

李以恒,徐隽婕,兰涛,等. 鳖甲煎丸对肝癌 Huh7 细胞恶性生物学行为的影响及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(7): 44-54.

Li YH, Xu JJ, Lan T, et al. Study on the effect and mechanism of Biejiajian pill on the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma Huh7 cells [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(7): 44-54.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.07.005

## 鳖甲煎丸对肝癌 Huh7 细胞恶性生物学行为的影响及机制研究

李以恒<sup>1</sup>,徐隽婕<sup>2</sup>,兰涛<sup>3</sup>,李鑫<sup>3</sup>,张荣花<sup>1</sup>,熊亚南<sup>1</sup>,朱丽华<sup>1</sup>,章广玲<sup>2\*</sup>

(1.华北理工大学基础医学院,河北省慢性疾病重点实验室,河北唐山 063210;

2.华北理工大学临床医学院,河北省医工融合精准医疗重点实验室,河北唐山 063000;

3.河北省沧州市人民医院肝胆胰外科,河北沧州 061000)

**【摘要】目的** 本研究旨在阐明鳖甲煎丸(Biejiajian pill,BJJP)含药血清对肝癌 Huh7 细胞恶性生物学行为的作用及机制。**方法** 通过趋化素样因子超家族 6 的 siRNA 敲降细胞中 CMTM6 表达。利用健康 SD 大鼠制备正常大鼠血清以及低(0.55 g/kg)、中(1.1 g/kg)、高(2.2 g/kg)浓度的 BJJP 含药血清,对数生长期的肝癌 Huh7 细胞分别给予正常胎牛血清(BC)、正常大鼠血清(NC)培养及低、中、高剂量的 BJJP 含药血清(LBJJP、MBJJP 和 HBJJP)培养。BJJP 含药血清和 si-CMTM6 分别作用于肝癌 Huh7 后,通过 CCK-8 法评估细胞的增殖能力、Transwell 检测细胞的迁移与侵袭能力,利用 Western blot 检测增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、上皮-间质转化(EMT)关键标志物及 CMTM6 的蛋白表达。**结果** 敲降 CMTM6 后,与阴性对照组(si-NC)相比,敲降 CMTM6 组(si-CMTM6)能够降低 Huh7 细胞中 CMTM6 mRNA 和蛋白的表达( $P < 0.05$ )。与 BC 组相比,NC 组 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭数量及 PCNA、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 和 CMTM6 蛋白表达水平均无明显差异(均  $P > 0.05$ )。经 BJJP 含药血清处理后,Huh7 细胞的增殖速率显著降低,迁移及侵袭细胞数减少( $P < 0.05$ );Western blot 分析显示,与正常大鼠血清组相比 BJJP 含药血清处理组 PCNA、CMTM6、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达量显著下调,而 E-cadherin 表达量显著上调(均  $P < 0.05$ )。CMTM6 敲降后,可有效抑制 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭能力,同时伴随 PCNA、Vimentin、N-cadherin 蛋白下调及 E-cadherin 蛋白上调(均  $P < 0.05$ )。**结论** BJJP 含药血清可显著抑制 Huh7 肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT 进程,且呈剂量依赖性;该作用可能与下调 CMTM6 蛋白表达有关。

**【关键词】** 鳖甲煎丸;肝癌;增殖;迁移;侵袭;上皮-间质转化;CMTM6

**【中图分类号】** R735.7;R285.5;R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2025)07-0044-11

### Study on the effect and mechanism of Biejiajian pill on the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma Huh7 cells

LI Yiheng<sup>1</sup>, XU Junjie<sup>2</sup>, LAN Tao<sup>3</sup>, LI Xin<sup>3</sup>, ZHANG Ronghua<sup>1</sup>, XIONG Yanan<sup>1</sup>,  
ZHU Lihua<sup>1</sup>, ZHANG Guangling<sup>2\*</sup>

**【基金项目】**河北省自然科学基金资助项目(H2023209047,H2024209077);河北省中央引导地方科技发展资金项目(246Z7720G);河北省创新能力提升计划——高水平人才团队建设专项(205A7701H)。

**【作者简介】**李以恒(2000—),男,在读硕士研究生,研究方向:中药治疗肝癌的机制研究。E-mail:2217274768@qq.com

**【通信作者】**章广玲(1972—),女,博士,教授,研究方向:中药治疗肝癌的机制研究。E-mail:zhanggl@ncst.edu.cn

1. Hebei Provincial Key Laboratory for Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China.
2. Hebei Provincial Key Laboratory of Medical-Industrial Integration Precision Medicine, School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000.
3. Hepatobiliary Pancreatic Surgery Department, Hebei Provincial Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000)

**【Abstract】 Objective** To elucidate the effects and mechanisms of Biejiajian pill (BJJP)-containing serum on the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma Huh7 cells. **Methods** This research knocked down CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6 (CMTM6) expression using a CMTM6-specific small interfering RNA (siRNA). Healthy Sprague-Dawley rats were used to prepare normal rat serum and low- (0.55 g/kg), medium- (1.1 g/kg), and high- (2.2 g/kg) BJJP-containing. Huh7 cells were cultured with normal fetal bovine serum (BC), normal rat serum (NC), and low-, medium-, and high-dose BJJP serum (LBJJP, MBJJP, and HBJJP, respectively). BJJP-containing serum and si-CMTM6 were applied to Huh7 cancer cells, and the proliferation, migration, and invasion abilities were evaluated by CCK-8 and Transwell assays, respectively. Protein expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, and CMTM6 were detected by Western blot. **Results** CMTM6 knockdown significantly reduced the mRNA and protein expression level of CMTM6 in Huh7 cells ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences between the BC and NC groups in terms of cell proliferation, migration, invasion, expression levels of PCNA, EMT markers, and CMTM6 (all  $P > 0.05$ ). BJJP-containing serum markedly inhibited Huh7 cell proliferation, migration, and invasion ( $P < 0.05$ ), downregulated PCNA, CMTM6, N-cadherin, and Vimentin expression, and upregulated E-cadherin compared with the NC group (all  $P < 0.05$ ). CMTM6 knockdown suppressed malignant behaviors, with reduced PCNA, Vimentin, and N-cadherin and elevated E-cadherin expression (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** BJJP-containing serum can significantly inhibit Huh7 cell growth, invasion, migration, and EMT progression, potentially mediated via CMTM6 suppression.

