芪连扶正胶囊对 TGF-β 介导 EMT 作用的影响

李秀荣　齐元富　李慧杰
（山东中医药大学附属医院，济南，250014）

摘要　目的：观察芪连扶正胶囊含药血清对 TGF-β 及 EMT 相关分子在肺癌 A549 细胞中表达的影响，探讨相关机制。方法：体外培养肺癌 A549 细胞，制备芪连扶正胶囊含药血清，分组干预，采用 RT-PCR 检测 TGF-β1mRNA 表达，IC 检测 E-cad 与 N-cad 表达。结果：对照组、芪连扶正低剂量、中剂量、高剂量组、化疗组及联合组的 TGF-β1 mRNA 相对表达量依次为（31.11 ± 1.58）%、（29.53 ± 1.50）%、（27.28 ± 1.75）%、（25.23 ± 1.38）%、（23.03 ± 1.59）%、（20.72 ± 1.38）%；各组 E-cad、N-cad 均有不同程度阳性表达，除芪连扶正胶囊低剂量组外，各药组 E-cad 阳性率均高于对照组、N-cad 则相反（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与化疗组相比，联合组及芪连扶正胶囊各组亦有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。结论：芪连扶正胶囊可通过逆转 TGF-β 介导的 EMT 作用防止肿瘤转移。

关键词　芪连扶正胶囊；TGF-β；EMT；抗肿瘤转移

Effect of Qilian Fuzheng Capsule on TGF-β-mediated EMT

Li Xiurong, Qi Yuanfu, Li Huijie
(*The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM*, *Jinan* 250014, *China*)

Abstract　**Objective**: To observe the effect of Qilian Fuzheng Capsule on expression of EMT (epithelial mesenchymal transition) and TGF-β in lung cancer A549 cells, and study its possible mechanism. **Methods**: A549 cells were cultured in vitro and group intervened, RT-PCR to detected the expression of TGF-β1mRNA, using Immunohistochemical to detected the expression of E-cad and N-cad. **Results**: the TGF-β1 mRNA relative expression of the control group, Qilian Fuzheng Capsule low, medium and high dose groups, chemotherapy group and combined group were (31.11 ± 1.58)%、(29.53 ± 1.50)%、(27.28 ± 1.75)%、(25.23 ± 1.38)%、(23.03 ± 1.59)%、(20.72 ± 1.38)% respectively. Except the low-dose group, the expression of E-cad and N-cad in other drug groups were all significantly different compared with the control group; the combined group and all Qilian Fuzheng Capsule groups were significantly different compared with the chemotherapy group. **Conclusion**: Qilian Fuzheng Capsule can reverse the TGF-β-mediated EMT therefore play an anti-tumor effect.

Key Words　Qilian Fuzheng Capsule; TGF-β; EMT; Anti-metastatic

中图分类号：R285.6；R243　　**文献标识码**：A　　**doi**：10.3969/j.issn.1673－7202.2015.04.022

上皮-间充质转化（Epithelial Mesenchymal Transition，EMT）是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转化的现象，EMT 是上皮细胞获得迁移能力的有效方式，也是上皮细胞癌浸润转移的一个重要途径[1]。TGF-β 在体内和体外培养的大多数上皮细胞、上皮来源的肿瘤细胞中均具有诱导 EMT 的作用，是目前研究最广泛的 EMT 诱导因子[2]。大量实验与临床研究证实中医药具有抑制肿瘤转移作用，笔者选用具有解毒化痰、消积散结、扶正抗癌之效的院内制剂芪连扶正胶囊为研究对象，观察其对 TGF-β 及 EMT 相关分子在肺癌 A549 细胞中表达的影响，以期为防治肺癌复发转移筛选有效中成药。

1　材料与方法

1.1　细胞与动物　高转移人肺腺癌细胞系 A549 细胞株，购自山东省医学科学院细胞室。SPF 级 SD 雄性大鼠，购自山东中医药大学实验动物中心，质量合格证编号为 SCXK（鲁）20110003。

