

# 柴芪益肝颗粒通过铁死亡途径抗肝癌的作用机制研究<sup>△</sup>

刘博文<sup>1\*</sup>, 马贵萍<sup>2</sup>, 李峰<sup>3</sup>, 李晓斌<sup>4</sup>, 卢芬萍<sup>4</sup>, 庞旭<sup>5</sup>, 胡世平<sup>4#</sup>[1. 北京中医药大学深圳医院(龙岗)治未病科, 广东深圳 518172; 2. 北京中医药大学深圳医院(龙岗)中心实验室, 广东深圳 518172; 3. 南方医科大学南方医院消化科, 广州 510515; 4. 北京中医药大学深圳医院(龙岗)肝病科, 广东深圳 518172; 5. 北京中医药大学第一临床医学院, 北京 100700]

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)10-1272-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.10.06



**摘要** 目的 探讨柴芪益肝颗粒通过铁死亡途径抗肝癌的作用机制。方法 采用网络药理学方法, 结合铁死亡数据库, 筛选柴芪益肝颗粒调控铁死亡抗肝癌的关键靶点与主要有效成分; 运用分子对接技术分析主要有效成分与关键靶点的结合能力。将人肝癌 Huh-7 细胞分为空白血清对照(CON)组、柴芪益肝颗粒含药血清(CQYGKL)组、铁死亡诱导剂(RSL3)组、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mTORC1)抑制剂(RMC-5552)组、mTORC1激动剂(CCT007093)组及CCT007093+CQYGKL组, 检测前3组细胞中Fe<sup>2+</sup>、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽(GSH)水平, 所有组细胞中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、哺乳动物固醇调节元件结合蛋白1(SREBP1)、硬脂酰辅酶A去饱和酶1(SCD1)mRNA表达和SREBP1、SCD1蛋白表达以及mTOR、核糖体S6激酶(S6K)蛋白磷酸化水平。结果 柴芪益肝颗粒通过铁死亡途径抗肝癌的关键靶点有mTOR、SREBP1、SCD1等, 主要有效成分有槲皮素、丹参酮II<sub>A</sub>、黄芩素, 主要有效成分与关键靶点的结合能均小于-5 kJ/mol。与CON组比较, CQYGKL组和RSL3组细胞中Fe<sup>2+</sup>、MDA水平均显著升高, GSH水平均显著降低( $P < 0.05$ ); CQYGKL组、RSL3组、RMC-5552组细胞中mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA表达量和SREBP1、SCD1蛋白表达量以及mTOR、S6K蛋白磷酸化水平均显著降低, CCT007093组细胞中上述指标均显著升高( $P < 0.05$ )。而相较CCT007093组, CCT007093+CQYGKL组细胞的上述指标变化均被显著抑制( $P < 0.05$ )。结论 柴芪益肝颗粒可能通过抑制mTORC1/SREBP1/SCD1轴诱导铁死亡, 从而发挥抗肝癌作用。

**关键词** 柴芪益肝颗粒; 肝癌; 铁死亡; mTORC1/SREBP1/SCD1轴; 网络药理学; 分子对接

## Research on the mechanism of Chaiqi yigan granules against liver cancer via the ferroptosis pathway

LIU Bowen<sup>1</sup>, MA Guiping<sup>2</sup>, LI Feng<sup>3</sup>, LI Xiaobin<sup>4</sup>, LU Fenping<sup>4</sup>, PANG Xu<sup>5</sup>, HU Shiping<sup>4</sup>[1. Dept. of Preventive Treatment of Disease, Beijing University of Chinese Medicine Shenzhen Hospital (Longgang), Guangdong Shenzhen 518172, China; 2. Central Laboratory, Beijing University of Chinese Medicine Shenzhen Hospital (Longgang), Guangdong Shenzhen 518172, China; 3. Dept. of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Dept. of Hepatology, Beijing University of Chinese Medicine Shenzhen Hospital (Longgang), Guangdong Shenzhen 518172, China; 5. The First School of Clinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China]