**【Keywords】** Biejiajian pill; hepatocellular carcinoma; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition; CMTM6

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是全球癌症相关死亡的主要因素之一,严重威胁人类健康<sup>[1]</sup>。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是该病最常见的病理类型,占有病例的90%以上<sup>[2]</sup>。尽管肝癌治疗在手术切除、肝移植及靶向免疫疗法等领域取得显著进展,患者远期生存率仍不理想<sup>[3]</sup>。开发安全高效的抗肝癌药物具有迫切需求。

中药复方凭借多组分、多靶点的独特优势,在肿瘤治疗中展现出化学合成药物难以替代的价值<sup>[4]</sup>。鳖甲煎丸(Biejiajian pill, BJJP)源于《金匮要略》,由鳖甲、蜂房、阿胶等23味药材配伍而成,寒热并调、攻补兼施,可发挥行气活血、化瘀散结之效<sup>[5]</sup>。BJJP作为一种辅助治疗可能通过抗炎、保肝、抗肿瘤等作用缓解肝病相关症状<sup>[6]</sup>。近年来的研究显示,CMTM6在多种癌细胞中通过调控相应蛋白的表达,在肿瘤细胞增殖、迁移以

及EMT进程中发挥多种作用<sup>[7,8]</sup>。课题组前期研究发现BJJP能够显著抑制肝星状细胞增殖活化<sup>[9]</sup>,但BJJP在肝癌发生发展过程中的作用尚未见报道。因此,本文利用BJJP含药血清和CMTM6的siRNA设计实验探讨BJJP对肝癌细胞Huh7恶性生物学行为的作用以及发挥作用的机制。以期BJJP在肝癌治疗中的应用,以及探索肝癌早期诊断、预防及精准治疗的核心生物标志物与新型治疗靶点,奠定坚实的实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

实验对象为河南斯克贝斯生物科技股份有限公司[SCXK(豫)2020-0005]提供的72只7~8周龄健康雄性SPF级SD大鼠,体质量(130±10)g,饲养于华北理工大学实验动物中心[SYXK

(冀)2020-007]。本研究严格遵守动物伦理规范,经华北理工大学实验动物伦理委员会审批通过(SQ20230147),且全程执行 3R(替代、减少、优化)原则。

### 1.1.2 细胞

人肝癌 Huh7 细胞购自武汉普诺赛公司。

## 1.2 主要试剂与仪器

BJJP(国药集团中联药业有限公司,批号:221330);DMEM 高糖培养基(EallBio 公司,批号:C003);胎牛血清(普诺赛生物科技有限公司,批号:SA240119);EDTA 胰酶(中生奥邦生物科技有限公司,批号:20230925);Polymerase MF166-g DNA remover 逆转录试剂盒(聚合美生物技术公司,批号:22JZ1002); $2\times$ M5 Hiper SYBR Premix EsTaq(聚合美生物技术公司,批号:24EW0411);BCA 蛋白定量试剂盒(雅酶生物医药科技有限公司,批号:03851050);CCK-8 试剂盒(亿奥邦生物科技研究有限公司,批号:202312);羊抗兔二抗(普利莱基因技术有限公司,批号:C1309);羊抗鼠二抗(普利莱基因技术有限公司,批号:C1308);E-cadherin 兔多抗(Affinity 公司,批号:#32P9942);N-cadherin 和 Vimentin 兔单克隆抗体(华安生物技术有限公司,批号:#6619511)。

正置显微镜(Olympus 公司,日本);酶标仪(Bio-Rad 公司,美国);生物安全柜、细胞培养箱(Thermo 公司,美国);水浴锅(长安科学仪器有限公司,北京);微型离心机(新康医疗器械有限公司,江苏);水平摇床(泰州诺米医疗有限公司);Transwell 细胞培养小室(Corning 公司,美国)。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 鳖甲煎丸含药血清的制备

本研究纳入 72 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠,随机分为对照组、低(0.55 g/kg)、中(1.1 g/kg)、高(2.2 g/kg)3 个 BJJP 剂量组,每组 18 只。各组按 12 h 间隔连续接受 3 d 灌胃干预,其中对照组以等量生理盐水替代药物处理。末次给药 2 h 后,于无菌条件下经腹主动脉穿刺采血。全血样本于室温静置 4 h 形成充分凝块后,经梯度离心(3500 r/min,15 min)获取上层血清。随后采用 56 °C 水浴灭活补体系统,并通过 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜完成除菌处理,最终分装保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

### 1.3.2 细胞培养及分组

研究采用人肝癌 Huh7 细胞系作为实验模型,细胞在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基中进行体外扩增,培养基配置过程中添加浓度 1%的青霉素-链霉素双抗溶液以控制微生物污染,维持于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养环境。选取处于对数增殖期且形态学特征稳定的细胞群体,设立以下实验组:正常胎牛血清(BC)组、正常大鼠血清(NC)组及 0.55 g/kg(LBJJP)、1.1 g/kg(MBJJP)、2.2 g/kg(HBJJP)3 个剂量梯度的 BJJP 含药血清组。各组细胞分别暴露于含 10%对应血清的培养基中持续干预 48 h,随后开展功能学检测。

### 1.3.3 细胞转染

对数生长期且状态良好的 Huh7 细胞,按  $8\times 10^5$ /孔细胞均匀的铺板于 6 孔培养体系。待细胞贴壁后,采用 Lipofectamine™ 2000 转染系统将 si-NC、si-CMTM6-1、si-CMTM6-2 和 si-CMTM6-3 分别转染肝癌细胞系 Huh7 细胞,转染 48 h 后进行后续实验。

### 1.3.4 CCK-8 测定

各组经 BJJP 干预或基因转染 48 h,将细胞消化后制备单细胞悬液并进行定量,按  $8\times 10^3$ /孔的浓度均匀分配至 96 孔培养板,将接种后的培养板置于标准细胞培养条件(37 °C、5% CO<sub>2</sub>)中进行连续培养。分别在培养 24、48、72、96 h 的时间节点,向各检测孔中加入由 10  $\mu$ L CCK-8 检测试剂与 100  $\mu$ L 无抗生素基础培养基组成的混合检测体系。孵育 2 h 后,使用多功能酶标仪在 450 nm 特征波长下测定各孔吸光度值(OD 值)。

