

· 肝脏肿瘤 ·

DOI: 10.12449/JCH250216

鳖甲煎丸调控 AKT/mTOR 信号通路在肝癌细胞有氧糖酵解中的作用

谭钦文¹, 黄晶晶^{2,3}, 钟瑞熙¹, 杜沅沁¹, 徐健¹, 农金丽¹, 彭玉姣¹

1 广西中医药大学研究生院, 南宁 530023

2 广西中医药大学第一附属医院脾胃肝病科, 南宁 530023

3 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530023

通信作者: 黄晶晶, 55869563@qq.com (ORCID: 0000-0002-4932-0838)

摘要: 目的 利用细胞实验探索鳖甲煎丸对肝细胞癌增殖、迁移及有氧糖酵解的抑制作用,并探索其内在机制。方法 选取人肝癌细胞株(Huh7)作为研究对象,随机将SD大鼠分为空白血清组、鳖甲煎丸高、中、低剂量组及抑制剂组,制备含药大鼠血清,用以孵育Huh7细胞。CCK-8、划痕实验探索鳖甲煎丸对肝癌细胞的增殖、迁移的影响,糖酵解限速酶及代谢产物检测探索鳖甲煎丸对肝癌细胞有氧糖酵解的影响,RT-qPCR、Western Blot实验探索鳖甲煎丸对AKT/mTOR信号通路的mRNA、相关蛋白及磷酸化的表达。多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*或Dunnettg T3检验。结果 与空白血清组相比,鳖甲煎丸组的OD值、不同时间段的迁移率、糖酵解限速酶(己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶)及糖酵解代谢产物(丙酮酸、乳酸、ATP)检测均显著降低(P 值均 <0.05);RT-qPCR结果显示,与空白血清组比较,鳖甲煎丸高、中、低剂量组的mTOR mRNA表达水平均下调,高、低剂量组的AKT mRNA表达水平下调(P 值均 <0.05);Western Blot结果显示,与空白血清组比较,鳖甲煎丸高、中、低剂量组的mTOR相关蛋白及磷酸化蛋白表达水平均下调,高、中剂量组的AKT相关蛋白及磷酸化蛋白表达水平均下调(P 值均 <0.05)。结论 初步验证了鳖甲煎丸含药血清可以抑制人肝癌细胞Huh7细胞的有氧糖酵解,从而抑制其增殖、迁移,其机制可能与抑制AKT/mTOR信号通路的相关蛋白表达有关。

关键词: 鳖甲煎丸; 肝肿瘤, 实验性; 瓦尔堡效应, 肿瘤学**基金项目:** 广西自然科学基金(2022GXNSFAA035460, 2024GXNSFDA010005); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2023395, YCSY2023021); 广西中医药大学引进博士科研启动基金项目(2022BS026)

Effect of Biejia Decoction Pill on aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway

TAN Qinwen¹, HUANG Jingjing^{2,3}, ZHONG Ruixi¹, DU Yuanqin¹, XU Jian¹, NONG Jinli¹, PENG Yujiao¹

1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Department of Spleen, Stomach and Hepatology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530023, China

Corresponding author: HUANG Jingjing, 55869563@qq.com (ORCID: 0000-0002-4932-0838)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Biejia Decoction Pill on the proliferation, migration, and aerobic glycolysis of hepatocellular carcinoma (HCC) using cell experiments, as well as related mechanisms. **Methods** Human liver cancer cell line Huh7 was selected, and Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank serum group, inhibitor group, and high-, middle-, and low-dose Biejia Decoction Pill groups. Rat serum containing the drug was prepared for the incubation of Huh7 cells. CCK8 assay and scratch assay were used to explore the effect of Biejia Decoction Pill on the proliferation and migration of

HCC cells; glycolytic rate-limiting enzymes and metabolites were measured to explore the effect of Biejia Decoction Pill on aerobic glycolysis of liver cancer cells; RT-qPCR and Western blot were used to explore the effect of Biejia Decoction Pill on the mRNA expression, related proteins, and phosphorylation of the protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. A one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, and the least significant difference *t*-test or the Dunnett's T3 test were used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the blank serum group, the Biejia Decoction Pill groups had significant reductions in OD value, migration rate during different periods of time, glycolytic rate-limiting enzymes (hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase), and glycolytic metabolites (pyruvate, lactic acid, ATP) (all $P < 0.05$). RT-qPCR results showed that compared with the blank serum group, the high-, middle-, and low-dose Biejia Decoction Pill groups had a significant reduction in the mRNA expression level of mTOR, and the high- and low-dose Biejia Decoction Pill groups had a significant reduction in the mRNA expression level of AKT (all $P < 0.05$). Western blot results showed that compared with the blank serum group, the high-, middle-, and low-dose Biejia Decoction Pill groups had significant reductions in the expression levels of mTOR-related proteins and phosphorylated proteins, and the high- and middle-dose Biejia Decoction Pill groups had significant reductions in the expression levels of AKT-related proteins and phosphorylated proteins (all $P < 0.05$). **Conclusion** This study preliminarily verifies that the serum containing Biejia Decoction Pill can inhibit the aerobic glycolysis of human hepatoma Huh7 cells, thereby inhibiting their proliferation and migration, possibly by inhibiting the expression of the proteins related to the AKT/mTOR signaling pathway.

