

大柴胡汤通过调控 p38 MAPK/IL-6/STAT3 信号通路抑制肝癌的作用机制

乔曦, 许世豪, 王宇炜, 封冰, 彭佩克, 沈凯凯*

(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

[摘要] 目的:探讨大柴胡汤抗小鼠肝癌的体内外活性及潜在作用机制。方法:取对数生长期 Hepa1-6 细胞,培养 1、2、4、8 d 后,用噻唑蓝(MTT)比色法、结晶紫染色法检测大柴胡汤(0、125、250、500、1 000 mg·L⁻¹)对小鼠肝癌细胞(Hepa1-6)增殖活性的影响。通过肝内注射 1×10⁶ 个 Hepa1-6 细胞建立小鼠肝癌原位模型,随机分为空白组,模型组,大柴胡汤低、中、高剂量组(0.21、0.625、1.875 g·kg⁻¹),灌胃给药,每日 1 次;5-氟尿嘧啶(5-FU)组,(25 mg·kg⁻¹)腹腔注射,隔日注射,连续给药 14 d 后处死小鼠,取肝,用 4% 多聚甲醛(PFA)固定,苏木素-伊红(HE)染色检测大柴胡汤抑制肝癌的活性。运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)、Cytoscape3.7.2 软件、STRING 平台、DAVID 平台数据库对大柴胡汤和肝癌靶基因进行关键靶基因的筛选及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大柴胡汤对 Hepa1-6 细胞及小鼠肝脏中白细胞介素-6(IL-6)mRNA 的影响。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、信号转导与转录活化因子 3(STAT3)相关通路蛋白的表达。结果:MTT 比色法、结晶紫染色结果显示,与空白组比较,大柴胡汤组(500、1 000 mg·L⁻¹)第 4、8 天时能够显著性地抑制 Hepa1-6 细胞增殖(P<0.05),呈浓度和时间依赖性;体内实验结果显示,大柴胡汤给药 14 d 后,与模型组比较,大柴胡汤组(1.875 g·kg⁻¹)的肿瘤细胞多呈高分化,异型不明显,坏死区少见。网络药理学结果显示大柴胡汤作用于肝癌的核心基因,以调控肝癌微环境为主如 IL-6、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等;信号通路以肝癌生长、分化、免疫和炎症为主,如 MAPK、STAT3 等。在 Hepa1-6 细胞中,与空白组比较,大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)第 1、2、4、8 天能抑制 IL-6 mRNA 表达(P<0.05)。与模型组比较,大柴胡汤组(0.625、1.875 g·kg⁻¹)处理的小鼠肝脏中 IL-6 mRNA 表达下降(P<0.05)。体外实验显示,与空白组比较,大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)第 4、8 天和 大柴胡汤(500、1 000 mg·L⁻¹)能够抑制 Hepa1-6 细胞中细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)和 STAT3 的磷酸化表达(P<0.05),呈时间和浓度依赖性;体内实验结果显示,与模型组比较,大柴胡汤组(0.625、1.875 g·kg⁻¹)能显著性地抑制 p38 MAPK 和 STAT3 的磷酸化(P<0.05)。结论:大柴胡汤通过调控 p38 MAPK/IL-6/STAT3 信号轴,从而达到抑制肝癌的活性。

[关键词] 肝癌; 大柴胡汤; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 白细胞介素-6; 信号转导与转录活化因子 3

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0019-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221026 **[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.20220328.1057.002.html>

[网络出版日期] 2022-03-29 16:46

Da Chaihutang Inhibits Hepatocellular Carcinoma by Regulating p38 MAPK/IL-6/STAT3 Signaling Pathway

QIAO Xi, XU Shihao, WANG Yuwei, FENG Bing, PENG Peike, SHEN Kaikai*

(School of Basic Medical Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the efficacy and underlying mechanism of Da

[收稿日期] 2022-01-03

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82004000);中华中医药学会青托人才项目(2019-QNRC2-B07);上海中医药大学杏林学者跟踪计划项目(B1-GY21-409-04-23)

[第一作者] 乔曦,在读硕士,从事肝癌发病机制与中医药干预策略研究,E-mail:hiqiaoxi@163.com

[通信作者] * 沈凯凯,博士,教授,从事肝癌发病机制与中医药干预策略研究,E-mail:skkshanghai@163.com

Chaihutang (DCHT) in treating hepatocellular carcinoma (HCC) *in vitro* and *in vivo*. **Method:** We employed methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and crystal violet staining to observe the proliferation of Hepal-6 liver cancer cells treated with DCHT at different doses (0, 125, 250, 500, 1 000 mg·L⁻¹) for different time periods (1, 2, 4, 8 days). The orthotopic liver cancer model was established by injection of 1×10⁶ Hepal-6 cells into mouse, and then the model mice were randomly assigned into six groups: blank, model, DCHT (0.21, 0.625, 1.875 g·kg⁻¹, *ig*, *qd*), and positive control (5-fluorouracil, 25 mg·kg⁻¹, *ip*, *qod*). After 14 days of administration, the mice were sacrificed, and the liver samples were collected and fixed in 4% paraformaldehyde for hematoxylin-eosin (HE) staining. The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), Cytoscape 3.7.2, STRING, and DAVID were used for the searching of the key targets of DCHT in treating HCC, the construction of protein-protein interaction (PPI) network, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment. Quantitative real-time PCR was performed to determine the mRNA level of interleukin-6 (IL-6) in Hepal-6 cells and liver tissue. Western blotting was employed to measure the protein levels of the proteins involved in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) signaling pathways. **Result:** DCHT (500, 1 000 mg·L⁻¹) treatment for 4 and 8 days inhibited the proliferation of Hepal-6 cells in a dose- and time-dependent manner ($P<0.05$). The *in vivo* assay showed that DCHT (high dose, 1.875 g·kg⁻¹) treatment for 14 days led to high differentiation and unobvious heterogeneity of HCC cells and small necrotic area compared with the model group. Network pharmacology analysis predicted that the potential targets of DCHT in the treatment of HCC were mainly the inflammation cytokines such as IL-6, interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in HCC microenvironment. The potential signaling pathways involved in the treatment were mainly associated with HCC growth and differentiation, including MAPK and STAT3 signaling pathways. Compared with the blank group, DCHT (1 000 mg·L⁻¹) treatment for 1, 2, 4, and 8 days down-regulated the mRNA level of IL-6 in Hepal-6 cells ($P<0.05$). Similar results were observed in the livers of mice treated with DCHT (0.625, 1.875 g·kg⁻¹). The *in vitro* assay demonstrated that DCHT (1 000 mg·L⁻¹) treatment for 4 and 8 days and DCHT (500, 1 000 mg·L⁻¹) treatment inhibited the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun NH₂-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK), p38 MAPK, and STAT3 in a dose- and time-dependent manner ($P<0.05$). The *in vivo* assay showed that DCHT (0.625 and 1.875 g·kg⁻¹) treatment only inhibited the phosphorylation of p38 MAPK and STAT3 ($P<0.05$). **Conclusion:** The present study indicates that DCHT can inhibit liver cancer cell proliferation by regulating p38 MAPK/IL-6/STAT3 signaling pathway.

