

# 波形蛋白与肝细胞癌的关系及健脾益气方的干预作用

王超<sup>1,2</sup>, 音金萍<sup>1</sup>, 蒋筱<sup>1</sup>, 卓少元<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200;

2. 广西中医药大学广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530200)

**[摘要]** 目的:研究波形蛋白(Vimentin)与肝细胞癌(HCC)的关系及健脾益气方通过 Vimentin 调控肝癌的分子机制。方法:利用基于肿瘤基因组图谱计划(TCGA)和临床蛋白质组肿瘤分析协作组(CPTAC)数据库在线分析平台、STRING 数据库及 Cytoscape 软件分析 Vimentin 与肝细胞癌的关系。随机将 SD 大鼠分为正常组、模型组、健脾益气方低、中、高剂量组(5.25、10.5、21 g·kg<sup>-1</sup>)、信号转导蛋白及转录激活子 3(STAT3)抑制组(C188-9, 4.5 mg·kg<sup>-1</sup>)和糖蛋白 130(gp130)抑制组(SC144, 4.5 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只。除正常组外,其余各组大鼠按照 70 mg·kg<sup>-1</sup>体质量腹腔注射二乙基亚硝胺(DEN)复制肝癌模型。造模成功后,正常组和模型组大鼠生理盐水灌胃,健脾益气方低、中、高剂量组分别给予对应剂量中药灌胃,2 个抑制组分别腹腔注射对应抑制剂,每日 1 次,连续 4 周。末次处置后,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测大鼠肝组织中 Vimentin mRNA 水平;比色法检测肝组织胱天蛋白酶-3(Caspase-3)酶活性;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中 Rho 相关含卷曲螺旋蛋白激酶 1(ROCK1)、Rho 相关含卷曲螺旋蛋白激酶 2(ROCK2)、aurora 激酶 B(AURKB)、锌指蛋白 148(ZNF148 或者 ZBP-89)、STAT3、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、总 Vimentin、磷酸化 Vimentin(p-Vimentin)及肝组织细胞核中 Vimentin 蛋白含量;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清中 Vimentin 的含量。结果:VIM mRNA 在肝癌患者不同病理分期(I~IV 期)、不同病理分级(G<sub>1</sub>~G<sub>3</sub>级)、无区域淋巴结转移患者(N0)和肝癌不同亚型患者组织中表达水平均显著升高(P<0.01);Vimentin 蛋白水平在肝癌组织中显著降低(P<0.01);VIM 基因有 4 处突变可以导致 Vimentin 蛋白一级结构的改变,这些遗传突变可降低患者无病生存期(P<0.01);VIM mRNA 的表达水平与 HCC 纯度呈负相关(P<0.01),而与微环境中肿瘤相关成纤维细胞、M2 型巨噬细胞和髓系树突状细胞等的浸润水平呈正相关(P<0.01)。关联分析结果显示 Vimentin 与 STAT3 在 HCC 患者肝癌组织中的表达存在一定相关性(P<0.01)。动物实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝组织中 VIM mRNA、总 Vimentin、p-Vimentin 和核 Vimentin 蛋白水平、血清中分泌型 Vimentin 水平、肝组织中 ROCK2、AURKB、STAT3 和 p-STAT3 蛋白水平均显著上调(P<0.01);负调控分子 ZBP-89 蛋白水平显著降低(P<0.01);Caspase-3 酶活性升高、ROCK1 蛋白表达水平增加,但是差异无统计学意义。STAT3 抑制剂和 gp130 抑制剂及中、高剂量健脾益气方均可显著降低大鼠血清中分泌型 Vimentin 水平,肝组织中总 Vimentin、p-Vimentin 和核 Vimentin 蛋白水平,及 STAT3/Vimentin 信号通路主要相关分子 STAT3、p-STAT3、ROCK2、AURKB 的蛋白水平,上调负调控分子 ZBP-89 蛋白水平和 Caspase-3 酶活性(P<0.05, P<0.01),且中剂量或高剂量健脾益气方对 VIM mRNA 水平、STAT3 蛋白、ZBP-89 蛋白、ROCK2 蛋白和 AURKB 蛋白水平, Caspase-3 酶活性的干预结果,与 STAT3 抑制剂比较差异均不具有统计学意义。结论:Vimentin 是肝癌组织中一种重要的炎症分子,其表达、细胞定位和功能可能受肿瘤相关成纤维细胞、M2 型巨噬细胞和髓系树突状细胞浸润水平,以及白细胞介素(IL)-6/STAT3 信号通路、特别是 STAT3 分子的影响;而健脾益气方可能通过干预 STAT3/Vimentin 信号通路调控 Vimentin 而防治肝癌。

**[关键词]** 健脾益气方;波形蛋白(Vimentin);信号转导蛋白及转录激活子 3(STAT3);生物信息学;肝细胞癌

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0123-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221614 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221013.1152.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-10-13 15:17:18

**[收稿日期]** 2022-05-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区科学基金项目(81860824);广西中医药大学“桂派杏林拔尖人才”项目(2022C004);广西中医药大学 2018 年博士科研启动基金项目(04B1803616)

