DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.04.048

白花蛇舌草提取物调控TGF－β/Smad信号通路对肾癌细胞增殖、凋亡的影响

尚官威[1],王兵[1],王佳鑫[1],张林超[2],于小明[2],潘世杰[2],赵俊峰[2]
(1.河南中医药大学第二临床医学院,河南 郑州 450002;2.河南省中医院,河南 郑州 450002)

摘要:目的 探究白花蛇舌草提取物对肾癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制。方法 将32只接种肾癌Renca细胞的BALB/c小鼠随机分为4组,分别为模型(Model)组、白花蛇舌草提取物(Hedyotis diffusa Willd)组、5－氟尿嘧啶(5－FU)组、TGF－β/Smad通路抑制剂(LY2157299)组,每组8只。相应剂量灌胃给药,模型组给予等体积生理盐水灌胃,1次/d,用药14 d。记录小鼠移植瘤块体积变化,末次给药24 h后处死各组小鼠,称量肿瘤质量,计算抑瘤率;通过Western blot检测TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Bcl－xl、Bad、cleaved－Caspase－3表达情况;免疫组化法检测增殖细胞核抗原Ki67、PCNA表达水平;肿瘤组织行HE和TUNEL染色检测肿瘤细胞形态和凋亡情况。结果 与模型组比较,3个实验组的移植瘤生长速度均被抑制,给药14 d后的移植瘤体积均明显减小。Western blot结果显示,与模型组比较,3个实验组上调促凋亡蛋白Bad、cleaved－Caspase－3的表达量,下调抗凋亡蛋白Bcl－xl及通路蛋白TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3的表达($P<0.05$);免疫组织化学结果表明,3个实验组肿瘤组织的Ki67与PCNA的表达显著低于模型组($P<0.05$);HE染色和TUNEL染色结果显示:与模型组比较,3个实验组肿瘤组织中的肾癌细胞增殖能力受到抑制,凋亡率显著增加($P<0.05$)。结论 白花蛇舌草提取物可以抑制肾癌Renca细胞增殖,促进肾癌Renca细胞凋亡,其机制可能与抑制TGF－β/Smad信号通路活化有关。

关键词:白花蛇舌草;肾癌;TGF－β/Smad信号通路;增殖;凋亡
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)04-0242-09

基金项目:河南省中医药科学研究专项(2021JDZX2043)
作者简介:尚官威(1998－),男,河南商丘人,医师,硕士,研究方向:泌尿外科相关疾病。
通讯作者:张林超(1972－),男,河南新密人,主任医师,硕士研究生导师,硕士,研究方向:泌尿外科、男科临床及基础。E-mail:zlcdoctor@163.com。

[7] 余学清,陈江华.内科学－肾脏内科分册[M].2版.北京:人民卫生出版社,2021.
[8] 吴勉华,石岩.中医内科学[M].5版.北京:中国中医药出版社,2021.
[9] 付会玲.越婢加术汤合五苓散治疗成人原发性肾病综合征风水相搏证临床观察[J].四川中医,2020,22(6):1266－1280.
[10] GUAN N,YAO Y,XIAO H J,et al. Factors predicting the recovery from acute kidney injury in children with primary nephrotic syndrome[J]. Clin Exp Nephrol,2021,25(9):1011－1017.
[11] 苏雨田,吴垚,许正锦.中西医结合治疗激素依赖型肾病综合征研究进展[J].中医学报,2024,39(1):108－113.
[12] NOONE D G,IIJIMA K,PAREKH R. Idiopathic nephrotic syndrome in children[J]. Lancet,2018,392(10141):61－74.
[13] CHRISTIAN M T,MAXTED A P. Correction to:Optimizing the corticosteroid dose in steroid－sensitive nephrotic syndrome[J]. Pediatr Nephrol,2022,37(6):1425.
[14] SINHA A,BAGGA A,BANERJEE S,et al. Steroid sensitive nephrotic syndrome:revised guidelines[J]. Indian Pediatr,2021,58(5):461－481.
[15] 尹聪,陈颖,赵昶潞,等.孙郁芝从"风"论治原发性肾病综合征[J].中医药导报,2022,28(11):103－106,110.
[16] 王晖,宋立群,何石骏,等.培土制水论治原发性肾病综合征的相关研究进展[J].世界中医药,2023,18(22):3306－3310.
[17] 刘小龙,金钟大.麻黄连翘赤小豆汤合防己黄芪汤加减治疗原发性肾病综合征临床观察[J].四川中医,2021,39(11):142－145.
[18] 肖祥,吴宣諭,任益锋,等.基于CiteSpace的麻黄连翘赤小豆汤研究进展与趋势可视化分析[J].中医药导报,2023,29(10):143－150.
[19] WANG Y X,MA Y H,KE Y R,et al. Fangji Huangqi decoction ameliorates membranous nephropathy through the upregulation of BNIP3－mediated mitophagy[J]. J Ethnopharmacol,2024,324:117734.
[20] 刘艳,张国媛,陈莎,等.经典名方麻黄汤的处方考证及历史沿革分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(1):7－16.
[21] 郑晓珂,周静,于洋,等.桑白皮各化学拆分组分对阿霉素肾病大鼠水钠潴留的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(23):103－110.
[22] ALFAKEEKH K,AZAR M,SOWAILMI B A,et al. Immunosuppressive burden and risk factors of infection in primary childhood nephrotic syndrome[J]. J Infect Public Health,2019,12(1):90－94.
[23] 卓小玉,陈晶,田明,等.麻黄的化学成分与药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(2):80－83.
[24] 刘楠,李纳,马晓华,等.中药影响实验性自身免疫性脑脊髓炎$CD4^+T$细胞亚群分化的研究进展[J].中草药,2021,52(4):1177－1184.
[25] 李琴,刘惠美,李兰芳.常见中药在治疗血脂异常中的研究新进展[J].中国动脉硬化杂志,2023,31(7):564－572.
[26] 王涛,陈绮蕾,王柏方,等.伤寒黄疸方"麻黄连轺赤小豆汤"证候分析、方中连轺考证及对连翘药用价值和研究的启示[J].世界科学技术－中医药现代化,2023,25(9):2909－2913.

