

## 柴芪益肝方调控巨噬细胞极化对肝癌 HepG2 细胞恶性生物学行为的抑制作用

张希倩<sup>1</sup>, 党志博<sup>2</sup>, 杜雨楠<sup>1</sup>, 吴培<sup>1</sup>, 谢航<sup>3</sup>, 谭高峰<sup>1</sup>

(1. 河南省中医院 河南中医药大学第二附属医院老年病科, 河南 郑州 450053; 2. 河南省中医院 河南中医药大学第二附属医院肝胆脾胃病科, 河南 郑州 450053; 3. 河南省中医院 河南中医药大学第二附属医院重症医学科, 河南 郑州 450053)

**[摘要]** **目的:** 探讨柴芪益肝方(CQ)通过激活核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路调控巨噬细胞极化对肝癌 HepG2 细胞恶性生物学行为的抑制作用, 为 CQ 应用于肝癌的治疗提供理论依据。**方法:** 制备含 CQ 血清, 稀释后浓度为 2.5%、5.0%、10.0%、20.0% 和 30.0%。采用细胞计数试剂盒 8(CCK-8)法检测含 CQ 血清作用后各组 RAW264.7 细胞和 HepG2 细胞活力, 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测含 CQ 血清作用后各组 RAW264.7 细胞上清中白细胞介素(IL)-6 和 IL-10 水平, 筛选 CQ 最佳处理浓度。建立 RAW264.7 和 HepG2 细胞共培养体系, 并构建 HepG2 细胞移植瘤裸鼠模型, 将共培养细胞和荷瘤小鼠分别随机分为对照组、CQ 组、NF- $\kappa$ B 抑制剂二巯代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)组和 CQ+PDTC 组。采用 CCK-8 法和 Transwell 小室实验分别检测各组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数。测定各组裸鼠移植瘤体积和质量。采用流式细胞术检测各组共培养体系下 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中巨噬细胞 M1 和 M2 型极化情况; ELISA 法检测各组共培养体系下 RAW264.7 细胞上清和裸鼠血清中 M1 型细胞因子 IL-6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)以及 M2 型细胞因子转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、精氨酸酶 1(Arg-1)和 IL-10 水平, Western blotting 法检测各组共培养体系下 RAW264.7 细胞和裸鼠血清中 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 $\alpha$ (I $\kappa$ B- $\alpha$ )、磷酸化 I $\kappa$ B- $\alpha$ (p-I $\kappa$ B- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B p65 及 p-NF- $\kappa$ B p65 表达水平。**结果:** 与对照组比较, CQ 组 HepG2 细胞活力、迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低( $P<0.05$ ), PDTC 组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数明显升高( $P<0.05$ ); 与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数明显升高( $P<0.05$ )。与对照组比较, CQ 组裸鼠移植瘤体积和质量均明显降低( $P<0.05$ ), PDTC 组裸鼠移植瘤体积和质量明显升高( $P<0.05$ ); 与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组裸鼠移植瘤体积和质量明显升高( $P<0.05$ )。与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显升高( $P<0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分率明显降低( $P<0.05$ ); PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显降低( $P<0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分率明显升高( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显降低( $P<0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分率明显升高( $P<0.05$ )。与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞培养上清和裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  及 iNOS 水平明显升高( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显降低( $P<0.05$ ); PDTC 组 RAW264.7 细胞上清和裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  及 iNOS 水平明显降低( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显升高( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞上清和裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  及 iNOS 水平明显降低( $P<0.05$ ),

[收稿日期] 2025-05-31 [录用日期] 2025-07-06

[基金项目] 河南省卫健委中医药科学研究专项课题项目(2023ZY2062)

[作者简介] 张希倩(1988—), 女, 河南省郑州市人, 医学硕士, 主要从事中医内科老年病方面的研究。

[通信作者] 党志博, 主治医师(E-mail: 1622097861@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值及 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值明显升高 ( $P < 0.05$ ), PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值及 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值明显降低 ( $P < 0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值及 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CQ 可通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路促进巨噬细胞从 M2 型向 M1 型极化, 进而抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移、侵袭和裸鼠皮下移植瘤生长。

**[关键词]** 柴芪益肝方; 核因子  $\kappa$ B; 巨噬细胞极化; 肝细胞癌; 肿瘤进展

**[中图分类号]** R273; R735.7 **[文献标志码]** A

## Inhibitory effect of Chaqi Yigan formula on malignant biological behaviors of liver cancer HepG2 cells by regulating macrophage polarization

ZHANG Xiqian<sup>1</sup>, DANG Zhibo<sup>2</sup>, DU Yunan<sup>1</sup>, WU Pei<sup>1</sup>, XIE Hang<sup>3</sup>, TAN Gaofeng<sup>1</sup>

(1. Department of Geriatrics, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China; 2. Department of Hepatobiliary, Spleen and Stomach Diseases, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China; 3. Department of Critical Care Medicine, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the inhibitory effect of Chaqi Yigan (CQ) formula on the malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by regulating macrophage polarization through activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway, and to clarify the theoretical basis for the application of CQ in the treatment of hepatocellular carcinoma. **Methods:** CQ-containing serum was prepared and diluted to concentrations of 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%, and 30.0%. Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the activities of RAW264.7 cells and HepG2 cells in various groups after treated with CQ-containing serum; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to detect the levels of interleukin (IL)-6 and IL-10 in supernatant of RAW264.7 cells in various groups after treated with CQ-containing serum to screen the optimal concentration of CQ for treatment. A co-culture system of RAW264.7 and HepG2 cells was established, and a nude mouse model bearing HepG2 cell xenograft tumor was constructed. The co-cultured cells and tumor-bearing mice were randomly divided into control group, CQ group, NF- $\kappa$ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group, and CQ+PDTC group. CCK-8 method and Transwell chamber assay were used to detect the activities, numbers of migration cells, and numbers of invasion cells of HepG2 cells in various groups, respectively. The volumes and mass of xenograft tumors of the nude mice in various groups were measured. Flow cytometry was used to detect M1 and M2 polarization of RAW264.7 cells in co-culture system and tumor tissue of the nude mice in various groups; ELISA method was used to detect the levels of M1-type cytokines IL-6, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and M2-type cytokines transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), arginase 1 (Arg-1), and IL-10 in supernatant of the RAW264.7 cells in co-culture system and serum of the nude mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of NF- $\kappa$ B pathway-related proteins NF- $\kappa$ B inhibitor protein  $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), phosphorylated I $\kappa$ B- $\alpha$  (p-I $\kappa$ B- $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B p65, and p-NF- $\kappa$ B p65 in RAW264.7 cells in the co-culture system and serum of the nude mice in various groups. **Results:** Compared with control group, the

