

九味癥消颗粒配伍治疗肝癌的网络模块分布机制分析

李荣¹, 顾浩¹, 王朋倩², 刘学武³, 彭冬冬³, 姜德建³, 王博¹, 刘骏¹, 王忠^{1*}

(1. 中国中医科学院 中医临床基础医学研究所, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 湖南普瑞玛药物研究中心有限公司 新药药效与安全性评价湖南省重点实验室, 长沙 410331)

[摘要] 目的:运用模块药理学分析框架探索九味癥消颗粒配伍治疗肝癌的网络模块分布机制。方法:通过细胞实验和动物实验研究九味癥消颗粒低、中、高剂量(4.1、8.2、16.4 g·kg⁻¹)的体外抗肝癌药效及对H22腹水瘤小鼠生存时间的影响。利用模块药理学分析策略,通过构建肝癌疾病网络和以MCODE划分模块的方式研究九味中药在肝癌疾病网络模块的分布特征。该研究以模块内节点的平均度值(AD)作为筛选疾病主要模块的指标,研究君臣佐药对主要模块的干预。最后利用Metascape生物信息分析平台对药物作用的模块进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果:细胞实验发现九味癥消颗粒可显著性抑制H22细胞增殖。动物实验发现九味癥消颗粒在中、高剂量组能够明显延长H22腹水瘤小鼠的存活时间($P<0.05, P<0.01$)。通过九味癥消颗粒中药靶点在肝癌疾病网络模块中的分布发现,九味癥消颗粒干预肿瘤坏死因子(TNF)、表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、转录因子jun(JUN)、肿瘤蛋白抗原p53(TP53)等26个靶点和8个模块。君药白果干预主要模块3、模块8,鹅不食草等臣药共同干预模块1、3、5、8、10、12。鹅不食草与余甘子还分别单独干预模块7及模块19。青蒿等佐药共同干预模块3、5、10、12。KEGG通路富集分析发现,8个模块共富集出135条通路,通路功能涉及癌症、信号转导、免疫系统、内分泌系统、氨基酸代谢等12大类。4个主要模块的功能都涉及癌症、信号转导、免疫系统。结合文献验证结果,九味癥消颗粒作用肝癌疾病网络的关键环节和核心机制,可能与抑制磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路,降低肿瘤微环境的免疫抑制性,增强抗肿瘤免疫反应有关。结论:九味癥消颗粒具有抗肝癌药理作用,其治疗效应是通过不同药物单独或联合干预疾病的多靶点、多模块、多功能实现的。该文用模块化分析策略降低了药物-疾病靶点网络分析的复杂性,探究了九味癥消颗粒配伍治疗肝癌的网络模块分布机制,为解密方剂配伍的复杂机制提供了新的思路。

[关键词] 九味癥消颗粒; 肝癌; 模块药理学; 主要模块; 药理机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0162-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220817 **[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.20220424.1810.001.html>

[网络出版日期] 2022-04-25 14:15

Distribution Mechanism of Network Modules in Combined Treatment of Liver Cancer with Jiuwei Zhengxiao Granules

LI Rong¹, GU Hao¹, WANG Pengqian², LIU Xuewu³, PENG Dongdong³, JIANG Dejian³, WANG Bo¹,
LIU Jun¹, WANG Zhong^{1*}

(1. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

Beijing 100700, China;

3. Hunan Key Laboratory of Pharmacodynamics and Safety Evaluation of New Drugs, Hunan Prima Drug Research Center Co. Ltd., Changsha 410331, China)

[收稿日期] 2022-12-31

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301059)

[第一作者] 李荣,在读硕士,从事临床药理学研究,E-mail:superlr1016@126.com

[通信作者] *王忠,研究员,从事临床药理学研究,E-mail:zhonw@vip.sina.com

[Abstract] **Objective:** To explore the distribution mechanism of network modules in the combined treatment of liver cancer with Jiuwei Zhengxiao granules (JWZX) based on the analysis framework of module pharmacology. **Method:** The cell experiment and the animal experiment were carried out to investigate the *in vitro* anti-liver cancer efficacy of JWZX of different concentrations and the effect on the survival time of H22 ascites tumor mice. By virtue of the analysis strategy of modular pharmacology, the distribution characteristics of nine Chinese drugs in the liver cancer disease network modules were investigated based on the constructed liver cancer disease network and module division by MCODE. In this study, the average degree (AD) of the nodes in the modules was used as an index to screen the main modules of the disease, and the intervention of the sovereign drugs, minister drugs, and assistant drugs on the main modules was explored. Finally, the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed on the drug-acted modules by Metascape. **Result:** As revealed by the cell experiment, JWZX could significantly inhibit the proliferation of H22 cells. The animal experiment demonstrated that the medium- and high-dose JWZX could significantly prolong the survival time of mice with H22 ascites tumor ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The distribution of targets of JWZX in the liver cancer disease network modules showed that JWZX interfered with tumor necrosis factor (TNF), epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), transcription factor (JUN), tumor protein p53 (TP53), and other 26 targets and 8 modules. The sovereign drug Ginkgo Semen mainly intervened in modules 3 and 8, and the minister drugs such as Centipeda Herba jointly intervened in modules 1, 3, 5, 8, 10, and 12. Centipeda Herba and Phyllanthi Fructus intervened in module 7 and module 19 individually. Artemisiae Annuae Herba and other assistant drugs jointly intervened in modules 3, 5, 10, and 12. KEGG pathway enrichment analysis found that 135 pathways were enriched in 8 modules, and the pathway functions involved 12 categories including cancer, signal transduction, immune system, endocrine system, and amino acid metabolism. The functions of the four major modules involved cancer, signal transduction, and immune system. According to the results of literature verification, the key links of JWZX on the liver cancer disease network and the core mechanism were presumedly related to the inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathways, reduction of the immunosuppressive effect in the tumor microenvironment, and improvement of the anti-tumor immune response. **Conclusion:** JWZX possesses pharmacological activity against liver cancer, and the therapeutic efficacy was achieved through the multiple targets, multiple modules, and multiple functions of drugs alone or in combination to intervene in the disease. The present study reduced the complexity of drug-disease target network analysis with module analysis strategy and explored the network module distribution mechanism of JWZX in the treatment of liver cancer, which provides a new idea for interpreting the complex mechanism of prescription compatibility.

