



## 基于网络药理学探明八宝丹治疗原发性肝癌的潜在机制研究

朱鑫宇, 白浩然, 赵娜萍, 戚大川, 卫立辛, 张黎

### Potential mechanism of Babao Dan in the treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology

ZHU Xinyu, BAI Haoran, ZHAO Naping, QI Dachuan, WEI Lixin, ZHANG Li

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202401061>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 网络药理学在中药作用机制中的研究进展

Advances in the mechanism of Traditional Chinese Medicine by network pharmacology method

药学实践与服务. 2018, 36(2): 97-102 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.02.001

#### 基于网络药理学的青风藤治疗类风湿关节炎的作用机制研究

Mechanism of *Sinomenii caulis* in the treatment of rheumatoid arthritis based on network pharmacology

药学实践与服务. 2021, 39(1): 17-22 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202004117

#### 基于网络药理学的肝力保胶囊保肝作用机制研究

Study on hepato-protective mechanism of Ganlibao capsule based on network pharmacology

药学实践与服务. 2018, 36(5): 403-408,416 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.005

#### 基于网络药理学对降脂护肝胶囊干预脂肪肝的机制研究

Mechanism of Jiangzhihugan capsule in treatment of fatty liver based on network pharmacology

药学实践与服务. 2021, 39(3): 232-239, 248 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202006054

#### 基于网络药理学的金振口服液干预新冠肺炎的机制研究

Mechanism of Jinzhen oral liquid in treatment of coronavirus disease 2019 based on network pharmacology

药学实践与服务. 2020, 38(3): 193-201 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003163

#### 基于网络药理学研究柴胡达胸合剂治疗新型冠状病毒肺炎的作用机制

The mechanism study on Chaihudaxiong mixture in the treatment of coronavirus disease 2019 with network pharmacology approach

药学实践与服务. 2020, 38(4): 289-295 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202004023



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

## 基于网络药理学探明八宝丹治疗原发性肝癌的潜在机制研究

朱鑫宇<sup>1</sup>, 白浩然<sup>2</sup>, 赵娜萍<sup>1</sup>, 戚大川<sup>2</sup>, 卫立辛<sup>3</sup>, 张黎<sup>1</sup> (1. 海军军医大学第一附属医院临床研究中心, 上海 200433; 2. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032; 3. 国家肝癌科学中心, 上海 201805)

**[摘要]** **目的** 基于网络药理学探讨八宝丹对原发性肝癌(HCC)影响的潜在机制。**方法** 首先利用二乙基亚硝胺诱导的原发性 HCC 大模型, 观察八宝丹对 HCC 的影响; 然后利用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS)检测八宝丹中的有效成分, 再在 Swiss Target Prediction 数据库等预测八宝丹有效成分的潜在作用靶点。运用 GeneCards、OMIM 和 Therapeutic Target Database 筛选 HCC 对应靶点, 取交集后获得八宝丹与 HCC 的共同靶点。使用 Cytoscape 软件和 STRING 数据库绘制蛋白与蛋白间互作网络, 筛选出八宝丹调控 HCC 的关键分子。利用 DAVID 数据库对有效作用靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。最后在 TCGA 数据库验证关键分子与 HCC 患者的临床相关性。**结果** 八宝丹可延缓 HCC 大鼠肿瘤进展。UPLC-MS 检测出八宝丹中化学成分 851 个, 主要活性成分 9 个, 作用靶点 285 个; 筛选出 HCC 靶点 637 个, 八宝丹调控 HCC 的靶点 16 个。GO 富集分析显示 802 个生物过程、11 个细胞组成、43 个分子功能, KEGG 通路共 90 条。TCGA 相关性分析发现 3 个关键分子与 HCC 患者生存期相关。**结论** 通过 HCC 大鼠模型发现, 八宝丹可显著延长 HCC 大鼠的生存周期并减少肿瘤负荷, 通过 UPLC-MS 及网络药理学方法初步预测八宝丹调控 HCC 的作用机制, 表明八宝丹具有多成分、多通路、多靶点作用原发性 HCC 的特点, 为进一步相关实验研究提供参考。

**[关键词]** 原发性肝癌; 八宝丹; 网络药理学; 超高效液相色谱-串联质谱; 作用机制

**[文章编号]** 2097-2024(2024)04-0157-08

**[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202401061

## Potential mechanism of Babao Dan in the treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology

ZHU Xinyu<sup>1</sup>, BAI Haoran<sup>2</sup>, ZHAO Naping<sup>1</sup>, QI Dachuan<sup>2</sup>, WEI Lixin<sup>3</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup> (1. Clinical Research Center, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Oncology, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 3. National Center for Liver Cancer, Shanghai 201805, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the potential mechanism of Babao Dan on primary liver cancer based on network pharmacology. **Methods** First, the diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma rat(HCC)model was used to observe the effects of Babao Dan. Then, the effective components in Babao Dan were detected by UPLC-MS, and the potential target sites of these effective components were predicted in the Swiss Target Prediction databases, etc. The corresponding target sites for HCC were screened using GeneCards, OMIM and Therapeutic Target Database, and the common target sites between Babao Dan and HCC were obtained after getting the intersection. The protein-protein interaction network was drawn by Cytoscape software and the STRING database, and the key molecules regulating HCC by Babao Dan were screened out. The effective target sites were subjected to GO analysis in the DAVID database and enrichment analysis in the Pathway's KEGG. Finally, the clinical relevance of key molecules to liver cancer patients was verified by the TCGA database. **Results** Babao Dan could slow down the tumor development. 851 chemical components were detected in BaBao Dan by UPLC-MS, 9 major active components and 285 target sites were identified. 637 hepatocellular carcinoma-related targets were screened out, and 16 targets of Babao Dan regulating HCC were identified. GO enrichment analysis showed 802 biological processes, 11 cell compositions, and 43 molecular functions, while KEGG pathway enrichment analysis identified a total of 90 pathways. Correlation analysis of TCGA identified three key molecules associated with the survival of liver cancer patients. **Conclusion** In the primary rat liver cancer model, Babao Dan was found to significantly prolong the survival of cancer-induced rats and reduce tumor burden. The initial prediction of the mechanism by which Babao Dan regulating liver cancer was made through UPLC-MS analysis and network pharmacology methods, indicating that