1.2　药品试剂　芪连扶正胶囊（山东中医药大学附属医院药剂科，批号：Z0120030239），顺铂（DDP，齐鲁制药有限公司，批号：207062DC）。胎牛血清（浙江天杭生物科技有限公司），改良型 RPMI-1640 培养基（赛默飞世尔生物化学制品有限公司），兔抗人 E-cad 多克隆抗体（编号：BA0475）、兔抗人 N-cad 多克隆抗体（编号：BA0673）、浓缩型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒（武汉博士德生物工程有限公司），总 RNA 提取试剂盒、SuperRT 二步法 RT-PCR 试剂盒（北京康为世纪生物科技有限公司）。TGF-β1 与 β-actin 引物：由上海生工生物技术有限公司合成，TGF-β1 上游 5'-CAGACTCTAGAGACTGTCAG-3'，

作者简介：李秀荣（1963—），女，汉族，山东济南人，医学博士，主任医师，博士研究生导师，山东中医药大学附属医院肿瘤科，从事中西医结合肿瘤防治研究

下游 5'-GTCACCAGAGAAAGAGGAC-3', 分子量: 384bp; β-actin 上游 5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGC-TA-3', 下游 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3', 分子量:302 bp。

1.3 主要仪器 超净工作台(美国 Thermo Forma 公司), CO_2 培养箱、鼓风干燥箱、超纯水系统(德国 Heraeus 公司), 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 电热压力蒸汽消毒器(山东安得医疗科技有限公司), 梯度 PCR 仪、电泳仪(德国 Biometro 公司), PCR 仪(英国 Thermo Hybaid 公司), 凝胶成像分析系统(美国 Alpha 公司)。

1.4 芪连扶正胶囊含药血清制备 购买体 200 g 左右、♂SD 大鼠 25 只, 适应性喂养 5 d; 分为芪连扶正胶囊组与空白对照组, 前者予以芪连扶正胶囊溶液灌胃, 后者给予等量生理盐水, 1 次/d; 给药第 7 d 末次灌药前 12 h 禁食, 末次给药后 1 h 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血, 离心, 取上清, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -80 ℃冰箱保存备用。

1.5 实验分组 共分 6 组: 对照组(10% 胎牛血清), 芪连扶正胶囊低剂量组(5% 含药血清), 芪连扶正胶囊中剂量组(10% 含药血清), 芪连扶正胶囊高剂量组(20% 含药血清), 顺铂组(终浓度为 2 μg/mL), 联合组(10% 含药血清 + 顺铂)。

1.6 PT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 表达 常规培养细胞, 制备细胞悬液, 平均分瓶, 待细胞长满时按实验分组加药干预, 48 h 时后按试剂盒说明书逐步提取总 RNA, 紫外分光光度仪测定 RNA 样品纯度, 各组样品吸光度比值均在 1.93 ~ 1.96 之间, 可进行后续实验。按试剂盒说明书逐步合成 cDNA、扩增 PCR, 制胶、上样, 跑电泳约 30 min, 完毕后将胶板至 0.5 μg/mL EB 溶液中室温染色 20 min, 凝胶成像分析系统观察拍照, 分析各目的条带和内参的灰度值(IDV), 计算相对表达量(RATIO), RATIO = 目的条带 IDV/内参 IDV[3]。

1.7 IC 检测 E-cad 与 N-cad 表达 常规培养细胞, 制备细胞悬液, 计数并调整密度以 2×10^5 为宜; 将细胞悬液垂直加于到经预处理有盖玻片的六孔板内, 2 mL/孔, 继续培养; 待细胞爬好片后, 按实验分组加药, 48 h 后弃液, 95% 乙醇固定, 5% Trion X-100 室温孵育, 3% H_2O_2 室温孵育, 正常山羊封闭血清封闭, 一抗稀释液 4 ℃孵育过夜, 二抗稀释液 37 ℃孵育 30 min, SABC 37 ℃孵育 30 min, DAB 显色 5 ~ 30 min, 以均匀黄染为宜, 苏木素复染, 盐酸乙醇脱色, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中心树胶封片, 观察拍照, 高清晰度彩色病理图文分析系统定量分析。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件对实验数据单因素方差分析, 检验标准以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 表达 对照组、芪连扶正低剂量、中剂量、高剂量组、化疗组及联合组的 TGF-β1 mRNA 相对表达量依次为(31.11 ± 1.58)%、(29.53 ± 1.50)%、(27.28 ± 1.75)%、(25.23 ± 1.38)%、(23.03 ± 1.59)%、(20.72 ± 1.38)%; 与对照组相比, 各药组 TGF-β1mRNA 的相对表达量均低于对照组, 但芪连扶正胶囊低剂量组与之无统计学意义($P > 0.05$), 余药组均有统计学意义($P < 0.01$); 与化疗组相比, 芪连扶正胶囊各组 TGF-β1mRNA 的相对表达量均高于化疗组, 比较均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而联合组 TGF-β1mRNA 的相对表达量低于化疗组, 比较亦有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化检测 E-cad 与 N-cad 表达 胞浆、胞核、胞膜为棕黄色颗粒者即阳性细胞, 各组 E-cad 与 N-cad 均有不同程度阳性表达。与对照组相比, 各药组 E-cad 阳性率均高于对照组、N-cad 则相反, 其中芪连扶正胶囊低剂量组无统计学意义($P > 0.05$), 余药组均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与化疗组相比, 芪连扶正胶囊各组 E-cad 阳性率均低于化疗组、N-cad 高于化疗组, 比较均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而联合组 E-cad 高于化疗组、N-cad 低于化疗组, 比较亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 见表 1。

