

## 实验研究

引用:鞠迪,李汨,韩曼,等.益脾养肝方对肝癌前病变大鼠肝星状细胞活化的影响[J].陕西中医药大学学报,2024,47(2):83-88.

# 益脾养肝方对肝癌前病变大鼠 肝星状细胞活化的影响\*

鞠迪<sup>1</sup> 李汨<sup>1</sup> 韩曼<sup>1</sup> 房冰莹<sup>1</sup> 闫曙光<sup>1</sup> 安荣<sup>1</sup> 李京涛<sup>2\*\*</sup>

(1. 陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;2.陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000)

**摘要:**目的 探讨益脾养肝方对二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine, DEN)诱导的肝癌前病变中肝星状细胞活化及胶原沉积的影响。方法 将26只雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为空白组、模型组、益脾养肝方组和护肝片组,空白组5只,其余3组各7只。腹腔注射DEN诱导肝癌前病变模型,给药14w后处死。取肝组织观察并记录其大小、外观等变化,计算肝重比(肝脏指数),通过HE染色观察大鼠肝组织病理形态学改变,天狼星红染色观察各组胶原沉积表达,免疫组化检测 $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达,实时定量PCR(Real Time PCR, RT-PCR)检测I型胶原蛋白(type I collagen, Collagen I)的表达,以研究益脾养肝方对大鼠肝癌前病变模型的影响。计量资料多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验。结果 与模型组相比,益脾养肝方组和护肝片组肝脏病理形态显著改善,肝脏指数、Collagen I和 $\alpha$ -SMA表达均降低( $P$ 值均 $<0.05$ );与护肝片组相比,益脾养肝方组对肝脏的保护作用更显著,其肝脏指数、Collagen I和 $\alpha$ -SMA表达均显著降低( $P$ 值均 $<0.05$ )。结论 益脾养肝方可有效改善DEN诱导的大鼠肝癌前病变,其机制可能与抑制肝星状细胞活化,减少胶原沉积有关。

**关键词:**肝癌前病变;益脾养肝方;肝星状细胞; $\alpha$ -平滑肌动蛋白;胶原沉积

中图分类号:R256.4

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)02-0083-06

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.02.016

## Effect of Yipi Yanggan Formula on the Activation of Hepatic Stellate Cells in Rats with Pre Liver Cancer Lesions

JU Di<sup>1</sup> LI Mi<sup>1</sup> HAN Man<sup>1</sup> FANG Bingying<sup>1</sup>

YAN Shuguang<sup>1</sup> AN Rong<sup>1</sup> LI Jingtao<sup>2</sup>

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China;

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of Yipi Yanggan formula on the activation of hepatic stellate cells and collagen deposition in diethylnitrosamine (DEN) induced precancerous lesions of liver cancer. **Methods** 26 male Sprague Dawley rats were randomly divided into a blank group, a model group, a Yipi Yanggan formula group, and a Huguang tablet

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81904192);陕西省教育厅项目(19JK0244);陕西中医药大学科学研究计划项目(2017QN15);陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-YS06);陕西省自然科学基金基础研究计划青年项目(2022JQ-793, 2022JQ-870);陕西省中医药管理局项目(15-JC004)

\*\* 通讯作者:李京涛,主任医师。E-mail: Lijingtao555@163.com

group. There were 5 rats in the blank group and 7 rats in each of the other 3 groups. DEN was injected intraperitoneally to induce a model of liver cancer precancerous lesions, and was euthanized after 14 weeks of administration. Take liver tissue for observation and record changes in size, appearance, etc., calculate liver weight ratio (liver index), observe pathological and morphological changes in rat liver tissue through HE staining, observe collagen deposition and expression in each group through Sirius red staining, detect the expression of alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) through immunohistochemistry, and detect type I collagen (Collagen I) through real-time quantitative PCR (RT-PCR). To investigate the effect of Yipi Yanggan formula on the pre liver cancer lesion model in rats. Multiple inter group comparisons of quantitative data were conducted using one-way analysis of variance, and further pairwise comparisons were conducted using *LSD-t* test. **Results** Compared with the model group, the liver pathological morphology of the Yipi Yanggan formula group and the Hupan tablet group was significantly improved, and the liver index, Collagen I, and  $\alpha$ -SMA expression were all reduced ( $P < 0.05$ ); Compared with the liver protection tablet group, the Yipi Yanggan formula group has a more significant protective effect on the liver, with significantly reduced liver index, Collagen I, and  $\alpha$ -SMA expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Yipi Yanggan formula can effectively improve DEN induced precancerous lesions in rats, and its mechanism may be related to inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing collagen deposition.