### 1.3.5 细胞迁移和侵袭实验

采用 Transwell 实验系统(24 孔规格,8  $\mu$ m 孔径)进行细胞迁移与侵袭能力检测。具体而言,上层腔室中注入 150  $\mu$ L 无血清培养基,下层腔室填充 650  $\mu$ L 含 20%胎牛血清的趋化诱导培养基。针对侵袭实验的特殊需求,需预先在聚碳酸酯膜表面形成 Matrigel 基质胶层(厚度 60~80  $\mu$ m),其余实验参数设置与迁移实验保持完全一致。各组细胞按  $8\times 10^4$ /150  $\mu$ L 的细胞密度接种于 Transwell 上室。37 °C 培养 24 h 后,用 4%多聚甲醛固定迁移至下室的细胞,0.1%结晶紫染色 10 min,正置显微镜采集图像,Image J(1.53t)软件分

析迁移细胞数量。

### 1.3.6 Western blot 试验检测 PCNA、CMTM6 及 EMT 相关标志物的蛋白表达水平

采用 Western blot 检测目标蛋白表达。细胞裂解后,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定裂解液总蛋白浓度。取等量蛋白样本经 SDS-PAGE 分离,随后电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。室温下,应用 5%脱脂牛奶(TBST 配制)封闭膜上非特异性结合位点 1 h。实验采用梯度抗体孵育策略,首先于 4 °C 条件下分别与特异性一抗(PCNA、CMTM6、Vimentin 按 1:1000 稀释;E-cadherin、N-cadherin 按 1:3000 稀释;GAPDH 按 1:10 000 稀释)进行 12 h 低温结合反应。完成一抗反应后,继续与 HRP 标记的二抗工作液(1:5000 稀释)在常温条件下进行 2 h 结合反应。经 ECL 化学发光底物完成显影操作后,运用 Image J (1.53t)图像分析系统,对目标蛋白条带进行灰度值实施精准定量分析,以获取蛋白表达数据。

### 1.3.7 qRT-PCR 检测 CMTM6 基因表达水平

采用 TRIzol 一步法对经分组转染处理 24 h 后的人肝癌 Huh7 细胞系进行总 RNA 抽提。使用微量紫外分光光度计测定 RNA 纯度,随后参照 Polymerase MF166-g DNA remover 逆转录试剂盒标准流程执行以下操作:首先完成基因组 DNA 去除步骤,继而合成 cDNA 的第一链,终产物用 40 μL 经 DEPC 处理的超纯水进行溶解,保存于 -20 °C 低温环境以备后续分析。qRT-PCR 检测 CMTM6 的表达水平,GAPDH 为内参。引物序列如下:CMTM6 (hsa): F-5'-GTACAGCCCCACTACGGAGGAG-3', R-5'-GCCAGCAGAGACAGCAACAGC-3'; GAPDH (hsa): F-5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3', R-5'-TCCCGTTGATGACCAGCTTC-3'。严格遵循 MF787 型核酸扩增试剂盒操作规范,在八联管反应板中构建 20 μL 标准反应体系。热循环程序设置为:初始预变性 95 °C/30 s;后续循环参数为 95 °C/5 s 变性→60 °C/34 s 退火(基于引物-模板特异性结合)→72 °C/30 s 延伸(Taq 酶最适活性温度),共进行 40 轮扩增。通过实时荧光监测系统记录荧光信号阈值循环数(Ct 值),实验进行 3 次生物学重复验证。

## 1.4 统计学方法

本研究严格遵循可重复性准则( $n \geq 3$ ),实验

数据的统计学处理及可视化由 GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., USA) 完成。经 Shapiro-Wilk 正态性检验和 Levene 方差齐性验证的定量数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )呈现。针对不同组间比较需求,采用分层统计策略;3 组及以上样本通过单因素方差分析进行整体差异分析,若存在显著性差异则进一步采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 法进行组间两两比较;组间差异采用双侧双样本 *t* 检验进行分析。统计显著性阈值设定为  $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CMTM6 转染效率的检测

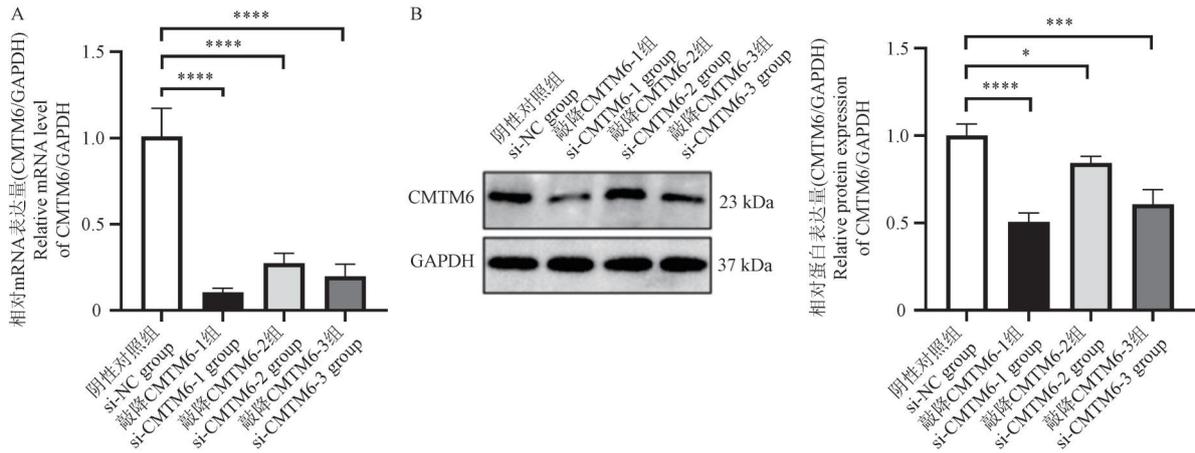
为调控 Huh7 细胞中 CMTM6 的表达,分别转染阴性对照组、敲降 CMTM6-1 组、敲降 CMTM6-2 组和敲降 CMTM6-3 组,分别采用 qRT-PCR 和 Western blot 技术,在 mRNA 和蛋白层面检测 CMTM6 的表达情况,用于评估转染效果。qRT-PCR 和 Western blot 结果提示,相较于阴性对照组,敲降 CMTM6-1 组能够显著降低 CMTM6 mRNA (图 1A) 和蛋白 (图 1B) 的表达,且达到最优的基因敲降效果,组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。所以将选取 si-CMTM6-1 进行后续敲降实验,修改名称为 si-CMTM6。

