

· 肝脏肿瘤 ·

DOI: 10.12449/JCH260115

## 鳖甲煎丸对肝癌 Huh-7 细胞皮下移植裸鼠模型的影响及作用机制

卢露<sup>1</sup>, 陈焕灵<sup>1</sup>, 徐健<sup>1</sup>, 杜沅沁<sup>1</sup>, 刘晓丽<sup>1</sup>, 吴颖升<sup>1</sup>, 吴成挺<sup>1</sup>, 班惟<sup>1</sup>, 黄晶晶<sup>2,3</sup>, 黄鸿娜<sup>4,5</sup>

1 广西中医药大学研究生院, 南宁 530022

2 广西中医药大学第一附属医院仙葫院区脾胃肝病科, 南宁 530022

3 广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530022

4 广西中医药大学第一附属医院中医内科教研室, 南宁 530022

5 广西中医药大学第一附属医院肝病科, 南宁 530022

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

**摘要:** **目的** 评估鳖甲煎丸对肝癌生长的抑制作用, 并阐明其通过线粒体能量代谢介导 AMP 活化的蛋白质激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路调控的潜在机制。 **方法** 采用人肝癌 Huh-7 细胞建立裸鼠皮下移植瘤模型, 将 18 只荷瘤裸鼠随机分为模型组、鳖甲煎丸组 (2.2 g/kg) 和二甲双胍组 (250 mg/kg), 灌胃给药 14 d。实验期间监测肿瘤体积与质量; 采用 HE 染色观察组织病理学变化; 检测瘤组织活性氧 (ROS) 与三磷酸腺苷 (ATP) 水平; 采用免疫组化法、蛋白质免疫印迹法检测 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达水平。满足正态分布的计量资料采用单因素方差分析进行多组间比较, 进一步两两比较采用 Tukey's 法检验; 不满足正态分布的计量资料采用 Kruskal-Wallis *H* 检验进行多组间比较, 进一步两两比较采用 Dunn's 法。 **结果** 与模型组比较, 鳖甲煎丸组相对肿瘤体积与质量均显著降低 ( $P$  值均  $< 0.01$ ), 抑瘤率达 45.73%。病理学显示, 与模型组比较, 鳖甲煎丸组肿瘤细胞数量减少, 并出现广泛坏死; 机制研究表明, 与模型组比较, 鳖甲煎丸组 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ), ATP 水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 同时, p-AMPK/AMPK 比值 ( $0.81 \pm 0.20$  vs  $0.13 \pm 0.04$ ) 与 p-ULK1/ULK1 比值 ( $0.69 \pm 0.17$  vs  $0.18 \pm 0.13$ ) 均显著升高 ( $P$  值均  $< 0.01$ ), 而 p-mTOR/mTOR 比值 ( $1.34 \pm 0.16$  vs  $3.20 \pm 0.62$ ) 显著降低 ( $P < 0.01$ )。 **结论** 鳖甲煎丸可能通过诱导线粒体能量代谢障碍, 即升高 ROS 水平并降低 ATP 水平, 进而激活 AMPK/mTOR 信号通路, 抑制肝癌生长。

**关键词:** 鳖甲煎丸; 肝肿瘤; AMP 活化的蛋白质激酶; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白**基金项目:** 国家自然科学基金 (8246150205); 广西自然科学基金 (2022GXNSFAA035460, 2024GXNSFDA010005)

### Effect and mechanism of Biejiajian Pill on subcutaneous xenograft tumor model of hepatocellular carcinoma Huh7 cells

LU Lu<sup>1</sup>, CHEN Huanling<sup>1</sup>, XU Jian<sup>1</sup>, DU Yuanqin<sup>1</sup>, LIU Xiaoli<sup>1</sup>, WU Yingsheng<sup>1</sup>, WU Chengting<sup>1</sup>, BAN Wei<sup>1</sup>, HUANG Jingjing<sup>2,3</sup>, HUANG Hongna<sup>4,5</sup>

1. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 2. Department of Spleen and Stomach Hepatology, Xianhu Branch of The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-Incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Nanning 530022, China; 4. Department of Chinese Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China; 5. Department of Hepatology, The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530022, China

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

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of Biejiajian Pills (BJJW) on the growth of liver cancer, as well as its potential mechanism in mediating the AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway through

mitochondrial energy metabolism. **Methods** Human hepatoma Huh7 cells were used to establish a nude mouse model of subcutaneous xenograft tumor. A total of 18 tumor-bearing nude mice were randomly divided into model group, BJJW group (2.2 g/kg), and metformin group (250 mg/kg), and the corresponding drug was given by gavage for 14 consecutive days. Tumor volume and weight were monitored during the experiment; HE staining was used to observe histopathological changes; the levels of reactive oxygen species (ROS) and adenosine triphosphate (ATP) in tumor tissue were measured; immunohistochemistry and Western blotting were used to measure the expression levels of proteins associated with the AMPK/mTOR pathway. A one-way analysis of variance was used for comparison of normally distributed continuous data between multiple groups, and the Tukey's test was used for further comparison between two groups; the Kruskal-Wallis *H* test was used for comparison of non-normally distributed continuous data between multiple groups, and the Dunn's test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the model group, the BJJW group had a tumor inhibition rate of 45.73%, with significant reductions in both tumor volume and weight ( $P < 0.01$ ). Pathological examination showed that compared with the model group, the BJJW group had a significant reduction in the number of tumor cells and the presence of extensive necrosis. Mechanistic studies showed that compared with the model group, the BJJW group had a significant increase in ROS level ( $P < 0.001$ ) and a significant reduction in ATP level ( $P < 0.001$ ), as well as significant increases in p-AMPK/AMPK ratio ( $0.81 \pm 0.20$  vs  $0.13 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ ) and p-ULK1/ULK1 ratio ( $0.69 \pm 0.17$  vs  $0.18 \pm 0.13$ ,  $P < 0.01$ ) and a significant reduction in p-mTOR/mTOR ratio ( $1.34 \pm 0.16$  vs  $3.20 \pm 0.62$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** BJJW may inhibit the growth of liver cancer by inducing mitochondrial energy metabolism dysfunction, increasing the level of ROS, reducing the level of ATP, and activating the AMPK/mTOR signaling pathway.

