解毒消癥饮通过抑制SPC25的表达调控肝癌细胞生长的机制研究

张小琴[1],陈莉莉[1],江芷珊[2],李悦轩[3],袁 洁[1],叶子贤[1],陈旭征[1*]
(1.福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院,福建 福州 350122;
2.福建省南平市第二医院,福建 南平 354200;3.福建中医药大学药学院,福建 福州 350122)

摘 要: 目的 基于网络药理学与分子对接预测解毒消癥饮(JXY)活性成分通过靶向纺锤体极体组件25同族体(SPC25)调控肝癌细胞周期的潜在机制,结合癌症基因组图谱(TCGA)临床数据分析与肝细胞癌(HCC)预后的关联,并通过细胞活力、周期分布及SPC25表达验证JXY抗肝癌作用。 方法 借助网络药理学方法,筛选JXY活性成分与治疗肝癌潜在靶点,进行JXY治疗肝癌的潜在靶点功能富集分析以及通路富集分析,再筛选JXY活性成分通过影响肝癌细胞周期治疗肝癌的潜在核心靶点,并将其与SPC25进行分子对接,分析JXY关键成分与SPC25的结合位点和结合能力。下载TCGA中HCC和正常肝组织样本的基因表达谱和临床数据,分析HCC与SPC25生存预后关系,开展基因本体论(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)和基因集富集(GSEA)的富集分析,确定SPC25与HCC的关联性。CCK-8法检测不同浓度JXY乙酸乙酯提取物(EE-JXY)对不同肝癌细胞株Hep-Rg、SK-Hep-1、Huh-7、Hep-3B细胞活力的影响。将细胞分为0、50、100、200 μg/mL组,分别给予0、50、100、200 μg/mL EE-JXY干预24 h,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测SPC25 mRNA的转录水平;Western blot检测Hep-Rg肝癌细胞中SPC25的蛋白表达水平;流式细胞术分析细胞周期各期比率。 结果 网络药理学分析显示,JXY活性成分与肝癌的220个交集靶点参与肝癌对激素的反应、细胞群增殖过程等生物学功能,主要在中心体、纺锤体等区域参与调控,并调控PI3K/Akt、细胞周期等肝癌相关信号通路,其中参与细胞周期的交集靶点共19个。TCGA分析显示,SPC25在肝癌组织中的表达高于正常肝组织,且其高表达与更短的总生存期和无进展生存期相关;该基因在肝癌中主要富集于染色体、纺锤体、着丝粒等区域,并在细胞器分裂、核分裂和染色体分离等方面呈现较高富集,参与氧化还原酶活性及DNA依赖的ATP酶活性等功能,主要涉及细胞周期和糖酵解等通路,可上调G2/M检查点及有丝分裂纺锤体和下调雌激素早期反应及脂肪酸代谢等通路。EE-JXY对4株肝癌细胞活力均呈有抑制增殖作用,高浓度处理72 h后,所有细胞系存活率均明显下降。与0 mg/mL组比较,50、100、200 μg/mL组Hep-Rg和Hep-3B细胞SPC25 mRNA相对表达水平均明显降低($P<0.05$);100、200 μg/mL组SK-Hep-1和Huh-7细胞SPC25 mRNA相对表达水平均明显降低($P<0.05$)。与0 mg/mL组比较,50、100、200 μg/mL组Hep-Rg细胞SPC25蛋白表达量均明显降低($P<0.05$)。与0 mg/mL组比较,100、200 μg/mL组Hep-Rg细胞G0/G1期均明显延长($P<0.05$),S期明显缩短($P<0.05$);100 μg/mL组G2/M期明显缩短($P<0.05$);200 μg/mL组G2/M期明显延长($P<0.05$)。与0 mg/mL组比较,100 μg/mL组SK-Hep-1细胞G0/G1期明显延长($P<0.05$);100、200 μg/mL组S期明显缩短($P<0.05$);200 μg/mL组G2/M期明显延长($P<0.05$)。与0 mg/mL组比较,50、100、200 μg/mL组Huh-7细胞G0/G1期均明显延长($P<0.05$),S期明显缩短($P<0.05$);50、100 μg/mL组G2/M期均明显缩短($P<0.05$);200 μg/mL组G2/M期明显延长($P<0.05$)。与0 mg/mL组比较,50、100 μg/mL组Hep-3B细胞G0/G1期均明显延长($P<0.05$);50、100、200 μg/mL组S期均明显缩短($P<0.05$);100、200 μg/mL组G2/M期均明显延长($P<0.05$)。 结论 SPC25在HCC细胞分裂、细胞周期进程中作用关键。JXY可能通过抑制肝癌细胞SPC25转录和蛋白的表达,影响细胞周期,从而抑制肝癌细胞生长,这可能与其含有槐果碱、槐胺等成分有关。

关键词: 肝细胞癌;解毒消癥饮;SPC25;细胞周期;网络药理学

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)作为原发性肝癌的主要类型,占所有原发性肝癌的75%~85%,其全球发病率与病死率均位居前列[1]。HCC起病过程较为隐匿,多数患者在确诊时已进展至中晚期,由于手术治疗窗口受限,药物干预仍是当前临床治疗的主要策略[2]。研究表明,细胞周期调控失常在HCC的发生演进中扮演关键角色。我国乙型或丙型肝炎病毒的长期感染是HCC主要诱因[3],而肝炎病毒可干扰细胞周期依赖性激酶(CDK)及其抑制因子的功能,引起G1/S期转换节点失调,促使细胞过度进入S期,推动肝细胞恶性增殖[4-5]。此外,p53基因突变在HCC中较为频发,致使p53/p21调控通路受损,进一步削弱了G1期限制点的屏障作用[6]。因此以细胞周期为切入点的靶向药物开发正逐步成为HCC治疗的新方向。

解毒消癥饮(Jiedu Xiaozheng Yin,JXY)为全国名老中医杜建教授总结的中药复方,常用于消化系统肿瘤围手术期的辅助治疗[7]。临床研究证实,原发性肝癌Ⅲ期围手术期合用JXY可显著提高HCC患者的生存率,有效控制其复发和转移[8]。前期基础研究表明,JXY可通过抑制肝癌血管与淋巴管新生、糖酵解过程、肝细胞干性和诱导细胞凋亡等,抑制肝癌细胞的生长、复发和转移[9-13]。但JXY是否通过调控细胞周期相关靶点发挥抗肝癌作用,目前

收稿日期: 2025-12-06;**接受日期:** 2026-01-23
基金项目: 福建省自然科学基金项目(2020J01747);福建省大学生创新训练计划项目(S202610393019)
通信作者: 陈旭征,E-mail:2003037@fjtcm.edu.cn
DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtcm.2026.08013

尚未见报道。为此，本研究利用网络药理学与分子对接技术探索JXY主要活性成分与核心靶点，借助癌症基因组图谱（TCGA）数据库从生物信息学的角度分析HCC预后，探究JXY抑制肝癌细胞生长周期的机制，为JXY临床应用提供更多理论依据。

1　实验材料

1.1　实验细胞　人肝癌细胞株Hep-3B、Hep-Rg、SK-Hep-1、Huh-7均购自长沙艾碧维生物科技有限公司。

1.2　实验药物　JXY由白花蛇舌草、山慈菇、苦参、夏枯草组成，均购自福建中医药大学国医堂。将白花蛇舌草、夏枯草、山慈菇、苦参按照2∶1∶1∶1比例混合并打成粉末，用75%乙醇回流2次，合并提取液，得到JXY总提取物。使用旋转蒸发仪减压浓缩除去乙醇后，用乙酸乙酯萃取，减压浓缩、真空干燥即得解毒消癥饮乙酸乙酯提取物（ethylacetate extract of Jiedu Xiaozheng Yin，EE-JXY）。将EE-JXY用DMSO溶解，制成50 mg/mL的母液，用于后续细胞实验。

1.3　实验试剂　总RNA提取试剂（中国博日生物科技有限公司，货号：NSC52M1）；反转录试剂盒（货号：RR047Q）、TB Green Premix Ex Taq™（货号：RR420A）均购自日本Takara公司；DMEM高糖培养基（货号：8123175）、MEM培养基（货号：202401-2）、1640培养基（货号：6123095）、胰蛋白酶（货号：25200-056）、胎牛血清（货号：10100147）均购自美国Gibco公司；PSS三重抗生素（货号：HB-Pss-100）、FxCycle™ PI/RNase染色工作液（货号：F10797）均购自美国Thermo Fisher Scientific公司；CCK-8试剂（大连博格林生物科技有限公司，货号：MA0218）。

1.4　实验仪器　智能生物荧光显微镜（德国Leica公司，型号：Leica DM4000 LED）；流式细胞仪（美国BD公司，型号：FACSCelesta）；实时荧光定量PCR仪（美国Applied Biosystems公司，型号：7500Fast）。

