

(S)-4-甲氧基黄檀醌通过上调*FGB*表达抑制 肝细胞癌发展

王艳 冯振博*

(广西医科大学第一附属医院病理科, 南宁 530021)

摘要 该研究主要探讨(S)-4-甲氧基黄檀醌(S-4MOD)通过上调纤维蛋白原β链(*FGB*)表达抑制肝细胞癌(HCC)发展的生物学功能,旨在揭示HCC发生发展的分子机制。通过公共数据库及转录组测序结果筛选出S-4MOD功能相关靶点*FGB*,并通过qRT-PCR检测S-4MOD对HCC细胞*FGB* mRNA表达水平的影响。该研究采用siRNA瞬转技术构建si*FGB*敲减细胞模型,并利用qRT-PCR检测*FGB* mRNA表达水平,验证细胞的敲低效率。随后,采用CCK-8法和克隆形成实验检测细胞增殖情况,划痕愈合实验和Transwell实验检测细胞迁移情况,Hoechst 33258荧光染色检测细胞凋亡情况,系统评价*FGB*敲低对S-4MOD抗HCC细胞恶性表型的影响。qRT-PCR结果显示S-4MOD能够显著上调HCC细胞中*FGB* mRNA的表达水平($P<0.001$)。CCK-8、克隆形成、划痕愈合及Transwell实验证实,*FGB*表达下调可显著减弱S-4MOD对HCC细胞增殖和迁移的抑制作用($P<0.05$)。Hoechst 33258荧光染色结果显示,*FGB*表达下调可显著减弱S-4MOD对HCC细胞凋亡的诱导作用($P<0.05$)。*FGB*表达水平与S-4MOD的抗HCC活性密切相关,下调*FGB*表达水平可显著降低S-4MOD的抗HCC治疗效果。

关键词 肝细胞癌; (S)-4-甲氧基黄檀醌; 纤维蛋白原β链

(S)-4-Methoxydalbergione Suppresses Hepatocellular Carcinoma Progression by Upregulating *FGB* Expression

WANG Yan, FENG Zhenbo*

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract This study investigates the biological function of S-4MOD [(S)-4-methoxydalbergione] in suppressing the development of HCC (hepatocellular carcinoma) by upregulating *FGB* (fibrinogen beta chain) expression, aiming to reveal the molecular mechanisms underlying HCC development and progression. The functionally relevant target *FGB* of S-4MOD was screened using public databases and transcriptome sequencing results. The effect of S-4MOD on *FGB* mRNA expression levels in HCC cells was detected by qRT-PCR. In this study, a transient siRNA transfection approach was used to establish an *FGB*-knockdown (si*FGB*) cell model. qRT-PCR was then performed to detect *FGB* mRNA expression levels and to verify the knockdown efficiency. Subsequently, cell proliferation was assessed using CCK-8 and colony formation assays; cell migration was evaluated by wound healing and Transwell assays; and cell apoptosis was detected by Hoechst 33258 fluorescent staining. These experiments collectively allowed a systematic evaluation of the impact of *FGB* knockdown on the anti-malignant phenotype effects of S-4MOD in HCC cells. Results from qRT-PCR showed that S-4MOD significantly up-regulated the mRNA expression level of *FGB* in HCC cells ($P<0.001$). CCK-8, colony formation, wound healing and Transwell assays confirmed that knockdown of *FGB* expression significantly attenuated the inhibitory effects

收稿日期: 2026-01-22

接受日期: 2026-05-19

国家自然科学基金地区项目(批准号: 82260581)资助的课题

*通信作者。Tel: 0771-5356566, E-mail: fengzhenbo_gxmu@163.com

Received: January 22, 2026

Accepted: May 19, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82260581)

*Corresponding author. Tel: +86-771-5356566, E-mail: fengzhenbo_gxmu@163.com

of *S*-4MOD on HCC cell proliferation and migration ($P < 0.05$). Hoechst 33258 staining revealed that knockdown of *FGB* expression significantly reduced the pro-apoptotic effect of *S*-4MOD on HCC cells ($P < 0.05$). The expression level of *FGB* is closely correlated with the anti-HCC activity of *S*-4MOD. Knockdown of *FGB* expression significantly attenuates the therapeutic efficacy of *S*-4MOD against HCC.

Keywords hepatocellular carcinoma; (*S*)-4-methoxydalbergione; fibrinogen beta chain

原发性肝癌是全球范围内最具侵袭性的恶性肿瘤之一。据统计,2022年全球原发性肝癌发病率位居恶性肿瘤第六位,致死率则高居第三位^[1]。原发性肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌和混合型肝癌3种病理类型,而HCC是最主要的病理亚型(占比为75%~85%)^[2]。目前针对HCC,临床主要采用手术切除、局部消融及系统药物等综合治疗策略^[3]。然而,由于HCC起病隐匿、诊断时常处于晚期,且化疗毒副作用大、免疫疗法应答有限,患者总体5年生存率仍不足10%^[4]。因此,深入阐明HCC发生发展的分子机制,开发高效低毒的新型靶向药物,对提高临床疗效具有重要意义。

4-甲氧基黄檀醌(4-methoxydalbergione, 4MOD)是从降香黄檀与印度黄檀等豆科黄檀属植物中分离出来的天然查尔酮类活性单体。(S)-4-甲氧基黄檀醌[(S)-4-methoxydalbergione, *S*-4MOD]作为4MOD的(S)-对映体,已被证实兼具抗过敏、抗炎及抗肿瘤等多重药理活性^[5]。近年来,4MOD(文献中多未明确其立体构型)的抗肿瘤潜力尤其受到关注,其在多种恶性肿瘤中显示出治疗价值^[6-8]。本课题组前期发现,4MOD可阻滞HCC细胞于G₀/G₁期,诱导其凋亡,并抑制其增殖与迁移,提示4MOD具有抗肝癌候选药物潜力^[9]。虽然该研究发现4MOD可通过上调生长阻滞和DNA损伤诱导基因G(growth arrest and DNA damage-inducible gene gamma, *GADD45G*)表达显著抑制肝癌进展,但考虑到肝癌发展涉及复杂的分子网络,我们推测4MOD可能存在其他关键作用靶点。本研究通过网络药理学与分子对接筛选*S*-4MOD作用于HCC的潜在效应靶点,并在细胞水平验证其在*S*-4MOD抑制肝癌细胞增殖、迁移等恶性表型中的功能与初步机制,旨在为阐释*S*-4MOD的多靶点抗肝癌作用提供新依据。

纤维蛋白原β链(fibrinogen beta chain, *FGB*)由位于4号染色体q23.3区域的*FGB*基因编码,是凝血系统中的关键糖蛋白,主要在肝细胞中合成并被分泌入血^[10]。近年多项研究发现,*FGB*在多种肿瘤的发生发展中发挥重要作用,与肿瘤恶性程度、转移风险及

不良预后显著相关^[11-13],提示其具有作为肿瘤诊断标志物和治疗靶点的潜力。分子机制研究表明,*FGB*参与复杂的调控网络:在乳腺癌中,miR-877-5p通过靶向抑制*FGB*,阻断上皮-间质转化,从而抑制肿瘤进展^[12];在肺腺癌中,circ_16601通过吸附miR-5580-5p上调*FGB*表达,进而促进肿瘤进展^[13]。尽管生物信息学分析已提示*FGB*在HCC中异常表达,且与患者生存率显著相关^[14-16],但其在HCC发生发展中的生物学功能与分子机制仍不明确,有待进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 本研究采用人肝癌细胞株HCCLM3(贴壁上皮样细胞)和HuH-7(贴壁上皮样细胞),这两种细胞均购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 实验药品 *S*-4MOD(CAS号:2543-95-5)由云南西力生物技术有限公司以5 mg/管的规格提供,其化学结构经红外光谱、紫外光谱、质谱和质子核磁共振验证。该化合物分子式为C₁₆H₁₄O₃,分子量为254.28 g/mol,常温下为黄色晶体粉末,经高效液相色谱检测其纯度≥98%。

