

从网络视角探讨复方鳖甲软肝片的抗肝癌潜能及其组方功效配伍特点

陈文佳¹, 毛霞¹, 郭晓东², 余灵祥², 林娜¹, 张彦琼^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 解放军总医院第五医学中心, 北京 100039)

[摘要] 目的:从网络视角出发,探讨复方鳖甲软肝片(FBRP)的抗肝癌潜能及其组方功效配伍的特点,为其临床重定位提供依据。方法:收集3例原发性肝癌患者的癌和癌旁组织样本,进行全基因组表达谱芯片检测,筛选到肝癌发生相关差异基因。在中医药百科全书数据库(ETCM)和中医药整合药理学研究平台(TCMIP)V2.0中分别检索并筛选获得化学成分谱以及相关化学成分所对应的候选靶标谱,提取上述肝癌发生相关差异基因和FBRP各功效组候选靶标之间的相互作用信息,构建“肝癌发生相关差异基因-FBRP功效物质群候选靶标”互作网络,筛选其核心网络节点,在此基础上进行通路富集分析,探讨FBRP组方中消癥散结组(鳖甲、莪术),补血活血组(赤芍、当归、三七),益气健脾组(党参、黄芪),育阴养肝组(紫河车、冬虫夏草)和清热解毒组(板蓝根、连翘)5个功效组干预肝癌失衡网络的潜在调控机制。结果:FBRP所含5个功效组既有共同的核心靶标群及通路群又各有侧重。前者主要涉及神经系统调节、维持“免疫-炎症系统”平衡、多种物质能量代谢途径调节和癌症相关通路调节等环节;后者主要体现在5个方面:①消癥散结组和益气健脾组对神经系统的调节作用可概括为行气解郁和补气血、益神明;补血活血组也参与了行气解郁的调节,益肾养肝组也参与了补气血、益神明的调节。②消癥散结组和育阴养肝组的调节作用可概括为精、气、血三补,补血活血组侧重于对免疫-循环系统的改善作用,清热解毒组则通过作用于T细胞受体信号通路维持机体“免疫-炎症系统”的平衡。③益气健脾组表现为对药物、脂质、糖、激素、辅助因子和维生素等多种物质代谢过程的调节;育阴养肝组主要参与脂质、糖、蛋白质和激素等物质代谢过程;清热解毒组则主要对核苷酸和激素的代谢过程产生影响。④相对于在以上环节协同发挥的扶正作用,在缓解癌症病理改变方面,5个功效组对细胞周期等功能的调节作用可概括为祛邪作用。⑤全方位侧重于体现FBRP整体的抗肝癌潜能,各功效组则强调各功效组在“免疫-炎症系统”平衡、多种代谢途径调节,尤其是神经系统调节中各有侧重的作用特点,2种网络分析模式相互补充、相互印证。结论:FBRP具有抗肝癌潜能,通过揭示其功效的生物学内涵及组方配伍的合理性,明确了该复方矫正肝脏“炎-癌”失衡网络的调控机制,可为FBRP增加防治肝癌的临床适应症提供可能性和生物学依据。

[关键词] 网络药理学; 复方鳖甲软肝片; 炎-癌恶性转化; 肝癌; 组方理论; 临床重定位; 配伍

[中图分类号] R2;R857.3;R28;R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0011-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202352

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200922.0909.001.html>

[网络出版日期] 2020-9-22 09:36

Investigation on Anti-liver Cancer Potential and Compatibility Characteristics of Fufang Biejia Ruangan Pian from Network Perspective

CHEN Wen-jia¹, MAO Xia¹, GUO Xiao-dong², YU Ling-xiang², LIN Na¹, ZHANG Yan-qiong^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. The Fifth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-liver cancer potential of Fufang Biejia Ruangan Pian (FBRP) and its compatibility characteristics from a network perspective, so as to provide a theoretical basis for

[收稿日期] 20200520(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673834)

[第一作者] 陈文佳,在读硕士,从事中药药理学研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:chenwenjia1111@163.com

[通信作者] *张彦琼,副研究员,博士生导师,从事中药药理学研究,Tel:010-64014411-2869,E-mail:yqzhang@icmm.ac.cn

the clinical repositioning of FBRP. **Method:** Three self-pairs of cancer and para-cancerous tissue samples were collected from three patients with primary liver cancer, and the whole genome expression profiling chip was used to detect the differential genes related to the development and progression of liver cancer. After collecting the phenotype-related genes and the candidate targets of the corresponding prescriptions of FBRP from The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM) and Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine (TCMIP) V2.0, the "differentially expressed genes related to liver cancer development-candidate targets of FBRP efficacy substance group" interaction network was constructed according to the interaction information between the above-mentioned differentially expressed genes related to liver cancer and the candidate targets of the FBRP efficacy group, and then the major network nodes were screened. After that, the enrichment analysis of the pathway was performed in order to explore the biological basis of various pharmacological efficacy groups of FBRP, including Xiaozheng Sanjie group (Trionycis Carapax and Curcumae Rhizoma), Buxue Huoxue group (Paeoniae Radix Rubra, Angelicae Sinensis Radix and Notoginseng Radix et Rhizoma), Yiqi Jianpi group (Codonopsis Radix and Astragali Radix), Yuyin Yanggan group (Placenta Hominis and Cordyceps) and Qingre Jiedu group (Isatidis Radix and Forsythiae Fructus). **Result:** The major network targets of the five efficacy groups may be involved into several common pathways but also associated with some special pathological processes. Those common pathways mainly contained the regulation of nervous system, the balance of immune-inflammatory system, the regulation of energy metabolism of various substances and cancer-related pathways, while the point was also reflected by the follows: ① The regulating effects of Xiaozheng Sanjie group and Yiqi Jianpi group were summarized as promoting Qi circulation and relieving depression and replenishing Qi-blood, benefiting spirit. Buxue Huoxue group may also participate in the regulation of promoting Qi circulation and relieving depression and Yuyin Yanggan group may participate in the regulation of replenishing Qi-blood and benefiting spirit. ② The regulatory effects of the Xiaozheng Sanjie group and the Yuyin Yanggan group were summarized as essence, Qi and blood supplement. Buxue Huoxue group focused on the improvement of the immune-circulatory system. Qingre Jiedu group mainly regulated the balance of immune-inflammatory system by acting on T cell receptor signaling pathway. ③ Yiqi Jianpi group was demonstrated to show the effects on various material and energy metabolisms. Yuyin Yanggan group exerted effects on lipid metabolism, carbohydrate metabolism, protein metabolism and hormone metabolism. Qingre Jiedu group was also involved into metabolism of nucleotide and hormone. ④ In the aspect of alleviating the pathological changes of cancer, the regulatory effects of the five efficacy groups on cell cycle and other functions could be summarized as dispelling pathogenic factors. ⑤ The whole prescription focused on the anti-liver cancer potential of FBRP as a whole, while each efficacy group emphasized that each efficacy group had its own functional characteristics. The two network analysis models complemented and verified each other. **Conclusion:** FBRP has the anti-hepatoma potential. By revealing the biological connotation of its efficacy and the rationality of the compatibility, the regulation mechanism of FBRP to correct the imbalance network of inflammation and cancer in liver is clarified, which can provide the possibility and biological basis for FBRP to increase the clinical indications for the prevention and treatment of liver cancer.