**[第一作者]** 王超,博士,主管技师,从事肝癌的中医药防治研究,E-mail:wangc@gxtcmu.edu.cn

**[通信作者]** \*卓少元,教授,博士,硕士生导师,从事肝癌的中医药防治研究,E-mail:sherwin\_zhuo@126.com

## Correlation Between Vimentin and Hepatocellular Carcinoma and Intervention Effect of Jianpi Yiqi Prescription

WANG Chao<sup>1,2</sup>, YIN Jinping<sup>1</sup>, JIANG Xiao<sup>1</sup>, ZHUO Shaoyuan<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Basic Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine for Treating High-incidence Infectious Diseases with Integrative Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the correlation between Vimentin and hepatocellular carcinoma (HCC) and the mechanism of Jianpi Yiqi prescription against HCC through Vimentin. **Method:** Correlation between Vimentin and HCC was analyzed based on the cancer genome atlas (TCGA), clinical proteomic tumor analysis consortium (CPTAC), STRING, and Cytoscape. SD rats were randomized into normal group (normal saline, *ig*, once/day, 4 weeks), model group (normal saline, *ig*, once/day, 4 weeks), low-dose, medium-dose, and high-dose (5.25, 10.5, 21 g·kg<sup>-1</sup>, *ig*, once/day, 4 weeks) Jianpi Yiqi prescription groups, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) inhibition group (C188-9, 4.5 mg·kg<sup>-1</sup>, *ip*, once/day, 4 weeks), and glycoprotein 130 (gp130) inhibition group (SC144, 4.5 mg·kg<sup>-1</sup>, *ip*, once/day, 4 weeks), 10 rats in each group. Diethylnitrosamine (DEN, 70 mg·kg<sup>-1</sup> body weight, *ip*) was injected in rats except the normal group to induce HCC. After the modeling, administration began. After last administration, Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was performed to determine Vimentin mRNA level in rat liver tissue. Caspase-3 activity in liver tissue was detected by colorimetry, and expression of Rho kinase (ROCK)1, ROCK2, aurora kinase B (AURKB), Zinc-finger protein 148 (ZNF148)/zinc-binding protein-89 (ZBP-89), STAT3, p-STAT3, total Vimentin, and phosphorylated (p)-Vimentin in liver tissue and Vimentin in liver tissue nucleus detected by Western blot. Serum Vimentin concentration was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Vimentin mRNA level was high in tissues from HCC patients with different cancer stages (stage I - IV), different pathological grades (G<sub>1</sub>-G<sub>3</sub>), no regional lymph node metastasis (N0), and different subtypes ( $P < 0.01$ ). Vimentin mRNA expression was higher in tissues from patients with lymph node metastasis than in patients without lymph node metastasis and normal samples. Vimentin protein level was decreased in HCC tissues ( $P < 0.01$ ). Vimentin gene has 4 mutations which can induce change in the primary structure of Vimentin protein and patients with Vimentin gene mutation had short disease free survival time ( $P < 0.01$ ). The mRNA expression of Vimentin was negatively associated with HCC cell purity ( $P < 0.01$ ) but was positively associated with the infiltration levels of cancer-associated fibroblasts, M2 macrophages, myeloid dendritic cell and other immune cells in tumor microenvironment ( $P < 0.01$ ). Association analysis results showed that the expression of Vimentin was correlated with the STAT3 expression in HCC tissues ( $P < 0.01$ ). As for the animal experiment, Vimentin mRNA level and protein levels of total Vimentin and p-Vimentin in liver tissue, Vimentin protein level in liver tissue nucleus, Vimentin in rat serum, ROCK2, AURKB, STAT3 and p-STAT3 in liver tissues were up-regulated ( $P < 0.01$ ) and protein level of negative regulator ZBP-89 was reduced in the model group ( $P < 0.01$ ) compared with those in the normal group. Activity of Caspase-3 in liver tissue increased and the ROCK1 protein level was increased in the model group compared with those in the normal group. STAT3 inhibitor, gp130 inhibitor, and medium-dose and high-dose Jianpi Yiqi prescription all can reduce the secretory Vimentin protein in serum, protein levels of total Vimentin and p-Vimentin in liver tissues, and Vimentin in liver tissue nucleus, and the protein levels of STAT3/Vimentin signaling pathway-related molecules, such as STAT3, p-STAT3,

ROCK2, and AURKB and up-regulate the protein level of negative regulator ZBP-89 and activity of Caspase-3 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Effect of medium-dose or high-dose Jianpi Yiqi prescription on Vimentin mRNA expression, STAT3 protein expression, ZBP-89 protein expression, ROCK2 protein expression, AURKB protein expression and Caspase-3 activity was not significantly different from that of STAT3 inhibitor. **Conclusion:** Vimentin, an important inflammatory molecule, is closely related to the occurrence and development of HCC and its expression, subcellular location and function may be affected by cancer-associated fibroblasts, M2 macrophages, myeloid dendritic cell, and IL-6/STAT3 signaling pathway, particularly by STAT3 molecule. Jianpi Yiqi prescription may exert therapeutic effect on HCC via regulating Vimentin through the STAT3/Vimentin signaling pathway.

**[Keywords]** Jianpi Yiqi prescription; Vimentin; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); bioinformatics; hepatocellular carcinoma

肝癌是全球最常见恶性肿瘤之一,发病率居第5位,死亡率高居第2位<sup>[1]</sup>。早期肝癌隐匿性强,发展快,恶性程度高,预后较差;而合并中医中药治疗是我国临床防治肝癌的重要补充<sup>[2-3]</sup>。临床实践表明,健脾类方药能显著改善肝癌相关症状、增强患者机体免疫力、提高生活质量、延长生存期<sup>[4-5]</sup>。健脾益气方是本课题组根据肝癌临床中医药防治经验和文献分析总结归纳而来,前期研究证实临床上具有补益正气、健脾祛湿、散结消痞之功的健脾益气方对肝癌有良好的治疗作用,其对肝癌微环境中众多炎症相关分子如信号转导蛋白及转录激活子3 (STAT3)、波形蛋白(Vimentin)、白细胞介素-6 (IL-6)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)等<sup>[6-10]</sup>均有明显调控作用,特别 Vimentin 是其关键干预靶点之一<sup>[7-8,11]</sup>。研究表明 STAT3 是 Vimentin 上游的重要调控分子,其对 Vimentin 的 mRNA 水平、蛋白水平和磷酸化水平均有直接或间接上调作用<sup>[8,12-17]</sup>,但这种调控是否在肝癌组织中存在以及健脾益气方能否通过 STAT3/Vimentin 信号通路防治肝癌仍不明确。因此本研究利用生物信息学探索 Vimentin 与 HCC 的关系,分析 Vimentin 与其上游调控分子 STAT3 在 HCC 中的相关性;并利用 DEN 诱导肝癌模型大鼠,以 C188-9(STAT3 抑制剂)和 SC144[糖蛋白 130(gp130)抑制剂]的干预为对照,研究肝癌组织中 STAT3 对 Vimentin 的调控作用,探讨健脾益气方防治肝癌的分子机制。

## 1 材料

**1.1 实验动物** SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量(200±20) g,购自湖南斯莱克景达公司,动物生产合格证编号为 43004700040127,动物使用合格证号为 SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养于 25 °C,明暗交替 12 h,均自由摄食饮水。本研究动物实验均符合广

西中医药大学动物伦理委员会标准(审查证书编号 DW20210328-049)。

**1.2 药物和试剂** 健脾益气方组成为黄芪 30 g(批号 20210201)、白术 10 g(批号 20201204)、薏苡仁 15 g(批号 20210201)、白芍 15 g(批号 20201202)、神曲 10 g(批号 202102109)、云苓 15 g(批号 20210401)、法半夏 10 g(批号 20210502),以上饮片均购于广西中医药大学第一附属医院中药房,经广西中医药大学中药鉴定教研室田慧教授鉴定质量合格。二乙基亚硝胺(DEN,美国 Sigma 公司,批号 049K1613); C188-9 和 SC144(美国 MedChemExpress 生物科技公司,批号分别为 #31595、#17412);兔源 STAT3 多克隆抗体,兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体,兔源 Vimentin 多克隆抗体,山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(武汉三鹰生物技术公司,批号分别为 00081195、00060976、00086320、20000003);兔源磷酸化(p)-Vimentin 多克隆抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR40293-11);兔源 ZBP89 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 AC07172356);兔源 aurora 激酶 B(AURKB)、Rho 相关含卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)1、ROCK2 多克隆抗体(北京索莱宝生物技术有限公司,批号分别为 20200413、20200413、20200408);Caspase-3 活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号 062619200429);RNA-easy Isolation Reagent、SYBR 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix、RT Super Mix for Real-time PCR(南京诺唯赞生物技术股份有限公司,批号分别为 7E360K9、7E342F9、7E352K9);Rat Vimentin 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号#39462)。

