及其分子机制, 为其进一步的临

床前研究及临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点的收集与筛选

利用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>, version 2.3)<sup>[13]</sup> 进行数据挖掘, 收集清肝化瘀颗粒组方 8 味中药的有效成分与作用靶点。通过对既往中药活性成分的药物代谢动力学研究结果分析<sup>[14]</sup>, 本研究将人体口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ , 药物相似性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ , 肠上皮 Caco-2 细胞渗透性  $> 0$  nm/s, 半衰期 (half-time, HL)  $\geq 4$  h, 氢键供体数目 (Hdon)  $< 5$  个及氢键受体数目 (Hacc)  $< 10$  个设置为有效成分的筛选参数。

同时利用肝癌数据库 OncoDB.HCC (<http://oncodb.hcc.ibms.sinica.edu.tw/index.htm>)<sup>[15]</sup> 及 Liverome (<http://liverome.kobic.re.kr/index.php>)<sup>[16]</sup> 中的肝癌基因组数据对肝癌相关靶点进行搜集与筛选。基于实验设计, 本研究纳入 OncoDB.HCC 数据库中的所有靶点及 Liverome 数据库中差异表达谱证据  $\geq 5$  条的靶点作为肝癌疾病靶点。

将以上两者预测的靶点结果取交集, 进一步确认清肝化瘀颗粒治疗肝癌的作用靶点。基于此作用靶点集合, 运用 STRING (<https://string-db.org/>, version 11.0) 及 Cytoscape (version 3.7.2) 软件进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建, 利用 MCODE 插件构建 PPI 网络中的分子相互作用模块, 根据实验设计, 筛选条件设置为度值临界值 (degree cutoff) = 2, K 核 (K-core) = 2。同时利用 CytoHubba 插件对 PPI 网络中核心靶点进行研究, 根据实验设计, 本研究选择最大团中心性 (maximal clique centrality,

MCC) 算法获取核心靶点信息并按照重要度大小对其进行排序。

将筛选得到的作用靶点导入 Metascape 数据库, 设定参数为最小重叠度 (min overlap) = 3, P 临界值 (P cutoff) = 0.01, 最小富集度 (min enrichment) = 1.5, 对作用靶点进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 及基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析, 并使用 R 语言 (version 3.0.6) 中的 ggplot2 (version 3.3.0) 程序包对富集分析的结果进行可视化, 利用 KEGG 数据库对靶向信号通路示意图进行绘制。

## 1.2 中药-成分-靶点-疾病网络构建与分析

将所获得的清肝化痰颗粒组方中药的有效成分及所获取的作用靶点与信号通路分别导入 Cytoscape 软件, 构建网络图并利用网络分析 (network analyzer) 功能对网络图的特征进行分析, 并获取主要有效成分及核心靶点信息。

## 1.3 分子生物学实验验证

**1.3.1 材料** HepG2 细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; 分析纯级苦参碱 (货号 M5319) 购自 Sigma-Aldrich 公司。

**1.3.2 细胞模型构建与细胞培养** 将 HepG2 细胞以含 10% 胎牛血清 (购自 GIBCO, 货号 10270-106) 的 RPMI 1640 培养基 (购自 GIBCO, 货号 11875093) 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行常规传代培养。

**1.3.3 CCK-8 细胞活力检测** 使用 Cell Counting Kit-8 (购自 Dojindo, 日本, CK04) 进行 CCK-8 细胞活力检测。收集对数生长期细胞, 按  $3 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后使用等量的不同浓度的苦参碱 (1、5、10 nmol/L) 给药并继续培养 12 h, 同时设置等量的不含苦参碱培养基处理的细胞作为对照组。每组设置 3 个重复孔。中止培养后, 每个培养孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu$ L, 避免引入气泡, 同时设置不加细胞, 仅添加不同浓度药物及 CCK-8 溶液的培养孔作为空白组。在培养箱中孵育 4 h, 将培养板置于酶标仪上, 于 450 nm 处测定各孔的吸光度 (A), 并按照下述公式计算细胞的生存率。同时确定苦参碱对 HepG2 细胞的最小抑制浓度。

$$\text{细胞生存率} = (A_{\text{苦参碱}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

**1.3.4 细胞凋亡检测** 使用 Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit (购自 Dojindo, 日本, AD10) 进行细胞凋亡检测。肝癌细胞的收集与接种按照“1.3.3”项下方法进行, 实验分为 4 组, 分别为对照组 (等量的不含苦参碱的培养基处理)、苦参碱组 (给药浓度采用“1.3.3”项下确定的苦参碱对 HepG2 细胞的最小抑制浓度)、苦参碱联合细胞凋亡抑制剂 z-VAD-FMK 组 (z-VAD-FMK 浓度为 10  $\mu$ mol/L, 苦参碱给药浓度与苦参碱组相同)、z-VAD-FMK 组 (仅添加 10  $\mu$ mol/L z-VAD-FMK)。收集细胞后加入 10 倍体积的 Annexin V 结合溶液, 重悬细胞使细胞终浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。吸取 100  $\mu$ L 细胞悬液加入到新的流式管中, 加入 5  $\mu$ L Annexin, FITC 聚合物, 随后加入 5  $\mu$ L PI 溶液。室温条件下, 避光, 孵育 15 min, 在流式管中加入 10 倍体积的 Annexin V 结合溶液, 在流式细胞仪中上机检测。

**1.3.5 细胞氧化应激标志物检测** 使用总谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (购自碧云天生物技术有限公司, 批号 S0052) 及总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (购自碧云天生物技术有限公司, 批号 S0101) 进行细胞氧化应激标志物检测。肝癌细胞的收集与接种按照“1.3.3”项下方法进行, 苦参碱组给药浓度为 1、5 nmol/L, 同时设置等量的不含苦参碱的培养基处理的 HepG2 细胞作为对照组。收集细胞后按照试剂盒说明书进行细胞裂解、检测体系构建及后续反应, 最后分别在酶标仪 412 nm 及 450 nm 处记录 A 并计算 GSH 及 SOD 的活性变化程度。

**1.3.6 ELISA 法检测血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 含量** 使用 VEGFA 定量检测试剂盒 (购自 R&D SYSTEMS, SVE00) 进行 VEGFA 检测。肝癌细胞的收集、接种及给药按照“1.3.5”项下方法进行。收集细胞后按照试剂盒说明书进行细胞裂解、检测体系构建及后续反应, 中止反应后将反应体系置于酶标仪 450 nm 处测定 A 并计算 VEGFA 的含量。

**1.3.7 Western blotting 检测相关蛋白水平** 肝癌细胞的收集、接种及给药按照“1.3.3”项下方法进行。各组细胞提取总蛋白后, 利用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (购自 Solarbio, PC0020) 对其浓度进行测定。使用浓度

为 10% 的 SDS-PAGE 蛋白电泳后将目的条带转移至醋酸纤维膜上。使用一抗在 4 °C 下孵育过夜后, 用 TBST 缓冲液清洗 3 次, 与二抗室温下孵育 1 h。使用化学发光法对凝胶图像进行显影及定影, 并进行扫描存档。本研究中使用的第一抗体信息: 抗肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53) 抗体 (Abcam, ab26), 抗 G<sub>1</sub>/S 期特异细胞周期蛋白 D1 (G<sub>1</sub>/S-specific cyclin D1, CCND1) 抗体 (Abcam, ab16663); 内参蛋白第一抗体信息: 抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (CST, 5174); 第二抗体信息: 羊抗鼠-辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) (CST, 7076), 羊抗兔-HRP (CST, 7074)。