Effect of Baihuasheshecao(*Hedyotis diffusa* Willd) Extract Regulating TGF-β/Smad Signaling Pathway on Proliferation and Apoptosis of Renal Cell Carcinoma Cells

SHANG Guanwei[1], WANG Bing[1], WANG Jiaxin[1], ZHANG Linchao[2], YU Xiaoming[2], PAN Shijie[2], ZHAO Junfeng[2]
(1. The Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, Henan, China;
2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: *Objective* To investigate the effects and mechanisms of extracts from Baihuasheshecao(*Hedyotis diffusa* Willd) on the proliferation and apoptosis of renal cancer cells. *Method* Thirty-two BALB/c mice inoculated with renal cancer Renca cells were randomly divided into model group, Baihuasheshecao(*Hedyotis diffusa* Willd) extract group, 5-fluorouracil(5-FU) group and transforming growth factor-β(TGF-β)/Smad pathway inhibitor(LY2157299) group, with 8 mice in each group. Corresponding doses were administered by gavage, and the model group was given an equal volume of physiological saline by gavage once a day for 14 days. The volume changes of transplanted tumor blocks in mice were recorded. The mice in each group were euthanized 24 hours after the last administration. The tumor mass was weighed, and the tumor inhibition rate was calculated. Western blot was used to detect the expressions of TGF-β1, p-Smad2, p-Smad3, Bcl-xl, Bad and cleaned-Caspase-3. Immunohistochemical method was used to detect the protein expressions of proliferating cell nuclear antigen Ki67 and PCNA. HE and TUNEL staining were performed on tumor tissues to detect the morphology and apoptosis of tumor cells. *Result* Compared with the model group, the growth rate of transplanted tumors in all three experimental groups was inhibited, and the volume of transplanted tumors significantly decreased after 14 days of administration. Western blot results showed that compared with the model group, the three experimental groups up-regulated the expression levels of pro apoptotic proteins Bad and cleaned-Caspase-3, down-regulated the expressions of anti apoptotic protein Bcl-xl and pathway proteins TGF-β1, p-Smad2 and p-Smad3($P<0.05$). The immunohistochemical results showed that the expressions of Ki67 and PCNA in tumor tissues of the three experimental groups were significantly lower than those of the model group($P<0.05$). The results of HE staining and TUNEL staining showed that compared with those of the model group, the proliferation ability of renal cancer cells in the tumor tissues of the three experimental groups was inhibited, and the apoptosis rate was significantly increased ($P<0.05$). *Conclusion* The extract of Baihuasheshecao(*Hedyotis diffusa* Willd) can inhibit the proliferation of renal cancer Renca cells and promote their apoptosis, which may be related to the inhibition of TGF-β/Smad signaling pathway activation.

Keywords: Baihuasheshecao(*Hedyotis diffusa* Willd); renal cancer; TGF-β/Smad signaling pathway; proliferation; apoptosis

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC, 简称“肾癌”)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。根据最新统计,2022年全球新增肾癌病例约43万例,占所有癌症新发病例数的2.2%,死亡病例约15万例,占所有癌症死亡病例数的1.6%[1],我国肾癌2022年发病患者约为7.4万,死亡病例约2.4万[2]。肾癌病死率为30%~40%,病死率高的主要原因:一是肾脏功能部分受损时有代偿能力,因此早期通过功能异常难以发现肾癌,多数患者在诊断时已经出现远处转移。实体瘤的转移扩散导致肾癌无法通过手术切除治愈[3],对于局部区域肿瘤患者,肾切除术后肿瘤复发是其高风险致死原因。二是尽管有许多治疗策略,但肾细胞癌对常规放疗和化疗具有耐药性。此外,多种药物的临床疗效有限且不可避免地耐药表明临床需求未得到满足[4]。目前的靶向药物酪氨酸激酶抑制剂的治疗取得一定的进展,但也仅对部分患者有效,并且患者仍会产生耐药性并导致临床治疗进展不佳。因此迫切需要为肾癌的治疗和预后选择新的药物[5]。

随着国家对传统中药材重视程度增加及现代药物处理技术的提高,中药材广泛应用于临床各个领域[6]。其中白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd 是一种一年生披散草本植物,具有清热解毒、利尿除湿、散结止痛之效[7]。现代药理研究还发现,该药具有抗肿瘤[8]、调节免疫、抗氧化等作用[9]。白花蛇舌草在癌症治疗中的应用广泛,近年关于其抑制胃癌、肾癌、大肠癌、肝癌、肺癌、乳腺癌[10]等的研究众多,引起科研和临床工作者的广泛关注。邹寒冰等[11]的研究表明,白花蛇舌草可以抑制增殖,也可以使肾癌细胞在细胞周期中陷入周期阻滞,并且可以选择性促进肾癌细胞凋亡。周兴波等[6]的研究表明,白花蛇舌草提取物可能通过提高机体免疫力、抑制血管增生两种途径,抑制肾癌786-O细胞增殖,发挥抗肿瘤功效。白花蛇舌草在肿瘤体外实验研究中,通过调控不同信号通路及靶基因的表达,表现出抑制肿瘤细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用[12],以上研究均表明白花蛇舌草能够发挥抗肿瘤活性。本课题组一直致力于研究传统中药白花蛇舌草对人肾癌细胞的作用机制,前期研究发现白花蛇舌草能够抑制肾癌细胞的增殖、迁移,并参与免疫因子的调节[13],且能通过多种途径发挥作用,如抑制癌组织 EGF-PI3K-AKT-MDM2 通路蛋白的表达,促进肾癌 Renca 细胞的凋亡[14],通过抑制 TGF-β/Smad 通路的活化,一定程度上抑制 Renca 细胞的迁移能力。本研究进一步探讨白花蛇舌草对肾癌细胞增殖和凋亡的影响及可能的作用机制。

TGF-β/Smad 与肾细胞癌的增殖、侵袭、迁移、转移、免疫

密切相关。TGF－β/Smad是细胞内重要的信号通路,参与调控多种重要的生物学过程,在多种肿瘤中均发挥重要作用。周磊等[15]的研究表明千金子二萜醇可以影响Th1/Th2的免疫平衡,促进IFN－γ的分泌和抑制IL－4的分泌,进而影响肾癌进展,其机制可能与TGF－β/Smad4信号通路有关。YIN L[16]等的研究中,作者证明了HOOK1通过经典的TGF－β/ALK5/p－Smad3和非经典的TGF－β/MEK/ERK/c－Myc途径抑制肾细胞癌的生长和转移。宋圣佑等[17]研究表明千金子二萜醇能够抑制TGF－β1/Smad信号转导通路进而降低肾癌小鼠IL－7、IL－10及VEGF表达。张爱莉等[18]的研究表明,TGF－βRⅠ、Smad4在RCCC中的表达降低,提示TGF－βRⅠ、Smad4的表达缺失可能参与了RCCC的发生、发展。TSAI Y T等[19]的研究表明,PFD可以通过抑制癌细胞TGF－β的产生和下游信号通路来阻止肾癌的进展。他们的研究还表明FAST1通过调控TGF－β/Smad信号通路在RC中发挥致癌作用[20]。综上所述,TGF－β/Smad信号通路表达的异常可能与肾癌的发生、发展相关,有希望成为癌症晚期和转移性肿瘤疾病的关键治疗靶点。但目前白花蛇舌草对肾癌细胞增殖和凋亡的影响与该通路的关系尚不明确,因此,本研究旨在前期研究的基础上,采用小鼠肾癌Renca细胞建立肾癌小鼠动物模型,分析白花蛇舌草提取物能否通过调节TGF－β/Smad信号通路活化影响肾癌细胞增殖和凋亡,进一步阐释白花蛇舌草的抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂

1.1.1 实验动物 雄性SPF级BALB/c小鼠共32只,7～8周龄,体质量21～25 g,均购自北京斯贝福生物技术有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(京)2019－0010,使用许可证号SYXK(豫)2021－0018],饲养于河南中医药大学。研究严格按照动物伦理委员会要求执行。动物实验经河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)伦理委员会批准(批号:PZ－HNSZYY－2023－037)。动物自然昼夜节律光照,适应性喂养7 d后进行实验。