**Key words:** Biejiajian Pills; Liver Neoplasms; AMP-activated Protein Kinase; Mammalian Target of Rapamycin

**Research funding:** National Natural Science Foundation of China(8246150205);Guangxi Natural Science Foundation(2022GXNSFAA035460, 2024GXNSFDA010005)

原发性肝癌是一种恶性程度高、预后差的肝脏肿瘤,主要包括肝细胞癌和肝内胆管癌2种类型。该病起病隐匿,多数患者确诊时已进展至中晚期,对常规治疗反应不佳,5年生存率不足30%。据统计,全球每年新发病例约86.5万例,且发病率呈持续上升趋势,其中我国病例数占全球总数的40%以上<sup>[1-4]</sup>。由于肝癌治疗周期长、治疗手段复杂,相关医疗开销巨大,给患者家庭和社会层面带来沉重的经济负担,且这一负担呈持续上升趋势<sup>[5]</sup>。肝癌的临床发病具有高度隐匿性,早期常缺乏特异性临床症状,导致大多数患者在确诊时已处于中晚期阶段,从而错失根治性切除的最佳时机,严重制约了整体治疗效果,因此从新的角度和靶点考察中医药在肝癌治疗中的作用,已成为当前研究的迫切需求<sup>[6]</sup>。研究表明,线粒体功能障碍在肝癌发展中发挥关键作用,线粒体呼吸链受损可导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高,进而激活Caspase级联反应,诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。AMP活化的蛋白质激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路是能量代谢的核心调控机制,AMPK激活可抑制mTOR信号,从而抑制肿瘤生长<sup>[8]</sup>。鳖甲煎丸是治疗肝癌的经典方剂,具有软坚散结、活血化痰的功效。既往研究显示,该方剂可通过多

靶点抑制肿瘤<sup>[9-12]</sup>,但具体作用机制尚不明确。本研究旨在探讨鳖甲煎丸是否通过调控线粒体能量代谢激活AMPK/mTOR通路发挥抗肝癌作用,以期为该方剂的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 实验采用人肝癌细胞株Huh7,购自武汉塞维尔生物技术有限公司(货号:STCC00033),实验时传代至第4~5代。

1.1.2 实验动物 实验选用18只SPF级BALB/c-nu裸鼠,4~6周龄,雄性,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物质量合格证号:No.430727241102949976,实验动物生产许可证号:SYXK(湘)2021-0002,实验单位使用许可证编号:SYXK桂2024-0004。实验动物饲养于广西中医药大学SPF级动物房内,饲养环境温度 $20 \sim 26$  °C,相对湿度为40%~70%,明暗节律为12 h/12 h,予以自由进食、饮水,适应性喂养7 d后进行相关实验。

1.1.3 实验用药 鳖甲煎丸(武汉中联药业集团股份有限公司,国药准字Z42020772,产品批号:211970,规格:3 g/袋),其组方按照《金匱要略》配制,共含23味药材:鳖甲12分(炙)、乌扇3分(炮)、黄芩3分、柴胡6分、鼠妇3分

(熬)、干姜3分、大黄3分、芍药5分、桂枝3分、葶苈1分(熬)、石苇3分(去毛)、厚朴3分、牡丹5分(去心)、瞿麦2分、紫葳3分、半夏1分、人参1分、土鳖虫5分(熬)、阿胶3分(炙)、蜂巢4分(炙)、赤硝12分、蛭螂6分(熬)和桃仁2分。盐酸二甲双胍片(河北天成药业股份有限公司,国药准字H13021647,产品批号:H20240044,规格:0.25 g×120片)。

## 1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 Huh-7细胞专用培养基(货号:GA2409022,Servicebio)、组织ROS检测试剂盒(DHE荧光法)(货号G1746-100T,Servicebio)、RIPA裂解液(货号:R0020,Solarbio)、ECL发光试剂(货号:sc-2048,中杉金桥)、PMSF(货号:BL507A,Biosharp)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:ZJ102,雅酶)、细胞/动物组织/植物组织RNA提取试剂盒(货号:A077-3,Solarbio)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号:G1076,Servicebio)、腺苷三磷酸(adenosine triphosphate,ATP)含量检测试剂盒(货号:G4309)、AMPK抗体(货号:AB32047,ABCAM)、mTOR抗体(货号:AB134903,ABCAM)、p-AMPK抗体(货号:AB131357,ABCAM)、p-mTOR抗体(货号:AB109268,ABCAM)、ULK1抗体(货号:DF7588,Affinity)、p-ULK1抗体(货号:AF4387,Affinity)、山羊抗兔的二抗(货号:ZB2301,中杉金桥)、山羊抗鼠的二抗(货号:ZB2305,中杉金桥)、基质胶(货号:G4130,Servicebio® Swe)、磷酸酶抑制剂(货号:BL636A,Biosharp)。

1.2.2 主要仪器 研磨仪(KZ-II,Servicebio)、电泳仪(DYCZ-24DN,北京六一公司)、核酸蛋白定量仪(DS-11,美国丹诺尔Denovix)、超声波细胞破碎仪(TL-650Y,江苏天翎仪器有限公司)、紫外分光光度计(UV-2600,岛津仪器公司)、全波长酶标仪(Epoch,Biotek)、生物分析仪(Agilent 5400,Agilent Technologies Co Ltd)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)仪(T100PCR,Bio-Rad)、凝胶成像系统(Tanon 5200,上海天能)、SHANDON石蜡切片机、ELX808多功能酶标仪(美国BIOTEK公司)、LightCycler 480 II荧光定量PCR检测系统(瑞士Roche公司)、AB2-5S1型BSL-II级生物安全柜(新加坡ESCO公司)、EXF40086V超低温冰箱(美国ThermoFische公司)、5417R低温高速离心机(德国EPPENDORF公司)、Moticam1300数码显微图像分析系统、ELT-13V-85℃超低温冰箱(美国HARRIS公司)。

## 1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 Huh7细胞采用专用培养基,于37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的恒温培养箱中常规培养,当细胞融合

度达到80%~90%时,使用无酚红重组胰蛋白酶进行消化,并按1:3~1:4比例传代培养。

1.3.2 肝癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立及干预 裸鼠适应性喂养1周后,取生长状态良好的对数生长期Huh7细胞,Huh7专用培养基和基质胶按照1:1比例重悬配制细胞浓度为 $5 \times 10^7$ 个/mL的单细胞悬液,每只裸鼠使用一次性1 mL注射器于右侧腋窝皮下接种100 μL悬液,每日观察裸鼠状态及移植瘤生长情况,当瘤体体积达到50 mm<sup>3</sup>时视为造模成功<sup>[13]</sup>,瘤体体积达到100 mm<sup>3</sup>时开始干预。