### 2.2 BJJP 含药血清抑制 Huh7 细胞增殖

肝癌 Huh7 细胞的增殖活性经 CCK-8 法评估,分析 BJJP 含药血清不同浓度的干预效应。实验数据显示,正常大鼠血清组与正常胎牛血清组在细胞增殖方面效果相当,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。值得注意的是,经 BJJP 含药血清处理的鳖甲煎丸低剂量、鳖甲煎丸中剂量及鳖甲煎丸高剂量组均显著抑制肝癌 Huh7 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(图 2)。图 3 结果显示,正常大鼠血清组与正常胎牛血清组间的 PCNA 蛋白表达量未呈现显著变化 ( $P > 0.05$ )。BJJP 含药血清处理组表现出明显的 PCNA 蛋白表达下调效应,各剂量组与正常大鼠血清组比较均具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

### 2.3 BJJP 含药血清抑制 Huh7 细胞迁移和侵袭

通过 Transwell 实验评估 BJJP 含药血清梯度浓度对 Huh7 细胞迁移与侵袭的作用。正常胎牛

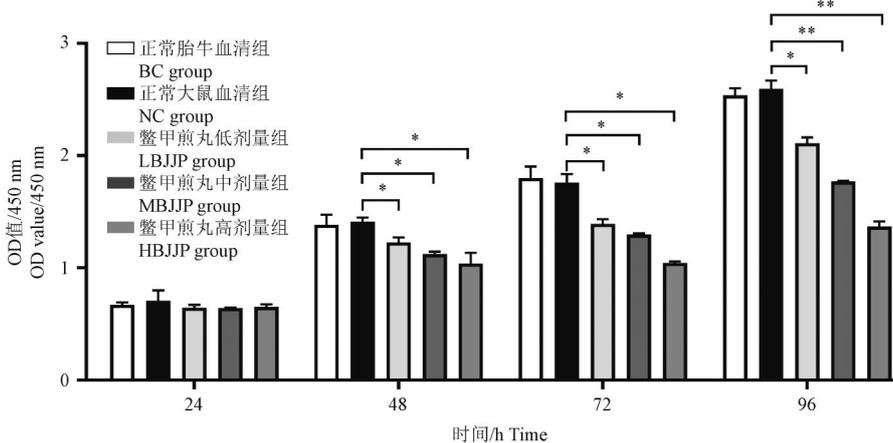


注:A:Huh7 细胞中 CMTM6 mRNA 的表达水平;B:Huh7 细胞中 CMTM6 蛋白表达及量化结果。与阴性对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 1 肝癌 Huh7 细胞中 CMTM6 的敲降效率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. A, Expression level of CMTM6 mRNA in Huh7 cells. B, CMTM6 protein banding and quantification in Huh7 cells. Compared with si-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 1 Knock down efficiency of CMTM6 in Huh7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注:Huh7 细胞的增殖能力。与正常大鼠血清组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 BJJP 含药血清对肝癌 Huh7 细胞增殖的抑制效应( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. Proliferation capacity of Huh7 cells. Compared with NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 2 Inhibitory effect of BJJP-mediated serum on the proliferation of hepatocellular carcinoma Huh7 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

血清组与正常大鼠血清组间的细胞迁移及侵袭能力未产生显著差异( $P > 0.05$ );各浓度处理组较正常大鼠血清组均显著抑制细胞迁移和侵袭(均  $P < 0.05$ ),且抑制效应呈剂量依赖性增强(图 4、图 5)。

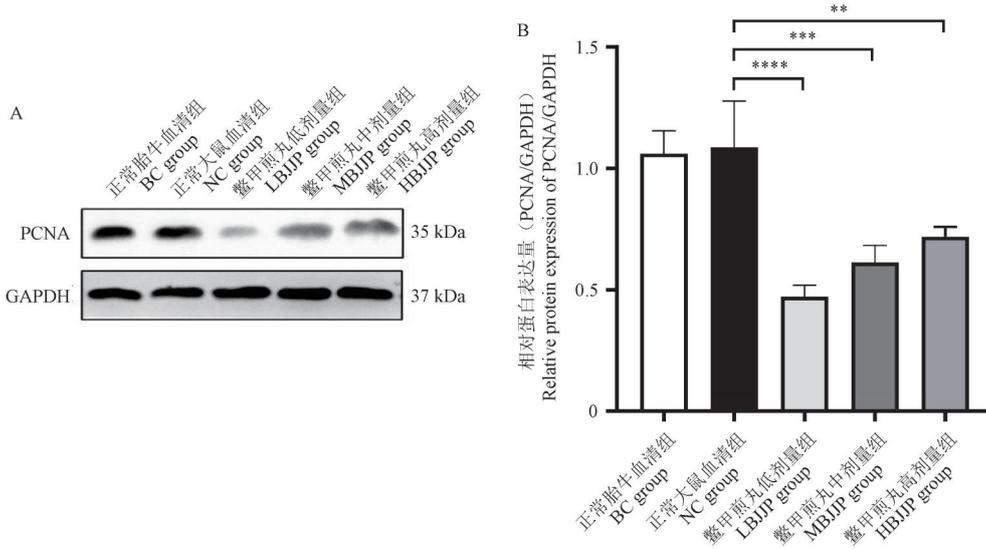
#### 2.4 BJJP 含药血清抑制 Huh7 细胞 EMT 进程及 CMTM6 的表达

Western blot 实验系统评估了 Huh7 细胞中 EMT 进程关键调控蛋白(上皮钙黏蛋白、神经钙黏蛋白、波形蛋白)的表达变化。结果显示,正常胎牛血清与大鼠血清处理均未显著改变 EMT 关

