DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230807.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20230807.1415.002

基于网络药理学和大鼠移植性肝癌模型探讨癌痛消颗粒防治肝癌的分子作用机制

刘 欢[1,2],刘 显[3],金丽杰[2,4],刘莎莎[2,4],韦燕飞[4]✉
(1.广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁 530024;2.广西中医药防治医学分子生物重点实验室,广西 南宁 530024;3.广西中医药大学教学实验实训中心,广西 南宁 530200;4.广西中医药大学基础医学院,广西 南宁 530200)

[摘要] **目的**:利用网络药理学方法探讨癌痛消颗粒(ATXF)防治肝癌的物质基础和作用靶点,并结合大鼠移植性肝癌模型进行初步的验证。**方法**:通过TCMSP数据库收集癌痛消颗粒各中药活性成分及其潜在作用靶点,在GeneCards、OMIN、Drugbank、TTD数据库获取肝癌疾病靶点,取两者交集获得ATXF防治肝癌的潜在作用靶点。使用Cytoscape 3.8软件构建ATXF各成分与肝癌作用靶点的相互作用网络,并对其结果进行可视化分析。使用STRING平台分析ATXF防治肝癌靶点的互作网络,并运用CytoNCA分析各节点之间的拓扑关系,利用中位数筛选获得ATXF防治肝癌的核心靶点。通过Metascape数据分析平台,对获得的核心靶点进行GO、KEGG通路富集分析。采用大鼠腹水癌Walker-256细胞株建立SD大鼠移植性肝癌模型,经ATXF灌药干预15 d后取出瘤块。采用Western blot检测比较治疗组与对照组移植瘤内AKT、pAKT、p53、p-p53、ERK1/2以及p-ERK1/2的蛋白表达水平。**结果**:从ATXF中筛选得到257种活性成分,作用于294个靶点,与7 993个肝癌疾病靶点相映射得到潜在作用靶点231个。进一步筛选获得*AKT1*、*IL6*、*TP53*、*MAPK3*、*TNF*、*JUN*、*CASP3*、*MAPK1*、*MYC*、*PTGS2*、*MMP9*等11个核心靶点,GO及KEGG分析结果显示以上核心靶点富集于HBV、TNF和癌症相关信号通路。大鼠移植瘤实验结果表明,ATXF可显著下调移植瘤内AKT、pAKT、pERK1/2的表达水平,同时显著上调p-p53蛋白表达水平,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:运用网络药理学方法分析发现癌痛消颗粒可作用于多条肿瘤信号通路,并运用大鼠移植瘤实验初步证实ATXF对于AKT、p53以及ERK1/2蛋白具有显著的调控作用,其机制可能是通过调控以上信号通路而发挥抗肝癌作用。

[关键词] 癌痛消颗粒;肝癌;大鼠移植瘤模型;网络药理学;信号转导
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)21-1632-10

Mechanism of AiTongXiao granule in the treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and rat transplanted liver cancer model

LIU Huan[1,2], LIU Xian[3], JIN Li-jie[2,4], LIU Sha-sha[2,4], WEI Yan-fei[4]✉
(1. *The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530024, *China*; 2. *Guangxi Key Laboratory of Molecular Biology of Preventive Medicine of Traditional Chinese Medicine*, *Nanning* 530024, *China*; 3. *Teaching Experiment Training Center of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanning* 530200, *China*; 4. *College of Basic Medicine of Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530200, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by Guangxi Science and Technology Base and Talent Project* (*Guike AD*20297013); *Guangxi Natural Science Foundation Project* (2021*GXNSFBA*220036); *The second batch of "Qihuang Project" High-Level Talent Team Cultivation Project of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine* (2021001)

[*Author*]: *LIU Huan*, *Ph.D.*, *Assistant Researcher*, *E-mail*: *liuchujie@yeah.net.*
[*Correspondence to*]: *WEI Yan-fei*, *Ph.D.*, *Professor*, *E-mail*: *weiyanfei@gxtcmu.edu.cn.*

Received: 2023-06-11 *Revised*: 2023-08-02 *JHMU*, 2023;29(21):1632-1641

[基金项目]广西科技基地和人才专项(桂科AD20297013);广西自然科学基金项目(2021GXNSFBA220036);广西中医药大学第二批"岐黄工程"高层次人才团队培育项目(2021001)
[作者简介]刘欢,博士,助理研究员,E-mail:liuchujie@yeah.net。
[通讯作者]韦燕飞,博士,教授,E-mail: weiyanfei@gxtcmu.edu.cn。
[收稿日期]2023-06-11 [修回日期]2023-08-02 网络出版时间:2023-08-07 18:05:21

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To investigate the mechanism of action and material basis of AiTongXiao granule in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) based on network pharmacology and transplanted liver cancer rat model. **Methods**: TCMSP database was used to screen out effective components and its corresponding potential pharmaceutical targets, and databases including Gene Cards, OMIN, Drugbank and TTD were further used to collect HCC-related drug targets. The intersecting targets were obtained by mapping the drug and disease targets. The component-targets network was constructed and visualized by Cytoscape 3.8.2 software. Protein-protein interaction (PPI) network was built by STRING online platform, and the topological relationship and core targets were analyzed and screened by using CytoNCA software. In addition, Metascape database was used to perform gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis of the core targets. At last, A transplanted liver cancer rat model was established by using Walker-256 cell line and treated by AiTongXiao granule for 15 days. Western blot was used to further compare the expression levels of AKT, pAKT, p53, p-p53, ERK1/2 and ERK1/2 in the tumor between the treatment group and the control group.**Results**: A total of 257 active components were obtained from AiTongXiao granule, corresponding to 294 drug targets. Meanwhile, 231 of the 7 993 HCC disease targets were screened out between AiTongXiao granule drug and HCC disease targets. Eleven core targets including *AKT1*, *IL6*, *TP53*, *MAPK3*, *TNF*, *JUN*, *CASP3*, *MAPK1*, *MYC*, *PTGS2 and MMP9* were further obtained by median screening. GO and KEGG analysis results showed that these core targets enriched to HBV, TNF and cancer related pathways. The rat transplanted liver cancer model results indicated significant downregulation for AKT, p-AKT, pERK1/2, and significant upregulation of p-p53 after AiTongXiao granule treatment ($P<0.05$).**Conclusion**: AiTongXiao granule could act to multiple cancer related pathways, and AKT, p53 and ERK1/2 were validated to be regulated by ATXF in rat model. The mechanism may be through the regulation of the above signaling pathways to exert anti-liver cancer effect.