[Keywords] hepatocellular carcinoma; Da Chaihutang; p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK); interleukin-6 (IL)-6; signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3)

肝癌(HCC)是全球六大流行癌症之一,其转移和复发率高,预后较差,5年总生存率仅为18%^[1]。现代临床研究表明,肝癌对常规化疗药物、经动脉化疗栓塞、酪氨酸激酶抑制剂、抗血管生成分子和免疫检查点抑制剂的敏感性有限^[2],这极大地影响了患者的预后与生活质量,故寻找更为安全、有效的药物/复方具有十分重要的临床意义。现代研究发现,多种信号通路参与肝癌的生长、转移与复发,共同诱发肝癌前病变、诱发肝癌形成、促进肝癌发生发展^[3-6];研究发现通过激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B

(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路可以促进细胞增殖、迁移和侵袭,抑制肝细胞癌的细胞凋亡^[3-4];研究发现通过抑制 PI3K/Akt、大鼠肉瘤蛋白(RAS)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)从而减缓肝癌进展,减少预后不良^[5-6]。本课题组在前期研究中,收集了自秦汉至近代治疗原发性肝癌相关的方剂 727 首,涉及医书 235 本,通过大数据分析,结果显示,大柴胡汤为历代治疗肝癌主要方剂之一^[7]。大柴胡汤出自东汉时期张仲景所著的《伤寒杂病论》,其方由柴胡半斤、黄芩三两、芍药三两、半夏半升(洗)、生姜五两(切)、枳实四枚(炙)、大枣十

二枚(擘)、大黄二两组成,具有和解少阳,内泻热结的功效,为治疗少阳枢机不利兼阳明里热证之经方。肝癌是体内癌毒与瘀血、痰饮等互结,阻碍脾胃气机失调,肝胆疏泄功能失常所致。《黄帝内经·素问·阴阳应象大论》曰:“其下者,引而竭之;中满者,泻之于内。”大柴胡汤具有疏利肝胆之气,攻肠胃之邪,破除瘀滞,痰积结气,以达阴平阳秘的稳态。临床上,大柴胡汤通过攻肠胃之邪,疏肝胆之气来治疗临床各期的肝癌患者,提高患者生存时间和生活质量,能有效缓解肝癌晚期及肝动脉化疗栓塞术(TACE)术后黄疸、发热、恶心、呕吐、肝区疼痛、便秘等症状^[8-11],郝腾腾等^[12]运用大柴胡汤加减治疗肝癌相关病证,体现“肝病可利胆,胆病必疏肝”的中医思想,但其具体作用机制仍需进一步阐明。本研究旨在中医理论指导下,运用网络药理学、细胞分子生物学等技术,从体内外探寻大柴胡汤抗肝癌的活性及潜在作用机制,以期为临床运用大柴胡汤抗肝癌提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6,源于 C57BL/6J 小鼠,购自于中国科学院细胞库,细胞目录号 SCSP-512,稳定传至 3~4 代。

1.2 动物 C57BL/6J 小鼠,雄性,6~8 周龄,体质量 18~20 g,购自于上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK(沪)2017-0005。所有小鼠均在上海中医药大学动物实验中心,许可证号 SYXK(沪)2014-0008,SPF 级屏障系统中饲养,温度湿度适宜,饮食饮水自由。动物实验的开展已获上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会同意,伦理编号为 PZSHUTCM210820003。

1.3 试剂及药品 DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 2318854、1009114),噻唑兰(MTT,上海碧云天生物技术有限公司,批号 081020201020),苏木素-伊红(HE)染色剂(上海舜百科技有限公司,批号 SBT10001-02),结晶紫染色液(美国 Millipore 公司,批号 C0121),PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、RNAiso Plus(日本 Takara 公司,批号分别 AJF1730A、AL42064A),Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(上海翊圣生物科技有限公司,批号 H6004040),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、胞外信号调节激酶(ERK)1/2、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)、JNK、磷酸化 JNK(p-JNK)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)、信号转导与转录

活化因子 3(STAT3)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)兔单克隆抗体、DyLight 800 标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 2118、4695、4370、9258、4668、8690、4511、12640、9145、5151),5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 118010510),大柴胡汤颗粒剂(日本津制药 Tsumura 公司,批号 R24711)^[13]。

1.4 仪器 Synergy 4 型酶标仪(美国 BioTek 公司),QuantStudio 3 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司),NanoDrop 2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),1658001 型垂直蛋白电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),Odyssey 红外荧光扫描成像系统(美国 Li-Cor 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 细胞实验:称取适量大柴胡汤颗粒剂,按 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 加 DMEM 溶解, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 混合 30 min, $1\ 200\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 12 cm,下同)去除不溶性成分, $0.22\ \mu\text{m}$ 针头式过滤器过滤除菌^[14]。

动物实验:临床治疗 60 kg 患者,每日服用大柴胡汤颗粒剂质量为 3.75 g,按照“人和小鼠等效剂量”计算小鼠剂量并配制大柴胡汤颗粒剂溶液低、中、高剂量组(0.21 、 0.625 、 $1.875\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),5-FU 组按 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 用生理盐水稀释配置^[15]。