1.1.3 主要试剂与耗材 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO; 货号:D8371)、结晶紫(货号:G1063)、Hoechst 33258染色液(货号:C0020)购自北京索莱宝科技有限公司;RNAeasy动物RNA抽提试剂盒(货号:RO027)购自上海碧云天生物技术有限公司;逆转录试剂盒(货号:R433-01)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒(货号:Q711-02)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;siRNA(货号:H5400130001)、RNA转染试剂(货号:E6074020500)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;CCK-8试剂盒(货号:BS350B)购自北京兰杰柯科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 *S*-4MOD的效应靶点筛选 本研究从课题组前期RNA-seq数据中筛选*S*-4MOD处理后的上调基因,同时从GEO(Gene Expression Omnibus, <https://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)和TCGA(The Cancer Genome Atlas, <https://cancergenome.nih.gov>)数据库的HCC数据集中筛选下调基因,并通过交叉(Venn)分析获得两者的交集基因。随后通过蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络筛选枢纽蛋白,并结合分子对接计算药物与靶蛋白的结合能力,最终筛选获得*S-4MOD*的潜在效应靶点。

从GEO数据库提取不同GPL平台的*FGB*表达矩阵,并结合TCGA-GTEx整合数据集,计算*FGB*表达量的均数±标准差($\bar{x}\pm s$)、标准化均数差(standardized mean difference, SMD)及其95%置信区间(confidence interval, CI),综合评估HCC与正常组织间*FGB* mRNA的表达差异。采用漏斗图进行定性评估,并辅以Egger's检验进行定量验证,以评估发表偏倚。利用GEPIA数据库(<http://gepia.cancer.pku.cn/>)绘制Kaplan-Meier生存曲线,评估*FGB*表达水平与HCC患者预后的关联。

1.2.2 药物处理 取对数生长期的HCCLM3和HuH-7细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板,置于37℃、5% CO₂培养箱中,过夜培养,使细胞贴壁生长。加入含相应浓度*S-4MOD*的新鲜培养基(对照组加入不含*S-4MOD*的等量新鲜培养基),培养箱中培养48 h后进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 使用RNAeasy动物RNA抽提试剂盒提取细胞RNA,逆转录试剂盒合成cDNA,ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒检测检测*FGB* mRNA表达水平。*FGB*引物序列(5'→3'):上游,ACG ACA ATG AGG AGG GTT TCT;下游,GGT CAG CGT GAA GAC AGC。*GAPDH*引物序列(5'→3'):上游,CCA ACC GCG AGA AGA TGA CC;下游,GAG TCC ATC ACG ATG CCA GT。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.4 小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)瞬时转染 采用siRNA瞬时转染技术构建*FGB*敲低细胞模型。取对数生长期细胞,将细胞以 2×10^5 /孔的密度接种在6孔板上。当细胞汇合度达到60%~70%时,吸弃原细胞培养液,加入基础培养基及siRNA/RNA转染试剂复合物,于37℃、5% CO₂培养箱中转染4~8 h后换液,继续培养4~72 h,随后使用qRT-PCR验证转染效率并进行后续实验。

1.2.5 CCK-8实验 取对数生长期细胞以 4×10^3 /孔的密度接种于96孔板中,当细胞贴壁且汇合度达到50%~60%时,根据实验所需进行药物干预与细胞换

液;待细胞药物干预24、48 h后,取出96孔板,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃孵育3 h;酶标仪检测各组细胞吸光度(*D*)值,根据*D*值计算细胞存活率与抑制率。

1.2.6 克隆形成实验 取对数生长期细胞以300/孔的密度接种于12孔板中,待细胞过夜贴壁后用*S-4MOD*干预48 h,后换为完全培养基继续于37℃、5% CO₂培养箱中培养,当观察到细胞集落形成时,终止培养。用PBS洗涤1~2次以去除死细胞和碎片。加入4%多聚甲醛室温固定15 min,结晶紫室温染色30 min。拍照后使用ImageJ软件分析克隆数量和面积。

1.2.7 划痕愈合实验 取对数生长期细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,当细胞汇合度达80%~90%,用200 μL枪头垂直于孔板划线,倒置显微镜下拍摄划痕区域照片。分组药物干预后继续培养,每隔24 h拍照记录,当对照组划痕基本愈合时终止实验。通过测量划痕迁移距离来评估细胞迁移能力,并使用ImageJ软件分析划痕间隙宽度。

1.2.8 Transwell迁移实验 细胞经*S-4MOD*处理48 h后,37℃消化细胞1 min,将细胞重悬于无血清培养基,并加入Transwell小室,下室加入含20%血清的完全培养基,于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h后,取出小室,4%多聚甲醛室温固定30 min,结晶紫室温染色20 min,倒置显微镜下拍照。利用ImageJ软件分析每个视野的细胞数量。

1.2.9 Hoechst 33258荧光染色 取对数生长期细胞以 2×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,当细胞汇合度达到50%~60%时,进行药物干预。于37℃、5% CO₂培养箱中培养48 h后,用PBS轻柔洗涤细胞,4%多聚甲醛室温固定15~30 min, Hoechst 33258染液室温孵育30 min,倒置荧光显微镜下观察并拍照。利用ImageJ软件分析凋亡细胞比例。

1.2.10 基于数据库与转录组数据的*FGB*调控因子挖掘 为探究*FGB*的转录调控机制,我们首先利用UCSC(<https://genome.ucsc.edu>)及JASPAR(<https://jaspar.elixir.no>)数据库预测其启动子区域的潜在转录因子结合位点。在此基础上,结合*S-4MOD*处理后的转录组测序数据,筛选出*S-4MOD*抗HCC效应中可能调控*FGB*的转录因子,并通过GEPIA数据库进行相关性分析和散点图绘制。

1.2.11 基于大数据挖掘*FGB*在HCC发展中的潜在功能和途径 利用GEPIA数据库,筛选出在HCC和

正常肝组织中均与 *FGB* 呈正相关的基因 ($PCC \geq 0.30$, $P < 0.05$), 再将其与 HCC 低表达基因取交集。对交集基因进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并以气泡图进行可视化, 以探究 *FGB* 在 HCC 中的潜在功能与通路。

1.3 统计学方法

所有实验均采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 并使用 GraphPad Prism 9.0 进行数据可视化。两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *S-4MOD* 的效应靶点筛选结果

通过 RNA-seq 分析, 筛选出 124 个经 *S-4MOD* 处理后表达上调的基因 [$P < 0.05$, $\log_2 FC(\text{fold change}) > 2$]; 结合 GEO 及 TCGA-GTEX 联合数据集 (共 3 926 例 HCC 组织和 3 428 例正常组织), 鉴定出 7 125 个 HCC 低表达基因。Venn 分析获得 52 个交集基因 (图 1A), 经 PPI 网络筛选出 24 个枢纽蛋白 (图 1B)。分子对接显示, *FGB* 与 *S-4MOD* 结合能为 -5.9 kcal/mol , 它们主要通过疏水作用稳定结合 (图 1C), 提示其可能存在相互作用。

2.2 *FGB* 在 HCC 中的表达情况及预后价值

对多平台数据进行标准化后, 采用随机效应模型进行数据分析。结果显示, *FGB* 在肝癌组织中显著低表达 ($SMD = -0.73$, $95\% \text{ CI} = -0.88 \sim -0.57$, $P < 0.01$), 样本间存在显著异质性 ($P = 81\%$, $P < 0.01$) (图 2A)。Egger's 检验 ($P = 0.546$) 及漏斗图提示无明显发表偏倚 (图 2B)。Kaplan-Meier 生存分析显示, *FGB* 高表达组患者中位总生存期 ($HR = 0.68$, $P < 0.05$) 及无病生存期 ($HR = 0.60$, $P < 0.01$) 均显著优于低表达组 (图 2C 和图 2D), 提示 *FGB* 高表达可作为 HCC 患者预后良好的独立预测指标。

2.3 *S-4MOD* 对 HCCLM3 细胞的抑制作用

CCK-8 检测显示, *S-4MOD* 以浓度和时间依赖性方式显著抑制 HCCLM3 细胞增殖 ($P < 0.05$) (图 3A)。*S-4MOD* 处理 HCCLM3 细胞 24 h 和 48 h 的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50}) 分别为 $(35.92 \pm 2.29) \mu\text{mol/L}$ 和 $(31.94 \pm 2.08) \mu\text{mol/L}$; HuH-7 细胞在 24 h 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 $(31.16 \pm 1.65) \mu\text{mol/L}$ 和 $(22.83 \pm 1.10) \mu\text{mol/L}$ [9]。后续实验均选用低于 IC_{50} 的药物浓度。

