·肝脏肿瘤·

DOI：10.12449/JCH260216

地五养肝胶囊对肝癌大鼠模型肝再生微环境影响的表观遗传学机制分析

王明刚[1,2]，董嘉美[3]，叶之华[1]，高　翔[1]，陈　乞[1]，余小乔[1]，李瀚旻[1]

1 湖北中医药大学附属医院（湖北省中医院）肝病研究所，国家中医药管理局细胞分子生物学三级实验室，国家中医药管理局慢性肝病肝肾论治重点实验室，中医肝肾研究及应用湖北省重点实验室，武汉 430061

2 广西中医药大学第一附属医院中医药、民族医药科学实验中心，广西高校中医临床研究重点实验室，南宁 530023

3 广西中医药大学研究生院，南宁 530001

通信作者：李瀚旻，lihanmin69@126.com（ORCID：0000-0003-1168-0876）

摘要：目的　探讨地五养肝胶囊通过调控DNA甲基化，改善肝癌大鼠模型肝再生微环境的表观遗传学机制，为临床提供科学用药依据。**方法**　选取48只无特定病原体级SD大鼠，按照随机数字表法分为正常组、模型组和地五养肝胶囊组，每组16只。采用Solt-Farber二步法复制肝癌大鼠模型，地五养肝胶囊组大鼠给予地五养肝胶囊750 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃处理，正常组及模型组给予等量生理盐水灌胃处理，连续干预16周后采集各组大鼠肝组织，使用DNA甲基化芯片分析各组大鼠肝组织DNA甲基化变化情况，并运用基因本体论分析（GO分析）及京都基因与基因组百科全书分析（KEGG分析）对数据进行整合分析。进一步运用甲基化DNA免疫共沉淀-聚合酶链式反应（MeDIP-PCR）技术检测各组大鼠肝组织中YWHAB、ADCK2、ERLIN2、SEMA3B和TPH2等候选差异甲基化基因变化情况，并运用Western Blot及RT-qPCR验证关键甲基化基因表达情况。计量资料两组间比较采用成组t检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。**结果**　DNA甲基化芯片分析发现，与正常组相比，肝癌模型组大鼠肝组织中共检测到2 422个基因启动子区域发生显著甲基化改变。进一步通过GO功能富集与KEGG通路分析显示，这些差异甲基化基因显著富集于类固醇激素生物合成、药物代谢-细胞色素P450等代谢相关通路。与模型组相比，地五养肝胶囊组肝组织中检测到1 650个基因启动子甲基化状态发生显著逆转，其中KEGG富集分析提示，这些基因主要参与钙离子信号通路、cAMP信号通路及细胞外因子信号通路等与细胞增殖、凋亡及微环境调节密切相关的途径。与模型组比较，地五养肝胶囊干预组中ADCK2基因的启动子甲基化水平显著升高（P<0.05），ERLIN2及TPH2基因的启动子甲基化水平显著降低（P值均<0.05）。与模型组相比，地五养肝胶囊干预组中ADCK2 mRNA与蛋白表达显著降低（P值均<0.05）。**结论**　肝组织DNA甲基化异常参与肝癌的发生与发展，地五养肝胶囊影响DNA甲基化水平是其防治肝癌的重要表观遗传学机制。

关键词：肝肿瘤，实验性；地五养肝胶囊；DNA甲基化；肝再生

基金项目：国家自然科学基金（81973669，81774280，81703912，81603484，81573815，81274147）；国家中医临床研究基地（湖北）重点病种研究（JDZX2015172）；李瀚旻湖北中医名师传承工作室资助项目（鄂卫生计生办通〔2018〕32号）；广西壮族自治区中医药管理局重症肝病多学科交叉创新团队项目（GZKJ2306）；广西科技计划项目（桂科AD17129001）

Epigenetic mechanism of Diwu Yanggan Capsule in improving liver regeneration microenvironment in a rat model of liver cancer

WANG Minggang[1,2], *DONG Jiamei*[3], *YE Zhihua*[1], *GAO Xiang*[1], *CHEN Qi*[1], *YU Xiaoqiao*[1], *LI Hanmin*[1]

1. Institute of Liver Disease, The Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine (Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine); Level 3 Laboratory of Cell Molecular Biology, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory of Liver and Kidney Treatment of Chronic Liver Disease, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Hubei Key Laboratory of Theoretical and Applied Research of Liver and Kidney in Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China;

2. Science Experiment Centre for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Scientific Experimental Center for Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine, Nanning 530023, China; 3. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China

Corresponding author: LI Hanmin, lihanmin69@126.com (ORCID: 0000-0003-1168-0876)

Abstract: Objective To investigate the epigenetic mechanism of Diwu Yanggan Capsule in improving liver regeneration microenvironment in a rat model of liver cancer by regulating DNA methylation, and to provide a basis for scientific clinical medication. **Methods** A total of 48 specific pathogen-free Sprague-Dawley rats were divided into normal group, model group, and Diwu Yanggan Capsule group using a random number table, with 16 rats in each group. The Solt-Farber two-step method was used to establish a rat model of liver cancer. The rats in the Diwu Yanggan Capsule group were given Diwu Yanggan Capsule at a dose of 750 mg/kg/d by gavage, and those in the normal group and the model group were given an equal volume of normal saline by gavage. Liver tissue samples were collected from each group of rats after 16 weeks of continuous intervention; DNA methylation chips were used to analyze the change in DNA methylation in liver tissue, and gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were used for data analysis. In addition, the MeDIP-PCR technique was used to detect the changes in candidate differentially methylated genes such as YWHAB, ADCK2, ERLIN2, SEMA3B, and TPH2 in the liver tissue of rats, and Western blot and RT-qPCR were used to verify the expression of key methylated genes. The independent-samples *t* test was used for comparison of continuous data between two groups, and a one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, while the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** The DNA methylation chip analysis showed that compared with the normal group, the model group had significant methylation changes in the promoter region of 2 422 genes in liver tissue of rats. The GO functional enrichment analysis and the KEGG pathway enrichment analysis showed that these differentially methylated genes were significantly enriched in metabolic pathways such as steroid hormone biosynthesis and drug metabolism-cytochrome P450. Compared with the model group, the Diwu Yanggan Capsule group had significant reversal of promoter methylation in 1 650 genes, and the KEGG enrichment analysis showed that these genes were mainly involved in the pathways closely associated with cell proliferation, apoptosis, and microenvironment regulation, such as the calcium ion signaling pathway, the cAMP signaling pathway, and the extracellular factor signaling pathway. Compared with the model group, the Diwu Yanggan Capsule group had a significant increase in the promoter methylation level of the ADCK2 gene ($P<0.05$) and significant reductions in the promoter methylation levels of the ERLIN2 and TPH2 genes (all $P<0.05$). Compared with the model group, the Diwu Yanggan Capsule group had significant reductions in the mRNA expression levels and the protein expression levels of the ADCK2 (all $P<0.05$). **Conclusion** Abnormal DNA methylation in liver tissue participates in the development and progression of liver cancer. The effect of Diwu Yanggan Capsule on DNA methylation level is an important epigenetic mechanism for its effect in the prevention and treatment of liver cancer.