**1.3 仪器** Epoch Biotek 型全波长酶标仪(美国

Biotek公司); Sorvall ST 16R型高速离心机(美国 Thermo Fisher公司); DYCZ-40D型转印电泳仪和 DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一生物技术有限公司); DMI3000B研究型倒置显微镜(德国 Leica公司); Light cycler 96型 Real-time PCR仪(美国罗氏公司); ChemiDoc MP全能型成像分析系统(美国 Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 Vimentin在人类肝癌组织中表达情况及与HCC患者分期/分级的关系** 登录GEPIA2网站(gepia2.cancer-pku.cn/),“gene A”选择“VIM”、“Datasets selection”选择“LIHC”、“Matched Normal data”选择“Match TCGA normal and GTEx data”,分析Vimentin在肝细胞癌中的表达情况。登录UALCAN数据库(<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>),选择“TCGA”,分析Vimentin在HCC患者肝癌组织、不同病理分期/分级、不同淋巴结转移状态,及不同亚型中mRNA表达水平;选择“CPTAC”分析Vimentin在肝癌中的蛋白表达水平。以上数据库检索时间为2022年4月。

**2.2 Vimentin mRNA高表达/低表达及Vimentin基因遗传变异与HCC患者总体生存期、无病生存期的关系** 登录GEPIA 2数据库,选择“Single Gene Analysis”“Survival Analysis”,检索“VIM”,分析Vimentin mRNA高表达/低表达对HCC患者总体生存期和无病生存期的影响。登录cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)数据库,选择“Liver Hepatocellular Carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)”,检索“VIM”,查看“Mutations”,绘制Vimentin变异情况对人类肝癌患者总体生存期、DFS生存曲线的影响。以上数据库检索时间为2022年4月。

**2.3 Vimentin与HCC患者肿瘤微环境不同免疫细胞浸润水平的关联分析** 利用TIMER 2.0数据库分析Vimentin与HCC患者肿瘤微环境不同免疫细胞浸润水平的关联性。选择“Immune”“Gene”,检索“VIM”,选择6种不同的免疫细胞类型,包括肿瘤相关成纤维细胞(Cancer associated fibroblast)、M1型巨噬细胞(Macrophage M1)、M2型巨噬细胞(Macrophage M2)、调节性T细胞(Treg)、髓系树突状细胞(Myeloid dendritic cell)和髓系来源抑制细胞(MDSC)。以上数据库检索时间为2022年4月。

**2.4 Vimentin与STAT3在HCC患者肝癌组织的关联分析** 采用STRING数据库([https://www.string-](https://www.string-db.org/)

[db.org/](https://www.string-db.org/))构建与Vimentin相互作用的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络。检索关键词“Vimentin”,选择物种为“Homo sapiens”,其他设定为系统默认参数;用Cytoscape 3.9.0软件将该PPI网络图进行可视化展示。采用GEPIA 2数据库([gepia2.cancer-pku.cn/](http://gepia2.cancer-pku.cn/))进行Vimentin与STAT3在肝癌组织中的关联分析。以上数据库检索时间为2022年4月。

**2.5 健脾益气方灌胃药液的制备** 按照处方称取健脾益气方7味药,加10倍量水浸泡1 h后(按 $L \cdot kg^{-1}$ 计算,下同),煎煮1.5 h;过滤,滤渣用8倍水煎煮1 h,过滤;合并2次滤液,浓缩为质量浓度 $1 g \cdot mL^{-1}$ (按照生药量计), $4^{\circ}C$ 保存备用。

**2.6 动物分组及处理** 70只大鼠适用性喂养1周后,随机分为正常组(10只)和造模组(60只);造模组大鼠按照 $70 mg \cdot kg^{-1}$ 体质量腹腔注射DEN复制肝癌模型<sup>[9,18]</sup>,正常组大鼠给予腹腔注射同比例的生理盐水。每周1次,连续10周。当造模后大鼠肝脏组织出现病理学形态改变及相关指标显著变化时,表明肝癌模型复制成功<sup>[9-10]</sup>。将造模成功的大鼠随机分成6组:模型组、健脾益气方低、中、高剂量组、STAT3抑制组和gp130抑制组,每组10只。各组大鼠自造模开始后的第16周末进行药物干预,正常组和模型组大鼠按照 $10.5 g \cdot kg^{-1}$ 采用生理盐水灌胃,健脾益气方低、中、高剂量组分别按照成人用药量的3、6、12倍,即 $5.25、10.5、21.0 g \cdot kg^{-1}$ 健脾益气方药液灌胃<sup>[9-10,19]</sup>,STAT3抑制组和gp130抑制组按照 $4.5 mg \cdot kg^{-1}$ 分别腹腔注射C188-9和SC144抑制剂<sup>[9]</sup>,每日1次,连续4周。末次处理后各组大鼠禁食禁水12 h,腹腔注射3%戊巴比妥麻醉,腹主动脉取血;血液静置4 h, $4^{\circ}C$ 离心(转速 $3 000 r \cdot min^{-1}$ ,时间15 min,半径16.8 cm),吸取上层血清, $-80^{\circ}C$ 备用;取肝脏组织,一部分保存在4%多聚甲醛固定液中,剩余部分放置在 $-80^{\circ}C$ 备用。在动物造模过程中,各组会有不同数量的大鼠死亡,每组最后平均有5~6只大鼠存活,而后续各项指标检测均随机选择3只大鼠进行实验研究。

**2.7 大鼠肝组织中总Vimentin mRNA表达水平检测** 采用Real-time PCR进行检测。取 $-80^{\circ}C$ 保存的各组大鼠肝脏组织10 mg,加入RNA-easy RNA提取试剂,用组织匀浆器破碎组织,按照试剂盒说明书操作进行RNA的提取,用Nanodrop ONE检测RNA的浓度和纯度, $-80^{\circ}C$ 保存用于后续实验;取定量后的RNA,根据反转录试剂盒操作进行去除残留基因组污染及反转录;反转录得到的cDNA稀释

10倍后按照SYBR PCR试剂盒进行操作,反应程序为95℃预变性30 s;95℃变性5 s,60℃延伸30 s,进行45个循环反应;95℃15 s,60℃60 s,95℃15 s绘制溶解曲线。以GAPDH为内参,实验重复3次,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示相对表达量。Vimentin基因引物序列:上游5'-ATGTCGCCAGCAGTATCA-3',下游5'-CCAC TTCGCAGGTGAGTGA-3',PCR产物长度为180 bp;GAPDH基因引物序列:上游5'-AGTTCAACGGCACAGTCAAGGC-3',下游5'-CGACAT ACTCAGCACCGCATCAC-3',PCR产物长度为123 bp。

**2.8 大鼠肝组织中Caspase-3酶活性的检测** 采用分光光度法进行检测。取-80℃保存的各组大鼠肝脏组织10 mg,加入裂解液,用组织匀浆器破碎组织,冰上充分裂解,4℃离心(转速16 000 r·min<sup>-1</sup>,时间15 min,半径10 cm),收集上清;Bradford法检测样本蛋白的浓度,并将所有样本稀释到同一浓度;按照Caspase-3酶活性检测试剂盒操作说明书进行,使用酶标仪在405 nm波长下测量各组的吸光度A,并计算各组样本中Caspase-3的酶活性。