表 1 EMT 相关因子蛋白表达情况

组别	鼠数	E-cad 阳性率%	N-cad 阳性率%
对照组	6	39.42 ± 4.10	67.86 ± 4.52
芪连扶正低剂量	6	42.16 ± 3.77**	64.00 ± 4.73**
芪连扶正中剂量	6	48.45 ± 4.59△**	57.24 ± 4.42△△**
芪连扶正高剂量	6	52.24 ± 4.13△△*	51.64 ± 4.02△△*
化疗组	6	58.58 ± 3.85△△	45.85 ± 2.96△△
联合组	6	65.22 ± 4.23△△*	36.87 ± 2.33△△**

注: 单因素方差分析, 与化疗组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较, △ $P < 0.05$、△△ $P < 0.01$。

3 讨论

上皮间充质转化是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转化的现象, 存在于多种慢性疾病的发病过程及肿瘤浸润转移过程中。E-钙黏着蛋白(E-cadherin)的减少或丢失、分子 Zonula occludens-1(ZO-1)的丢失和重定位、上调某些蛋白

质的表达以及 EMT 与胞外基质的关系是 EMT 的主要特征[4]。在 EMT 过程中伴有多个细胞分子标志改变,其中 E-cadherin 的减少或丢失是 EMT 最重要的标志性变化,同时也是促进肿瘤转移的重要表现,另一种钙黏蛋白,N-钙黏蛋白(N-cadherin)在 EMT 发生后表达增加,具有促进肿瘤细胞运动和转移的作用[5]。EMT 可被多种信号分子所诱导,其中 TGF-β 是其诱导发生的关键因子,研究较为广泛。TGF-β 参与肿瘤 EMT 过程的主要机制是通过 Smad 途径和非 Smad 途径完成的[6-7]。首先,TGF-β 与肿瘤细胞膜上的 TβRⅡ结合,通过 TβRⅡ激酶使 TβRⅠ磷酸化,进一步激活下游的 Smad2/3,磷酸化的 Smad2/3 再与胞内的 Smad4 结合形成三聚体,进入细胞核与 DNA 结合而发生相互作用,促使 EMT 形成[8]。TGF-β 还可通过非 Smad 依赖途径对肿瘤 EMT 进行调节,如丝裂原活化的蛋白激酶(Mitogen Activated Protein Kinase,MAPK)途径,TGF-β 通过 MAPK 途径激活下游的细胞外调节蛋白激酶(Extracellular Regulated Protein Kinase,ERK),从而诱导肿瘤 EMT 发生[9]。TGF-β/Smad 通路与多条通路间进行"交谈",与 Wnt 通路的"对话"可上调 EMT 诱导因子 Snail 和 Twist,抑制 E-cad 表达,同时激活 β-catenin/TCF/LEF 复合物,间接导致 vimentin 等间质标志物的表达,共同协调完成对肿瘤 EMT 的调节[10]。鉴于 EMT 在肿瘤转移中的作用,其相关研究可深入了解 EMT 影响肿瘤的机制,还可促进 EMT 作为生物标记物与靶点治疗的研究[11]。

