

半夏泻心汤含药血清对胃癌来源外泌体诱发腹膜间皮细胞 上皮间质转化的影响

董俊刚, 刘喜平*, 李沛清, 王庆苗, 朱中博, 何玲, 李永玉, 王宇
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨半夏泻心汤对胃癌来源外泌体(Exo)诱发人腹膜间皮细胞(HMrSV5)上皮间质转化(EMT)的影响。方法:制备半夏泻心汤含药血清,提取人胃癌NCI-N87细胞外泌体(NCI-N87-Exo),采用透射电镜及蛋白免疫印迹法(Western blot)进行鉴定,并用细胞膜红色荧光探针(Dil)标记。实验分为空白组、模型组、半夏泻心汤低、中、高剂量组(13.5, 27, 54 g·kg⁻¹)。空白组将HMrSV5细胞单独培养;模型组在HMrSV5中加入的NCI-N87-Exo(100 mg·L⁻¹);半夏泻心汤低、中、高剂量组在模型组的基础上分别加入10%的半夏泻心汤低、中、高剂量含药血清。激光共聚焦显微镜观察24, 48, 72 h时HMrSV5细胞对NCI-N87-Exo的摄取情况,72 h后观察HMrSV5细胞形态学的变化,Western blot检测HMrSV5细胞中E-钙黏附蛋白(E-cadherin),细胞角蛋白19(CK19), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和弹性蛋白(Elastin)及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad2/3,磷酸化(p)-Smad2/3蛋白表达。结果:透射电镜观察到NCI-N87-Exo呈椭圆或碟状的囊泡结构,粒径介于40~80 nm,高表达Exo标志蛋白CD9, CD63,不表达钙网蛋白(Calreticulin),证实为NCI-N87-Exo。共培养24, 48, 72 h后,荧光显微镜下均可观察到NCI-N87-Exo被HMrSV5细胞摄取,与时间呈正相关。与空白组比较,半夏泻心汤可显著抑制HMrSV5细胞对NCI-N87-Exo的摄取,以半夏泻心汤中、高剂量组含药血清最为明显($P<0.05$, $P<0.01$)。半夏泻心汤含药血清干预后HMrSV5细胞排列较为紧密,细胞间隙明显缩小,以半夏泻心汤含药血清大剂量组最为明显。Western blot显示,与模型组比较,半夏泻心汤中、高剂量组含药血清干预后HMrSV5细胞E-cadherin, CK19蛋白表达显著升高($P<0.01$), α -SMA, Elastin蛋白表达显著降低($P<0.01$),半夏泻心汤低、中、高剂量组TGF- β_1 , p-Smad2/3蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), Smad2/3无明显变化。结论:NCI-N87-Exo能够被HMrSV5细胞摄取并诱发HMrSV5细胞EMT,半夏泻心汤能够阻抑HMrSV5细胞对NCI-N87-Exo的摄取,抑制NCI-N87-Exo诱发的HMrSV5细胞EMT,其作用机制与调控TGF- β_1 /Smads信号通路有关。

[关键词] 胃癌; 外泌体; 人腹膜间皮细胞; 上皮间质转化; 半夏泻心汤

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)21-0019-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212126

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210908.1456.003.html>

[网络出版日期] 2021-09-08 15:29

Effect of Banxia Xiexintang-containing Serum on Epithelial-mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelial Cells Induced by Gastric Cancer-derived Exosomes

DONG Jun-gang, LIU Xi-ping*, LI Pei-qing, WANG Qing-miao, ZHU Zhong-bo, HE Ling,
LI Yong-yu, WANG Yu

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Banxia Xiexintang on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human peritoneal mesothelial cell line (HMrSV5) induced by gastric cancer-derived exosomes (Exo). **Method:** Banxia Xiexintang-containing serum was prepared and the human gastric cancer NCI-N87-derived exosomes (NCI-N87-Exo) were extracted, followed by their identification by transmission

[收稿日期] 20210807(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860813, 81860782)