[Keywords] Jiuweizhengxiao granules; liver cancer; modular pharmacology; main module; pharmacological mechanism

肝癌是复杂难治性疾病,其致死率位居全球第4^[1]。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%^[2]。肝癌起病隐匿,大多数患者在发现时已进展至中晚期,在全世界范围内造成了广泛的医疗负担与社会负担^[3]。近年来,分子靶向药索拉菲尼、仑伐替尼被应用于晚期肝癌患者的一线治疗。免疫检查点抑制剂纳武利尤单抗和帕博利珠单抗被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于晚期肝癌患者的二线治疗^[4]。靶向治疗和免疫治疗对于晚期肝癌患者有一定的生存

获益,但仍存在疗效低、耐药性、免疫相关毒性反应严重等问题^[4]。针对肝癌这类复杂疾病,单靶点的治疗策略往往难以取得理想效果^[5]。中医药治疗肝癌重视整体调节,中药复方具有多成分、多靶点的治疗优势,在改善患者临床症状、延长生存期、提高生存质量方面发挥重要作用^[6]。网络分析作为一种新的工具用以整合疾病与药物之间的复杂关系,为阐明中药复方作用机制提供了新的视角。在中医药理论指导下结合多组学生物大数据和网络模块分析方法为抗肝癌中药复方新药发现和组方配伍

机制研究提供了新的机遇^[7]。

九味癥消颗粒是课题组前期在国家十三五重大新药创制课题,“基于模块药理学的临床价值方剂发现与评价技术”的新药研发成果(2017ZX09301059)。通过临床转录组数据建立肝癌分子网络后运用“核心节点和模块筛选策略^[8-9]”及“网络控制优化筛选策略^[10]”等方法,融合比较已有相似中成药数据库信息,根据靶点化合物筛选、富集出中药组方,并根据肝癌诊疗的临床经验,结合斑马鱼实验多次筛选与优化确定中药组方及其剂量,结合人用经验,最后形成“九味癥消颗粒”由白果、鹅不食草、等9味中药组成,用于晚期肝癌正虚毒结证。从扶正祛邪、解毒散结角度,以改善患者临床病症,提高患者的生活质量。目前,九味癥消颗粒已完成新药临床前的研究,通过提取工艺优化、制剂配方优选、中试、质量标准、稳定性考察、毒理、药效学等实验研究,完成了药学、药效、毒理的研究工作。前期研究表明九味癥消颗粒质量可控,在规定剂量和疗程内使用安全,具有抑制肿瘤生长的作用。小样本临床研究也表明九味癥消颗粒用药安全,随用药时间延长具有一定改善患者生存时间的作用。九味癥消颗粒前期研究已显示出抗肝癌作用,为促进其临床的合理应用,需进一步探究其组方配伍机制。

课题组前期结合网络药理学方法和多靶点治疗思路,提出了“模块药理学”理念^[11-13],模块药理学认为复杂疾病治疗需要一种模块化的靶点研究模式,强调对复杂生物网络进行模块化分析,用以度量和整合药物干预网络的特征。通过对大网络进行分解或解构,找到药物特异性针对的小网络(即模块),有助于大网络的降维和简化。为进一步探究九味癥消颗粒配伍治疗肝癌的潜在作用机制,本文旨在运用模块药理学分析框架探索九味癥消颗粒配伍治疗肝癌的网络模块分布机制。通过构建疾病网络和划分疾病模块的方式,明确了九味癥消颗粒在肝癌疾病网络模块中的分布,并进一步分析了其治疗肝癌的核心作用机制,一方面为九味癥消颗粒临床合理应用提供了依据,另一方面通过探索网络模块靶点分布也为解密方剂配伍的复杂机制提供了新思路。

1 材料

九味癥消颗粒(由白陈皮、枳实等9味中药组成),样品自制,制备工艺如下,将9味药材加水10倍量,浸泡2 h,提取挥发油,挥发油另器收集,备用;挥发油提取后的滤液另器收集;取挥发油10倍

量的 β -环糊精,加水适量,溶解成水溶液,放凉,加入挥发油,搅拌1 h,冷藏,取出,抽滤,研细,备用;药渣继续加水煎煮2次,加水8倍量,每次煎煮1 h,煎液滤过,滤液合并;将挥发油提取后的滤液与两次煎煮滤液合并浓缩,干燥,粉碎成细粉,加入 β -环糊精包合物及其糊精适量,混合均匀,制粒,干燥,整粒,制成(批号20200101)。肝复乐胶囊(康普药业股份有限公司,批号20190817,规格0.5 g/粒)。

小鼠肝癌细胞(H22,腹水型,武汉普诺赛生物科技有限公司,批号CL-0341,传代2~3代)。FBS、RPMI-1640完全培养基(美国Gibco公司,型号500 mL,批号分别为10270-106、C11875500BT),Spectra Max i3x型酶标仪(Molecular Devices)。

BALB/c小鼠,SPF级,体质量18~22 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司动物,合格证号1107262011000808,许可证号SCXK(湘)2019-0004。通过湖南省药物安全评价中心实验动物管理(伦理)委员会审查,编号IACUC-2020(2)006。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 分组及浓度设置 根据九味癥消颗粒溶解性预实验,能溶解配制成溶液状态的最大可配制质量浓度为 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,采用 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 终质量浓度为最高浓度,以3 000、1 000、300、100、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 终浓度向下设计5个浓度,配制质量浓度为20 000、6 000、2 000、600、200、60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;另设溶媒组(培养基)、肝复乐胶囊组,质量浓度设计为10 000、3 000、1 000、300、100、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,配制浓度为20 000、6 000、2 000、600、200、60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每组做5个平行样,4个加样品不加细胞的调零孔。根据第一批实验结果,重新设计第二批、第三批实验浓度为1 000、300、100、30、10、3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 细胞培养 取H22细胞,采用含10%FBS的RPMI-1640完全培养基于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,根据细胞生长情况,1~2 d传代或换液,至对数生长期备用。

2.1.3 MTT比色法检测细胞增殖 将处于指数分裂期,贴壁/悬浮生长良好的肝癌细胞,制成单细胞悬液,调整细胞密度,接种于96孔细胞培养板中(终密度 2×10^3 个/孔),5% CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,弃去原培养液,加入新鲜培养液100 μL ,再加入不同浓度的供试品或对照品,每孔100 μL ,每个浓度5孔,另设4孔供试品或对照品作为调零孔。细胞毒性实验染毒方式供试品或对照品与细胞连续作用72 h,终

