整合生物信息学与实验验证解析黄芪-莪术药对抗肝癌配伍机制

鲍　宁[1, 2]，陈子超[3]，刘名玉[1]，赵春芹[1]，李　肖[1*]，张　振[1*]

1. 山东中医药大学 中医药创新研究院，山东 济南　250355
2. 山东中医药大学药学院，山东 济南　250355
3. 山东中医药大学 实验中心，山东 济南　250355

摘　要：目的　整合生物信息学、网络药理学及分子对接技术预测黄芪-莪术药对抗肝癌配伍机制，并进行细胞实验验证。**方法**　利用 R 软件包 Limma 分析 GEO 数据库中肝癌基因表达数据，筛选肝癌靶点；通过 TCMSP 数据库结合文献报道，筛选潜在活性成分；采用 TCMSP、SEA 和 SwissTargetPrediction 数据库进行成分靶点预测，筛选抗肝癌靶点；对靶点进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析；构建蛋白质-蛋白质相互作用网络、成分-靶点网络、关键成分-靶点-通路网络，并结合网络贡献指数，筛选关键肝癌靶点、关键抗肝癌成分及其靶点、核心抗肝癌成分及其靶点；使用 Autodock Vina 软件对核心成分与核心靶点进行分子对接；通过细胞实验，验证所预测成分抗肝癌活性及其作用机制。**结果**　预测得到黄芪-莪术抗肝癌活性成分 33 个，抗肝癌靶点 180 个，关键肝癌靶点 112 个；筛选后得到关键成分 29 个，对应靶点 15 个；KEGG 通路分析显示关键成分主要通过协同影响细胞周期、细胞衰老、p53 信号通路等发挥配伍作用；进一步筛选得到核心成分 6 个（黄芪中黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、芒柄花素，莪术中莪术醇、姜黄素、双去甲氧基姜黄素），对应靶点 5 个[细胞周期蛋白依赖性激酶 1（cyclin-dependent kinase 1，CDK1）、DNA 拓扑异构酶 2A（topoisomerase 2A，TOP2A）、极光激酶 B（aurora B，AURKB）、检查点蛋白激酶 1（check point kinase 1，CHEK1）、AURKA]。细胞实验结果显示，黄芪-莪术药对 6 个核心成分均对 HepG2 细胞增殖具有显著的抑制作用（$P<0.01$），且黄芪皂苷 II 与双去甲氧基姜黄素具有协同增效作用；黄芪皂苷 II 与双去甲氧基姜黄素可通过下调细胞周期相关蛋白表达水平（$P<0.05$、0.01），进而阻滞细胞周期。**结论**　黄芪-莪术药对的多种活性成分通过作用于相同或不同靶点抑制细胞周期、p53 信号通路等相同或不同相关信号关通路，从而发挥协同配伍抗肝癌作用。

关键词：黄芪；莪术；肝癌；配伍机制；生物信息学；网络药理学；细胞周期；黄芪皂苷 II；双去甲氧基姜黄素

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)01 - 0114 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.013

Mechanisms of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair for anti-hepatocellular carcinoma by integrating bioinformatics and experimental validation

BAO Ning[1, 2], CHEN Zichao[3], LIU Mingyu[1], ZHAO Chunqin[1], LI Xiao[1], ZHANG Zhen[1]

1. Innovation Institute of Chinese Medicine and Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
3. Experimental Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective　To analyze the combination mechanisms of Huangqi (*Astragali Radix*)-Ezhu (*Curcumae Rhizoma*) herb pair in treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) by integrating bioinformatics, network pharmacology and molecular docking, and further verified by cell experiments. **Methods**　HCC targets were analyzed by HCC gene expression data in GEO database using R package Limma; Active compounds were screened by TCMSP database and literature reports; TCMSP, SEA and SwissTargetPrediction

收稿日期：2023-07-28

基金项目：国家自然科学基金资助项目（21775061）；国家自然科学基金资助项目（82204656）；泰山学者青年专家计划项目（tsqn202211136）；济南市“新高校 20 条”资助项目（202228085）；山东省高等学校青创人才引育计划项目（2021505031）；山东中医药大学青年创新团队支持计划项目（22202105）

作者简介：鲍　宁，硕士研究生，研究方向为中药效物质基础与新药创新。E-mail: bn990918@163.com

***通信作者：**李　肖，讲师，研究方向为中药药效物质基础与作用机制。E-mail: lixiaoedu@126.com

张　振，教授，研究方向为中药药效物质基础与药物创新。E-mail: zhangzhen19801981@126.com

databases were used for compound targets prediction; R language was used to perform Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on targets; Protein-protein interaction network, compound-target network and key compound-target-pathway network were constructed and combined with network contribution index to screen key HCC targets, key anti-HCC compounds and their targets, core anti-HCC compounds and their targets; Molecular docking of core compounds and core targets was performed using Autodock Vina software. The anti-HCC activities and mechanism of predicted components were verified by cellular assays. **Results** There were 33 anti-HCC active compounds, 180 anti-HCC targets and 112 key HCC targets in *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair; There were 29 key ingredients, corresponding to 15 targets; KEGG pathway analysis showed that key targets involved cell cycle, cellular senescence, p53 signaling pathway, etc. Six core ingredients (formononetin, astragaloside II, astragaloside IV in *Astragali Radix*, bisdemethoxycurcumin, curcumin, curcumol in *Curcumae Rhizoma*) corresponding to five targets [cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), topoismoerase 2a (TOP2a), aurora B (AURKB), check point kinase 1 (CHEK1) and AURKA]; The results of cell experiment showed that six compounds of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells ($P < 0.01$), astragaloside II and bisdemethoxycurcumin had a synergistic effect; Astragaloside II and bisdemethoxycurcumin significantly induced cell cycle arrest in G_2/M phase by downregulating cell cycle related protein expression levels ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Compounds of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair may play a synergistic effect to inhibit the proliferation of HCC cells through cell cycle, cellular senescence, p53 signaling pathway and other related pathways by the same or different targets.

Key words: *Astragali Radix*; *Curcumae Rhizoma*; hepatocellular carcinoma; combination mechanisms; bioinformatics; network pharmacology; cell cycle; astragaloside II; bisdemethoxycurcumin

原发性肝癌是我国第 4 位常见恶性肿瘤及第 2 位肿瘤致死病因，其中约 90%为肝细胞癌[1]。肝癌的发生、发展机制复杂，涉及多个原癌基因以及信号通路[2]。近年来，中药在肝癌的预防、控制转移与复发等方面所具有的优势，使其成为抗肝癌新药研发的热点和方向[3-5]。目前中医药界对于肝癌的理论及治疗研究逐渐增多，并形成了较为统一的认识，其病机在于气虚血瘀，其治法以益气活血为主[6]。黄芪-莪术是益气活血法代表性药对，源于张锡纯所著《医学衷中参西录》中的理冲汤，主治气虚血瘀证[7]。从中医理论讲，黄芪味甘性微温，可补气升阳，为“补中益气之要药”[8]；莪术辛散苦泄，能破血散瘀，又能行气化积，是“破血化瘀之重药”[9]；两药配伍使用“破中有补，补中有行，相得益彰”从而达到“补而不滞”之效，为益气活血配伍的典型代表[10]。孙桂芝教授擅用桃红芪术软肝煎起益气活血之效，认为黄芪-莪术配伍治疗肝癌时能够补脾胃、破癥消积，对肝癌有很好的抑制作用，在临床实践中运用此法与化疗联合使用，能够明显改善肝癌患者的生存质量，在提高肝癌远期疗效上具有一定优势[11-13]。黄芪-莪术药对配伍治疗肝癌的作用确切，在抗肝癌中药中具有重要地位，但是黄芪-莪术药对抗肝癌的配伍机制尚不明确。本研究整合生物信息学与网络药理学预测黄芪-莪术药对治疗肝癌的相关靶点和通路，将筛选得到的核心成分与靶点进行分子对接，探究黄芪-莪术药对的多成分、多靶点、多通路的配伍协同作用机制，并采用体外细胞实验对核心成分和靶点进行验证。系统研究黄芪-莪术药对抗肝癌配伍机制，不仅可为含有该药对的抗肝癌系列类方的研究提供参考，而且有利于指导中医临床的合理用药，同时为该类方的质量控制和新药研发提供重要的科学依据，为肝癌这一发病率日趋升高、严重威胁人类健康的重大疑难疾病治疗做出贡献。