[第一作者] 董俊刚,在读博士,从事方剂的临床应用与作用机制研究, E-mail: 1551358797@qq.com

[通信作者] *刘喜平,博士,教授,从事方剂的临床应用与作用机制研究, Tel: 0931-5161353, E-mail: lxp-257@163.com

electron microscopy and Western blotting and labeling with 1, 1-dioctadecyl-3, 3, 3, 3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI). The cells were divided into the blank group, model group, and low-, medium-, and high-dose (13.5, 27, 54 g·kg⁻¹) Banxia Xiexintang groups. HMrSV5 cells in the blank group were cultured alone, the ones in the model group with 100 mg·L⁻¹ NCI-N87-Exo, and those in the low-, medium-, and high-dose Banxia Xiexintang groups with 100 mg·L⁻¹ NCI-N87-Exo plus low-, medium-, and high-dose 10% Banxia Xiexintang-containing serum, respectively. Confocal laser microscope was used to observe the uptake of NCI-N87-Exo by HMrSV5 cells at 24 h, 48 h and 72 h. Seventy-two hours later, the morphological changes in HMrSV5 cells were observed. The protein expression levels of E-cadherin, cytokeratin 19 (CK19), α -smooth muscle actin (α -SMA), elastin, and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Smad2/3, and p-Smad2/3 were assayed by Western blot. **Result:** It was observed under the transmission electron microscope that NCI-N87-Exo showed an oval or dish-shaped vesicle structure with a particle size ranging from 40 to 80 nm. Exo marker proteins CD9 and CD63 were highly expressed while calreticulin was not expressed, implying that the NCI-N87-Exo was confirmed. After 24 h, 48 h, 72 h of co-culture, it was observed under the fluorescence microscope that NCI-N87-Exo were taken up by HMrSV5 cells, which was positively correlated with time. Compared with the blank group, Banxia Xiexintang significantly inhibited the uptake of NCI-N87-Exo by HMrSV5 cells, with better effect noticed in the middle- and high-dose Banxia Xiexintang groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After intervention with Banxia Xiexintang-containing serum, the HMrSV5 cells were arranged densely, and the intercellular space was significantly reduced, with the most obvious changes present in the high-dose Banxia Xiexintang group. Western blot revealed that the protein expression levels of E-cadherin and CK19 in HMrSV5 cells after being intervened with the medium- and high-dose Banxia Xiexintang-containing serum were increased significantly as compared with those in the blank group, whereas the levels of α -SMA and Elastin were decreased significantly ($P < 0.01$). Banxia Xiexintang-containing serum at the low, medium, and high doses remarkably down-regulated TGF- β_1 and p-Smad2/3 protein expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, there was no significant change in Smad2/3. **Conclusion:** NCI-N87-Exo can be taken up by HMrSV5 cells to induce EMT. Banxia Xiexintang can inhibit the uptake of NCI-N87-Exo by HMrSV5 cells and the resulting EMT induced by NCI-N87-Exo, which is related to the regulation of TGF- β_1 /Smads signaling pathway.

[Keywords] gastric cancer; exosomes (Exo); human peritoneal mesothelial cells; epithelial-mesenchymal transition (EMT); Banxia Xiexintang

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤。目前,临床上对 I 期胃癌的确诊率仅占 4.1%,约 25% 的胃癌患者在术前或术中即被诊断有腹膜转移,对进展期胃癌即使实施了根治手术,术后也有 40%~60% 的患者发生腹膜转移,腹膜转移是胃癌术后复发和死亡的主要原因之一^[1]。中医学在防治胃癌复发转移中积累了丰富的临床经验,半夏泻心汤防治胃癌及胃癌复发转移,临床疗效确切^[2],课题组前期基于“脾胃升降”理论,依据“辛开苦降法”开展了半夏泻心汤防治胃癌及其复发转移的相关研究,研究发现半夏泻心汤对胃癌荷瘤裸鼠有明显的抑瘤作用^[3],并能保护胃癌上清液对腹膜间皮细胞的损伤^[4],抑制人胃癌腹膜高转移潜能细胞的增殖及侵袭转移^[5]。

上皮间质转化(EMT)是指上皮细胞形态学发

生间质细胞表型的转变过程。腹膜间皮细胞紧密连接形成的完整间皮层是腹膜微环境中阻止肿瘤侵袭的首要屏障。经历了 EMT 后腹膜间皮细胞的细胞骨架排列疏松^[6],导致间皮细胞之间的间隙增大^[7],易被肿瘤细胞黏附和侵袭。已有研究表明,胃癌腹膜转移与腹膜间皮细胞 EMT 密切相关^[8]。进一步研究发现,在肿瘤细胞定植于腹膜间皮细胞之前,腹膜间皮细胞就已发生了表型及功能的改变,为肿瘤细胞的转移创造了有利的转移前微环境^[9],然而其机制并不明确。近年来的研究发现,肿瘤在发生转移前,肿瘤细胞分泌的外泌体(Exo)可将携带的生物信息物质传递到受体细胞,进而诱发受体细胞 EMT^[10],并已证实胃癌细胞来源的 Exo 可诱发腹膜间皮细胞 EMT,促进胃癌腹膜转移^[11]。转化生长因子- β (TGF- β)信号通路在腹膜间皮细胞 EMT 的

调控中发挥着非常重要的作用,而TGF- β_1 /Smads则是TGF- β 调控细胞EMT的关键通路。

本研究拟通过TGF- β_1 /Smads信号通路,以胃癌细胞来源Exo诱发腹膜间皮细胞EMT为切入点,观察半夏泻心汤对腹膜间皮细胞摄取胃癌细胞来源Exo及腹膜间皮细胞EMT的影响,探讨半夏泻心汤防治胃癌腹膜转移的作用机制,以期半夏泻心汤防治胃癌复发转移提供实验依据。

1 材料

1.1 动物及细胞 雄性SPF级SD大鼠60只,6~8周龄,体质量200~250 g,由甘肃中医药大学动物实验中心提供,动物质量合格证号SCXK(甘)2020-0001,动物设施使用许可证号SYXK(甘)2020-0009。饲养于温度23~25℃,相对湿度(50±10)%的SPF级实验室。本研究中涉及动物的实验均经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号2018-009)。人腹膜间皮细胞(HMrSV5)及人胃癌NCI-N87细胞购自上海中科院细胞库,传至第3代备用。