#### 1.4 肝癌细胞移植瘤动物模型实验验证

**1.4.1 肝癌细胞移植瘤动物模型的建立、分组与给药** 雄性 SPF 级 BALB/C 裸鼠, 6 周龄, 实验开始时体重质量 (17.6±2.3) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2019-0008。所有裸鼠分笼饲养于中日友好医院临床研究所 SPF 级动物实验平台, 采用 12 h 光/暗周期, 自由摄食饮水, 实验开始前适应性饲养 1 周, 取材前 12 h 禁食。肝癌细胞移植瘤动物模型的建立与分组参考朱丹丹等<sup>[17]</sup>的方法, 随机分为对照组和苦参碱给药组, 每组各 5 只。收集对数生长期的 HepG2 人肝癌细胞, 调整浓度至 5×10<sup>7</sup> 个/mL, 使用一次性注射器将细胞 sc 至裸鼠右侧腋窝, 0.1 mL/只, 连续 10 d, 瘤块长至约 5 mm×5 mm×5 mm 认为造模成功。对照组 ip 生理盐水 1 mL, 1 次/d, 参考朱丹丹等<sup>[17]</sup>前期的研究结果, 苦参碱给药组用药剂量为 50 mg/kg, ip 1.0 mg/mL 苦参碱溶液 1 mL, 1 次/d。连续给药 28 d。

**1.4.2 移植瘤瘤体 HE 染色病理检查** 将裸鼠瘤块剥离后置于标记编号的包埋盒中, 利用乙醇逐级脱水, 二甲苯透明, 并于 58~60 °C 的石蜡中浸蜡, 包埋, 4 °C 过夜后置于切片机上, 厚度调整为 4 μm, 连续切片, 60 °C 烤片后脱蜡, 使用苏木素及 0.5% 伊红染液染色, 利用中性树胶封片后置于显微镜下采集图像。

**1.4.3 移植瘤瘤体 TUNEL 染色法检测细胞凋亡** 石蜡切片脱蜡后利用 PBS 溶液漂洗 3 次, 并将切片置于煮沸的抗原修复液中修复抗原 10 min, 冷却至室温后加入 100 μL 蛋白酶 K, 湿盒中透明 20 min, PBS 漂洗后于 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液中孵育封闭 10 min, 加

入 100 μL 阳性片孵育液, 37 °C 湿盒孵育 30 min, 滴加 50 μL 标记反应液, 37 °C 湿盒孵育 90 min, 加入 PI 染液 50 μL, 室温反应 5 min, 60 °C 烘箱中干燥后, 使用含 DAPI 的抗荧光猝灭封片剂封片, 置于显微镜下采集图像。

**1.4.4 免疫组化及 Western blotting 法检测苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠瘤体线粒体稳态相关分子的表达水平** 石蜡切片脱蜡后利用 PBS 溶液漂洗 3 次, 并将切片置于煮沸的抗原修复液中修复抗原 10 min, 使用免疫组化笔圈定待测组织区域, 区域内加 100 μL 的 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 孵育 10 min, 加入 100 μL 封闭液, 室温条件下于湿盒中孵育 1 h, 加入一抗后, 4 °C 湿盒中孵育过夜, PBS 冲洗后加入二抗, 室温条件下湿盒中孵育 1 h, 以 1:100 的体积比加入适量 HRP 标记的链霉亲和素, 室温湿盒中孵育 30 min, 加入 100 μL 新鲜配制的 DAB 显色液, 室温孵育 7 min, 加入苏木素染色液染色 7 min, 随后放入自来水 10 min 进行返蓝, 置于 60 °C 烘箱中干燥后封片并置于显微镜下拍照。Western blotting 实验方法采用“1.3.7”项下方法。第一抗体信息: 抗 MST1 抗体 (Genetex, GTX109294), 抗 Parkin 抗体 (Bioworld, BS91016), 抗哺乳动物不育系 20 样激酶 1 (mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1) 抗体 (Genetex, GTX109294), 抗磷酸化的 c-Jun 氨基末端激酶 (p-c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 抗体 (CST, 4668T), 抗 PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN-induced kinase 1, PINK1) 抗体 (Bioworld, BS91075), 抗 Parkin 抗体 (Bioworld, BS91016); 第二抗体信息: 羊抗兔 IgG (H+L) HRP (Bioworld, BS13278), 羊抗兔-HRP (CST, 7074)。

#### 1.5 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

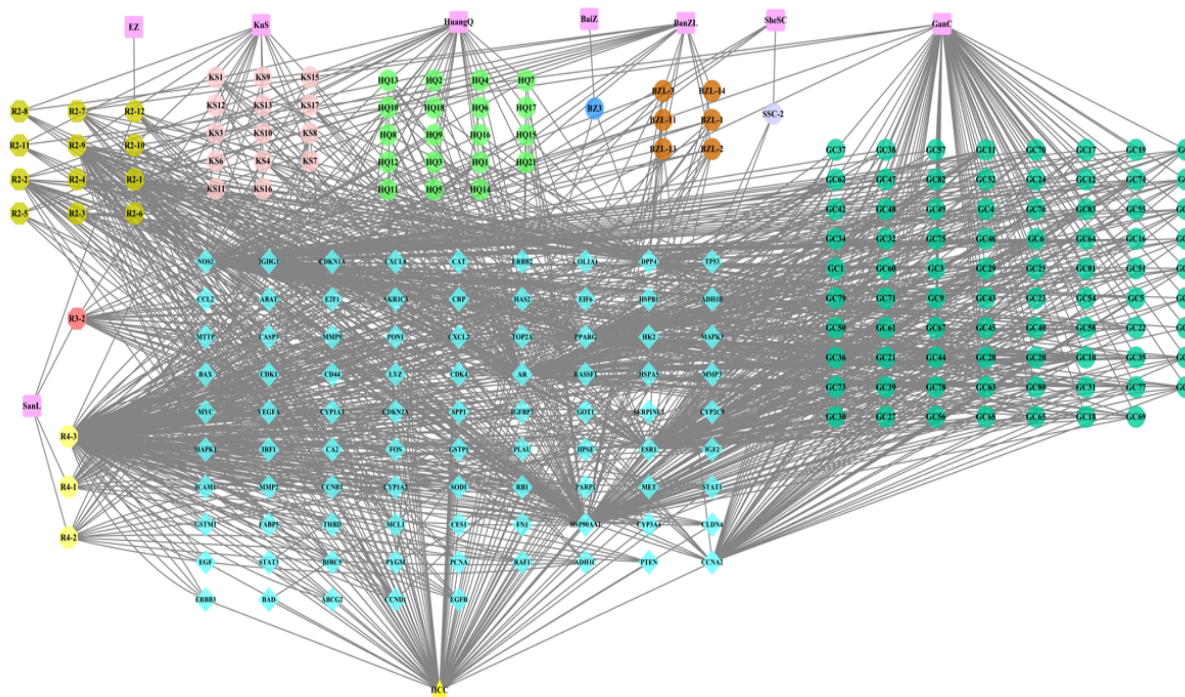
## 2 结果

### 2.1 清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点获取及“中药-成分-靶点-疾病”网络构建

本研究经数据挖掘得到清肝化瘀颗粒有效成分 161 种, 其中重复成分 17 种, 包含于 2 味中药的重复成分 12 种, 包含于 3 味中药的重复成分 2 种, 包含于 4 味中药的重复成分 3 种。同时获得上述有效成分对应的靶点 276 个。利用肝癌数据库 Liverome 及 OncoDB.HCC 数据库共收集得到 994

个肝癌疾病靶点。将获得的清肝化瘀颗粒有效成分作用靶点及肝癌疾病靶点相互映射，得到 86 个交集靶点，即为清肝化瘀颗粒治疗肝癌潜在作用靶

点。将共有靶点所对应的中药、有效成分与对应的疾病信息导入 Cytoscape 软件构建“中药-成分-靶点-疾病”网络图（图 1）。



KuS-苦参 BanZL-半枝莲 HuangQ-黄芩 BaiZ-白术 SheSC-白花蛇舌草 GanC-甘草 SanL-三棱 Ezh-莪术 HCC-肝癌  
KuS-Sophorae Flavescentis Radix BanZL-Scutellariae Barbatae Herba HuangQ-Scutellariae Radix BaiZ-Atractylodis Macrocephalae Rhizoma  
SheSC-Hedyotis diffusa GanC-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma SanL-Sparganii Rhizoma Ezh-Curcumae Rhizoma HCC-liver cancer