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the mechanism of Chaiqi yigan granules (CQYG) against liver cancer through the ferroptosis pathway. **METHODS** Network pharmacology combined with ferroptosis-related database was used to screen key targets and main effective components of CQYG against liver cancer via regulating ferroptosis; molecular docking technology was employed to analyze the binding ability of main active components to key targets. Human liver Huh-7 cells were divided into blank serum control (CON) group, CQYG drug-containing serum (CQYGKL) group, ferroptosis inducer (RSL3) group, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) inhibitor (RMC-5552) group, mTORC1 agonist (CCT007093) group, and CCT007093+CQYGKL group. The levels of Fe<sup>2+</sup>, malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) in the cells were detected in the former three groups; mRNA expressions of mammalian target of rapamycin (mTOR), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1), and stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), protein expressions of SREBP1 and SCD1 as well as phosphorylation levels of mTOR and ribosomal S6 kinase (S6K) proteins were detected in all groups. **RESULTS** Key targets of CQYG for anti-liver cancer through the ferroptosis pathway were mTOR, SREBP1, SCD1, etc. The main active components included quercetin, tanshinone II<sub>A</sub>, baicalein, etc. The binding energies of main active components to key targets were all less than -5 kJ/mol. Compared with CON group, the levels of Fe<sup>2+</sup> and MDA in the cells in CQYGKL group and RSL3 group were significantly increased, while the levels of GSH were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). mRNA expressions of mTOR, SREBP1

<sup>△</sup> 基金项目 广东省自然科学基金面上项目(No.2025A1515011796); 深圳市引进中医药高层次医学团队立项项目(No.SZZYSM202311018)

\* 第一作者 主治医师, 博士。研究方向: 中医药防治肝癌。E-mail: drliubowen@163.com

# 通信作者 教授, 博士。研究方向: 中医药防治肝癌。E-mail: 2078200488@qq.com

and SCD1, protein expressions of SREBP1 and SCD1, as well as the phosphorylation levels of mTOR and S6K proteins were significantly decreased in the CQYGKL group, RSL3 group, and RMC-5552 group, whereas all the above indicators were significantly increased in the CCT007093 group ( $P < 0.05$ ). Compared with CCT007093 group, the changes in all the above indicators were significantly suppressed in the CCT007093+CQYGKL group ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** CQYG may induce ferroptosis by inhibiting mTORC1/SREBP1/SCD1 axis, thereby exerting anti-liver cancer effects.

**KEYWORDS** Chaiqi yigan granules; liver cancer; ferroptosis; mTORC1/SREBP1/SCD1 axis; network pharmacology; molecular docking

肝癌是全球范围内发病率与死亡率均位居前列的恶性肿瘤,其发生发展与代谢重编程及细胞死亡抵抗密切相关<sup>[1-4]</sup>。当前临床治疗方案虽不断完善,但患者整体预后仍不理想,晚期患者尤为突出,耐药与复发仍是亟待解决的关键问题<sup>[5]</sup>。因此,深入探究肝癌发病机制,对寻找多靶点、低毒的治疗策略,具有重要的临床意义与科研价值。

近年来,铁死亡作为一种铁依赖性的新型程序性细胞死亡方式,在肿瘤领域受到广泛关注<sup>[6]</sup>。铁死亡以脂质过氧化物过度累积为主要特征,与肝癌进展、治疗抵抗及不良预后密切相关,铁死亡相关关键信号通路也已成为肝癌防治的潜在新靶点<sup>[7]</sup>。中医药在肿瘤治疗中强调“整体调节”与“扶正祛邪”,中药复方凭借其多成分、多靶点的作用特点,在调控肿瘤微环境、诱导肿瘤细胞死亡等方面展现出独特优势<sup>[8-9]</sup>。柴芪益肝颗粒为广东省名中医胡世平治疗肝癌的经验方,组方包含黄芪、茯苓、甘草、黄精等12味中药。已有回顾性临床研究显示,柴芪益肝方联合西医治疗手段可显著提升正虚瘀毒型肝癌患者的5年总生存率以及无进展生存率,且该方是患者5年总生存率的独立保护因素<sup>[10]</sup>。但该方是否通过调控铁死亡途径发挥抗肝癌作用,目前尚不明确。基于此,本研究采用网络药理学、分子对接结合实验验证,探究柴芪益肝颗粒通过铁死亡途径抗肝癌的作用靶点与信号调控机制,以期为肝癌的中医药治疗提供实验依据与理论支撑。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括FORMA STERI-CYCLE i250型CO<sub>2</sub>培养箱、Multiskan FC型酶标仪、ProFlex 3×32型普通聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Rotor-Gene Q型5通道荧光定量PCR仪(德国Qiagen公司),Universal Power型蛋白电泳配套电泳仪、Universal Hood III型全能型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 主要药品与试剂