Key words: Bie Jia Jian Wan; Liver Neoplasms, Experimental; Warburg Effect, Oncologic

Research funding: Guangxi Natural Science Foundation (2022GXNSFAA035460, 2024GXNSFDA010005); Guangxi Graduate Education Innovation Program (YCSW2023395, YCSY2023021); Guangxi University of Traditional Chinese Medicine Introduction of Doctoral Research Fund Project (2022BS026)

肝脏是人体代谢中心,是糖代谢重要的场所。正常细胞在有氧条件下,主要通过线粒体氧化磷酸化获得能量;而无氧环境下,细胞会在己糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的催化下,产生丙酮酸、乳酸、ATP等代谢产物,为细胞提供能量。“瓦伯格”效应指出,癌细胞在有氧情况下也依赖糖酵解提供能量,有氧糖酵解是肝癌细胞代谢的主要方式之一。中医认为,肝癌具有寒热错杂、虚实夹杂的特点,治疗上以扶正固本、活血化瘀、解毒散结为原则。鳖甲煎丸是中医经典方剂,具有调节寒热,补益气血、活血散瘀、解毒散结的功效。现代研究^[1]也表明,鳖甲煎丸可抑制肝癌的发生、发展,且具有确切的临床疗效,是目前常用的抗癌方剂,但其抗癌内在机制尚未有统一的说法。蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路是细胞内信号通路之一,肿瘤的发生发展过程中,具有调节癌细胞周期、增殖、凋亡、代谢、炎症以及血管生存等作用^[2-4]。基于此,本研究探讨鳖甲煎丸是否通过调控AKT/mTOR通路,参与干预肝癌细胞有氧糖酵解,从而发挥抑制肝癌细胞增殖、迁移的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 本实验使用人肝癌细胞株(Huh7),购买于武汉普诺赛生命科技有限公司,细胞货号:CL-0120。

1.1.2 实验用药 项目组采用鳖甲煎丸中成药(武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字号:Z42020772,产品批号:211970,3 g/袋),鳖甲煎丸:鳖甲、乌扇、黄芩、柴胡、鼠妇、干姜、大黄、芍药、桂枝、葶苈、石苇、厚朴、牡丹、瞿麦、紫葳、半夏、人参、土鳖虫、阿胶、蜂巢、赤硝、蜣螂、桃仁。

1.1.3 实验动物 32只SD大鼠,体质量为(180±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SYXK(湘)2019-0001,使用许可证编号:SYXK桂2019-0001,在广西中医药大学SPF级动物房内常规饲养,饲养环境:22℃,自由进食、饮水,适应性喂养7天后进行相关实验。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 2-Deoxy-D-glucose(货号:HY-13966, MCE)、Huh-7细胞专用培养基(货号:CM-0120,普诺赛)、CCK-8细胞增殖试剂盒(货号:C6005M,UElandy)、HK试剂盒(货号:A077-3,南京建成)、PFK活性测定试

剂盒(货号:A129-1-1,南京建成)、PK活性检测试剂盒(货号:BC0540,Solarbio)、ATP含量检测试剂盒(货号:BC0300,Solarbio)、高效RIPA组织/细胞裂解液(货号:ZJ102L,Solarbio)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:ZJ102,雅酶)、丙酮酸试剂盒(货号:A081-1-1,南京建成)、乳酸试剂盒(货号:A019-2-1,南京建成)、细胞/动物组织/植物组织RNA提取试剂盒(货号:A077-3,Solarbio)、AKT抗体(兔多抗)(货号:AA326,碧云天)、mTOR兔单抗(货号:AF1648,碧云天)、p-AKT抗体(货号:PAB43158-P,Bioswamp)、p-mTOR抗体(货号:AF3308,Affinity)、MonAmp™ SYBR® Green qPCR Mix(货号:MQ10301S,Uelandy)。