传统中医药在肿瘤防治中发挥着重要作用,研究发现一些中药的有效成分及复方有明显的抗肿瘤作用,具有良好的应用前景,而其中中西医结合治疗肺癌进展较快,尤其体现在中药对肺癌放化疗减毒和增效及手术后防复发转移方面的研究方面[12]。芪连扶正胶囊由生黄芪、连翘、莪术、清半夏、天南星、白花蛇舌草、仙鹤草、全蝎、蜈蚣、壁虎、女贞子十一味中药组成,方中黄芪乃补气药之长,可补中益气,营运中州,且生用力专,取其益气托毒之功;连翘不仅能解疮毒,又能散气血凝聚、具有消痈散结之功,为疮家圣药;莪术有破血行气,消积止痛之效,为医家治积聚最药;清半夏、天南星、白花蛇舌草、仙鹤草、全蝎、蜈蚣、壁虎多具有解毒祛瘀散结之效;女贞子则补益肝肾、滋阴清热,反佐诸药伤阴之弊。芪连扶正胶囊纵观全方,药精力专,可针对肿瘤患者病机特点发挥解毒消积、扶正抗癌作用。且大量现代药理研究证实本胶囊所选药物可通过不同机制、不同程度的抑制肿瘤细胞、调节机体免疫力达到抗肿瘤作用,印证了芪连扶正胶囊组方的合理性与治疗恶性肿瘤的有效性[13]。近年来研究发现,EMT 是肺癌发生侵袭转移的重要原因,TGF-β 可以促使肺癌细胞中 E-cad 表达减少,细胞发生 EMT,提高其侵袭和迁移能力[14]。本研究结果表明芪连扶正胶囊含药血清可上调 E-cad 表达、下调 N-cad 表达与 TGF-β1mRNA 表达,逆转 TGF-β 介导的 EMT 发生,发挥抗肿瘤转移作用,提示芪连扶正胶囊可作为防治肺癌转移的有效中成药。

参考文献

[1] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res, 2009, 19(2): 156 – 172.

[2] 王宏刚,黄晓丹,季国忠. EMT 的信号通路及 microRNA 在肿瘤中的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(34): 3672 – 3678.

[3] 齐元富,李慧杰,聂奔. 纳米雄黄对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株增殖抑制及诱导凋亡作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 244 – 248.

[4] 张可华,宋建国. EMT 与肿瘤[J]. 生命的化学, 2008, 28(5): 523 – 526.

[5] Sabe H. Cancer early dissemination: cancerous epithelial-mesenchymal transdifferentiation and transforming growth factor-β signaling[J]. J Biochem, 2011, 149(6): 633 – 639.

[6] Watanabe Y, Itoh S, Goto T, et al. A transmembrane TGFbeta-inducible protein sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling[J]. Mol Cell, 2010, 37(1): 123 – 134.

[7] Pino MS, Kikuchi H, Zeng M, et al. Epithelial to mesenchymal transition is impaired in colon cancer cells with microsatelliteinstability[J]. Gastroenterology, 2010, 138(4): 1406 – 1417.

[8] Vincent T, Neve EP, Johnson JR, et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(8): 943 – 950.

[9] Secker GA, Shortt AJ, Sampson E, et al. TGFbeta stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and Ras/MEK/ERK signaling[J]. Exp Cell Res, 2008, 314(1): 131 – 142.

[10] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition[J]. Cell Res, 2009, 19(2): 156 – 172.

[11] 尹帅,李永翔. 上皮间质转化与肿瘤转移研究进展[J]. 肝胆外科杂志, 2013, 23(1): 76 – 78.

[12] 齐元富,李慧杰,李静. 六神丸对 H22 肝癌腹水移植瘤 PDGF 与 VEGF 表达的影响及相关机制探讨[J]. 世界中医药, 2013, 8(1): 69 – 71.

[13] 李慧杰. 芪连扶正胶囊联合 GP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2010: 19 – 21.

[14] Zhang HJ, Wang HY, Zhang HT, et al. Transforming growth factor-β1 promotes lung adenocarcinoma invasion and metastasis by epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 355(2): 309 – 314.

(2013 – 08 – 30 收稿　责任编辑:徐颖)