

本文引用: 伍梦思, 刘 华, 李杏瑶, 谭年花, 苏联军, 彭 杰, 陈 扬, 陈 斌. 基于 EGFR/MAPK/ERK 信号通路探讨鳖甲煎丸对 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤的抑瘤作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 227-234.

## 基于 EGFR/MAPK/ERK 信号通路探讨鳖甲煎丸对 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤的抑瘤作用

伍梦思<sup>1</sup>, 刘 华<sup>1</sup>, 李杏瑶<sup>1</sup>, 谭年花<sup>2</sup>, 苏联军<sup>2</sup>, 彭 杰<sup>1</sup>, 陈 扬<sup>1</sup>, 陈 斌<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一临床学院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

**[摘要]** **目的** 基于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号通路探讨鳖甲煎丸对 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤的抑瘤作用及作用机制。**方法** 选取 30 只雄性 BLAB/c 裸鼠, 建立 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤模型。造模成功后随机分为模型组, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组(0.55、1.1、2.2 g/kg), 西药组(乐伐替尼 4 mg/kg+吉非替尼 80 mg/kg), 每组 6 只。鳖甲煎丸低、中、高剂量组灌胃 2 次/d, 西药组每周灌胃 5 d, 模型组予以等量生理盐水 2 次/d 灌胃, 每组连续干预 2 周。观察大鼠一般情况; 计算各组大鼠抑瘤率; HE 染色观察病理形态学变化; RT-qPCR 检测瘤体组织中 EGFR、丝裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)、ERK1、ERK2 mRNA 表达水平; Western blot 检测 EGFR、磷酸化的 EGFR(p-EGFR)、MEK、磷酸化的 MEK(p-MEK)、ERK1、ERK2、磷酸化的 ERK1/2(p-ERK1/2)、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、细胞周期蛋白 D1(cell cycle protein D1, Cyclin D1)、神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)、上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)相对表达水平。**结果** 与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及西药组精神、反应、进食饮水等情况均明显改善。与第 0 天比较, 各组第 14 天体质量明显降低( $P<0.01$ )。与模型组、鳖甲煎丸低剂量组比较, 鳖甲煎丸中、高剂量组和西药组瘤体质量减轻( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。鳖甲煎丸低、中、高剂量组和西药组抑瘤率分别为 20%、47.73%、55.91%、75.45%。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组及西药组肿瘤细胞排列疏松, 边界模糊, 细胞核固缩、破裂, 其中西药组最明显。与模型组比较, 鳖甲煎丸低、中、高剂量组和西药组 EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达水平明显下降( $P<0.01$ ); 与鳖甲煎丸低剂量组比较, 鳖甲煎丸高剂量组和西药组 EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ ), 鳖甲煎丸中剂量组 ERK1 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ ); 与鳖甲煎丸中剂量组比较, 西药组 EGFR、ERK2 mRNA 表达水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与模型组比较, 鳖甲煎丸中、高剂量组和西药组 p-EGFR/EGFR、p-MEK/MEK、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白相对表达水平明显升高( $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸高剂量组比较, 西药组 p-EGFR/EGFR、p-ERK1/ERK1、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平明显下降( $P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白相对表达水平升高( $P<0.05$ )。**结论** 鳖甲煎丸可能通过抑制 EGFR/MAPK/ERK 信号通路激活, 从而下调 MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白, 上调 E-cadherin 蛋白表达, 进而对 MHCC-97H 肝癌细胞皮下瘤产生显著的抑制作用。

**[关键词]** 鳖甲煎丸; 表皮生长因子受体; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外信号调节激酶; 原发性肝癌; 活血化瘀

**[中图分类号]** R273

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.008

## Inhibitory effects of Biejiajian Pill on subcutaneous tumor of MHCC-97H hepatoma cells based on EGFR/MAPK/ERK signaling pathway

WU Mengsi<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>1</sup>, LI Yaoyao<sup>1</sup>, TAN Nianhua<sup>2</sup>, SU Lianjun<sup>2</sup>, PENG Jie<sup>1</sup>, CHEN Yang<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1\*</sup>

**[收稿日期]** 2023-10-13

**[基金项目]** 湖南省临床医学研究中心(基地)项目(2021SK4023); 湖南省自然科学基金项目(2023JJ40487); 中国博士后科学基金项目(2022M721127); 湖南中医药大学研究生创新课题项目(2022CX29)。