2.4 *S-4MOD* 对 HCC 细胞 *FGB* mRNA 表达水平的影响

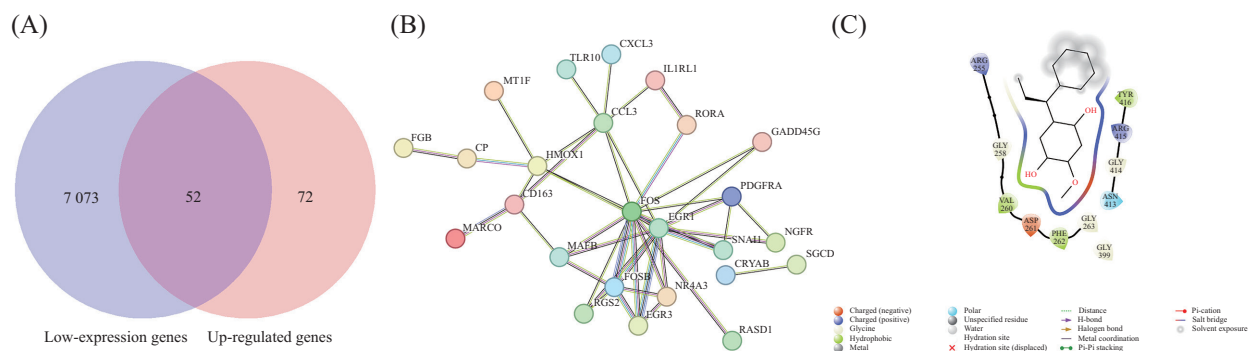
为验证 *S-4MOD* 是否调控 *FGB* 表达, 采用 qRT-PCR 检测 *S-4MOD* 处理 48 h 后 HCCLM3 ($25 \mu\text{mol/L}$) 和 HuH-7 ($15 \mu\text{mol/L}$) 细胞中 *FGB* mRNA 的水平。结果显示, *S-4MOD* 显著上调两株细胞中 *FGB* 的表达 ($P < 0.001$, 图 3B), 提示 *S-4MOD* 可调控 *FGB* 表达, *FGB* 可能为其功能相关靶点。

2.5 通过 siRNA 干扰技术构建 *FGB* 基因敲低的 HCC 细胞模型

本研究采用 siRNA 干扰技术, 分别在 HCCLM3 和 HuH-7 肝癌细胞株中构建 *FGB* 敲低模型, 并通过 qRT-PCR 检测转染效率。结果显示, 在 HCCLM3 和 HuH-7 细胞中 si*FGB* 组的 *FGB* mRNA 表达水平显著低于 siNC 组 (敲低效率分别为 93% 和 96%, $P < 0.001$, 图 3C)。结果表明, *FGB* 敲低细胞模型构建成功, 为后续功能研究提供了可靠的实验基础。

2.6 *FGB* 敲低能够显著减弱 *S-4MOD* 对 HCC 细胞增殖的抑制作用

通过 CCK-8 实验发现, 在 HCCLM3 和 HuH-7 细胞中, si*FGB*+*S-4MOD* 组细胞存活率显著高于

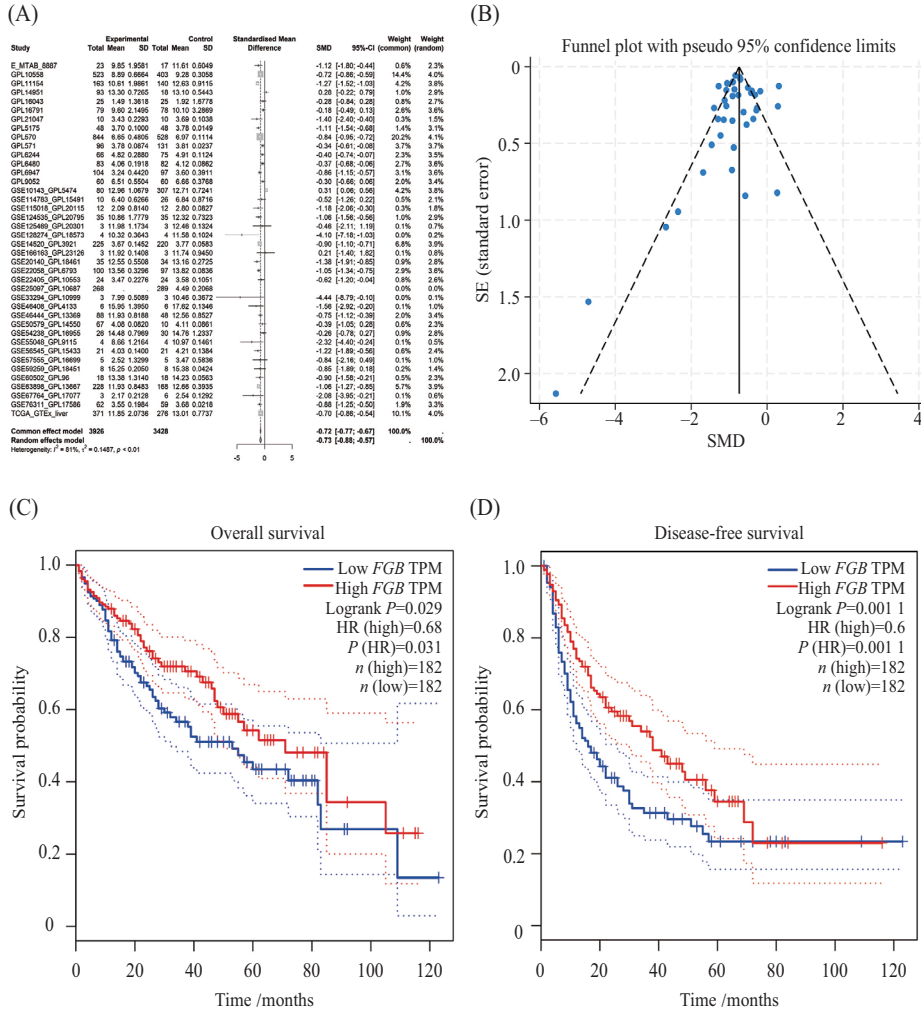


A: Venn 分析图; B: PPI 网络图; C: *S-4MOD* 与 *FGB* 蛋白的相互作用 2D 图。

A: Venn diagram; B: PPI network diagram; C: 2D diagram of the interaction between *S-4MOD* and *FGB* proteins.

图 1 *S-4MOD* 效应靶点筛选

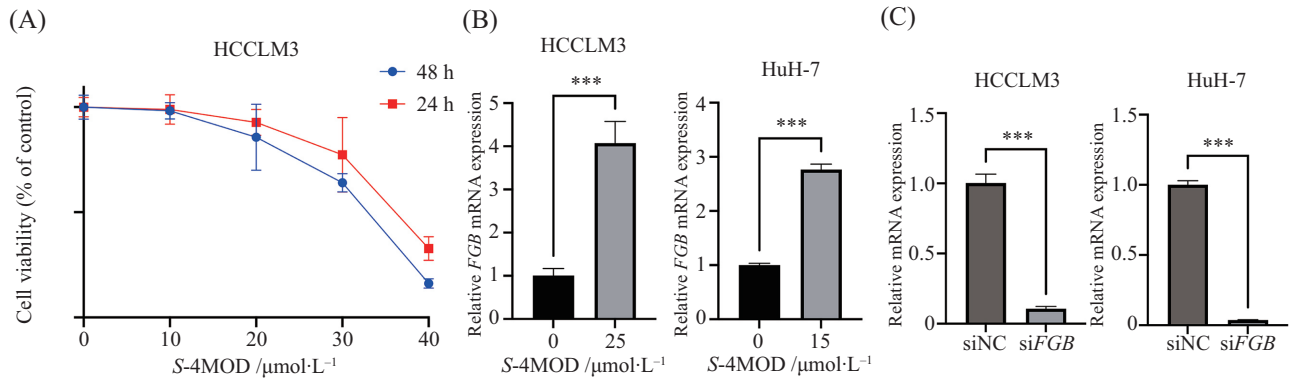
Fig.1 Screening of *S-4MOD* effector targets



A: 森林图; B: 漏斗图; C: 总生存期; D: 无病生存期。TPM: 每百万转录本。

A: forest plot; B: funnel plot; C: overall survival; D: disease-free survival. TPM: transcripts per million.