1.2.2 主要仪器 非接触式超声波细胞粉碎机(型号:SCIENTZ08-III,宁波新芝生物科技股份有限公司)、紫外分光光度计(型号:UV-2600,岛津仪器公司)、全波长酶标仪(型号:Epoch,Biotek)、荧光定量PCR仪(型号:Roche,LightCycler®96)、生物分析仪(型号:Agilent 5400,Agilent Technologies Co Ltd)、PCR仪(型号:T100PCR,Bio-Rad)、凝胶成像系统(型号:Tanon 5200,上海天能)。

1.3 实验方法

1.3.1 含药血清的制备 将32只SD大鼠随机分为空白血清组(对照)、鳖甲煎丸高、中、低剂量组,每组8只大鼠,鳖甲煎丸组根据成人(60 kg)的临床剂量来换算,从而得到大鼠(250 g/只)的鳖甲煎丸用药剂量为1.1 g/kg(此设为中剂量组),高、低剂量组分别为中剂量组的2、0.5倍,即分别为2.2、0.55 g/kg,空白血清组以生理盐水代替药物,各组灌胃2次/d,连续给药3 d。第4天,禁食禁水12 h,给药1次,并在给药1 h后予2%戊巴比妥钠(0.01 mL/g)腹部麻醉,麻醉满意后行腹主动脉采血,室温静置2 h,3 000 r/min离心,56 °C、30 min灭活,0.22 μm滤膜过滤,得到含药血清保存于-80 °C冰箱中,用于后续细胞实验。

1.3.2 抑制剂的制备及使用 抑制剂组使用5 μmol/L的MK-2206直接加入细胞培养液进行直接干预。

1.3.3 细胞培养及分组 Huh7细胞均采用Huh-7细胞专用培养基培养,待细胞贴壁且生长密度达到80%~90%时,分别加入空白血清组血清(20%)、鳖甲煎丸低剂量组血清(20%)、鳖甲煎丸中剂量组血清(20%)、鳖甲煎丸高剂量组血清(20%)以及含有MK-2206的Huh-7细胞培养液。

1.3.4 CCK-8检测细胞的增殖情况 各组以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到96个孔中,分别加入100 μL含药

培养液,药物干预24 h后,加入CCK-8试剂10 μL,后将96孔板放于37 °C、5% CO₂培养箱中培养2 h,于酶标仪上检测450 nm吸光度时每孔的OD值。

1.3.5 划痕实验检测细胞的迁移能力 按照密度 8×10^5 /孔接种于6孔板中,用10 μL枪头在直尺辅助下进行划痕。分别加入2 mL含药培养液进行药物干预。显微镜下观察细胞迁移情况,在0、24、48 h时进行拍照记录,随后用Image J软件进行图片处理计算划痕面积。

1.3.6 糖酵解激酶(HK、PFK、PK)活性测定 药物干预后,使用细胞刮刀将各组细胞收集到离心管中,并用超声波进行破碎(采用冰浴,功率为20%,超声波持续3 s,间隔10 s,重复30次),根据每个试剂盒的说明书,对样本进行操作和计算,并对各组细胞蛋白(HK、PFK、PK)浓度进行测定,随后进行归一化处理。

1.3.7 糖酵解代谢产物(丙酮酸、乳酸、ATP)水平测定 药物干预后,分别按照说明书要求收集各组细胞及上清液,利用酶标仪及紫外分光光度计进行检测,并根据说明书提示计算丙酮酸、乳酸含量及ATP水平,同时测定各组细胞蛋白浓度进行归一化处理。

1.3.8 RT-qPCR检测 按照试剂盒说明书的方法,利用双离心柱法提取RNA并进行逆转录。RT-qPCR检测,引物设计,AKT:正向引物5'-CCATCACACCACCTGACCAA-3',反向引物5'-CGAGTAGGAGAAGCTGGGGGA-3',扩增产物大小为83 bp。mTOR正向引物5'-CGCGGAATATTAAGGAAACT-3',反向引物5'-CAGGACGCTCACATTGCTAG A-3',扩增产物大小为:113 bp。GAPDH:正向引物5'-GG AAGCTTGTTCATCAATGGAAATC-3',反向引物5'-TGATGACCCCTTTGGCTCCC-3',扩增产物大小为:168 bp。使用MonAmp™ SYBR® Green qPCR Mix试剂盒对合成的基因进行扩增,检测AKT、mTOR的基因表达,以GAPDH作为内部对照。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组与对照组中基因的倍数关系。

1.3.9 Western Blot检测 使用高效RIPA细胞裂解液对细胞进行裂解,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定。凝胶电泳后,湿转到PVDF膜上,室温孵育二抗2 h,TBST洗膜,滴加ECL发光液,使用发光成像系统进行成像并拍照,以GAPDH为内参,计算蛋白相对表达。