2　实验方法

2.1　网络药理学

2.1.1　药物成分靶点筛选　利用TCMSP数据库（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）检索JXY中苦参、山慈菇、白花蛇舌草、夏枯草，根据口服生物利用度（OB）≥30%，药物类药性（DL）≥0.18筛选出苦参碱、槐果碱、苦参素等单体小分子化合物，并获取活性成分靶点信息，通过Uniprot数据库（https://www.uniprot.org/）转换为基因名。

2.1.2　疾病靶点和交集靶点获取　以“hepatoma”为关键词在GeneCards数据库（https://www.genecards.org/）搜索疾病靶点。基因名借助Uniprot数据库将靶点目标蛋白名称转化而得，在BioinfoGP平台（https://bioinfogp.cnb.csic.es/）绘制Venny图并获取肝癌与JXY的交集靶点。

2.1.3　GO功能和KEGG通路富集分析　将肝癌与JXY的交集靶点导入Metascape数据库（https://metascape.org/），进行基因本体论（GO）功能富集分析，包括生物学过程（BP）和细胞组分（CC），以及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，并利用微生信网（https://www.bioinformatics.com.cn/）作图。

2.1.4　JXY与肝癌细胞周期相关的核心靶点分析　筛选出GO功能注释与KEGG通路富集中“细胞周期（cell cycle）”相关功能条目，最终鉴定出19个直接参与细胞周期调控的核心靶基因并输入STRING数据库（https://string-db.org），设定物种为“Homo Sapiens”。随后将得到的TSV文件导入Cytoscape 3.10.2软件，绘制PPI网络图与药物-活性成分-潜在靶点图，节点的颜色和大小根据Degree的值设计，并进行可视化分析和整理展示。

2.1.5　分子对接　通过TCMSP数据库筛选出单体化合物配体，于Pubchem数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）下载其3D结构。在RCSB PDB数据库查询并选择分辨率较高且其配体结合较少的纺锤体极成分25（Spindle pole body component 25，SPC25）蛋白结构，用Pymol-2.3.4软件中去除水分子及原始配体，经ADFR软件加氢获得蛋白受体。最后，用SailVina软件进行分子对接，在Pymol-2.3.4中形成配体-受体复合物，通过PLIP网站分析确定结合位点，再进行可视化分析。

2.2　生物信息学数据挖掘

2.2.1　TCGA差异表达分析　从TCGA数据库中下载肝细胞癌项目（LIHC）的转录组数据。从GDC数据门户下载经统一处理的HTSeq-Counts表达矩阵，共纳入369例肝细胞癌组织及50例正常肝组织样本。利用R包DESeq2对肿瘤与正常组织进行基因差异表达分析，筛选条件为：表达变化倍数＞2（即$|\log_2 FC|>1$）且错误发现率（FDR）＜0.05。最后采用R包ggplot2绘制火山图，展示差异基因的整体分布。

2.2.2　患者生存评估　采用KMplot在线生存分析工具（http://kmplot.com/analysis/），选择“Liver cancer”模块中基于mRNA RNA-seq数据的肝细胞癌（HCC）数据集。分别以总生存期（OS）和无进展生存期（PFS）作为终点事件。平台自动计算SPC25转录本表达量的中位值，将患者队列划分为高表达组与低表达组。采用Kaplan-Meier法绘制2组在OS和PFS上的生存曲线，并应用log-rank时序检验比较组间差异，同时计算风险比（HR）及95%置信区间，以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2.2.3　GO功能注释　基于TCGA-LIHC队列肝细胞癌与正常肝组织差异表达分析筛选SPC25相关差异基因集，运用clusterProfiler软件包开展GO功能注释，从BP、CC和分子功能（MP）3个维度进行分类，以校正后$P<0.05$判定为统计学显著条目。

2.2.4 KEGG通路映射 通过clusterProfiler软件包内置的KEGG数据库接口对SPC25相关差异基因集实施通路富集检验，通过超几何分布模型计算目标基因在各信号通路中的聚集显著性，将q值＜0.05的通路定义为显著富集项。

2.2.5 基因集富集分析 基于TCGA-LIHC预过滤的全部基因表达矩阵，利用R语言计算各基因与SPC25表达量的Pearson相关系数并降序排列。以MSigDB中Hallmark基因集为参考，利用clusterProfiler软件包执行基因集富集分析(GSEA)，采用加权富集统计及1 000次随机置换检验，结果以标准化富集评分(NES)和FDR q值表示。NES＞0的通路与SPC25高表达正相关，NES＜0的通路呈负相关。

2.3 细胞实验验证

2.3.1 细胞培养和传代 SK-Hep-1、Hep-3B、Huh-7、Hep-Rg细胞分别于MEM、DMEM、1640培养基培养(均含1%PSS三重抗生素)，均置于37 ℃、5%CO_2恒温细胞培养箱中培养。待细胞生长至合适密度，使用1 mL胰酶充分消化，按合适比例进行传代。

2.3.2 CCK-8检测细胞活力 SK-Hep-1、Hep-3B、Huh-7、Hep-Rg细胞按7×10^4个/mL密度接种于96孔板中。待细胞贴壁后，对照组加入DMSO溶剂，实验组分别加入50、100、200、400、800 μg/mL EE-JXY，干预24、48、72 h。干预结束后每孔加入10 μL CCK-8溶液，置于培养箱中培养2 h，应用酶标仪于450 nm波长下检测吸光值(OD)，并计算细胞存活率。

2.3.3 分组和干预 将细胞分为0、50、100、200 μg/mL组，分别给予0、50、100、200 μg/mL EE-JXY干预24 h。

2.3.4 RT-qPCR检测SPC25 mRNA相对表达水平 将4株细胞以8×10^5个/mL密度接种于6孔板，按“2.3.3”项下方法分组和干预24 h后收集细胞。试剂盒提取总RNA，NanoDrop 2000检测浓度与纯度。去除基因组DNA(42 ℃ 2 min)后反转录为cDNA(37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s)。以GAPDH为内参，进行qPCR扩增：95 ℃预变性30 s；40个循环(95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s)。基因的相对表达量以$2^{-\Delta\Delta CT}$表示。引物序列见表1。

表1 基因引物序列

基因名称	基因序列
SPC25	F：5′-GCAGAGAGGTTGAAAAGGCTG-3′ R：5′-GAGGGGCACTATCTGACACT-3′
GAPDH	F：5′-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3′ R：5′-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3′

2.3.5 Western blot检测SPC25蛋白表达量 Hep-Rg细胞以6×10^5个/mL密度接种于3 cm培养皿中，当细胞汇合度至70%～80%时，按“2.3.3”项下方法分组和干预24 h。裂解细胞提取蛋白，经变性、电泳、转膜后，封闭1 h，TBST溶液洗涤后置于SPC25(1∶800)、GAPDH(1∶1 000)一抗中，4 ℃孵育过夜。次日经TBST溶液洗涤后，置于二抗(1∶10 000)室温孵育1 h。经TBST溶液洗涤3次后ECL显影检测条带，以目的蛋白与内参GAPDH的灰度值比值表示其相对表达量。

2.3.6 流式细胞术检测细胞周期 4株细胞分别以密度7×10^5个/mL接种于6孔板，细胞贴壁后，按“2.3.3”项下方法分组和干预24 h，其中0 μg/mL组加入DMS溶剂。收集、固定细胞后加入200～300 μL FxCycle™ PI/RNase染色溶液，避光20 min。采用流式细胞仪对细胞周期的各个时相进行测定，细胞G0/G1、S、G2/M期的百分比采用ModFit软件进行统计分析。

2.4 统计学方法 采用Prism Graphpad 8.0处理与分析数据。计量资料符合正态分布以($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，若方差齐，两两比较采用LSD-t检验；若方差不齐则采用Games-Howell检验。组间生存分析采用Kaplan-Meier法。P＜0.05为差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 网络药理学结果

3.1.1 JXY活性成分靶点与肝细胞癌靶点的交集结果 共筛选出JXY活性成分66种，361个潜在靶点；肝细胞癌相关靶点4 686个，二者交集JXY治疗肝癌的潜在靶点220个。见图1。

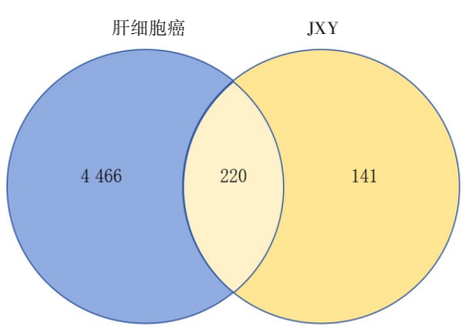


图1 JXY活性成分与疾病靶点韦恩图

3.1.2 JXY治疗肝癌的潜在靶点功能富集分析 通过220个JXY治疗肝癌的潜在靶点进行GO功能富集分析。结果显示，JXY参与生物过程(BP)包括对激素的反应、程序性细胞死亡的正调控和细胞群增殖过程等，参与调控的细胞组分(CC)富集在囊泡腔、中心体、纺锤体等。见图2和图3。