[KEYWORDS] AiTongXiao granule; Hepatocellular carcinoma; Transplanted tumor rat model; Network pharmacology; Signal transduction

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种异质性强、致死率高的恶性肿瘤。我国肝癌的危害更为严重,每年约有38万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例的51%[1]。由于肝癌的病因病机复杂,依靠单一手段往往不能获得理想的治疗效果。因此,中西医结合、多学科联合治疗对于肝癌的防治具有重要的地位和实践意义。中药复方制剂是中医临床疾病治疗最主要的手段之一,对其药效物质基础及其作用机制的现代科学阐释是中医药现代化研究的关键领域。然而由于中药复方多成分、多靶点等特点,其物质基础及作用机制研究方面尚未形成较为完善的科学研究体系。近年来网络药理学的快速发展为解析中药复方的分子作用机制提供了有力的支持,该方法逐步运用于越来越多的中药单体、单味中药或者中药复方的机制研究中,成为当前研究的热点[2]。

癌痛消颗粒是韦艾凌教授在"膈下逐瘀汤"的基础上加味研制而成,在肝癌治疗上采用"清、消、补"三法合用,其中白花蛇舌草和半枝莲为君药,行清热解毒之功效;而红花、三棱、莪术、赤芍为化瘀散结、行气止痛之品;由于体内毒瘀互结、正气耗伤,故加用黄芪、延胡索、绞股蓝、乌药、香附等以扶助正气。癌痛消颗粒已临床应用于肝癌治疗十余年,疗效确切、显著,可有效防治肝癌和提高患者生活质量[3-5]。前期大鼠移植性肝癌模型实验结果显示,癌痛消颗粒可抑制肝癌细胞增殖,诱导细胞周期阻滞,显著提高癌细胞凋亡率,同时下调细胞内B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(B-cell lymphoma-2,*Bcl-2*)、凋亡抑制蛋白Survivin、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达水平以及微血管密度(micro vessel density, MVD)[6,7]。以上研究为癌痛消颗粒的临床疗效提供了一定的科学依据,然而其物质基础和具体的分子机制尚未完全清楚。因此,本研究运用网络药理学方法,通过构建"药物组分-疾病靶标"网络,筛选获得癌痛消颗粒的活性成分和核心作用靶点,并在在前期结果的基础上,运用大鼠移植性肝癌模型进行初步的分子验证,以期为阐明癌痛消颗粒治疗肝癌的分子机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学研究

1.1.1 癌痛消颗粒活性成分筛选及靶点信息 在中药系统药理学数据库与分析平台TCMSP(http://tcmspw.com/tcmsp.php)内搜索收集癌痛消颗粒包含的12味中药(白花蛇舌草,半枝莲,赤芍,莪术,黄芪,三棱、甘草、乌药、香附、延胡索、绞股蓝、红花)所有已知化学成分。以口服生物利用度(Oral Bio-availability, OB)≥30%、类药性(Drug-likeness,DL)≥0.18作为筛选阈值收集各味中药内活性成分,同时获得其靶点信息。

1.1.2 肝癌疾病靶点信息的获取 通过生物信息数据库GeneCards(http://www.genecards.org/)、OMIM(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)、TTD(http://db.idrblab.net/ttd/)以及DrugBank(https://go.drugbank.com/),以“hepatocellular carcinoma”为关键词进行检索,得到相应数据库的肝癌疾病靶点。利用韦恩图将以上4个数据库结果取并集最终得到全部肝癌疾病靶点信息。

1.1.3 癌痛消颗粒防治肝癌的“活性成分-潜在靶点”网络的构建 利用VENNY2.1.0软件将上述获得肝癌疾病靶点与癌痛消颗粒中药活性成分作用靶点作交集饼图,获得癌痛消颗粒防治肝癌的潜在作用靶点。随后应用Cytoscape 3.8.2导入药物成分、疾病靶点信息,构建“活性成分-潜在作用靶点”疾病网络图,分析其相关性。

1.1.4 蛋白相互作用网络的构建、KEGG通路和GO生物学过程富集分析 运用String分析平台(http://string-db.drg/)构建癌痛消颗粒防治肝癌潜在靶点之间的蛋白质相互作用(protein-protein interaction,PPI)网络。设置蛋白种类为“homo sapiens”,设置“minimum required interaction score”为0.95,隐藏断开节点,选择“hide disconnected in the network”筛选癌痛消颗粒防治肝癌的核心蛋白靶点。

使用Metascape分析平台(http://metascape.org)对核心靶点进行GO和KEGG通路分析。根据转换的EntrezIDs,以$P<0.05$为阈值,使用Omicshare在线分析平台对富集结果进行可视化分析。

1.2 实验部分

1.2.1 细胞、动物及主要试剂 大鼠腹水癌细胞系Walker-25(LLC-WRC 256)由广西中医药防治医学分子生物学重点实验室保存。30只SPF级雄性SD大鼠(200～220 g)购于长沙市天勤生物技术有限公司(许可证号SCXK(湘)2019-0014)。癌痛消颗粒由江阴天江药业有限公司制备成免煎颗粒(15 g/包);高糖DMEM培养液购自美国Gibco公司;胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)购自以色列Biological Industries公司;兔抗p53多克隆抗体(货号10442-1-AP)、兔抗phospho-p53(Ser 15)多克隆抗体(货号29961-1-AP)、小鼠抗AKT单克隆抗体(货号60203-2-Ig)和小鼠抗phospho-AKT(Ser 473)单克隆抗体货号66444-1-Ig)均购于美国Proteintech公司;兔抗p44/42 MAPK(Erk1/2)单克隆抗体(货号4695s)购于美国CST公司。