柴芪益肝颗粒免煎颗粒剂(具体处方:黄芪30g、茯苓20g、甘草10g、黄精15g、柴胡10g、白芍10g、赤芍15g、丹参20g、醋鳖甲15g、茵陈10g、山豆根6g、垂盆草30g)购于广东一方制药有限公司;铁死亡诱导剂RSL3(货号HY-100218A)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1(mammalian target of rapamycin complex 1,

mTORC1)激动剂CCT007093(货号HY-15880)、mTORC1抑制剂RMC-5552(货号HY-132168)均购于美国MCE公司;CCK8试剂盒(货号CK04)、比色法铁含量检测试剂盒(货号I291)均购于日本同仁化学研究所;MolPure<sup>®</sup> Cell/Tissue Total RNA Kit(货号19221ES50)购于上海翊圣生物科技有限公司;定量用预混型反转录试剂盒(货号RR037Q)购于日本宝生物工程株式会社;还原型和氧化型谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(货号S0053)购于上海碧云天生物技术有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(货号BC0025)购于北京索莱宝科技有限公司;兔源哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化mTOR(phosphorylated mTOR, p-mTOR)、核糖体S6激酶(ribosomal S6 kinase, S6K)、p-S6K单抗(货号分别为28273-1-AP、80596-1-RR、14485-1-AP、28735-1-AP);兔源哺乳动物固醇调节元件结合蛋白1(sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP1)、硬脂酰辅酶A去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)单抗和山羊抗小鼠、山羊抗兔免疫球蛋白G H&L二抗(货号分别为ab28481、ab236868、ab150113、ab150077-500)均购于英国Abcam公司;鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单抗(货号60004-1-Ig)购于武汉三鹰生物技术有限公司。

### 1.3 实验动物与细胞

SPF级雄性SD大鼠30只,8周龄,体质量(200±20)g,均购于广东省医学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(粤)2022-0002。大鼠饲养于深圳市药品检验研究院SPF级屏障系统动物房,饲养环境温度(22±1)°C、相对湿度(50±5)%,大鼠自由摄食、饮水。本实验经北京中医药大学深圳医院(龙岗)伦理委员会批准(批件号:KY-2023-047)。

人肝癌Huh-7细胞购于广州剪刀手基因科技有限公司(源自中国科学院细胞库,编号:TCHu182)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学

#### 2.1.1 柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点获取

首先,通过TCMSP数据库(<https://www.tcmsp-e.com/>)检索柴芪益肝颗粒中药物成分及其对应靶点(设置口服生物利用度≥30%,类药性≥0.18),对于鳖甲成分则先从HERB数据库(<http://herb.ac.cn/>)获取化学成分后利用PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

获取 SMILES 编号,再通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 预测靶点;合并上述靶点去重后用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 统一为基因名,获得柴芪益肝颗粒药物靶点。从铁死亡数据库 FerrDb (<http://www.zhounan.org/ferrdb/>) 获取铁死亡靶点;同时,从 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 以“liver cancer”为关键词检索肝癌疾病靶点,最后利用 R 软件中的 VennDiagram 包获取柴芪益肝颗粒-铁死亡交集靶点、柴芪益肝颗粒-肝癌交集靶点,以及柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点。

### 2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点导入 STRING 数据分析平台 (<https://string-db.org/>), 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,筛选关键靶点;然后,使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建药物-成分-靶点网络,并对其进行可视化分析,筛选主要有效成分。

### 2.1.3 分子对接分析

将柴芪益肝颗粒的关键成分导入 Chem3D 软件,构建其化学结构式并对其进行能量最小化处理,保存为 PDB 格式文件;将关键靶点导入 PDB 数据库,下载对应蛋白的 PDB 格式文件,经去水分子、去小分子、加氢处理后,保存为 PDBQT 格式文件。利用 PyMOL 和 MOE 软件采用全原子对接方法进行分子对接,验证主要有效成分与关键靶点的结合活性。