图 1 清肝化瘀颗粒治疗肝癌的“中药-成分-靶点-疾病”网络图

Fig. 1 Chinese materia medica-compounds-targets-disease network diagram of Qinggan Huayu Granule for liver cancer

“中药-成分-靶点-疾病”网络包括中药节点 8 个（图中以正方形显示），组方中药有效成分节点 136 个（图中以圆形显示），靶点节点 86 个（图中以菱形显示），疾病节点 1 个（图中以三角形显示），以及 1299 种“中药-成分-靶点-疾病”对应关系（图中以黑色直线显示）。在中药水平，对应有效成分数目由多到少的中药分别为甘草（83 种有效成分）、黄芩（28 种有效成分）、苦参（20 种有效成分）、半枝莲（18 种有效成分）、白花蛇舌草及三棱（各 4 种有效成分）、白术及莪术（各 1 种有效成分）。在化合物水平，按对应治疗肝癌的靶点数目由多到少的化合物有槲皮素（对应 59 个靶点），木犀草素（对应 24 个靶点）及苦参碱（对应 16 个靶点）等。在靶点蛋白层面，连接化合物数目较高的靶点有  $9 \times 10^4$  热休克蛋白  $\alpha A1$ （HSP90AA1，对应有效成分 105 种）、TP53（对应有效成分 93 种）及 VEGFA

（连接化合物数目 60 种）等，86 个靶点节点中，有 46 个节点与 2 个及 2 个以上的化合物相连接，占全部靶点的 53.5%。清肝化瘀颗粒组方中药治疗肝癌作用靶点蛋白数目如下：苦参治疗肝癌靶点数目为 70 个（占苦参预测靶点总数的 34.8%，下同），黄芩 31 个（25.2%），白术 2 个（10.5%），莪术 4 个（18.2%），半枝莲 72 个（32.3%），白花蛇舌草 62 个（33.9%），三棱 15 个（18.8%），甘草 75 个（32.8%）。该网络中，每味中药对应平均靶点数目为 10.75，每种中药成分对应的平均靶点数量 0.63，每个靶点平均对应成分 1.58 个。

## 2.2 清肝化瘀颗粒治疗肝癌核心靶点的筛选与分析

利用 STRING 数据库及 MCODE 和 cytoHubba 插件对清肝化瘀颗粒治疗肝癌作用靶点 PPI 网络中的核心靶点进行筛选。如图 2 所示，在 PPI 网络中，评分较高的核心靶点有 TP53、CCND1、VEGFA、



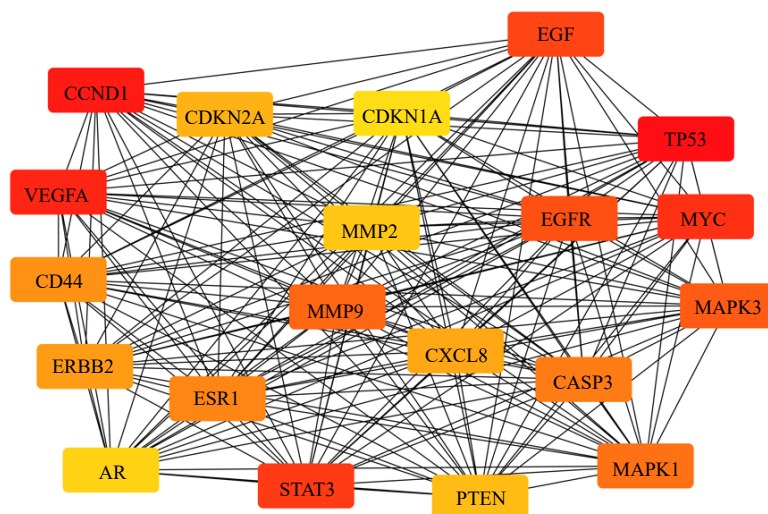


图 2 清肝化瘀颗粒治疗肝癌的核心靶点网络

Fig. 2 Network of core targets of Qinggan Huayu Granule in liver cancer treatment

原癌基因蛋白 c-myc (proto-oncogene protein c-myc, MYC) 及信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 等, 以上作用靶点均为 PPI 网络中度值较高且受到多味中药及有效成分调节的靶点蛋白。

### 2.3 清肝化瘀颗粒治疗肝癌作用靶点的生物学过程分析

利用在线生物信息学数据库 Metascape 对得到的清肝化瘀颗粒治疗肝癌作用靶点基因进行 GO 功能注释分析。如图 3 所示, GO 生物学途径分析得到 20 个条目, 分别为细胞因子介导的信号通路 (29 个靶点参与)、氧含量响应途径 (23 个靶点参与) 及细胞凋亡信号通路 (20 个靶点参与) 等。GO 细胞组分分析共得到 15 个条目, 分别为细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物 (8 个靶点参与)、内质网腔 (7 个靶点参与) 及线粒体膜 (10 个靶点参与) 等。GO 分子功能分析共得到 20 个条目, 分别为激酶结合功能 (21 个靶点参与)、激酶调节活性 (12 个靶点参与) 及泛素样蛋白连接酶结合功能 (9 个靶点参与) 等。KEGG 代谢信号通路富集分析得到 20 个条目, 分别为癌症相关通路 (34 个靶点参与)、含铂类药物耐药性相关通路 (13 个靶点参与) 及 P53 信号通路 (12 个靶点参与) 等。

根据本课题的研究内容, 选取了肿瘤相关通路 (pathways in cancer, hsa05200)、肝癌相关信号通路 (hepatocellular carcinoma, hsa05225)、细胞凋亡信号通路 (apoptosis, hsa04210)、动物细胞自噬信号通路 (autophagy-animal, hsa04140) 及动物

细胞线粒体自噬信号通路 (mitophagy-animal, hsa04137) 5 条信号通路, 利用 KEGG 考察了清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点参与以上信号通路的调节机制。结果表明清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点可以通过调节多条信号通路诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡, 并对肝癌细胞过度增殖、血管新生、基因组不稳定、细胞分化阻遏及去分化状态维持等细胞学行为进行抑制。同时对肝细胞从氧化应激胁迫、慢性炎症、肝纤维化、肝硬化、肝癌癌前病变、早期肝癌、中期肝癌及转移型肝癌各个阶段的细胞学行为进行调节。此外, 清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点可以对肝癌细胞的自噬, 特别是线粒体自噬进行有效调节。

### 2.4 苦参碱对肝癌 HepG2 细胞生存率的影响

为了验证网络药理学实验筛选的治疗肝癌主要有效成分的可靠性, 首先查阅了本课题前期初步构建的清肝化瘀颗粒指纹图谱<sup>[9]</sup>, 并在指纹图谱中验证了槲皮素、木犀草素及苦参碱的存在。以上结果初步验证了网络药理学实验筛选的清肝化瘀颗粒治疗肝癌的主要有效成分的预测结果。

苦参作为君药在清肝化瘀颗粒组方中扮演着清热燥湿、泻火解毒的重要药理学作用, 在网络药理学研究中发现苦参为清肝化瘀颗粒组方 8 味中药中对应有效成分数目及靶点数目最多的君药, 而苦参碱则是对应靶点数目较多的有效成分之一, 且在清肝化瘀颗粒组方中为苦参中独有有效成分。既往研究也表明苦参及苦参碱在肝癌的治疗中发挥重要的药理学作用<sup>[18]</sup>。因此, 推测苦参及苦参碱在清肝化瘀颗粒抗肝癌的作用机制中发挥重要作用, 为