1 材料

1.1 细胞株

人肝癌 HepG2 细胞、人正常 LO2 肝细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

DMEM 高糖培养基（批号 G4511-500ML）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 GC203002-100ml）购自武汉塞维尔生物科技有限公司；胰蛋白酶（批号 C0208-500ml）、RIPA 强裂解液（批号 P0013B）、MTT（批号 ST316）购自上海碧云天生物科技有限公司；黄芪皂苷 II（批号 SJ-MN1426）、黄芪甲苷（批号 SJ-MN0659）、芒柄花素（批号 SJ-MN0281）、姜黄素（批号 SJ-MN0060）、莪术醇（批号 SJ-MN0198）、双去甲氧基姜黄素（批号 SJ-MN1811）购自山东思科捷生物技术有限公司，质量分数均≥98%；细胞周期蛋白依赖性激酶 1（cyclin-dependent kinase 1，CDK1）抗体（批号 db12527）、细胞周期蛋白 B1（cyclin B1，CCNB1）抗体（批号 db13323）购自杭州戴格生物技术有限

公司；β-actin 抗体（批号 PTG81115-1-RR）购自武汉三鹰生物技术有限公司；HRP 标记的山羊抗兔单克隆抗体（批号 AS014）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

BB150 型 CO_2 细胞恒温培养箱、NanoDrop™ Lite 微量分光光度计、Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪号（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；电泳仪、ChemiDoc XRS＋凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；Centrifuge 5425R 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Accuri C6 Plus 型流式细胞仪（美国 BD 公司）。

2 方法

2.1 生物信息学分析

2.1.1 肝癌靶点筛选 以“hepatocellular carcinoma”为关键词在 NCBI（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）GEO 数据库中检索并下载与肝癌相关的 GSE57957[14]、GSE60502[15]、GSE84402[16]基因表达谱，芯片平台分别为 GPL10558、GPL96[HG-U133A]、GPL570[HG-U133_Plus_2]，共收集 142（78、36、28）例样本，其中肝癌组织样本 71（39、18、14）例，癌旁组织样本 71（39、18、14）例。将以上 3 个基因表达谱通过归一化和基于 $\log_2$ 转化进行定量，之后使用 R 软件包 stats（version 3.6.0）进行主成分分析（principal component analysis，PCA）[17]，同时使用 R 软件包“Limma”包[18]（version 3.40.6）进行差异表达基因（differential expression genes，DEGs）筛选，筛选条件为$|\log_2 FC|>1$［FC 表示倍数变化（fold change）］和 P 值＜0.05，将 3 组数据集筛选得到的 DEGs 合并，作为肝癌靶点。

2.1.2 肝癌关键靶点筛选 通过 STRING（https://cn.string-db.org/）数据库对“2.1.1”项下肝癌靶点进行分析，设置物种为“Homo sapiens”，所有参数选择默认值，导出 tsv 格式的数据并输入到 Cytoscape（version 3.9.1）软件中构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，然后利用 MCODE 插件对 PPI 网络中联系紧密的功能模块进行分析，分析条件为“Degree Cutoff＝2、Node Score Cutoff＝0.2、k-Core＝2、Max. Depth＝100”。将得分最高的功能模块的子网中所含靶点作为肝癌关键靶点[19]。

2.1.3 黄芪、莪术化学成分收集及潜在活性成分筛选 在 TCMSP（https://tcmspw.com/tcmsp.php）数据库中对黄芪、莪术成分进行检索；将人体口服生物利用度（oral bioavailability，OB）≥30%、药物相似性（drug-likeness，DL）≥0.18 的成分作为潜在活性成分，并结合文献报道，将具有体内外抗癌活性的黄芪、莪术成分补充到潜在活性成分中[20-21]。

2.1.4 黄芪、莪术活性成分靶点预测与抗肝癌靶点筛选 在 PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库中检索“2.1.3”项下活性成分的 Isomeric SMILES 数据，将该数据输入 SEA（http://sea.bkslab.org/）和 SwissTargetPrediction（http://www.swisstargetprediction.ch/）2 个数据库，预测成分靶点，与 TCMSP 数据库中的靶点取并集得到潜在活性成分作用靶点，并在 Uniprot 数据库中对靶点基因名称进行校正，使蛋白质靶点信息标准化[22]。将成分作用靶点与“2.1.1”项下所筛选肝癌靶点取交集，得到黄芪、莪术抗肝癌靶点。

2.1.5 黄芪、莪术抗肝癌关键成分筛选 将“2.1.4”项下潜在活性成分靶点与“2.1.2”项下所筛选肝癌关键靶点取交集，采取疾病关键靶点“反向钩钓”关键潜在活性成分的方式，得到黄芪、莪术抗肝癌关键成分及其靶点。

2.1.6 黄芪、莪术抗肝癌靶点及关键靶点京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析 通过 KEGG rest API（https://www.kegg.jp/kegg/rest/keggapi.html）获取最新 KEGG 通路基因注释，使用 R 软件包 cluster Profiler（version 3.14.3）进行富集分析，设定阈值最小基因集为 5、最大基因集为 5 000、P＜0.05、FDR＜0.1，根据包含靶点数量筛选排名靠前的 KEGG 富集信息[23]。

2.1.7 拓扑网络构建与分析 采用 Cytoscape（version 3.9.1）软件构建肝癌关键靶点的 PPI 网络、成分-靶点网络、关键成分-靶点-通路网络。通过 Network Analyzer 插件对关键成分-靶点-通路网络的拓扑性质进行分析，获取成分、靶点、通路相关介数值。

2.1.8 黄芪、莪术抗肝癌核心成分及其抗肝癌核心靶点筛选 通过 1 种网络贡献指数（CI）评价黄芪-莪术抗肝癌成分发挥抗肝癌作用的贡献大小[24]。

$$A_{ij}=\omega_{ei}+|(C_{Ai}+C_{Bi})/(C_{Ai}-C_{Bi})|$$

$$\omega_{ei}=C_{edge}/T_{edge}$$

$$NE_i=\sum_{ij}^{n} C_i\times(A_{ij}\times P_j)$$

$$CI_i=NE_i/\sum_{ij}^{n} NE_i\times 100$$

i 为成分的数量；j 为靶点的数量；ω_{ei} 为网络节点参数；A_{ij} 为根据 ω_{ei} 值确定的亲和力指数；C_{Ai} 为黄芪关键成分-靶点-通路网络中每种抗肝癌成分的介数；C_{Bi} 为莪术关键成分-靶点-通路网络中每种抗肝癌成分的介数，C_i 为每种抗肝癌成分的介数；P_j 为每种靶点的介数，以参数由关键成分-靶点-通路网络中获得；NE_i 为网络中 1 种抗肝癌成分的网络贡献；CI 为抗肝癌成分发挥抗肝癌作用的贡献大小

以“hepatocellular carcinoma”和“liver cancer”及活性成分的常用名称用作为关键词，检索 1990—2018 年出版于 PubMed 和 CNKI 数据库中的相关文献。如果前 N 个成分的 CI 总和超过 50%，则认为这些相关的 N 个成分对黄芪和莪术发挥抗肝癌作用的贡献最大；CI 总和超过 90%，则认为这些相关的 N 个成分对黄芪和莪术发挥抗肝癌作用的贡献最主要。核心成分在关键成分-靶点-通路网络中所调节的介数大于 5 的靶点为抗肝癌核心靶点。

2.1.9 黄芪、莪术抗肝癌核心成分与靶点分子对接验证 在 PubChem 数据库中获得化合物的 SDF 文件，然后通过 Open Babel 3.1.1 软件将获得的 SDF 文件转化为 MOL2 格式；从 AlphaFold 蛋白质结构数据库（AlphaFold Protein Structure Database，https://alphafold.ebi.ac.uk/）获取抗肝癌核心靶点的 PDB 文件；靶蛋白与化合物均使用 Auto Dock Tools1.5.6 去除水分子、加氢、计算电荷等前处理，转化为 PDBQT 格式；利用 Autodock Vina 1.1.2 软件进行分子对接，分子对接的结合能越低表示构象越稳定，对结果进行分析，绘制分子对接结合能热图[21]。

2.1.10 核心基因在肿瘤及正常组织表达量差异分析 在癌症基因组图谱（cancer genome atlas，TCGA）网站中得到核心基因在肿瘤组织及正常组织中的表达量，进行差异表达分析[25]。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 MTT 实验 将处于对数生长期的 HepG2 和 LO2 细胞分别以 5 000 个/孔接种到 96 孔板中，培养 24 h 后，分别给予不同浓度的黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、芒柄花素、莪术醇、姜黄素、双去甲氧基姜黄素，对照组加入不含药物的培养基，同时设置调零孔（不接种细胞），处理 24、48、72 h，处理后每孔加入 10 μL MTT（5 mg/mL），37 ℃孵育 4 h；去上清，加入 100 μL DMSO 终止孵育，使用酶标仪测定 570 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞存活率。