## 2.2 实验验证

### 2.2.1 空白血清及柴芪益肝颗粒含药血清制备

取 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,随机分为空白组与柴芪益肝颗粒组,每组 15 只。参照《药理试验方法学》中种属间体表面积换算原则(人与大鼠等效剂量换算系数为 6.3),结合大鼠体重计算给药剂量。柴芪益肝颗粒组大鼠灌胃柴芪益肝颗粒药液 16.2 g/kg,用于制备柴芪益肝颗粒含药血清;空白组大鼠灌胃等体积生理盐水,用于制备空白血清。两组大鼠均每日灌胃 2 次,连续 7 d,于末次灌胃 2 h 后腹主动脉采血。血样于室温静置 2 h,经离心、56 °C 水浴灭活、0.22 μm 滤膜过滤后,分装保存于 -20 °C 备用。

### 2.2.2 柴芪益肝颗粒含药血清给药浓度和干预时间筛选

采用 CCK-8 法检测细胞活力。取对数生长期 Huh-7 细胞,重悬后以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,分为对照孔(30% 空白血清)及 10%、20%、30% 柴芪益肝颗粒含药血清孔,另设不含细胞和血清的调零孔,每个浓度设 6 个复孔。每孔加入含相应血清的基础培养基 100 μL,置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24、48 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续孵育 3 h,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(A),计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验孔 A 值-调零孔 A 值)/(对照孔 A 值-调零孔 A 值)×100%。筛选增殖抑制作用最为显著的柴芪益肝颗粒含药血清浓度及干预时间进行后续实验。

### 2.2.3 实验分组与给药

实验分为 6 组,分别为:(1)空白血清对照(CON)组,含 Huh-7 细胞+含 30% 空白血清的基础培养基;(2)柴芪益肝颗粒含药血清组(CQYGKL 组),含 Huh-7 细胞+含 30% 柴芪益肝颗粒含药血清(根据“2.2.2”项下结果设置)的基础培养基;(3)铁死亡诱导剂(RSL3)组,含 Huh-7 细胞+DMEM 完全培养基+RSL3(5 μmol/L);(4) mTORC1 抑制剂(RMC-5552)组,含 Huh-7 细胞+DMEM 基础培养基+RMC-5552(10 μmol/L);(5) mTORC1 激动剂(CCT007093)组,含 Huh-7 细胞+DMEM 基础培养基+CCT007093(25 μmol/L);(6) CCT007093+CQYGKL 组,含 Huh-7 细胞+CCT007093(25 μmol/L)+含 30% 柴芪益肝颗粒含药血清的基础培养基。

### 2.2.4 细胞中铁死亡指标检测

取对数生长期的 Huh-7 细胞,按“2.2.3”项下分组、给药,干预 48 h(根据“2.2.2”项下结果设置,下同)后,收集 CON 组、CQYGKL 组、RSL3 组细胞,置于离心管中,离心后弃上清液,超声波破碎细胞,于 4 °C 下以  $8\ 000 \times g$  离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明书操作,检测 Fe<sup>2+</sup>、MDA、GSH 水平。实验重复 6 次。

### 2.2.5 细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达检测

采用荧光定量 PCR 法检测。取对数生长期的 Huh-7 细胞,按“2.2.3”项下分组、给药,干预 48 h 后,采用 TRIzol 法提取 RNA 并反转录为 cDNA,采用 SYBR Green 法进行定量 PCR。PCR 反应体系包含 TB Green Premix Ex Taq(Tli RNase HPlus) 10 μL,正、反向引物各 0.8 μL,ROX Reference Dye 0.4 μL,DNA 样本 2 μL,超纯水 6 μL。PCR 扩增条件如下:先 95 °C 预变性 30 s;再 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火延伸 30 s,循环 40 次;最后 95 °C 作用 5 s、60 °C 作用 1 min、97 °C 作用 1 s 获取溶解曲线与循环阈值(cycle threshold, Ct),每组重复 3 次。以 GAPDH 为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达量。引物由上海闪锦生物科技有限公司设计并合成,引物序列和产物大小见表 1。

表 1 待测引物序列和产物大小

待测引物	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	产物大小/bp
mTOR	GCCTCATGGGATTGGGAC	ATCAGCGAGTTCCTGCTAITCC	142
SREBP1	TCTGGAGGCATCGCAAGC	GAGGTTCCAGAGGAGGCTACA	149
SCD1	TGATCCTCATAATCCCGACG	TGGGCAGGATGAAGCACA	188
GAPDH	TGTTCTACCCCAATGTGTC	TGAAGTCGAGGAGACAACC	158