**Key words:** Precancerous lesions of liver cancer; Yipi Yanggan formula; Hepatic stellate cells;  $\alpha$ -Smooth actin; Collagen deposition

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,早期很难被确诊,多数患者发现时已为晚期,导致最佳治疗时机延误,死亡率<sup>[1]</sup>。临床数据显示 80%~90%的 HCC 是由肝纤维化、肝硬化演变而来,期间存在的癌前病变阶段是良性向恶性过度的关键时期<sup>[2]</sup>。但目前肝癌前病变的发生机制仍未阐明,临床也缺乏相应的药物,因此研究肝癌前病变的机制具有重大理论意义。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化是肝纤维化、肝硬化和肝癌前病变共同的主要细胞学基础,在肝癌前病变细胞的产生、炎症微环境的形成过程中发挥着关键作用<sup>[3-4]</sup>。活化的 HSC 作为肿瘤微环境的重要组成部分<sup>[5]</sup>,可通过调节细胞外基质组分促进临近癌细胞的迁移和增殖<sup>[6-8]</sup>,协助基因突变的肝细胞躲避免疫系统的清除<sup>[9-10]</sup>,还可促进损伤肝细胞的恶性转变<sup>[4,11]</sup>,为癌细胞的产生提供物质与环境基础,是治疗慢性肝病的重要靶标<sup>[12]</sup>。益脾养肝方是陕西省名中医常占杰教授沿用多年的防治肝硬化进展的临床常用方,前期研究已证实该方具有抗肝癌前病变的作用<sup>[13-18]</sup>。本研究通过二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine, DEN)诱导大鼠肝癌前病变模型,观察益脾养肝方对大鼠肝癌前病变组织病理、胶原沉积和肝星状细胞活化的影响,为该方抗肝癌前病变提供理论依据。

## 1 仪器与材料

**1.1 仪器** HistoCore BIOCUT 轮转式切片机(德

国 Leica 公司); YD-AB 型摊烤片机、YD-6L 型生物组织包埋机(金华市益迪医疗设备有限公司); BX41/60 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); BS224S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Scientz-48L 冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); QuantStudio 1 实时定量 PCR(Real-Time PCR, RT-PCR)仪(赛默飞世尔科技有限公司)。

**1.2 试药** 益脾养肝方(白术、党参、熟地、鳖甲、枸杞、半枝莲、郁金、姜黄、白花蛇舌草)购于陕西中医药大学附属医院药剂科。使用前制成每克生药含量为 5 g 的冻干粉,置于 4 ℃ 冰箱封存,使用时溶于 100 ℃ 沸水配制成浓度为 1.0 g · mL<sup>-1</sup> 的中药汤液。护肝片由黑龙江葵花药业股份有限公司生产。DEN 购自美国 Sigma 公司; $\alpha$ -平滑肌动蛋白(alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体购自 abcam 公司;鼠 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;苏木精和伊红购自北京索莱宝公司,天狼星红染液购自南京森贝伽利生物科技有限公司;总 RNA 提取试剂盒购自天根生化技术有限公司,反转录试剂盒和 SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司。

**1.3 实验动物** SPF 级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 26 只,体重 180~200 g,购自成都达硕生物科技有限公司,生产许可证号 SCXK(川)2020-24,使用许

