

淫羊藿抗肝癌活性成分及作用机制研究进展

刘谊民^{1,2}, 张黄琴^{1,2}, 刘玉萍^{1,2}, 陈彦^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 南京 210028;

2. 江苏省中医药研究院中药组分与微生态研究中心, 南京 210028)

[摘要] 肝癌是世界范围内的恶性肿瘤,发病率逐年上升,预后差且尚无有效治疗药物。淫羊藿用药历史悠久,临床可用于肝癌的治疗。现代研究表明,淫羊藿素、淫羊藿苷、宝藿苷 I 和朝藿定 C 等 C-8 位异戊烯基取代的黄酮醇及其苷类成分,以及淫羊藿多糖(EPS)具有良好的抗肝癌活性,是淫羊藿抗肝癌的主要活性成分。淫羊藿中黄酮类成分可以通过抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡、改善肿瘤免疫抑制微环境、抑制肝癌细胞免疫逃逸、抑制肝癌细胞侵袭和迁移、逆转肝癌细胞耐药性、抑制肝癌起始细胞干性特征、调节免疫系统功能等多种机制发挥抗肝癌作用;EPS 则主要通过调节机体免疫而发挥抗肝癌作用。淫羊藿通过多成分、多靶点、多途径共同发挥抗肝癌作用,是具有较高研究价值的抗肝癌药物,但相关方面的综合分析尚有欠缺。基于此,笔者对淫羊藿抗肝癌的活性成分及作用机制进行了梳理。此外,经过文献梳理发现,目前淫羊藿抗肝癌的研究集中在几个单体成分,并且从整体上阐释淫羊藿抗肝癌活性成分及作用机制的研究不足,笔者针对这些问题提出了相应建议,以期淫羊藿抗肝癌物质基础研究及其临床应用、合理开发提供参考。

[关键词] 淫羊藿; 肝癌; 活性成分; 黄酮类; 多糖; 作用机制; 耐药性

[中图分类号] R22;R28;R73;G353.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0217-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212155

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1636.006.html>

[网络出版日期] 2021-11-26 8:10

Active Constituents and Mechanism of Epimedii Folium Against Liver Cancer: A Review

LIU Yimin^{1,2}, ZHANG Huangqin^{1,2}, LIU Yuping^{1,2}, CHEN Yan^{1,2*}

(1. *Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,*

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China;

2. *Multi-component of Traditional Chinese Medicine (TCM) and Microecology Research Center,*
Jiangsu Province Academy of TCM, Nanjing 210028, China)

[Abstract] Liver cancer is a worldwide malignant tumor with an increasing incidence by years. At present, it is facing the predicament of poor prognosis and lack of effective therapeutic drugs. Epimedii Folium is a well-known traditional Chinese medicine with a long history, and exiting clinical and pharmacological studies show that it can be used in clinical treatment of liver cancer. According to reports, Epimedii Folium polysaccharides (EPS), C-8-isopentenyl substituted flavonoids and their glycosides (icaritin, icariin, baohuoside I, epimedin C) have good anti-liver cancer activity. They are the main active ingredients of Epimedii Folium against liver cancer. The data which comes from *in vitro* and *in vivo* studies suggests flavonoids in Epimedii Folium demonstrate anti-liver cancer activity through various mechanisms, including inhibiting hepatoma cells proliferation, promoting hepatoma cells apoptosis, improving tumor immunosuppression microenvironment, inhibiting hepatoma cells immune escape, invasion and migration, reversing hepatoma cells

[收稿日期] 2021-09-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873016);江苏省中医药科技发展计划项目(YB201925)

[第一作者] 刘谊民,在读硕士,从事中药制剂研究,E-mail:115036974346@163.com

[通信作者] *陈彦,博士,研究员,博士生导师,从事中药制剂研究,Tel:025-52362155,E-mail:yichen202@hotmail.com

resistance, suppressing hepatocellular carcinoma initiation cells and regulating the immunity of the body. While EPS play an anti-hepatocellular carcinoma role mainly through the regulation of immunity. Epimedii Folium exerts good anti-liver cancer effects with multiple components, multiple targets, and multiple pathways, which makes it a valuable anti-liver cancer drug. However, the comprehensive analysis of related aspects is still lacking. Therefore, this study briefly reviewed the anti-hepatocellular carcinoma active ingredients of Epimedii Folium and their mechanisms. In addition, in the process of literature review, it was found that the anti-liver cancer studies of Epimedii Folium mainly focused on a few components and the studies elucidating the active constituents and mechanism of Epimedii Folium against liver cancer on the whole level were insufficient. Based on these questions, the study also proposed corresponding suggestion to provide reference for the further study of substance basis, clinical application and rational development of Epimedii Folium against liver cancer.

[Keywords] Epimedii Folium; liver cancer; active constituents; flavonoids; polysaccharides; mechanism; drug resistance

2020年全世界新发肝癌患者90余万人,死亡病例83万例,肝癌已成为第3大癌症死亡原因^[1]。目前肝癌的治疗方法包括手术切除、肝移植、射频消融、经导管动脉化疗栓塞、全身化疗和靶向治疗等,其中分子靶向治疗取得了较大进展,但肝癌患者的生存率和预后情况依旧不容乐观,2012—2015年我国肝癌患者5年生存率仅12.1%^[2]。因此,探寻安全有效的抗肝癌药物依旧十分迫切。中药具有多成分、多靶点、多途径整体协同作用的特点,在抗肿瘤及改善肝癌患者的生存质量、延长生存期等方面具有独特优势,是研发安全有效的抗肝癌药物的重要资源。