**2.9 大鼠肝组织中STAT3、p-STAT3、ZBP-89、ROCK1、ROCK2、AURKB、总Vimentin、核Vimentin、p-Vimentin及分泌型Vimentin蛋白表达水平检测** 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测组织中各蛋白水平,核Vimentin采用核蛋白提取试剂盒提取细胞核蛋白后,再用Western blot进行检测。取-80℃保存的各组大鼠肝脏组织20 mg,加入RIRA裂解液(含蛋白磷酸酶抑制剂,质量分数为1%),用组织匀浆器破碎组织,冰上充分裂解,4℃离心(转速12 000 r·min<sup>-1</sup>,时间5 min,半径10 cm),收集上清;BCA法检测蛋白浓度,将各组蛋白样本稀释到同一浓度,加入5倍蛋白上样缓冲液,混匀,100℃,干浴5 min将蛋白变性;将变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭液室温封闭20 min;分别加入稀释的GAPDH(1:5 000)、STAT3(1:2 000)、p-STAT3(1:2 000)、ZBP-89(1:1 000)、ROCK1(1:1 000)、ROCK2(1:1 000)、AURKB(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、p-Vimentin(1:2 000)一抗,4℃孵育过夜;用TBST缓冲液洗膜3次,加入稀释二抗(1:5 000),孵育1 h;用TBST缓冲液洗膜3次,加入ECL发光显影液,经全自动凝胶成像系统成像。采用Image J软件采集灰度值,计算各蛋白相对表达量。

采用ELISA检测血清分泌型Vimentin水平。

取-80℃保存的各组大鼠血清,严格按照试剂盒说明书进行操作,设置空白对照、阴性对照和阳性对照及复孔,酶标仪测各孔吸光度 $A_{450}$ ,根据标准曲线计算各组大鼠血清中分泌型Vimentin水平。

**2.10 统计学方法** 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,实验计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据呈正态分布,多组间均数比较用单因素方差分析,方差齐组间数据两两比较用最小显著性差异法(LSD),方差不齐用Dunnett's法,非正态分布的资料采用Kruskal-Wallis秩和检验比较组间差异,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 VIM mRNA/蛋白在HCC患者肝癌组织的表达情况及与病理分期分级的关系** GEPIA2数据库显示,与正常组织(160例)比较,Vimentin mRNA在HCC患者(369例)中表达水平显著升高( $P<0.01$ )。见增强出版附加材料。

UALCAN数据库显示,与正常组织(50例)相比,Vimentin mRNA在HCC患者(371例)、患者不同病理分期<sup>[20]</sup>(I期168例、II期84例、III期82例、IV期6例)、不同病理分级<sup>[21]</sup>(G<sub>1</sub>级54例、G<sub>2</sub>级173例、G<sub>3</sub>级118例),无区域淋巴结转移患者(N<sub>0</sub>,252例)肝癌组织中的表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与正常组织比较,Vimentin mRNA在各种肝癌亚型患者(肝细胞癌361例、纤维层状肝细胞癌3例、混合型肝胆管细胞癌亚型7例)肿瘤组织中的表达水平也显著升高( $P<0.01$ );其中与混合型肝胆管细胞癌相比,Vimentin mRNA在HCC患者肝癌组织中的表达水平显著降低( $P<0.01$ )。但肝癌患者不同病理分期、病理分级、淋巴结转移之间的差异没有统计学意义。且与正常组织(165例)相比,Vimentin的蛋白水平在肝癌组织(165例)中显著降低( $P<0.01$ )。见增强出版附加材料。

**3.2 Vimentin mRNA高表达/低表达及VIM基因遗传变异与HCC患者总体生存期、无病生存期的关系** Vimentin mRNA高表达/低表达对HCC患者总体生存期、无病生存期的影响差异无统计学意义,见图1。

Vimentin基因有4处突变可以导致Vimentin蛋白一级结构的改变,包括3个位点的错义突变(missense)和1个剪接位点突变(splice)。这些遗传突变对总体生存期的影响差异无统计学意义,但可导致HCC患者无病生存期更短(与Vimentin基因无突变HCC患者比较 $P<0.01$ )。见图2。

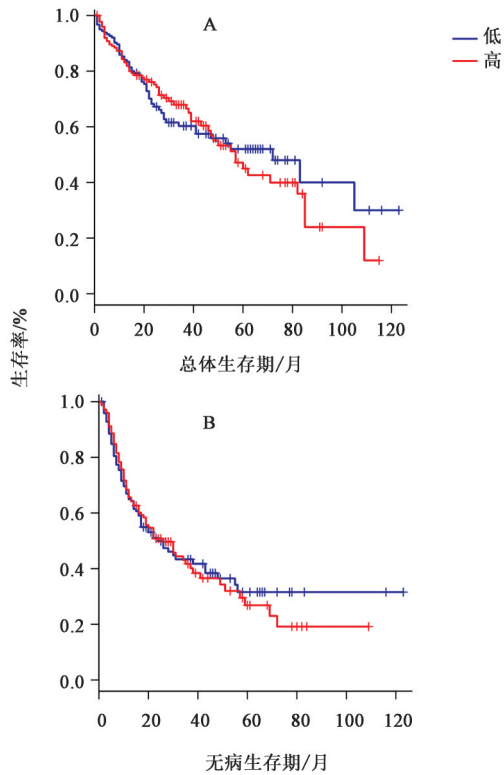


图1 VIM高表达/低表达对肝癌患者总体生存率(A)和无病生存率(B)的影响

Fig. 1 Effect of high/low VIM expression on overall survival time (A) and disease free survival time (B) curves of HCC patients

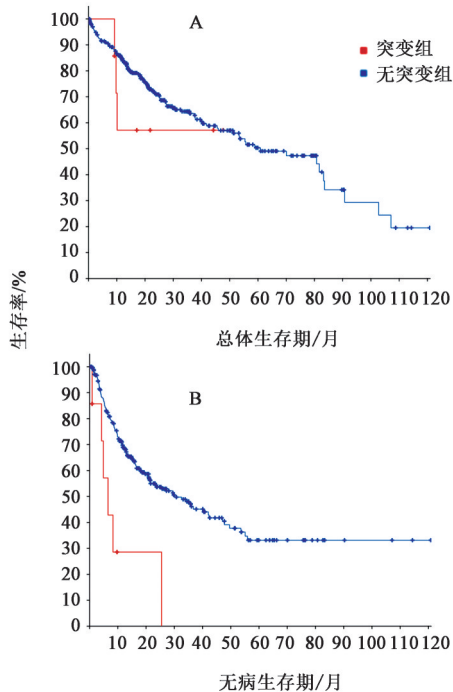


图2 Vimentin基因突变/无突变对肝癌患者总体生存率(A)和无病生存率(B)的影响

Fig. 2 Effect of Vimentin gene with mutation/without mutation on overall survival time (A) and disease free survival time (B) curves of HCC patients