1.4 统计学方法 使用SPSS 27.0软件,并利用GraphPad Prism 8设计相应的图像。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,进一步两两比较若方差齐采用LSD-*t*检验,不齐则用Dunnett T3检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鳖甲煎丸对肝癌细胞增殖的影响 与空白血清组相比,鳖甲煎丸高、中、低剂量组的OD值均降低(P 值均 <0.05)(表1),药物浓度越大,OD值越低。

表1 各组细胞OD值检测结果
Table 1 Test results of cell OD value in each group

组别	细胞增殖(OD值)
空白血清组	2.07±0.02
低剂量组	1.55±0.05 ¹⁾
中剂量组	1.22±0.08 ¹⁾
高剂量组	1.13±0.04 ¹⁾
抑制剂组	0.90±0.05 ¹⁾
F 值	332.81
P 值	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

2.2 鳖甲煎丸对肝癌细胞迁移的影响 药物干预24、48 h后,鳖甲煎丸高、中、低剂量组迁移率均低于空白血清组(P 值均 <0.05)(图1、表2),浓度越大,迁移率越低。

2.3 鳖甲煎丸对肝癌细胞糖酵解限速酶活性的影响 利用糖酵解激酶试剂盒对HK、PFK、PK这3个限速酶进行检测,结果显示:与空白血清组相比,鳖甲煎丸高、中、低剂量组的3个限速酶活性均降低(P 值均 <0.05)(表3)。

2.4 鳖甲煎丸对肝癌细胞糖酵解代谢产物的影响 利用乳酸、丙酮酸、ATP试剂盒对药物干预后的代谢产物含量进行检测,结果提示:与空白血清组相比,鳖甲煎丸高、中、低剂量组的乳酸、丙酮酸、ATP含量均减少(P 值均 <0.05)(表4)。

表2 各组细胞24、48 h的迁移率比较

Table 2 Comparison of 24 h and 48 h mobility of cells in each group

组别	24 h 迁移率	48 h 迁移率
空白血清组	0.385±0.017	0.891±0.009
低剂量组	0.311±0.024 ¹⁾	0.850±0.005 ¹⁾
中剂量组	0.301±0.025 ¹⁾	0.774±0.016 ¹⁾
高剂量组	0.129±0.025 ¹⁾	0.740±0.021 ¹⁾
抑制剂组	0.059±0.035 ¹⁾	0.677±0.005 ¹⁾
F 值	83.60	137.73
P 值	<0.001	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

表3 各组细胞糖酵解限速酶活性

Table 3 Cell glycolytic rate-limiting enzyme activities in each group

组别	HK 活性 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PFK 活性 (U/mg)	PK 活性 (U/mg)
空白血清组	13.62±0.42	36.43±2.02	628.57±23.98
低剂量组	12.29±0.69 ¹⁾	35.16±0.43 ¹⁾	582.52±21.60 ¹⁾
中剂量组	8.39±0.58 ¹⁾	26.22±0.98 ¹⁾	525.14±5.21 ¹⁾
高剂量组	10.23±0.82 ¹⁾	28.56±0.49 ¹⁾	527.28±13.36 ¹⁾
抑制剂组	5.43±0.58 ¹⁾	21.75±0.12 ¹⁾	472.42±24.12 ¹⁾
F 值	78.78	98.75	29.41
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

2.5 鳖甲煎丸含药血清对AKT、mTOR的mRNA表达的影响 如表5所示,鳖甲煎丸高、低剂量组AKT的mRNA表达均低于空白血清组(P 值均 <0.05),中剂量组与空白血清组比较没有明显差异($P>0.05$)。鳖甲煎丸高、中、低剂量组mTOR的mRNA表达均低于空白血清组(P 值均 <0.05)。

