

健脾益气方含药血清通过 Caspase-3/Vimentin 促进人肝癌 MHCC-97H 细胞凋亡

卓少元^{*}, 谢金玲

(广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200)

[摘要] **目的:**观察健脾益气方含药血清对人 MHCC-97H 肝癌细胞凋亡的影响,探讨凋亡过程中波形蛋白(Vimentin)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的变化及其意义。**方法:**采用血清药理学方法,并结合 Vimentin 裂解剂和 Caspase 抑制剂,观察 7.5%,15%,30% 体积浓度健脾益气方含药血清干预对肝癌细胞增殖、侵袭、凋亡,及 Vimentin,Caspase-3,聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP-1)蛋白表达的影响。**结果:**健脾益气方中、高剂量含药血清均可以降低 MHCC-97H 肝癌细胞中 Vimentin 蛋白表达($P < 0.01$),其下调程度与肝癌细胞的增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率趋势一致;Vimentin 裂解组细胞增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率在各组中均最高;Caspase 抑制组细胞的增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率在各组中均最低。与空白血清组比较,健脾益气方中、高剂量组,Vimentin 裂解组 Caspase-3 蛋白表达上调($P < 0.01$),Vimentin,PARP-1 蛋白表达下调($P < 0.01$),且 PARP-1 蛋白出现了裂解片段;Caspase 抑制组 Caspase-3 表达下调($P < 0.01$),Vimentin,PARP-1 蛋白表达无统计学差异,PARP-1 无蛋白裂解片段出现。**结论:**15% 的健脾益气方含药血清对人肝癌细胞 MHCC-97H 的干预效果最佳,可能通过 Caspase-3 下调细胞中 Vimentin 蛋白表达,抑制肝癌细胞的增殖与侵袭;同时可能利用 Caspase-3/Vimentin 形成的正反馈促凋亡信号诱导肝癌细胞发生凋亡。

[关键词] 健脾益气方;MHCC-97H 肝癌细胞;波形蛋白;半胱氨酸蛋白酶-3;凋亡;聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0161-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240161

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0945.042.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:45

Effect of Serum Containing Jianpi Yiqi Decoction on MHCC-97H Cell Apoptosis Via Caspase-3/Vimentin

ZHUO Shao-yuan^{*}, XIE Jin-ling

(School of Basic Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of serum containing Jianpi Yiqi decoction (JYD) on MHCC-97H cell apoptosis, and the changes in Vimentin and Caspase-3 in the process of apoptosis and the significance. **Method:** By using the serologic pharmacological method, Vimentin breaker and Caspase inhibitor were adopted to observe the effect of serum containing Jianpi Yiqi decoction at concentrations of 7.5%, 15% and 30% on proliferation, invasion and apoptosis of liver tumor cells, and protein expressions of Vimentin, Caspase-3 and poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). **Result:** Compared with the blank serum group, decreased protein expression of Vimentin and PARP-1 ($P < 0.01$), and increased protein expression of Caspase-3 were observed in Jianpi Yiqi decoction groups (with concentrations of 15% and 30%) and Vimentin-breaker group. The down-regulation degree of Vimentin and PARP-1 were consistent with the proliferation inhibition rate, invasion inhibition rate and apoptosis rate of MHCC-97H cells. The proliferation and invasion inhibition rates and apoptosis rate of the Vimentin-breaker group cells were the highest among all experimental groups. However, the Caspase-

[收稿日期] 20160322(014)

[基金项目] 广西壮族自治区自然科学基金青年项目(2014GXNSFBA118145)