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖活性 取对数生长期 Hepa1-6 细胞,将细胞制成细胞悬液接种于 96 孔板(1×10^3 个/孔),待细胞贴壁后,加入不同浓度大柴胡汤(0 、 125 、 250 、 500 、 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), $0\sim 8\text{ d}$ 后,加入 MTT(终质量浓度 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)置于培养箱中反应 4 h,弃培养基,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) $100\ \mu\text{L}$ 溶解,在 570 nm 处测定吸光度 A 。细胞存活率 = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{溶剂组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{溶剂组}}) \times 100\%$ 。

2.3 结晶紫染色法检测细胞增殖 取对数生长期 Hepa1-6 细胞,接种于 24 孔板(3×10^3 个/孔),待细胞贴壁后,加入不同浓度大柴胡汤(0 、 125 、 250 、 500 、 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)继续培养, 8 d 后弃培养基,用 4% 多聚甲醛固定 20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 0.1% 结晶紫染色 30 min,用显微镜拍照记录。

2.4 原位肝癌动物模型实验 取对数生长期的细胞,调整密度至 2×10^7 个/mL。C57BL/6J 小鼠开腹暴露肝脏组织,用胰岛素注射器注射 $50\ \mu\text{L}$ 细胞悬液于肝大叶(1×10^6 个/只)。造模成功后随机分为 6 组(8 只/组),空白组和 HCC 模型组灌胃(ig)水,每日

1次(qd),大柴胡汤组(0.21、0.625、1.875 g·kg⁻¹, ig, qd),5-FU组(25 mg·kg⁻¹,腹腔注射,隔日1次)。

2.5 HE染色观察病理改变 用4%多聚甲醛固定肝组织,24 h后换液,固定组织脱水、透明,样本浸蜡包埋,石蜡包块切片,脱蜡处理,HE染色,观察各组小鼠肝细胞形态。

2.6 网络药理 利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选大柴胡汤中8味中药(柴胡、黄芩、白芍、半夏、大黄、枳实、生姜和大枣)的活性成分,设置筛选条件为生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18,收集大柴胡汤的活性成分,同时收集活性成分对应的有效靶基因。以“hepatocellular carcinoma”为检索词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)搜集原发性肝癌的相关靶基因。运用R语言编程,取大柴胡汤中药预测靶基因和原发性肝癌相关靶基因的交集,得到药物-疾病交集靶基因即为大柴胡汤抗肝癌的预测靶基因。将药物-疾病交集靶基因导入STRING(<https://string-db.org/>)平台进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,设置研究物种“Homo sapiens”,隐藏未关联节点,其余参数保持默认设置,得到大柴胡汤抗肝癌的PPI网络图。同时运用R语言编程分析PPI关键靶基因,取邻接节点排名前20位的靶基因。利用Cytoscape 3.7.2软件,构建“疾病-靶基因-化学成分-药物”网络。将药物-疾病交集靶基因输入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),设置物种为“Homo sapiens”,选择修正靶基因为官方名称“official gene symbol”,设置P<0.05。进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

2.7 Real-time PCR检测相关mRNA表达 取对数生长期Hepa1-6细胞消化传代,接种于6孔板(1×10⁵个/孔),加入大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)继续培养,8 d后弃培养基,根据RNAiso Plus操作说明,提取细胞总RNA,相同方法提取动物样本总RNA。每个样品RNA质量浓度调至500 mg·L⁻¹进行逆转录反应,按gDNA eraser 1 μL,5×gDNA eraser buffer 2 μL,RNase free D₂O 5 μL,total RNA 2 μL配成体系,42℃作用2 min;加入PrimeScript RT enzyme mix I 1 μL,5×primerscript buffer 2 4 μL,RT primer mix 1 μL,RNase free D₂O 4 μL,37℃、15 min,85℃、5 s,得到cDNA。PCR扩增条件为95℃预变性5 min,1个循环;95℃变性10 s,60℃退火20 s,72℃延伸20 s,40个循环。用Real-time PCR仪读取各样品C_t,结果用2^{-ΔΔC_t}来表示。进行PCR反应,

引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IL-6	上游 CCAAGAGGTGAG TGCTTCCC	118
	下游 CTGTTGTTTCAGACTCTCTCCCT	
GAPDH	上游 TGACCACAGTCCATGCCATC	203
	下游 GACGGACACATTGGGGGTAG	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 细胞接种步骤及浓度同2.7项,加入不同浓度大柴胡汤(0、125、250、500、1 000 mg·L⁻¹)继续培养,0~8 d后弃培养基,细胞裂解后BCA试剂盒测定蛋白浓度,常规方法制备蛋白质电泳样品,上样、电泳、转膜、封闭,加入一抗(1:1 000),4℃孵育过夜;次日TBST洗膜3次,室温下荧光二抗孵育(1:15 000)1 h;TBST洗膜3次后,Odyssey红外荧光扫描成像系统采集图像。

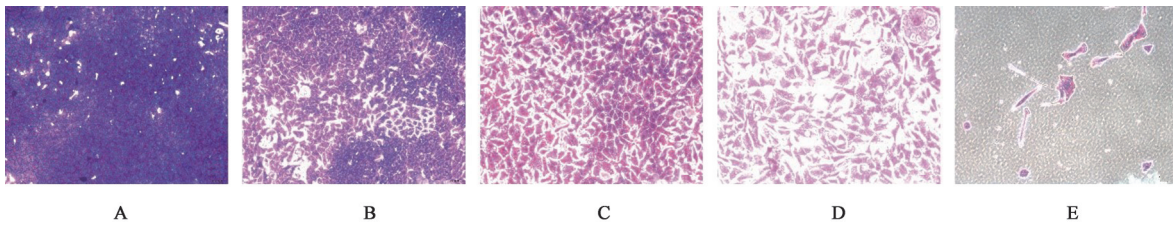
2.9 统计学方法 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 25.0统计软件进行分析,组间差异采用One-way ANOVA进行方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大柴胡汤对Hepa1-6细胞活性的影响 与空白组比较,大柴胡汤能够浓度依赖性和时间依赖性地抑制Hepa1-6细胞生长,且在第4天开始出现抑制效果(P<0.05,P<0.01),且当大柴胡汤1 000 mg·L⁻¹给药8 d后,其抑制效果最佳(P<0.01)。与空白组比较,大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)给药8 d,能够显著性地抑制肝癌细胞恶性增殖。大柴胡汤能够显著性地抑制Hepa1-6细胞恶性增殖,且呈浓度依赖性和时间依赖性。见图1、表2。