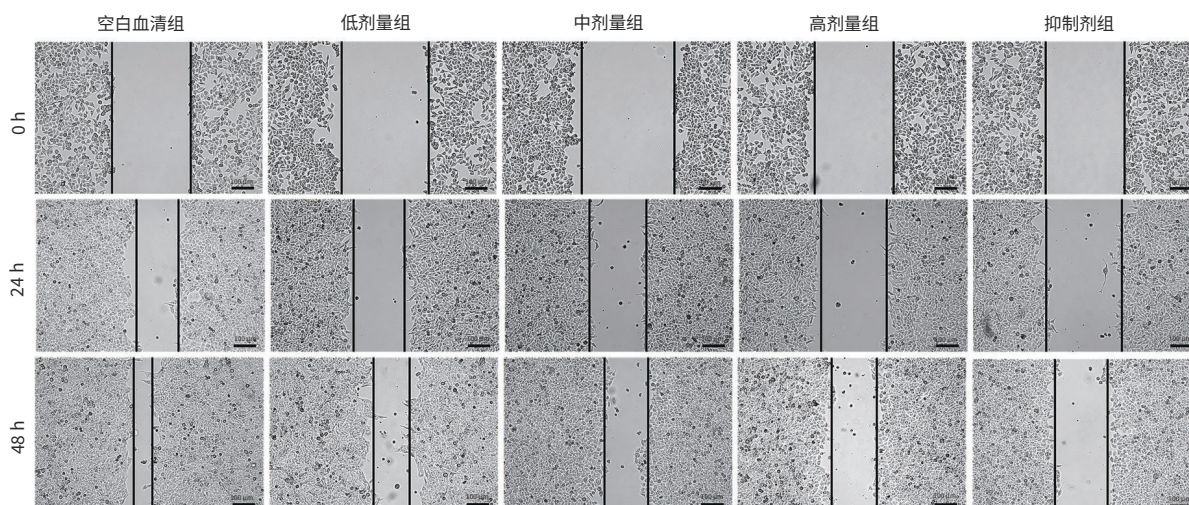


图1 各组细胞划痕图片

Figure 1 Cell scratch pictures for each group

2.6 鳖甲煎丸对含药血清对AKT、mTOR蛋白及磷酸化蛋白表达的影响 如表6及图2所示,鳖甲煎丸高、中剂量组AKT的蛋白表达均低于空白血清组(P 值均 <0.05),浓度越高,表达越低,但低剂量组与空白血清组比较没有明显差异($P>0.05$)。而鳖甲煎丸高、中、低剂量组mTOR的蛋白表达均低于空白血清组(P 值均 <0.05),浓度越高,表达越低。

表4 各组细胞糖酵解代谢产物水平

Table 4 Levels of glycolytic metabolites in each group

组别	丙酮酸 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	乳酸 ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	ATP活性 ($\mu\text{mol}/10^6$ 个)
空白血清组	0.451 \pm 0.009	3.709 \pm 0.113	0.083 \pm 0.003
低剂量组	0.366 \pm 0.008 ¹⁾	2.818 \pm 0.048 ¹⁾	0.072 \pm 0.001 ¹⁾
中剂量组	0.188 \pm 0.006 ¹⁾	2.062 \pm 0.032 ¹⁾	0.057 \pm 0.003 ¹⁾
高剂量组	0.178 \pm 0.003 ¹⁾	1.781 \pm 0.047 ¹⁾	0.053 \pm 0.002 ¹⁾
抑制剂组	0.144 \pm 0.006 ¹⁾	1.319 \pm 0.021 ¹⁾	0.047 \pm 0.002 ¹⁾
F 值	1 222.53	707.09	88.49
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

表5 AKT、mTOR的mRNA水平

Table 5 mRNA levels of AKT and mTOR

组别	AKT	mTOR
空白血清组	0.98 \pm 0.03	1.06 \pm 0.21
低剂量组	0.74 \pm 0.11 ¹⁾	0.64 \pm 0.12 ¹⁾
中剂量组	0.86 \pm 0.10	0.53 \pm 0.08 ¹⁾
高剂量组	0.73 \pm 0.21 ¹⁾	0.54 \pm 0.11 ¹⁾
抑制剂组	0.33 \pm 0.09 ¹⁾	0.15 \pm 0.03 ¹⁾
F 值	12.10	19.73
P 值	0.001	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

表6 p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR的表达水平

Table 6 Expression levels of P-AKT/AKT and P-mTOR/mTOR

组别	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
空白血清组	1.09 \pm 0.15	1.29 \pm 0.16
低剂量组	1.07 \pm 0.13	0.95 \pm 0.14 ¹⁾
中剂量组	0.72 \pm 0.09 ¹⁾	0.71 \pm 0.08 ¹⁾
高剂量组	0.55 \pm 0.07 ¹⁾	0.51 \pm 0.06 ¹⁾
抑制剂组	0.37 \pm 0.05 ¹⁾	0.23 \pm 0.03 ¹⁾
F 值	124.00	82.98
P 值	<0.001	<0.001