止培养后在每孔中加入MTT 20 μL ,继续培养4 h后使用酶标仪在492 nm处测量各孔的吸光度 A 。以溶媒组 A 为100%细胞活力,其余各组 A 与溶媒组 A 的比值为相对活力。以细胞增殖抑制率进行评价,若出现有细胞增殖抑制率 $>100\%$ 时,判为系统误差,以100%计。

2.1.4 半抑制浓度(IC_{50}) 分别求出每一浓度的细胞抑制率后,用SPSS 22.0软件计算供试品 IC_{50} ,最大抑制率为 E_{max} 。

2.2 对H22腹水瘤小鼠生存时间的影响

2.2.1 分组、给药与造模 BALB/c小鼠20只,SPF级,雌雄各半,体质量18~22 g,腹腔注射接种 1×10^7 个/只的H22腹水瘤细胞,在体内传代1次,选用传至2代以上的H22腹水瘤细胞,用于后续实验。

BALB/c雌、雄性小鼠各50只,SPF级,体质量18~22 g,将小鼠腹水瘤细胞(1×10^8 个/mL)0.2 mL注入各只动物腹腔。接种后次日随机分为5组,分别为模型组、肝复乐胶囊组、九味癥消颗粒低、中、高剂量组,10只/组/性别。每日给药前采用纯水将九味癥消颗粒干浸膏粉配制成浓度为0.055、0.111、0.221 g干浸膏/mL药液,将肝复乐胶囊配制成质量浓度为0.059 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 药液。各组按20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 经口灌胃给予相应浓度的药液,模型组经口灌胃给予等体积纯水,1次/日,连续给药4周。

2.2.2 剂量设计 九味癥消颗粒临床拟用剂量为63 g生药/d,成人体质量以50 kg计(肝癌晚期患者体质量低于成人平均体质量),按体表面积换算成小鼠等效剂量为63 g生药/d $\times 0.0026/0.02$ kg,约等于生药8.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。根据九味癥消颗粒前期长毒剂量,结合药效学剂量设计原则,选用九味癥消颗粒生药8.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为小鼠实验的中剂量,另设低、高剂量组,分别相当于等效剂量的0.5、2倍,即生药4.1、16.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。肝复乐胶囊临床用量为1次6粒,1 d 3次,规格为0.5 g/粒,成人平均体重按60 kg计算,按体表面积换算成小鼠等效剂量约为1.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以肝复乐胶囊小鼠等效剂量的1倍作为小鼠实验中肝复乐胶囊组给药剂量,即1.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。检测指标小鼠生存天数。

2.2.3 统计学分析 统计分析所用软件为SPSS 22.0。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用Leven's test方法检验正态性和方差齐性。如果差异没有统计学意义,用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析。如果ANOVA差异有统计学意义($P < 0.05$),用LSD test(参数法)进行比较分析。如果方差不齐($P < 0.05$),

则用Kruskal-Wallis检验。如果Kruskal-Wallis检验有统计学意义($P < 0.05$),则用Dunnett's Test(非参数方法)进行比较分析。 $P < 0.05$ 表示统计结果差异有统计学意义。

2.3 九味癥消颗粒治疗肝癌的网络模块分布机制

2.3.1 中药的化学成分与靶点收集 分别于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、中医药综合数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>)及中国科学院上海有机化学研究所中药与化学成分数据库(<http://www.chemcpd.csdb.cn/>)检索九味癥消颗粒中白果、余甘子、鹅不食草、青蒿、枳实、青皮、陈皮、枳壳、化橘红九味中药的化学成分,并对三个数据库的中药化学成分进行整合。将九味癥消颗粒药物的化学成分输入到STITCH数据库(<http://stitch.embl.de/>),选择物种为“Homo sapiens”,得分 > 0.7 (high confidence)的靶点作为九味癥消颗粒中药的化学成分的相关靶点,结果见表1。

表1 九味癥消颗粒中药的化学成分和靶点统计

Table 1 Chemical composition and target number statistics of Jiuzhizhengxiao Granules

中药	成分	有靶点成分	靶点数
白果	123	21	71
余甘子	97	20	88
青蒿	270	45	103
鹅不食草	133	17	46
枳实	135	21	67
枳壳	24	9	19
化橘红	74	16	59
陈皮	122	23	57
青皮	35	13	47

注:成分来源TCMSP、TCMID、中国科学院化学数据库,靶点来源STITCH数据库,得分 > 0.7

2.3.2 肝癌疾病网络构建与主要模块识别 以“liver cancer”和“hepatocellular carcinoma”为关键词,从在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)、美国国立生物技术信息基因数据库(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)下载肝癌的相关基因,将所有得到的基因合并去重。将下载的肝癌相关基因映射到STRING数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>),构建肝癌疾病分子相互作用网络,简称肝癌疾病网络。应用MCODE(Cytoscape中一种基于聚类算法的插件)对肝癌疾病网络进行模块划分。本研究的模块是指由多个

分子紧密连接形成的具有一定网络拓扑结构特征的功能集团,药物的效应可能通过模块而发生^[11-13]。有研究用模块内节点的平均度值(AD)作为筛选主要模块的指标^[14]。 $AD_{mx} = \sum D_{m_i} / M_x$ 。

AD_{m_x} 为模块 m_x 中蛋白的平均度值, i 为来自模块 m_x 的蛋白, D_{m_i} 为蛋白 i 在靶点网络中的度值, M_x 为模块 m_x 中蛋白质的总数。本研究将AD值大于平均值的模块作为肝癌疾病网络的主要模块。

2.3.3 中药靶点在肝癌疾病网络模块中的分布及功能富集分析 将九味癍消颗粒的中药靶点映射到肝癌疾病网络模块中,重叠节点数目 ≥ 1 ,认为药物对该疾病模块有影响,因此定义为药物的作用模

块。利用在线生物信息学数据库Metascape(<https://metascape.org/>)对药物作用模块进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,设定参数设置最小重叠度(min overlap)=3, P 临界值(P_{value} Cutoff)=0.01,最小富集度(min enrichment)=1.5。并将富集到的通路根据KEGG数据库中通路功能进行分类,探索每个模块的功能特征。

3 结果

3.1 体外抗肝癌药效学结果 在本实验条件下,九味癍消颗粒对H22细胞的 $IC_{50} < 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,肝复乐胶囊对H22细胞的 $IC_{50} < 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,九味癍消颗粒与肝复乐胶囊可显著性抑制H22的细胞增殖,3批独立实验的结果趋势基本一致,见表2。