1.2.2 大鼠移植性肝癌模型的建立及药物处理 参照王书杰等大鼠移植性肝癌造模方法[6],对30只大鼠造模后分为对照组和治疗组。在造模后第8天按每日10 mL/kg体重灌服等量药物溶液;其中治疗组每日灌服癌痛消颗粒溶液(药物浓度为75 mg/L),对照组以等量蒸馏水灌胃,每日2次,连续灌胃15 d后停药。大鼠空腹麻醉后腹主动脉取血,摘除肝脏并完整剥离肿瘤组织,测定瘤体重量。该动物实验方案经过广西中医药大学伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定,批准编号为No. DW20230620-118。

1.2.3 HE病理学及AST、ALT肝功能检测 取部分移植瘤组织经4 %多聚甲醛室温固定后,使用不同浓度酒精脱水、二甲苯透明后包埋于石蜡中;将包埋好的蜡块经切片、烘干、脱蜡后使用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后,置于显微镜下观察肝癌组织细胞形态变化。

取对照组、治疗组及保存的正常大鼠血清,使用天门冬氨基酸转移酶(AST)酶联免疫试剂盒(武汉华美,货号CSB-E13023r)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)酶联免疫试剂盒(武汉华美,货号CSB-E13024r)的含量,具体检测方法参照试剂盒说明书。

1.2.4 Western blot检测 称取50 mg瘤体组织,加入500 μL含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,经匀浆裂解后提取组织总蛋白;BCA法测定总蛋白浓度后加入SDS-PAGE上样缓冲液,经沸水浴处理后制备成Western blot样品。使用10 %PAGE胶电泳分离目的蛋白,半干法将蛋白转印至PVDF膜上,5 %脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入目的蛋白抗体以及内参β-actin抗体(1∶1 000稀释),4 ℃孵育过夜。使用TBST缓冲液洗涤PVDF膜3次(5 min/次),加入辣根过氧化酶(HRP)标记二抗,室温下孵育1 h。孵育结束后经TBST缓冲液洗涤3次后采用化学发光法(ECL)显影,拍照保存结果。使用Image J软件测定各条带灰度值,以β-actin作为内参对照,分析比较目的蛋白的相对表达水平变化。

1.2.5 统计学分析 实验数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析,计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示;两组之间统计分析采用独立样本t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 癌痛消颗粒活性成分及其靶点 在TCMSP

数据库中检索“白花蛇舌草”、“半枝莲”、“赤芍”、“莪术”、“甘草”、“红花”、“黄芪”、“绞股蓝”、“三棱”、“乌药”、“香附”、“延胡索”收集其活性成分及靶点信息，每种中药收集得到的活性成分及靶点个数如表1所示。所有中药的活性成分取并集后得到257种活性成分，其中18个为共有成分，其名称及本文代号分别为豆甾醇（stigmasterol，A1）、谷甾醇（beta-sitosterol，A2）、槲皮素（quercetin，A3）、黄芩苷（baicalin，B1）、胆固醇（CLR，B2）、黄芩素（baicalein，B3）、鼠李金（rhamnazin，B4）、谷甾醇（sitosterol，B5）、木樨草素（luteolin，B6）、豆甾醇（spinasterol，C1）、常春藤皂苷元（hederagenin，C2）、芒柄花黄素（formononetin，C3）、山奈酚（kaempferol，C4）、丁子香蒜（mairin，C5）、华良姜素（jaranol，C6）、异鼠李亭（isorhamnetin，C7）、毛蕊异黄酮（calycosin，C8）、罗痛定（hyndarin，C9）。槲皮素、豆甾醇、谷固醇、谷甾醇为7～9个中药的共有成分。方药内活性成分分别对应24～223个靶点，取并集共获得294个药物作用靶点（表1）。

表1　癌痛消颗粒各中药活性成分及靶点个数

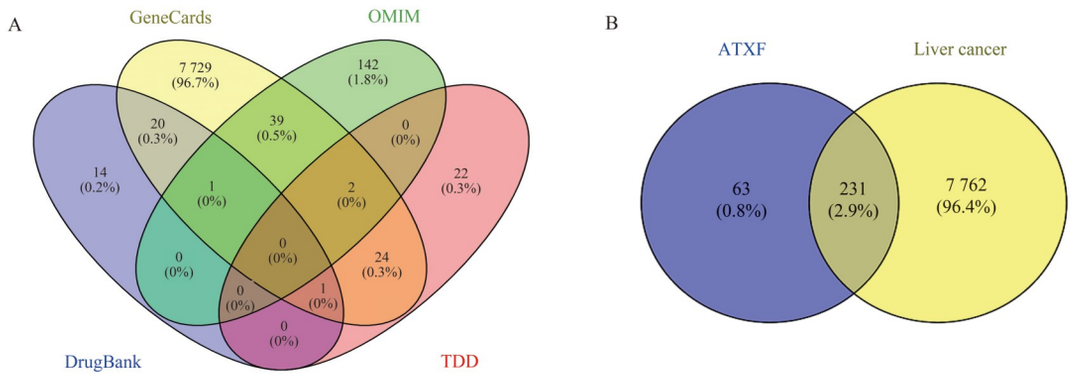
Tab 1　The number of active components and targets of each herb in Ai Tong Xiao granale（ATXF）

中药名称	拉丁名	活性成分数量	潜在靶点	重复成分
白花蛇舌草	*Hedyotis diffusa*	7	181	A1-A3
半枝莲	*Scutellariae barbatae*	28	221	A1-A3，B1-B6
赤芍	*Radix Paeoniae Rubra*	29	98	A1-A2，B1，B3，B5，C1
莪术	*Curcumae Rhizoma*	3	24	C2
三棱	*Sparganii Rhizoma*	5	80	A1，A2，C2，C3
红花	*Carthami Flos*	22	210	A1-A3，B1-B3，B6，C4
黄芪	*Hedysarum Multijugum Maxim*	20	201	A3，C2-C9
延胡索	*Corydalis Rhizoma*	49	207	A1，A3，B5，C9
绞股蓝	*Gynostemmae Pentaphylli Herba*	24	158	A3，B2，B4，B5，C1
乌药	*Linderae Radix*	9	179	A2，A3，B5
香附	*Cyperi Rhizoma*	18	217	A1-A3，B5-B6，C4，C6，C9
甘草	*Licorice*	92	223	A3，B5，C3-C8