activity, number of migration cells, and number of invasion cells of HepG2 cells in CQ group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while those in PDTC group were significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with CQ group, the activity, number of migration cells, and number of invasion cells of HepG2 cells in CQ+PDTC group were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the volume and mass of xenograft tumor of the nude mice in CQ group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while those in PDTC group were significantly increased ( $P<0.05$ ); compared with CQ group, the volume and mass of xenograft tumor of the nude mice in CQ+PDTC group were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the percentages of M1-type macrophages in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in CQ group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the percentages of M2-type macrophages were significantly decreased ( $P<0.05$ ); the percentages of M1-type macrophages in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the percentages of M2-type macrophages were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with CQ group, the percentages of M1-type macrophages in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in CQ+PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the percentages of M2-type macrophages were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in supernatant of the RAW264.7 cells and serum of the nude mice in CQ group were significantly increased ( $P<0.05$ ), while the levels of TGF- $\beta$ , Arg-1, and IL-10 were significantly decreased ( $P<0.05$ ); the levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in supernatant of the RAW264.7 cells and serum of the nude mice in PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the levels of TGF- $\beta$ , Arg-1, and IL-10 were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with CQ group, the levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and iNOS in supernatant of the RAW264.7 cells and serum of the nude mice in CQ+PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), while the levels of TGF- $\beta$ , Arg-1, and IL-10 were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the ratios of p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in CQ group were significantly increased ( $P<0.05$ ); the ratios of p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Compared with CQ group, the ratios of p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  and p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 in RAW264.7 cells and tumor tissue of the nude mice in CQ+PDTC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** CQ can promote macrophage polarization from M2 to M1 type by activating NF- $\kappa$ B signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the growth of subcutaneous xenograft tumor in the nude mice.

**KEYWORDS** Chaqi Yigan formula; Nuclear factor  $\kappa$ B; Macrophage polarization; Hepatocellular carcinoma; Tumor progression

肿瘤相关巨噬细胞极化在肝细胞癌进展中起关键作用。诱导巨噬细胞向M2型极化,可促进肝细胞癌的恶性进展<sup>[1-2]</sup>,而促使巨噬细胞向M1型极化则可重塑肝细胞癌免疫抑制性肿瘤微环境,进而发挥抗肿瘤功效<sup>[3-4]</sup>。核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是调控巨噬细胞激活和极化的重要信号,抑制其激活可阻止巨噬细胞促炎型M1极化且诱导抗炎型M2极化,并促使巨噬细胞向促肿瘤表型转化;反之,激活NF- $\kappa$ B信号可通过调节肿瘤细胞-巨噬细胞交互作用和抑制巨噬细胞M2极化,抑制肝细胞癌进展<sup>[5-6]</sup>。因此,NF- $\kappa$ B是通过调控巨噬

细胞极化进而治疗肝细胞癌的潜在作用靶点。

在中医学理论中,肝癌归属于“积聚”和“肝积”范畴,其病机以脾虚为本,气滞、血瘀、湿热、热毒互结为标,最终导致毒瘤形成。柴芪益肝方(Chaqi Yigan formula, CQ)是治疗肝癌前期肝纤维化病变的常用方剂,具有健脾疏肝、补益气血、清热解毒和活血化瘀等功效,可起到清消癌毒的作用。研究<sup>[7-8]</sup>显示CQ能有效抑制裸鼠异位肝癌的生长,最终起到明显抗肝癌作用。但巨噬细胞极化在CQ抗肝癌过程中的作用目前尚不明确。本研究通过构建RAW264.7和HepG2细胞体外共培

养体系和HepG2移植瘤裸鼠模型,探讨CQ调控NF- $\kappa$ B介导的M1/M2型肿瘤相关巨噬细胞极化而抑制肝细胞癌进展的作用机制,以期CQ应用于肝癌的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器** SPF级BALB/c-nu雄性裸鼠,体质量18~21 g,购自上海西普尔必凯实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2020-0016。裸鼠按照每笼5只或少于5只进行分笼喂养,统一提供标准饲料与纯净水后小鼠自由进食饮水,动物饲养房内保持清洁级、22℃~24℃室温、昼夜各12 h节律、45%~60%湿度的环境。人肝细胞癌HepG2和小鼠巨噬细胞RAW264.7购自中国科学院上海生命科学研究院。本研究实验经河南省中医院动物伦理委员会批准(批准号:HNSZYWZ-2022012016)。

CQ组方药材包括生黄芪、柴胡、白芍、丹参、鳖甲和重楼,均购自安徽敬道药业有限公司。NF- $\kappa$ B抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)(纯度 $\geq 95\%$ )购自上海翌圣生物科技股份有限公司。结晶紫染色液购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂购自美国MCE公司。小鼠白细胞介素(interleukin, IL)-6、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、IL-10、精氨酸酶1(arginase-1, Arg-1)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。小鼠PE-CD206、PE-CD16和APC-F4/80抗体购自美国BioLegend公司。兔源抗鼠磷酸化NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (phosphorylated inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$ , p-I $\kappa$ B- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B抑制蛋白 $\alpha$ (inhibitor of NF- $\kappa$ B  $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ )、磷酸化NF- $\kappa$ B p65(phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65)、 $\beta$ -actin和NF- $\kappa$ B p65一抗及驴抗兔二抗购自英国Abcam公司。酶标仪(型号:ASOOZ)购自瑞士Tecan公司,正置生物显微镜(型号:ZYS-121)购自上海兆仪光电科技有限公司,流式细胞仪(型号:CyFlow<sup>®</sup> Cube 6)购自德国Partec公司,垂直电泳与转印系统(型号:1658033)购自美国Bio-Rad公司。

**1.2 含CQ裸鼠血清的制备** 取生黄芪30 g、柴胡10 g、白芍20 g、丹参20 g、鳖甲10 g和重楼15 g,加入6倍量水浸泡后煎煮3次,每次1 h。过滤后,合并滤液进行浓缩、烘干,以生理盐水溶解制成生药浓度为30 g·mL<sup>-1</sup>的CQ药液。稀释后,取BALB/c-nu雄性裸鼠,灌胃13.65 g·kg<sup>-1</sup> CQ药液(2.73 g·mL<sup>-1</sup> CQ药液按体质量计算,5 mL·kg<sup>-1</sup>),每日1次<sup>[7]</sup>,连续14 d。末次给药后,将裸鼠安乐死,收集心脏血,4℃、3 500 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,分离血清。加入DMEM培养基对裸鼠血清(100%含CQ血清)进行稀释,得到含2.5%、5.0%、10.0%、20.0%和30.0% CQ的裸鼠血清备用。