**[通信作者]** \* 陈 斌, 男, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: chenbin0410@qq.com。

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

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract] Objective** To investigate the inhibitory effects and their mechanism of Biejiajian Pill (BJJP) on the subcutaneous tumor of MHCC-97H hepatoma cells based on the signaling pathway of epidermal growth factor receptor (EGFR)/mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK). **Methods** A total of 30 male BLAB/c nude mice were used to establish a subcutaneous tumor model of MHCC-97H hepatoma cells. After successful modeling, they were randomized into model group, low-, medium-, and high-dose BJJP groups, and western medicine group, with six mice in each group. Low-, medium-, and high-dose BJJP groups were treated with concentrated BJJP 0.55 g/kg, 1.1 g/kg, and 2.2 g/kg, respectively, twice a day; western medicine group was administered Lenvatinib 4 mg/kg combined with Gefitinib 80 mg/kg, 5 days a week; model group was given the equal volume of normal saline; twice a day. The intervention was carried out by gavage for 14 days successively. The general condition of mice was observed, and the tumor inhibition rate of each group was calculated. HE staining was used to observe pathological and morphological changes; RT-qPCR was used to determine the mRNA expression levels of EGFR, mitogen-activated protein kinase kinase (MEK), ERK1, and ERK2 in the tumor tissue; Western blot was used to examine the relative expression levels of EGFR, phosphorylated EGFR (p-EGFR), MEK, phosphorylated MEK (p-MEK), ERK1, ERK2, phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), cell cycle protein D1 (Cyclin D1), N-cadherin, and E-cadherin. **Results** Compared with model group, the condition of spirit, reactions, and intake of food and water of mice in low-, medium-, and high-dose BJJP groups and western medicine group were improved significantly. Compared with day 0, the body weight of mice in each group was significantly lower on the 14th day, with the most obvious reduction in western medicine group ( $P<0.01$ ). Compared with model and low-dose BJJP groups, the tumor mass of mice in medium- and high-dose BJJP groups and western medicine group was significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The tumor inhibition rates of low-, medium-, and high-dose BJJP groups and western medicine group were 20%, 47.73%, 55.91%, and 75.45%, respectively. Compared with model group, the tumor cells in the low-, medium-, and high-dose BJJP groups and western medicine group were loosely arranged and the boundaries were blurred, and the cell nuclei were condensed and ruptured, especially in western medicine group. Compared with model group, the mRNA expression levels of EGFR, MEK, ERK1, and ERK2 in low-, medium-, and high-dose BJJP groups and western medicine group significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with low-dose BJJP group, the mRNA expression levels of EGFR, MEK, ERK1, and ERK2 in high-dose BJJP and western medicine groups were significantly reduced ( $P<0.01$ ), and that of ERK1 in medium-dose BJJP group was significantly lower ( $P<0.01$ ); compared with medium-dose BJJP group, the mRNA expression levels of EGFR and ERK2 in western medicine group decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with model group, medium- and high-dose BJJP groups and western medicine group showed a decrease in the relative protein expression levels of p-EGFR/EGFR, p-MEK/MEK, p-ERK1/ERK1, p-ERK2/ERK2, MMP-1, Cyclin D1, and N-cadherin ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and a significant increase in the relative protein expression level of E-cadherin ( $P<0.01$ ). Compared with high-dose BJJP group, the relative protein expression levels of p-EGFR/EGFR, p-ERK1/ERK1, MMP-1, Cyclin D1, and N-cadherin in western medicine group were significantly reduced ( $P<0.01$ ), while that of E-cadherin was elevated ( $P<0.05$ ). **Conclusion** BJJP may downregulate the protein expressions of MMP-1, Cyclin D1, and N-cadherin and upregulate that of E-cadherin by inhibiting EGFR/MAPK/ERK signaling pathway activation, thereby exerting significant inhibitory effects on the subcutaneous tumor of MHCC-97H hepatoma cells.

**[Keywords]** Biejiajian Pill; epidermal growth factor receptor; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase; primary liver cancer; circulating blood and eliminating blood stasis

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是我国最常见的消化道恶性肿瘤,起病隐匿,恶性程度高,一旦发现多已进入中、晚期,预后极差,具有生存期短、易复发、易转移、病死率高的特点<sup>[1]</sup>。肝癌的发病机制尚未完全明确,对于肝癌的西医治疗多采用肝

动脉灌注化学药物治疗(以下简称化疗)栓塞、放射治疗、消融、分子靶向治疗、免疫治疗等多种治疗方式<sup>[2-3]</sup>。在肝癌的综合治疗中,中医药治疗发挥着重要的作用,具有减毒增效、延长患者生存期、改善生活质量、减轻药物不良反应及毒性等作用<sup>[4]</sup>。

古代中医学对肝癌病名并无记载,根据肝癌发病的部位以及临床表现将其归属于中医学“癥瘕”“积聚”“肥气”“膨胀”或“胁痛”等疾病范畴<sup>[5]</sup>。历代医家经过不断临床实践,将原发性肝癌的基本病因病机归纳为“瘀、毒、虚”<sup>[6-9]</sup>。鳖甲煎丸出自《金匮要略·疟病脉证并治第四》,是治疗肝病最经典的方剂,方中诸多活血破瘀、消癥散结之品,以治标;三阳同调,佐以干姜、阿胶等扶正气、行气血、化痰浊、泄结热,以复本<sup>[10]</sup>。清代徐忠可曾言:“药用鳖甲煎者,鳖甲入肝,除邪养血,合煅灶灰浸酒去痕,故以为君;以小柴胡汤、桂枝汤及大承气汤为三阳主药,故以为臣,但甘草嫌柔缓而减药力,枳实嫌破气而直下,故去之;外加干姜、阿胶助人参养正为佐;痕必假血依痰,故以四虫合半夏消血化痰,凡积必有气结,气利则积消,故以乌扇、葶苈子利肺气,合石韦、瞿麦清气热而化气散结,血因邪聚则热,故以牡丹皮、紫葳去血中伏火、膈中实热为使”<sup>[11]</sup>。

