

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学探讨清肝化瘀颗粒对非酒精性脂肪性肝病和肝癌“异病同治”的作用机制

曹建¹, 朱晓燃², 杨振寰², 索菲娅², 姚树坤^{1,2,3*}

(1. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 北京 100191;

2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 中日友好医院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 基于网络药理学研究方法, 探讨清肝化瘀颗粒治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和肝癌的有效成分、作用靶点及可能作用机制, 并为其对NAFLD和肝癌“异病同治”的合理性阐释提供依据。方法: 通过多个中药与疾病数据库, 运用网络药理学筛选清肝化瘀颗粒治疗NAFLD和肝癌的主要有效成分与作用靶点。通过STRING 11.0分析作用靶点之间的相互作用, 使用cytoHubba插件从作用靶点中筛选出核心作用靶点。使用Metascape数据库对作用靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。同时, 利用体外试验验证清肝化瘀颗粒主要有效成分之一山柰酚对肝癌细胞模型与NAFLD细胞模型的作用。结果: 共筛选出清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌的作用靶点43个, 对应8味中药中的136种有效成分。富集分析结果显示作用靶点共涉及20种生物过程, 13种分子功能, 9种细胞组分及15条信号通路。利用构建的“中药-成分-靶点-疾病”网络图发现清肝化瘀颗粒主要通过以山柰酚、槲皮素及木犀草素为代表的主要有效成分对胱天蛋白酶-3(CASP3), 肿瘤蛋白p53(TP53), 血管内皮生长因子A(VEGFA)等枢纽基因参与细胞凋亡抑制等与肝癌有关的肿瘤生物学行为进行调节, 同时对氧化应激等与NAFLD相关的生物学行为进行调节。体外试验发现山柰酚可以剂量依赖性地抑制肝癌细胞的增殖, 并对NAFLD细胞模型氧化应激标志物丙二醛(MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的浓度进行调节; 同时, 山柰酚还可对肝癌与NAFLD细胞模型中枢纽基因CASP3蛋白水平的表达量进行调节。结论: 清肝化瘀颗粒对NAFLD和肝癌“异病同治”的主要机制涉及以槲皮素、木犀草素及山柰酚为代表的多成分, 以VEGFA, TP53及CASP3为代表的多靶点, 以及以氧化应激及细胞凋亡为代表的多通路。

[关键词] 网络药理学; 清肝化瘀颗粒; 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD); 肝癌; 异病同治; 山柰酚; 胱天蛋白酶-3(CASP3)

[中图分类号] R22;R24;R96;R28;R256.4 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)07-0151-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202350

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200914.1246.001.html>

[网络出版日期] 2020-9-14 14:19

An Exploration on Mechanisms of Treating Different Diseases with Same Method of Qinggan Huayu Granules in Treating NAFLD and Liver Cancer Based on Network Pharmacology

CAO Jian¹, ZHU Xiao-ran², YANG Zhen-huan², SUO Fei-ya², YAO Shu-kun^{1,2,3*}

(1. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To reveal the effective components, targets and possible mechanisms of Qinggan Huayu granules in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and liver cancer based on

[收稿日期] 20200617(011)

[基金项目] 北京市科委G20工程创新研究“十病十药”研发项目(Z171100001717008)

[第一作者] 曹建, 在读博士, 从事中药单体抗肿瘤机制研究, Tel:010-84206160, E-mail:caojian120@163.com

[通信作者] * 姚树坤, 博士, 主任医师, 从事中西医结合抗肝癌的基础与临床研究, Tel:010-84206160, E-mail:shukun_yao@163.com

network pharmacology and experimental verification, and to provide a basis for its rational interpretation of treating different diseases with same method for NAFLD and liver cancer. **Method:** Based on databases of traditional Chinese medicine and disease, the network pharmacology was used to screen main active compounds and potential targets of Qinggan Huayu granules for NAFLD and liver cancer. STRING 11.0 was used to analyze the interaction between potential targets. The core targets were selected from the interaction targets by cytoHubba plug-in. The gene ontology (GO) function and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on the target by Metascape database. At the same time, *in vitro* experiments were conducted to validate the effect of kaempferol, one of the main active ingredients of Qinggan Huayu granules, on hepatocellular carcinoma cell model and NAFLD cell model. **Result:** A total of 43 potential targets of Qinggan Huayu granules for for NAFLD and liver cancer were screened, corresponding to 136 active ingredients in 8 herbal medicines. Through enrichment analysis of potential targets, there were 20 biological processes, 13 molecular functions, 9 cellular components and 15 signaling pathways. Qinggan Huayu granules regulated biological behaviors of tumors related to liver cancer and NAFLD (such as apoptosis inhibition and oxidative stress) mainly through kaempferol, quercetin, luteolin and other active ingredients for Caspase-3 (CASP3), tumor protein p53 (TP53), vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and other hub genes. *In vitro* experiments revealed that kaempferol could inhibit cell proliferation in a dose-dependent manner in hepatocellular carcinoma cell model. And kaempferol could modulate the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GPx), which were the molecular markers of oxidative stress of NAFLD cell model. Kaempfero also regulated the expression level of CASP3 in hepatocellular carcinoma cell model and NAFLD cell model. **Conclusion:** The main mechanism of Qinggan Huayu granules in treating liver cancer and NAFLD with concept of treating different diseases with same method is related to systematic synergy effect of multiple compounds (represented by quercetin, luteolin and kaempferol), multiple targets (represented by VEGFA, TP53 and CASP3) and multiple signaling pathways (represented by oxidative stress and cell apoptosis).