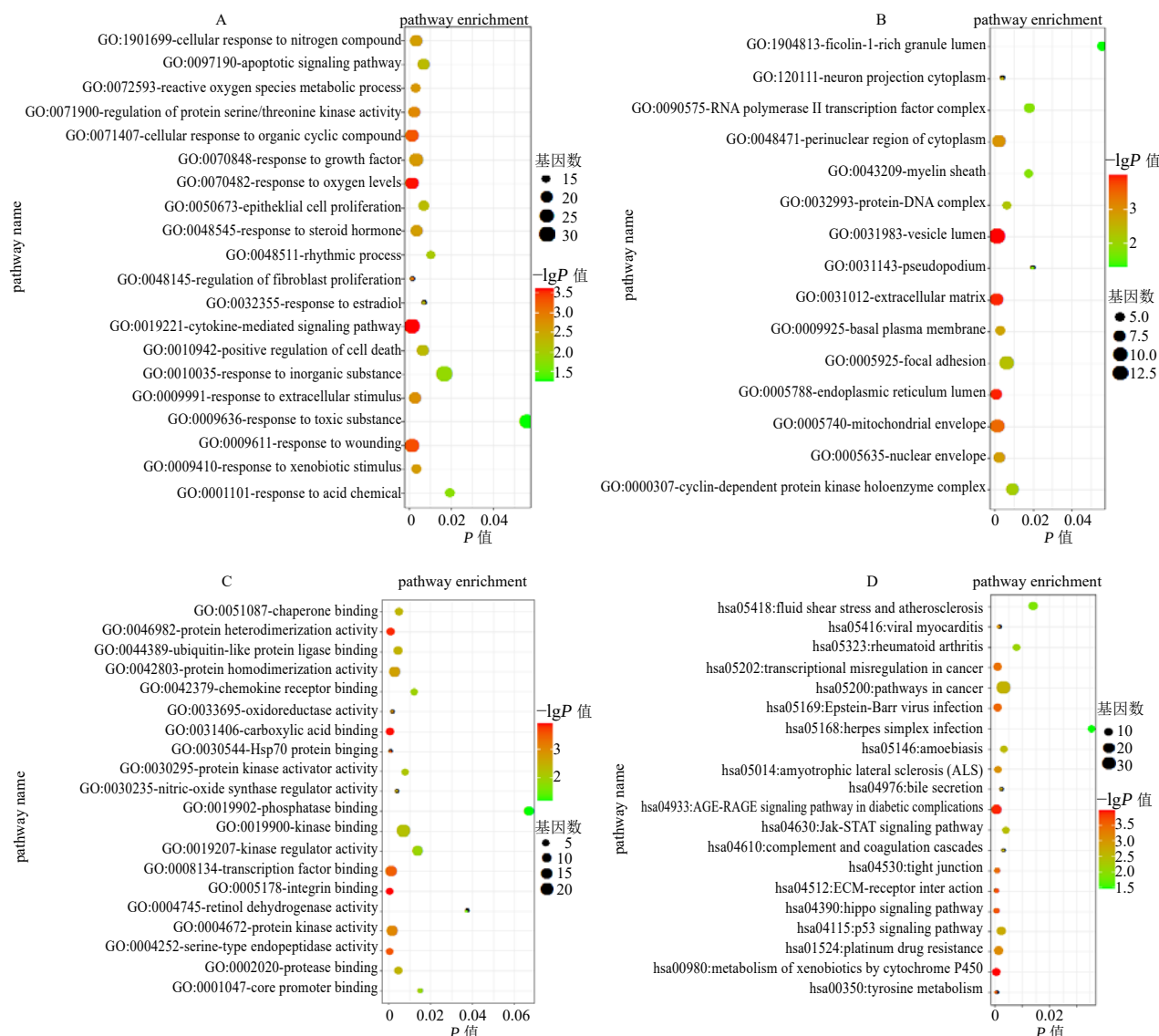


图 3 清肝化痰颗粒治疗肝癌作用靶点的 GO-生物学过程分析 (A)、GO-细胞组分分析 (B)、GO-分子功能分析 (C) 和 KEGG 富集分析 (D)

Fig. 3 GO analysis of biological process (A), cellular component (B), molecular function (C), and KEGG enrichment analysis (D) of targets of Qinggan Huayu Granule for liver cancer

为了验证网络药理学实验预测的清肝化痰颗粒治疗肝癌的主要有效成分及分子机制的可靠性, 本实验选取苦参碱作为主要有效成分代表进行了细胞模型实验验证。使用不同浓度的苦参碱处理 HepG2 细胞 12 h 后采用 CCK-8 实验考察细胞的生存率。结果表明, 5、10 nmol/L 苦参碱处理后, HepG2 细胞的生存率分别为对照组的 81.2%、62.4%, 提示与对照组相比, 苦参碱可以显著降低 HepG2 细胞的生存率, 且存在剂量相关性。实验结果同时表明 1 nmol/L 苦参碱对于 HepG2 细胞无细胞毒性, 生存率为对照组的 98.3%, 与对照组相比无显著差异。

苦参碱对 HepG2 细胞的最小抑制浓度为 5 nmol/L。因此, 选择 5 nmol/L 剂量的苦参碱作为肝癌细胞模型后续实验处理浓度。

## 2.5 苦参碱对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测苦参碱处理肝癌 HepG2 细胞后细胞凋亡的变化情况。结果如图 4 所示, 对照组 HepG2 细胞中细胞凋亡率为 4.9% (图 4-A), 5 nmol/L 苦参碱处理 HepG2 细胞后细胞凋亡率与对照组相比显著提高, 达到 20.2% (图 4-C), 而细胞凋亡抑制剂 z-VAD-FMK 处理可以显著抑制苦参碱诱导的 HepG2 细胞凋亡, 凋亡率下调至 6.2%

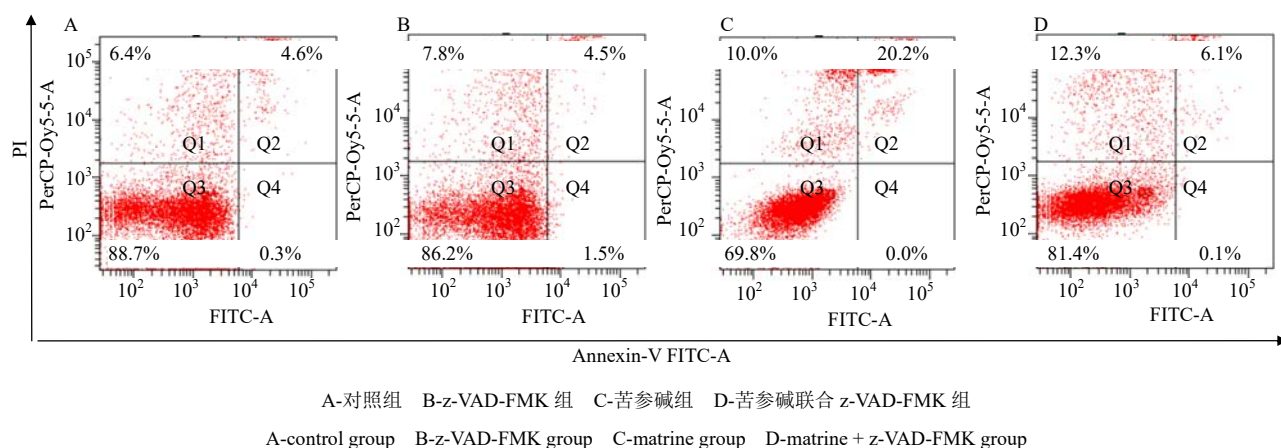


图4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测肝癌细胞 HepG2 凋亡的变化情况

Fig. 4 HepG2 cell apoptosis evaluated by Annexin V-FITC/PI dual staining

(图4-D)。以上结果表明,苦参碱可以在肝癌 HepG2 细胞中诱导线粒体依赖的内源性细胞凋亡。

## 2.6 苦参碱对肝癌 HepG2 细胞氧化应激标志物的影响

使用苦参碱作用于肝癌 HepG2 细胞 12 h 后,利用试剂盒检测细胞体内的氧化应激标志物的变化。结果发现浓度为 5 nmol/L 的苦参碱处理后,细胞内氧化应激标志物 GSH 的浓度下调至 23.9 nmol/mg (以蛋白量计,下同),而对照组中 GSH 的浓度为 51.5 nmol/mg,提示苦参碱可以显著下调肝癌 HepG2 细胞中 GSH 浓度。此外,5 nmol/L 苦参碱处理后,另一种氧化应激标志物 SOD 的浓度下调至 4.10 U/mg,而对照组 SOD 的浓度则为 8.62 U/mg,提示苦参碱可以显著下调肝癌 HepG2 细胞中 SOD 的水平。而浓度为 1 nmol/L 苦参碱处理的肝癌细胞中,氧化应激标志物无显著变化 (GSH 浓度为 49.4 nmol/mg, SOD 浓度为 8.40 U/mg)。这一部分的实验结果说明苦参碱处理后,肝癌细胞模型