1.2 药物及试剂 半夏泻心汤由半夏、干姜、黄芩、黄连、人参、大枣、炙甘草各味中药组成,药材饮片购自甘肃中医药大学附属医院中药房,由甘肃中医药大学药学院景明教授鉴定为正品。DMEM培养基(美国Gibco公司,批号11995-065);微量BCA蛋白定量试剂盒(上海易色医疗科技有限公司,批号BC201);外泌体快速提取试剂盒Exo-Quick-TC(美国SBI公司,批号EXOTC50A-1);胎牛血清(美国Gibco公司,批号HLC0101);4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号C1005);细胞膜红色荧光探针(Dil)试剂(美国Sigma公司,批号41085-99-8);E-钙黏附蛋白(E-cadherin),细胞角蛋白19(CK19), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),弹性蛋白(Elastin),TGF- β_1 ,Smad2/3,磷酸化(p)-Smad2/3, β -肌动蛋白(β -actin)抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗鼠IgG(英国Abcam公司,批号分别为ab40772, ab52625, ab150301, ab9519, ab179695, ab202445, ab272332, ab8226, ab150077, ab6728)。

1.3 仪器 7500型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);ECLIPSE Ti型荧光倒置显微镜,A1R型激光共聚焦荧光显微镜(日本Nikon公司);DYCP-31DN型电泳仪,DY CZ-40B型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);Tanon 2500R化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);SpectraMax i3x型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 半夏泻心汤含药血清的制备 按原方(半夏12 g,干姜9 g,黄芩9 g,黄连3 g,人参9 g,大枣4枚,炙甘草9 g)剂量称取半夏泻心汤药材饮片^[12],混合并浸泡30 min,煎煮2次,第1次加8倍量水,煎煮1.5 h,第2次加6倍量水,煎煮1 h,合并煎液离心滤过,滤液减压分别浓缩至含生药浓度为2.7,1.35,0.675 g·mL⁻¹。按照人与动物体表面积换算半夏泻心汤的用药剂量,半夏泻心汤的大鼠等效剂量为5.4 g·kg⁻¹。参考文献方法^[13],32只SPF级SD雄性大鼠,常规适应性饲养1周后,按随机数字表法分为空白组及半夏泻心汤高、中、低剂量组,每组8只,半夏泻心汤高、中、低剂量含药血清组分别以大鼠等效剂量的10,5,2.5倍进行灌胃,给药剂量分别为54,27,13.5 g·kg⁻¹,空白组给予等体积的生理盐水灌胃,2次/d,每次2 mL,连续2周^[14],末次灌胃后1 h,麻醉动物,腹腔解剖,从腹主动脉采集全血,静置分层后3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm,下同),收集血清,于56℃水浴灭活30 min,经0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,分装,-20℃保存备用。用时血清浓度配制为10%。

2.2 人胃癌NCL-N87细胞Exo的分离 用无Exo血清培养基培养人胃癌NCL-N87细胞后,在1 500 r·min⁻¹,4℃条件下离心5 min,收集上述的细胞培养上清10 mL。再次在5 000 r·min⁻¹,4℃条件下离心20 min,用0.22 μ m的滤膜过滤去除较大的囊泡。将过滤后的细胞上清与Exo Quick-TC试剂以5:1的比例混匀,4℃孵育过夜,1万 \times g,离心30 min,弃去上清液,将所得沉淀用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 mL重悬,即得到Exo悬液。进行分装,各取适量外泌体混悬液采用二喹啉甲酸法(BCA)按微量BCA蛋白定量试剂盒说明书对提纯后的NCI-N87细胞Exo进行定量,根据标准曲线计算Exo的总蛋白浓度,余保存于-80℃冰箱。

2.3 人胃癌NCL-N87细胞Exo的鉴定 将Exo混悬液以PBS稀释至合适浓度,加到Formvar-carbon载样铜网上,将铜网放2.5%的戊二醛液上固定,然后移至包被碳膜的微栅网,将其嵌入在50 μ L的草酸双氧铀液及甲基纤维素-UA液滴上,置于透射电镜下观察Exo的外观形态,80 kV下观察拍摄电镜照片并保存。同时,使用BCA法测定Exo浓度,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Exo标志蛋白CD9,CD63及钙网蛋白(Calreticulin),取Exo样品,加入6 \times 蛋白样品上样缓冲液,100℃加热10 min变

性。以总蛋白量 20 μg 进行点样,电泳,转膜,洗涤封闭,分别结合一抗(CD9, CD63, Calreticulin 1:1 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗涤,室温下结合二抗(山羊抗兔 IgG 1:1 000)孵育 2 h 后,洗涤,ECL 化学发光液显影检测蛋白条带,Image J 软件分析灰度值。