2.1.2　癌痛消颗粒防治肝癌潜在作用靶点分析　将GeneCards、OMIM、TTD以及DrugBank数据库收集的肝癌疾病靶点导入至VENNY 2.1软件制作韦恩图，取并集得到7 993个肝癌疾病靶点，由图可知其中绝大多数靶点来源于GeneCards数据库（图1A）。随后利用以上肝癌疾病靶点与癌痛消颗粒各中药活性成分靶点制作韦恩图，取两者交集，得到231个潜在作用靶点（图1B）。

2.1.3　癌痛消颗粒防治肝癌活性成分-潜在作用靶点网络的构建　将癌痛消颗粒主要活性成分及筛选得到的231个防治肝癌潜在作用靶点导入Cytoscape 3.8.2软件构建“活性成分-潜在作用靶点”网络拓扑图。此网络共涉及512个节点，5 798条边（图2）。在活性成分方面，甘草、延胡索和半枝莲特有成分较多。靶点数目方面，共有成分槲皮素（A3）、豆甾醇（A1）、谷固醇（A2）、山奈酚（C4）、木樨草素（B6）连接靶点数目较多（图2）。在特有成分连接靶点数目方面，半枝莲的汉黄岑素（wogonin，BZL13），延胡索含有的隐品碱（Cryptopin，YHS3），乌药含有的6，7-dimethoxy-2-（2-phenylethyl）chromone（WY1），红花的β-胡萝卜素（beta carotene，HH9），赤芍的并没食子酸（ellagic acid，CS1），香附的金圣草黄素（Chryseriol，XF1），甘草内7-甲氧基-2-甲基异黄酮（7-Methoxy-2-methyl isoflavone，GC6）、3′-甲氧基光甘草定（3′-Methoxyglabridin，GC60）、甘草查尔酮A（licochalcone a，GC59）连接的靶点较多（图2）。

2.1.4　PPI网络构建及核心靶点的筛选　将得到的231个“药物-疾病”交集靶点上传至String平台，获取靶点之间的相互作用关系，结果显示*MAPK3*、*IL6*、*TP53*、*ALB*以及*AKT1*等5个靶点的与其他靶点的互作水平最高，结果如图3所示。将“药物-疾病”靶点上传至CytoNCA进行拓扑分析，根据Degree、Eigenvector、LAC、Betweenness、Closeness、



A：肝癌疾病靶点韦恩图；B：癌痛消颗粒防治肝癌潜在靶点韦恩图

图1　癌痛消颗粒防治肝癌作用靶点筛选

Fig 1　Screening of therapeutic targets of ATXF for hepatocellular crcinoma

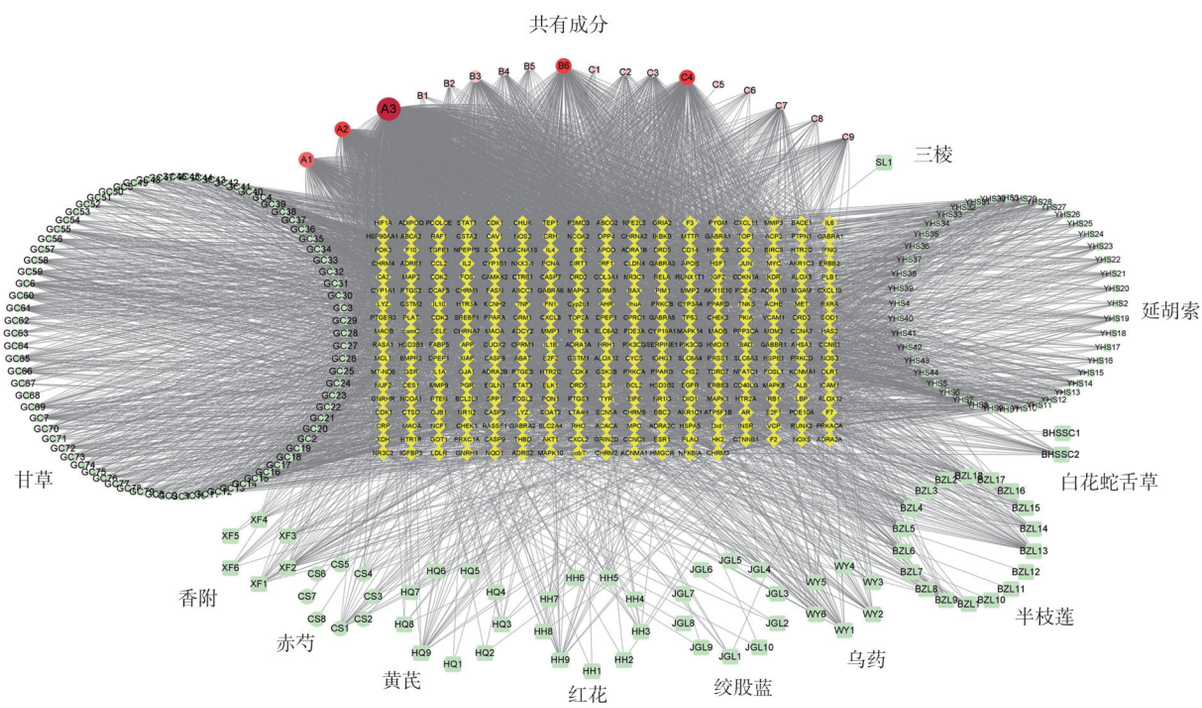


图2　癌痛消颗粒活性成分-潜在作用靶点网络图

Fig 2　Network diagrams of active ingredients-potential targets of ATXF

Network数值的中位数作为筛选标准，经过二次筛选后最终得到11个核心基因，分别为*AKT1*、*CASP3*、*IL6*、*JUN*、*MAPK1*、*MAPK3*、*MMP9*、*MYC*、*PTGS2*、*TNF*、*TP53*，各基因具体拓扑参数如表2所示。