中出现氧化应激胁迫,而苦参碱诱导的线粒体依赖性细胞凋亡可能与氧化应激胁迫环境的出现有关。

## 2.7 苦参碱对肝癌 HepG2 细胞中 VEGFA 含量的影响

利用 ELISA 法检测苦参碱处理肝癌 HepG2 细胞 12 h 后,其中 VEGFA 的含量变化。结果表明,与对照组相比,5 nmol/L 苦参碱处理后,肝癌细胞 HepG2 中的 VEGFA 水平显著下调,下调倍数为 2.4 倍,而浓度为 1 nmol/L 苦参碱在肝癌细胞中对 VEGFA 水平无影响。

## 2.8 苦参碱对肝癌 HepG2 细胞中 TP53 及 CCND1 表达量的影响

利用 Western blotting 法检测苦参碱处理 12 h 肝癌 HepG2 细胞中 TP53 及 CCND1 的表达量变化。结果如图 5 所示,与对照组相比,HepG2 细胞在 5、10 nmol/L 苦参碱处理后 TP53 蛋白的表达量显著提高 ( $P < 0.05$ ),上调倍数分别为 3.4 倍与 3.1 倍;CCND1 蛋白的表达量则显著下调 ( $P < 0.01$ ),下调幅度分别为 83.9%、83.8%。而浓度为 1 nmol/L 苦参碱对肝癌

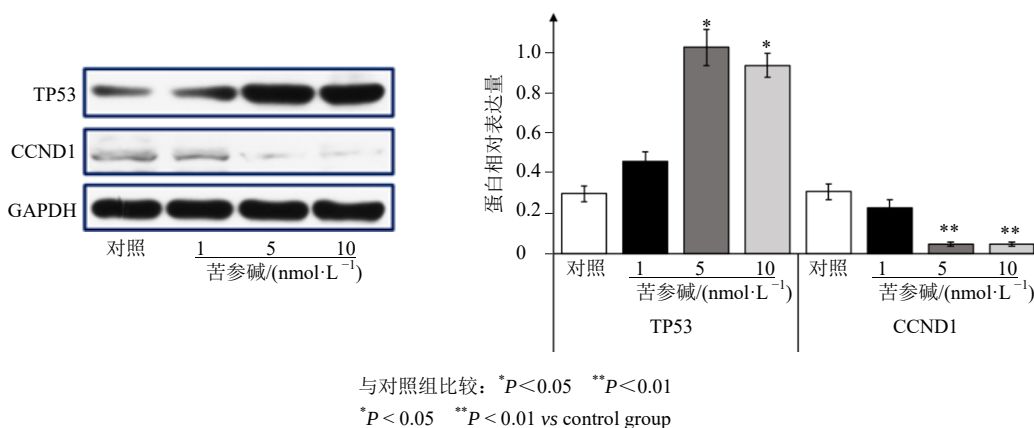


图5 Western blotting 法检测肝癌 HepG2 细胞 TP53 及 CCND1 的表达量

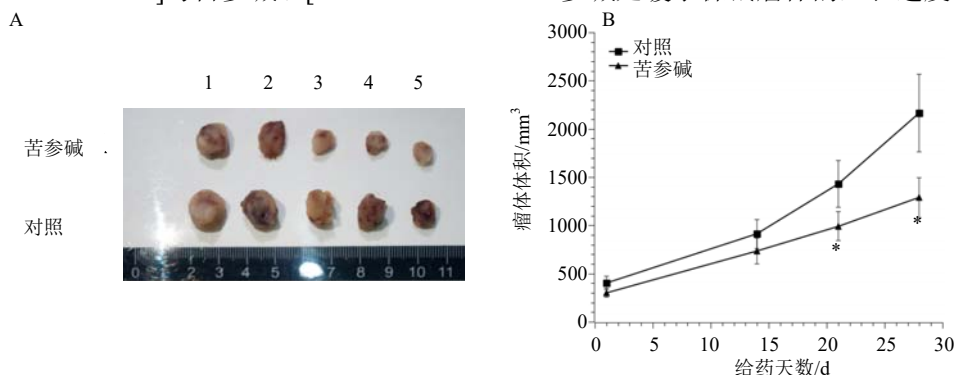
Fig. 5 Detection of TP53 and CCND1 quantities in HepG2 cells by Western blotting



HepG2 细胞中 2 种蛋白的表达量无影响。

## 2.9 苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠瘤体积的影响

为了验证细胞实验检测的苦参碱对肝癌细胞生物学行为的作用, 本实验探究了苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠模型的治疗作用。研究发现, 给药前对照组 [ $(129.47 \pm 8.67) \text{ mm}^3$ ] 与苦参碱组 [ $(129.73 \pm 7.51)$



1~5-每组中肝癌荷瘤裸鼠编号 与对照组比较: \* $P < 0.05$

1—5-number of tumor-bearing nude mice in each group \* $P < 0.05$  vs control group

图 6 苦参碱对 HepG2 肝癌荷瘤裸鼠瘤体生长的影响 (A) 及肝癌荷瘤裸鼠瘤体生长曲线 (B)

Fig. 6 Effect of matrine on growth of HepG2 xenograft (A) and growth curves of mice implanted tumor (B)

## 2.10 苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠瘤体病理组织学影响

为了进一步验证苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠模型的治疗作用, 对肝癌荷瘤裸鼠瘤体进行了病理组织学观察。对照组瘤体可见完整的白色包膜, 瘤体存在较多的出血及坏死组织; 苦参碱组瘤体体积显著小于对照组, 出血组织及坏死组织少于对照组。镜下可见对照组肝癌组织一系列病理变化, 如肝细胞索紊乱, 细胞形态异常, 细胞核体积变大, 细胞质内容物增多, 深核染色以及炎症细胞浸润等。与对照组相比, 苦参碱组上述病理改变显著减轻 (图 7)。

## 2.11 苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠瘤体细胞凋亡的影响

为了进一步验证苦参碱对肝癌细胞凋亡行为的调控, 利用 TUNEL 染色法对苦参碱处理后肝癌

$\text{mm}^3$ ] 中裸鼠瘤体积无统计学差异。给药后, 与对照组 [ $(2163.58 \pm 400.40) \text{ mm}^3$ ] 相比, 苦参碱组 [ $(1286.45 \pm 210.10) \text{ mm}^3$ ] 裸鼠瘤体积显著减小 ( $P < 0.05$ ), 抑瘤率为 40.5% (图 6-A)。此外, 由肿瘤瘤体生长曲线 (图 6-B) 可见, 从 14 d 起, 苦参碱延缓了裸鼠瘤体的生长速度。

荷瘤裸鼠瘤体内肝癌细胞的凋亡水平进行了检测。如图 8 所示, 与对照组相比, 苦参碱处理后肝癌荷瘤裸鼠瘤体内发生凋亡的细胞数明显增多。

## 2.12 苦参碱对肝癌荷瘤裸鼠瘤体线粒体稳态相关分子的调节作用

以线粒体自噬及线粒体分裂为代表的线粒体稳态调节机制与在肿瘤细胞中被广泛抑制的线粒体介导的内源性细胞凋亡存在相互调节作用。在体外实验中发现苦参碱可以在 HepG2 细胞中通过抑制 PINK1/Parkin 通路相关的线粒体自噬及激活 MST1/JNK 通路相关的线粒体分裂诱导细胞凋亡的发生, 抑制肝癌细胞增殖<sup>[19-20]</sup>。网络药理学研究结果也表明清肝化瘀颗粒及其有效成分可能通过调