可证编号 SYXK(川)2019-189。实验动物饲养过程中可自由进食和饮水,室内温度 20~24 ℃、相对湿度 50%~60%。适应 1 w 后开始实验。

2 实验方法

2.1 动物分组与造模取材 将 26 只大鼠随机分为 4 组:空白组 5 只,模型组 7 只,护肝片组 7 只,益脾养肝方组 7 只。除空白组外,其余各组均以 0.5 mL/100 g 的 DEN 腹腔注射,每次 25 mg·kg<sup>-1</sup>,2 次·w<sup>-1</sup>,连续给药 14 w;空白组给予同等条件的饲养与抓捕,在同等时间点注射等量生理盐水。造模次日起益脾养肝方组给予浓度为 1.0 g·mL<sup>-1</sup>的益脾养肝方药液灌胃,护肝片组按 921 mg·kg<sup>-1</sup>大鼠体重灌胃,空白组、DEN 组大鼠给予等量生理盐水灌胃。灌胃持续 14 w,1 次·d<sup>-1</sup>。第 14 w 结束时全部大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔注射(0.3 mL/100 g),取各组大鼠肝脏左叶约 1 cm×1 cm×1 cm 浸入 4%多聚甲醛中,常温固定过夜后制作石蜡切片;其余肝组织置于-80 ℃冰箱备用。

2.2 肝脏指数 记录大鼠体重,对大鼠肝脏进行称重,测量肝重比(肝脏指数)。肝脏指数(%)=肝脏重量/大鼠体质量×100%。

2.3 肝脏病理组织染色 将制作的石蜡块按每张 3 μm 厚切片,分别进行苏木素-伊红(Hematoxylin and Eosin,HE)染色、天狼星红染色和免疫组化染色,脱水透明后中性树胶封片。光学显微镜下观察各组大鼠肝损伤情况、胶原沉积情况和 α-SMA 的表达情况,随机选取 3 个视野进行图片采集,用 Image-Pro Plus 6.0 软件对肝组织胶原沉积和 α-SMA 蛋白的光密度值进行半定量分析。

2.4 RT-PCR 检测 I 型胶原蛋白(type I collagen, Collagen I)的表达 取 50 mg 肝组织,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,反转为 cDNA,设计引物(表 1),以 cDNA 为模板采用三步法进行扩增,反应结束后根据各样本 CT 值,利用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 计算各组基因的相对表达量。

表 1 引物序列

基因	上游	下游
Col1a1	GACTGTCCCAACCCCAAAA	TGGGTCCCTCGACTCCTATG

2.5 伦理学审查 本研究方案经由陕西中医药大学伦理委员会审批,批号:SUCMDL20211115001,符合实验室动物管理与使用准则。

2.6 统计学方法 采用 Graphpad Prism 8.0、Image-Pro-Plus 6.0 软件进行统计分析、作图,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  表示;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况和体重 空白组大鼠毛色光亮,行为敏捷,进食、进水正常;模型组毛色晦暗,反应迟缓;益脾养肝方组和护肝片组较模型组大鼠症状减轻;各组均无死亡。实验结束时,空白组大鼠体重最大,模型组体重最轻,益脾养肝方组和护肝片组体重介于模型组与空白组之间。

3.2 大鼠肝脏指数的比较 与空白组相比,模型组肝脏指数显著升高(*P*<0.05);与模型组相比,益脾养肝方组和护肝片组肝脏指数明显下降(*P*<0.05);与护肝片组相比,益脾养肝方组肝脏指数明显下降(*P*<0.05)。提示益脾养肝方和护肝片对 DEN 诱导的肝癌前病变模型大鼠肝损伤具有保护作用,且益脾养肝方组效果比护肝片组显著(表 2)。

表 2 各组大鼠肝脏指数的比较( $\bar{x}\pm s$ ,%)

组别	<i>n</i>	肝脏指数
空白组	5	2.54±0.18
模型组	7	5.56±1.02 <sup>*</sup>
护肝片组	7	4.24±0.51 <sup>#</sup>
益脾养肝方组	7	3.12±0.25 <sup>△</sup>

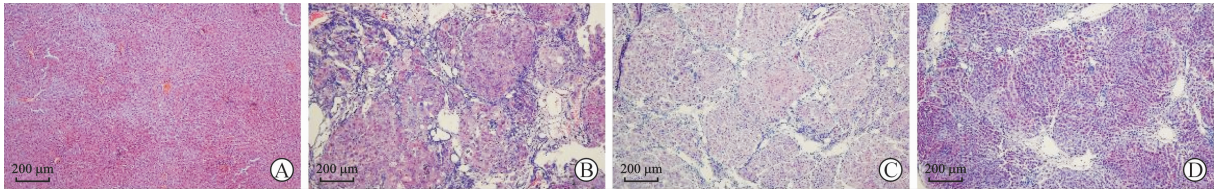
注:与空白组相比,<sup>\*</sup>*P*<0.05;与模型组相比,<sup>#</sup>*P*<0.05;与护肝片组相比,<sup>△</sup>*P*<0.05