图2 *FGB*在HCC中的表达情况及预后价值
Fig.2 Expression and prognostic value of *FGB* in HCC



A: HCCLM3经不同浓度S-4MOD处理24、48 h后的细胞存活率; B: qRT-PCR检测经S-4MOD处理48 h后的HCCLM3和HuH-7细胞中*FGB* mRNA的表达水平; C: *FGB* siRNA在HCCLM3和HuH-7细胞中的基因沉默效果。*** $P<0.001$ 。

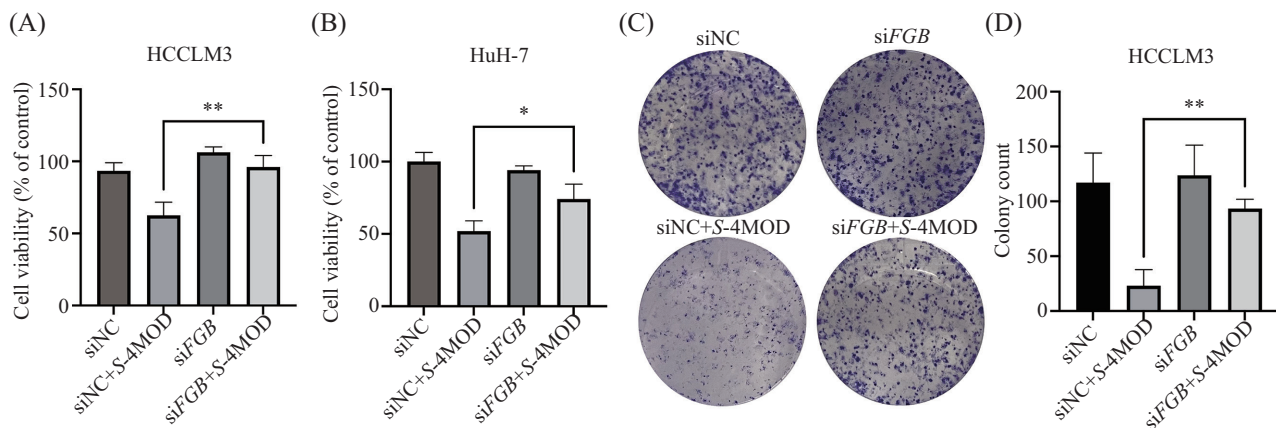
A: viability of HCCLM3 cells following treatment with increasing concentrations of S-4MOD for 24 or 48 h; B: *FGB* mRNA expression levels in HCCLM3 and HuH-7 cells treated with S-4MOD for 48 h were detected by qRT-PCR; C: knockdown efficiency of *FGB* siRNA in HCCLM3 and HuH-7 cells. *** $P<0.001$.

图3 S-4MOD效应靶点及*FGB*敲低细胞模型的验证
Fig.3 Validation of the effector target of S-4MOD and the *FGB* knockdown cell model

表1 瞬时转染及S-4MOD处理后HCCLM3和HuH-7的细胞存活率与细胞抑制率

Table 1 The cell viability and inhibition rate of HCCLM3 and HuH-7 cells after transient transfection and S-4MOD treatment

分组 Group	HCCLM3		HuH-7	
	细胞存活率/% Cell viability /%	细胞抑制率/% Inhibition rate /%	细胞存活率/% Cell viability /%	细胞抑制率/% Inhibition rate /%
siNC	100±7.65		100±6.96	
siNC+S-4MOD	67±13.33	33±17.09	52±8.97	48±13.11
siFGB	114±5.76		94±3.27	
siFGB+S-4MOD	103±11.78**	11±6.54*	74±14.52*	20±11.25**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与siNC+S-4MOD组比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with siNC+S-4MOD group.

A: CCK-8检测HCCLM3经siRNA转染及S-4MOD处理48 h后的细胞存活率; B: CCK-8检测HuH-7经siRNA转染及S-4MOD处理48 h后的细胞存活率; C: HCCLM3经siRNA转染及S-4MOD处理48 h后的代表性集落形成图像; D: 定量分析显示siRNA转染及S-4MOD处理48 h后HCCLM3的集落形成数量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: CCK-8 assay showing viability of HCCLM3 cells after siRNA transfection and S-4MOD treatment for 48 h; B: CCK-8 assay showing viability of HuH-7 cells after siRNA transfection and S-4MOD treatment for 48 h; C: representative colony formation images of HCCLM3 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment for 48 h; D: quantification of colony formation number in HCCLM3 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment for 48 h. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 FGB敲减对S-4MOD抑制HCC细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of FGB knockdown on S-4MOD-mediated inhibition of HCC cell proliferation

表2 siRNA转染及S-4MOD处理后HCCLM3细胞的集落形成数

Table 2 The colony formation numbers of HCCLM3 cells after siRNA transfection and S-4MOD treatment

分组 Group	集落形成数 Colony formation number
siNC	117±27
siNC+S-4MOD	23±17
siFGB	124±29
siFGB+S-4MOD	93±9**

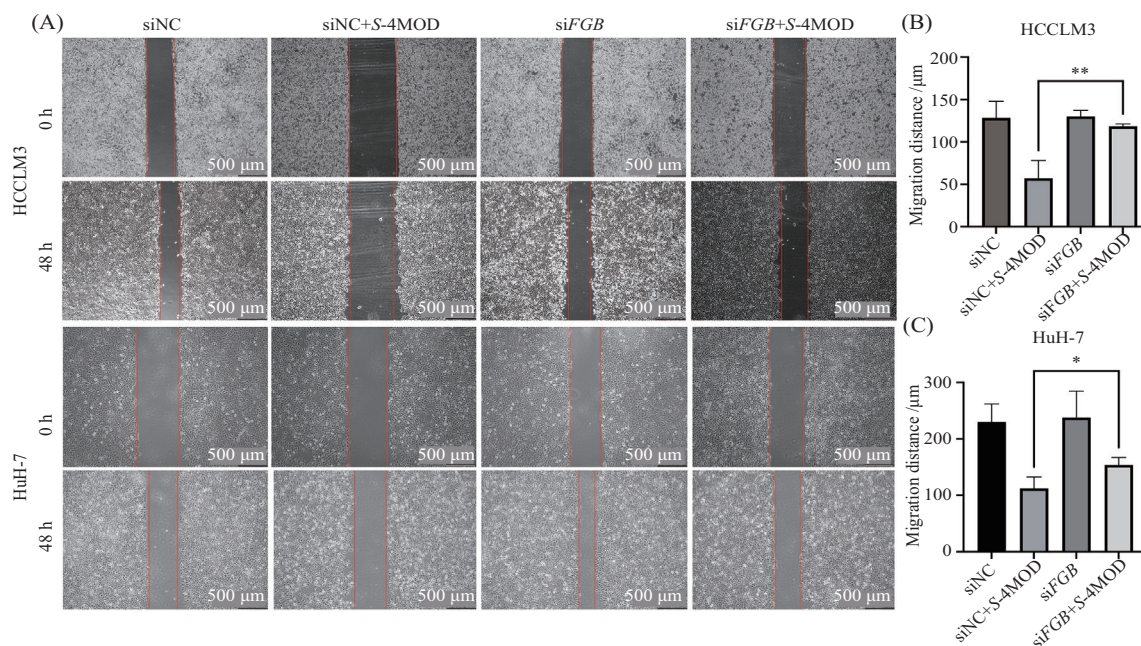
** $P<0.01$, 与siNC+S-4MOD组比较。** $P<0.01$ compared with siNC+S-4MOD group.

siNC+S-4MOD组($P<0.05$, 表1、图4A和图4B), 而siFGB+S-4MOD组中S-4MOD的细胞抑制率显著低于siNC+S-4MOD组($P<0.05$, 表1), 表明敲低FGB可显著减弱S-4MOD对细胞活力的抑制作用。克隆形成实验进一步显示, 在HCCLM3细胞中, siFGB+S-4MOD组的集落形成数量显著多于siNC+S-4MOD组