1.1.2 实验细胞 小鼠肾癌Renca细胞(中乔新舟,ZQ0996)。

1.1.3 主要试剂与仪器 白花蛇舌草提取物,购买自上海源叶生物科技有限公司(Shanghai yuanye Bio－Technology Co,Ltd,S27202);RIPA总蛋白裂解液(Beyotime,P0013D);PMSF(Beyotime,ST505);PBS缓冲液(biosharp,G0002);HE染色试剂盒(Solarbio,G1079);通用组织固定液(Solarbio,G1101);免疫组化试剂盒(Servicebio,G1215－200T);苏木素染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1004);通用型组织固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1101);组化试剂盒DAB显色剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1212);正常兔血清浓缩型(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1209);HRP标记的山羊抗兔二抗(Servicebio,GB23303);Anti－Ki67(Solarbio,GB111499)、Anti－PCNA(Solarbio,GB12010);原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1502);DAPI染色试剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1012);抗荧光淬灭封片剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1401);破膜液BCA(武汉赛维尔生物科技有限公司,G1204);蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Fisher,A53225);蛋白marker(Thermo,26616);PVDF膜(Millipore,IPVH00010);内参蛋白GAPDH(Proteintech,60004－1－Ig);TGF－β1抗体(Abcam,ab92486)、p－Smad2抗体(Bioss,bs－3419R)、p－Smad3抗体(华安生物,ET1609－41)、Bcl－xl抗体(Bioss,bs－1336R)、Bad抗体(Bioss,bs－0892R)、cleaved－Caspase－3抗体(CST,9661);TGF－β/Smad通路抑制剂LY2157299(AbMole生物科学,M1980－50)、5－氟尿嘧啶/5－FU(美国MCE公司,HY－90006－50)。

1.2 实验方法

1.2.1 体外细胞培养 Renca肾癌细胞接种于含10%胎牛血清的1640培养基中培养(含100 U/ml青霉素和100 U/mL链霉素),细胞置于37 ℃、5%、湿度95%的培养箱中培养,隔日以0.25%胰蛋白酶＋0.02% EDTA消化液消化传代,取处于对数生长期生长良好的肾癌细胞用于实验。

1.2.2 肾癌小鼠模型构建 待细胞生长至对数生长期时,收获细胞,加适量磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞浓度为1×10^7/mL。用脱毛膏进行脱毛并暴露右侧腋下皮肤,于小鼠右侧腋下皮下处接种0.2 mL Renca细胞悬液,在SPF级小鼠IVC饲养室环境中饲养,小鼠自由活动与进食,实验过程遵循《实验动物保护条例》相关规定。

1.2.3 给药及取材 每日观察小鼠肿瘤生长情况,14 d后注射处见肿瘤结节视为肾癌荷瘤小鼠模型建立成功。各组间瘤块生长无明显差异时开始给予药物干预。模型(Model)组小鼠灌胃等体积的0.9%生理盐水0.2 mL,1次/d,持续给药14 d;白花蛇舌草提取物(Hedyotis diffusa wild)组予以100 mg/kg白花蛇舌草提取物灌胃,1次/d,持续给药14 d。5－氟尿嘧啶(5－FU)组予以20 mg/kg 5－FU灌胃,1次/d,持续给药14 d。TGF－β/Smad通路抑制剂(LY2157299)组予以25 mg/kg LY2157299灌胃,1次/d,持续给药14 d。给药结束后,腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠,分离小鼠移植瘤瘤块记录称重。

1.2.4 测定小鼠瘤体积绘制生长曲线图并计算抑瘤率 给药后各组小鼠的一般情况:给药期间,2 d/次记录各组小鼠的移植瘤体积。移植瘤体积检测方法:测量并记录移植瘤长(a)、宽(b)、高径(c),移植瘤体积$V=1/2\times a\times b\times c(mm^3)$,GraphPad Prism软件绘制时间－小鼠移植瘤体积生长曲线。抑瘤率=(模型组肿瘤平均质量－给药组肿瘤平均质量)/模型组肿瘤平均质量×100%。

1.2.5 肿瘤组织HE染色 瘤块样本用4%多聚甲醛组织固定液固定,包埋切片,切片脱蜡至水,严格按照HE染色试剂盒步骤进行染色,脱水、透明、封片,于显微镜下观察染色效果并图像采集。

1.2.6 Western blot印迹检测肾癌细胞中TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3、Bcl－xl、Bad、cleaved－Caspase－3蛋白表达情况 肿瘤组织块用预冷的PBS缓冲液漂洗,剪切成小块置于匀浆器中。加入10倍于组织体积的组织蛋白提取试剂,冰浴彻底匀浆。将匀浆液转移至离心管中,振荡。冰浴30 min,其间用移液器反复吹打,确保匀浆液完全裂解。4 ℃ 13 000 g离心5 min,分离上清为所得的蛋白质抽提物。BCA法测定蛋白含量,凝胶电泳,转印至PVDF膜,转印结束后取出PVDF膜,将转好的膜加入封闭液室温封闭1 h。除去封闭液,加入一

抗 4 ℃过夜。用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。加入稀释好的二抗,室温孵育 30 min,用 TBST 在室温下摇床上洗 4 次,每次 5 min。ECL 底物发光,扫描条带存档并分析目标条带的光密度值。

1.2.7 肿瘤组织免疫组化检测 Ki67、PCNA 的表达 将肿瘤组织行石蜡切片,依次经过二甲苯、梯度酒精,脱蜡至水。微波中抗原修复后,3% 双氧水避光孵育 25 min 后,将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次。血清封闭后,滴加一抗,湿盒内 4 ℃孵育过夜。洗涤后,滴加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育 50 min。PBS 洗涤后 DAB 显色,苏木素复染。脱水,透明,封片。显微镜观察拍照。

1.2.8 肿瘤组织 TUNEL 染色 组织行石蜡切片,二甲苯和梯度酒精脱蜡至水,蛋白酶 K 工作液室温孵育后 PBS 洗涤 3 次,滴加破膜工作液覆盖组织,常温下孵育 PBS 洗涤 3 次,滴加 buffer 覆盖组织,室温孵育 10 min。按 1∶5∶50 比例 TDT 酶,dUTP,buffer,滴加到圈内覆盖组织,37 ℃恒温箱孵育 1 h 后,DAPI 复染细胞核。在荧光显微镜下观察并采集图像。利用 Image ProPlus 软件统计蓝色细胞核数量和红色标记的细胞数,以蓝色细胞核数量作为总细胞数,红色标记的细胞为凋亡细胞数,细胞凋亡率/% =(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

1.3 统计学方法

采用 IBM SPSS 26.0 对数据进行分析,GraphPad Prism 10.1.2软件作图分析。本文实验数据为计量资料,若符合正态分布用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较进行 t 检验;多组间比较使用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD – t 检验,$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肾癌移植瘤生长情况