**3.3 Vimentin与HCC肿瘤微环境中不同免疫细胞浸润水平的关联分析** Vimentin mRNA的表达水平与肝癌细胞纯度呈负相关( $Rho=-0.453, P<0.01$ ),而与微环境中的肿瘤相关成纤维细胞( $Rho=0.803$ )、M2型巨噬细胞( $Rho=0.633$ )、髓系树突状细胞( $Rho=0.604$ )、B细胞( $Rho=0.429$ )、调节性T细胞( $Rho=0.405$ )、M1型巨噬细胞( $Rho=0.39$ )和髓系来源抑制细胞( $Rho=0.134$ )的浸润水平均呈正相关( $P<0.01$ ),表明HCC肝癌组织中癌细胞的纯度越高,Vimentin mRNA的表达水平可能越低;而肝癌微环境中上述免疫细胞(特别是肿瘤相关成纤维细胞、M2型巨噬细胞和髓系树突状细胞)的浸润水平越高,其对应的Vimentin mRNA水平越高。见增强出版附加材料。

### 3.4 HCC患者肝癌组织中VIM与STAT3关联分析

STRING数据库显示Vimentin与HSP90AA1、Akt1、STAT3、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-7、AURKB等分子存在相互作用;特别STAT3、Caspase-3、AURKB均是STAT3/Vimentin通路中重要的信号分子。GEPIA 2数据库也显示Vimentin与STAT3在HCC患者肝癌组织中的表达存在一定正相关( $R=0.4, P<0.01$ )。见增强出版附加材料。

### 3.5 对大鼠肝脏组织中Vimentin mRNA表达水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中Vimentin mRNA表达水平显著上调( $P<0.01$ )。与模型组相比,健脾益气方低、中、高剂量组Vimentin mRNA表达水平均显著下调( $P<0.01$ );STAT3和gp130抑制组中Vimentin mRNA表达水平也显著下调( $P<0.01$ ),并且STAT3抑制组中Vimentin mRNA表达水平在各药物组中表达量最低,但其与健脾益气方高剂量组的差异无统计学意义。见表1。

### 3.6 对大鼠肝组织中Caspase-3酶活性的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中Caspase-3的酶活性升高,但是差异无统计学意义。与模型组比较,健脾益气方低、中、高剂量组及STAT3抑制组与gp130抑制组中Caspase-3的酶活性均明显升高( $P<0.05, P<0.01$ )。见表2。

### 3.7 对大鼠肝组织中STAT3、ROCK1、ROCK2、AURKB、ZBP-89、总Vimentin蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝组织中ROCK2、AURKB、p-STAT3、STAT3和Vimentin蛋白水平显著升高( $P<0.01$ );ROCK1蛋白表达量增加,但差异无统计学意义;ZBP-89蛋白水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,健脾益气方低、中、高剂量

表1 健脾益气方对各组大鼠肝组织中 Vimentin mRNA 相对表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of Jianpi Yiqi prescription on relative mRNA expression levels of Vimentin mRNA in liver tissue samples from rats of each experimental group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Vimentin
正常组	10.5	1.00±0.06
模型组	10.5	3.64±0.17 <sup>2)</sup>
健脾益气方低剂量组	5.25	3.05±0.14 <sup>4)</sup>
健脾益气方中剂量组	10.5	2.03±0.37 <sup>4)</sup>
健脾益气方高剂量组	21.0	2.01±0.07 <sup>4)</sup>
STAT3抑制组	0.004 5	1.86±0.07 <sup>4)</sup>
gp130抑制组	0.004 5	2.64±0.34 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表5同)

表2 健脾益气方对各组大鼠肝组织中 Caspase-3 酶活性的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Jianpi Yiqi prescription on enzyme activity of Caspase-3 in liver tissue samples from rats of each experimental group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Caspase-3 酶活性/U·mg <sup>-1</sup>
正常组	10.5	70.68±20.12
模型组	10.5	78.14±5.13
健脾益气方低剂量组	5.25	118.43±34.14 <sup>3)</sup>
健脾益气方中剂量组	10.5	165.51±34.22 <sup>4)</sup>
健脾益气方高剂量组	21.0	132.24±17.77 <sup>4)</sup>
STAT3抑制组	0.004 5	158.03±10.42 <sup>4)</sup>
gp130抑制组	0.004 5	114.94±19.14 <sup>3)</sup>

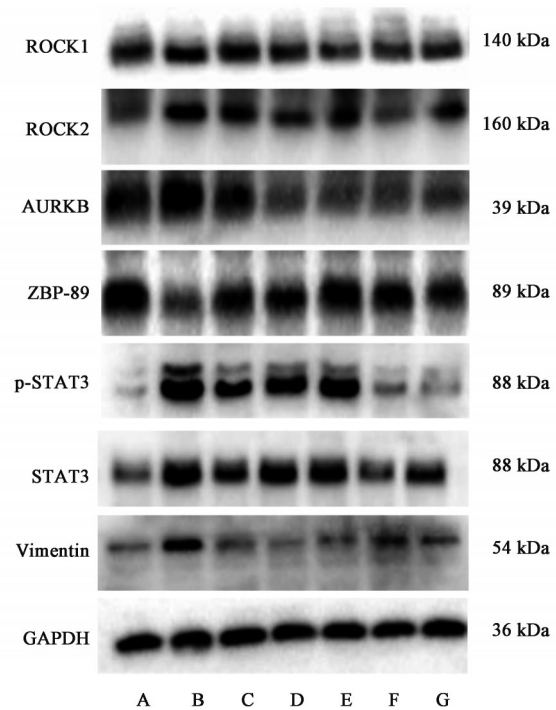
组,及STAT3抑制组和gp130抑制组中ROCK2、AURKB、p-STAT3、STAT3和Vimentin蛋白表达水平明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),ROCK1蛋白表达量下降,但差异无统计学意义;在各药物干预组中,

表3 健脾益气方对各组大鼠肝组织中 ROCK1、ROCK2、AURKB、ZBP-89、p-STAT3、STAT3、Vimentin 蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Jianpi Yiqi prescription on relative protein expression levels of ROCK1, ROCK2, AURKB, ZBP-89, p-STAT3, STAT3 and Vimentin in liver tissue samples from rats of each experimental group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ROCK1 /GAPDH	ROCK2 /GAPDH	AURKB /GAPDH	ZBP-89 /GAPDH	p-STAT3 /STAT3	STAT3 /GAPDH	Vimentin /GAPDH
正常组	10.5	0.84±0.10	0.59±0.05	0.87±0.02	0.98±0.10	0.30±0.01	0.56±0.05	0.20±0.01
模型组	10.5	0.88±0.06	0.76±0.10 <sup>2)</sup>	0.96±0.01 <sup>2)</sup>	0.48±0.15 <sup>2)</sup>	1.22±0.05 <sup>2)</sup>	1.00±0.06 <sup>2)</sup>	0.48±0.02 <sup>2)</sup>
健脾益气方低剂量组	5.25	0.81±0.03	0.64±0.06 <sup>3)</sup>	0.67±0.02 <sup>4)</sup>	0.83±0.08 <sup>4)</sup>	1.01±0.01 <sup>4)</sup>	0.75±0.02 <sup>4)</sup>	0.25±0.01 <sup>4)</sup>
健脾益气方中剂量组	10.5	0.83±0.08	0.61±0.05 <sup>3)</sup>	0.46±0.01 <sup>4)</sup>	0.84±0.03 <sup>4)</sup>	1.02±0.04 <sup>4)</sup>	0.89±0.06 <sup>3)</sup>	0.13±0.01 <sup>4)</sup>
健脾益气方高剂量组	21.0	0.78±0.11	0.65±0.07 <sup>3)</sup>	0.49±0.01 <sup>4)</sup>	1.04±0.08 <sup>4)</sup>	1.02±0.02 <sup>4)</sup>	0.79±0.03 <sup>4)</sup>	0.20±0.01 <sup>4)</sup>
STAT3抑制组	0.004 5	0.79±0.17	0.57±0.05 <sup>4)</sup>	0.51±0.02 <sup>4)</sup>	0.86±0.08 <sup>4)</sup>	0.63±0.04 <sup>4)</sup>	0.63±0.03 <sup>4)</sup>	0.20±0.02 <sup>4)</sup>
gp130抑制组	0.004 5	0.80±0.11	0.64±0.03 <sup>3)</sup>	0.48±0.01 <sup>4)</sup>	0.71±0.16 <sup>3)</sup>	0.48±0.02 <sup>4)</sup>	0.77±0.07 <sup>4)</sup>	0.20±0.04 <sup>4)</sup>

