

“温升三阴,肃金秘阳法”抗肝癌的网络药理学研究*

邱祥玉, 谢星星, 宋娜, 虎雅敏, 关东龙, 吴施国[△]

(云南中医药大学基础医学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 目的 通过对“温升三阴,肃金秘阳法”的网络药理学分析,探讨此治法在治疗肝细胞癌的潜在抗肿瘤靶点及作用机制,为后续实验研究提供有针对性的指导。**方法** 利用 TCMSP 数据库对“温升三阴,肃金秘阳法”下对应中药所含化学成分进行筛选并预测其作用靶点。通过 Gene Cards 数据库、OMIM 数据库获得肝细胞癌的相关靶点,然后利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建药物-疾病-靶标关系网络。利用 R 语言,获得两者的交集靶点蛋白并通过 STRING 平台进行蛋白质互作网络分析。对关键靶点及相关有效化学成分做分子对接验证。利用 DIVID 数据库进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果** “温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝细胞癌的关键成分涉及到槲皮素、 β -谷甾醇、山柰酚、豆甾醇;关键靶基因主要有 PTGS2、STAT3、HSP90AA1、AKT1 等,主要生物学过程有信号转导、氧化还原过程、药物反应、凋亡过程、炎症反应等;作用机制与 PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路、乙型肝炎信号通路、MAPK 信号通路有关。**结论** “温升三阴,肃金秘阳法”对肝细胞癌的治疗作用可能是多靶点、多途径、多层次的,并且可以推测槲皮素和山柰酚可能是其中比较重要的 2 个有效成分。PTGS2、STAT3、AKT 可能是主要的作用靶点。PI3K/Akt 信号通路、TNF 信号通路可能是本方发挥作用比较重要的两条信号通路。

关键词: 温升三阴,肃金秘阳法;肝癌;网络药理学

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)04-0076-10

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.04.012

The Network Pharmacological Study on the Treatment of Hepatocellular Carcinoma with the Warming and Ascending Three Yin, Descending Metal and Storing Yang Law

QIU Xiangyu, XIE Xingxing, SONG Na, HU Yamin, GUANG Donglong, WU Shiguo

(College of Basic Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** Through network pharmacology, the “the warming and ascending three Yin, descending metal and storing Yang law”(温升三阴, 肃金秘阳法), was analyzed to explore the potential anti-tumor target and mechanism in the treatment of hepatocellular carcinoma, so as to provide targeted guidance for the follow-up research. **Methods** The TCMSP database was used to screen the chemical components contained in the corresponding traditional Chinese medicine under the method of “the warming and ascending three Yin, descending metal and storing Yang law” and to predict their action targets. The relevant targets of hepatocellular carcinoma were obtained through Gene Cards database and OMIM database. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct drug-disease-target relationship network. R language was used to obtain the intersection target protein of the two. Protein-protein interaction network analysis was carried out on the STRING platform, and Molecular docking verification of key targets and related active chemical components was performed. Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using DIVID database. **Results** The key components in the treatment of primary liver cancer were quercetin, β -sitosterol, kaempferol and stigmasterol. The key target genes mainly included PTGS2, STAT3, HSP90Aa1 and

收稿日期: 2021-04-28

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(81960835)

第一作者简介: 邱祥玉(1991-),女,在读硕士研究生,研究方向:临床常见病证的治法与方剂研究。

[△]通信作者: 吴施国, E-mail: 383948975@qq.com

AKT1. In this method, the main biological processes may be signal transduction, redox process, drug reaction, apoptosis, inflammation and so on. The mechanism of action may be related to PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, hepatitis B signaling pathway and MAPK signaling pathway. **Conclusion** The therapeutic effect of “the warming and ascending three Yin, descending metal and storing Yang law” on hepatocellular carcinoma may be multi-target, multi-pathway and multi-level. It can be speculated that quercetin and kaempferol may be the two more important active components. PTGS2, STAT3, and AKT may be the main targets, and PI3K/Akt signaling pathway, TNF signaling pathway may be the two more important signaling pathways that this method plays a role in.

KEY WORDS: the warming and ascending three Yin; descending metal and storing Yang law; hepatocellular carcinoma; network pharmacology

“温升三阴,肃金秘阳法”是建立在云南吴氏扶阳学术基础上形成的一种治疗原则和方法。“温升三阴法”用于治疗“阳衰阴盛,三阴脏寒”所致的三阴不升,人体气机圆运动失常^[1]。所谓“三阴”是指少阴肾、太阴脾和厥阴肝。三阴阳气的升发是整个气机圆运动的运行不息的关键,即名为“温升三阴法”。在人体气机圆运动中,有升才有降,有左升也需有右降,左升者,温升三阴,右降者,肃降三阳也。肝木、脾土,升于左,则胃土、肺金、胆火需降于右,升降循环,周流不息,是以整个气机的圆运动得以正常地运转。吴荣祖教授在此理论原则之下:予以吴萸四逆汤“温升三阴”,同时予以杏仁肃降肺金,厚朴肃降胃土,乌梅敛降胆火,三者共取“肃金”右降之意。同时吴荣祖教授认为肾水寒则龙浮,相火不能潜藏其位,而浮越于上,故在温升三阴的基础上,需引火归元。“黄柏、砂仁、甘草”三味药为封髓丹,予之以取“秘阳”之意。少阴阳衰,火不暖土,脾失健运,水湿不化,取苓桂术甘汤,燥土湿以助阳左升。

原发性肝癌(又称肝细胞癌)是临床中最常见且恶性程度较高的肿瘤之一,2020年我国肝癌发病人数达41万,死亡人数39万,死亡率高达95%,严重威胁我国人民的生命健康,手术、介入、放化疗虽然有一定效果,但作用有限^[2-3]。吴荣祖教授在临床上运用“温升三阴,肃金秘阳法”治疗内、外、妇、儿等疑难杂症,取效颇佳。在治疗肝癌上亦有较好的临床疗效。

