

引用:梁楠,李峥,程紫轩,孙异强,牛杜升,黄博.当归四逆汤加吴茱萸生姜汤及其核心成分山柰酚对肝癌机制的研究[J].中医药导报,2025,31(7):16-24.

# 当归四逆汤加吴茱萸生姜汤及其核心成分山柰酚对肝癌机制的研究

梁楠,李峥,程紫轩,孙异强,牛杜升,黄博  
(山西医科大学附属山西省人民医院,山西太原 030012)

**[摘要]** 目的:基于网络药理学、分子动力学模拟及免疫组化探究当归四逆汤加吴茱萸生姜汤(DSJWST)抗肝癌的作用机制。方法:借助中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)对DSJWST所含8味中药的活性成分及潜在靶点进行筛选,整合GeneCards、OMIM、TCGA等数据库资源,获取与肝癌相关的靶点信息,再通过韦恩图分析,精准确定药物-疾病的交集基因。利用String数据库构建蛋白互作(PPI)网络,直观展示靶点间的相互作用关系,并采用Cytoscape软件中的MCC算法识别DSJWST抗肝癌关键靶标,进一步筛选核心成分。通过基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)对靶蛋白功能和相关通路进行富集分析,挖掘DSJWST抗肝癌的潜在分子机制。同时,借助Cytoscape构建“药物-核心成分-核心靶点”网络,呈现药物、成分与靶点之间的内在联系。采用Pymol插件和GROMACS 2016.4软件,开展分子对接及分子动力学模拟实验,从分子层面探究DSJWST活性成分与靶标的结合特性及稳定性。最后,通过免疫组化实验,对肝癌关键靶点表达及其与临床预后的相关性进行验证。结果:经筛选,共获得1 599个活性成分和4 124个肝癌相关靶点,确定了166个交集靶点。通过PPI网络筛选出10个关键靶标,包括IL6、TNF、STAT3、IL1B、AKT1、IFNG、TP53、NFKBIA、JUN和CASP3。KEGG富集分析显示,DSJWST治疗肝癌主要涉及AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路、TNF信号通路及HIF-1信号通路等。分子对接结果显示,DSJWST的10个活性组分与7个靶标的对接结合能均小于-5.0 kcal/mol,表明两者具有一定的结合活性。之后,选取结合能最高的山柰酚与CASP3进行分子动力学模拟,结果表明,在与山柰酚的结合过程中CASP3结构趋于稳定。免疫组织化学实验证实,CASP3在肝癌组织中呈低表达状态,且与良好预后相关。结论:DSJWST可能通过靶向CASP3,进而介导AGE-RAGE信号通路的激活,发挥抑制肝癌进展的作用。

**[关键词]** 肝癌;当归四逆汤加吴茱萸生姜汤;网络药理学;分子动力学模拟;CASP3

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)07-0016-09

**DOI:** 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.07.003

## Research on the Mechanism of Danggui Sini Tang Jia Wuzhuyu Shengjiang Tang (当归四逆汤加吴茱萸生姜汤) and Its Core Component Kaempferol on Liver Cancer

LIANG Nan, LI Zheng, CHENG Zixuan, SUN Yiqiang, NIU Dusheng, HUANG Bo

(Shanxi Provincial People's Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan Shanxi 030012, China)

**[Abstract]** Objective: To investigate the mechanism of Danggui Sini Tang Jia Wuzhuyu Shengjiang Tang (DSJWST) in combating liver cancer based on network pharmacology, molecular dynamics simulation, and immunohistochemistry. Methods: The active components and potential targets of the eight herbs in DSJWST were screened using the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Liver cancer-related targets were obtained from the GeneCards, OMIM, and TCGA databases, and the drug-disease intersection genes were identified through a Venn diagram. The String database was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network, and the MCC algorithm in Cytoscape software was employed to identify key targets of DSJWST against liver cancer and to screen core components. The functions and pathways of the target proteins were analyzed through gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses. A "drug-core component-core target" network was constructed using

\*基金项目:山西省自然科学研究面上项目(202103021224381)

通信作者:黄博,男,教授,主任医师,研究方向为肝胆胰疾病、肝移植、胃肠疾病、疝与腹部疾病

Cytoscape. Molecular docking and molecular dynamics simulations were performed using the Pymol plugin and GROMACS 2016.4 software. Finally, immunohistochemical experiments were conducted to validate the expression of key liver cancer targets and their correlation with clinical prognosis. Results: A total of 1 599 active components and 4 124 liver cancer-related targets were screened, resulting in 166 intersection targets. Through the PPI network, 10 key targets were selected, including IL6, TNF, STAT3, IL1B, AKT1, IFNG, TP53, NFKBIA, JUN, and CASP3. KEGG enrichment analysis revealed that the treatment of liver cancer by DSJWST was primarily associated with the AGE-RAGE signaling pathway, IL-17 signaling pathway, TNF signaling pathway, and HIF-1 signaling pathway. Molecular docking results showed that the docking binding energies of the 10 active components of DSJWST and 7 targets were all below -5.0 kcal/mol, indicating significant binding activity. Subsequently, kaempferol, which exhibited the highest binding energy, was selected for molecular dynamics simulation with CASP3. The results demonstrated that the structure of CASP3 tended to stabilize during its binding process with kaempferol. Meanwhile, immunohistochemical experiments confirmed that CASP3 was lowly expressed in liver cancer tissues and that it was associated with a favorable prognosis. Conclusion: Danggui Sini Tang Jia Wuzhuyu Shengjiang Tang may inhibit the progression of liver cancer by targeting CASP3 and subsequently mediating the activation of AGE-RAGE signaling pathway.

[Keywords] liver cancer; Danggui Sini Tang Jia Wuzhuyu Shengjiang Tang; network pharmacology; molecular dynamics simulation; CASP3

肝癌作为一种常见的恶性肿瘤,是全球范围内第六大常见的癌症,也是第三大常见癌症死亡原因<sup>[1-2]</sup>。尽管新辅助治疗手段在中晚期肝癌的临床治疗中取得了显著效果,但该治疗方式伴随的不良反应问题却较为突出,给患者带来了较大痛苦与负担。因此,开发疗效确切且毒副作用轻微的肝癌治疗药物,已成为当前肿瘤医学领域亟待解决的重要任务。