[Key words] network pharmacology; Qinggan Huayu granules; non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); liver cancer; treating different diseases with same method; kaempferol; Caspase-3 (CASP3)

肝癌起病隐匿、致死率高,是目前世界范围内第六大常见的恶性肿瘤,致死率位居全球第四。虽然近年来我国肝癌的发病率及死亡率有所下降,然而肝癌年龄标准化的5年生存率仍处于12.1%的低位^[1]。由于多数患者在确诊时已处于中、晚期阶段,已不符合外科手术切除、肝移植手术及经动脉化疗栓塞(TACE)等治疗策略的标准,只能接受药物治疗。目前肝癌的药物治疗策略依然有限,包括索拉非尼在内的一线治疗方案的临床收益依然不尽如人意,且具有不良反应率较高、患者耐受性较差的缺陷^[2]。非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)作为除了肝炎病毒、乙醇及黄曲霉素之外的肝癌风险因素已被医学界所证实^[3]。最新研究表明,我国NAFLD发病率高达29.2%^[4]。目前针对NAFLD的特效药物匮乏,且存在作用靶点单一、患者依从性差等局限性。

清肝化瘀颗粒是本课题组在慢性肝病领域临床三十余年的经验方,由苦参、黄芩、莪术、白术、白

花蛇舌草、半枝莲、三棱及甘草8味中药组成,具有清热解毒、化瘀散结、健脾益气之功效,临床疗效显著^[5],对NAFLD患者也具有抗肝纤维化、抑制肝脏炎症微环境形成、改善肝脏功能的作用^[6]。临床前研究也揭示了其在抑制肝癌细胞增殖、改善大鼠肝纤维化及阻遏肝癌癌前病变进程中发挥着重要作用^[7-9]。然而清肝化瘀颗粒组方有效成分众多,发挥作用的具体分子机制尚待阐明,因此,本研究运用网络药理学方法,从宏观角度探讨清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌的可能作用机制,并通过体外实验进一步验证该制剂主要有效成分之一山柰酚的作用功能及其对核心靶点胱天蛋白酶-3(CASP3)的调节作用,为深入阐明该制剂异病同治的作用机制及临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 清肝化瘀颗粒治疗肝癌与NAFLD靶点的收集与筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmsp.php>, version

2.3)^[10], 中医药百科全书数据库 (ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>)^[11], 中医药综合数据库 (TCMID, <http://119.3.41.228:8000/tcmid/,version.2.0>)^[12], 中药分子机制的生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)^[13] 及中医药证候关联数据库 (SymMap, <https://www.symmap.org/>)^[14] 共同进行数据挖掘, 广泛收集清肝化瘀颗粒组方8味中药的有效成分与作用靶点。通过对既往中药有效成分的药物代谢动力学研究结果分析^[15], 将人体口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 , 肠上皮 Caco-2 细胞渗透性 $> 0 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, 半衰期 (HL) $\geq 4 \text{ h}$, 氢键供体数目 (Hdon) < 5 个及氢键受体数目 (Hacc) < 10 个设置为 TCMSP 中中药有效成分的筛选参数; 将 $P < 0.05$, 评分临界值 (score cutoff) > 39 设置为 BATMAN-TCM 中中药有效成分的筛选参数; 将相似性分值 ≥ 0.8 设置为 ETCM 数据库中候选靶标的筛选参数。同时, 利用肝癌数据库 OncoDB.HCC (<http://oncodb.hcc.ibms.sinica.edu.tw/index.htm>, 数据截止时间 2007 年 1 月 3 日)^[16], Liverome (<http://liverome.kobic.re.kr/index.php>, 数据截止时间 2011 年 4 月 14 日)^[17] 及疾病相关的基因与突变位点数据库 (DisGeNET, <https://www.disgenet.org/>, version 7.0, 数据截止时间 2020 年 5 月) 中的肝癌基因组数据对原发性肝癌相关靶点进行搜集与筛选。基于实验设计, 本研究将 OncoDB.HCC 数据库中的所有靶点, Liverome 数据库中差异表达谱证据大于 5 条的靶点, DisGeNET 数据库中基因-疾病关联评分 (score_gda) > 0.05 的靶点的并集作为肝癌疾病靶点。利用人类基因数据库 (GeneCards, <https://www.genecards.org/>, version 4.14, 数据截止时间为 2020 年 3 月 11 日)^[18] 检索 NAFLD 相关的疾病靶点。

将以上三者预测的靶点结果取交集, 进一步确认清肝化瘀颗粒治疗 NAFLD 及肝癌的靶点。基于此靶点集合, 运用 STRING (<https://string-db.org/>, version 11.0, 下同) 及 Cytoscape (version 3.7.2, 下同) 软件进行蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建, 利用 MCODE 插件构建 PPI 网络中的分子相互作用模块, 根据实验设计, 筛选条件为度值临界值 (degree cutoff) = 2, $K\text{-core} = 2$ 。同时利用 cytoHubba 插件对 PPI 网络中核心靶点进行研究, 根据实验设计, 本研究选择最大团中心性 (maximal clique centrality, MCC) 算法获取核心靶点信息并按照重要度大小对其进行排序。

将筛选得到的靶点导入 Metascape 数据库, 设定参数为最小重叠度 (min overlap) = 3, P 临界值 (P cutoff) = 0.01, 最小富集度 (min enrichment) = 1.5, 对靶点进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 及基因本体 (GO) 富集分析, 并使用 R 语言 (version 3.0.6) 中的 ggplot2 (version 3.3.0) 程序包对富集分析的结果进行可视化, 利用 KEGG 数据库对靶向信号通路示意图进行绘制。

1.2 “中药-成分-靶点-疾病”网络构建与分析 将所获得的清肝化瘀颗粒组方中药的有效成分以及获取的靶点与信号通路分别导入 Cytoscape 软件, 构建网络图并利用 NetworkAnalyzer 功能对网络图的特征进行分析, 以获取主要有效成分及核心靶点信息。

1.3 分子生物学试验验证

1.3.1 材料 HepG2 细胞系购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。山柰酚 (纯度 $\geq 97.0\%$), 油酸及棕榈酸盐 (Sigma-Aldrich 公司, 货号分别为 60010, O1383, P9767); 二甲基亚砜 (DMSO, 北京索莱宝科技有限公司, 货号 D8371), 胎牛血清和 RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司, 货号分别为 10270-106, 11875093)。

1.3.2 细胞模型构建与细胞培养 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 于 37°C , 5% CO_2 细胞培养箱中对 HepG2 细胞进行常规传代培养。NAFLD 细胞模型构建方法参考刘波^[19]改进的方法, 即当 HepG2 细胞密度达到 60% 时开始诱导分化。倾去原培养液, 改用终浓度含 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 油酸, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 棕榈酸的诱导液继续培养细胞, 每 2 d 换培养液 1 次, 培养 1 周。