### 2.2.6 细胞中 mTORC1/SREBP1/SCD1 轴相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测。取对数生长期的 Huh-7 细胞,按“2.2.3”项下分组、给药。干预 48 h 后,收集细胞,裂解后提取总蛋白,并进行定量、加热变性、电泳分离、转膜、封闭,加入 p-mTOR、mTOR、p-S6K、S6K、SREBP1、SCD1、GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4 °C 下孵育过夜;次日加入相应二抗(稀释比例均为 1:3 000),于室温下孵育 2 h;用 ECL 显影、成像。以目的蛋白与内参(GAPDH)的灰度值比值为目的蛋白的表达水平,并

以 p-mTOR/mTOR、p-S6K/S6K 比值评价 mTOR、S6K 蛋白的磷酸化水平。实验重复 3 次。

### 2.2.7 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件作图。定量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时组间两两比较采用 Dunnett's *T*3 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析结果

#### 3.1.1 柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点、关键靶点及主要有效成分

经筛选,共获得柴芪益肝颗粒药物靶点 532 个,铁死亡靶点 484 个,肝癌疾病靶点 15 134 个。取三者交集后,得到 73 个柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点。PPI 网络分析显示,mTOR、SREBP1、SCD1 等均为关键靶点;药物-成分-靶点网络分析显示,柴芪益肝颗粒的主要有效成分包括槲皮素、丹参酮 II<sub>A</sub>、黄芩素等。

#### 3.1.2 分子对接分析结果

关键靶点 mTOR、SREBP1、SCD1 与槲皮素、丹参酮 II<sub>A</sub>、黄芩素进行分子对接的结合能为  $-7.4566 \sim -5.1753$  kJ/mol,且均小于  $-5$  kJ/mol,表明各有效成分与关键靶点的结合相对稳定。

### 3.2 细胞实验验证结果

#### 3.2.1 柴芪益肝颗粒含药血清给药浓度和干预时间

不同浓度柴芪益肝颗粒含药血清分别干预 Huh-7 细胞 24、48 h 的结果(表 2)显示,该含药血清对细胞的增殖抑制作用呈剂量与时间依赖趋势,其中 30% 柴芪益肝颗粒含药血清干预细胞 48 h 的抑制效果最为显著,故后续选用 30% 柴芪益肝颗粒含药血清干预 48 h 进行后续实验。

表 2 不同浓度柴芪益肝颗粒含药血清对 Huh-7 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6, \%$ )

干预时间/h	0	10%	20%	30%
24	98.15 ± 10.30	91.33 ± 2.89	67.31 ± 5.48	63.19 ± 5.70
48	99.07 ± 3.87	88.10 ± 9.30	57.84 ± 10.16	47.81 ± 7.24

#### 3.2.2 柴芪益肝颗粒含药血清对 Huh-7 细胞中铁死亡指标的影响

与 CON 组比较,CQYGKL 组和 RSL3 组 Huh-7 细胞中 Fe<sup>2+</sup>、MDA 水平均显著升高,GSH 水平均显著降低( $P<0.05$ ),结果见图 1。

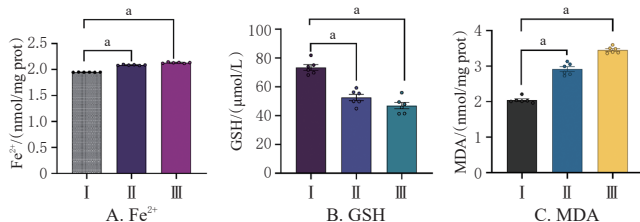


图 1 3 组细胞中铁死亡指标比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

#### 3.2.3 柴芪益肝颗粒含药血清对 Huh-7 细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达影响

与 CON 组比较,CQYGKL 组、RSL3 组、RMC-5552 组 Huh-7 细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达量均显著降低( $P<0.05$ ),CCT007093 组 Huh-7 细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达量均显著升高( $P<0.05$ )。与 CCT007093 组比较,CCT007093+CQYGKL 组 Huh-7 细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达量均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图 2。

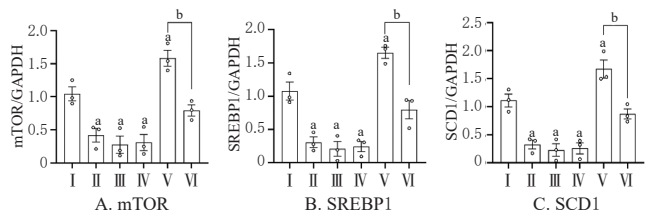


图 2 各组细胞中 mTOR、SREBP1、SCD1 mRNA 表达量比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