表2 供试品/对照品对H22细胞增殖的影响

Table 2 Effect of test/control substance on H22 cell proliferation

受试物	质量 浓度 /mg·L ⁻¹	第一批			质量 浓度 /mg·L ⁻¹	第二批			质量 浓度 /mg·L ⁻¹	第三批		
		抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	E _{max} /%		抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	E _{max} /%		抑制率 /%	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹	E _{max} /%
肝复乐胶囊	30	27.675	396.233	91.818	3	12.173	167.955	87.005	3	30.019	2 659.064	66.806
	100	23.243			10	21.545			10	27.808		
	300	21.751			30	12.782			30	28.076		
	1 000	67.433			100	1.357			100	11.955		
	3 000	91.818			300	87.005			300	30.502		
	10 000	89.219			1 000	5.993			1 000	66.806		
九味癍消颗粒	30	-4.815	782.321	89.050	3	83.721	>1 000	83.721	3	41.518	116.252	94.148
	100	-12.726			10	9.483			10	31.630		
	300	3.038			30	-21.443			30	33.848		
	1 000	88.980			100	-2.833			100	20.569		
	3 000	89.050			300	20.972			300	45.201		
	10 000	84.015			1 000	38.920			1 000	94.148		

3.2 九味癍消颗粒对H22腹水瘤小鼠生存时间的影响 与模型组比较,雌性动物的九味癍消颗粒低、中、高剂量组及肝复乐胶囊组在造模后的生存天数都明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,雄性动物的九味癍消颗粒中、高剂量组及肝复乐胶囊组在造模后的生存天数也明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。实验表明,九味癍消颗粒具有延长H22腹水瘤小鼠存活时间的作用。见表3。

3.3 肝癌疾病网络构建与主要模块分析 从OMIM数据库和NCBI-Gene数据库共获得3 034个基因,进一步构建肝癌的疾病网络。疾病网络由845个节点,2 725条边组成。对疾病网络进行模块划分,划分为26个疾病模块(节点数目 > 3),见表4。

肝癌26个疾病模块AD值平均为12.63,大于平

表3 九味癍消颗粒对H22腹水瘤小鼠生存时间的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 3 Effect of test/control substance on survival time in H22 mice ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	生存时间/d	
		雌性	雄性
模型组		14.6±3.1	14.1±2.2
肝复乐胶囊组	1.2	18.2±2.3 ²⁾	16.6±2.9 ¹⁾
九味癍消颗粒低剂量组	4.1	17.4±1.3 ¹⁾	16.0±1.6
九味癍消颗粒中剂量组	8.2	18.2±2.3 ²⁾	16.6±3.0 ¹⁾
九味癍消颗粒高剂量组	16.4	18.9±3.2 ²⁾	17.3±3.2 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$

均值的主要模块共6个,分别为模块1、模块12、模块43、模块3、模块5、模块33。

表 4 肝癌 26 个模块的平均连通性(AD)

Table 4 Average degree(AD) of 26 modules in liver cancer

模块	节点数/个	边数/个	基因名	平均连通度
模块 1	14	79	AKAP9、AGGF1、受体酪氨酸蛋白激酶 2(ERBB2)、TRIM24、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)、表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、NRAS、MAP2K1、HGF、KRAS、HRAS、PTPN11、ARRB1	32.92
模块 12	31	75	成纤维细胞生长因子受体(FGFR4、FGFR3、FGFR2)、FASLG、NFKB1、CD40LG、MAPK1、MAPK14、BIRC3、CUL3、BIRC2、半胱氨酸蛋白酶(Caspase-8)、缺氧诱导因子(HIF1A)、SKP2、RBX1、STAT1、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARG)、CKS1B、肿瘤坏死因子配体超家族成员(TNFSF10)、FGF20、肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF1A)、细胞肿瘤抗原 p53(TP53)、FBXW7、STAT3、细胞因子信号转导抑制因子(SOCS3、SOCS1)、钙黏蛋白(CDH1)、PIK3R1、CBLB	22.58
模块 43	7	12	转录因子叉头框蛋白(FoxO1、FoxO3)、TRIP12、周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A(CDKN2A)、SMAD4、PARK2、TRIM37	20.57
模块 3	34	133	C-X-C 趋化因子受体 2 型(CXCR2)、C-X-C 基序趋化因子(CXCL16、CXCL12)、C-C 基序趋化因子(CCL5)、肝细胞生长因子受体(MET)、补体 C3(C3)、非典型趋化因子受体 3(ACKR3)、toll 样受体(TLR4、TLR2)、磷脂酰肌醇 4、5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α 亚型(PIK3CA)、GF1R、BTRC、原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Src(SRC)、PNPLA2、IKBKKG、WFS1、白蛋白(ALB)、IKBKB、SPP1、SERPINC1、PCSK9、EGF、磷脂酰肌醇(GPC3)、连环蛋白 beta 1(CTNNB1)、骨形成蛋白 4(BMP4)、甲胎蛋白(AFP)、载脂蛋白(APOE)、CHUK、肿瘤坏死因子(TNF)、酪氨酸受体激酶 JAK2(JAK2)、载脂蛋白 b-100(APOB)、C-X-C 趋化因子受体(CXCR6、CXCR4)、NFKB2	20.55
模块 5	18	44	BCL2L1、转录因子 p65(RELA)、NOTCH1、AKT1、XIAP、Myc 原癌基因蛋白(MYC)、VHL、E2F1、肝细胞核因子(HNF1A)、CREB1、红细胞生成素(EPO)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1B(CDKN1B)、转录因子(JUN)、CDKN1A、PSMB5、CCND1、POU5F1、转录因子 SOX-2(SOX2)	17.88
模块 33	5	6	RB1、FoxA1、组蛋白脱乙酰酶 1(HDAC1)、PML、雄激素受体(AR)	14.2
模块 6	5	18	OFD1、微管蛋白(TUBB)、PLK4、CEP290、SDCCAG8	12.2
模块 7	6	12	PSMD14、PSMD10、丝裂原活化蛋白激酶 6(MAPK6)、酪氨酸蛋白激酶 I 亚型(CSNK1A1)、NFKBIA、PSMD4	10.5
模块 8	23	57	TP53BP1、PYCARD、BARD1、ATR、丝氨酸蛋白激酶 ATM(ATM)、HELZ2、前列腺素 E 合酶 2(PGES2)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、磷脂酰胆碱转运蛋白 ABCB4(ABCB4)、ANGPTL4、组蛋白乙酰转移酶 p300(EP300)、XPC、USP7、XPA、MED1、核糖核酸酶 T2(RNASET2)、ERCC5、RETN、CHD1L、GLIPR1、PRSS3P2、ERCC4、PARP1	10.17
模块 22	4	5	胰岛素受体底物(IRS1、IRS2)、类胰岛素生长因子(IGF1)、催乳素受体(PRLR)	7.5
模块 11	5	9	TTK、NCAPG、CDCA3、TOP2A、BIRC5	7
模块 14	4	6	SEC13、BUB1B、CASC5、CENPM	6.75
模块 24	8	11	RAP1A、PEBP1、SMURF1、BCL2L11、泛素结合酶 E2Q1(UBE2Q1)、TLN1、TRIM71、RUNX3	6.75
模块 4	6	15	60S 核糖体蛋白 L11(RPL11)、40S 核糖体蛋白 S23(RPS23)、40S 核糖体蛋白 S6(RPS6)、40S 核糖体蛋白 S15(RPS15)、RPN2、60S 核糖体蛋白 L9(RPL9)	6.67
模块 2	7	21	RAB25、RAB24、RAB22A、RAB21、RAB1B、RAB10、RAB4B	6.29
模块 15	4	6	LRP6、AXIN2、AXIN1、APC	6.25
模块 10	5	10	细胞色素(CYP)3A4、CYP3A7、CYP2B6、CYP2A6、CYP2E1	6
模块 21	4	7	CDK12、乳腺癌 1 型易感蛋白(BRCA1)、NELFB、CDK9	5.5
模块 13	4	6	HSP90B1、GOLM1、FSTL3、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP3)	5.25
模块 9	5	9	白细胞介素-22 受体亚基-1(IL22RA1)、白细胞介素-24 IL24、白细胞介素-20 受体亚基(IL20RB)、IL20RA、酪氨酸受体激酶 JAK1(JAK1)	4.8
模块 16	4	9	SDHD、SDHB、SDHAF2、SDHA	4.5
模块 19	4	6	谷氨酸脱氢酶 1(GLUD1)、异柠檬酸脱氢酶(IDH2)、天冬氨酸转氨酶(GOT1)、IDH1	4.5
模块 17	4	6	丙酮酸激酶(PKM)、PFKM、PFKP、PFKL	4.25
模块 18	4	6	代谢型谷氨酸受体(GRM5)、UTS2R、UTS2、TACR1	3.5
模块 20	4	6	CCR2、CCR1、生长抑素受体 2 型(SSTR2)、CXCL1	3.25
模块 23	4	5	细胞间黏附分子(ICAM1)、TRIM3、HLA-A、TRIM29	3