细胞存活率＝($A_{给药}-A_{调零}$)/($A_{对照}-A_{调零}$)

2.2.2 药物协同作用研究 根据“2.2.1”项结果，从黄芪、莪术各成分中各选 1 个作用效果最佳的单体，进行药物协同作用研究。细胞存活率的结果通过 Chou-Talalay 模型进行分析，以评价黄芪-莪术成分配伍的协同作用，明确最佳协同剂量，CompuSyn 软件采用 Chou-Talalay 模型计算药物组合的组合指数，组合指数＝1 为加和效应，组合指数＜1 为协同作用，组合指数＞1 为拮抗作用[24]。

2.2.3 流式细胞术检测细胞周期 将 HepG2 细胞以 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中，培养 24 h 后分别给予黄芪皂苷 II（5 μmol/L）、双去甲氧基姜黄素（5 μmol/L）及黄芪皂苷 II（2.5 μmol/L）＋双去甲氧基姜黄素（2.5 μmol/L），以不含药液的培养基作为对照，处理 24 h 后收集细胞，细胞密度调整为 1×10^6 个/mL，用预冷的 PBS 洗涤 2 次，然后加入 500 μL 预冷的 70%乙醇固定，−4 ℃过夜，细胞离心后在沉淀中加入 100 μL RNaseA 溶液，37 ℃孵育 30 min，加入 400 μL 碘化丙啶（PI）染色液，于 4 ℃避光孵育 30 min 后上机检测[26]。

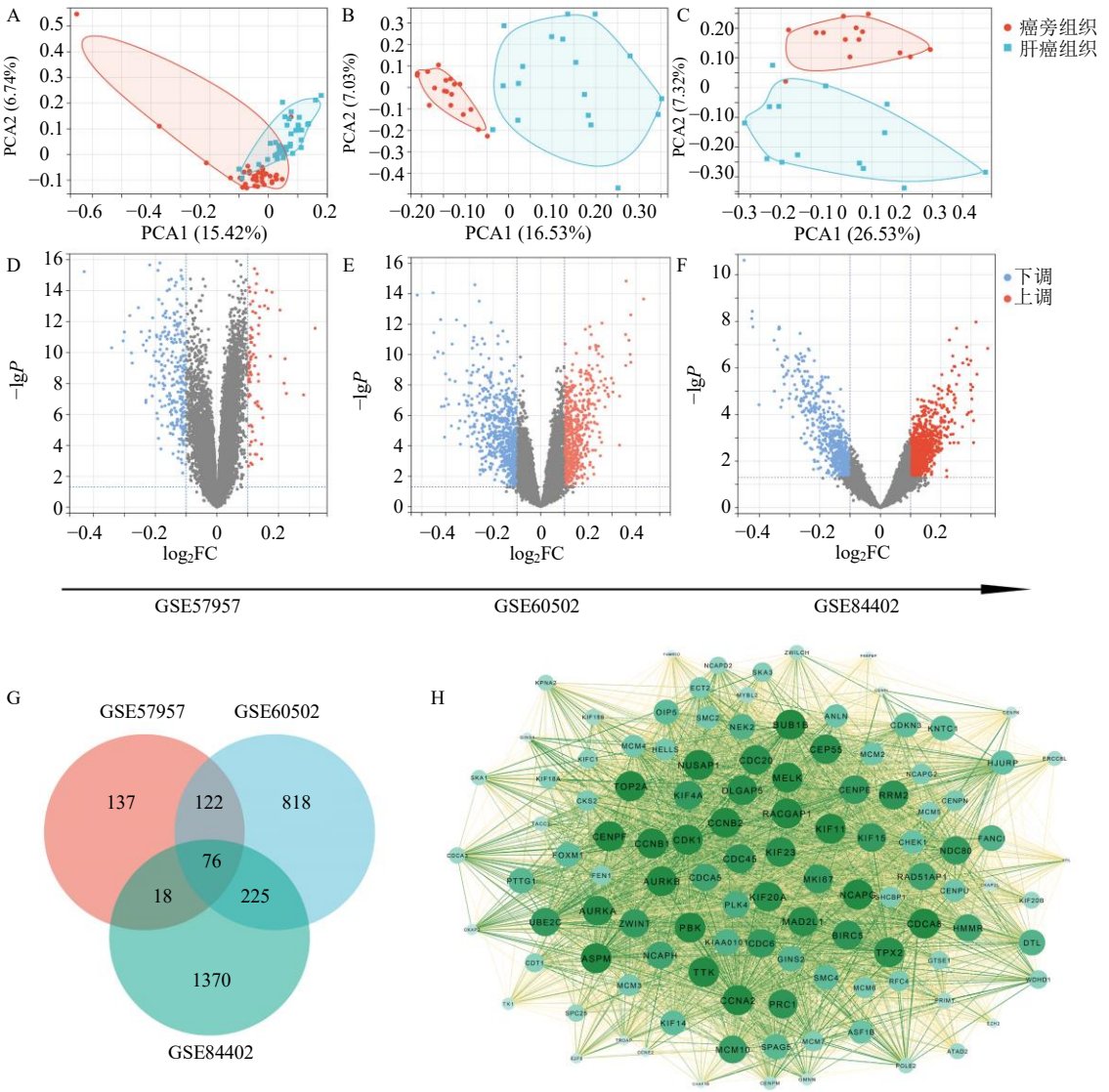
2.2.4 Western blotting 法检测蛋白表达 选择“2.2.2”项单体对应的靶点在 Pymol 软件中进行分子对接可视化，并通过 Western blotting 实验验证单体对蛋白表达的影响。分组与给药同“2.2.3”项，收集药物作用后的 HepG2 细胞，加入细胞裂解液提取总蛋白，使用 Nanodrop lite 检测蛋白浓度，蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，经 5%脱脂奶粉封闭后，加入一抗，4 ℃孵育过夜；加入二抗，37 ℃孵育 2 h，使用 ECL 化学发光试剂盒显影，采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.5 统计学分析 数据使用 Graphpad Prism 9.5 软件处理，采用单因素方差分析进行组间统计。

3 结果

3.1 肝癌靶点及关键肝癌靶点

对 GSE57957、GSE60502、GSE84402 肝癌基因表达数据进行 PCA，结果显示在 3 个数据集中，肝癌组织与癌旁组织基因表达均能明显区分（图 1-A～C）；进一步 Limma 分析，结果显示在 3 组数据中 DEGs 分别有 353 个（上调 85 个，下调 268 个）、1 241 个（上调 575 个，下调 666 个）、1 689 个（上调 1 031 个，下调 658 个，图 1-D～F）；将以上 3 组数据中的 DEGs 取并集，共得到肝癌靶点 2 766 个（图 1-G）；进一步疾病关键靶点分析，结果显示 PPI 网络中得分最大为 97.33 的 MCODE 功能模块所含有的 112 个靶点为肝癌关键靶点（图 1-H）。



A～C-PCA 图；D～F-差异基因火山图；G-Venn 图；H-肝癌靶点 PPI 网络图。

A—C-PCA plot; D—F-differential gene volcano plot; G-Venn plot; H-PPI network plot of key hepatocellular carcinoma.

图 1　肝癌靶点及关键肝癌靶点分析

Fig. 1　Analysis of targets and key targets of hepatocellular carcinoma

3.2　黄芪、莪术活性成分及其抗肝癌靶点和 KEGG 通路

通过检索 TCMIP 数据库，得到黄芪化学成分 87 种，经筛选潜在活性成分 26 种，其中 OB≥30%、DL≥0.18 的成分 20 种（AR-1～AR-20），通过文献补充的成分 6 种（AR-21～AR-26）；得到莪术化学成分 81 种，经筛选潜在活性成分 13 种，其中 OB≥30%、DL≥0.18 的成分 3 种（CR-1～CR-3），通过文献补充的成分 10 种（CR-4～CR-13），黄芪与莪术共有成分 1 种（常春藤皂苷元），共得到黄芪-莪术药对潜在活性成分 38 种（表 1）。

采用 TCMSP、SEA、SwisstargetPrediction 数据库预测得到 38 种潜在活性成分靶点 1 177 个，与“3.1”项下 2 766 个肝癌靶点取交集，得到黄芪-莪术抗肝癌活性成分 33 个，其中黄芪 22 个（无 AR-7、AR-13、AR-15、AR-20），莪术 12 个（无 CR-9），两者共有成分 1 个（AR-3、CR-1），对应抗肝癌靶点 180 个，其中黄芪独有靶点 77 个、莪术独有靶点 14 个、两者共有靶点 89 个（图 2-A）。