3.3 HE 染色 实验结束时空白组大鼠肝脏表面光滑,质地柔软,无明显病变出现;模型组大鼠肝脏表面可见大量结节;益脾养肝方组和护肝片组肝脏表面粗糙,结节数量较模型组减少,其中益脾养肝方组结节数更少。

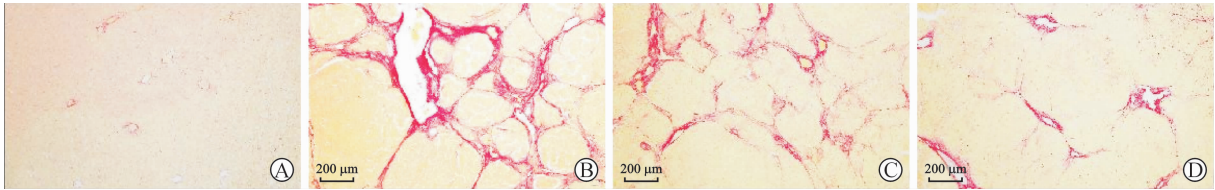
HE 染色显示:空白组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞大小均一,排列整齐,以中央静脉为轴心呈放射状排列形成肝索;模型组大鼠肝细胞大面积变性坏死,核质比增大,肝索结构紊乱,并有大量炎性细胞浸润,形成大量假小叶;与模型组相比,益脾养肝方组和护肝片组肝脏病理形态显著改善,变性坏死细胞减少,核质比降低,假小叶数量减少,炎性细胞浸润减少,益脾养肝方组比护肝片组更明显(图 1)。

**3.4 天狼星红染色** 天狼星红染色显示:空白组仅在汇管区血管周围有少量胶原沉积;模型组胶原沉积显著增多( $P<0.05$ ),可观察到大量纤维条索将肝组织分割形成许多假小叶;与模型组相比,

益脾养肝方组和护肝片组胶原沉积显著减少( $P$ 均 $<0.05$ ),纤维条索分割形成的假小叶明显减少,益脾养肝方组比护肝片组更明显(图 2,表 3)。



A.空白组;B.模型组;C.护肝片组;D.益脾养肝方组  
图 1 益脾养肝方对各组大鼠肝脏结构形态的影响( $\times 100$ )



A:空白组;B.模型组;C.护肝片组;D.益脾养肝方组  
图 2 益脾养肝方对各组大鼠肝组织胶原沉积的影响( $\times 100$ )

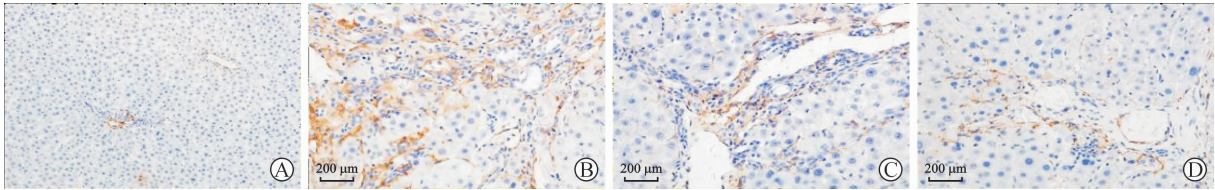
表 3 各组大鼠胶原沉积分析( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	胶原沉积光密度值( $\times 10^7$ )
空白组	5	0.49 $\pm$ 0.08
模型组	7	8.91 $\pm$ 1.62 *
护肝片	7	5.52 $\pm$ 1.00 <sup>#</sup>
益脾养肝方组	7	2.57 $\pm$ 0.88 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

注:与空白组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与护肝片组相比, $\Delta$  $P<0.05$