Key words: Liver Neoplasms, Experimental; Diwu Yanggan Capsule; DNA Methylation; Liver Regeneration

Research funding: National Natural Science Foundation of China (81973669, 81774280, 81703912, 81603484, 81573815, 81274147); Key Disease Research Project of the National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine (Hubei) (JDZX2015172); Li Hanmin's Hubei Famous Traditional Chinese Medicine Master's Transmission Studio Funding Project(Hubei Health and Family Planning Commission Document (2018) No.32); Guangxi Zhuang Autonomous Region Traditional Chinese Medicine Administration Department's Multi-Disciplinary Cross-Interactive Innovation Team Project for Severe Liver Diseases (GZKJ2306); Guangxi Science and Technology Project (Guike AD17129001)

肝细胞癌是全球常见的恶性肿瘤，具有高发病率、高病死率及高复发率的临床特点[1]。在中国，其发病率及病死率分别居恶性肿瘤的第4位和第2位，高于世界平均水平[2]。近年来，肝癌治疗手段多样，早期多采用手术切除或移植，中晚期则采用介入、消融等疗法[3]。然而，受肝癌发生、发展及转移机制尚未完全阐明的影响，其总体远期疗效不佳，总体5年生存率不超过20%[4-5]。因此，探索新型治疗方法和防治策略是改善现状的有效途径。

近年来，切断肝癌微环境与肝癌细胞之间的联系已

成为肝癌防治的新策略[6-7]。肿瘤干细胞理论在阐明肝癌的发生机制以及细胞起源方面备受关注。有研究提出，肝癌可能是肝干细胞在自我更新过程中失控，导致其未分化或分化不全的结果，而肝干细胞的表观遗传改变可能是其重要机制之一[8-9]。本研究团队提出，肝癌肝再生微环境作为肝癌微环境的组成部分之一，主要指紊乱表达的肝再生调控因子、异常激活/失活的信号途径及失序的组织结构等组成的恶性肝再生微环境体系，恶化的肝再生微环境启动会促进或加速肝癌的发生发展或复发转移[10-12]。DNA甲基化作为重要的表观遗传学调控机制，已被证实在肝癌发生、侵袭及转移等演变过程中发挥重要作用，其异常状态会促进肝再生微环境恶化，进而促进肝癌的形成与发展[13]。相反，分析肝癌再生微环境中DNA甲基变化特点，并调控DNA甲基化异常，以改善肝癌肝再生微环境，可成为防治肝癌的有效手段之一。

中药复方制剂地五养肝胶囊是基于对肝癌肝再生微环境调控深入研究而研发的有效方药[14]。循证医学证据表明，地五养肝胶囊能降低乙型肝炎病毒e抗原阴性慢性乙型肝炎患者的肝癌发生风险及发生率[15]。实验研究证实，地五养肝胶囊可提高肝癌大鼠模型的存活率，调控多种信号通路，从而阻断肝癌的病理进程，改善肝癌肝再生微环境状态，抑制肝癌的发生与发展[14,16-17]。本研究通过建立Solt-Farber肝癌大鼠模型，进一步利用大鼠的肝癌组织，使用DNA甲基化芯片结合生物信息学分析技术，解析DNA甲基化变化参与肝癌发生与发展的机制特点，旨在探明地五养肝胶囊通过影响DNA甲基化防治肝癌的疗效路径。

1 材料与方法

1.1 化学药品及试剂 二乙酰氨基芴、5-氟尿嘧啶和二乙基亚硝胺购于美国Sigma公司；DNeasy血液和组织试剂盒、免疫沉淀缓冲液购于德国Qiagen公司；Nimblegen杂交缓冲液购于美国Madison公司；AarF结构域包含激酶2（AarF domain-containing kinase 2，ADCK2）蛋白一抗购于美国Thermo公司。

1.2 地五养肝胶囊的制备 本研究所用地五养肝胶囊（鄂药制字Z20113160）经湖北省食品药品监督管理局批准生产，由湖北省中医院肝病研究所提供。

1.3 Solt-Farber二步法肝癌大鼠模型建立及取材 选用48只雄性无特定病原体级SD大鼠，4～5周龄，体重（150±50）g，由湖北省疾病预防控制中心提供（动物生产许可证号：SCXK湘2019-0014）。大鼠按照随机数字表法分为正常组（Normal组）、模型组（Model组）和地五养肝胶囊组（DWYG组），每组16只。全部大鼠适应性饲养1周后开始构建模型，采用Solt-Farber二步法建立肝癌大鼠模型，具体方法如下：造模第1天Model组及DWYG组按50 mg/kg的剂量一次性腹腔注射二乙基亚硝胺作为启动剂，2周后均按15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$剂量予以二乙酰氨基芴灌胃7天，第3周末行2/3肝部分切除术（切除肝左叶和中叶），目的是通过肝再生刺激创造肝癌发生的敏感微环境，加速肝细胞异常增殖及癌变进程[16]。自肝切除术后第4天起，DWYG组大鼠给予地五养肝胶囊750 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$灌胃处理，Normal组及Model组给予等量生理盐水灌胃处理，连续干预16周。干预结束后，经3%戊巴比妥钠（45 mg/kg）麻醉大鼠，腹主动脉采血后处死大鼠，观察肝组织形态并收集各组大鼠肝癌组织，将肝癌组织快速液氮冷冻，置于-80 ℃冰箱中保存备检相关指标[16]。

1.4 DNA甲基化芯片检测与分析 提取各组实验大鼠肝组织DNA，进行定量评估并检测完整程度。取1 μg超声打断的基因组DNA，加入1 μL抗5-甲基胞嘧啶单克隆抗体以及400 μL免疫沉淀缓冲液，充分混合后于4 ℃下孵育过夜。次日，加入anti-mouse IgG磁珠200 μL，于4 ℃条件下混合处理2 h，处理结束后回收抗体结合的DNA片段，并在4 ℃条件下清洗5次。清洗完成后，使用TE缓冲液（含有0.25%十二烷基硫酸钠和0.25 mg/mL的蛋白酶K）在65 ℃条件下重悬磁珠2 h，重悬后样本冷却至室温。随即进行DNA标记和芯片杂交，使用高解析度芯片扫描仪检测DNA甲基化芯片中的杂交信号并对数据进行分析。使用enrichment peak代表样本间差异的DNA甲基化区域，利用每组探针的log_2-ratio均值计算探针的M′值，并基于M′值再次运算NimbleScan软件中的peak-finding程序以搜索各样本间甲基化peaks。DNA甲基化芯片检测与分析由上海康成生物工程有限公司提供技术支持。