将18只裸鼠按照简单随机分组法分为3个组(每组6只):模型组(MOD组)、鳖甲煎丸组(BJJW组)、二甲双胍组(MET组)(多项研究指出二甲双胍作为AMPK激动剂有显著的抗癌作用<sup>[14-18]</sup>)。各实验组小鼠每日按0.2 mL/10 g体积灌胃给予相应药物,1次/d,连续干预14 d。MOD组予以相应体积饮用水灌胃,BJJW组灌胃给予2.2 g/kg剂量的药物(根据前期研究确定该浓度为最佳实验浓度<sup>[19-20]</sup>),MET组灌胃给予250 mg/kg剂量的药物。每2 d测量各组裸鼠的体质量,用游标卡尺测量皮下移植瘤,并计算肿瘤体积。终点处理:末次给药后24 h手术剥离肿瘤,用吸水纸吸干瘤体组织表面多余的水分,利用精密电子天平称取瘤体质量。计算相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV)= $V_{\text{给药后}}/V_{\text{给药前}}$ ,抑瘤率=(MOD组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/MOD组平均瘤质量×100%,脏器指数=各脏器质量/体质量。

1.3.3 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%多聚甲醛中固定过夜,随后进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明化处理,石蜡包埋。切片脱蜡后进行HE染色,脱水、封片,置于显微镜下观察瘤体组织形态特征。

1.3.4 肿瘤组织内ROS检测 肿瘤组织冰冻切片在室温下复温,控干水分,滴加自发荧光淬灭剂5 min,流水冲洗10 min,滴加ROS染液,置于37℃避光恒温箱中孵育30 min,DAPI复染,避光室温孵育10 min后封片,采集图形,用Image J软件分析荧光强度。

1.3.5 肿瘤组织内ATP检测 肿瘤组织切片,准确称重,按质量(mg):体积(μL)=1:9的比例加入0.9%的生理盐水,于冰水浴条件下机械匀浆,制备成10%的匀浆液,以3 000 r/min离心10 min,取上清液,使用ATP检测试剂盒测定其化学发光值。

1.3.6 免疫组化法检测裸鼠皮下移植瘤组织p-AMPK、p-mTOR蛋白的表达水平 肿瘤组织切片依次经脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭后,加入按一定

比例稀释的一抗p-AMPK(1:200)和p-mTOR(1:2 000),于4℃湿盒内孵育过夜后,加入二抗(HRP山羊抗小鼠,1:200),室温孵育50 min,待DAB显色后,苏木素复染细胞核3 min,脱水封片,置于白光显微镜下进行结果判读。

1.3.7 Western Blot检测AMPK/mTOR信号通路的蛋白表达水平 剪取约0.025 g肿瘤组织,用提前预冷的PBS缓冲液清洗肿瘤组织,随后加入300 μL RIPA裂解液,于组织研磨仪中反复研磨肿瘤组织至无组织块,置于冰上裂解10 min至组织完全裂解。将离心机提前预冷至4℃,以12 000 r/min离心15 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AMPK(1:1 000)、p-AMPK(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、p-mTOR(1:800)、ULK1(1:1 100)、p-ULK1(1:1 100)和β-actin(1:8 000),4℃孵育过夜。PBST洗膜3次,加入二抗(稀释比例均为1:3 000),PBST洗涤3次。ECL化学发光后,依次加入显影液、定影液处理各1 min,胶片经扫描仪扫描后,用Image J软件分析灰度值。

1.4 统计学方法 采用SPSS 25.0、GraphPad Prism 9进行数据统计分析。分别采用Shapiro-Wilk检验与Levene检验对数据的正态性及方差齐性进行验证。满足正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用单因素方差分析进行多组间比较,进一步两两比较采用Tukey's法检验;不满足正态分布的计量资料以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,采用Kruskal-Wallis  $H$ 检验进行多组间比较,进一步两两比较采用Dunn's法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 鳖甲煎丸对Huh7裸鼠移植瘤体积及质量的影响 在药物干预期间,各组裸鼠均未出现死亡,每2天测量各组裸鼠体重并作比较,各组间差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )。MOD组裸鼠的肿瘤体积持续快速增长,由初始的( $106.17 \pm 4.19$ )  $\text{mm}^3$ 增长至第14天的( $829.73 \pm 115.17$ )  $\text{mm}^3$ 。从干预第5天起,BJJW组与MET组的肿瘤体积均显著小于MOD组( $P$ 值均 $<0.01$ );MET组的肿瘤体积均显著小于BJJW组( $P$ 值均 $<0.05$ )(表1)。

给药第14天,与MOD组比较,BJJW组和MET组的移植瘤RTV均显著减小( $P$ 值均 $<0.01$ );给药结束后剖离移植瘤组织并称量,与MOD组比较,BJJW组和MET组的移植瘤质量均显著降低( $P$ 值均 $<0.01$ );不同组间的肝脏指数、脾脏指数差异均无统计学意义( $P$ 值均 $>0.05$ )(表2,图1)。BJJW组、MET组的抑瘤率分别为45.73%、62.17%。

2.2 鳖甲煎丸对Huh7裸鼠移植瘤组织病理学的影响 MOD组肿瘤细胞呈现显著增殖特征,表现为细胞密度明显增高,细胞异型性显著,大小不一、形态不规则且排列紧密。肿瘤细胞增殖活跃:所有样本均显示高核质比、核异型性明显以及核分裂象多见。肿瘤细胞坏死少见(仅少量核固缩/溶解),但普遍存在水样变性(细胞肿胀、胞质疏松淡染)。仅个别样本局部见少量淋巴细胞浸润,其余无显著炎性细胞浸润。与MOD组比较,BJJW组肿瘤细胞数量减少,坏死显著增加:所有样本均出现较多至大量

表1 鳖甲煎丸对Huh7裸鼠移植瘤体积变化的影响

Table 1 Effect of Biejiajian Pills on hepatocellular subcutaneous tumor mice

组别	动物数(只)	第1天	第3天	第5天	第7天	第9天	第12天	第14天
MOD组	6	106.17 ± 4.19	126.87 ± 8.55	183.98 ± 4.98	291.84 ± 22.53	459.73 ± 83.46	632.40 ± 101.37	829.73 ± 115.17
BJJW组	6	106.61 ± 5.05	117.67 ± 7.66	125.26 ± 12.83 <sup>1)</sup>	174.88 ± 28.46 <sup>1)</sup>	251.81 ± 85.24 <sup>1)2)</sup>	303.09 ± 112.98 <sup>1)2)</sup>	408.44 ± 141.95 <sup>1)2)</sup>
MET组	6	104.47 ± 3.64	124.73 ± 8.78	144.88 ± 18.62 <sup>1)2)</sup>	147.09 ± 27.96 <sup>1)2)</sup>	180.80 ± 48.03 <sup>1)</sup>	222.08 ± 63.49 <sup>1)</sup>	272.74 ± 81.03 <sup>1)</sup>
$F$ 值		0.409	1.996	30.004	50.589	22.870	31.401	37.979
$P$ 值		0.672	0.170	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$