1.3.3 细胞生存率检测 使用 CCK-8 (cell counting kit-8) 检测试剂盒 (日本 Dojindo, 批号 CK04) 进行细胞生存率检测。收集对数期细胞后按 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板, 每个试验组设置 3 个重复孔, 待细胞贴壁后, 试验组细胞使用等量的不同浓度山柰酚 ($1, 5, 10, 20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药并继续培养 12 h, 同时设置等量的不含山柰酚的培养基处理的细胞作为对照组。中止培养后, 每个培养孔小心加入 CCK-8 溶液 $10 \mu\text{L}$, 避免引入气泡, 同时设置不加细胞、仅添加不同浓度药物及 CCK-8 溶液的培养孔作为空白组。在培养箱中孵育 4 h, 将培养板置于酶标仪上, 在 450 nm 处测量各孔的吸光度 A , 计算细胞生存率, 计算公式为细胞生存率 = $(A_{\text{试验组}} -$

$A_{\text{空白组}})/(A_{\text{对照组}}-A_{\text{空白组}})\times 100\%$,同时,确定山柰酚对 HepG2 细胞的最小抑制浓度。

1.3.4 细胞氧化应激标志物检测 使用总丙二醛(MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0131S)及总谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0058)进行细胞氧化应激标志物检测。按 1.3.2 项下方法构建 NAFLD 细胞模型后,收集对数期细胞,按 3×10^3 个/孔的密度接种 NAFLD 细胞于 96 孔细胞培养板,每个试验组设置 3 个重复孔,待细胞贴壁后,试验组 NAFLD 细胞使用等量的不同浓度(1, 5, 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)山柰酚给药并继续培养 12 h,同时,设置等量的不含山柰酚的培养基处理的 NAFLD 细胞作为对照组。按试剂盒说明书进行细胞裂解及检测体系构建,分别在酶标仪 535, 340 nm 处测定 A, 计算 MDA 及 GPx 的活性变化程度。同时,确定山柰酚对 NAFLD 细胞模型的最小起效浓度。

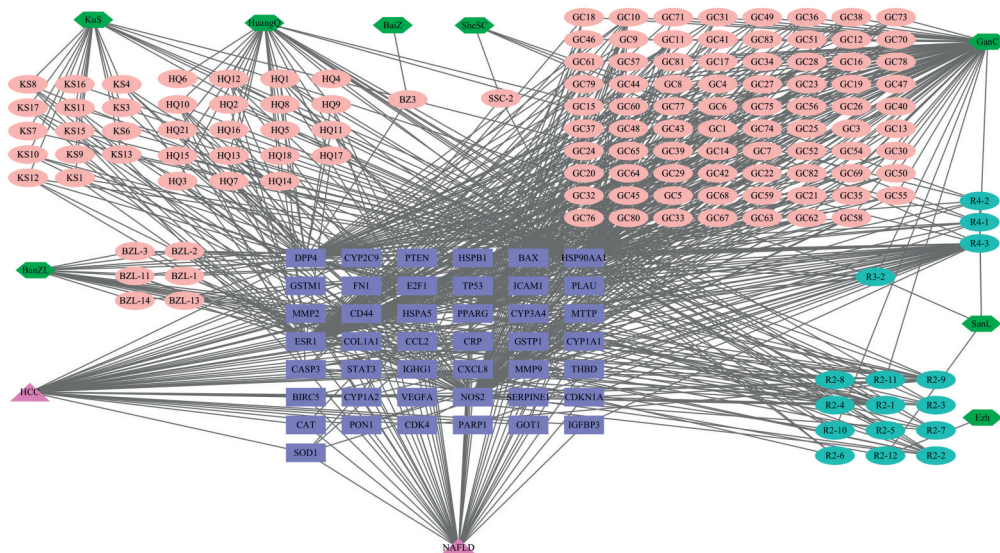
1.3.5 半胱氨酸蛋白酶-3(CASP3)活性检测 使用 CASP3 活性检测试剂盒(Solarbio 公司,批号 BC3830)对 CASP3 活性进行检测。肝癌细胞的收集与接种按 1.3.3 项下方法进行,试验组给药浓度采用 1.3.3 项下确定的山柰酚对 HepG2 细胞的最小抑制浓度,同时设置等量的不含山柰酚的培养基处理的 HepG2 细胞作为对照组。NAFLD 细胞的收集与接种按 1.3.4 项下方法进行,试验组给药浓度采用 1.3.4 项下确定的山柰酚对 NAFLD 细胞的最小起效浓度,同时设置等量的不含山柰酚的培养基处理的

NAFLD 细胞作为对照组。收集细胞后按照每 2×10^6 个细胞加入裂解液 100 μL 的比例加入裂解液,冰浴裂解 15 min。于 $4\text{ }^\circ\text{C}$, $600\times g$ 离心 5 min(离心半径 13.5 cm)后将上清转移至新的预冷离心管中。按照试剂盒说明书配制检测体系并轻轻混匀。将离心管置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应 2 h 直至管内出现颜色变化。将反应体系置于分光光度计上,于 405 nm 处测定 A, 计算 CASP3 的活性变化程度。

1.3.6 数据处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 共有靶点获取及“中药-成分-靶点-疾病”网络图绘制 共筛选出有效成分 161 种,包含 17 种存在于不同中药中的重复成分,其中存在于 2 种中药中的重复成分有 12 种,存在于 3 种中药中的重复成分 2 种,存在于 4 种中药中的重复成分 3 种。同时筛选出 161 种有效成分作用的靶点数目 276 个。利用数据库 Liverome, OncoDB, HCC, DisGeNET 和 GeneCards 分别筛选收集了 994 个肝癌疾病靶点, 937 个 NAFLD 疾病靶点。将以上 2 种疾病靶点与清肝化瘀颗粒对应的 276 个靶点进行映射,得 43 个交集靶点,即为清肝化瘀颗粒治疗 NAFLD 和肝癌的共有靶点。将共有靶点所对应的 8 味中药, 136 种有效成分与对应的 2 种疾病的对应关系导入 Cytoscape 软件,并构建“中药-成分-靶点-疾病”网络图,见图 1。



KuS. 苦参; BanZL. 半枝莲; HuangQ. 黄芩; BaiZ. 白术; SheSC. 白花蛇舌草; GanC. 甘草; SanL. 三棱; Ezh. 莪术; HCC. 肝癌