本课题组前期通过网络药理学及分子对接分析发现,鳖甲煎丸活性成分与肝癌的核心靶点:表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)对接结合稳定<sup>[12]</sup>。其中EGFR作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(protooncogene serine/threonine-protein kinase, Raf)/丝裂原活化蛋白质激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK)/细胞外信号调节激酶(extracellular-signal-regulated kinase, ERK)信号通路的上游因子。研究证实,可通过上调EGFR的表达,从而激活Raf/MEK/MAPK信号通路诱发肝细胞癌<sup>[13]</sup>。因此,本课题组以BALB/c裸鼠作为研究对象,用鳖甲煎丸进行干预,进一步研究鳖甲煎丸是否可通过EGFR/MAPK/ERK信号通路对MHCC-97H肝癌细胞皮下瘤产生抑制作用。

## 1 材料

### 1.1 细胞和动物

肝癌细胞株MHCC-97H(中国Abiowell公司,批号:AW-CCH024);SPF级BALB/c雄性裸鼠30只,4~6周龄,体质量(20±2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SYXK(湘)2020-0010,饲养于湖南中医药大学动物实验中心。实验动物自

由进食和饮水,室温恒温20~25℃,湿度(50.0%±10.0%),每隔12小时开灯照明。本研究所设计的实验操作均遵循实验动物伦理委员会的相关规定,并接受湖南中医药大学伦理委员会的监督,伦理审批号:ZYFY20230725-36。

### 1.2 药物及主要试剂

鳖甲煎丸(国药集团中联药业有限公司,国药准字Z42020772,批号:202790,规格:3g/袋);仑伐替尼、吉非替尼(上海麦克林生化科技有限公司,批号分别为:C15327639、C14497254);DMEM培养基(美国Sigma公司,批号:D5796);胎牛血清(美国Gibco公司,批号:10099141);双抗(青链霉素)(碧云天生物技术有限公司,批号:SV30010);蛋白上样缓冲液、RIPA裂解液、山羊抗兔免疫球蛋白IgG、山羊抗鼠免疫球蛋白IgG、HE染色试剂盒(Abiowell公司,批号分别为:AWB0055、AWB0136、AWS0001、AWS0001、AW22A230813);BCA蛋白定量试剂盒(中国Abiowell公司,批号:AWB0104);mRNA逆转录试剂盒、miRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪公司,批号分别为:CW2569、CW2141);Trizol试剂(美国Thermo公司,批号:15596026);核酸染料(中国北京普利莱公司,批号:PB11141);RNA转染试剂(上海生工生物工程有限公司,批号:E607402-1000);MEK、ERK1/2、磷酸化的ERK1/2(p-ERK1/2)、EGFR、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、细胞周期蛋白D1(cell cycle protein D1, Cyclin D1)、上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)、β-actin抗体(美国proteintech公司,批号分别为:11049-1-AP、11257-1-AP、28733-1-AP、51071-2-AP、10371-2-AP、26939-1-AP、22018-1-AP、20874-1-AP、66009-1-Ig);磷酸化的MEK(p-MEK)、磷酸化的EGFR(p-EGFR)抗体(英国abcam公司,批号分别为:ab278564、ab40815)。

### 1.3 主要仪器

CO<sub>2</sub>培养箱(上海三藤仪器有限公司,型号:DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);流式细胞仪(美国Beckman公司,型号:A00-1-1102);荧光定量RCP仪、荧光PCR板(美国Thermo公司,型号:PIKOREAL96、SPL0960);台式冷冻离心机(中国湖南湘仪公司,型号:H1650R);水平琼脂糖电泳槽、电泳仪(中国北京

六一生物科技有限公司,型号分别为: DYCP-31DN、DYY-2C);化学发光成像系统(中国上海勤翔科学仪器有限公司,型号:ChemiScope6100)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

MHCC-97H 细胞置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,采用 10%胎牛血清 DMEM 培养基培养,当细胞达到 80%~90%融合度时进行常规传代。

### 2.2 模型制备

选取状态良好的 MHCC-97H 细胞,加入 1.5 mL 胰蛋白酶消化,离心,并弃上清,加入适量 RPMI1640,取 10 μL 进行计数,将细胞浓度调整为 3×10<sup>6</sup> 个/mL,用 1 mL 注射器吸取 0.2 mL 细胞悬液,75%乙醇棉球擦拭消毒后,将细胞悬液接种至裸鼠右前肢腋下,建立肝癌 MHCC-97H 细胞皮下瘤模型。接种后定期观察裸鼠皮下瘤生长情况,游标卡尺测量皮下移植瘤大小并计算体积(mm<sup>3</sup>)=长径(mm)×短径(mm)×高度(mm)。接种 7~10 d 肉眼可观察到成型的肿瘤,当肿瘤生长至直径 6 mm 时提示造模成功<sup>[14]</sup>。