[通讯作者] ^{*}卓少元,博士,副教授,从事肝癌的中医药防治研究,Tel:0771-4733794,E-mail:sherwin_zhuo@126.com

inhibitor group showed the lowest proliferation and invasion inhibition rates, and apoptosis rate among all experimental groups. Compared with the blank serum group, medium and high-dose JYD group and Caspase-inhibitor group showed up-regulation of Caspase-3 protein expression ($P < 0.01$), down-regulation in Vimentin and PARP-1 expressions ($P < 0.01$), and fragments in PARP-1 protein, the Caspase-inhibitor group showed down-regulation in Caspase-3 expression ($P < 0.01$), with no statistically significant difference in Vimentin and PARP-1 protein expressions. **Conclusion:** The expression of Vimentin in MHCC-97H cells was down-regulated by serum containing Jianpi Yiqi decoction, especially at the concentration of 15%. Jianpi Yiqi decoction may inhibit liver cancer cell proliferation and invasive by down-regulating Vimentin via Caspase-3, while inducing liver cancer cell apoptosis by using positive feedback apoptosis-promoting apoptosis signal formed by Caspase-3/Vimentin.

[Key words] Jianpi Yiqi decoction; MHCC-97H cell; Vimentin; Caspase-3; apoptosis; poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是临床常见难治的恶性肿瘤,在各种恶性肿瘤中发病占第 3 位,死亡第 2 位^[1]。由于肝癌的发病十分隐匿,病情发展、变化快,就诊时往往已进入中晚期,手术切除仍是目前临床肝癌首选的治疗方式,但术后的高复发率和转移率是制约肝癌患者生存率的瓶颈^[2]。临床实践证明,中医在辨证论治肝癌方面有着独特的优势和疗效,已成为我国肝癌治疗的主要手段之一。中医认为脾虚是肝癌的基本病机之一,“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”,在肝癌的诊治中当重视健脾。健脾益气方是本课题组对临床中医药防治肝癌文献分析^[3]后归纳总结出来的抑癌扶正行气活血法(分为健脾益气法、清热解毒法与活血化瘀法)中的一种,以黄芪为君,白术、茯苓为臣,白芍、半夏、薏仁、神曲为佐,意在补益正气、健脾祛湿、散结消痞,主要对应临床肝癌脾气虚弱的基本证型^[4],具有延长二乙基亚硝胺(DEN)所致肝癌模型大鼠生存率,降低肝细胞炎性坏死和肝癌组织癌基因表达^[5-6],及抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖与侵袭^[7]等作用。课题组前期研究发现健脾益气方能够诱导培养的人肝癌细胞凋亡,并证实波形蛋白(Vimentin)是健脾益气方防治 DEN 肝癌模型大鼠的核心靶点之一^[8]。Vimentin 与细胞凋亡的关系非常密切,一些抗肿瘤药物在表达 Vimentin 的肿瘤细胞中能够通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)裂解 Vimentin 诱发明显的促凋亡反应^[9]。健脾益气方是否通过 Caspase/Vimentin 促进诱导肝癌细胞凋亡,尚未见文献报道。因此,本实验利用具有高转移潜能的人肝癌 MHCC-97H 细胞株,观察健脾益气方干预对肝癌细胞增殖、侵袭、凋亡,及细胞凋亡相关分子 Vimentin, Caspase-3, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP-1)蛋白表达的影响,深入探讨健

脾益气方防治肝癌的作用机制,以期健脾类方药进一步开发应用提供基础研究支持。

1 材料

1.1 动物和细胞 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体重(200 ± 20)g,购自广西医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(桂)2009-0002。人肝癌 MHCC-97H 细胞株,购自复旦大学中山医院肝癌研究所。