2.4 激光共聚焦显微镜观察 HMrSV5 细胞对 NCI-N87-Exo 的摄取 将得到的 NCI-N87-Exo 悬液与 Dil 以体积比为 1 000:1 混合,避光放置 30 min,在 10 万 $\times\text{g}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 90 min,PBS 重悬后再次离心,收集 Exo,即为带 Dil 标记的 NCI-N87-Exo。实验分为空白组、模型组、半夏泻心汤低、中、高剂量组。取对数生长期 HMrSV5 细胞,以 2×10^5 个/mL 接种于细胞培养板中。空白组将 HMrSV5 培养在空白大鼠血清的培养基中(DMEM 培养基+10% 的空白大鼠血清+1% 青霉素-链霉素);模型组在空白组的基础上加入 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NCI-N87-Exo 1 mL;根据前期研究及预实验结果,半夏泻心汤低、中、高剂量组在模型组基础上分别加入 10% 半夏泻心汤低、中、高剂量的含药血清^[14]。各组分别在培养 24,48,72 h 终止培养。收集各组 HMrSV5 细胞,用 4% 的多聚甲醛(PBS 配制)常温固定细胞片 15 min。滴加 DAPI 的染液(蓝色染色细胞核),避光孵育 15 min,对细胞核进行复染,PBS 洗 4 次,每次 5 min;用含荧光淬灭剂封片后在激光共聚焦显微镜下观察各组 HMrSV5 细胞内红色荧光表达,并用 Image J pro plus 6.0 软件分析各组 HMrSV5 细胞红色荧光标记的积分吸光度 IA。同时,收集各组培养 72 h 后 HMrSV5 细胞,观察腹膜间皮细胞的形态学变化,并做相关检查。

2.5 Western blot 检测 HMrSV5 细胞中相关蛋白的表达 收集各组干预 72 h 后 HMrSV5 细胞,将细胞样品溶解在冰上的裂解缓冲液中,12 000 $\times\text{g}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 后吸取上清,将 5 \times 蛋白上样缓冲液与蛋白样品按照 1:4 进行配置,震荡混匀,并在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸 5 min,BCA 法测蛋白浓度。然后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。将凝胶转移到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗膜后,用封闭液将一抗(E-cadherin, CK19, α -SMA, Elastin, TGF- β_1 , Smad2/3 及 p-Smad2/3)按 1:500 稀释,内参一抗 β -actin 按 1:1 000 稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用封闭液将二抗按 1:1 000 稀释,温育 1.5 h,再次用 TBST 清洗 4 次。最后将 ECL 曝光液混匀后均匀覆盖在整片膜上,反应 2 min,放入曝光仪曝光检测。用 Image J pro plus 6.0 软件测量灰度值,计算蛋白质

的相对表达量。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验均独立重复 3 次。若数据符合正态分布,经方差齐性检验后若方差齐,则两组间均数比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,若方差不齐采用 Tamhane's *T*₂ 检验。若数据不符合正态分布,则选用非参数 Kruskal Walli's 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 NCI-N87-Exo 的鉴定 透射电镜观察到 NCI-N87-Exo 有完整的双层包膜,呈椭圆或碟状的囊泡结构,内含低密度物质,粒径介于 40~80 nm。BCA 法检测 Exo 的蛋白含量,标准曲线为 $Y=0.005 2X+0.017 5$, $R^2=0.995 8$,计算含量为 $(145 3.84\pm 193.14)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据预实验,实验时将其质量浓度配制为 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Western blot 检测显示,与 NCI-N87 细胞比较,NCI-N87-Exo 特征性相关蛋白 CD9,CD63 蛋白表达升高($P<0.05$),Calreticulin 蛋白未见明显表达,提示获得了 NCI-N87-Exo。见图 1,2。

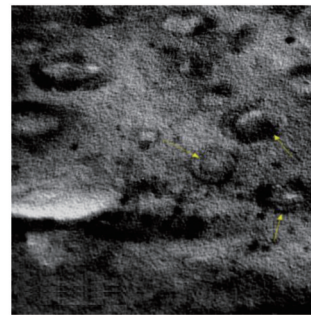
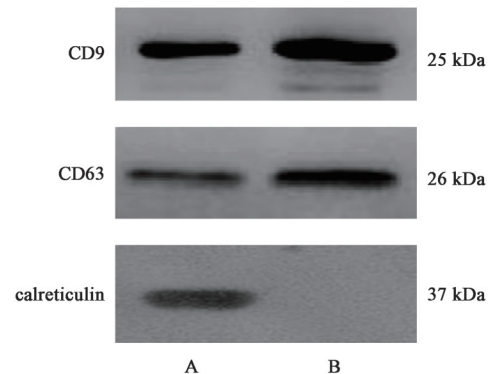


图 1 NCI-N87-Exo 形态(透射电镜, $\times 5 000$)

Fig. 1 Form of NCI-N87-Exo (TEM, $\times 5 000$)