图 1 清肝化瘀颗粒治疗 NAFLD 及肝癌的“中药-成分-靶点-疾病”网络

Fig. 1 Herbs-compounds-targets-diseases network of Qinggan Huayu granules for NAFLD and liver cancer

“中药-成分-靶点-疾病”网络图包括清肝化痰颗粒组方中药节点8个(图中以绿色六边形节点显示),组方中药有效成分节点136个(图中对应单一中药的有效成分以浅粉色椭圆形节点显示,对应多味中药的有效成分以青色椭圆形节点显示),靶点节点43个(图中以紫色长方形节点显示),疾病节点2个(图中以粉色三角形节点显示)以及768种“中药-成分-靶点-疾病”之间的联系(图中以黑色线条显示)。在中药层次,按参与治疗NAFLD及肝癌的有效成分数目多寡排序为甘草(83种有效成分),黄芩(28种有效成分),苦参(20种有效成分),半枝莲(18种有效成分),白花蛇舌草(4种有效成分),三棱(4种有效成分),白术(1种有效成分),莪术(1种有效成分);按对应治疗NAFLD及肝癌的靶点数目多寡排序为甘草(对应40个靶点),苦参(对应37个靶点),半枝莲(对应37个靶点),白花蛇舌草(对应34个靶点),黄芩(对应17个靶点),三棱(对应10个靶点),白术(对应1个靶点)及莪术(对应1个靶点)。在有效成分层次,按对应参与治疗NAFLD及肝癌的靶点较多的有效成分有槲皮素(对应32个靶点),木犀草素(对应13个靶点)及山柰酚(对应12个靶点)等。在靶点层次,按对应参与治疗NAFLD及肝癌的有效成分较多的靶点有90 kDa热休克蛋白 α 1(HSP90AA1,对应105种有效成分),雌激素受体1(ESR1,对应95种有效成分),一氧化氮合酶2(NOS2,对应92种有效成分),过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPARG,对应70种有效成分),二肽基肽酶4(DPP4,对应69种有效成分),免疫球蛋白重链恒定区 γ 1(IGHG1,对应15种有效成分)及CASP3(对应10种有效成分)等。

2.2 清肝化痰颗粒治疗NAFLD及肝癌核心靶点的筛选与分析 利用STRING数据库,MCODE及cytoHubba插件对清肝化痰颗粒治疗NAFLD及肝癌靶点PPI网络中的核心靶点进行筛选,见图2。结果发现在PPI网络中,评分较高的核心靶点有血管内皮生长因子A(VEGFA),肿瘤蛋白p53(TP53)及CASP3等,这些靶点均为PPI网络中度值较高且受到多味中药及有效成分调节的靶点。

2.3 作用靶点GO功能与KEGG代谢通路富集分析 利用Metascape数据库对清肝化痰颗粒治疗NAFLD及肝癌的靶点进行GO功能和KEGG信号通路富集分析,见图3。GO生物过程富集分析得条目20条,主要包括结果细胞因子介导的信号通路(19个靶点参与),氧含量响应的信号通路(16个靶

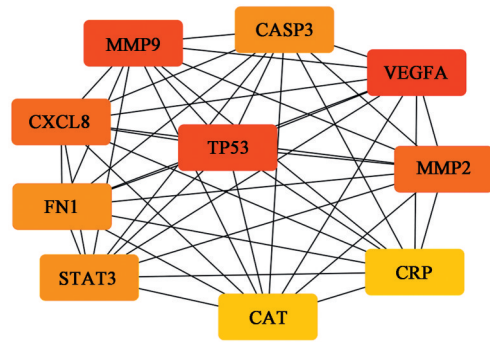
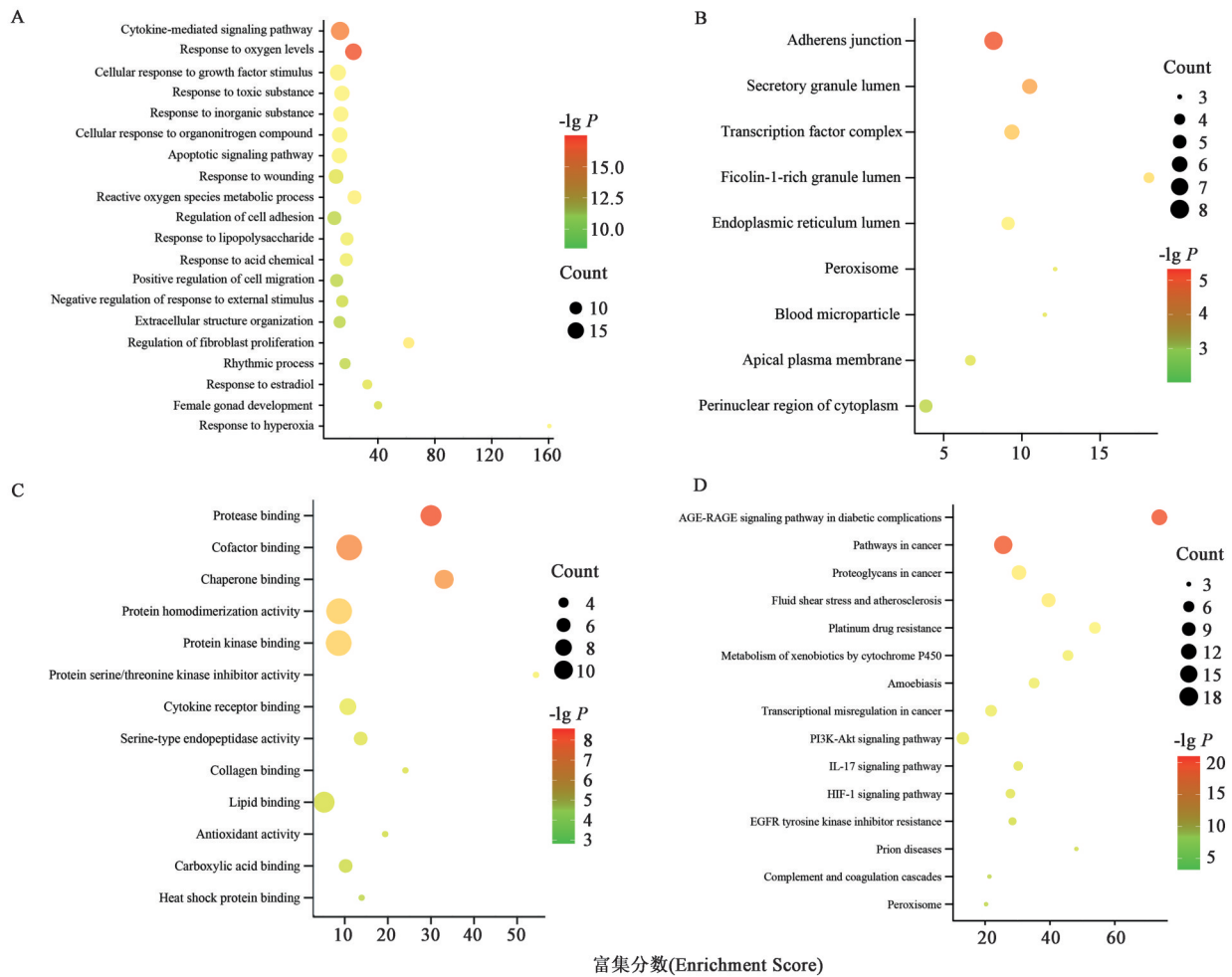