3.1.3 JXY调控HCC的通路富集分析 对JXY调控HCC的通路进行KEGG富集分析，结果显示：其主要富集PI3K/Akt信号通路、IL-17信号通路、细胞周期等参与通路的调控，见图4。

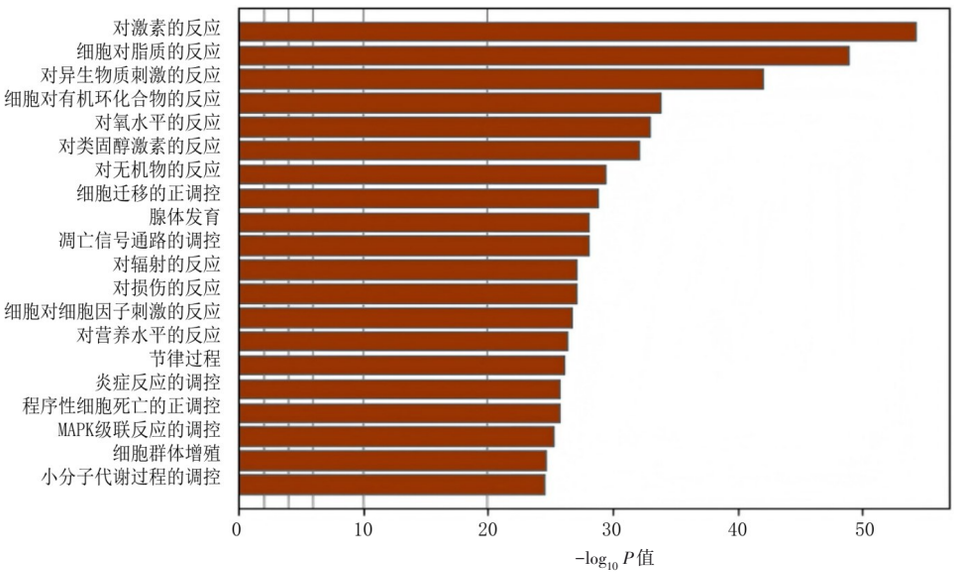


图2　GO(BP)功能富集分析

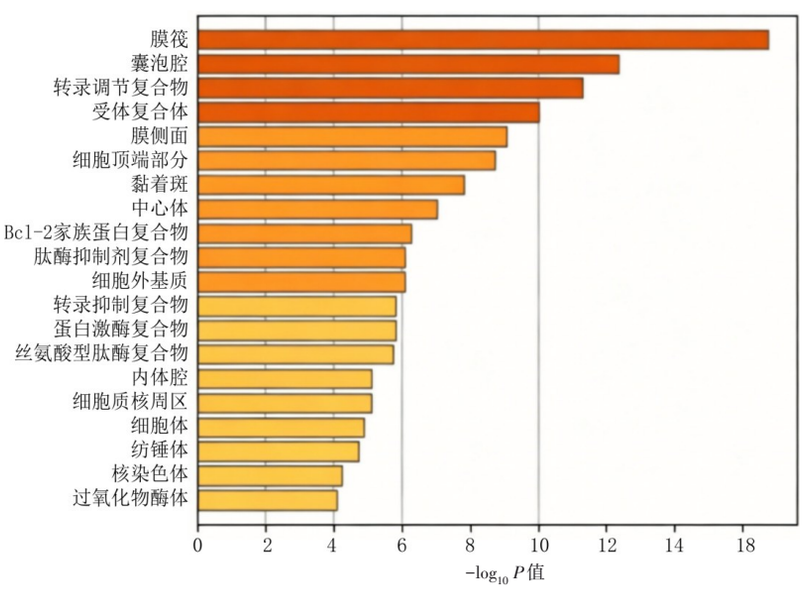


图3　GO(CC)功能富集分析

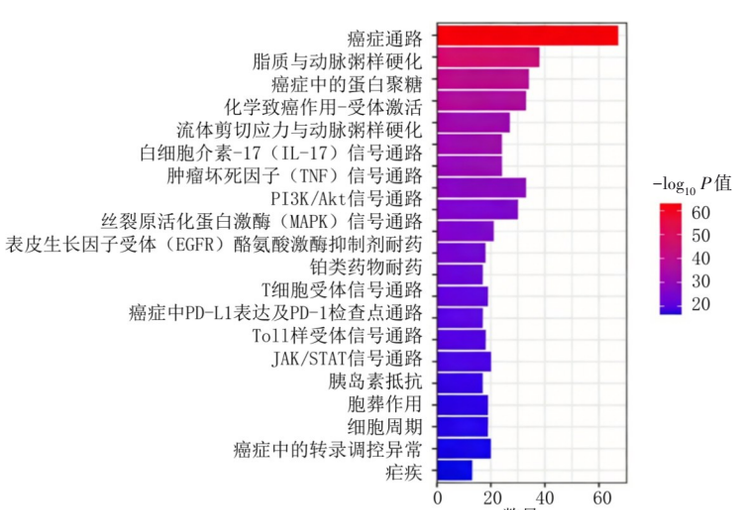


图4　KEGG通路富集分析

3.1.4 JXY与肝癌细胞周期相关的核心靶点分析 对Venny图中交集获得的220个JXY治疗肝癌的潜在靶点进行分析，其中涉及细胞周期调控的靶基因共有19个，主要包括：肿瘤蛋白（tumor protein，TP53）、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂（cyclin-dependent kinase inhibitor 1A，CDKN1A）、细胞周期蛋白D1（cyclin D1，CCDN1）、核分裂周期蛋白80复合体（nuclear division cycle 80 complex，NDC80）等，见图5。SPC25是NDC80复合体的核心组成亚基之一，可能是JXY调控肝癌细胞周期的重要靶点之一。

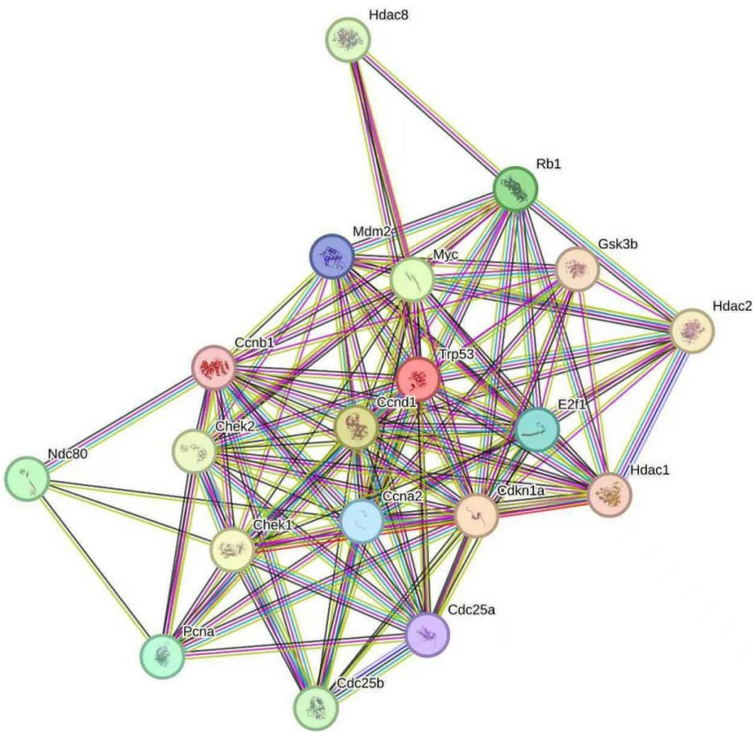
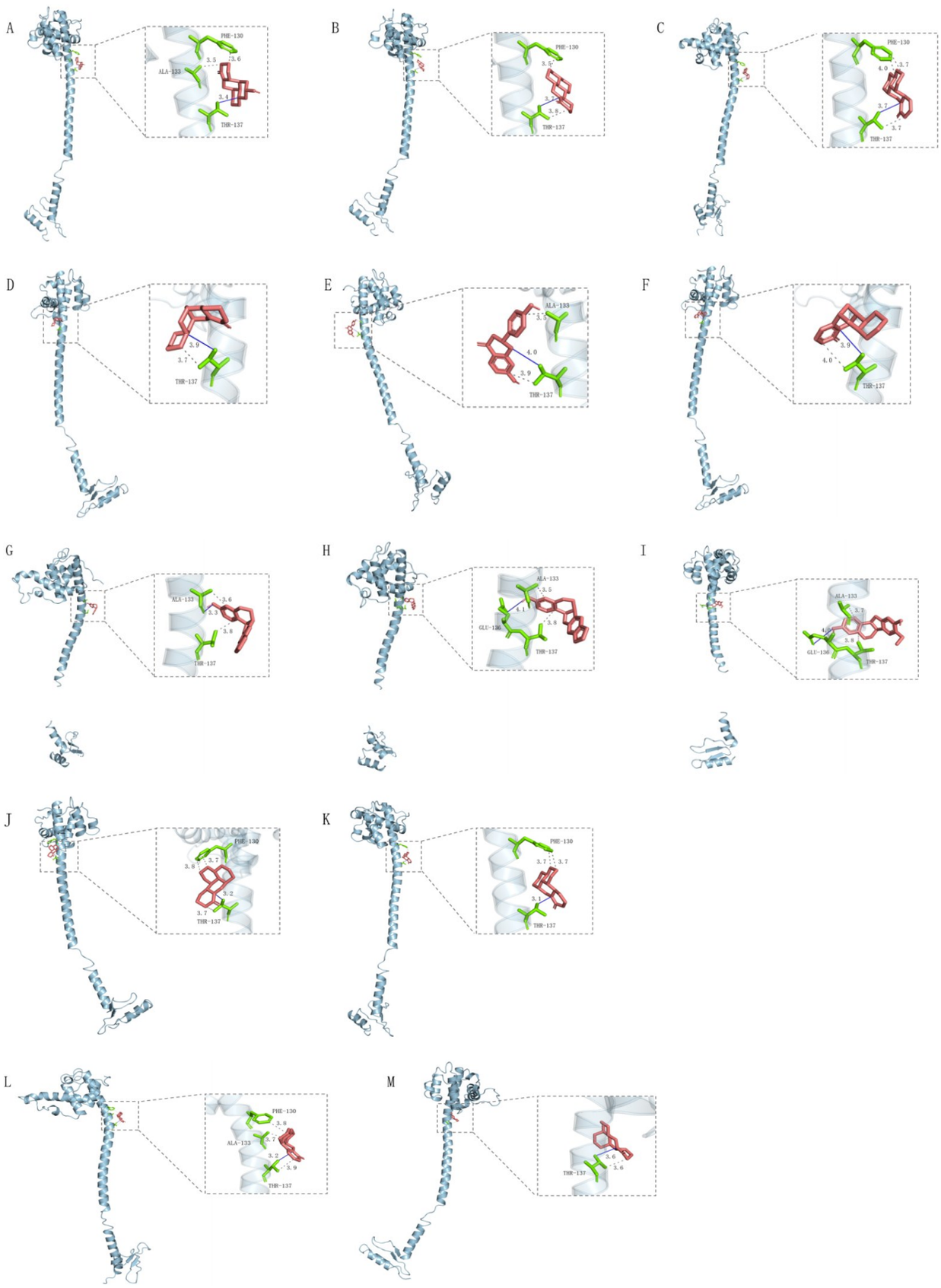