AURKB和Vimentin蛋白水平在健脾益气方中剂量组中表达量最低,ZBP-89蛋白在健脾益气方高剂量组中表达量最高。与STAT3抑制组比较,健脾益气方高剂量组AURKB、STAT3和Vimentin蛋白表达差异无统计学意义,健脾益气方中剂量组ROCK2和ZBP-89蛋白表达差异无统计学意义。见图3和表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.健脾益气方低剂量组;D.健脾益气方中剂量组;E.健脾益气方高剂量组;F.STAT3抑制组;G.gp130抑制组(图4同)

图3 各组大鼠肝组织中 ROCK1、ROCK2、AURKB、ZBP-89、p-STAT3、STAT3、Vimentin 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of ROCK1, ROCK2, AURKB, ZBP-89, p-STAT3, STAT3 and Vimentin in liver tissue samples from rats of each experimental group

**3.8 对大鼠肝组织中 STAT3、p-Vimentin、核 Vimentin 和血清分泌型 Vimentin 蛋白水平的影响**

与空白组比较,模型组大鼠肝组织中 p-Vimentin、核 Vimentin 蛋白含量均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,STAT3 抑制组与 gp130 抑制组中 p-Vimentin、核 Vimentin 蛋白含量均明显下降( $P<0.05, P<0.01$ );健脾益气方低、中、高剂量干预后核 Vimentin 蛋白含量显著下降( $P<0.01$ ),而 p-Vimentin 在健脾益气方中、高剂量组中蛋白含量显著下降( $P<0.01$ )。见图 4 和表 4。

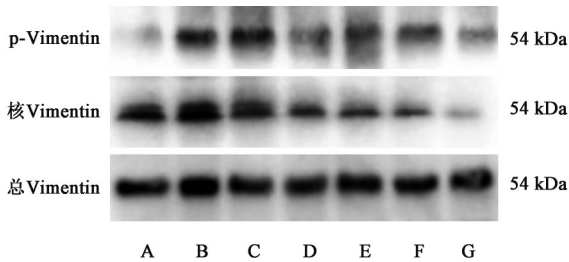


图 4 各组大鼠肝组织中 p-Vimentin 与核 Vimentin 蛋白电泳  
Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of p-Vimentin and Vimentin in nucleus in liver tissue samples from rats of each experimental group

表 4 健脾益气方对大鼠肝组织中 p-Vimentin 与核 Vimentin 蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Table 4 Effect of Jianpi Yiqi prescription on relative protein expression levels of p-Vimentin and Vimentin in nucleus in liver tissue samples from rats of each experimental group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-Vimentin /Vimentin	核 Vimentin /Vimentin
正常组	10.5	0.41±0.06	0.89±0.02
模型组	10.5	0.92±0.10 <sup>2)</sup>	1.10±0.02 <sup>2)</sup>
健脾益气方低剂量组	5.25	0.94±0.07	0.85±0.01 <sup>4)</sup>
健脾益气方中剂量组	10.5	0.58±0.10 <sup>4)</sup>	0.69±0.02 <sup>4)</sup>
健脾益气方高剂量组	21.0	0.56±0.17 <sup>4)</sup>	0.61±0.01 <sup>4)</sup>
STAT3 抑制组	0.004 5	0.72±0.06 <sup>3)</sup>	0.49±0.01 <sup>4)</sup>
gp130 抑制组	0.004 5	0.47±0.03 <sup>4)</sup>	0.20±0.01 <sup>4)</sup>

与正常组比较,模型组大鼠血清分泌型 Vimentin 水平显著增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,健脾益气方中、高剂量组、STAT3 抑制组和 gp130 抑制组血清 Vimentin 水平均显著下降( $P<0.01$ ),低剂量组血清 Vimentin 水平也有下降,但差异无统计学意义。与健脾益气方高剂量组比较,STAT3 抑制组血清 Vimentin 水平的差异无统计学意义。见表 5。

#### 4 讨论

现代医学认为肿瘤的发生发展与其微环境(TME)密切相关<sup>[22]</sup>。TME 是肿瘤细胞赖以生存的

表 5 健脾益气方对大鼠血清 Vimentin 含量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Table 5 Effect of Jianpi Yiqi prescription on protein content of Vimentin in serum samples from rats of each experimental group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Vimentin/μg·L <sup>-1</sup>
正常组	10.5	101.69±2.77
模型组	10.5	144.13±12.14 <sup>2)</sup>
健脾益气方低剂量组	5.25	130.56±3.51
健脾益气方中剂量组	10.5	107.67±5.49 <sup>4)</sup>
健脾益气方高剂量组	21.0	117.50±7.11 <sup>4)</sup>
STAT3 抑制组	0.004 5	117.70±4.42 <sup>4)</sup>
gp130 抑制组	0.004 5	112.02±17.26 <sup>4)</sup>

内环境,肿瘤细胞与 TME 既相互依赖,又相互影响。慢性炎症是肿瘤微环境的核心特征,在促进肿瘤发生发展及抗治疗反应中发挥关键作用<sup>[22-23]</sup>。TME 在中医理论中也有相似之处,“积之成也,正气不足,而后邪气踞之”“邪之所凑,其气必虚”;慢性炎症常伴有脾虚,故有学者认为脾虚是肿瘤微环境形成的关键病机<sup>[24]</sup>。健脾是中医临床防治肝癌的重要治则。前期通过基因芯片分析和数据挖掘<sup>[11]</sup>,以及实验研究证实,下调炎症相关分子 Vimentin 在肝癌细胞中的过度表达可能是健脾益气方防治肝癌的重要机制<sup>[7-8]</sup>,并且前期通过苏木素-伊红(HE)染色观察健脾益气方对肝癌大鼠肝脏组织的病理学影响,结果显示健脾益气方中剂量和高剂量组大鼠肝细胞坏死、炎性浸润等情况均不同程度地改善,且健脾益气方各剂量组大鼠的肝组织损伤指数均显著降低<sup>[9-10]</sup>,故本文不再赘述。