**1.3 CCK-8法检测不同浓度CQ血清处理后各组细胞活性** 取RAW264.7和HepG2细胞,置于39.6℃水浴内快速解冻,洗涤后培养于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM完全培养基中。当细胞融合度达到80%~85%时进行传代,取对数生长期细胞用于实验。取RAW264.7和HepG2细胞分别接种于96孔细胞培养板,培养至对数生长期后,随机分为6组,以含0%、2.5%、5.0%、10.0%、20.0%和30.0%的CQ血清处理24 h;以0% CQ血清处理细胞作为对照组。另设置不接种细胞的培养孔作为空白对照孔。处理结束后,每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂,孵育2 h。采用酶标仪于450 nm波长处测定各组RAW264.7细胞和HepG2细胞的吸光度(A)值,计算各组细胞活力。细胞活力=(实验组A值-空白对照孔A值)/(对照组A值-空白对照孔A值) $\times 100\%$ 。

**1.4 细胞共培养体系的建立和分组** 按照参考文献[9]中方法构建细胞共培养体系。取Transwell共培养小室,用0.41  $\mu$ m的无菌聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜分隔开上、下室,同时将共培养小室放在12孔板中,上室内接种 $2 \times 10^4$ 个HepG2细胞,下室内接种 $5 \times 10^4$ 个RAW264.7细胞,细胞共培养24 h。将共培养细胞随机分为4组并进行如下处理:CQ组,加入5%含CQ血清;PDTC组,加入4 mg·L<sup>-1</sup> PDTC<sup>[10]</sup>;CQ+PDTC组,加入5% CQ血清和4 mg·L<sup>-1</sup> PDTC联合处理;对照组,不给予任何药物处理。各组细胞处理24 h后进行后续实验。

**1.5 ELISA法检测单独培养和共培养体系下RAW264.7细胞上清中IL-6及IL-10水平** 将单独

培养RAW264.7细胞的Transwell小室设置为空白组。将细胞共培养体系随机分为6组:共培养组、2.5% CQ血清组、5.0% CQ血清组、10.0% CQ血清组、20.0% CQ血清组和30.0% CQ血清组,分别以0%、2.5%、5.0%、10.0%、20.0%和30.0% CQ血清处理。空白组不进行药物干预。处理24 h后,收集各组Transwell下室RAW264.7细胞培养上清,严格按照ELISA试剂盒说明书操作,采用酶标仪测定各组RAW264.7细胞上清中IL-6和IL-10水平。

**1.6 CCK-8法检测共培养体系下各组HepG2细胞活性** 收集“1.4”中各组处理后共培养体系下的HepG2细胞,以每孔 $2 \times 10^4$ 个的密度接种于96孔细胞培养板内,培养24 h。按照“1.3”中CCK-8实验方法,检测各组HepG2细胞活性。

**1.7 Transwell小室实验检测共培养体系下各组HepG2细胞的迁移细胞数和侵袭细胞数** 分别收集各组处理后共培养体系下的HepG2细胞,以无血清DMEM培养基配制为单细胞悬液,以每孔 $5 \times 10^5$ 个的密度接种于24孔Transwell板上层小室内,并在下室加入含10%血清的DMEM培养基。侵袭实验采用涂有基质胶的Transwell膜,迁移实验采用不含基质胶的Transwell膜。培养24 h后,对下室内细胞进行洗涤和多聚甲醛固定处理,加入结晶紫染色后拍照,采用Image J软件计数下室内细胞数目,即为迁移细胞数和侵袭细胞数。

**1.8 HepG2移植瘤裸鼠的制备和分组** 按照参考文献[7, 11]中方法构建HepG2移植瘤裸鼠模型。取24只BALB/c-nu雄性裸鼠,于其右背皮下接种HepG2细胞(约 $1 \times 10^6$ 个)。定期观察,待裸鼠皮下触及约2 mm直径的肿块时,视为HepG2移植瘤裸鼠模型构建成功。将荷瘤裸鼠随机分为4组,每组6只:①CQ组,灌胃给予 $13.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  CQ药液( $2.73 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CQ药液按 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 计算灌胃体积),每日1次<sup>[7]</sup>,瘤内注射0.1 mL生理盐水;②PDTC组,灌胃 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 生理盐水,每日1次,瘤内注射 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PDTC溶液0.1 mL(每3日1次)<sup>[12]</sup>;③CQ+PDTC组,联合给予CQ灌胃和PDTC瘤内注射;④对照组,灌胃等体积生理盐水( $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每日1次,瘤内注射等体积生理盐水0.1 mL(每3日1次)。各组裸鼠共处理14 d,期间各组裸鼠CQ灌胃共14次,PDTC或生理盐水瘤内注射共5次。

**1.9 各组裸鼠皮下移植瘤体积和质量测定** 取各组裸鼠,经颈椎脱臼处死后,用手术剪剪开右背部皮肤,完整剥离皮下移植瘤。于电子天平上称量肿瘤质量,采用游标卡尺测量肿瘤长径(mm)和短径(mm),计算肿瘤体积。肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )=长径 $\times$ 短径 $^2/2$ 。

**1.10 流式细胞术检测共培养体系下各组RAW264.7细胞和裸鼠肿瘤组织中巨噬细胞极化标志物的表达情况** 取各组处理后共培养体系下的RAW264.7细胞,加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)制成 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液。取“1.9”中的各组新鲜肿瘤组织约240 mg,剪碎后经胶原酶消化分离细胞,用PBS缓冲液洗涤后,制成 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液。取各组RAW264.7细胞和裸鼠肿瘤组织细胞悬液各1 mL,以3%牛血清白蛋白溶液封闭后,依次孵育APC-F4/80、PE-CD206和PE-CD16抗体,加入PBS缓冲液洗涤并重悬后,采用流式细胞术检测各组RAW264.7细胞和裸鼠肿瘤组织中M1及M2型巨噬细胞情况,计算M1和M2型巨噬细胞比值。M1型巨噬细胞定义为 $\text{F4/80}^+\text{CD16}^+$ , M2型巨噬细胞定义为 $\text{F4/80}^+\text{CD206}^+$ 。

**1.11 试剂盒检测共培养体系下各组RAW264.7细胞上清和裸鼠血清中M1/M2型巨噬细胞分泌因子水平** 取各组处理后共培养体系下的RAW264.7细胞上清,于 $4^\circ\text{C}$ 、 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清。取各组裸鼠处死前经眼眶采集的血液样本,离心后取上清。严格按照ELISA试剂盒说明书操作,采用酶标仪测定各组细胞上清和裸鼠血清中M1型巨噬细胞分泌因子IL-6、TNF- $\alpha$ 和iNOS及M2型巨噬细胞分泌因子TGF- $\beta$ 、Arg-1和IL-10水平。