($P<0.01$, 图4C、图4D和表2), 而HuH-7细胞因密度依赖生长未能成功建模。综上, FGB敲低能有效减弱S-4MOD对HCC细胞增殖的抑制作用。

2.7 FGB敲低能够显著减弱S-4MOD对HCC细胞迁移的抑制作用

划痕愈合实验显示, 在HCCLM3和HuH-7细胞中,



A: HCCLM3和HuH7经siRNA转染及*S-4MOD*处理后的代表性划痕愈合图像; B: 定量分析显示经siRNA转染及*S-4MOD*处理后HCCLM3的迁移距离; C: 定量分析显示经siRNA转染及*S-4MOD*处理后HuH7的迁移距离。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: representative images of wound healing in HCCLM3 and HuH-7 cells after siRNA transfection and *S-4MOD* treatment; B: quantification of migration distance in HCCLM3 cells after siRNA transfection and *S-4MOD* treatment; C: quantification of migration distance in HuH-7 cells after siRNA transfection and *S-4MOD* treatment. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 划痕愈合实验检测*FGB*敲减对*S-4MOD*抑制HCC细胞迁移的影响

Fig.5 Effect of *FGB* knockdown on the anti-migratory activity of *S-4MOD* in HCC cells was assessed by wound healing assay

*S-4MOD*处理可抑制细胞迁移,但si*FGB*+*S-4MOD*组的相对迁移距离显著大于siNC+*S-4MOD*组($P<0.05$,图5)。Transwell迁移实验同样表明,*S-4MOD*抑制细胞迁移,而si*FGB*+*S-4MOD*组的迁移细胞数显著高于siNC+*S-4MOD*组($P<0.01$,图6)。综上,敲低*FGB*可显著减弱*S-4MOD*对HCC细胞迁移能力的抑制作用。

2.8 *FGB*敲低能够显著减弱*S-4MOD*对HCC细胞凋亡的促进作用

Hoechst 33258染色结果显示,在HCCLM3和HuH-7细胞中,*S-4MOD*处理均可诱导细胞凋亡,而si*FGB*+*S-4MOD*组的凋亡细胞数显著低于siNC+*S-4MOD*组($P<0.05$,表3和图7)。结果表明,敲低*FGB*可显著减弱*S-4MOD*对HCC细胞凋亡的促进作用。

2.9 基于数据库与转录组数据的*FGB*调控因子挖掘

通过数据库我们共获筛选出48个*FGB*潜在调控因子,将这些因子与*S-4MOD*处理后上调的基因($P<0.05$, $\log_2FC>1$)以及在HCC中低表达的基因取交集(图8A)。结果显示,JunB原癌基因(JunB proto-oncogene, *JUNB*)是*S-4MOD*抑制HCC发生发展过程中调控*FGB*的候选关键因子。进一步的相关性分析显示,*JUNB*的表达与*FGB*的表达呈正相关($r=0.32$,

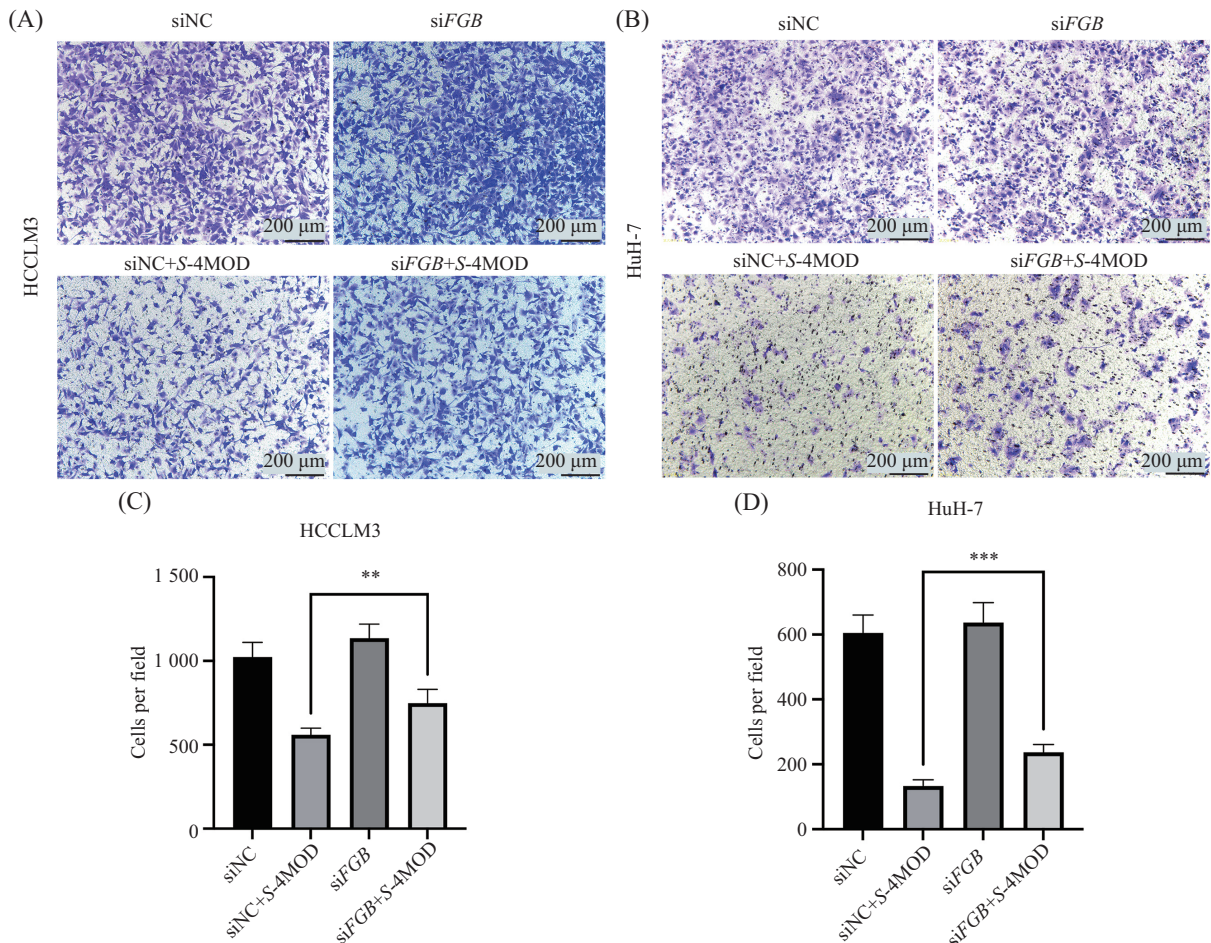
$P<0.001$)(图8B)。基于此,我们推测在*S-4MOD*抗HCC效应中,*JUNB*可能是调控*FGB*的潜在转录因子。

2.10 *FGB*在HCC发展中的潜在功能和途径

我们共获得149个与*FGB*表达呈正相关且在HCC中低表达的基因,并对这些基因进行富集分析。GO富集分析显示,这些基因主要涉及先天免疫反应(生物过程,图9A)、细胞外空间(细胞组分,图9B)和蛋白质结合(分子功能,图9C)。KEGG通路分析表明,它们主要富集在补体与凝血级联(complement and coagulation cascades, CCC)等通路中(图9D)。

3 讨论

本研究通过整合GEO、TCGA及前期RNA-seq数据,结合PPI网络分析与分子对接,成功筛选出*FGB*作为中药活性成分*S-4MOD*的潜在效应靶点。通过绘制森林图证实*FGB*在HCC组织中的mRNA表达水平显著低于正常肝组织,生存分析提示其低表达与患者不良预后显著相关。功能实验证实,*S-4MOD*可显著上调HCC细胞中*FGB*的mRNA表达,敲低*FGB*可显著减弱*S-4MOD*对HCC细胞增殖和迁移的抑制作用,并降低*S-4MOD*诱导的细胞凋亡水平。结果表明,*FGB*



A: HCCLM3经siRNA转染及S-4MOD处理后Transwell迁移实验的代表性图像; B: HuH-7经siRNA转染及S-4MOD处理后Transwell迁移实验的代表性图像; C: 定量分析显示siRNA转染及S-4MOD处理后HCCLM3迁移细胞数; D: 定量分析显示siRNA转染及S-4MOD处理后HuH-7迁移细胞数。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: representative images of Transwell migration assay in HCCLM3 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment; B: representative images of Transwell migration assay in HuH-7 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment; C: quantitative analysis of migrated HCCLM3 cell number following siRNA transfection and S-4MOD treatment; D: quantitative analysis of migrated HuH-7 cell number following siRNA transfection and S-4MOD treatment. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图6 Transwell迁移实验检测FGB敲减对S-4MOD抑制HCC细胞迁移的影响