1.5 甲基化DNA免疫共沉淀-聚合酶链式反应（methylated DNA immunoprecipitation-polymerase chain reaction，MeDIP-PCR）检测目的基因DNA甲基化变化 提取肝癌组织DNA，超声处理后纯化，使用Nanodrop测定DNA浓度。配制PCR反应体系，混合后离心，加入384孔PCR板中，封口后进行PCR反应。通过熔解曲线验证产物特异性，记录各样本的CT值，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算%（MeDIP/Input）值（目的基因在MeDIP组相对于Input

组的富集程度），进而分析甲基化丰度倍比值。所用引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名	引物序列（5′-3′）	退火温度（℃）	产物长度（bp）
YWHAB		60	238
F	5′-CCGCCCTCTCTTCTTCCTC-3′		
R	5′-CGCTCTAGCCCAAGTCCC-3′		
ADCK2		60	142
F	5′-AGGCTTTTGCCCTGGTTC-3′		
R	5′-GCACGGAGCCTACAGTCAG-3′		
ERLIN2		60	146
F	5′-ACCCCACGCCACCTCTTG-3′		
R	5′-TCACTCAGCTCGCCCACC-3′		
SEMA3B		60	173
F	5′-CACCCTCCTCTGTAACCTCC-3′		
R	5′-TGCCCTCTGAAATGACCAC-3′		
TPH2		60	164
F	5′-AGGCAGACAGAAAGGAGGGA-3′		
R	5′-CTTGGCGGCTTAACAGTGAG-3′		

1.6 Western Blot检测目的蛋白表达 使用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，电泳转膜后快速封闭，加入一抗置于4 ℃孵育过夜，加入二抗孵育后显色。使用Image J软件计算蛋白条带灰度值，分析目的蛋白相对表达量。

1.7 逆转录实时定量聚合酶链式反应（reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction，RT-qPCR）检测目的基因mRNA表达 提取总mRNA，测定浓度后逆转录合成cDNA，配置20 μL RT-qPCR反应体系。进行PCR反应，实验中同步进行内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）的定量检测，扩增反应在LC480荧光定量PCR仪上进行，各样品的荧光信号值由荧光定量PCR仪的支持软件实时产生并自动计算确定。以$2^{-\Delta\Delta}$CT表示实验组与对照组中基因的倍数关系（ADCK2 F：5′-CTTGGGCAAGGACGGAATAC-3′、R：5′-ATGTTTCGTCGGCAAGGTTT3′、261 bp，GAPDH F：5′-CGCTAACATCAAATGGGGTG-3′、R：5′-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3′、201 bp）。

1.8 统计学方法 采用SPSS 19.0统计软件进行数据处理。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用成组t检验；多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

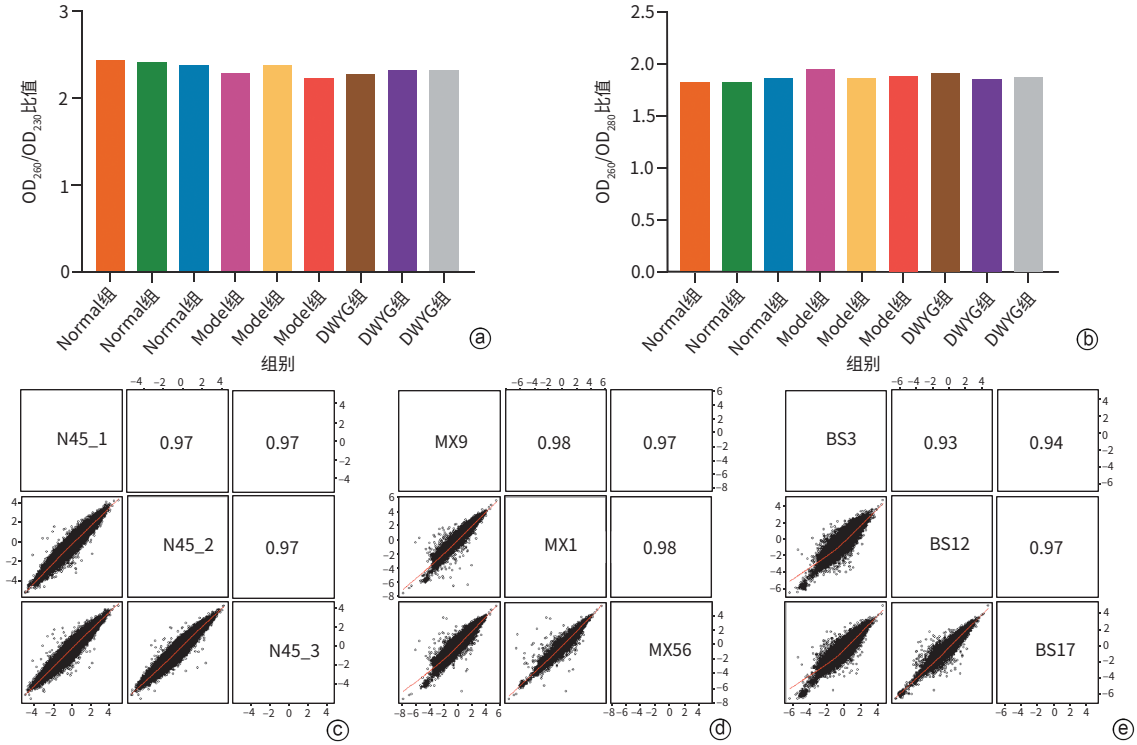
2 结果

2.1 DNA甲基化芯片分析结果

2.1.1 各组大鼠肝组织提取DNA样品及DNA甲基化芯片扫描数据的质量控制 对各组大鼠肝癌组织提取的DNA进行定量分析，结果显示，各组标本OD_{260}/OD_{280}及OD_{260}/OD_{230}比值范围是1.8～2.5，表明DNA样本纯度较高。琼脂糖凝胶电泳分析各组大鼠肝癌组织提取DNA完整性，可见各组样本有完整明显的主带，无明显弥散拖带，表明各组大鼠肝癌组织提取DNA质量控制合格，可以进行后续实验。为保障芯片扫描数据的有效性和可利用性，通过绘制相关矩阵图完成芯片扫描数据质量控制。结果显示，Normal组间、Model组间、DWYG组间的芯片原始数据均符合重复性原则，组间样本原始值可信赖（图1）。