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82173276, 82073032, 82073037, 82203237); 上海市卫生健康委员会基金(20214Y0013)

**[作者简介]** 朱鑫宇, 硕士研究生, 研究方向: 临床药学, Tel: 18901968979, Email: zxy2000626@163.com

**[通信作者]** 张黎, 博士, 研究员, 研究方向: 肿瘤免疫与代谢, Tel: (021)31162333, Email: lizhangpaper@163.com

Babao Dan has the characteristics of multi-component, multi-pathway, and multi-target regulation of primary liver cancer, which could provide a reference for further relevant experimental research.

[Key words] hepatocellular carcinoma; Babao Dan; network pharmacology; UPLC-MS; mechanism of action

肝癌(HCC)是常见的恶性肿瘤之一,尤其在在我国特别高发,全球 HCC 患者超过半数在中国。2022 年我国 HCC 发病率达 36.77/10 万人,位于恶性肿瘤第 4 位;总体病死率达 31.65/10 万人,居恶性肿瘤第 2 位<sup>[1]</sup>。HCC 已然成为我国一项社会公共卫生问题,严重危害国民健康,给国民经济和社会发展带来沉重负担<sup>[2-4]</sup>。目前手术及肝移植可以临床治愈早期 HCC,但多数患者诊断时已是晚期<sup>[5]</sup>。尽管免疫检查点抑制剂和小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂联合治疗法为晚期 HCC 患者带来了希望,但患者的中位生存期仅提高至 19.2 个月<sup>[6]</sup>。中医药治疗晚期 HCC 有其独特的优势,可以增强化疗、靶向、免疫治疗疗效,减轻毒副作用,改善症状,延长患者总生存期。因此运用中医药探索晚期 HCC 患者的治疗方案,对阻止该疾病的进一步发展,延长患者生存期具有重要的意义。

八宝丹起源于明代,至今有近 400 年的应用历史,是原国家食品药品监督管理局允许使用天然麝香的特效药之一。八宝丹成分包含天然牛黄、天然麝香、蛇胆、羚羊角、珍珠、三七等。既往研究已证实,八宝丹可用于急慢性肝炎、胆囊炎等肝胆系统疾病,具有清热利湿、祛黄解毒的功效<sup>[7-8]</sup>,并且八宝丹对 HCC、胰腺癌、胆囊癌等消化系统肿瘤性疾病也有治疗效果<sup>[9-10]</sup>。本团队前期研究发现,八宝丹可以通过抑制慢性炎症介导的肝纤维化进而抑制 HCC 的发生,但八宝丹对于晚期 HCC 的治疗作用机制尚未明确<sup>[11]</sup>。因此探寻八宝丹对晚期 HCC 的作用机制可为中医药治疗 HCC 提供证据。

二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠模型是一个成熟的原发性 HCC 模型。DEN 模型中 HCC 的发展过程与人类 HCC 相似,是一种非常合适研究 HCC 的生物工具<sup>[12]</sup>。本研究利用 DEN 大鼠观察八宝丹对 HCC 的影响,发现其能有效延缓 HCC 进展,但是作用机制尚不明确。由于八宝丹成分复杂多样,需要多组学分析技术探明八宝丹中有效药物成分与疾病的互作关系,因此本研究基于网络药理学和 UPLC-MS 方法,筛选八宝丹治疗 HCC 的有效化合物和潜在治疗靶点,构建“疾病-基因-药物”的多层次网络,揭示八宝丹调控疾病进展的潜在机制,为八宝丹的“老药新用”和 HCC 晚期患者的临床用药提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

八宝丹胶囊(批号 Z10940006,厦门中药厂有限公司)、甲醇(A452-4, Fisher)、乙腈(A998-4, Fisher)、甲酸(A117-50, Fisher); DEN(245437, Sigma-Aldrich); 高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC I-Class HF, Water)、色谱柱(ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>, 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Water)、PDA 检测器(ACQUITY Premier PDA eλ, Water); 高分辨液质联用质谱仪(Thermo-Obitrap-QE, Thermo)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HCC 大鼠模型的建立及分组给药

