

• 论著 •

健脾通络方通过调控 TGF- β 1/SMAD4 信号通路抑制结直肠癌细胞上皮-间充质转化的机制研究

赵 勇 任建琳 严玉婷 周 霖 储金砚 袁晨越

【摘要】 目的 探究健脾通络方 (JPTLR) 对结直肠癌 (CRC) 细胞增殖、侵袭、迁移和上皮-间充质转化 (EMT) 的影响及作用机制。**方法** 构建转化生长因子- β (TGF- β) 高表达的 HCT116 细胞模型。将 HCT116 细胞分为对照 (NC) 组、NC+TGF- β 1 组、JPTLR 组、JPTLR+TGF- β 1 组、LY2109761 组和 LY2109761+TGF- β 1 组。采用细胞划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验分别检测各组细胞的迁移、侵袭能力。采用蛋白质印迹法检测各组细胞中 TGF- β 1、SMAD4 及 EMT 相关蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组相比, JPTLR 组的细胞划痕愈合率降低, 细胞侵袭数量减少, SMAD4 和波形蛋白 (Vimentin) 表达水平均显著降低, E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和紧密连接蛋白-1 (Claudin-1) 表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。与 NC+TGF- β 1 组相比, JPTLR+TGF- β 1 组的 SMAD4 和 Vimentin 表达水平均显著降低, E-cadherin 和 Claudin-1 表达水平均显著升高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。**结论** JPTLR 通过下调 HCT116 细胞中 SMAD4 的表达, 使 E-cadherin、Claudin-1 表达水平升高, Vimentin 表达水平降低, 从而抑制 CRC 细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT。

【关键词】 结直肠癌; 健脾通络方; 上皮-间充质转化; 侵袭; 迁移

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-534X. 2024. 06. 008

Effects and mechanism of JPTLR in inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells by regulating the TGF- β 1/SMAD4 signaling pathway ZHAO Yong, REN Jianlin, YAN Yuting, ZHOU Lin, CHU Jinyan, YUAN Chenyue. Department of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

【Abstract】 Objective This paper attempts to investigate the effects and mechanisms of Jianpi Tongluo Recipe (JPTLR) on the proliferation, invasion, migration, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of colorectal cancer (CRC) cells. **Methods** A high-expression transforming growth factor- β (TGF- β) HCT116 cell model was established. The HCT116 cells were divided into six groups: control (NC) group, NC+TGF- β 1 group, JPTLR group, JPTLR+TGF- β 1 group, LY2109761 group, and LY2109761+TGF- β 1 group. The scratch healing assay and Transwell invasion assay were used to evaluate cell migration and invasion. The expression levels of TGF- β 1, SMAD4, and EMT-related proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared to the NC group, the JPTLR group shows a significantly lower cell scratch healing rate, reduced number of invasive cells, decreased expression of SMAD4 and Vimentin, and increased expression of E-cadherin and Claudin-1, with statistically significant differences ($P < 0.05$). Compared

基金项目: 上海市科技创新行动计划生物医药科技支撑专项 (22S21901000); 国家自然科学基金面上项目 (82174452、81873279); 上海医学创新发展基金会-中医药科技发展项目 (WLJH2021ZY-MZY026); 上海申康医院发展中心临床三年行动计划疑难疾病精准诊治攻关项目 (SHDC2020CR2047B)

作者单位: 200071 上海中医药大学附属市中医医院肿瘤科

通信作者: 任建琳, Email: renjianlin666@126.com

to the NC+TGF- β 1 group, the expression of SMAD4 and Vimentin in the JPTLR+TGF- β 1 group are decreased; the expression of E-cadherin and Claudin-1 are increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** JPTLR inhibits the proliferation, invasion, migration, and EMT of CRC cells by downregulating SMAD4 expression, increasing the expression of E-cadherin and Claudin-1, and decreasing the expression of Vimentin in HCT116 cells.