注:与空白血清组比较,1) $P<0.05$ 。

3 讨论

癌细胞过度增殖与迁移是肝癌形成、生长与转移的前提条件^[5]。中医认为,正虚是肝癌发生的前提条件,正虚则内外邪气有侵袭人体的机会,引起机体脏腑功能

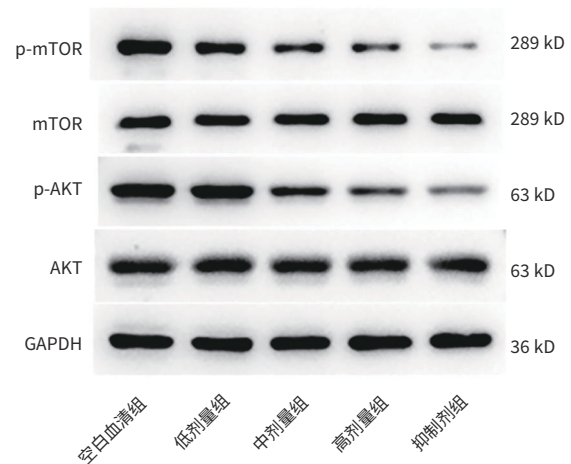


图2 Western Blot条带图

Figure 2 Western Blot strip diagram

失调,气血津液失司,寒、热、湿、毒、瘀、痰等邪气结聚于胁下^[6],癌细胞不断增殖,形成肿块。然湿毒、痰毒等具有流窜之性,加之机体抗邪不利,阴阳失衡,固涩失司,使癌细胞不断迁移、扩散,从而发生肝内外转移^[7-8]。由此可见,寒热错杂、虚实夹杂是肝癌的基本病机。鳖甲煎丸是由东汉医家张仲景所提出的,治疗癥瘕、疟母的主方,全方由23味中药组成。其中,人参、阿胶、芍药、桂枝能补益气血、调和营卫;大黄、紫葳、土鳖虫、虻螂、鼠妇、牡丹皮、芍药、桃仁、鳖甲、半夏、乌扇、赤硝具有活血化瘀、软坚散结的功效;蜂房、黄芩、柴胡清热解毒散结,这些药物的功效与肝癌病机相契合,是目前常用的抗肝癌方剂之一。现代研究^[9-11]也表明,鳖甲煎丸不仅抑制癌细胞生长、代谢,调控血管生成,也能通过改善癌细胞代谢以及调节机体免疫等途径来抑制肝癌的发生、发展。

癌细胞在发生增殖、转移时需要消耗大量的能量,当微环境中能量缺乏时,癌细胞往往会调整代谢方式,以应对自身的能量需求^[12-13]。研究^[14]发现,肝癌细胞在侵袭和转移时有氧糖酵解相关基因(PKM2、HK、LDHA、葡萄糖转运蛋白1)的表达增强。AKT/mTOR信号通路在癌症多个方面都起着重要的作用,包括影响癌细胞的周期性、增殖、凋亡、代谢、炎症和血管生成等^[15]。最近的研究^[16-17]显示,AKT能够直接磷酸化PRAS40(40 kD的富含脯氨酸蛋白激酶B底物蛋白),导致其失去对mTORC1(雷帕霉素靶蛋白复合物1)的抑制作用,以此来激活mTORC1通路,而且这种激活可以促使p70核糖体蛋白S6激酶磷酸化,进而激活核糖体蛋白S6,以此来促进蛋白质的合成,促使肿瘤细胞增殖,同时也能通过调控下游的转录因子影响糖酵解相关代谢酶

(HK2、PFK、PK)以及葡萄糖转运蛋白1的表达水平,从而调控糖酵解。且许多研究^[18-20]指出,在肺癌、胆管细胞癌等多种肿瘤中观察到激活的AKT/mTOR信号通路可以调控癌细胞糖酵解抑制肿瘤细胞代谢。比如,淫羊藿素可以通过AKT/mTOR信号通路呈剂量依赖方式抑制人肝内胆管癌HuCCT1细胞的增殖,同时抑制其葡萄糖消耗,抑制糖酵解限速酶HK1、HK2、PKM1、PKM2的活性,抑制肝内胆管细胞癌的生长及糖酵解^[21]。

本研究以不同剂量鳖甲煎丸含药血清干预Huh7细胞,结果显示,与空白血清相比,鳖甲煎丸含药血清能抑制Huh7细胞的增殖、迁移活动,减少有氧糖酵解中相关激酶的活性及代谢产物的产生。同时,鳖甲煎丸含药血清还能使AKT/mTOR信号通路中的mRNA及蛋白表达下调。这提示鳖甲煎丸可以通过抑制肝癌细胞有氧糖酵解,从而发挥抑制肝癌细胞增殖、迁移的作用,其作用机制可能与调控AKT/mTOR信号通路的表达有关。

综上所述,本研究结果从侧面验证了鳖甲煎丸能抑制肝癌的发生、发展,也为鳖甲煎丸干预癌细胞代谢提供了相关依据。与传统、广谱治疗方式不同,针对信号通路、细胞因子及基因表达的治疗是更为精准的治疗方式。AKT/mTOR信号通路在癌细胞能量代谢方面发挥重要的调控作用,开发更多靶向AKT/mTOR信号通路的药物可能具有广泛的研究前景,探索AKT/mTOR信号通路与肝癌发生发展之间的联系对于指南的制定可能具有重要意义。但实验也存在较多未能排除的干扰因素,如其他通路、因子等。本研究团队将在后续实验中不断改进及进行更深入的探索。