2.1.5　癌痛消颗粒治疗肝癌核心靶点KEGG分析　利用metascape网站对筛选到的11个核心靶点进行KEGG通路富集分析（Min overlap：3，P value Cutoff：0.01，Min Enrichment：1.5），结果显示排名前20的通路分别是Hepatitis B（乙肝病毒感染）、TNF-related weak inducer of apoptosis（TWEAK）signaling pathway（肿瘤坏死因子相关的凋亡弱诱导因子信号通路）、TNF signaling pathway（肿瘤坏死因子信号通路）、Hepatitis C and hepatocellular carcinoma（丙型肝炎以及肝癌）、Signaling by interleukins（白介素相关信号通路）、Spinal cord injury（脊髓损伤）、Chromosomal and microsatellite instability in colorectal cancer（结直肠癌中的染色体和微卫星不稳定性）、Pathways in cancer（肿瘤信号通路）、Apoptosis（凋亡）、positive regulation of smooth muscle cell proliferation（平滑肌细胞增殖的正向调控）等（图4）。

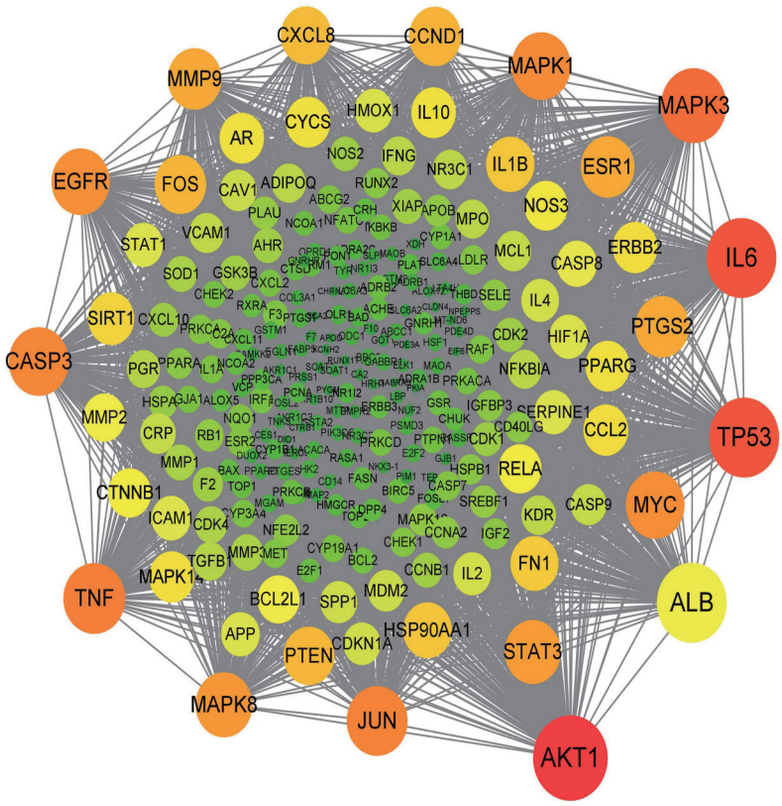


图 3　癌痛消颗粒潜在作用靶点PPI相互作用网络

Fig 3　Protein-protein interaction networks of the potential targets of ATXF

表 2　癌痛消颗粒关键作用靶点及其拓扑参数

Tab 2　Topological parameters of the key targets of ATXF in the treatment of HCC

Number	Name	Degree	Evigenvectors	LAC	Betweeness	Closeness	Network
1	*AKT1*	151	0.16	47.26	2 896.74	0.74	131.39
2	*IL6*	140	0.15	46.40	2 376.77	0.71	119.34
3	*TP53*	140	0.15	47.94	1 972.72	0.70	121.81
4	*MAPK3*	130	0.14	47.02	1 531.72	0.69	107.25
5	*TNF*	122	0.14	48.97	1 060.08	0.67	102.00
6	*JUN*	120	0.14	51.12	804.33	0.67	100.68
7	*CASP3*	118	0.14	50.08	844.68	0.66	97.19
8	*MAPK1*	116	0.14	47.16	1 153.30	0.66	92.39
9	*MYC*	115	0.14	47.79	908.41	0.65	93.45
10	*PTGS2*	104	0.13	48.73	793.04	0.63	82.37
11	*MMP9*	104	0.13	48.23	1 176.90	0.64	83.86

2.2　动物实验结果

2.2.1　癌痛消颗粒对Walker-256移植瘤大鼠的抑瘤作用　大鼠模型实验结果显示，癌痛消颗粒处理15 d后，处理组精神状态较好，存活率较高(80%，12/15)，在干预10 d之后不再出现死亡；而对照组精神状态差，每隔1～2 d便有死亡现象，最终存活率仅为40 %(6/15)，表明癌痛消颗粒可显著延长荷瘤SD大鼠的生存期($P < 0.05$)(图5A)。比较两组大鼠肝内移植瘤重量发现，癌痛消颗粒治疗组可显著抑制瘤体生长(图5B)。解剖观察发现，治疗组大鼠肝脏形态较好，肝内肿瘤体积较小(图5C)；而对照组大鼠肝内肿瘤由于生长过快，体积过大、肝脏受挤压，且外表面出现少数疑似转移瘤(图5D)。

2.2.2　癌痛消方对大鼠肝功能的影响　通过ELISA法检测癌痛消方治疗组、模型对照组以及空白组大鼠血清内AST、ALT的含量，结果发现对照组和治疗组血清内AST和ALT均显著高于空白组大鼠($P<0.01$)，提示使用肝内直视法造模以及后续肝