图5 JXY与肝癌细胞周期相关的19个核心靶点PPI网络图谱

3.1.5 分子对接分析 对JXY中有效分子与SPC25进行分子对接，结果显示：13个JXY有效关键成分与SPC25有结合作用，结合残基共3个，分别为THR-137、ALA-133、GLU-136。其中，10个活性成分与THR-137有结合，2个活性成分与GLU-136有结合，1个活性成分与ALA-133有结合，且与SPC25的结合能均<-1.2 kcal/mol，范围为-3.3～-2.0 kcal/mol，其中槐果碱亲和力最强（-3.3 kcal/mol），分子对接结果见表2，示意图见图6。

表2 JXY活性成分与SPC25分子对接结果

活性成分	中文名称	结合能/（kcal/mol）	结合位点氨基酸残基	氢键长度/Å
(+)-9alpha-hydroxymatrine	9α-羟基苦参碱	-2.7	THR-137	3.4
(+)-allomatrine	槐定碱	-3.1	THR-137	3.7
(+)-lehmannine	去氢苦参碱	-3.1	THR-137	3.7
(+)-lupanine	羽扇豆鹼	-3.0	THR-137	3.9
(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	甘草素	-2.0	THR-137	4.0
anagyrine	臭豆碱	-3.1	THR-137	3.9
inermin	高丽槐素	-3.2	ALA-133	3.3
inermine	高丽槐素	-3.2	GLU-136	4.1
kushenin	苦参素	-2.5	GLU-136	4.0
matrine	苦参碱	-3.2	THR-137	3.2
sophocarpine	槐果碱	-3.3	THR-137	3.1
sophoramine	槐胺	-3.2	THR-137	3.2
sophoridine	槐定碱	-3.0	THR-137	3.6

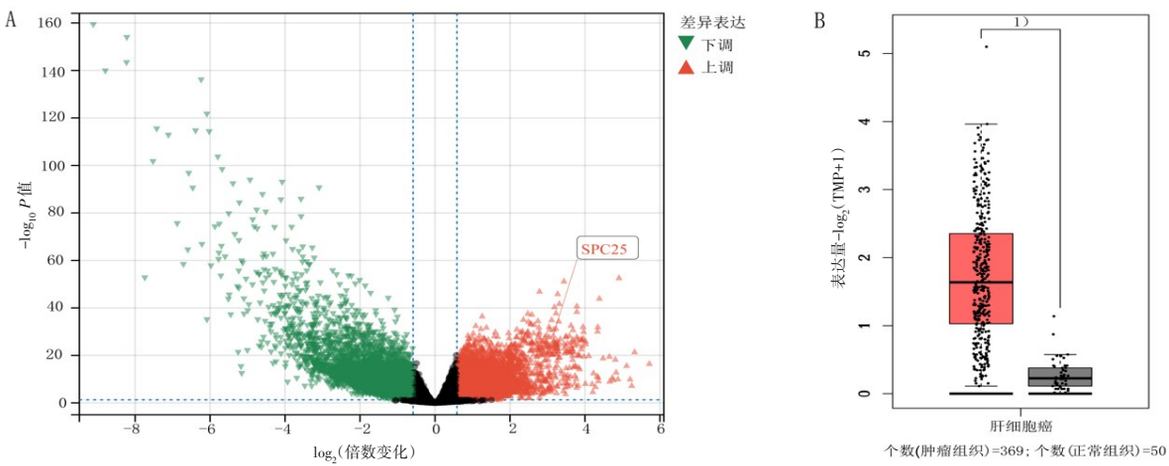


注：A 9α-羟基苦参碱-THR-137；B 槐定碱-THR-137；C 去氢苦参碱-THR-137；D 羽扇豆鹼THR-137；E 甘草素-THR-137；F 臭豆碱-THR-137；G 高丽槐素-ALA-133；H 高丽槐素-GLU-136；I 苦参素-GLU-136；J 苦参碱-THR-137；K 槐果碱THR-137；L 槐胺-THR-137；M 槐定碱-THR-137。

图6　JXY活性成分与SPC25分子对接示意图

3.2 生物信息学数据挖掘

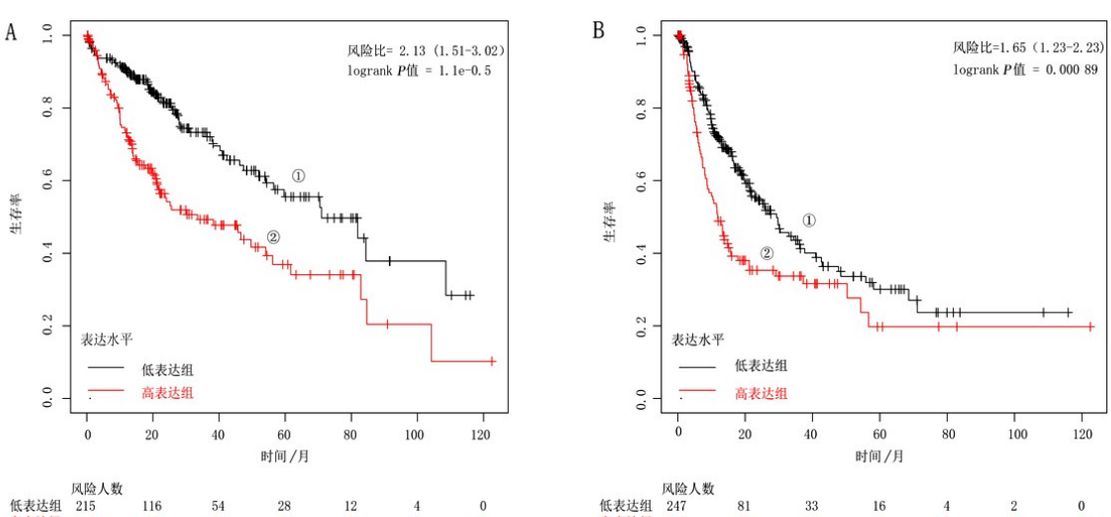
3.2.1 差异表达基因筛选 TCGA 数据库一共分析得出 LIHC 与正常肝组织之间存在 23 543 个差异表达基因（DEGs），其中 13 261 个下调基因，10 282 个上调基因，进一步观察发现 SPC25 在差异表达基因中呈现显著上调，见图 7A。另外，SPC25 在 369 例 LIHC 样本中与正常肝组织 50 例样本差异表达具有统计学意义（$P<0.05$），见图 7B。