注:与MOD组比较,1) $P < 0.01$ ;与MET组比较,2) $P < 0.05$ 。

表2 鳖甲煎丸对Huh7裸鼠移植瘤生长的影响

Table 2 Effect of Biejiajian Pills on the growth of transplanted tumours

组别	动物数(只)	RTV	移植瘤质量(g)	肝脏指数(%)	脾脏指数(%)
MOD组	6	7.81 ± 1.02	0.61 ± 0.09	40.46 ± 5.42	3.67 ± 0.43
BJJW组	6	3.82 ± 1.35 <sup>1)</sup>	0.33 ± 0.113 <sup>1)</sup>	42.77 ± 3.64	3.54 ± 0.27
MET组	6	2.60 ± 0.74 <sup>1)</sup>	0.23 ± 0.08 <sup>1)</sup>	41.78 ± 2.63	4.15 ± 0.76
$F$ 值		39.249	25.342	0.486	2.244
$P$ 值		$<0.001$	$<0.001$	0.624	0.140

注:与MOD组比较,1) $P < 0.01$ 。

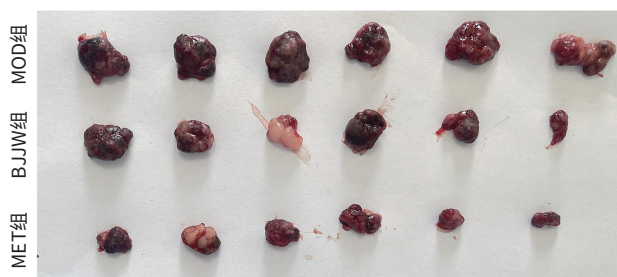
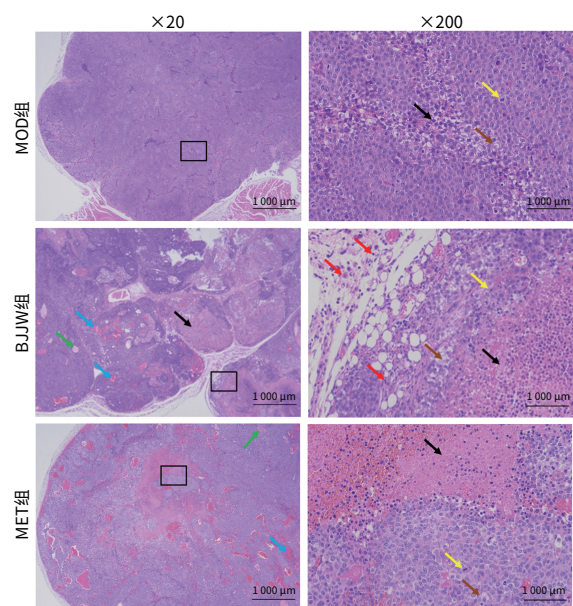


图1 各药物组对 Huh7 裸鼠移植瘤的抑制作用  
Figure 1 Inhibitory effect of various drugs groups on subcutaneous xenografts in nude mice

坏死(核固缩/碎裂/溶解),个别出现大面积坏死(占 1/3 组织)。多数样本无显著炎性浸润,水样变性较 MOD 组减少。MET 组的肿瘤细胞数量最少,肿瘤细胞坏死最显著:所有样本均表现为大量坏死,部分伴广泛核溶解,出血程度不一(轻度至大量),但水样变性更普遍,所有样本均无炎性细胞浸润,嗜酸性物质渗出少见(图2)。



注:黑色箭头,坏死;蓝色箭头,出血;黄色箭头,核分裂现象;红色箭头,淋巴细胞浸润;绿色箭头,嗜酸性物质渗出;棕色箭头,肿瘤细胞水样变性。

图2 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织形态学的影响 (HE 染色)

Figure 2 Effect of Biejiajian Pills on morphological changes of Huh7 nude mice transplanted tumors (H&E staining)

2.3 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 ROS 水平的影响 DHE 荧光染色结果显示,与 MOD 组比较,BJJW 组和 MET 组 ROS 的荧光强度均有不同程度的升高,且差异均有统计学意义( $P$  值均  $<0.001$ ),说明鳖甲煎丸能升高肝癌裸鼠移植瘤组织内的 ROS 水平,其中 MET 组移植瘤 ROS 荧光强度升高较 BJJW 组更显著( $P < 0.001$ )(图3)。

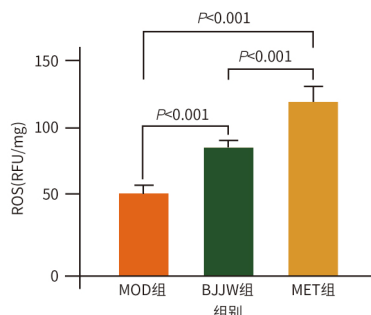
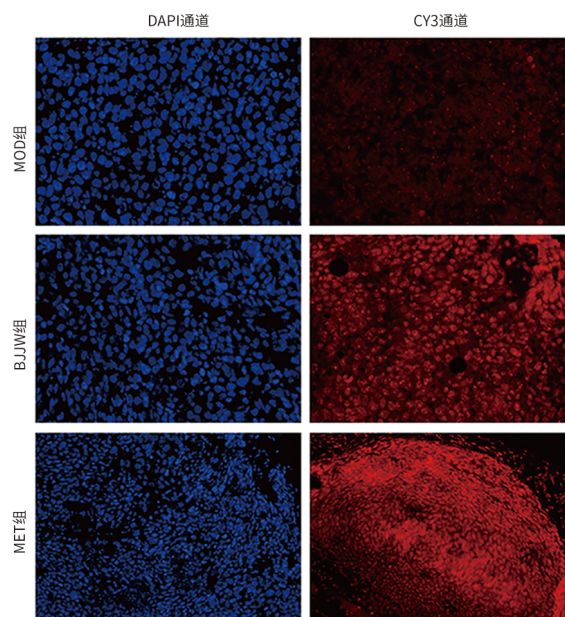


图3 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 ROS 水平的影响 (DHE 荧光法染色,  $\times 200$ )

Figure 3 Effect of Biejiajian Pills on ROS content in Huh7 nude mice transplanted tumors (DHE fluorescence staining,  $\times 200$ )

