

芪术抗癌方对肝癌细胞上皮间质化的影响

冯文杏, 胡锐, 孙新锋, 韩志毅, 马文峰, 张卫, 周小舟

(广州中医药大学第四临床医学院, 广东深圳 518033)

摘要:【目的】探讨芪术抗癌方对肝癌HepG2细胞上皮间质化的影响。【方法】将HepG2细胞分为空白对照组, 转化生长因子 β 1(TGF- β 1)组, TGF- β 1+芪术抗癌方1 mg/mL组, TGF- β 1+芪术抗癌方2 mg/mL组等4组, 显微镜下观察处理24 h后细胞的形态变化, 划痕实验观察24 h细胞迁移能力, 蛋白免疫印迹法检测细胞上皮间质化相关蛋白E钙黏蛋白(E-cadherin)、N钙黏蛋白(N-cadherin)、Vimentin、Snail、纤黏蛋白(Fibronectin)的表达情况。【结果】HepG2细胞加入TGF- β 1后出现上皮间质化多样形改变, 而芪术抗癌方2个治疗组均能抑制这一细胞形态改变。划痕实验结果显示, TGF- β 1组划痕愈合百分比较空白对照组显著增加($P < 0.05$), 而芪术抗癌方2个治疗组划痕愈合百分比较TGF- β 1组显著减小($P < 0.05$)。蛋白免疫印迹法结果显示: TGF- β 1组E-cadherin表达水平较空白对照组降低, N-cadherin、Vimentin、Fibronectin和Snail表达水平较空白对照组均升高, 其中2组的Fibronectin表达水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与TGF- β 1组比较, 芪术抗癌方2个治疗组E-cadherin表达水平均升高, N-cadherin、Vimentin、Snail和Fibronectin表达水平均降低, 其中, 芪术抗癌方1 mg/mL组Vimentin、Snail表达水平, 与TGF- β 1组比较, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$), 芪术抗癌方2 mg/mL组E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Fibronectin表达水平, 与TGF- β 1组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。【结论】芪术抗癌方对TGF- β 1诱导的HepG2细胞上皮间质化具有抑制作用。

关键词: 芪术抗癌方; 肝癌; 上皮间质化; 转移; HepG2细胞

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)01-0142-05

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.01.026

Effects of *Qizhu* Anti-Cancer Recipe on Epithelial-Mesenchymal Transition of Liver Cancer Cells

FENG Wen-Xing, HU Rui, SUN Xin-Feng, HAN Zhi-Yi,
MA Wen-Feng, ZHANG Wei, ZHOU Xiao-Zhou

(The Forth clinical Medical School of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of *Qizhu* Anti-Cancer Recipe (QAR) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of HepG2 cells. **Methods** HepG2 cells were divided into blank control group, tumor growth factor β 1 (TGF- β 1) group, TGF- β 1 plus QAR 1 mg/mL group, and TGF- β 1 plus QAR 2 mg/mL group. The changes of cell morphology were observed under the microscope after 24 hours of treatment. The cell migration ability in 24 hours was detected by scratch test. Western blotting assay was used to detect the expression of EMT-related protein E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail and Fibronectin. **Results** After the HepG2 cells were dealt with TGF- β 1, the EMT-like polymorphic changes were seen. The scratch test results showed that the percentage of scratch wound healing in TGF- β 1 group significantly was increased as compared with that in the blank control group ($P < 0.05$), while the percentage of scratch wound healing in the two QAR groups significantly was decreased as compared with that in TGF- β 1 group ($P < 0.05$). Western blotting assay results showed that the expression level of E-cadherin was decreased and expression levels of N-cadherin, Vimentin, Fibronectin and Snail were increased in TGF- β 1 group as compared to those in the blank control group, in which there was significant difference in Fibronectin expression level between the two groups ($P < 0.05$). Compared with the TGF- β 1

收稿日期: 2020-04-04

作者简介: 冯文杏(1993-), 女, 硕士研究生; E-mail: 1415877161@qq.com

通讯作者: 周小舟(1964-), 女, 博士, 主任医师; E-mail: zxz0815@hotmail.com

基金项目: 深圳市基础学科布局项目(编号: JCYJ20170817094901026); 深圳市科技计划项目(编号: JCYJ201803023000674)

group, the expression level of E-cadherin was increased and expression levels of N-cadherin, Vimentin, Snail and Fibronectin were decreased in the two QAR groups, among which there were significant differences in the expression levels of Vimentin and Snail between QAR 1 mg/mL group and TGF- β 1 group (all $P < 0.05$), and there were significant differences in the expression levels of N-cadherin, Vimentin, Snail and Fibronectin between QAR 2 mg/mL group and TGF- β 1 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** QAR has an inhibitory effect on TGF- β 1-induced EMT in HepG2 cells.

