

基于转录组测序探讨养阴扶正解毒方抑制乙型肝炎病毒相关肝细胞癌 sgPten/c-Met 皮下移植瘤生长及调控 Wnt 通路的机制

商子梦^{1,2}, 刘晓利¹, 于莉华¹, 闫慧文¹, 霍光远¹, 张哲¹, 石宛鑫¹, 宋鑫华³, 杨志云¹ (1. 首都医科大学附属北京地坛医院 中西医结合二科, 北京 100015; 2. 首都医科大学 基础-临床联合实验室 中医药防治传染性重症肝病研究与转化实验室, 北京 100069; 3. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069)

摘要: **目的** 观察养阴扶正解毒方 (Yangyin Fuzheng Jiedu Decoction, YFJD) 对 sgPten/c-Met (敲除 Pten 并过表达 c-Met) 驱动的肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 皮下移植瘤模型的抑制作用, 并基于转录组测序探讨其可能的分子机制。 **方法** 使用结晶紫法测定 YFJD 对 HepG2.2.15 和原代细胞 sgPten/c-Met 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀)。使用 5 周龄 C57BL/6J 小鼠, 采用水动力尾静脉注射 sgPten/c-Met/SB 质粒系统构建 HCC 原位模型, 造模 4 周后取原位肿瘤组织提取原代细胞, 接种于小鼠背部皮下建立异位移植瘤模型。成瘤后给予 YFJD 灌胃治疗, 测量肿瘤体积和质量, 取皮下瘤组织进行转录组测序, 对差异表达基因进行 GO、KEGG、Reactome 及 WikiPathways 富集分析。 **结果** YFJD 对 HepG2.2.15 细胞的 IC₅₀ 为 42.34 g/L, 对 sgPten/c-Met 细胞的 IC₅₀ 为 55.66 g/L, HepG2.2.15 细胞对 YFJD 的敏感性更高。造模 21 d 时, 与对照组相比, YFJD 组小鼠皮下瘤体积 [(513.72 ± 229.86) mm³ 比 (937.35 ± 371.00) mm³; $t = 3.21, P = 0.004$] 和质量 [(0.62 ± 0.31) g 比 (1.22 ± 0.27) g; $t = 4.64, P < 0.001$] 均显著降低。转录组测序共筛选出 895 个差异表达基因, 其中 590 个上调、305 个下调, GO 富集分析提示差异基因主要涉及细胞黏附、细胞外基质组织等生物学过程, KEGG 富集分析表明 Wnt 信号通路被显著富集, Reactome 分析结果显示差异基因主要富集于补体激活、抗原呈递、程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1) 信号等免疫相关通路, WikiPathways 富集分析显示 Wnt 信号通路、Wnt 信号通路与多能性等条目显著富集。 **结论** YFJD 可有效抑制 HCC 细胞及 sgPten/c-Met 源性 HCC 皮下移植瘤的生长增殖, 其作用机制可能与负向调控 Wnt 信号通路有关。

关键词: 养阴扶正解毒方; 肝细胞癌; sgPten/c-Met; Wnt 信号通路; 转录组测序; 皮下移植瘤

Mechanism of Yangyin Fuzheng Jiedu Decoction on inhibiting the growth of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma sgPten/c-Met subcutaneous transplanted tumor and regulating the Wnt pathway based on transcriptome sequencing

Shang Zimeng^{1,2}, Liu Xiaoli¹, Yu Lihua¹, Yan Huiwen¹, Huo Guangyuan¹, Zhang Zhe¹, Shi Wanxin¹, Song Xinhua³, Yang Zhiyun¹ (1. The Second Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. Laboratory for Clinical Medicine, Research and Translational Laboratory

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2026.02.009

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274479); 新发突发与重大传染病防控国家科技重大专项 (2025ZD01906000); 北京市医院管理中心北京市卫健委卓越计划 (BRWEP2024W10217010); 高层次公共卫生技术人才建设项目 (学科带头人 -02-16)。

通信作者: 杨志云 Email: yangzhiyun66@163.com

for Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Infectious Severe Liver Diseases, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe the inhibitory effect of Yangyin Fuzheng Jiedu Decoction (YFJD) on a subcutaneous transplanted tumor model of hepatocellular carcinoma (HCC) driven by sgPten/c-Met, and to explore its possible molecular mechanism based on transcriptome sequencing. **Methods** The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of YFJD against the HepG2.2.15 and primary sgPten/c-Met cells was determined by the crystal violet assay. An orthotopic HCC model was established via hydrodynamic tail vein injection of the sgPten/c-Met/SB plasmid system in 5-week-old C57BL/6J mice. Four weeks after modeling, primary cells were isolated from the orthotopic tumor tissues and subcutaneously inoculated into the backs of mice to generate an ectopic subcutaneous tumor model. After tumor formation, YFJD was administered by gavage. Tumor volume and weight were measured. Subcutaneous tumor tissues were collected for transcriptome sequencing, and differentially expressed genes were subjected to GO, KEGG, Reactome, and WikiPathways enrichment analyses. **Results** The IC_{50} of YFJD was 42.34 g/L for HepG2.2.15 cells and 55.66 g/L for sgPten/c-Met cells, indicating that HepG2.2.15 had a higher sensitivity to YFJD. At 21 days after modeling, compared with the control group, both the volume [$(513.72 \pm 229.86) \text{ mm}^3$ vs. $(937.35 \pm 371.00) \text{ mm}^3$; $t = 3.21$, $P = 0.004$] and weight [$(0.62 \pm 0.31) \text{ g}$ vs. $(1.22 \pm 0.27) \text{ g}$; $t = 4.64$, $P < 0.001$] of subcutaneous tumors in the YFJD group were significantly reduced. Transcriptome sequencing identified a total of 895 differentially expressed genes, of which 590 were upregulated and 305 were downregulated. GO enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes were mainly involved in biological processes such as cell adhesion and extracellular matrix organization. KEGG enrichment analysis revealed that the Wnt signaling pathway was significantly enriched. Reactome analysis showed that the differentially expressed genes were mainly enriched in immune-related pathways, including complement activation, antigen presentation, and programmed death-1 (PD-1) signaling. WikiPathways enrichment analysis demonstrated significant enrichment in terms such as the Wnt signaling pathway and Wnt signaling pathway and pluripotency. **Conclusion** YFJD could effectively inhibit the growth and proliferation of HCC cells and sgPten/c-Met-derived HCC subcutaneous transplanted tumors, and its mechanism may be related to negative regulation of the Wnt signaling pathway.