Vimentin 是蛋白质中间丝家族(IF)的主要组成部分,广泛表达于各种正常的间质细胞及中胚层来源的细胞,能维持细胞完整性并提供抵抗压力;其在上皮细胞中的表达是细胞发生上皮-间质转化(EMT)的特征标志之一。已有报道 Vimentin 在肝癌、肺癌、乳腺癌等多种上皮细胞来源的肿瘤中过度表达<sup>[25]</sup>。p-Vimentin 是其发挥胞内信号转导功能的重要方式,蛋白激酶 A(PKA)、AURKB 等都可催化其磷酸化而影响 Vimentin 解聚及 IF 的拆解<sup>[26-27]</sup>。此外 Vimentin 还可作为细胞核转录因子或胞外信号分子参与细胞各种功能的调控,如神经母细胞瘤细胞的核 Vimentin 可调控 p21Waf1 的转录活性,影响患者的预后<sup>[28]</sup>;而胞外 Vimentin 则可促进乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖、黏附与迁移<sup>[29]</sup>。本研究首先采用生物信息学对 HCC 患者肝癌组织中的 Vimentin 进行分析,表明 VIM 基因突变可降低患者的无病生

存期;VIM mRNA在患者不同病理分期(I~IV期)、不同病理分级(G<sub>1</sub>~G<sub>3</sub>级)和无区域淋巴结转移患者(N0)肝癌组织中均呈显著高表达。Vimentin mRNA在有区域淋巴结转移患者(N1)肝癌组织表达水平高于正常组和N0,但差异不具有统计学意义,其原因可能是N1患者病例较少所致。值得注意的是,Vimentin蛋白表达水平与Vimentin mRNA正好相反,其在患者肝癌组织中呈显著低表达,推测可能有以下原因:①患者Vimentin mRNA和Vimentin蛋白的数据来源不同。本研究分析的Vimentin mRNA数据均基于肿瘤基因组图谱计划(TCGA)数据库,而Vimentin蛋白数据基于临床蛋白质组肿瘤分析协作组(CPTAC)数据库;②肝癌患者中存在较多的胞外分泌型Vimentin,实际检测方法仅能观察到组织细胞中的Vimentin而导致蛋白水平较低,本研究中肝癌模型大鼠血清Vimentin显著升高也证实了这一点;③患者肝癌组织Vimentin mRNA可能与正常组织相比存在明显的甲基化差异,影响了其蛋白质水平。多项研究表明m<sup>6</sup>A甲基化转移酶3(METTL3)在肝癌组织中过度表达,能够促进肝癌细胞的增殖、侵袭,并与肝癌患者预后相关<sup>[30-32]</sup>。通过Whistle网站(<http://180.208.58.19/whistle/index.html>)预测Vimentin基因m<sup>6</sup>A甲基化位点,发现Vimentin基因可能出现多个m<sup>6</sup>A位点,并且可能会影响到基因本体(GO)富集分析中多种分子功能、细胞组分和生物学过程;④患者肝癌组织Vimentin mRNA和Vimentin蛋白的采样时间存在差异。一是Vimentin基因表达受到生物钟基因调控<sup>[33-34]</sup>,Vimentin蛋白的采样时其表达可能处于低谷期;二是肝癌患者不同病理分级Vimentin mRNA表达不同,其在G<sub>1</sub>~G<sub>3</sub>级患者中显著升高,在G<sub>4</sub>级患者中降低且与正常组织比较差异无统计学意义,而蛋白样本未分级、采集时患者处于哪个分级不清楚。而且,本研究证实DEN肝癌大鼠肝组织总Vimentin、p-Vimentin和核Vimentin蛋白水平,以及血清分泌型Vimentin水平均显著升高。特别是胞外Vimentin可能与细胞EMT过程密切相关,在癌细胞侵袭过程中发挥重要作用<sup>[25,29]</sup>。结合上述第二点,这可能也是Vimentin mRNA高表达/低表达对HCC患者总体生存期、无病生存期的影响差异无统计学意义的重要原因;但分泌型Vimentin是否影响HCC患者的总体生存期和无病生存期,有待进一步研究。

Vimentin是联系“炎癌转化”的重要分子,可通

过与肝癌致病因子直接相互作用、调控EMT过程和抑制人NOD样受体家族蛋白3(NLRP3)/Caspase-1炎症信号等方面参与肝癌炎症微环境的调节<sup>[35]</sup>,而且本研究通过生物信息学分析也表明Vimentin mRNA在肝癌组织中表达水平的升高可能不是由肝癌细胞而是肝癌组织中浸润的免疫细胞(主要是肿瘤相关成纤维细胞、M2型巨噬细胞和髓系树突状细胞)引起的。STAT3是慢性炎症介导肝癌进程的关键分子<sup>[36]</sup>;研究表明Vimentin与IL-6/STAT3炎症信号通路、特别是STAT3分子密切相关,在mRNA水平,p-STAT3进入细胞核后可通过与Vimentin基因启动子-757区的抗沉默子元件(ASE)及负调控因子ZBP-89蛋白结合,抑制沉默子元件的作用<sup>[12]</sup>,并阻止组蛋白去乙酰化酶1(HDAC1)与VIM启动子结合,增强VIM mRNA的转录水平<sup>[13]</sup>;在蛋白水平,STAT3可通过促进存活蛋白(Survivin)的表达而抑制Caspase-3的酶活性<sup>[14]</sup>,使后者裂解Vimentin蛋白的能力减弱<sup>[8]</sup>,间接提高Vimentin的蛋白水平;在磷酸化水平,STAT3可通过RAS同源基因家族A(RhoA)、Survivin等间接上调ROCK激酶与AURKB激酶的活性,促进Vimentin磷酸化<sup>[14-15]</sup>。前期基于网络药理学及实验验证,也证实健脾益气方可通过显著下调IL-6/STAT3炎症信号防治DEN肝癌大鼠<sup>[9]</sup>。因此,笔者重点分析了Vimentin与STAT3在肝癌组织中的相关性,结果显示二者在HCC患者肝癌组织中的表达存在正相关,DEN肝癌大鼠实验研究也证实了这一点。IL-6/STAT3信号通路抑制剂(STAT3抑制剂和gp130抑制剂)均可明显降低模型大鼠肝组织高表达的总Vimentin、p-Vimentin和核Vimentin蛋白水平,以及血清高表达的分泌型Vimentin水平;而且STAT3/Vimentin信号通路主要相关分子STAT3、p-STAT3、ZBP-89、ROCK2、AURKB也受STAT3抑制剂和gp130抑制剂干预,除负调控分子ZBP-89和Caspase-3水平显著上调外,其他分子水平均显著下调。表明肝癌组织中的STAT3炎症信号可在mRNA、蛋白和磷酸化水平影响Vimentin表达、细胞定位和功能。