图2 清肝化痰颗粒治疗NAFLD及肝癌的核心靶点网络
Fig. 2 Network of core targets of Qinggan Huayu granules for NAFLD and liver cancer

点参与),生长因子刺激参与的细胞响应信号通路(15个靶点参与)等;GO细胞组分富集分析得到的条目有9条,主要包括黏着连接(8个靶点参与),转录因子复合体(6个靶点参与),分泌颗粒管腔(6个靶点参与)等;GO分子功能富集分析得到的条目有13种,主要包括蛋白激酶结合(10个靶点参与),蛋白同源二聚化活性(10个靶点参与),辅因子结合(10个靶点参与)等。KEGG信号通路富集分析得到的条目有15条,主要包括癌症相关通路(18个靶点参与),糖尿病并发症中的晚期糖基化终产物/晚期糖基化终产物受体通路(13个靶点参与),癌症中蛋白质糖基化信号通路(11个靶点参与)及磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B(PI3K-Akt)信号通路(8个靶点参与)等。

根据本课题组的研究内容以及NAFLD与肝癌的疾病特点,选取了肿瘤相关通路(pathways in cancer, hsa05200),肝癌相关信号通路(hepatocellular carcinoma, hsa05225),新陈代谢相关信号通路(metabolic pathways, hsa01100)3条信号通路,利用KEGG数据库考察了清肝化痰颗粒治疗NAFLD与肝癌靶点参与这些信号通路的调节机制。结果表明清肝化痰颗粒治疗NAFLD与肝癌靶点可以通过调节多条信号通路诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡抑制、过度增殖、血管新生、基因组不稳定、细胞分化阻遏及去分化状态维持。而清肝化痰颗粒治疗NAFLD与肝癌靶点也可以对肝细胞从氧化应激胁迫、慢性炎症、肝纤维化、肝硬化、肝癌癌前病变、早期肝癌、中期肝癌直至转移型肝癌各个病理阶段的细胞学行为进行调节。此外,清肝化痰颗粒治疗NAFLD与肝癌靶点可参与细胞中糖类化合物、脂质类化合物、核酸类化合物、维生素与辅酶类化合物、氨基酸类化合物、蛋白质类化合物、萜类



A. 生物过程; B. 细胞组分; C. 分子功能; D. KEGG 通路
图 3 清肝化痰颗粒治疗 NAFLD 及肝癌作用靶点的 GO 和 KEGG 分析

Fig. 3 GO and KEGG enrichment analysis of targets of Qinggan Huayu granules for NAFLD and liver cancer

化合物、聚酮类化合物、氨基糖苷类抗生素及次生代谢产物的合成代谢过程与分解代谢过程,同时,这些靶点也与细胞中外源生物物质的分解与能量代谢有关。

2.4 山柰酚对人肝癌细胞 HepG2 生存率的影响
本课题组前期初步构建的清肝化痰颗粒指纹图谱,并在指纹图谱中验证了槲皮素、木犀草素及山柰酚的存在^[20],这也初步验证了网络药理学筛选的治疗 NAFLD 与肝癌的主要有效成分的预测结果。同时,有研究发现,槲皮素^[21-22]与木犀草素^[23-24]治疗 NAFLD 及肝癌的药理学机制研究已较为深入与成熟。此外,甘草在清肝化痰颗粒组方中起到了解毒扶正、调和诸药的重要药理作用,上文网络药理学研究发现甘草为清肝化痰颗粒 8 味组方中药中对应有效成分数目及靶点数目最多的中药,而山柰酚在清肝化痰颗粒组方中为甘草独有的有效成分。既往研究也表明甘草在 NAFLD 及肝癌的治疗中发挥

重要的药理作用^[25]。因此,选择山柰酚作为主要有效成分代表进行了细胞模型实验验证,以期进一步证明网络药理学实验预测结果的可靠性。使用不同浓度山柰酚处理 HepG2 细胞 12 h 后使用 CCK-8 实验考察细胞生存率变化。结果表明浓度为 5, 10, 20 nmol·L⁻¹ 的山柰酚处理后, HepG2 细胞生存率分别为 80.9%, 68.9% 及 52.9%, 提示山柰酚可以显著降低 HepG2 细胞的生存率,并存在剂量依赖性。同时, 1 nmol·L⁻¹ 山柰酚处理后, HepG2 细胞生存率 96.0%, 与对照组细胞生存率相比无显著差异,山柰酚对 HepG2 细胞最小抑制浓度为 5 nmol·L⁻¹。因此,选择 5 nmol·L⁻¹ 作为肝癌细胞模型后续实验中山柰酚的处理浓度。

2.5 山柰酚对 NAFLD 细胞模型氧化应激标志物的作用
为了验证山柰酚对于 NAFLD 的治疗作用及可能的分子机制,使用山柰酚处理 NAFLD 细胞模型 12 h 后,检测细胞模型中氧化应激标志物的变化