[**Key words**] network pharmacology; Fufang Biejia Ruangan Pian; malignant transformation of inflammatory-carcinoma; hepatocellular carcinoma; theory of composing prescriptions; clinical repositioning; compatibility

复方鳖甲软肝片(FBRP)^[1]由鳖甲、莪术、赤芍、当归、三七、党参、黄芪、紫河车、冬虫夏草、板蓝根、连翘共11种中药组成,是我国首个临床批准的抗肝纤维化中药复方制剂,临床疗效显著^[2]。化学成分

研究表征发现^[3-5],FBRP主要含有三萜皂苷类(如人参皂苷),单萜类(如芍药苷),黄酮类(如芒柄花素),苯乙醇苷类(如连翘酯苷),挥发油(如洋川芎内酯),有机酸(如没食子酸)等38种成分。药效学

和药理学研究表明, FBRP可能通过抑制肾素-血管紧张肽系统的反应^[6]、调节基质金属蛋白酶及其抑制因子活性^[7]和调控转化生长因子- β (TGF- β)/Smad通路信号^[8]等发挥抑制胶原纤维的合成、沉积及促进其降解的作用, 从而改善肝细胞代谢、防止肝细胞损伤和促进肝细胞恢复。在干预肝癌发生发展方面, 赵志敏等^[9]发现临床患者不同时间点的FBRP药物血清对HepG2人肝癌细胞有增殖抑制作用; 周宇辰^[10]开展的一项临床研究发现, FBRP联合核苷类抗病毒药具有良好的抗病毒和抗肝纤维化效果, 联合用药组的肝纤维化逆转程度明显优于单用抗病毒药物组, 长期抗病毒、抗肝纤维化治疗可显著降低肝细胞癌的发生率。

目前, FBRP的基础和临床研究主要集中在其抗纤维化的核心临床功效上, 尚缺乏其在干预肝癌方面的研究。但绝大多数肝癌患者有肝纤维化或肝硬化的病史, 这促使学者们从“炎-癌”恶性转化轴切入研究肝癌发病过程的潜在分子调控机制, 并据此寻找治疗肝癌的新药^[11-14]。受到该问题的启发, 本课题组开展了针对FBRP临床重定位潜能及机制研究的系列工作, 前期已基于分子网络对FBRP全方进行了临床重定位研究和相关实验验证, 结果显示FBRP在肝纤维化微环境调节和肿瘤预防方面有一定潜力^[15]。在此基础上, 本研究结合对临床样本的转录组学检测和对组方中药的分组功效比较, 将肝炎发展为肝癌的临床特征和中医遣药组方的治法治则有机结合后, 开展功效组靶标网络挖掘和分析, 从而进一步考察FBRP干预肝脏“炎-癌”恶性转化的潜能和相关机制, 有助于明确组方中药在全方抗肝癌过程中的贡献和功效特点, 为FBRP增加防治肝癌的临床适应症提供可能性和生物学依据。

1 方法

1.1 FBRP组方理论与功效组的划分 方中鳖甲软坚散结, 滋阴潜阳, 为君药。当归、赤芍、三七三者共用, 养血柔肝, 活血祛瘀, 为臣药。加黄芪与党参, 健脾益气, 寓“肝病实脾”之意; 配紫河车与冬虫夏草, 益肾填精, 育阴养肝, 寓“乙癸同源”之意; 配板蓝根与连翘, 清热解毒, 六药俱为佐药。方中莪术破血行气, 消积止痛, 助鳖甲散结消癥, 但用量较小, 为使药。鳖甲、赤芍、当归、三七诸药可直达肝经, 兼为使药。全方重用血肉有情之品和行气养血、逐瘀生新之品, 立意软坚、活血消积, 能平衡气血、调整阴阳。围绕核心功效, 以君臣佐使之分做第一层划分, 再以6味佐药中的归经之别做第二层

划分, 将FBRP拆分为消癥散结组(鳖甲、莪术), 补血活血组(赤芍、当归、三七), 益气健脾组(党参、黄芪), 育阴养肝组(紫河车、冬虫夏草)和清热解毒组(板蓝根、连翘)5个功效组, 该分组直接反映中医方解理论, 能够与治法治则相呼应。

1.2 临床样本的收集 肝癌及癌旁组织样本来源于2016—2017年在解放军总医院第五医学中心(原解放军第302医院)进行肝癌根治手术且经病理证实的3例原发性肝癌患者, 年龄45~50岁, 从肝炎发展至肝癌的时间达20年及以上, 肝功能分级为A, 肿瘤分期为T2NXMX型, 肿瘤分级为中分化(GⅢ), 肿瘤生长状态为粗梁, 瘤体大小分别为9 cm×8 cm×6 cm, 5 cm×3 cm×2 cm, 3 cm×2.5 cm×3 cm, 伴有肝硬化, 无远处转移。纳入标准为病理诊断为原发性肝癌, 无远处转移。排除标准为术前接受过化疗、放疗、免疫治疗, 同时合并其他类型的恶性肿瘤, 临床资料不完整。患者均签署相关知情文件, 同时本研究已得到解放军总医院第五医学中心伦理委员会批准, 批准号2016003D。

1.3 芯片检测 采用Affymetrix Clariom D Human芯片对收集到的临床样本进行检测; 采用GeneChip Scanner 3000图像分析软件与Command Console Software 4.0对芯片进行扫描并读取原始数据; 采用微阵列显著性分析软件SAM 4.01筛选出肝癌组及癌旁组之间有统计学意义的基因。RNA的提取与质检、芯片检测委托北京康生赛克技术有限公司完成。利用DAVID数据库(version 6.8, <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>)对肝癌发生相关差异基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

1.4 FBRP药物潜在活性成分群和候选靶标谱的获取 从中医药百科全书数据库^[16](ETCM, <http://www.nrc.ac.cn:9090/ETCM/>)和中医药整合药理学研究平台(TCMIP V2.0, <http://www.tcmip.cn/>)中收集FBRP所含11味中药的潜在活性成分, 要求成药性(druglikeness)>0.49, 属于良-优等级, 提取上述潜在活性成分的候选靶标谱, 要求相似性评分>0.80。

1.5 功效组的潜在物质基础研究及网络调控机制研究 利用STRING数据库(version 11.0, <https://string-db.org/cgi/input.pl>)提取上述肝癌发生相关差异基因和FBRP功效组候选靶标之间的相互作用信息, 选取具有实验证据且各类证据总分大于中位数的相互作用信息并构建“肝癌相关基因-FBRP各功效组靶标”分子网络。通过其网络拓扑特征(节点