**3.5 免疫组化检测  $\alpha$ -SMA** 免疫组化结果显示  $\alpha$ -SMA 阳性灶主要分布在纤维间隔处,呈棕黄色

不规则形状。空白组仅在血管处有少量阳性表达;与空白组相比,模型组在纤维间隔处可见棕黄色阳性灶,呈强阳性表达( $P<0.05$ );与模型组相比,益脾养肝方组和护肝片组大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 表达显著下调( $P$ 值均 $<0.05$ );与护肝片组相比,益脾养肝方组大鼠肝组织  $\alpha$ -SMA 表达明显降低( $P<0.05$ )。上述结果提示益脾养肝方和护肝片可抑制大鼠肝星状细胞活化,且益脾养肝方组比护肝片组显著(图 3,表 4)。



A:空白组;B.模型组;C.护肝片组;D.益脾养肝方组  
图 3  $\alpha$ -SMA 在 DEN 诱导肝癌前病变组织中的表达( $\times 400$ )

表 4 各组大鼠  $\alpha$ -SMA 分析( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	$\alpha$ -SMA 光密度( $\times 10^6$ )
空白组	5	0.19 $\pm$ 0.09
模型组	7	8.78 $\pm$ 1.90 *
护肝片	7	4.23 $\pm$ 1.06 <sup>#</sup>
益脾养肝方组	7	1.46 $\pm$ 0.59 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

注:与空白组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与护肝片组相比, $\Delta$  $P<0.05$

**3.6 RT-PCR 检测肝组织中 Collagen I 表达** 与空白组相比,模型组大鼠肝组织 Collagen I mRNA 表达水平显著增高( $P<0.05$ );与模型组相比,益脾养肝方组和护肝片组大鼠肝组织 Collagen I mRNA 表达水平显著降低( $P<0.05$ );与护肝片组相比,益脾养肝方组大鼠肝组织 Collagen I mRNA 表达水平显著降低( $P<0.05$ )。上述结果提示,益脾养肝方和护肝片可抑制大鼠肝癌前病变组织中 Collagen I 的表达,益脾养肝方组比护肝片组更明显。

表5 各组大鼠肝组织 Collagen I mRNA  
相对表达量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Collagen I
空白组	5	1.01±0.18
模型组	7	16.60±2.40 *
护肝片	7	10.60±1.31 #
益脾养肝方组	7	6.51±0.61 #△

注:与空白组相比,\* $P<0.05$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ;与护肝片组相比,△ $P<0.05$

4 讨论

肝癌前病变是肝纤维化、肝硬化发展为肝癌的过渡阶段<sup>[2,19]</sup>,对该阶段的干预和研究是癌症防治工作的重点。中医学“未病先防”“既病防变”的理念,力求客观把握疾病发生发展规律,在防治肝癌前病变方面具有独特优势,可延缓疾病进程、降低肝癌发生率。益脾养肝方是陕西省名中医常占杰教授的临床常用方,由党参、白术、熟地、枸杞、姜黄、鳖甲、郁金、半枝莲、白花蛇舌草九味药物组成,具有益脾养肝、行气活血、解毒散结的功能,在防治肝硬化进展方面功效显著。

肝癌前病变的产生涉及炎症纤维化微环境的形成、肝癌起始细胞的产生及二者相互作用并最终形成结节性病变<sup>[20]</sup>。炎症微环境是一个复杂多变的内环境,是肝癌发生、发展、侵袭转移的沃土<sup>[21]</sup>。HSC在炎症微环境中占据举足轻重的地位<sup>[5,22]</sup>,通过多种途径影响肝癌前病变细胞的产生、免疫逃逸、血管新生等过程。

HSC位于肝窦间隙中,在正常肝脏中呈静息状态,增殖活性低、合成胶原能力弱。当肝脏受损,HSC活化并转分化为肌成纤维细胞,通过调节基质金属蛋白酶及基质金属蛋白酶抑制剂的表达,分泌以I型胶原为主的胞外基质,改变胞外环境促进自身的迁移、黏附、增殖和收缩能力<sup>[23]</sup>。HSC活化是肝纤维化、肝硬化疾病演变过程中的核心事件,也是促进肝癌前病变恶性转变并最终发展为肝癌的重要原因<sup>[3]</sup>。活化的HSC作为肿瘤微环境的重要组成部分,可分泌大量的胞外基质促进炎症因子的浸润,与自身分泌的促炎因子共同形成肿瘤微环境,为癌细胞的产生、增殖、迁移提供便利条件。一方面HSC可通过旁分泌转化生长因子1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)和