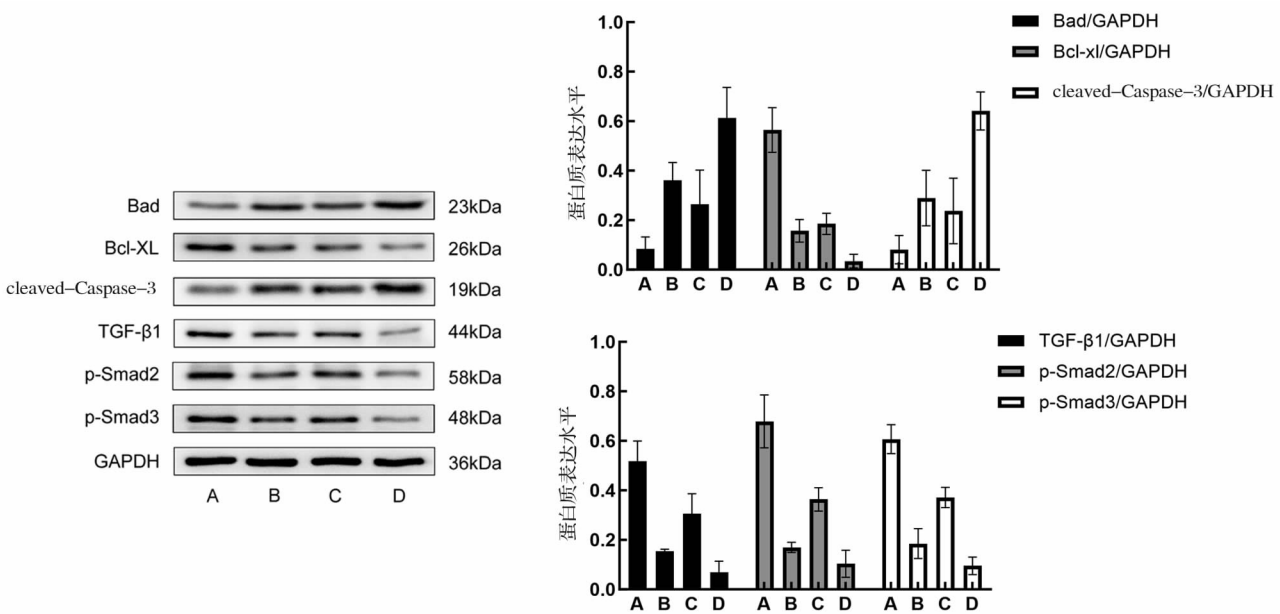
如插页XXXⅦ图 1 所示,给药干预 14 d 后处死小鼠,测肿瘤大小并绘制肿瘤成长曲线,与模型组相比,白花蛇舌草提取物组、5 – 氟尿嘧啶组、TGF – β/Smad 通路抑制剂组显著抑制移植瘤的生长,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。白花蛇舌草提取物组、5 – 氟尿嘧啶组、TGF – β/Smad 通路抑制剂组抑瘤率分别为 33.71%、31.6%、67.9%。

2.2 HE 染色观察各组肿瘤组织的形态学改变

如插页XXXⅦ图 2 所示,HE 染色结果显示,模型组小鼠肿瘤细胞排列紧密且细胞密度高,出现明显的形态学改变,细胞体积与细胞核体积增大,胞质丰富,间质具有许多新生的毛细血管和血窦;各组小鼠肿瘤组织低倍镜(×200 倍)下可见肿瘤细胞呈现高分化状态,核大深染,血管末端分支丰富,移植瘤中有完整的假性包膜包被将肿瘤细胞分割成巢;肿瘤组织高倍镜(×400 倍)下可见异型性肿瘤细胞明显,细胞核可见核分裂象。白花蛇舌草提取物组、5 – 氟尿嘧啶组和 TGF – β/Smad 通路抑制剂组与模型组相比可见部分肿瘤组织出现坏死,呈不规则片状分布,肿瘤细胞数量不同程度减少,细胞排列疏松,且肿瘤细胞出现变性、破裂、增殖受限及核碎裂核固缩等现象。

2.3 Western blot 检测各组肿瘤组织中 TGF – β1、p – Smad – 2、p – Smad3、Bcl – xl、Bad、cleaved – Caspase – 3 的表达水平

结果如图 3 所示,与模型组[TGF – β1(1 919.590 6 ± 250.270 935)、p – Smad – 2(2 511.721 4 ± 340.109 7)、p – Smad3(2 256.833 6 ± 285.177 6)、Bcl – xl(2 100.970 8 ± 404.523 4)、Bad(314.819 2 ± 186.371 0)、cleaved – Caspase – 3(305.015 1 ± 217.265 4)]的表达相比,白花蛇舌草提取物组[TGF – β1(575.446 6 ± 11.291 2)、p – Smad2(634.224 8 ± 55.171 6)、p – Smad3(698.282 9 ± 240.837 5)、Bcl – xl(591.175 1 ± 176.339 1)]、5 – 氟尿嘧啶组[TGF – β1(1 099.561 7 ± 255.879 3)、p – Smad2(1 313.167 3 ± 167.393 2)、p – Smad3(1 345.509 9 ± 185.468 8)、Bcl – xl(672.844 4 ± 176.524 6)]及 TGF – β/Smad 通路抑制剂组[TGF – β1(236.477 8 ± 148.459 8)、p – Smad2(355.504 6 ± 178.929 8)、p – Smad3(327.354 2 ± 114.590 1)、Bcl – xl(120.933 8 ± 97.974 2)]的表达显著低于 Model 组的表达($P < 0.05$);白花蛇舌草提取物组[Bad(1 364.742 8 ±



注:A. Model 组;B. Hedyotis diffusa Willd 组;C. 5 – FU 组;D. LY2157299 组。

图 3 白花蛇舌草提取物对肾癌移植瘤 TGF – β/Smad 通路蛋白及凋亡相关蛋白表达的影响

335.104 1) cleaved－Caspase－3(1 099.357 5±458.258 9)]、5－氟尿嘧啶组[Bad(964.495 8±531.592 7)、cleaved－Caspase－3(866.586 8±496.666 9)]及TGF－β/Smad通路抑制剂组[Bad(2 125.865 1±446.550 3)、cleaved－Caspase－3(2 223.625 0±314.535 6)]的表达显著高于模型组的表达($P<0.05$)；白花蛇舌草提取物组与5－氟尿嘧啶组凋亡蛋白的表达差异不明显。

2.4 免疫组化法检测肿瘤组织中Ki67、PCNA的表达水平

结果如插页XXXⅦ图4所示，Ki67、PCNA免疫反应定位在细胞核内，棕黄色染色为阳性表达。在高倍镜(×400倍)镜下观察，与模型组相比，白花蛇舌草提取物组、5－氟尿嘧啶组和TGF－β/Smad通路抑制剂组肿瘤组织中Ki67、PCNA的表达显著降低，且两者在TGF－β/Smad通路抑制剂组表达最低，白花蛇舌草提取物组和5－氟尿嘧啶组表达无明显差异。