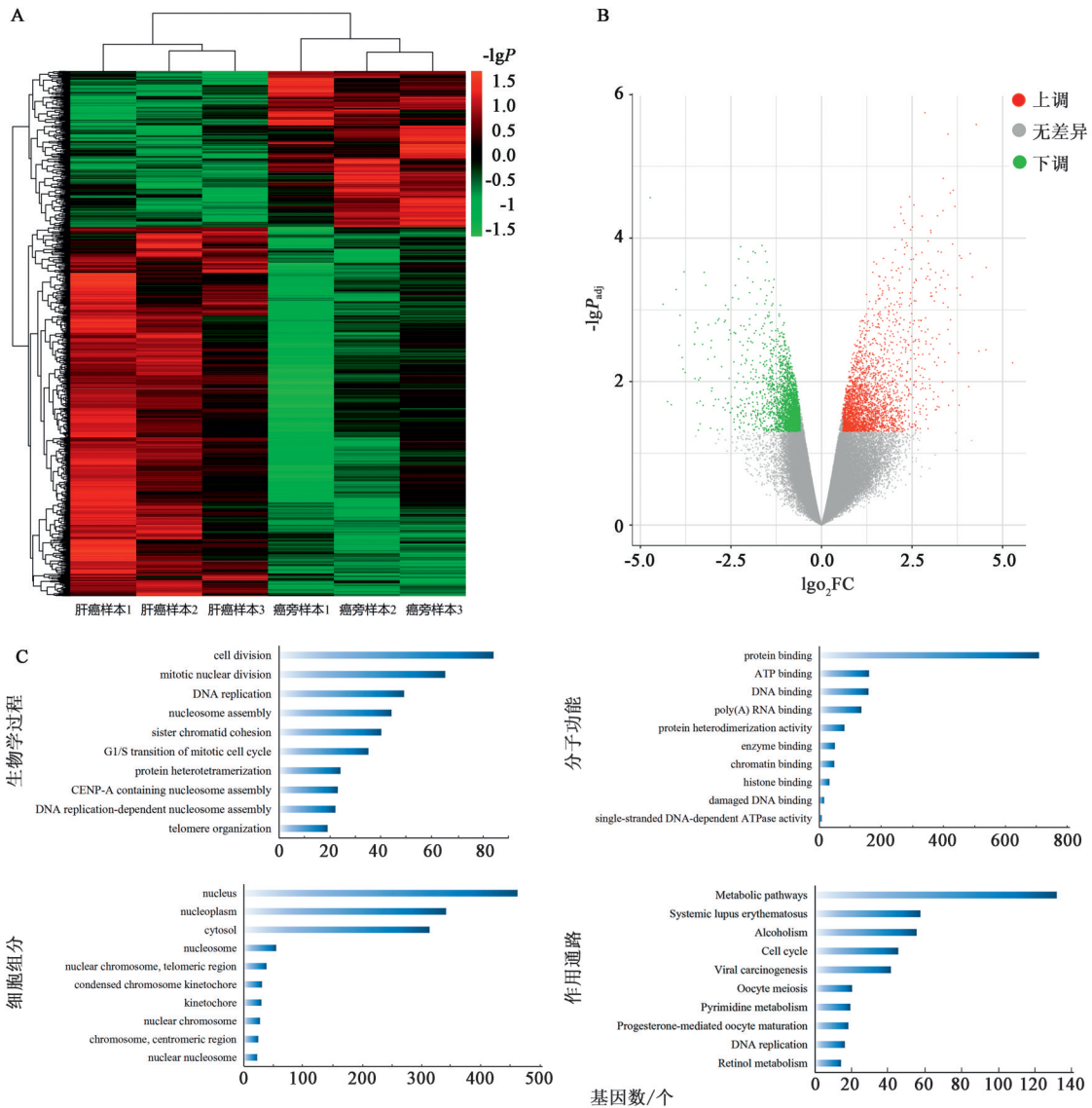
连接度、介数和紧密度)的计算,筛选3个拓扑特征值均大于相应中位数的节点为核心网络节点。基于 KEGG 数据库和 Reactome 数据库 (<https://reactome.org/>)进行通路信息挖掘。

2 结果与讨论

2.1 肝癌发生相关差异基因的获取

基于全基因组表达谱芯片检测和肝癌组及癌旁组之间的差异

基因对比,提取组间差异倍数(FC)>2倍且 $P<0.05$ 的差异基因,获得1282个与肝癌发生相关的基因;利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,显著性基因富集的临界值设定为 $P<0.05$,见图1,结果发现作用通路主要集中于代谢通路,这在一定程度上体现了肝癌发展多累及消化和代谢系统正常状态的发病特点。



A. 聚类图; B. 火山图; C. 富集分析

图1 肝癌组及癌旁组之间的差异基因分析

Fig. 1 Analysis of differentially expressed genes between liver cancer group and adjacent non-cancerous liver group

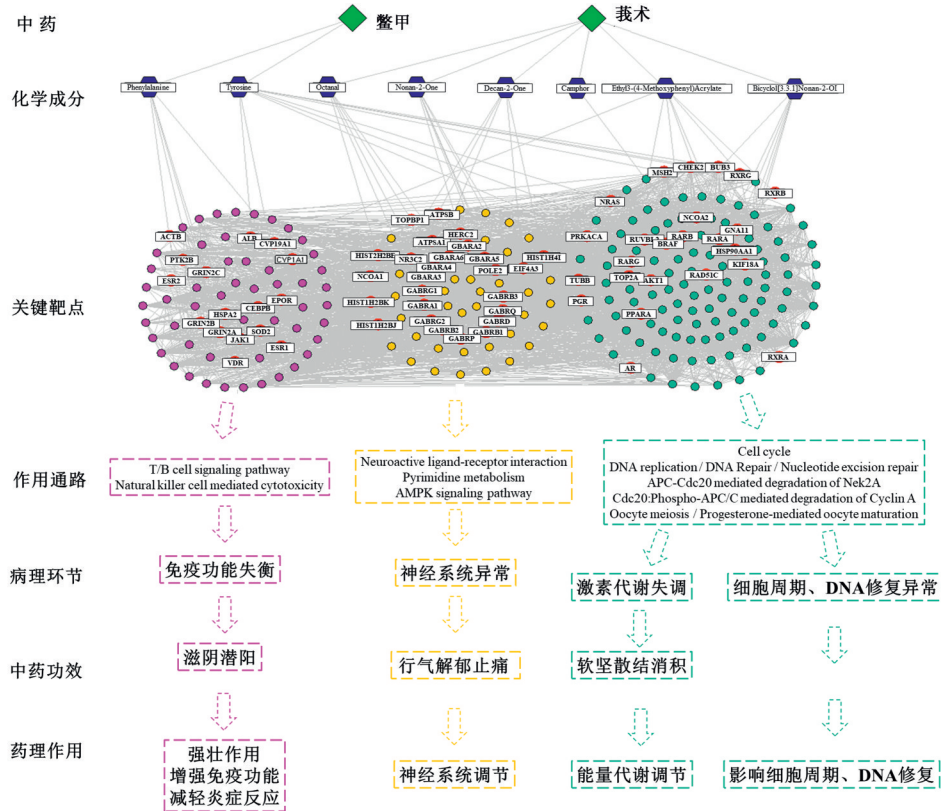
2.2 FBRP 药物候选靶标谱的获取

利用 ETCM 和 TCMIP V2.0 收集 FBRP 中 11 味中药的潜在活性成分,获得化学成分中有消癥散结组 18 个、补血活血组 422 个、益气健脾组 256 个、育阴养肝组 56 个和清热解

毒组 146 个,去重后共计 807 个化学成分,设定成药性大于 0.49,属于良-优等级,筛选后全方共得到 262 个潜在活性成分;提取上述 262 个潜在活性成分的候选靶标谱,获得药物靶标中有消癥散结组 226 个、补血活血组 282 个、益气健脾组 297 个、育阴养肝组 550 个和清热解

2.3 消瘕散结组药理作用特点分析 构建“肝癌发生相关差异基因-消瘕散结功效组候选靶标”互作网络,获得265个核心网络节点,其中,48个为FBRP中鳖甲和莪术的候选靶标,对应18个候选活性成

分,218个肝癌发生相关差异基因。其核心靶标基因参与的通路主要与“免疫-炎症系统”平衡、神经系统调节相关,并参与激素代谢和癌症相关通路,见图2。



中药来源的关键靶点显示红色标签(图3-6同)

图2 消瘕散结组-肝癌关联网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 2 Core genes and their functional interpretation of associated network of Xiaozheng Sanjie group in FBRP-liver cancer