Keywords: Yangyin Fuzheng Jiedu Decoction; Hepatocellular carcinoma; sgPten/c-Met; Wnt signaling pathway; Transcriptome sequencing; Subcutaneous transplanted tumor

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全世界发病率较高、预后较差的恶性肿瘤之一^[1], HCC 中约有 84% 病例的发病与乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染有关^[2]。手术切除、局部消融、肝移植是实现根治早期 HCC 的首选方案, 但多数患者在首次确诊时已处于中晚期, 对于这类患者系统治疗是主要选择之一^[3]。临床常用的仑伐替尼等分子靶向药物及抗程序性死亡蛋白-1 (programmed death-1, PD-1)、抗程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 等免

疫检查点抑制剂虽在一定程度上延长了患者的生存期, 但客观缓解率仍偏低, 且耐药问题普遍存在, 治疗相关不良反应也较为突出^[4]。造成这一问题的根本原因是 HCC 具有高度的个体间差异和瘤内异质性, 针对单一靶点的药物难以持久起效^[5]。因此, 探索新的 HCC 治疗策略是目前亟待解决的临床问题, 尤其是兼具多靶点调节优势的干预手段。

HCC 的发生是抑癌基因失活与癌基因激活共同驱动的结果^[6]。磷酸酶及张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, Pten) 作为重要的

抑癌基因,通过负向调控磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路来抑制细胞过度增殖和存活^[7]。在HCC中, Pten缺失或低表达与肿瘤进展、转移和不良预后密切相关^[8]。间质上皮转化因子(cellular-mesenchymal epithelial transition factor, c-Met)属于受体酪氨酸激酶家族,是肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的高亲和力受体。c-Met过度激活可促进HCC细胞增殖、诱导上皮-间质转化并增强侵袭转移能力^[9]。Pten缺失与c-Met激活在HCC中可产生显著的协同致癌效应^[10]。采用水动力尾静脉注射联合成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR相关蛋白9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)技术,同时敲除Pten并过表达c-Met(即sgPten/c-Met模型)可快速诱导小鼠形成高侵袭性、低分化的HCC,研究已证实其肿瘤发生率与负荷均明显高于仅改变单个基因的动物^[11]。临床数据证实,同时存在Pten低表达和c-Met高表达的HCC患者预后更差,且对常规靶向治疗也不敏感^[12]。Pten缺失可通过维持AKT的持续激活,促使HCC对c-Met抑制剂产生获得性耐药;而联合抑制MET与AKT或成红细胞白血病病毒癌基因同源物(erythroblastic leukemia viral oncogene homolog, ERBB)激酶可恢复治疗反应,单用c-Met抑制剂难以克服由PTEN缺失驱动的复杂信号网络^[10]。Wnt/ β -catenin通路参与调控HCC细胞增殖、肿瘤干性维持及耐药表型的形成^[13]。Pten缺失通过AKT/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK3 β)轴导致 β -catenin稳定或核转位^[14],而c-Met激活可上调T细胞因子(T-cell factor, TCF)/淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor, LEF)依赖性转录活性^[15]。提示在sgPten/c-Met双驱动模型中Wnt通路可能处于异常活化状态,能高度模拟临床中该类HCC亚型的分子特征、信号通路异常及耐药表型。为本研究评估多靶点、多成分的抗HCC策略提供合适平台。

养阴扶正解毒方(Yangyin Fuzheng Jiedu Decoction, YFJD)是基于HCC“气阴两虚、瘀毒内蕴”的核心病机凝练出的协定处方,主要组分:沙参、麦冬滋阴生津;黄芪、白术益气健脾;柴胡引诸药入肝经,疏肝理气;白花蛇舌草、徐长卿、苦参解毒散结活血;全方具有养阴扶正、解毒散结、活血止痛之功。前期临床观察提示该方可能改善HCC患者生活质量、延缓疾病进展,但其具体抗肿瘤机

制尚不明确^[16-18]。本研究采用sgPten/c-Met/SB转座子水动力尾静脉注射构建HCC原位模型,从原位肿瘤组织中提取原代肿瘤细胞并建立皮下移植瘤模型,通过体内药效实验联合转录组测序技术,初步探讨YFJD抑制HCC增殖的作用及潜在分子通路,以期为该方的临床应用提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 细胞株 HepG2.2.15由人肝癌细胞系HepG2细胞稳定转染HBV全长基因构建而成,能够持续复制HBV并分泌病毒颗粒,本研究选用HepG2.2.15细胞系及高度模拟HBV感染后信号通路异常状态的原代细胞sgPten/c-Met作为研究对象。HepG2.2.15细胞株购自浙江美森细胞科技有限公司(货号:SCC249)。HepG2.2.15细胞采用DMEM加10% FBS和1%青链霉素(100倍浓缩液)培养基,在37℃、5% CO₂的培养箱中培养,贴壁后每1~2 d传代。原代细胞sgPten/c-Met从HCC原位瘤小鼠sgPten/c-Met的肝脏肿瘤分离获得,具体步骤见1.5和1.6部分。

1.2 实验动物 60只无特定病原体雄性C57BL/6小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养于恒定环境:12 h/12 h光暗周期,(22±2)℃,自由摄食饮水。所有动物实验经首都医科大学实验动物伦理委员会批准(批件号:AEEI-2025-931)。

1.3 药物与试剂 YFJD组成:沙参150 g、麦冬150 g、生黄芪200 g、白术90 g、柴胡90 g、苦参90 g、徐长卿120 g、白花蛇舌草200 g。所有中药材均购自北京同仁堂药业,经药材学鉴定符合质量标准。药材加水浸泡后煎煮,合并滤液浓缩至所需浓度,4℃保存备用。DMEM(货号:6123114)和FBS(货号:A5256701)购自赛默飞世尔科技公司,青链霉素混合液(货号:P1400)、胰蛋白酶-EDTA消化液(货号:T1300)购自北京索莱宝科技有限公司,胶原酶(货号:C5138)购自德国达姆施塔特默克集团,PBS(货号:G4202)和HBSS缓冲液(货号:G4203)购自武汉赛维尔生物科技有限公司.sgPten、c-Met及SB转座子质粒均由加州大学旧金山分校Xin Chen Lab捐赠。无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.4 结晶紫法检测 YFJD对HCC细胞的体外抗增殖作用 对数生长期细胞HepG2.2.15和sgPten/c-Met用胰酶消化后,按 5×10^4 个/孔的密度接种于24孔平底细胞培养板,贴壁后弃去培养基,用PBS清洗3遍,加入0.5 ml配置好的YFJD溶液,药物终浓

度分别为5、10、25、50、100、200、300 g/L(按生药重量计算),设空白对照(不加YFJD)及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)对照,每个浓度3个复孔,于5% CO₂、37℃培养箱内孵育48 h后终止培养,每孔加入200 μl 1%结晶紫溶液(0.5 g结晶紫溶于50 ml无水乙醇),反应3 min后,用纯水沿孔边冲洗,倒置晾干,24孔板每孔加300 μl的33%乙酸溶液,点板,24孔板每孔100 μl,采用酶标仪检测570 nm的吸光度值,计算各孔吸光度的平均值,存活率=(各组平均吸光度值/DMSO对照组吸光度值)×100%,记录IC₅₀。

1.5 HCC原位模型的建立 采用水动力尾静脉注射技术,将sgPten/c-Met与SB质粒按20:20:1.6混合,溶于生理盐水,总体积为小鼠体质量的10%^[11]。在5~7 s内快速推注完毕。注射后常规饲养4周,经解剖确认5只小鼠肝脏均出现明显肿瘤结节。

1.6 原代肿瘤细胞提取与皮下移植瘤模型的构建 造模4周后,处死部分sgPten/c-Met小鼠,无菌条件下取出肝内原位肿瘤组织,放入预冷的HBSS洗液[含2.5 mmol/L乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸]中。将组织转移至培养皿中,用小刀剪切成小块,转入预温至37℃的消化液(HBSS-CaCl₂缓冲液含100 g/L胶原酶),每20 ml消化液加入约400 μl胶原酶浓缩液。于37℃孵育30 min,每5 min摇振1次。孵育结束后,消化液经100 μm细胞筛过滤,滤液1 000 r/min离心5 min(离心半径17.4 cm),弃上清,沉淀细胞重悬于含10%胎牛血清及1%双抗的DMEM培养基中,置于培养皿培养。每3 d换液1次,非肿瘤细胞逐渐被抑制,约2~4周后得到均一的HCC细胞sgPten/c-Met。通过台盼蓝染色计数,活细胞比例>90%。将原代细胞重悬于PBS中,调整密度至2.5×10⁶个/ml,以0.2 ml/只接种于另一批正常小鼠背部皮下。接种后约3 d,皮下可触及明显肿瘤结节,视为模型构建成功。