3.2 大柴胡汤对小鼠体内原位肝癌发生发展活性的影响 正常组小鼠肝小叶正常,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,大小一致,无变性、坏死;与正常组比较,模型组肝细胞排列紊乱,可见局部异型增生结节,与周围肝分界清晰,癌细胞增生紊乱,核深染,核分裂象明显,说明肝癌原位模型构建成功;与模型组比较,5-FU组、大柴胡汤组(0.625、1.875 g·kg⁻¹)肿瘤细胞大多呈高分化,异型不明显,肿瘤体积相对较小,坏死区少见,结果提示,大柴胡汤能够显著抑制小鼠肝癌的发生发展。见图2。

3.3 网络药理学分析大柴胡汤对肝癌生长作用机



注:A.空白组;B-E.大柴胡汤组(125、250、500、1 000 mg·L⁻¹)(图4同)

图1 大柴胡汤对Hepa1-6细胞生长的影响(结晶紫,×200)

Fig. 1 Effect of DCHT treatment on cell proliferation of Hepa1-6 cells (crystal violet, ×200)

表2 不同干预时间及浓度大柴胡汤对Hepa1-6细胞活性的影响(̄x±s, n=4)

Table 2 Effect of Da Chaihutang (DCHT) with different doses and different time periods on cell viability of Hepa1-6 cells (̄x±s, n=4)

时间/d	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞存活率/%
0	空白组		100.00±3.18
1	大柴胡汤组	125	136.67±3.65
		250	135.25±3.82
		500	135.41±4.85
		1 000	154.10±6.60
2	大柴胡汤组	125	182.53±10.67
		250	172.95±10.53
		500	166.35±13.04
		1 000	177.66±14.20
4	大柴胡汤组	125	237.68±6.77 ¹⁾
		250	238.62±10.56 ¹⁾
		500	202.83±15.98 ²⁾
		1 000	165.93±13.66 ²⁾
8	大柴胡汤组	125	680.65±169.18
		250	704.21±252.07
		500	518.54±149.80 ¹⁾
		1 000	247.57±60.12 ²⁾

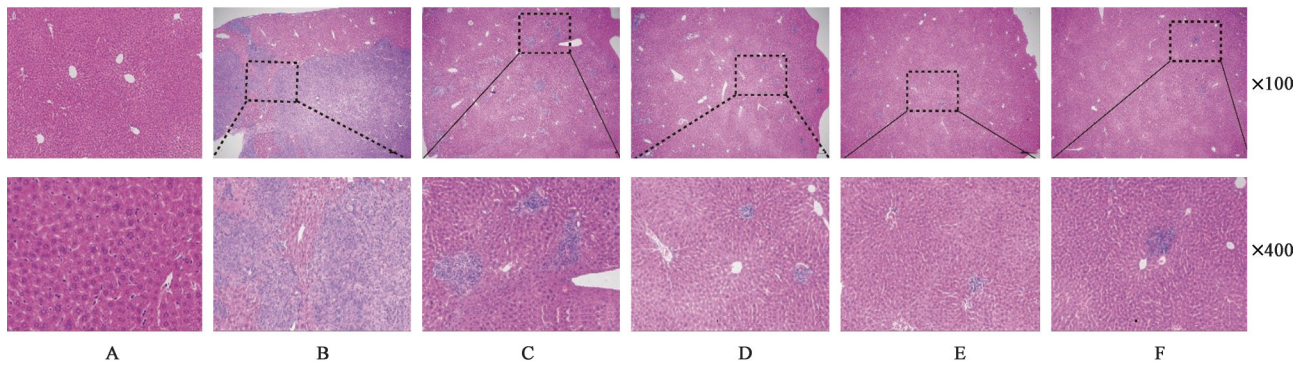
注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表3、表5、表6同)

制的影响 为探寻大柴胡汤抗肝癌的作用机制,本研究基于中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)、Cytoscape 3.7.2 软件、STRING 平台、DAVID 平台数据库,运用R语言,将225个化合物靶点和3 257个疾病靶基因取交集,得到144个交集基因,对应大柴胡汤中107个化学成分。借助Cytoscape 3.7.2 软件,构建“靶基因-化学成分-药物”

网络,大柴胡汤的“靶基因-化合物-草药”网络图见增强出版附加材料。将药物-疾病交集靶基因输入STRING 平台构建PPI网络,并进行分析,大柴胡汤抗肝癌潜在基因PPI网络见增强出版附加材料,网络中有144个靶基因发生蛋白相互作用,2 968条边代表各蛋白间相互作用,PPI网络中,节点的平均自由度41.2,平均聚类系数0.673;大柴胡汤抗肝癌PPI网络核心基因见增强出版附加材料,其中度值排名前20的核心基因,包括白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)等。大柴胡汤抗肝癌关键靶基因参与通路富集分析见增强出版附加材料,144个药物-疾病交集基因显著富集在128条通路上(P<0.05),取富集程度排名前20的通路,如PI3K/Akt、TNF、MAPK等信号通路,主要涉及肝癌、肿瘤细胞凋亡、胆汁分泌等,提示大柴胡汤是通过多层次、多靶点干预肝癌的形成及发生发展。

3.4 大柴胡汤对体内外IL-6 mRNA的影响 根据网络药理学结果,本研究检测了体内外IL-6 mRNA的表达。体外实验结果,与空白组比较,大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)第1、2、4、8天均能够抑制Hepa1-6细胞中IL-6 mRNA表达(P<0.01),并呈时间依赖性。体内实验结果,与空白组比较,模型组小鼠IL-6 mRNA的表达明显增加(P<0.05);与模型组比较,大柴胡汤中、高剂量组能够浓度依赖性地抑制小鼠肝内IL-6 mRNA表达(P<0.01)。大柴胡汤可以抑制肝癌微环境中炎症因子IL-6 mRNA的表达。见表3、表4。

3.5 大柴胡汤对体内外肝癌相关蛋白的影响 网络药理学结果显示大柴胡汤抑制肝癌生长与MAPK和STAT3信号通路密切相关,因此,本研究运用Western blot进行体外验证,结果显示,与空白组比较,大柴胡汤组(1 000 mg·L⁻¹)第4、8天可以抑制p38 MAPK、STAT3、ERK1/2、JNK的磷酸化表达(P<0.01),呈时间依赖性;与空白组比较,大柴胡汤