键标志物的表达( $P > 0.05$ );值得注意的是,与正常大鼠血清组相比,中、高剂量 BJJP 含药血清干预后,Huh7 中 E-cadherin 的表达呈浓度依赖性增强,同时 N-cadherin 及 Vimentin 的蛋白表达显著受到抑制(均  $P < 0.05$ ,图 6)。并且,与正常大鼠血清组相比,不同浓度的 BJJP 含药血清均能显著下调 Huh7 细胞中 CMTM6 的表达(均  $P < 0.05$ ,图 7)。

#### 2.5 CMTM6 对 Huh7 细胞增殖的影响

为探究 CMTM6 对肝癌细胞恶性表型的影响,在 Huh7 细胞中分别转染阴性对照和 si-CMTM6。细胞增殖检测显示:与阴性对照组相

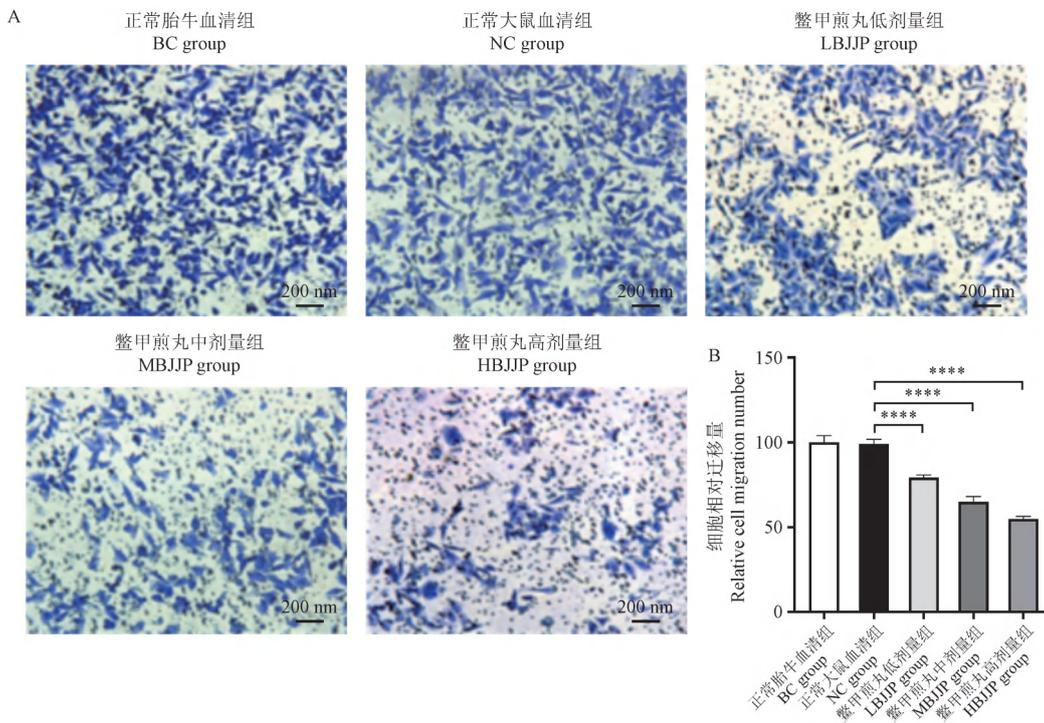


注:A:Huh7 细胞中 PCNA 蛋白表达条带;B:Huh7 细胞内 PCNA 相对蛋白量表达量。与正常大鼠血清组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图 3 BJJP 含药血清处理对 Huh7 细胞 PCNA 表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )。

Note. A, Protein expression band of PCNA in Huh7 cells. B, Relative protein expression of PCNA in Huh7 cells. Compared with NC group, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , \*\*\*\* $P<0.0001$ .

Figure 3 PCNA expression in Huh7 cells following BJJP-mediated serum treatment( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

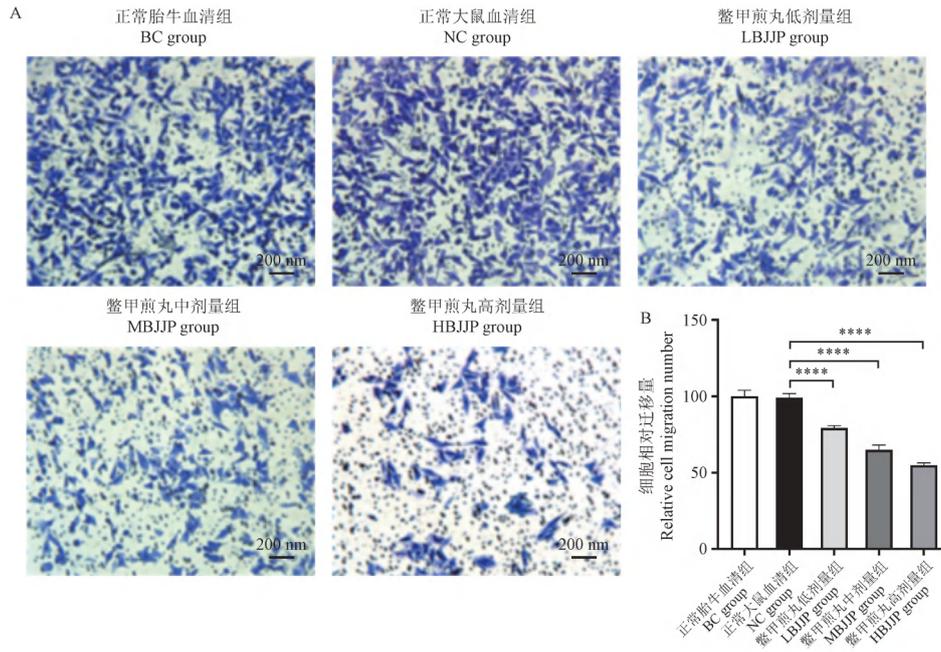


注:A:Huh7 细胞迁移代表图像;B:Huh7 细胞迁移数量。与正常大鼠血清组相比, \*\*\*\* $P<0.0001$ 。

图 4 BJJP 含药血清对 Huh7 肝癌细胞迁移的抑制效应( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Note. A, Huh7 Cell migration representation image. B, Huh7 cell migration of number. Compared with NC group, \*\*\*\* $P<0.0001$ .