1.7 动物分组与给药 使用随机数字表将小鼠随机分为YFJD组[6.2 g生药/(kg·d)灌胃]和对照组(等体积生理盐水灌胃),每组10只。连续给药18 d。每2 d用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),按公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算肿瘤体积。实验结束后剥离肿瘤,拍照、称重。

1.8 转录组测序 使用随机数字表,每组随机选取3只小鼠的皮下瘤组织,液氮速冻后提取RNA。总RNA提取后,使用Nanodrop2000与Labchip GX touch检测样品的纯度、浓度及完整性。合格样品

采用Oligo(dT)磁珠富集mRNA,加入打断试剂将其片段化后,以六碱基随机引物合成cDNA第一链,再使用DNA聚合酶I和RNaseH合成第二链并纯化。纯化后的双链cDNA经末端修复、加A尾、连接测序接头,筛选回收约350 bp的片段,经聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增富集得到cDNA文库。文库浓度及片段大小分别用Qubit3.0和安捷伦2100系统检测,定量合格后于Illumina NovaSeq平台进行双端150 bp测序。

原始测序数据(fastq格式)首先进行质控,去除含接头、含N及低质量(碱基质量值≤20的碱基数超过读长50%)的序列,得到高质量数据,并计算Q30与GC含量。使用HISAT2软件(v2.0.5)将高质量读段比对至小鼠参考基因组(mm10)。通过每百万映射片段中每千碱基转录本片段数法(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM法)计算基因表达水平。采用DESeq2软件包进行差异表达分析,以Benjamini-Hochberg法校正后 $P \leq 0.05$ 作为差异基因筛选阈值。最后利用clusterProfiler软件对差异基因进行GO功能富集、KEGG通路富集分析、Reactome和WikiPathways通路富集分析, $P < 0.05$ 表示显著富集。

1.9 统计学处理 采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。皮下瘤小鼠肿瘤体积和肿瘤质量为符合正态分布的计量资料,两组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YFJD抑制HBV相关HCC细胞的增殖 YFJD对HepG2.2.15和sgPten/c-Met细胞的增殖均呈剂量依赖性抑制,HepG2.2.15和sgPten/c-Met细胞的IC₅₀分别为42.34 g/L、55.66 g/L,提示HepG2.2.15细胞对YFJD的敏感性更高,见图1。

2.2 YFJD抑制sgPten/c-Met皮下移植瘤的生长 皮下移植瘤模型建立及给药流程见图2A。给药期间,对照组小鼠皮下肿瘤体积呈持续增长趋势,21 d时达(937.35±371.00) mm³;YFJD组肿瘤生长速度明显减缓,21 d时体积为(513.72±229.86) mm³,较对照组降低约45.2%(图2B)。两组小鼠肿瘤体积差异自给药第9天起逐渐明显,21 d时肿瘤体积差异有统计学意义($t = 3.21$, $P = 0.004$)。实验结束后剥离肿瘤称重,YFJD组瘤质量为(0.62±0.31) g,对照组为(1.22±0.27) g,YFJD组肿瘤质量显著低于对照组($t = 4.64$, $P < 0.001$),见图2C。肿瘤大体照片同样显示YFJD组瘤体明显小于对照组