【Keywords】 Colorectal cancer; Jianpi Tongluo Recipe; Epithelial-mesenchymal transition; Invasion; Migration

结直肠癌 (CRC) 是一种常见的消化道肿瘤, 其居肿瘤相关死亡原因第 3 位^[1]。在肿瘤转移过程中, 肿瘤细胞从原发部位扩散, 在远处形成继发性肿瘤。上皮-间充质转化 (EMT) 是肿瘤转移过程中的重要形态学变化^[2]。转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路在胚胎干细胞的自我更新和分化、维持分化细胞的稳态, 以及抑制免疫反应和肿瘤进展等多个方面发挥作用, 并可调节 EMT 过程^[3]。研究表明, TGF- β 1 在 CRC 组织中的表达水平较癌旁组织显著升高^[4]。中医药是恶性肿瘤的重要辅助治疗方式。在临床上, 湿热和脾虚是 CRC 的常见证型, CRC 的各个阶段均贯穿着脾虚证, 其与 CRC 的进展密切相关。本课题组的前期研究结果表明, 健脾为主的扶正中药可延长 CRC 患者的术后总生存期、晚期 CRC 患者的总生存期和无病生存期^[5-6]。健脾通络方 (JPTLR) 是一种基于络病理论, 针对中、晚期 CRC 的临床经验方。本研究通过检测 JPTLR 对 TGF- β 1/SMAD4 信号通路表达, 以及 CRC 细胞侵袭、迁移和 EMT 的影响, 探索其对 CRC 的疗效及相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 CRC 细胞 HCT116 购自中科院上海生命科学研究院细胞库。DMEM 高糖培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司, 人源 TGF- β 1 检测试剂盒、CCK-8 细胞增殖检测试剂盒均购自南京倍尔博实验器材有限公司。JPTLR 由生黄芪 30 g、苦参 15 g、党参 15 g、炒白术 15 g、白茯苓 15 g、炒薏苡仁 15 g、白花蛇舌草 30 g、天龙 3 g、蜈蚣 3 g、甘草 6 g 组成, 累计给药剂量为 195.3 g/kg。上述中药材取自上海中医药大学附属市中医医院中药房。根据本课题组的前期研究结果, JPTLR 给药剂量为 20 mg/mL。中药饮片采用醇提的方法进行浓缩提取, 调整质量浓度为 1 g/mL, 在超净台中使用 0.22 μ m 规格的过滤器过滤除菌后用于后续研究。TGF- β 1 受体抑制剂 LY2109761 购自美国 TargetMol

公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。抗 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、紧密连接蛋白-1 (Claudin-1) 及 SMAD4 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 主要方法

1.2.1 HCT116 细胞增殖情况检测

使用 CCK-8 试剂盒检测 HCT116 细胞增殖情况。待 HCT116 细胞培养至对数生长期后, 将细胞消化、接种至 96 孔板中 (密度为 8 000 个/孔), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养 12 h 后, 弃去旧液, 分别给予上述细胞不同质量浓度的 JPTLR (0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 mg/mL)、LY2109761 (0、5、10、20、40、80 μ g/mL) 进行干预, 每组设置 3 次重复。再次培养 24 h 后, 弃去培养基, 使用 CCK-8 试剂盒检测经处理后的细胞增殖情况。具体步骤: 加入含 10% CCK-8 的 DMEM 完全培养基, 继续培养 1 h, 使用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值, 计算细胞增殖抑制率。计算公式: 细胞增殖抑制率 = $1 - [A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(\text{未加药}) - A(\text{空白})] \times 100\%$; A (加药) 指含有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的 OD 值, A (空白) 指含有培养基和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔的 OD 值, A (未加药) 指含有细胞、CCK-8 溶液而没有药物溶液的孔的 OD 值。之后, 根据细胞增殖抑制率在 50% 左右, 确定 JPTLR 的 IC₅₀ 范围。