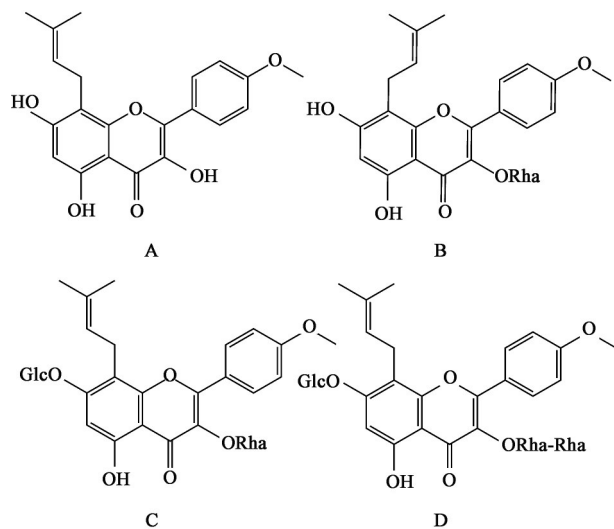
淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu*、箭叶淫羊藿 *E. sagittatum*、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* 的干燥叶,始载于《神农本草经》,被列为中品,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿功效,是临床常用的补益类中药。在中医扶正祛邪治疗方法的指导下,淫羊藿常被用于肝癌、肺癌的治疗,对肝癌(特别是晚期肝癌)具有良好的治疗作用^[3-7]。仝小林院士应用基础方佐以大剂量淫羊藿(60 g)入汤剂对肝癌的治疗效果较好^[3]。王志学^[4]将淫羊藿与金匱肾气丸同用,治疗脾肾阳虚、瘀血内阻的肝癌后期患者。柴可群针对肝癌术后复发患者使用淫羊藿(15 g)配伍基础方,补肾助阳、扶助正气,实现了肝癌复发患者长期无瘤生存(>34个月)^[5]。李在林^[6]证明在西药对症处理(如若患者出现疼痛,给予杜冷丁进行镇痛处理)的基础上,给予淫羊藿和去甲斑蝥素联合治疗肝癌,可以显著提高肝癌治疗的有效率。其中,西药对症处理组的有效率32.6%,而给予淫羊藿和去甲斑蝥素联合治疗后有效率提高至61%,差异具有统

计学意义($P<0.01$)。刘少杰等^[7]通过观察原发性肝癌患者临床治疗效果发现,益气温阳解毒方(党参15 g、茯苓20 g、白术30 g、半夏15 g、黄芪60 g、当归15 g、仙鹤草60 g、龙葵30 g、白英30 g、柴胡12 g、桂枝15 g、厚朴10 g、黑附片15 g、淫羊藿15 g、巴戟天15 g、紫草15 g)联合肝动脉插管化疗栓塞术(TACE)治疗的总体有效率较TACE治疗明显提高($P<0.05$)。此外,LIN等^[8]研究发现淫羊藿水提液对SK-Hep-1和PLC/PRF/5肝癌细胞有明显的杀伤作用,半数抑制浓度(IC_{50})分别为15、57 $mg \cdot L^{-1}$ 。周建锋等^[9]研究证实,淫羊藿含药血清可以显著促进SMMC-7721肝癌细胞抑癌基因p53的表达。淫羊藿中含有黄酮、生物碱、多糖、木脂素等化合物,其中异戊二烯黄酮和多糖具有良好的抗肝癌活性,尤其是淫羊藿素,其已完成了肝细胞癌(HCC)治疗的Ⅱ期临床研究并在Ⅲ期临床试验中显示出了优势。Ⅱ期临床结果显示,其客观缓解率与现有治疗(索拉非尼治疗和FOLFOX4方案治疗)相当,意向性治疗分析(ITT)人群的中位总生存期为186 d,略高于索拉非尼组的177 d^[10]。淫羊藿中多种成分(如淫羊藿素、淫羊藿苷、宝藿苷I)均具有抗肝癌作用,目前已有较多文献对淫羊藿中某单一成分的抗肝癌作用及其机制进行了报道,但尚无综述对淫羊藿通过多成分、多靶点、多途径整体调节,发挥抗肝癌作用的特点进行综合分析。因此,笔者拟对淫羊藿抗肝癌活性成分及其作用机制的研究情况进行梳理,以期为淫羊藿的抗肝癌物质基础研究、临床应用及合理开发提供参考依据。

1 淫羊藿中具有抗肝癌作用的活性成分

迄今为止,从淫羊藿属植物中分离和鉴定出了260余个化合物,包括141个黄酮类、31个木脂素

类、9个酚苷类、6个苯乙醇苷类和多糖等其他一些成分^[11]。其中,黄酮类化合物和多糖是淫羊藿发挥抗肝癌作用的主要药效成分。淫羊藿中黄酮及其衍生物为黄酮醇、黄酮、查尔酮、黄烷酮、黄酮醇糖苷等多种结构类型。据报道,C-8位异戊烯基取代的黄酮醇及其苷类成分,特别是3-O-、7-O-和3,7-二-O-糖苷,是淫羊藿抗肝癌的主要生物活性化合物。目前,文献报道具有抗肝癌作用的淫羊藿黄酮类成分包括淫羊藿素、淫羊藿苷、宝藿苷I和朝藿定C。这4种成分结构类似,区别仅在于糖基的种类、数目和位置。其中宝藿苷I为C-3位鼠李糖取代的单糖苷,淫羊藿苷为C-7位葡萄糖取代、C-3位鼠李糖基取代的双糖苷,朝藿定C为C-7位葡萄糖取代、C-3位双鼠李糖基取代的多糖苷,结构式见图1。