2.4 补血活血组药理作用特点分析 构建“肝癌发生相关差异基因-补血活血功效组候选靶标”互作网络,获得269个核心网络节点,其中,44个为FBRP中赤芍、当归和三七的候选靶标,对应17个候选活性成分,227个肝癌发生相关差异基因。其核心靶标基因参与的通路主要与血液循环相关,并参与“免疫-炎症系统”平衡、神经系统调节、肝肾代谢和癌症相关通路,见图3。

生相关差异基因-育阴养肝功效组候选靶标”互作网络,获得276个核心网络节点,其中,99个为FBRP中紫河车、冬虫夏草的候选靶标,对应23个候选活性成分,187个肝癌发生相关差异基因。其核心靶标基因参与的通路主要与“免疫-炎症系统”平衡、神经系统调节相关,并参与脂质代谢、核苷酸代谢和癌症相关通路,见图5。

2.5 益气健脾组药理作用特点分析 构建“肝癌发生相关差异基因-益气健脾功效组候选靶标”互作网络,获得280个核心网络节点,其中,45个为FBRP中党参、黄芪的候选靶标,对应13个候选活性成分,237个肝癌发生相关差异基因。其核心靶标基因参与的通路主要与各种物质能量代谢相关,并参与神经系统调节和癌症相关通路,见图4。

2.7 清热解毒组药理作用特点分析 构建“肝癌发生相关差异基因-清热解毒功效组候选靶标”互作网络,获得261个核心网络节点,其中,44个为FBRP中板蓝根、连翘的候选靶标,对应10个候选活性成分,224个肝癌发生相关差异基因。其核心靶标基因参与的通路主要与多种能量代谢相关,并参与“免疫-炎症系统”平衡、神经系统调节和癌症相关通路,见图6。

2.6 育阴养肝组药理作用特点分析 构建“肝癌发

2.8 全方与各功效组网络分析结果比较 本课题

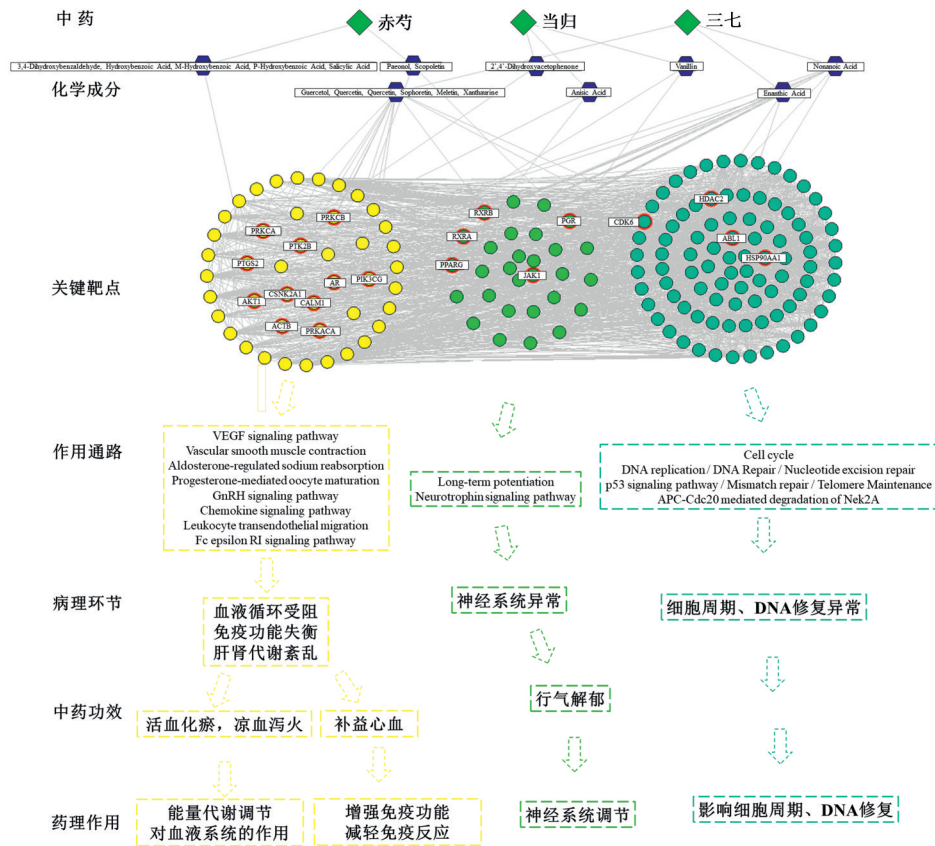


图3 补血活血组-肝癌关联网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 3 Core genes and their functional interpretation of associated network of Buxue Huoxue group in FBRP-liver cancer

组前期已开展FBRP全方干预肝脏“炎-癌”恶性转化的分子网络分析^[15],本研究基于临床样本进行的FBRP全方网络分析方法等与之颇似,在此不多赘述,结果表明FBRP具有抗肝癌潜能的关键网络靶标显著富集于代谢相关途径、免疫系统相关途径和癌症相关途径等通路,见表1,而在鉴定到的161个药物候选靶标中大部分为癌症相关基因,说明通过全方网络分析体现了FBRP抗肝癌的潜能。相比之下,拆方后的各功效组相关分子网络分析则强调了不同功效组特异的作用特点,尤其凸显各功效组在“免疫-炎症系统”平衡、多种代谢途径调节、神经系统调节等方面的异同点,同时与划分功效组的本意(探讨功效生物内涵和组方配伍特点)相扣,说明2种网络分析模式可相互补充、相互印证。

3 讨论

通过网络分析发现,消癥散结组、补血活血组、益气健脾组、育阴养肝组和清热解毒组既有共同的核心靶标群及通路群,又各有侧重,核心靶标主要涉及神经系统调节、“免疫-炎症系统”平衡、多种物质能量代谢途径调节和癌症相关通路调节等环节,各通路群间通过共有靶标基因连接,显示出中药不

同成分间的多靶点、多途径的协同作用特点,见图7。

在神经系统调节方面,消癥散结组、益气健脾组含有理气补气药(莪术、黄芪)和补益药(鳖甲、党参、黄芪),结合中医组方理论来阐释,则其对神经系统的调节作用可概括为行气解郁和补气血、益神明两方面;补血活血组内含有理气药(赤芍、三七),也参与行气解郁的调节;3个功效组共同作用于长时程增强作用和神经营养因子信号通路等通路;育阴养肝组内含有补益药(紫河车、冬虫夏草),参与补气血、益神明的调节,并参与神经活性配体受体相互作用和嘧啶代谢等通路。在“免疫-炎症系统”平衡方面,结合中医组方理论来阐释,则消癥散结组和育阴养肝组包含了FBRP方中重用的“血肉有情之品”(鳖甲、紫河车),其对免疫系统的调节作用可概括为精、气、血三补,均参与自然杀伤细胞介导的细胞毒性和T/B细胞受体信号通路等通路;补血活血组含理血药(赤芍、当归、三七)兼有理气药之用,体现中医“气主煦之,血主濡之”的认识,其作用仍可概括为补血活血,侧重于免疫-循环系统的改善作用,主要涉及通路包括血管内皮生长因子(VEGF)