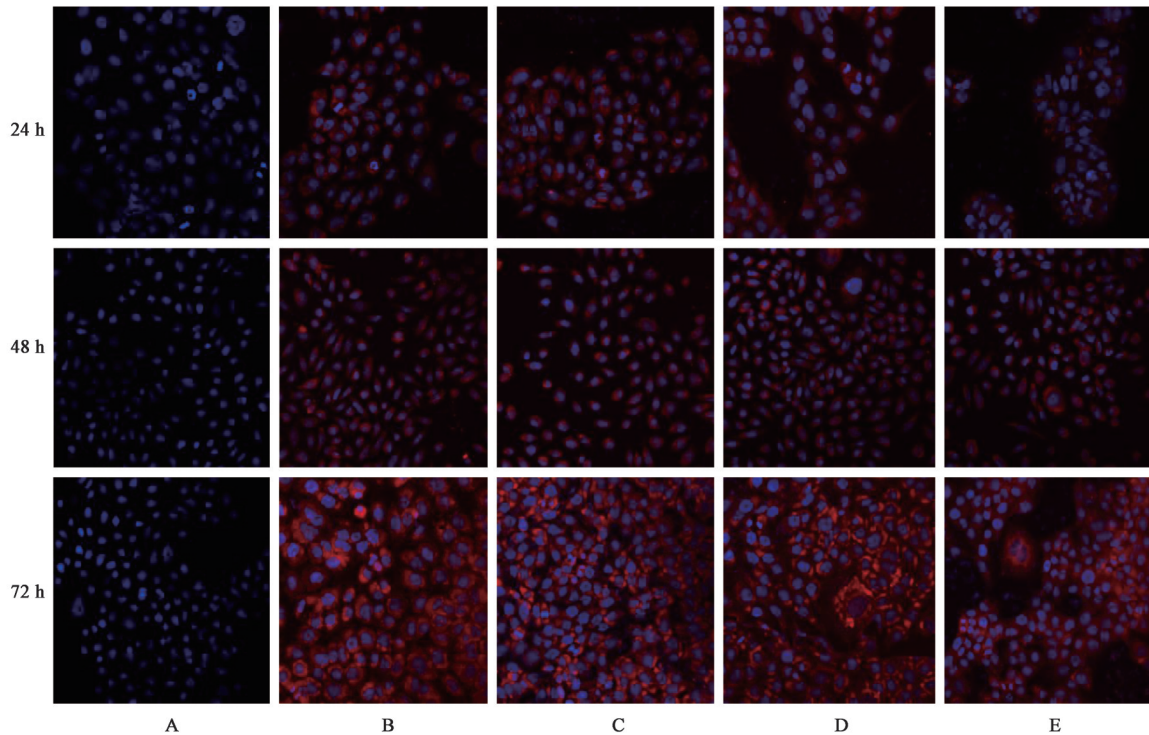
A. NCI-N87; B. NCI-N87-Exo

图 2 Western blot 鉴定 NCI-N87-Exo

Fig. 2 Identification of NCI-N87 cell Exo by Western blot

3.2 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞摄取 NCI-N87-Exo 的影响 将 NCI-N87-Exo 与 HMrSV5 细胞共培养 24, 48, 72 h, 激光共聚焦观察显示, 与空白组比较, 模型组 HMrSV5 细胞内可见大量红色荧光标记, IA 明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$),

与时间呈正相关; 与模型组比较, 半夏泻心汤低、中、高剂量含药血清组在不同时间点红色荧光均减弱, IA 下降, 其中以半夏泻心汤中、高剂量组含药血清最为明显 ($P < 0.05, P < 0.01$), 呈剂量-效应关系。见图 3, 表 1。



A. 空白组; B. 模型组; C~E. 半夏泻心汤低、中、高剂量组(图 4~6 同)

图 3 HMrSV5 细胞对 NCI-N87-Exo 的摄取 (DAPI 染色, $\times 400$)

Fig. 3 NCI-N87-Exo is taken up by HMrSV5 cells (DAPI staining, $\times 400$)

表 1 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞摄取 NCI-N87-Exo 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of Banxia Xiexintang containing serum on the uptake of NCI-N87-Exo by HMrSV5 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IA		
		24 h	48 h	72 h
模型		7 682.49 \pm 295.74 ¹⁾	8 386.38 \pm 91.11 ¹⁾	8 527.52 \pm 368.80 ¹⁾
半夏泻心汤	13.5	7 557.43 \pm 192.39	8 210.85 \pm 627.87	8 054.70 \pm 350.57
	27	7 570.14 \pm 562.13	7 424.38 \pm 83.80 ²⁾	7 329.83 \pm 695.08 ²⁾
	54	6 950.61 \pm 188.83 ²⁾	6 870.65 \pm 136.97 ³⁾	6 684.96 \pm 484.85 ³⁾

注: 设空白组 IA 为 0; 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05, ^{3)}$ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.3 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞形态学的影响 各组 HMrSV5 细胞处理 72 h, 空白组 HMrSV5 细胞呈现出多边形和鹅卵石外观, 结构紧密; 模型组 HMrSV5 细胞形态不规则, 排列松散, 大多呈长梭形, 细胞间隙明显增宽, 有的长出多个触角; 与模型组比较, 半夏泻心汤含药血清干预后 HMrSV5 细胞呈团状生长, 排列较为紧密, 细胞间隙明显缩小, 其中以半夏泻心汤含药血清高剂量组最