注:A.淫羊藿素;B.宝藿苷I;C.淫羊藿苷;D.朝藿定C;Rha.鼠李糖基;Glc.葡萄糖基

图1 淫羊藿中具有抗肝癌药效的主要黄酮类化合物的结构式
Fig. 1 Structure formulae of main flavonoids in *Epimedium Folium* exerting anti-liver cancer effect

淫羊藿多糖(EPS)是一种杂多糖,主要由葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等组成,具有抗氧化和免疫增强活性^[12-14]。WANG等^[12]发现朝鲜淫羊藿中多糖组分具有较强的免疫活性,对其进行扫描电子显微镜(SEM)表征和单糖组成分析,发现EPS表面光滑,内含多个孔,主要由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖胺、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖和岩藻糖组成,八者摩尔比为1:10.97:0.43:7.41:2.77:10.34:11.33:1.28,相对分子质量 1.80×10^6 Da。李畅等^[13]使用DEAE-52纤维素柱从EPS中分离出中性多糖EPS-1-1和酸性多糖EPS-2-1。EPS-1-1为

光滑球形结构,由果糖、甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖按照摩尔比1.90:0.67:0.05:0.08:3.29:1.51:0.05:0.37组成;EPS-2-1则为粗糙片状结构,由果糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖按照摩尔比5.25:0.18:0.32:0.13:1.14:0.16:0.55:0.08:0.20组成。虽然EPS的结构特征不尽相同,但研究表明其均具有良好的免疫调节活性^[12-13]。

2 淫羊藿抗肝癌作用机制

2.1 抑制肝癌细胞增殖 癌细胞具有无限增殖的特点,抑制肝癌细胞增殖是肝癌的有效治疗策略之一。据报道,淫羊藿苷可以将SMMC-7721和HepG2肝癌细胞的细胞周期阻滞在G₀/G₁期,增加G₀/G₁期细胞的比例,抑制肝癌细胞增殖^[15-16]。朝藿定C可以增加细胞周期依赖性蛋白激酶(CDK)抑制因子p21^{Cip1}和p27^{Kip1}的表达或负向调节细胞外调节蛋白激酶(ERK)/c-Fos/激活蛋白-1(AP-1)通路,抑制细胞周期蛋白D₁(Cyclin D₁)/CDK4复合物形成,将低分化肝癌细胞SK-Hep-1阻滞在G₀/G₁期,阻断细胞周期进程,发挥抗增殖作用^[17]。淫羊藿素可以通过诱导活性氧(ROS)产生,诱导DNA损伤,抑制DNA合成,阻滞细胞周期,促进HepG2和Huh7细胞系的衰老,减弱肝癌细胞的增殖能力^[18]。

2.2 促进肝癌细胞的凋亡 细胞凋亡是指基因调控的细胞自发性的程序性死亡过程,在肿瘤发生发展和治疗中发挥着关键作用,常作为抗肿瘤药物的作用靶点。淫羊藿中成分主要通过干预死亡受体途径和线粒体途径介导肝癌细胞凋亡。LI等^[19]研究表明 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 淫羊藿苷可促进SMMC-7721肝癌细胞的凋亡,其作用机制可能是淫羊藿苷促进肝癌细胞内ROS的产生,进而诱导c-Jun氨基末端激酶(JNK)磷酸化,激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路和线粒体/胱天蛋白酶(Caspase)凋亡通路,促进肝癌细胞凋亡。GUO等^[20]研究表明,宝藿苷I可以靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),下调磷酸化-mTOR(p-mTOR)的表达水平,干扰肝癌细胞能量代谢,诱导Caspase依赖的细胞凋亡,从而发挥抑制肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用。同时,体内实验证实宝藿苷I灌胃治疗可以显著抑制Huh7荷瘤小鼠肿瘤的生长,具有良好的抗肿瘤作用。淫羊藿素可以作用于多个通路促进肝癌细胞凋亡。例如,淫羊藿素可以激活JNK1信号通路^[21-22],增加肝癌细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)与Bcl-2的比值,增加

Caspase-3的活化,触发线粒体/Caspase凋亡通路,诱导肝癌细胞凋亡^[21,23];增加死亡因子Fas表达水平,激活Fas介导的外源性凋亡通路,诱导肝癌细胞凋亡^[23];抑制肝癌标志物甲胎蛋白(AFP)水平升高,抑制癌细胞的增殖,促进肝癌细胞凋亡^[24]。其中淫羊藿素抑制AFP水平升高可能与增加肿瘤抑制因子高迁移率族(HMG)盒转录因子1(HBP1)与AFP的结合^[25]、减弱双微体基因2(MDM2)介导的p53降解、稳定p53蛋白有关^[26]。

此外,免疫原性细胞死亡(ICD)是一种特殊的细胞凋亡形式,能够使肿瘤细胞由非免疫原性转化为免疫原性而介导抗肿瘤免疫应答,使具有一定免疫能力的宿主对死亡细胞相关抗原产生特异性免疫反应^[27]。淫羊藿素可以诱导肝癌细胞发生线粒体自噬和凋亡,激活ICD。同时,低剂量的淫羊藿素与诱导ICD的化疗药物阿霉素(ADR)在树突状细胞(DC)激活和抗HCC效果中表现出协同作用,当淫羊藿素与ADR的摩尔比为1:2时,二者协同效应最强,此时淫羊藿素和ADR的IC₅₀分别由单独用药时的23.1、0.6 μmol·L⁻¹降至0.07、0.14 μmol·L⁻¹^[27]。