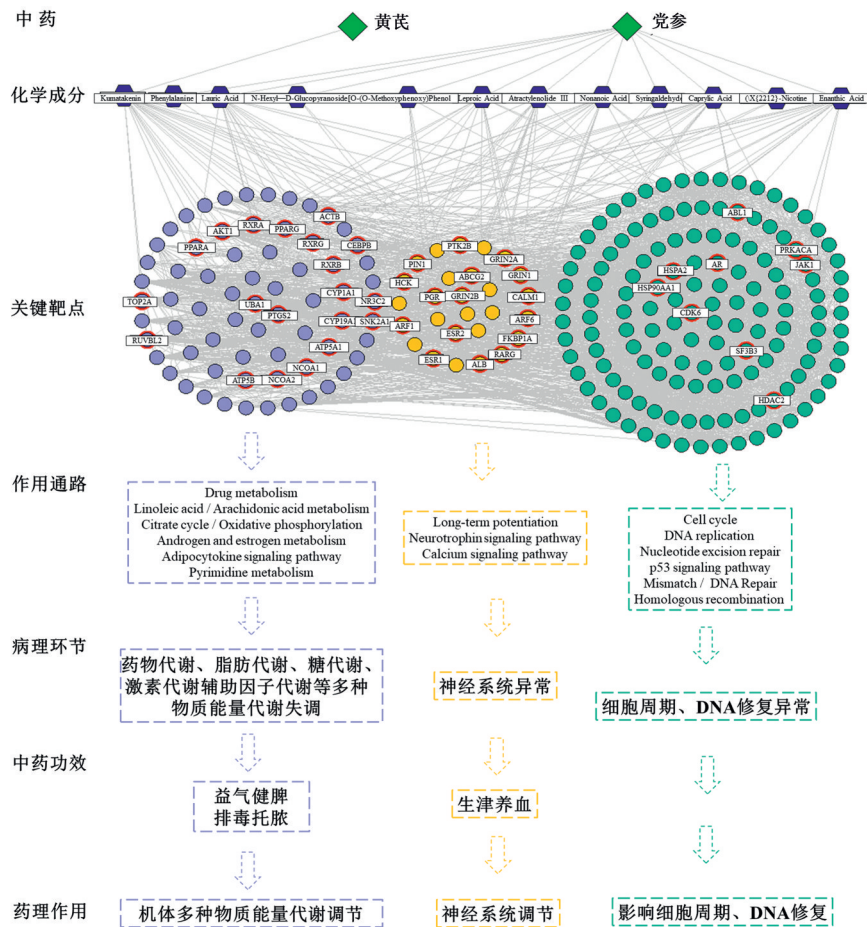


图4 益气健脾组-肝癌关联网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 4 Core genes and their functional interpretation of associated network of Yiqi Jianpi group in FBRP-liver cancer

信号通路,血管平滑肌收缩等;清热解毒组(板蓝根、连翘)主要通过T细胞受体信号通路来调节机体“免疫-炎症系统”的平衡。

在物质和能量代谢方面,结合中医组方理论来阐释,则益气健脾组、育阴养肝组和清热解毒组作用各有特点。其中,益气健脾组(党参、黄芪)体现中医“气为血之帅,血为气之母”的认识,表现为对药物、脂质、糖、激素、辅助因子和维生素等多种物质的代谢调节,两药均归脾经,功可补中益气、生津养血,以补后天之本,寓“肝病实脾”之意。现代研究发现^[17-19],肝癌从肾脾论治,意在干预肝癌微环境中的免疫细胞、肿瘤相关成纤维细胞、血管内皮细胞。育阴养肝组(紫河车、冬虫夏草)表现为对脂质、糖、蛋白质和激素的代谢调节,两药同归肾经,功可育阴养肝,以益先天之本,寓“乙癸同源”之意。有研究发现肝肾同源的物质基础是神经-内分泌-免疫网络,肝脏和肾脏纤维化过程的生物信号与物质基础相似^[20-21]。清热解毒组(板蓝根、连翘)表现为对核苷酸和激素代谢的影响,这是其清热作用的生

物学基础。结果与临床芯片检测到的差异基因KEGG富集结果主要集中于代谢通路,所反映的肝癌发展多累及消化和代谢正常状态的发病特点相匹配。

卓少元等^[22-23]研究了健脾益气法和活血化瘀法对二乙基亚硝胺大鼠肝癌基因表达谱的影响,生物信息学分析结果显示,对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的肝癌皮-间质转化过程和Gq蛋白激活的花生四烯酸-羟基二十碳四烯酸代谢通路的下调作用可能是健脾益气法治疗肝癌的重要机制;波形蛋白(VIM)和5-甲基四氢叶酸高半胱氨酸甲基转移酶(MTR)编码基因可能是活血化瘀法治疗肝癌的重要靶点。FBRP益气健脾组、消癥散结组和补血活血组中药的配伍可以分别对应以上2种治法,在一定程度上肯定了FBRP拆方后网络分析结果的可靠性。结合中医药确立治法治则的理论,则可认为相对于在以上环节协同发挥的扶正作用,在缓解癌症病理改变方面,5个功效组对细胞周期等功能的调节作用可以概括为祛邪作用,主要共同参与了细胞

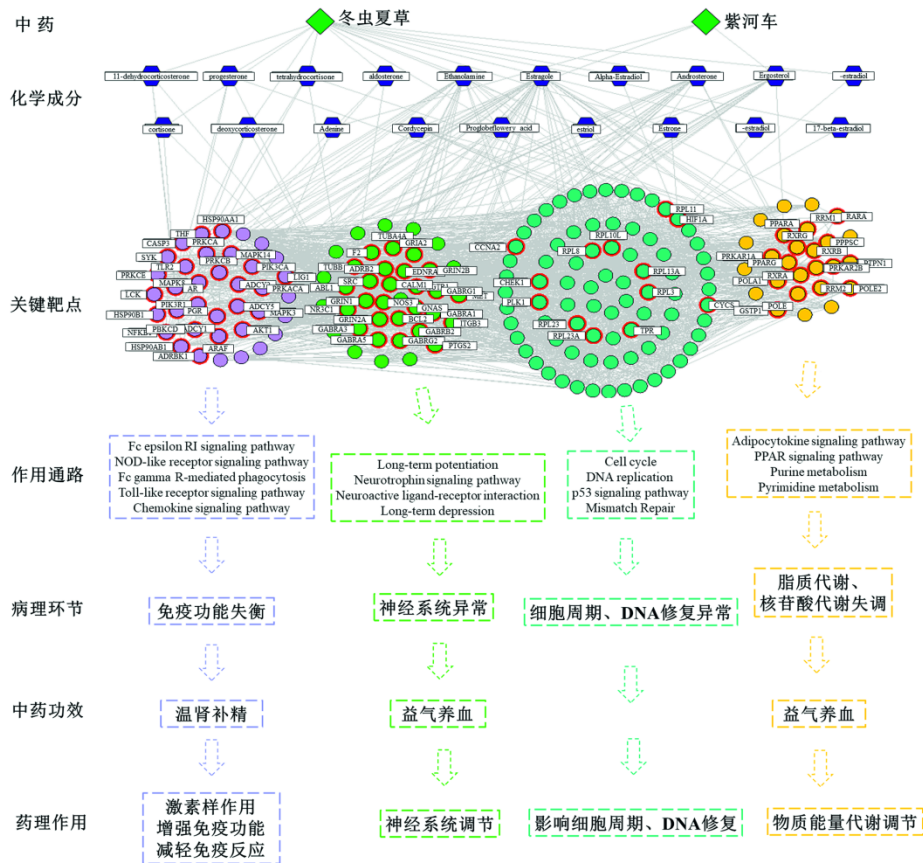


图5 育阴养肝组-肝癌关联网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 5 Core genes and their functional interpretation of associated network of Yuyin Yanggan group in FBRP-liver cancer