为明显。见图 4。

3.4 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞中 E-cadherin, CK19, α -SMA 及 Elastin 蛋白表达的影响 HMrSV5 细胞处理 72 h, 与空白组比较, 模型组 HMrSV5 细胞中 E-cadherin, CK19 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), α -SMA, Elastin 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 半夏泻心汤中、高剂量组 HMrSV5 细胞中 E-cadherin, CK19 蛋白表达均显著

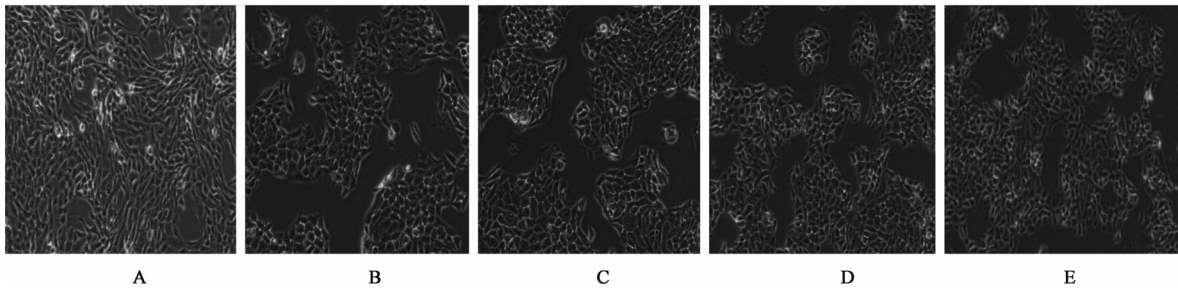


图 4 HMrSV5 细胞摄取 NCI-N87-Exo 后细胞形态学的变化(倒置显微镜, ×100)

Fig. 4 Changes in cell morphology of HMrSV5 cells after taking NCI-N87-Exo (inverted optical microscope, ×100)

升高 ($P < 0.01$), α -SMA, Elastin 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 5, 表 2。

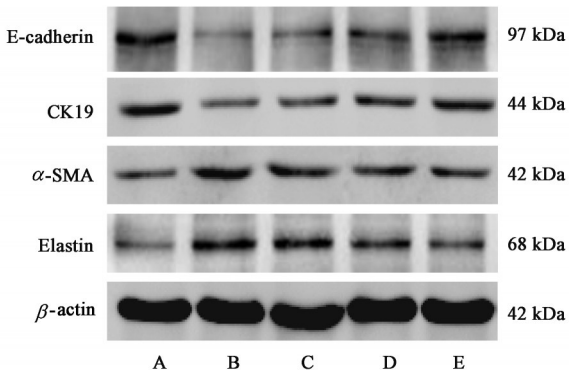


图 5 HMrSV5 细胞中 E-cadherin, CK19, α -SMA 及 Elastin 蛋白表达电泳

Fig. 5 Expression of E-cadherin, CK19, α -SMA and Elastin protein in HMrSV5 cells

3.5 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞 TGF- β_1 , Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达的影响 HMrSV5

细胞处理 72 h 后, 与正常组比较, 模型组 TGF- β_1 , p-Smad2/3 蛋白表达显著增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), Smad2/3 蛋白无明显变化。与模型组比较, 半夏泻心汤各剂量组 TGF- β_1 , p-Smad2/3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 呈剂量-效应关系。见图 6, 表 3。

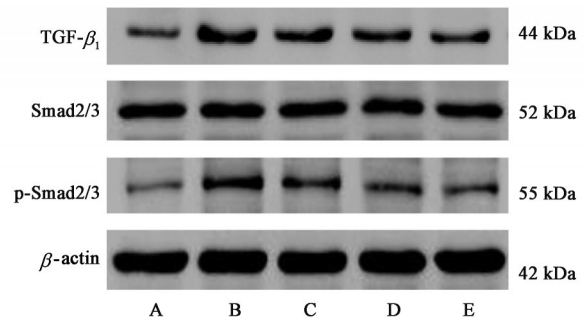


图 6 HMrSV5 细胞中 TGF- β_1 , Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达电泳

Fig. 6 TGF- β_1 , Smad2/3 and p-Smad2/3 protein expression in HMrSV5 cells

表 2 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞 E-cadherin, CK19, α -SMA 及 Elastin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	E-cadherin/ β -actin	CK19/ β -actin	α -SMA/ β -actin	Elastin/ β -actin
空白		37.66±1.45	39.35±1.63	20.51±1.36	15.07±1.10
模型		13.57±0.63 ¹⁾	18.03±0.96 ¹⁾	40.93±1.32 ¹⁾	37.00±1.45 ¹⁾
半夏泻心汤	13.5	17.67±1.64 ²⁾	18.91±1.32	33.80±1.26 ³⁾	31.68±1.45 ³⁾
	27	19.55±1.55 ³⁾	25.68±0.98 ³⁾	26.99±1.34 ³⁾	24.78±1.26 ³⁾
	54	30.63±1.12 ³⁾	32.93±1.56 ³⁾	24.02±0.98 ³⁾	18.84±0.31 ³⁾