2.3 改善肿瘤免疫抑制微环境 HCC具有独特的免疫应答特性。肝脏通过门静脉持续暴露于来自营养物质和驻留菌群的非自身抗原,促使肝脏进化出多种免疫抑制机制,如骨髓来源的抑制性细胞(MDSCs)、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)、调节性T细胞(Treg)相关分子在HCC微环境中大量存在^[27-28]。淫羊藿苷和淫羊藿素在体内外对MDSCs的生成、信号转导、表型和功能都有直接影响。ZHOU等^[29]研究表明,淫羊藿苷和淫羊藿素在体内可以下调内源性损伤相关分子模式分子S100钙结合蛋白A8/A9复合物(S100A8/A9)和Toll样受体4(TLR4)的表达,显著降低小鼠脾脏MDSCs的数量,增加CD8⁺T细胞的浸润和γ干扰素(IFN-γ)生成量,抑制4T1-Neu荷瘤小鼠肿瘤的生长。同时,体外研究表明淫羊藿素可以显著降低MDSCs的比例,促进MDSCs向DC和巨噬细胞分化,恢复机体免疫。HAO等^[30]体内研究同样证实淫羊藿素能调节肿瘤免疫抑制微环境,减少MDSCs数量,发挥抗肿瘤免疫调节作用。TAO等^[31]借助Hep1-6原位肝癌小鼠和H22皮下肿瘤模型小鼠首次证实淫羊藿素能降低肝癌肿瘤组织中MDSCs的浸润和活性。该研究发现给予淫羊藿素治疗2周后的肝癌小鼠中,肿瘤组织中细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的数量和活性均明显增加,多形核MDSCs数量显著降低。其作用

机制与淫羊藿素降低肿瘤诱导的脾脏骨髓系造血干/祖细胞(HSPCs)聚集及MDSCs生成有关。体外干扰人脐静脉血来源CD34⁺T细胞形成MDSCs的实验也证实淫羊藿素可以抑制人多形核髓源性巨噬细胞的生成,抑制MDSCs的产生和激活,进而促进CTL介导的抗肿瘤作用^[31]。

2.4 抑制肝癌细胞免疫逃逸 肿瘤细胞低表达Fas,异常高表达其配体FasL,通过诱导T细胞发生凋亡反击宿主免疫系统,是其逃避免疫系统监视的重要方式。据报道,淫羊藿苷可以使HepG2.2.15细胞FasL表达率显著下降,Fas表达率提高,抑制由HepG2.2.15细胞诱导的Jurkat细胞凋亡,同时增强HepG2.2.15细胞对CD3单克隆抗体激活的杀伤细胞(CD3AK)的敏感性,有效逆转肿瘤细胞的免疫逃逸^[32]。SUN等^[23]研究也发现淫羊藿素可以增加SMMC-7721细胞系Fas的表达,有助于逆转肝癌细胞的免疫逃逸。此外,肿瘤细胞可通过表达细胞程序性死亡-配体1(PD-L1),与CTL表面程序性死亡受体1(PD-1)结合,负向调控T细胞活性,实现免疫逃逸。MO等^[33]研究发现,淫羊藿素可以在蛋白和RNA水平显著降低SMMC-7721肝癌细胞中由肿瘤坏死因子-α(TNF-α)诱导的PD-L1表达,降低人髓系白血病单核细胞(THP-1)细胞表面PD-L1水平。这一作用与淫羊藿素特异性地与核转录因子-κB(NF-κB)抑制蛋白(IκB)激酶α(IKKα)结合,阻断IKK复合物形成,进而抑制NF-κB p65核移位,降低NF-κB p65与PD-L1启动子的结合及PD-L1的表达有关。淫羊藿素与PD-1抑制剂联用还可以显著增强PD-1抑制剂的抗癌能力^[31,33]。

2.5 抑制肝癌细胞侵袭和转移 肝癌可以发生骨转移、肺转移,甚至乳腺等多部位的转移,造成疾病复发,影响患者术后生存。淫羊藿苷具有抑制肝癌转移的潜力。淫羊藿苷能抑制HepG2细胞在I型胶原上的黏附,显著降低HepG2细胞的迁移速度^[34];还能改善HepG2细胞中血管内皮生长因子(VEGF)和增殖诱导配体(APRIL)的高表达,明显降低细胞内VEGF和APRIL水平,抑制内皮细胞迁移,发挥抑制血管生成和肿瘤转移的作用^[35]。

2.6 逆转肝癌细胞的耐药性 HCC被认为是最耐化疗的肿瘤类型之一,具有多药耐药性(MDR)^[36]。三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运体家族成员P-糖蛋白(P-gp)、多药耐药相关蛋白2(MRP2)、MRP3介导的药物外排是导致HCC产生MDR的原因^[37]。黄酮类成分具有抑制ATP结合盒转运蛋白的能力,是极具

前景的抗多药耐药的化合物^[38]。据报道,淫羊藿的黄酮类成分淫羊藿素具有逆转肝癌细胞MDR的作用^[39]。SUN等^[39]建立了HepG2/ADR细胞株,经淫羊藿素处理后,通过噻唑蓝(MTT)比色法测定耐药菌株对ADR的敏感性,荧光光谱测定细胞中ADR的累积情况,聚合酶链式反应(PCR)扩增技术测定MDR1基因表达情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)测定P-gp的蛋白水平,结果表明淫羊藿素下调了HepG2/ADR细胞中MDR基因表达量和P-gp水平,使细胞内ADR积累增加,有效地逆转了HepG2/ADR细胞株的MDR。

