# 肝细胞癌外周血单个核细胞关键基因与治疗中药的生信分析及系统评价

高云霄[1]，杨柳[1]，李泽[1]，王杰[1]，贾雪梅[1]，郭榆西[1]，李博林[2]，王小天[2*]
（1. 河北中医学院 研究生院，石家庄 050090；
2. 河北中医学院 第一附属医院，石家庄 050011）

［摘要］ **目的：**基于生物信息学的方法探索肝细胞癌外周血单个核细胞（HCC-PBMC）的关键基因和潜在的治疗中药，并通过系统评价进一步确认该药的临床疗效。**方法：**利用基因表达数据库（GEO）下载关于HCC-PBMC的芯片GSE58208和GSE36076。通过RStudio软件分析获得差异表达基因（DEGs）。利用STRING在线数据库进行蛋白-蛋白相互作用（PPI）分析，DAVID在线功能注释工具进行基因本体（GO）和京都基因和基因组百科全书（KEGG）富集分析。通过Cytoscape软件对HCC-PBMC差异基因进行可视化，同时，利用CytoHubba插件计算出HCC-PBMC的关键基因。通过将关键基因与医学信息检索平台相互映射，筛选出治疗肝细胞癌（HCC）的潜在中药并纳入下一步的系统评价。**结果：**共得出203个DEGs（上调基因194个，下调基因9个）。经DAVID分析，可知这些DEGs主要富集的生物学过程和信号通路包括DNA模板转录调控、核糖核酸磷酸二酯键水解，核内裂解、核分裂的正调控、骨骼肌纤维发育、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）活性的激活、范可尼贫血途径、代谢途径。通过Cytoscape软件计算出HCC-PBMC的关键基因，分别是GTP酶IMAP家族成员1（GIMAP1），GTP酶IMAP家族成员4（GIMAP4），GTP酶IMAP家族成员6（GIMAP6），GTP酶IMAP家族成员7（GIMAP7），GTP酶IMAP家族成员8（GIMAP8），白细胞介素-1$\beta$（IL-1$\beta$），趋化因子（CX3C基元）受体1（CX3CR1），趋化因子（C-C基元）受体2（CCR2），Toll样受体7（TLR7），表皮生长因子（EGF）。经Coremine Medical分析得出人参、姜黄、积雪草、白花蛇舌草与关键基因关系较为密切，其中人参具有补益肺脾、增强气力功效，与HCC肝郁脾虚、气阴两虚证相符合，故将以人参为君药的四君子汤纳入系统评价。经过评价得出人参在提高临床总体疗效，改善患者中医证候及血清$CD4^+$，$CD4^+/CD8^+$水平，降低患者血清$CD8^+$，总胆红素（TBIL）水平方面均优于单纯西医治疗（$P<0.01$），且安全性高。**结论：**本研究基于基因层面展开分析，为临床工作者在诊断和治疗HCC方面提供了新思路，人参治疗HCC的系统评价为中医药临床防治HCC提供了依据。

［关键词］ 肝细胞癌外周血单个核细胞；关键基因；中药；生信分析；系统评价
［中图分类号］ R22；R242；R287；R285.5 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1005-9903（2021）20-0162-10
［doi］ 10.13422/j.cnki.syfjx.20212027 ［增强出版附件］ 内容详见http://www.syfjxzz.com或http://cnki.net
［网络出版地址］ https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210825.1844.001.html
［网络出版日期］ 2021-08-26 13:08

## Key Genes of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Hepatocellular Carcinoma and Effective Chinese Herbs: A Bioinformatics Analysis and Systematic Review

GAO Yun-xiao[1], YANG Liu[1], LI Ze[1], WANG Jie[1], JIA Xue-mei[1], GUO Yu-xi[1], LI Bo-lin[2], WANG Xiao-tian[2*]
(1. *Graduate School*, *Hebei University of Chinese Medicine*, *Shijiazhuang* 050090, *China*;
2. *The First Affiliated Hospital of Hebei University of Chinese Medicine*, *Shijiazhuang* 050011, *China*)

［**Abstract**］ **Objective:** To explore the key gens of peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma (HCC-PBMC) and potentially effective Chinese herbs based on bioinformatics, and to verify the

［收稿日期］ 20210803（018）
［基金项目］ 国家科技部重点研发计划项目（2018YFC1704102）；河北省科技计划项目（21377724D，21377740D）
［第一作者］ 高云霄，在读硕士，从事中医内科脾胃病研究，E-mail：2285410658@qq.com
［通信作者］ *王小天，硕士，主治医师，从事中医正骨手法治疗脊柱关节退行性病变研究，E-mail：374777291@qq.com

clinical efficacy of these Chinese herbs via a systematic review. **Method**: The chips GSE58208 and GSE36076 of HCC-PBMC were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO), followed by the identification of differentially expressed genes (DEGs) using RStudio. After protein-protein interaction (PPI) analysis by STRING, the DAVID was employed for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The DEGs of HCC-PBMC were visualized by Cytoscape. The key genes of HCC-PBMC were calculated by CytoHubba plug-in and mapped with those in Coremine Medical for screening out the potential Chinese herbs for the treatment of HCC, which were then included for subsequent systematic review. **Result**: A total of 203 DEGs were obtained (194 up-regulated and nine down-regulated). As revealed by DAVID analysis, the DEGs were mainly enriched in such biological processes and signaling pathways as transcriptional regulation of DNA template, hydrolysis of ribonucleic acid phosphodiester bond, positive regulation of intranuclear mitosis and division, skeletal muscle fiber development, activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, Fanconi anemia pathway, and metabolic pathway. The key genes of HCC-PBMC were calculated by Cytoscape to be GTPase IMAP family member 1 (GIMAP1), GTPase IMAP family member 4 (GIMAP4), GTPase IMAP family member 6 (GIMAP6), GTPase IMAP family member 7 (GIMAP7), GTPase IMAP family member 8 (GIMAP8), interleukin-1$\beta$ (IL-1$\beta$), CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1), C-C chemokine receptor type 2 (CCR2), Toll-like receptor 7 (TLR7), and epidermal growth factor (EGF). Through Coremine Medical analysis, it was concluded that Ginseng Radix et Rhizoma, Curcumae Longae Rhizoma, Centellae Herba, and Hedyotidis Herba were closely related to the key genes. Ginseng Radix et Rhizoma has the effects of tonifying and benefiting lung and spleen and enhancing strength, suitable for the liver depression and spleen deficiency syndrome or Qi-Yin deficiency syndrome of HCC. Hence, Si Junzitang with Ginseng Radix et Rhizoma as the sovereign medicinal was included for systematic review. It has been confirmed that Ginseng Radix Et Rhizoma was superior to western medicine alone in improving the overall clinical efficacy, alleviating TCM syndrome, elevating serum $CD4^+$ and $CD4^+/CD8^+$ levels, and reducing the serum $CD8^+$ and TBIL levels ($P<0.01$), with high safety. **Conclusion**: This study conducted at the gene level has provided new ideas for clinical diagnosis and treatment of HCC. The systematic review of Ginseng Radix Et Rhizoma against HCC provides a basis for the clinical prevention and treatment of HCC with TCM.