Keywords: Qizhu Anti-Cancer Recipe; liver cancer; epithelial-mesenchymal transition (EMT); metastasis; HepG2 cells

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 异质性强, 死亡率高。约90%与癌症相关的死亡是由转移性疾病而不是原发性肿瘤引起的^[1-2]。侵袭性肿瘤前缘细胞多表现出一种去分化的形态, 这种形态是由上皮标志物和细胞与细胞间连接的丢失引起的, 并获得间叶细胞标志物的表达^[3-4], 这种细胞表型的转变程序称为上皮间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)。上皮间质化与多种肿瘤功能相关, 包括肿瘤的发生、恶性进展、肿瘤的干性、肿瘤细胞的迁移、侵入血管、转移和对治疗的抵抗等方面^[5]。中医学无“肝癌”病名, 根据相关症状其隶属于“鼓胀”“肝积”“肝胀”等范畴, 在病因病机上存在正虚邪实的特点。基于这一特点, 周小舟主任在临床中运用芪术抗癌方治疗肝癌获得了良好的疗效^[6], 但其机制尚不明确。因此, 本研究通过体外实验探讨芪术抗癌方对肝癌 HepG2 细胞上皮间质化的影响, 以期为其临床应用提供理论依据, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 购自武汉博士德公司。

1.2 试剂与仪器 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) (美国 R&D 公司); E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 抗体、N 钙黏蛋白 (N-cadherin) 抗体、Vimentin 抗体、Snail 抗体、纤黏蛋白 (Fibronectin) 抗体 (美国 Abcam 公司); GAPDH 抗体、 β -actin 抗体 (美国 Sigma 公司)。ChemiDoc™ MP 全自动凝胶成像和化学发光图像分析系统、垂直电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.3 芪术抗癌方冻干粉浸提液制备 芪术抗癌方

由黄芪 10 g、炒白术 15 g、柴胡 5 g、白芍 10 g、薏苡仁 30 g、淮山药 15 g、鸡内金 10 g、莪术 10 g、白花蛇舌草 15 g、炙甘草 5 g 组成, 各中药材冻干粉由深圳市中医院制剂科制备。浸提液制备方法: 用微量天平称取冻干粉置于无菌离心管中, 以 DMEM 培养液充分溶解, 用 0.22 μ m 微孔滤器过滤得到母液, 以 DMEM 稀释获得 1 mg/mL 浓度的浸提液, 均现配现用。

1.4 细胞培养与传代 人肝癌细胞株 HepG2 细胞复苏后, 以含体积分数 10% 胎牛血清 (FBS)+1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、体积分数 95% 湿度、体积分数 5% CO_2 。每 2 d 换液 1 次, 当细胞生长融合达 80%~90% 时, 以 2.5 g/L 胰蛋白酶 [含 0.2 g/L 乙二胺四乙酸 (EDTA)] 消化、传代。

1.5 分组并镜下观察细胞形态 将指数生长的 HepG2 细胞按 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板, 贴壁后, 空白对照组以 DMEM 培养液培养, TGF- β 1 组加入 TGF- β 10 ng/mL 培养, 中药组分别加入 TGF- β 1 10 ng/mL+芪术抗癌方浸提液 1 mg/mL、TGF- β 1 10 ng/mL+芪术抗癌方浸提液 2 mg/mL 培养。培养 24 h 后, 显微镜下观察各组细胞形态变化并拍照。

1.6 划痕实验观察细胞迁移能力 实验前在超净台用记号笔在 6 孔板背后沿直尺均匀地划横线 5~6 条, 接种细胞量以隔夜能达到 80% 为计。第 2 天吸除培养基, 用枪头比着直尺垂直于板背后的横线划痕, 然后用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻洗 3 次, 洗去划下的细胞。分组培养方法同“1.5”项, 分别于 0 h 和培养 24 h 在同一划痕处显微镜下拍照。用 ImageJ 软件计算 0、24 h 划痕面积, 愈合百分比 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积)/0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.7 蛋白免疫印记法检测细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Fibronectin、Snail 的表达 将指数生长的 HepG2 细胞按 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板, 贴壁后分组培养方法同“1.5”项。48 h 后吸除培养液, 将培养皿置于冰上提取细胞蛋白, 蛋白浓度及配平采用 Bradford 法, 配平后于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min 变性, 离心, 置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。根据蛋白分子量配制相应十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶, 将等量蛋白进行电泳、转膜, 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 60 min, 孵育对应一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, 孵育对应二抗, 曝光显影、图像分析。采用 Image-Lab 软件进行电泳条带灰度值分析, 结果以目的蛋白与内参蛋白(β -actin 或 GAPDH)灰度值的比值表示。