将 32 只 SD 大鼠(6~8 周龄, 180~200 g, 雄性, SPF 级)随机分为 4 组, 每组 8 只, 分别为: 对照组、八宝丹组、DEN 诱导组(DEN 组)、DEN+八宝丹组。DEN 组和 DEN+八宝丹组连续饲喂 12 周 DEN 溶液(95 μg/ml), 对照组和八宝丹组饲喂灭菌水。八宝丹组不进行 DEN 诱导, 从第 12 周开始予以八宝丹给药。DEN 诱导组, DEN 饮水喂养大鼠持续 12 周, 诱导 HCC 的发生, 然后使用生理盐水灌胃, 1 次/2 d, 持续 4 周。DEN+八宝丹组, DEN 诱导 HCC 发生后, 八宝丹按照 0.5 g/kg 的剂量对实验动物进行灌胃, 1 次/2 d, 持续 4 周(图 1A)。实验结束后处死部分大鼠获取肝脏组织标本, 剩余部分停药后继续观察生存期。

#### 1.2.2 UPLC-MS 分析八宝丹中的化学成分

将八宝丹取出, 用液氮研磨均匀后, 称取约 98.3 mg 样本于 1.5 ml 离心管中; 加入 983 μl 甲醇-水溶液(V/V=3:1, 含混合内标, 4 μg/ml), 涡旋震荡 1 min, 加入钢珠; 放入-40 °C 冰箱中预冷 2 min 后, 在研磨机中研磨(60 Hz, 2 min); 冰水浴超声提取 60 min, -40 °C 下静置 30 min; 离心 10 min(12 000 r/min, 4 °C), 取全部上清液过 0.22 μm 的有机相滤膜; 4 °C 下静置过夜, 离心 10 min(12 000 r/min, 4 °C), 取上清液过 0.22 μm 的有机相滤膜置于内衬管的 LC-MS 进样小瓶中进行分析。本次实验的分析仪器为 ACQUITY UPLC I-Class HF 超高效液相串联 QE 高分辨质谱仪组成的液质联用系统。色谱条件: 色谱柱(ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>, 100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: 45 °C; 流动相: 水(含 0.1% 甲

酸)和乙腈,梯度洗脱信息详见表1;流速:0.35 ml/min;进样体积:5  $\mu$ l;PDA扫描范围210~400 nm。质谱条件:离子源(HESI,样品质谱信号采集分别采用正负离子扫描模式);数据采集模式为DDA;扫描方式为Full MS/dd-MS2(TOP 8);质谱参数详见表2。

表1 八宝丹梯度洗脱信息

时间( <i>t</i> /min)	水(含0.1%甲酸)(%)	乙腈(%)
0	95	5
2	95	5
4	70	30
8	50	50
10	20	80
14	0	100
15	0	100
15.1	95	5
16	95	5

表2 Thermo-Obitrap-QE 质谱参数信息

参数	正离子	负离子
喷雾电压( <i>U</i> /V)	3 800	-3 000
毛细管温度( <i>T</i> /°C)	320	320
辅助气体加热器温度( <i>T</i> /°C)	350	350
鞘气流量(Arb)	35	35
辅助气体流速(Arb)	8	8
S透镜射频水平	50	50
质量范围( <i>m/z</i> )	100~1 200	100~1 200
全质谱分辨率	70 000	70 000
串联质谱分辨率	17 500	17 500
质谱仪二级碎裂能量	10, 20, 40	10, 20, 40

### 1.2.3 八宝丹有效化学成分筛选策略

八宝丹 UPLC-MS 数据由上海欧易生物医学科技有限公司提供,根据八宝丹化学成分在210 nm和254 nm波长下的紫外吸收图初步确定其结构类型。质谱数据经Progenesis QI v3.0软件(Nonlinear Dynamics, Newcastle, 英国)处理(基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化)获得八宝丹的质谱峰表。

### 1.2.4 八宝丹有效成分鉴定方法

八宝丹的质谱峰表中化合物的鉴定基于精确质量数、二级碎片以及同位素分布,并结合TCM数据库(上海欧易生物医学科技有限公司,中国)进行鉴定。在本研究中,质谱峰表中对各鉴定物质进行评分,满分80分,其中,一级质谱精确分子量匹配,

20分;二级质谱碎片匹配,20分;同位素分布匹配,20分;保留时间匹配,20分。将化合物相对峰面积的总含量定为100%,得到定性定量结果数据矩阵,并规定峰面积的比值大于1%,总分大于55,一级分子量误差在 $1.4\times 10^{-6}$ 以内的化合物作为八宝丹的有效成分进行后续分析。

### 1.2.5 八宝丹中有效化学成分靶点的筛选

根据前期筛选出的有效化学成分导入PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库查找与有效活性成分相对应的Smiles号,并将Smiles号导入Swiss Target Prediction(<http://swisstargetprediction.ch/>)和SuperPred(<https://prediction.charite.de/subpages>)数据库进行有效活性成分对应靶点的预测,保留结合可能性1%以上或文献报道过与化合物相关的作用靶点。根据各成分相关基因富集情况,利用R(version 3.6.1)构建各组分之间互作网络。

### 1.2.6 HCC 相关靶点的筛选

使用GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库、OMIM(<https://omim.org/>)数据库和Therapeutic Target Database(<https://db.idrblab.net/>)筛选HCC对应靶点,以“Hepatocellular carcinoma”为关键词进行筛选。并根据文献比对,保留与HCC相关的靶点用于后续研究。

### 1.2.7 有效成分与HCC互作分析

根据前期有效成分相关靶点筛选和HCC相关靶点的选择,取交集进行后续分析。将共同靶点的数据导入STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建蛋白互作网络,再利用Cytoscape3.9.0软件,以介数中心数为参考,筛选出关键调控蛋白。