2.1.2 各组样本间差异启动子甲基化基因分析 在差异启动子甲基化基因分析中，Model组与Normal组比较，共有2 422个基因启动子存在甲基化差异，其中，高甲基化948个，高CpG含量启动子（high CpG content promoter，HCP）类197个、中CpG含量启动子（intermediate CpG content promoter，ICP）类284个、低CpG含量启动子（low CpG content promoter，LCP）类467个，低甲基化1 474个（HCP类995个、ICP类295个、LCP类184个），其在染色体上的数量见图2。提示这些差异的基因启动子甲基化参与了Solt-Farber肝癌大鼠肝癌的发生与发展。DWYG组与Model组比较，共有1 650个基因启动子存在甲基化差异，其中，高甲基化935个（HCP类588个、ICP类219个、LCP类128个），低甲基化715个（HCP类216个、ICP类186个、LCP类313个），其在染色体上的数量见图2。这些差异的基因启动子甲基化区域极有可能是地五养肝胶囊通过影响Solt-Farber肝癌大鼠的肝癌组织DNA甲基化阻断肝癌发生及发展的作用靶点。

2.1.3 各组样本差异启动子甲基化基因本体论分析（gene ontology analysis，GO分析） Model组与Normal组差异启动子甲基化基因GO分析结果表明，差异启动子甲基化基因主要参与免疫反应过程、细菌来源分子反应及生物刺激应激等生物过程，分子功能与氧化还原酶活性、分子功能调节及蛋白质二聚体活性等有关，位于质膜受体复合体、内质网膜及T细胞受体复合物等细胞成分中（图3）。DWYG组与Model组差异启动子甲基化基因GO分析发现，DWYG组治疗大鼠通过DNA甲基化参



注：a，各组DNA样本OD_{260}/OD_{230}比值分布柱状图；b：各组DNA样本OD_{260}/OD_{280}比值分布柱状图；c，组内样本DNA数据相关性散点图，展示同组（如Normal组）不同重复样本间的DNA数据重复性；d，组间样本DNA数据相关性散点图，展示不同组（如Normal组vs Model组）样本间的DNA数据关联度；e，样本间DNA数据相关系数矩阵图，图中数值为样本间的Pearson相关系数（越接近1，代表样本数据的一致性、重复性越高）。

图1　各组大鼠肝癌组织提取DNA质量控制数据及各组间相关矩阵分析分布图

Figure 1　Quality control data of DNA extracted from liver cancer tissues of each group and distribution map of correlation analysis among different groups

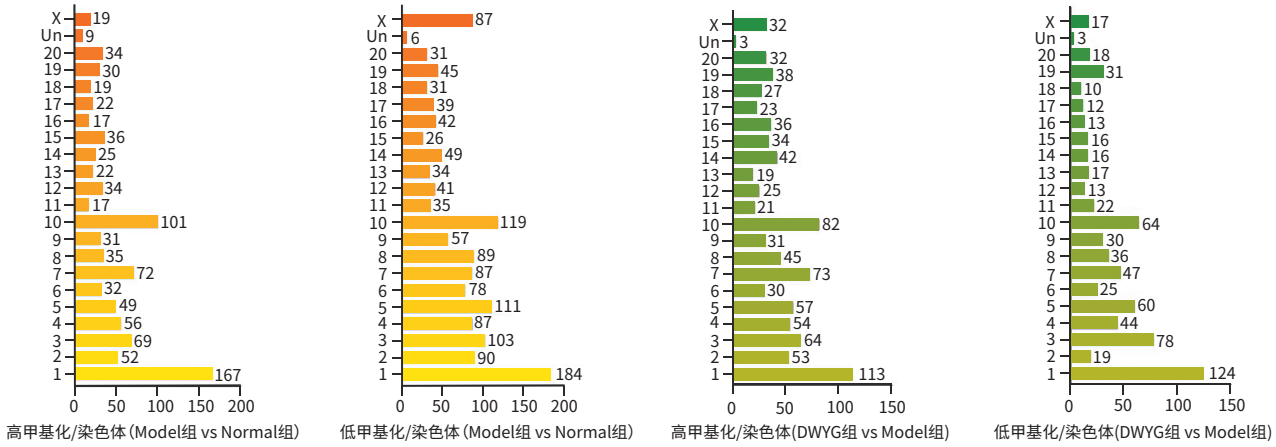
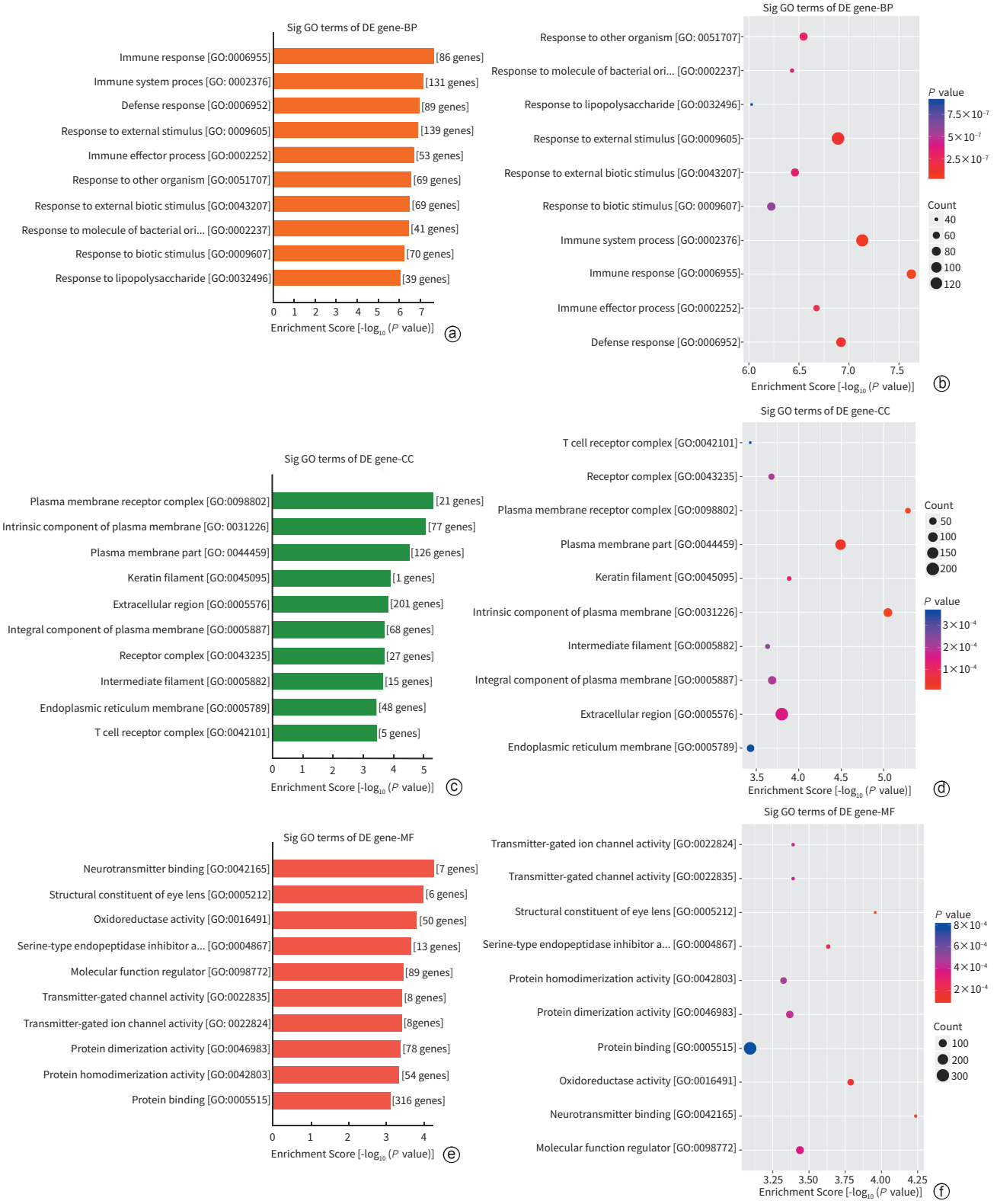