2.4 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 ATP 水平的影响 与 MOD 组比较,BJJW 组和 MET 组的 ATP 水平明显降低,差异均有统计学意义( $P$  值均  $<0.001$ ),且 MET 组移植瘤的 ATP 水平较 BJJW 组降低更显著( $P < 0.001$ )(图4)。

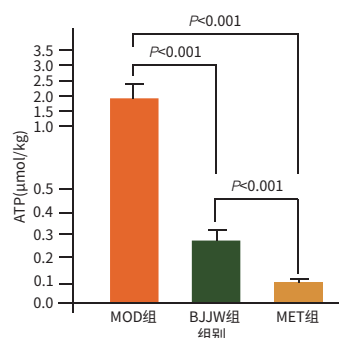


图4 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 ATP 水平的影响  
Figure 4 Effect of Biejiajian Pills on ATP content in Huh7 nude mice transplanted tumors

2.5 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 p-AMPK、p-mTOR 蛋白表达水平的影响 与 MOD 组对比, BJJW 组和 MET 组移植瘤的 p-AMPK 表达水平均升高, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $<0.01$ ), 其中 MET 组移植瘤 p-AMPK 表达水平较 BJJW 组升高更显著 ( $P < 0.05$ ); 与 MOD 组对比, BJJW 组和 MET 组移植瘤的 p-mTOR 表达水平均降低, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $<0.01$ ), 其中 MET 组移植瘤 p-mTOR 表达水平较 BJJW 组降低更显著 ( $P < 0.05$ ) (图 5, 表 3)。

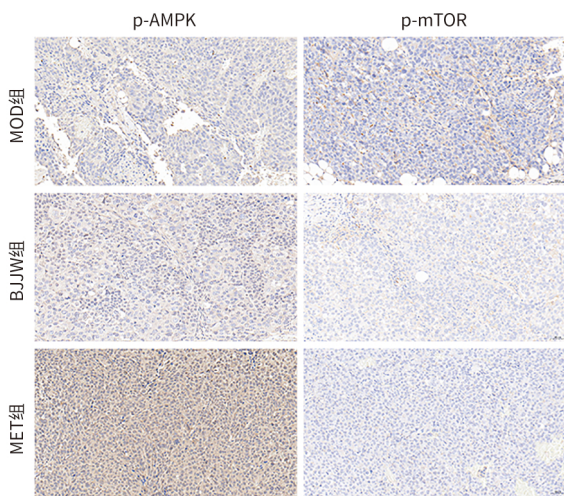


图 5 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 p-AMPK、p-mTOR 蛋白表达水平的影响

Figure 5 Effect of Biejiajian Pills on p-AMPK, p-mTOR protein in Huh7 nude mice transplanted tumors

2.6 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达水平的影响 与 MOD 组对比, BJJW 组和 MET 组移植瘤的 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值均有升高, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $<0.01$ ), 其中 MET 组移植瘤的 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值较 BJJW 组升高更显著 ( $P$  值均  $<0.05$ ); 与 MOD

表 4 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达水平的影响

Table 4 Effect of Biejiajian Pills on expression levels of AMPK/mTOR signaling pathway-related proteins in Huh7 nude mice transplanted tumors

组别	动物数 (只)	AMPK	p-AMPK	p-AMPK/AMPK	mTOR	p-mTOR	p-mTOR/mTOR	ULK1	p-ULK1	p-ULK1/ULK1
MOD 组	6	0.41 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.55 ± 0.09	3.20 ± 0.62	0.40 ± 0.10	0.06 ± 0.04	0.18 ± 0.13
BJJW 组	6	0.44 ± 0.07	0.36 ± 0.10 <sup>1)2)</sup>	0.81 ± 0.20 <sup>1)2)</sup>	0.18 ± 0.04	0.24 ± 0.06 <sup>1)2)</sup>	1.34 ± 0.16 <sup>1)2)</sup>	0.42 ± 0.10	0.28 ± 0.05 <sup>1)2)</sup>	0.69 ± 0.17 <sup>1)2)</sup>
MET 组	6	0.35 ± 0.07	0.74 ± 0.13 <sup>1)</sup>	2.10 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.20 ± 0.04	0.07 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.33 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.40 ± 0.04	0.71 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.79 ± 0.33 <sup>1)</sup>
F 值		4.00	79.41	374.79	0.65	75.88	84.72	0.06	137.75	78.28
P 值		0.040	<0.001	<0.001	0.538	<0.001	<0.001	0.943	<0.001	<0.001

注: 与 MOD 组比较, 1)  $P < 0.01$ ; 与 MET 组比较, 2)  $P < 0.05$ 。

表 3 鳖甲煎丸对 Huh7 裸鼠移植瘤组织 p-AMPK、p-mTOR 蛋白表达水平的影响

Table 3 Effect of Biejiajian Pills on p-AMPK, p-mTOR protein in Huh7 nude mice transplanted tumors

组别	动物数 (只)	p-AMPK	p-mTOR
MOD 组	6	2.59(1.57 ~ 3.48)	7.74(4.13 ~ 13.16)
BJJW 组	6	7.72(5.54 ~ 9.47) <sup>1)2)</sup>	1.05(0.60 ~ 1.67) <sup>1)2)</sup>
MET 组	6	17.31(15.69 ~ 21.47) <sup>1)</sup>	0.22(0.14 ~ 0.51) <sup>1)</sup>
$\chi^2$ 值		40.48	41.62
P 值		<0.001	<0.001

注: 与 MOD 组比较, 1)  $P < 0.01$ ; 与 MET 组比较, 2)  $P < 0.05$ 。

组对比, BJJW 组和 MET 组移植瘤的 p-mTOR/mTOR 比值均降低, 差异均有统计学意义 ( $P$  值均  $<0.01$ ), 其中, MET 组移植瘤的 p-mTOR/mTOR 比值较 BJJW 组降低更显著 ( $P < 0.05$ ) (图 6, 表 4)。

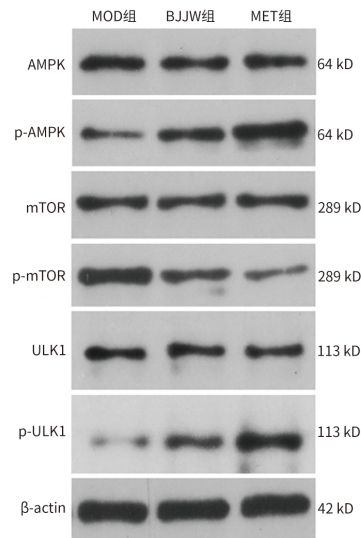


图 6 各组 Huh7 裸鼠移植瘤组织 AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、ULK1、p-ULK1 蛋白印迹