### 1.2.8 GO 功能注释及KEGG 通路富集分析

将有效成分和HCC之间的共有靶点导入DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库,设置物种为人, $P<0.01$ ,分别勾选GO分析中的生物过程、细胞组成、分子功能以及Pathway中的KEGG进行富集分析,提取结果后,应用微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)平台将富集分析结果可视化。

### 1.2.9 TCGA 相关性分析

将有效成分和HCC之间的共有靶点依次导入GEPIA2(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)中,以182例TCGA数据库中保留的临床HCC患者的RNA测序数据为基础,分析共有靶点与患者生存期的相关性。

### 1.2.10 H&E 染色

大鼠被处死后,用磷酸盐缓冲液和4%多聚甲醛进行经心灌注。取肝脏组织进行病理评估。

石蜡包埋后肝脏切成 5  $\mu\text{m}$  厚的切片。染色时将 HCC 组织石蜡切片, 60  $^{\circ}\text{C}$  烘烤固片 30 min; 脱蜡至水, 并按照生产商的方案用苏木精-伊红染色, 最后镜下观察各组织病理学情况。

### 1.2.11 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行方差分析, 每次实验的定量数据以平均值 $\pm$ 标准差表示, 组间差异采用  $t$  检验。Kaplan-Meier 分析用于进行生存期分析。采用对数秩检验比较各组存活时间。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 八宝丹延长原发 HCC 大鼠生存期并减少肿瘤负荷

在实验观察期间, 对照组和八宝丹组的大鼠均存活, 而 DEN 组平均生存期为 17.1 周, DEN+八宝丹组平均生存期为 23 周, 是 DEN 组的 1.35 倍 (图 1B)。同时观察肝脏大体发现, 对照组和八宝

丹组肝脏组织未见异常; DEN 组肝脏组织中均出现大量肉眼可见肿瘤结节; 而 DEN+八宝丹组肝脏组织中虽然出现了部分肉眼可见的肿瘤结节, 但大体形态上相较于 DEN 组损伤较轻 (图 1C)。通过对肿瘤结节的最大直径和数量测量统计发现 DEN+八宝丹组肿瘤负荷和最大肿瘤直径显著小于 DEN 组 (图 1D)。同时, 对各肝脏组织进行病理学评估和 H&E 染色结果发现, 八宝丹组和正常肝脏组织组织排列紧密, 未出现肝脏损伤, 而 DEN 组出现明显的组织空泡化, 组织间排列弥散, 肝脏损伤严重。尽管 DEN+八宝丹组大鼠肝脏组织相较于八宝丹组和正常对照大鼠出现了明显的炎症浸润和肝纤维化, 但是, 相较于 DEN 组的肝脏组织损伤较轻且组织排列较为紧密 (图 1E)。H&E 染色结果表明, 八宝丹对大鼠肝脏未发现实质性病理损伤, 并且缓解了同期 DEN 大鼠的肝脏病理状态。上述结果表明, 八宝丹能延缓 DEN 大鼠的生存期并减少肿瘤负荷, 但是具体机制尚不明了。