**1.12 Western blotting法检测共培养体系下各组RAW264.7细胞和裸鼠肿瘤组织中I $\kappa$ B- $\alpha$ 、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平** 取各组处理后共培养体系下的RAW264.7细胞和裸鼠肿瘤组织,加入RIPA裂解液提取总蛋白,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度后,于沸水浴中变性。每组取 $15 \mu\text{g}$ 细胞和肿瘤蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),并转印至PVDF膜。封闭后分别孵育p-I $\kappa$ B- $\alpha$ (1:1 000稀释)、I $\kappa$ B- $\alpha$

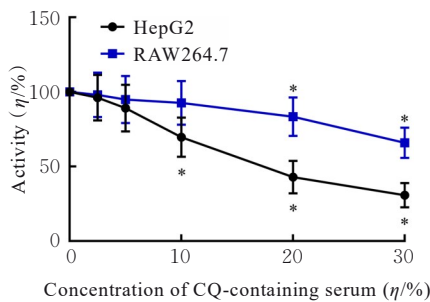
(1:2 000)、p-NF- $\kappa$ B p65(1:2 000)、 $\beta$ -actin(1:1 000)和 NF- $\kappa$ B p65 (1:2 000) 一抗, 洗涤后加入二抗 (1:2 000), 增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色后拍照, 采用 Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/ $\beta$ -actin 条带灰度值。

**1.13 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。各组细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数, 裸鼠移植瘤体积和质量, RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1/M2 型巨噬细胞百分率, RAW264.7 细胞上清和裸鼠血清中 M1/M2 型细胞因子表达水平以及 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  及 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK- $q$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 含 CQ 血清最佳处理浓度和各组细胞活性

不同浓度含 CQ 血清作用后, 结果显示: 与对照组比较, 10.0%、20.0% 和 30.0% CQ 血清组 HepG2 细胞活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 20.0% 和 30.0% CQ 血清组 RAW264.7 细胞活性明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1。



\* $P < 0.05$  compared with 0% CQ-containing serum group.

图1 不同浓度含 CQ 血清作用后 HepG2 和 RAW264.7 细胞活性

Fig. 1 Activities of HepG2 and RAW264.7 cells after treated with different concentrations of CQ-containing serum

ELISA 试剂盒检测结果显示: 与空白组比较, 共培养组 RAW264.7 细胞上清中 IL-10 水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 提示共培养可促进 RAW264.7 细胞

向 M2 型极化; 与共培养组比较, 2.5%、5.0%、10.0%、20.0% 和 30.0% CQ 血清组 RAW264.7 细胞上清中 IL-6 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), IL-10 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。为尽量避免 CQ 对 HepG2 和 RAW264.7 细胞的诱导作用对实验产生影响, 选择 5.0% CQ 血清进行后续细胞实验。

表1 不同浓度含 CQ 血清作用后 RAW264.7 细胞上清中 IL-6 和 IL-10 水平

Tab. 1 Levels of IL-6 and IL-10 in supernant of RAW264.7 cells after treated with different concentrations of CQ-containing serum [n=6,  $\bar{x} \pm s$ ,  $\rho_B / (ng \cdot L^{-1})$ ]

| Group                     | IL-6                   | IL-10               |
|---------------------------|------------------------|---------------------|
| Blank                     | 79.04±13.35            | 23.01±3.92          |
| Co-culture                | 96.15±12.10            | 82.75±5.13*         |
| 2.5% CQ-containing serum  | 220.28±13.64* $\Delta$ | 63.52±2.87 $\Delta$ |
| 5.0% CQ-containing serum  | 345.76±14.15* $\Delta$ | 45.02±3.24 $\Delta$ |
| 10.0% CQ-containing serum | 402.85±15.86* $\Delta$ | 27.93±2.90 $\Delta$ |
| 20.0% CQ-containing serum | 420.23±17.12* $\Delta$ | 25.80±3.45 $\Delta$ |
| 30.0% CQ-containing serum | 435.71±16.53* $\Delta$ | 24.14±4.16 $\Delta$ |

\* $P < 0.05$  compared with blank group;  $\Delta P < 0.05$  compared with co-culture group.

2.2 各组共培养体系下 HepG2 细胞活性、迁移

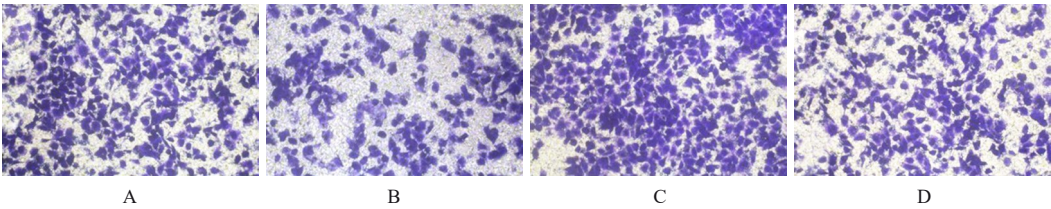
细胞数和侵袭细胞数 与对照组比较, CQ 组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数明显降低 ( $P < 0.05$ ), PDTTC 组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 CQ 组比较, CQ+PDTTC 组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数明显升高 ( $P < 0.05$ )。见图 2、图 3 和表 2。

2.3 各组裸鼠皮下移植瘤的体积和质量

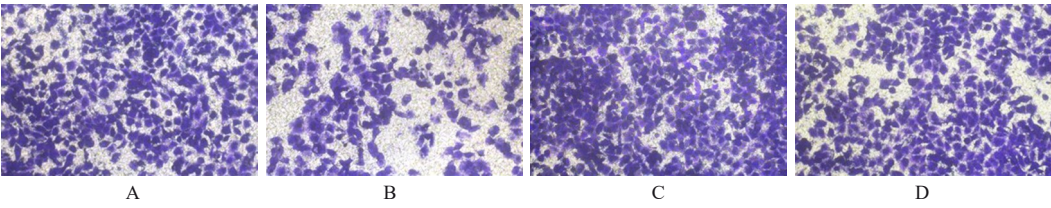
与对照组 (912.35 mm<sup>3</sup>±31.46 mm<sup>3</sup>和 2.31 g±0.23 g) 比较, CQ 组裸鼠移植瘤体积 (254.82 mm<sup>3</sup>±23.15 mm<sup>3</sup>) 和质量 (0.79 g±0.15 g) 均明显降低 ( $P < 0.05$ ), PDTTC 组裸鼠移植瘤体积 (1 613.42 mm<sup>3</sup>±37.85 mm<sup>3</sup>) 和质量 (3.82 g±0.30 g) 均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 CQ 组比较, CQ+PDTTC 组裸鼠移植瘤体积 (881.96 mm<sup>3</sup>±32.41 mm<sup>3</sup>) 和质量 (2.16 g±0.18 g) 均明显升高 ( $P < 0.05$ )。