天然化合物凭借低毒性、易获取的特点,已在医学界引发广泛关注<sup>[3]</sup>。传统中药作为天然化合物的重要来源,具有适用性广、可靠性高及毒副作用小等显著优势<sup>[4-5]</sup>,且在抗肿瘤领域展现出强大的应用潜力<sup>[6-7]</sup>。当归四逆汤作为中医经典方剂,在肝癌治疗方面已彰显出重要功效。方中当归与甘草是发挥抗肝癌作用的核心成分<sup>[8]</sup>,其余药材相互协同增效。当归配桂枝能养肝血,祛寒邪;白芍疏肝理气,可有效缓解肝郁;细辛有助于补肝阳;通草能利尿渗湿,间接支持肝脏功能正常;甘草既调和诸药,又可保肝。在中药联合疗法成为肿瘤治疗领域重要发展趋势的背景下,当归四逆汤加吴茱萸生姜汤(Danggui-Sini-Jia-Wuzhuyu-Shengjiang-Tang, DSJWST)已在多种肿瘤治疗中展现出良好疗效,如胰腺癌<sup>[9]</sup>、结肠癌<sup>[10]</sup>、胃癌<sup>[11]</sup>及肝癌<sup>[12]</sup>等恶性肿瘤。然而,目前DSJWST发挥抗肿瘤作用的具体机制仍未完全明晰,亟待深入研究。

因此,本研究旨在深入探讨DSJWST抗肝癌的作用机制,通过网络药理学、分子对接及分子动力学模拟等多种技术手段,预测并验证DSJWST治疗肝癌的活性成分、相关靶蛋白及潜在分子机制。此外,本研究还将针对关键靶点的临床病理特征展开详细分析,为全方位、系统性阐明DSJWST的抗肝癌作用机制提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学分析

1.1.1 中药活性成分及相关靶点筛选 使用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>),

对当归四逆汤加吴茱萸生姜汤(药物组成:当归、桂枝、白芍、细辛、通草、大枣、吴茱萸、生姜)的有效活性成分进行筛选,设定筛选条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug-like, DL)≥0.18。将筛选出的药物活性成分在TCMSP数据库中查找相应靶点。

1.1.2 中药成分及靶点的进一步筛选 首先,将筛选出的相关靶点对应的化学成分复制到TCMSP数据库中,查找每个成分对应的Mol ID,并记录其CAS号。然后,根据记录的CAS号,在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索对应的化学成分,获取其SMILES号。接着,将获取的SMILES号上传至SwissADME数据库(<http://www.swissadme.ch/>),查看预测的胃肠吸收度是否达到“high”,以及药物相似性(drug likeness)是否大于等于2个“yes”水平,剔除未达到这2个标准的结果。最后,将剩余符合标准的靶点信息进行规范化处理,转换为symbol ID。

1.1.3 疾病靶点的筛选 分别利用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM数据库(<https://mirror.omim.org/>),以及TCGA数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>),以“liver cancer”为检索词,收集肝癌的相关靶点。

1.1.4 中药-疾病交集靶点的筛选 依次将已搜寻的中药靶点及疾病靶点上传至Venny 2.1绘图数据库(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)中,绘制韦恩图得到交集靶点。

1.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)分析 将中药-疾病的交集靶点上传至String数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建PPI网络,并将物种选择为智人,删除无关靶点。把从String数据库中得到的数据导入Cytoscape v.3.10.1进行蛋白互作分析,使用cytohubba插件,运用MCC方法实施定性分析。MCC方法通过计算蛋白质相互作用网络中每个节点(靶点)的拓扑特性,来评估其重要程度。依据MCC值的高低,对靶点进行排序筛选,进而精确定位在肝细胞癌发生发展进程中起关

键作用的Hub基因,即核心靶点。以筛选出的核心靶点为依据,反向追溯与之对应的中药成分。通过梳理中药成分与核心靶点之间的对应关系,筛选出关联核心靶点的成分。

1.1.6 GO与KEGG通路富集分析 使用基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)对这些交集靶点开展富集分析,探索所有潜在靶点的核心机制和途径。借助R程序包中的“clusterProfiler”和“pathview”工具,对DSJWST与肝癌的交集靶点进行GO和KEGG通路富集分析。GO功能富集由细胞成分(cellular component,CC)、分子功能(molecular function, MF)及生物过程(biological processes, BP)3个维度展开。使用微生物绘图网站 (<https://www.bioinformatics.com.cn/login/>)<sup>[13]</sup>对分析所生成的图片进行格式化处理。

1.1.7 构建“药物-核心成分-核心靶点”网络 将DSJWST的药材、核心成分、核心靶点导入Cytoscape v.3.10.1软件,构建“药物-核心成分-核心靶点”网络图。

1.1.8 分子对接 首先,通过Pubchem数据库下载DSJWST核心成分结构的mol2格式三维文件,将其导入Chem3D软件,运用MM2算法对核心成分进行能量最小化操作。然后,通过PDB数据库下载Hub基因编码的蛋白结构的PDB格式文件。接着,将经前期处理的核心成分与Hub基因编码的蛋白结构文件导入Pymol2.5.0软件,使用插件Docking Pie1.2<sup>[14-15]</sup>开展分子对接计算。最后,依据所得结合自由能数值对计算结果进行排序。

1.1.9 分子动力学 从PDB数据库获取的靶点蛋白(受体)PDB文件可能存在结构缺失或不完整的情况。因此,需要先对靶点蛋白(受体)的PDB文件中的数据进行检查和预处理,再使用spdbv软件对靶点蛋白的结构进行补齐操作。对于小分子物质(配体),则通过ACPYPE(<https://www.bio2byte.be/acpype/submit/>)进行处理,选择采用GAFF2(General Amber Force Field 2)作为小分子力场参数。GAFF2力场是一种广泛应用于分子动力学模拟的力场,它能够较为准确地描述小分子的分子结构和相互作用。对靶点蛋白(受体)和小分子物质(配体)的上述处理步骤,能够为进一步的分子动力学研究,如模拟配体与受体之间的相互作用过程、探索分子的动态行为等,提供高质量的结构模型和准确的力场参数,从而更深入地了解DSJWST抗肝癌的分子机制。

本研究使用GROMACS 2016.4软件进行分子动力学模拟<sup>[16-17]</sup>,模拟过程中采用Amber ff99SB力场和TIP3P水模型进行相关计算。首先,将包含靶点蛋白(受体)与小分子物质(配体)的体系放置于立方体的溶剂盒子内,为确保模拟的准确性和稳定性,严格保证体系内原子到盒子边缘的距离不小于10 Å,随后向溶剂盒子中加入SPC216水作为溶剂。通过向系统中添加Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>离子对来平衡电荷,添加适量的抗衡离子以确保整个体系呈电中性。接着采用最陡下降法和共轭梯度法依次对各体系进行能量最小化操作,使体系逐步达到收敛状态。然后对经过能量最小化的体系依次进行100 ps的NVT(等容等温)平衡和100 ps的NPT(等压等温)平衡。在NVT平衡阶段,使用V-rescale耦合方法将体系温度精确维持在300 K;在NPT平衡阶段,运用Berendsen方法将体系压力稳定维持在1 atm。最后,体系在相同的参数设置下,采用Parrinello-Rahman算法