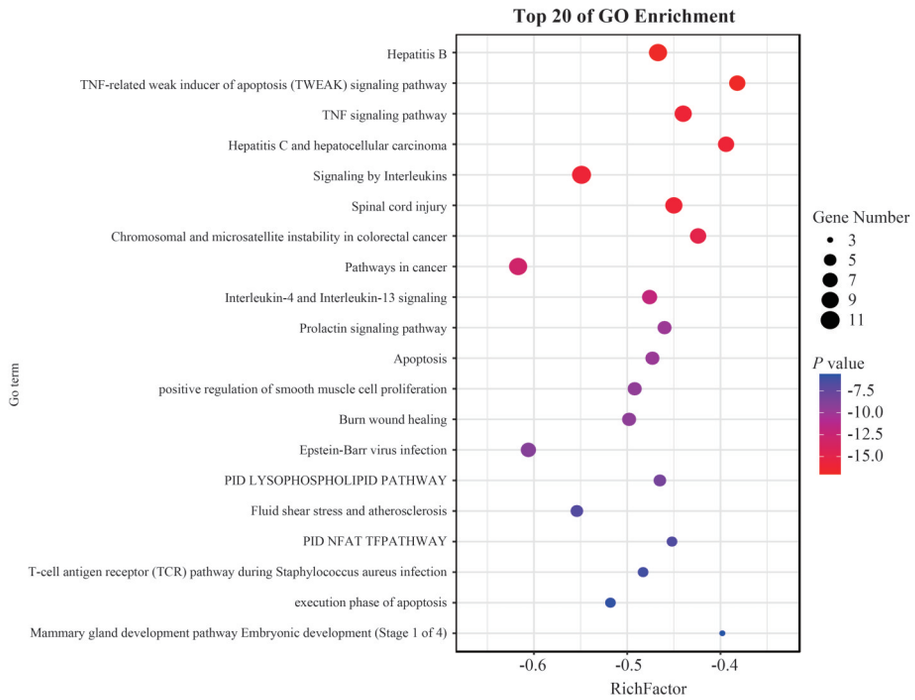
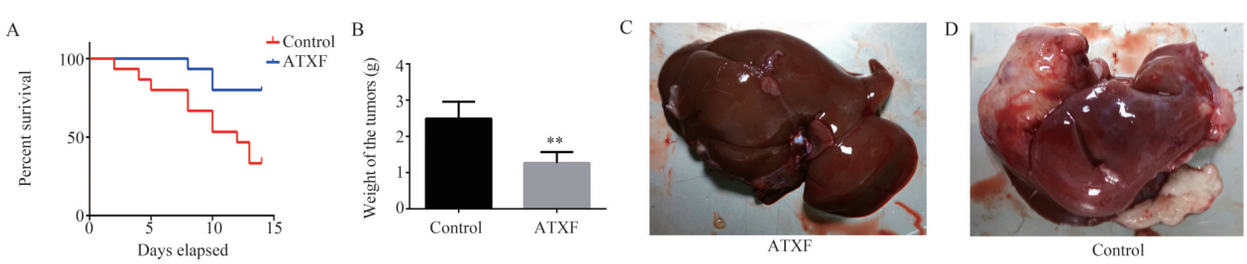


图4　癌痛消颗粒治疗肝癌相关的KEGG通路富集分析气泡图(前20)

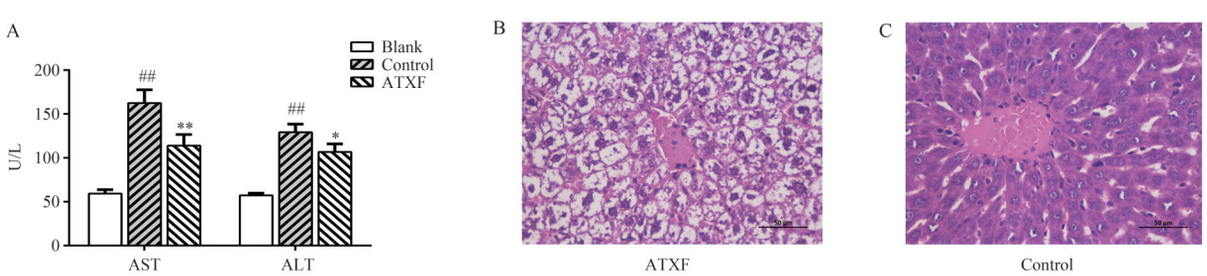
Fig 4　KEGG pathway of ATXF in the treatment of HCC (top 20)



A、B:肝癌移植瘤大鼠生存曲线及移植瘤体重量比较,与对照组相比:$^{**}P<0.01$;C、D:治疗组、模型组大鼠肝脏及其移植瘤

图5　癌痛消颗粒对移植瘤模型大鼠干预作用

Fig 5　The intervention effect of ATXF on transplanted tumor model rats



A:癌痛消颗粒处理后大鼠血清AST、ALT含量检测,与空白组相比较:$^{\#\#}P<0.01$;与对照组相比较:$^{**}P<0.01$,$^{*}P<0.05$;B、C:大鼠移植瘤组织HE病理学检测,scale bar=50 μm

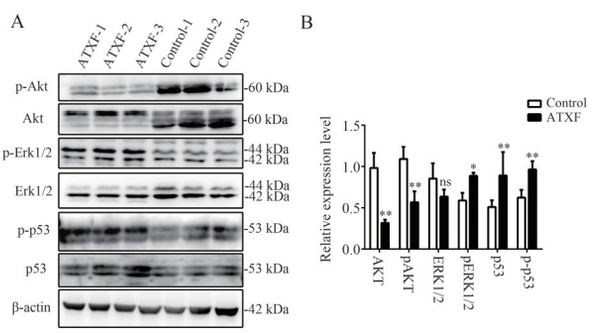
图6　癌痛消颗粒对大鼠肝功能影响及移植瘤组织病理学检测

Fig 6　Effects of ATXF on the liver function of the rats and HE pathology detection of the transplanted tumors

癌移植瘤可对大鼠肝功能造成损伤作用;而与对照组相比较,治疗组内AST和ALT含量显著下降($P<0.05$),这有可能是因为癌痛消方对移植瘤的抑制作用而产生的(图6A)。对两组大鼠移植瘤组织的

HE病理学检测发现,治疗组移植瘤细胞内出现较多空泡、细胞核边界不清晰等坏死细胞形态;对模型组移植瘤细胞形态完好,提示癌痛消方对大鼠肝癌移植瘤组织具有杀伤作用(图6B、C)。