Figure 4 Inhibitory effect of BJJP-mediated serum on the migration of Huh7 cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

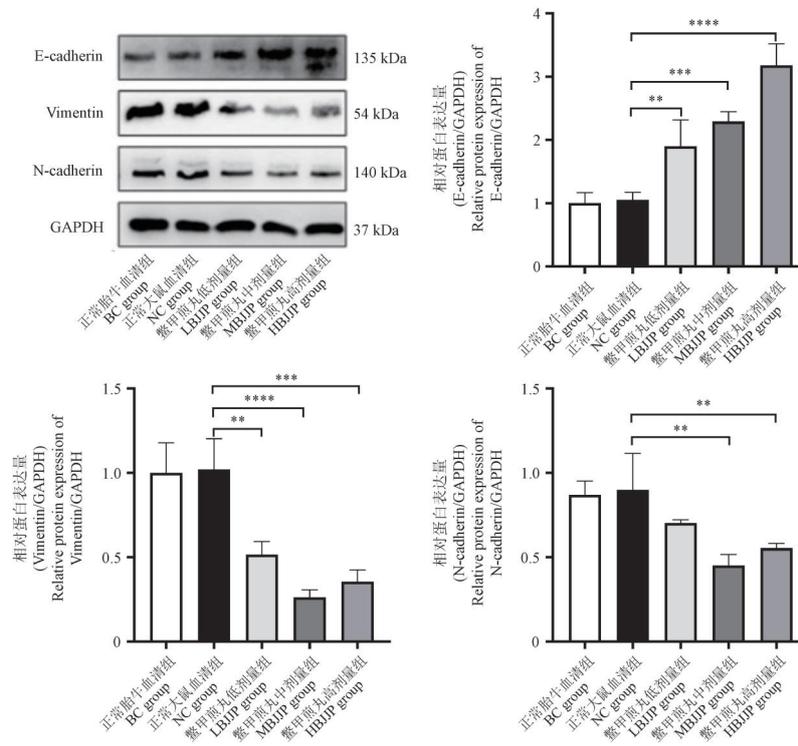


注:A:Huh7 细胞侵袭代表图像;B:Huh7 细胞侵袭数量。与正常大鼠血清组相比, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 5 BJJP 含药血清对 Huh7 肝癌细胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Huh7 Cell invasion representative image. B, Huh7 cells invaded of number. Compared with NC group, \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 5 Effect of BJJP drug-containing serum on invasion ability of Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注:与正常大鼠血清组相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

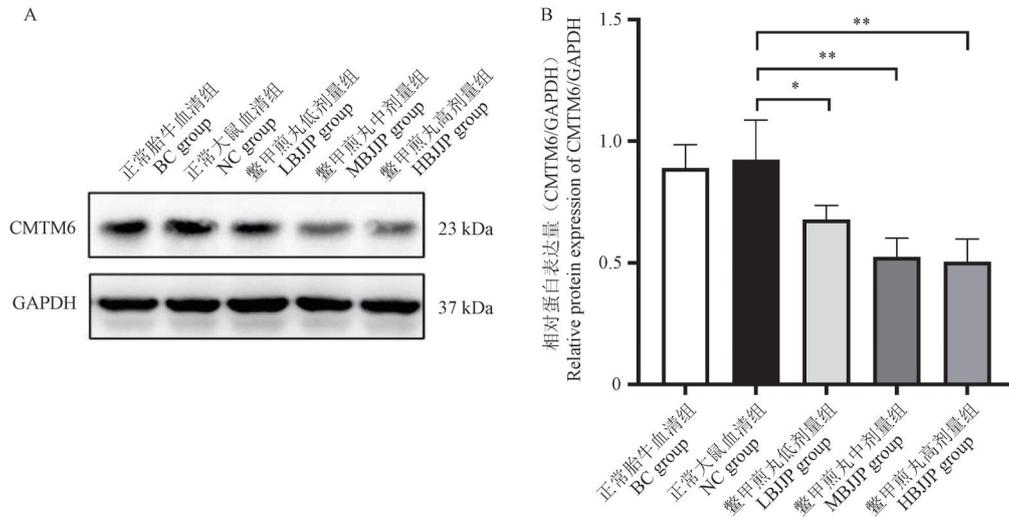
图 6 BJJP 含药血清处理下 Huh7 细胞 EMT 标志物表达分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. Compared with NC group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 6 Effect of BJJP drug-containing serum on EMT markers in Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

比, 敲降 CMTM6 组细胞活力显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 8A)。Western blot 分析进一步揭示, CMTM6

敲降后 PCNA 蛋白表达量较阴性对照组明显下调 ( $P < 0.05$ , 图 8B)。

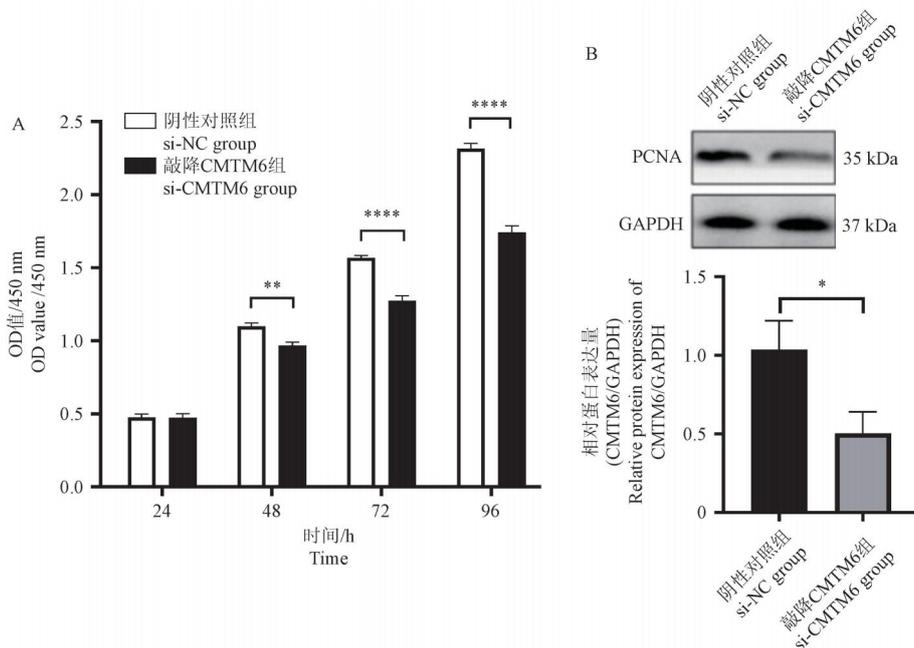


注: A: Huh7 细胞中 CMTM6 的蛋白表达; B: Huh7 细胞中 CMTM6 的量化结果。与正常大鼠血清组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 7 BJJP 含药血清处理对 Huh7 细胞 CMTM6 表达水平的调控 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, CMTM6 protein banding in Huh7 cells. B, CMTM6 quantification in Huh7 cells. Compared with NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 7 Effect of BJJP drug-containing serum on CMTM6 expression in Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注: A: Huh7 细胞的增殖能力; B: Huh7 细胞中 PCNA 的蛋白表达及量化。与阴性对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