#### 3.2.4 柴芪益肝颗粒含药血清对 Huh-7 细胞中 mTORC1/SREBP1/SCD1 轴相关蛋白表达的影响

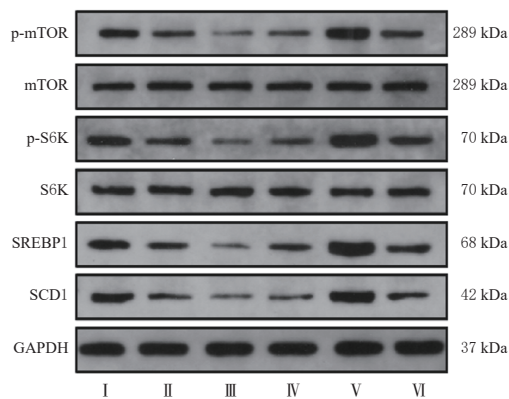
与 CON 组比较,CQYGKL 组、RSL3 组、RMC-5552 组 Huh-7 细胞中 SREBP1、SCD1 蛋白表达量和 mTOR、S6K 蛋白磷酸化水平均显著降低( $P<0.05$ ),而 CCT007093 组 Huh-7 细胞中 SREBP1、SCD1 蛋白表达量和 mTOR、S6K 蛋白磷酸化水平均显著升高( $P<0.05$ )。与 CCT007093 组比较,CCT007093+CQYGKL 组 Huh-7 细胞中 SREBP1、SCD1 蛋白表达量和 mTOR、S6K 蛋白磷酸化水平均显著降低( $P<0.05$ )。结果见图 3。

## 4 讨论

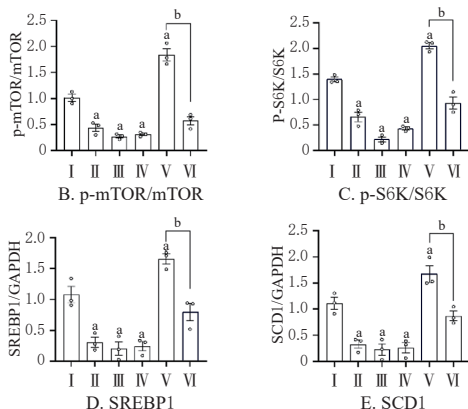
肝癌病机归属于“正虚瘀毒”,临床治疗以扶正培本、化瘀解毒贯穿全程<sup>[4,11]</sup>。柴芪益肝颗粒以扶正化瘀解毒为核心治则,临床常用于治疗辨证属正虚瘀毒证的肝癌患者。近年来的研究证实,“正虚瘀毒证”的现代生物学内涵与细胞铁死亡机制高度契合:一方面,“正气亏虚”对应机体抗病能力减弱,与现代医学氧化防御系统功能减退相契合;另一方面,铁死亡以脂质活性氧过量蓄积、细胞膜脂质过氧化损伤为核心特征,与中医“瘀毒”致病特点高度吻合<sup>[12-13]</sup>。

本研究基于网络药理学,筛选得到 73 个柴芪益肝颗粒-铁死亡-肝癌交集靶点,其中 mTOR、SREBP1、SCD1 为柴芪益肝颗粒通过铁死亡途径抗肝癌的关键靶点,槲皮素、丹参酮 II<sub>A</sub>、黄芩素为主要有效成分。分子对接分析显示,柴芪益肝颗粒中主要活性成分槲皮素、丹参酮 II<sub>A</sub>、黄芩素,与 mTOR、SCD1、SREBP1 关键靶点均有良好的结合稳定性。

铁死亡的发生常伴随特异性生化标志物的改变,其中胞内 Fe<sup>2+</sup>蓄积、GSH 耗竭及 MDA 水平上调被视为评



A. 电泳条带图



I : CON组; II : CQYGKL组; III : RSL3组; IV : RMC-5552组; V : CCT007093组; VI : CCT007093+CQYGKL组; a: 与CON组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与CCT007093组比较,  $P < 0.05$ 。

图3 各组细胞中 mTORC1/SREBP1/SCD1 轴相关蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

估铁死亡的核心指标<sup>[14-15]</sup>。本研究结果显示,与CON组比较,柴芪益肝颗粒含药血清可显著升高Huh-7细胞内 $Fe^{2+}$ 与MDA水平,并下调GSH水平。该变化趋势与铁死亡经典诱导剂RSL3的作用特征高度一致,证实柴芪益肝颗粒能有效诱导Huh-7细胞发生铁死亡。

