

益气除痰方下调 vimentin 表达与逆转 EMT 相关性研究[※]

● 周京旭¹ 林丽珠^{1▲} 王淑美²

摘 要 目的:观察益气除痰方肺癌肿瘤生长、肺转移的影响,并通过差异蛋白组学技术筛选出差异表达蛋白 vimentin,并结合相关技术分析其可能的意义。方法:C57BL 小鼠 40 只,接种 Lewis 肺癌细胞,造模第 2 天,随机分为对照组(生理盐水)和低、中、高剂量观察组予益气除痰方 $1.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $9.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每组 10 只,灌胃 21d 后,检测肿瘤体积、重量、肺转移灶,分别提取最佳剂量治疗组和模型组肿瘤组织的总蛋白,应用双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)系统获得蛋白点表达差异信息,运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-TOF)鉴定出差异蛋白质。并以荧光定量 PCR 和 Western blot 法对差异蛋白进行表达差异鉴定。培养 A549 细胞,20% 益气除痰方含药血清干预,划痕实验分析细胞侵袭、转移能力的改变,RT-PCR 检测其对 A549 肺癌细胞 MMP-1、MMP2、MMP9、MMP14 mRNA 基因表达的影响。结果:益气除痰方 $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 治疗组肿瘤体积、瘤重、肺转移灶数均明显小于 LEWIS 模型组($P < 0.01$),肿瘤抑制率为 57.21%。蛋白质组学研究鉴定受益气除痰方调控影响的蛋白 37 个,其中 vimentin 下调尤其明显。20% 益气除痰方含药血清可抑制 A549 细胞的侵袭和转移能力,并能降低 MMP2、MMP14 mRNA 基因的表达,与空白组比较差异有显著性($P < 0.01$)。结论:益气除痰方明显下调 vimentin 表达,抑制 A549 细胞的运动能力,减少基质金属蛋白酶 MMP2、MMP14 的分泌,这可能与益气除痰方逆转肺癌细胞上皮-间质转化有关,值得进一步研究。

关键词 益气除痰方 LEWIS 肺癌 上皮-间质转化

上皮间质细胞转化是具有极性的上皮细胞转换成为具有移行能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程,上皮细胞标志——E-钙黏素和细胞角蛋白的表达受到抑制,而诱导表达一种间叶细胞骨架中间纤维组成成分波形蛋白(vimentin),同时获得分泌基质金属蛋白酶的能力^[1,2]。益气除痰方由党参、生法夏、守宫、露蜂房等组成,通过健脾益气、化痰散结达到固本抑瘤、兼治标本的功效。临床研究证明,益气除痰方能够明显延长非小细胞肺癌患者的

生存期,提高生存质量。其疗效既和抑制肺癌的生长有关,也和降低肺癌的转移有关,使患者能较长期的“带瘤生存”,达到治疗目的^[3,4]。

本实验采用比较蛋白质组学的方法,鉴定分析发现益气除痰方明显降低 LEWIS 肺癌细胞 vimentin 的表达,并进一步分析了调节 vimentin 表达的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料 益气除痰方(Yiqi Chutan Tang, YQCT)按组成严格称取鉴定。经煮液,过滤,浓缩至含生药量 $2\text{g}/\text{ml}$,密闭 4°C 保存备用。Cy Dye 荧光染料(Cy 2, Cy 3, Cy 5)、CHAPS、两性电解质($\text{pH} 3 \sim 10 \text{ NL}$)、DTT、24cm IPG 胶条($\text{pH} 3 \sim 10 \text{ NL}$)、碘乙酰胺(IAA)、Clean-up 试剂盒、2D Quant 试剂盒等均购自 AmershamBioscience 公司。IPG-phor II 等电聚焦

※基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30772862)

▲通讯作者 林丽珠,女,主任医师,教授,博士研究生导师。E-mail: lizhulin903@21cn.com。

• 作者单位 1. 广州中医药大学第一临床学院肿瘤科(510405); 2. 重庆医科大学中医药学院(401331)