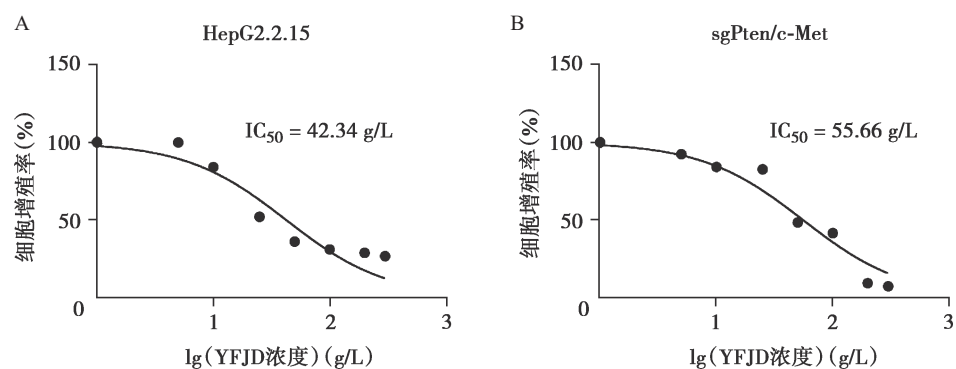


图1 YFJD对HepG2.2.15(A)和sgPten/c-Met(B)细胞活力的影响

注:细胞经不同浓度YFJD处理48 h后,检测细胞活力并拟合剂量-效应曲线($n=6$)。

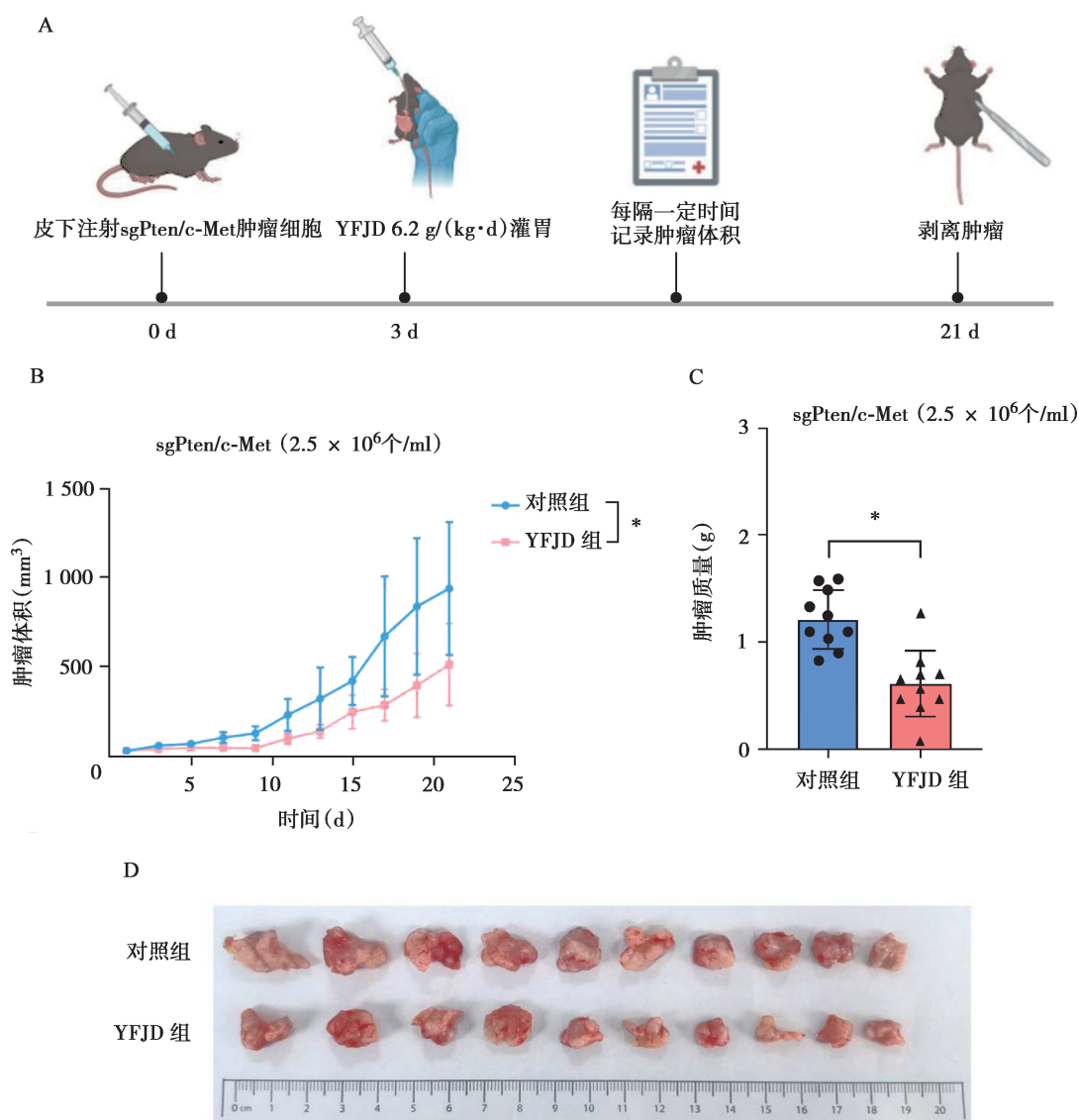


图2 YFJD抑制sgPten/c-Met异位移植皮下瘤模型肿瘤增殖

注: A为皮下移植瘤模型建立及给药流程示意图,将sgPten/c-Met原代肿瘤细胞(2.5×10^6 个/ml)接种于小鼠背部皮下,接种后第3天开始给予YFJD 6.2 g/(kg·d)灌胃,每3 d测量1次肿瘤体积,连续给药21 d后处死小鼠,剥离肿瘤; B为两组小鼠给药期间肿瘤体积变化曲线; C为两组小鼠给药21 d后肿瘤质量比较; D为两组小鼠代表性肿瘤大体照片。3次生物学重复; * $P < 0.05$ 。

(图2D)。以上结果提示, YFJD能有效抑制 sgPten/c-Met 源性肝癌皮下移植瘤的生长。

2.3 转录组测序揭示 YFJD 处理后基因表达谱改变 主成分分析(PCA)分析表明, 对照组与 YFJD 组样本沿主成分1(PC1)明显分离, 组内样本相对聚集, 组间距离较大(图3A), YFJD 处

理后肿瘤组织的基因表达谱发生了整体性改变, 两组间存在系统性表达差异。基于此, 进一步以 $|\log_2FC| > 1$ 且 $P < 0.05$ 为阈值筛选差异表达基因, 共筛选出 895 个差异表达基因, 其中 590 个上调、305 个下调, 差异基因的火山图及分类热图分别见图3B和图3C。

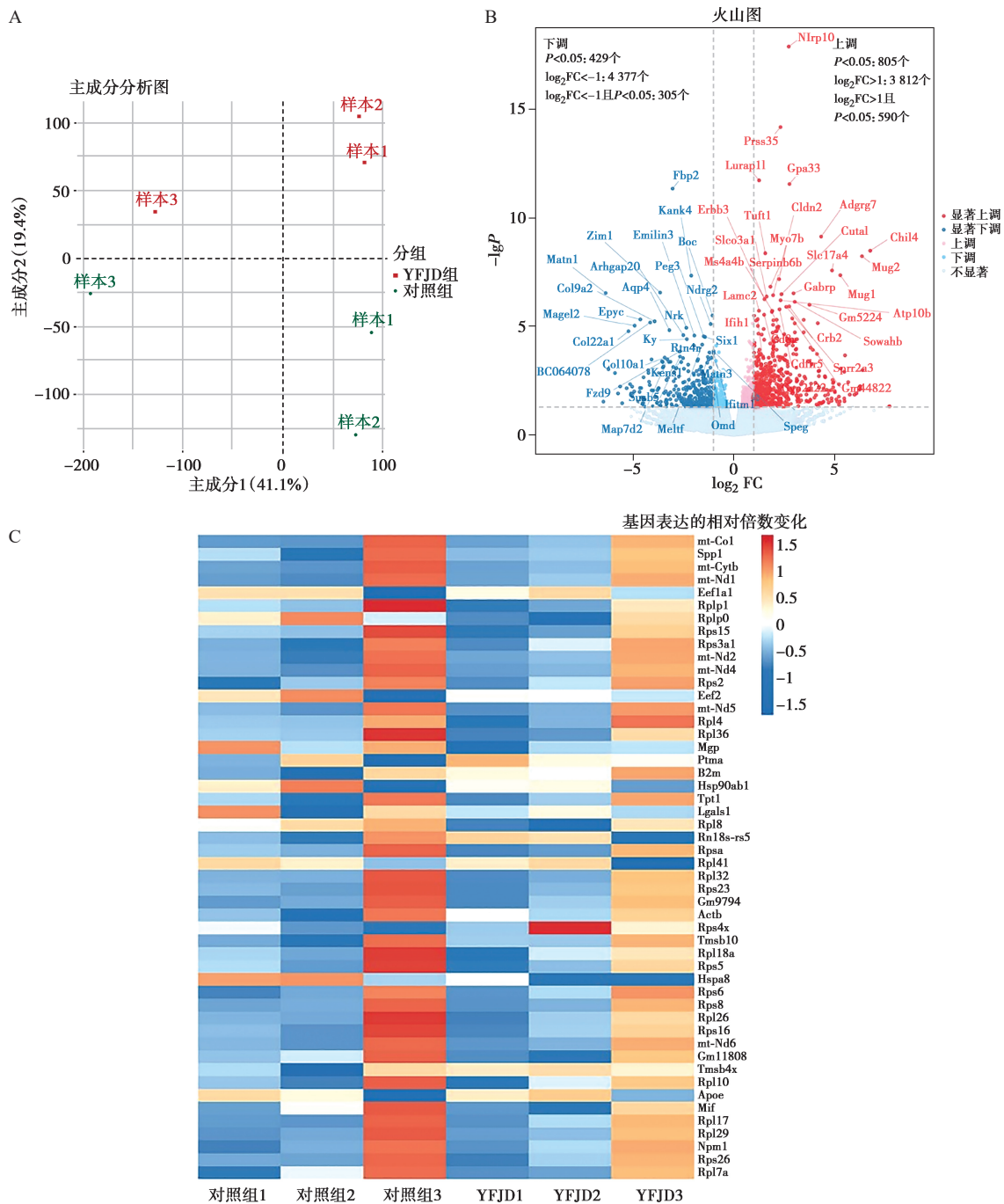


图3 小鼠 sgPten/c-Met 皮下移植瘤组织转录组测序差异分析

注: A 为样本主成分分析; B 为差异基因的火山图, 显著上调: $\log_2FC > 1$ 且 $P < 0.05$; 显著下调: $\log_2FC < -1$ 且 $P < 0.05$; 上调: $\log_2FC > 1$ 且 $P \geq 0.05$; 显著下调: $\log_2FC < -1$ 且 $P \geq 0.05$; 不显著: $\log_2FC > -1$ 或 $\log_2FC < 1$; C 为差异基因分类热图, 横轴代表不同样本, 纵轴代表不同基因, 不同颜色代表不同基因的表达水平。