周期, DNA复制或修复, p53信号通路等通路, 活血补血组和清热解毒组共同参与了端粒维持通路, 消癥散结组还参与磷酸化的泛素连接酶介导的细胞周期素A降解通路, 益气健脾组还参与同源重组通路, 清热解毒组还参与细胞凋亡通路。以上富集通路集中表现为各功效组对细胞周期等功能的调节作用, 而就抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移等方面综合考虑, 活血补血组、育阴养肝组和清热解毒组涉及到的酪氨酸激酶受体(ErbB), VEGF, 趋化因子, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等通路也共同发挥了抗肝癌作用。

值得关注的是, 前期本课题组^[15]已从FBRP全方药物候选靶标与“炎-癌”恶性转化轴相关基因互作网络出发, 通过关键网络靶标识别和功能模块分析表明, 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/核转录因子- κ B(PI3K/Akt/NF- κ B)信号介导的相关途径可能是候选的FBRP逆转肝硬化-肝癌轴的核心靶点所在, 通过体内外实验初步验证了FBRP在肝“炎-癌”恶性转化中的逆转作用及其在PI3K/Akt/NF- κ B信号转导中的调节作用。相比这一结论, 本研究的通路富集结果较为分散, 侧重于更明确地揭示FBRP

组方中药在抗肝癌过程中的功效生物内涵和组方配伍特点, 前后研究都有力地说明了FBRP具有抗肝癌的潜能和临床重定位的可能性。

此外, FBRP所含的多种活性成分均具有抗肝癌活性。抑制脂质过氧化、增强免疫功能可能是鳖甲寡肽和鳖甲多糖发挥抗癌保肝作用的基础^[24]。莪术醇能够明显改善血瘀型肝纤维化病变, 其机制可能是抑制MAPK信号通路、下调内皮素-1(ET-1)蛋白表达及逆转肝窦毛细血管化^[25-26]。姜黄素可能通过降低缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)来消除HepG2细胞由低氧微环境导致的细胞增殖、迁移和侵袭能力以及上皮-间质转化方面的变化, 还可能通过调控Wnt信号通路、诱导内质网应激和线粒体功能障碍来抑制肝癌细胞增殖^[27-29]。芍药苷、芍药内酯苷对造血细胞因子有调控作用, 能够调节免疫系统紊乱并维持骨髓造血内环境的稳态; 具有抑制下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴)的过度激活来调控神经-内分泌系统的功能; 还可通过调控血虚肝郁证大鼠细胞内环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)信号通路来发挥神经保护作用^[30]。分别从赤芍和黄芪中分离的没食子酸和黄芪皂苷与黄芪多糖结合后

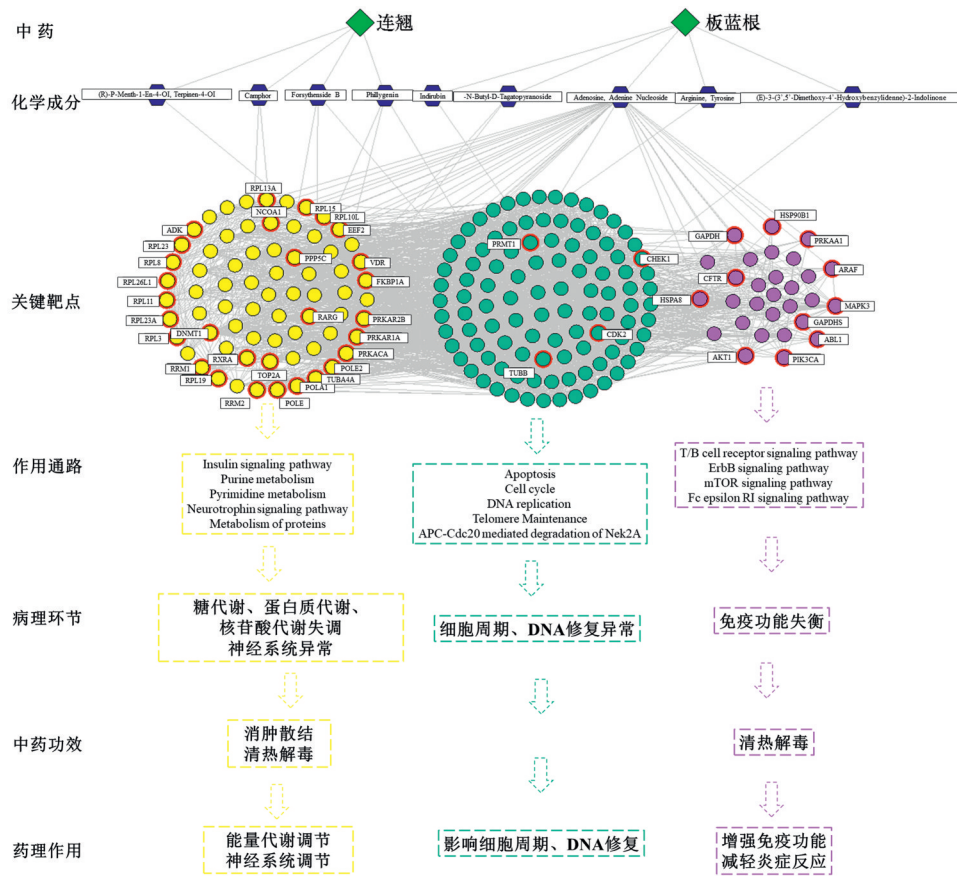


图6 清热解组-肝癌关联网络的核心基因及其功能诠释

Fig. 6 Core genes and their functional interpretation of associated network of Qingre Jiedu group in FBRP-liver cancer

表1 复方鳖甲软肝片全方与各功效组网络分析的结果比较

Table 1 Comparison of results of network analysis between whole prescription and each efficacy group of FBRP

来源/分组	相关基因集的获取 /个		肝癌-FBRP 互动网络中的核心节点数/个			主要富集通路
	FBRP 候选靶标数	肝癌差异基因数	药物	肝癌	共计 ³⁾	
全方 ¹⁾	797	547 ¹⁾	161	250 ¹⁾	411	Toll样受体信号通路、病毒致癌、氧化磷酸化、糖酵解/糖异生、柠檬酸循环、脂肪酸降解、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路等
全方 ²⁾	797	1 282 ²⁾	161	308 ²⁾	469	病毒致癌, 细胞周期, DNA复制, 癌症通路, 缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路, p53信号通路, 色氨酸代谢等
消癥散结组	226	1 282 ²⁾	48	218 ²⁾	265	细胞周期, DNA复制, DNA修复, 核苷酸切除修复, T/B细胞受体信号通路, 自然杀伤细胞介导的细胞毒性, 神经活性配体-受体相互作用等
补血活血组	282	1 282 ²⁾	44	227 ²⁾	269	细胞周期, 核苷酸切除修复, p53信号通路, 错配修复, 端粒维持, 血管内皮生长因子(VEGF)信号通路, 血管平滑肌收缩等
益气健脾组	297	1 282 ²⁾	45	237 ²⁾	280	细胞周期, p53信号通路, 错配修复, DNA修复, 药物代谢, 亚油酸代谢, 雄激素和雌激素代谢等
育阴养肝组	550	1 282 ²⁾	99	187 ²⁾	276	细胞周期, DNA复制, 核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路, 长期抑制, p53信号通路, 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路, 嘌呤代谢等
清热解组	219	1 282 ²⁾	44	224 ²⁾	261	细胞周期, DNA复制, 胰岛素信号通路, 蛋白质代谢, T/B细胞受体信号通路, 酪氨酸激酶受体(ErbB)信号通路, 细胞凋亡等