2.2.3 癌痛消颗粒防治肝癌靶点验证 提取两组大鼠瘤体内总蛋白,经Western blot检测发现,癌痛消颗粒组内AKT、pAKT表达量显著低于对照组($P<0.01$);两组p53、ERK1/2蛋白表达水平无显著差异,但是癌痛消颗粒组p-p53、pERK1/2水平显著高于对照组($P<0.01$)(图7A、B)。



A:Western blot检测结果图;B:灰度值统计分析,与对照组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$

图7 大鼠移植瘤组织Western blot检测

Fig 7 Western blot analysis of transplanted tumor tissue in rats

3 讨论

原发性肝癌病因病机复杂,依靠单一治疗手段很难达到治疗预期。临床上癌痛消颗粒联合肝动脉化疗栓塞术、射频消融术可显著改善晚期肝癌患者生存质量,然而其防治肝癌的物质基础和作用机制有待阐明[5]。本研究利用网络药理学方法,搜集获得癌痛消颗粒方药内活性成分多达257种,其中包含多种抗肿瘤活性成分。如存在于多种食源性药物内的黄酮类成分槲皮素,也是癌痛消颗粒多达9味中药的共有成分。研究显示,槲皮素对肿瘤细胞具有细胞毒性,可通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡以及抑制肿瘤细胞侵袭与转移等多种途径发挥抗肿瘤作用[8]。近期另一项网络药理学研究指出槲皮素亦是5种治疗肝癌经典方剂的共同有效成分[9],提示槲皮素在肝癌的临床防治中可能具有重要意义,值得进一步开展深入的研究。另外,豆甾醇可引起口腔癌细胞内质网和线粒体功能障碍,进而诱导细胞凋亡[10]。另一项研究显示豆甾醇还具有化疗增敏作用,可通过抑制Nrf2信号通路增强子宫内膜癌细胞对顺铂的化疗敏感性[11]。关于谷固醇、山奈酚、木樨草素,已有多项研究显示可对乳腺癌、结肠癌、肺癌、胃癌、宫颈癌以及白血病等多种肿瘤细胞具有抑制作用[12-14]。除此之外,如黄芩苷、黄芩素等亦在近年研究发现可调控肿瘤关键信号通路,进而抑制肿瘤[15,16]。活性成分-靶点网络结果亦显示以上中药共有活性成分可作用于多个靶点,提示癌痛消颗粒中包含槲皮素、谷固醇、山奈酚等共有成分对于其发挥抗肝癌作用具有重要意义,可能是其重要的药效物质基础。

为了深入研究癌痛消颗粒治疗肝癌的关键蛋白靶点,对预测得到的潜在靶点进行PPI分析网络分析,*AKT1*、*IL6*、*TP53*、*MAPK3*、*TNF*、*JUN*、*CASP3*、*MAPK1*、*MYC*、*PTGS2*、*MMP9*等基因在网络中具有较高的Degree,在网络中处于重要地位。通常条件下,PI3K/Akt/mTOR信号通路在肝癌组织异常激活,因而开发该通路的抑制剂变得尤为重要[17]。IL-6可作为多效细胞因子,通过异常激活IL-6/JAK/STAT信号通路,参与肝癌细胞增殖、迁移、侵袭、血管生成和凋亡等多个过程[18]。另外,在肝癌细胞内的另一大特点在于p53的异常失活及其负调控因子MDM2的过表达。由于这一维持细胞基因稳态的关键通路异常,细胞内基因变得不稳定,出现氧化应激、能量代谢转换以及抗癌基因异常等多种情况,最终导致肝细胞癌变为肝癌细胞[19]。作为重要的抑癌基因,p53最为核心的作用机制为诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞。当细胞受到DNA损伤或其他致癌应激的刺激下,可被磷酸化激活而启动下游一系列参与细胞周期阻滞、细胞衰老和细胞凋亡等细胞生物学过程蛋白的转录[20]。作为Ras-Raf-MEK-ERK信号通路的关键蛋白激酶,ERK1和ERK2参与调控肿瘤细胞凋亡、增殖、免疫反应、RNA合成等多个生物学过程,因此该通路也是肝癌发生发展最为重要的信号通路之一[21]。因此,部分研究指出开发针对RAS-RAF-MEK-ERK、PI3K-AKT-mTOR及p53信号通路的通用或者联用抑制剂将为肝癌的治疗提供新的手段[22]。

“药物-疾病”交集基因KEGG富集通路结果显示,癌痛消颗粒防治肝癌核心靶点主要富集于乙肝病毒(hepatitis)、肿瘤坏死因子(TNF signaling)、白介素通路(The interleukin pathway)和癌症相关信号通路(Pathways in cancer)。已有研究结果显示,白花蛇舌草乙醇提取物中的2-羟基-3甲基蒽醌类化合物、β-谷甾醇、豆甾醇、熊果醇以及对羟基香豆酸

等均可不同程度抑制HBV抗原[23]；而另一项研究指出半枝莲水煎液和醇提取液均对HBV抗原具有一定的抑制作用[24]。提示癌痛消颗粒在HBV相关的肝癌的防治中，对HBV病毒感染具有一定的作用。而白花蛇舌草和半枝莲内具体的抗病毒活性成分及其作用机制以及其他方药是否亦含有抗HBV活性有待深入研究。