2.4 各组共培养体系下 RAW264.7 细胞和裸鼠肿

瘤组织中巨噬细胞极化情况 与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显升高 ( $P < 0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分



A: Control group; B: CQ group; C: PDTC group; D: CQ+PDTC group.  
图 2 各组 HepG2 细胞迁移情况(结晶紫, ×200)  
Fig. 2 Migration of HepG2 cells in various groups (Crystal violet, ×200)



A: Control group; B: CQ group; C: PDTC group; D: CQ+PDTC group.  
图 3 各组 HepG2 细胞侵袭情况(结晶紫, ×200)  
Fig. 3 Invasion of HepG2 cells in various groups (Crystal violet, ×200)

表 2 各组 HepG2 细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数  
Tab. 2 Cell activities and numbers of migration and invasion  
HepG2 cells in various groups (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

| Group   | Cell activity<br>( $\eta/\%$ ) | Number of<br>migration cells | Number of<br>invasion cells |
|---------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Control | 100.00 $\pm$ 0.00              | 232.50 $\pm$ 19.23           | 329.00 $\pm$ 21.36          |
| CQ      | 48.90 $\pm$ 9.62*              | 119.00 $\pm$ 14.15*          | 132.50 $\pm$ 16.22*         |
| PDTC    | 205.45 $\pm$ 13.25*            | 343.50 $\pm$ 22.46*          | 471.00 $\pm$ 27.40*         |
| CQ+PDTC | 92.70 $\pm$ 10.84 $\Delta$     | 215.00 $\pm$ 20.14 $\Delta$  | 314.50 $\pm$ 23.05 $\Delta$ |

\* $P<0.05$  compared with control group;  $\Delta P<0.05$  compared with CQ group.

率明显降低 ( $P<0.05$ ); PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显降低 ( $P<0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分率明显升高 ( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 型巨噬细胞百分率明显降低 ( $P<0.05$ ), M2 型巨噬细胞百分率明显升高 ( $P<0.05$ )。见图 4、图 5 和表 3。

2.5 各组共培养体系下 RAW264.7 细胞上清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平

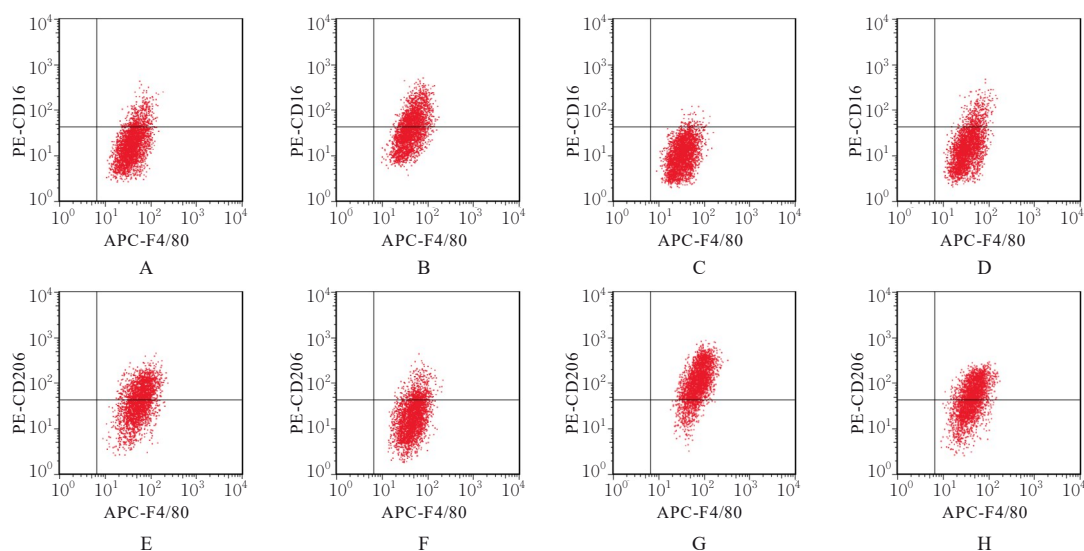
与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞上清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显降低 ( $P<0.05$ ); PDTC 组 RAW264.7 细胞上清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和

IL-10 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞上清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。见表 4。

2.6 各组 HepG2 移植瘤裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS、TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平 与对照组比较, CQ 组裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显升高 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显降低 ( $P<0.05$ ); PDTC 组裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组裸鼠血清中 IL-6、TNF- $\alpha$  和 iNOS 水平明显降低 ( $P<0.05$ ), TGF- $\beta$ 、Arg-1 和 IL-10 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。见表 5。

2.7 各组共培养体系下 RAW264.7 细胞中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值 与对照组比较, CQ 组 RAW264.7 细胞中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显升高 ( $P<0.05$ ), PDTC 组 RAW264.7 细胞中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显降低 ( $P<0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组 RAW264.7 细胞中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  比值和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显降低 ( $P<0.05$ )。见图 6。

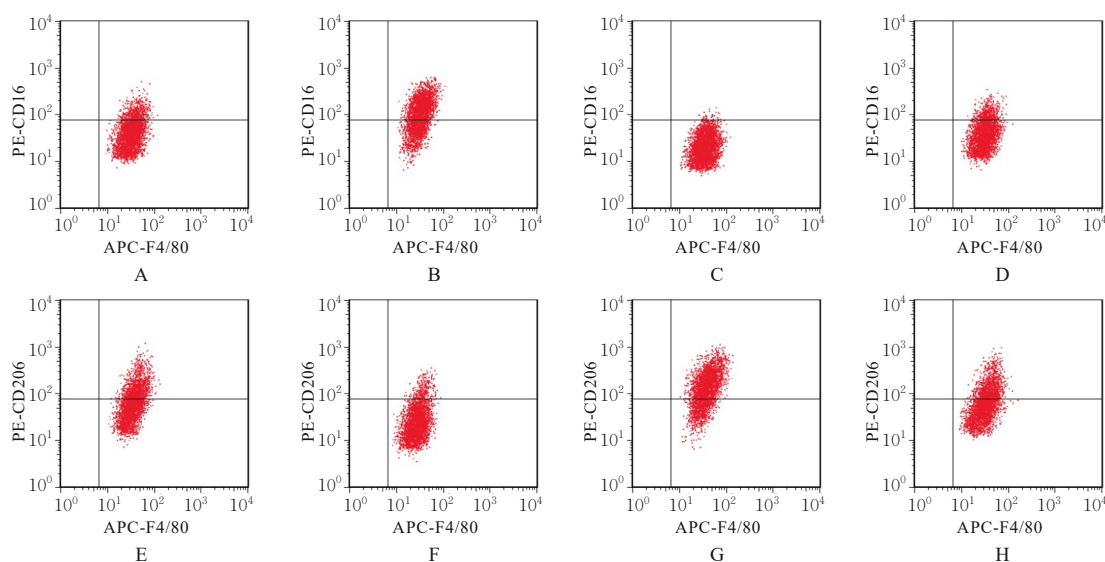
2.8 各组裸鼠移植瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值 与对照组比较, CQ 组



A, E: Control group; B, F: CQ group; C, G: PDTC group; D, H: CQ+PDTC group; A-D: M1 type; E-H: M2 type.

