

本文引用: 周 意, 李 倩, 彭 憬, 孙克伟, 银思涵. 鳖龙软肝汤通过下调 TGF- β 1/Smad 信号通路关键分子表达抑制肝癌的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2072–2080.

鳖龙软肝汤通过下调 TGF- β 1/Smad 信号通路关键分子表达抑制肝癌的作用机制

周 意¹, 李 倩², 彭 憬², 孙克伟^{1*}, 银思涵^{1*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院肝病研究所, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一中医临床学院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 目的 探讨鳖龙软肝汤通过调节转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/信号转导蛋白(Smad)通路抑制肝癌的药效机制。方法 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组, 包括正常组、模型组、鳖龙软肝汤低剂量组(6.84 g·kg⁻¹·d⁻¹)、鳖龙软肝汤高剂量组(27.36 g·kg⁻¹·d⁻¹), 每组 15 只。除正常组大鼠外, 其余大鼠腹腔注射二乙基亚硝胺(DEN)(50 mg·kg⁻¹·w⁻¹)构建肝癌模型, 连续干预 16 周。在第 8 周对鳖龙软肝汤低、高剂量组予以相应剂量(6.84、27.36 g·kg⁻¹·d⁻¹)中药干预, 连续干预 8 周。观察各组大鼠的一般状况; HE 染色观察肝组织病理学损伤状况; Western blot 和免疫荧光法检测 TGF- β 1、Smad2、Smad3、赖氨酰氧化酶样蛋白 1(LOXL1)、I 型胶原蛋白(Collagen I)、金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMPI)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达水平; 免疫组化法检测增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平。结果 正常组大鼠一般状况良好, 精神、饮食、活动正常; 模型组大鼠第 16 周精神萎靡不振, 皮毛枯槁, 饮食、活动明显减少; 鳖龙软肝汤低剂量组与模型组无差异, 鳖龙软肝汤高剂量组则精神好转、饮食增加。正常组肝细胞正常、肝小叶结构健全, 模型组第 16 周出现异型肝癌细胞, 鳖龙软肝汤低剂量组肝细胞坏死及炎症减轻, 鳖龙软肝汤高剂量组肝细胞排列更规则、坏死与变性明显减轻。与正常组比较, 第 16 周模型组体质量降低($P<0.05$), 肝脏体质量比升高($P<0.05$), Ishak 评分升高($P<0.05$); 肝组织中 PCNA 表达水平升高($P<0.05$), TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMPI、 α -SMA 蛋白及 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。与模型组和鳖龙软肝汤低剂量组比较, 第 16 周鳖龙软肝汤高剂量组肝脏质量比降低($P<0.05$), PCNA 表达水平降低($P<0.05$)。与模型组比较, 鳖龙软肝汤低剂量组大鼠肝组织中 TGF- β 1、TIMPI、 α -SMA 蛋白表达水平降低($P<0.05$), TGF- β 1、Smad3、LOXL1、TIMPI mRNA 表达水平降低($P<0.05$); 鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMPI、 α -SMA 蛋白及 mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。与鳖龙软肝汤低剂量组比较, 鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝组织中 Smad2、 α -SMA 蛋白表达水平下降($P<0.05$), Smad2、Smad3、Collagen I mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。结论 鳖龙软肝汤可改善大鼠肝纤维化, 抑制肝癌进展, 其作用机制可能与下调肝组织中 PCNA 及 TGF- β 1/Smad 信号通路相关分子的表达有关。

〔关键词〕 肝细胞癌; 肝纤维化; 鳖龙软肝汤; 转化生长因子- β 1/信号转导蛋白通路; 增殖细胞核抗原; 二乙基亚硝胺; 细胞外基质

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.007

Mechanism of Bie Long Ruangan Decoction in inhibiting hepatocellular carcinoma via downregulation of key molecular expressions in the TGF- β 1/Smad signaling pathway

ZHOU Yi¹, LI Qian², PENG Jing², SUN Kewei^{1*}, YIN Sihan^{1*}

1. Hepatology Institute, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. The First Clinical School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔收稿日期〕2025-06-25

〔基金项目〕湖南省自然科学基金项目(2024JJ9442); 湖南省中医药管理局科研计划项目(D2022059); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdk-2023146); 湖南中医药大学双一流学科建设项目(2018[03]); 湖南省卫生健康科研课题(20257775)。

〔通信作者〕* 银思涵, 女, 硕士, 主治医师, E-mail: 324066597@qq.com; 孙克伟, 男, 博士, 主任医师, E-mail: keweisun550@163.com。