网络药理学利用网络大数据平台,分析药物、疾病、靶点相互作用的机制,与中医药多靶点、多成分特点相一致,有利于中药及中药复方活性成分研究及机制探索^[4-5]。本文基于“温升三阴,肃金秘阳法”的立法理论,取吴萸四逆汤温升三阴,苓桂术甘汤温阳健脾,杏仁、厚朴、乌梅肃降肺胃、胆火以“肃金”,封髓丹“秘

阳”。采用网络药理学研究在此大法下4个不同治法、方药治疗肝癌的药效活性成分及可能的分子机制,为丰富此理论及后续实验研究提供一定基础。

1 资料和方法

1.1 活性成分的筛选 通过检索中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)^[6]查询温升三阴法对应中药(吴茱萸、附子、干姜、甘草),温阳化饮法对应中药(茯苓、桂枝、白术、甘草),肃金法对应中药(杏仁、厚朴、乌梅),秘阳法对应中药(黄柏、砂仁、甘草)的化学成分,并进一步收集各味中药中口服生物利用度($OB \geq 30\%$)和药物相似性($DL \geq 0.18$)的活性成分,以纳入后续研究。

1.2 活性成分靶点预测 利用TCMSP数据库查询上述代表药物活性成分对应的靶点信息,以(Homo Sapiens)为检索条件在蛋白数据库(UniProt)(<https://www.uniprot.org/>)^[7]进行检索,并将获得的各个靶蛋白对应的靶基因名换成对应的基因Symbol。

1.3 肝癌疾病靶点预测 以英文“hepatocellular carcinoma”为关键词分别在GeneCards(<http://www.genecards/>)^[8],OMIM(<http://omim.org/>)^[9]疾病数据库检索肝癌靶点基因。

1.4 潜在作用靶点预测 运用R语言对药物成分的预测靶点和疾病靶点进行映射取交集,获得“温升三阴,肃金秘阳”法治疗肝癌的潜在作用靶点。

1.5 构建“中药-化合物-治疗靶点”网络图 运用Cytoscape3.7.2软件对获取的中药有效成分靶点构建“中药-化合物-治疗靶点”网络图。采用CytoHubba插件进一步分析该网络的关键成分。根据degree值选取网络中排列15位的关键靶蛋白。

1.6 构建蛋白质相互作用(PPI)网络及关键靶点分析 将1.4所得交集基因导入STRING(<https://string-db.org/>)^[10]数据分析平台进行蛋白质互作网络分析。选择

“Multiple proteins”作为分析模式,“Homo sapiens”用于生物种类限制,同时选择置信度为 ≥ 0.90 进一步筛选并隐藏孤立蛋白后构建 PPI 网络,并且利用 R 语言 4.0 软件(<https://www.r-project.org/>)对该网络中的关键靶点蛋白进行分析。

1.7 将 4 个治法下的药物活性成分靶点导入 Cytoscape 3.7.2 用 Cyto Hubba 插件分析每个治法网络中的关键成分,根据 degree 值选取网络中排列前 4 的关键活性成分。

1.8 GO 富集分析与 KEGG 富集分析 为了进一步分析“温升三阴,肃金秘阳法”作用肝癌的可能机制,利用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>, Version 6.8)对 210 个潜在靶点进行 GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析,分别研究“温升三阴,肃金秘阳法”的主要生物功能与主要信号通路,并运用 Graphpad Prism8.0.1.244x64 软件对 GO 富集中的 BP(生物进程)和 KEGG 富集排名靠前的通路条目绘制成柱状图。

1.9 核心活性成分与核心靶点分子对接 通过 PDB 蛋白质结构数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载关键靶点蛋白 PDB ID 并保存为 pdb 格式。在 TCMSP 数据库查找关键的有效成分信息,下载并保存为 mol2 格式。利用 AutoDock Tools 软件将关键活性成分与关键靶点完成分子对接,再通过 pymol 软件对所得结果进行可视化展示。

2 结果

2.1 TCMSP 数据库有效成分检索结果 根据 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的标准在 TCMSP 数据库内检索并筛选得到 253 个有效成分(已删除重复值)。其中温升三阴法中 148 个有效成分,温阳健脾法中 121 个有效成分,肃降肺胃中 29 个有效成分,秘阳法中 139 个有效成分。

2.2 肝癌潜在作用靶点 将药物活性成分靶点基因 229 个,与疾病所得的相关靶点取交集,获得 210 个交集基因为“温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝癌的潜在作用靶点(见图 1)。

2.3 靶点 PPI 网络、关键基因分析

2.3.1 PPI 网络分析 将所得 210 个交集基因输入 STRING 数据分析平台进行 PPI 网络分析。去除游离节

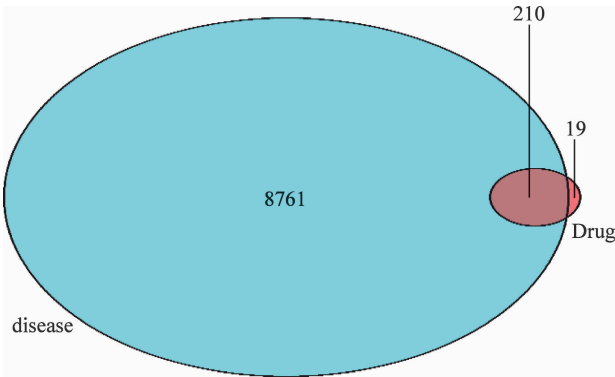


图 1 “温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝癌的靶点筛选图

点后,网络中包含 210 个靶点,818 条相互作用连线。

2.3.2 关键基因分析 为进一步分析网络中重要的核心靶点,利用 R 语言进行筛选并根据度值将 PPI 网络中核心靶点绘制条形图(见图 2)。在该 PPI 网络中其中度值较大的有 STAT3(度值=31)、JUN(度值=29)、HSP90AA1(度值=25)、AKT1(度值=24)、MAKP1(度值=23)、MAKP3(度值=22)、IL6(度值=18)等,它们与其他蛋白相互作用,在该网络中发挥了关键作用。其中 STAT3 是度值最高的。