### 2.3 实验分组、给药及取样

造模 10 d 左右,待皮下瘤长至 50~100 mm<sup>3</sup> 时<sup>[15]</sup>,将 30 只 SPF 级裸鼠随机分为 5 组:模型组,鳖甲煎丸低、中、高剂量组,西药组,每组 6 只。鳖甲煎丸成人临床用药 6~9 g/d,以成人 7.5 g/d 的剂量作为鳖甲煎丸中剂量组的灌胃剂量,按照 1:2:4 原则,按照人体和动物体表面积比换算<sup>[16]</sup>裸鼠需要的灌胃剂量,即鳖甲煎丸低、中、高剂量分别为:0.55、1.1、2.2 g/kg,西药组用药剂量为:乐伐替尼 4 mg/kg+吉非替尼 80 mg/kg<sup>[17]</sup>。各组按 0.01 mL/g 折算给药,模型组给予等量生理盐水 2 次/d 灌胃,鳖甲煎丸低、中、高剂量组给药 2 次/d,西药组每周给药 5 d,1 次/d,每组连续干预 2 周。末次给药后禁食过夜,水合氯醛麻醉下颈椎脱臼处死裸鼠,摘取瘤体,立即称重,一部分用 4%多聚甲醛固定,剩余部分放于-80 ℃冰箱储存备用。

### 2.4 一般情况观察

观察裸鼠的精神状态、自主活动、进食情况、二便排泄、呼吸等一般情况,并比较各组裸鼠体质量变化。

### 2.5 抑瘤率计算

末次给药后处死裸鼠,手术剥离肿瘤组织,用吸水纸吸干组织表面多余的水分,利用精密电子天平称,称取瘤体质量,并在实验记录本记录数据。计算抑瘤率=[模型组平均瘤体质量(g)-用药组平均瘤体质量(g)]/模型组平均瘤体质量(g)×100%。

### 2.6 HE 染色观察裸鼠肿瘤组织病理形态学变化

取各组裸鼠部分瘤体组织,于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋后,进行切片脱蜡,再用 HE 染色,脱水、封片,显微镜观察瘤体组织形态。

### 2.7 RT-qPCR 检测瘤体组织中 EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA 表达水平

取肿瘤组织 0.02 g,加入 1 mL Trizol 后于匀浆器中充分研磨匀浆,混匀后裂解 5 min,12 000 r/min,4 ℃,离心 15 min(离心半径 9 cm),取上层液相,转移到新的 RNase-Free 离心管中,提取总 RNA 并计算其浓度和纯度,利用反转录试剂盒反转录为 cDNA,再利用 SYBR 荧光定量试剂盒进行 PCR 扩增定量,扩增条件为:95 ℃预变性 10 min,95 ℃变性 15 s,60 ℃延伸 30 s,扩增 40 个循环。在 NCBI 上搜索目的基因的序列,运用 Primer 5 软件设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成引物,以 β-actin 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法比较分析各基因表达,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'-3')	长度/bp
EGFR	正向:CAGATAGTCGCCCAAAGTTCC	149
	反向:TTCATCCATCAGGGCACGGTA	
MEK	正向:CCCTTAGCTCATAACGGAATGGAC	239
	反向:GAGCCAACCTGC AAAATCCAC	
ERK1	正向:CATCAACATGAAGCCCGAA	155
	反向:CTTCCTCCACTGTGATCCGTT	
ERK2	正向:ATCCCCATCACAAGAAGACCTG	187
	反向:AGCCTGTTCTACTTCAATCCTCT	
β-actin	正向:ACCCTGAAGTACCCCATCGAG	224
	反向:AGCACAGCCTGGATAGCAAC	

### 2.8 Western blot 检测 EGFR/MAPK/ERK 信号通路及 MMP-1、Cyclin D1、E-cadherin、N-cadherin 的蛋白表达水平

剪取 0.025 g 瘤体组织,用冰预冷 PBS 洗组织,加入 300 μL RIPA 裂解液于生物样品均质仪中反复研磨组织至无组织块,置于冰上裂解 10 min 至组织完

表2 各组裸鼠给药前后体质量比较( $\bar{x}\pm s, n=6, g$ )

组别	第0天	第7天	第14天
模型组	24.49±1.00	23.62±0.63	22.20±0.98 <sup>△△</sup>
鳖甲煎丸低剂量组	24.30±0.86	22.92±0.49	21.21±1.22 <sup>△△</sup>
鳖甲煎丸中剂量组	24.32±0.74	23.38±0.81	21.88±1.02 <sup>△△</sup>
鳖甲煎丸高剂量组	24.47±0.61	23.40±0.75	21.62±0.98 <sup>△△■</sup>
西药组	24.46±0.95	18.72±0.68 <sup>***##▲▲△△</sup>	17.72±0.89 <sup>***##▲▲△△</sup>
F值	0.07	55.81	19.16
P值	0.99	<0.01	<0.01