2.5 TUNEL试剂盒检测肾癌细胞凋亡

结果如插页XXXⅨ图5所示，镜下观察，与模型组相比，白花蛇舌草提取物组、5－氟尿嘧啶组和TGF－β/Smad通路抑制剂组的肿瘤细胞凋亡发生率明显增高，且TGF－β/Smad通路抑制剂组细胞凋亡率高于白花蛇舌草提取物组和5－氟尿嘧啶组，白花蛇舌草提取物组和5－氟尿嘧啶组凋亡率无明显差异。模型组、白花蛇舌草提取物组、5－氟尿嘧啶组、TGF－β/Smad通路抑制剂组细胞凋亡率均值分别为2.45%、22.73%、21.18%、59.71%。

3 讨论

为肾癌治疗提供新的药物和靶点对于提高肾癌患者的生存率和生活质量至关重要。探索中药的有效成分抗肿瘤活性及可能的作用机制是目前研究热点，其中白花蛇舌草的抑癌作用得到了大部分学者的肯定，LING J Y等[21]研究表明，白花蛇舌草黄酮类化合物能抑制人胃癌细胞的增殖并诱导其凋亡。FENG J Y等[22]的研究表明，白花蛇舌草可能通过抑制多种结直肠癌相关信号的激活，并调控多种炎症和血管生成因子的表达发挥抗癌作用。孙超等[23]观察白花蛇舌草有效成分HMA对人肝癌HepG2细胞具有抑制生长、促进凋亡的作用。郭洪梅等[24]研究发现，白花蛇舌草水提物对人肺癌细胞株A549和PC－9细胞具有显著的剂量依赖的增殖抑制，并促进细胞凋亡。LI Z Y等[25]的实验结果表明，白花蛇舌草的提取物能够通过下调LMO1的表达和降低AKT/mTOR信号通路的激活来抑制肿瘤的增殖和转移。目前研究现状来看，白花蛇舌草中萜类、蒽醌类、甾醇类、黄酮类、多糖类等化学成分抗癌作用较为突出，抗肿瘤治疗效果与机制实验研究多采用白花蛇舌草水提取或醇提物作用于不同肿瘤细胞来观察体外抗肿瘤作用，这十分契合中医药多靶点整体治疗的观念。手术切除是目前肾癌治疗的主要策略。术后转移和侵袭是肾癌患者的主要死亡原因[26]。大约1/3的患者在诊断为肾细胞癌时已经发生转移，另外30%～40%的患者在肾切除后的数年内发生转移。因此，肾癌细胞在体内增殖凋亡能力的强弱对肿瘤的发生发展尤为重要[27]。

本研究通过测量肾癌小鼠移植瘤体积及质量表明：白花蛇舌草提取物可减缓肾癌小鼠瘤体增大并抑制其质量增加。白花蛇舌草提取物可显著地延缓肿瘤生长活性和疾病进展。高增殖率是恶性肿瘤细胞生长扩散的重要特征，因此抑制细胞的增殖是治疗肿瘤的有效策略[28]。增殖细胞核蛋白Ki67、PCNA是一种细胞增殖相关的核抗原，仅在增殖细胞中合成表达，尤其在恶性肿瘤细胞中呈高表达，通常用作癌症诊断和治疗的预测和预后的指标[29]。一般情况下，增殖期细胞比例越高，Ki67和PCNA阳性率越高，肿瘤生长越快，恶性程度越高。本研究通过HE染色、免疫组化和Western blot印迹实验可以得出：白花蛇舌草提取物作用后肾癌细胞增殖受限，抑制TGF－β/Smad信号通路活化以及肾癌Renca细胞中Ki67、PCNA的表达，且对肾癌细胞作用效果与阳性对照药5－氟尿嘧啶一致，使用TGF－β/Smad通路抑制剂抑制TGF－β/Smad信号通路蛋白表达可以显著降低肾癌Renca细胞中TGF－β/Smad通路蛋白以及Ki67、PCNA的表达。由此得出：白花蛇舌草提取物可以抑制肾癌Renca细胞增殖，其机制可能与抑制TGF－β/Smad信号通路活化相关。

细胞凋亡是癌症治疗中的关键机制之一，也是肿瘤细胞死亡的主要原因[30]，近年来通过诱导促进癌细胞的凋亡来控制癌症一直是抗肿瘤的热点。Bcl－2蛋白家族(主要包括Bcl－2、Bcl－xl、Bax和Bad等)在凋亡中起关键作用，其中Bcl－xl是重要的抗凋亡蛋白，而Bad则是重要的促凋亡蛋白[31]。Caspase级联反应是细胞凋亡通路的关键步骤，启动性Caspase包括Caspase－8、Caspase－9被激活后调控下游执行性Caspase如Caspase－3活化为cleaved－Caspase－3进而引起凋亡反应[32－33]。本研究通过对肾癌荷瘤小鼠肿瘤组织进行TUNEL和Western blot检测发现，白花蛇舌草提取物组与TGF－β/Smad通路抑制剂组肿瘤细胞凋亡率显著提升，促凋亡蛋白Bad、cleaved－Caspase－3表达显著增高，抗凋亡蛋白Bcl－xl、通路蛋白TGF－β1、p－Smad2、p－Smad3表达下降，且TGF－β/Smad通路抑制剂组作用效果明显强于白花蛇舌草提取物组。白花蛇舌草组提取物和阳性对照药5－氟尿嘧啶对肾癌细胞凋亡蛋白表达的差异不明显，结果表明白花蛇舌草提取物可以促进肾癌细胞凋亡，其机制可能与抑制TGF－β/Smad信号通路活化相关。

TGF－β是多肽类细胞因子超家族，具有多种生物学活性。研究表明，TGF－β在肿瘤初期发挥负性调控作用，可抑制肿瘤细胞的增殖；而在肿瘤末期，TGF－β的过度激活可导致上皮间质细胞增殖、促进血管生成、促进肿瘤细胞浸润转移[34]。游离的TGF－β激活TGF－β受体RⅡ，从而发生构象改变，与TGF－β受体RⅠ识别并与之结合形成异四聚体复合物；TGF－βRⅠ磷酸化后进一步促进Smad2或Smad3磷酸为p－Smad2、p－Smad3，二者与Smad4结合形成异寡聚体，由此产生的Smad复合物由胞浆转位至细胞核；在细胞核中Smad复合物通过DNA结合蛋白与特异性DNA序列结合，直接或间接调节靶基因的表达，从而调控细胞周期[35]。TGF－β/Smad信号通路中的任一环节出现异常均可影响细胞周期，导致细胞异常增殖。本研究通过建立肾癌Renca细胞小鼠移植瘤模型，观察各组与TGF－β/Smad通路抑制剂组各项指标，结果表明TGF－β/Smad通路抑制剂组显著下调TGF－β/Smad信号通路上相关蛋白表达，抑制肾癌组织增殖，诱导肾癌细胞凋亡。

综上所述，本研究通过体内外实验首次探讨了白花蛇舌草提取物对肾癌细胞增殖、凋亡的调节作用与TGF－β/Smad信号通路的联系，发现白花蛇舌草提取物对小鼠肾癌细胞具有显

著抑制增殖和促进凋亡的作用,其机制与抑制 TGF－β/Smad 信号通路活化密切相关。然而,本研究还有一些不足之处,如白花蛇舌草的抗肾癌作用是否有更多通路参与尚不清楚。此外,后期还需要通过不同肾癌细胞来验证本研究的结论,为白花蛇舌草的临床应用提供更多的依据。

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] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47－53.