1.2 药物和试剂 健脾益气方由白术 10 g,薏苡仁 15 g,黄芪 30 g,白芍 15 g,神曲 10 g,茯苓 15 g,法半夏 10 g 组成,采用免煎中药(每一单味中药为纯中药浓缩颗粒,根据免煎中药单味剂量与煎煮药单味剂量等效配比制备,成分与煎煮药成分一致,由江阴天江药业有限公司提供),购于广西中医药大学附属瑞康医院。高糖 DMEM 培养基,胰蛋白酶(Trypsin),胎牛血清(FBS),AnnexinV-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(美国 Wisent 公司,批号分别为 319-006-CL, 325-043-EL, 086-110, A211-01);四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒(美国 Vazyme 公司,批号 A312-01);二甲基亚砜(DMSO,美国 Sigma 公司,批号 D8372-100);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号 354234);Z-VAD-FMK(美国 Selleck 公司,批号 S7023),Withaferin A(WFA,美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-200381),均用 DMSO 溶解,配成 1 mmol·L⁻¹ 储备液,于 -80 °C 保存;小鼠抗人 Vimentin(V9),小鼠抗人 Caspase-3,小鼠抗人 PARP-1 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-6260, sc-7272, sc-8007);兔抗人 β-actin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 13E5);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 和山羊抗兔 IgG(美国 Vazyme 公司,批号分别为 Ab201-01, Ab203-01);总蛋白提取试剂盒(美国 Vazyme 公司,批号 E211-01);BCA 蛋

白定量试剂盒(美国 Vazyme 公司,批号 E112-01)。

1.3 仪器 MCO-18AIC 型 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司);Sorvall ST16R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Epoch 型酶标仪(美国 Biotek 公司),LSR Fortessa 型流式细胞分析仪(美国 Becton Dickinson 公司),Mini-PROTEAN Tetra Cell 型垂直电泳槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 将 SD 大鼠随机分为含药血清组和空白血清组,每组各 15 只。其中含药血清组给予健脾益气方(10.5 g·kg⁻¹)灌胃,参照公式:给药剂量 = 临床常用量 × 动物等剂量系数,空白血清组除给予生理盐水灌胃。每日给药 2 次,连续 3 d,于末次给药后 1 h 采血,严格无菌操作,腹主动脉采血,静置 2 h 以上,3 000 r·min⁻¹离心 15 min 无菌分离血清,血清以 55 °C 灭活 30 min,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,置 -80 °C 保存备用。

2.2 细胞培养及分组处理 人肝癌细胞株 MHCC-97H,于 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度条件下,以含 10% 胎牛血清,1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基培养。取对数生长期的细胞,胰酶消化,计数,调整细胞密度为 4 × 10⁴ 个/mL,以每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,细胞分组:培养液组、空白血清组、健脾 L 组、健脾 M 组、健脾 H 组、Vim 裂解组和 Casp 抑制组。其中,培养液组加入培养液,继续培养 24 h;空白血清组加入空白血清,培养 24 h;健脾 L, M, H 组分别加入用不含胎牛血清的培养液调至 7.5%, 15%, 30% 体积浓度的健脾益气方含药血清,培养 24 h;Vim 裂解组参照文献[10]用含终浓度为 10 μmol·L⁻¹WFA 的培养液,培养细胞 4 h;Casp 抑制组加入含终浓度为 10 μmol·L⁻¹Z-VAD-FMK 的培养液,培养 24 h。

2.3 MTT 法检测细胞增殖能力 待 96 孔板中的细胞贴壁后,吸去培养孔中的培养液,根据分组分别加入相应血清进行干预 48 h。设置调零孔(无细胞)、对照孔(培养基不加药,有细胞)、实验孔(不同浓度的健脾益气方含药血清及相对应的空白血清干预),每组设定 5 个复孔。每孔加入 5 g·L⁻¹MTT 溶液 10 μL,孵育 4 h,小心吸弃上清,各加入 DMSO 100 μL。采用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔细胞吸光度 A。按照公式计算各组细胞的增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = [1 - (A_{\text{实验组}}/A_{\text{培养液组}})] \times 100\%$$