2.7 抑制肝癌起始细胞的干性特征 在肝癌的形成过程中,由肝祖细胞或正常肝细胞去分化形成的肝细胞癌起始细胞(HCICs)是HCC的主要细胞来源^[40-41]。其具有较高的恶性、复发性和MDR^[41],与肝癌的复发相关。ZHAO等^[41]发现淫羊藿素能通过白细胞介素(IL)-6/Janus 酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)/信号转导与转录激活因子3(STAT3)信号通路显著降低肝癌细胞系(PLC/PRF/5和Huh7)中上皮细胞黏附分子(EpCAM)阳性细胞的比例及HCC复发患者原代肝癌细胞Hep-12干性标志物EpCAM⁺的表达,降低PLC/PRF/5和Huh7细胞在低附着培养皿中的瘤球形成能力及PLC/PRF/5细胞在体内的成瘤能力。

2.8 调节免疫系统功能,间接发挥抗肿瘤作用 肿瘤和免疫系统间存在复杂的相互作用,即“免疫编辑”。据报道,肝癌患者免疫功能受到抑制,自身的抗肿瘤能力下降^[42]。随着病情发展,这种免疫抑制可逐渐加重,而激活患者先天免疫有益于肝癌的治疗和预后^[42-43]。淫羊藿具有补肾助阳、扶正祛邪的攻效。现代药理研究表明,其可以通过增强机体免疫功能、增加或维持免疫器官的功能、激活免疫细胞来发挥抗肿瘤作用。QIN等^[10]研究了预后不良患者给予淫羊藿素治疗后体内细胞因子、免疫检查点蛋白及免疫细胞的变化,结果证实淫羊藿素对预后不良的晚期乙型肝炎病毒相关HCC患者具有免疫调节作用。FAN等^[44]的临床实践表明,淫羊藿素在晚期肝癌患者的治疗中显示出了安全性和初步持久生存优势,患者体内免疫标志物(IL-6、TNF- α 、INF- γ 等)、免疫细胞(中性粒细胞、淋巴细胞、CD8⁺T细胞等)的变化显示这与淫羊藿素的免疫调节作用有关。赵连梅等^[45]在体内实验中发现淫羊藿苷能逆转化疗后小鼠免疫抑制状态。此外,EPS可以增加荷瘤小鼠免疫器官指数、激活荷瘤小鼠免疫细

胞并显著提高荷瘤小鼠的免疫功能,进而发挥抗肿瘤作用^[46]。WANG等^[12]体内研究发现EPS可以上调巨噬细胞和DC的表面受体分子,促进DC的成熟及抗原提呈,促进IL-6、TNF- α 、IL-2等细胞因子的分泌及CD4⁺T细胞的增殖和分化,具有明显的体内抗肿瘤活性。李畅等^[13]研究也表明EPS可促进骨髓来源小鼠树突状细胞(BMDC)的成熟,显著升高BMDC的表面CD86、CD80、CD40和主要组织相容性复合体(MHC)-II表达水平,增加IL-6、IL-12和TNF- α 等免疫应答细胞因子水平,激活细胞免疫应答,发挥免疫调节作用。淫羊藿主要通过上述机制发挥抗肝癌作用,其抗肝癌活性成分及作用效果/机制总结见表1。

3 总结和展望

现有研究表明淫羊藿中C-8位异戊烯基取代的黄酮醇(淫羊藿素)及其苷类(朝藿定C、淫羊藿苷、宝藿苷I等)、EPS可以通过多种机制直接作用于肝癌细胞或调节免疫杀伤肝癌细胞发挥抗肝癌作用,是淫羊藿发挥抗肝癌作用的主要物质基础。值得关注的是,黄酮类成分通过抑制肝癌起始细胞干性特征、诱导肝癌细胞衰老、诱导ICD等新的机制被逐渐发现,为淫羊藿抗肝癌研究提供了新依据。

尽管目前淫羊藿抗肝癌活性成分的机制研究逐渐深入,可为抗肝癌新药的研发提供一定参考,但仍存在一些不足:①淫羊藿中含有丰富的结构类似的黄酮类成分,除已经报道的具有抗肝癌作用的4个成分外,箭藿苷A、箭藿苷B等其他C-8位异戊烯基取代的黄酮类成分是否同样有抗肝癌作用尚不明确,需要进一步研究证实。②中药具有多成分、多靶点、多途径整体协同作用的特点,而淫羊藿抗肝癌的研究多集中于某几个单体的药效及作用机制的挖掘,缺乏系统阐明淫羊藿抗肝癌物质基础及其作用机制的研究。③淫羊藿为多基原中药且药材资源主要来自于野生,淫羊藿苷等有效成分的含量在不同基原,甚至同一基原的不同居群中变异极大^[49],难以保障其质量和药效的稳定,而目前尚无研究对不同基原或不同居群淫羊藿的药效进行研究。为了解决上述问题,更好地实现淫羊藿抗肝癌作用的科学解释和合理开发利用,笔者建议从以下几个方面开展研究。首先,在抗肝癌活性成分挖掘方面,继续开展体内外实验明确淫羊藿中其他的C-8位异戊烯基取代的黄酮类成分是否具有抗肝癌作用,为该药材的抗肝癌物质基础阐释提供依据。其次,在物质基础研究方面,可结合谱效关联、血清

表1 淫羊藿的抗肝癌活性成分及作用效果/机制

Table 1 Anti-hepatocellular carcinoma active components of Epimedii Folium and corresponding effects/mechanisms