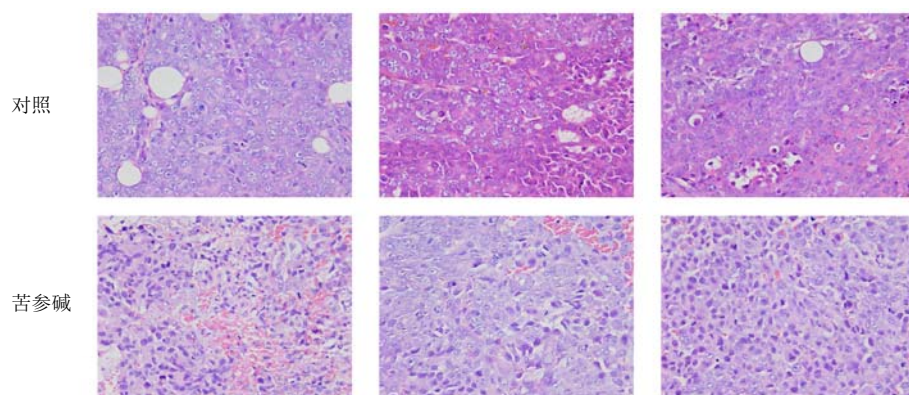


图 7 裸鼠瘤体病理切片 (HE 染色,  $\times 400$ )

Fig. 7 Pathological section of implanted tumor in nude mice (HE staining,  $\times 400$ )

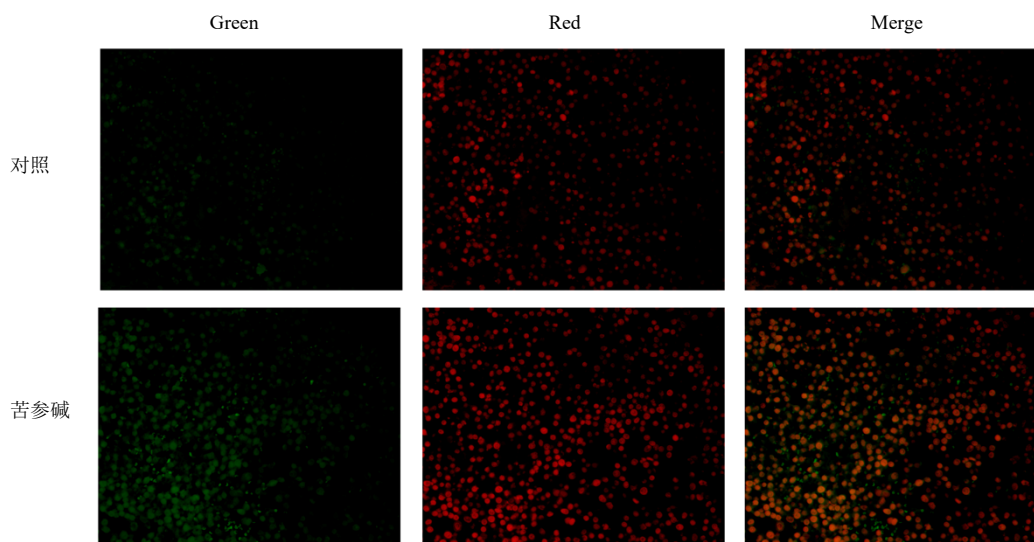


图 8 TUNEL 法检测肝癌荷瘤裸鼠瘤体细胞凋亡情况 ( $\times 400$ )

Fig. 8 Apoptotic liver cancer cells of xenograft tumours in nude mice detected with TUNEL assay ( $\times 400$ )

节肝癌细胞凋亡与细胞自噬，并通过调节线粒体细胞学行为发挥抑制肝癌的作用，因此本实验通过免疫组化及 Western blotting 验证了苦参碱给药后肝癌荷瘤裸鼠瘤体线粒体稳态相关分子的表达水平变化。如图 9 所示，免疫组化染色显示对照组瘤体 MST1 阳性细胞率为  $(27.90 \pm 5.51)\%$ ，苦参碱组瘤体 MST1 阳性细胞率为  $(45.92 \pm 8.62)\%$ ，与对照组相比显著提高 ( $P < 0.01$ )；此外，对照组瘤体 Parkin 阳性细胞率为  $(41.50 \pm 3.80)\%$ ，苦参碱组瘤体 Parkin 阳性细胞率为  $(33.69 \pm 2.98)\%$ ，

与对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 结果验证了免疫组化的结果，如图 10 所示，苦参碱给药后线粒体分裂相关蛋白 MST1 及 p-JNK 表达量较对照组显著提高 ( $P < 0.01$ )，MST1、p-JNK 上调倍数分别为 2.1 倍和 5.2 倍；而线粒体自噬相关蛋白 PINK1 及 Parkin 在苦参碱给药后表达水平较对照组显著下调，PINK1 下调 62.9% ( $P < 0.01$ )，Parkin 下调 40.2% ( $P < 0.05$ )。以上结果提示苦参碱可以在肝癌动物模型中对线粒体稳态进行调节。

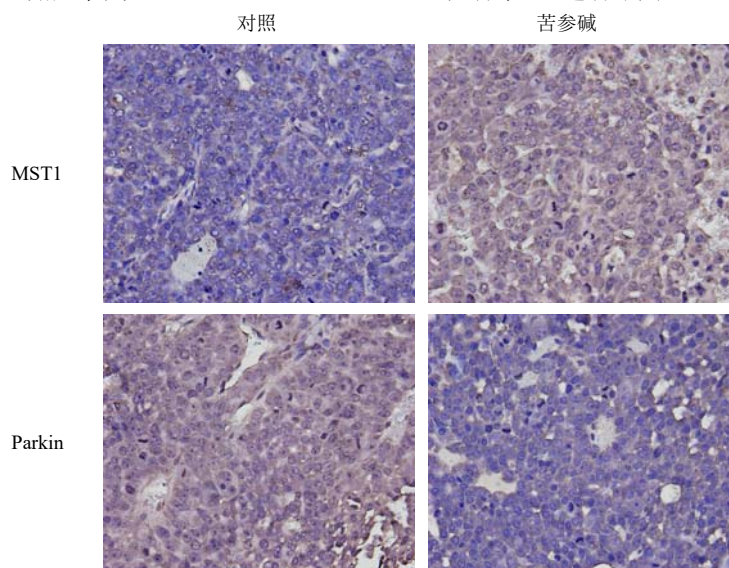


图 9 免疫组化法检测肝癌荷瘤裸鼠瘤体线粒体稳态相关分子表达情况 ( $\times 400$ )

Fig. 9 Expression of mitochondrial homeostasis-related protein in tumor-bearing nude mice tumor tissue (immunohistochemical staining,  $\times 400$ )