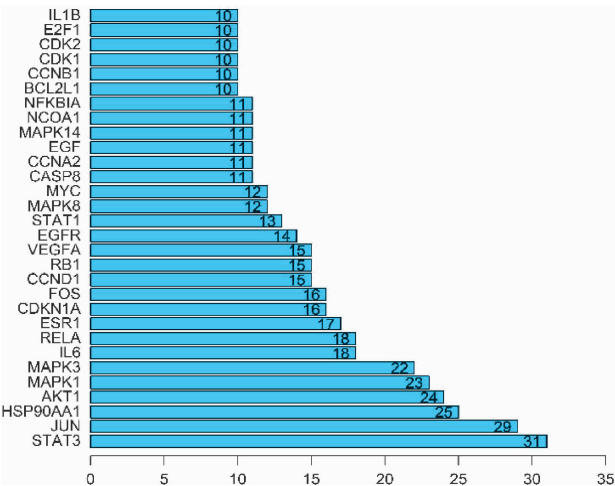
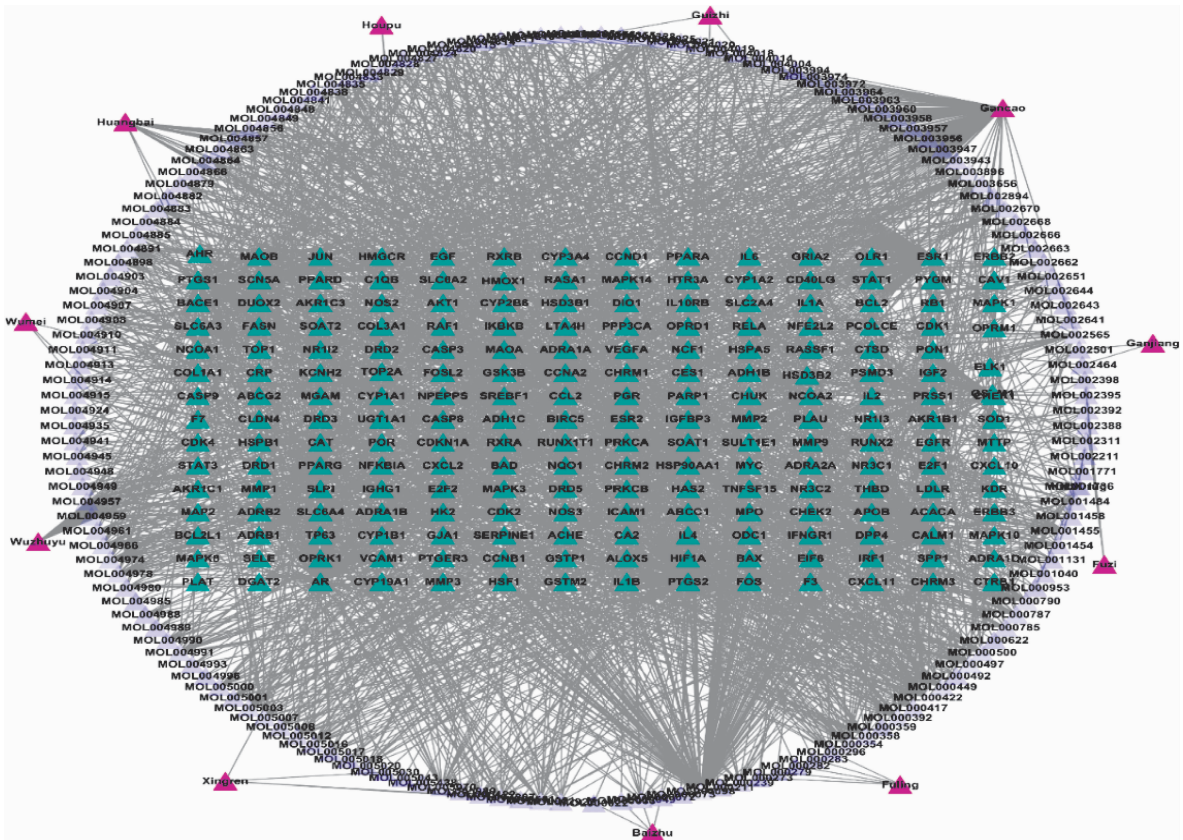


图 2 “温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝癌的 PPI 网络关键靶蛋白

2.4 “中药-化合物-治疗靶点”网络图构建及分析 将 TCMSP 数据库筛选得到 253 个有效成分及 2.2 中获得的交集基因上传至 Cytoscape3.7.2 软件构建“中药-化合物-治疗靶点”网络图(见图 3)。

在中药-化合物-治疗靶点”网络图上采用 Cyto Hubba 插件进行分析,根据 degree 值选取网络中排列前 15 位的关键靶点及关键活性成分(见表 1)。



注：粉色节点表示中药，蓝色节点代表疾病潜在的靶点，紫色代表药物活性成分

图 3 “温升三阴，肃金秘阳法”治疗肝癌的“中药-化合物-治疗靶点”图

表 1 “温升三阴，肃金秘阳法”治疗肝癌中根据 degree 值排列的前 15 个化合物及靶点信息		
TOP 15 in network		
Rank	Name	Score
1	MOL000098	320
2	PTGS2	257
3	ESR1	47
4	AR	37
5	NCOA2	35
6	MOL000296	22
7	PTGS1	19
8	MOL004328	18
9	PGR	15
10	KCNH2	12
11	MOL000049	12
12	MOL000449	7
13	MOL000354	7
14	CHRM3	7
15	MOL000422	6