2.4 差异基因的 GO 富集分析 GO 分析表明,在前 30 个显著富集的条目中,生物学过程方面主要包括非经典 Wnt 信号通路、免疫反应的正向调节、细胞-细胞黏附、免疫系统过程、血管内皮生长因子产生的调节等。此外,差异基因还富集到“循环系统发育”等发育相关条目。细胞组分方面,显著富集的条目包括主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex class, MHC) II 类蛋白复合物、溶酶体膜、基底质膜以及质膜外侧。进一步分析表明,上调基因主要富集于受体聚集、肿瘤坏死因子生成正调控、受体复合物、MHC II 类蛋白复合物、MHC I 类蛋白复合物等细胞组分和生物过程;下调基因则主要富集于 Wnt 信号通路负调控、非经典 Wnt 信号通路、Wnt 受体活性、Wnt 蛋白结合等生物学过程。上述结果提示,YFJD 可能通过调节 Wnt 信号通路、免疫应答、细胞黏附等过程发挥抗肿瘤作用,同时可能影响肿瘤相关血管生成和溶酶体功能。见图 4。

2.5 差异基因的 KEGG 富集分析 KEGG 通路富集分析表明,YFJD 组显著上调的通路包括吞噬体、细胞黏附分子、抗原加工与呈递等;显著下调的通路包括 Wnt 信号通路、黏着斑、干细胞多能性调控信号通路、细胞外基质-受体相互作用、Hedgehog 信号通路、AMPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路

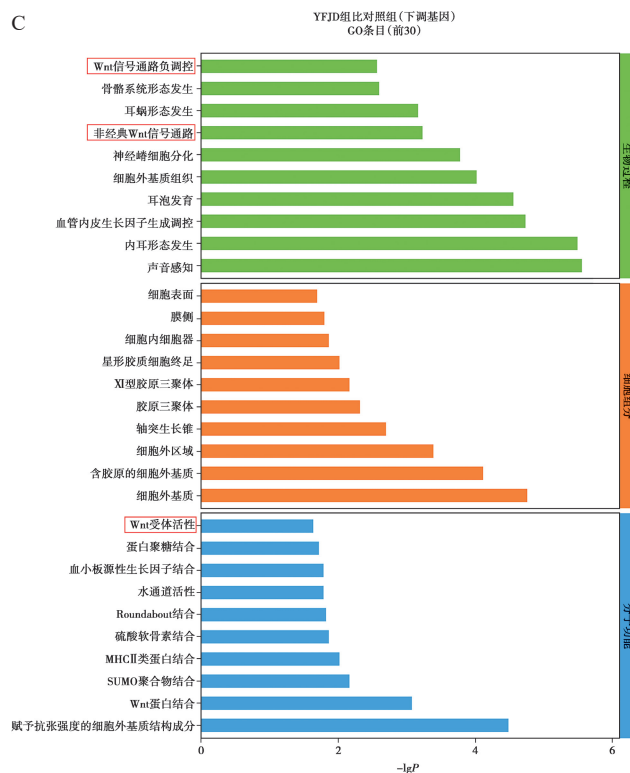
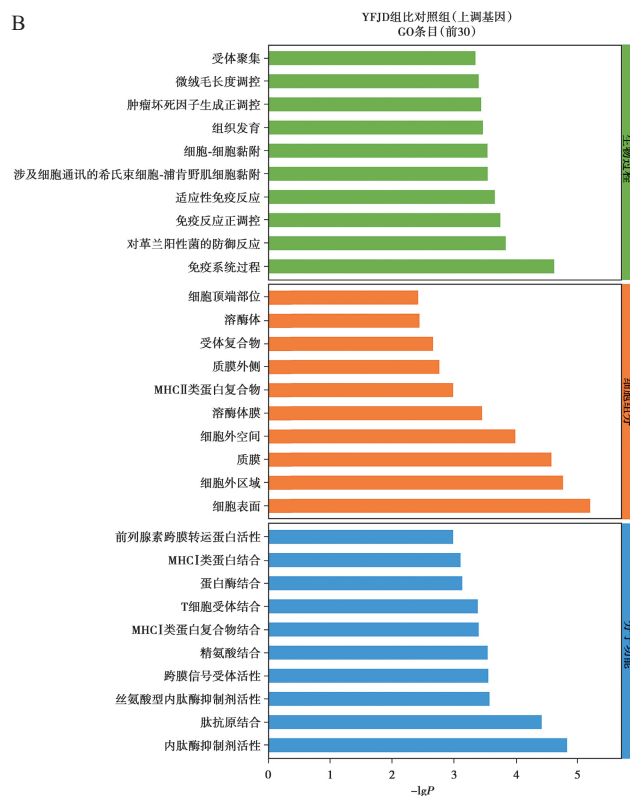
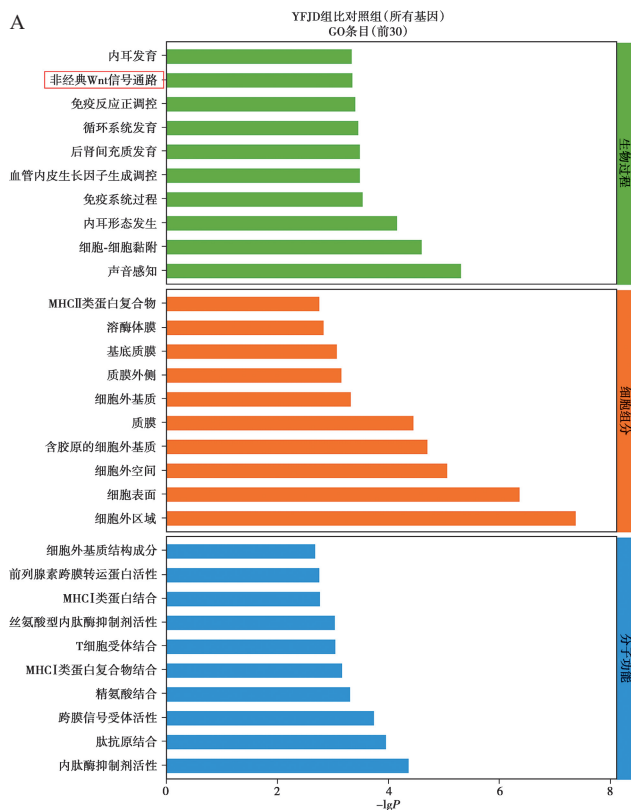


图 4 YFJD 组和对照组差异表达基因的 GO 富集分析

注: A 为差异表达基因中前 30 个显著富集基因的 GO 条目; B 为表达上调基因中前 30 个显著富集基因的 GO 条目; C 表达下调基因中前 30 个显著富集基因的 GO 条目。

等。在前20个富集的下调通路中，Wnt通路的富集得分较高。此外，多条与细胞代谢（磷酸戊糖途径、糖酵解/糖异生、果糖和甘露糖代谢）、蛋白质消化吸收及激素信号（加压素调节的水重吸收、胰高血糖素信号、胰岛素信号）相关的通路也发生显

著改变。提示YFJD主要通过负向调控Wnt信号通路，同时协同影响细胞黏附、代谢重编程及肿瘤微环境相关通路发挥抗HCC肿瘤增殖的作用。见图5。KEGG富集分析弦图（图6）显示，整体水平上，在所分析的10条通路（包括抗原加工与呈递、移