注:与模型组比较,\*\* $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸低剂量组比较,## $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸中剂量组比较,△△ $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸高剂量组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与第0天比较,△△ $P<0.01$ ;与第7天比较,■ $P<0.05$ 。

全裂解。将离心机提前预冷至4℃,离心15 min(离心半径9 cm)12 000 r/min,取上清进行电泳分离后,将蛋白质转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭90 min,加入按一定比例稀释的一抗(MEK为1:5 000;p-MEK为1:1 000;ERK1/2为1:2 000;p-ERK1/2为1:1 000;EGFR为1:1 500;p-EGFR为1:500;MMP-1为1:1 000;Cyclin D1为1:5 000;N-cadherin为1:2 000;E-cadherin为1:20 000;β-actin为1:5 000),4℃孵育过夜,PBST洗膜3次,加入二抗(HRP山羊抗鼠IgG为1:5 000;HRP山羊抗兔IgG为1:5 000),PBST洗3次,ECL化学发光,曝光拍照保存,凝胶成像系统成像进行读片分析。

## 2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0统计分析,符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组裸鼠一般情况比较

药物干预治疗后,各组裸鼠均出现不同程度的体质量减轻,精神欠佳,活动减少,反应迟钝,进食、饮水减少。与模型组比较,鳖甲煎丸低、中、高剂量组及西药组精神、反应、进食及饮水等情况均明显改善。

### 3.2 各组裸鼠体质量比较

药物治疗前,各组裸鼠体质量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与第0天比较,西药组第7天、第14天体质量明显降低( $P<0.01$ ),模型组和鳖甲煎丸低、中、高剂量组第14天体质量明显降低( $P<0.01$ );与第7天比较,鳖甲煎丸高剂量组第14天体质量降低( $P<0.05$ )。与模型组和鳖甲煎丸低、中、高剂量组比较,西药组第7天、第14天体质量明显降低( $P<0.01$ )。详见表2。

### 3.3 各组裸鼠瘤体质量和抑瘤率的比较

与模型组、鳖甲煎丸低剂量组比较,鳖甲煎丸中、高剂量组和西药组瘤体质量减轻( $P<0.05, P<0.01$ )。鳖甲煎丸低、中、高剂量组和西药组抑瘤率分别为20.00%、47.73%、55.91%、75.45%。详见表3。

表3 各组裸鼠瘤体质量的比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	瘤体质量/g	抑瘤率/%
模型组	0.73±0.07	—
鳖甲煎丸低剂量组	0.59±0.17	20.00
鳖甲煎丸中剂量组	0.38±0.07 <sup>***</sup>	47.73
鳖甲煎丸高剂量组	0.32±0.17 <sup>***</sup>	55.91
西药组	0.18±0.08 <sup>***</sup>	75.45
F值	9.48	—
P值	<0.001	—

注:与模型组比较,\*\* $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸低剂量组比较,\* $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。

### 3.4 各组裸鼠瘤体组织病理学比较

模型组肿瘤细胞排列紧密,细胞核大,染色较深,出血坏死较少;与模型组比较,鳖甲煎丸低、中、高剂量组及西药组肿瘤细胞排列疏松,边界模糊,细胞核固缩、破裂,其中西药组最明显。详见图1。

### 3.5 各组裸鼠肿瘤组织内EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA表达水平比较

与模型组比较,鳖甲煎丸低、中、高剂量组和西药组EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA表达水平明显下降( $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸低剂量组比较,鳖甲煎丸高剂量组和西药组EGFR、MEK、ERK1、ERK2 mRNA表达水平显著降低( $P<0.01$ )。鳖甲煎丸中剂量组ERK1 mRNA表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸中剂量组比较,西药组EGFR、ERK2 mRNA表达水平降低( $P<0.05, P<0.01$ )。详见表4。

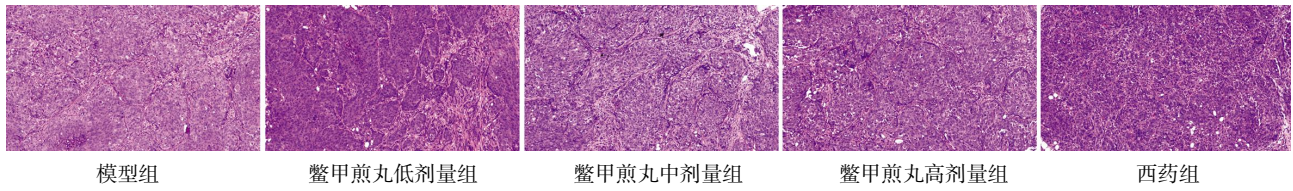


图 1 各组瘤体组织病理学观察(HE,×200)