仪、DALE Six 电泳系统、Typhoon9400 系列多功能激光扫描成像系统、DeCyder 差异分析软件和 MALDI-TOF-TOF 质谱均为 Amersham Bio science 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 造模与给药 SPF 级 C57BL 小鼠 40 只, 18~20g, 雌雄各半。C57BL 小鼠 d1 右腋皮下接种 1×10^7 个 Lewis 肺癌细胞。接种 d2 开始用药, 治疗组予益气除痰方 $1.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $9.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 灌胃, 给药量为 $0.5\text{mL}/\text{只}$, 每天 1 次, 连续灌胃 21d; 对照组予生理盐水。接种后每 3d 称量一次体重, d 22 处死小鼠, 检测各组肿瘤体积、重量、肺转移灶, 取肿瘤组织 -80°C 保存备用。

1.2.2 双向电泳^[5] 用蛋白裂解液提取中剂量实验组和对照组蛋白, 用改良的 Bradford 法测定提取蛋白样品的蛋白浓度。荧光标记 G1 对照组 (CY3), 治疗组 (CY5), CY2 标记内标; G2 胶反标记对照组 (CY5), 治疗组 (CY3), CY2 标记内标。将上述三个标记好的样品混合, 进行等点聚焦、SDS-PAGE 电泳。凝胶图像分析, 筛选出在两组中差异表达的蛋白质。

1.2.3 制备质谱样品及质谱分析 将 G1、G2 胶进行质谱分析, 蛋白质原位酶解, MALDI-TOF-TOF 肽质量指纹图测定, 蛋白质鉴定数据库查询通过 Internet 在 ExPASy 的 Peptide 软件进行搜寻。选择合适参数, 进行匹配。Western blot 验证差异蛋白的表达情况。

1.2.4 划痕细胞迁移试验^[6] 6 孔板长满细胞单层后, 用灭菌 $10\mu\text{L}$ 枪头沿细胞中部划一条直线, 洗去细胞碎片, 每组设 3 个复孔, 治疗组予 20% 含药血清, 对照组予 20% 无药血清, 相差显微镜观察划痕愈合程度, 计算迁移率 = $1 - \text{实验组}/\text{对照组} \times 100\%$ 。

1.2.5 RT-PCR 检测 MMP-1、MMP2、MMP9、MMP14 mRNA 的表达^[6] A549 细胞经 20% 含药血清处理 24h, Trizol 法总 RNA, 逆转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增。设置 PCR 扩增条件: 94°C 2 分钟; 94°C 25 秒; 55°C 30 秒; 72°C 30 秒; 72°C 5 秒, 循环 25 次。扩增产物 1.5% 的琼脂糖电泳后, 紫外灯观察拍照。Quantity one 软件分析定量。见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游序列	下游序列
MMP-1	5-CCACAACCCCAAAAGCGTG-3	5-TCCTCAGAAAGAGCAGCATCG-3
MMP-2	5-TGGATGGAGGAAAACCAAGCC-3	5-AACTACGACACCGACGACC-3
MMP-9	5-AACTACGACACCGACGACC-3	5-TCAGGCCGAGGACCATAGA-3
MMP-14	5-AGCAACTTTATGCGGGTGACT-3	5-CCAGACTTTTGATCTTCTGGGG-3
GAPDH	5-ATCACTGCCACCCAGAAGACT-3	5-CATGCCAGAGTCGCTTCGTTT-3

2 结果

2.1 益气除痰方对肿瘤生长的影响 无论肿瘤体积、瘤重、肺转移灶数益气除痰方治疗组均明显小于对照组 ($P < 0.01$), 其中, 中剂量组 $3.0\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 肿瘤抑瘤效果最好, 最大抑瘤率 57.21%。见表 2。