[Abstract] Objective To investigate the pharmacological mechanism by which Bielong Ruangan Decoction (BLRGD) inhibits hepatocellular carcinoma through modulation of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Smad signaling pathway. **Methods** Sixty male SPF Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: normal group, model group, low-dose BLRGD group ($6.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and high-dose BLRGD group ($27.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), with 15 rats per group. Except the rats in the normal group, the remaining rats received intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN) ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{w}^{-1}$) to establish a hepatocellular carcinoma model, with continuous intervention for 16 weeks. In Week 8, the low- and high-dose BLRGD groups received the corresponding doses ($6.84, 27.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) of BLRGD for 8 consecutive weeks. General condition was observed in each group. Pathological changes in liver tissue were assessed using hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3, lysyl oxidase-like protein 1 (LOXL1), type I collagen (Collagen I), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), and α -smooth muscle actin (α -SMA) were measured by Western blot and immunofluorescence assays. The expression level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was determined by immunohistochemistry. **Results** Rats in the normal group exhibited good general condition, with normal mental status, food consumption and activity. At Week 16, rats in the model group were lethargic, had dull fur, and showed a significant reduction in food consumption and activity. No differences were observed between the low-dose BLRGD group and the model group, while the high-dose BLRGD group showed improved mental status and increased food consumption. Hepatocytes in the normal group were normal, and the hepatic lobular structure was intact; atypical hepatocellular carcinoma cells were observed in the model group at Week 16; hepatocyte necrosis and inflammation were alleviated in the low-dose BLRGD group, while in the high-dose BLRGD group, hepatocyte arrangement was more regular with markedly reduced necrosis and degeneration. Compared with the normal group, the model group at Week 16 exhibited decreased body weight ($P < 0.05$), increased liver-to-body weight ratio ($P < 0.05$), and increased Ishak scores ($P < 0.05$); the expression levels of PCNA in liver tissue increased ($P < 0.05$), along with the increased protein and mRNA expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3, LOXL1, Collagen I, TIMP1, and α -SMA ($P < 0.05$). Compared with the model group and the low-dose BLRGD group, the high-dose BLRGD group at Week 16 showed a decreased liver-to-body weight ratio ($P < 0.05$), and reduced PCNA expression levels ($P < 0.05$). Compared with the model group, the low-dose BLRGD group showed decreased protein expression levels of TGF- β 1, TIMP1, and α -SMA in liver tissue ($P < 0.05$), and reduced mRNA expression levels of TGF- β 1, Smad3, LOXL1, and TIMP1 ($P < 0.05$); the high-dose BLRGD group showed decreased protein and mRNA expression levels of TGF- β 1, Smad2, Smad3, LOXL1, Collagen I, TIMP1, and α -SMA in liver tissue ($P < 0.05$). Compared with the low-dose BLRGD group, the high-dose BLRGD group showed further decreased expression levels of Smad2 and α -SMA proteins in liver tissue ($P < 0.05$), as well as reduced mRNA expression levels of Smad2, Smad3, and Collagen I ($P < 0.05$). **Conclusion** BLRGD can ameliorate hepatic fibrosis and inhibit the progression of hepatocellular carcinoma in rats, and its mechanism may be related to the downregulation of PCNA and key molecules in the TGF- β 1/Smad signaling pathway in liver tissue.

[Keywords] hepatocellular carcinoma; hepatic fibrosis; Bielong Ruangan Decoction; TGF- β 1/Smad signaling pathway; proliferating cell nuclear antigen; diethylnitrosamine; extracellular matrix

根据 2022 年中国癌症统计报告数据,我国原发性肝癌的发病率在所有恶性肿瘤中位列第 5,死亡率居第 2,年度新发病例达 36.77 万例,死亡病例达 31.65 万例^[1]。在原发性肝癌中,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占比高达 75%~85%^[2],80%~90%的 HCC 病例由肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)、肝硬化发展而来;而肝硬化作为肝癌发病的独立危险因素,患者进展为 HCC 的概率约为 2.4%^[3]。由此可见,HF 向 HCC 癌前病变的转化是肝癌防控

的核心节点。因此,阻断这一转化过程成为肝癌防治工作的关键环节。尽管国内外指南尚未明确肝癌癌前病变的治疗方案,但中药制剂通过抗 HF 减少 HCC 发生的研究已获关注^[3-4]。鳖龙软肝汤作为疏肝健脾、活血化瘀的代表方剂,组方严谨,由桃仁、醋莪术、醋鳖甲、炒地龙、茯苓、醋柴胡、白芍配伍而成。从药理作用来看,鳖龙软肝汤含药血清能抑制乙型肝炎病毒相关原发性肝癌细胞的增殖迁移,其作用机制可能与下调乙型肝炎病毒相关肝癌细胞中甲基转

移酶样 3 介导的 N-甲基腺苷水平下降有关,其过程可能与细胞因子信号抑制因子 2 的表达上升密切相关^[5]。研究表明,鳖龙软肝汤通过调控肿瘤细胞的增殖、侵袭及肿瘤炎症微环境发挥抗癌作用,通过多成分、多靶点、多途径参与肝癌的治疗^[6]。鳖龙软肝汤可能通过促进细胞 B 淋巴细胞瘤-2/细胞色素 C 线粒体凋亡通路活化,抑制肝癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[7]。目前,该方剂在临床上常用于 HF、肝硬化、病毒性肝炎相关原发性肝癌等疾病的治疗,且能通过延缓 HF 进展,降低患者向肝癌转化的风险^[8-10]。但当前研究尚未阐明其通过何种分子机制阻断 HF 向肝癌的癌变进程,这也成为该方剂进一步转化应用与机制研究的核心方向。

从现代医学视角来看,转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)作为一类多功能多肽类细胞因子,在哺乳动物体内存在 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 三种亚型,可参与调控细胞分化、迁移、增殖及基因表达等多种生物学过程,其中 TGF- β 1 是该家族的主要亚型,也是目前公认作用最强的促纤维化细胞因子^[11]。信号转导蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smad)作为 TGF- β 信号通路下游的效应性转录因子,其活化状态可调控促纤维化相关基因的表达^[12]。TGF- β 1/Smad 信号通路是调控细胞外基质重塑的关键枢纽,更是促进 HF 发展的重要通路^[13]。该通路在 HF 向 HCC 转化的进程中同样发挥着关键作用:一方面,其信号传导失调在肝癌微环境的炎症反应、纤维生成及免疫调节中占据核心地位;另一方面,TGF- β 1 还能通过调控血管生成、抑制抗肿瘤免疫微环境等途径,加速肝细胞的恶性转化^[14-16]。鳖龙软肝汤作为治疗慢性肝炎 HF 的重要方剂,其对 TGF- β 1/Smad 通路的干预研究正逐步深入。研究显示,鳖龙软肝汤可能通过调节细胞外基质代谢发挥抗纤维化作用^[17],而 TGF- β 1/Smad 通路是基质重塑关键枢纽,提示鳖龙软肝汤与该通路存在潜在联系。相关研究表明,类似复方中药如鳖甲煎丸^[18]、疏肝健脾活血方^[19]能抑制 TGF- β 1/Smad 诱导的纤维形成,降低相关蛋白表达,抑制肝星状细胞增殖。从组方药材看,丹参^[20]、莪术^[21]等成分已证实可调节 TGF- β 1/Smad 通路相关活性。但目前鳖龙软肝汤对 TGF- β 1/Smad 通路的精准干预机制,包括具体靶点、分子调控过程等尚待明确。因此,本研究以二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱导的大鼠肝癌模型为载体,模拟肝癌的病变过程,聚焦 TGF- β 1/Smad 通路,探讨鳖龙软肝汤在