进行100 ns的分子动力学模拟,并以10 ps为时间间隔保存快照至轨迹,以便用于后续深入分析。模拟结束后,对系统分子轨迹进行校正处理,去除可能存在的误差和异常数据。基于校正后的轨迹数据,进行全面的评估与计算。

1.1.10 结合自由能计算 在结合自由能的计算环节,本研究采用分子力学泊松玻尔兹曼表面积法(molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area,MM-PBSA)计算各体系的结合自由能。从动力学模拟时长为50 ns的平衡轨迹中,有针对性地采集100帧构象,用于结合自由能( $\Delta G$ )的计算。公式如下:

$$\Delta G = \Delta E_{\text{polar, total}} + \Delta E_{\text{nonpolar, total}}$$

$$\Delta E_{\text{polar, total}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{GB}}$$

$$\Delta E_{\text{nonpolar, total}} = \Delta E_{\text{vdw}} + \Delta E_{\text{SURF}}$$

$$E_{\text{SURF}} = \gamma \cdot \text{SASA}$$

根据MM-PBSA方法, $\Delta G$ 可表示为总极性性能( $\Delta E_{\text{polar, total}}$ )和总非极性性能( $\Delta E_{\text{nonpolar, total}}$ )之和,两者可进一步分解为 $\Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{GB}}$ 和 $\Delta E_{\text{vdw}} + \Delta E_{\text{SURF}}$ 。 $E_{\text{polar, total}}$ 包括静电相互作用能( $E_{\text{ele}}$ )和极性溶剂自由能( $E_{\text{GB}}$ ),其中 $E_{\text{GB}}$ 通过求解GeneralizedBorn(GB)方程获得; $E_{\text{nonpolar, total}}$ 包括范德华相互作用能( $E_{\text{vdw}}$ )和非极性溶剂自由能( $E_{\text{SURF}}$ ), $E_{\text{SURF}}$ 通过计算分子表面积(surface area,SA)得出。

## 1.2 免疫组化队列资料收集

1.2.1 研究对象 选取2021年1月至2024年3月山西医科大学第五临床医学院肝胆胰外科收治的104例原发性肝癌患者作为研究对象。本研究经山西医科大学第五临床医学院伦理委员会审批(批准号:2024省医科伦审字第860号)。

1.2.2 纳入标准、排除标准 (1)纳入标准:所有患者均为初次诊断为原发性肝癌;临床资料完整;患者自愿参与本研究并签署知情同意书。(2)排除标准:继发性肝癌患者;术后复发转移或行二次手术患者;合并其他部位恶性肿瘤;术前患者重大疾病明显影响术后恢复的患者。

1.2.3 免疫组化实验操作流程 (1)石蜡切片预处理。将石蜡切片依次进行脱蜡与水化处理,使用3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶。(2)抗原修复。采用高压锅进行抗原修复,按照高压锅操作说明,设置适当的压力和时间参数进行加热;加热结束后,迅速将高压锅置于流动水下快速冷却,使切片快速降温至室温;冷却后,将切片从高压锅中取出,用PBS缓冲液冲洗3次,每次冲洗3~5 min。(3)封闭及一抗孵育。滴加适量血清封闭30 min后直接加入CASP3抗体(浓度:1:1 000),置于4 °C环境内过夜孵育。(4)二抗孵育及冲洗。取出切片于室温环境平衡15~20 min后,用PBS缓冲液轻柔冲洗3次,5 min/次,以去除未结合的一抗。滴加相应的二抗(根据一抗种属来源选择合适的二抗,如抗兔IgG二抗等),二抗工作浓度按照产品说明书进行稀释。将二抗均匀覆盖在切片组织上,37 °C恒温孵育30 min,促进二抗与一抗的特异性结合。孵育结束后,再次用PBS缓冲液冲洗3次,5 min/次,去除未结合的二抗。(5)显色、复染及封片。进行DAB显色处理,苏木精复染细胞核后,依次进行脱水、透明及封片处理。(6)图片采集与分析。使用KFBIO.SlideViewer软件扫描染色的切片,利用Image-J软件中的IHCProfiler进行染色评分。在200倍视野下,每张切片随机选取3个视野,每个视野依据染色程度进行评分。评分标准

以阳性细胞的平均灰度值(即染色强度)为依据,通过特定软件算法计算出相应的IHC评分,计算公式为:High Positive $\times$ 3+Positive $\times$ 2+Low Positive $\times$ 1+Negative $\times$ 0。

1.3 统计学方法 两组间差异分析用Wilcoxon检验,多组间差异分析用Kruskal-Wallis(K-W)检验。Log-Rank检验比较两组或多组曲线之间的差异,采用Kaplan-Meier方法绘制生存曲线。采用Chi-Square检验和Fisher确切概率法检验不同亚型分组和高低表达组与临床病理特征变量之间的关系。单因素和多因素Cox回归模型用于确定肝癌的预后因素。所有统计分析均采用R4.1.3版本和SPSS 26.0版本, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

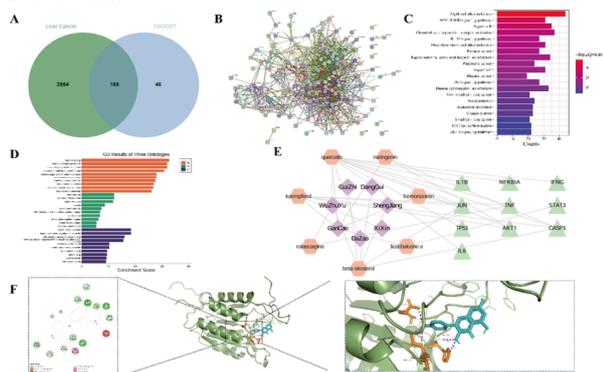
## 2 结 果

### 2.1 DSJWST的核心成分为山柰酚,靶点为CASP3

2.1.1 DSJWST有效成分及靶点 借助TCMSP及SwissADME数据库对DSJWST中的当归、桂枝、白芍、细辛、通草、大枣、吴茱萸、生姜这8味药的有效成分进行靶点预测分析,具体靶点获取情况为:当归27个、桂枝47个、白芍13个、细辛109个、甘草996个、大枣72个、吴茱萸306个、生姜29个。将所有药物靶点进行合并去重,最终得到1 599个作用靶点。