Fig.6 Effect of FGB knockdown on the anti-migratory activity of S-4MOD in HCC cells was assessed by Transwell migration assay

表3 siRNA转染及S-4MOD处理后HCCLM3和HuH-7凋亡细胞数目

Table 3 The apoptotic cell numbers of HCCLM3 and HuH-7 cells after siRNA transfection and S-4MOD treatment

分组 Group	HCCLM3凋亡细胞数 Apoptotic cell number of HCCLM3 cells	HuH-7凋亡细胞数 Apoptotic cell number of HuH-7 cells
siNC	8.33±2.67	11.33±1.33
siNC+S-4MOD	42.33±12.67	190.67±42.67
siFGB	4.00±2.00	8.33±1.67
siFGB+S-4MOD	12.67±3.67*	52.67±3.33***

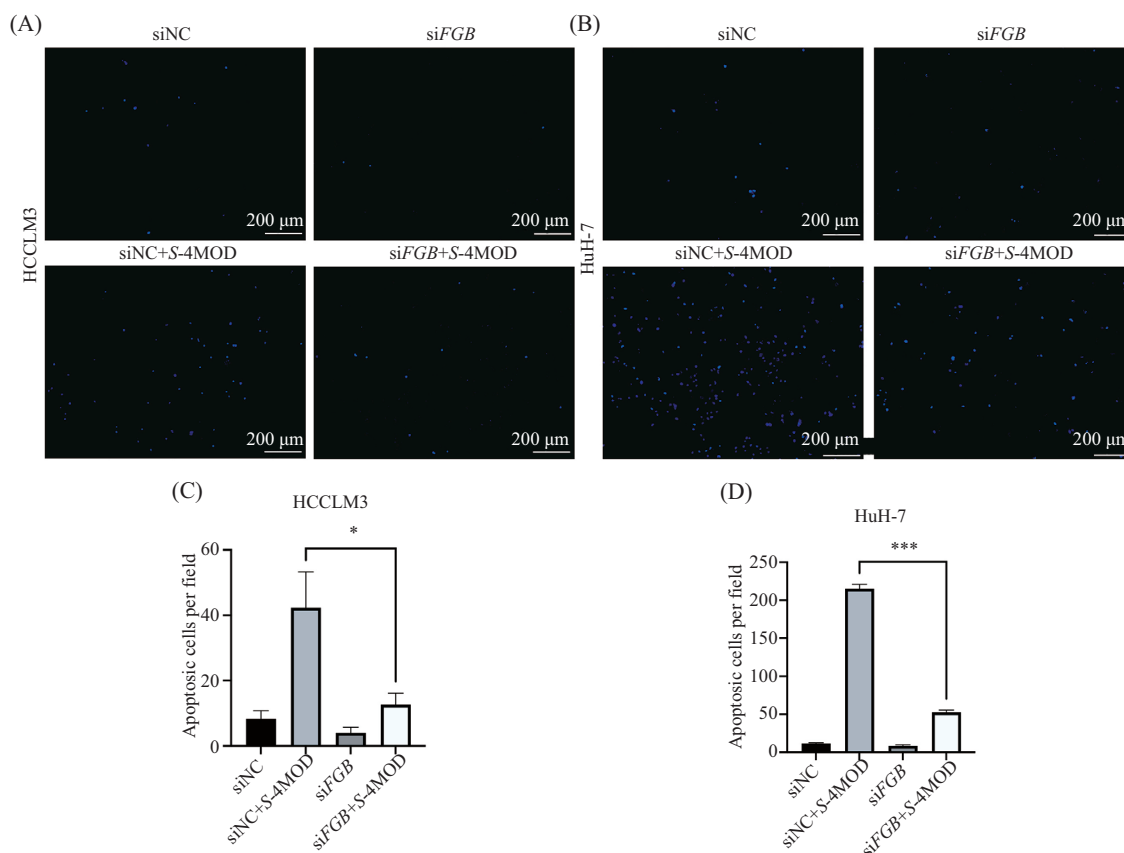
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与siNC+S-4MOD组比较。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with siNC+S-4MOD group.

表达水平的下调可显著削弱S-4MOD的抗HCC活性。以上结果支持S-4MOD通过上调FGB表达发挥其抑制HCC发展的药理作用。

传统中药(traditional Chinese medicines, TCMs)

以其减毒增效及免疫调节作用在肿瘤综合治疗中展现出独特价值,并已在临床实践中得到验证^[17]。在HCC治疗领域,与西医治疗相比,TCMs不仅具有显著的经济性,可大幅减轻患者的治疗负担,而且其多



A: HCCLM3经siRNA转染及S-4MOD处理后Hoechst 33258染色的代表性图像; B: HuH-7经siRNA转染及S-4MOD处理后Hoechst 33258染色的代表性图像; C: 定量分析显示siRNA转染及S-4MOD处理后HCCLM3凋亡细胞数; D: 定量分析显示siRNA转染及S-4MOD处理后HuH-7凋亡细胞数。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

A: representative images of Hoechst 33258 staining in HCCLM3 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment; B: representative images of Hoechst 33258 staining in HuH-7 cells following siRNA transfection and S-4MOD treatment; C: quantitative analysis of apoptotic HCCLM3 cell number following siRNA transfection and S-4MOD treatment; D: quantitative analysis of apoptotic HuH-7 cell number following siRNA transfection and S-4MOD treatment. * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

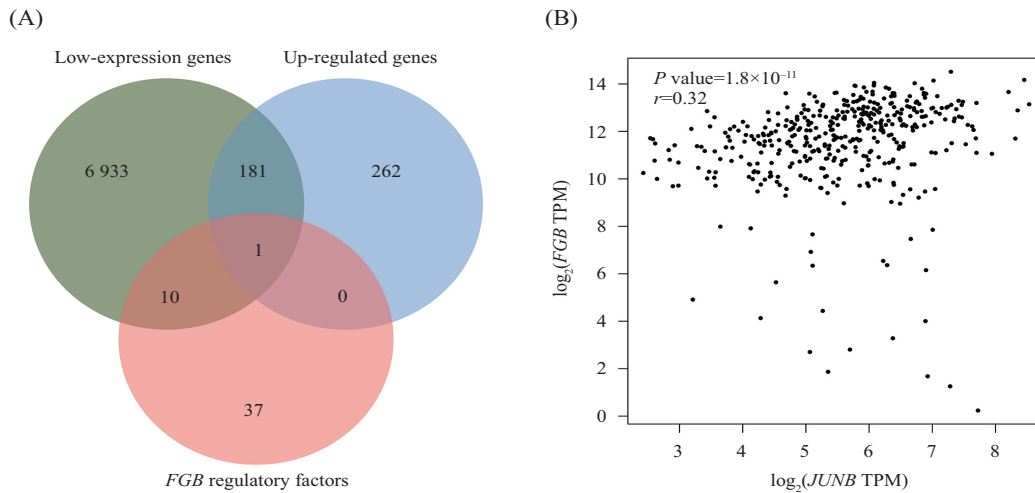
图7 *FGB*敲减对S-4MOD促进HCC细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of *FGB* knockdown on the pro-apoptotic activity of S-4MOD in HCC cells

靶点调控特性使其在抑制肿瘤的同时能维持较好的安全性^[18-19]。4MOD作为一种具有代表性的中药活性成分,既往多项研究已证实其在多种恶性肿瘤中表现出广谱抗肿瘤效应^[6-9]。基于这些发现,4MOD在HCC治疗领域具有突出的研究价值和发展潜力,有望被开发成为一种新型的靶向抗肝癌药物。本研究首次从分子机制层面阐明S-4MOD通过上调*FGB*表达抑制HCC发展的作用机理,不仅为S-4MOD的抗肝癌效应提供了实验依据,也为传统中医药辅助治疗肝癌的临床应用奠定了理论基础。

为探究*FGB*在S-4MOD抗肝癌效应中的调控机制,我们通过数据库筛选出其潜在的调控因子*JUNB*。*JUNB*基因位于19号染色体p13.2区域,编码含347个氨基酸的蛋白质,该蛋白可形成同源二聚体或与Fos