抑制癌变中的作用机制,为中医药防治肝癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物

鳖龙软肝汤组方:桃仁 10 g、醋莪术 10 g、醋鳖甲 10 g、炒地龙 6 g、茯苓 15 g、醋柴胡 10 g、白芍 15 g(批号分别为 2023010903、230101、20221206、2023012401、SN22123101、CK23012301、TH23010701)。药材均选用湖南中医药大学第一附属医院门诊部中药房提供的优质地道药材,并由医院副研究员吴迪确认为正品。制备方法:药材中加入总药量 10 倍量水浸泡 1 h,煎煮 40 min,倒出药液,再加 6 倍量水煎煮 40 min。将 2 次煎煮过后的药液放一起加热浓缩至 0.684、2.736 g/mL 的生药,4℃冰箱储存备用。

1.2 动物

60 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量(200±20) g。实验所用动物购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠在温度 24~28℃、湿度 60%~75%下饲养,适应性喂养 1 周,自由饮食和饮水。本项实验已经通过湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会的正式审批,并赋予伦理审查编号:ZYFY20221109-03。

1.3 主要试剂

DEN 试剂(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号:C14391670);HE 染色试剂盒、赖氨酰氧化酶样蛋白 1(lysyl oxidase like protein 1, LOXL1)抗体(北京索莱宝生物科技有限公司,货号:G1120、K001876P);无水乙醇、二甲苯、3%过氧化氢溶液、中性树胶(国药集团化学试剂有限公司,货号:100092683、10023418、10011208、10004160);TGF- β 1、Smad2、Smad3、I 型胶原蛋白(collagen type I, Collagen I)、金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(美国 Affinity Biosciences 公司,批号:AF1027、AF6449、AF6362、AF7001、AF7007、AF1032、AF0239);柱式法 WB 专用动物细胞和组织总蛋白提取试剂盒、羊抗小鼠抗体、羊抗兔抗体、肌动蛋白单克隆抗体(美国 Immunoway Biotechnology 公司,货号:RS0024、RS23710、RS23920、YM3028);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:P0012);

柠檬酸抗原修复液、磷酸盐缓冲液(PBS)、自发荧光淬灭剂、BSA、DAPI、抗荧光淬灭封片剂、组化试剂盒 DAB 显色剂(武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: G1202、G0002、G1221、G5001、G1012、G1401、G1211)。

1.4 主要仪器

JT-12S 型脱水机、JB-L5 型包埋机、JB-L5 型冻台(武汉俊杰电子有限公司);RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);KD-P 型组织摊片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司);Universal500V-2.5A-500W 型电泳电源、Mini Trans-Blo 型电泳转膜槽、Mini-Protean 型垂直电泳槽(美国伯乐公司);Eclipse C1 型正置荧光显微镜、DS-U3 型成像系统(日本尼康公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 干预方法及模型制备 本课题组依据《新药临床前剂量设计关键要素》^[21]和《药理实验方法学》^[23],在前期预实验中确定了动物给药量的计算方法,即大鼠剂量(mg/kg)=成人剂量(mg/kg)×6.3(成人体重按 70 kg 计算)。其中,鳖龙软肝汤的低剂量设为 $6.84 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (按生药量计算,后同),中、高剂量则分别为低剂量的 2 倍和 4 倍,即 $13.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $27.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

实验将 60 只大鼠随机分为正常组、模型组、鳖龙软肝汤低剂量组和鳖龙软肝汤高剂量组,每组 15 只。对照组大鼠腹腔注射生理盐水,其余各组大鼠腹腔注射 50 mg/kg DEN 以复制肝癌模型^[24],每周 1 次,连续干预 16 周。自 DEN 注射第 8 周起,鳖龙软肝汤低、高剂量组分别按 6.84 、 $27.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃给药,正常组和模型组给予等体积生理盐水,每日 2 次,直至第 16 周^[24]。大鼠出现明显的食欲减退、体形消瘦、毛色晦暗、精神不振、活动减少、毛发枯槁等表现,肝脏体质量比升高,肝脏表面可见肿瘤结节,HE 染色可见异型细胞提示造模成功^[25]。

1.5.2 动物处死和肝组织处理 各组于第 16 周末处死大鼠,处死前称量大鼠体质量,处死后剖开大鼠腹腔,剪取整个肝脏,对于肝脏有结节的大鼠,均采集结节及其周围 1 cm 的组织样本。未出现结节者则统一取肝组织,称量肝质量,计算肝脏体质量比。肝脏体质量比=肝质量/最终体质量×100%。

1.5.3 大鼠整体状况记录 实验过程中密切观察大鼠精神、饮食、活动、毛发等一般情况,称取第 16 周大鼠体质量。

1.5.4 肝组织病理形态学观察 取经脱水、包埋、切

片、脱蜡后的大鼠肝组织,进行 HE 染色,用中性树胶封片,烤片冷却后,用数字扫描显微镜随机拍摄 5 张 HCC 图片。观察各组大鼠肝脏形态组织学变化及 HF 程度,依据 Ishak 评分系统,从纤维化程度、间隔形成、其他表现 3 个方面将 HF 分为 0~6 分,分数越高提示 HF 程度越严重^[26]。