[**Keywords**] peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma (HCC-PBMC); key genes; traditional Chinese medicine; bioinformatics analysis; systematic review

肝细胞癌(HCC)是消化道最常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着人类的寿命和健康,其发病与各种肝炎病毒感染、肥胖、遗传、过量饮酒、代谢/自身免疫性疾病等导致的慢性肝损伤有关[1]。HCC由于复发率、死亡率高,侵袭性、转移性强,临床治疗主要以手术切除为主,辅以化疗、放射治疗、生物靶向治疗、肝移植、动脉栓塞等,但临床总体疗效欠佳[2]。目前,已有研究发现多个基因和分子参与肝细胞癌的进展,但是具体发生、发展机制尚未完全阐明,临床上仍缺乏有效的诊断和治疗靶标[3]。当前,以生物信息学为代表的高通量平台可以系统分析体内基因表达的变化,已成为研究癌症发病机制的重要手段。外周血单核细胞是由骨髓造血干细胞发育而来,参与体内的炎症免疫反应。近来,相关研究表明单核细胞除了发挥炎症免疫作用外,还与HCC的发生发展密切相关[4]。一项基于生物信息学挖掘影响HCC患者生存预后关键基因的研究发现,G蛋白信号调节蛋白2(GPSM2)在HCC肿瘤组织和外周血单个核细胞(PBMC)中高表达,可能是HCC筛查和判断预后的新型标志物[5];相关临床试验分析表明,HCC患者PBMC中Toll样受体2(TLR2),Toll样受体4(TLR4)和翼状螺旋转录因子P3(Foxp3)的表达明显高于健康组,对肿瘤的发生发展具有一定的预测作用[6-7]。中药治疗HCC历史久远,疗效确切,因此,研究肝细胞癌外周血单个核细胞(HCC-PBMC)关键差异基因及相关中药对完善HCC的诊断和治疗具有重大意义。本研究将从基因表达数据库(GEO)中下载2个基因芯片数据集,寻找HCC-PBMC中关键基因和治疗中药,通过系统评价进一步确认该药的临床疗效,以期为中医

学者论治HCC提供新思路。

## 1 资料和方法

**1.1** 芯片数据的来源 从GEO数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)下载包含肝细胞癌患者外周血单个核细胞的基因芯片数据(GSE58208, GSE36076),其中GSE58208芯片数据中包括正常外周血单个核细胞(NOR-PBMC)样本5例,HCC-PBMC样本10例,GSE36076芯片数据中包括NOR-PBMC样本10例,HCC-PBMC样本10例,芯片研究类型为expression profiling by array,种属为"homo sapiens",平台均来自于GPL570[8]。

**1.2** 数据的处理与筛选 利用R软件affy, affyPLM包进行预处理,通过背景校正、标准化和计算,并根据平台注释信息先将探针序列号(probe id)转化为基因序列号(Gene id),再将Gene id转换为基因符号(Gene symbol)并保存。应用R软件limma包筛选HCC-PBMC与NOR-PBMC之间的差异表达基因(DEGs),筛选条件为调整$P<0.05$和$|\log_2 FC|>1$,两者之间的交集DEGs数据用韦恩在线绘图软件进行可视化。

**1.3** 基因本体(GO)功能和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析筛选 通过DAVID在线功能注释工具(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)对DEGs进行功能和通路富集分析,背景基因设置为"homo sapiens",筛选条件设为$P<0.05$。

**1.4** 蛋白互作网络分析与关键(Hub)基因的筛选 将两个基因芯片的交集DEGs导入到STRING(https://string-db.org/)在线数据库进行蛋白-蛋白相互作用(PPI)分析,PPI分析的物种设为"homo sapiens",相互作用得分≥0.4[9]。其后,将数据导入Cytoscape_v3.7.2软件并绘制可视化网络图,用CytoHubba插件对蛋白互作网络进行关联度分析,并根据节点度大小进行排序,选取前10个DEGs作为Hub基因[9]。

**1.5** 治疗肝细胞癌中药分析 医学信息检索平台(https://www. coremine. com/medical/) - Coremine Medical是通过输入Human Gene/Protein,可检索出与该基因或蛋白相关的疾病、生物进程、细胞组成、分子功能、可能性治疗药物等。将肝细胞癌患者外周血单核细胞的核心基因输入Coremine Medical检索框,以$P<0.05$为标准进行潜在治疗中药的筛选[10]。最后筛选得出与HCC-PBMC关系较为密切的中药。

**1.6** 中药系统性评价 通过阅读以上述筛选出的中药为君药的方剂治疗HCC的相关文献,得出1味关系最密切的中药,对以该味中药为君药的文献治疗HCC进行系统评价[11]。

**1.6.1** 文献检索 在英文数据库(百链外文期刊数据库,PubMed,Cochrane Library,Embase,Medline)及中文数据库[百链中文期刊数据库,中国知网(CNKI),万方数据库,维普数据库(VIP)],对上述方药治疗HCC进行文献检索,文献检索日期设定为建库至2021年7月。