分别对黄芪 166 个靶点、莪术 103 个靶点进行 KEGG 富集分析，根据包含靶点数量筛选排名前 20 的通路，结果显示，黄芪与莪术所调节的 20 条通路中，共有通路有 9 条；其中黄芪中排名前 5 位的通路分别为代谢途径、癌症的通路、神经活性配体-受

表 1 黄芪、莪术活性成分

Table 1 Active components of *Astragali Radix* and *Curcumae Rhizoma*

ID	成分	OB/%	DL	PubChem CID	ID	成分	OB/%	DL	PubChem CID
AR-1	白桦脂酸	55.38	0.78	64971	AR-20	槲皮素	46.43	0.28	5280343
AR-2	华良姜素	50.83	0.29	5318869	AR-21*	毛蕊异黄酮苷	10.05	0.81	5318267
AR-3	常春藤皂苷元	36.91	0.75	73299	AR-22*	黄芪皂苷II	46.06	0.13	13996693
AR-4	(24*S*)-24-propylcholesta-5-ene-3beta-ol	36.23	0.78	15976101	AR-23*	黄芪皂苷III	31.83	0.10	441905
AR-5	异鼠李素	49.60	0.31	5281654	AR-24*	异阿魏酸	50.83	0.06	736186
AR-6	3,9-di-*O*-methylnissolin	53.74	0.48	15689655	AR-25*	阿魏酸	54.97	0.06	445858
AR-7	5′-hydroxyiso-muronulatol-2′,5′-di-*O*-glucoside	41.72	0.69	—	AR-26*	黄芪甲苷	22.50	0.15	13943297
					CR-1	常春藤皂苷元	36.91	0.75	73299
AR-8	7-*O*-methylisomucronulatol	74.69	0.30	15689652	CR-2	wenjine	47.93	0.27	101603568
AR-9	黄芪异黄烷苷	36.74	0.92	74977390	CR-3	双去甲氧基姜黄素	77.38	0.26	5315472
AR-10	黄芪紫檀烷	64.26	0.42	14077830	CR-4*	新莪术二酮	36.65	0.08	24836956
AR-11	联苯双酯	31.10	0.67	108213	CR-5*	吉马酮	32.50	0.07	6436348
AR-12	芒柄花素	69.67	0.21	5280378	CR-6*	莪术二酮	7.00	0.08	6441391
AR-13	异黄烷酮	109.99	0.30	160767	CR-7*	莪术醇	103.55	0.13	14240392
AR-14	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	5280448	CR-8*	姜黄素	5.15	0.41	969516
AR-15	山柰酚	41.88	0.24	5280863	CR-9*	β-榄香烯	25.63	0.06	6918391
AR-16	亚叶酸	68.96	0.71	135483768	CR-10*	β-蒎烯	44.77	0.05	15837102
AR-17	(*R*)-isomucronulatol	67.67	0.26	10380176	CR-11*	右旋龙脑	81.80	0.05	64685
AR-18	isomucronulatol-7,2′-di-*O*-glucosiole	49.28	0.62	15689653	CR-12*	羽扇豆醇	12.12	0.78	259846
AR-19	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy-pterocarpene	39.05	0.48	5316760	CR-13*	β-谷甾醇	5.84	0.71	222284

*通过文献补充的潜在活性成分。

*Potential active ingredients supplemented through literature.

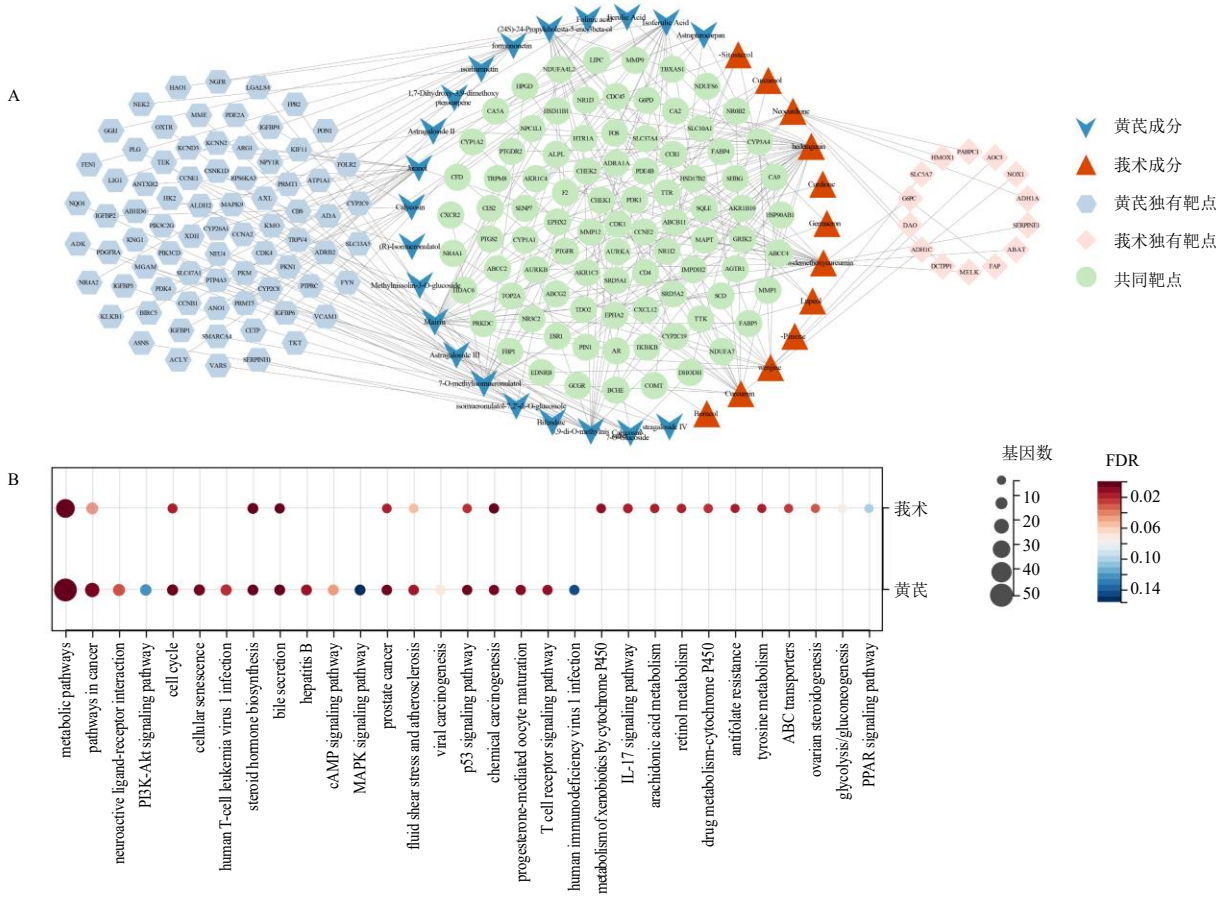


图 2 黄芪-莪术抗肝癌成分-靶点网络 (A) 和 KEGG 富集分析 (B)

Fig. 2 Anti-hepatocellular carcinoma component of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma*-target network (A) and KEGG enrichment analysis (B)

体相互作用、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）-蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路、细胞周期，莪术中排名前 5 位的通路分别为代谢途径、癌症的通路、类固醇激素生物合成、胆汁分泌、化学致癌（图 2-B）。

3.3　黄芪、莪术抗肝癌关键成分及其靶点和 KEGG 通路

通过肝癌关键靶点进行“反向钩钓”，得到黄芪-莪术抗肝癌关键成分 29 种，其中黄芪抗肝癌关键成分 22 种、莪术抗肝癌关键成分 8 种，两者共有抗肝癌关键成分 1 种（常春藤皂苷元，图 3-A）。29 种黄芪-莪术抗肝癌关键成分所调节抗肝癌关键靶点 15 个，对以上靶点进行 KEGG 富集分析，共得到 17 条通路，其中最为重要的细胞过程包含细胞周期、细胞衰老、p53 信号通路、卵母细胞减数分裂、细胞凋亡-多个物种共 5 条信号通路（图 3-B）。

3.4　黄芪、莪术抗肝癌核心成分和靶点的分子对接

通过网络贡献指数模型，计算黄芪-莪术抗肝癌 29 种关键成分的抗肝癌作用贡献指数。根据计算结果，CI 值合计为 55.67%的前 6 种成分均为黄芪成分，表明其抗肿瘤作用贡献最大；CI 值合计为 90.64%的前 17 种成分中莪术成分有 2 种，在一定程度上表明黄芪-莪术配伍发挥协同抗肿瘤作用（图 4-A）。根据成分 CI 值及其所在中药中的相对特异性，选取黄芪中的黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、芒柄花素与莪术中的莪术醇、姜黄素、双去甲氧基姜黄素共 6 种成分作为黄芪-莪术药对的核心代表性成分，与之相对应的 CDK1、DNA 拓扑异构酶 2A（topoisomerase 2A，TOP2A）、极光激酶 B（aurora B，