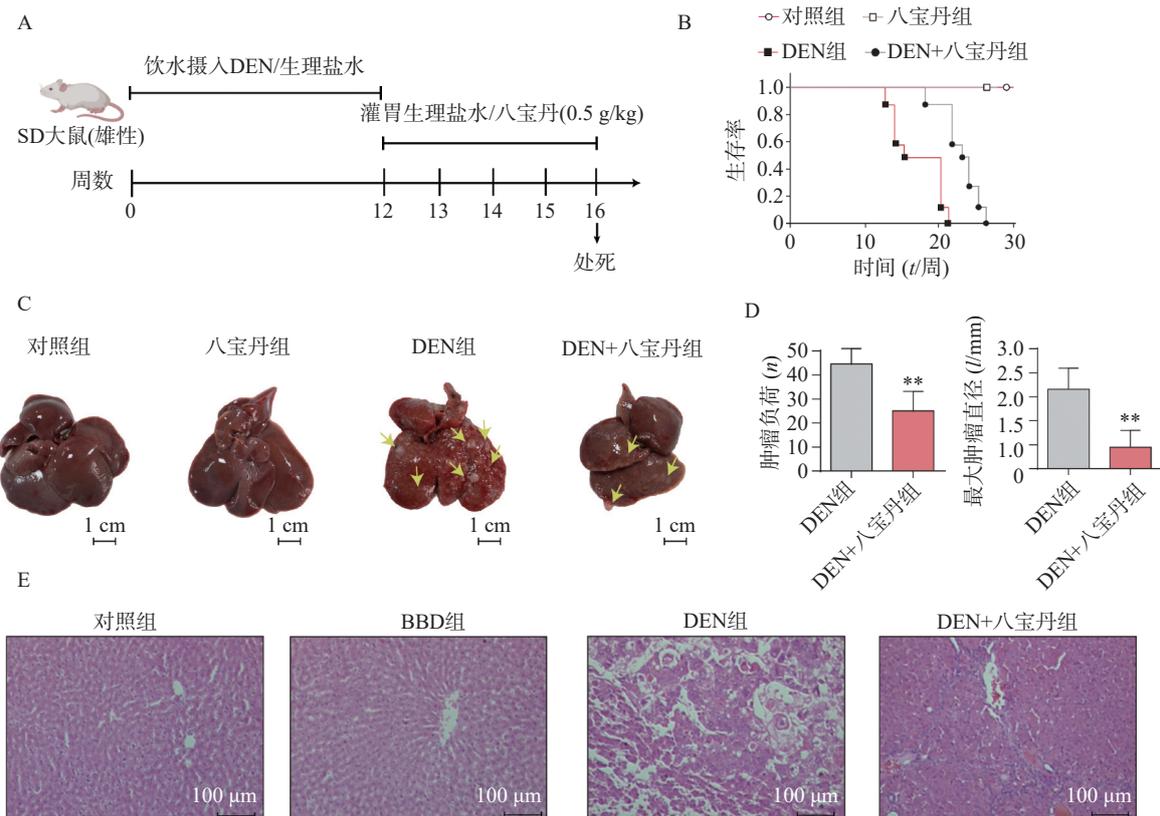


图 1 八宝丹对 HCC 大鼠的影响

- A. 动物模型的构建与八宝丹干预策略机制图; B. Kaplan-Meier 总生存曲线; C. 各组间代表性肝脏大体观, 黄色箭头指示肿瘤结节; D. 定量分析 DEN 组和 DEN+八宝丹组大鼠肝组织肿瘤结节数和最大肿瘤结节直径 (mean $\pm$ SD,  $n=3$ , \*\* $P < 0.01$ , 与 DEN 组比较); E. H&E 染色各组间代表性肝脏组织切片

### 2.2 八宝丹可能通过多种化合物和多靶点调控 HCC 的进展

为进一步探索八宝丹对 HCC 的影响机制, 本

研究首先对八宝丹进行 UPLC-MS 中药化学成分检测。中药成分鉴定流程如图 2A 所示, 将八宝丹颗粒进行溶解、研磨、过滤和提纯后上机检测。紫

外吸收图谱发现, 210 nm 处皂苷类成分在该波长下有强吸收, 254 nm 处含有苯环、双键等结构的成分在该波长下有强吸收。然后通过基峰色谱图反应样品的整体信息, 3 次重复性检测结果可知该检测方法离子相应响度、保留时间重复性良好, 由此说明本次实验仪器稳定、数据可靠。原始数据经 Progenesis QI 软件处理和 TCM 数据库进行定性后, 共发现 851 个中药成分, 保留 9 个主要活性成分供后续研究, 分别是牛磺草胆酸盐、12-酮脱氧胆酸、去氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、三七皂苷 R1、环氧油酸和 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -二羟基-12-羰基-5 $\beta$ -胆烷酸。将主要活性成分信息分别导入 PubChem 和 Swiss Target Prediction 数据库, 共获得 285 个潜在作用靶点, 并绘制出化合物之间的互作网络, 发现八宝丹中主要化学成分之间关系密切, 相互存在多个共有靶点(图 2B)。在 Therapeutic Target Database、GeneCards、OMIM 数据库和文献中共筛选出与 HCC 相关的靶点 637 个, 保留八宝丹与 HCC 共有相关性靶点 16 个(图 2C)作为潜在调控分子。将潜在调控分子导入 STRING 数据库构建蛋白与蛋白间互作网络(图 2D), 再利用 Cytoscape3.9.0 软件, 以介数中心数(网络中所有最短路径中经过该节点的路径的数目占最短路径数的比例)为参考, 将潜在调控分子进行排序, 介数中心数越大, 圆形的直径越大, 颜色越蓝, 说明在该网络中的关联度就越高, 反之圆形的直径越小, 颜色越绿(图 2E)。其中, 潜在调控分子介数中心数排名前 5 的分别是: 白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、细胞肿瘤抗原 p53(TP53)、过氧化酶增殖因子活化受体- $\gamma$ (PPARG)和雌激素受体 1(ESR1)。

### 2.3 八宝丹临床上可能通过多途径影响 HCC

为探索八宝丹调控 HCC 的潜在作用机制, 本研究基于 DAVID 数据库将上述 16 个共有相关靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。GO 富集分析显示 802 个生物过程、11 个细胞组成、43 个分子功能, KEGG 通路富集分析共 90 条通路, 展示排名前 10 的富集条目。

图 3A 提示八宝丹在生物过程中通过沉默细胞中 mRNA 的转录, 抑制上皮样细胞的增殖和转录因子的结合调控 HCC; 图 3B 提示八宝丹有效化学成分在细胞层面上通过结合各种细胞器或细胞膜受体发挥作用; 图 3C 提示八宝丹有效化学成分能调控转录因子的结合、细胞因子的分泌及细胞核的状态。图 3D 提示八宝丹调控 HCC 是通过多通路、多靶点之间的相互作用。最后在 TCGA 数据

库中查询了共有相关靶点与 HCC 患者的临床相关性, 在 182 例临床样本的调查中发现, 3 个基因的高表达提示着患者的总生存期较短, 分别为 ESR1 (Logrank  $P=0.00069$ )、PPARG(Logrank  $P=0.00074$ ) 和 COL18A1(Logrank  $P=0.006$ ), 详见图 3E~G,  $P$  值由 Kaplan-Meier 生存曲线和 log-rank 检验确定。