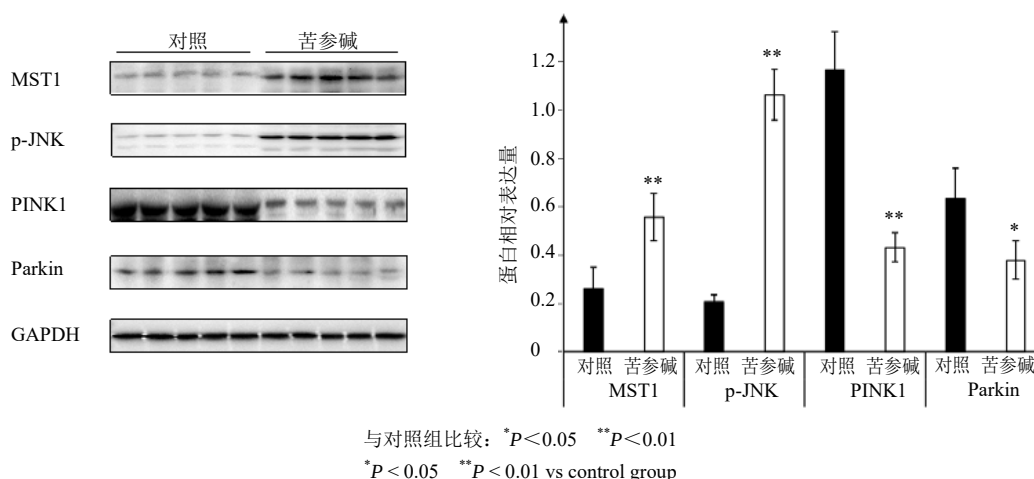


图 10 Western Blot 法检测肝癌荷瘤裸鼠瘤体线粒体稳态相关分子表达情况

Fig. 10 Detection of mitochondrial homeostasis-related protein quantities in tumor-bearing nude mice tumor tissue by Western blotting

### 3 讨论

本研究从清肝化瘀方 8 味中药中发现了可以作用于肝癌治疗靶点蛋白的 136 种有效成分，其中槲皮素、木犀草素、苦参碱为对应靶点与信号通路数量较多的有效成分，同时这几种有效成分也为清肝化瘀颗粒组方中君药和臣药的主要药效成分，且具有较好的口服利用度与成药性，这一结果从主要成分的层次说明了清肝化瘀颗粒配伍严谨，君臣佐使搭配精妙，处方遣方用药合理科学。既往研究发现这 3 种化合物具有较好的抗肿瘤活性。Salama 等<sup>[21]</sup>发现槲皮素可以通过调节酪蛋白激酶 2 $\alpha$  (Casein kinase 2 $\alpha$ , CK2 $\alpha$ ) /cyclin D1 的表达量阻遏肝癌细胞的细胞周期进程，同时通过调节 p53/Caspase-3 信号通路解除肝癌细胞凋亡的抑制进而下调肝癌细胞的增殖水平。研究人员发现，木犀草素可以诱导肝癌 Hep3B 细胞发生内质网应激参与的细胞凋亡，同时抑制其细胞增殖水平<sup>[22]</sup>。本课题组前期研究也发现苦参碱可以通过诱导肝癌细胞凋亡与自噬的相互调节对肝癌细胞的恶性增殖进行抑制<sup>[23]</sup>。

本研究也利用体内外实验同时验证了苦参碱对于肝癌细胞增殖的抑制作用。本研究同时发现，清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点蛋白 PPI 网络中评分较高的靶点蛋白也是槲皮素、木犀草素及苦参碱的靶点蛋白，并可以富集到多条与肿瘤发生发展相关的信号途径中。因此，推测以槲皮素、木犀草素、苦参碱为代表的 3 种主要成分在清肝化瘀颗粒治疗肝癌中发挥主导作用。这为从有效单体成分水平研究清肝化瘀颗粒治疗肝癌的作用提供了依据。

本研究利用网络药理学工具发现 TP53、CCND1 及 VEGFA 为清肝化瘀颗粒治疗肝癌靶点蛋白 PPI 网络中的枢纽蛋白。TP53 是人体中最重要的抑癌蛋白，其可在多种恶性肿瘤中起到抑制肿瘤发生发展的作用。P53 信号通路的活性抑制可以在肝癌细胞中维持恶性增殖、凋亡抑制及侵袭转移等多种肿瘤细胞学行为的激活，进而对肝癌的发生发展提供机会<sup>[24]</sup>。CCND1 是一种细胞周期调节蛋白，可以对细胞周期蛋白依赖性激酶进行调节并参与 G<sub>1</sub> 期向 S 期的细胞周期转化。CCND1 参与了多种肿瘤的发生发展。已有研究表明 CCND1 可以通过调节肝癌细胞的细胞周期进程对肝癌细胞的侵袭转移、肝癌干细胞干性维持及化疗药物耐药性形成等肿瘤细胞学行为发挥促进作用<sup>[25]</sup>。VEGFA 为生长因子家族的成员，其在许多肿瘤组织中表达量上调并与肿瘤分期及进展相关，既往研究表明，其在肝癌中可以在氧化应激胁迫下诱导促癌炎症微环境形成，促进肝癌细胞的血管新生、侵袭转移与免疫逃逸，同时抑制肝癌细胞凋亡而引起肝癌细胞恶性增殖<sup>[26]</sup>。本研究利用基因功能富集分析结果显示，TP53、CCND1 及 VEGFA 可以参与细胞凋亡通路、氧化应激胁迫相关信号通路、细胞增殖相关信号通路及细胞周期相关信号通路多条与肿瘤发生发展相关的信号通路。本研究利用网络药理学工具同时发现，来自清肝化瘀颗粒组方中药的多种有效成分可与这 3 种靶点发生相互作用，进一步的体外实验也证实苦参碱对这 3 种靶点蛋白的调节作用。以上结果说明 TP53、CCND1 及 VEGFA 可以作为

核心靶点在清肝化瘀颗粒对肝癌的治疗中发挥着重要作用,为从靶点水平上阐释清肝化瘀颗粒治疗肝癌的分子学机制提供了依据。

肿瘤的发生发展是多种蛋白分子、多条信号通路对多种细胞生物学行为进行调节的结果。而中医药对疾病多靶点、多信号通路,整体性的治疗方式在肿瘤的治疗中具有极大优势。本研究对获得的清肝化瘀颗粒治疗肝癌的靶点基因进行富集分析发现其治疗肝癌的靶点蛋白可以富集到包括磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase-Akt, PI3K-Akt) 信号通路, P53 信号通路及 JAK 激酶-信号传导及转录激活蛋白 (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 信号通路等与肝癌发生发展密切相关的信号通路,基因富集分析结果发现这些靶点基因可以定位于肝癌细胞的各个组分,并在肝癌发生发展过程中对促炎微环境形成、氧化应激胁迫、代谢重编程、细胞周期调节、细胞凋亡进程以及侵袭转移等肝癌细胞生物学调节功能中发挥重要作用。线粒体作为整合细胞能量代谢、物质代谢和生命信号转导的细胞器,在细胞的环境适应与存活作用中不可或缺<sup>[27]</sup>。因此,线粒体的功能与自稳态调节对于肿瘤的发生发展及药物治疗肿瘤的效果至关重要,线粒体的生物发生、裂变与融合、新陈代谢与氧化应激调节,线粒体自噬及线粒体参与的细胞凋亡等生物学事件都在肿瘤细胞的存活与死亡中扮演重要角色,其在肿瘤靶向治疗中也发挥着重要作用<sup>[28]</sup>。本研究利用苦参碱治疗 HepG2 肝癌荷瘤裸鼠后发现,苦参碱可以在肝癌细胞中通过 PINK1/Parkin 信号通路与 MST1-JNK 信号途径对线粒体自稳态进行调节,并重新激活被抑制的细胞凋亡进程,进而抑制肝癌的发生发展。同时在体外实验中也发现,苦参碱可以诱导肝癌细胞发生氧化应激胁迫及细胞凋亡进程。本课题组前期研究也发现清肝化瘀方含药血清对肝癌细胞的抑制与线粒体参与的代谢重编程、细胞凋亡及细胞增殖等肝癌细胞生物学行为的调节密切相关<sup>[29]</sup>。以上研究结果进一步说明清肝化瘀颗粒组方可以通过多成分、多靶点、多信号通路对肝癌的多种生物学行为进行抑制,苦参碱在其中可以作为主要有效成分发挥作用,此外作为细胞生命活动,新陈代谢途径及信号通路的交汇中心,线粒体在清肝化瘀颗粒抑制肝癌的作用中发挥着重要作用。