2.1.2 肝癌相关靶点筛选 通过GeneCards数据库进行检索,设定得分 $>10$ 的筛选条件,共获得2 372个作用靶点。同时,在TCGA数据库中,依据 $|LgFCI| \geq 2$ 的条件进行筛选,检索出1 401个作用靶点。另外,从OMIM数据库检索出519个作用靶点。完成上述检索后,对3个数据库的检索结果进行整合和去重,最终得到4 124个肝癌相关靶点。

2.1.3 中药-疾病共同靶点的获取 将DSJWST的1 599个药物预测靶点与肝癌的4 124个疾病靶点进行取交集操作,得到166个重叠的交集靶点,可被视为DSJWST治疗肝癌的潜在靶点。(见图1A)



注:A.韦恩图。B.PPI互作分析。C.排名前20的KEGG富集分析。每个节点的尺寸表示富集计数,横轴表示富集基因的数量,颜色表示根据 $-\log_{10}(P)$ 值的富集程度。D.排名前10的GO富集分析。横轴表示每个项目中的基因富集的数量,颜色分别表示BP、CC和MF。E.药物-核心成分-核心靶点图。

图 1 各网络药理学结果

2.1.4 PPI网络 为进一步明确交集靶点间的相互作用,本研究开展了PPI互作分析。根据MCC值,选取排名前10位的核心靶点,分别为白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、蛋白激酶B1(Akt1)、干扰素 $\gamma$ (IFNG)、肿瘤蛋白p53(TP53)、核

因子 $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (NFKBIA)、转录因子c-Jun(JUN)、半胱天冬酶3(CASP3)。通过对DSJWST中各成分与核心靶点的关联分析,筛选出拥有这些核心靶点的成分,即确定为核心成分。经筛选,核心成分包括山柰酚、槲皮素、柚皮素、 $\beta$ -谷甾醇、芒柄花黄素、甘草茶尔酮A、吴茱萸次碱。(见图1B)

2.1.5 GO与KEGG通路富集分析 KEGG通路富集分析结果显示,DSJWST治疗肝癌的潜在作用主要涉及多个关键信号通路,如AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路、TNF信号通路、HIF-1信号通路等。这些信号通路在肝癌的发生、发展以及肿瘤微环境的调控中起着至关重要的作用。此外,富集结果还涉及乙型肝炎、丙型肝炎以及化学致癌-受体活化等通路,提示DSJWST可能通过对这些相关疾病和致癌过程的干预,间接影响肝癌的进程。(见图1C)

交集靶点GO富集分析结果显示,CC主要涉及膜筏、质膜筏及RNA聚合酶II转录调控复合物。MF主要包括核受体活性、配体激活的转录因子活性及DNA结合转录因子结合等。BP包括对药物的反应、对化学应激的翻译及对氧化应激的反应等。(见图1D)

2.1.6 构建“药物-核心成分-核心靶点”网络 将8种药材、7种核心成分、10个核心靶点与肝癌导入Cytoscape v.3.10.1软件构建“药物-核心成分-核心靶点”网络。该网络包含24个节点和33条边。(见图1E)

2.1.7 分子对接 DSJWST的10个蛋白与7个蛋白配体的对接得分均小于 $-5$  kcal/mol,表明其具有较强的结合力,其中山柰酚与CASP3的结合能为 $-7.489$  kcal/mol。进行筛选比较之后,山柰酚与CASP3的对接结果最佳,因此选取CASP3为靶基因。(见表1)

2.1.8 分子动力学 根据分子对接结果及分子动力学的前期验证,本研究选取山柰酚与CASP3进行100 ns的MD模拟分析,研究山柰酚与CASP3间的相互作用情况及体系的动态性质,以明晰其分子运动、结构变化及能量变化。(见图1F)在分子动力学模拟过程中,通过对均方根偏差(root mean square deviation,RMSD)监测来评估体系的稳定性。结果显示:CASP3-山柰酚复合物体系RMSD值在0.4 nm处保持相对较为稳定的波动状态,而未结合山柰酚的CASP3体系的RMSD值波动在0.45 nm左右。说明CASP3-山柰酚复合物相较于未结合山柰酚的CASP3蛋白,具有更高的稳定性。(见图2A)

均方根涨落(root mean square fluctuation,RMSF)可以评估蛋白质中氨基酸残基的柔性大小。尽管2个体系的RMSF趋势呈现出一定的相似性,但CASP3-山柰酚复合物体系的柔性明显低于CASP3体系。通过进一步观察蛋白质二级结构后发现,CASP3-山柰酚复合物体系柔性降低显著的区域主要集中在Turn及 $\beta$ -Sheet区域。Turn结构和 $\beta$ -Sheet结构在维持蛋白质的空间构象和稳定性方面起着关键作用,其柔性变化对蛋白质的紧凑型结构有着重要影响。综上所述,小分子山柰酚能有效降低CASP3的柔性,进而稳定其结构,并可能借此改变CASP3的生物学功能。(见图2B)

溶剂可及表面积(Solvent accessible surface area,SASA)能够反映溶剂可接触的生物分子表面积情况。稳定状态下的CASP3-山柰酚复合物体系的SASA整体数值明显低于CASP3体