蛋白家族形成异源二聚体,是激活蛋白-1(activating protein-1, AP-1)的关键亚基^[20],在细胞生长、分化及肿瘤转化中发挥重要作用^[21]。早期研究显示*JUNB*在肝癌组织中低表达^[22],并参与免疫反应及HCC进展^[23];然而近期研究却指出,*JUNB*在HCC中过表达可激活PI3K-Akt通路,促进癌细胞转移与并提高其恶性程度^[24],同时诱导分化簇90(cluster of differentiation 90, CD90)阴性HCC细胞向CD90阳性表型转化,从而增强其肺部转移潜力^[25]。此外,可溶性半乳糖苷结合凝集素3B(lectin, galactoside binding soluble 3B, LGALS3B)可通过增强*JUNB*转录活性诱导整合素亚基 αV (integrin subunit alpha V, ITGAV)表达并促进HCC进展^[26],而肾母细胞瘤1相关蛋白(Wilms tumor 1 associated protein, WTAP)介导的*JUNB*的 N^6 -甲基腺苷

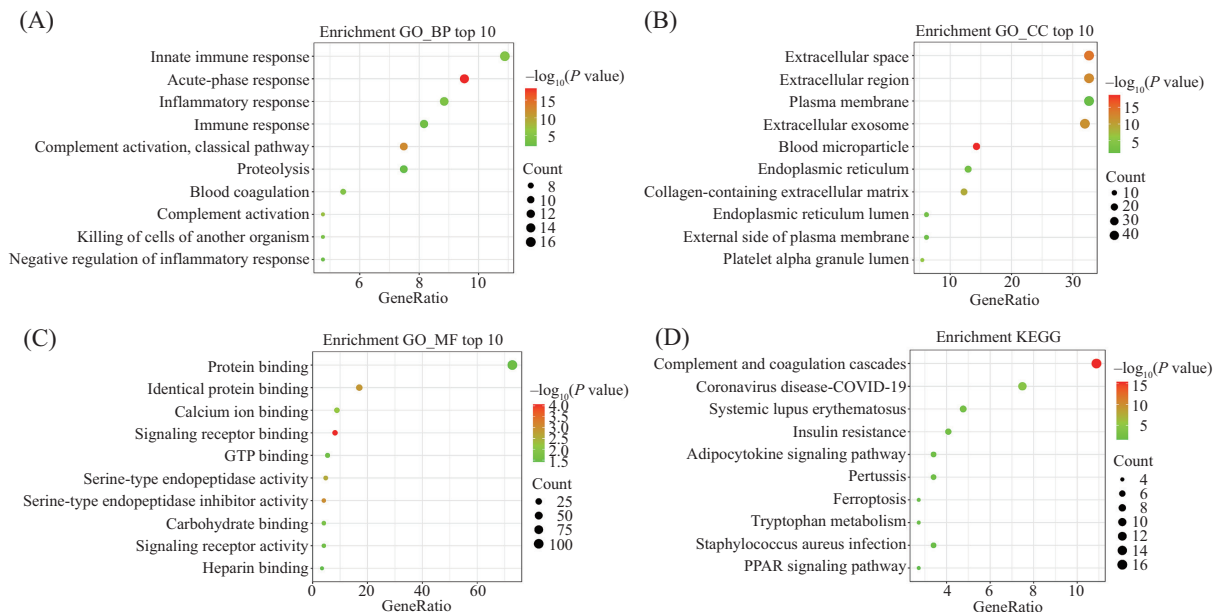


A: Venn分析图; B: *JUNB*与*FGB*在HCC中表达的相关性分析散点图。TPM: 每百万转录本。

A: Venn diagram; B: scatter plot showing the correlation between *JUNB* and *FGB* expression in HCC. TPM: transcripts per million.

图8 *FGB*潜在调控因子的相关性分析

Fig.8 Correlation analysis of potential regulatory factors of *FGB*



A: GO生物过程(BP)富集气泡图; B: GO细胞成分(CC)富集气泡图; C: GO分子功能(MF)富集气泡图; D: KEGG富集气泡图。

A: bubble plot of GO BP (biological process) enrichment; B: bubble plot of GO CC (cellular component) enrichment; C: bubble plot of GO MF (molecular function) enrichment; D: bubble plot of KEGG pathway enrichment.

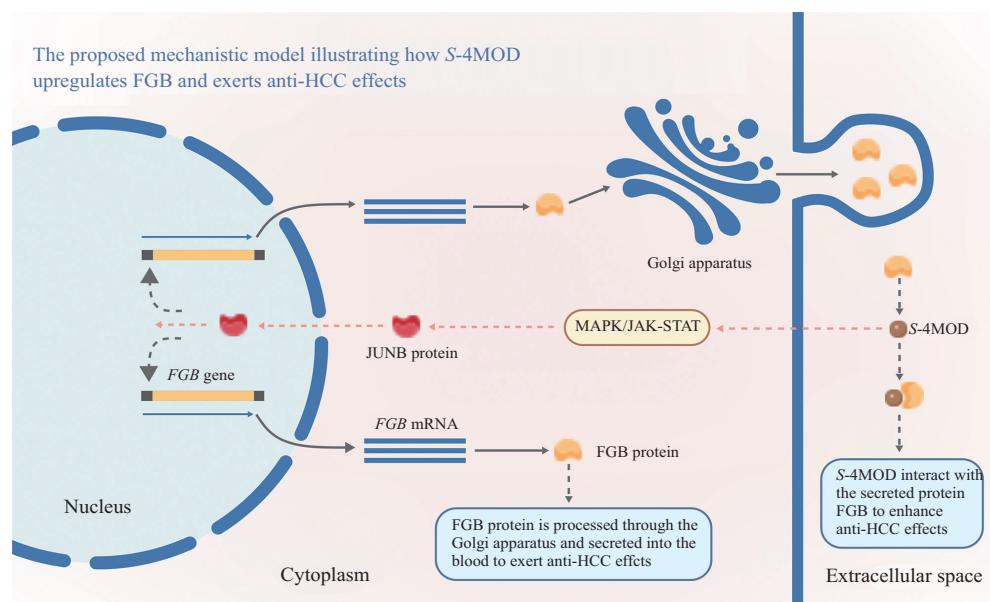
图9 *FGB*在HCC发展中的潜在功能和途径

Fig.9 Potential functions and pathways of *FGB* in HCC development

(*N*⁶-methyladenosine, m⁶A)修饰与HCC患者预后不良相关,且该关联由NLRP3-GSDMD通路介导^[27]。综上,*JUNB*可能作为上游转录因子调控下游靶基因*FGB*表达,从而参与HCC进展,并经由该上游调控作用介导*S-4MOD*的抗HCC效应,值得深入研究。但是值得注意的是,*JUNB*在HCC中呈低表达,但近期研究却发现其具有促癌功能。这一矛盾可能反映了*JUNB*在HCC不同阶段或亚型中的情境依赖性作用,因此需结合肿

瘤异质性进一步研究其功能。

此外,本研究发现*FGB*在HCC中显著下调且与不良预后密切相关,提示其具有潜在的诊断及预后判断价值。富集分析显示,*FGB*可能参与HCC发展中的先天免疫反应等生物过程,并主要富集于CCC通路。CCC是先天免疫与止血两大核心通路的关键交汇枢纽。这两条通路在宿主防御、炎症调控和组织修复中紧密协同,广泛参与血栓性疾病、自身免疫病及感



虚线箭头表示尚未经实验验证的推测环节。

Dashed arrows indicate hypothesized steps that require experimental validation.