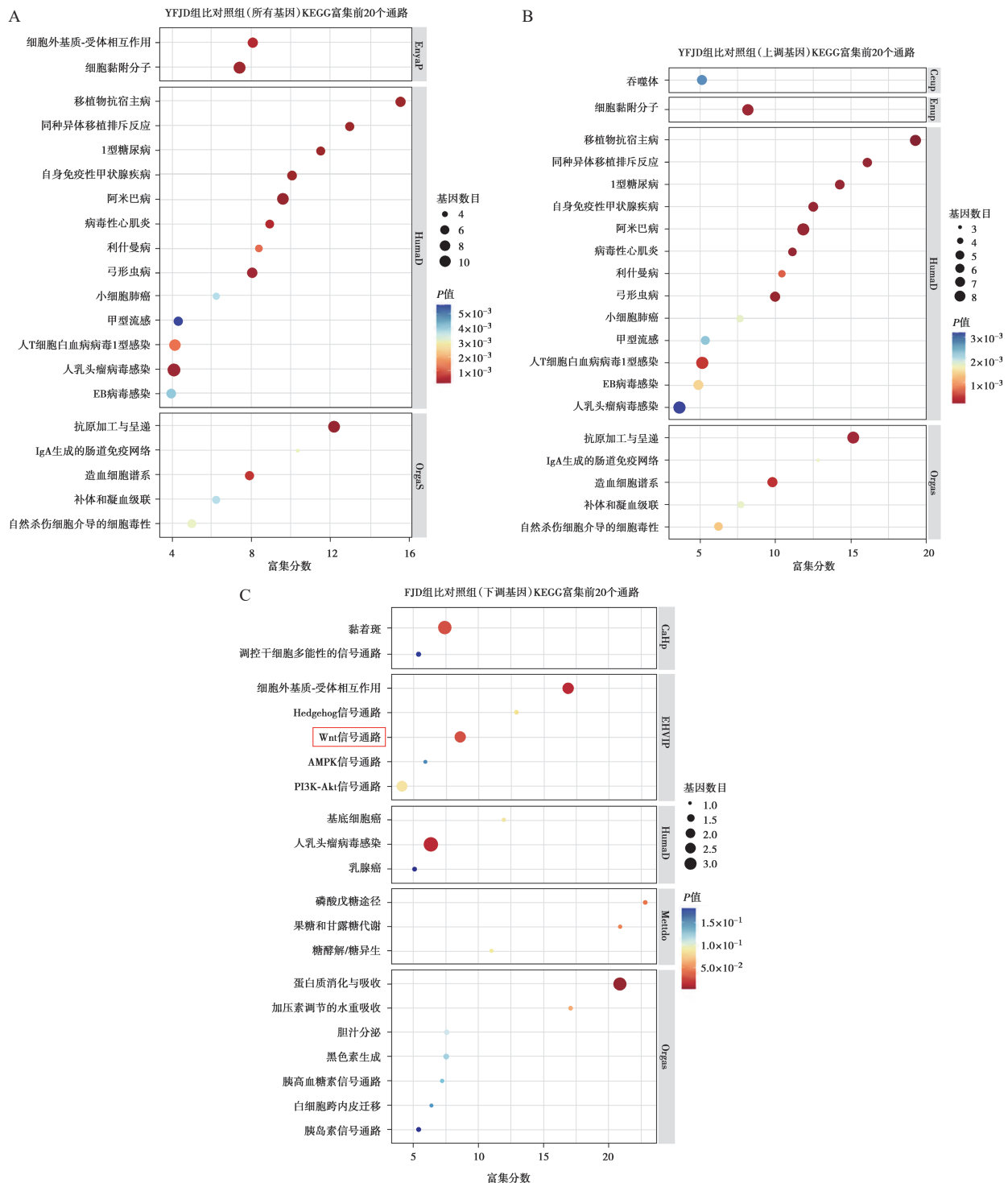


图5 YFJD组和对照组差异表达基因的KEGG通路富集分析(前20个显著通路)

注：A为所有差异基因的KEGG富集分析；B为上调基因中富集程度前20位的KEGG通路；C为下调基因中富集程度前20位的KEGG通路。

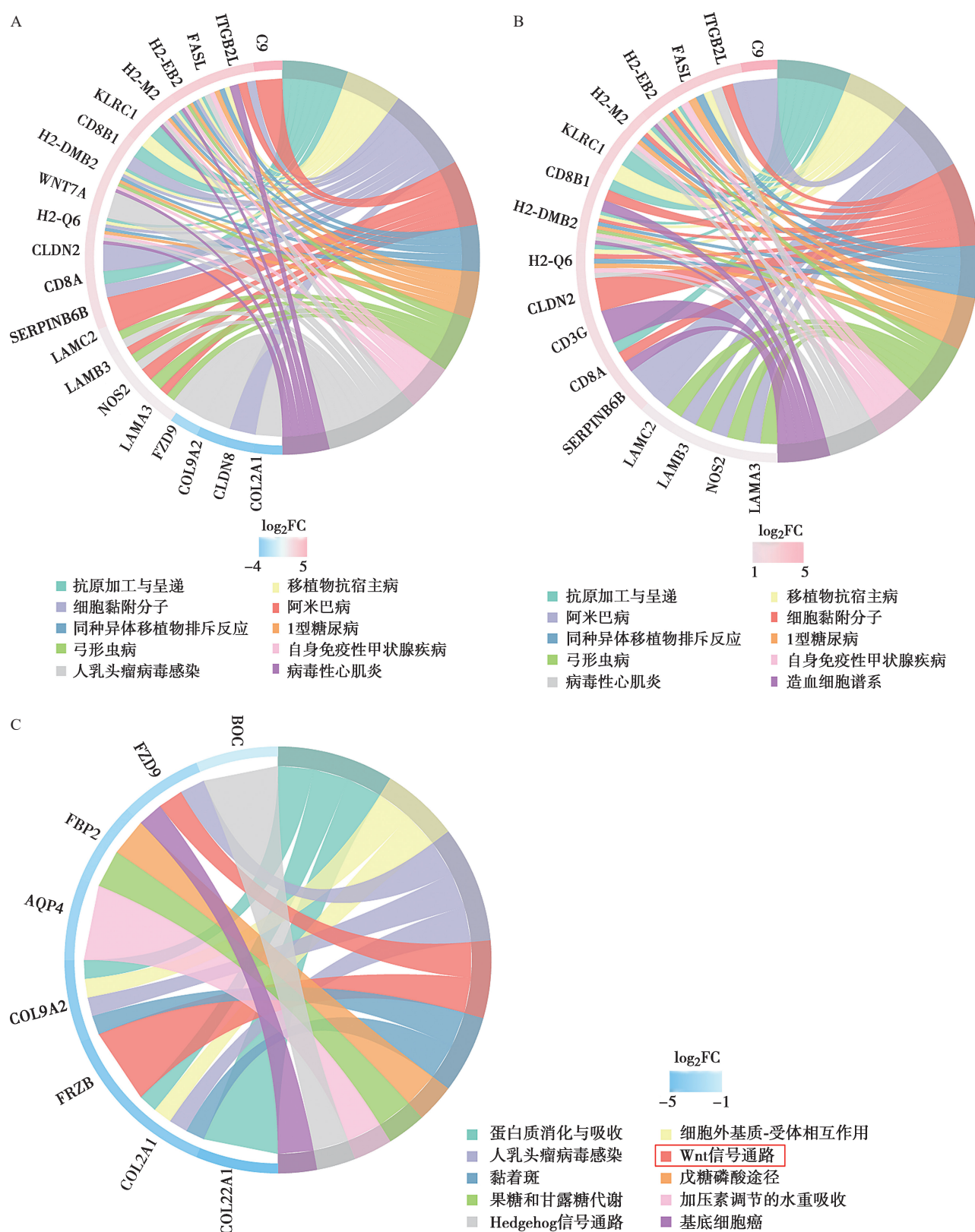


图6 YFJD组和对照组差异表达基因的KEGG富集通路弦图

注: A 为所有差异基因的KEGG富集通路弦图; B 为上调基因中富集程度前10位的KEGG富集通路弦图; C 为下调基因中富集程度前10位的KEGG富集通路弦图。