**1.6.2** 纳入标准 研究类型,临床随机对照试验;研究对象:经过组织学或病理学活检明确诊断为HCC的患者,所有文献入组患者不限性别、年龄、病程和分期;干预措施,试验组患者采用中西医联合治疗,对照组患者采用单纯西医治疗;结局指标,有明确的临床疗效评价指标(总有效率)。

**1.6.3** 排除标准 重复发表的文献;基本信息不全无法进行数据提取的文献;综述、系统评价、动物实验、临床经验、个案报道等不属于临床随机对照研究的文献;对照组不为单纯西医治疗的文献;研究所纳入患者伴有其他部位肿瘤等。

**1.6.4** 数据提取与质量评价 采用主题词与自由词结合的方式进行检索,中文检索词包括:肝肿瘤,肝癌,肝细胞癌,肝脏恶性肿瘤,四君子汤;英文检索词包括Liver tumor, Liver cancer, Hepatocellular carcinoma, Malignant tumor of liver, Sijunzi decoction, HCC, Hepatoma, Liver neoplasms。由2名研究者独立进行文献检索、纳入和数据提取,使用标准资料提取表进行一般信息、试验组和对照组的基线情况、干预措施和结局指标等数据的提取,如遇分歧则进行讨论或由第3名研究者进行文献的评定。对最终纳入的文献运用Cochrane系统提供的临床随机对照试验(RCT)偏倚风险评估工具进行质量评价。并采用Jadad量表对临床试验方法学进行质量评估[12],1~3分为低质量,4~7分为高质量。

**1.6.5** 统计学方法 利用Revman 5.3软件进行Meta分析。二分类变量资料、连续变量资料分别采用比值比(OR),标准均数差(SMD)为效应指标,此两类指标均以95%置信区间(CI)表示。其异质性大小可通过评价$P$和$I^2$值判断,当$P\geq0.10$,$I^2\leq50\%$时,各研究间异质性较小,采用固定效应模型分析;当$P<0.10$,$I^2>50\%$时,各研究间异质性较大,则采用随机效应模型分析。利用倒漏斗图的对称情况表示发表性偏倚。$P<0.05$认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1** 核心差异基因 根据筛选条件得出，GSE58208芯片中共包含2 428个DEGs，其中上调基因2405个，下调基因23个；GSE36076芯片含有DEGs 508个，其中上调基因41个，下调基因467个。分别取2个芯片的前100个DEGs做聚类分析并绘制相关热图(图1)。另外，本研究分别绘制了2个芯片DEGs的火山图(图2)应用Venny 2.1.0软件作图，得出GSE58208芯片与GSE36076芯片的共有DEGs 203个，包括上调基因194个，其中有GTP酶，IMAP家族成员1/4/6/7/8(GIMAP1/4/6/7/8)，趋化因子(C-X3-C基元)受体1(CX3CR1)，趋化因子(C-C基元)受体2(CCR2)，Toll样受体7(TLR7)等；下调基因9个，包括表皮生长因子(EGF)，白细胞介素-1$\beta$(IL-1$\beta$)等。

**2.2** GO和KEGG富集分析 通过DAVID在线数据库对203个共同DEGs进行生物学注释。GO功能富集分析包括生物过程(BP)，细胞组分(CC)，分子功能(MF)，其中上调差异基因的BP主要与DNA模板转录调控，DNA模板转录、核糖核酸磷酸二酯键水解，核内裂解等功能有关；CC主要与细胞内、细胞核、纤毛、中心粒、高尔基膜等功能有关；MF主要与核酸结合、金属离子结合，DNA结合、转录因子活性，序列特异性DNA结合，GTP结合，核苷酸转移酶活性等功能有关。另外，根据筛选条件得出下调差异基因只与BP相关，其功能包括核分裂的正调控，骨骼肌纤维发育，丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)活性的激活。同时，通过KEGG通路富集分析共得到范可尼贫血途径，代谢途径等2条信号通路。

**2.3** 蛋白互作网络的构建与关键基因的筛选 将2个芯片共有的203个DEGs导入STRING在线数据库进行分析，得到PPI网络，再将其数据传入Cytoscape软件进行蛋白互作网络图的构建。利用CytoHubba插件中的最大集团中心(MCC)算法筛选网络图中相互作用程度最高的前10个Hub基因，其基因名称分别为GIMAP1，GIMAP4，GIMAP6，GIMAP7，GIMAP8，IL-1$\beta$，CX3CR1，CCR2，TLR7，EGF。见图3。

**2.4** 治疗肝细胞癌的有关中药分析 将上述筛选得出的10个Hub基因依次输入到Coremine Medical网站，同时汇总与Hub基因有关的中药($P$<0.05)，共筛选得出与HCC-PBMC关系较为密切的4种中药，包括人参、姜黄、积雪草、白花蛇舌草，其中人参$P$最小，人参性温，味甘、微苦，归脾、肺经，具有补益肺脾、增强气力、生精血、止泻等功效。肝细胞癌的辨证分型中前期有肝郁脾虚证，后期有气阴两虚证，故将人参纳入到后期的系统评价。见表1。

**2.5** 纳入文献一般情况、质量评价及基本特征 通过阅读以上述4味中药为君药的方剂治疗HCC的相关文献，得出以人参为君药的四君子汤与HCC关系最密切；四君子汤出自《太平惠民和剂局方》，全方配伍精当，人参在本方中起主导作用，故将四君子汤作为研究的对象。通过对上述限定条件进行检索，共检索出250篇相关文献，经过筛选后最终共纳入15篇[13-27]，总计1 066例患者，检索流程见图4。所纳入的文献中12篇[13-14,16-17,19-21,23-27]文献提出采用随机法，其中4篇[13,20,23,25]提及采用随机数字表法，1篇[24]采用掷骰子法，5篇[13,20,23-25]采用随机隐藏分配，无文献提及盲法，2篇[24-25]涉及到病例退出、脱落。风险偏倚情况见图5。纳入的15篇[13-27]文献中有2篇[24-25]属于高质量，其余均为低质量。见表2。