图2　差异甲基化基因在染色体上的分布情况

Figure 2　Distribution of differentially methylated genes on the chromosomes

与细胞代谢过程、细胞定位及细胞器组织活动等生物过程；在蛋白质结合、核糖核苷酸结合及离子通道结合等分子功能方面与Model组大鼠明显不同，同时细胞器结合膜、细胞质及细胞器等细胞组分也存在明显差异（图4）。

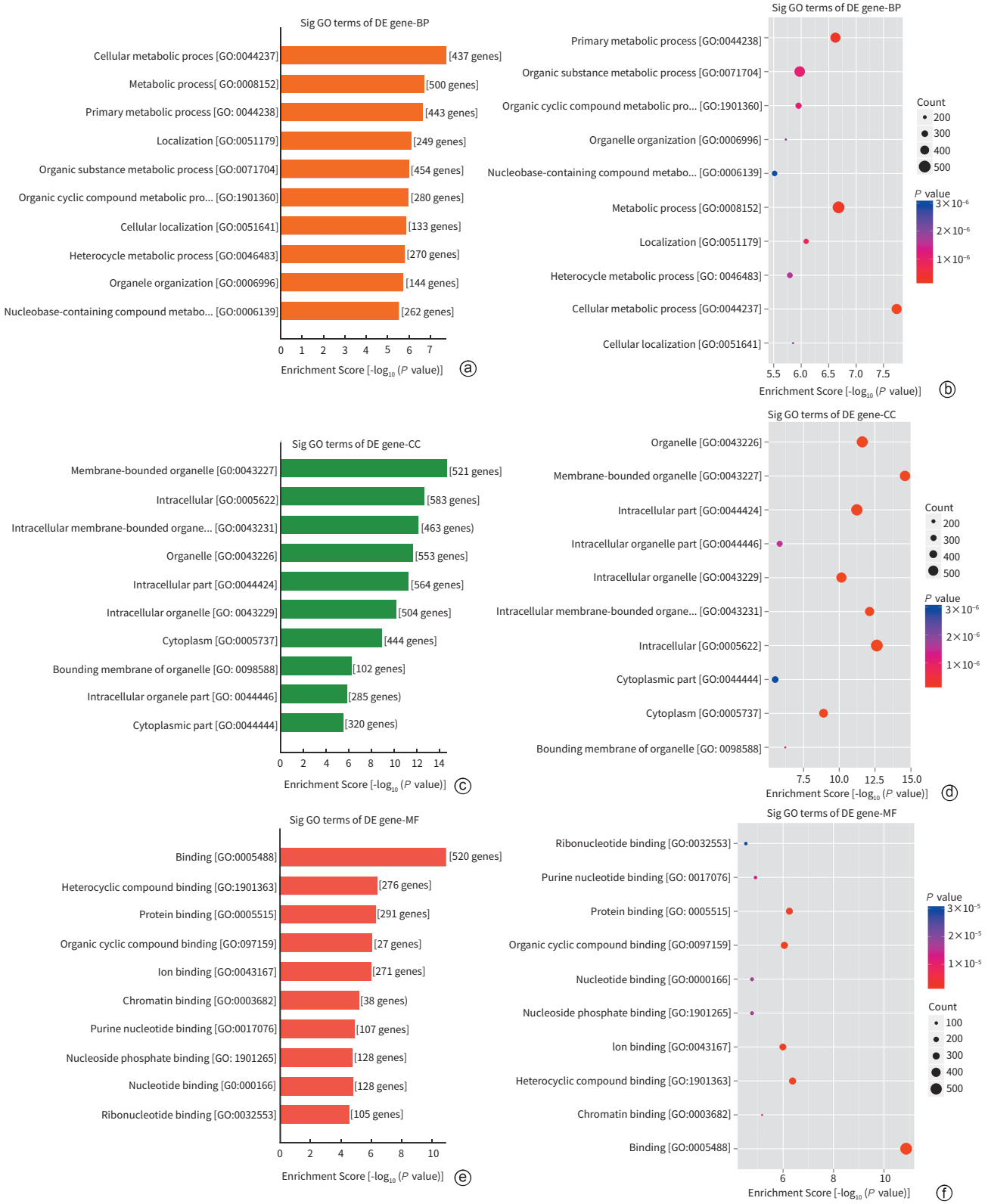
2.1.4　各组样本差异启动子甲基化基因京都基因与基因组百科全书分析（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG分析）　Model组与Normal组差异启动子甲基化基因KEGG分析发现，差异启动子甲基化基因显著富集在造血细胞信号通路、类固醇激素生物合成通路、辅助性T细胞1和辅助性T细胞2细胞分化通路、Toll样受体信号通路、硒化合物与代谢通路及维甲酸代谢通



注：a，差异基因的生物过程显著富集 GO term 柱状图；b，差异基因的生物过程显著富集 GO term 气泡图；c，差异基因的细胞组分显著富集 GO term 柱状图；d，差异基因的细胞组分显著富集 GO term 气泡图；e，差异基因的分子功能显著富集 GO term 柱状图；f，差异基因的分子功能显著富集 GO term 气泡图。