2.4 transwell 体外侵袭实验检测细胞侵袭能力 采用铺有基质胶的 transwell 的小室进行实验。已用无血清高糖 DMEM 饥饿培养 20 h 的 MHCC-97H 细胞消化、计数,调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/mL,离心弃上清液,分别用 0.1% BSA 100 μL 的培养液配制的各组别药物重悬细胞,加入 transwell 上室中,下室加入 10% 胎牛血清培养液 600 μL,每组设 3 个复孔。培养箱孵育 24 h 后,取出 transwell 板,移去培养液,PBS 清洗小室 2 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,无水甲醛透化 20 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,用棉签轻轻拭去没有侵袭的细胞及基质胶,封片,倒置显微镜下随机取 5 个视野观察、拍照并计数穿过小室的细胞数。

$$\text{侵袭抑制率} = [1 - (\text{侵袭细胞数}_{\text{实验组}}/\text{侵袭细胞数}_{\text{培养液组}})] \times 100\%$$

2.5 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡 细胞培养及干预方法同 2.3 项,用不含 EDTA 的胰酶消化各组细胞,4 °C,300 r·min⁻¹离心 5 min 收集细胞;用预冷的 PBS 洗涤后收集细胞,加入 1 × Binding Buffer 100 μL 重悬,再加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI Staining Solution 5 μL,混匀,避光,室温反应 10 min,补加 1 × Binding Buffer 400 μL,混匀,尼龙筛网(200 目)过滤,1 h 内用流式细胞仪检测。

$$\text{细胞凋亡率} = (\text{凋亡细胞数}/\text{观察细胞总数}) \times 100\%$$

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞 Vimentin, Caspase-3 蛋白表达 细胞培养及干预方法同 2.3 项,收集各实验组细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,加入冷裂解液 500 μL,混匀,4 °C 振荡 15 ~ 20 min;4 °C,16 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清,BCA 法测定蛋白的浓度。进行电泳,转膜,室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液封闭 1 h,分别加入一抗 β-actin (1:1 000), Caspase-3 (1:300), Vimentin (1:300),4 °C 孵育过夜;加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:12 000)或 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:10 000),室温孵育 1 h。ECL 法化学发光,X-光片曝光显影定影,胶片扫描,采用 NIH Image J 软件进行定量分析,以 β-actin 为内参,结果以目的条带/内参条带来表示。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,除细胞增殖抑制率、侵袭率和凋亡率外,所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较符合正态分布的数据采用单因素方差分析检验,若为非正态分布则采用 Mann-Whitney U 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞增殖、侵袭的影响 与空白血清组比较,健脾 L, M, H 组均可以抑制人肝癌细胞 MHCC-97H 的增殖、侵袭 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中以健脾 M 组效果最佳,健脾 M 组对 MHCC-97H 细胞的增殖抑制率和侵袭抑制率分

别为 8.64%, 74.85%。Casp 抑制组细胞增殖和侵袭数均高于空白血清组 ($P < 0.05, P < 0.01$),其细胞的增殖抑制率和侵袭抑制率在各实验组中均为最低值; Vim 裂解组细胞增殖 A, 细胞侵袭数均低于空白血清组 ($P < 0.01$),且其细胞的增殖抑制率和侵袭抑制率在各实验组中均为最高值。见表 1。

表 1 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞增殖和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of serum containing Jianpi Yiqi decoction on proliferation and invasion of MHCC-97H cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度	增殖		侵袭	
		A	增殖抑制率/%	细胞侵袭数	侵袭抑制率/%
培养液	-	0.721 ± 0.005	/	430.7 ± 10.1	/
空白血清	10% 空白血清	0.705 ± 0.010 ¹⁾	2.26	305.3 ± 12.2 ¹⁾	29.10
健脾 L	7.5% 健脾益气方含药血清	0.680 ± 0.004 ^{1,4)}	5.69	252.0 ± 22.3 ^{1,4)}	41.49
健脾 M	15% 健脾益气方含药血清	0.659 ± 0.006 ^{1,4)}	8.64	108.3 ± 4.7 ^{1,4)}	74.85
健脾 H	30% 健脾益气方含药血清	0.692 ± 0.006 ^{1,3)}	3.98	236.0 ± 8.0 ^{1,4)}	45.20
Vim 裂解	10 μmol·L ⁻¹ WFA	0.316 ± 0.002 ^{1,4)}	56.13	9.7 ± 0.6 ^{1,4)}	97.75
Casp 抑制	10 μmol·L ⁻¹ Z-VAD-FMK	0.717 ± 0.002 ³⁾	0.60	408.0 ± 8.0 ^{2,4)}	5.26