3.4 九味癥消颗粒通过多靶点多模块作用肝癌疾病网络 九味癥消颗粒作用于肝癌疾病网络模块中的模块1、模块3、模块5、模块7、模块8、模块12等8个模块,干预了TNF、EGFR、VEGFA、JUN、TP53等26个靶点,见增强出版附加材料。其中,模块1、模块3、模块5、模块12是肝癌疾病网络的主要模块,占中药作用模块总数的50%。九味癥消颗粒在主要模块1中干预了2个靶点(EGFR、VEGFA),在主要模块3中干预了6个靶点(ALB、IKBKB、APOB、TNF、TLR4、APOE),在主要模块5中干预了6个靶点(JUN、MYC、RELA、CCND1、Akt1、BCL2L1),在主要模块12中干预了5个靶点(CASP8、HIF1A、TP53、TNFRSF10B、PPARG)。可以看出九味癥消颗粒通过多靶点、多模块干预肝癌疾病网络,且靶点较多聚集在4个主要模块内。

进一步分析九味癥消颗粒的中药靶点和作用模块,发现以上26个中药靶点中18个靶点是中药的共同靶点,8个靶点是中药单独干预靶点。如君药白果与臣药鹅不食草共同干预TNF,臣药余甘子、枳实与佐药青蒿、化橘红、枳壳共同干预PPARG。白果、鹅不食草、余甘子、青蒿还分别单独干预LPL、RELA、NFKBIA、GLUD1、IKBKB等靶点,见表5。从九味癥消颗粒作用的8个模块来看,君药白果作用于主要模块3和模块8,臣药鹅不食草、余甘子、青皮、陈皮、枳实共同作用于主要模块1、3、5、12和模块8、10,佐药青蒿、化橘红、枳壳共同作用于主要模块3、5、12和模块10。鹅不食草与余甘子还分别单独作用于模块7、19。可以发现九味癥消颗粒君臣佐药都干预了主要模块,臣药和佐药在干预主要模块的基础上扩大了对肝癌疾病网络的作用范围,进一步辅助君药干预肝癌疾病网络。

3.5 模块通路富集分析 对以上8个模块分别进行KEGG通路富集分析,识别每个模块的功能。8个模块共富集出135条通路,4个主要模块共富集出125条通路,占总通路富集结果的92.6%。根据KEGG数据库通路功能分类,8个模块富集出的通路大致可以分为12大类,每个模块的富集通路种类见增强出版附加材料。模块1富集出69条通路,通路功能主要涉及癌症、信号转导、内分泌系统和免疫系统。模块3富集出77条通路,主要涉及癌症、信号转导和免疫系统。模块5富集出64条通路,主要涉及癌症、信号转导、免疫系统和内分泌系统。模块7只富集出1条通路,涉及病毒感染性疾病。模块8富集出4条通路,主要涉及病毒感染性疾病、

细胞生长与死亡、遗传信息加工过程中的复制和修复。模块10富集出5条通路,主要涉及新陈代谢。模块12富集出93条通路,主要涉及癌症、信号转导、免疫系统和细胞的生长与死亡。模块19富集出3条通路,主要涉及氨基酸代谢。4个主要模块的功能都涉及到癌症、信号转导、免疫系统。因此笔者推测,九味癥消颗粒潜在的核心作用机制可能与干预信号转导、免疫系统有关。