2.5 “温升三阴，肃金秘阳法”下 4 个不同治法的关键活性成分及核心作用靶点

2.5.1 4 个不同治法的关键活性成分 将“温升三阴，

肃金秘阳法”4 个不同治法下的药物活性成分及靶点导入 Cytoscape3.7.2，用 Cyto Hubba 插件分析每个治法网络中的关键成分，根据 degree 值分别选取各个网络中排名前 4 位的关键活性成分(见表 2–表 5)。

2.5.2 4 个不同治法网络下关键活性成分与靶点的关系 为了进一步分析不同网络中活性成分与靶点的关系，据 Cyto Hubba 插件中的 degree 值，取网络中排名前 12 的核心信息。见图 4–图 7。

2.6 GO 富集分析结果 将 210 个关键靶点通过 DAVID 数据库进行 GO 富集分析，其中 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、信号转导、氧化还原过程、药物反应、凋亡过程、炎症反应等是 BP(生物进程)分析中靠前的条目(见图 8)。提示“温升三阴，肃金秘阳法”在治疗肝癌过程中通过参与调控多种生物学过程而发挥作用。

2.7 KEGG 富集分析结果 通过 KEGG 通路富集分析，取“温升三阴，肃金秘阳法”显著发挥影响的 30 条通路(见图 9)。结果显示，其治疗肝癌的机制主要涉及癌症信号通路、PI3K/Akt 信号通路、Hepatitis B 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路(见图 10)等。

表 2 “温升三阴”网络中排名前 4 活性成分

治法	温升三阴				
方剂	吴茱萸四逆汤(吴茱萸、附子、干姜、甘草)				
药物	序列号	成分	OB(%)	DL	Degree
甘草	MOL000098	槲皮素(querletin)	46.43	0.38	282
吴茱萸	MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	49.62	0.31	58
干姜 吴茱萸	MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75	56
甘草	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	54

表 3 “温阳健脾”网络中排名前 4 活性成分

治法	温阳健脾				
方剂	苓桂术甘汤(茯苓、白术、桂枝、甘草)				
药物	序列号	成分	OB(%)	DL	Degree
甘草	MOL000098	槲皮素(querletin)	46.43	0.38	141
甘草	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	54
甘草	MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone(7-甲氧基-2-甲基异黄酮)	42.96	0.2	37
甘草	MOL000392	芒柄花素(formononetin)	69.67	0.21	31

表 4 “肃金”网络中排名前 4 的活性成分

治法	肃金				
方剂	杏仁、厚朴、乌梅				
药物	序列号	成分	OB(%)	DL	Degree
乌梅	MOL000098	槲皮素(querletin)	46.43	0.38	140
乌梅	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	41.88	0.24	55
乌梅	MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75	28
乌梅 杏仁	MOL000449	豆甾醇(Stigmasterol)	43.83	0.76	27

表 5 “秘阳法”网络中排名前 4 的活性成分

治法	秘阳法				
方剂	封髓丹(黄柏、砂仁、甘草)				
药物	序列号	成分	OB(%)	DL	Degree
甘草 黄柏	MOL000098	槲皮素(querletin)	46.43	0.38	141
黄柏	MOL000790	异紫堇杷明(Isocorypalmine)	35.77	0.59	31
黄柏	MOL001455	四氢小檗碱(S-Canadine)	53.88	0.77	28
甘草 黄柏	MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	36.91	0.75	28