成分	研究方式	细胞系	浓度范围/最佳浓度	作用效果/机制	参考文献
淫羊藿苷	b	B	50~400 mg·L ⁻¹	下调增殖细胞核抗原(PCNA)的表达,阻滞细胞周期于G ₀ /G ₁ 期,抑制细胞增殖,上调Bax/Bcl-2比例,促进其凋亡	[15]
	b	A	10 μmol·L ⁻¹	阻碍细胞进入S期,抑制细胞增殖;降低Bcl-2蛋白的表达,促进细胞凋亡;抑制纤维状肌动蛋白(F-actin)细胞骨架蛋白的聚合,影响细胞正常生理过程	[16]
	a+b	A+B+C	5~40 μmol·L ⁻¹ /15~60 mg·kg ⁻¹	时间和剂量依赖性地抑制肝癌细胞的活性;促进SMMC-7721细胞内ROS的产生,进而诱导JNK磷酸化,激活MAPK信号通路,上调Bax/Bcl-2比例,激活线粒体/Caspase凋亡通路,促进SMMC-7721细胞凋亡	[19]
	b	H	50 mg·L ⁻¹	降低肝癌细胞FasL的表达,增加Fas表达,逆转肿瘤细胞的免疫逃逸	[32]
	b	A	2~16 mg·L ⁻¹	促进细胞凋亡,降低肝癌细胞黏附能力和迁移速度	[34]
	b	A	25 mg·L ⁻¹	降低细胞内VEGF和APRIL水平,抑制内皮细胞细胞迁移,抑制新血管生成和肿瘤转移	[35]
	a	-	40~150 mg·kg ⁻¹	逆转化疗后小鼠免疫抑制状态	[45]
淫羊藿素	b	A	5~100 μmol·L ⁻¹	激活JNK1信号通路,诱导HepG2凋亡	[21]
	b	A+D	1~2 μmol·L ⁻¹	诱导ROS产生和DNA损伤,抑制DNA合成,诱导细胞周期阻滞,促进细胞衰老	[18]
	b	B	8~60 μmol·L ⁻¹	剂量依赖性地抑制SMMC-7721细胞活性;上调SMMC-7721细胞中Bax/Bcl-2比例,增加Caspase-3的活化,触发线粒体/Caspase凋亡通路,增加Fas表达水平,激活Caspase-8,激活Fas介导的外源性凋亡通路,诱导SMMC-7721细胞凋亡	[23]
	b	E	2.5~40 μmol·L ⁻¹	促进微小RNA(miR)-620、miR-1236、miR-1270的表达,降低AFP mRNA的稳定性和翻译活性,抑制AFP水平升高,抑制癌细胞增殖,促进肝癌细胞凋亡	[24]
	a+b	A+D+F+M	1~25 μmol·L ⁻¹ /2.5~25 mg·kg ⁻¹	作用于鞘氨醇激酶1(SphK1),促进促凋亡神经酰胺的生成和JNK1激活,诱导肝癌细胞凋亡并抑制异位增生	[22]
	a+b	A+E+L	100 mg·kg ⁻¹	增加肿瘤抑制因子HBP1与AFP的结合,在转录水平抑制AFP表达,改善AFP对人第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN)、基质金属蛋白酶-9和Caspase-3的影响,抑制肝癌细胞增殖、迁移并诱导其凋亡	[25]
	a+b	A+B	20 μmol·L ⁻¹ /100 mg·kg ⁻¹	降低MDM2介导的p53蛋白降解,提高p53水平,在转录水平抑制AFP启动子,降低AFP水平,抑制肝癌细胞增殖,促进肝癌细胞凋亡	[26]
	a+b	D+I	10~40 μmol·L ⁻¹ /1 mg·kg ⁻¹	诱导肝癌细胞线粒体自噬和凋亡,激活肿瘤的ICD	[27]
	a	I+K	70 mg·kg ⁻¹	降低肿瘤导致的脾脏中HSPCs聚集及MDSCs生成,降低肿瘤组织中MDSCs的浸润和活性,增加CTL的数量和活性	[31]
	a+b	B+I	10~20 μmol·L ⁻¹ /70 mg·kg ⁻¹	特异性地与IKKα结合,阻断IKK复合物的形成,进而抑制NF-κB p65核移位,降低NF-κB p65与PD-L1启动子的结合及PD-L1的表达,降低肝癌细胞中由TNF-α诱导的PD-L1表达及THP-1细胞表面PD-L1水平	[33]
	b	A	1~30 μmol·L ⁻¹	下调耐药细胞株MDR和P-gp基因,逆转耐药细胞株的MDR	[39]
a+b	D+E+M	5~20 μmol·L ⁻¹ /70 mg·kg ⁻¹	激活IL-6/JAK2/STAT3信号通路,降低HCICs的比例和干性,抑制肝癌细胞体内的成瘤能力	[41]	
a	-	600 mg·kg ⁻¹	通过IL-6/JAK/STAT3通路调节细胞因子、免疫检查点[T细胞免疫球蛋白黏蛋白3(TIM3)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、CD28等]和免疫细胞,发挥免疫调节活性	[10]	
宝藿苷 I	a+b	A+D	20~50 μmol·L ⁻¹ /25 mg·kg ⁻¹	靶向mTOR,下调p-mTOR表达水平,干扰肝癌细胞能量代谢,诱导Caspase依赖的细胞凋亡,从而抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移	[20]
	a+b	J	5~10 μmol·L ⁻¹ /5~10 mmol·L ⁻¹	诱导肝癌细胞凋亡,下调NF-κB信号通路相关蛋白,抑制肝癌细胞增殖	[47]
朝藿定 C	b	G	500 μmol·L ⁻¹	抑制MAPK的活力,增加CDK抑制因子p21 ^{Cip1} 、p27 ^{Kip1} 的表达或负向调节ERK/c-Fos/AP-1通路,抑制Cyclin D ₁ /CDK4复合物的形成,阻滞细胞周期于G ₀ /G ₁ 期,阻断细胞周期进程	[17]
EPS	a+b	O	100 mg·L ⁻¹ /5~20 mg·kg ⁻¹	上调巨噬细胞和DC表面辅助分子,促进DC的成熟及抗原提呈,促进淋巴细胞的增殖和分化	[12]
	b	N	10~100 mg·L ⁻¹	促进BMDC的成熟,激活细胞免疫应答;显著升高BMDC的表面CD86、CD80、CD40和MHC-II表达水平,增加IL-6、IL-12和TNF-α等免疫应答细胞因子水平	[13]
	a	-	10~100 mg·kg ⁻¹	促进胸腺细胞增殖并促进胸腺释放成熟细胞	[48]