注:A.正常组;B.模型组;C.5-FU组(25 mg·kg⁻¹);D-F.大柴胡汤组(0.21、0.625、1.875 g·kg⁻¹)

图2 大柴胡汤对小鼠肝组织病理形态的影响(HE)

Fig. 2 Effect of DCJT on liver changes of histopathology (HE)

表3 大柴胡汤(1 000 mg·L⁻¹)对Hepa1-6细胞中IL-6 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DCJT treatment with doses of 1 000 mg·L⁻¹ inhibited mRNA expression of IL-6 in Hepa1-6 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

时间/d	组别	IL-6
1	空白组	1.00±0.14
	大柴胡汤组	0.58±0.11 ²⁾
2	空白组	0.97±0.11
	大柴胡汤组	0.21±0.04 ²⁾
4	空白组	1.00±0.13
	大柴胡汤组	0.17±0.03 ²⁾
8	空白组	1.00±0.05
	大柴胡汤组	0.17±0.07 ²⁾

表4 大柴胡汤对肝癌原位模型小鼠肝内IL-6 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

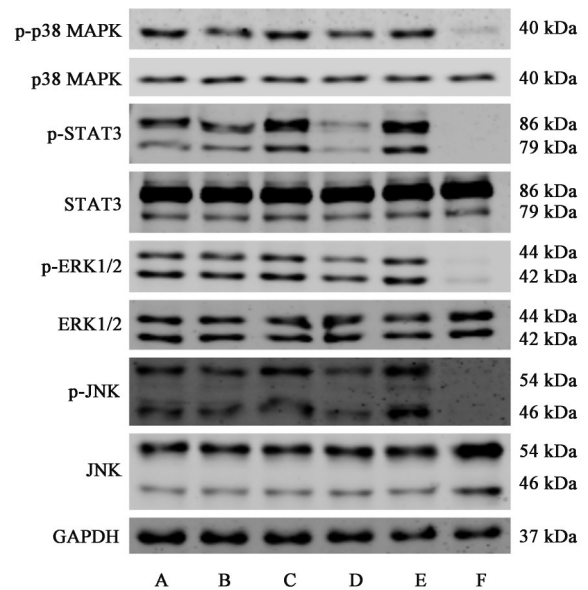
Table 4 Effect of DCJT inhibited mRNA expression of IL-6 in dose-dependent manner *in vivo* ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6
正常组		0.99±0.24
模型组		24.75±16.59 ¹⁾
大柴胡汤低剂量组	0.21	15.38±13.14
大柴胡汤中剂量组	0.625	9.78±7.92 ⁴⁾
大柴胡汤高剂量组	1.875	3.10±1.48 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表7同)

500、1 000 mg·L⁻¹组能够显著性地抑制 p38 MAPK、STAT3、ERK1/2、JNK 的磷酸化表达(P<0.01),且呈浓度依赖性。见图3、图4,表5、表6。

体内结果,与空白组比较,HCC模型组肝内STAT3、p38 MAPK磷酸化表达显著增加(P<0.01);与模型组比较,大柴胡汤高剂量组STAT3、p38 MAPK磷酸化表达显著降低(P<0.01),且呈浓度依



注:A.空白组第1天;B.大柴胡汤组(1 000 mg·L⁻¹)第1天;C.空白组第4天;D.大柴胡汤组(1 000 mg·L⁻¹)第4天;E.空白组第8天;F.大柴胡汤组(1 000 mg·L⁻¹)第8天

图3 Hepa1-6细胞MAPK和STAT3细胞信号通路蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway in Hepa1-6 cells

赖性;与模型组比较,大柴胡汤低、中、高剂量组对ERK1/2、JNK磷酸化表达差异无统计学意义。大柴胡汤能够通过调控p38 MAPK和STAT3信号轴抑制肝癌的发生发展。见图5和表7。

4 讨论

原发性肝癌病因复杂,病情多变,肝癌可归属中医学“肝积”“肥气”“癥积”“胁痛”“黄疸”“鼓胀”等范畴^[16],累及少阳、阳明、厥阴等。肝为刚脏,主升主动,喜调达而恶抑郁,《丹溪心法·六郁》中就提到:“气血冲和,百病不生,一有怫郁,诸病生焉。故人身诸病,多生于郁”。中医认为肝胆是调节人体气机升降出入的枢纽,“升降出入,无器不有”,气机

表5 大柴胡汤对Hepa1-6细胞MAPK和STAT3细胞信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DCHT treatment on protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway in Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间/d	组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-STAT3/STAT3	p-ERK1/2/ERK1/2	p-JNK/JNK
1	空白组		1.01±0.17	1.00±0.08	1.00±0.03	1.00±0.02
	大柴胡汤组	1 000	0.87±0.12	0.97±0.08	0.97±0.03	0.75±0.02 ²⁾
4	空白组		1.00±0.09	1.00±0.10	1.00±0.03	1.00±0.03
	大柴胡汤组	1 000	0.71±0.16 ¹⁾	0.56±0.06 ²⁾	0.73±0.02 ²⁾	0.53±0.01 ²⁾
8	空白组		1.00±0.15	1.00±0.08	1.00±0.03	1.00±0.02
	大柴胡汤组	1 000	0.50±0.14 ²⁾	0.41±0.05 ²⁾	0.40±0.01 ²⁾	0.09±0.01 ²⁾