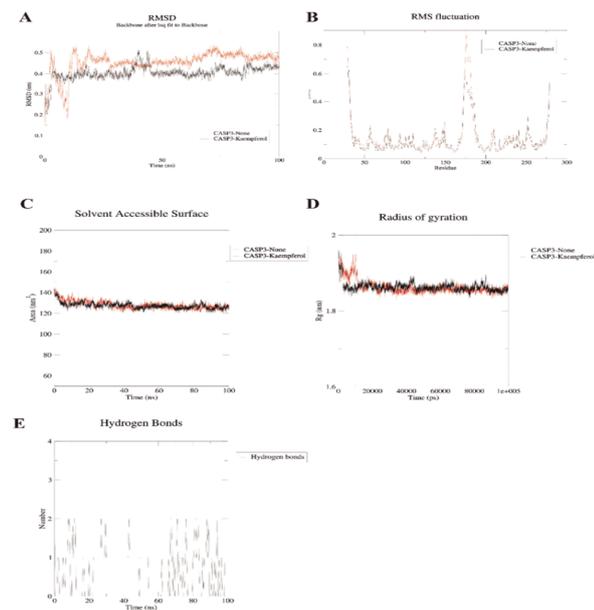
表1 分子对接结果

蛋白	PDB ID	配体	结合亲和力/(kcal/mol)	氢键	关联残基
JUN	1t2k	山柰酚	-5.091	0	-
		槲皮素	-5.198	2	ARG-227, GLU-275
		芒柄花黄素	-5.479	1	GLN-307
		β-谷甾醇	-5.876	0	-
NFKBIA	1nfi	槲皮素	-5.772	2	ARG-140, GLN-107
TNF	5yoy	山柰酚	-6.131	6	ALA-134, ASN-46, GLN-47, LYS-90
		槲皮素	-6.430	4	ASN-46, GLN-47, ILE-136
		吴茱萸次碱	-6.736	2	ALA-134, ASN-46
TP53	4mzi	槲皮素	-6.474	3	ASP-208, ARG-267
IL-1B	1itb	槲皮素	-6.494	3	ASN-7, TYR-90, PRO-87
IL-6	4cni	槲皮素	-6.948	6	ASN-103, ARG-104, ASP-160, GLN-152, GLN-156
STAT3	6t1c	甘草查尔酮A	-6.993	1	GLN-361
AKT1	3cqw	槲皮素	-7.133	8	ARG-147, ASN-231, TYR-175, TYR-229, LEU-213, LYS-214
		山柰酚	-7.161	1	LEU-156
IFNG	1eku	槲皮素	-7.206	2	ASN-97, THR-96
CASP3	6cl0	槲皮素	-6.455	3	ALA-227, ASP-228, LYS-224
		β-谷甾醇	-7.287	0	-
		山柰酚	-7.489	3	ARG-207, GLN-161, HIS-121

系。表明山柰酚与CASP3的结合导致CASP3蛋白质分子间作用力增强,且有更多的疏水性残基被埋藏在分子内部。(见图2C)

回旋半径(radius of gyration, ROG)能够有效表征蛋白质结构的紧实程度,其数值大小与蛋白结构的致密性密切相关,半径越小则意味着蛋白结构越致密,相应结构也更加稳定。2个体系的R<sub>g</sub>值稳定地维持在1.83~1.85 nm之间,说明两个体系均较为稳定。CASP3体系和CASP3-山柰酚复合物体系拥有相近的R<sub>g</sub>值,表明两体系均具有较高的结构稳定性。(见图2D)

氢键分析显示,CASP3与山柰酚形成的复合物在模拟过程中,氢键数量在0~2之间波动,大多数情况下维持在1~2个氢键。(见图2E)

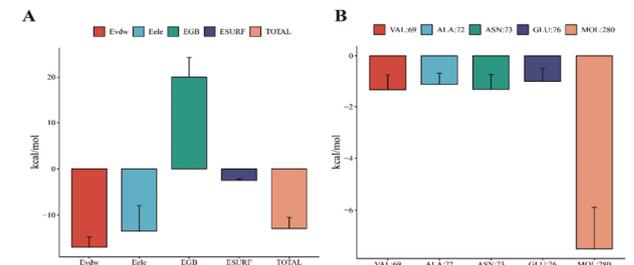


注:A.均方根偏差;B.均方根涨落;C.溶剂可及表面积;D.回旋半径;E.氢键分析。

图2 分子动力学模拟部分结果图

结合自由能分析表明,CASP3-山柰酚复合物体系的结合能为(-12.9±4.16) kcal/mol。体系的ΔE<sub>vdw</sub>和ΔE<sub>ESURF</sub>分别为(-16.96±3.91) kcal/mol和(-2.51±0.53) kcal/mol,ΔE<sub>ele</sub>也提供了(-13.47±9.6) kcal/mol的有利贡献,但完全被不利于山柰酚结合的极性溶剂化能ΔE<sub>GB</sub>[(20.05±7.33) kcal/mol]抵消,产生了不利于结合的总极性相互作用。总之,总非极性相互作用是CASP3-山柰酚复合物体系结合的主要驱动力,而总极性作用不利于结合。(见图3A)

结合自由能分解显示,山柰酚与CASP3的4个残基产生了低于0 kcal/mol的相互作用。分别是VAL:69, ALA:72, ASN:73, GLU:76。在这些残基中,VAL:69与山柰酚的结合力最强,结合能为(-1.34±1.06) kcal/mol,此外,山柰酚自身产生了(-7.5±2.79) kcal/mol的结合能。因此,VAL:69, ALA:72, ASN:73和GLU:76可以被认为是山柰酚与CASP3结合的关键残基。(见图3B)



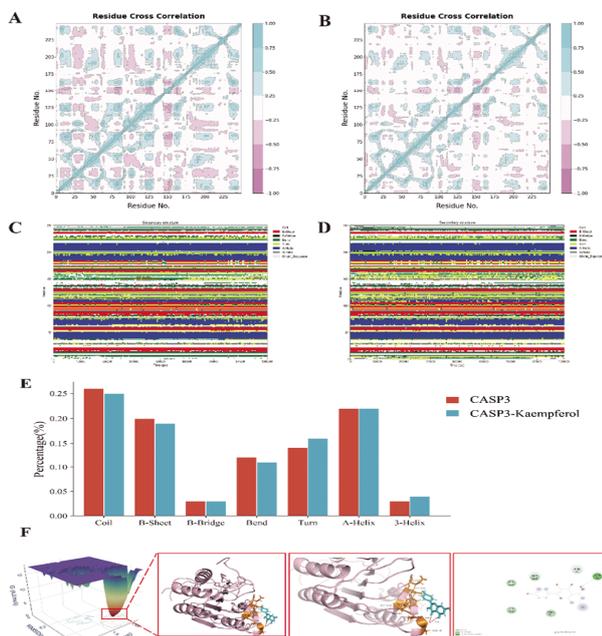
注:A.结合自由能分析;B.结合自由能分解。

图3 结合自由能分析结果图

动态互相关矩阵(DCCM)分析探究了山柰酚对CASP3原子运动性的影响。(见图4A、图4B)矩阵中对角线颜色表示残基的运动程度,蓝色部分(正值)代表残基间运动呈正相关,即残基间的动力学运动方向一致。而红色部分(负值)代表残基间的运动有负相关性,即残基间的动力学运动方向相反。对角线相关表明连续残基之间存在紧密的二级结构联系;非对角线相关表示非连续的残基结构之间存在运动相关。由图可