伦理学声明: 本研究方案于2023年8月30日经由广西中医药大学伦理委员会审批,批号:DW20230830-162,符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 谭钦文、钟瑞熙负责课题设计,起草论文;谭钦文、钟瑞熙、杜沅沁、徐健负责实验操作,研究过程的实施;谭钦文负责数据收集,统计学分析,绘制图表;杜沅沁、农金丽、彭玉姣负责拟定写作思路;黄晶晶指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] WANG J, ZHANG CL, TANG KY, et al. Research advances in traditional Chinese medicine in regulating epithelial-mesenchymal transformation to inhibit hepatocellular carcinoma metastasis[J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(11): 2636-2642. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.11.040.
- [2] SEVER R, BRUGGE JS. Signal transduction in cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5(4): a006098. DOI: 10.1101/cshperspect.a006098.
- [3] LEE G, ZHENG YX, CHO S, et al. Post-transcriptional regulation of de novo lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 signaling[J]. Cell, 2017, 171(7): 1545-1558. e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.10.037.
- [4] PATRA T, MEYER K, RAY RB, et al. A combination of AZD5363 and FH5363 induces lethal autophagy in transformed hepatocytes[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 540. DOI: 10.1038/s41419-020-02741-1.
- [5] WANG HY, CHEN L. Tumor microenvironment and hepatocellular carcinoma metastasis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2013, 28(Suppl 1): 43-48. DOI: 10.1111/jgh.12091.
- [6] SUN C, LI B, LI L, et al. Effect of Huaier granules on patients with middle and advanced liver cancer[J]. J Changchun Univ Chin Med, 2022, 38(10): 1130-1133. DOI: 10.13463/j.cnki.cczyy.2022.10.016.
- [7] SHI ZG, WANG WP. The transformation of the pathogenesis of tumor metastasis[J]. J Pract Tradit Chin Intern Med, 2013, 27(8): 68-70. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7813.2013.04(x).34.
- [8] 史振广, 王文萍. 恶性肿瘤转移的病机转化[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(8): 68-70. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7813.2013.04(x).34.
- [9] WU MS, LIU H, TAN NH, et al. The effect of Biejiajian Pills on regulating the EGFR/MAPK/ERK pathway in MHCC-97H liver cancer cells[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2024, 47(3): 394-406.
- [10] 伍梦思, 刘华, 谭年花, 等. 鳖甲煎丸调控EGFR/MAPK/ERK通路对MHCC-97H肝癌细胞的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 394-406.
- [11] ZHONG XD, WEN B, SUN HT, et al. Mechanism of Biejiajian Wan against EMT of hepatocellular carcinoma cells through NF- κ B signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(1): 24-32. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212421.
- [12] 钟晓丹, 文彬, 孙海涛, 等. 鳖甲煎丸通过NF- κ B信号通路抑制肝癌细胞上皮间质转化的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(1): 24-32. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20212421.
- [13] HUANG JJ, HUANG HN, ZHANG WF, et al. Bie Jia Jian pill combined with bone mesenchymal stem cells regulates microRNA-140 to suppress hepatocellular carcinoma stem cells[J]. Int J Stem Cells, 2021, 14(3): 275-285. DOI: 10.15283/ijsc20157.
- [14] SHAO FL, CHEN QP, BI Q, et al. Intervention mechanism of Biejiajian Wan on primary liver cancer by regulating lncRNA SNHG5/miRNA-26a-5p/GSK-3 β signal axis[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2024, 30(4): 107-113. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230730.
- [15] 邵范雷, 陈秋平, 毕倩, 等. 鳖甲煎丸调控lncRNA SNHG5/miRNA-26a-5p/GSK-3 β 信号轴干预原发性肝癌的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 107-113. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230730.
- [16] TAO ZD, WU QY, LAN XH, et al. Effect of physcion on proliferation and glycolysis of liver cancer cells and its mechanism[J]. Chin Clin Oncol, 2022, 27(9): 769-775. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2022.09.001.
- [17] 陶正娣, 吴勤研, 蓝晓红, 等. 大黄素甲醚对人肝癌细胞增殖及糖酵解的调控作用及机制研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2022, 27(9): 769-775. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0460.2022.09.001.
- [18] ZANOTELLI MR, ZHANG J, REINHART-KING CA. Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis[J]. Cell