1.8 统计方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较, 方差齐时采用 LSD 检验, 方差不齐时采用 Games-Howell 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HepG2 细胞形态变化比较 图 1 结果显示: HepG2 细胞加入 TGF- β 1 后, 可见细胞形态呈细长多形样间质表型转变(箭头处), 而加入芪术

抗癌方共培养的 2 个治疗组, 可见细胞呈钝圆, 维持紧密连接。

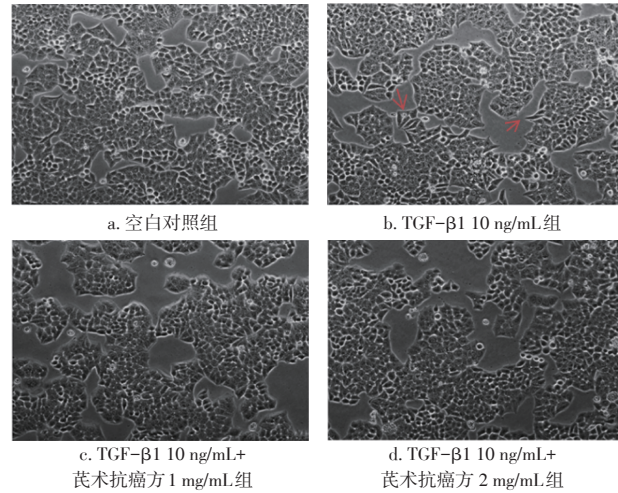
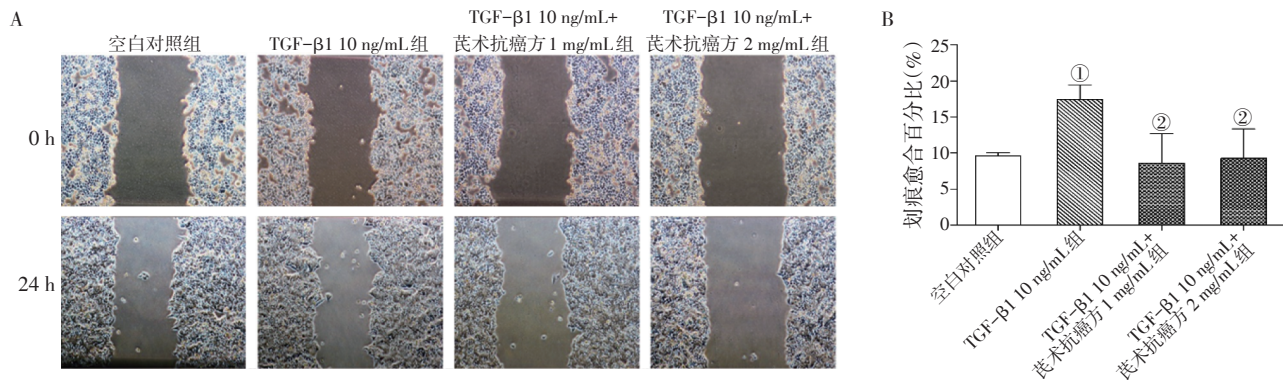


图 1 各组 HepG2 细胞形态变化比较($\times 40$)

Figure 1 Comparison of the morphological changes of HepG2 cells in various groups($\times 40$)

2.2 各组 HepG2 细胞迁移能力比较 图 2 结果显示: HepG2 细胞加入 TGF- β 1 后, 细胞划痕愈合百分比增加, 与空白对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 加入芪术抗癌方共培养的 2 个治疗组细胞划痕愈合百分比比较 TGF- β 1 组均显著减小($P < 0.05$)。