## 3 讨论

HCC 是一种典型的炎症相关癌症, 近 90% 的 HCC 与病毒性肝炎、过度酒精摄入、非酒精性脂肪肝或酒精性脂肪肝引起的长期炎症相关。在 HCC 慢性炎症微环境中, 先天免疫细胞和成纤维细胞被募集并激活至损伤部位分泌细胞因子和生长因子, 有利于肿瘤细胞的增殖或抵消凋亡<sup>[6]</sup>。研究表明, NF- $\kappa$ B 和 JAK-STAT 两条经典通路是促进 HCC 的关键炎症信号通路, 抑制炎症通路的激活能有效抑制住 HCC 进一步进展<sup>[13]</sup>。八宝丹作为传统中药复方, 临床上已发现对 HCC、胰腺癌、胆囊癌等消化系统肿瘤性疾病也有着积极的治疗效果, 但是具体机制尚不明了。本团队前期研究发现, 八宝丹可以通过抑制炎症细胞因子分泌和减少肝前体细胞上 TRL4 的表达, 从抑制肝前体细胞的肿瘤转化, 进而抑制肿瘤发生<sup>[11]</sup>。因此本研究团队假设八宝丹减缓了原发性 HCC 的肿瘤进展。

在本研究中, 通过观察八宝丹对 DEN 诱癌大鼠的影响, 发现八宝丹可以延长 DEN 大鼠的生存期, 并且缓解 DEN 导致的肝脏肿瘤负荷。但是, 目前尚未有具体的机制阐明这一现象。为探索是八宝丹中何种中药成分发挥了作用, 利用 UPLC-MS 技术检测出化学成分 851 个, 鉴定出主要活性成分 9 个, 其中大部分是人体胆汁酸中主要成分, 也发现具有强抗炎作用的三七皂苷 R1<sup>[14]</sup>, 主要活性成分之间关系密切。共筛选出 285 个潜在作用靶点。在与 HCC 相关靶点取交集后, 筛选出八宝丹调控 HCC 的 16 个潜在靶点。利用上述靶点构建了八宝丹“化学成分-潜在靶点”网络模型以及 PPI 网络, 将潜在作用靶点进行排序, 发现了 HCC 小鼠模型已验证能加速 HCC 的发展并影响肿瘤的侵袭性免疫信号 IL-6 和 TNF<sup>[15]</sup>; HCC 中的显性突变驱动因子 TP53 和 RB1<sup>[16]</sup>; 与 HCC 炎症相关的信号分子 STAT3; 与肿瘤细胞增殖相关的分子 MTOR 和 AFP<sup>[17]</sup>。