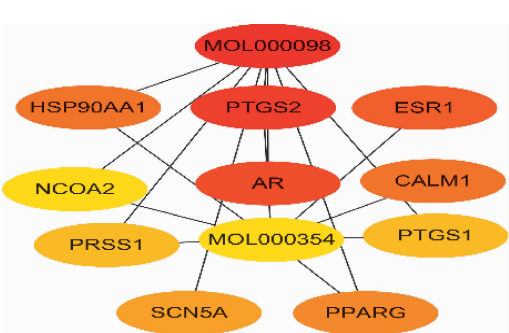


图 4 “温升三阴法”网络核心信息图

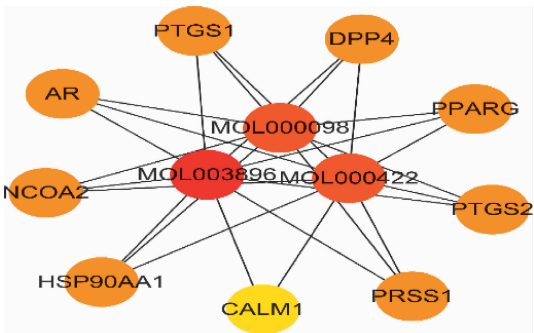


图 5 “温阳健脾”网络核心信息图

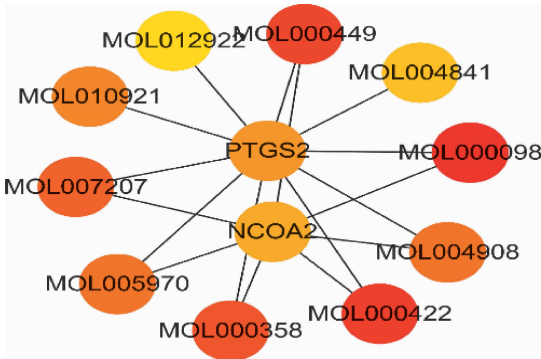


图 6 “肃金”网络核心信息图

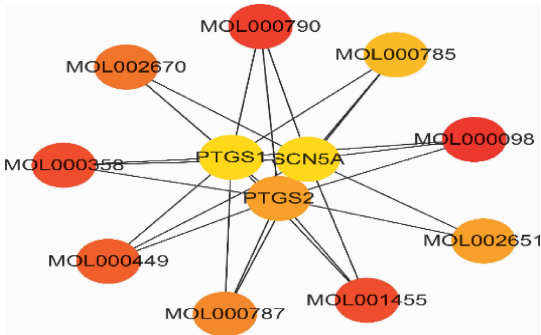
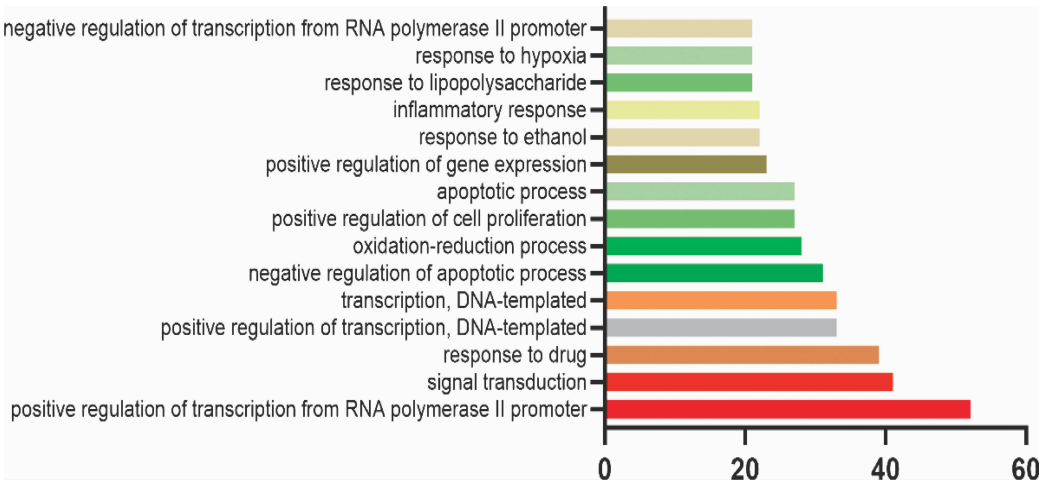
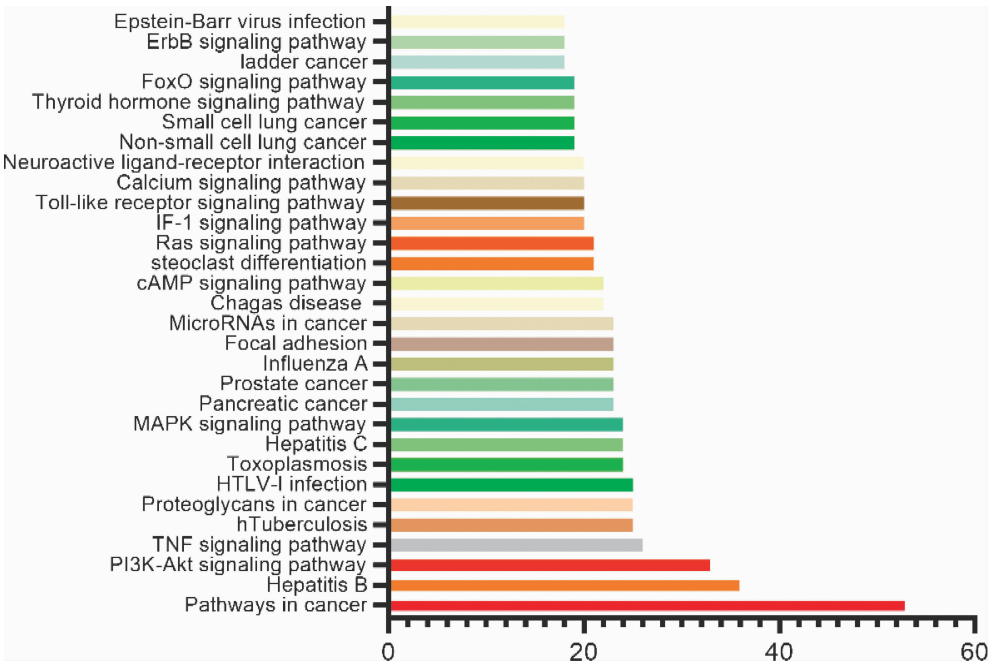