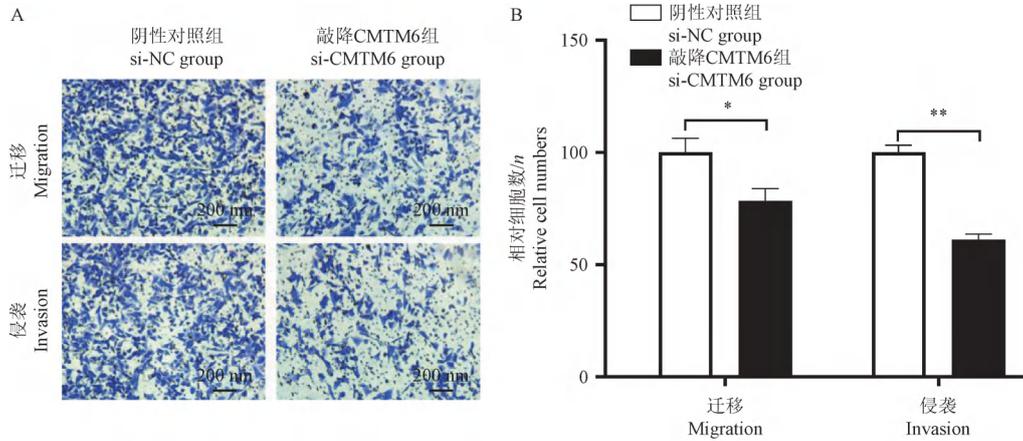
图 8 CMTM6 对 Huh7 细胞增殖能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Proliferation capacity of Huh7 cells. B, Protein banding and quantification of PCNA in Huh7 cells. Compared with si-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 8 Effect of CMTM6 on the proliferation capacity of Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 2.6 CMTM6 对 Huh7 细胞迁移和侵袭及 EMT 进程的影响

通过 Transwell 实验评估 CMTM6 敲降对 Huh7 细胞迁移与侵袭的作用。图 9 显示, 转染后敲降 CMTM6 组细胞的迁移和侵袭数量显著减少

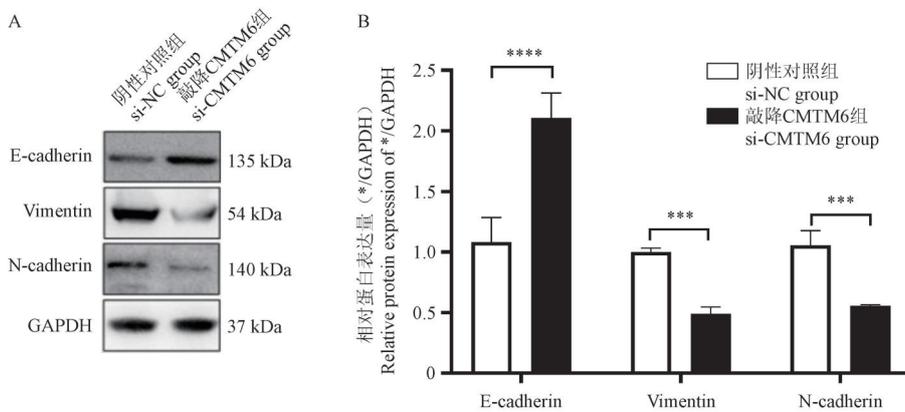


注: A: Huh7 细胞迁移和侵袭代表图像; B: Huh7 细胞迁移和侵袭细胞量化。与阴性对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 9 CMTM6 对 Huh7 细胞迁移和侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Representative images of Huh7 cell migration and invasion. B, Quantification of Huh7 cell migration and invasion. Compared with si-NC group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 9 Effect of CMTM6 on migration and invasion ability of Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



注: A: Huh7 细胞 EMT 标志物 E-cadherin、Vimentin、N-cadherin 蛋白条带; B: 蛋白条带量化结果。与阴性对照组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 10 CMTM6 对 Huh7 细胞中 EMT 标志物的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Huh7 cell EMT markers E-cadherin, Vimentin, N-cadherin protein bands. B, Protein banding results. Compared with si-NC group, \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Fig 10 Effect of CMTM6 on EMT markers in Huh7 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 3 讨论

肝癌的高致死特性使其成为多国癌症防控焦点, 持续增长的发病与死亡数据凸显其全球健康优先事项地位。目前, 中医药干预肝癌具有双

( $P < 0.05$ )。进一步采用 Western blot 法检测 EMT 标志物表达, 发现 CMTM6 敲降后 E-cadherin 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ )、Vimentin 及 N-cadherin 的表达同步下调 ( $P < 0.05$ , 图 10)。表明 CMTM6 通过调控 EMT 进程抑制肝癌细胞转移潜能。

重抗肿瘤机制: 一方面直接抑制肿瘤增殖与转移, 另一方面通过重塑免疫微环境增强机体对癌细胞的免疫监视及清除效能。这种多靶点、整体调节的治疗特性, 凸显了其在肝癌综合治疗中的独特临床价值<sup>[10]</sup>。