注: a. 体内; b. 体外; A. HepG2; B. SMMC-7721; C. Bel-7402; D. Huh7; E. PLC/PRF/5; F. KYN-2; G. SK-Hep-1; H. HepG2.2.15; I. Hepa1-6; J. QGY7703; K. H22; L. PLC; M. 人源肿瘤样本; N. 原代BMDC细胞; O. 原代腹腔巨噬细胞和脾淋巴细胞

药物化学、网络药理学等手段在整体作用下预测淫羊藿发挥抗肝癌作用的物质基础^[50],而后基于成分敲出/敲入模式^[51]对目标药效物质进行研究,明确淫羊藿抗肝癌的具体药效物质;同时,网络药理学、代谢组学、生物膜干涉技术^[52]等手段的联合应用将为淫羊藿多靶点、多途径协同抗肝癌机制的阐释提供技术保障。最后,针对淫羊藿多基原的问题,应通过植物代谢组学^[53]、体内药效研究等手段确定淫羊藿的优良种质,建立符合《中药材生产质量管理规范》的种植基地,保障其质量和疗效的稳定。此外,大量文献研究表明淫羊藿素与西药如PD-1抗体抑制剂、ADR等联用可改善化疗药物的耐药性问题,增强药物抗肿瘤作用^[31,33,39],说明淫羊藿与西药的合理联用值得深入探索,为淫羊藿抗肝癌的临床应用提供新方向。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] ZENG H M, CHEN W Q, ZHENG R S, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: A pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. Lancet Glob Health, 2018, 6(5): e555-e567.
- [3] 郭敬,陈弘东,周强,等. 仝小林运用淫羊藿经验[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(4): 336-338.
- [4] 王志学. 活血化痰七法治疗原发性肝癌[J]. 中医药研究, 1999(5): 30-31.
- [5] 余志红,陈嘉斌,徐国晷,等. 柴可群运用中医辨治肿瘤四则四法论治肝癌经验[J]. 中医杂志, 2019, 60(7): 559-561.
- [6] 李在林. 去甲斑蝥素与淫羊藿联合对原发性肝癌的临床效果分析[J]. 中外医学研究, 2015, 13(26): 8-9.
- [7] 刘少杰,王桂芬,李义松,等. 应用益气温阳解毒疗法治疗原发性肝癌的疗效观察[J]. 当代医药论丛, 2014, 12(12): 37-39.
- [8] LIN C C, NG L T, HSU F F, et al. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004, 31(1/2): 65-69.
- [9] 周建锋,王怡兵. 不同扶正药物及其配伍对SMMC-7721人肝癌细胞p53、N-ras基因的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(S1): 192-195.
- [10] QIN S K, LI Q, XU J M, et al. Icaritin-induced immunomodulatory efficacy in advanced hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: Immunodynamic biomarkers and overall survival [J]. Cancer Sci, 2020, 111(11): 4218-4231.
- [11] MA H P, HE X R, YANG Y, et al. The genus *Epimedium*: An ethnopharmacological and phytochemical review [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 519-541.
- [12] WANG C C, FENG L, SU J Y, et al. Polysaccharides from *Epimedium koreanum* Nakai with immunomodulatory activity and inhibitory effect on tumor growth in LLC-bearing mice [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 207: 8-18.
- [13] 李畅,陈菲菲,杨艳君,等. 淫羊藿多糖组成分析及其免疫调节作用研究[J]. 中国中药杂志, 2021, doi: 10.19540/j.cnki.cjcm.20210525.306.
- [14] 李晓兵,丁云录,李驰坤,等. 淫羊藿多糖的提取分离及体内抗氧化活性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2020, 36(5): 908-912.
- [15] 朱燕辉,黄丽霞,石崇军. 淫羊藿苷对肝癌细胞株SMMC-7721增殖与凋亡的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(8): 968-972.
- [16] WANG Z M, SONG N, REN Y L. Anti-proliferative and cytoskeleton-disruptive effects of icariin on HepG2 cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 6815-6820.
- [17] LIU T Z, CHEN C Y, YIIN S J, et al. Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1} [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(2): 227-235.
- [18] WANG S K, WANG Q, WANG H J, et al. Induction of ROS and DNA damage-dependent senescence by icaritin contributes to its antitumor activity in hepatocellular carcinoma cells [J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 424-431.
- [19] LI S G, DONG P, WANG J W, et al. Icaritin, a natural flavonol glycoside, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells via a ROS/JNK-dependent mitochondrial pathway [J]. Cancer Lett, 2010, 298(2): 222-230.
- [20] GUO Y, ZHU H, WENG M, et al. Baohuoside- I targeting mTOR inducing apoptosis to inhibit hepatocellular carcinoma proliferation, invasion and migration [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110366.
- [21] HE J, WANG Y, DUAN F, et al. Icaritin induces apoptosis of HepG2 cells via the JNK1 signaling