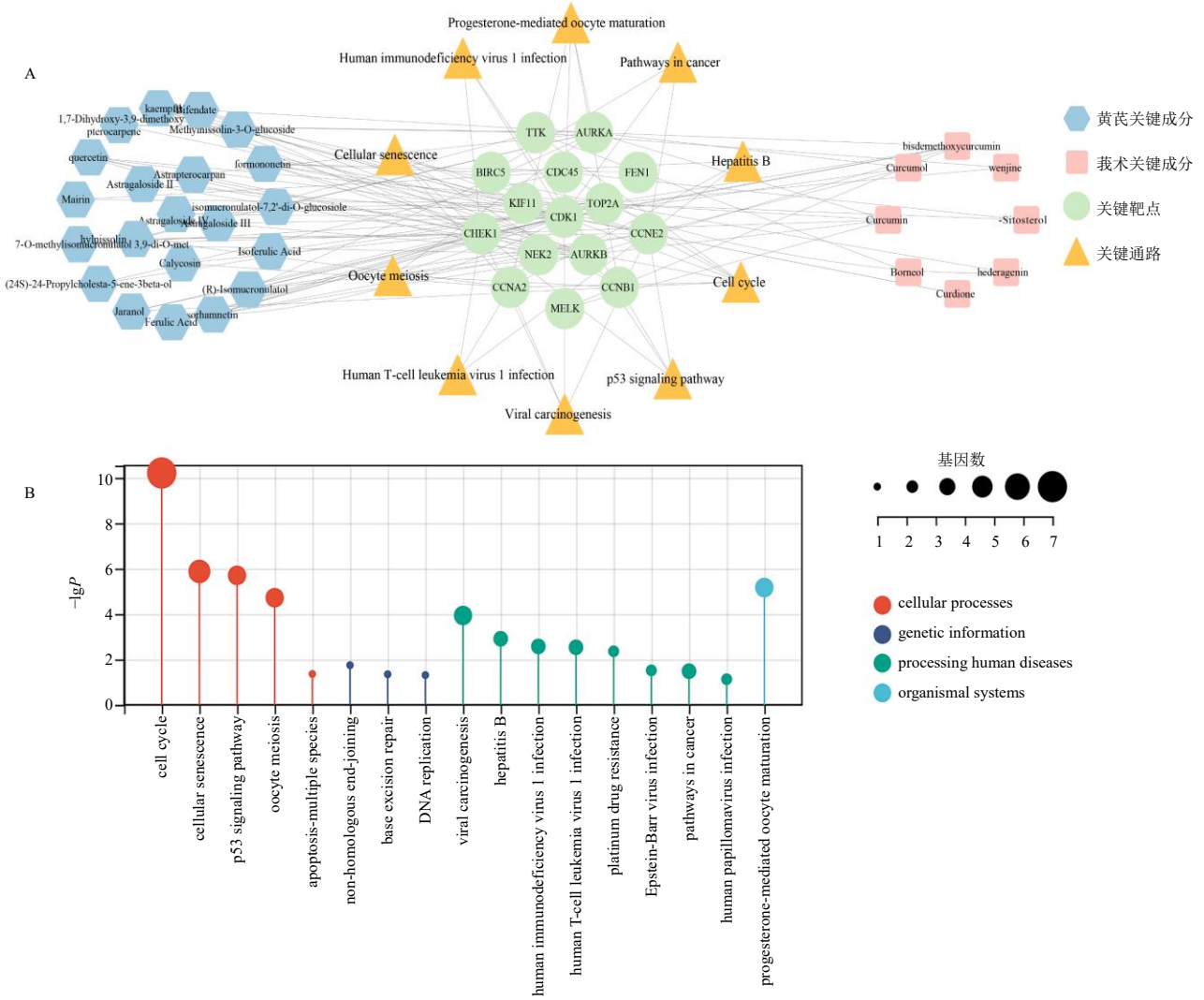
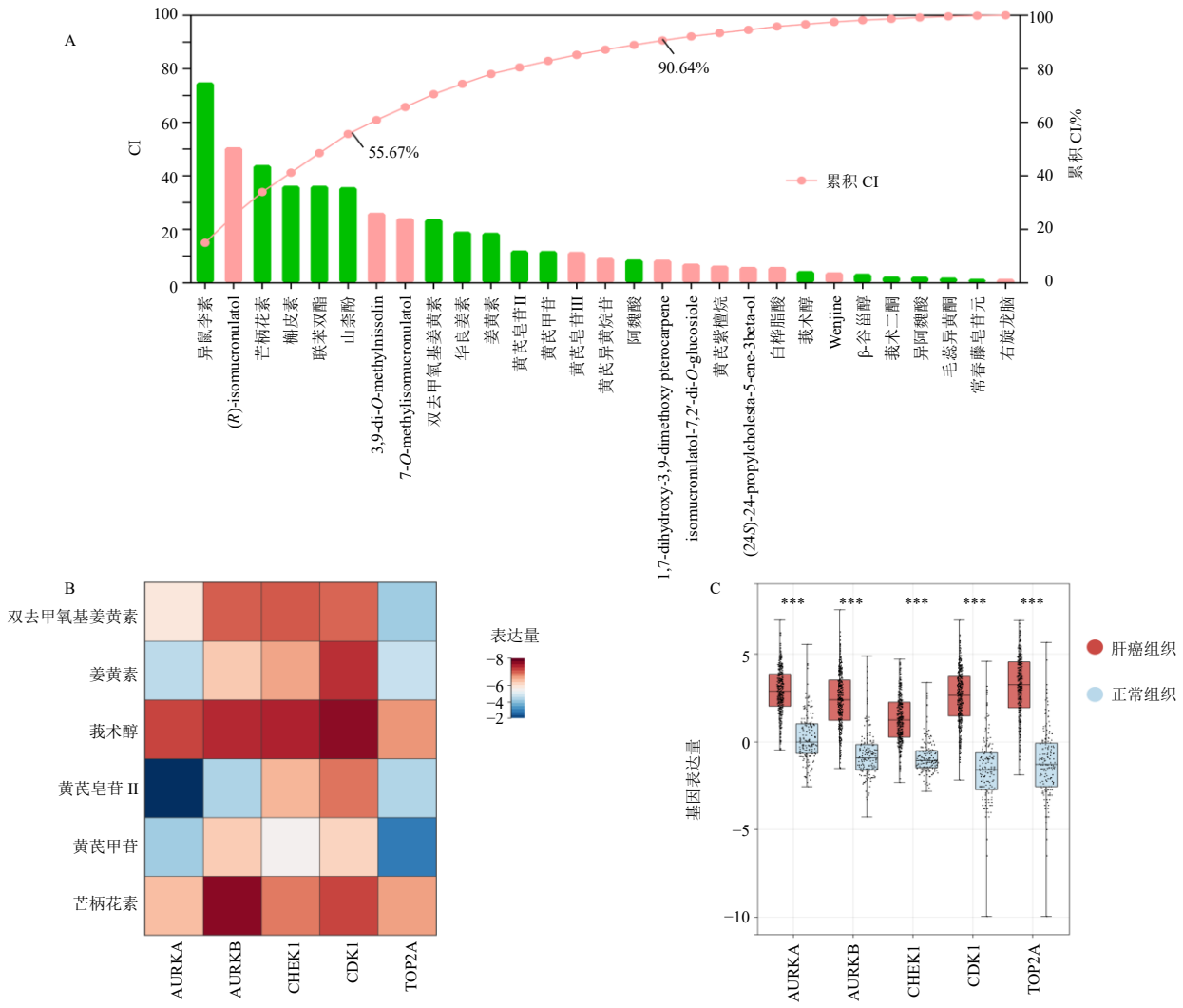


图 3　黄芪-莪术抗肝癌关键成分-靶点-通路网络（A）和 KEGG 富集分析（B）

Fig. 3　Key component of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* against hepatocellular carcinoma-target-pathway network (A) and KEGG enrichment analysis (B)



$^{***}P$<0.001；绿色柱状图代表有文献报道，粉色柱状图代表无文献报道。

$^{***}P$ < 0.001; Green bars represent literature reports, pink bars represent no literature reports.