- Metab, 2021, 33(7): 1307-1321. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.04.002.
- [14] NIU YQ, LIU F, WANG XY, et al. *miR-183-5p* promotes HCC migration/invasion via increasing aerobic glycolysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 3649-3658. DOI: 10.2147/OTT.S304117.
- [15] WEI YH, YANG CX, YANG GM, et al. Inhibitory effect of downregulating HMGB2 expression on epithelial-mesenchymal transition of liver cancer LM3 cells and its AKT/mTOR signaling pathway mechanism[J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2024, 50(1): 143-149. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240118.
- 魏雁虹, 杨晨雪, 杨广民, 等. 下调HMGB2表达对肝癌LM3细胞上皮-间质转化的抑制作用及其AKT/mTOR信号通路机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(1): 143-149. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240118.
- [16] DI SC, GONG M, LV JM, et al. Glycolysis-related biomarker TCIRG1 participates in regulation of renal cell carcinoma progression and tumor immune microenvironment by affecting aerobic glycolysis and AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 186. DOI: 10.1186/s12935-023-03019-0.
- [17] YU FY, ZHAO XY, LI MT, et al. SLITRK6 promotes the progression of lung adenocarcinoma by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling and Warburg effect[J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7-8): 1216-1225. DOI: 10.1007/s10495-023-01838-0.
- [18] SHI Z, ZHOU LY, ZHAO GD, et al. Effect of micro-ribonucleic acid-21 on the malignant biological behavior of cholangiocarcinoma cells by targeting the PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. *J Clin Hepatol*, 2022, 38(9): 2091-2098. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.09.026.
- 施喆, 周丽媛, 赵国栋, 等. MiR-21靶向调控PTEN/PI3K/Akt通路对胆管癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(9): 2091-2098. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.09.026.
- [19] LI ZB, YE JX, WU Y, et al. Study on the mechanism of bezafibrate inhibiting glycolysis in lung adenocarcinoma through AKT/mTOR pathway[J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2024, 40(1): 101-104. DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2023030703.
- 李智斌, 叶锦霞, 巫艳, 等. 苯扎贝特通过AKT/mTOR通路抑制肺腺癌糖酵解机制研究[J]. *广东药科大学学报*, 2024, 40(1): 101-104. DOI: 10.16809/j.cnki.2096-3653.2023030703.
- [20] QU YQ, ZHANG QY, TAN XY, et al. Effect of nuciferine against the proliferation of cholangiocarcinoma cells through Akt/mTOR/4EBP1-glycolytic pathway[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2023, 35(8): 1297-1304, 1379. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.002.
- 屈雅琴, 张倩玉, 谈相云, 等. 荷叶碱抑制Akt/mTOR/4EBP1-糖酵解通路抗胆管癌细胞增殖作用研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(8): 1297-1304, 1379. DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.002.
- [21] DENG DJ, LI L, TAN XY, et al. Effect and mechanism of icaritin on inhibiting proliferation of intrahepatic cholangiocarcinoma cells by Akt/mTOR-mediated glycolysis[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(10): 3061-3069. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.016.
- 邓冬杰, 李励, 谈相云, 等. 淫羊藿素通过Akt/mTOR调控糖酵解抑制肝内胆管癌细胞增殖的作用机制研究[J]. *中草药*, 2022, 53(10): 3061-3069. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.10.016.

收稿日期: 2024-06-22; 录用日期: 2024-09-24

本文编辑: 王莹

引证本文: TAN QW, HUANG JJ, ZHONG RX, et al. Effect of Biejia Decoction Pill on aerobic glycolysis in hepatocellular carcinoma by regulating the protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(2): 300-306.

谭钦文, 黄晶晶, 钟瑞熙, 等. 鳖甲煎丸调控AKT/mTOR信号通路在肝癌细胞有氧糖酵解中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(2): 300-306.

· 致谢 ·

本期审稿专家

Current reviewers

王艳 王晓东 王继恒 王甦 牛春燕 毛靖伟 方步武 左维泽 丛敏 朱月永 朱凤尚
 朱磊 刘江凯 刘军权 刘绍能 江勇 苏永华 苏洋 杜锡林 李天然 李文岗 李红
 李京涛 李波 李建军 李健 肖明兵 吴江锋 吴金明 吴浩 何松 沈思鹏 张吉才
 张伟 张春清 张勇 陈源文 苗新普 林苏 周琳 郑文杰 赵平 赵彩彦 郝建宇
 钟渊斌 钟鉴宏 钟碧慧 饶慧瑛 贾建伟 党晓卫 徐可树 郭红辉 唐霓 黄坚 曹建彪
 崔梅花 彭海燕 董高宏 程良斌 管青天 熊伍军 滕晓东 潘修成 霍继荣