传统中药 BJJ 在临床实践中长期应用于治疗各种肝脏疾病,并具有显著疗效。中药是通过口服的方式使用的,经胃肠道吸收进入血液后随体循环系统分布到各组织器官,与靶细胞结合而发挥疗效,有的原形成分必须经过体内转化或代谢后才产生药效<sup>[11]</sup>。因此,本文通过给 SD 大鼠灌胃 BJJ 获得 BJJ 的含药血清,此方法通过模拟药物在人体内的代谢吸收,获得含有药物有效成分的 BJJ 含药血清。利用 CCK-8、Western blot 实验,对 BJJ 含药血清影响肝癌 Huh7 细胞增殖能力以及增殖标志物 PCNA 表达的情况展开检测,实验数据证实,其可下调肝癌 Huh7 细胞增殖能力。肝癌治疗面临的主要挑战在于高复发率及高度侵袭性;肺转移与淋巴结转移是其常见转移途径<sup>[12]</sup>。利用 Transwell、Western blot 实验分别检测 BJJ 含药血清对肝癌细胞 Huh7 迁移侵袭和 EMT 标志物表达的影响,结果提示,BJJ 含药血清抑制了 Huh7 细胞的迁移侵袭和 EMT 进程。

深入研究 CMTM 家族蛋白的调控机制,对肿瘤及相关疾病的防治具有重要科学及临床价值。CMTM6 作为该超家族成员之一,最新研究表明其在免疫相关疾病及恶性肿瘤的发生发展中扮演关键角色<sup>[13,14]</sup>。CMTM6 在多种肿瘤包括 HCC 中被证实可通过多种途径促进肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮-间质转化(EMT)进程,与肿瘤的恶性进展密切相关<sup>[15,16]</sup>。课题组前期研究已证实,BJJ 能够延缓 CCl<sub>4</sub> 联合高糖高脂饮食诱导的小鼠肝癌的发生和发展,下调其肝组织中 CMTM6 表达<sup>[17]</sup>。Western blot 检测结果表明,BJJ 含药血清可显著下调肝癌 Huh7 细胞中 CMTM6 的蛋白表达。因此,设计 CMTM6 的 siRNA 敲降细胞中 CMTM6 的表达水平,然后通过 CCK-8、Transwell、Western blot 实验证实抑制 CMTM6 表达后,肝癌 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭及 EMT 进程也受到抑制。

综合上述实验结果显示,BJJ 含药血清在调控肝癌 Huh7 细胞生物学行为方面表现出显著作用,可有效抑制 Huh7 细胞的增殖、迁移、侵袭活动,并对 EMT 进程产生阻滞效果。且降低细胞中 CMTM6 的蛋白表达水平;降低肝癌 Huh7 细胞中 CMTM6 的表达水平后,细胞的增殖、迁移、侵袭及

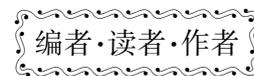
EMT 进程也受到抑制。提示 BJJ 含药血清可能通过抑制 CMTM6 的表达抑制肝癌细胞的恶性生物学作用。

#### 参考文献:

- [1] RUMGAY H, FERLAY J, DE MARTEL C, et al. Global, regional and national burden of primary liver cancer by subtype [J]. *Eur J Cancer*, 2022, 161: 108-118.
- [2] LLOVET J M, KELLEY R K, VILLANUEVA A, et al. Hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 6.
- [3] MANDLIK D S, MANDLIK S K, CHOUDHARY H B. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives [J]. *World J Gastroenterol*, 2023, 29(6): 1054-1075.
- [4] WANG S, LONG S, DENG Z, et al. Positive role of Chinese herbal medicine in cancer immune regulation [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(7): 1577-1592.
- [5] WANG C Y, BAI X Y, WANG C H. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development [J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(3): 543-559.
- [6] 刘思鸿, 李莎莎, 侯西娟, 等. 《金匱要略》鳖甲煎丸临床应用的古今文献研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(6): 12-17.  
LIU S H, LI S S, HOU Y J, et al. Ancient and modern literature on clinical application of Biejia jianwan in medical treasures of the golden chamber [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2020, 26(6): 12-17.
- [7] WANG X L, WANG S, WU Z Z, et al. Overexpression of ATAD2 indicates poor prognosis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(11): 1598-1609.
- [8] SHAHA A, WANG Y, WANG X, et al. CMTM6 mediates the Warburg effect and promotes the liver metastasis of colorectal cancer [J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(9): 2002-2015.
- [9] CUI X, ZHANG R, LI Y, et al. Bie Jia Jian pill ameliorates BDL-induced cholestatic hepatic fibrosis in rats by regulating intestinal microbial composition and TMAO-mediated PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt 2): 118910.
- [10] LAI H C, LIN H J, JENG L B, et al. Roles of conventional and complementary therapies in recurrent hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2023, 15(1): 19-35.
- [11] LIU Y, YANG L. Early metabolism evaluation making traditional Chinese medicine effective and safe therapeutics

- [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(2): 99-106.
- [12] WU W, HE X, ANDAYANI D, et al. Pattern of distant extrahepatic metastases in primary liver cancer: a SEER based study [J]. J Cancer, 2017, 8(12): 2312-2318.
- [13] DUAN H J, LI X Y, LIU C, et al. Chemokine-like factor-like MARVEL transmembrane domain-containing family in autoimmune diseases [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(8): 951-958.
- [14] ZHAO Y, ZHANG M, PU H, et al. Prognostic implications of pan-cancer CMTM6 expression and its relationship with the immune microenvironment [J]. Front Oncol, 2021, 10: 585961.
- [15] LIU Q, WANG J, GUO Z, et al. CMTM6 promotes hepatocellular carcinoma progression through stabilizing  $\beta$ -catenin [J]. Cancer Lett, 2024, 583: 216585.
- [16] HUANG X, XIANG L, WANG B, et al. CMTM6 promotes migration, invasion, and EMT by interacting with and stabilizing vimentin in hepatocellular carcinoma cells [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 120.
- [17] 李鑫, 崔佳林, 赵丹, 等. 程序性死亡配体 1 在肝癌小鼠的表达及鳖甲煎丸的抑制作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29(6): 819-823.
- LI X, CUI J L, ZHAO D, et al. Expression of programmed death ligand 1 in mice with liver cancer and inhibitory effect of Biejiajian pill [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2023, 29(6): 819-823.

[收稿日期] 2025-02-24



## 《中国比较医学杂志》稿约

国内刊号 CN 11-4822/R

国际刊号 ISSN 1671-7856

邮局代号 82-917

### 一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与比较医学相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究进展、继续教育、设施设备、3R 等。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

### 二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zggydw.cnjournals.com>

期待您的来稿!