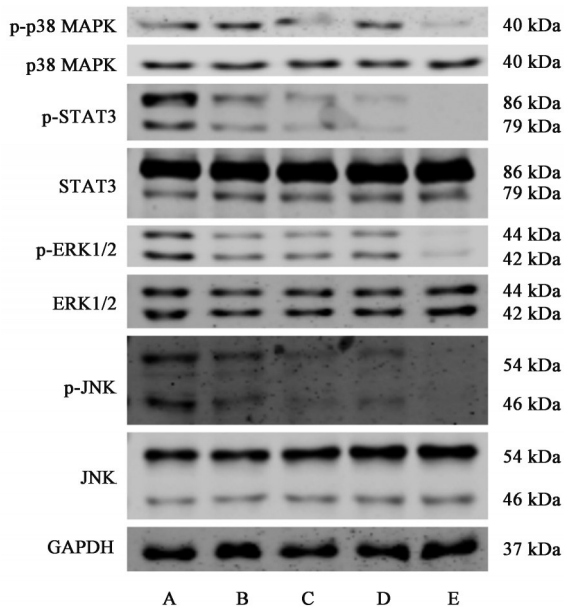
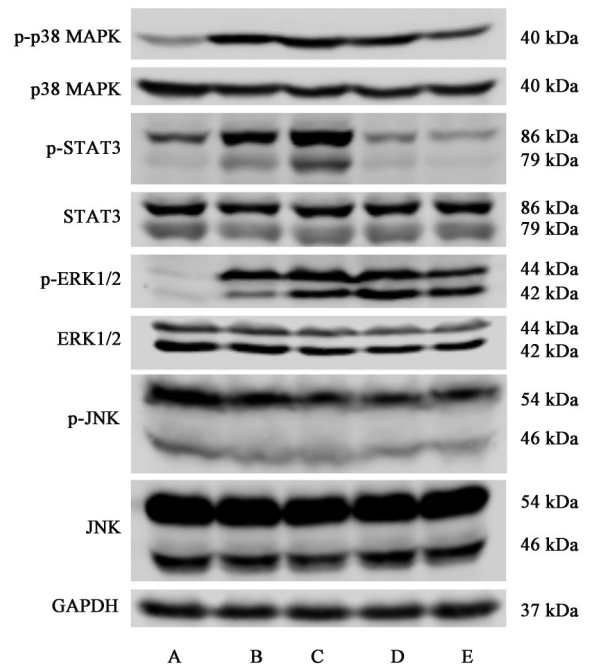


图4 Hepa1-6细胞MAPK和STAT3细胞信号通路蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway in Hepa1-6 cells



注: A. 空白组; B. 模型组; C~E. 大柴胡汤组(0.21、0.625、1.875 g·kg⁻¹)

图5 原位肝癌模型小鼠肝内MAPK和STAT3细胞信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway *in vivo*

调节失常,气机不畅,则会酿生百病。原发性肝癌患者多以肝气郁结为主,伴随湿热、瘀阻或毒聚,阻碍肝胆气机的正常升降,导致肝胆疏泄功能失常,日久则由气及血、气滞、血瘀、痰凝、毒结,日久形成癌瘤。在手术、放疗、化疗、肝动脉栓塞等疗法的基础上,辨证和辨病相结合运用大柴胡汤可以显著改善肝癌相关症状,提高患者生活质量的同时显著延长生存期^[17],但其抗肿瘤机制尚未明确有待于进一步的研究阐明。

步的研究阐明。

大柴胡汤为仲景众方中开郁泻火第一方,可和解少阳、内泻热结,用于少阳阳明合病,机体感受外邪,汗出表不解,邪热侵入半表半里,瘀滞于上腹部

表6 大柴胡汤对Hepa1-6细胞MAPK和STAT3细胞信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of DCHT treatment on protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway in Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-STAT3/STAT3	p-ERK1/2/ERK1/2	p-JNK/JNK
空白组		1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.04	1.00±0.04
大柴胡汤组	125	1.05±0.04	0.65±0.05 ²⁾	0.75±0.03 ²⁾	0.61±0.03 ²⁾
	250	0.97±0.03	0.60±0.05 ²⁾	0.72±0.03 ²⁾	0.36±0.04 ²⁾
	500	0.78±0.04 ²⁾	0.50±0.04 ²⁾	0.77±0.02 ²⁾	0.32±0.03 ²⁾
	1 000	0.51±0.02 ²⁾	0.46±0.04 ²⁾	0.47±0.02 ²⁾	0.15±0.02 ²⁾

表7 大柴胡汤对原位肝癌模型小鼠肝内MAPK和STAT3相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of DCHT treatment on protein expression of STAT3 and MAPK signaling pathway *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-p38 MAPK/p38 MAPK	p-STAT3/STAT3	p-ERK1/2/ERK1/2	p-JNK/JNK
空白组		1.00±0.10	1.00±0.14	1.00±0.16	1.00±0.09
模型组		2.50±0.18 ²⁾	2.42±0.06 ²⁾	2.57±0.36 ²⁾	0.85±0.07
大柴胡汤低剂量组	0.21	2.59±0.09	3.46±0.09	2.64±0.08	0.79±0.03
大柴胡汤中剂量组	0.625	2.52±0.11	0.63±0.05 ⁴⁾	2.93±0.04	0.76±0.02
大柴胡汤高剂量组	1.875	1.74±0.08 ⁴⁾	0.41±0.04 ⁴⁾	2.74±0.89	0.75±0.02

腕之间,胃气壅滞,升降失常,柴胡味苦,性微寒,入肝胆,有和解退热,疏肝解郁的作用。张锡纯认为柴胡“禀少阳生发之气,为足少阳之主药,而兼治厥阴,肝气不舒畅者,此能舒之,胆火甚炽盛者,此能散之,至外感少阳者,又能助其枢转以透膈升出之”。黄芩味苦,性寒,能清热泻火,去湿热黄疸。二药合用以治少阳邪热。大黄味苦,性寒,有泻火清热,下肠胃积滞之功。枳实有导滞除痞、破气消积之功用,与大黄合用善去阳明热结,并还能疏肝胆之火郁。芍药味酸苦,性微寒,有缓急止痛、柔肝养血之功,对腹中诸痛效果较好。芍药配枳实又可治气血不和、腹痛烦满。半夏有和胃宽中、降逆止呕的作用,配生姜更能增加止呕之效,加用大枣可健脾益胃;因此,大柴胡汤疏肝利胆当解少阳之邪、通腑泻热当解阳明之热。现代临床研究表明,大柴胡汤可广泛地应用于胰腺炎、胆结石、胆囊炎、反流性胃炎、糖尿病早期、脂肪肝、高血脂症、发热、感染性疾病、支气管哮喘等疾病^[17]。