- pathway independent of the estrogen receptor [J]. *Planta Med*, 2010, 76(16):1834-1839.
- [22] LU P H, CHEN M B, LIU Y Y, et al. Identification of sphingosine kinase 1 (SphK1) as a primary target of icaritin in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14):22800-22810.
- [23] SUN L, PENG Q S, QU L L, et al. Anticancer agent icaritin induces apoptosis through Caspase-dependent pathways in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4):3094-3100.
- [24] ZHANG C, LI H, JIANG W, et al. Icaritin inhibits the expression of alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-infected hepatoma cell lines through post-transcriptional regulation [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50):83755-83766.
- [25] CAO Z Y, CHENG Y N, WANG J Y, et al. HBPI-mediated transcriptional repression of AFP inhibits hepatoma progression [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1):118.
- [26] LI H, LIU Y J, JIANG W, et al. Icaritin promotes apoptosis and inhibits proliferation by down-regulating AFP gene expression in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1):318.
- [27] YU Z, GUO J F, HU M Y, et al. Icaritin exacerbates mitophagy and synergizes with doxorubicin to induce immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Nano*, 2020, 14(4):4816-4828.
- [28] MARVEL D, GABRILOVICH D I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: Expect the unexpected [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9):3356-3364.
- [29] ZHOU J M, WU J F, CHEN X H, et al. Icaritin and its derivative, ICT, exert anti-inflammatory, anti-tumor effects, and modulate myeloid derived suppressive cells (MDSCs) functions [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(7):890-898.
- [30] HAO H B, ZHANG Q, ZHU H, et al. Icaritin promotes tumor T-cell infiltration and induces antitumor immunity in mice [J]. *Eur J Immunol*, 2019, 49(12):2235-2244.
- [31] TAO H M, LIU M Y, WANG Y, et al. Icaritin induces anti-tumor immune responses in hepatocellular carcinoma by inhibiting splenic myeloid-derived suppressor cell generation [J]. *Front Immunol*, 2021, 12:609295.
- [32] 王谦, 张玲, 毛海婷, 等. 中药淫羊藿苷抑制肝癌 HepG2.2.15 细胞增殖和免疫逃逸作用研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 23(10):908-911.
- [33] MO D L, ZHU H, WANG J, et al. Icaritin inhibits PD-L1 expression by targeting protein I κ B kinase α [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(4):978-988.
- [34] 王程强, 彭小春. 淫羊藿苷抗肝癌细胞 HepG2 迁移机制的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(9):2196-2197.
- [35] 唐菁, 张玲, 李翠玲, 等. 淫羊藿苷与黄芩苷联合多柔比星对肝癌细胞 APRIL 表达和血管内皮细胞生长抑制的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(20):1534-1537.
- [36] DONG X, MUMPER R J. Nanomedicinal strategies to treat multidrug-resistant tumors: Current progress [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5(4):597-615.
- [37] CHEN Z L, SHI T L, ZHANG L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):153-164.
- [38] CHAMBERS C S, VIKTOROVÁ J, ŘEHOŘOVÁ K, et al. Defying multidrug resistance! Modulation of related transporters by flavonoids and flavonolignans [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(7):1763-1779.
- [39] SUN L, CHEN W G, QU L L, et al. Icaritin reverses multidrug resistance of HepG2/ADR human hepatoma cells via downregulation of MDR1 and P-glycoprotein expression [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(6):1883-1887.
- [40] SIA D, VILLANUEVA A, FRIEDMAN S L, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4):745-761.
- [41] ZHAO H, GUO Y M, LI S, et al. A novel anti-cancer agent icaritin suppresses hepatocellular carcinoma initiation and malignant growth through the IL-6/JAK2/STAT3 pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31):31927-31943.
- [42] 林丽珠, 蓝韶清. 原发性肝癌中医证型与免疫功能关系的研究 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2001, 11(7):15-17.
- [43] PAN J, XU Y Y, WU Q S, et al. Mild magnetic hyperthermia-activated innate immunity for liver cancer therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(21):8116-8128.
- [44] FAN Y, LI S, DING X Y, et al. First-in-class immunomodulating small molecule icaritin in advanced hepatocellular carcinoma: Preliminary results of safety, durable survival and immune biomarkers [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):279.
- [45] 赵连梅, 纪昕, 潘晓明, 等. 淫羊藿苷 (ICA) 对化疗后免疫抑制小鼠的免疫促进作用 [J]. *中国免疫学杂志*

- 志, 2009, 25(12): 1092-1095, 1099.
- [46] 王刚, 徐颖. 淫羊藿多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 武警医学院学报, 2003, 12(3): 194-196.
- [47] SUN Y L, PANG B, WANG Y Z, et al. Baohuoside I inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via apoptosis signaling and NF- κ B pathway[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(6): e2100063.
- [48] 丁雁, 邢善田, 周金黄. 淫羊藿多糖致小鼠胸腺缩小的免疫药理机理研究[J]. 中国免疫学杂志, 1993, 9(3): 185-188.
- [49] 周茗, 郑伟, 郭宝林, 等. 基于UHPLC-PDA-Q-TOF/MS^E技术的栽培淫羊藿质量研究[J]. 药学学报, 2020, 55(5): 995-1003.
- [50] 刘谊民, 许婷, 张黄琴, 等. 基于谱效关系和网络药理的淫羊藿抗骨质疏松物质基础及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 177-184.
- [51] 庞晨, 贤欢, 李慧, 等. 基于成分敲出/敲入模式辨识藜蒿叶抗白色念珠菌的药效物质[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 28-35.
- [52] SHI Q P, GUO W, SHEN Q C, et al. *In vitro* biolayer interferometry analysis of acetylcholinesterase as a potential target of aryl-organophosphorus flame-retardants[J]. J Hazard Mater, 2021, 409: 124999.
- [53] 荔淑楠, 王引权, 王富胜, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的不同品种当归代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8): 138-147.

[责任编辑 刘德文]