图4 流式细胞术检测各组RAW264.7细胞中M1和M2型巨噬细胞极化表型

Fig. 4 Polarization phenotypes of macrophages in RAW264.7 cells in various groups detected by flow cytometry



A, E: Control group; B, F: CQ group; C, G: PDTC group; D, H: CQ+PDTC group; A-D: M1 type; E-H: M2 type.

图5 流式细胞术检测各组裸鼠肿瘤组织中M1和M2型巨噬细胞极化表型

Fig. 5 Polarization phenotypes of macrophages in tumor tissue of nude mice in various groups detected by flow cytometry

裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显升高 ( $P < 0.05$ ), PDTC 组裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显降低 ( $P < 0.05$ )。与 CQ 组比较, CQ+PDTC 组裸鼠肿瘤组织中 p-I $\kappa$ B- $\alpha$ /I $\kappa$ B- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 比值均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

### 3 讨论

肝细胞癌对我国人民生命和健康造成严重威胁, 现已成为我国癌症相关死亡的主要原因之一<sup>[13-14]</sup>。目前临床上以手术为主的综合治疗方案虽在一定程度上改善了患者生活质量和预后, 但总体生存率仍不理想, 因此探讨更有效的防治手段始终是肝细胞癌研究的热点<sup>[15-16]</sup>。中医理论将肝细胞癌归属于“积聚”范畴, 认为其病机根本在于脾虚气

表 3 各组 RAW264.7 细胞和裸鼠肿瘤组织中 M1 及 M2 型巨噬细胞百分率

Tab. 3 Percentages of M1 type and M2 type macrophages in RAW264. 7 cells and tumor tissue of nude mice in various groups  
( $n=6, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

| Group   | M1 type macrophage      |                         | M2 type macrophage      |                         |
|---------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|         | RAW264.7                | Tumor tissue            | RAW264.7                | Tumor tissue            |
| Control | 18.05±3.30              | 20.84±2.62              | 52.43±4.73              | 45.31±4.12              |
| CQ      | 52.32±4.25*             | 63.75±4.80*             | 20.36±3.15*             | 16.70±2.90*             |
| PDTC    | 1.84±0.60*              | 2.56±0.79*              | 81.90±5.64*             | 71.89±4.53*             |
| CQ+PDTC | 20.13±2.72 <sup>△</sup> | 22.13±2.45 <sup>△</sup> | 49.86±3.92 <sup>△</sup> | 43.25±3.64 <sup>△</sup> |

\* $P<0.05$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with CQ group.

表 4 各组 RAW264.7 细胞上清中 M1/M2 型巨噬细胞分泌因子水平

Tab. 4 Levels of M1/M2 type macrophage secretion factors in supernatant of RAW264. 7 cells in various groups  
( $n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ )

| Group   | IL-6                      | TNF- $\alpha$           | iNOS                    | TGF- $\beta$            | Arg-1                    | IL-10                   |
|---------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Control | 93.54±9.37                | 42.71±5.02              | 11.74±1.15              | 31.15±3.76              | 126.21±9.16              | 82.75±6.13              |
| CQ      | 234.76±15.72*             | 184.69±9.20*            | 29.83±2.04*             | 14.49±2.53*             | 49.86±7.95*              | 29.10±4.51*             |
| PDTC    | 40.13±7.51*               | 13.45±3.62*             | 3.67±0.92*              | 47.62±4.14*             | 198.74±8.78*             | 131.82±8.36*            |
| CQ+PDTC | 101.08±11.13 <sup>△</sup> | 47.93±4.84 <sup>△</sup> | 12.95±1.48 <sup>△</sup> | 29.05±3.12 <sup>△</sup> | 118.54±8.20 <sup>△</sup> | 76.91±6.42 <sup>△</sup> |

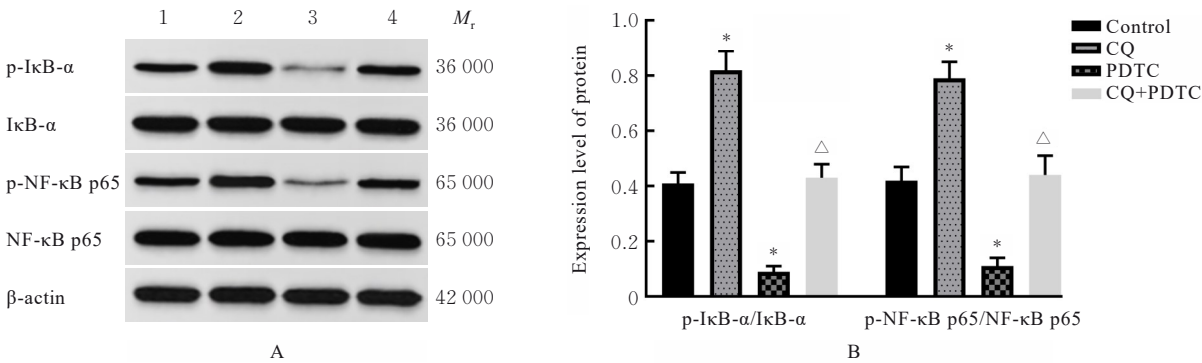
\* $P<0.05$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with CQ group.