注: ¹⁾疾病差异基因来源为 LOMA 和 DrugBank 数据库^[15]; ²⁾疾病差异基因来源为临床芯片检测; ³⁾此数据为去重后的数值。

可以通过诱导白三烯 B₂-12 羟基脱氢酶(LTB4DH)表达来抑制 HepG2 细胞的体外致癌转化^[31]; 当归多

糖可能通过对荷 H22 小鼠铁代谢的调控发挥抗肿瘤作用^[32]; 三七总皂苷具有体内外抑制 H22 细胞增

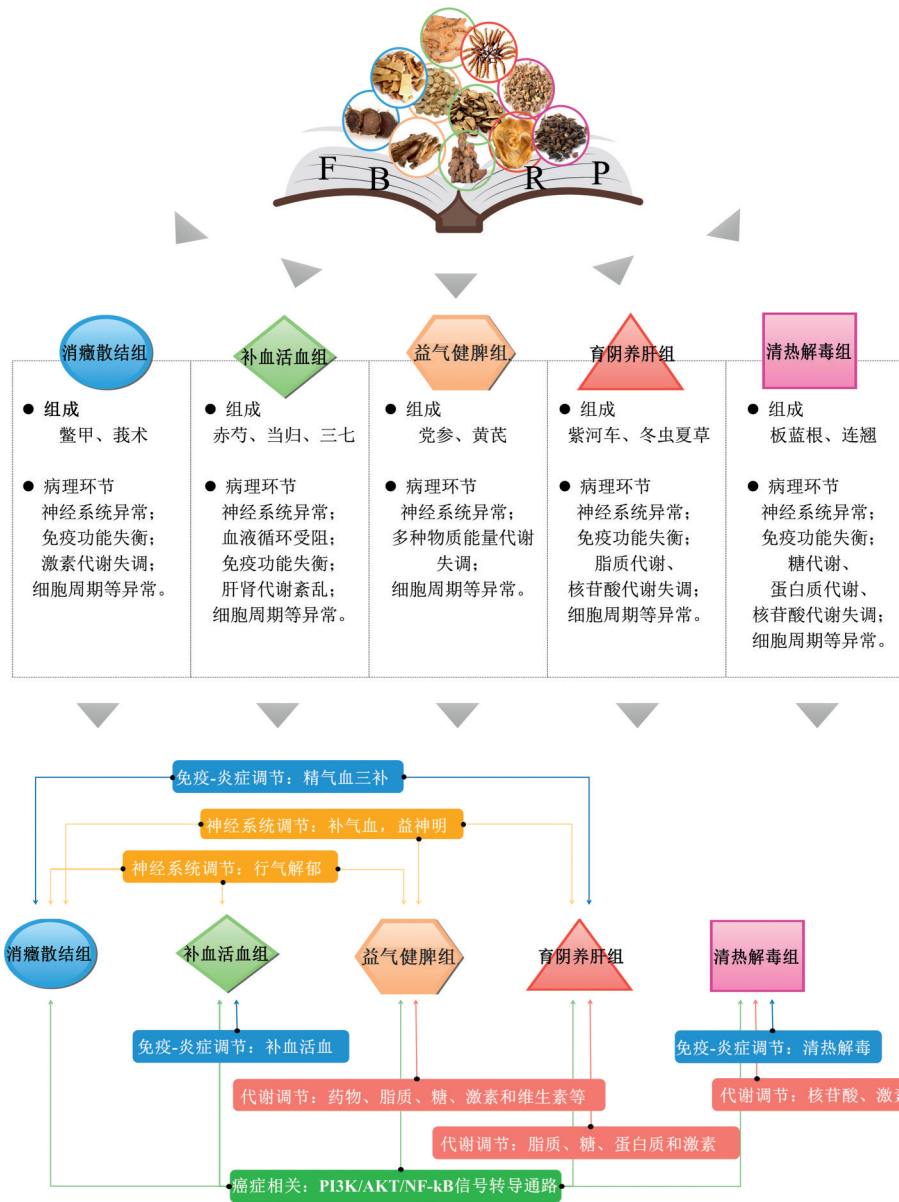


图7 复方鳖甲软肝片的组方思路分析

Fig. 7 Illustration on principle of composition of FBRP

殖、促进H22细胞凋亡的作用,其作用机制可能与负调控PI3K/Akt-mTOR信号通路有关^[33-34];党参多糖能有效抑制人肝癌HepG2细胞的生长和运动能力,其机制与调节PI3K/Akt信号通路有关^[35];黄芪多糖、黄芪蛋白和黄芪甲苷能够抑制肝癌细胞侵袭和转移,其机制可能与调控Janus激酶/信号转导和转录激活子(JAK/STAT),Wnt/ β -连环蛋白(Wnt/ β -catenin),p53信号通路以及调节氧化应激和NF- κ B信号通路有关^[36-41]。卵巢雌激素可能参与肝损伤修复调控过程,以解释性别间肝脏损伤的差异^[42]。冬虫夏草提取物可延缓二乙基亚硝胺(DEN)导致的慢性肝损伤,对肝脏起到保护作用,

此作用可能与其抑制TGF- β_1 /Smad通路激活有关^[43];板蓝根双糖具有靶向VEGF/血管内皮生长因子受体(VEGFR)信号通路抑制肝癌细胞增殖和血管生成的作用^[44];牛蒡子苷元能明显抑制HepG2肝癌细胞的增殖,并下调自噬^[45];其中,明确报道与PI3K/Akt/NF- κ B信号转导通路调控相关的抗肝纤维化、抗肝癌活性成分(群)有三七总皂苷、党参多糖和黄芪甲苷。这些研究报道均为本课题组的探索性研究提供了实验依据。

本研究结合临床样本的转录组学结果,通过构建和分析“肝癌发生相关差异基因-FBRP功效物质候选靶标”互作网络,揭示了FBRP组方消癥散结、

补血活血、益气健脾、育阴养肝和清热解毒5个主要功效组的生物学内涵及其与中医组方配伍之间的联系。结果表明各功效组的核心靶标群均参与了对癌症发生、发展密切相关的“炎症-免疫系统”失衡、神经系统异常、物质和能量代谢失调等相关通路的干预,同时,也作用于与各自功效密切相关的通路群。一方面增强免疫系统功能、干预细胞周期,以消除对机体不利的因素,另一方面对神经系统功能、物质和能量代谢等发挥正向调节为主的改善作用,以推动机体恢复动态平衡,这与FBRP中医组方“标本兼顾、消补兼施”的理论相契合;还提示了FBRP可能具有对癌细胞的直接作用和改善肿瘤微环境等间接作用,凸显了FBRP干预“炎-癌”恶性转化轴的综合作用,为FBRP临床重定位治疗肝癌的研究奠定了理论和数据基础。

[参考文献]

[1] 吴玉叶. 复方鳖甲软肝片对乙肝肝硬化患者HBV-DNA复制及肝纤维化的影响[J]. 北方药学, 2018, 15(3):22-23.

[2] ZHANG L J, SCHUPPAN D. Traditional Chinese medicine (TCM) for fibrotic liver disease: hope and hype[J]. J Hepatol, 2014, 61(1):166-168.

[3] DONG Q, QIU L L, ZHANG C E, et al. Identification of compounds in an anti-fibrosis Chinese medicine (Fufang Biejia Ruangan Pill) and its absorbed components in rat biofluids and liver by UPLC-MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1026:145-151.