注:与培养液组比较¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$;与空白血清组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞凋亡的影响 7.5%, 15%, 30% 健脾益气方含药血清干预人肝癌细胞 MHCC-97H 48 h 后,早期细胞凋亡率分别为 22.40%, 29.17%, 23.07%,其中健脾 M 组与空白血清组比较凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与空白血清组比较,Casp 抑制组细胞的凋亡率在各实验组中为最低值 ($P < 0.05$), Vim 裂解组细胞的凋亡率在各实验组中为最高值 ($P < 0.01$)。见表 2。

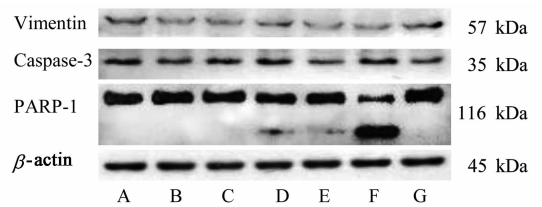
白的表达,上调 Caspase-3 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。健脾 M, H 组和 Vim 裂解组中 PARP-1 均存在一定程度的裂解,且裂解程度与细胞凋亡率正相关。但 Casp 抑制组与空白血清组比较,Vimentin 和 PARP-1 蛋白的表达差异均不具有统计学意义,Caspase-3 蛋白表达下调 ($P < 0.01$),PARP-1 蛋白不存在裂解现象。见表 3,图 1。

表 2 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of serum containing Jianpi Yiqi decoction on proliferation and invasion of MHCC-97H cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	早期细胞凋亡率/%
培养液	-	17.83 ± 2.02 ⁴⁾
空白血清	10% 空白血清	20.90 ± 0.87 ²⁾
健脾 L	7.5% 健脾益气方含药血清	22.40 ± 1.35 ¹⁾
健脾 M	15% 健脾益气方含药血清	29.17 ± 1.52 ^{1,4)}
健脾 H	30% 健脾益气方含药血清	23.07 ± 1.92 ¹⁾
Vim 裂解	10 μmol·L ⁻¹ WFA	53.93 ± 2.05 ^{1,4)}
Casp 抑制	10 μmol·L ⁻¹ Z-VAD-FMK	17.50 ± 0.70 ³⁾

3.3 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞 Vimentin, Caspase-3, PARP-1 蛋白表达的影响 与空白血清组比较,健脾 L 组可以上调 Vimentin, Caspase-3, PARP-1 蛋白的表达 ($P < 0.01$);健脾 M, H 组和 Vim 裂解组均可下调 Vimentin 和 PARP-1 蛋



A. 培养液组; B. 空白血清组; C. 健脾 L 组; D. 健脾 M 组; E. 健脾 H 组; F. Vim 裂解组; G. Casp 抑制组

图 1 各组 MHCC-97H 细胞 Vimentin, Caspase-3, PARP-1 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expressions of Vimentin, Caspase-3 and PARP-1 in MHCC-97H cells

4 讨论

Vimentin 是一种重要的中间纤维蛋白,广泛表达于各种正常的间质细胞及中胚层来源的细胞中,其一端与核膜相连,另一端与细胞表面处的桥粒或半桥粒相连,将细胞核和细胞器维持在特定的空间;可以通过组装成纤维和解聚为非纤维性颗粒参与细胞内的信号调节。已证实 Vimentin 在众多上皮来源的恶性肿瘤组织或癌细胞株中(包括肝癌、胰腺