**2.6** Meta分析结果

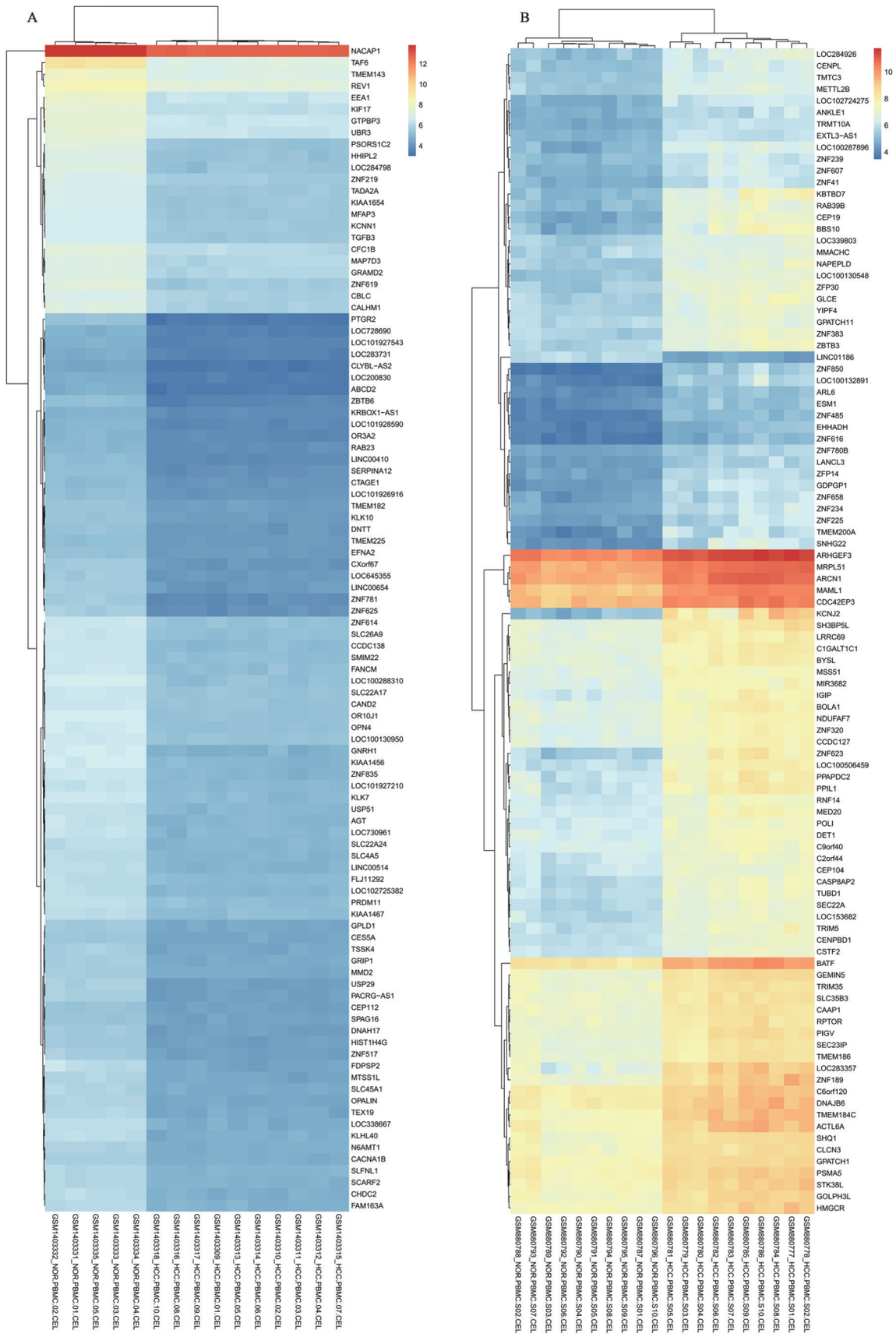
**2.6.1** 临床总体疗效 本研究共纳入15篇文献[13-27]，这15篇RCT均报道了临床总体疗效[13-27]。各研究间检测均无异质性($P$=0.92，$I^2$=0%)，采用固定效应模型分析。Meta分析结果显示，试验组(中西医联合治疗)临床总体疗效显著优于对照组(单纯西医治疗)[OR=3.91，95% CI(2.87，5.34)，$P$<0.000 01]。

**2.6.2** 甲胎蛋白改善 本研究所纳入的15篇文献[13-27]中，有3个RCT对甲胎蛋白改善进行分析[22,26-27]。各研究间异质性较大($P$=0.03，$I^2$=72%)，采用随机效应模型分析。Meta分析结果显示，试验组(中西医联合治疗)甲胎蛋白的改善与对照组(单纯西医治疗)之间差异无统计学意义[SMD=−0.55，95%CI(−1.11，0.00)，$P$<0.1]。

**2.6.3** 肝功能变化

**2.6.3.1** 血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)水平 本研究所纳入的15篇文献[13-27]中，有4个RCT对血清ALT水平进行分析[15,18,24,26]。各研究间异质性较大($P$<0.000 01，$I^2$=96%)，采用随机效应模型分析。Meta分析结果显示，试验组(中西医联合治疗)与对照组(单纯西医治疗)在降低血清ALT水平方面差异无统计学意义[SMD=−0.74，95%CI(−2.07，0.60)，$P$>0.01]。