Figure 6 Western Blott bands AMPK, p-AMPK, mTOR, p-mTOR, ULK1 and p-ULK1 of graft tumours in Huh7 nude mice transplanted tumors

### 3 讨论

肝癌作为全球范围内的重大健康负担,其治疗面临巨大挑战。本研究通过动物实验证实,鳖甲煎丸可显著抑制肝癌生长,其机制与调控线粒体能量代谢和 AMPK/mTOR 通路密切相关。

中医认为,肝癌的发病机制是肝脾肾虚损,继而导致气滞、血瘀、痰凝和毒聚,最终形成“癥积”。《黄帝内经·灵枢》云:“积之始生,得寒乃生,厥乃成积也”,并指出“凝血蕴里而不散,津液涩渗,著而不去,而积皆成矣。”《诸病源候论》中描述到:“积聚者,由阴阳不和,腑脏虚弱,受于风邪,搏于腑脏之气所为也。诸脏受邪,初未能为积聚,留滞不去,乃成积聚。”鳖甲煎丸作为抗癌经典方,出自东汉医家张仲景所著《金匮要略》,方中人参、阿胶、芍药和桂枝补益气血,调和营卫;大黄、紫葳、土鳖虫、蜣螂、鼠妇、牡丹皮、芍药、桃仁、鳖甲、半夏、乌扇和赤硝活血化瘀,软坚散结;蜂房、黄芩和柴胡清热解毒散结。全方攻补兼施、寒温并用、气血津液同治,诸法兼备,本方遵消癥化积之法,于肝癌诸证中疗效独到,深具临证应用价值<sup>[21-23]</sup>。本课题组前期研究证实了鳖甲煎丸能促进肝癌细胞中 miRNA-14 的表达,抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的激活,从而抑制肝细胞癌进展<sup>[24]</sup>。

本研究通过裸鼠皮下移植瘤模型证实,鳖甲煎丸能显著抑制肝癌 Huh7 细胞的生长。BJJW 组的抑瘤率为 45.73%,且病理学分析显示,与 MOD 组相比,BJJW 组肿瘤细胞数量减少,伴随广泛坏死、核固缩及核碎裂。这些结果与前期临床研究一致,提示鳖甲煎丸可能通过多靶点作用抑制肝癌进展<sup>[9-12]</sup>。值得注意的是,其抑瘤效果虽略低于 MET 组(62.17%),但鳖甲煎丸作为中药复方仍具有相当的抗肿瘤潜力。

进一步的机制研究发现,鳖甲煎丸可显著升高肿瘤组织内 ROS 水平,并降低 ATP 水平( $P<0.01$ )。线粒体功能紊乱是肝癌的典型特征<sup>[25-27]</sup>,ROS 过量积累可诱导线粒体膜电位下降,通过线粒体通透性转换孔开放释放细胞色素 C,进而激活 Caspase 级联反应,最终导致细胞凋亡<sup>[28-30]</sup>。同时,ATP 耗竭直接反映线粒体能量代谢障碍,迫使细胞进入能量应激状态。这一发现与中医“癥积”病机中“毒聚”理论相契合,提示鳖甲煎丸可能通过“解毒”作用破坏肿瘤能量稳态。

Western Blot 结果显示,鳖甲煎丸可显著提高 p-AMPK/AMPK 及 p-ULK1/ULK1 比值( $P<0.01$ ),并降低 p-mTOR/mTOR 比值( $P<0.01$ )。p-AMPK/AMPK 及 p-ULK1/ULK1 比

值升高表明 AMPK 磷酸化激活增强,AMPK 作为细胞能量感应器,可通过感知 ATP/AMP 比率变化,在能量不足时被肝激酶 B1 或钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶  $\beta$  磷酸化激活<sup>[31]</sup>,进而抑制合成代谢(如 mTOR C1 介导的蛋白质合成),并促进分解代谢(如脂肪酸氧化)<sup>[32]</sup>。激活的 AMPK 通过磷酸化结节性硬化症复合体 2 或 mTOR 的调节相关蛋白,直接阻断 mTORC1 活性<sup>[33]</sup>,从而抑制肝癌细胞周期进程(如下调细胞周期蛋白 D1)和糖酵解(如抑制缺氧诱导因子-1 $\alpha$ )<sup>[34-36]</sup>。p-mTOR/mTOR 比值降低则反映 mTOR 通路受到抑制,其意义包括:(1)阻断促增殖信号:mTORC1 通过磷酸化核糖体 S6 激酶 1 和真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 促进核糖体生成和蛋白翻译<sup>[37]</sup>,其抑制可减少肿瘤生长所需的生物合成;(2)恢复自噬平衡:AMPK 被激活时,在丝氨酸 317、丝氨酸 777 等位点磷酸化 ULK1,激活其激酶活性,并抑制 mTORC1,解除其对 ULK1 的抑制,启动自噬,而 mTORC1 是自噬的关键负调控因子,其抑制可激活自噬性细胞死亡<sup>[38-41]</sup>。

本研究揭示鳖甲煎丸通过“ROS/ATP $\rightarrow$ AMPK/mTOR/ULK1”轴发挥抗肝癌作用。其中,ROS 积累和 ATP 耗竭是线粒体功能障碍的直接表现,而 AMPK/mTOR 通路激活则通过双重调控(抑制合成代谢/促进分解代谢)放大抗肿瘤效应。与阳性对照药二甲双胍相比,鳖甲煎丸的抑瘤率虽略低,但依然显示出较强的抑瘤效果及多靶点调控能力。二甲双胍作为经典的 AMPK 激动剂,其抗肿瘤机制明确,在本研究中表现出更显著的抑瘤效果,提示其作为单药抗肿瘤的优越性;而鳖甲煎丸作为传统中药复方,成分复杂、作用途径多样,不仅通过调节线粒体能量代谢和氧化应激发挥作用,还可能影响免疫微环境和细胞凋亡等路径,具备多层次、多靶点的综合抗癌潜力。在安全性方面,鳖甲煎丸展现出潜在优势。与部分化学药物相比,中药复方通常副作用较小,长期使用更为安全。二甲双胍虽具有良好的抗肿瘤效果,但长期大剂量使用可能伴随乳酸酸中毒、胃肠不适等风险。鳖甲煎丸基于传统中药配伍,临床安全性较高,副作用相对较少,具有更好的耐受性。这一机制与鳖甲煎丸“活血化瘀、解毒消癥”的中医功效相呼应,也为靶向能量代谢的肝癌治疗提供了新策略。本研究为鳖甲煎丸的抗肝癌作用提供了重要的实验依据,丰富了传统中医药在现代肿瘤治疗中的应用理论。但目前仍有不足:本研究仅聚焦于 AMPK/mTOR 通路,未来需结合转录组或代谢组学探索鳖甲煎丸对其他代谢节点(如糖酵解、脂质合成)的影响。此外,需在自发性肝癌模型中验证其疗效,以更贴近临床病理特征。未来工作应进一步明确