为进一步揭示其作用通路,本研究通过药理学激活和抑制策略对mTORC1进行双向验证。荧光定量PCR结果显示,与CON组比较,柴芪益肝颗粒含药血清可显著下调Huh-7细胞中mTOR mRNA表达,其下调水平略逊于RSL3组与RMC-5552组;而CCT007093可显著上调Huh-7细胞中mTOR mRNA表达,其联合柴芪益肝颗粒含药血清后,这种上调趋势被显著抑制。Western blot实验结果显示,柴芪益肝颗粒含药血清可显著下调Huh-7细胞中mTOR、S6K(mTORC1底物)蛋白磷酸化水平,其下调作用略逊于RSL3组与RMC-5552组;而CCT007093可显著上调Huh-7细胞中mTOR、S6K蛋白磷酸化水平,其联合柴芪益肝颗粒含药血清后,这种上调趋势被显著抑制。此外还发现,柴芪益肝颗粒含药血清可显著下调Huh-7细胞中SREBP1、SCD1 mRNA及其蛋白的表达,这与分子对接结果相互印证。

综上,柴芪益肝颗粒可能通过抑制mTORC1/SREBP1/SCD1轴来驱动铁死亡进程,进而发挥抗肝癌作用。

## 参考文献

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3):229-263.
- [2] 吴昊,张志伟.《原发性肝癌诊疗指南(2024年版)》更新解读[J]. 肝胆胰外科杂志, 2024, 36(10):577-582, 588.
- [3] 张本常,王泽宇,苟红艳,等. 铁死亡与双硫死亡在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36(1):114-123.
- [4] 李霞,杨杰雄,刘西洋,等. 基于“正虚瘀毒”探讨免疫微环境和代谢重编程在肝癌中的作用[J/OL]. 中国实验方剂学杂志, 1-14[2026-01-13]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20252024>.
- [5] FENG F, ZHAO Y. Hepatocellular carcinoma: prevention, diagnosis, and treatment[J]. Med Princ Pract, 2024, 33(5):414-423.
- [6] BATTAGLIA A M, CHIRILLO R, AVERSA I, et al. Ferroptosis and cancer: mitochondria meet the “iron maiden” cell death[J]. Cells, 2020, 9(6):1505.
- [7] ZHANG C, LIU X Y, JIN S D, et al. Ferroptosis in cancer therapy: a novel approach to reversing drug resistance[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1):47.
- [8] 尹畅,施茵,刘然,等. 基于“扶正祛邪”理论探讨中医药靶向干预肝癌肿瘤微环境的研究进展[J/OL]. 辽宁中医药大学学报, 1-22[2026-01-13]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1543.r.20250911.1223.010>.
- [9] 李荣,顾浩,王朋倩,等. 九味癩消颗粒配伍治疗肝癌的网络模块分布机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15):162-172.
- [10] 李晓斌,苏晓鹏,马贵萍,等. 柴芪益肝方治疗乙型病毒性肝炎相关性原发性肝癌正虚瘀毒证患者的临床回顾性分析[J]. 中医学报, 2024, 39(4):845-853.
- [11] 崔祎,张姣,赵培西,等. 扶正抗癌方治疗肝癌肝郁脾虚瘀毒证的血清代谢组学研究[J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(9):1669-1677.
- [12] 韩佳悦,潘单依,肖佳璇,等. 从“瘀毒”病机探讨脑缺血再灌注铁死亡机制及活血化瘀解毒方干预机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(8):51-60.
- [13] 张敏捷,曲妮妮,张全英,等. 基于“虚气留滞”探讨中医药调控细胞铁死亡对低氧性肺动脉高压的影响[J]. 中医药导报, 2025, 31(12):196-202, 210.
- [14] 魏爽,郝峰,章文春,等. 黄芪-葛根配伍对T2DM胰岛素抵抗大鼠铁死亡的影响及机制研究[J]. 中国药房, 2025, 36(1):57-63.
- [15] 田源,王宇僖,刘震,等. 复方喜树颗粒调控铁死亡抑制肝癌细胞增殖的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(2):37-45.

(收稿日期:2026-01-20 修回日期:2026-05-13)

(编辑:邹丽娟)