表 2 益气除痰方治疗 21 天对小鼠 Lewis 肺癌实体瘤生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	体重 (g)	肿瘤体积 (cm^3)	瘤重 (g)	肺转移灶数 (个)	抑瘤率 (%)
对照组	—	23.22 ± 1.54	2.83 ± 0.35	2.08 ± 0.28	8.60 ± 1.84	—
低剂量治疗组	1.0	$23.89 \pm 1.46^*$	$2.24 \pm 0.45^*$	$1.64 \pm 0.33^*$	8.90 ± 2.56	21.15
中剂量治疗组	3.0	$25.82 \pm 1.49^{**}$	$1.21 \pm 0.43^{**}$	$0.89 \pm 0.31^{**}$	$5.30 \pm 2.06^{**}$	57.21
高剂量治疗组	9.0	22.62 ± 2.60	$1.99 \pm 0.53^{**}$	$1.45 \pm 0.39^{**}$	8.40 ± 2.27	30.29

注: 与 LEWIS 肺癌模型组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 2D-DIGE 胶图分析结果分析 以统计学参数: 差异参数 T-TEST < 0.05 , 差异倍数参数: RITIO < -1.5 或 > 1.5 为标准, 筛选出治疗组与对照差异蛋白点 44 个, 其中治疗后上调表达蛋白 6 个, 下调表达蛋白 38 个。

2.3 质谱鉴定结果 治疗组与对照组 44 个差异表达蛋白经质谱成功鉴定出 37 个蛋白, 其中波纹蛋白

vimentin 下调表达最显著。见表 3。

表 3 治疗组 vimentin 的差异表达

编号	蛋白名称	差异倍数	T-test
290	Vimentin	-3.13	0.002
288	Vimentin	-2.41	0.004
286	Vimentin	-1.82	0.014
319	Vimentin	-1.79	0.009

2.4 Western blot 法对部分差异蛋白鉴定结果 显示益气除痰治疗组, vimentin, prolyl 4 - hydroxylase, protein disulfide - isomerase A3 precursor, EG433182 protein 表达水平较模型组下降, 与蛋白质组学实验结论一致。见图 1。

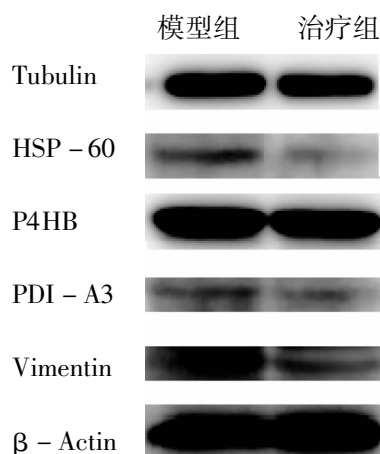


图 1 益气除痰方对小鼠 Lewis 肺癌组织表达 Vimentin 的影响(内参为 β-Actin) (Western blot, n = 10)