肝癌在中医属“肝积”“癥积”“鼓胀”“胁痛”等范畴,中医学认为,由于机体正气虚弱,外感邪毒;或情志抑郁,气滞血瘀;或脾失健运,湿浊内生,终致湿浊瘀毒结于脏腑所致。根据我国卫生健康委员会发布的《原发性肝癌诊疗规范》及国家中医药管理局发布的《肝癌中医诊疗方案》,肝癌从发病到进展等各个时期的临床表现可辨证分型为“肝胆湿热证”及“肝热血瘀证”等 5 种<sup>[6]</sup>。针对肝癌的这些辨证分型也符合现代人因过度进食高蛋白、高脂肪的饮食,进而影响脾胃运化,积聚而生湿浊的肝癌病因<sup>[7]</sup>;也符合恶性肿瘤患者气血不足甚至气血衰败,癥积日久进而瘀阻血脉造成的气血运行不畅等临床表现<sup>[8]</sup>。研究表明,湿热证可通过调节炎症、免疫反应,影响代谢及肠道微环境诱导肿瘤的发生发展,清热燥湿类中药可发挥抗炎、抗氧化、调节免疫、调节肠道菌群、调节血糖血脂等作用。清肝化瘀颗粒是由苦参、黄芩等 8 味中药组成,具有清热解毒、化瘀散结、健脾益气之功。其中苦参、黄芩作为君药,可清热燥湿、泻火解毒;白术、莪术作为臣药,可健脾和胃、活血化瘀;臣药之中另外 2 味为半枝莲及白花蛇舌草,有加强清热解毒及抗癌作用,辅以消肿散结的功效;三棱为佐药,可以增强活血化瘀、软坚消癥的药效;使药为甘草,有解毒扶正、益气且调诸药的作用。本研究利用网络药理学发现清肝化瘀颗粒组方中药可对细胞凋亡、代谢重编程、促癌炎症微环境、血管新生与侵袭转移等多种肝癌细胞学行为发挥作用。而改善炎症微环境、降低氧化应激胁迫、调节细胞凋亡及阻止血管新生可能是清肝化瘀颗粒发挥清热解毒、破瘀散结功效的主要分子机制。既往研究也发现,清肝化瘀方可以通过改变 VEGFA 信号通路,抑制肝癌模型大鼠的血管新生和侵袭转移,同时通过促进肝癌细胞凋亡发挥肝癌抑制作用<sup>[30]</sup>,基于清肝化瘀方联合肝动脉化疗栓塞的肝癌临床研究也得到了类似的结论<sup>[31]</sup>。基于以上传统医学和现代医学 2 个角度的研究结果,推测清肝化瘀颗粒可以通过组方中药中的多种有效成分,对多靶点、多通路、多生物学行为进行调节,同时对现代人群中湿热型肝癌发挥治疗作用,而改善炎症微环境、降低氧化应激胁迫、调节细胞凋亡及阻止血管新生可能是清肝化瘀颗粒发挥清热解毒、破瘀散结功效的主要分子机制。

本研究为中西医结合治疗肝癌的作用机制研



究提供了理论依据及新思路,也为传统中医药理论的现代化奠定了基础。为进一步验证本研究得出的结果,利用分子细胞生物学及动物实验研究,对本研究预测的有效成分、靶点蛋白、信号通路及细胞生物学行为开展深入研究,以期为祖国医学在肝癌治疗中的应用提供更多的依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] GBD Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 [J]. *Lancet*, 2016, 388(10053): 1459-1544.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Zeng H M, Chen W Q, Zheng R S, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: A pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567.
- [4] Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 385(9963): 117-171.
- [5] Omata M, Cheng A L, Kokudo N, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: A 2017 update [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(4): 317-370.
- [6] 林丽珠, 肖志伟, 黄学武, 等. 原发性肝癌中西医结合诊疗实践回眸 [J]. *中医肿瘤学杂志*, 2020, 2(1): 5-9.
- [7] 袁菊花, 郑丽平, 吴煜. 从“痰”之致病学说探讨原发性肝癌的发病机制 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(5): 323-326.
- [8] 李莹. 140 例乙肝相关性原发性肝癌中医证候及心理健康调查研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [9] 吴桐. 清肝化瘀颗粒制剂工艺、指纹图谱及药代动力学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [10] 姚树坤, 殷飞, 王娜. 清肝化瘀方药对原发性肝癌患者的疗效及对细胞免疫功能的影响 [J]. *临床荟萃*, 2006, 21(18): 1300-1302.
- [11] 王娜, 殷飞, 姚树坤. 清肝化瘀方含药血清对肝癌细胞的影响 [J]. *河北医科大学学报*, 2011, 32(5): 501-504.
- [12] 李蕊, 柳芳, 宋威江, 等. 清肝化瘀颗粒对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(9): 2130-2134.
- [13] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] Wang Y H, Zheng C L, Huang C, et al. Systems pharmacology dissecting holistic medicine for treatment of complex diseases: An example using cardiocerebrovascular diseases treated by TCM [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 980190.
- [15] Su W H, Chao C C, Yeh S H, et al. OncoDB.HCC: An integrated oncogenomic database of hepatocellular carcinoma revealed aberrant cancer target genes and loci [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: D727-D731.
- [16] Lee L, Wang K, Li G, et al. Liverome: A curated database of liver cancer-related gene signatures with self-contained context information [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl 3): S3.
- [17] 朱丹丹, 姚树坤. 苦参碱对人肝癌细胞 HepG2 荷瘤裸鼠的抑瘤作用研究 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(6): 736-741.
- [18] 曹建, 魏润杰, 邓茹芸, 等. 苦参碱及氧化苦参碱抑制肿瘤作用机制研究进展及展望 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 753-760.
- [19] Wei R, Cao J, Yao S. Matrine promotes liver cancer cell apoptosis by inhibiting mitophagy and PINK<sub>1</sub>/Parkin pathways [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23(6): 1295-1309.
- [20] Cao J, Wei R J, Yao S K. Matrine has pro-apoptotic effects on liver cancer by triggering mitochondrial fission and activating Mst1-JNK signalling pathways [J]. *J Physiol Sci*, 2019, 69(2): 185-198.
- [21] Salama Y A, El-Karef A, El Gayyar A M, et al. Beyond its antioxidant properties: Quercetin targets multiple signalling pathways in hepatocellular carcinoma in rats [J]. *Life Sci*, 2019, 236: 116933.
- [22] Lee Y, Kwon Y H. Regulation of apoptosis and autophagy by luteolin in human hepatocellular cancer Hep3B cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517(4): 617-622.
- [23] Yang J, Yao S K. JNK-bcl-2/bcl-xL-bax/bak pathway mediates the crosstalk between matrine-induced autophagy and apoptosis via interplay with beclin 1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 25744-25758.
- [24] Krstic J, Galhuber M, Schulz T J, et al. p53 as a dichotomous regulator of liver disease: The dose makes the medicine [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): E921.

- [25] Gennaro V J, Stanek T J, Peck A R, *et al.* Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(40): E9298-E9307.
- [26] Liu C, Xu D, Xue B, *et al.* Upregulation of RUNX1 suppresses proliferation and migration through repressing VEGFA expression in hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020; 26(2): 1301-1311.
- [27] Zong W X, Rabinowitz J D, White E. Mitochondria and cancer [J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 667-676.
- [28] Vyas S, Zaganjor E, Haigis M C. Mitochondria and cancer [J]. *Cell*, 2016, 166(3): 555-566.
- [29] 贺云妹, 殷飞, 姚树坤. 清肝化癥方药含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞基因组学影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(12): 843-846.
- [30] 殷飞, 姚树坤, 吴新满, 等. 清肝化癥方对大鼠肝癌血管形成的影响 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21(1): 29-32.
- [31] 王永中, 姚树坤, 李智岗, 等. 清肝化癥口服液对肝细胞癌介入治疗后血管内皮生长因子及环氧合酶 2 表达的影响 [J]. 临床荟萃, 2010, 25(22): 1951-1954.

[责任编辑 潘明佳]