中药复方作用机制复杂,本研究运用网络药理学分析复方的药效成分-疾病-靶点-通路互作关系,发现大柴胡汤可调控肝癌微环境中炎症因子、生长因子及肿瘤代谢^[18],与大柴胡汤治疗肝癌的临床运用相一致。KEGG通路富集分析提示,144个药物-疾病交集基因主要涉及肿瘤细胞凋亡、肝癌发生发展、胆汁分泌等过程的信号通路,参与抑制癌细胞恶性增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制癌细胞血管生成、抑制肝癌细胞多药耐药,发挥抗癌的功效。前期研究表明,大柴胡汤中主要抗癌活性物来源于柴胡、黄芩、大黄和枳实中的萜类、黄酮类、蒽醌类成分。现代研究表明,中药柴胡具有抗肿瘤、保肝、抗菌、解热等作用;其主要成分柴胡皂苷具有诱导肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化、抑制肿瘤血管生长、抑制肿瘤侵袭转移、逆转肿瘤细胞多药耐药、免疫调节、调控肿瘤细胞自噬、抑制环氧合酶等抗肿瘤作用^[19]。黄芩中的主要有效成分黄芩苷和汉

黄芩素通过调控肝癌细胞中B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达,且增加细胞内Ca²⁺,激发线粒体膜通透性转运孔开放,线粒体跨膜电位降低,最终促使肝癌细胞凋亡^[20-21];黄芩苷还可通过抑制ERK1/2信号通路从而抑制肿瘤细胞增殖且诱导细胞凋亡^[22],且在内质网应激过程中通过激活激活转录因子6(ATF6)信号通路诱发细胞凋亡^[23]。大黄中的主要有效成分大黄素可通过调控MAPK和PI3K/Akt信号通路抑制肝癌细胞增殖且促进肝癌细胞凋亡,从而抑制小鼠体内肝癌生长^[24-25]。川陈皮素是从枳实中提取而得到的一种多甲氧基黄酮类物质,具有预防肿瘤发生发展的作用,对肺癌、腹膜肿瘤、胃癌、结肠癌、纤维瘤等具有极强的抗癌活性,亦被认为是一种具有开发前景的抗癌小分子化合物^[26]。枳实中的槲皮素可通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、调节抑癌基因、抑制信号转导、阻滞侵袭及转移等多种途径发挥抗肿瘤作用^[27]。本研究通过网络药理学以“多成分-多靶点-多途径”阐释大柴胡汤抑制肝癌发生发展的潜在作用机制。基于前期临床研究报道和历代医案研究,本研究运用动物药理学和细胞生物学,结合体内外实验,证实大柴胡汤具有抗肝癌细胞恶性增殖的活性。

p38 MAPK是一种应激激活的蛋白激酶,在受到应激刺激、病原体或促炎症因子的作用下,其磷酸化被激活,参与肿瘤的发生发展过程,调节细胞免疫反应、炎症反应及细胞凋亡^[28],有研究表明p38 γ 抑制剂吡非尼酮可有效抑制小鼠肝肿瘤生长、转移,提高其存活率^[29]。本研究发现,大柴胡汤能够显著性地抑制肝癌细胞中p38 MAPK磷酸化。研究表明,p38 MAPK抑制剂可以在胃癌中可以降低这些细胞因子如IL-6等mRNA的表达^[30]。肿瘤细胞在慢性炎症因子的刺激下,会促使基质细胞分泌大量的固有免疫信号传导介质IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等^[31-34];当肝癌微环境中的炎症因子IL-6与受体结

合后,激活 STAT3 磷酸化,并进入细胞核,使癌症驱动基因异常表达,通过影响肝癌细胞增殖、侵袭、迁移、凋亡和血管生成等方式,促进肿瘤进展,在肝癌起始、发生发展中发挥着重要的作用^[35-36]。本研究表明,大柴胡汤能够浓度依赖性和时间依赖性地抑制肝癌中 IL-6 的表达。肝癌组织中 STAT3 磷酸化呈高表达状态,与肝癌病理分级、转移率、复发率和预后性呈相关性^[37]。当 STAT3 持续性激活时,诱导正常肝细胞发生癌变,使转录激活癌基因、增殖和血管生成相关基因出现异常表达,调控肝癌微环境,促进癌细胞增殖及肝癌的发生发展^[38-44]。基于体内外实验,大柴胡汤能够显著性地抑制肝癌中 STAT3 的磷酸化。

本实验结果显示大柴胡汤可通过调控 p38 MAPK/IL-6/STAT3 信号轴相关蛋白表达实现抑制肝癌的发生发展的作用的,与空白组比较,大柴胡汤可呈剂量/时间依赖性地抑制小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 的增殖,且能抑制 Hepa1-6 细胞和肝癌模型小鼠 IL-6 mRNA 的表达;大柴胡汤能够抑制 Hepa1-6 细胞中 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 和 STAT3 的磷酸化表达,且呈浓度和时间依赖性;体内实验结果显示,大柴胡汤高剂量组能显著性地抑制肝癌模型小鼠 p38 MAPK 和 STAT3 的磷酸化,但低、中、高剂量组对 ERK1/2、JNK 磷酸化表达差异无统计学意义。

综上所述,大柴胡汤主要通过调控 p38 MAPK/IL-6/STAT3 信号轴,以多成分-多靶点-多途径抑制肝癌的发生发展,诠释大柴胡汤转少阳之枢机,开阳明之气结,达疏肝利胆的科学内涵,为临床运用大柴胡汤治疗肝癌提供理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] DRAPER A. A concise review of the changing landscape of hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Manag Care*, 2020, 26(10 Suppl): S211-S219.

[2] LEE A, LEE FC. Medical oncology management of advanced hepatocellular carcinoma 2019: A reality check [J]. *Front Med*, 2020, 14(3): 273-283.

[3] XING Y, LIU Y, QI Z, et al. LAGE3 promoted cell proliferation, migration, and invasion and inhibited cell apoptosis of hepatocellular carcinoma by facilitating the JNK and ERK signaling pathway [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 49-64.

[4] SUN E J, WANKELL M, PALAMUTHUSINGAM P, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in

hepatocellular carcinoma [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(11): 1639-1658.

[5] ZHANG L, CHANG S, ZHAO Y, et al. MicroRNA-4317 suppresses the progression of hepatocellular carcinoma by targeting ZNF436-mediated PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Tissue Cell*, 2021, doi: 10.1016/j.tice.2021.10169.

[6] SUN L, XIS, ZHOU Z, et al. Elevated expression of RIT1 hyperactivates RAS/MAPK signal and sensitizes hepatocellular carcinoma to combined treatment with sorafenib and Akt inhibitor [J]. *Oncogene*, 2022, 41(5): 732-744.