注:A.模型组;B.鳖甲煎丸低剂量组;C.鳖甲煎丸中剂量组;D.鳖甲煎丸高剂量组;E.西药组。

表 4 各组裸鼠肿瘤组织内 EGFR、MEK、ERK1/2 mRNA 表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	EGFR	MEK	ERK1	ERK2
模型组	0.97±0.13	1.22±0.31	1.01±0.10	1.10±0.12
鳖甲煎丸低剂量组	0.38±0.04**	0.63±0.09**	0.47±0.10**	0.48±0.14**
鳖甲煎丸中剂量组	0.24±0.02**	0.36±0.04**	0.21±0.06** <sup>##</sup>	0.31±0.07**
鳖甲煎丸高剂量组	0.11±0.03** <sup>##</sup>	0.18±0.04** <sup>##</sup>	0.14±0.04** <sup>##</sup>	0.12±0.03** <sup>##</sup>
西药组	0.07±0.01** <sup>##</sup>	0.11±0.02** <sup>##</sup>	0.09±0.01** <sup>##</sup>	0.07±0.02** <sup>##</sup>
F 值	124.20	43.13	133.70	101.50
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与模型组比较,\*\* $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸低剂量组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸中剂量组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ 。表 5 各组裸鼠肿瘤组织内 EGFR/MAPK/ERK 信号通路及 MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin、E-cadherin 蛋白相对表达水平比较( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	p-EGFR/EGFR	p-MEK/MEK	p-ERK1/ERK1	p-ERK2/ERK2	MMP-1	Cyclin D1	N-cadherin	E-cadherin
模型组	0.82±0.06	0.75±0.13	0.83±0.03	0.85±0.10	0.56±0.04	0.41±0.01	0.43±0.01	0.08±0.02
鳖甲煎丸低剂量组	0.63±0.06*	0.55±0.10	0.63±0.03**	0.59±0.09*	0.45±0.03*	0.32±0.01*	0.35±0.03*	0.23±0.03**
鳖甲煎丸中剂量组	0.43±0.03** <sup>##</sup>	0.38±0.06**	0.45±0.07** <sup>##</sup>	0.36±0.11** <sup>##</sup>	0.31±0.02** <sup>##</sup>	0.22±0.04** <sup>##</sup>	0.24±0.04** <sup>##</sup>	0.24±0.04**
鳖甲煎丸高剂量组	0.41±0.09** <sup>##</sup>	0.37±0.08**	0.37±0.09** <sup>##</sup>	0.31±0.06** <sup>##</sup>	0.32±0.04** <sup>##</sup>	0.21±0.04** <sup>##</sup>	0.22±0.03** <sup>##</sup>	0.34±0.04** <sup>##</sup>
西药组	0.17±0.03** <sup>##</sup> ▲▲	0.16±0.03** <sup>##</sup>	0.17±0.02** <sup>##</sup> ▲▲	0.16±0.05** <sup>##</sup>	0.13±0.04** <sup>##</sup> ▲▲	0.06±0.01** <sup>##</sup> ▲▲	0.11±0.04** <sup>##</sup> ▲▲	0.45±0.03** <sup>##</sup> ▲▲
F 值	50.85	19.48	64.01	29.55	64.86	69.50	51.72	49.14
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸低剂量组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸中剂量组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与鳖甲煎丸高剂量组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ 。

### 3.6 各组裸鼠肿瘤组织内 EGFR/MAPK/ERK 信号通路及 MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin、E-cadherin 蛋白相对表达水平比较

与模型组比较,鳖甲煎丸中、高剂量组和西药组 p-MEK/MEK 蛋白相对表达水平明显下降( $P<0.01$ );鳖甲煎丸低、中、高剂量组和西药组 p-EGFR/EGFR、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平下降( $P<0.05, P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白相对表达水平明显升高( $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸低剂量组比较,西药组 p-MEK/MEK 蛋白相对表达水平明显下降( $P<0.01$ ),鳖甲煎丸高剂量组和西药组 E-cadherin 蛋白相对表达水平升高( $P<0.05, P<0.01$ ),鳖甲煎丸中、高剂量组和西药组 p-EGFR/EGFR、p-ERK1/ERK1、p-ERK2/ERK2、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平下降( $P<$

0.05,  $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸中剂量组比较,鳖甲煎丸高剂量组和西药组 E-cadherin 蛋白相对表达水平升高( $P<0.05, P<0.01$ ),西药组 p-EGFR/EGFR、p-ERK1/ERK1、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平明显下降( $P<0.01$ )。与鳖甲煎丸高剂量组比较,西药组 p-EGFR/EGFR、p-ERK1/ERK1、MMP-1、Cyclin D1、N-cadherin 蛋白相对表达水平明显下降( $P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白相对表达水平升高( $P<0.05$ )。详见表 5、图 2。

## 4 讨论

肝癌的发病机制由多种分子机制驱动,其中 MAPK/ERK 是肝癌发展中最关键的通路<sup>[7]</sup>。Raf/MEK/ERK 信号通路作为 MAPK 信号通路的关键通路,在各种潜在致癌因素的刺激下,如表皮生长因子(epidermal