图 3　Model 组与 Normal 组差异启动子甲基化基因 GO 分析

Figure 3　GO analysis of differentially methylated promoter genes between model group and normal group



注：a，差异基因的生物过程显著富集GO term柱状图；b，差异基因的生物过程显著富集GO term气泡图；c，差异基因的细胞组分显著富集GO term柱状图；d，差异基因的细胞组分显著富集GO term气泡图；e，差异基因的分子功能显著富集GO term柱状图；f，差异基因的分子功能显著富集GO term气泡图。

图4 DWYG组与Model组差异启动子甲基化基因GO分析

Figure 4 GO analysis of differentially methylated promoter genes between the Diwu Yanggan Capsule group and the model group

路等信号通路中（图5）。DWYG组与Model组差异启动子甲基化基因Pathway分析发现，差异启动子甲基化基因在钙离子信号通路、缺氧诱导因子1信号通路、环鸟苷酸-蛋白激酶G信号通路、癌症信号通路、细胞脂肪调节信号通路及环腺苷酸信号通路中显著富集（图6）。

2.2 MeDIP-PCR检测YWHAB、ADCK2、ERLIN2、SEMA3B和TPH2基因甲基化水平 Model组ADCK2甲基化丰度倍比值低于DWYG组，TPH2和ERLIN2甲基化丰度倍比值高于地DWYG组，且差异均有统计学意义（P值均<0.05）；此外，Model组与DWYG组的SEMA3B、YWHAB甲基化丰度倍比值比较无统计学差异（P值均>0.05）。上述研究结果表明，地五养肝胶囊干预治疗可提高大鼠肝癌组织ADCK2基因甲基化水平，降低ERLIN2和TPH2基因甲基化水平（图7）。

2.3 地五养肝胶囊对大鼠肝癌组织ADCK2蛋白mRNA表达的影响 Western Blot结果显示，Model组大鼠肝癌组织中ADCK2基因蛋白表达水平显著高于Normal组，DWYG组的上述蛋白表达水平显著低于Model组（P值均<0.05）。同样，RT-qPCR结果显示，Model组中ADCK2 mRNA表达水平显著高于Normal组，DWYG组ADCK2 mRNA表达水平显著低于Model组（P值均<0.05）（图8）。

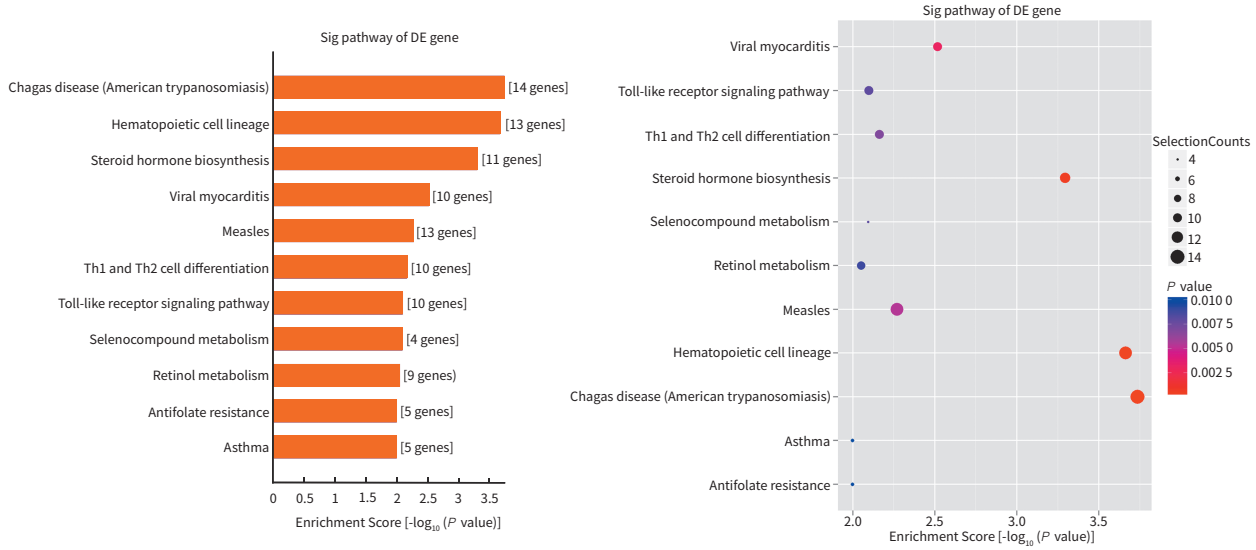


图5 Model组与Normal组差异启动子甲基化基因Pathway分析

Figure 5 Analysis of differentially methylated promoter genes in the model group and the normal group using pathway approach

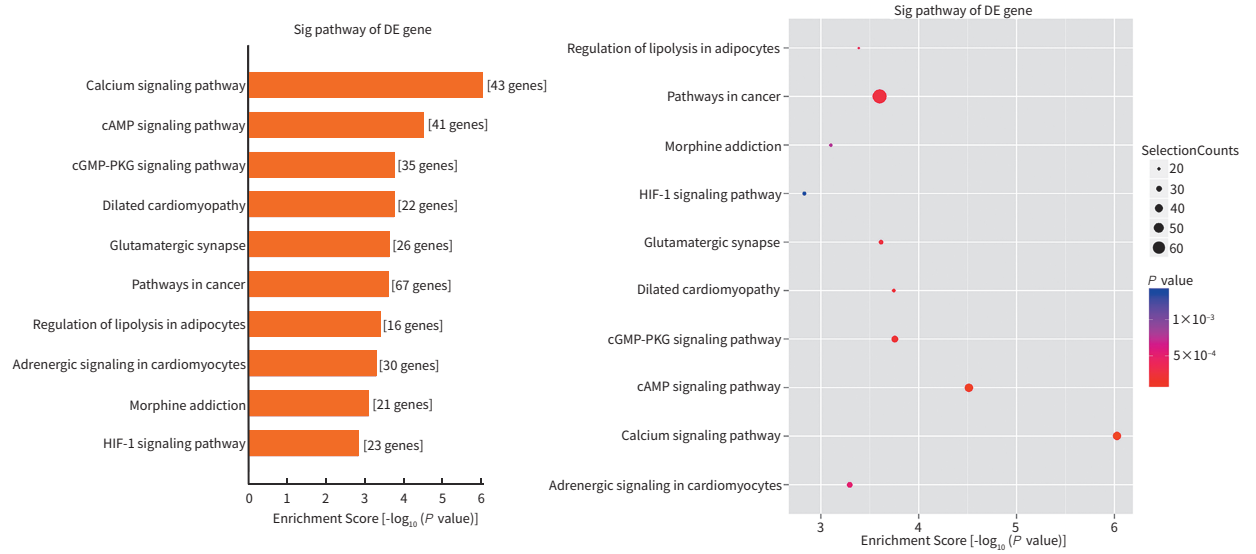


图6 DWYG组与Model组差异启动子甲基化基因Pathway分析

Figure 6 Analysis of differentially methylated promoter genes in the Diwu Yanggan Capsule group and the model group using pathway approach