表5 九味癥消颗粒的中药靶点和8个作用模块

Table 5 herb targets and 8 action modules of Jiuwei Zhengxiao granules

中药	靶点	作用模块
余甘子、青蒿	EGFR	模块1
鹅不食草、陈皮、青蒿	VEGFA	模块1
余甘子、青蒿	ALB	模块3
余甘子、青皮、陈皮、枳实	APOB	模块3
白果、余甘子、陈皮、化橘红、枳壳	APOE	模块3
青蒿	IKBKB	模块3
余甘子、青蒿、化橘红	TLR4	模块3
白果、鹅不食草	TNF	模块3
余甘子、青皮、陈皮、青蒿	Akt1	模块5
青蒿	BCL2L1	模块5
青皮、枳实、化橘红	CCND1	模块5
余甘子、枳实、青蒿	JUN	模块5
鹅不食草、陈皮	MYC	模块5
鹅不食草	RELA	模块5
鹅不食草	NFKBIA	模块7
余甘子、枳实	ANGPTL4	模块8
白果	LPL	模块8
枳实、青蒿	PARP1	模块8
鹅不食草、青皮、青蒿、化橘红	CYP2A6	模块10
枳实、青蒿	CYP3A4	模块10
陈皮、枳实	CASP8	模块12
青蒿	HIF-1 α	模块12
余甘子、枳实、青蒿、化橘红、枳壳	PPARG	模块12
青蒿	TNFRSF10B	模块12
鹅不食草、青蒿、枳壳	TP53	模块12
余甘子	GLUD1	模块19

进一步对比4个主要模块的通路,发现主要模块之间存在30条重叠通路。通过实验文献验证发现有12条通路与肝癌相关,见增强出版附加材料。其中,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路^[15-16]、HIF-1信号通路^[17-19]都与抗肿瘤免疫相

关,通过调节细胞因子、趋化因子、生长因子影响肿瘤免疫微环境,在肝癌免疫逃逸中起着至关重要的作用^[20-21]。肝细胞癌中PI3K/Akt信号通路激活与程序性细胞死亡配体-1(PD-L1)表达增加呈正相关^[22]。程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)与其配体(PD-L1)相互作用能够抑制T细胞活化和增殖,介导负性免疫调控,是肝癌免疫逃逸的关键^[23]。Akt信号通路激活会进一步驱动HIF-1对癌症免疫适应^[20,24]。HIF-1激活导致血管内皮生长因子(VEGF)产生,从而诱导肿瘤血管生成^[25]九味癍消颗粒治疗肝癌的核心机制可能与抑制PI3K/Akt、HIF-1信号通路,降低肿瘤微环境的免疫抑制性,增强抗肿瘤免疫反应有关。

3.6 九味癍消颗粒抗癌靶点文献验证 从上述实验结果中发现九味癍消颗粒干预肝癌疾病网络模块中的26个靶点。为了探索九味癍消颗粒能否通过上述靶点治疗肝癌,通过已发表文献验证上述结果的可靠性。结果发现九味癍消颗粒中白果、青蒿、余甘子、鹅不食草、陈皮的相关成分有文献^[26-40]证明作用于以下13个靶点,见表6。其中6个靶点TNF^[26]、EGFR^[28]、VEGFA^[37]、JUN^[30]、TP53^[34]、MYC^[38]是癌症的已知靶点。未验证靶点有ALB、IKBKB、RELA、CCND1、PARP1、ANGPTL4、LPL、CYP3A4、Caspase-8、PPARG等13个靶点,是九味癍消颗粒潜在的治疗靶点。

4 讨论

本研究通过体外细胞实验和动物实验发现九味癍消颗粒可显著性抑制H22的细胞增殖,并且具有延长H22腹水瘤小鼠生存期的药理作用。为进一步探索其药效作用机制,本研究运用模块药理学分析框架,从方剂配伍角度发现了九味癍消颗粒中君药、臣药、佐药在肝癌疾病网络中多靶点、多模块的分布特征和多途径的功能特征,并进一步探索了其核心作用机制可能与抑制PI3K/Akt、HIF-1信号通路,降低肿瘤微环境的免疫抑制性,增强抗肿瘤免疫反应有关。为解密方剂配伍的复杂机制提供了新的思路,为下一步开展九味癍消颗粒的药理机制实验研究提供了参考。

4.1 从方剂配伍角度探讨九味癍消颗粒君臣佐药对肝癌疾病模块的作用特点 本研究通过模块解构的方法,发现九味癍消颗粒君臣佐药在肝癌疾病模块靶点谱的差异。君药白果干预主要模块3和模块8。鹅不食草等臣药和青蒿等佐药在干预4个主要模块的基础上还干预了模块7、8、10、19,扩大了

表6 已发表文献中九味癍消颗粒的已验证靶点

Table 6 Verified targets of Jiuwei Zhengxiao granules in published literature

中药	已验证靶点	参考文献
白果	TNF	[26]
白果	APOE	[27]
青蒿	EGFR	[28]
青蒿	TLR4	[29]
青蒿	JUN	[30]
青蒿	Akt1	[31]
青蒿	BCL2L1	[32]
青蒿	CYP2A6	[33]
青蒿	TP53	[34]
余甘子	APOB	[35]
余甘子	GLUD1	[36]
鹅不食草	VEGFA	[37]
鹅不食草	MYC	[38]
鹅不食草	CYP2A6	[39]
陈皮	VEGFA	[37]
陈皮	APOE	[40]

对肝癌疾病模块的干预范围。每个模块的功能既不相同又相互补充,九味癍消颗粒通过干预不同的功能模块,参与调节肝癌的生物学过程。

主要模块3是信号转导、免疫相关模块,富集到PI3K/Akt、TNF等信号通路。PI3K/Akt通路与抗肿瘤免疫相关,通过调节细胞因子、趋化因子、生长因子影响肿瘤免疫微环境,在肿瘤免疫逃逸中起着至关重要的作用^[20-21]。药物通过抑制PI3K/Akt信号通路能够诱导肝癌细胞凋亡^[41]。TNF是一种重要的细胞因子,能够诱导细胞凋亡、炎症、免疫等多种细胞内信号通路。TNF信号通路激活在肝癌进展和转移中发挥重要作用^[42]。模块8是细胞周期相关模块,主要富集到细胞周期、转录因子叉头框蛋白O(FoxO)等信号通路。FoxO最初被认为是诱导细胞周期阻滞和凋亡的肿瘤抑制因子。但新的研究发现,FoxO蛋白在肝癌患者中高表达,FoxO通路激活会引起氧化应激和肝细胞DNA损伤,诱导肿瘤发生^[43]。君药白果通过干预模块3、8中APOE^[27]、TNF^[26]等靶点,可能参与调节肿瘤免疫微环境、细胞凋亡、炎症细胞因子释放等与肝癌发病密切相关的生物学过程。