GO 富集分析结果提示, 八宝丹调控 HCC 在生物过程上参与 miRNA 对基因的沉默负调控、转录后 miRNA 对基因的沉默负调控、RNA 对基因的

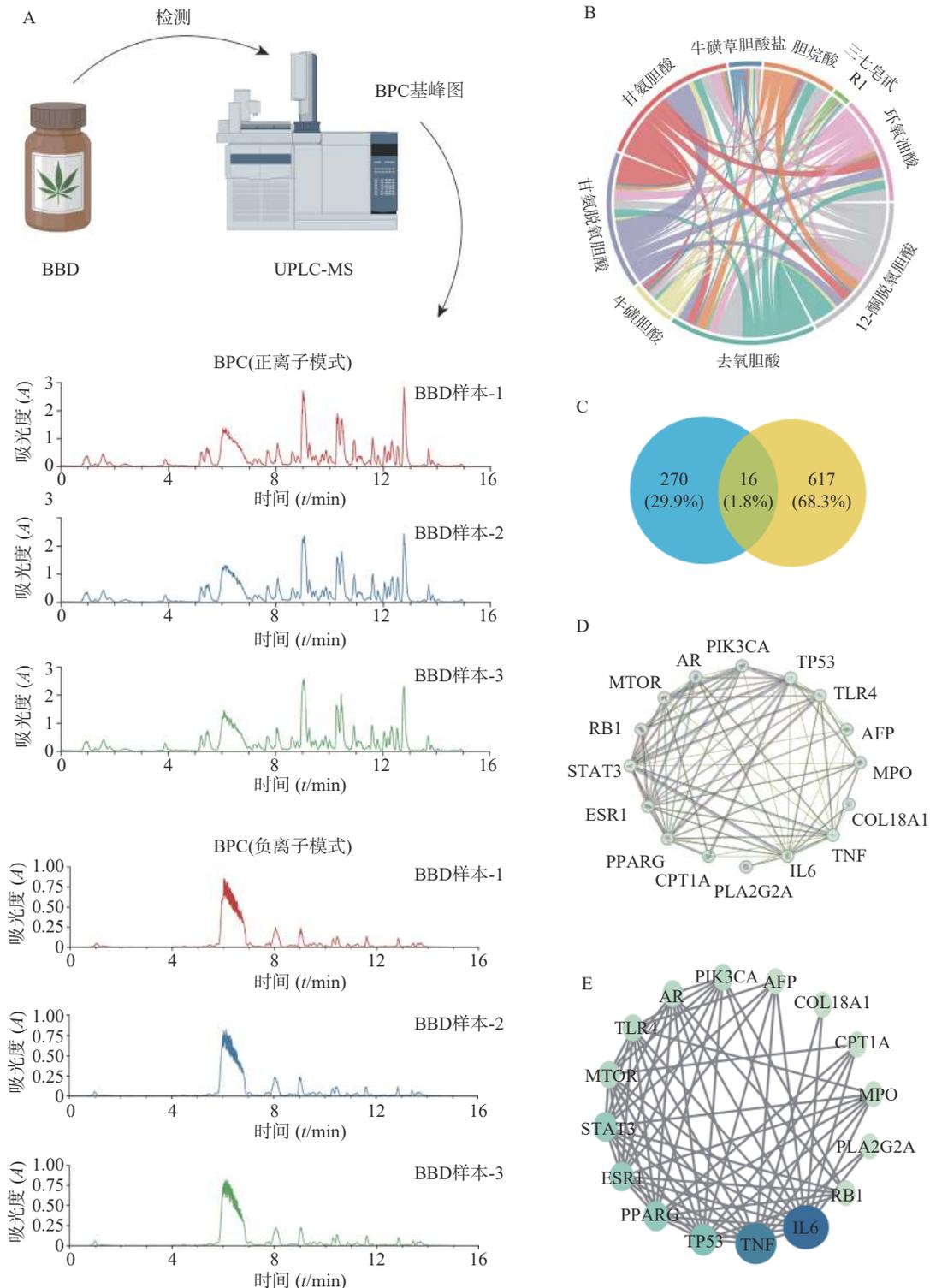


图2 八宝丹通过多化学成分和多靶点对原发HCC的影响

- A. 八宝丹检测流程示意图及基峰色谱图(红、蓝、绿色表示三针技术重复); B. 八宝丹中有效中药成分相互作用弦图;  
C. 韦恩图显示八宝丹与HCC共有相关性靶点; D. 基于STRING数据库绘制的蛋白与蛋白间互作网络;  
E. 基于介数中心数为参考绘制的蛋白与蛋白间互作网络

沉默负调控等;在细胞组分上富集到RNA聚合酶II转录调节因子复合物、吞噬作用相关受体、细胞膜受体等词条;在分子功能上富集到与转录起始因子结合,激活核受体,与配体结合激活转录因子活性等。KEGG信号通路提示,八宝丹参与了癌症中的

蛋白聚糖、乙型肝炎、HIF-1信号通路、化学致癌受体激活、EGFR络氨酸激酶抑制剂耐药等通路。TCGA数据库中发现,ESR1、PPARG和COL18A1高表达与HCC患者总生存期密切相关。据报道,PPARG高表达可激活WNT/CTNNB1信