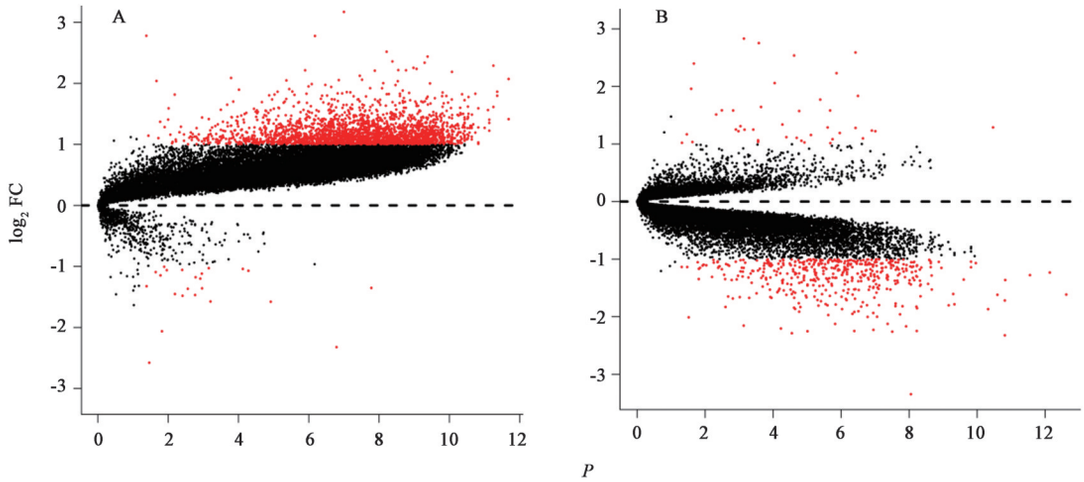
**2.6.3.2** 血清总胆红素(TBIL)水平 本研究所纳入15篇文献[13-27]中，有5个RCT对血清TBIL水平进行分析[15,18,24-26]。各研究间异质性较大($P$<0.01，$I^2$=




A. GSE58208；B. GSE36076

**图 1　差异表达基因的层次聚类**（前 100）

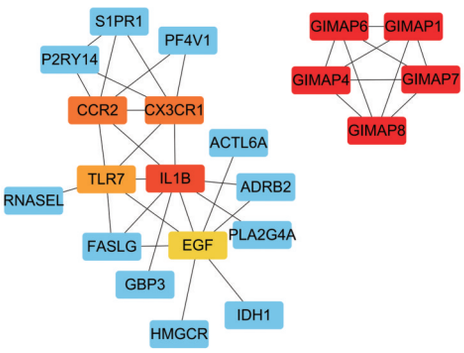
**Fig. 1　Hierarchical clustering heat map of differentially expressed genes** (top 100)




A. GSE58208 芯片差异基因；B. GSE36076 芯片差异基因；$log_2FC>1$ 的红点表示上调基因，$log_2FC<-1$ 的红点表示下调基因，黑点表示没有显著差异的基因

**图 2　差异表达基因的火山**

**Fig. 2　Volcano map of differentially expressed genes**




红、黄色标记的基因为关键基因，且颜色越红，Score 值越大；颜色越黄，Score 值越小

**图 3　前 10 位 Hub 基因编码蛋白质互作网络**

**Fig. 3　Protein interaction network of top 10 hub genes**

**表 1　关键基因相关的潜在治疗中药**

**Table 1　Potential therapeutic herbs related to key genes**

| 中药 | 对应基因 | *P* |
|---|---|---|
| 人参 | IL-1*β* | 0.013 8 |
| 姜黄 | IL-1*β* | 0.014 8 |
| 积雪草 | IL-1*β* | 0.038 1 |
| 白花蛇舌草 | EGF | 0.017 0 |

77%)，采用随机效应模型分析。Meta 分析结果显示，试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著降低患者血清 TBIL 水平[SMD=−0.64，95% CI(−1.12，−0.16)，$P<0.01$]。

**2.6.4　免疫功能变化**

**2.6.4.1　血清 $CD4^+$ 水平**　本研究所纳入的 15 篇文献[13-27]中，有 9 个 RCT 对血清 $CD4^+$ 水平进行分析[14,19-21,23]。各研究间异质性较大($P<0.000\ 01$，$I^2=$

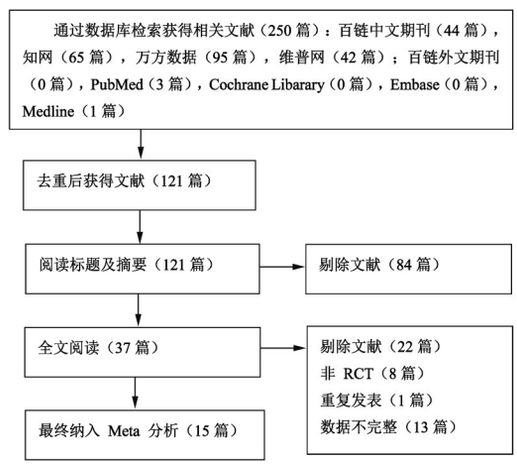



**图 4　纳入文献筛选流程**

**Fig. 4　Screening process of included literatures**

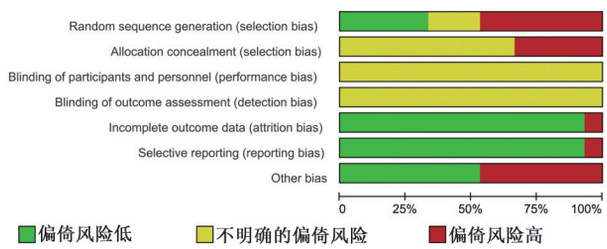



**图 5　风险偏倚情况**

**Fig. 5　Analysis of bias risk**

84%)，采用随机效应模型分析。Meta 分析结果显示，试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著提高患者血清 $CD4^+$ 水平[SMD=1.23，95%CI(0.80，1.66)，$P<0.000\ 01$]。

**2.6.4.2　血清 $CD8^+$ 水平**　本研究所纳入的 15 篇文献[13-27]中，有 9 个 RCT 对血清 $CD8^+$ 水平进行分析[14,19-21,23]。各研究间异质性较大($P<0.000\ 01$，$I^2=$

表2 纳入文献质量评分

Table 2 Quality score of included literatures

分

| 纳入文献 | 随机序列产生 | 随机化隐藏 | 盲法 | 退出或失访 | Jadad研究 |
|---|---|---|---|---|---|
| 黄智芬,等2004年[13] | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 杨嘉麟,等2021年[14] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 李杏英,等2019年[15] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 宋佩,等2017年[16] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 张玉萍,等2020年[17] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 朱玉辉,等2021年[18] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 王文海,等2006年[19] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 张厚云,等2019年[20] | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 唐亚乐,等2021年[21] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 刘晓焕2020年[22] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 赵华2019年[23] | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 余新莲2016年[24] | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 |
| 沈逸豪2021年[25] | 2 | 1 | 0 | 1 | 4 |
| 蔡岳2012年[26] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 邵婷婷2018年[27] | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |

89%),采用随机效应模型分析。Meta分析结果显示,试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著降低患者血清$CD8^+$水平[SMD=−0.72,95% CI(−1.22,−0.22),$P$<0.01]。

**2.6.4.3** 血清$CD4^+/CD8^+$水平 本研究所纳入的15篇文献[13-27]中,有7个RCT对血清$CD4^+/CD8^+$水平进行分析[14,16-17,19-21,23]。各研究间异质性较小($P$=0.13,$I^2$=39%),采用固定效应模型分析。Meta分析结果显示,试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著提高患者血清$CD4^+/CD8^+$水平[SMD=0.52,95% CI(0.35,0.70),$P$<0.000 01]。

**2.6.5** 中医证候积分 本研究所纳入的15篇文献[13-27]中,有6个RCT对中医证候积分进行分析[16,22-23,25-27]。各研究间异质性较大($P$<0.000 01,$I^2$=89%),采用随机效应模型分析。Meta分析结果显示,试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著降低患者中医证候积分[SMD=−0.87,95% CI(−1.44,−0.29),$P$<0.01]。

**2.6.6** 不良反应 本研究所纳入的15篇文献[13-27]中,有6个RCT对不良反应情况进行分析[13-14,16,19,24,26]。各研究间异质性较小($P$=0.12,$I^2$=48%),采用固定效应模型分析。Meta分析结果显示,试验组(中西医联合治疗)较对照组(单纯西医治疗)可显著降低不良反应发生率[OR=0.44,95% CI(0.25,0.78),$P$<0.01]。

**2.7** 发表偏倚分析 对有报道"临床总体疗效"这一结局指标的15项研究[13-27]进行倒漏斗图分析,见图6,图中散点左右稍不对称,提示存在发表偏倚可能性,可能有阴性结果研究未发表。

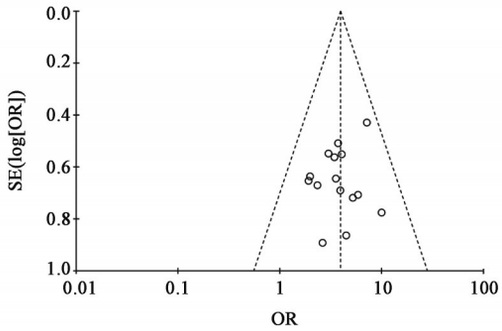



图6 临床总体疗效倒漏斗

Fig. 6 Inverted funnel chart of clinical total therapeutic effect

## 3 讨论

**3.1** HCC与PBMC之间存在紧密联系 HCC是位列我国癌症发病率第二、病死率第三的恶性肿瘤[28]。HCC的发病是个复杂的过程,其中炎症免疫细胞与恶性肿瘤之间的关系是近来研究的热点,因为恶性肿瘤的病理演变过程始终伴随着炎症免疫细胞的浸润[28]。单核细胞是一种来源于骨髓造血干细胞的炎症免疫细胞,参与体内的炎症免疫反应。外周血循环中的单核细胞在受到肿瘤相关趋化因子和细胞因子的招募下转移到肿瘤基质,分化成巨噬细胞,发挥免疫抑制、促进肿瘤血管生成、刺激肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的作用。肿瘤相关的巨噬细胞作为HCC微环境中的重要组成部分,可通过产生各种趋化因子和细胞因子促进HCC的发展[4]。因此,研究HCC-PBMC的分子机制,寻找有效的治疗靶点和潜在的中药具有重要的临床意义。

**3.2** HCC与多靶点的表达相关 本研究应用生物信息学方法进行分析,通过检索GEO数据库共获得2组HCC-PBMC基因芯片数据,经筛选共得出203个DEGs,其中包括194个上调表达基因,9个下调表达基因。经过进一步的筛选,最终共得到10个Hub基因,GIMAP1,GIMAP4,GIMAP6,GIMAP7,GIMAP8,IL-1$\beta$,CX3CR1,CCR2,TLR7,EGF。GTP酶,GIMAP基因位于染色体7q35~7q36.1区域内,他们编码一个主要在免疫系统中表达的蛋白质家族。GIMAP基因可促进胸腺细胞发育,外周血淋巴细胞凋亡和辅助性T细胞分化等免疫功能。当这些基因改变时,他们与免疫疾病有关,如T细胞淋巴细胞减少症、急性髓性白血病和自身免疫性疾病[29]。相关

研究表明，GIMAP除了参与免疫系统的调节外，还可能作为肿瘤抑制基因发挥作用[29]。此外，HUANG等[30]最近对HCC进行的一项研究中发现，GTP酶，IMAP家族成员5（GIMAP5）和GIMAP6的mRNA在HCC肿瘤样本和HCC患者的血液样本中的表达显著低于匹配的非肿瘤组织样本和健康受试者的血液样本，结果提示GIMAP5和GIMAP6参与了HCC的发病过程。一项最新研究，发现骨髓中的$CX3CR1^+$单核细胞可感知血液循环中的菌群信号，并以TLR依赖性方式产生炎症因子，从而促进造血祖细胞的扩增及向髓系细胞的分化，但CX3CR1与HCC之间的关系还有待进一步研究。CCR2是一种存在于免疫细胞表面的趋化因子受体，能引导免疫细胞到达炎症和肿瘤部位。BARTNECK等[31]研究显示，在肝纤维化-肝癌模型中，使用药理趋化因子趋化因子配体2（CCL2）拮抗剂抑制$CCR2^+$肿瘤相关巨噬细胞（TAM）的浸润，可显著减少病变血管形成和肝血容量，同时减小肿瘤体积，由此得出$CCR2^+$炎性TAM亚群具有促血管生成特性。TLR7是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子，主要在内小体上表达。MOHAMED等[32]研究结果表明，TLR7在人肝癌、肝癌动物模型和细胞系中均有高表达，他们可能是肝癌未来的治疗靶点。EGF是人体内的一种活性物质，能够促进细胞的增殖分化。研究发现，多数恶性肿瘤（包括HCC）会过度表达表皮生长因子受体（EGFR），且其被连接后会导致细胞分化和增殖[33]。单核巨噬细胞分泌这种细胞因子，由此可知，单核细胞通过分泌EGF促进HCC发生、发展。而目前，对于IL-1$\beta$基因与HCC-PBMC之间的关系研究较少，作用机制尚不明确，需进一步研究。