主要模块1、5、12都是与信号转导、内分泌、免疫相关的模块,富集到过氧化物酶体增植物激活受体(PPAR)、HIF-1、VEGF、PI3K/Akt等信号通路。

肝脏是人体重要的代谢和内分泌器官。PPAR能够调节肝脏脂质代谢的基因表达,参与脂质氧化和细胞增殖。研究表明,药物通过抑制HIF-1 α /PPAR- γ 轴能够抑制糖酵解,降低肝癌细胞增殖、促进癌细胞凋亡^[44]。抑制VEGF信号通路能够减弱肝癌中肿瘤相关巨噬细胞的活性,调控肝癌细胞侵袭和迁移^[45-46]。缺氧是形成肝癌微环境的一个重要因素。HIF-1是细胞适应缺氧过程中重要的转录因子,也是血管内皮生长因子- α (VEGF-A)的主要调节因子,在细胞代谢、免疫逃逸、肿瘤血管生成中发挥重要作用^[47]。干预HIF-1有望成为肝癌精准治疗的新策略^[48]。PI3K/Akt信号通路能够在调控肝癌细胞的增殖、凋亡和糖酵解中发挥作用^[49]。模块10和模块19都是与氨基酸代谢相关的模块,富集到氨基酸代谢相关通路。氨基酸浓度的变化可以影响肝癌细胞的生长^[50]。研究发现,支链氨基酸(BCAA)在小鼠模型中具有抗纤维化的作用,补充BCAA可防止小鼠肝细胞凋亡,降低肝癌的发生率^[51]。臣药和佐药通过干预以上4个主要模块和模块7、8、10、19,可能参与调节肿瘤血管生成、细胞增殖与凋亡、肝癌细胞侵袭和迁移等与肝癌发病密切相关的生物学过程。本文探讨了九味癍消颗粒君臣佐药在肝癌疾病网络模块中的分布差异和功能特征。发现4个主要模块的功能都涉及信号转导和免疫,这在一定程度上提示了九味癍消颗粒作用于肝癌疾病网络的关键环节和核心机制,为解密方剂配伍的复杂机制提供了新的思路。

4.2 从中药有效成分的靶点探讨九味癍消颗粒的作用机制 TNF- α 在肝癌预后不良的患者中高表达,通过药物抑制TNF- α 的表达可以增强索拉菲尼抗肝癌的作用^[52]。豆甾醇是白果中重要的化学成分之一,有研究发现豆甾醇可以显著降低TNF- α 的转录水平,抑制肿瘤的生长^[26]。青蒿中的木犀草素能够促进恶性肿瘤的细胞凋亡。木犀草素通过上调细胞凋亡调节蛋白(Bax)的表达和下调抗凋亡蛋白(Bcl-xL)的表达能够抑制乳腺癌肿瘤的生长^[28]。青蒿琥酯是一种新的潜在的抗肿瘤药物,能够抑制血管瘤内皮细胞的增殖和侵袭,并且随时间推移可显著降低血管瘤细胞VEGFA、VEGFR-1、VEGFR-2和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达^[53]。有研究发现,青蒿乙醇提取物能通过阻断PI3K/Akt/mTOR信号通路,诱导人肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞生长^[16]。芹菜素是青蒿和枳实的有效成分之一,研究发现芹菜素对肝癌细胞有抗癌活性,通过抑制

PI3K/Akt/mTOR通路诱导细胞凋亡和自噬^[15]。在肿瘤微环境中,细胞和组织经常处于缺氧状态,细胞通过激活HIF通路适应低氧,HIF有望成为肝癌精准治疗的新靶点^[17-19]。川皮苷是陈皮、鹅不食草、化橘红的有效成分之一,研究发现川皮苷通过Akt/HIF-1 α 途径影响前列腺癌细胞VEGF的表达^[38]。本文从中药成分和靶点角度探讨了九味癍消颗粒不同中药的抗癌作用,为验证其治疗肝癌的作用机制提供了文献佐证。中药靶点的文献验证结果与通路研究结果相一致,这也在一定程度上提示了九味癍消颗粒潜在的核心作用机制,为下一步开展九味癍消颗粒的药理机制实验研究提供了参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GBD 2015 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] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. 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.
- [4] 国家卫生健康委员会. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(2): 277-292.
- [5] KOLA I, LANDIS J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(8): 711-715.
- [6] 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.
- [7] 王忠, 刘骏. 网络药理学与中药复方新药发现[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(11): 862-864.
- [8] 张莹莹. 清开灵多组分干预脑缺血模型蛋白质网络主要模块的识别与比较[D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [9] ZHANG Y Y, ZHAO Z D, KONG P Y, et al. A comparative pharmacogenomic analysis of three classic