表 3 半夏泻心汤含药血清对 HMrSV5 细胞中 TGF- β_1 , Smad2/3 及 p-Smad2/3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β_1 / β -actin	Smad2/3	p-Smad2/3
空白		20.36±2.34	60.86±5.26	15.68±2.48
模型		48.65±1.45 ¹⁾	58.12±2.68	47.59±3.53 ¹⁾
半夏泻心汤	13.5	40.07±3.61 ²⁾	61.23±4.36	32.70±2.12 ³⁾
	27	34.09±1.35 ³⁾	57.01±2.35	26.72±1.63 ³⁾
	54	27.80±2.36 ³⁾	55.60±2.45	21.10±2.89 ³⁾

4 讨论

胃癌腹膜转移是一个多阶段、多因素参与的复杂病理过程,虽然其机制目前尚未完全阐明,但“种子-土壤”学说得到广泛认可。而作为“种子”的胃癌细胞只有在适宜的“土壤”中才能种植生长。腹膜组织是胃癌细胞种植的关键“土壤”,作为腹腔的保护屏障,正常腹膜可抵御肿瘤细胞侵袭^[15]。腹膜间皮细胞是一种特殊的扁平上皮细胞,覆盖于腹膜的表面,其结构及表型的完整是腹膜抵御胃癌细胞侵袭转移关键^[16]。

腹膜间皮细胞EMT降低了腹膜抵御胃癌细胞的侵袭能力,有利于胃癌细胞的定植、生长,形成腹腔转移结节,是胃癌腹膜转移的病理基础^[17]。本课题组前期研究已证实,将腹膜间皮细胞与胃癌细胞上清液共培养,会引起腹膜间皮细胞损伤,损伤后的腹膜间皮细胞间骨架及排列稀松,呈纤维样变化,具有EMT现象^[4]。众多研究表明,胃癌细胞或其上清液与腹膜间皮细胞直接接触,均可导致腹膜间皮细胞发生EMT^[18-19],发生EMT的腹膜间皮细胞又可反作用于胃癌细胞,增强了胃癌细胞的转移活性^[20]。

目前,虽已证实胃癌细胞及其上清液能够引起腹膜间皮细胞EMT,然而这是基于胃癌细胞与腹膜间皮细胞黏附的前提下,腹膜间皮细胞发生EMT。有研究认为胃癌细胞在黏附到腹膜间皮细胞之前,腹膜间皮细胞的细胞表型已经发生了改变^[9]。肿瘤细胞来源的外泌体被认为是改良“土壤”的前驱部队,其向腹膜间皮细胞传递并被摄取是腹膜间皮细胞EMT重要机制之一,对可重塑转移前微环境具有重要意义^[9]。TGF- β_1 /Smads是调控细胞EMT的关键通路^[21]。研究表明,胃癌组织和腹腔冲洗液来源的TGF- β_1 可促进胃癌细胞的腹膜转移^[22]。Smad2, Smad3是TGF- β_1 下游关键信号分子。TGF- β_1 通过 β 整合素信号传导途径,促进Smad2, Smad3磷酸化(p-Smad2, p-Smad3)形成Smads复合物转移至细胞核,调控细胞核内TGF- β 靶基因的转录^[23],进而激活多种核转录因子,引起E-cadherin和CK等间质表型分子标志物表达下调和 α -SMA和Elastin等间质表型分子标志物表达上调,从而实现细胞由上皮细胞向间质细胞表型的转化。

胃癌转移属已病之“传舍”范畴。《黄帝内经·灵枢·百病始生》谓:“留而不去,传舍于胃肠之外,募原之间,留著于脉,稽留而不去,息而成积。”脾胃升降失调是胃癌腹膜转移的核心病机,寒热搏结是其

病理演化特征^[24],据此,课题组提出将“辛开苦降”法作为防治胃癌腹膜转移的思路与方法^[25]。半夏泻心汤为辛开苦降法的代表方剂,方中半夏、干姜辛开以化痰散结;黄连、黄芩苦降以清解癌毒;人参、大枣、甘草甘补健脾补虚。全方辛开、苦降、甘补配伍,兼顾虚实,共奏健脾补虚、化痰散结、清解癌毒之功。近年来研究发现,半夏泻心汤能有效预防胃癌根治术后肿瘤复发转移^[26],其含药血清可保护胃癌上清液对腹膜间皮细胞的损伤,抑制人胃癌腹膜高转移潜能细胞的增殖及侵袭转移^[4-5]。

本研究发现半夏泻心汤含药血清能够抑制正常人HMrSV5细胞对NCI-N87-Exo的摄取,进而减弱NCI-N87-Exo向正常人HMrSV5细胞的传递。经半夏泻心汤含药血清干预后HMrSV5细胞呈团状生长,排列较为紧密,细胞间隙明显缩小。Western blot检测结果显示,经半夏泻心汤含药血清干预后HMrSV5细胞E-cadherin和CK19表达显著上调, α -SMA和Elastin表达明显下调,表明半夏泻心汤含药血清可抑制NCI-N87-Exo诱导的腹膜间皮细胞EMT。同时发现半夏泻心汤含药血清可下调TGF- β_1 , p-Smad2/3蛋白表达,表明半夏泻心汤含药血清对胃癌来源外泌体诱发腹膜间皮细胞EMT的影响可能与调控TGF- β_1 及其下游信号分子Smad2, Smad3的磷酸化有关。