1.5.5 Western blot 检测大鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP1、 α -SMA 蛋白表达水平 取-80℃冻存肝组织,裂解并提取蛋白,利用 BCA 法测定浓度,沸水浴 10 min 变性。加载变性蛋白 20 μg ,经电泳转移至 PVDF/NC 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,孵育 TGF- β 1 一抗(1:1 000)、Smad2(1:1 000)、Smad3(1:1 000)、LOXL1(1:1 000)、Collagen I (1:1 000)、TIMP1 (1:1 000)、 α -SMA (1:1 000),均以 5%TBST 牛奶稀释,4℃孵育过夜,次日室温复温 20 min,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。加入远红外荧光二抗:羊抗小鼠二抗(1:10 000)和羊抗兔二抗(1:10 000),稀释于 5%脱脂奶粉 TBST 溶液,37℃孵育 1 h;TBST 洗涤 4 次,每次 5 min。ECL 法曝光显影,ImageJ 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参,计算目标蛋白相对表达量。

1.5.6 免疫荧光法检测大鼠肝组织中 TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP-1、 α -SMA 蛋白荧光表达 取大鼠肝组织,脱水,石蜡包埋,切片,贴于防脱载玻片,烤片,室温保存备用。切片依次经二甲苯脱蜡(3 次,各 10 min),梯度乙醇水化(100%、95%、90%、80%、70%各 5 min),蒸馏水冲洗 2 次,每次 5 min;抗原修复采用柠檬酸盐缓冲液,微波炉中高火加热至沸腾,保持微沸 15 min,自然冷却至室温,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。用免疫组化笔在切片组织周围画圈,加一抗 TGF- β 1(1:200)、Smad2(1:100)、Smad3(1:100)、LOXL1(1:100)、Collagen I (1:100)、TIMP1(1:100)、 α -SMA(1:200),湿盒内 4℃孵育过夜,PBS 洗涤,加羊抗小鼠二抗(1:10 000)和羊抗兔二抗(1:10 000),室温避光孵育 50 min,PBS 洗涤后 DAPI 复染 10 min,滴加抗荧光淬灭封片剂 5 min,流水冲 10 min,盖玻片封片。荧光镜下观察,ImageJ 分析荧光强度。

1.5.7 免疫组化检测肝组织中 PCNA 表达水平 肝组织石蜡切片脱蜡、水化、抗原修复,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,进行抗原修复,滴加 5%BSA 均匀覆盖,室温封闭 30 min。滴加一抗 PCNA(1:100),切片置于湿盒,4℃孵育过夜。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:200)室温孵育 50 min,

PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。新鲜配制 DAB 显色液,均匀滴加于切片组织,显微镜下实时观察显色情况(3~5 min,至棕黄色阳性信号清晰、背景无明显着色),立即用自来水冲洗 10 min 终止显色。苏木素染液复染细胞核 5 min,自来水冲洗返蓝 10 min,梯度乙醇脱水(70%、80%、90%、95%、100%各 3 min),二甲苯透明(2 次,各 5 min),中性树胶封片。在正置荧光显微镜下观察,每张照片随机选择 2 个视野,用 ImageJ 软件进行图像分析。

1.6 统计学分析

使用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析。计数资料以“%”呈现,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。若数据符合正态分布且方差齐性,则采用单因素方差分析,并通过 LSD 法进行两两对比;若方差不齐,则使用秩和检验。对于组间比较,采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 表示结果有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况及肝脏体质量比较

观察发现,在实验期间正常组大鼠的一般状况良好,精神、饮食、活动正常。模型组大鼠第 16 周精神萎靡不振,皮毛枯槁,饮食、活动明显减少。鳖龙软肝汤低剂量组大鼠一般状态与模型组无显著差异;鳖龙软肝汤高剂量组情况则逐渐改善,精神好转,饮食量增加。

与正常组比较,模型组体质量降低($P<0.05$),肝脏体质量比升高($P<0.05$);与模型组和鳖龙软肝汤低剂量组比较,鳖龙软肝汤高剂量组肝脏体质量比降低($P<0.05$)。详见表 1。

2.2 各组大鼠肝脏形态改变比较

观察大鼠肝脏外形,正常组大鼠肝脏为红褐色且形似楔形,表面光滑无结节,质柔而脆;模型组大鼠第 16 周肝脏明显缩小,弹性差,与周围组织出现明显粘连,表面遍布结节,颗粒感明显,直径 4~

表 1 各组大鼠体质量、肝脏体质量比的比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of body weight and liver-to-body weight ratio among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	体质量/g	肝脏体质量比/%
正常组	468.08±35.61	2.67±0.41
模型组	363.51±42.47*	8.00±1.67*
鳖龙软肝汤低剂量组	362.11±45.77*	7.81±1.05*
鳖龙软肝汤高剂量组	368.28±46.08*	5.78±1.41* ^{#Δ}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与鳖龙软肝汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$ 。

8 mm,可见大量暗红色球状肿瘤,直径 3~15 mm(8/8, 100.0%)。与模型组比较,鳖龙软肝汤低剂量组肝脏肿胀质韧,肝包膜出现皱缩,与周围组织出现不同程度粘连,表面结节较小,颗粒感稍轻;鳖龙软肝汤高剂量组肝脏肿大减轻,表面较为光滑,颗粒感明显减轻,结节及暗红色肿瘤数量较模型组明显减少,结节大小较模型组明显减小,直径 1~3 mm。详见图 1。

2.3 各组大鼠肝组织病理形态学观察

HE 染色表明,正常组大鼠肝细胞胞质饱满,核大而圆整,排列有序,肝小叶构造健全,肝索及肝血窦自中央静脉呈放射状延展。与正常组比较,模型组大鼠第 16 周镜下可见不同分化程度的肝癌细胞,细胞异型性明显,排列杂乱,可见散在坏死灶与空泡状变性。与模型组比较,鳖龙软肝汤低剂量组大鼠肝脏可见部分肝细胞坏死和大量炎症细胞浸润,但细胞形态较规则,肿胀坏死程度较轻,异型细胞较模型组减少;鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝脏肝细胞排列较为规则,细胞坏死与空泡状变性明显减轻。详见图 2。