1.2.2 HCT116 细胞迁移情况检测

采用细胞划痕愈合实验检测 HCT116 细胞迁移情况。选取对数生长期的 HCT116 细胞, 将其分为对照 (NC) 组、JPTLR 组 (给予不同质量浓度的 JPTLR 进行干预)、LY2109761 组 (给予不同质量浓度的 LY2109761 进行干预)。待培养瓶内细胞覆盖率为 80%~90% 时, 消化细胞后接种于 6 孔板中, 每孔补充完全培养基 2 mL。第 2 天进行观察, 待 6 孔板内细胞覆盖率为 80%~90% 时即可进行划痕实验。弃去旧培养基, 对照组加入无血清不完全培养基, 用 200 μ L 的灭菌加样枪头在 6 孔板中央

轻轻划线,避免贴壁细胞脱落,使用显微镜进行拍摄并统计。应用 ImageJ 软件处理数据,划痕愈合率=愈合面积/初始面积 $\times 100\%$ 。

1.2.3 HCT116 细胞侵袭情况检测

采用 Transwell 侵袭实验检测 HCT116 细胞侵袭情况。将 Matrigel 基质胶与冷的无血清 DMEM 高糖培养基按 1:8 的比例混合备用。取 20 μL 稀释后的 Matrigel 胶注入 Transwell 小室滤膜的上表面,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~60 min,使其凝固。将处于对数生长期的 HCT116 细胞置于无血清不完全培养基中培育 12 h。将消化后的细胞密度调整为 5×10^5 个/mL,用无血清不完全培养基进行重悬,然后分组(分组同 1.2.2)。将 100 μL 细胞悬液加入上室,下室加入含有 10% 胎牛血清的培养基,在对应组别的细胞悬液中加入 TGF- $\beta 1$ 及对应药物干预,继续放入培养箱中培育 24 h。培育结束后使用 PBS 洗涤上室,以移除未侵袭的细胞,然后使用 4% 甲醛固定滤膜上的细胞 20 min,再使用 0.1% 结晶紫染色 10~20 min,在 10 \times 物镜和 10 \times 目镜下拍摄细胞,随机选取 5 个镜下视野计数,计算其平均数。

1.2.4 HCT116 细胞中 TGF- $\beta 1$ 、SMAD4 及 EMT 标志物表达情况检测

采用蛋白质印迹法检测 HCT116 细胞中 TGF- $\beta 1$ 、SMAD4 及 EMT 标志物表达情况。各组(分组同 1.2.2)经药物干预 24 h 后,收集细胞,加入 150 mL RIPA 裂解液(已加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂),用超声波粉碎细胞,离心后取上清液,使用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。将蛋白质样品调整为统一浓度后加入 Loading Buffer 煮沸定性,保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。将蛋白质上样后进行电泳,通过电泳将凝胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜上。随后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入稀释后的抗 β -actin、SMAD4、Vimentin、Claudin-1、E-cadherin 一抗,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,使用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入 HRP 标记二抗,避光孵育 2 h。使用超敏 ECL 化学发光试剂盒进行显色、显影。应用 ImageJ 软件对样本条带进行灰度值分析,并对数据进行标准化处理。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JPTLR 对 HCT116 细胞增殖的影响

如图 1 所示,当 HCT116 细胞增殖抑制率为 50% 时, JPTLR 的质量浓度约为 25 mg/mL,且细胞增殖抑制率随着 JPTLR 的质量浓度升高而升高。