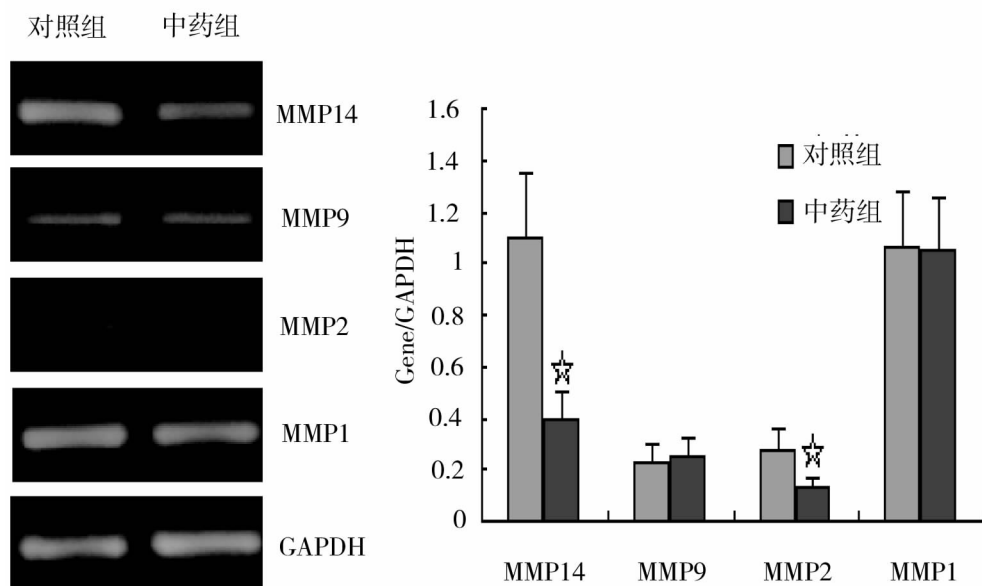


图 2 益气除痰方含药血清对 A549 细胞 MMP1、MMP2、MMP9、MMP14mRNA 的影响

3 讨论

肺癌的浸润转移, 是其治疗失败的主要原因之一。而肿瘤细胞必须获得侵袭转移的能力, 突破基底膜, 必须由上皮形态转化为间质形态, 因而上皮间质细胞转化是肿瘤发生转移的关键步骤。癌细胞发生上皮间叶细胞转移时, 丧失了上皮细胞极性, E - 钙黏素和细胞角蛋白的表达受到抑制; 获得了成纤维细胞

2.5 益气除痰方含药血清对 A549 细胞迁移的影响

12h 后, 20% 含药血清组 A549 细胞迁移率分别为 $(18.6 \pm 2.8)\%$, 对照组为 $(43.3 \pm 2.9)\%$; 24h 后, 20% 含药血清组细胞的迁移率分别为 $(43.1 \pm 3.3\%)$, 对照组已经长满。两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.6 益气除痰方含药血清对 A549 细胞 MMP1、

MMP2、MMP9、MMP14mRNA 表达的影响 与对照组比较, 治疗组可明显降低 MMP2、MMP14 mRNA 的表达, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 而 MMP1、MMP9mRNA 的表达改变不明显, 无显著性差异 ($P < 0.01$)。见图 2。

形态, 运动侵袭能力、N - 钙黏素和波形蛋白表达, 基质金属蛋白酶和纤连蛋白分泌。EMT 通常由肿瘤所处的环境信号激发。也就是说, 处于原发灶侵袭性前缘的肿瘤细胞可以从邻近的反应性基质中获得特异性信号, 从而获得向间质细胞转化的能力^[1,2]。事实上, 多种恶性肿瘤如乳腺癌、肝癌、前列腺癌、肺癌、肠癌等的侵袭转移过程均观察到 EMT 现象, 而且肿瘤组织中的发生 EMT 的肿瘤细胞数目直接与病变组织

的侵袭转移程度相关。肿瘤细胞发生 EMT 后,侵袭转移能力明显增强。用 EMT 调节因子 Twist 处理后乳腺癌细胞, Ax1 表达上调, 侵袭转移能力明显增强^[7]; 过表达 EMT 相关的转录因子 Snail/Twist 可促进肝癌细胞 EMT 的发生, 肝癌细胞转移能力增加, 而沉默 Snail/Twist, 使肝癌细胞转移能力明显受到抑制^[8]。而肺癌发生 EMT 促进肿瘤的进展、转移、耐药, 不仅是化疗药物, 也包括对分子靶向药物 EGFR TKI 的耐药。肺腺癌细胞株 A549 经 TGF- β 1 孵育 21 天以后, 转变为 EMT 表型的 A549-M, 其迁徙、转移能力明显增强^[9]。而用 RNAi 抑制 Snail 后, 则明显降低其体外侵袭转移能力^[10]。

益气除痰方可以明显抑制肿瘤的生长, 减少肺转移的发生。而上皮间质转化是肿瘤转移的首要条件。因而理论上推测益气除痰方是也抑制 A549 细胞 EMT 的发生。可以从以下几个方面进行探讨: (1) 肿瘤细胞是否发生了形态学的变化, 如从梭形细胞变成圆形细胞; (2) 细胞运动迁移能力是否发生改变; (3) 一些上皮和间叶组织的细胞标志物是否发生改变。