与正常组比较,模型组 Ishak 评分升高($P<0.05$);与模型组比较,鳖龙软肝汤高剂量组 Ishak 评分降低($P<0.05$)。详见表 2。

2.4 各组大鼠肝组织中 TGF-β1/Smad 通路相关蛋白表达水平比较

与正常组比较,模型组大鼠 TGF-β1、Smad2、

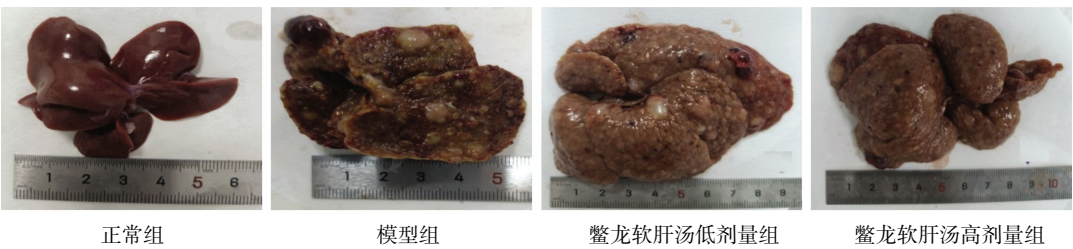


图 1 各组大鼠肝脏形态图

Fig.1 Liver morphology among groups of rats

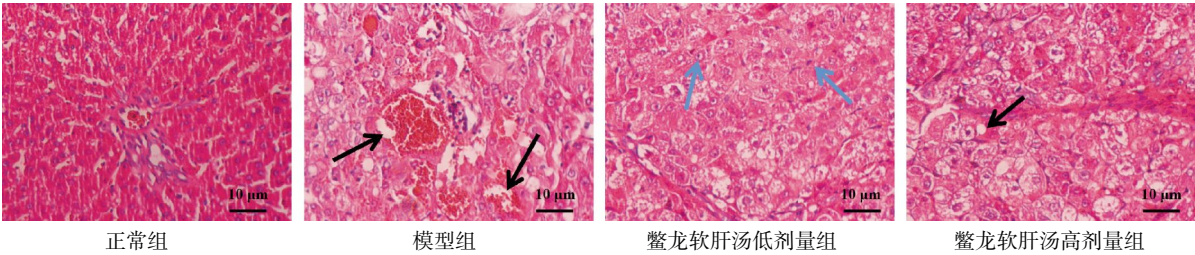


图 2 各组大鼠第 16 周肝组织病理形态学比较(HE 染色,×200)

Fig.2 Histopathological comparison of liver tissues at Week 16 among groups of rats (HE staining, ×200)

注:黑色箭头指肿瘤细胞空泡状变性;蓝色箭头指炎症细胞。

表 2 各组大鼠 Ishak 评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Comparison of Ishak scores among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	Ishak 评分/分
正常组	0.75±0.66
模型组	14.13±2.09*
鳖龙软肝汤低剂量组	12.25±2.28*
鳖龙软肝汤高剂量组	10.00±2.74**

注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, ** $P<0.05$ 。

Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP1、 α -SMA 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,鳖龙软肝汤低剂量组 TGF- β 1、TIMP1、 α -SMA 蛋白表达水平降低($P<0.05$),鳖龙软肝汤高剂量组 TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP1、 α -SMA 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与鳖龙软肝汤低剂量组比较,鳖龙软肝汤高剂量组 Smad2、 α -SMA 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。详见图 3、表 3。

2.5 各组大鼠肝组织中 TGF- β 1/Smad 通路相关蛋白 mRNA 表达水平

与正常组比较,模型组大鼠 TGF- β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP1、 α -SMA mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,鳖龙软肝汤低剂量组 TGF- β 1、Smad3、LOXL1、TIMP1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$);鳖龙软肝汤高剂量组 TGF-

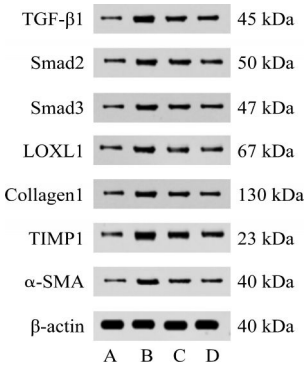


图 3 各组大鼠肝组织中 TGF- β 1/Smad 通路相关蛋白电泳图

Fig.3 Electropherogram of TGF- β 1/Smad pathway-related protein expression in liver tissues among groups of rats

注:A.正常组;B.模型组;C.鳖龙软肝汤低剂量组;D.鳖龙软肝汤高剂量组。

β 1、Smad2、Smad3、LOXL1、Collagen I、TIMP1、 α -SMA mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。与鳖龙软肝汤低剂量组比较,鳖龙软肝汤高剂量组 Smad2、Smad3、Collagen I mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。详见表 4、图 4。

2.6 各组大鼠肝组织中 PCNA 表达比较

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 PCNA 表达水平升高($P<0.05$);与模型组、鳖龙软肝汤低剂量组比较,鳖龙软肝汤高剂量组大鼠肝组织中 PCNA 表达水平降低($P<0.05$)。详见图 5、表 5。

表 3 各组大鼠肝组织中 TGF- β 1/Smad 通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Comparison of TGF- β 1/Smad pathway-related protein expression levels in liver tissues among groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	TGF- β 1	Smad2	Smad3	LOXL1	Collagen I	TIMP1	α -SMA
正常组	1.00±0.02	1.00±0.01	1.00±0.09	1.00±0.02	1.00±0.01	1.00±0.03	1.00±0.08
模型组	2.76±0.19*	2.04±0.09*	2.16±0.08*	2.36±0.09*	1.87±0.04*	2.59±0.10*	2.50±0.02*
鳖龙软肝汤低剂量组	2.02±0.09* [#]	1.84±0.01*	1.80±0.04*	1.79±0.18*	1.55±0.08*	2.14±0.07* [#]	1.82±0.03* [#]
鳖龙软肝汤高剂量组	1.62±0.12* [#]	1.42±0.02* ^{#△}	1.51±0.05* [#]	1.36±0.06 [#]	1.30±0.14 [#]	1.84±0.04* [#]	1.50±0.02* ^{#△}