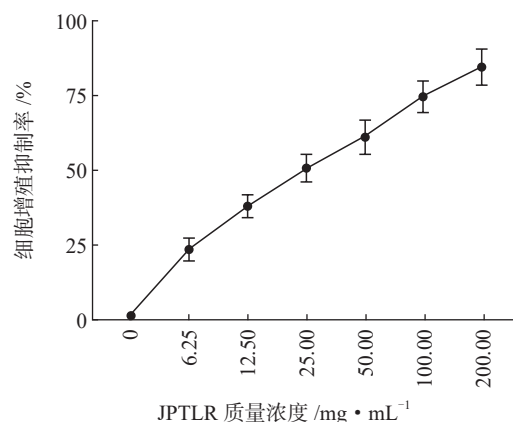


图 1 不同质量浓度的 JPTLR 对 HCT116 细胞增殖的影响

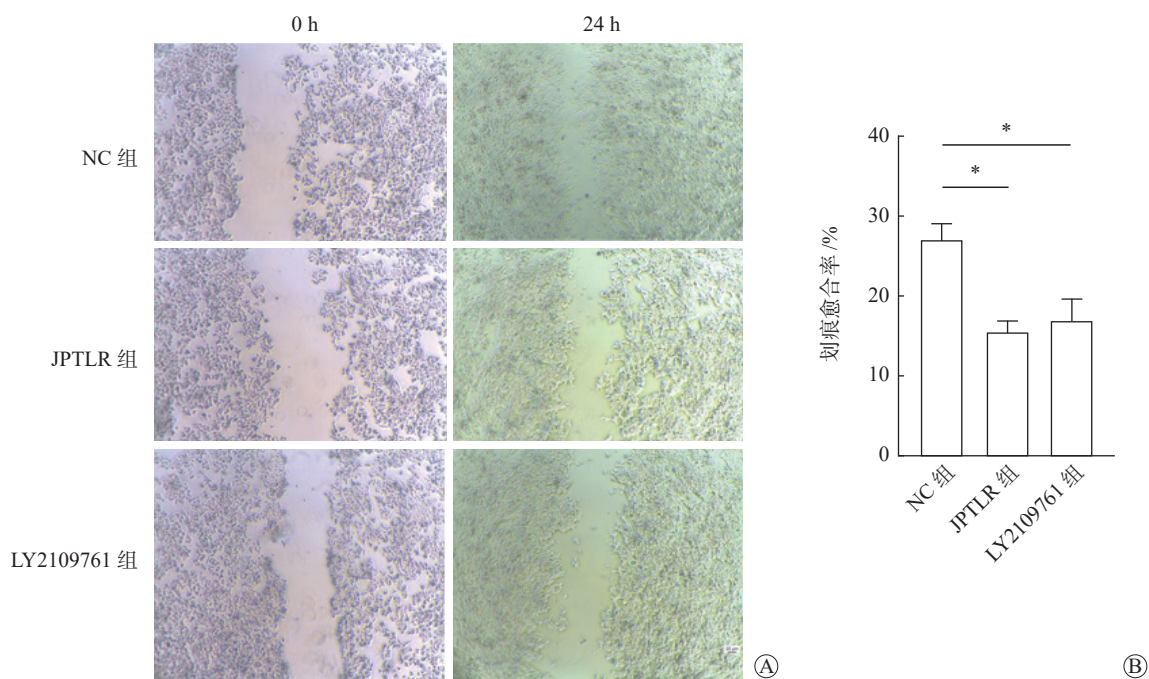
2.2 JPTLR 对 HCT116 细胞侵袭、迁移的影响

细胞划痕愈合实验检测结果显示,经 24 h 培养后,NC 组的划痕愈合率为 $(29.3\pm 0.5)\%$,分别高于 JPTLR 组 $[(10.1\pm 0.6)\%]$ 和 LY2109761 组 $[(12.1\pm 0.3)\%]$,差异均有统计学意义(P 均 <0.05),见图 2。Transwell 实验结果显示, JPTLR 组的细胞侵袭数量较 NC 组显著减少($P<0.05$)。见图 3。

2.3 JPTLR 对 HCT116 细胞中 TGF- $\beta 1$ /SMAD4 信号通路的影响

蛋白质印迹实验结果显示,NC 组、JPTLR 组和 LY2109761 组细胞中 TGF- $\beta 1$ 表达水平分别为 1.009 ± 0.121 、 1.170 ± 0.054 、 1.477 ± 0.115 ,其中 JPTLR 组与 NC 组的差异无统计学意义($P>0.05$),而 LY2109761 组细胞中 TGF- $\beta 1$ 表达水平显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