[3] YANG D C, CHEN C H. Potential new therapeutic approaches for renal cell carcinoma[J]. Semin Nephrol, 2020, 40(1): 86－97.

[4] XIONG L, ZHANG Y, WANG J X, et al. Novel small molecule inhibitors targeting renal cell carcinoma: Status, challenges, future directions[J]. Eur J Med Chem, 2024, 267: 116158.

[5] 宣成睿. CKLF1 过表达对肾癌细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响及机制研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2023, 56(4): 35－39.

[6] 周兴波, 李慕刚, 蒋峰, 等. 白花蛇舌草提取物对肾癌 786－O 细胞移植瘤的生长及血管生成的研究[J]. 四川中医, 2021, 39(7): 52－55.

[7] 张蜀艳, 蒲蓝萍, 李政. 白花蛇舌草和半枝莲总黄酮提取工艺优化及抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 91－96.

[8] 王骁, 范焕芳, 李德辉, 等. 白花蛇舌草的抗癌作用研究进展[J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1428－1431.

[9] 何枝华, 彭朦媛, 王颖芳. 白花蛇舌草抗炎有效成分及其机制的研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(5): 661－663.

[10] 杜江洋, 徐元, 王楠, 等. 白花蛇舌草－半枝莲药对组分诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 99－107.

[11] 邹寒冰, 周雁, 张元亮, 等. 白花蛇舌草通过抑制 RAP1－JNK 信号通路选择性促进人肾癌 ACHN 细胞间质－上皮转化[J]. 肿瘤, 2019, 39(4): 235－248.

[12] 李梓盟, 张佳彦, 李菲, 等. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2021, 38(2): 74－79.

[13] 张林超. 白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响[J]. 中成药, 2021, 43(3): 765－769.

[14] 陈晴, 张林超, 潘世杰, 等. 白花蛇舌草对肾癌 Renca 细胞体外增殖侵袭及小鼠体内移植瘤生长影响机制的探讨[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(7): 1603－1607.

[15] 周磊, 宋圣佑, 郜伦伟, 等. 千金子二萜醇调控 TGF－β/Smad4 通路调节肾癌小鼠 Th1/Th2 免疫平衡[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(18): 4512－4515.

[16] YIN L, LI W J, CHEN X X, et al. HOOK1 inhibits the progression of renal cell carcinoma *via* TGF－β and TNFSF13B/VEGF－A axis[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(17): e2206955.

[17] 宋圣佑,周磊,郜伦伟,等. 千金子二萜醇通过 TGF－β/Smad 信号通路影响肾透明细胞癌小鼠免疫因子 IL－7,IL－10 及 VEGF 表达[J]. 中国免疫学杂志, 2025, 41(7):1581－1585.

[18] 张爱莉, 任宗涛. 转化生长因子 β 受体Ⅰ及 Smad4 蛋白在肾癌中的表达及意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2013, 28(11): 819－821, 825.

[19] TSAI Y T, STRAUSS J, TONEY N J, et al. Immune correlates of clinical parameters in patients with HPV－associated malignancies treated with bintrafusp Alfa[J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(4): e004601.

[20] TIAN T, FU X Y, HU L L, et al. FAST1 predicts poor survival of renal carcinoma and promotes its progression through the TGF－β/smad pathway[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 1487－1499.

[21] LING J Y, WANG Q L, LIANG H N, et al. Flavonoid－rich extract of *Oldenlandia* diffusa (Willd.) roxb. inhibits gastric cancer by activation of Caspase－dependent mitochondrial apoptosis[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(3): 213－223.

[22] FENG J Y, JIN Y, PENG J, et al. *Hedyotis diffusa willd* extract suppresses colorectal cancer growth through multiple cellular pathways[J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 8197－8205.

[23] 孙超, 吴铭杰, 江泽群, 等. 白花蛇舌草有效成分 2－羟基－3－甲基蒽醌通过 IL－6/STAT3 信号通路诱导肝癌细胞凋亡作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(12): 5346－5350.

[24] 郭洪梅, 赵丹, 曹琳, 等. 白花蛇舌草水提物通过抑制 MAPK 通路致肺癌细胞的凋亡[J]. 药学与临床研究, 2019, 27(1): 5－9.

[25] LI Z Y, LI J W, LIU X F, et al. Ethyl acetate fraction from *Hedyotis* diffusa plus *Scutellaria barbata* inhibits the progression of breast cancer *via* targeting LMO1 and AKT/mtor signaling pathway[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2024, 27(12): 1735－1744.

[26] WANG G, ZHOU X W, GUO Z L, et al. The Anti－fibrosis drug Pirfenidone modifies the immunosuppressive tumor microenvironment and prevents the progression of renal cell carcinoma by inhibiting tumor autocrine TGF－β[J]. Cancer Biol Ther, 2022, 23(1): 150－162.

[27] CHOUEIRI T K, MOTZER R J. Systemic therapy for metastatic renal－cell carcinoma[J]. N Engl J Med, 2017, 376(4): 354－366.

[28] GAGLIA G, KABRAJI S, RAMMOS D, et al. Temporal and spatial topography of cell proliferation in cancer[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(3): 316－326.

[29] JAYARAMAN S, PAZHANI J, PRIYAVEERARAGHAVAN V, et al. PCNA and Ki67: Prognostic proliferation markers for oral cancer[J]. Oral Oncol, 2022, 130: 105943.

[30] SINGH P, LIM B. Targeting apoptosis in cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2022, 24(3): 273－284.

[31] MAHIEUX R, PISE－MASISON C, GESSAIN A, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human T－cell leukemia virus type 1－and type 2－infected cells by a Caspase－3－dependent mechanism involving Bcl－2 cleavage[J]. Blood, 2001, 98(13): 3762－3769.

[32] JULIEN O, WELLS J A. Caspases and their substrates[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(8): 1380－1389.

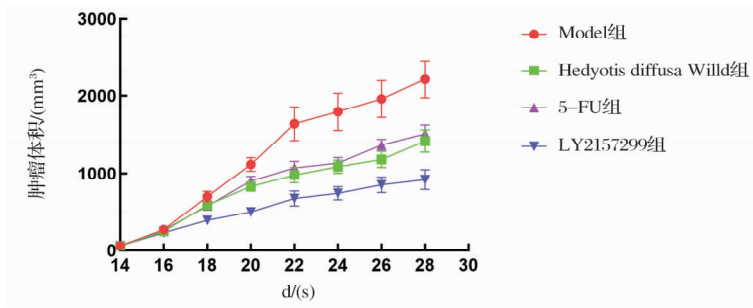
[33] ESKANDARI E, EAVES C J. Paradoxical roles of Caspase－3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis[J]. J Cell Biol, 2022, 221(6): e202201159.