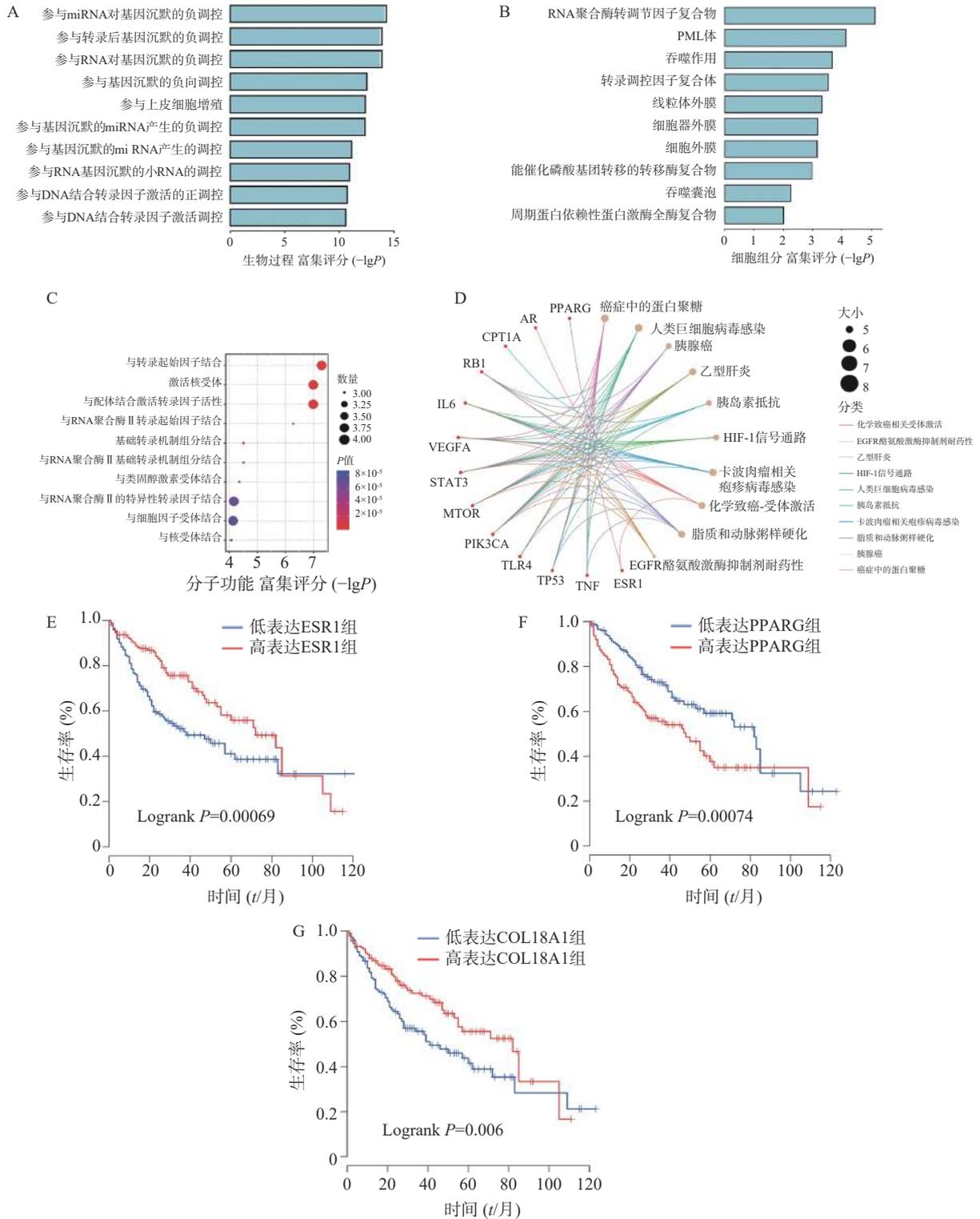


图3 富集分析发现八宝丹临床上可能是通过多途径影响 HCC

A. 生物过程富集分析柱状图; B. 细胞组分富集分析柱状图; C. 分子功能富集分析气泡图; D. KEGG 富集分析花瓣图; E. ESR1 与 HCC 患者总生存期的关系图; F. PPARG 与 HCC 患者总生存期的关系图; G. COL18A1 与 HCC 患者总生存期的关系图

号通路,从而维持肿瘤细胞干性特征,促进癌症进展<sup>[18]</sup>。人类 HCC 临床样本调查和组织染色也证实,ESR1 可通调控 miR-141-3p /GSN 信号影响原发性 HCC 进展<sup>[19]</sup>;肌成纤维细胞分泌的胶原  $\alpha$ -1 (XV III) 链 (COL18A1) 可促进肿瘤转移,加速

HCC 进展<sup>[20]</sup>。因此 TCGA 结果提示,八宝丹可能是通过调控 ESR1、PPARG 和 COL18A1 来延长原发性 HCC 患者的生存期。

综上所述,本研究证实了八宝丹对治疗原发性 HCC 的积极影响,并且发现 9 种八宝丹的有效

活性成分。还利用网络药理学研究方法,分析揭示八宝丹可能是通过多靶点、多通路来调控原发HCC,并结合已有的研究进行分析验证,提出新的视角与思路,为后续的实验研究提供参考。

### 【参考文献】

- [1] ZHENG R S, CHEN R, HAN B F, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2024, 46(3): 221-231.
- [2] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [4] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [5] BROWN Z J, TSILIMIGRAS D I, RUFF S M, et al. Management of hepatocellular carcinoma: a review[J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4): 410-420.
- [6] GILLES H, GARBUTT T, LANDRUM J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Crit Care Nurs Clin N Am*, 2022, 34(3): 289-301.
- [7] 张虎平, 马艳品. 八宝丹胶囊联合替诺福韦治疗乙型病毒性肝炎的临床研究 [J]. *临床医学工程*, 2021, 28(9): 1221-1222.
- [8] 任军帮, 沈有秀, 张永刚, 等. 八宝丹胶囊治疗急性胆囊炎患者的临床研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(12): 1689-1693.
- [9] 胡玮晔, 高司成, 朱小涵, 等. 八宝丹治疗肝脏疾病的临床与基础研究 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(3): 281-283.
- [10] 徐意, 李伟, 楼妙姿, 等. 八宝丹胶囊治疗原发性肝癌化疗栓塞术后综合征临床研究 [J]. *新中医*, 2020, 52(16): 104-106.
- [11] LIANG L, YANG X, YU Y, et al. Babao Dan attenuates hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cells activation and proliferation via TLR4 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82554-82566.
- [12] SCHULIEN I, HASSELBLATT P. Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice[J]. *Methods Cell Biol*, 2021, 163: 137-152.
- [13] HOU J J, ZHANG H Y, SUN B C, et al. The immunobiology of hepatocellular carcinoma in humans and mice: basic concepts and therapeutic implications[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 167-182.
- [14] HU K R, LI C J, YU T J, et al. Global analysis of qualitative and quantitative metabolism of Notoginsenoside R1 in rat liver-brain-gut axis based on LC-IT-TOF/MS combining mMDF strategy[J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154261.
- [15] SEEHAWER M, HEINZMANN F, D'ARTISTA L, et al. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer[J]. *Nature*, 2018, 562(7725): 69-75.
- [16] ZUCMAN-ROSSI J, VILLANUEVA A, NAULT J C, et al. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(5): 1226-1239.
- [17] LEONE V, ALI A, WEBER A, et al. Liver inflammation and hepatobiliary cancers[J]. *Trends Cancer*, 2021, 7(7): 606-623.
- [18] TO J C, CHIU A P, TSCHIDA B R, et al. ZBTB20 regulates WNT/CTNNB1 signalling pathway by suppressing PPARG during hepatocellular carcinoma tumourigenesis[J]. *JHEP Rep*, 2021, 3(2): 100223.
- [19] XIAO Y, LIU G D, SUN Y, et al. Targeting the estrogen receptor alpha(ER $\alpha$ )-mediated circ-SMG1.72/miR-141-3p/Gelsolin signaling to better suppress the HCC cell invasion[J]. *Oncogene*, 2020, 39: 2493-2508.
- [20] Qu C, He L, Yao N, et al. Myofibroblast-specific Msi2 knock-out inhibits HCC progression in a mouse model[J]. *Hepatology*, 2021, 74(1): 458-473.

[收稿日期] 2024-01-26 [修回日期] 2024-03-18

[本文编辑] 蔺淼