表 5 各组裸鼠血清中 M1/M2 型巨噬细胞分泌因子水平

Tab. 5 Levels of M1/M2 type macrophage secretion factors in serum of nude mice in various groups  
( $n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$ )

| Group   | IL-6                    | TNF- $\alpha$           | iNOS                   | TGF- $\beta$            | Arg-1                   | IL-10                   |
|---------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Control | 60.92±6.73              | 29.62±4.14              | 5.98±0.37              | 15.56±2.63              | 71.64±7.13              | 59.12±5.20              |
| CQ      | 156.45±13.62*           | 130.51±6.97*            | 19.32±0.64*            | 7.47±1.82*              | 23.60±6.04*             | 18.63±3.57*             |
| PDTC    | 27.63±5.21*             | 8.75±2.70*              | 0.83±0.25*             | 24.06±3.15*             | 117.95±8.20*            | 105.82±7.69*            |
| CQ+PDTC | 67.10±7.24 <sup>△</sup> | 33.56±3.92 <sup>△</sup> | 5.13±0.46 <sup>△</sup> | 13.91±2.81 <sup>△</sup> | 66.17±7.92 <sup>△</sup> | 54.96±4.84 <sup>△</sup> |

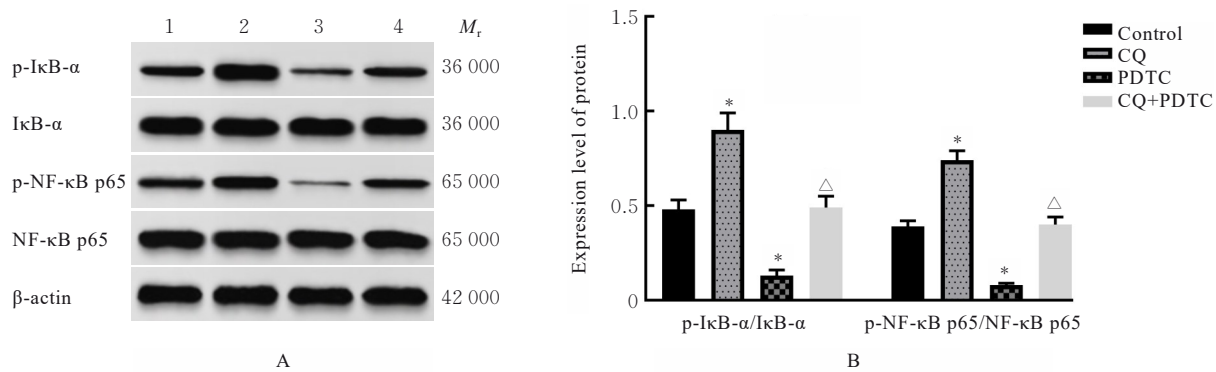
\* $P<0.05$  compared with control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  compared with CQ group.



Lane 1: Control group; Lane 2: CQ group; Lane 3: PDTC group; Lane 4: CQ+PDTC group. \* $P<0.05$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs CQ group.

图 6 各组 RAW264.7 细胞中 NF-κB 通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of NF-κB pathway related proteins in RAW264.7 cells in various groups



Lane 1: Control group; Lane 2: CQ group; Lane 3: PDTC group; Lane 4: CQ+PDTC group. \* $P < 0.05$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs CQ group.

图7 各组裸鼠肿瘤组织中 NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 7 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of NF- $\kappa$ B pathway related proteins in tumor tissue of nude mice in various groups

滞和毒邪入侵, 导致痰、湿、热、瘀、毒互结, 发为肝癌; 治疗应以扶正为本, 兼清解湿热、祛除毒邪<sup>[11]</sup>。CQ主要由柴胡、黄芪、丹参、白芍和鳖甲等组成, 其中柴胡可疏肝理气, 黄芪可建中益气, 白芍可滋阴补气, 丹参可祛瘀活血, 鳖甲可软坚散结, 诸药配合, 共奏疏肝健脾、补益气血和清热化痰之效<sup>[8, 17]</sup>。研究<sup>[11, 18]</sup>显示 CQ 颗粒制剂可抑制肝移植瘤生长和转移。本研究结果显示: CQ 处理后, 裸鼠移植瘤体积和质量明显降低, 表明 CQ 可抑制肝细胞癌细胞的体内生长和增殖, 进一步证实了 CQ 的抗肝癌作用。

肿瘤相关巨噬细胞是肝细胞癌肿瘤微环境中的重要组成部分, 与肝细胞癌的恶性进展和治疗有密切关联。研究<sup>[19-20]</sup>显示: 促进巨噬细胞向 M1 型极化并抑制其 M2 极化, 可有效降低肝细胞癌细胞增殖活性, 从而抑制肿瘤进展。本研究结果显示: 巨噬细胞 RAW264.7 和 HepG2 细胞共培养可促进巨噬细胞向 M2 型极化, 表现为 M2 型相关因子 IL-10 水平升高, 表明 HepG2 可促进 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 型极化; 含 CQ 血清处理后, 可逆转 HepG2 对 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 型极化的促进作用。与对照组比较, CQ 组 HepG2 细胞的细胞活性、迁移细胞数和侵袭细胞数均明显降低, M2 型巨噬细胞百分率和 M2 型巨噬细胞分泌因子 TGF- $\beta$ 、Arg-1 及 IL-10 水平明显降低, 且其 M1 型巨噬细胞百分率和 M1 型巨噬细胞分泌因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及 iNOS 水平升高, 进一步表明 CQ 可促使巨噬细胞从 M2 型向 M1 型极化, 增强其促炎表型, 从而抑制肝细

胞癌细胞增殖、迁移与侵袭。移植瘤裸鼠实验进一步证实: CQ 可诱导巨噬细胞向 M1 型极化, 抑制肝细胞癌恶性进展, 揭示了 CQ 对肝细胞癌发挥抗癌作用的机制之一可能是促进巨噬细胞向 M1 型极化。网络药理学研究<sup>[21]</sup>发现: CQ 主要活性成分包括槲皮素、白藜芦醇、山柰酚、木樨草素、 $\beta$ -谷甾醇和丹参酮 II A 等, 含 CQ 血清中的主要起效成分可能是以上活性成分或其代谢物质。本文作者尚未对其活性成分进行研究, 存在一定局限性, 后续还需通过超高效液相色谱-串联质谱对含 CQ 血清的具体药理学活性成分进行分析鉴定。

NF- $\kappa$ B 信号通路在调控巨噬细胞极化和肝细胞癌发生发展中有重要作用<sup>[5, 22]</sup>, 该通路激活后可促进肿瘤相关巨噬细胞从 M2 型向 M1 型转化, 进而增强效应 T 细胞的抗肿瘤免疫应答, 最终发挥抗肿瘤功效<sup>[23-24]</sup>。本研究体内外实验结果显示: CQ 可促进 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化及其降解, 并促进 NF- $\kappa$ B p65 发生磷酸化; NF- $\kappa$ B 抑制剂 PDTC 则可促进巨噬细胞向 M2 型极化, 加速肝癌 HepG2 细胞恶性进展和移植瘤生长; PDTC 可减弱 CQ 对巨噬细胞从 M2 型向 M1 型极化的促进作用, 逆转 CQ 对肝细胞癌细胞恶性进展的抑制作用, 揭示 CQ 可能通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路, 诱导肿瘤相关巨噬细胞向 M1 型极化, 从而抑制肝细胞癌进展。LEI 等<sup>[25]</sup>研究表明: 激活 NF- $\kappa$ B 信号通路可通过促进慢性肝脏炎症, 减弱柴胡皂苷 b2 对肝癌的抑制作用, 表明慢性炎症是肿瘤发生发展的诱发因素之一。研究<sup>[23-24]</sup>显示: 当 NF- $\kappa$ B 信号激活时, 肿瘤相关巨噬细胞从 M2 型向