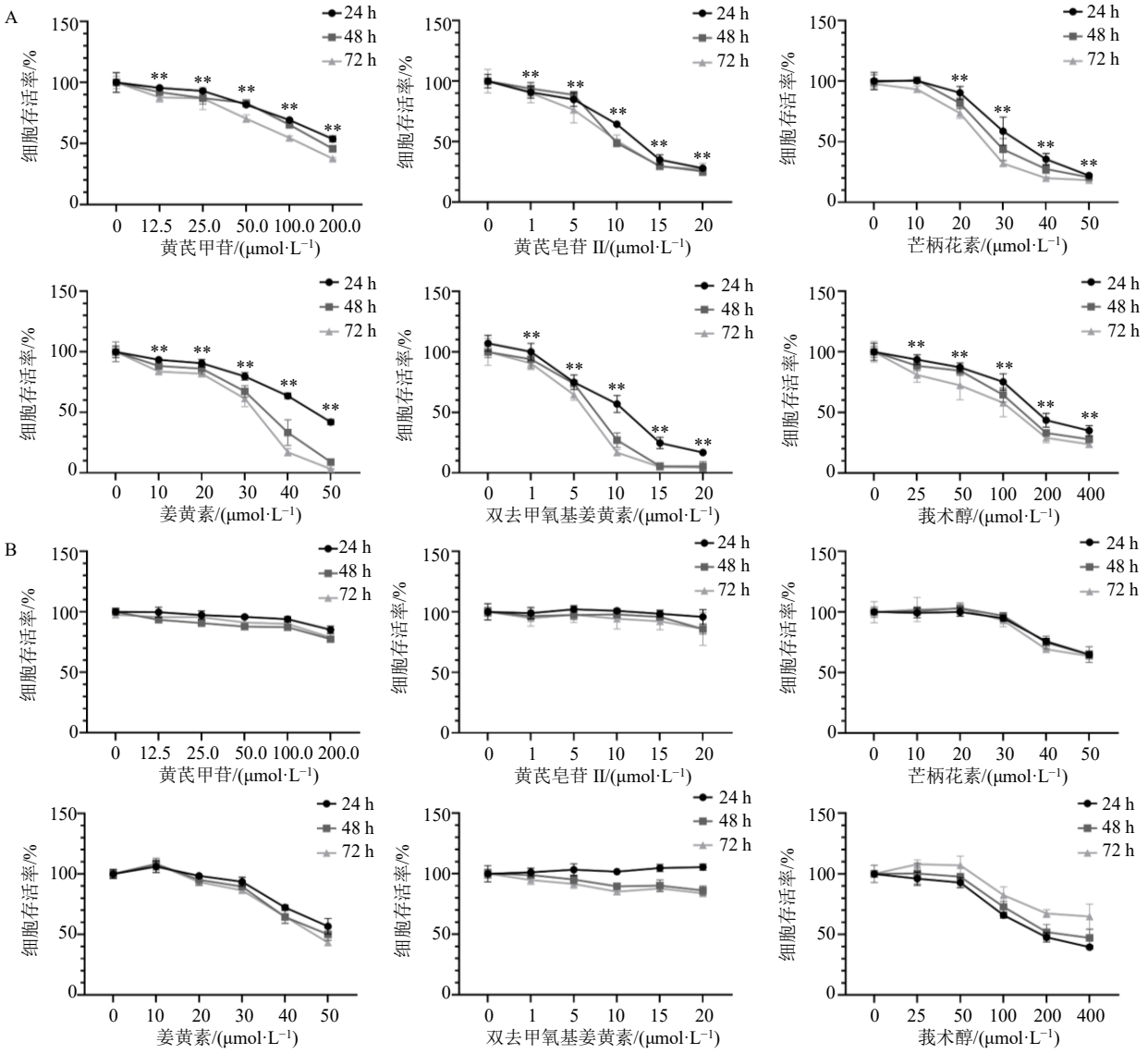
图 4　黄芪-莪术抗肝癌关键成分贡献指数图（A）、分子对接得分热图（B）、正常组织和肿瘤组织核心靶点基因表达（C）

Fig. 4　Contribution index plot of key components of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* against hepatocellular (A), molecular docking score heat map (B), gene expressions of core targets between normal and tumor tissues (C)

AURKB）、检查点蛋白激酶 1（check point kinase 1，CHEK1）、AURKA 共 5 个靶点为核心靶点。对分子对接得分进行热图分析，结果显示 CDK1 与这 6 个核心成分均有较好的结合活性（结合能均＜−5 kJ/moL，图 4-B）。将上述 5 个靶点在肿瘤组织与正常组织之间的表达量差异进行分析，结果显示以上 5 个靶点在肝癌组织及正常组织中的表达均有较大差异（图 4-C）。

3.5　黄芪、莪术活性成分对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

如图 5 所示，不同浓度的黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、芒柄花素、姜黄素、莪术醇、双去甲氧基姜黄素对 HepG2 细胞均有一定的抑制作用，且呈剂量相关性，应用 Graphpad Prism 9.5 软件计算各单体作用于 HepG2 细胞 24 h 的半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）分别为黄芪皂苷 II 12.22 μmol/L、芒柄花素 34.03 μmol/L、黄芪甲苷 223.9 μmol/L、双去甲氧基姜黄素 9.797 μmol/L、姜黄素 46.31 μmol/L、莪术醇 206.7 μmol/L。黄芪甲苷（0～25 μmol/L）、黄芪皂苷 II（0～20 μmol/L）、芒柄花素（0～20 μmol/L）、姜黄素（0～20 μmol/L）、双去甲氧基姜黄素（0～20 μmol/L）、莪术醇（0～50 μmol/L）在一定的浓度范围内对 LO2 细胞活性几乎无影响。



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$，下图同。

$^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$ *vs* control group, same as below figures.

图 5　黄芪-莪术药对活性成分对 HepG2 (A) 及 LO2 (B) 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

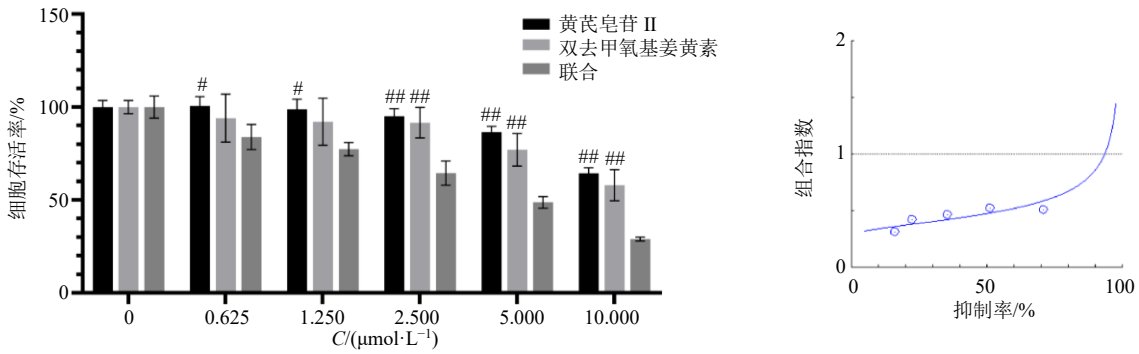
Fig. 5　Effect of active ingredients of *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* herb pair on viability of HepG2 (A) and LO2 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6　药物协同作用研究

为了评价黄芪-莪术药对成分配伍的体外抗肿瘤协同作用，选择双去甲氧基姜黄素和黄芪皂苷 II 进行协同作用研究，通过 Chou-Talalay 数学模型进行协同作用效果评价[27]。结果如图 6 所示，与单独药物作用相比，联合组的细胞活力显著降低（$P<0.05$、0.01）。为了查明该组合是否起到加和作用或协同作用，使用 CompuSyn 软件进一步分析细胞活性数据，结果表明各浓度的双去甲氧基姜黄素和黄芪皂苷 II 在中位有效剂量（组合指数＜1）时均表现出协同作用，其最佳协同剂量为 0.625 μmol/L 黄芪皂苷 II 和 0.625 μmol/L 双去甲氧基姜黄素。

3.7　双去甲氧基姜黄素与黄芪皂苷 II 对 Hep G2 细胞周期的影响

细胞周期检测结果显示，黄芪皂苷 II（5 μmol/L）和双去甲氧基姜黄素（5 μmol/L）以及联合给药（黄芪皂苷 II 2.5 μmol/L＋双去甲氧基姜黄素 2.5 μmol/L）处理 HepG2 细胞 24 h 后可导致细胞周期异常。如图 7 所示，与对照组比较，不同组别药物处理 HepG2 细胞 24 h 后，各组 G_2/M 期的细胞比例



与联合组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$，下图同。

$^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* combination group, same as below figures.