鳖甲煎丸中的关键活性成分及其作用机制,探索其与现代抗肿瘤药物的联合应用效果,评估协同抗癌潜力和安全性,为其临床推广提供更坚实的基础。

**伦理学声明:** 本研究方案于2024年6月3日经由广西中医药大学伦理委员会审批,批号:DW20240603165,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:** 卢露、陈焕灵负责课题设计,起草论文;卢露、吴颖升、徐健、班惟负责实验操作,研究过程的实施;卢露、吴颖升、陈焕灵、刘晓丽负责数据收集,统计学分析,绘制图表;杜沅沁、卢露、吴成挺负责拟定写作思路;黄晶晶、黄鸿娜负责指导撰写文章并最后定稿。

## 参考文献:

- [1] DENG XX, LI H, ZHONG YR, et al. Burden of liver cancer attributable to hepatitis B and alcohol globally, in China, and for five sociodemographic index regions from 1990 to 2021: A population-based study[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2025, 13(1): 1-14. DOI: 10.14218/JCTH.2024.00351.
- [2] ZHOU Y, DING JM, QIN ZY, et al. Predicting the survival rate of patients with hepatocellular carcinoma after thermal ablation by nomograms[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(18): 1159. DOI: 10.21037/atm-20-6116.
- [3] CAO MD, XIA CF, CAO MM, et al. Attributable liver cancer deaths and disability-adjusted life years in China and worldwide: Profiles and changing trends[J]. *Cancer Biol Med*, 2024, 21(8): 679-691. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2024.0149.
- [4] LIU Y, ZHENG JX, HAO JL, et al. Global burden of primary liver cancer by five etiologies and global prediction by 2035 based on global burden of disease study 2019[J]. *Cancer Med*, 2022, 11(5): 1310-1323. DOI: 10.1002/cam4.4551.
- [5] YU Z, MAN XW, JIANG Y, et al. Analysis of hospitalization expenses and influencing factors of 5 487 patients with liver cancer in Beijing[J]. *Chin J Health Stat*, 2020, 37(5): 748-751. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3674.2020.05.029.  
于哲, 满晓玮, 蒋艳, 等. 北京市5 487例肝癌患者住院费用及影响因素分析[J]. *中国卫生统计*, 2020, 37(5): 748-751. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3674.2020.05.029.
- [6] RANKOVIĆ B, HAUPTMAN N. Circulating microRNA panels for detection of liver cancers and liver-metastasizing primary cancers[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15451. DOI: 10.3390/ijms242015451.
- [7] ZENG LL, ZHU LT, FU SS, et al. Mitochondrial dysfunction-molecular mechanisms and potential treatment approaches of hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2025, 480(4): 2131-2142. DOI: 10.1007/s11010-024-05144-4.
- [8] FAUBERT B, SOLMONSON A, DEBERARDINIS RJ. Metabolic reprogramming and cancer progression[J]. *Science*, 2020, 368(6487): eaaw5473. DOI: 10.1126/science.aaw5473.
- [9] LI YF, XU JJ, LAN T, et al. Biejiajian Pill inhibits the malignant biological behavior of Hep3B cells through CMTM6[J]. *J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci*, 2025, 46(3): 522-531. DOI: 10.7652/jdyxb202503021.  
李尹凡, 徐隽婕, 兰涛, 等. 鳖甲煎丸通过CMTM6抑制Hep3B细胞的恶性生物学行为[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2025, 46(3): 522-531. DOI: 10.7652/jdyxb202503021.
- [10] 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 $\beta$  signal axis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2024, 30(4): 107-113. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230730.  
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]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(4): 107-113. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20230730.
- [11] FENG MH, HE SQ, HUANG SZ, et al. Inhibitory effect of Biejiajian pills against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats[J]. *J South Med Univ*, 2020, 40(8): 1148-1154. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.08.12.  
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. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.08.12.
- [12] YU XP, WANG SY, MENG QG, et al. Exploring regulatory mechanism of Biejiajian pill on hepatocellular carcinoma based on bioinformatics[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2025, 43(4): 82-89. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.015.  
于欣萍, 王诗尧, 孟庆刚, 等. 基于生物信息学探究鳖甲煎丸对肝细胞癌的调控机制[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(4): 82-89. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.015.
- [13] National Institutes of Health Office of Laboratory Animal Welfare. Animal use and management[EB/OL]. (2024-11-25) [2025-04-22]. <https://olaw.nih.gov/guidance/topic-index/animal-use.htm>.
- [14] KUAI Z, CHAO X, HE YT, et al. Metformin attenuates inflammation and boosts autophagy in the liver and intestine of chronologically aged rats[J]. *Exp Gerontol*, 2023, 184: 112331. DOI: 10.1016/j.exger.2023.112331.
- [15] WANG GF, GAO H, DAI SN, et al. Metformin inhibits neutrophil extracellular traps-promoted pancreatic carcinogenesis in obese mice[J]. *Cancer Lett*, 2023, 562: 216155. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216155.
- [16] YENİMİŞ G, BEŞLİ N, YAPRAK SARAÇ E, et al. Metformin promotes apoptosis in primary breast cancer cells by downregulation of cyclin D1 and upregulation of P53 through an AMPK-alpha independent mechanism[J]. *Turk J Med Sci*, 2021, 51(2): 826-834. DOI: 10.3906/sag-1908-112.
- [17] DAS BK, KNOTT RM, GADAD PC. Metformin and asarone inhibit HepG2 cell proliferation in a high glucose environment by regulating AMPK and Akt signaling pathway[J]. *Future J Pharm Sci*, 2021, 7(1): 43. DOI: 10.1186/s43094-021-00193-8.
- [18] LUO S, SCHOOLING CM, WONG ICK, et al. Evaluating the impact of AMPK activation, a target of metformin, on risk of cardiovascular diseases and cancer in the UK Biobank: A Mendelian randomisation study[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(11): 2349-2358. DOI: 10.1007/s00125-020-05243-z.
- [19] TAN QW, XU J, ZHU RH, et al. Effects of Biejia Jianwan on the tumorigenicity and dryness of liver cancer stem cells by regulating miR-140[J]. *Jilin J Chin Med*, 2024, 44(1): 90-95. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyzy.2024.01.021.  
谭钦文, 徐健, 朱荣火, 等. 鳖甲煎丸调控 miR-140 对肝癌干细胞致瘤性及干性的影响[J]. *吉林中医药*, 2024, 44(1): 90-95. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzyzy.2024.01.021.
- [20] 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. DOI: 10.12449/JCH250216.  
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. DOI: 10.12449/JCH250216.
- [21] LIN HS, TAN JN, FANG QL, et al. Analysis of the circRNA expression profile in hepatocellular carcinoma cells inhibited by Biejia Jianwan[J]. *Genom Appl Biol*, 2025, 44(5): 511-519. DOI: 10.13417/j.gab.044.000511.  
林洪升, 谭金娜, 方巧玲, 等. 鳖甲煎丸抑制肝癌细胞的环状 RNA 表达谱分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2025, 44(5): 511-519. DOI: 10.13417/j.gab.044.000511.