[34] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF－β and the TGF－β family: context－dependent roles in cell and tissue physiology[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(5): a021873.

[35] ZHAO M, MISHRA L, DENG C X. The role of TGF－β/SMAD4 signaling in cancer[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(2): 111－123.

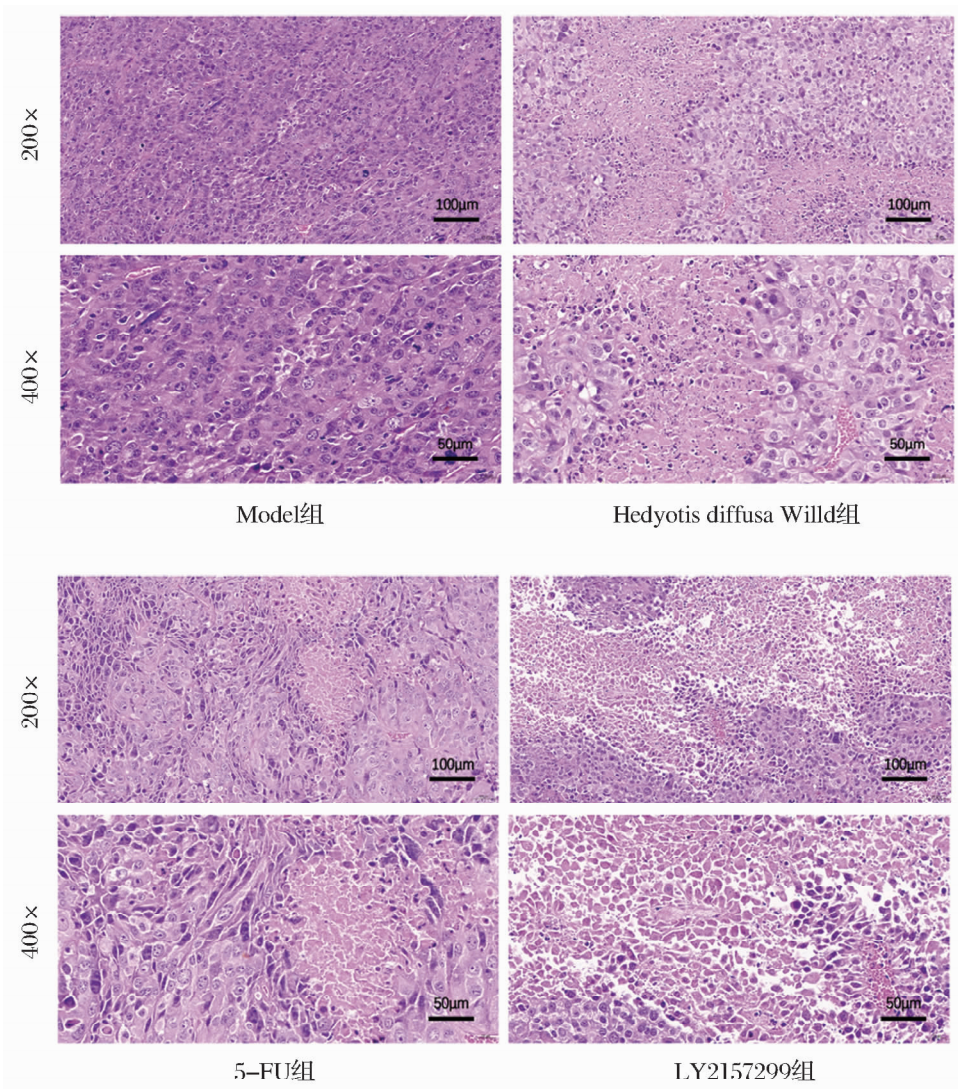
白花蛇舌草提取物调控 TGF－β/Smad 信号通路对肾癌细胞增殖、凋亡的影响

（正文见 242－247 页）



注：3 个实验组与 Model 组比较，$P<0.05$。