注：A 为火山图表示 DE-ARGs 的表达，左侧为下调基因，中间为无差异表达基因，右侧为上调基因；B 为肝细胞癌 SPC25 在 TCGA 队列中的状态。与 0 mg/mL 组比较，1）$P<0.05$。

图 7 TCGA 中 SPC25 在 HCC 中表达水平

3.2.2 临床预后分析 采用 KMplot 分析 SPC25 与 HCC 患者的预后关系，结果显示：随着时间延长，SPC25 高表达组（high）风险人数（Number at risk）下降快于低表达组（low），OS 分析显示 SPC25 高表达组的风险是低表达组的 2.13 倍，其 OS 更短，见图 8A。PFS 分析显示高表达组的风险是低表达组的 1.65 倍，其 PFS 更短，见图 8B。以上差异具有统计学意义。该分析提示 SPC25 高表达与 HCC 不良预后明显相关。



注：A SPC25 高表达组患者 Kaplan-Meier 曲线；B SPC25 低表达组患者 Kaplan-Meier 曲线。

图 8 SPC25 在 HCC 中的表达与生存分析

3.2.3 SPC25 相关差异基因 GO 富集分析 基于 TCGA 数据库肝癌样本，依据 SPC25 表达水平筛选差异基因并开展 GO 富集分析。结果显示，差异基因 BP 层面主要富集于细胞器分裂、核分裂与染色体分裂；在 CC 层面主要富集于染色体、纺锤体、着丝粒等细胞分离相关结构；在 MF 层面富集于氧化还原酶活性、铁离子结合、单加氧酶活性及 DNA 依赖性 ATP 酶活性等生物学功能。见图 9。

3.2.4 SPC25 相关差异基因 KEGG 富集分析 对差异基因开展 KEGG 富集分析，结果提示差异基因主要富集在细胞周期、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、糖酵解/糖异生等通路。见图 10。

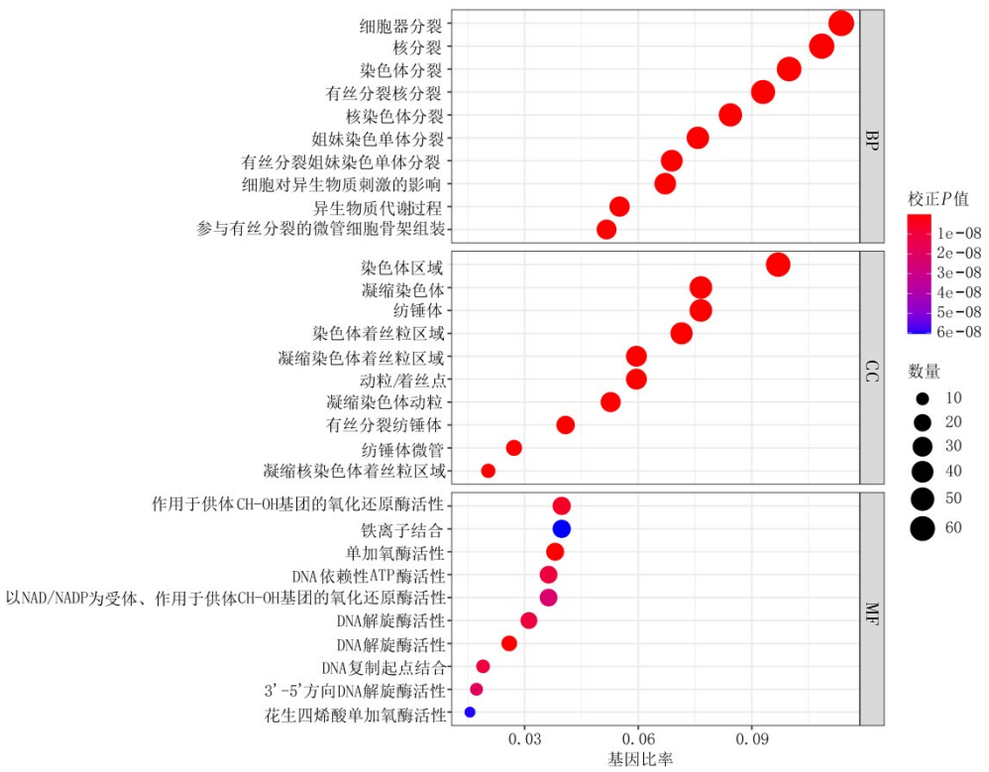


图 9　差异表达基因 SPC25 的 GO 富集气泡图

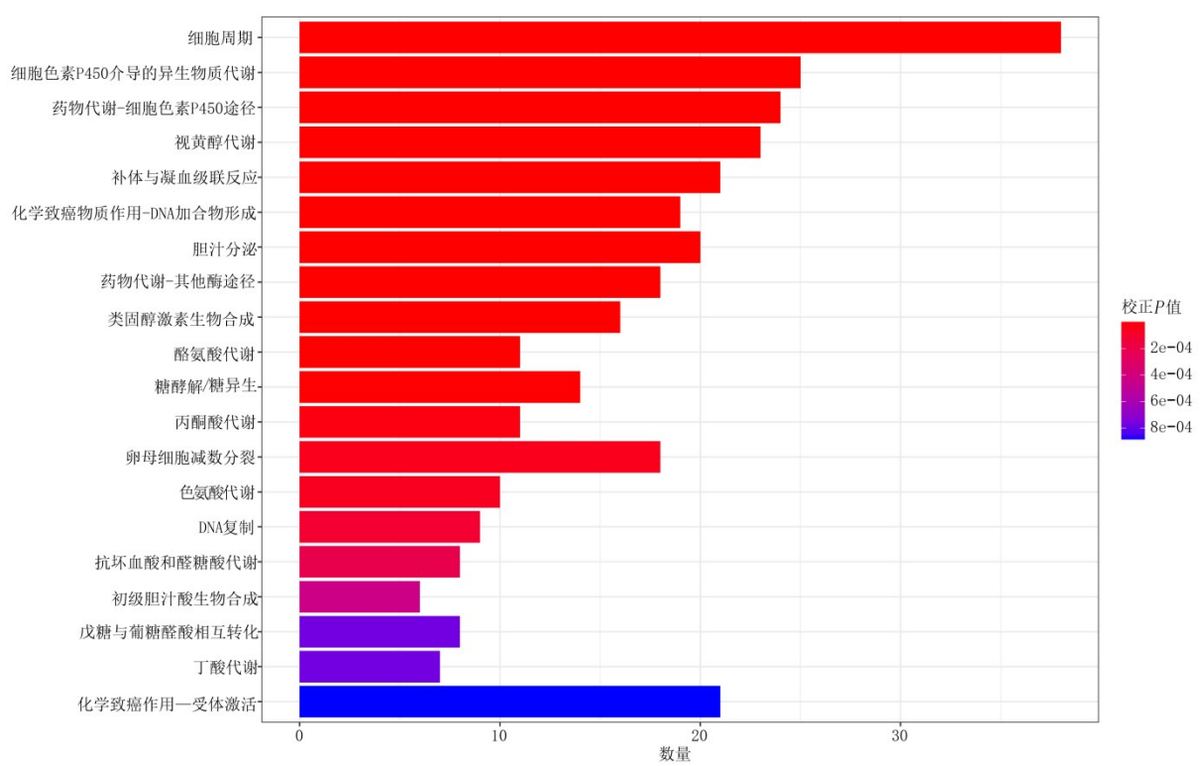
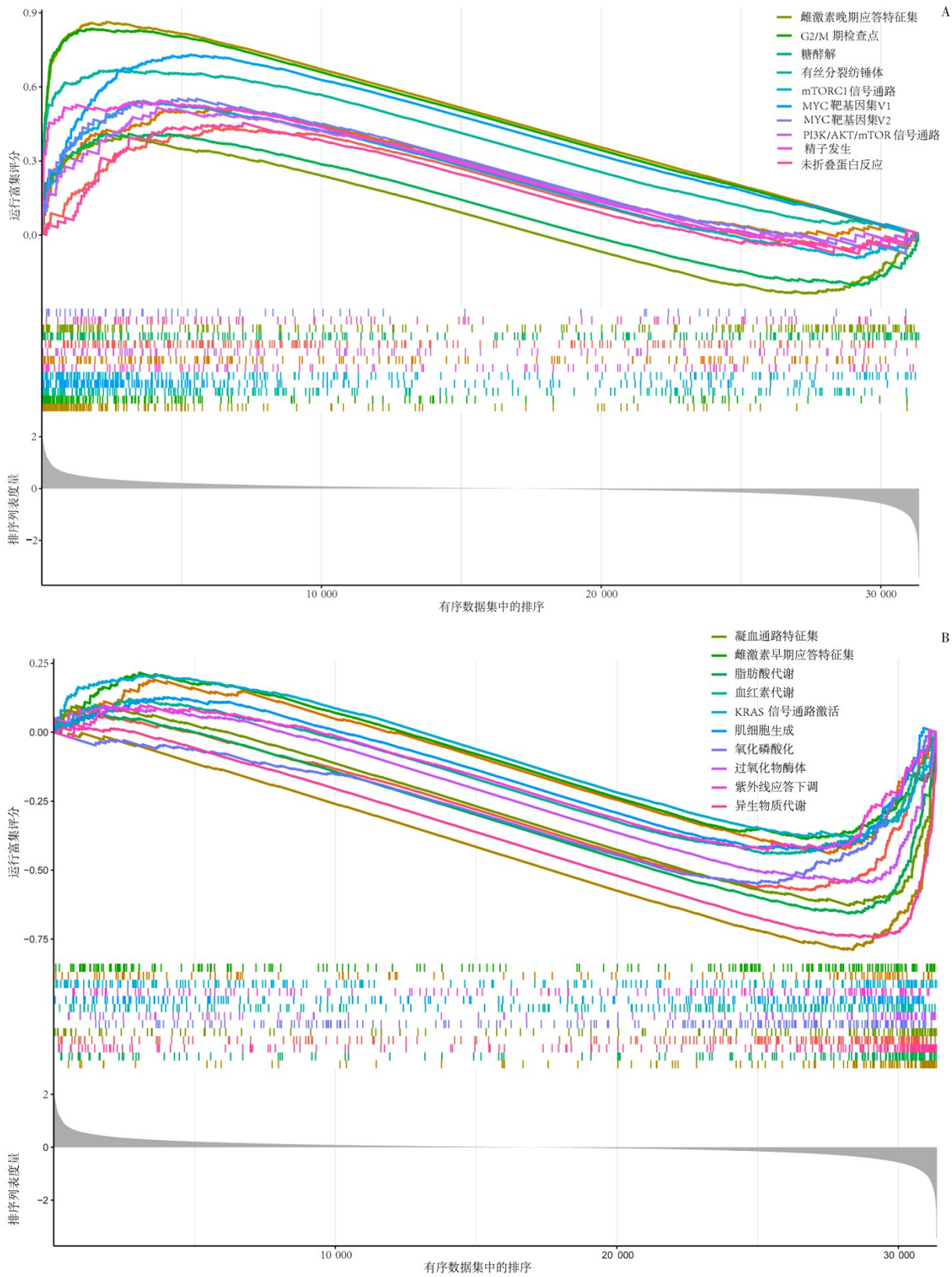