图 7 “秘阳法”网络核心信息图



注：图中纵坐标为 GO 富集中排名靠前的生物进程(BP)，横坐标代表富集基因数

图 8 生物进程(BP)富集分析图



注：横坐标为该通路所富集的基因数，富集基因数越多说明此条通路的作用越大

图 9 KEGG 信号通路富集图

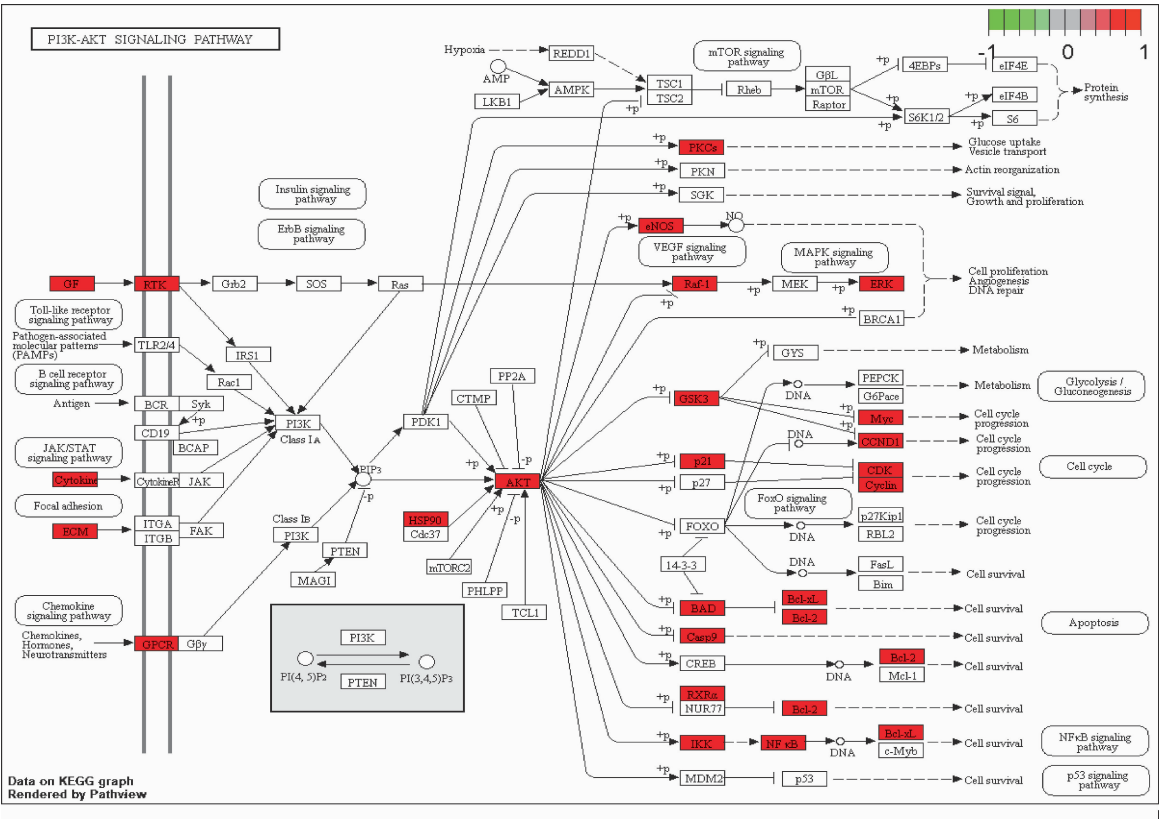
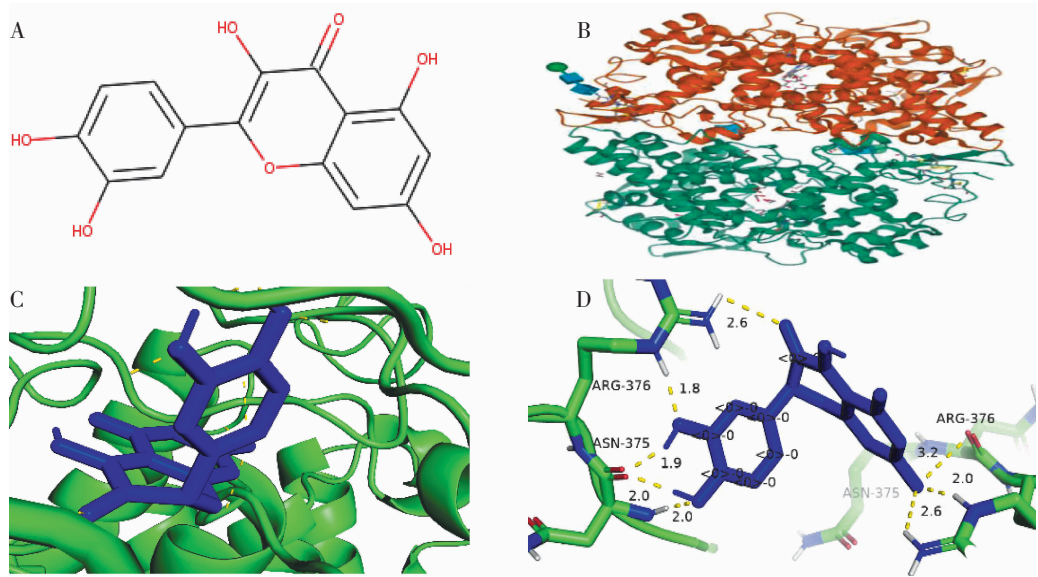


图 10 “温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝癌的 PI3K/Akt 信号通路图

2.8 分子对接 在“温升三阴,肃金秘法”的每个治法网络中,MOL000098 槲皮素(querctetin)为 4 个治法共同的活性成分也是预测靶点最多的.PTGS2 为中药调控网络中 degree 值最大的靶点,同时也是四个治法网络中排名靠前的核心靶点之一。因此,将二者选

为分子对接的配体和受体。在 PDB 上检索到 PTGS2 蛋白 ID 为 5f19 并下载其 3D 结构。分子对接结果显示槲皮素(querctetin)能稳定地对接到 PTGS2 蛋白结构 5f19 中,二者通过氨基酸残基 ARG-376,ASN-375 相互发生作用。



注:A.槲皮素的结构;B.人类 PTGS2 晶体结构,命名为 5f19;C.槲皮素与 PTGS2 的对接;D.槲皮素与 PTGS2 通过 4 个氨基酸残基发生潜在相互作用。