[7] 乔曦,许世豪,朱紫依,等. 基于关联规则和复杂系统熵聚类研究历代原发性肝癌方剂遣药组方规律 [J]. *中医学*, 2021, 10(4): 516-527.

[8] 王鑫,杨洋,杨兴武. 大柴胡汤治疗肝癌 TACE 术后综合征的疗效分析 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2019, 42(1): 130-133.

[9] 刘满成. 加味大柴胡汤对肝癌合并阻塞性黄疸患者预后的影响 [J]. *实用中西医结合临床*, 2018, 18(5): 44-46.

[10] 费国新. 加味大柴胡汤辅助治疗原发性肝癌合并阻塞性黄疸的临床观察 [J]. *湖北中医杂志*, 2010, 32(9): 36-37.

[11] 乔喜婷,王克穷,闫明亮,等. 加味大柴胡汤治疗原发性肝癌患者 TACE 术后综合征的临床观察 [J]. *中医药导报*, 2016, 22(11): 28-31.

[12] 郝腾腾,吴煜,蔡琳琳,等. 大柴胡汤辨证与辨病治疗肝癌体会 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(3): 125-127.

[13] HE JX, OHNO K, TANG J, et al. Da-Chaihu-Tang alters the pharmacokinetics of nifedipine in rats and a treatment regimen to avoid this [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(11): 1623-1630.

[14] YANO H, MIZOGUCHI A, FUKUDA K, et al. The herbal medicine sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G₀/G₁ phase [J]. *Cancer Res*, 1994; 54(2): 448-454.

[15] 冯颖,吴喆,李杰. 基于内质网应激探讨扶正解毒方联合 5-Fu 对胃癌荷瘤小鼠术后复发及转移的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(16): 75-83.

[16] 周勇,唐万和. 中晚期原发性肝癌的中医临床研究 [J]. *湖北中医杂志*, 2013, 35(7): 45-47.

[17] 姜礼双,崔亚,乔大伟,等. 大柴胡汤内科临床应用研究进展 [J]. *亚太传统医药*, 2018, 14(8): 89-91.

[18] 许世豪,李姚婷,朱紫依,等. 基于整合药理学探索大柴胡汤治疗肝癌的作用机制 [J]. *中医学*, 2020, 9(2): 70-80.

- [19] 刘丹, 王佳贺. 柴胡皂苷抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 203-208.
- [20] 郭昱. 黄芩甙对肝癌细胞体外作用及机制的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2006.
- [21] LI Y, TU M, CHENG C, et al. Wogonoside induces apoptosis in Bel-7402, a hepatocellular carcinoma cell line, by regulating Bax/Bcl-2 [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1831-1835.
- [22] LIANG R R, ZHANG S, QI J A, et al. Preferential inhibition of hepatocellular carcinoma by the flavonoid, Baicalein through blocking MEK-ERK signaling [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 969-978.
- [23] YU Z, LUO X, WANG C, et al. Baicalin promoted site-2 protease and not site-1 protease in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(11): 1093-1101.
- [24] EL-SAIED M A, SOBEH M, ABDO W, et al. Rheum palmatum root extract inhibits hepatocellular carcinoma in rats treated with diethylnitrosamine [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2018, 70(6): 821-829.
- [25] LIN W, ZHONG M, YIN H, et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt signaling pathways *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 961-967.
- [26] 韦金红, 韦金双, 吴炜邦, 等. 川陈皮素抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(11): 1211-1216.
- [27] 吴思琪, 李毅俊, 孙伟芬. 榭皮素及其衍生物抗肺癌机制研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6): 231-236.
- [28] MARTÍNEZ-LIMÓN A, JOAQUIN M, CABALLERO M, et al. The p38 pathway: From biology to cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 1913-1930.
- [29] TOMÁS-LOBA A, MANIERI E, GONZÁLEZ-TERÁN B, et al. p38 γ is essential for cell cycle progression and liver tumorigenesis [J]. *Nature*, 2019, 568(7753): 557-560.
- [30] XIA Y, KHOI PN, YOON HJ, et al. Piperine inhibits IL-1 β -induced IL-6 expression by suppressing p38 MAPK and STAT3 activation in gastric cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 398(1/2): 147-156.
- [31] LU C, RONG D, ZHANG B, et al. Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 130-141.
- [32] WANG Y, TAKEISHI K, LI Z, et al. Microenvironment of a tumor-organoid system enhances hepatocellular carcinoma malignancy-related hallmarks [J]. *Organogenesis*, 2017, 13(3): 83-94.
- [33] GHOURI Y A, MIAN I, ROWE J H. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis [J]. *J Carcinog*, 2017, doi: 10.4103/jcar.JCar_9_16.
- [34] ARRESE M, HERNANDEZ A, ASTETE L, et al. TGF- β and hepatocellular carcinoma: When a friend becomes an enemy [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(12): 1172-1179.
- [35] 柳辉, 郭乐, 丁淑琴, 等. IL-6/STAT3信号通路与肝癌研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13): 1656-1662.
- [36] 陈炜聪, 文彬, 孙海涛, 等. 鳖甲煎丸对二乙基亚硝胺诱导的肝癌前病变模型大鼠肝组织 IL-6/STAT3信号通路的影响 [J]. 中医杂志, 2021, 62(19): 1720-1727.
- [37] LEE C, CHEUNG S T. STAT3: An emerging therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1646-1665.
- [38] SRIVASTAVA J, DIGIOVANNI J. Non-canonical STAT3 signaling in cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(12): 1889-1898.
- [39] YANG Y, ZHENG B, HAN Q, et al. Targeting blockage of STAT3 inhibits hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(4): 449-456.
- [40] BANERJEE K, RESAT H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(11): 2570-2578.
- [41] DUTTA P, SABRI N, LI J, et al. Role of STAT3 in lung cancer [J]. *Jaksat*, 2015, 3(4): e999503.
- [42] RYBAK AP, BRISTOW RG, KAPOOR A. Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 1900-1909.
- [43] LAUDISI F, CHERUBININ F, MONTELEONE G, et al. STAT3 interactors as potential therapeutic targets for cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1787-1807.
- [44] KORTYLEWSKI M, JOVE R, YU H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2005, 24(2): 315-327.

[责任编辑 张丰丰]