植物抗宿主病、细胞黏附分子等)中,多数免疫相关基因(如H2-EB2、H2-M2、H2-DMB2、H2-Q6)广泛参与了9条通路,且 $\log_2FC$ 均为正值,表明MHC分子介导的抗原呈递过程被显著激活,见图6A。KEGG上调通路弦图表明,显著上调的基因主要富集于抗原加工与呈递、移植物抗宿主病、细胞黏附分子、同种异体移植排斥等免疫与炎症相关通路,其中,H2家族基因(如H2-EB2、H2-M2、H2-DMB2、H2-Q6)广泛参与多条通路且 $\logFC$ 均为正值,反映出MHC介导的抗原呈递过程被系统激活,CLDN2、CD3G也呈现上调,表明紧密连接和T细胞受体相关分子在特定通路中增强,见图6B。YFJD组小鼠皮下移植瘤组织中多个通路显著下调,其中前10个通路包括蛋白质消化与吸收、细胞外基质-受体相互作用、人乳头瘤病毒感染、Wnt信号通路、黏着斑、磷酸戊糖途径、果糖与甘露糖代谢、血管加压素调节的水重吸收、Hedgehog信号通路及基底细胞癌,提示YFJD可能通过负向干扰上述信号节点而发挥抗肿瘤作用,见图6C。

2.6 Reactome 和 WikiPathways 富集分析 为验证上述结果,对差异表达基因进行基于Reactome和WikiPathways数据库的通路富集分析。Reactome分析结果显示差异基因主要富集于补体激活、抗原呈递、PD-1信号及细胞外基质组织等免疫相关通路(图7A)。WikiPathways数据库富集分析显示排名前20位的富集通路中包括Wnt信号通路、Wnt信号通路与多能性等条目(图7B)。上述结果充分验证YFJD对Wnt信号通路的负向调控作用,同时提示YFJD可能协同调节肿瘤免疫微环境。

3 讨论

HCC的发生和进展与多条信号通路的异常激活相关。其中,Pten缺失和c-Met过表达是HCC中常见的分子事件,可共同促进肿瘤的发生发展,并可引起下游Wnt/ β -catenin等致癌通路的激活^[15]。本研究通过水动力尾静脉注射sgPten/c-Met/SB质粒系统构建HCC原位模型,提取原代肿瘤细胞,建立皮下移植瘤模型,观察YFJD对皮下瘤的抗肿瘤效应。结果证实YFJD组的HCC皮下瘤体积和质量均显著小于对照组,提示该方对HCC的增殖具有抑制作用。肿瘤组织转录组测序进一步显示,YFJD处理组与对照组间存在895个差异表达基因(590个上调、305个下调),提示YFJD主要发挥转录抑制效应。KEGG富集分析表明,Wnt信号通路是下调最显著的通路之一,同时黏着斑、细胞外基质-受体相互作用、Hedgehog信号通路、PI3K-

Akt信号通路等也有富集。对Wnt通路中差异变化基因的进一步分析表明,FZD9、FRZB和Ndr2表达下调,而Wnt7a表达上调,这说明YFJD可能通过多个节点负向干扰Wnt信号的传递。除了经典Wnt/ β -catenin通路外,非经典Wnt通路相关基因在GO富集分析中也高度富集,这与其他中药复方多靶点作用的特点一致^[20],推测YFJD可同时对Wnt信号的不同分支产生抑制作用。

HBV感染是HCC最主要的病因之一^[2],HBV编码的HBV X蛋白可通过与 β -catenin相互作用促进其核转位或抑制GSK3 β 活性^[22],以激活Wnt/ β -catenin信号通路。本研究的细胞实验发现,HBV转染的HepG2.2.15细胞对YFJD的敏感性高于普通HCC细胞,据此推测YFJD对Wnt通路的负向调控可能是其特异性抑制HBV相关HCC细胞增殖的关键原因之一。

本研究所用的sgPten/c-Met原位模型虽非直接由HBV驱动,但Pten缺失与c-Met过表达所诱导的PI3K/AKT及Wnt通路异常,与HBV相关HCC中常见的信号紊乱高度相似^[11,15],这使其成为评估YFJD在HBV相关HCC中潜在疗效的可行替代模型。同时,本研究使用的HepG2.2.15细胞系来源于肝母细胞瘤,虽能稳定表达HBV相关基因,但其细胞背景与典型HBV-HCC存在差异。为弥补这一不足,本研究同步采用sgPten/c-Met原代HCC细胞(来源于小鼠原位肝癌模型),该细胞更能反映HCC的分子特征,二者相互印证增强了结论的可靠性。

除Wnt通路外,GO富集分析还显示免疫反应的正向调节、MHC II类蛋白复合物及溶酶体膜等条目显著富集;Reactome和WikiPathways富集分析亦提示补体激活、抗原呈递、PD-1信号等免疫相关通路高度富集。肿瘤微环境中的免疫状态、细胞外基质重塑及新生血管生成均会影响HCC的进展和药物响应^[21]。因此推测,YFJD可能在对Wnt通路进行直接负向调控的同时协同调节免疫应答与肿瘤微环境,从而多层面抑制HCC增殖。本研究尚存在以下局限性:第一,皮下移植瘤模型便于动态监测,但无法完全模拟原位HCC的免疫微环境和血管生成特征,后续需采用原位模型验证;第二,目前仅在转录组水平进行筛选,Wnt通路关键蛋白(如 β -catenin、GSK3 β 、LEF1)的表达及磷酸化水平仍需Western blot或免疫组织化学验证;第三,体外HBV转染细胞系的结果尚需在HBV转基因动物或患者来源的异种移植瘤模型中进一步验证。此