图 10　差异表达基因 SPC25 的 KEGG 富集分析

3.2.5　GSEA 富集分析探究 SPC25 高表达相关通路变化　依托 TCGA 肝癌数据集开展 GSEA 富集分析,解析 SPC25 表达关联的通路改变。结果显示,SPC25 高表达样本中,G2/M 期检查点、有丝分裂纺锤体、糖酵解代谢、MYC 及 PI3K/AKT/mTOR 通路上调;雌激素早期反应、脂肪酸代谢、氧化磷酸化等通路下调。见图 11。



注：A 为 SPC25 高表达引起上调信号通路；B 为 SPC25 高表达引起下调的信号通路。

图 11 差异表达基因 SPC25 的 GSEA 富集分析

3.3 验证实验结果

3.3.1 不同浓度 EE-JXY 干预肝癌细胞存活率比较 EE-JXY 对 4 株肝癌细胞活力均具有抑制增殖作用，高浓度处理 72 h 后，所有细胞系存活率均明显下降（$P<0.05$）。见表 3。

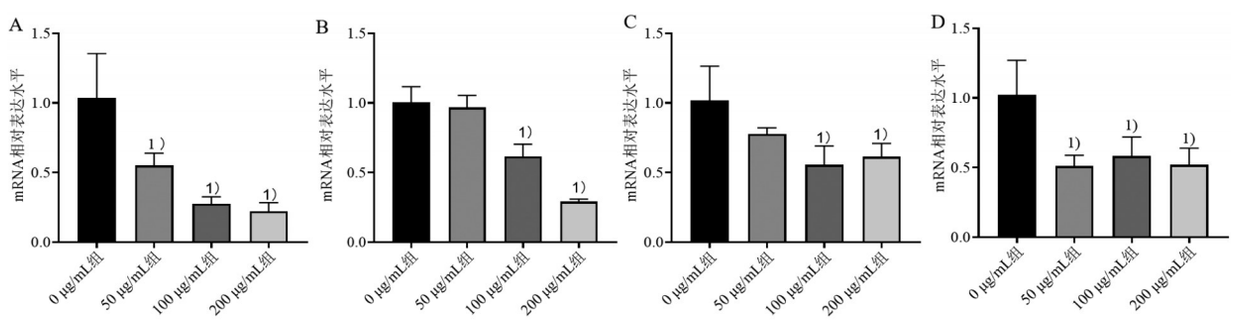
表3　不同浓度EE-JXY干预肝癌细胞存活率比较（$\bar{x}\pm s$）　　%

组别	n	Hep-Rg细胞			SK-Hep-1细胞		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0 μg/mL组	8	100.00±2.64	100.00±6.80	100.00±8.85	100.00±15.49	100.00±11.20	100.00±16.65
50 μg/mL组	8	92.31±6.13[1)]	86.89±6.39[1)]	86.54±4.28[1)]	135.23±8.76[1)]	156.75±10.22[1)]	103.96±6.71
100 μg/mL组	8	77.12±7.73[1)]	69.49±4.16[1)]	65.50±4.40[1)]	92.32±10.41	136.85±9.44[1)]	86.85±7.20
200 μg/mL组	8	50.50±1.36[1)]	41.01±1.41[1)]	33.67±3.95[1)]	45.48±8.35[1)]	69.03±7.83[1)]	34.59±5.90[1)]
400 μg/mL组	8	16.36±1.96[1)]	8.82±0.94[1)]	3.45±0.74[1)]	15.98±3.03[1)]	7.92±1.80[1)]	1.99±0.50[1)]
800 μg/mL组	8	1.97±0.43[1)]	1.94±0.68[1)]	0.70±0.35[1)]	11.05±1.57[1)]	2.35±0.60[1)]	0.00±0.00[1)]

组别	n	Huh-7细胞			Hep-3B细胞		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0 μg/mL组	8	100.00±6.23	100.00±7.97	100.00±5.70	100.00±5.77	100.00±5.32	100.00±2.64
50 μg/mL组	8	87.64±5.55[1)]	91.72±6.94[1)]	90.04±4.56[1)]	95.34±8.57	94.21±2.50[1)]	95.33±3.41[1)]
100 μg/mL组	8	74.00±3.48[1)]	89.31±11.02[1)]	83.67±1.46[1)]	92.94±13.82	94.57±5.50	77.47±3.61[1)]
200 μg/mL组	8	53.8±10.44[1)]	48.03±1.64[1)]	34.09±3.06[1)]	71.46±2.49[1)]	73.84±0.54[1)]	66.45±4.22[1)]
400 μg/mL组	8	6.10±1.80[1)]	1.52±0.46[1)]	0.53±0.49[1)]	36.98±4.29[1)]	26.46±3.02[1)]	11.59±0.72[1)]
800 μg/mL组	8	0.78±0.80[1)]	1.44±1.08[1)]	0.47±0.53[1)]	0.85±0.17[1)]	0.50±0.17[1)]	0.19±0.25[1)]

注：与0 μg/mL组比较，1）$P<0.05$。

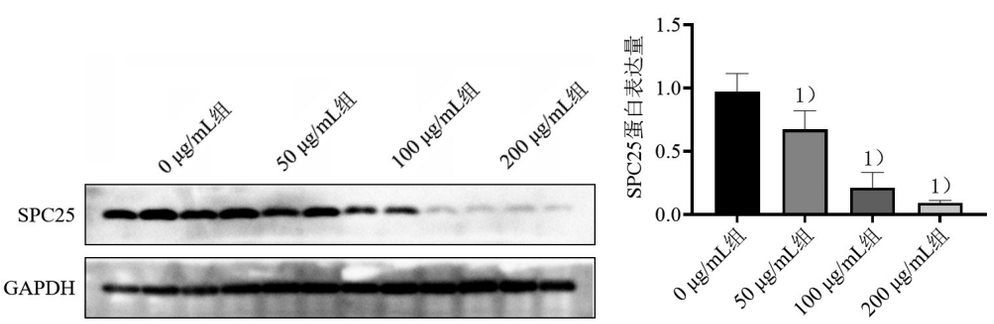
3.3.2　4组SPC25 mRNA相对表达水平比较　与0 mg/mL组比较，50、100、200 μg/mL组Hep-Rg和Hep-3B细胞SPC25 mRNA相对表达水平均明显降低（$P<0.05$）；100、200 μg/mL组SK-Hep-1和Huh-7细胞SPC25 mRNA相对表达水平均明显降低（$P<0.05$）。见图12。