TNF-α、IL-6作为肿瘤微环境关键效应分子，这两者在乙肝相关肝癌患者内中存在过量表达[25]。除此之外，研究显示TNF-α、IL-6、TGF-β等炎症因子可参与肿瘤的发生发展，对于肿瘤细胞上皮间质转化（EMT）、血管生成、肿瘤转移等过程具有重要意义[26]。癌痛消颗粒核心靶点KEGG富集以上关键肿瘤微环境关键炎症因子，提示癌痛消颗粒可能对于肝癌微环境具有一定的作用。虽然已有部分研究发现癌痛消颗粒具有免疫调节作用，可对细胞内T淋巴细胞免疫因子以及血清内IL-12 、IFN-γ等具有调节作用[4, 27]，而IL-6以及TNF-α与癌痛消颗粒在防治肝癌过程中的相关性有待实验确认。细胞内代谢、信号转导异常，最终造成细胞增殖与凋亡异常是细胞癌变的主要机制，针对这些关键信号分子的靶向调控，可有效逆转、延缓甚至是阻断癌症的发生发展[28]。结合PPI网络核心靶点筛选结果不难发现，癌痛消颗粒可靶向磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3 kinase，PI3K）/蛋白激酶B（Protein kinase B，Akt）/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）通路、细胞外信号调节激酶（Extracellular signal-related kinase，EKR）通路、p53通路等信号通路核心蛋白，进一步揭示了其防治肝癌的分子机制。然而对于癌痛消颗粒的“清热解毒”、“化瘀散结”和“行气止痛”的物质基础和君药、臣药的作用特点及之间的联系仍然需要深入系统的研究。本研究初步结果显示，癌痛消颗粒对于大鼠移植瘤内AKT、ERK以及p53的表达及活化具有调控作用，提示以上分子及其相关信号通路对于癌痛消颗粒发挥抗肝癌作用具有重要作用。然而具体是哪种物质成分以及如何发挥调控作用有待进一步系统的研究。

综上，本研究利用网络药理学分析并筛选得到了癌痛消颗粒防治肝癌潜在靶点，并通过大鼠移植瘤实验验证部分核心靶点。本研究结果显示PI3K/AKT、p53和ERK1/2通路对于癌痛消颗粒发挥抑瘤作用具有重要意义，而各有效靶点之间的内部联系以及具体的信号转导机制有待于进一步的研究。本研究为癌痛消颗粒防治肝癌的物质基础以及具体的作用机制提供了参考依据，同时也对后续的研究具有一定的指导意义。

作者贡献度说明：

刘欢、韦燕飞、刘显：实验设计、论文撰写及动物建模；金丽杰：数据收集；刘莎莎：指标检测，统计分析。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Xie DY, Ren ZG, Zhou J, et al. 2019 Chinese clinical guidelines for the management of hepatocellular carcinoma: updates and insights[J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2020, 9(4): 452-463.

2 Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment[J]. Front Pharmacol, 2019, 10(2): 123.

3 韦艾凌，唐健，陈逸恒，等. 癌痛消颗粒治疗原发性肝癌血瘀毒结兼正虚证疗效分析[J]. 辽宁中医杂志，2007，(5)：570-572.

4 唐秋媛，韦艾凌，潘哲，等. 癌痛消方联合肝动脉栓塞化疗治疗中晚期肝癌患者的临床疗效观察[J]. 时珍国医国药，2015，26(4)：906-908.

5 李屏，李明芬，韦巍，等. 癌痛消颗粒联合肝动脉化疗栓塞术治疗原发性肝癌的疗效及其对白介素12、白介素10、γ干扰素的影响研究[J]. 中国全科医学，2019，22(18)：2230-2236.

6 王书杰，韦艾凌，张永琴，等. 癌痛消方调控大鼠移植性肝癌细胞Survivin及Bcl-2的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志，2012，32(12)：1652-1657.

7 黄峰，韦艾凌. 癌痛消颗粒对移植性肝癌模型大鼠肝癌组织miRNAs表达的影响[J]. 中国药学杂志，2013，48(20)：1740-1743.

8 Tang SM, Deng XT, Zhou J, et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121(1): 109604.

9 程秋骆，刘柳，白长川，等. 基于网络药理学探析5种经典方剂治疗肝细胞癌的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志，2021，37(8)：1848-1855.

10 Bae H, Song G, Lim W. Stigmasterol causes ovarian cancer cell apoptosis by inducing endoplasmic reticulum and mitochondrial dysfunction[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(6):488.

11 Liao H, Zhu D, Bai M, et al. Stigmasterol sensitizes endometrial cancer cells to chemotherapy by repressing Nrf2 signal pathway [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20(6): 480.

12 Bin Sayeed MS, Ameen SS. Beta-sitosterol: A promising but orphan nutraceutical to fight against cancer[J]. Nutr Cancer, 2015, 67(8): 1214-1220.

13 Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(12):2277.

14 Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112(4): 108612.

15 Singh S, Meena A, Luqman S. Baicalin mediated regulation of key signaling pathways in cancer[J]. Pharmacol Res, 2021, 164(2): 105387.

16 Liu H, Dong Y, Gao Y, et al. The fascinating effects of baicalein on cancer: A review[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10):1681.

17 Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicines,2021, 9(11):1639.

18 Lokau J, Schoeder V, Haybaeck J, et al. Jak-stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers ,2019, 11(11):1704.

19 Cao H, Chen X, Wang Z, et al. The role of MDM2-p53 axis dysfunction in the hepatocellular carcinoma transformation[J]. Cell death discovery, 2020, 6(19): 53.

20 Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression[J]. Nature Rev Cancer, 2014, 14(5): 359-370.

21 Roskoski R, Jr. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers[J]. Pharmacol Res, 2019, 142(4): 151-168.

22 Akula SM, Abrams SL, Steelman LS, et al. RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/PTEN/AKT/mTORC1 and TP53 pathways and regulatory miRs as therapeutic targets in hepatocellular carcinoma[J]. Exp Opin Ther Targets ,2019, 23(11): 915-929.

23 杨俊, 许军, 刘燕华,等. 白花蛇舌草抗乙肝病毒化合物体外筛选[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(6): 1402-1403.

24 周凌凌, 胡筱希, 丁霞. 半枝莲提取物抗乙肝病毒体外实验研究[J]. 中药材, 2015, 38(5): 1042-1045.

25 龙静, 刘洁玲, 韩朝辉, 等. 甲胎蛋白、甲胎蛋白异质体与TNF-α联合检测在原发性肝癌诊断中的应用及其临床价值[J]. 武汉大学学报(医学版), 2021, 42(3): 418-422.

26 Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment[J]. J Immunol Res, 2014, 2014(13): 149185.

27 李媛媛. 癌痛消方干预移植型肝癌大鼠T淋巴细胞及其亚群的实验研究[D]. 广西中医药大学, 2016.

28 Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer metabolism: Phenotype, signaling and therapeutic targets[J]. Cells, 2020, 9(10):2308.

[本文编辑] 谭贝加 宋睿璞 朱 昊