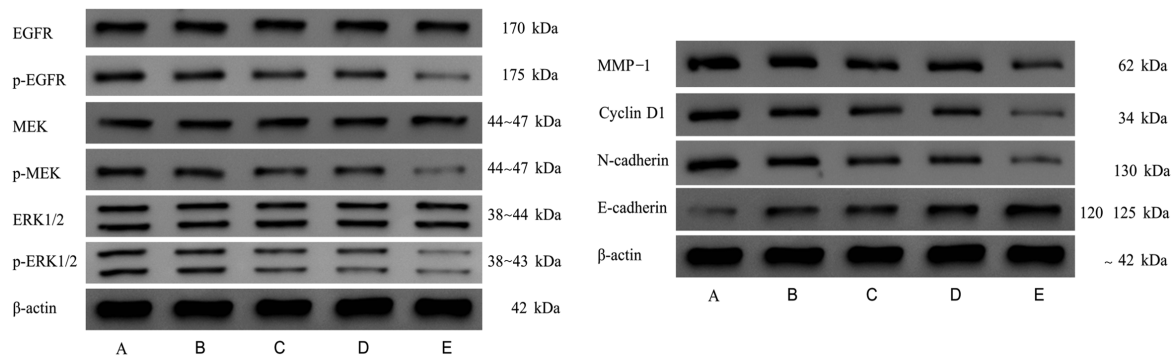


图2 各组肿瘤组织各蛋白表达水平比较

注:A.模型组;B.鳖甲煎丸低剂量组;C.鳖甲煎丸中剂量组;D.鳖甲煎丸高剂量组;E.西药组。

growth factor, EGF)和转化生长因子 $\alpha$ (transforming growth factor- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ )与EGFR结合,EGFR作为Raf/MEK/ERK通路的关键上游因子,进而触发下游的MAPK/ERK信号通路,诱导肝癌的发生<sup>[13]</sup>。研究表明,部分肝癌晚期患者在服用乐伐替尼后出现EGFR激活,刺激下游的MEK/ERK信号通路,刺激癌细胞分离,出现耐药现象<sup>[18]</sup>。在体内和体外试验中,通过敲除EGFR提高了肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性,将乐伐替尼与EGFR抑制剂(如吉非替尼)合用后,明显抑制肝癌细胞的增殖、促进凋亡<sup>[18]</sup>。在临床实验中,对服用乐伐替尼无效同时EGFR高表达的30名肝癌晚期患者展开乐伐替尼与吉非替尼联合治疗研究,有半数以上患者的肿瘤明显缩小,明显改善了乐伐替尼的耐药情况,提高了乐伐替尼的疗效,可能与乐伐替尼和吉非替尼阻断EGFR介导的MAPK/ERK信号通路相关<sup>[18]</sup>。

张仲景创立的鳖甲煎丸在治疗肝病尤其是肝癌的过程中充当重要角色,该方攻补兼施、寒热并用、气血津液共治,诸法兼备,实乃消癥化积之良剂<sup>[10]</sup>。根据现代药理研究,鳖甲煎丸具有提高免疫力、抗肿瘤、抗纤维化等作用<sup>[19]</sup>。同时有大量研究表明,鳖甲煎丸可促进肿瘤细胞凋亡,调控细胞周期,抑制细胞增殖,抗肿瘤血管生成,抑制炎症因子,改善炎症反应、核因子 $\kappa$ B、血小板衍生生长因子 $\beta$ 受体等多种信号通路等<sup>[20-23]</sup>。

本实验发现,药物干预治疗7、14 d后,与模型组、鳖甲煎丸低剂量组比较,鳖甲煎丸中、高剂量组瘤体质量与西药组的肿瘤增长缓慢,抑制肿瘤增长效果明显。同时,与模型组相比,各治疗组裸鼠精神、进食、活动等一般情况较好,鳖甲煎丸各剂量组裸鼠

体质量无明显差异,但西药组裸鼠体质量明显减轻,可能与乐伐替尼与吉非替尼两种化疗药物合用有关。化疗药物虽然能够明显抑制瘤体生长,抗癌作用显著,但都存在一定的胃肠道不良反应及肝功能损害。这也暗示着鳖甲煎丸相比化疗药物在抑制肿瘤方面能力相当,但对机体的损害更低,体现了中医药在治疗肿瘤方面有明显改善生活质量、减轻副作用等优势。治疗结束后,鳖甲煎丸各组随剂量增加,肿瘤细胞破裂坏死越明显。进一步研究鳖甲煎丸对MHCC-97H肝癌细胞MAPK/ERK信号通路的调控作用,相比模型组,鳖甲煎丸各剂量组与西药组明显下调EGFR、MEK、ERK1/2 mRNA表达水平。同时,鳖甲煎丸中、高剂量组与西药组显著抑制EGFR、MEK、ERK1/2磷酸化的激活,且不同程度下调MMP-1及Cyclin D1的蛋白表达。MMP-1是与细胞外基质多种组分降解相关的内肽酶,在肿瘤侵袭与转移中发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。Cyclin D1是与肿瘤直接相关的癌基因,其过度表达与肿瘤的增殖密切相关<sup>[25]</sup>。此外,本实验还发现鳖甲煎丸可以上调E-cadherin,下调N-cadherin的蛋白表达,E-cadherin和N-cadherin是上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的标志物。EMT是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,与癌细胞的转移密切相关,抑制或者阻断EMT的发生,可抑制肿瘤的发生发展<sup>[26]</sup>。