中、高剂量健脾益气方也可明显下调模型大鼠血清分泌型Vimentin水平,肝组织总Vimentin、p-Vimentin和核Vimentin蛋白水平,及STAT3/Vimentin信号通路主要相关分子STAT3、p-STAT3、ROCK2、AURKB的蛋白水平,上调负调控分子ZBP-89的蛋白水平和Caspase-3酶活性。这种调控

趋势与STAT3抑制剂和gp130抑制剂类似;且中剂量或高剂量健脾益气方对Vimentin mRNA水平、STAT3蛋白、ZBP-89蛋白、ROCK2蛋白和AURKB蛋白水平,以及Caspase-3酶活性的干预结果,与STAT3抑制剂相比差异均不具有统计学意义。提示健脾益气方可能通过STAT3调控Vimentin在肝癌细胞中的过度表达、细胞定位和功能,进而干预肝癌炎症微环境。

综上,Vimentin是肝癌组织中一种重要的炎症分子,与HCC的发生发展密切相关,其表达、细胞定位和功能可能受肿瘤相关成纤维细胞、M2型巨噬细胞和髓系树突状细胞浸润水平,以及IL-6/STAT3信号通路、特别是STAT3分子的影响;而健脾益气方可能通过干预STAT3/Vimentin信号通路调控Vimentin而防治肝癌。本研究仍存在缺乏体外实验验证的不足,接下来需要开展体外实验验证,进一步研究健脾益气方通过STAT3/Vimentin信号干预肝癌的机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 肖琨珉,朱世杰,李可敬,等. 近10年中医药治疗肝癌研究的知识图谱分析[J]. 世界中西医结合杂志, 2022, 17(2): 236-242, 248.

[3] 龙江,高宠. 原发性肝癌中西医结合介入诊疗专家共识(试行第一版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(1): 70-77.

[4] 钊梦媛,张国梁. 中医药治疗原发性肝癌的切入点与难点[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(9): 2016-2024.

[5] 吴驻林,魏春山,康建媛,等. 中医益气健脾解毒法辅助治疗原发性肝癌的荟萃分析[J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(4): 94-101.

[6] 杨琪,卓少元. Caspase-1及其相关炎症因子在二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌形成过程中的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(9): 1382-1386.

[7] 卓少元,谢金玲. 健脾益气方含药血清下调Vimentin蛋白水平对人肝癌细胞SMMC-7721的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 55-59.

[8] 卓少元,谢金玲. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 161-166.

[9] 音金萍,岳紫晨,王超,等. 基于网络药理学探讨健脾益气方治疗DEN肝癌大鼠的分子机制及关键通路的验证[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(10): 917-927.

[10] 王超,岳紫晨,音金萍,等. 健脾益气方对肝癌模型大鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国药房, 2021, 32(19): 2342-2346.

[11] 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.

[12] WU Y, DIAB I, ZHANG X, et al. STAT3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89[J]. Oncogene, 2004, 23(1): 168-178.

[13] WU Y, ZHANG X, SALMON M, et al. The zinc finger repressor, ZBP-89, recruits histone deacetylase 1 to repress Vimentin gene expression [J]. Genes Cells, 2007, 12(8): 905-918.

[14] SHIN S, SUNG B J, CHO Y S, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of Caspase-3 and -7[J]. Biochemistry, 2001, 40(4): 1117-1123.

[15] TANG L, DAI F, LIU Y, et al. RhoA/ROCK signaling regulates smooth muscle phenotypic modulation and vascular remodeling via the JNK pathway and Vimentin cytoskeleton[J]. Pharmacol Res, 2018, 133: 201-212.

[16] RENAULT-MIHARA F, MUKAINO M, SHINOZAKI M, et al. Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation [J]. J Cell Biol, 2017, 216(8): 2533-2550.

[17] 庄筱璇,莫非,窦震,等. 有丝分裂激酶Aurora B的研究进展[J]. 生命的化学, 2014, 34(6): 829-836.

[18] 汤靓. DEN诱导大鼠肝癌模型的代谢组学研究[D]. 上海:第二军医大学, 2010.

[19] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011.

[20] WANG Z, PAN L, GUO D, et al. A novel five-gene signature predicts overall survival of patients with hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Med, 2021, 10(11): 3808-3821.

[21] ALLY A, BALASUNDARAM M, CARLSEN R, et al. Comprehensive and integrative genomic characterization of hepatocellular carcinoma [J]. Cell, 2017, 169(7): 1327-1341.

[22] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[23] 黄波. 肿瘤微环境中免疫与炎症的调节[J]. 中国肿

- 瘤生物治疗杂志,2012,19(2):111-115.
- [24] 王熙,张莹雯. 中医药干预肿瘤微环境的研究进展与思考[J]. 环球中医药,2022,15(2):357-362.
- [25] 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.
- [26] LI Q F, SPINELLI A M, WANG R, et al. Critical role of vimentin phosphorylation at Ser-56 by p21-activated kinase in Vimentin cytoskeleton signaling [J]. *J Biol Chem*,2006,281(45):34716-34724.
- [27] GOTO H, YASUI Y, KAWAJIRI A, et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific Vimentin phosphorylation in the cytokinetic process [J]. *J Biol Chem*,2003,278(10):8526-8530.
- [28] MERGUI X, PUIFFE M L, VALTEAU-COUANET D, et al. p21Waf1 expression is regulated by nuclear intermediate filament Vimentin in neuroblastoma [J]. *BMC Cancer*,2010,10:473.
- [29] THALLA D G, JUNG P, BISCHOFF M, et al. Role of extracellular Vimentin in cancer-cell functionality and its influence on cell monolayer permeability changes induced by SARS-CoV-2 receptor binding domain [J]. *Int J Mol Sci*,2021,doi:10.3390/IJMS22147469.
- [30] PU J, WANG J, QIN Z, et al. IGF2BP2 promotes liver cancer growth through an m<sup>6</sup>A-FEN1-dependent mechanism [J]. *Front Oncol*,2020,10:578816.
- [31] 徐聿言. N6-甲基腺嘌呤修饰调控因子促进肝细胞癌的进展及影响其临床预后 [D]. 广州:南方医科大学,2020.
- [32] LIU G M, ZENG H D, ZHANG C Y, et al. Identification of METTL3 as an adverse prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*,2021,66(4):1110-1126.
- [33] DE A, BELIGALA D H, SHARMA V P, et al. Cancer stem cell generation during epithelial-mesenchymal transition is temporally gated by intrinsic circadian clocks [J]. *Clin Exp Metastasis*,2020,37(5):617-635.
- [34] ZHANG Y, DEVOCELLE A, DESTERKE C, et al. BMAL1 Knockdown leans epithelial-mesenchymal balance toward epithelial properties and decreases the chemoresistance of colon carcinoma cells [J]. *Int J Mol Sci*,2021,doi:10.3390/ijms22105247.
- [35] 谢金玲,卓少元. Vimentin在原发性肝癌发生发展及凋亡过程中的作用 [J]. *中国肿瘤*,2017,26(2):130-134.
- [36] 音金萍,岳紫晨,卓少元. STAT3:慢性炎症介导肝癌进程的关键分子 [J]. *临床肝胆病杂志*,2020,36(4):948-952.

[责任编辑 顾雪竹]