表 3 健脾益气方含药血清对 MHCC-97H 细胞 Vimentin, Caspase-3, PARP-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of serum containing Jianpi Yiqi decoction on protein expressions of Vimentin, Caspase-3 and PARP-1 in MHCC-97H cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	Vimentin/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	PARP-1/ β -actin
培养液	-	0.403 \pm 0.009	0.424 \pm 0.016	1.300 \pm 0.008
空白血清	10% 空白血清	0.414 \pm 0.011	0.432 \pm 0.009	1.605 \pm 0.033 ¹⁾
健脾 L	7.5% 健脾益气方含药血清	0.438 \pm 0.004 ^{1,2)}	0.547 \pm 0.006 ^{1,2)}	1.648 \pm 0.014 ^{1,2)}
健脾 M	15% 健脾益气方含药血清	0.378 \pm 0.011 ^{1,2)}	0.602 \pm 0.013 ^{1,2)}	1.445 \pm 0.024 ^{1,2)}
健脾 H	30% 健脾益气方含药血清	0.344 \pm 0.014 ^{1,2)}	0.492 \pm 0.015 ^{1,2)}	1.454 \pm 0.010 ^{1,2)}
Vim 裂解	10 μ mol·L ⁻¹ WFA	0.322 \pm 0.011 ^{1,2)}	0.599 \pm 0.012 ^{1,2)}	0.727 \pm 0.007 ^{1,2)}
Casp 抑制	10 μ mol·L ⁻¹ Z-VAD-FMK	0.422 \pm 0.008 ¹⁾	0.360 \pm 0.012 ^{1,2)}	1.592 \pm 0.007 ¹⁾

注:与培养液组比较¹⁾ $P < 0.01$;与空白血清组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

癌和结肠癌等消化道肿瘤,及前列腺癌、乳腺癌、中枢神经系统肿瘤、恶性黑色素瘤和肺癌等)过度表达,并作为一种重要的信号分子和转录因子,参与肿瘤细胞的快速生长、浸润和转移^[11]。

大量研究表明,Vimentin 与肿瘤细胞的凋亡密切相关。在细胞凋亡过程中,Vimentin 蛋白裂解成不同大小的裂解片段。如 Hashimoto 等^[12]在由紫外线照射人上皮肿瘤细胞引发细胞凋亡的研究中,发现 Vimentin 裂解成 3 个大小不同的片段。Morishima^[13]分别用抗死亡因子(Fas)抗体,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和星形孢菌素处理人的白血病细胞(Jurkat 细胞),裂解产物都产生一致的 4 个大小不同的裂解片段。Belichenko 等^[14]用 Pc4-PDT 处理的 Jurkat 细胞,得到了一致的结果。Lahat 等^[9]和 Byun 等^[15]研究均表明,细胞凋亡相关蛋白酶 Caspase 参与了对 Vimentin 的裂解,而且 Vimentin 裂解片段又进一步促进了 Caspase 凋亡途径,从而形成了一个由 Caspase/Vimentin 构成的正反馈促凋亡信号。Hsu 等^[16]采用过度表达的肽基精氨酸脱亚胺酶 2 (PADI2)裂解 Vimentin,同样成功诱导 Jurkat 细胞形成了 Caspase/Vimentin 正反馈促凋亡信号。

本实验结果表明,健脾益气方含药血清低剂量不能降低 Vimentin 蛋白表达,中、高剂量均可以降低 MHCC-97H 肝癌细胞中 Vimentin 蛋白表达量,其下调程度与肝癌细胞的增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率趋势一致;且 Vim 裂解组细胞的增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率在各组中均为最高值;Casp 抑制组细胞的增殖抑制率、侵袭抑制率和凋亡率在各实验组中均为最低值。提示健脾益气方中剂量可明显降低肝癌细胞的侵袭能力,并诱导部分肝癌细胞凋亡,其原因与 Vimentin 下调和 Caspase 上调