综上所述,本实验研究发现,鳖甲煎丸可能通过抑制EGFR/MAPK/ERK信号通路的激活,下调下游MMP-1、Cyclin D1蛋白的表达,同时抑制EMT发生,为鳖甲煎丸治疗肝癌提供了科学理论依据。因此,鳖甲煎丸抗肝癌的机制有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 中华医学会外科学分会脾及门静脉高压外科学组. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 中华外科杂志, 2022, 60(4): 273-309.
- [2] GANESAN P, KULIK L M. Hepatocellular carcinoma: New developments[J]. Clinics in Liver Disease, 2023, 27(1): 85-102.
- [3] ZHOU H Y, SONG T Q. Conversion therapy and maintenance therapy for primary hepatocellular carcinoma[J]. Bioscience Trends, 2021, 15(3): 155-160.
- [4] 林小林, 唐林, 陈宝贵. 原发性肝癌的中医药治疗研究进展[J]. 江西中医药, 2021, 52(6): 77-80.
- [5] 熊雨. 原发性肝癌中医理论及临床研究进展[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [6] 陈琳, 唐蔚, 潘博, 等. 潘敏求治疗肝癌经验[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(12): 15-17.
- [7] 孔怡琳, 张玉佩. 肝癌“瘀毒”病机与肠道微环境关系刍议[J]. 中国医药指南, 2022, 20(21): 113-116.
- [8] 孙敏, 李菁, 林丽珠. 林丽珠教授运用“肝肾同源”理论治疗中晚期肝癌经验撷菁[J]. 中国药业, 2019, 28(21): 5-8.
- [9] 王琦, 周胜强, 刘芳, 等. 刘祖贻扶正三法治疗肝癌经验[J]. 中医杂志, 2019, 60(13): 1099-1101.
- [10] 曹方, 杨福双, 钱婷婷, 等. 鳖甲煎丸三阳同调治疗肿瘤思路探析[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2796-2798.
- [11] 张仲景撰, 徐彬注. 金匮要略论注[M]. 上海: 上海古籍出版社, 1991: 56.
- [12] 罗倩, 苏联军, 张林子, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨鳖甲煎丸抗肝癌的作用机制[J]. 中国中医药图书情报杂志, 2023, 47(5): 11-17.
- [13] 段昆朋, 高超, 左彦波, 等. 长链非编码 RNA LINC00978 通过调控 MAPK 信号通路对肝癌细胞的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2019, 48(4): 432-436.
- [14] 邵范雷, 陈秋平, 毕倩, 等. 鳖甲煎丸调控 lncRNA SNHG5/miRNA-26a-5p/GSK-3 $\beta$  信号轴干预原发性肝癌的作用机制[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-9[2024-01-12]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230730>.
- [15] 于笑笑, 李曼, 马利节, 等. 基于 AKT 信号通路探讨鳖甲煎丸诱导 H22 肝癌细胞皮下瘤细胞凋亡的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4449-4453.
- [16] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [17] DEGIRMENCI U, WANG M, HU J C. Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy[J]. Cells, 2020, 9(1): 198.
- [18] JIN H J, SHI Y P, LV Y Y, et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. Nature, 2021, 595: 730-734.
- [19] 朱燃培, 张华, 李小青, 等. 鳖甲煎丸抗肝癌的作用机制和临床研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(18): 267-276.
- [20] 李明芬, 潘爱萍, 林英辉, 等. 鳖甲煎丸含药血清抑制肝癌细胞的 miRNA-mRNA 调控机制分析[J]. 中成药, 2021, 43(6): 1437-1444.
- [21] 孙阳, 陶雪莲, 解颖, 等. 鳖甲煎丸含药血清对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中成药, 2019, 41(11): 2757-2760.
- [22] 冯明辉, 贺松其, 黄松泽, 等. 鳖甲煎丸对二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝癌的抑制作用及机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(8): 1148-1154.
- [23] CHEN W C, YANG X M, SUN J L, et al. Biejiajian pill inhibits progression of hepatocellular carcinoma by downregulating PDGFR $\beta$  signaling in cancer-associated fibroblasts[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 301: 115825.
- [24] 文键, 王华桥, 杨斌, 等. 基质金属蛋白酶 1 在肝癌组织的表达及其与迁移、侵袭的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(3): 534-536.
- [25] WANG C, JIANG X X, LI X N, et al. Long noncoding RNA HULC accelerates the growth of human liver cancer stem cells by upregulating CyclinD1 through miR675-PKM2 pathway via autophagy[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1): 8.
- [26] GERBER T S, RIDDER D A, SCHINDELDECKER M, et al. Constitutive occurrence of E: N-cadherin heterodimers in adherens junctions of hepatocytes and derived tumors[J]. Cells, 2022, 11(16): 2507.

(本文编辑 田梦妍)