注:与正常组比较, * $P<0.05$;与模型组比较, [#] $P<0.05$;与鳖龙软肝汤低剂量组比较, [△] $P<0.05$ 。

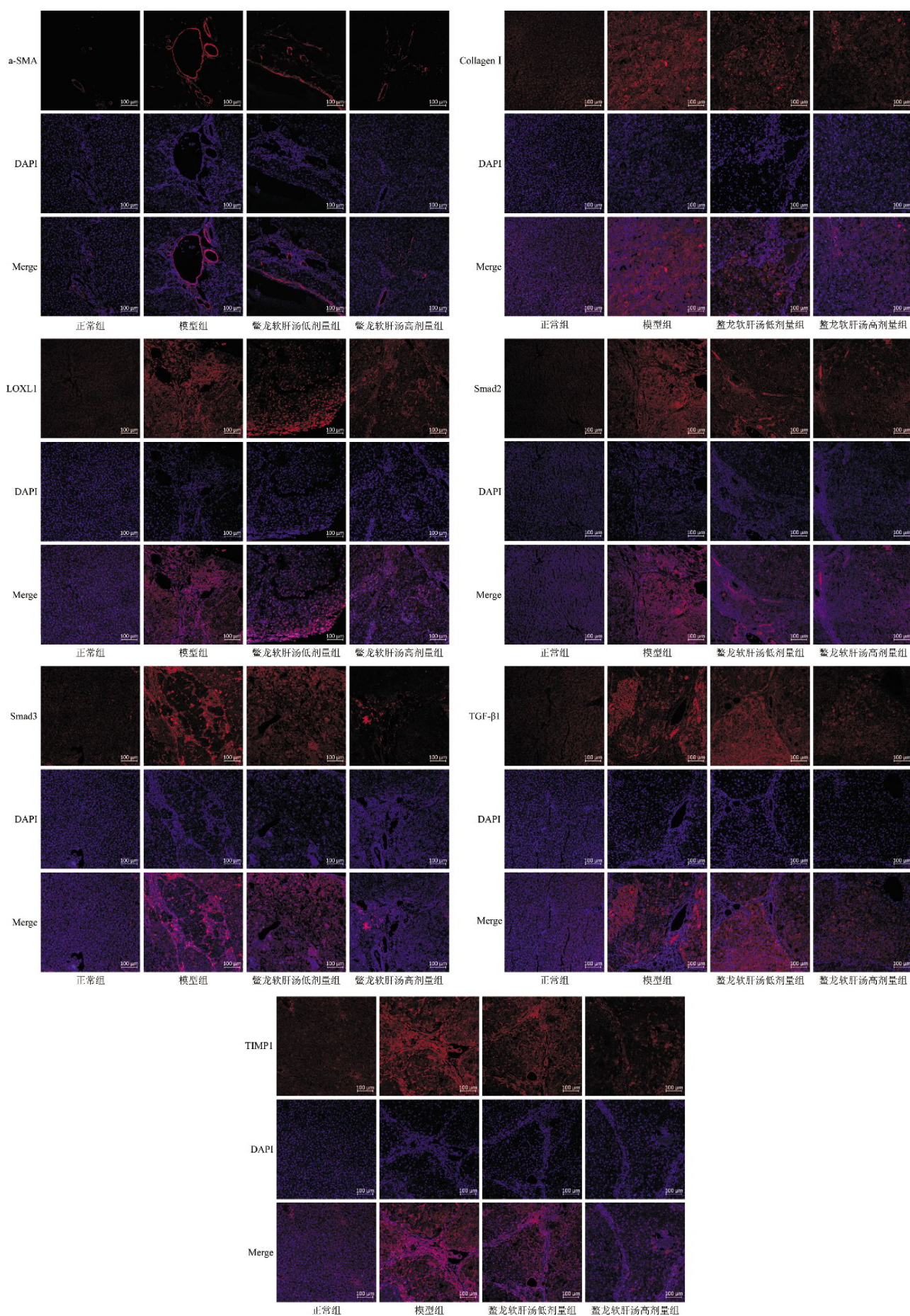


图 4 各组大鼠肝组织中 TGF-β1/Smad 通路相关蛋白 mRNA 表达量比较(免疫荧光, ×200)

Fig.4 Comparison of mRNA expression levels of TGF-β1/Smad pathway-related proteins in liver tissues among groups of rats (immunofluorescence, ×200)

表 4 各组大鼠肝组织中 TGF-β1/Smad 通路相关蛋白 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of mRNA expression levels of TGF-β1/Smad pathway-related proteins in liver tissues among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	TGF-β1	Smad2	Smad3	LOXL1	Collagen I	TIMP1	α-SMA
正常组	1.00±0.07	1.00±0.04	1.00±0.06	1.00±0.07	1.00±0.04	1.00±0.08	1.00±0.08
模型组	2.42±0.13*	1.92±0.11*	1.86±0.04*	1.79±0.08*	1.93±0.17*	1.89±0.10*	2.56±0.32*
鳖龙软肝汤低剂量组	1.82±0.13**	1.76±0.07*	1.51±0.18**	1.28±0.17 [#]	1.58±0.10*	1.43±0.12**	2.10±0.11*
鳖龙软肝汤高剂量组	1.51±0.15**	1.43±0.10* ^{#Δ}	1.10±0.10 ^{#Δ}	1.04±0.06 [#]	1.12±0.12 ^{#Δ}	1.11±0.12 [#]	1.59±0.15 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,** $P<0.05$;与鳖龙软肝汤低剂量组比较,^Δ $P<0.05$ 。