见,CASP3-山柰酚复合物体系蓝色区域较CASP3体系占比更多,表明CASP3-山柰酚复合物体系中残基运动具有更强的正相关性。

蛋白质二级结构计算了CASP3-山柰酚复合物体系和CASP3体系蛋白质二级结构随时间变化的规律。由图4C、图4D可见,CASP3-山柰酚复合物体系和CASP3体系的 $\alpha$ -螺旋如MET:39-ASN:52,LYS:186-LEU:194或TYR:204-ASP:22,以及 $\beta$ -折叠如ARG:86-LEU:91或LEU:236-VAL:239均稳定存在于整个动力学模拟过程。变化主要出现在SER:150-THR:152,在CASP3中该区域结构主要在Bend,Turn及B-Bridge之间转变,而当CASP3-山柰酚结合后,该区域则改变为3-Helix与Turn。而HIS:108-SER:112这段结构也产生了较大的改变,由A-Helix转变为了Bend,Turn和3-Helix。从整体来看,CASP3-山柰酚复合物体系与CASP3体系相比,蛋白质二级结构的变化主要表现为Coil,B-Sheet,Bend向Turn和3-Helix转变。这样的转变可能是CASP3与山柰酚结合所导致的。(见图4C、图4D图4E)最后,我们利用RMSD,ROG和吉布斯自由能的三维数据绘制了自由能景观图,以求进一步了解模拟过程中蛋白质配体稳定构象的变化。自由能较低的稳定构象在红色区域,而自由能较大的较不稳定的构象在蓝色区域。FEL分析表明,CASP3-山柰酚复合物体系有且仅有一个最低构象,即在RMSD 1.86 nm和ROG 0.40 nm时达到了最低自由能态。提取该能量最低的构象可见山柰酚与CASP3的结合。(见图4F)



注:A、B为动态互相关矩阵分析;C、D、E为蛋白质二级结构分析;F为自由能形貌图。

图4 分子动力学模拟结果图

## 2.2 CASP3在肝癌中低表达且与预后良好

2.2.1 CASP3蛋白于原发性肝癌组织切片表达情况 CASP3蛋白主要定位于胞浆,癌组织中的表达要明显低于癌旁组织,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见图5A、图5B)

2.2.2 CASP3蛋白于原发性肝癌临床病理特征表达情况 如表2所示,共纳入患者104例,其中男性63例,女性41例;CASP3

高表达患者52例,低表达患者52例;T分期 I~II 期60例,III~IV 期44例;淋巴侵犯患者42例,未转移患者62例;谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)正常患者45例,异常患者59例子。此外,通过分为高、低表达CASP3对原发性肝癌进行关联性分析发现,CASP3的表达与患者的T分期有明显相关性。

之后我们建立单因素、多因素的COX回归模型,如表3所示,在单因素分析中,CASP3蛋白表达量、病理T分期、N分期、Child分级及分化程度,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );但在多因素分析中,CASP3蛋白表达量( $P=0.001$ )、病理T分期( $P<0.05$ )及N分期( $P=0.001$ )差异均有统计学意义。根据以上结果,我们推断CASP3蛋白表达量可能与原发性肝癌患者的临床指标相关,CASP3可能是原发性肝癌的生物标志物。(见图5D、图5E)

2.2.3 CASP3蛋白与原发性肝癌患者预后生存关系 通过整理上述104例原发性肝癌患者的临床信息,计算其术后生存时间,行Kaplan-Meier生存分析,结果显示CASP3蛋白高表达时,患者的预后较好。(见图5C)

表2 原发性肝癌组织中 CASP3 表达与临床病理特征的关系

项目	临床病理参数	n	CASP3表达		$\chi^2$	P
			低表达	高表达		
总计		104	52	52		
年龄(岁)	$\leq 60$	47	27	20	1.398	0.237
	$> 60$	57	25	32		
性别	女性	41	13	28	7.030	0.008
	男性	63	38	25		
T分期	T1~T2	60	43	17	24.621	$<0.001$
	T3~T4	44	9	35		
N分期	N <sub>0</sub>	62	38	24	6.750	0.009
	N <sub>1-2</sub>	42	14	28		
M分期	M <sub>0</sub>	52	30	22	1.885	0.170
	M <sub>1</sub>	52	22	30		
病理分期	I~II	50	30	20	3.120	0.077
	III~IV	54	22	32		
分化程度	G <sub>1</sub>	20	7	13	1.548	0.214
	G <sub>2~3</sub>	84	45	39		
CD34		41	19	22	0.161	0.688
		63	33	30		
CA199/(ng/mL)	$\leq 27$	72	33	39	1.129	0.288
	$> 27$	32	19	13		
CA125		23	12	7	1.040	0.308
		81	38	43		
Ki-67		19	12	7	1.030	0.310
		85	40	45		
AFP		58	30	28	0.039	0.844
		46	22	24		
ALT		72	39	33	1.129	0.288
		32	13	19		
AST		45	30	15	7.678	0.006
		59	22	37		

表3 单因素、多因素回归分析影响原发性肝癌患者预后状态的相关因素

临床病理参数	单因素分析			多因素分析		
	HR	95%CI	P	HR	95%CI	P
年龄	1.546 587 047	0.760 ~ 3.145	0.220			
性别	0.503 146 928	0.254 ~ 0.998	0.049			
复发和转移	0.916 506 903	0.463 ~ 1.814	0.802			
T 分期	6.867 428 764	3.064 ~ 15.390	<0.001	0.048	1.010 ~ 6.228	6.228
N 分期	6.755 138 394	3.029 ~ 15.066	<0.001	<0.001	1.716 ~ 9.377	9.377
M 分期	2.714 510 215	1.290 ~ 5.712	0.009			
病理阶段	2.233 000 000	1.082 ~ 4.610	0.030			
肝炎	1.395 642 860	0.629 ~ 3.095	0.412			
腹水	1.960 813 530	0.989 ~ 3.887	0.054			
腹部手术史	1.527 951 270	0.752 ~ 3.106	0.242			
Child 分级	5.319 059 723	2.519 ~ 11.230	<0.001			
分化程度	0.090 564 165	0.045 ~ 0.184	<0.001			
肝癌分期	1.309 675 728	0.635 ~ 2.703	0.465			
Ki67	1.076 000 000	0.444 ~ 2.608	0.871			
CD34	0.734 014 528	0.370 ~ 1.457	0.377			
Glypican3	0.784 591 529	0.380 ~ 1.619	0.511			
CA199	0.957 217 028	0.455 ~ 2.013	0.908			
CA125	1.444 720 968	0.596 ~ 3.501	0.415			
AFP	1.741 000 000	0.877 ~ 3.457	0.113			
ALT	1.772 174 829	0.887 ~ 3.539	0.105			
AST	2.114 225 936	1.004 ~ 4.454	0.049			
术前化疗	1.444 041 862	0.724 ~ 2.881	0.297			
高、低表达组	0.049 032 826	0.012 ~ 0.207	<0.001	<0.001	0.019 ~ 0.379	0.379