注：A为Hep-Rg细胞；B为SK-Hep-1细胞；C为Huh-7细胞；D为Hep-3B细胞。与0 μg/mL组比较，1）$P<0.05$。

图12　4组SPC25 mRNA相对表达水平比较

3.3.3　4组SPC25蛋白表达量比较　与0 mg/mL组比较，50、100、200 μg/mL组Hep-Rg细胞SPC25蛋白表达量均明显降低（$P<0.05$）。见图13。

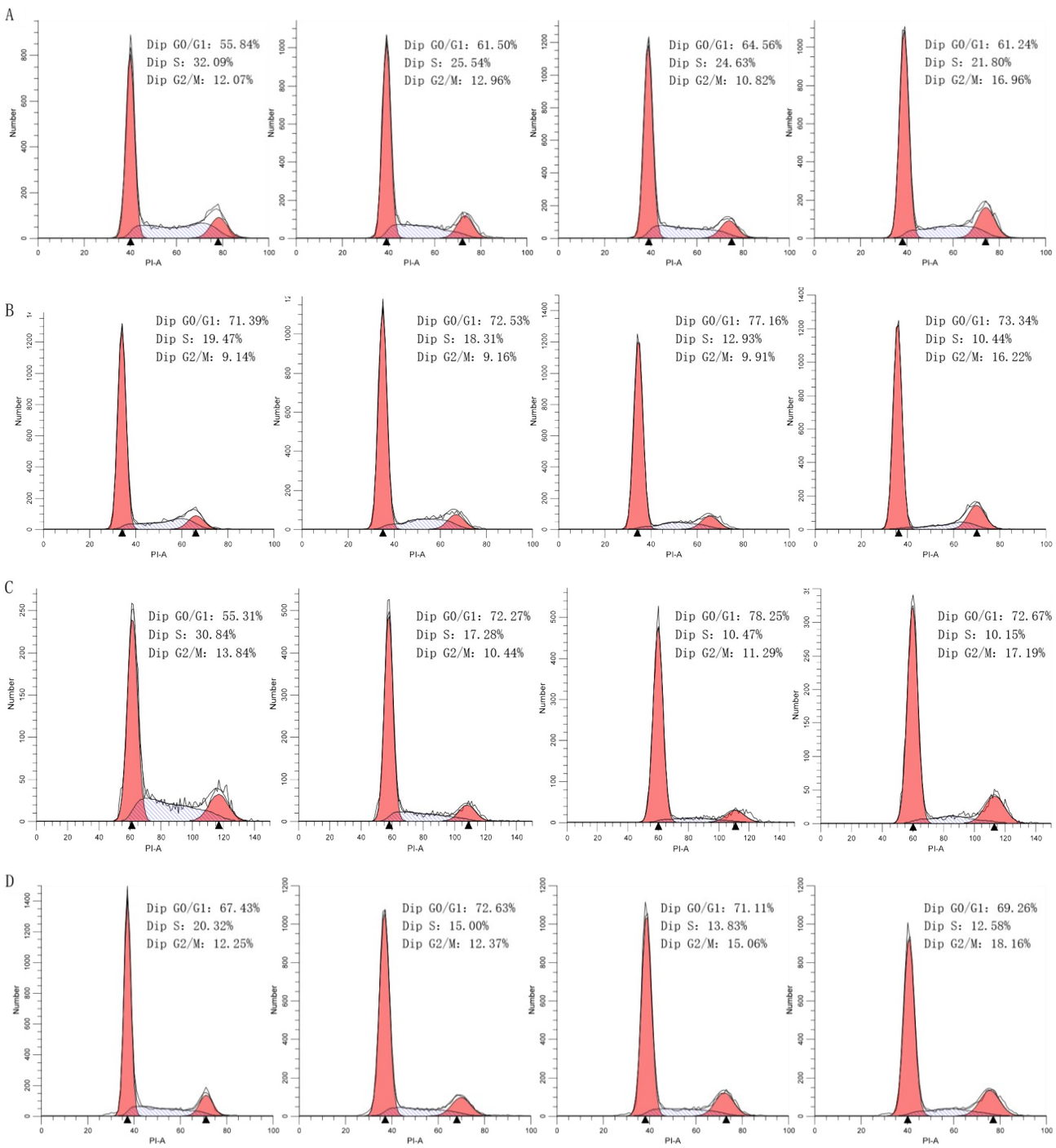


注：与0 μg/mL组比较，1）$P<0.05$。

图13　4组SPC25蛋白表达量比较

3.3.4　4组细胞周期各时相分布情况比较　与0 mg/mL组比较，100、200 μg/mL组Hep-Rg细胞G0/G1期均明显延长（$P<0.05$），S期明显缩短（$P<0.05$）；100 μg/mL组G2/M期明显缩短（$P<0.05$）；200 μg/mL组G2/M期明显延长（$P<0.05$）。与0 mg/mL组比较，100 μg/mL组SK-Hep-1细胞G0/G1期明

显延长（$P<0.05$）；100、200 μg/mL组S期明显缩短（$P<0.05$）；200 μg/mL组G2/M期明显延长（$P<0.05$）。与0 mg/mL组比较，50、100、200 μg/mL组Huh-7细胞G0/G1期均明显延长（$P<0.05$），S期明显缩短（$P<0.05$）；50、100 μg/mL组G2/M期均明显缩短（$P<0.05$）；200 μg/mL组G2/M期明显延长（$P<0.05$）。与0 mg/mL组比较，50、100 μg/mL组Hep-3B细胞G0/G1期均明显延长（$P<0.05$）；50、100、200 μg/mL组S期均明显缩短（$P<0.05$）；100、200 μg/mL组G2/M期均明显延长（$P<0.05$）。见图14和表4。



注：A为Hep-Rg细胞；B为SK-Hep-1细胞；C为Huh-7细胞；D为Hep-3B细胞。

图14 4组流式细胞周期图

表4　4组细胞周期各时相分布情况比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Hep-Rg细胞			SK-Hep-1细胞		
		G0/G1期	S期	G2/M期	G0/G1期	S期	G2/M期
0 μg/mL组	3	57.80±1.89	29.68±1.89	12.51±0.43	72.10±0.85	18.63±1.03	9.27±0.18
50 μg/mL组	3	60.88±1.42	26.57±2.41	12.54±1.06	73.15±1.07	17.54±0.91	9.30±0.28
100 μg/mL组	3	64.71±0.58[1)]	24.18±0.82[1)]	11.10±0.33[1)]	76.37±1.08[1)]	14.01±1.52[1)]	9.62±0.44
200 μg/mL组	3	61.30±0.05[1)]	23.17±1.28[1)]	15.54±1.33[1)]	71.23±1.99	12.10±1.70[1)]	16.67±0.41[1)]

组别	n	Huh-7细胞			Hep-3B细胞		
		G0/G1期	S期	G2/M期	G0/G1期	S期	G2/M期
0 μg/mL组	3	55.07±0.24	31.19±0.30	13.73±0.13	67.98±0.78	19.13±1.04	12.88±0.95
50 μg/mL组	3	76.06±3.44[1)]	13.41±3.69[1)]	10.52±0.53[1)]	73.74±1.05[1)]	14.63±0.41[1)]	11.63±0.92
100 μg/mL组	3	79.65±2.64[1)]	10.30±1.99[1)]	10.04±1.14[1)]	73.30±1.89[1)]	13.62±0.20[1)]	13.08±1.71[1)]
200 μg/mL组	3	72.58±0.83[1)]	10.51±0.48[1)]	16.92±1.23[1)]	67.74±1.34	13.31±0.67[1)]	18.95±0.84[1)]

注：与0 μg/mL组比较，1）$P<0.05$。

4　讨　论

中医学认为原发性肝癌以正气亏虚为本，脏腑功能失调，无力抗邪。外感六淫、情志郁结或饮食失节，均可致肝脾运化失常，形成寒积、痰浊、气滞、血瘀及湿热癌毒等，结聚腹中而成积，呈现“因虚致病、本虚标实”特点，“瘀、毒、虚”三者贯穿始终[14-15]。JXY中白花蛇舌草为君，解毒散结；夏枯草为臣，清肝散结；山慈菇、苦参为佐使，共助清热解毒、软坚散结。故常用于肝癌的治疗。