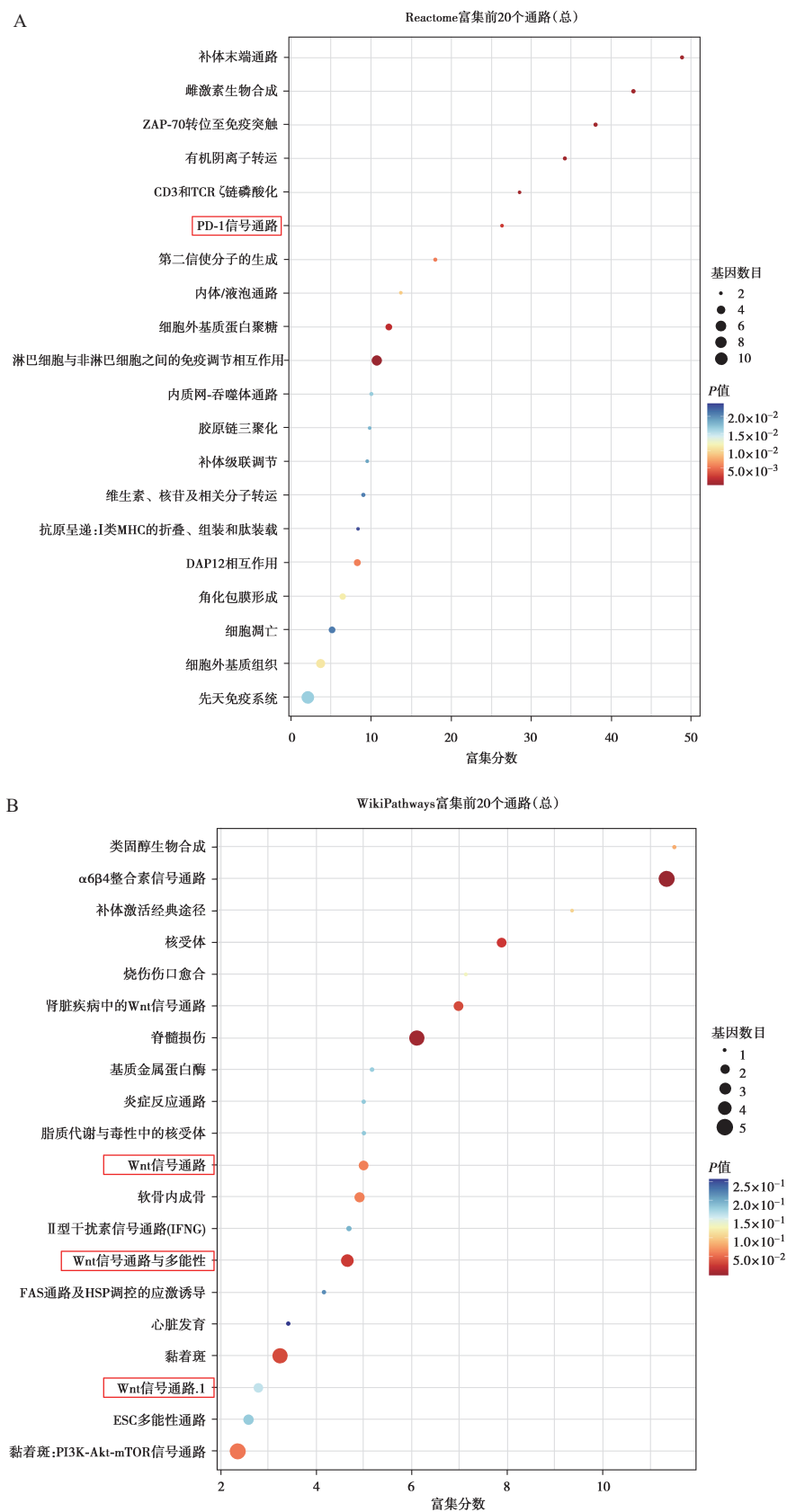


图7 YFJD组和对照组差异表达基因的Reactome和WikiPathways富集分析

注: A为Reactome通路富集分析(排名前20位的通路); B为WikiPathways通路富集分析(排名前20位的通路)。纵轴为通路名称, 横轴为富集得分, 气泡大小或颜色代表富集显著性及基因数目。

外, YFJD 由多味中药组成, 其靶向 Wnt 通路的具体活性成分尚需药物化学实验加以解析。

综上, 本研究使用体内外实验和转录组数据证实 YFJD 既能抑制 HBV 相关 HCC 细胞的增殖, 也可延缓 sgPten/c-Met 源性皮下移植瘤的生长, 具体机制可能与负向调控 Wnt 通路有关。这些结果为 YFJD 治疗 HBV 相关 HCC 提供了初步数据支持, 后续应进一步在功能上验证 Wnt 通路的必要性和充分性。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

人工智能使用声明 本文未使用任何人工智能相关工具对文字及图片进行处理

参考文献

- [1] TOH M R, WONG E Y T, WONG S H, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(5): 766-782.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2022 年版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2022, 15(6): 401-427.
- [3] MAURO E, DE CASTRO T, ZEITLHOEFLER M, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, diagnosis and treatment[J]. *JHEP Rep*, 2025, 7(12): 101571.
- [4] QI D, QIN Y, ZHU H, et al. Resistance of first-line targeted drugs in hepatocellular carcinoma: the epigenetic regulation mechanisms[J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 875.
- [5] ZANELLA E R, GRASSI E, TRUSOLINO L. Towards precision oncology with patient-derived xenografts[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(11): 719-732.
- [6] LIN H Y, JEON A J, CHEN K, et al. The epigenetic basis of hepatocellular carcinoma-mechanisms and potential directions for biomarkers and therapeutics[J]. *Br J Cancer*, 2025, 132(10): 869-887.
- [7] SHEN X, TAN J, LIU R, et al. The genetic duet of concurrent RASAL1 and PTEN alterations promotes cancer aggressiveness by cooperatively activating the PI3K-AKT pathway[J]. *Mol Oncol*, 2025, 19(1): 248-259.
- [8] SANCHEZ-MARTIN A, SANCHON-SANCHEZ P, ROMERO M R, et al. Impact of tumor suppressor genes inactivation on the multidrug resistance phenotype of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115209.
- [9] YU J, CHEN G G, LAI P B S. Targeting hepatocyte growth factor/c-mesenchymal-epithelial transition factor axis in hepatocellular carcinoma: Rationale and therapeutic strategies[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(1): 507-524.
- [10] QIAN R, GUO Y, HU X, et al. PTEN loss and ERBB2/ERBB3-mediated AKT reactivation drive resistance to MET inhibition in MET-amplified hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2025, 48(6): 1711-1724.
- [11] XU Z, HU J, CAO H, et al. Loss of Pten synergizes with c-Met to promote hepatocellular carcinoma development via mTORC2 pathway[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(1): e417.
- [12] WANG H, ZHOU Y, XU H, et al. Therapeutic efficacy of FASN inhibition in preclinical models of HCC[J]. *Hepatology*, 2022, 76(4): 951-966.
- [13] LEHRICH B M, MONGA S P. WNT- β -catenin signalling in hepatocellular carcinoma: from bench to clinical trials[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2026, 23(3): 246-263.
- [14] CAO Y, LV W, DING W, et al. Sevoflurane inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells through regulating the PTEN/Akt/GSK-3 β - β -catenin signaling pathway by downregulating miR-25-3p[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(1): 97-106.
- [15] LIN B, LI M. Role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the development of HCC[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1691297.
- [16] 蔡雪, 于莉华, 刘晓利, 等. 基于免疫微环境探讨养阴扶正解毒法治疗原发性肝癌[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2024, 34(4): 351-354.
- [17] LIU X, LI M, WANG X, et al. Effects of adjuvant traditional Chinese medicine therapy on long-term survival in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Phytomedicine*, 2019, 62: 152930.
- [18] YAN F, WANG X, XIE Y, et al. Yangyin Fuzheng Jiedu Prescription exerts anti-tumor immunity in hepatocellular carcinoma by alleviating exhausted T cells[J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153722.
- [19] WU S Y, ZHU Y Y, SUN J L, et al. Targeting tumor-intrinsic BCL9 reverses immunotherapy resistance by eliciting macrophage-mediated phagocytosis and antigen presentation[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 10039.
- [20] ZHANG Y, LI H, JIANG N, et al. Chinese herbal medicines: the modifier of hepatocellular carcinoma targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1626251.
- [21] XUE J, ZHANG J, CHEN G, et al. Advances in tumor microenvironment and immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Res*, 2025, 33(9): 2309-2329.
- [22] CHA M Y, KIM C M, PARK Y M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/ β -catenin signaling in hepatoma cells[J]. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1683-1693.

收稿日期: 2026-05-08

商子梦, 刘晓利, 于莉华, 等. 基于转录组测序探讨养阴扶正解毒方抑制乙型肝炎病毒相关肝细胞癌 sgPten/c-Met 皮下移植瘤生长及调控 Wnt 通路的机制 [J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2026, 18(2): 79-95.