3 讨论

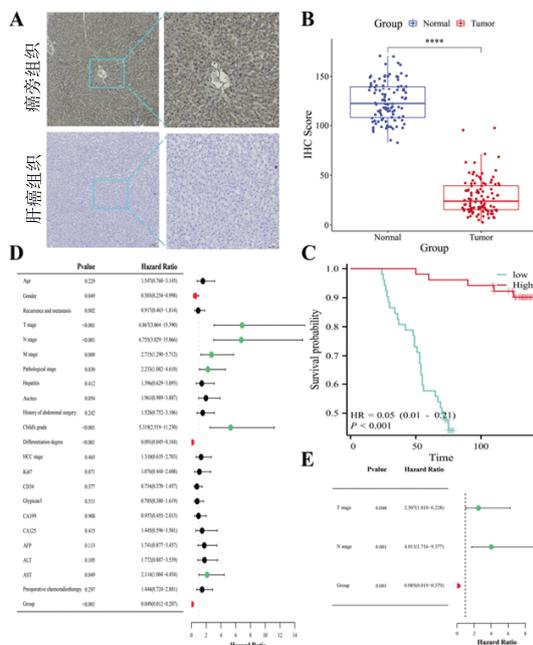
肝癌的发病机制较为复杂,其发生与肝血虚弱、肝气郁结及外邪侵袭密切相关。当归四逆汤加吴茱萸生姜汤中的多种药材正合肝癌病机,诸多研究表明该方剂对胰腺癌、胃癌等多种癌症具有抑制细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用。然而,DSJWST在肝癌治疗中的潜在机制尚不明确。

本研究通过网络药理学方法构建“药物-核心成分-核心靶点”图,预测DSJWST抗肝癌的作用机制。将获取的1 599个药物作用靶点与4 124个肝癌相关靶点构置韦恩图,共获得166个交集靶点。基于PPI网络分析,筛选出CASP3、JUN、TNF等关键核心靶点,并鉴定出山柰酚、槲皮素、β-谷甾醇等主要活性成分。随后使用分子对接技术显示山柰酚与CASP3的结合能最低(-7.489 kcal/mol),表明其具有最优的结合亲和力。进一步采用分子动力学模拟方法,从分子运动轨迹、蛋白质构象变化及结合自由能等多个维度对CASP3-山柰酚复合物进行系统分析,结果证实该复合物具有良好的动力学稳定性。综上所述,两者协同可更好地产生抗肝癌效应。

CASP3属于半胱天冬酶家族,参与肝癌细胞的凋亡、增殖、迁移、分化和免疫反应<sup>[18]</sup>。而山柰酚为可食用植物中的黄酮类化合物,具有抗炎、保肝、抑癌等多种药理活性<sup>[19-20]</sup>。WU X等<sup>[21]</sup>研究发现,山柰酚可通过干扰蛋白间的相互作用抑制肝细胞的铁依赖性凋亡,发挥保肝及抗炎作用,从而有效地将药物性肝损伤小鼠的死亡率由70%降至50%。TIE FF等<sup>[22]</sup>研究表明,山柰酚可减轻油酸对肝细胞的脂质蓄积和氧化应激,发挥保肝作用。研究<sup>[23-24]</sup>表明,山柰酚可介导信号通路,调控CASP3依赖性凋亡途径,抑制肝癌细胞活性,且山柰酚可通过激活CASP3家族依赖性凋亡通路诱导肿瘤细胞凋亡。这与本文网络药理学预测结果一致。

GO富集分析表明,DSJWST靶点的抗肝癌活性主要与药物反应、对氧化应激的反应、对类固醇激素的反应、活性氧代谢过程的调控有关。KEGG通路富集分析表明,AGE-RAGE信号通路对DSJWST治疗肝癌至关重要。AGE-RAGE信号通路的激活可通过破坏氧化还原平衡,使程序性细胞死亡信号发生改变。这可能与恶性肿瘤的发展密切相关<sup>[25]</sup>。此外,该通路可诱发慢性炎症,使活性氧生成增多,从而增强肿瘤细胞迁移能力<sup>[26-27]</sup>。多项研究证实,核心靶点CASP3在AGE-RAGE信号通路中发挥着重要的作用。CASP3可通过调控AGE-RAGE信号通路在非酒精性肝病的治疗中发挥保肝作用,同时AGE-RAGE信号通路可借助活性氧和一氧化氮合酶的介导,激活CASP3来引发肝癌细胞凋亡<sup>[28-29]</sup>。此外,AGE-RAGE信号通路的激活可通过调控细胞周期进程诱导细胞周期阻滞,进而显著抑制肝癌细胞的迁移能力<sup>[30]</sup>。因此,CASP3介导的AGE-RAGE信号通路可作为抑制肝癌进展的潜在机制之一。

与多数研究结果一致,本研究结果亦揭示CASP3在肝癌组织中低表达,与良好预后相关。李军等<sup>[31]</sup>研究指出,CASP3的表达越高,肿瘤免疫侵袭性越弱,呈现负相关趋势。同时,促进CASP3活化也可加快肝癌细胞凋亡,抑制肝癌的进展<sup>[32]</sup>。



注:A.肝癌及癌旁组织图;B.肝癌及癌旁组织免疫评分;C.高低表达预后分析;D.单因素的COX回归森林图;E.多因素的COX回归森林图。

图5 免疫组化结果图

但PAN J M等<sup>[33]</sup>研究表明,CASP3可间接影响乐伐替尼的耐药性,从而影响肝癌的进展。CASP3可通过促血管生成、激活多种活性酶等途径,促进脑胶质瘤、卵巢癌、结肠癌等癌症的进展<sup>[34-36]</sup>。

本研究证实DSJWST可通过靶向CASP3,激活AGE-RAGE信号通路,抑制肝癌进展。免疫组化结果显示,CASP3在肝癌组织中的表达水平越低,患者的预后效果越好。这与网络药理学预测的结果一致。未来研究可进一步揭示DSJWST通过调控CASP3及其相关信号通路抑制肝癌进展的具体机制,并探索DSJWST与现有疗法的协同作用。

然而,本研究仍存有一些局限性。首先,样本来源单一,缺乏多中心数据支持,可能导致研究结果的普遍性和代表性受限。最后,缺乏分子互作实验,后续研究将通过生物膜层干涉技术和表面等离子共振技术来进一步验证。此外,在免疫组化实验方面,本研究样本均来自单一来源。由于缺乏多中心数据的有力支撑,这极有可能降低本研究结果的普遍性和代表性,难以广泛适用于不同地域、不同人群的肝癌患者情况。