[4] 陈龙虎. 基于不同层次的复方鳖甲软肝片药效物质辨识及相关问题探讨[D]. 成都:成都中医药大学, 2013.

[5] 白金霞,戴领,陈红鸽,等. 血清药理学与药代动力学整合模型的复方鳖甲软肝片日服用次数合理性研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2394-2398.

[6] 袁强,何岚,陈芝芸,等. 复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠肝脏血管紧张素II及其受体mRNA表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(2):158-161.

[7] 赵景民,周光德,李文淑,等. 复方鳖甲软肝片抗肝纤维化机制的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(7):560-562.

[8] 孙振亮,吴哲,贵襄平,等. 复方鳖甲软肝片对肝纤维化大鼠的保护作用及其机制[J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(1):30-32, 58.

[9] 赵志敏,叶永安,杨先照,等. 中药复方抗纤维抑癌方和复方鳖甲软肝片不同采血时间点药物血清对HepG2肝癌细胞增殖活性的影响[J]. 中国中医基础医学杂

志, 2010, 16(3):244-246.

[10] 周宇辰. 抗病毒和抗肝纤维化联合治疗慢性乙型肝炎肝纤维化减少肝细胞癌发生的队列研究[D]. 广州:南方医科大学, 2019.

[11] DE MINICIS S, MARZIONI M, SACCOMANNO S, et al. Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis leading to liver cancer [J]. Transl Gastrointest Cancer, 2012, 1(1):88-94.

[12] ALISON M R, NICHOLSON L J, LIN W R. Chronic inflammation and hepatocellular carcinoma[J]. Recent Results Cancer Res, 2011, 185:135-148.

[13] DING Y F, WU Z H, WEI Y J, et al. Hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis in the rat hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2017, 143(5):821-834.

[14] ELSHARKAWY A M, MANN D A. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. Hepatology, 2007, 46(2):590-597.

[15] ZHANG Y Q, MAO X, CHEN W J, et al. A discovery of clinically approved formula FBRP for repositioning to treat HCC by inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B activation [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19:890-904.

[16] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D976-D982.

[17] 张洁,马仰仰,马一鸣,等. “肝病治脾肾”思路干预肝癌微环境的研究进展[J]. 四川中医, 2020, 38(1):213-218.

[18] 何玲玲,赵亚林,杜林林,等. 扶正方药调节原发性肝癌肿瘤微环境作用机制研究概述[J]. 中医杂志, 2015, 56(20):1790-1792.

[19] 张怡,周荣耀,王文海,等. 补肾健脾方调控原发性肝癌患者细胞免疫功能及血管生成相关因子临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2013, 47(6):27-29, 47.

[20] 李瀚旻,赵宾宾,高翔,等. “补肾生髓成肝”改善肝再生微环境,防治肝癌的作用及机制[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(1):5-8.

[21] LI P, ZHANG H J, ZHENG L T. The theory of homogeneity of liver and kidney in the treatment of kidney and liver fibrosis[J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(4):250-252.

[22] 卓少元,方肇勤,管冬元,等. 健脾益气法对DEN大鼠肝癌后基因组转录调控的生物信息学分析[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7):1765-1768.

[23] 卓少元,方肇勤,管冬元,等. 活血化瘀法调节DEN肝癌大鼠相关基因的生物信息学分析[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(12):2599-2602.

- [24] 徐士勋. 基于鳖甲功效的先导化合物的研究(Ⅲ)-络合法分离鳖甲寡肽探讨及鳖甲七肽抗酒精性肝损伤活性研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [25] 刘皓葳, 王娟, 秦建莉, 等. 莪术醇联合5-氟尿嘧啶对大肠癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 130-133.
- [26] 黎桂玉. 莪术醇干预大鼠血瘀型肝纤维化及LSEC超微结构的实验研究[D]. 南宁:广西中医药大学, 2017.
- [27] DUAN W X, CHANG Y H, LI R, et al. Curcumin inhibits hypoxia inducible factor-1 α -induced epithelial-mesenchymal transition in HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(5): 2505-2510.
- [28] CHENG C Y, LIN Y H, SU C C. Curcumin inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma J5 cells by inducing endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction[J]. Int J Mol Med, 2010, 26(5): 673-678.
- [29] XU M X, ZHAO L L, DENG C Y, et al. Curcumin suppresses proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via the wnt signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2013, 43(6): 1951-1959.
- [30] 王成龙. 基于白芍养血柔肝功效的芍药苷, 芍药内酯苷药理作用研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [31] WEI L, LIU J, LE X C, et al. Pharmacological induction of leukotriene B₄-12-hydroxydehydrogenase suppresses the oncogenic transformation of human hepatoma HepG2 cells[J]. Int J Oncol, 2011, 39(3): 735-745.
- [32] CHENG Y, ZHOU J L, LI Q, et al. The effects of polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* on tumor growth and iron metabolism in H22-bearing mice[J]. Food Funct, 2016, 7(2): 1033-1039.
- [33] LI Y, LI Z, JIA Y H, et al. *In vitro* anti-hepatoma activities of notoginsenoside R₁ through downregulation of tumor promoter miR-21[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(5): 1364-1375.
- [34] 冯晓昇, 何朋伦, 姚政, 等. 三七总皂苷对H22细胞的抑制作用及对H22荷瘤小鼠PI3K-AKT-mTOR信号通路的影响[J]. 中药材, 2020(6): 1455-1459.
- [35] 刘云鹤, 蔡金保, 王红丽. 党参多糖抑制PI3K/AKT通路对人肝癌HepG2细胞生长和运动能力的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(9): 1108-1113.
- [36] QI H Y, WEI L, HAN Y F, et al. Proteomic characterization of the cellular response to chemopreventive triterpenoid astragaloside IV in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. Int J Oncol, 2010, 36(3): 725-735.
- [37] 徐放, 安铁洙, 朴善花, 等. 黄芪多糖通过Janus激酶/信号转导与转录激活子信号通路对肝癌细胞SMMC-7721侵袭和转移的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(11): 1499-1502.
- [38] 邱艳丽, 丁妍, 陈德森. 黄芪多糖对人子宫内癌裸鼠皮下移植瘤Wnt基因转导通路的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(11): 1145-1148.
- [39] 安小翠, 朱瑞雪, 蔺淑梅, 等. 黄芪甲苷抑制ROS NF- κ B信号通路促进肝癌细胞增殖, 凋亡的作用机制[J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(12): 1399-1403.
- [40] 王敏, 郑喜, 祁燕, 等. 黄芪皂苷II抗肝癌肺转移效应及作用机理的研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(6): 41-45.
- [41] 王禹璇, 刘海英, 姚红, 等. 中药黄芪蛋白抗肝癌细胞HepG2作用机制[J]. 药学学报, 2020, 55(2): 241-246.
- [42] 乔冰珂, 马兴宇, 韩凌云, 等. 雌激素通过调控肝细胞更新促进CCl₄诱导的肝损伤修复[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2020, 42(8): 49-58.
- [43] 宋立莹. 冬虫夏草提取物对大鼠慢性肝损伤的保护作用[D]. 长沙:中南大学, 2014.
- [44] 覃雪峰. 板兰根双糖Fructopyrano-(1 \rightarrow 4)-glucopyranose靶向VEGF/VEGFR通路对肝癌细胞增殖和血管生成的影响[D]. 泸州:四川医科大学, 2015.
- [45] OKUBO S, OHTA T, SHOYAMA Y, et al. Arctigenin suppresses cell proliferation via autophagy inhibition in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Nat Med, 2020, 74(3): 525-532.

[责任编辑 刘德文]