图 6 双去甲氧基姜黄素和黄芪皂苷 II 的协同抗肝癌作用（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 6 Synergistic anti-hepatocellular carcinoma effect of bisdemethoxycurcumin and astragaloside II ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

均升高。与单用黄芪皂苷 II 和双去甲氧基姜黄素组相比，联合组 G_2/M 期细胞比例显著升高（$P<0.01$），上述结果提示黄芪皂苷 II 与双去甲氧基姜黄素均能诱导 HepG2 细胞周期停滞于 G_2/M 期，且联用效果更佳（$P<0.01$）。

3.8 分子对接及 Western blotting 法检测蛋白表达

利用 Pymol 软件将“3.4”项的黄芪皂苷 II、双去甲氧基姜黄素与 CDK1 的对接情况进行可视化，结果如图 8-A 所示，黄芪皂苷 II 与 CDK1 结合能力较强，分别在 ASP-92、GLN-132、THR-14 形成 H 键，

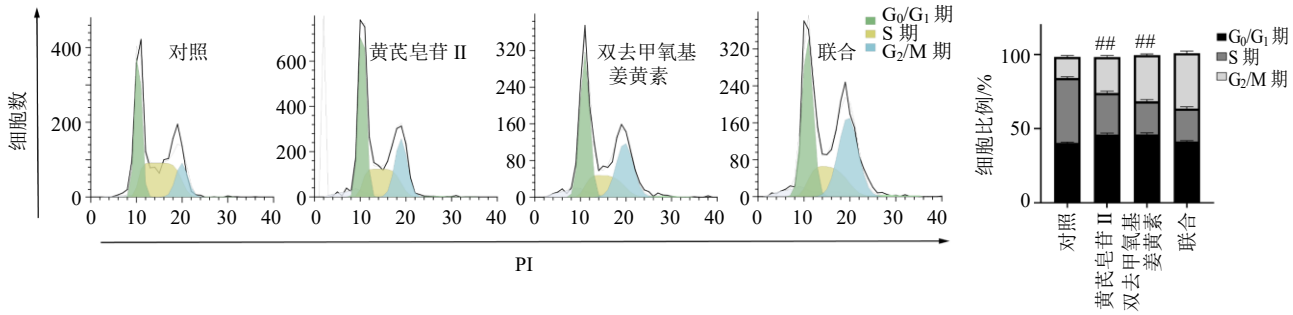


图 7 双去甲氧基姜黄素、黄芪皂苷 II 以及联合组对 HepG2 细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 7 Effect of bisdemethoxycurcumin, astragaloside II and combination group on cycle of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

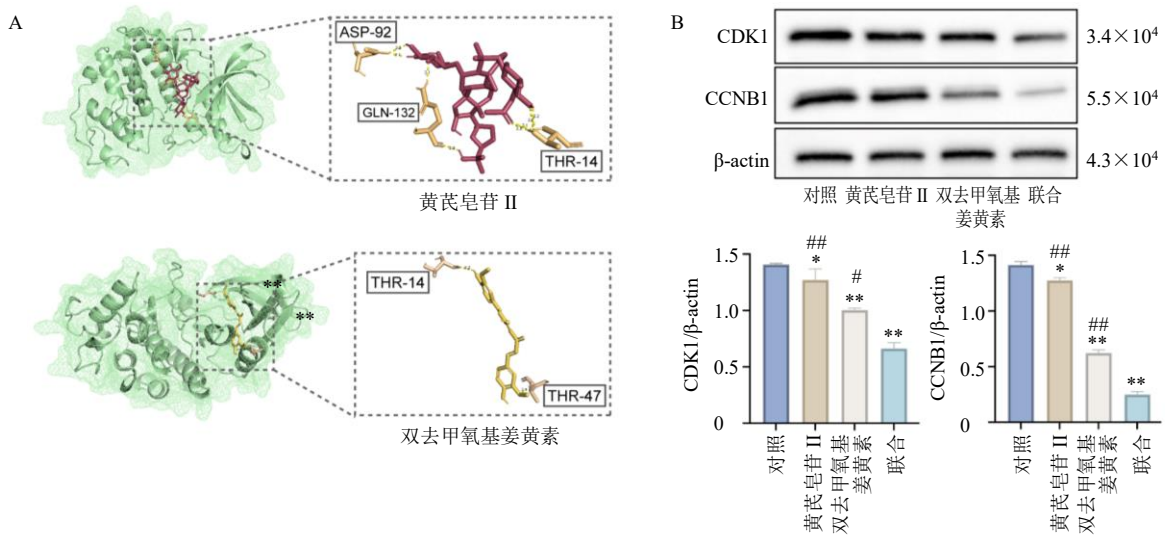


图 8 双去甲氧基姜黄素、黄芪皂苷 II 与 CDK1 的分子对接 (A) 和双去甲氧基姜黄素、黄芪皂苷 II 以及联合组对 HepG2 细胞周期蛋白表达 (B) 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 8 Docking of bisdemethoxycurcumin and astragaloside II to CDK1 (A), effect of bisdemethoxycurcumin, astragaloside II and combination group on cyclin protein expressions (B) in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

结合能为−6.27 kJ/mol；双去甲氧基姜黄素与 CDK1 结合能力较强，分别在 THR-14、THR-47 形成 H 键，结合能为−7.04 kJ/mol。蛋白表达结果显示，黄芪皂苷 II（5 μmol/L）组、双去甲氧基姜黄素（5 μmol/L）组以及联合组细胞 CDK1 和 CCNB1 蛋白表达水平均显著低于对照组（P＜0.05、0.01），且联合组效果较单药组显著（P＜0.05、0.01，图 8-B）。

4 讨论

古今医家多认为正气亏虚为肝癌的发病内因和前提，瘀血凝滞是肝癌发病的基本病理因素，正气不足、瘀血阻滞始终伴随着肝癌的发生、发展和转移[28]。因此临床治疗肝癌常将黄芪、莪术等益气药与活血药配伍使用，不仅可辅助正气，同时能行气活血，两者兼顾，共凑扶正祛邪之效[11-13,29-30]。

本研究利用生物信息学结合网络药理学与分子对接技术探究黄芪-莪术药对治疗肝癌的活性成分、潜在靶点和信号通路，进而揭示其配伍机制。结果显示，黄芪-莪术抗肝癌活性成分 33 种，其中黄芪 22 种、莪术 12 种、两者共有成分 1 种；对应抗肝癌靶点 180 个，其中黄芪调节 77 个、莪术调节 14 个、两者共同调节 89 个；KEGG 通路富集分析显示黄芪-莪术药对调节抗肝癌通路 31 条，其中黄芪调节 20 条、莪术调节 20 条、共同调节 9 条。以上结果从成分、靶点、通路 3 个方面揭示了黄芪、莪术配伍协同抗肝癌的科学内涵。

KEGG 通路结果显示黄芪-莪术药对主要通过细胞周期、细胞衰老、p53 信号通路、细胞凋亡、代谢通路等发挥抗肝癌作用。其中细胞周期、p53 信号通路是与肿瘤发生发展密切相关的信号通路，在调控肝癌细胞周期、增殖、凋亡、细胞代谢等行为上发挥重要作用。p53 作为一种转录因子，通过调节其下游基因的表达来调控细胞周期阻滞、细胞衰老、DNA 修复和细胞凋亡等过程，p53 缺失不仅会引起细胞分裂的增加和细胞存活率的提高，还会引起更具侵袭性的行为和基因组不稳定性的增加[31]。p53 下游靶蛋白 p21 和 CDK2 调控细胞周期的进行，CDK2 与 CCNA、CCNE 相互作用可使 Rb 蛋白磷酸化，从而促进细胞从 G_1 期进入 S 期，p21 可以抑制其相互作用从而抑制细胞周期进程[32-33]。