情况。结果发现经5, 10 nmol·L⁻¹山柰酚处理后, MDA的浓度依次为0.75, 0.71 nmol·L⁻¹, 而对照组的MDA浓度为0.85 nmol·L⁻¹。提示山柰酚可降低NAFLD细胞模型中的MDA浓度, 并存在剂量依赖性。此外, 经5, 10 nmol·L⁻¹山柰酚处理, 另一氧化应激标志物GPx的浓度分别为43.0, 46.2 μmol·g⁻¹ (以蛋白量计, 下同), 而对照组中GPx的浓度为37.0 μmol·g⁻¹。提示山柰酚可上调NAFLD细胞模型中的GPx浓度, 并存在剂量依赖性。这部分实验结果说明山柰酚可改善NAFLD细胞模型中的氧化应激胁迫。而1 nmol·L⁻¹山柰酚对于NAFLD细胞模型氧化应激胁迫无改善作用(MDA和GPx的浓度分别为0.81 nmol·L⁻¹, 37.4 μmol·g⁻¹), 说明山柰酚对NAFLD细胞模型的最小起效浓度为5 nmol·L⁻¹。因此, 选择5 nmol·L⁻¹作为NAFLD细胞模型后续实验中山柰酚的处理浓度。

2.6 山柰酚对肝癌细胞模型及NAFLD细胞模型中CASP3的作用 使用5 nmol·L⁻¹山柰酚分别处理肝癌细胞模型及NAFLD细胞模型, 检测2种细胞模型中CASP3的活性变化。结果表明5 nmol·L⁻¹山柰酚处理后, 肝癌细胞中的CASP3活性与对照组相比上调2.1倍; 而NAFLD细胞模型中的CASP3活性与对照组相比下调2.5倍。而1 nmol·L⁻¹山柰酚处理后, 2种细胞模型中CASP3的活性与对照组相比均无显著差异。

3 讨论

本研究发现清肝化瘀颗粒8味组方中药中有136个有效成分可以参与其对NAFLD与肝癌的治疗作用。其中对应靶点较多有效成分有槲皮素、木犀草素及山柰酚等。既往研究表明, 槲皮素及木犀草素可以通过调节肝脏细胞的胆汁酸分泌、减少肝脏细胞脂质累积、抑制肝脏炎症微环境形成、阻滞肝细胞的凋亡、降低肝脏细胞的氧化应激水平等细胞学行为缓解NAFLD的疾病进程^[21, 23]。另有研究证实, 槲皮素及木犀草素可通过多条信号通路对肝癌细胞的侵袭转移、干细胞的生成及凋亡自噬等细胞学行为进行调节, 从而阻遏肝癌的发展进程^[22, 24]。本文利用网络药理学工具也发现槲皮素、山柰酚及木犀草素可对多个清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌的靶点进行调节, 这些靶点可被富集到多条与NAFLD及肝癌发生发展的信号途径中。另外, 体外试验发现山柰酚可在肝癌及NAFLD细胞模型中抑制肝癌细胞增殖, 调节NAFLD细胞中的氧化应激水平。因此, 推测以槲皮素、木犀草素及山柰酚

为代表的有效成分在清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌中发挥重要作用。

在靶点层面, 本研究利用网络药理学工具筛选出了43个清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌的作用靶点, 同时, 利用cytoHubba插件预测TP53, VEGFA及CASP3可能为潜在的核心作用靶点。既往研究发现, TP53可以通过参与脂肪酸生物合成的调节及肿瘤微环境的调节分别对NAFLD及肝癌的发生发展进行调控^[26-27]。在NAFLD患者中, VEGFA表达量显著提高, 且与氧化应激胁迫的形成、胆道脂质富集及胆结石的形成有关^[28]。而在肝癌细胞中, VEGFA与肝癌血管新生、侵袭与转移, 耐药性形成以及患者的不良预后密切相关^[29]。NAFLD模型小鼠的研究结果表明, CASP3依赖的肝细胞凋亡通路在NAFLD及肝纤维化中发挥重要作用^[30]。此外, 也有研究表明, CASP3的蛋白表达量降低引起的肝癌凋亡水平下降与索拉非尼的耐药性增加有关^[31]。本文肝癌及NAFLD细胞模型的实验结果也发现, 经山柰酚处理后, 肝癌细胞中的CASP3活性显著上调, 提示山柰酚可以在肝癌细胞中重新激活被抑制的细胞凋亡; 而NAFLD细胞模型中CASP3活性显著下调, 提示在NAFLD细胞模型中, 山柰酚可以抑制因氧化应激环境引起的肝细胞凋亡性死亡。总之, 清肝化瘀颗粒可以通过多靶点的调节作用协同治疗NAFLD及肝癌, 且以TP53, VEGFA及CASP3为代表的核心靶点可能在其中发挥主导作用。

目前, 针对NAFLD的发病机制主要是“二次打击”学说, 第一次打击与胰岛素抵抗有关, 第二次打击则包括脂质过氧化与氧化应激, 而免疫细胞与炎症微环境在二次打击中发挥着重要的调节作用。包括规避细胞凋亡、促癌炎症微环境及能量代谢异常在内的生物学特征则是肿瘤发生发展的主要促进因素。本研究利用网络药理学分析发现, 清肝化瘀颗粒治疗NAFLD及肝癌的靶点基因可以被富集到与这些生物学特征调控相关的信号通路上。GO分析所获得的活性氧代谢信号通路及高氧含量响应信号通路与肝细胞氧化应激密切相关, 而活性氧代谢信号通路又与肝细胞脂质代谢密切相关, 成纤维细胞增殖调节信号通路与肝细胞纤维化进程及炎症微环境的维持密切相关, 以上细胞学行为的调节已被证实可能与NAFLD的发生发展密切相关^[32]; 此外, 细胞针对生长因子刺激响应的信号通路可参与肝癌细胞的恶性增殖过程, 调节细胞凋亡的信号通路可参与肝癌细胞程序性死亡的调节^[33]。