本研究从胃癌Exo诱导腹膜间皮细胞EMT途径揭示了半夏泻心汤防治胃癌腹膜转移的机制,为临床应用提供了重要的科学依据。至于胃癌Exo诱导腹膜间皮细胞EMT的相关通路、靶点及半夏泻心汤的干预作用有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] RIIHIMÄKI M, HEMMINKI A, SUNDQUIST K, et al. Metastatic spread in patients with gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 52307-52316.
- [2] 代海军. 半夏泻心汤加减联合SOX方案化疗治疗晚期胃癌临床观察[J]. *光明中医*, 2020, 35(15): 2376-2378.
- [3] 崔国宁, 刘喜平, 陈嘉慧, 等. 半夏泻心汤联合IL-12转染骨髓间充质干细胞对胃癌荷瘤裸鼠抑瘤作用研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(1): 39-44.
- [4] 王璟, 刘喜平, 李沛清, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境诱导腹膜间皮HMrSV5细胞损伤的保护作用[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(11): 2566-2568.

- [5] 刘喜平, 李沛清, 明海霞, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌腹膜转移细胞系 GC9811-P 增殖及侵袭转移的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10): 1224-1228.
- [6] JIN G, SU Y, DONG Q, et al. Arctigenin alleviates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and PAI-1 expression via AMPK/NF-kappaB pathway in peritoneal mesothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 520(2): 413-419.
- [7] 张炜, 刘喜平, 明海霞, 等. 半夏泻心汤含药血清对胃癌微环境诱导腹膜间皮 HMrSV5 细胞凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3735-3738.
- [8] LI Q, LI B, LI Q, et al. Exosomal miR-21-5p derived from gastric cancer promotes peritoneal metastasis via mesothelial-to-mesenchymal transition[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 854-871.
- [9] SUN Z, XU H M, ZHAO Z Z, et al. Induction of apoptosis in human peritoneal mesothelial cells by gastric cancer cell supernatant promotes peritoneal carcinomatosis[J]. Tumour Biol, 2014, 35(8): 8301-8307.
- [10] YAN Y, FU G, YE Y, et al. Exosomes participate in the carcinogenesis and the malignant behavior of gastric cancer[J]. Scand J Gastroenterol, 2017, 52(5): 499-504.
- [11] DENG G, QU J, ZHANG Y, et al. Gastric cancer-derived exosomes promote peritoneal metastasis by destroying the mesothelial barrier[J]. FEBS Lett, 2017, 591(14): 2167-2179.
- [12] 李冀, 连建伟. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社出版, 2016, 69-71.
- [13] 国锦, 高燕, 赵瀚年. 中药复方血清药理学研究方法进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1656-1658.
- [14] 崔国宁, 刘喜平, 李沛清, 等. 半夏泻心汤调控 Shh 信号通路对 BMSCs 外泌体诱导的人胃癌细胞 BGC-823 增殖的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(8): 77-82.
- [15] 刘九洋, 李雁. 乳斑与腹膜转移癌的相关性研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(6): 618-621.
- [16] KENNY H A, KRAUSZ T, YAMADA S D, et al. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum[J]. Int J Cancer, 2010, 121(7): 1463-1472.
- [17] SHINBO T, FUSHIDA S, TSUKADA T, et al. Protein-bound polysaccharide K suppresses tumor fibrosis in gastric cancer by inhibiting the TGF-beta signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 33(2): 553-558.
- [18] 杨显金, 杜江, 张旭, 等. 胃癌细胞上清液对腹膜间皮细胞的作用[J]. 肿瘤, 2016, 36(4): 380-387.
- [19] WU P, WANG J, MAO X, et al. PDCD4 regulates apoptosis in human peritoneal mesothelial cells and promotes gastric cancer peritoneal metastasis[J]. Histol Histopathol, 2021, 36(4): 447-457.
- [20] TSUKADA T, FUSHIDA S, HARADA S, et al. The role of human peritoneal mesothelial cells in the fibrosis and progression of gastric cancer[J]. Int J Oncol, 2012, 41(2): 476-482.
- [21] GU J, QIAN H, SHEN L, et al. Gastric cancer exosomes trigger differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts through TGF-beta/Smad pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52465.
- [22] YU X, SONG H, XIA T, et al. Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer[J]. Gene, 2013, 532(1): 87-93.
- [23] COLAK S, TEN D P. Targeting TGF-beta Signaling in Cancer[J]. Trends Cancer, 2017, 3(1): 56-71.
- [24] 张成晶, 朱许丽, 张颖慧, 等. 基于寒热错杂病机中医药在胃癌各阶段防治中的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(4): 510-512.
- [25] 刘喜平, 李沛清, 张炜. 中医药防治胃癌腹膜转移的思路与方法[J]. 中医杂志, 2012, 53(4): 288-290.
- [26] 张君儒, 姚玮. 加味四逆泻心汤对胃癌根治术后患者的疗效观察[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2014, 23(1): 57-59.

[责任编辑 张丰丰]