本研究通过网络药理学与分子对接技术发现，JXY活性成分成分可能通过NDC80、CDKN1A等靶点影响细胞组分纺锤体、细胞周期通路等，从而影响细胞周期，进而抑制肝癌细胞增殖。而SPC25作为NDC80的核心亚基之一，参与着丝粒与微管结合，调节有丝分裂和纺锤体组装检查点[16]。其功能异常可能是该复合体阻碍有丝分裂进程并诱发染色体不稳定的主要分子机制，对动粒-微管附着的形成和维持起重要作用[17]。同时，研究发现SPC25的敲除增加PC-3细胞G2/M期细胞百分比，并降低S期细胞的百分比，证实其参与细胞周期调节[18]。此外，在多种恶性肿瘤中，SPC25均呈现显著过表达态势，参与调控前列腺癌细胞、乳腺癌细胞的细胞周期进程[19-20]。通过TCGA数据分析SPC25在HCC组织中表达量相对于癌旁组织显著上调，且其高表达会缩短患者的OS和PFS，提示可能是抗肝癌药物作用的潜在靶点，且SPC25高表达与HCC不良预后明显相关。GO富集结果表明，SPC25通过参与染色体分离，定位于染色体、着丝粒、纺锤体等区域，发挥DNA依赖ATP酶活性（MF）等特性，提示其可能调控HCC的增殖相关的重要事件发挥作用。这与GSEA提示SPC25可通过影响细胞周期导致癌症不良程度的关键机制相一致，分析提示SPC25可能促进细胞周期的异常进展，从而引发基因组的不稳定性调控HCC的增殖相关的重要事件。在此基础上，用EE-JXY分别干预4株肝癌细胞株，发现4株肝癌细胞的生长均受到明显的抑制作用，且对Hep-Rg和Huh-7细胞抑制效果更显著。表明EE-JXY具有广谱抗肝癌活性，但其效应具有细胞系背景依赖性。进一步实验发现EE-JXY可有效抑制SPC25 mRNA和蛋白表达水平，提示JXY抗肝癌作用可能通过下调SPC25实现。

鉴于此，应用流式细胞术分析经EE-JXY干预后细胞周期各时相分布情况，结果表明，随着EE-JXY浓度的升高，4株肝癌细胞的S期百分比例均逐渐降低，G0/G1期的百分比例有不同程度的上升，高浓度EE-JXY处理时G2/M期百分比明显增加，提示EE-JXY可能抑制细胞周期进展并诱导细胞停滞或凋亡，从而抑制肝癌细胞增殖。

综上所述，本研究明确了SPC25在肝细胞癌中表达水平显著升高，可能通过促进细胞周期异常推进，导致基因组不稳定性，进而在肝癌发生和发展中发挥作用。同时，EE-JXY可通过影响SPC25的表达，抑制肝癌细胞的S期，将肝癌细胞阻滞在G0/G1期、G2/M期，最终达到抑制肝癌细胞增殖的目的。其抗肝癌作用可能归因于苦参碱、苦参素、槐果碱等单体小分子化合物通过与SPC25结合，进而对肝癌细胞周期进行调控。本研究为肝癌治疗提供了新的理论依据，揭示了SPC25作为潜在治疗靶点的可能性，同时也为EE-JXY在肝癌临床治疗中的应用提供了更坚实的理论支持。但仍需进一步深入研究，以全面揭示EE-JXY基于SPC25调控肝癌细胞生长的详细分子机制，为肝癌精准治疗奠定基础。

参考文献

[1]　BRAY F，LAVERSANNE M，SUNG H，et al. Global cancer statistics 2022：GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries［J］. CA Cancer J Clin，2024，

74(3):229- 263.
[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.原发性肝癌诊疗指南(2024年版)[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2024,10(3):17-68.
[3] 王钦波.肝细胞癌患者的流行病学与临床特征调查与分析[D].重庆:重庆医科大学,2025:8.
[4] TAVAKOLIAN S,GOUDARZI H,FAGHIHLOO E. Cyclin-dependent kinases and CDK inhibitors in virus-associated cancers [J]. Infect Agent Cancer,2020,15(1):27.
[5] GUO Y X,SHAO J,ZHANG R Y,et al. Large HBV surface protein-induced unfolded protein response dynamically regulates p27 degradation in hepatocellular carcinoma progression [J]. Int J Mol Sci,2023,24(18) :13825.
[6] 国际肝胆胰协会中国分会,中华医学会外科学分会肝脏外科学组,中国临床肿瘤学会(CSCO)肝癌专家委员会,等.肝细胞癌免疫联合治疗多学科中国专家共识(2023版)[J].中华消化外科杂志,2023,22(3):293-315.
[7] 曹治云,兰岚.杜建教授中西医结合治疗消化道肿瘤经验[J].福建中医药大学学报,2011,21(6):51-53.
[8] 陈立武,林晶,陈文,等.中药治疗原发性肝癌Ⅲ期围手术期患者42例[J].中国中西医结合杂志,2005,25(9):832-834.
[9] 杨寓宁,鲁琴,林明和,等.解毒消癥饮通过VEGF-C/VEGFR-3信号途径抑制肝癌淋巴管生成的机制研究[J].福建中医药,2022,53(3):31-35.
[10] 鲁琴,关建华,曾建伟,等.解毒消癥饮通过HIF-1/miR-210调节葡萄糖能量代谢抑制肝癌细胞增殖的生物学机制研究[J].福建中医药,2022,53(11):34-41.
[11] 胡海霞,陈旭征,曹治云,等.解毒消癥饮对肝癌干细胞标记分子CD90和CD133表达的影响[J].实用中西医结合临床,2015,15(5):80-82.
[12] 曹治云,陈旭征,林瀛,等.中药复方对肝癌移植瘤小鼠肿瘤干细胞表面标志c-kit和CD133表达的影响[J].福建中医学院学报,2010,20(3):18-21.
[13] 陈旭征,曹治云,杨竣联,等.中药复方对小鼠肝癌皮下移植瘤细胞凋亡和免疫功能的影响[J].福建中医药,2009,40(2):52-54.
[14] 潘敏求,潘博.原发性肝癌中医临床和实验研究的回顾与展望[J].湖南中医杂志,2002,18(4):1-3.
[15] 郑伟达,郑东海.癌症瘀毒论[M].北京:中国中医药出版社,2014 :32-33.
[16] SUZUKI A,BADGER B L,HAASE J,et al. How the kinetochore couples microtubule force and centromere stretch to move chromosomes [J]. Nat Cell Biol,2016,18(4):382-392.
[17] MUIR K W,BATTERS C,DENDOOVEN T,et al. Structural mechanism of outer kinetochore Dam1-Ndc80 complex assembly on microtubules [J]. Science,2023,382(6675):1184-1190.
[18] CUI F L,HU J P,FAN Y,et al. Knockdown of spindle pole body component 25 homolog inhibits cell proliferation and cycle progression in prostate cancer [J]. Oncol Lett,2018 ,15(4):5712-5720.
[19] WANG Q,ZHU Y H,LI Z X,et al. Up-regulation of SPC25 promotes breast cancer [J]. Aging (Albany NY),2019,11(15):5689-5704.
[20] TANG N H,TODA T. MAPping the Ndc80 loop in cancer:a possible link between Ndc80/Hec1 overproduction and cancer formation [J]. Bioessays,2015,37(3):248-256.

(上接第63页)

[11] DIXON S J,STOCKWELL B R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death [J]. Nat Chem Biol,2014,10(1):9-17.
[12] JINDANI A,DORÉ C J,MITCHISON D A. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days [J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,167(10):1348-1354.
[13] SRINIVAS U S,TAN B W Q,VELLAYAPPAN B A,et al. ROS and the DNA damage response in cancer [J]. Redox Biol,2019,25:101084.
[14] ROGINSKAYA M,RAZSKAZOVSKIY Y. Oxidative DNA damage and repair:mechanisms,mutations,and relation to diseases [J]. Antioxidants (Basel),2023,12(8) :1623.
[15] AN X Q,YU W F,LIU J B,et al. Oxidative cell death in cancer:mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Cell Death Dis,2024,15(8):556.
[16] LEI G,ZHUANG L,GAN B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer [J]. Nat Rev Cancer,2022,22(7):381-396.
[17] LV L J,WANG Y,LV X,et al. Involvement of HMGB1-mediated ferroptosis in systemic diseases [J]. Front Cell Dev Biol,2025,13:1676941.
[18] HOU W,XIE Y C,SONG X X,et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. Autophagy,2016,12(8):1425-1428.
[19] HU C H,GAO S Y,LI X Y,et al. Crosstalk of autophagy and ferroptosis in cardiovascular diseases:from pathophysiology to novel therapy [J]. Redox Biol,2025,84:103705.
[20] LEE S,HWANG N,SEOK B G,et al. Autophagy mediates an amplification loop during ferroptosis [J]. Cell Death Dis,2023,14(7):464.
[21] KLIONSKY D J,EMR S D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. Science,2000,290(5497):1717-1721.
[22] KROEMER G,MARIÑO G,LEVINE B. Autophagy and the integrated stress response [J]. Mol Cell,2010,40(2):280-293.