**3.3** HCC的发生是多个生物学过程及通路协同参与的结果　通过对2组基因芯片的共同DEGs进行GO功能和KEGG通路富集分析，结果表明，DEGs主要富集的生物学过程包括DNA模板转录调控，核糖核酸磷酸二酯键水解，核内裂解，核分裂的正调控，骨骼肌纤维发育，MAPK活性的激活。相关研究表明，p38 MAPK是细胞内重要的炎症信号通路，当外周血单核细胞受到细菌分泌的成分如脂多糖（LPS）刺激时，p38 MAPK信号通路被强激活，经过一系列生化反应，最终分泌肿瘤坏死因子-$\alpha$（TNF-$\alpha$）入血，到达相应肿瘤位置后发挥杀伤肿瘤细胞的作用[34]。另外，DEGs主要富集的信号通路包括范可尼贫血途径，代谢途径。范可尼贫血（FA）是由22个FA基因中至少1个双等位基因突变引起的一种隐性遗传病。FA与染色体异常和基因组不稳定有关，从而代表了癌症易感性的遗传脆弱性。随着FA基因改变在体细胞癌中的普遍发生和观察，FA通路的癌症相关性进一步确立，但是HCC中FA通路如何在单核细胞中发挥作用研究甚少，仍需进一步研究挖掘其潜在作用机制[35]。肝癌细胞重新编程他们的新陈代谢，以满足他们快速增殖和肿瘤生长的需要。ZHANG等[36]研究发现，大约30%的HCC组织或血液细胞中参与葡萄糖代谢途径的基因的表达一直处于失调状态，以下调为主。此外，差异表达的基因与晚期临床分期和不良预后有关。这项综合研究表明，葡萄糖代谢基因的表达可以作为潜在的预后标志物和/或治疗靶点，这可能有助于发展对HCC患者的精确治疗。

**3.4** 人参具有抗HCC的作用　HCC在中医古籍里并没有详细记载其相对应的疾病名称，根据其临床症状及病因病机可归属于中医古籍中的“胁痛”“肝积”“臌胀”“黄疸”等病范畴。疾病早期以气滞、血瘀、湿热等病邪为主，多属实证；疾病后期余邪耗气伤阴，导致气阴两虚，多属虚实夹杂、本虚标实之证[37]。本文通过对四君子汤（以人参为君药）治疗肝细胞癌进行系统评价后发现，和单纯应用西医治疗相比，应用中西医结合治疗可提高患者临床总体疗效，增强血清$CD4^+$，$CD4^+/CD8^+$水平；降低血清$CD8^+$，TBIL水平，改善中医证候，降低中医证候积分，并且安全性高，不良反应发生率低；在甲胎蛋白，ALT指标改善方面，观察组与对照组之间差异均无统计学意义，这种结果的出现与纳入文献数量较少、纳入文献质量不高等多种因素有关。现代医学研究认为，HCC与人体免疫功能低下、代谢功能紊乱等密切相关，本研究利用生物信息学共筛选出10个关键基因，其中通过调节免疫系统功能参与HCC发生、发展的基因包括GIMAP，CCR2，TLR7；并且可以通过KEGG富集分析得出代谢通路，这与本研究临床HCC的重要发病病因“代谢功能紊乱”不谋而合。同时，本研究尚存在一定局限性，①本研究所纳入文献大多未提及随机分配隐藏，施盲情况，随访情况，纳入原始文献质量不高；②纳入文献均为中文，缺乏多样化的文献研究。③本研究纳入文献数目较少，纳入患者例数不多，降低试验结果的准确性。④中医治疗虽然以四君子汤为主方进行干预，但是随症加减药物不同，患者病程不同，用药疗程亦不相同，导致存在不同程度的偏倚和混杂

因素。

综上所述，本研究基于生物信息学和系统评价分析发现GIMAP1，GIMAP4，GIMAP6，GIMAP7，GIMAP8，IL-1$\beta$，CX3CR1，CCR2，TLR7，EGF基因可能是HCC发生，发展的Hub基因；并且，HCC的发病过程与MAPK活性的激活，代谢途径等密切相关，中药人参治疗肝细胞癌临床总体疗效较好，患者临床各项指标改善明显，安全性高，不良反应发生率低。本研究为临床医生诊治HCC提供了一些思路和方法。但是，由于缺乏相应的生物学实验验证，本研究存在一定的局限性。接下来，本研究团队将设计相关生物实验进一步研究其分子机制，以期为今后临床试验和工作提供更加可靠的依据。

［利益冲突］ 本文不存在任何利益冲突。

［参考文献］

［1］ CRAIG A J, VON FELDEN J, GARCIA-LEZANA T, et al. Tumour evolution in hepatocellular carcinoma［J］. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(3): 139-152.

［2］ 郭江，李洪璐，李常青. TACE联合微波消融治疗中晚期肝癌的临床疗效分析［J］. 川北医学院学报，2019，34(2)：219-222.

［3］ 杨双燕，任红，李传飞，等. 基于生物信息学分析筛选肝细胞癌中的核心基因：细胞周期蛋白B2可作为肝癌潜在的诊疗和预后生物标志物［J］. 中华肝脏病杂志，2020，28(9)：773-783.

［4］ 沈晓燕，李婷婷，童海江. 外周血淋巴细胞/单核细胞比值在肝细胞肝癌中的临床意义［J］. 肿瘤学杂志，2018，24(8)：774-778.

［5］ 于哲，罗婧，杨永平. 外周血单个核细胞GPSM2水平可能是肝细胞癌预后判断的新型标志物［J］. 实用肝脏病杂志，2021，24(4)：556-560.

［6］ 周东晓，马英杰，陈光耀，等. 肝细胞癌患者外周血单个核细胞表面Toll样受体2和4与小肠细菌过度生长的关系［J］. 中华肝脏病杂志，2019，28(4)：286-290.