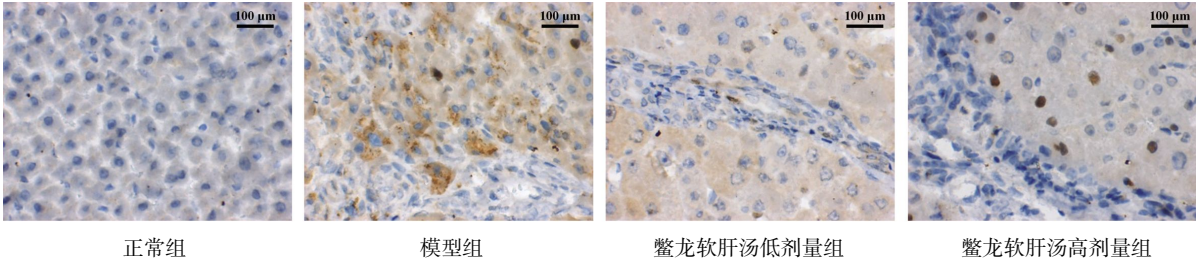


图 5 各组大鼠肝组织中 PCNA 表达比较(免疫组化染色,×400)

Fig.5 Comparison of PCNA expression in liver tissues among groups of rats (immunohistochemistry, × 400)

表 5 各组大鼠肝组织中 PCNA 表达比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Comparison of PCNA expression in liver tissues among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	PCNA
正常组	1.01±0.13
模型组	30.66±1.46*
鳖龙软肝汤低剂量组	25.97±1.31*
鳖龙软肝汤高剂量组	12.73±0.16* ^{#Δ}

3 讨论

在中医学理论中,参考 HF 向肝癌转化时的临床表现,肝癌癌前病变可归属于中医学“胁痛”“癥瘕”等范畴,其核心病机为湿热毒邪内蕴,从而导致肝络痹阻、瘀血内结,加之正气亏虚,正虚邪恋,终致疾病恶变。鳖龙软肝汤以活血化瘀、疏肝健脾为治则,全方君臣佐使配伍严谨,共奏逐瘀疏肝、健脾软坚之效。

现代医学研究表明,TGF-β1/Smad 信号通路是调控 HF 进展及肝癌发生的关键枢纽^[27-28]。该通路的激活始于 TGF-β1 与细胞膜受体结合,进而引发下游 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,还可上调 Smad2/3 总蛋白表达,二者共同促进 p-Smad2/3 与 Smad4 形成异源三聚体并入核,调控纤维化及肿瘤相关基因转录^[29-30]。这一核心事件驱动了肝星状细胞的活化与上皮-间质转化,促进 Collagen I、α-SMA 等细胞外基质过度沉积^[31-32],并通过上调 TIMP1 与 LOXL1,抑制细胞外基质降解、加速胶原交联,最终塑造了利

于 HF 及肝癌发生的微环境^[33]。

本研究通过建立 DEN 诱导的大鼠肝癌模型,深入探讨了鳖龙软肝汤能否通过调节 TGF-β1/Smad 信号通路发挥抗癌作用。研究结果显示,鳖龙软肝汤高剂量组能降低模型组大鼠的肝脏体质量比、Ishak 评分及肝脏表面癌结节数。病理组织学观察进一步证实,该方剂可显著减轻 HF 程度,改善肝组织的病理结构。在分子机制层面,中药组肝细胞中肿瘤增殖标志物 PCNA 表达下调,PCNA 在细胞 DNA 合成过程中发挥重要作用,其表达水平与细胞的增殖活性密切相关^[34-35]。PCNA 表达下调提示鳖龙软肝汤高剂量组能够抑制肝细胞的异常增殖,从而延缓肝细胞向恶性肿瘤细胞的转化进程。同时,本研究还发现,鳖龙软肝汤高剂量组可抑制 TGF-β1/Smad 通路关键分子(TGF-β1、Smad2/3、LOXL1、Collagen I、α-SMA、TIMP1)的蛋白与 mRNA 水平表达。

基于研究结果,推测鳖龙软肝汤通过以下途径发挥作用:一是阻断 TGF-β1 信号传导,抑制其与受体结合,同时下调 Smad2/3 蛋白水平,从源头遏制纤维化信号传递;二是调控细胞外基质代谢,降低 Collagen I、α-SMA 合成,帮助恢复细胞外基质降解与合成的动态平衡,其还可下调 TIMP1 的表达,减少对基质金属蛋白酶活性的抑制,进一步助力细胞外基质代谢平衡的恢复;三是抑制肝星状细胞活化,下调 α-SMA 和 LOXL1 表达,影响肝星状细胞活化核心通路;四是抑制肿瘤增殖,下调 PCNA 表达以延缓肝细胞恶性转化。