白介素6(Interleukin-6,IL-6)等细胞因子促进损伤肝细胞恶性转变为肝癌癌前病变细胞<sup>[4,11]</sup>,加重异型增生结节由低分化向高分化恶变的风险。另一方面活化的HSC既可分泌TGF-β1抑制T细胞增殖,诱导T细胞凋亡<sup>[24]</sup>,又可分泌IL-6诱导产生髓源型抑制细胞<sup>[10]</sup>,抑制T淋巴细胞的免疫反应,增强肿瘤细胞的免疫逃逸能力。另外活化的HSC可上调基质金属蛋白酶2和血管内皮生长因子A等血管生成相关基因的表达,通过增强肿瘤微环境中的血管生成促进肝癌的形成和转移<sup>[25-26]</sup>。其分泌的细胞外基质与肿瘤发生发展过程中的血管生成、侵袭转移和不良预后密切相关,并最终导致肝癌的发生发展<sup>[27-28]</sup>。研究显示多种恶性肿瘤组织中的细胞外基质表达量均显著高于良性肿瘤组织,I型胶原蛋白α2可在肝癌组织中高表达,通过促进TP53基因突变,诱导抗肿瘤细胞的免疫抑制,与肿瘤的发展及患者生存密切相关<sup>[29]</sup>。

本研究采用腹腔注射DEN诱导大鼠肝癌前病变模型,可很好地模拟人的肝脏损伤-肝炎-肝硬化-肝癌前病变-HCC发生发展过程。正常组肝脏成淡红色、质地柔软,给药第12w肝脏体积缩小、表面呈结节性改变、暗红色、质硬,第14w肝脏体积增大、表面弥漫结节,形成肝癌前病变。本研究的病理结果证实了大鼠肝癌前病变模型制作成功。HE染色结果显示模型组动物肝脏结构被破坏,肝细胞大面积变性坏死,核质比增大,有脂肪变性和水肿,大量炎症细胞浸润;天狼星红染色显示胶原沉积,纤维间隔分割形成假小叶。益脾养肝方干预后,肝细胞坏死区减小,肝细胞核质比降低,炎症细胞浸润减少,胶原沉积明显改善,假小叶变少。同时免疫组化结果显示,HSC活化标志物α-SMA表达量显著降低;RT-PCR结果显示Collagen I表达量显著降低。以上结果提示该方可显著改善大鼠肝癌前病变的病理形态,抑制肝星状细胞活化,减少胶原沉积,在一定程度上阐明了益脾养肝方抗肝癌前病变的作用机制。本研究结果为益脾养肝方抗肝癌前病变的临床应用提供了理论基础,也为益脾养肝方抗肝癌前病变作用机制的深入探讨提供了一定的实验依据。

参考文献

[1] Goh GBB, Chang PE, Tan CK. Changing epidemiology of hepatocellular carcinoma in Asia[J]. Best Practice & Re-