A. 0、24 h 划痕实验 HepG2 细胞迁移情况($\times 40$); B. 各组划痕愈合百分比(%)比较

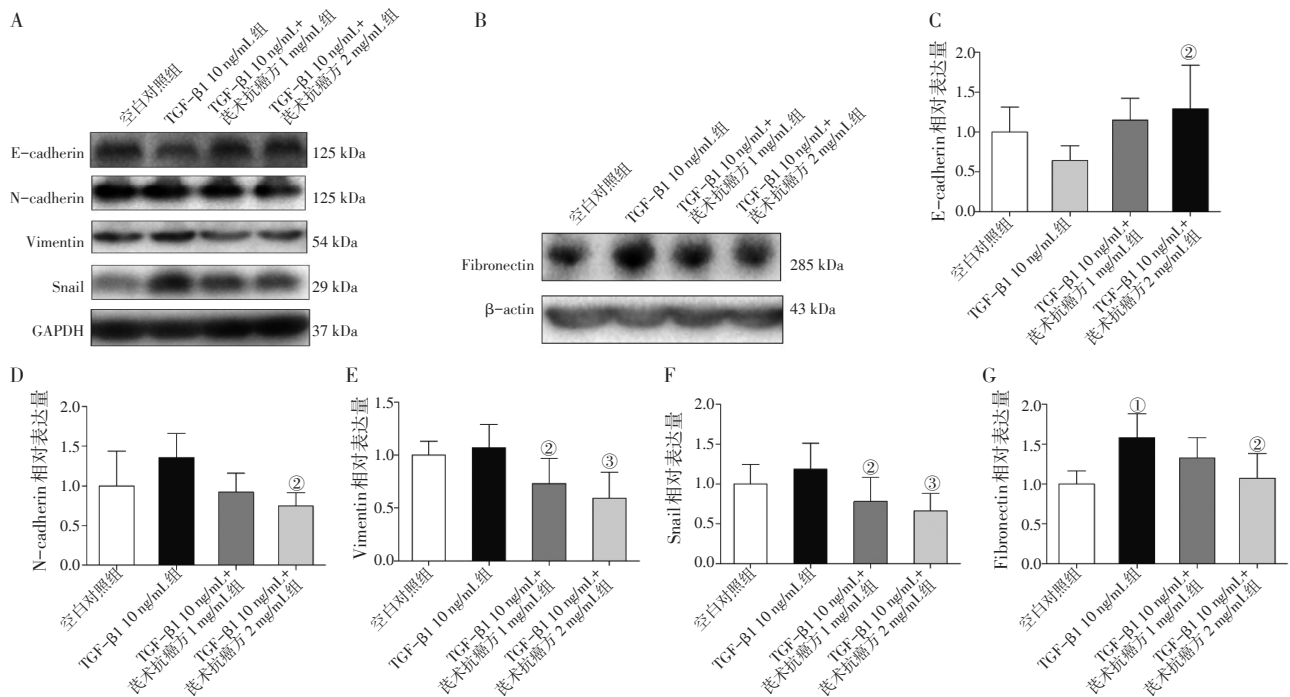
① $P < 0.05$, 与空白对照组比较; ② $P < 0.05$, 与单纯 TGF- β 1 组比较

图 2 各组 HepG2 细胞迁移能力比较

Figure 2 Comparison of the migration abilities of HepG2 cells in various groups

2.3 各组 HepG2 细胞上皮间质化蛋白表达情况比较 图 3 结果显示: TGF- β 1 组上皮表型标记物 E-cadherin 表达水平较空白对照组降低, 间质表型标记物 N-cadherin、Vimentin、Fibronectin 和 Snail 表达水平较空白对照组均升高, 其中, 2 组的

Fibronectin 表达水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 TGF- β 1 组比较, 芪术抗癌方 2 个治疗组 E-cadherin 表达水平均升高, N-cadherin、Vimentin、Snail 和 Fibronectin 表达水平均降低, 其中: 芪术抗癌方 1 mg/mL 组 Vimentin、Snail 表达水平, 与



A. E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 的蛋白免疫印迹电泳条带；B. Fibronectin 的蛋白免疫印迹电泳条带；C. E-cadherin；D. N-cadherin；E. Vimentin；F. Snail；G. Fibronectin

① $P < 0.05$ ，与空白对照组比较；② $P < 0.05$ ，③ $P < 0.01$ ，与单纯TGF-β1组比较

图3 各组HepG2细胞上皮间质化蛋白表达情况比较

Figure 3 Comparison of the expression of EMT proteins in HepG2 cells from various groups

TGF-β1组比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$)；芪术抗癌方2 mg/mL组E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Fibronectin表达水平，与TGF-β1组比较，差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明芪术抗癌方对HepG2细胞上皮间质化的抑制作用呈浓度依赖性，浓度越高，抑制效果越大。

3 讨论

芪术抗癌方为周小舟教授在临床治疗肝癌患者经验中总结创立的。周小舟教授认为肝癌的主要病因是正气不足与外感疫毒相互作用所致，结合现代医学有关乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、过度饮酒等病原因素与机体免疫失调研究^[7]的综合结果，通过临床调查发现肝癌的主要证型是气虚血瘀^[8]。芪术抗癌方以益气散结、疏肝健脾为法，方中：黄芪益气扶正、莪术活血消积为君，白术、鸡内金、山药补脾散结为臣，柴胡、白芍疏肝柔肝，白花蛇舌草、薏苡仁养肝利湿为佐，炙甘草调和诸药。突出了“见肝之病，