图 1 各组肾癌小鼠移植瘤体积变化（$n=8$）



注：各组第一行为低倍镜（HE，×200 倍）下肿瘤组织的 HE 染色结果，第二行为高倍镜（HE，×400 倍）下肿瘤组织的 HE 染色结果。

图 2 各组小鼠肿瘤组织 HE 染色比较

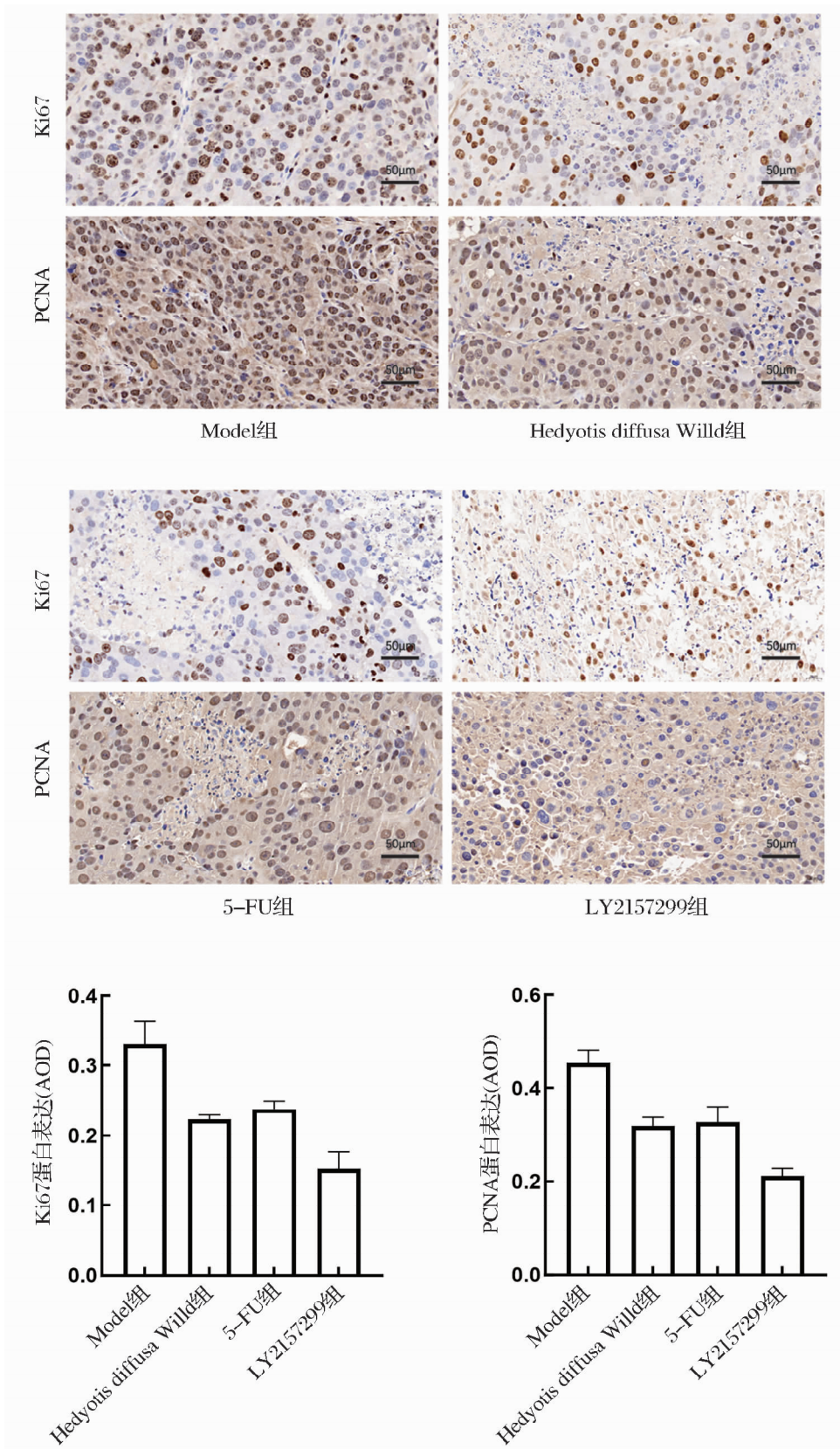
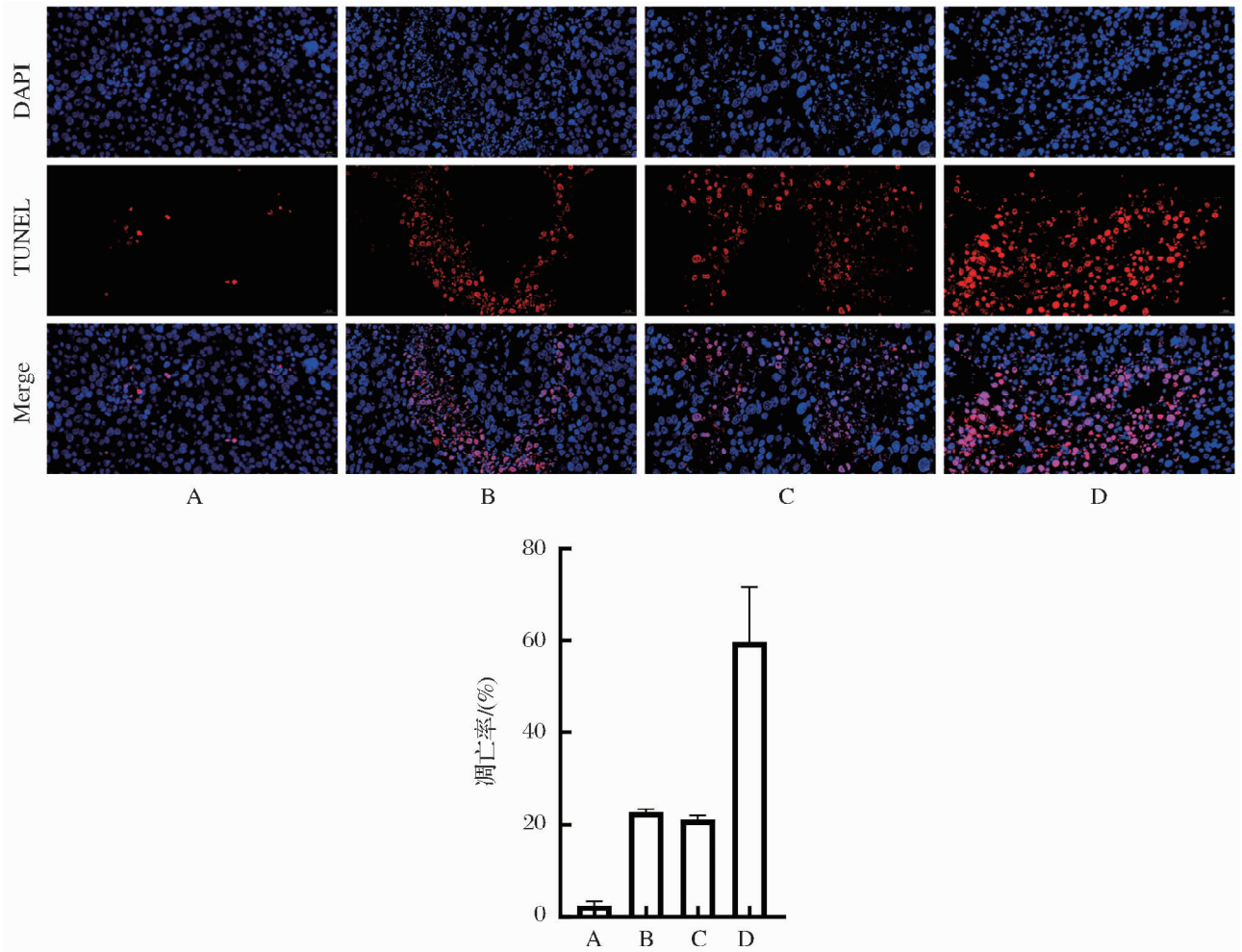


图4 各组肾癌移植瘤中 Ki67、PCNA 的表达水平(×400)



注：A. Model 组；B. Hedyotis diffusa Willd 组；C. 5－FU 组；D. LY2157299 组。染色后肿瘤组织细胞核在紫外的激发下为蓝色，试剂盒为 TMR 荧光素标记，红色代表凋亡细胞。

图 5 TUNEL 染色检测肾癌细胞凋亡率

党参中木脂素类化学成分及其抗缺氧活性研究

（正文见 248－254 页）

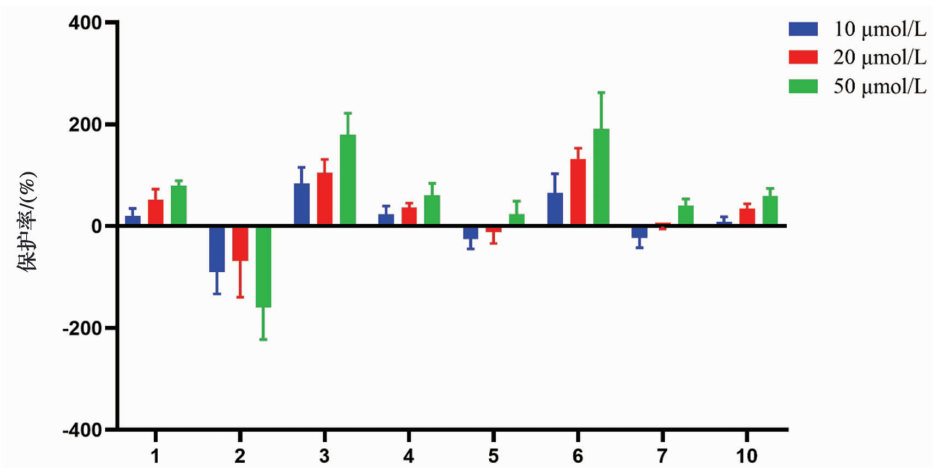


图 4 不同浓度木脂素对缺氧 PC12 细胞的保护率