- [22] CHEN WG, HE CY, WEN B, et al. Biejiajian pill regulates ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells via p62/Keap1/NRF2 signaling pathway: A mechanism study[J]. J Sichuan Univ Med Sci, 2025, 56(1): 51-58. DOI: 10.12182/20250160502.  
陈伟光, 何春雨, 文彬, 等. 鳖甲煎丸通过 p62/Keap1/NRF2 信号通路调控肝癌细胞铁死亡的作用机制研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2025, 56(1): 51-58. DOI: 10.12182/20250160502.
- [23] SUN JL, WEN B, YANG XM, et al. Mechanism research of regulation of proliferation and metastasis of hepatoma cells Hep3B by Biejiajian Pill based on PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(3): 1361-1365.  
孙嘉玲, 文彬, 杨雪梅, 等. 基于 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  信号通路探讨鳖甲煎丸调控肝癌细胞 Hep3B 增殖转移的机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1361-1365.
- [24] HUANG JJ, HUANG HN, WANG XJ, et al. Bie Jia Jian pill enhances the amelioration of bone mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma progression[J]. J Nat Med, 2022, 76(1): 49-58. DOI: 10.1007/s11418-021-01548-4.
- [25] WANG WL, SUN Q, WU ZH, et al. Mitochondrial dysfunction-related genes in hepatocellular carcinoma[J]. Front Biosci, 2013, 18(3): 1141-1149. DOI: 10.2741/4169.
- [26] LEE HY, NGA HT, TIAN JW, et al. Mitochondrial metabolic signatures in hepatocellular carcinoma[J]. Cells, 2021, 10(8): 1901. DOI: 10.3390/cells10081901.
- [27] van der BLIEK AM, SEDENSKY MM, MORGAN PG. Cell biology of the mitochondrion[J]. Genetics, 2017, 207(3): 843-871. DOI: 10.1534/genetics.117.300262.
- [28] HU CX, HUANG Y, LI LJ. Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): 144. DOI: 10.3390/ijms18010144.
- [29] SHADEL GS, HORVATH TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis[J]. Cell, 2015, 163(3): 560-569. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.001.
- [30] TIAN CW, LIU YF, LI ZS, et al. Mitochondria related cell death modalities and disease[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 832356. DOI: 10.3389/fcell.2022.832356.
- [31] HSU CC, PENG DN, CAI Z, et al. AMPK signaling and its targeting in cancer progression and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 52-68. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.04.006.
- [32] TREFTS E, SHAW RJ. AMPK: Restoring metabolic homeostasis over space and time[J]. Mol Cell, 2021, 81(18): 3677-3690. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.015.
- [33] FANG GX, ZHANG PL, LIU JF, et al. Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity suppresses HCC malignant phenotype by inhibiting glycolysis via activating AMPK/mTOR signaling[J]. Cancer Lett, 2019, 463: 11-26. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.08.003.
- [34] LIU YF, XU YY, WANG F, et al. Inhibition of AMPK activity by TRIM11 facilitates cell survival of hepatocellular carcinoma under metabolic stress[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(12): e617. DOI: 10.1002/ctm2.617.
- [35] MENG SS, GU HW, ZHANG T, et al. Gradual deterioration of fatty liver disease to liver cancer via inhibition of AMPK signaling pathways involved in energy-dependent disorders, cellular aging, and chronic inflammation[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1099624. DOI: 10.3389/fonc.2023.1099624.
- [36] JUNG TY, RYU JE, JANG MM, et al. Naa20, the catalytic subunit of NatB complex, contributes to hepatocellular carcinoma by regulating the LKB1-AMPK-mTOR axis[J]. Exp Mol Med, 2020, 52(11): 1831-1844. DOI: 10.1038/s12276-020-00525-3.
- [37] ZHOU XJ, CHEN Y, WANG FF, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells[J]. Chem Biol Interact, 2020, 331: 109273. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109273.
- [38] JIA L, LIN XR, GUO WY, et al. Salvia chinensis Benth induces autophagy in esophageal cancer cells via AMPK/ULK1 signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 995344. DOI: 10.3389/fphar.2022.995344.
- [39] NAIK PP, MUKHOPADHYAY S, PRAHARAJ PP, et al. Secretory clusterin promotes oral cancer cell survival via inhibiting apoptosis by activation of autophagy in AMPK/mTOR/ULK1 dependent pathway[J]. Life Sci, 2021, 264: 118722. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118722.
- [40] WANG CM, CIGLIANO A, JIANG LJ, et al. 4EBP1/eIF4E and p70S6K/RPS6 axes play critical and distinct roles in hepatocarcinogenesis driven by AKT and N-Ras proto-oncogenes in mice[J]. Hepatology, 2015, 61(1): 200-213. DOI: 10.1002/hep.27396.
- [41] XU M, WANG ZJ, WU ZS, et al. Autophagy activated by the AMPK/mTOR/ULK1 pathway involves AURKB-mediated microglial in neuropathic pain[J]. Brain Behav Immun, 2025, 129: 948-959. DOI: 10.1016/j.bbi.2025.07.019.

收稿日期: 2025-07-12; 录用日期: 2025-10-15

本文编辑: 王莹

引证本文: LU L, CHEN HL, XU J, et al. Effect and mechanism of Biejiajian Pill on subcutaneous xenograft tumor model of hepatocellular carcinoma Huh7 cells[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(1): 125-133.

卢露, 陈焕灵, 徐健, 等. 鳖甲煎丸对肝癌 Huh-7 细胞皮下移植裸鼠模型的影响及作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(1): 125-133.