图10 S-4MOD上调FGB并发挥抗HCC效应的潜在机制模型(使用BioGDP.com创建)

Fig.10 The proposed mechanistic model illustrating how S-4MOD upregulates FGB and exerts anti-HCC effects (created by BioGDP.com)

染等多种病理过程^[28]。近年来,补体与凝血系统作为肝脏来源的重要免疫组分,其在HCC免疫微环境中的调控作用受到广泛关注^[29]。多项研究证实,CCC通路相关的差异表达基因在HCC中显著富集^[30-31],且该通路中下调的补体C8 β 链(complement C8 beta chain, C8B)基因已被证实可作为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关HCC患者的生存预后生物标志物^[32]。然而,蛋白质组学分析却显示HCC中补体级联相关蛋白水平升高^[33],提示CCC通路的调控可能存在复杂的多层次机制。尽管如此,其与HCC预后之间的重要关联是明确的。综合本研究结果,FGB可能通过补体与凝血级联通路参与HCC的发生与发展。

本研究初步证实FGB是S-4MOD发挥抗HCC作用的功能相关靶点,且下调FGB可显著削弱S-4MOD的活性。S-4MOD为小分子化合物,其理化性质提示其具备跨膜进入细胞的能力,表明该化合物主要经由胞内途径发挥作用。尽管分子对接预测S-4MOD与分泌蛋白FGB存在潜在结合位点,但该结合机制本身难以解释S-4MOD对FGB mRNA的上调效应,且目前证据尚不支持两者存在直接物理结合。综合以上结果,我们提出以下主要机制假说:S-4MOD进入细胞后,可能通过激活胞内信号通路(如MAPK或JAK-STAT通路)或直接与胞内靶蛋白相互作用,进而活化转录因子JUNB;活化的JUNB结合FGB启动子区,上

调FGB转录水平从而介导S-4MOD的抗HCC效应。此外,可能存在次要机制:S-4MOD亦可与FGB直接结合,在胞外或细胞膜表面通过相互作用增强其抗HCC效应。具体机制如图10所示。基于上述结论,应意识到本研究尚存在以下局限性:第一,尚不清楚是S-4MOD与FGB的直接结合还是通过JUNB-FGB调控轴在抗HCC效应中起主导作用;第二,对于FGB的表达,仅检测了其mRNA水平,尚缺乏蛋白水平的验证;第三,FGB下游通路目前仅基于生信预测,尚需RNA-seq等系统验证;第四,缺乏体内动物模型评估S-4MOD调控FGB的抗肿瘤效应。后续拟采用细胞热位移实验(cellular thermal shift assay, CETSA)及表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)验证S-4MOD与FGB蛋白的直接结合,通过ChIP-qPCR及双荧光素酶报告基因实验明确JUNB与FGB启动子的直接互动,并结合Western blot及JUNB干预实验对JUNB-FGB调控轴进行解析。同时利用RNA-seq和HCC移植瘤模型阐明FGB介导S-4MOD抗HCC效应的下游机制及体内药效,从而为S-4MOD抗HCC的分子机制提供更完整的理论依据。

参考文献 (References)

- [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): 229-63.
- [2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6.
- [3] 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]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(5): 893-918.
- [4] WANG H B, LU Z M, ZHAO X X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 133.
- [5] CHAN S C, CHANG Y S, WANG J P, et al. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 153-8.
- [6] PARK K R, YUN H M, QUANG T H, et al. 4-methoxydalbergione suppresses growth and induces apoptosis in human osteosarcoma cells *in vitro* and *in vivo* xenograft model through down-regulation of the JAK2/STAT3 pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(6): 6960-71.
- [7] DU H Y, TAO T, XU S M, et al. 4-methoxydalbergione inhibits bladder cancer cell growth via inducing autophagy and inhibiting Akt/ERK signaling pathway [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 789658.
- [8] LI M, XIAO Y B, LIU P Y, et al. 4-methoxydalbergione inhibits esophageal carcinoma cell proliferation and migration by inactivating NF- κ B [J]. *Oncol Rep*, 2023, 49(2): 42.
- [9] ZENG L P, QIN Y Q, LU X M, et al. 4-methoxydalbergione elicits anticancer effects by upregulation of GADD45G in human liver cancer cells [J]. *J Healthc Eng*, 2023, 2023: 6710880.
- [10] MOESSON M W. Fibrinogen and fibrin structure and functions [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(8): 1894-904.
- [11] KUANG M Y, PENG Y Z, TAO X T, et al. FGB and FGG derived from plasma exosomes as potential biomarkers to distinguish benign from malignant pulmonary nodules [J]. *Clin Exp Med*, 2019, 19(4): 557-64.
- [12] LIU H X, XIANG L L, MEI Y. miR-877-5p inhibits epithelial mesenchymal transformation of breast cancer cells by targeting FGB [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 4882375.
- [13] ZHOU J, LI P P, ZHAO X G, et al. Circ_16601 facilitates Hippo pathway signaling via the miR-5580-5p/FGB axis to promote my-CAF recruitment in the TME and LUAD progression [J]. *Respir Res*, 2023, 24(1): 276.
- [14] ZHAO L P, SHI J H, CHANG L, et al. Serum-derived exosomal proteins as potential candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(1): 827-35.
- [15] WANG H L, FU Y, DA B B, et al. Single-cell sequencing identifies the heterogeneity of CD8⁺ T cells and novel biomarker genes in hepatocellular carcinoma [J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 8256314.
- [16] KIM H S, CHOI J Y, JANG S H, et al. Fibrinogen alpha and beta chains as non-invasive predictors of hepatocellular carcinoma progression [J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 42459.
- [17] WANG Y S, ZHANG Q F, CHEN Y C, et al. Antitumor effects of immunity-enhancing traditional Chinese medicine [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 121: 109570.
- [18] JIA W T, WANG L N. Using traditional Chinese medicine to treat hepatocellular carcinoma by targeting tumor immunity [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 9843486.
- [19] WANG H, ZHANG W N, LI L L, et al. Revealing the active ingredients and mechanisms of Xiatianwu against hepatocellular carcinoma: a study based on network pharmacology and bioinformatics [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2025, 398(1): 729-46.
- [20] KATAGIRI T, KAMEDA H, NAKANO H, et al. Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB [J]. *Immunol Med*, 2021, 44(3): 197-203.
- [21] YOSHITOMI Y, IKEDA T, SAITO-TAKATSUJI H, et al. Emerging role of AP-1 transcription factor JunB in angiogenesis and vascular development [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2804.
- [22] CHANG Y S, YEH K T, YANG M Y, et al. Abnormal expression of JUNB gene in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(3): 433-8.
- [23] YAN P, ZHOU B, MA Y D, et al. Tracking the important role of JUNB in hepatocellular carcinoma by single-cell sequencing analysis [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(2): 1478-86.
- [24] PASKEH M D A, GHADYANI F, HASHEMI M, et al. Biological impact and therapeutic perspective of targeting PI3K/Akt signaling in hepatocellular carcinoma: promises and challenges [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 187: 106553.
- [25] KAWAKAMI Y, OKADA H, NIO K, et al. Transcription factor JUNB is required for transformation of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma (HCC) cells into CD90-positive HCC cells *in vitro* [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 319.
- [26] SHIM H J, PARK M S, BAE W K, et al. ITGAV regulation of LGALS3BP-JUNB axis facilitates the cell-to-cell adhesion and invasiveness of hepatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2025, 45(7): 2997-3008.
- [27] SUN Z J, LI J B, ZHANG Z, et al. WTAP-mediated m⁶A modification of JUNB contributes to poor prognosis of HCC patients through the NLRP3-GSDMD pathway [J]. *Chin Med J*, 2025, 138(5): 622-4.
- [28] SATYAM A, GRAEF E R, LAPCHAK P H, et al. Complement and coagulation cascades in trauma [J]. *Acute Med Surg*, 2019, 6(4): 329-35.
- [29] THORGERSEN E B, BARRATT-DUE A, HAUGAA H, et al. The role of complement in liver injury, regeneration, and transplantation [J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 725-36.
- [30] WALAKIRA A, SKUBIC C, NADIZAR N, et al. Integrative computational modeling to unravel novel potential biomarkers in hepatocellular carcinoma [J]. *Comput Biol Med*, 2023, 159: 106957.
- [31] YUAN Y M, XU J T, JIANG Q X, et al. Ficolin 3 promotes ferroptosis in HCC by downregulating IR/SREBP axis-mediated MUFA synthesis [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 133.
- [32] ZHANG Y, CHEN X R, CAO Y J, et al. C8B in complement and coagulation cascades signaling pathway is a predictor for survival in HBV-related hepatocellular carcinoma patients [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 3503-15.
- [33] DONG W, XIA Z Y, CHAI Z H, et al. Proteomic analysis of small extracellular vesicles from the plasma of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *World J Surg Oncol*, 2022, 20(1): 387.