图 11 核心靶点的分子对接

3 讨论

“温升三阴,肃金秘阳法”旨在恢复三阴脏寒所致的气机圆运失常。在此法中,运转的圆运动由“中土为轴,金木水火四象为轮”共同构成。少阴肾为命门之火,其温煦及气化的作用是圆运动的动力,脾居中央是气机升降之枢纽,脾阳旺盛带动圆运动中轴的运行,肝木升发标着圆运动正常启功、运行^[1]。四逆汤为补火助阳,回阳救逆之要方。吴荣祖教授认为四逆汤中之附子主要用于升举足少阴肾的阳气,作用十分重要;干姜用以温中散寒,炙甘草用以补土以伏火,二药共用,共同升举足太阴阳气;吴茱萸,性温,入肝经,可通过温散厥阴之寒达到升足厥阴肝阳气的作用。故“温升三阴法”在治疗上即体现在吴茱萸四逆汤上。彭子益所著的《圆运动之古中医学》中云:“杏仁降肺金,开敛结以降肺火,肺金降则相火便降”;“厚朴降胆理胃^[11]”,说明了杏仁、厚朴降肺金、胃土、胆火之用,在此取之以“肃金”之意。《素问·生气通天论》云:“凡阴阳之要,阳密乃固”,只有肾中之水将命门之火潜藏其中才是实质意义上的温阳^[12]。故而吴荣祖教授认为“温阳”需与“秘阳”共举,创“秘阳法”。“秘阳法”是针对“肾阳虚衰,相火不密”而创以“温水潜阳,引火归元”的一种治疗方法^[13]。此处取“黄柏、砂仁、甘草”三味药。苓桂术甘汤可温健中轴脾阳以化饮,消散三阴脏寒停滞之寒饮^[1]。故,药物吴茱萸、附子、干姜、甘草、茯苓、白术、桂枝、杏仁、厚朴、乌梅、黄柏、砂仁共同构建了“温升三阴、肃金秘阳”的大法。

本研究运用网络药理学方法对“温升三阴,肃金秘阳法”下各个不同治法抗肝癌作用进行研究。全网络共筛选出210个潜在治疗靶点,利用STRING数据分析平台得出PPI靶点互作网络中STAT3、JUN、HSP90AA1、AKT1是治疗的核心靶点。STAT3作为信号转导及转录激活因子家族成员,在肝癌的炎症微环境中发挥重要作用。STAT3不仅参与肝癌的“炎癌转化”,还可直接调控肝癌细胞内与增殖、侵袭、转移相关的基因表达,甚至与肝癌血管生成和免疫抑制有关^[14-15]。STAT3被磷酸化后由细胞质转移至细胞核,通过对Mcl-1、Bcl-xl、c-myc和Survivin基因表达的调控,促进细胞周期,抑制细胞凋亡^[16]。c-Jun是细胞增殖过程中的一种重要转录因子,可通过拮抗抑癌基

因p53的活性,抑制肝癌细胞凋亡^[17]。c-Jun在HBV相关肝癌的发生过程中发挥重要作用,有研究表明被敲除c-Jun的HBV小鼠,其肿瘤生长受到了抑制^[18]。热休克蛋白90a(HSP90AA1)与肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移和血管生成有密切关系^[19]。有研究发现^[20]HSP90AA1的mRNA随着肝癌TNM分期升高,其表达量随之升高。AKT是本文PPI网络中核心治疗靶点之一,是PI3K/Akt信号通路中重要的下游靶标,被磷酸化激活后的AKT是原发性肝癌预后不良的危险因素^[21]。异常激活的AKT可存在于多种癌症中,参与癌细胞的代谢,抑制癌细胞凋亡,促进癌细胞增殖以及血管生成^[22]。抑制AKT以及磷酸化AKT的表达水平有助于阻滞细胞周期,促进肝癌细胞的凋亡^[23]。

通过网络发现,槲皮素不仅是“温升三阴,肃金秘阳法”治疗肝癌网络中度值最高的也是4个治法下度值最高的活性成分。山柰酚是“温升三阴”、“温阳健脾”以及“肃金”3个治法的共有关键成分。 β -谷甾醇是“温阳健脾”、“肃金”以及“秘阳”法的共有关键成分。现代研究证明槲皮素是黄酮类化合物的主要成分,对肝癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌等多种恶性肿瘤均有抑制作用。将槲皮素作用于人肝癌细胞株Hep3、Huh7、HepG2,其结果显示槲皮素可诱导肝癌细胞凋亡^[24-25]。也可以降低自由基等损伤产物水平以发挥保肝作用^[26]。有研究采用人肝癌LM3模型和裸鼠肝癌模型来观察槲皮素对肝癌的作用,其结果表明槲皮素可抑制肝癌的发展,机制可能是通过作用于JAK2/STAT3信号通路以调节细胞凋亡、侵袭、迁移和自噬^[27]。也有研究表明槲皮素可以抑制被生长因子磷酸化的AKT,从而抑制AKT信号通路诱导的肝癌细胞迁移^[28]。“自噬细胞死亡”被认为是持续的自噬激活而导致的细胞死亡。山柰酚可诱导HepG2肝癌细胞非凋亡性死亡,其原因可能是诱导肝癌细胞自噬激活^[29]。有实验证明, β -谷甾醇可以上调Bax的表达,下调Bcl-2的表达来促进肝癌细胞HepG2的凋亡^[30]。此外,李庆勇^[31]等人发现 β -谷甾醇和豆甾醇具有抑制肝癌细胞SMMC-7721的增殖和诱导其凋亡的作用。

PTGS2是本文中药调控网络中degree值最大的靶标,在分子对接中亦与槲皮素稳定结合。PTGS2是PTGS诱导型基因中的一种,PTGS2也称环氧合酶2

(COX-2)。有研究报道 PTGS2 在肝癌中高表达^[32],此外谢咏梅^[33]等人,用 western blot 检测肝炎、肝硬化、癌前病变及肝癌手术标本的 COX-2 蛋白表达含量,其结果表明在肝硬化组织中 COX-2 呈现峰值,表明 COX-2 可能诱导肝硬化发生癌变。相关研究证明^[34]美洛昔康作为一种选择性环氧合酶 2 抑制剂,在体外和体内均具有抗肝癌细胞增殖和抗血管生成的作用,其机制可能是通过降低 HIF-1 α 的转录激活和表达从而抑制肝癌细胞血管生成,促进细胞凋亡。