［7］ 杨智，陈洪涛，吴诗品. 肝细胞癌患者外周血单个核细胞Foxp3 mRNA水平变化［J］. 实用肝脏病杂志，2015，18(4)：395-398.

［8］ 周国俊，应伟，李文菠，等. 基于生物信息学研究肝癌发生相关基因及其功能［J］. 中华肝脏外科手术学电子杂志，2020，9(5)：488-492.

［9］ 周泽文，周先果，刘颖春，等. 肝细胞癌发病关键基因和预后相关基因的生物信息学分析［J］. 中华肝脏病杂志，2020，28(8)：686-691.

［10］ KONG Q, MA Y, YU J, et al. Predicted molecular targets and pathways for germacrone, curdione, and furanodiene in the treatment of breast cancer using a bioinformatics approach［J］. Sci Rep, 2017, 7(1): 15543.

［11］ 吴娜，毛祥坤，万治平，等. 溃疡性结肠炎活动期关键基因与治疗中药的生信分析及系统评价［J］. 中国中药杂志，2020，45(11)：2677-2686.

［12］ JADAD A R, MOORE R A, CARROLL D, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary?［J］. Control Clin Trials, 1996, 17(1): 1-12.

［13］ 黄智芬，刘俊波，黎汉忠，等. 柴芍四君子汤合西药治疗肝癌疼痛30例［J］. 中国中西医结合消化杂志，2004，12(5)：297-298.

［14］ 杨嘉麟，林安琪，卢振宁. 瑞戈非尼联合四君子汤治疗原发性肝癌的临床疗效观察［J］. 世界最新医学信息文摘，2021，21(27)：254-255.

［15］ 李杏英，杨德全，骆常义，等. 黄芪四君子汤对老年原发性肝癌放疗患者放射增敏及免疫功能的影响［J］. 中国老年学杂志，2019，39(16)：3937-3940.

［16］ 宋佩，武静. 黄芪四君子汤联合成分输血对肝癌患者术后免疫功能的影响［J］. 中医药导报，2017，23(21)：50-53.

［17］ 张玉萍，李婵桂，邹莹. 黄芪四君子汤联合成分输血对肝癌介入术后免疫功能影响的研究［J］. 新中医，2020，52(9)：46-48.

［18］ 朱玉辉，柴劲. 四君子汤加味联合介入疗法对原发性肝癌肝功能及免疫球蛋白的影响［J］. 湖北中医药大学学报，2021，23(2)：21-24.

［19］ 王文海，周荣耀，吴丽英，等. 六味地黄合四君子汤对原发性肝癌介入术后患者细胞免疫功能的调节作用［J］. 辽宁中医杂志，2006，33(10)：1225-1227.

［20］ 张厚云，王洪白. 射频消融术结合加味四君子汤治疗原发性肝癌临床观察［J］. 实用中医药杂志，2019，35(5)：549-550.

［21］ 唐亚乐，韩涛. 黄芪四君子汤对气血亏虚型中晚期原发性肝癌免疫功能的影响［J］. 实用中医内科杂志，2021，doi：21. 1187. R. 20210707. 1458. 006.

［22］ 刘晓焕. 四君子汤加味治疗原发性肝癌临床观察［J］. 光明中医，2020，35(8)：1133-1135.

［23］ 赵华. 四君子汤联合雷替曲塞和奥沙利铂治疗晚期肝癌的疗效及对免疫功能的影响［J］. 现代中西医结合杂志，2019，28(15)：1630-1633，1644.

［24］ 余新莲. 四君子汤联合西药治疗原发性肝癌导管动脉内化疗栓塞术后综合征(脾虚气滞)随机平行对照研究［J］. 实用中医内科杂志，2016，30(12)：64-66.

［25］ 沈逸豪. 四君子汤合柴胡疏肝散联合TACE治疗原发性肝癌临床观察［D］. 武汉：湖北中医药大学，2021.

[26] 蔡岳. 膈下逐瘀汤合四君子汤加减方治疗原发性肝癌介入术后临床观察[D]. 武汉:湖北中医药大学,2012.

[27] 邵婷婷. 基于聚类分析总结柴可群辨治原发性肝癌用药规律[D]. 杭州:浙江中医药大学,2018.

[28] 唐涛,廖锐,李静,等. 影响肝细胞癌预后的炎症免疫细胞研究进展[J]. 中国综合临床,2018,34(1):82-85.

[29] MEGARBANE A, PIQUEMAL D, REBILLAT A S, et al. Transcriptomic study in women with trisomy 21 identifies a possible role of the GTPases of the immunity-associated proteins (GIMAP) in the protection of breast cancer[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 611-616.

[30] HUANG Z, ZHANG W, GAO C, et al. Dysregulation of GTPase IMAP family members in hepatocellular cancer[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4119-4123.

[31] BARTNECK M, SCHRAMMEN PL, MOCKEL D, et al. The CCR2 + macrophage subset promotes pathogenic angiogenesis for tumor vascularization in fibrotic livers[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(2): 371-390.

[32] MOHAMED F, DHAR D, SHAH N, et al. PMO-092 TLR7 expression is increased in hepatocellular cancer (HCC) and its modulation is associated with alterations in tumour growth: a novel therapeutic target [J]. Gut, 2012, 61(Suppl 2): 110-111.

[33] EALES-REYNOLDS L J, LAVER H, MODJTAHEDI H. Evidence for the expression of the EGF receptor on human monocytic cells[J]. Cytokine, 2001, 16(5): 169-172.

[34] 卢应民,李锦华,顾军. P38MAPK在脂多糖诱导人单核细胞产生肿瘤坏死因子中的作用[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(10):620-623.

[35] LIU W, PALOVCAK A, LI F, et al. Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention [J]. Cell Biosci, 2020, 10(33): 39-85.

[36] ZHANG X, LI J, GHOSHAL K, et al. Identification of a subtype of hepatocellular carcinoma with poor prognosis based on expression of genes within the glucose metabolic pathway [J]. Cancers, 2019, 11 (12): 2023.

[37] 郭若闻,杨森,曹林,等. 原发性肝癌的中西医结合治疗进展[J]. 中西医结合肝病杂志,2019,29(6):573-576.

[责任编辑 张丰丰]