知肝传脾，当先实脾”的思想。周小舟课题组对芪术抗癌方进行了系列临床研究，发现经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)+抗癌方组与单纯行TACE组比较，总有效率分别为90.6%(29/32)、65.6%(21/32)，肿瘤初次复发率分别为9.37%(3/32)、34.38%(11/32)，可明显改善患者的生存质量、减少肿瘤的复发和转移并提高患者的生存率^[9]。

上皮间质化是胚胎发育和器官形成过程中至关重要的细胞重塑过程，是上皮细胞获得间质特征的细胞生物学行为，表现为上皮细胞失去极性和细胞间连接，变成多形和松散的间质状态。上皮间质化是执行对特殊诱导转化因子即上皮间质化转录因子(EMT-TFs)、miRNAs、表观遗传和转化后调节子表达的反应^[10]，诱导上皮细胞去分化，抑制上皮细胞特征蛋白的表达，包括E-cadherin，以及激活间质化表型蛋白，包括N-cadherin、Vimentin、Fibronectin等。SNAIL、TWIST、ZEB家族被认为是主要的EMT-TFs，已被大量实验证实^[11-12]。

癌细胞的E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、Fibronectin等蛋白表达情况比较

失、E-cadherin 相关的细胞与细胞间黏合剂的崩解、间质标记阳性获得为特征,诱导肿瘤细胞的迁移性增加^[13]。在一定情况下多种经典生长因子均可诱发上皮间质化,这些因子不仅仅由肿瘤细胞分泌,也可以由肿瘤基质细胞分泌,其中TGF- β 被认为是上皮间质化最有效的诱导因子之一^[14-15]。中医药在肝癌的治疗中显示其独特优势,在对部分中药单体(如姜黄素、槲皮素、木犀草素、白藜芦醇等)及复方的研究中发现其有一定的抗上皮间质化效果^[16]。

综上所述,本研究用TGF- β 1刺激HepG2细胞后,HepG2细胞的形态向多形和狭长状间质样细胞转变,间质表型蛋白表达增强,细胞迁移能力增加,提示TGF- β 1诱导HepG2细胞发生了上皮间质化。而加入芪术抗癌方共培养后,细胞可维持在紧密连接状态,上皮表型蛋白表达增强,间质表型蛋白表达较减弱,细胞迁移能力下降,表明芪术抗癌方对TGF- β 1诱导的HepG2细胞上皮间质化具有抑制作用,但这种抑制效果的具体机制还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, WEINBERG R A. Emerging biological principles of metastasis[J]. Cell, 2017, 168(4): 670-691.
- [3] BRABLETZ T, HLUBEK F, SPADERNA S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial- mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and β -catenin[J]. Cells Tissues Organs, 2005, 179(1-2): 56-65.
- [4] CHRISTOFORI G. New signals from the invasive front[J]. Nature, 2006, 441(7092): 444-450.
- [5] BRABLETZ T. To differentiate or not- routes towards metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(6): 425-436.
- [6] 谢悠青. 芪术中药抗癌方治疗原发性肝癌疗效研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [7] 周小舟, 郭振球, 黄献平, 等. 肿瘤患者血清锌、铜、铁含量和T细胞亚群活性的变化及其与气血辨证的关系[J]. 中国中医药科技, 1997(1): 7-9.
- [8] 周小舟, 孙新锋, 周大桥, 等. HCC回顾性调查研究[A]// 中华中医药学会全国第十四次肝胆病学术会议论文汇编[C]. 2010.
- [9] 周小舟, 孙新锋, 马文峰, 等. 抗癌方联合TACE治疗气虚血瘀型原发性肝癌的临床观察[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(11): 55-57.
- [10] NIETO M A, HUANG R Y J, JACKSON R A, et al. EMT: 2016[J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [11] DE CRAENE B, BERX G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 97-110.
- [12] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R. Molecular mechanisms of epithelial- mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3): 178.
- [13] GIANNELLI G, KOUDELKOVA P, DITURI F, et al. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2016, 65(4): 798-808.
- [14] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y J, et al. Epithelial- mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.
- [15] VAN ZIJL F, KRUPITZA G, MIKULITS W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration [J]. Mutat Res, 2011, 728(1-2): 23-34.
- [16] 朱耀东, 刘延庆. 中药抑制肿瘤上皮间质转化的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 228-232.

【责任编辑: 侯丽颖】