综上所述,“温升三阴,肃金秘阳法”具有多成分、多靶点、多通路治疗肝癌的作用模式,其作用的机制可能是通过槲皮素等多种有效成分作用于 PTGS2、STAT3、AKT 等蛋白调控信号转导,诱导细胞凋亡,以及调控多种生物学功能和 PI3K/Akt、TNF 等信号通路发挥抗肝癌作用。从分子水平揭示该治疗大法治疗肝癌的潜在化学成分及潜在作用机制,为下一步深入实验验证提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 姜莉云,吴文笛,许云姣,等. 基于吴荣祖“升举三阴法”的临床辨治探赜[J]. 辽宁中医杂志,2020,47(5):52-56.
- [2] 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.
- [3] 刘泽宇,万宇翔,黄金昶. 当归四逆汤治疗肝细胞癌作用机制的网络药理学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):185-192.
- [4] 何小娟,李健,陈杲,等. 基于病证结合的中药网络药理学研究与新药研发策略 [J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(11):1271-1273.
- [5] 石璐,孙文燕. 基于网络药理学探讨芍药甘草汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 中草药,2020,51 (24):6246-6257.
- [6] RU J L,LI P,WANG J A,et al. TCMSP:a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform,2014,6:13.
- [7] UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D506-D515.
- [8] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards Suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016,54:1. 30. 1-1. 30. 33.
- [9] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCHIETTEGATTE F, et al. OMIM. org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders[J]. Nucleic Acids Res,2015,43:D789-D798.
- [10] SZKLARCZYK D,GABLE A L,LYON D,et al. STRING v11:protein-protein association networks with increased coverage,supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res,2019, 47(D1):D607-D613.
- [11] 彭子益.《圆运动的古中医学》[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:127.
- [12] 吴文笛. 吴荣祖主任医师温阳扶正学术思想及经验总结[D]. 昆明:云南中医学院,2015.
- [13] 蔡悦青,魏炜,姜莉云. 姜莉云教授运用“秘阳法”辨治验案举隅[J]. 成都中医药大学学报,2019,42(1):19-21.
- [14] 音金萍,岳紫晨,卓少元. STAT3:慢性炎症介导肝癌进程的关键分子 [J]. 临床肝胆病杂志,2020,36 (4):948-952.
- [15] LEE C,CHEUNG S T. STAT3:an emerging therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. Cancers (Basel), 2019;11(11):1646.
- [16] BUETTNER R,MORA L B,JOVE R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention[J]. Clin Cancer Res,2002, 8(4):945-954.
- [17] EFERL R,RICCI R,KENNER L,et al. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53[J]. Cell,2003,112(2):181-192.
- [18] TRIERWEILER C,HOCKENJOS B,ZATLOUKAI K,et al. The transcription factor c-JUN/AP-1 promotes HBV-related liver tumorigenesis in mice[J]. Cell Death Differ, 2016,23(4):576-582.
- [19] 孔巧巧,邹志强. 热休克蛋白 90 α 与原发性肝癌关系的研究进展[J]. 滨州医学院学报,2016,39(4):289-290.
- [20] 徐庆年,陆云飞,汤伯宗,等. HBV 相关肝细胞癌肿瘤组织中热休克蛋白 mRNA 表达水平与肿瘤分期的相关性分析[J]. 临床肝胆病杂志,2017,33(5):869-874.
- [21] NAKANISHI K,SAKAMOTO M,YAMASAKI S,et al.

- Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 103(2):307–312.
- [22] WANG Y W, LIN K T, CHEN S C, et al. Overexpressed-eIF3I interacted and activated oncogenic Akt1 is a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2013, 58(1):239–250.
- [23] LIU J S, HUO C Y, CAO H H, et al. Aloperine induces apoptosis and G2/M cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells through the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61:152843.
- [24] 陈兆勋, 高彦宇, 李冀. 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 细胞凋亡的影响[J]. *中医杂志*, 2015, 56(12):1051–1053.
- [25] 周孟, 廖祥明, 王珊, 等. 槲皮素抑制人肝癌细胞 HepG2 的体内外活性研究[J]. *安徽医药*, 2019, 23(11):2136–2141.
- [26] 刘姝. 急性酒精性肝损伤中槲皮素抗氧化应激及抗炎作用交互影响的机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学, 2018: 1–75.
- [27] 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.
- [28] YAMADA N, MATSUSHIMA-NISHIWAKI R, KOZAWA O. Quercetin suppresses the migration of hepatocellular carcinoma cells stimulated by hepatocyte growth factor or transforming growth factor- α : Attenuation of AKT signaling pathway[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020, 682: 108296.
- [29] HAN B, YU Y Q, YANG Q L, et al. Kaempferol induces autophagic cell death of hepatocellular carcinoma cells via activating AMPK signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49):86227–86239.
- [30] 张忠泉, 邢煜君, 胡国强, 等. β -谷甾醇诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(15):2145–2148.
- [31] 李庆勇, 姜春菲, 张黎, 等. β -谷甾醇、豆甾醇诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(5):1173–1175.
- [32] HUANG M S, WANG L, CHEN J W, et al. Regulation of COX-2 expression and epithelial-to-mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor-1 α is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients post TACE surgery[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5):2144–2154.
- [33] 谢咏梅, 李肖, 严律南, 等. 生长抑素、环氧合酶-2 在肝癌发生发展中的变化及意义[J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2015, 46(5):710–716.
- [34] ZHOU Y H, DONG X F, XU P, et al. Meloxicam, a Selective COX-2 Inhibitor, Mediates Hypoxia-Inducible Factor-(HIF-1 α) Signaling in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:7079308.