而KEGG信号通路的结果也与GO结果相似,PI3K-Akt信号通路,低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路及过氧化物酶体信号通路等都与氧化应激胁迫及炎症微环境的形成有关,并参与NAFLD的发生发展^[34]。而肿瘤中糖基化信号通路、肿瘤中转录失调信号通路、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药性信号通路等均被报道参与了肝癌的发生发展^[35]。而利用KEGG数据库构建的信号通路调控网络也发现,靶点基因可以参与糖类、脂质及核酸等物质的新陈代谢行为,并通过多条信号的调节参与到包括细胞凋亡、恶性增殖等肿瘤细胞学行为的调节,同时通过多条信号通路的调节对肝细胞从氧化应激胁迫及慢性炎症形成到转移型肿瘤发生的肝癌发生发展的各个阶段的细胞学行为进行调控。本研究利用体外试验初步验证了上述结果,山柰酚可以在NAFLD细胞模型中对氧化应激相关标志物的表达量进行调控,同时可对细胞凋亡的关键执行蛋白CASP3的激活水平进行抑制,这一结果表明山柰酚可能通过对氧化应激胁迫的缓解,抑制其引起的凋亡性细胞死亡,从而对NAFLD病程中的肝细胞起到保护作用。而在肝癌细胞模型中,山柰酚可以促进CASP3的激活,同时对肝癌细胞的恶性增殖水平进行抑制。这一结果表明山柰酚可能通过重新激活肝癌细胞中的细胞凋亡进程,从而抑制肝癌细胞的恶性增殖。

“异病同治”是中医核心理论体系中整体观念与辨证论治的体现,指的是不同的疾病,发病机制相同,疾病发展过程中出现相同的关键症候群,产生的病理变化相同,即使症状略有差异,也可以采取同一种辨证施治的治疗策略,即“证同治亦同”。中医古籍中并无NAFLD及肝癌的病名记载,结合症状、病因和病机,中医将NAFLD归属于“肥气”“肝积”“胁痛”“积聚”“肝痞”“肝着”“肝癖”等范畴,将肝癌归属于“肝积”“积聚”“肝癖”“癥积”“鼓胀”等范畴。二者虽病名略有不同,但病位都在肝,病因皆源于饮食饮酒不节、情志失调、邪毒内侵等,导致湿浊内生、聚而为痰,阻塞气机、脾失健运,久则土壅木郁,甚而痰湿血瘀互结成积。二者都属于内伤饮食,情志失调,久病入里,气机紊乱,湿热蕴蓄于肝,痰瘀互结的慢性肝病范畴,主要病变在肝,兼及脾、肾等脏器。本课题组在临床中亦发现,肝癌和NAFLD患者的证型以湿热证多见,证多夹瘀、夹痰,因此针对肝癌和NAFLD患者,即使二者病名不同,症状表现略有差异,仍可根据“异病同治”的原

则,针对疾病发展过程中的关键病机转归,施以清热祛湿、解毒化痰、健脾理气之法,清除病理代谢产物、调和气血运行、恢复脏腑的正常功能。

近年来随着生活水平的提高,人们的饮食生活方式发生了巨大改变。现代人过食辛辣、肥甘厚味炙烤之品,活动量大大减少,长期精神压力过大,肥胖人群比例上升,尤其是腹型肥胖居多。故饮食饮酒失节、情志失调导致的湿热型肝癌和NAFLD较从前增多。王晓怡^[36]通过研究脂肪性肝病中医证型与炎症因子的关系发现,热证和湿热证具有较低的抑炎因子水平,存在更强的炎症反应。其他研究也表明,湿热证可通过调节炎症、免疫反应,影响代谢及肠道微环境诱导肿瘤的发生发展,清热燥湿类中药可发挥抗炎、抗氧化、调节免疫、调节肠道菌群、调节血糖血脂等作用^[37],故历代医家常以清热解毒、祛湿化痰法治疗肿瘤。

清肝化痰颗粒组方以黄芩、苦参为君清热燥湿、泻火解毒;臣以白术、莪术,健脾和胃,活血化痰;佐以半枝莲、白花蛇舌草,清热解毒、消肿散结,三棱活血祛瘀、软坚消癥;使以甘草调和诸药,共奏清热解毒、破瘀散结、健脾益气之功效,对以湿、痰、瘀、毒为主要病理因素,以脾虚夹杂湿热、痰浊、血瘀为证型的NAFLD患者及肝癌患者具有治疗作用。这从理法方药的角度为研究清肝化痰颗粒治疗NAFLD及肝癌奠定了中医基础。根据现代药理学研究,清肝化痰颗粒组方中药有抗炎、细胞保护、抗癌、抗纤维化、改善肝脏微循环、免疫增强等作用。本研究利用网络药理学工具及体外试验发现,改善炎症微环境、降低氧化应激胁迫、调节细胞凋亡及阻止血管新生可能是清肝化痰方发挥清热解毒、破瘀散结功效的主要分子机制。既往研究也证实清肝化痰方可以在大鼠肝病模型中通过改善炎症微环境、抑制肝细胞程序性死亡发挥治疗非酒精性脂肪性肝纤维化的作用^[8],同时通过Jagged/Notch信号通路对肝细胞中三磷酸腺苷(ATP)酶及白蛋白表达量进行调节,并对肝细胞产生保护作用以延缓肝癌癌前病变的进展^[38]。而在肝癌模型大鼠中,清肝化痰方也可以通过改变VEGF信号通路的调节抑制肝癌血管新生和侵袭转移,同时通过促进肝癌细胞凋亡发挥肝癌抑制作用^[39],基于清肝化痰方联合肝动脉化疗栓塞的肝癌临床研究也得到了类似的结论^[40]。基于以上传统医学和现代医学2个角度的研究结果,笔者推测清肝化痰颗粒可通过组方中药中的多种有效成分对多靶点、多通路、多生物学行

为进行调节,同时对现代人群中湿热型肝癌和NAFLD发挥治疗作用,达到“异病同治”的作用,而改善炎症微环境、降低氧化应激胁迫、调节细胞凋亡及阻止血管新生可能是清肝化瘀方发挥清热解毒、破瘀散结功效的主要分子药理作用与核心作用机制。

本研究利用网络药理学工具发现清肝化瘀颗粒对NAFLD与肝癌“异病同治”的主要机制涉及以槲皮素、木犀草素及山柰酚为代表的多有效成分,以VEGFA, TP53及CASP3为代表的多靶点与以氧化应激及细胞凋亡为代表的多通路的系统性、协同性作用。本研究同时利用体外试验初步验证了清肝化瘀颗粒组方主要有效成分之一山柰酚通过核心靶点CASP3的调节对NAFLD及肝癌细胞模型生物学功能的影响。本研究为中西医结合治疗NAFLD及肝癌的作用机制研究提供了理论依据及新思路,也为“异病同治”这一传统中医药理论的现代化研究奠定了分子药理学机制基础。为进一步验证本研究所得到的结果,本课题组后续将围绕网络药理学研究得到的结果,利用分子细胞生物学实验及动物实验对预测的有效成分、靶点蛋白、信号通路及细胞生物学行为开展深入研究,以期“异病同治”原则在NAFLD与肝癌治疗中的应用提供更多的研究依据。

[参考文献]

[1] 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.