- TCM prescriptions for coronary heart disease based on molecular network modeling[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(6):735-744.
- [10] 王博,张莹莹,王念,等. 复杂网络控制理论在方剂作用机制研究中的价值[J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(2):116-119.
- [11] 陈寅莹,冯丽鹏,李勇,等. 模块分析法:解密复杂疾病和药物作用机制的新策略[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(20):4112-4116.
- [12] WANG Z, LIU J, YU Y, et al. Modular pharmacology: The next paradigm in drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7(8):667-677.
- [13] WANG Z, WANG Y Y. Modular pharmacology: Deciphering the interacting structural organization of the targeted networks[J]. *Drug Discov Today*, 2013, 18(11/12):560-566.
- [14] WANG P, ZHOU W, LIU J, et al. Modulome-fangjiome association study (MoFAS) reveals differential target distribution among four similar fangjis (formulas)[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 113822.
- [15] YANG J, PI C, WANG G. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103:699-707.
- [16] KIM J, JUNG K H, CHOI J G, et al. Artemisiae iwayomogii herba inhibits growth, motility, and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Planta Med*, 2020, 86(10): 717-727.
- [17] GUO Y, XIAO Z, YANG L, et al. Hypoxia-inducible factors in hepatocellular carcinoma (Review) [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43(1):3-15.
- [18] ZHANG J, ZHANG Q, LOU Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α /interleukin-1 β signaling enhances hepatoma epithelial-mesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment[J]. *Hepatology*, 2018, 67(5): 1872-1889.
- [19] FENG W, XUE T, HUANG S, et al. HIF-1 α promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells via the IL-8-NF- κ B axis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23:26.
- [20] NISHIDA N. Role of oncogenic pathways on the cancer immunosuppressive microenvironment and its clinical implications in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers*, 2021, 13(15):3666-3681.
- [21] HE Y, WANG X. Identification of molecular features correlating with tumor immunity in gastric cancer by multi-omics data analysis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(17):1050.
- [22] NISHIDA N, SAKAI K, MORITA M, et al. Association between genetic and immunological background of hepatocellular carcinoma and expression of programmed cell death-1[J]. *Liver Cancer*, 2020, 9(4): 426-439.
- [23] 兰芬,李睿旻,阳凌燕,等. 程序性细胞死亡蛋白1及其配体抑制剂抗肿瘤免疫治疗进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(5):813-817.
- [24] 翁雄峰. CDK5RAP3通过Akt/HIF-1 α /VEGFA通路抑制胃神经内分泌癌的血管生成[D]. 福州:福建医科大学, 2019.
- [25] SEMENZA G L. HIF-1: Using two hands to flip the angiogenic switch[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19(1/2):59-65.
- [26] KANGSAMAKSIN T, CHAITHONGYOT S, WOOTHICHAIKANGSANG C, et al. Lupeol and stigmasterol suppress tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- α [J]. *PLoS One*, 2017, 12(12):e0189628.
- [27] HUANG Z H, GU D, MAZZONE T. Oleic acid modulates the post-translational glycosylation of macrophage ApoE to increase its secretion [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(28):29195-29201.
- [28] KAPOOR S. Luteolin and its inhibitory effect on tumor growth in systemic malignancies [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(6):777-778.
- [29] LAI L, CHEN Y, TIAN X, et al. Artesunate alleviates hepatic fibrosis induced by multiple pathogenic factors and inflammation through the inhibition of LPS/TLR4/NF- κ B signaling pathway in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765(5):234-241.
- [30] WANG S W, CHEN Y R, CHOW J M, et al. Stimulation of Fas/FasL-mediated apoptosis by luteolin through enhancement of histone H3 acetylation and c-Jun activation in HL-60 leukemia cells [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(7):866-877.
- [31] YAO X, JIANG W, YU D, et al. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis of human melanoma cells *in vivo* and *in vitro* by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/Akt pathway [J]. *Food Funct*, 2019, 10(2):703-712.
- [32] TANG S Y, ZHONG M Z, YUAN G J, et al. Casticin, a flavonoid, potentiates TRAIL-induced apoptosis through modulation of anti-apoptotic proteins and death

- receptor 5 in colon cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2):474-480.
- [33] ABU-BAKAR A, HAKKOLA J, JUVONEN R, et al. Function and regulation of the Cyp2a5/CYP2A6 genes in response to toxic insults in the liver[J]. *Curr Drug Metab*, 2013, 14(1):137-150.
- [34] GRANATO M, GILARDINI MONTANI M S, SANTARELLI R, et al. Apigenin, by activating p53 and inhibiting STAT3, modulates the balance between pro-apoptotic and pro-survival pathways to induce PEL cell death[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1):167.
- [35] LEE M R, LEE H Y, LEE G H, et al. Ixeris dentata decreases ER stress and hepatic lipid accumulation through regulation of ApoB secretion[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(3):639-649.
- [36] LUO Y, HUO Y, SONG P, et al. Validation and functional analysis of the critical proteins in combination with taurine, epigallocatechin gallate and genistein against liver fibrosis in rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115:108975.
- [37] LAM K H, ALEX D, LAM I K, et al. Nobiletin, a polymethoxylated flavonoid from citrus, shows anti-angiogenic activity in a zebrafish *in vivo* model and HUVEC *in vitro* model[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(11):3313-3321.
- [38] CHEN J, CREED A, CHEN A Y, et al. Nobiletin suppresses cell viability through Akt pathways in PC-3 and DU-145 prostate cancer cells[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2014, 15:59.
- [39] HOSONO H, KUMONDAI M, MAEKAWA M, et al. Functional characterization of 34 CYP2A6 allelic variants by assessment of nicotine C-oxidation and coumarin 7-hydroxylation activities [J]. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45(3):279-285.
- [40] CASTELLANOS-TAPIA L, LÓPEZ-ALVARENGA J C, EBBESSON S O. Apolipoprotein E isoforms 3/3 and 3/4 differentially interact with circulating stearic, palmitic, and oleic fatty acids and lipid levels in Alaskan Natives [J]. *Nutrition research : Nutr Res*, 2015, 35(4):294-300.
- [41] LIU J S, HUO C Y, CAO H H, et al. Aloperine induces apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2019, 61(7):152843.
- [42] MA W, CHEN X, WU X, et al. Long noncoding RNA SPRY4-IT1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma via mediating TNF signaling pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(11):7849-7862.
- [43] LU M, HARTMANN D, BRAREN R, et al. Oncogenic Akt-FOXO3 loop favors tumor-promoting modes and enhances oxidative damage-associated hepatocellular carcinogenesis[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):887.
- [44] FENG J, DAI W, MAO Y, et al. Simvastatin re-sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by inhibiting HIF-1 α /PPAR- γ /PKM2-mediated glycolysis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1):24.
- [45] OKIKAWA S, MORINE Y, SAITO Y, et al. Inhibition of the VEGF signaling pathway attenuates tumor-associated macrophage activity in liver cancer [J]. *Oncol Rep*, 2022, 47(4):71.
- [46] FEI G, CAO M, GE C, et al. Propofol suppresses hepatocellular carcinoma by inhibiting NET1 through downregulating ERK/VEGF signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):11208.
- [47] SHAN B, GEREZ J, HAEDO M, et al. RSUME is implicated in HIF-1-induced VEGF-A production in pituitary tumour cells[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(1):13-27.
- [48] CHEN C, LOU T. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(28):46691-46703.
- [49] SHENG T, MAO X B, ZHANG S H. CaMKK β regulates proliferation, apoptosis, and glycolysis of hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt pathway [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(6):3857-3869.
- [50] HASSAN Y A, HELMY M W, GHONEIM A I. Combinatorial antitumor effects of amino acids and epigenetic modulations in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(11):2245-2257.
- [51] TAKEGOSHI K, HONDA M, OKADA H, et al. Branched-chain amino acids prevent hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):18191-18205.
- [52] TAN W, LUO X, LI W, et al. TNF- α is a potential therapeutic target to overcome sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *E Bio Med*, 2019, 40:446-456.
- [53] WANG N, CHEN H, TENG Y, et al. Artesunate inhibits proliferation and invasion of mouse hemangioendothelioma cells *in vitro* and of tumor growth *in vivo*[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5):6170-6176.

[责任编辑 顾雪竹]