经筛选得到的 6 个核心成分（黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、芒柄花素、姜黄素、双去甲氧基姜黄素、莪术醇），均具有不同程度的抗肿瘤作用，其调控的 5 个核心基因（*CDK1*、*CHEK1*、*TOP2A*、*AURKA*、*AURKB*），在肿瘤发生发展过程中同样具有重要的调控作用。研究表明，AURK 是一类丝/苏氨酸激酶，可以通过干扰中心体、纺锤体以及染色体的功能影响细胞的有丝分裂，AURKA 调节有丝分裂早期中心体成熟，参与建立双极纺锤体，其功能的有效发挥离不开周期蛋白 B 与 CDK 复合物（cyclin B-CDK1）的正常作用，活化的 cyclin B-CDK1 可以使蛋白磷酸酶 1（protein phosphatase 1，PP1）失活，PP1 可以抑制 AURKA 活性[34]。CDK1 是调控细胞周期的关键蛋白，CHEK1 为调控 CDK 蛋白的上游蛋白，CHEK1 的磷酸化能够导致细胞分裂周期因子 25A/C（cell division cyclin 25A/C，CDC25A/C）的磷酸化失活，从而抑制 CDK1 进入有丝分裂 G_2/M 期[35]。分子对接结果显示核心成分（黄芪甲苷、黄芪皂苷 II、芒柄花素、姜黄素、双去甲氧基姜黄素、莪术醇）与核心靶点（CDK1、CHEK1、TOP2A、AURKB、AURKA）结合能较强，可能存在较好的结合活性。研究发现，芒柄花素通过环氧合酶-2/CCND 轴将人肝癌 Bel-7402 细胞和 HepG2 细胞阻滞于 G_0/G_1 期[36-37]；莪术醇可以阻滞 HepG2 细胞于 G_1 期[38]；黄芪甲苷能够上调具有低转移潜能和高转移潜能的人肝癌 Huh7 细胞和人肝癌 MHCC97-H 细胞中 E-钙黏蛋白的蛋白水平并促进其在细胞膜上积累，使得细胞间连接更加紧密从而降低转移扩散能力；姜黄素能够通过激活 Huh7 细胞内死亡受体介导的通路诱导凋亡[39]；且黄芪甲苷与姜黄素联用对血管生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、基质金属蛋白酶 2（matrix metallopeptidase 2，MMP2）、成纤维细胞生长因子-2（fibroblast growth factor-2，FGF-2）、肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）以及血栓形成相关因子组织因子（tissue factor，TF）和凝血因子 VII 有协同抑制作用[40]。

通过体外细胞实验验证了黄芪-莪术药对 6 个核心成分对 HepG2 细胞的增殖均具有明显的抑制作用。协同作用分析结果显示，黄芪中的黄芪皂苷 II 和莪术中的双去甲氧基姜黄素配伍有协同作用，其最佳协同剂量为黄芪皂苷 II 0.625 μmol/L、双去甲氧基姜黄素 0.625 μmol/L。2 个成分配伍使用可协同增效抑制周期调控蛋白 CDK1 和 CCNB1 的表达，进而诱导 HepG2 细胞停滞于 G_2/M 期。

本研究基于生物信息学数据，结合网络药理学方法与分子对接技术及细胞实验证明了黄芪、莪术

配伍能够通过多成分、多靶点、多通路在肝癌治疗中发挥协同作用，为更准确寻找、确认和优化黄芪、莪术发挥抗肝癌效应的有效成分与靶点的作用，推动临床应用提供新的见解。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *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] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462.

[3] Li Y Y, Li Y, Zhang J H, *et al*. Current perspective of traditional Chinese medicines and active ingredients in the therapy of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2022, 9: 41-56.

[4] Liu X L, Li M G, Wang X H, *et al*. Effects of adjuvant traditional Chinese medicine therapy on long-term survival in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152930.

[5] Wei L, Wang Z Y, Jing N C, *et al*. Frontier progress of the combination of modern medicine and traditional Chinese medicine in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 90.

[6] 王歆圆. 益气活血组方治疗原发性肝癌的临床疗效 Meta 分析 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.

[7] 王惠. 理冲汤加减方联合 5-氟尿嘧啶对肝癌上皮间质转化影响的实验研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.

[8] Liang X L, Jia M M, Chen L, *et al*. Traditional Chinese herbal medicine *Astragalus Radix* and its effects on intestinal absorption of aconite alkaloids in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2021, 13(2): 235-242.

[9] Li Z Y, Hao E W, Cao R, *et al*. Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 479-493.

[10] 许成勇. 窦永起教授治疗肿瘤学术思想总结及黄芪-莪术配伍抗肿瘤血管生成机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2018.

[11] 王靖思, 陈兰羽, 刘玉琴, 等. 孙桂芝从补脾胃、治未病论治肝癌经验 [J]. 中医杂志, 2015, 56(13): 1096-1098.

[12] 王靖思. 从桃红芪术软肝煎抗肝纤维化探讨孙桂芝教授防治肝癌经验内涵 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.

[13] 王靖思, 孙桂芝, 赵杰. 孙桂芝“益气活血软坚解毒法”论治原发性肝癌经验介绍 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(1): 112-114.

[14] Mah W C, Thurnherr T, Chow P K, *et al*. Methylation profiles reveal distinct subgroup of hepatocellular carcinoma patients with poor prognosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104158.

[15] Wang Y H, Cheng T Y, Chen T Y, *et al*. Plasmalemmal vesicle associated protein (PLVAP) as a therapeutic target for treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 815.

[16] Wang H, Huo X S, Yang X R, *et al*. STAT3-mediated upregulation of lncRNA HOXD-AS1 as a ceRNA facilitates liver cancer metastasis by regulating SOX4 [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 136.

[17] Giuliani A. The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(7): 1069-1076.

[18] 崔文超, 刘明远, 关宝生, 等. 基于生物信息学结合实验验证的常春藤皂苷元抗肝癌机制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3704-3710.

[19] Mohamad M A, Mohd Manzor N F, Zulkifli N F, *et al*. A review of candidate genes and pathways in preeclampsia-an integrated bioinformatical analysis [J]. *Biology*, 2020, 9(4): 62.

[20] Wei X, Zhou R P, Chen Y, *et al*. Systemic pharmacological verification of Baixianfeng Decoction regulating TNF-PI3K-Akt-NF-κB pathway in treating rheumatoid arthritis [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105519.

[21] 王方园, 王栋, 孔宪斌, 等. 基于网络药理学和分子对接研究丹参-赤芍药对治疗结直肠癌的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5731-5741.

[22] 杨艳妮, 袁培培, 冯敖梓. 基于网络药理学和分子对接技术探讨巴戟天治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1463-1470.

[23] Shen W T, Song Z G, Zhong X A, *et al*. Sangerbox: A comprehensive, interaction-friendly clinical bioinformatics analysis platform [J]. *iMeta*, 2022, 1(3): e36.

[24] 李肖. 柴胡-白芍药对及其成分配伍增效抗抑郁作用与协同机制研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.

[25] 张道平, 刘起立, 姚昆鹏, 等. 基于生物信息学分析肝癌差异基因及潜在的中药干预 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 788-798.

[26] 王森, 戴婷婷, 钟荣玲, 等. 雪胆素片联合阿霉素增强细胞免疫原性死亡的抗肝癌作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3367-3375.

[27] Chou T C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method [J]. *Cancer*

Res, 2010, 70(2): 440-446.

[28] 臧文华, 唐德才. 益气活血法治疗原发性肝癌的理论探讨 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(12): 1498-1500.

[29] 卢冬雪, 祁明浩, 薛恬, 等. 刘沈林治疗晚期消化道肿瘤用药经验 [J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(8): 1064-1068.

[30] 侯智通, 马晓霞, 仪孝臣. 益气活血汤剂配合介入治疗早期原发性肝癌影像学疗效分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 303-304.

[31] Bieging K T, Mello S S, Attardi L D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(5): 359-370.

[32] Du W W, Yang W N, Liu E, *et al*. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(6): 2846-2858.

[33] Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G_1-phase progression [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(12): 1501-1512.

[34] 王佳宝, 徐忠伟, 王志美, 等. 蟾酥活性成分下调极光激酶表达并促进肝癌细胞周期阻滞的机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3796-3801.

[35] Smith H L, Southgate H, Tweddle D A, *et al*. DNA damage checkpoint kinases in cancer [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2020, 22: e2.

[36] 焦文鹏, 焦文静, 张金艳. 刺芒柄花素通过 COX-2/cyclin D1 轴调控肝癌的发生和发展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2021, 28(9): 877-884.

[37] 吴佳菲, 姚映芷, 尹刚, 等. HPLC 对黄芪和莪术单煎、单煎后合并及共煎的有效成分含量分析 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1567-1570.

[38] 黄岚珍, 王娟, 卢菲婷, 等. 莪术醇抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的机制 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1812-1815.

[39] Wang W Z, Li L, Liu M Y, *et al*. Curcumin induces FasL-related apoptosis through p38 activation in human hepatocellular carcinoma Huh7 cells [J]. *Life Sci*, 2013, 92(6/7): 352-358.

[40] Zhang S, Tang D, Zang W, *et al*. Synergistic inhibitory effect of traditional Chinese medicine astragaloside IV and curcumin on tumor growth and angiogenesis in an orthotopic nude-mouse model of human hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(2): 465-473.

[责任编辑 李亚楠]