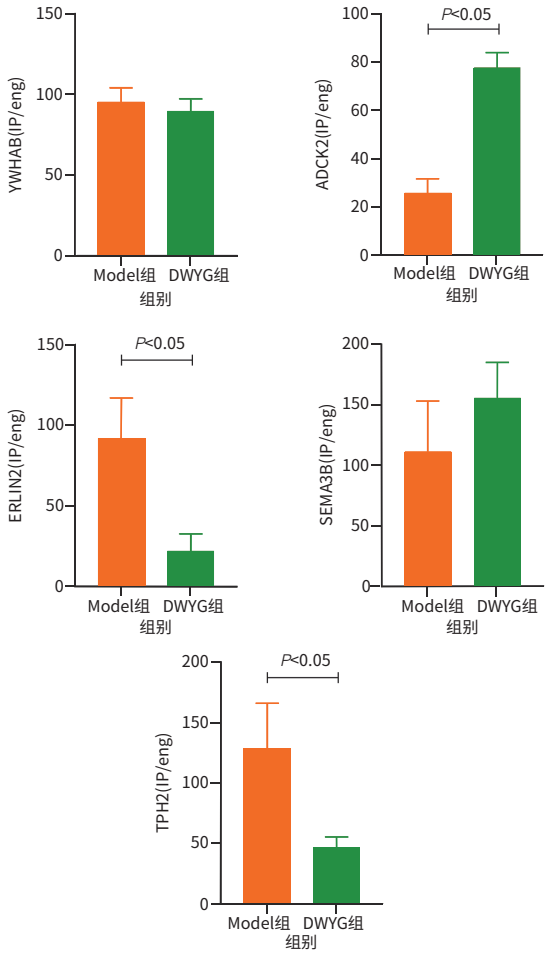


图7 MeDIP-PCR检测各组大鼠肝癌组织YWHAB、ADCK2、ERLIN2、SEMA3B及TPH2甲基化水平

Figure 7 MeDIP-PCR was used to detect the methylation levels of YWHAB、ADCK2、ERLIN2、SEMA3B AND TPH2 in liver cancer tissues of each group of rats

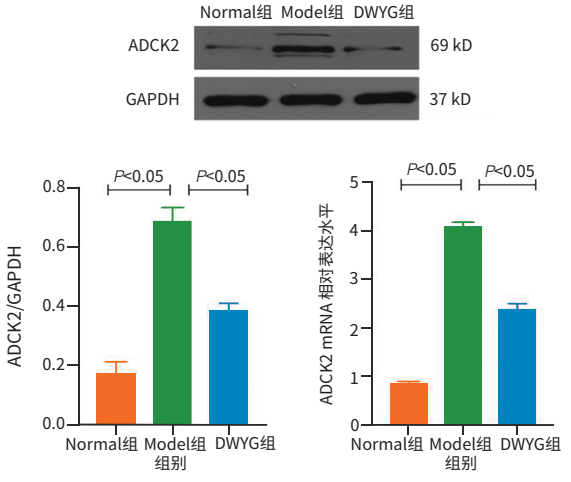


图8 Western Blot及RT-qPCR检测大鼠肝癌组织ADCK2表达情况

Figure 8 Western Blot and RT-qPCR were used to detect the expression of ADCK2 in liver cancer tissues of rats

3 讨论

近年来，肝癌在全球范围内的发病率及病死率持续上升，而针对肝癌的治疗策略仍然不足。因此，深入探讨肝癌发病和进展机制具有重要意义。肝癌的进展与恶化与肝再生微环境密切相关，异常或恶化的肝再生微环境可以促进肝癌的发生发展、复发转移[10-12]。研究显示，地五养肝胶囊具有多方面改善肝再生微环境的作用特点，可促进恶性的肝癌肝再生微环境向正常的肝再生微环境转变，进而延缓、阻止甚至逆转肝癌的发生与发展[14,16-18]。

本研究采用Solt-Farber二步法复制肝癌大鼠模型，该模型通过二乙基亚硝胺启动癌变、二乙酰氨基芴促进异常增殖，结合2/3肝切除诱导肝再生微环境，更贴近临床肝癌发生的病理生理过程，能有效模拟肝癌肝再生微环境。本研究结果显示，Model组与Normal组比较共有2 422个基因启动子存在甲基化差异，其中高甲基化948个、低甲基化1 474个。DWYG组与Model组比较共有1 650个基因启动子存在甲基化差异，其中高甲基化935个、低甲基化715个，这些差异基因可能为地五养肝胶囊阻断肝癌发生发展的作用靶点。GO和KEGG分析显示，DWYG组大鼠在细胞代谢等方面与Model组存在显著差异。研究表明，地五养肝胶囊防治Solt-Farber大鼠肝癌的发生发展可能通过钙离子等信号通路发挥改善肝再生微环境以实现其疗效的作用。这一发现拓宽了地五养肝胶囊改善肝癌肝再生微环境的疗效机制研究思路，有助于探索差异甲基化基因位点及研究下游影响的生物学效应。

基于DNA甲基化芯片数据，选取ADCK2进行MeDIP-PCR检测以验证基因DNA甲基化变化情况，Western Blot及RT-qPCR检测实验大鼠肝癌组织中ADCK2表达情况，研究结果提示地五养肝胶囊干预治疗可以降低Solt-Farber肝癌大鼠肝癌组织ADCK2蛋白和mRNA表达水平，其机制与提高ADCK2启动子DNA甲基化水平存在密切关联。ADCK家族目前已知共有5个成员：ADCK1、ADCK2、ADCK3、ADCK4及ADCK5，ADCK2在细胞中定位于细胞线粒体周围并与线粒体功能密切相关[19-20]。研究证实，ADCK2在非小细胞肺癌细胞中高表达，敲除ADCK2可显著抑制非小细胞肺癌细胞增殖、迁移与侵袭能力，并诱导细胞凋亡，因此ADCK2可作为非小细胞肺癌的治疗靶点[21-22]。目前，ADCK2相关功能研究尚不充分，已有研究表明其与多种生物学功能相关，并能影响蛋白质磷酸化过程及膜质组分[23]。此