此外,从分子机制探究的完整性来看,本研究尚缺乏关键的分子互作实验。分子互作对于深入理解DSJWST中各成分与肝癌相关靶点之间的作用方式和具体过程至关重要。为弥补这一不足,后续的研究计划借助生物膜层干涉技术和表面等离子共振技术等先进的分子生物学手段,进一步对DSJWST与肝癌相关靶点的分子互作进行验证,力求更准确、更全面地揭示DSJWST治疗肝癌的潜在机制,提升研究的科学性和可靠性。

#### 参考文献

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics,2024[J]. *CA A Cancer J Clin*,2024,74(1):12-49.
- [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] TANIGUCHI H. Liver cancer 2.0[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(24):17275.
- [4] XIANG Y N, GUO Z M, ZHU P F, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science[J]. *Cancer Med*,2019,8(5):1958-1975.
- [5] LIU Y M, YANG SS, WANG K L, et al. Cellular senescence and cancer: Focusing on traditional Chinese medicine and natural products[J]. *Cell Prolif*,2020,53(10):e12894.
- [6] ZHANG L, ZHANG F Y, LI G F. Traditional Chinese medicine and lung cancer: From theory to practice[J]. *Biomed Pharmacother*,2021,137:111381.
- [7] CHEN J F, WU S W, SHI Z M, et al. Traditional Chinese medicine for colorectal cancer treatment: Potential targets and mechanisms of action[J]. *Chin Med*,2023,18(1):14.
- [8] 张靖,李红法,樊威,等.抗肝癌中药古方用药规律统计及抗肝癌新药研发风险评估[J].*中国中药杂志*,2014,39(19):3870-3875.
- [9] CHOI H S, LEE K, KIM M K, et al. DSGOST inhibits tumor growth by blocking VEGF/VEGFR2-activated angiogenesis[J]. *Oncotarget*,2016,7(16):21775-21785.
- [10] LEE K, CHO S G, CHOI Y K, et al. Herbal prescription, Danggui-Sayuk-Ga-Osuyu-Senggang-Tang, inhibits TNF- $\alpha$ -induced epithelial-mesenchymal transition in HCT116 colorectal cancer cells[J]. *Int J Mol Med*,2018,41(1):373-380.
- [11] KIM T W, LEE S Y, KIM M, et al. DSGOST regulates resistance via activation of autophagy in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(6):649.
- [12] 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.
- [13] TANG DD, CHEN M J, HUANG X H, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing[J]. *PLoS One*,2023,18(11):e0294236.
- [14] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDockvina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and Python bindings[J]. *J Chem Inf Model*,2021,61(8):3891-3898.
- [15] TROTT O, OLSON A J. AutoDockVina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *J Comput Chem*,2010,31(2):455-461.
- [16] PRONK S, PÁLL S, SCHULZ R, et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit[J]. *Bioinformatics*,2013,29(7):845-854.
- [17] HILDEBRAND P W, ROSE A S, TIEMANN J K S. Bringing molecular dynamics simulation data into view[J]. *Trends Biochem Sci*,2019,44(11):902-913.
- [18] LAUBER K, BOHN E, KRÖBER S M, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes viacaspase-3-mediated release of a lipid attraction signal[J]. *Cell*,2003,113(6):717-730.
- [19] CALDERÓN-MONTAÑO J M, BURGOS-MORÓN E, PÉREZ-GUERRERO C, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol[J]. *Mini Rev Med Chem*,2011,11(4):298-344.
- [20] PERIFERAKIS A, PERIFERAKIS K, BADARAU I A,

- et al. Kaempferol: Antimicrobial properties, sources, clinical, and traditional applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23):15054.
- [21] WU X, SONG M Y, QIU P J, et al. A metabolite of nobiletin, 4'-demethylnobiletin and atorvastatin synergistically inhibits human colon cancer cell growth by inducing G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Food Funct*, 2018, 9(1):87-95.
- [22] TIE FF, DING J, HU N, et al. Kaempferol and kaempferide attenuate oleic acid-induced lipid accumulation and oxidative stress in HepG2 cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16):8847.
- [23] ZHOU S Y, ZHANG H D, LI J, et al. Potential anti-liver cancer targets and mechanisms of kaempferitrin based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification[J]. *Comput Biol Med*, 2024, 178:108693.
- [24] RUAN G Y, YE L X, LIN J S, et al. An integrated approach of network pharmacology, molecular docking, and experimental verification uncovers kaempferol as the effective modulator of HSD17B1 for treatment of endometrial cancer[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):204.
- [25] KAY A M, SIMPSON C L, STEWART J A Jr. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:6809703.
- [26] WANG Z W, ZHANG J Q, CHEN L, et al. Glycine suppresses AGE/RAGE signaling pathway and subsequent oxidative stress by restoring Glo1 function in the aorta of diabetic rats and in HUVECs[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:4628962.
- [27] WAGHELA B N, VAIDYA F U, RANJAN K, et al. AGE-RAGE synergy influences programmed cell death signaling to promote cancer[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2):585-598.
- [28] YU C Y, HAN D, YU J F, et al. Exploration of potential targets and mechanisms of naringenin in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease through network pharmacology[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(42):e35460.
- [29] MOULAHOUH H, GHORBANIZAMANI F, KHIARI Z, et al. Artemisia alleviates AGE-induced liver complications via MAPK and RAGE signaling pathways modulation: A combinatorial study[J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477(10):2345-2357.
- [30] GAO S Y, TAN H X, GANG J. Inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation through regulation of the Cell Cycle, AGE-RAGE, and Leptin signaling pathways by a compound formulation comprised of andrographolide, wogonin, and oroxylin A derived from *Andrographis paniculata* (Burm.f) Nees[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 329:118001.
- [31] 李军, 成果, 楼迪栋, 等. 葛花作用于Casp3调控细胞自噬干预肝癌的机制研究[J]. *海南医科大学学报*, 2025, 31(3):200-210.
- [32] LI Y, CHEN LL, CHAN T H, et al. SPOCK1 is regulated by CHD1L and blocks apoptosis and promotes HCC cell invasiveness and metastasis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(1):179-191.e4.
- [33] PAN J M, ZHANG M, DONG L Q, et al. Genome-Scale CRISPR screen identifies LAPTM5 driving lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. *Autophagy*, 2023, 19(4):1184-1198.
- [34] FENG X, YU Y, HE S J, et al. Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism[J]. *Cancer Lett*, 2017, 385:12-20.
- [35] ZHOU M, LIU X J, LI Z H, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4):921-930.
- [36] ZHAO XX, WANG D M, ZHAO Z W, et al. Caspase-3-dependent activation of calcium-independent phospholipase A2 enhances cell migration in non-apoptotic ovarian cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(39):29357-29368.

(收稿日期:2024-12-16 编辑:时格格)