综上所述,鳖龙软肝汤可改善大鼠 HF,抑制肝癌,其作用机制可能与下调肝组织中 PCNA 及 TGF- β 1/Smad 信号通路相关分子的表达有关。然而,本研究尚存局限:未设置阳性对照药物组及完整的剂量梯度;对肝星状细胞活化的影响主要为在体证据。未来研究将补充体外肝星状细胞实验,并深入探讨其是否协同调控多条通路,以全面揭示其多靶点作用机制。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南(2024 年版)[J]. 协和医学杂志, 2024, 15(3): 532-559.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] REDDY K R, MCLERRAN D, MARSH T, et al. Incidence and risk factors for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: The multicenter hepatocellular carcinoma early detection strategy (HEDS) study[J]. Gastroenterology, 2023, 165(4): 1053-1063.e6.
- [4] 李文轩, 游丽萍, 张雨琴, 等. 中成药对原发性肝癌的治疗研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(6): 141-145.
- [5] 刘彬彬, 姜佳呈, 周 意, 等. 基于调控 METTL3 介导的 m⁶A 修饰探讨鳖龙软肝汤抑制 HBV 原发性肝癌细胞增殖、迁移的作用机理[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(6): 1370-1374.
- [6] 银思涵, 袁 维, 罗凌威, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨鳖龙软肝汤治疗肝癌的机制[J]. 中国医师杂志, 2023, 25(3): 8.
- [7] 谭华梁, 肖 麟, 李 珍. 鳖龙软肝汤对肝癌细胞增殖、凋亡及 Bcl-2/CytC 信号通路的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(4): 842-845.
- [8] 王 雅, 熊 焰, 张 涛, 等. 鳖龙软肝片抗肝纤维化临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 181-183.
- [9] 石文静, 彭 杰, 张 涛, 等. 鳖龙软肝片联合抗病毒药治疗乙型肝炎肝硬化的回顾性临床研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 473-478.
- [10] 伍玉南, 张 冬, 孙克伟. 鳖龙软肝汤联合经肝动脉化疗栓塞术治疗 HBV 相关原发性肝癌临床观察[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(11): 2152-2157.
- [11] DEWIDAR B, MEYER C, DOOLEY S, et al. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019[J]. Cells, 2019, 8(11): 1419.
- [12] DERYNCK R, BUDI E H. Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling[J]. Science Signaling, 2019, 12(570): eaav5183.
- [13] CHI C, LIANG X F, CUI T Y, et al. SKI/SnoN attenuates TGF- β 1/SMAD signaling-dependent collagen synthesis in hepatic fibrosis[J]. Biomolecules & Biomedicine, 2023, 23(6): 1014-1025.
- [14] CHEN J, GINGOLD J A, SU X P. Immunomodulatory TGF- β signaling in hepatocellular carcinoma[J]. Trends in Molecular Medicine, 2019, 25(11): 1010-1023.
- [15] GUNGOR M Z, UYSAL M, OZTURK M, et al. Systematic analysis of cytostatic TGF- β response in mesenchymal-like hepatocellular carcinoma cell lines[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer, 2021, 52(4): 1320-1335.
- [16] XIN X, CHENG X Y, ZENG F X, et al. The role of TGF- β /SMAD signaling in hepatocellular carcinoma: From mechanism to therapy and prognosis[J]. International Journal of Biological Sciences, 2024, 20(4): 1436-1451.
- [17] 雷久士, 李观林, 郭建生, 等. 鳖龙软肝片对实验大鼠肝纤维化的病理研究[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(1): 22-23.
- [18] 康海燕, 叶协琼, 唐 静, 等. 鳖甲煎丸联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎肝纤维化患者肝功能、肝纤维化指标和外周血 TGF- β 1/Smad 信号通路的影响[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(23): 4441-4445.
- [19] 周 凝, 杨 欣, 夏雪皎, 等. 疏肝健脾活血方对大鼠肝星状细胞 TGF- β 1/Smads 信号通路的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(4): 267-270.
- [20] 余 汇, 郭海彪, 林 娟, 等. 隐丹参酮通过 TGF- β 1/Smad3 信号改善小鼠急性心肌梗死后心室重构[J]. 药物评价研究, 2025, 48(1): 85-92.
- [21] 郑 洋, 卢能源, 黄永贤, 等. 基于 TGF- β 1/Smad 信号通路探讨莪术醇对肝纤维化小鼠作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 149-152, 271-272.
- [22] 张春茂, 夏结来, 王素珍, 等. 新药临床试验量效关系研究的设计与分析方法评价[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(20): 1930-1934.
- [23] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202-204.
- [24] TOLBA R, KRAUS T, LIEDTKE C, et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice[J]. Laboratory Animals, 2015, 49(1 Suppl): 59-69.
- [25] 张日云, 吴凤兰, 毛德文, 等. 三种不同剂量 DEN 诱导大鼠原发性肝癌模型的比较[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(2): 169-179.
- [26] 陈洋溢, 刘成海. 慢性肝炎病理评价分类系统的发展与未来[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 1098-1102.
- [27] 霍 亮, 骆 杨, 冯海林. 肝癌组织中 GPSM2、TGF- β 1 蛋白表达水平及临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(3): 406-410.
- [28] 陈春苗, 张国哲, 刘平平, 等. 小檗碱通过 TGF- β /Smad 通路抑制 TGF- β 1 诱导的人肝癌 HepG2 细胞上皮间质转化的研究[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(2): 261-267.
- [29] TU S, HUANG W, HUANG C H, et al. Contextual regulation of TGF- β signaling in liver cancer[J]. Cells, 2019, 8(10): 1235.
- [30] 丁晓明, 曾江琴, 黄天慧, 等. 延胡索乙素通过抑制 TGF- β 1/Smads 通路影响肝癌细胞的迁移和侵袭[J]. 中药材, 2023, 46(9): 2314-2318.
- [31] SISTO M, RIBATTI D, LISI S. Organ fibrosis and autoimmunity: The role of inflammation in TGF β -dependent EMT[J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 310.
- [32] 和梦静, 赵长普, 胡慧慧, 等. TGF- β 1/Smad 信号通路在肝纤维化中的作用机制及中医药调控研究进展[J]. 中医学报, 2024, 39(1): 114-121.
- [33] DEWIDAR B, MEYER C, DOOLEY S, et al. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019 [J]. Cells, 2019, 8(11): 1419.
- [34] 单长民, 刘同慎, 李 娟, 等. 人肝细胞癌中 PCNA 和 RAB10 水平上调 miR-224 表达下调[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2020, 29(1): 41-45.
- [35] CUI D J, WU Y, WEN D H. CD34, PCNA and CK19 expressions in AFP- hepatocellular carcinoma[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2018, 22(16): 5200-5205.