M1型极化,可启动机体天然免疫应答,通过释放促炎因子来杀伤癌细胞,因而NF- $\kappa$ B信号介导的肿瘤相关巨噬细胞极化在癌症发生发展中具有双重作用,可能与时间和空间不同有关。

综上所述,CQ可通过激活NF- $\kappa$ B信号通路,刺激巨噬细胞从M2型向M1型极化,增加促炎因子分泌并减少抗炎因子分泌,进而抑制肝癌HepG2细胞的增殖、迁移、侵袭及移植瘤生长,最终抑制其恶性进展。本研究结果进一步证实了CQ在肝癌细胞癌临床治疗中的应用潜力,为其临床推广提供了初步的药理学依据,也为完善肝癌治疗策略提供了新思路。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

张希倩参与研究选题、实验设计、实验操作和论文撰写,党志博参与论文指导、审阅和修改,杜雨楠和吴培参与实验操作及数据整理,谢航和谭高峰参与统计学分析。

#### [参考文献]

- [1] LV S M, WANG J H, LI L. Extracellular vesicular lncRNA FAL1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by inducing macrophage M2 polarization[J]. J Physiol Biochem, 2023, 79(3): 669-682.
- [2] CHEN S P, ZHANG P L, ZHU G Q, et al. Targeting GSDME-mediated macrophage polarization for enhanced antitumor immunity in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Mol Immunol, 2024, 21(12): 1505-1521.
- [3] CAI J L, SONG L N, ZHANG F, et al. Targeting SRSF10 might inhibit M2 macrophage polarization and potentiate anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Commun, 2024, 44(11): 1231-1260.
- [4] HAN S L, BAO X Y, ZOU Y F, et al. D-lactate modulates M2 tumor-associated macrophages and remodels immunosuppressive tumor microenvironment for hepatocellular carcinoma[J]. Sci Adv, 2023, 9(29): eadg2697.
- [5] TAN S Y, WANG Z H, LI N, et al. Transcription factor Zhx2 is a checkpoint that programs macrophage polarization and antitumor response [J]. Cell Death Differ, 2023, 30(9): 2104-2119.
- [6] LI L, ZUO W T, LIU H, et al. Oxoaporphine Pr(III) complex inhibits hepatocellular carcinoma progression and metastasis by disrupting tumor cell-macrophage crosstalk [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169: 115849.
- [7] 游敏玲,罗满芳,廖蔚茜,等. 柴芪益肝颗粒联合紫杉醇抑制裸鼠肝癌生长的在体成像研究[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(7): 1042-1045.
- [8] 周怡驰,晏 军,胡世平,等. 基于生物分子网络调控研究柴芪益肝方治疗肝纤维化的作用机制[J]. 世界中西医结合杂志, 2021(3): 393-400, 445.
- [9] 吕景娣,王永辉,冷茹冰,等. 比卡鲁胺对乳腺癌细胞周期、巨噬细胞极化及p38/p-STAT1水平的影响[J]. 现代药物与临床, 2023, 38(7): 1553-1559.
- [10] 张春焕,阚士锋,魏守娟,等. LPS通过宫颈癌细胞来源的IL-6调节巨噬细胞分泌和趋化活性[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(12): 905-909.
- [11] 罗江萍,刘永红,马全庆,等. 柴芪益肝颗粒对小鼠肝移植瘤的作用[J]. 广东医学, 2011, 32(3): 284-286.
- [12] 袁兆林,刘 娣,朱绪锋. HMGB1/RAGE轴在结直肠癌肥大细胞浸润中的作用机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(15): 1861-1865.
- [13] COFFIN P, HE A W. Hepatocellular carcinoma: past and present challenges and progress in molecular classification and precision oncology[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(17): 13274.
- [14] SINGH S P, ARORA V, MADKE T, et al. Hepatocellular carcinoma-Southeast Asia updates [J]. Cancer J, 2023, 29(5): 259-265.
- [15] WU D Q, LI Y J. Application of adoptive cell therapy in hepatocellular carcinoma[J]. Immunology, 2023, 170(4): 453-469.
- [16] PONVILAWAN B, ROTH M T. Sequencing systemic therapy in hepatocellular carcinoma [J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24(11): 1580-1597.
- [17] 王 妮,贺屹巍,陈燕京,等. 柴芪疏肝调脾方联合生物反馈对腹腔镜直肠癌低位保肛术后胃肠、肛门功能指标恢复的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2023, 22(5): 491-495.
- [18] 马贵萍, 刘博文, 李晓斌, 等. 基于 mTORC1/SREBP1/SCD1信号通路探讨柴芪益肝颗粒含药血清对肝癌HepG2细胞铁死亡的影响[J]. 中成药, 2025, 47(4): 1305-1309.
- [19] LU Y J, SUN Q K, GUAN Q F, et al. The XOR-IDH3 $\alpha$  axis controls macrophage polarization in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2023, 79(5): 1172-1184.
- [20] LIU Y Y, TANG Y F, JIANG H L, et al. Exosome-related FTCD facilitates M1 macrophage polarization and impacts the prognosis of hepatocellular

- carcinoma[J]. *Biomolecules*, 2023, 14(1): 41.
- [21] LI G L, TANG J F, TAN W L, et al. The anti-hepatocellular carcinoma effects of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by regulating macrophage polarization via the MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Food Funct*, 2023, 14(7): 3155-3168.
- [22] 冯雯倩, 杜 洋, 毛德文, 等. 核因子 $\kappa$ B信号通路在肝脏疾病中的作用机制及潜在治疗靶点[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(9): 1949-1955.
- [23] YU Z, LI Y Y, LI Y, et al. Bufalin stimulates antitumor immune response by driving tumor-infiltrating macrophage toward M1 phenotype in hepatocellular carcinoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2022, 10(5): e004297.
- [24] XU G L, FENG D J, YAO Y, et al. Listeria-based hepatocellular carcinoma vaccine facilitates anti-PD-1 therapy by regulating macrophage polarization [J]. *Oncogene*, 2020, 39(7): 1429-1444.
- [25] LEI C H, GAO Z H, LV X Z, et al. Saikosaponin-b2 inhibits primary liver cancer by regulating the STK4/IRAK1/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(10): 2859.