外，有文献报道，抑制ADCK2的表达，可导致HIF-1α转录与聚集减少[24]。

综上所述，地五养肝胶囊可影响Solt-Farber大鼠肝癌组织DNA甲基化，具有防治肝癌发生与发展的特殊疗效作用。地五养肝胶囊可通过提高大鼠肝癌组织ADCK2基因甲基化程度，降低ADCK2表达强度。后续研究团队将围绕ADCK2开展深入的分子机制研究，以进一步揭示地五养肝胶囊的药效作用机制。

伦理学声明：本研究方案于2019年12月30日经由湖北省中医院伦理委员会审批，批号：2019017。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：王明刚、董嘉美负责设计论文框架，起草论文并负责部分实验操作工作；叶之华、高翔负责DNA甲基化芯片数据的分析与整理；陈乞、余小乔负责论文修改；李瀚旻负责拟定写作思路，指导撰写文章并最后定稿。王明刚和董嘉美贡献等同，同为第一作者。

参考文献：

[1] BROWN ZJ, TSILIMIGRAS DI, RUFF SM, et al. Management of hepatocellular carcinoma: A review[J]. JAMA Surg, 2023, 158(4): 410-420. DOI: 10.1001/jamasurg.2022.7989.
[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, 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. DOI: 10.3322/caac.21660.
[3] ZHOU J, SUN HC, WANG Z, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition)[J]. Liver Cancer, 2023, 12(5): 405-444. DOI: 10.1159/000530495.
[4] RICH NE, YOPP AC, SINGAL AG. Medical management of hepatocellular carcinoma[J]. J Oncol Pract, 2017, 13(6): 356-364. DOI: 10.1200/JOP.2017.022996.
[5] CHEN WQ. Cancer statistics: Updated cancer burden in China[J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 1. DOI: 10.3978/j. issn. 1000-9604.2015.02.07.
[6] TAHMASEBI BIRGANI M, CARLONI V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 405. DOI: 10.3390/ijms18020405.
[7] SAS Z, CENDROWICZ E, WEINHÄUSER I, et al. Tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma: Challenges and opportunities for new treatment options[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3778. DOI: 10.3390/ijms23073778.
[8] CLEVERS H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges[J]. Nat Med, 2011, 17(3): 313-319. DOI: 10.1038/nm.2304.
[9] WU K, DING J, CHEN C, et al. Hepatic transforming growth factor beta gives rise to tumor-initiating cells and promotes liver cancer development[J]. Hepatology, 2012, 56(6): 2255-2267. DOI: 10.1002/hep.26007.
[10] LI HM, ZHANG LS. Liver regeneration microenvironment of hepatocellular carcinoma for prevention and therapy[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 1805-1813. DOI: 10.18632/oncotarget.12101.
[11] LI HM. Microcirculation of liver cancer, microenvironment of liver regeneration, and the strategy of Chinese medicine[J]. Chin J Integr Med, 2016, 22(3): 163-167. DOI: 10.1007/s11655-016-2460-y.
[12] LI HM, YE ZH. Microenvironment of liver regeneration in liver cancer[J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(7): 555-560. DOI: 10.1007/s11655-017-2806-0.
[13] WANG MG, YE QL, MAO DW, et al. Research progress in liver-regenerating microenvironment and DNA methylation in hepatocellular carcinoma: The role of traditional Chinese medicine[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e920310. DOI: 10.12659/MSM.920310.
[14] LI Y, LI HM, LI ZC, et al. Ingredients, anti-liver cancer effects and the possible mechanism of DWYG formula based on network prediction[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 4213-4227. DOI: 10.2147/OTT.S238901.
[15] LI HM, YE ZH, GAO X, et al. Diwu Yanggan capsule improving liver histological response for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: A randomized controlled clinical trial[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(5): 1511-1521.
[16] ZHAO BB, YE ZH, GAO X, et al. Diwu Yanggan modulates the Wnt/β-catenin pathway and inhibits liver carcinogenesis signaling in 2-AAF/PH model rats[J]. Curr Med Sci, 2019, 39(6): 913-919. DOI: 10.1007/s11596-019-2123-2.
[17] YE ZH, GAO X, ZHAO BB, et al. Diwu Yanggan capsule inhibits the occurrence and development of liver cancer in the Solt-Farber rat model by regulating the Ras/Raf/Mek/Erk signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11): 3797-3805.
[18] ZHAO BB, LI HM, GAO X, et al. The herbal compound "Diwu Yanggan" modulates liver regeneration by affecting the hepatic stem cell microenvironment in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 468303. DOI: 10.1155/2015/468303.
[19] VIERTHALER M, SUN Q, WANG YM, et al. ADCK2 knockdown affects the migration of melanoma cells via MYL6[J]. Cancers, 2022, 14(4): 1071. DOI: 10.3390/cancers14041071.
[20] VÁZQUEZ-FONSECA L, SCHAEFER J, NAVAS-ENAMORADO I, et al. ADCK2 haploinsufficiency reduces mitochondrial lipid oxidation and causes myopathy associated with CoQ deficiency[J]. J Clin Med, 2019, 8(9): 1374. DOI: 10.3390/jcm8091374.
[21] ZHANG JZ, LIU J, XU YX, et al. Identification of the mitochondrial protein ADCK2 as a therapeutic oncotarget of NSCLC[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(16): 6163-6175. DOI: 10.7150/ijbs.78354.
[22] HERNÁNDEZ-CAMACHO JD, FERNÁNDEZ-AYALA DJM, VICENTE-GARCÍA C, et al. Calorie restriction rescues mitochondrial dysfunction in Adck2-deficient skeletal muscle[J]. Front Physiol, 2022, 13: 898792. DOI: 10.3389/fphys.2022.898792.
[23] XU Y, WANG L, ZHANG H, et al. ADCK2 regulates protein phosphorylation and membrane composition in mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(4): 987-993. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.054.
[24] SCHOOLMEESTERS A, BROWN DD, FEDOROV Y. Kinome-wide functional genomics screen reveals a novel mechanism of TNFα-induced nuclear accumulation of the HIF-1α transcription factor in cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31270. DOI: 10.1371/journal.pone.0031270.

收稿日期：2025-07-17；**录用日期：**2025-11-04

本文编辑：王莹

引证本文：WANG MG, DONG JM, YE ZH, et al. Epigenetic mechanism of Diwu Yanggan Capsule in improving liver regeneration microenvironment in a rat model of liver cancer[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(2): 362-371.
王明刚, 董嘉美, 叶之华, 等. 地五养肝胶囊对肝癌大鼠模型肝再生微环境影响的表观遗传学机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(2): 362-371.