研究表明, 肿瘤侵袭前缘的癌细胞选择性表达 Vimentin, 细胞也变成一种拉伸的纤维母细胞形态, 而内部的癌细胞不表达 Vimentin, 细胞也维持上皮样形态^[1]。本研究发现益气除痰方可明显抑制 Vimentin 表达, 可能使细胞保持上皮样形态, 也可能与抑制肿瘤上皮向间叶细胞转化有关。

其次, 细胞迁移运动能力的下降, 基质金属蛋白酶的分泌减少也是抑制 EMT 的表现之一。用益气除痰方含药血清处理人肺癌 A549 细胞株, 划痕实验发现能明显抑制细胞的迁移; 同时 RT-PCR 也发现益气除痰方含药血清降低 MMP-2、MMP-14 mRNA 基因的表达。而基质金属蛋白酶是细胞突破基底膜, 在细胞外基质中运动最重要的效应分子^[11]。

一些上皮和间叶组织的细胞标志物比如 E-cad

和 N-cad 是否发生改变尚待检测, 但益气除痰方逆转 EMT 抑制肺癌转移、耐药现象, 将成为今后工作新的重点领域。

参考文献

- [1] Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial - mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15: 117 - 134.
- [2] Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial - mesenchymal transitions. J Clin Invest 2009, 119: 1429 - 1437.
- [3] 周岱翰, 林丽珠, 周宜强, 等. 益气除痰法延长非小细胞肺癌中位生存期的作用. 中医杂志, 2005, 46(8): 600 - 602.
- [4] 周岱翰, 林丽珠, 周宜强, 等. 中医药治疗 III - VI 期非小细胞肺癌的预后因素分析. 癌症, 2005, 24(10): 1252 - 1256.
- [5] Shumei - Wang, Lizhu - Lin, Jingxu - Zhou, Shaoquan - Xiong. The effect of Yiqi Chutan Tang on proteome in LEWIS lung cancer in mice ASI-AN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION. 2011, 12(7): 1665 - 1669.
- [6] 史海岭, 刘 芬, 郭晓军, 等. 黄连素对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移与黏附的影响. 中国癌症杂志, 2009, 19(12): 910 - 914
- [7] Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, et al. Ax1 is an essential epithelial - to - mesenchymal transition - induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(3): 1124 - 1129.
- [8] Yang MH, Chen CH, Chau GY, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2009, 50(5): 1464 - 1474.
- [9] Maitah M Y, Ali S, Ahmad A. Up - Regulation of Sonic Hedgehog Contributes to TGF - β 1 - Induced Epithelial to Mesenchymal Transition in NSCLC Cells. PLoS One, 2011, 6(1): e16068.
- [10] 卓文磊, 张云嵩, 王 彦, 等. RNA 干扰抑制 Snail 表达对 A549 细胞上皮 - 间充质转化及体外侵袭的影响. 现代肿瘤医学, 2008, 16(6): 889 - 893.
- [11] Delassus GS, Cho H, Hoang S, et al. Many new down - and up - regulatory signaling pathways, from known cancer progression suppressors to matrix metalloproteinases, differ widely in cells of various cancers. J Cell Physiol, 2010, 224(2): 549 - 58.

(上接第 59 页)

手中麻木、疼痛感觉异常等周围性感觉神经病变, 严重影响治疗的进程, 给患者造成了极大的痛苦。

中医学认为, 肿瘤是整体性疾病的一种局部表现, 有其复杂的病理变化及临床征象, 中晚期肿瘤多属本虚标实之证, 且化疗药物乃攻邪之品, 攻伐则进一步损伤正气。

肿瘤患者临床多表现为全身属虚、局部属实的病变, 其特点在于虚实夹杂, 病因病理复杂, 变化多端。

临床运用经方治疗化疗所致的毒副反应, 关键在于明了方义, 切中病机。具体实施在临床时, 要善于抓主症, 只要辨证准确, 灵活

变通, 合理选择经方, 运用得当, 就能取得良好疗效。

参考文献

- [1] 许利纯, 刘 华, 张 红, 等. 针刺配合旋复代赭石汤加味治疗晚期癌症并发顽固性呃逆疗效观察[J]. 中国中医急症, 2006, 15(12): 1340, 1365.