有关。

与空白血清组比较,健脾益气方含药血清健脾中、高剂量组,Vim 裂解组 Caspase-3 蛋白表达量上调,Vimentin 和 PARP-1 蛋白表达下调,且 PARP-1 蛋白出现了裂解片段;Casp 抑制组 Caspase-3 表达下调,PARP-1 表达上调。实验中课题组没有观察到 Vimentin 蛋白裂解片段(Vim 裂解组也没有观察到,可能与实验使用的 Vimentin 抗体有关),但却在细胞凋亡率最高的健脾中、高剂量组和 Vim 裂解组中均观察到了 PARP-1 的裂解。Vimentin 裂解是细胞凋亡早期的一个事件,几乎与 PARP 的裂解同时发生。该研究结果进一步提示健脾益气方可能通过凋亡蛋白酶 Caspase-3 裂解 Vimentin,并利用 Caspase-3/Vimentin 形成的正反馈促凋亡信号诱导部分肝癌细胞发生凋亡。

综上所述,健脾益气方含药血清中、高剂量可能通过下调人肝癌细胞 MHCC-97H 中 Vimentin 蛋白的表达,抑制肝癌细胞的增殖与侵袭、并促进肝癌细胞凋亡;它可能通过凋亡蛋白酶 Caspase-3 裂解 Vimentin 使其蛋白水平下调,并通过 Caspase-3/Vimentin 形成的正反馈促凋亡信号诱导部分肝癌细胞发生凋亡。

[参考文献]

[1] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2016,25(1):1-8.

[2] 汤钊猷. 关于肝癌治疗的策略[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(4):337-339.

[3] 陈德溯,方肇勤. 中药治疗原发性肝癌中晚期的药味频率分析[J]. 辽宁中医杂志,2002,29(4):187-189.

[4] 方肇勤. 分子生物学技术在中医药研究中的应用[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:7-8.

[5] 方肇勤,管冬元,梁尚华. 清热活血健脾中药对大鼠肝癌基因转录差异的调整[J]. 世界华人消化杂志,

- 2003,11(3):276-280.
- [6] 管冬元,方肇勤. 清热、活血、健脾等不同中医治法对癌基因 ras 转录调节的实验研究[J]. 中医药通报, 2004,3(4):44-47.
- [7] 谢金玲,卓少元. 健脾益气方含药血清对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖与侵袭能力的影响[J]. 广西中医药,2016,39(1):62-65.
- [8] 卓少元,方肇勤,管冬元,等. 健脾益气法对 DEN 大鼠肝癌后基因组转录调控的生物信息学分析[J]. 时珍国医国药,2014,25(7):1765-1768.
- [9] Lahat G,Zhu Q S,Huang K L,et al. Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from *in vitro* and *in vivo* mice xenograft studies[J]. PLoS One, 2010, 5(4):e10105.
- [10] Bargagna-Mohan P,Hamza A,Kim Y E,et al. The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin a targets the intermediate filament protein vimentin[J]. Chem Biol, 2007,14(6):623-634.
- [11] Satelli A,Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. Cell Mol Life Sci,2011,68(18):3033-3046.
- [12] Hashimoto M, Inoue S, Ogawa S, et al. Rapid fragmentation of vimentin in human skin fibroblasts exposed to tamoxifen;a possible involvement of Caspase-3 [J]. Biochem Biophys Res Commun,1998,247(2):401-406.
- [13] Morishima N. Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action[J]. Genes Cells,1999,4(7):401-414.
- [14] Belichenko I, Morishima N, Separovic D. Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in Jurkat cells[J]. Arch Biochem Biophys,2001,390(1):57-63.
- [15] Byun Y, Chen F, Chang R, et al. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis[J]. Cell Death Differ,2001,8(5):443-450.
- [16] Hsu P C,Liao Y F,Lin C L,et al. Vimentin is involved in peptidylarginine deiminase 2-induced apoptosis of activated Jurkat cells [J]. Mol Cells, 2014, 37(5):426-434.

[责任编辑 张丰丰]