[2] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.

[3] DUAN X Y, ZHANG L, FAN J G, et al. NAFLD leads to liver cancer: do we have sufficient evidence? [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2): 230-234.

[4] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China [J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.

[5] 姚树坤, 殷飞, 王娜. 清肝化瘀方药对原发性肝癌患者的疗效及对细胞免疫功能的影响 [J]. *临床荟萃*, 2006, 21(18): 1300-1302.

[6] 殷飞, 姚树坤, 吴新满, 等. 清肝化瘀方药、马洛替酯对肝硬化患者肝纤维化及门脉血流的影响 [J]. *临床荟萃*, 2004, 19(23): 1357-1358.

[7] 李蕊, 柳芳, 宋威江, 等. 清肝化瘀颗粒对H22荷瘤小

鼠的抗肿瘤作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(9): 2130-2134.

[8] 姚树坤, 殷飞, 李志辉, 等. 清肝化瘀口服液对大鼠肝纤维化的治疗作用 [J]. *中国中西医结合脾胃杂志*, 1998, 6(2): 101-103.

[9] 杨志云, 姚树坤, 殷飞, 等. 清肝化瘀方药对大鼠肝癌前病变中卵圆细胞表型的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18(6): 450-454.

[10] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.

[11] 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.

[12] HUANG L, XIE D L, YU Y R, et al. TCMID 2.0: a comprehensive resource for TCM [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1117-D1120.

[13] LIU Z Y, GUO F F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.

[14] WU Y, ZHANG F L, YANG K, et al. SymMap: an integrative database of traditional Chinese medicine enhanced by symptom mapping [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1110-D1117.

[15] WANG Y H, ZHENG C L, HUANG C, et al. Systems pharmacology dissecting holistic medicine for treatment of complex diseases: an example using cardiocerebrovascular diseases treated by TCM [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 980190.

[16] SU W H, CHAO C C, YE H S H, et al. OncoDB. HCC: an integrated oncogenomic database of hepatocellular carcinoma revealed aberrant cancer target genes and loci [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Database issue): D727-D731.

[17] LEE L, WANG K, LI G, et al. Liverome: a curated database of liver cancer-related gene signatures with self-contained context information [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(Suppl 3): S3.

[18] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, doi: 10.1002/cpbi.5.

[19] 刘波. NAFLD细胞模型构建、核酸适配体的筛选及靶向药物运输 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.

[20] 吴桐. 清肝化瘀颗粒制剂工艺、指纹图谱及药代动力学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

- [21] YANG H, YANG T T, HENG C, et al. Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. *Phytother Res*, 2019, 33 (12) : 3140-3152.
- [22] WU L W, LI J J, LIU T, et al. Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2019, 8 (10) : 4806-4820.
- [23] SUN Y R, WANG L, LU Q X, et al. Phenols fragment of *Veronica ciliata* Fisch. ameliorate free radical-induced nonalcoholic fatty liver disease by mediating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253 : 112579.
- [24] NAZIM U M, PARK S Y. Luteolin sensitizes human liver cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via autophagy and JNK-mediated death receptor 5 upregulation [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54 (2) : 665-672.
- [25] 张明, 邓毅. 甘草及其有效成分的药效学研究进展 [J]. *西部中医药*, 2015, 28 (4) : 156-159.
- [26] ABDOLLAHI H, AZODI M Z, HATAMI B. Protein interaction mapping interpretation of none alcoholic fatty liver disease model of rats after fat diet feeding [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2017, 10 (Suppl1) : S146-S153.
- [27] GILLET R, GRIMBER G, BENNOUN M, et al. The consequence of p53 overexpression for liver tumor development and the response of transformed murine hepatocytes to genotoxic agents [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (31) : 3498-3507.
- [28] ASAI Y, YAMADA T, TSUKITA S, et al. Activation of the hypoxia inducible factor 1 α subunit pathway in steatotic liver contributes to formation of cholesterol gallstones [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152 (6) : 1521-1535.
- [29] YANG W D, LI Z W, QIN R, et al. YY1 promotes endothelial cell-dependent tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma by transcriptionally activating VEGFA [J]. *Front Oncol*, 2019, 9 : 1187.
- [30] THAPALIYA S, WREE A, POVERO D, et al. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet-induced NASH model [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59 (6) : 1197-1206.
- [31] FORNARI F, POLLUTRI D, PATRIZI C, et al. In hepatocellular carcinoma miR-221 modulates sorafenib resistance through inhibition of Caspase-3-mediated apoptosis [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (14) : 3953-3965.
- [32] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (7) : 908-922.
- [33] LI L, WANG H Y. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy [J]. *Cancer Lett*, 2016, 379 (2) : 191-197.
- [34] XI C, JIA Z H, WU X L, et al. New aspect of liver IL-17+ $\gamma\delta$ T cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 107 : 41-43.
- [35] MARQUARDT J U, ANDERSEN J B, THORGEIRSSON S S. Functional and genetic deconstruction of the cellular origin in liver cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15 (11) : 653-667.
- [36] 王晓怡. 脂肪性肝病中医证型与炎症因子的关系 [D]. 北京:北京中医药大学, 2012.
- [37] 李沁媚, 李铮, 司红彬. 中药防治湿热证的药效作用及机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26 (14) : 208-216.
- [38] 杨志云, 姚树坤, 殷飞, 等. 清肝化痰方对大鼠肝癌前病变模型 Notch 信号系统的影响 [J]. *中医杂志*, 2006, 47 (12) : 933-935.
- [39] 殷飞, 姚树坤, 吴新满, 等. 清肝化痰方对大鼠肝癌血管形成的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2005, 21 (1) : 29-32.
- [40] 王永中, 姚树坤, 李智岗, 等. 清肝化痰口服液对肝细胞癌介入治疗后血管内皮生长因子及环氧合酶2表达的影响 [J]. *临床荟萃*, 2010, 25 (22) : 1951-1954, 1958.

[责任编辑 刘德文]