- search Clinical Gastroenterology, 2015, 29(6): 919-928.
- [2] 焦俊喆, 李京涛, 闫曙光, 等. 肝细胞癌前异型增生结节的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(5): 974-978.
  - [3] Liu BY, Zhou ZW, Jin Y, et al. Hepatic stellate cell activation and senescence induced by intrahepatic microbiota disturbances drive progression of liver cirrhosis toward hepatocellular carcinoma[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2022, 10(1): e003069.
  - [4] Shiraha H, Iwamuro M, Okada H. Hepatic stellate cells in liver tumor[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020, 1234: 43-56.
  - [5] 杨粒, 钱保林, 付文广, 等. 活化的肝星状细胞参与肝细胞性肝癌发生发展的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(1): 116-122.
  - [6] Appunni S, Rubens M, Ramamoorthy V, et al. Lumican, pro-tumorigenic or anti-tumorigenic: a conundrum[J]. Clinica Chimica Acta, 2021, 514: 1-7.
  - [7] Scheau C, Badarau IA, Costache R, et al. The role of matrix metalloproteinases in the epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma[J]. Analytical Cellular Pathology (Amsterdam), 2019, 2019: 9423907. 2019, 9(1): 83.
  - [8] Mazza G, Telese A, Al-Akkad W, et al. Cirrhotic human liver extracellular matrix 3D scaffolds promote smad-dependent TGF- $\beta$ 1 epithelial mesenchymal transition[J]. Cells, 2019, 9(1): E83.
  - [9] Wang PW, Lin TY, Yang PM, et al. Hepatic stellate cell modulates the immune microenvironment in the progression of hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(18): 10777.
  - [10] Hsieh CC, Hung CH, Chiang MH, et al. Hepatic stellate cells enhance liver cancer progression by inducing myeloid-derived suppressor cells through interleukin-6 signaling[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(20): E5079.
  - [11] Kew MC. The role of cirrhosis in the etiology of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer, 2014, 45(1): 12-21.
  - [12] Ruan Q, Wang HL, Burke LJ, et al. Therapeutic modulators of hepatic stellate cells for hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Cancer, 2020, 147(6): 1519-1527.
  - [13] 鞠迪, 李汭, 韩曼, 等. 益脾养肝方对大鼠肝癌前病变肝干细胞恶性转化的影响和作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(4): 865-871.
  - [14] 宋春荣, 南然, 刘永刚, 等. 益脾养肝方对肝郁脾虚证原发性肝癌 TACE 患者 bFGF、VEGF、AFP-L3 及免疫功能影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(1): 80-84.
  - [15] 边倩, 曹妮, 刘航, 等. 益脾养肝方对大鼠肝癌前病变 miR-221 表达的影响[J]. 陕西中医, 2020, 41(11): 1515-1519.
  - [16] 魏海梁, 曹妮, 李京涛, 等. 基于 miRNA-124 探讨益脾养肝方对大鼠肝癌前病变影响的实验研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2020, 43(5): 60-65.
  - [17] 李京涛, 魏海梁, 闫曙光, 等. 益脾养肝方对肝癌前病变大鼠血清 IL-6、TNF- $\alpha$  的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(3): 236-239.
  - [18] 李京涛, 闫曙光, 魏海梁, 等. 益脾养肝方对大鼠肝癌前病变 NF- $\kappa$ B、STAT3 蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(1): 196-198, 231.
  - [19] 吴孟超, 汤钊猷, 刘彤华, 等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 31(6): 833-839.
  - [20] 吴杰, 李京涛, 魏海梁, 等. microRNA 调控肝星状细胞活化干预肝癌前病变的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(7): 1650-1654.
  - [21] Garrido A, Djouder N. Cirrhosis: a questioned risk factor for hepatocellular carcinoma[J]. Trends in Cancer, 2021, 7(1): 29-36.
  - [22] Luo NA, Li JB, Wei Y, et al. Hepatic stellate cell: a double-edged sword in the liver[J]. Physiological Research, 2021, 70(6): 821-829.
  - [23] Khomich O, Ivanov AV, Bartosch B. Metabolic hallmarks of hepatic stellate cells in liver fibrosis[J]. Cells, 2019, 9(1): 24.
  - [24] Li Y, Kim BG, Qian S, et al. Hepatic stellate cells inhibit T cells through active TGF- $\beta$ 1 from a cell surface-bound latent TGF- $\beta$ 1/GARP complex[J]. Journal of Immunology, 2015, 195(6): 2648-2656.
  - [25] Wu MN, Miao HJ, Fu R, et al. Hepatic stellate cell: a potential target for hepatocellular carcinoma[J]. Current Molecular Pharmacology, 2020, 13(4): 261-272.
  - [26] Lin N, Meng LL, Lin JZ, et al. Activated hepatic stellate cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma by secreting angiopoietin-1[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(2): 1441-1451.
  - [27] 彭佩纯, 欧和生, 罗雪兰, 等. 活化的肝星状细胞对肝癌肿瘤微环境的影响[J]. 广西医学, 2019, 41(24): 3184-3188.
  - [28] Lee KM, Nam K, Oh S, et al. ECM1 regulates tumor metastasis and CSC-like property through stabilization of  $\beta$ -catenin[J]. Oncogene, 2015, 34(50): 6055-6065.
  - [29] 鄂志野, 文怡欣, 张珊, 等. 基于数据库分析 COL1A2 在肝细胞癌组织中的表达及对预后的影响[J]. 牡丹江医学院学报, 2022, 43(1): 31-34, 118.

(修回日期: 2022-10-27 编辑: 崔春利)