NC 组、NC+TGF- $\beta 1$ 组、JPTLR 组、JPTLR+TGF- $\beta 1$ 组、LY2109761 组和 LY2109761+TGF- $\beta 1$ 组细胞中 SMAD4 表达水平分别为 0.567 ± 0.020 、 1.201 ± 0.010 、 0.193 ± 0.001 、 0.388 ± 0.002 、 0.159 ± 0.004 和 0.366 ± 0.011 。与 NC 组相比, JPTLR 组和 LY2109761 组细胞中 SMAD4 表达水平均显著降低;与 NC+TGF- $\beta 1$ 组相比, JPTLR+TGF- $\beta 1$ 组和 LY2109761+TGF- $\beta 1$ 组细胞中 SMAD4 表达水平也均显著降低,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。见图 4。



注: * $P < 0.05$

图2 细胞划痕实验检测 JPTLR 对 HCT116 细胞迁移的影响 A 各组细胞划痕实验结果 B 各组细胞划痕愈合率的柱形图 (24 h)

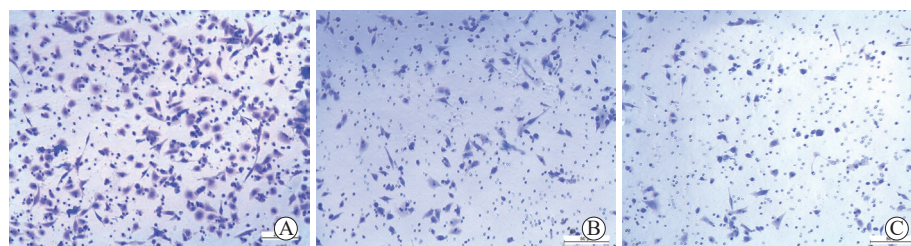
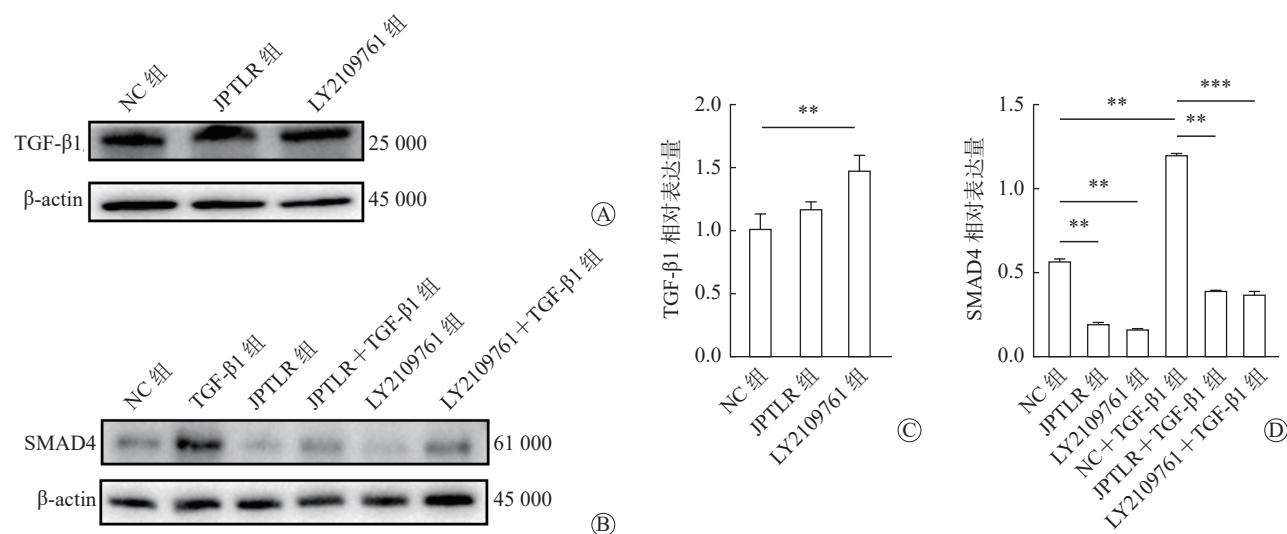


图3 Transwell 实验检测 JPTLR 对 HCT116 细胞侵袭的影响 0.1% 结晶紫染色 $\times 100$ A NC 组 B JPTLR 组 C LY2109761 组



注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

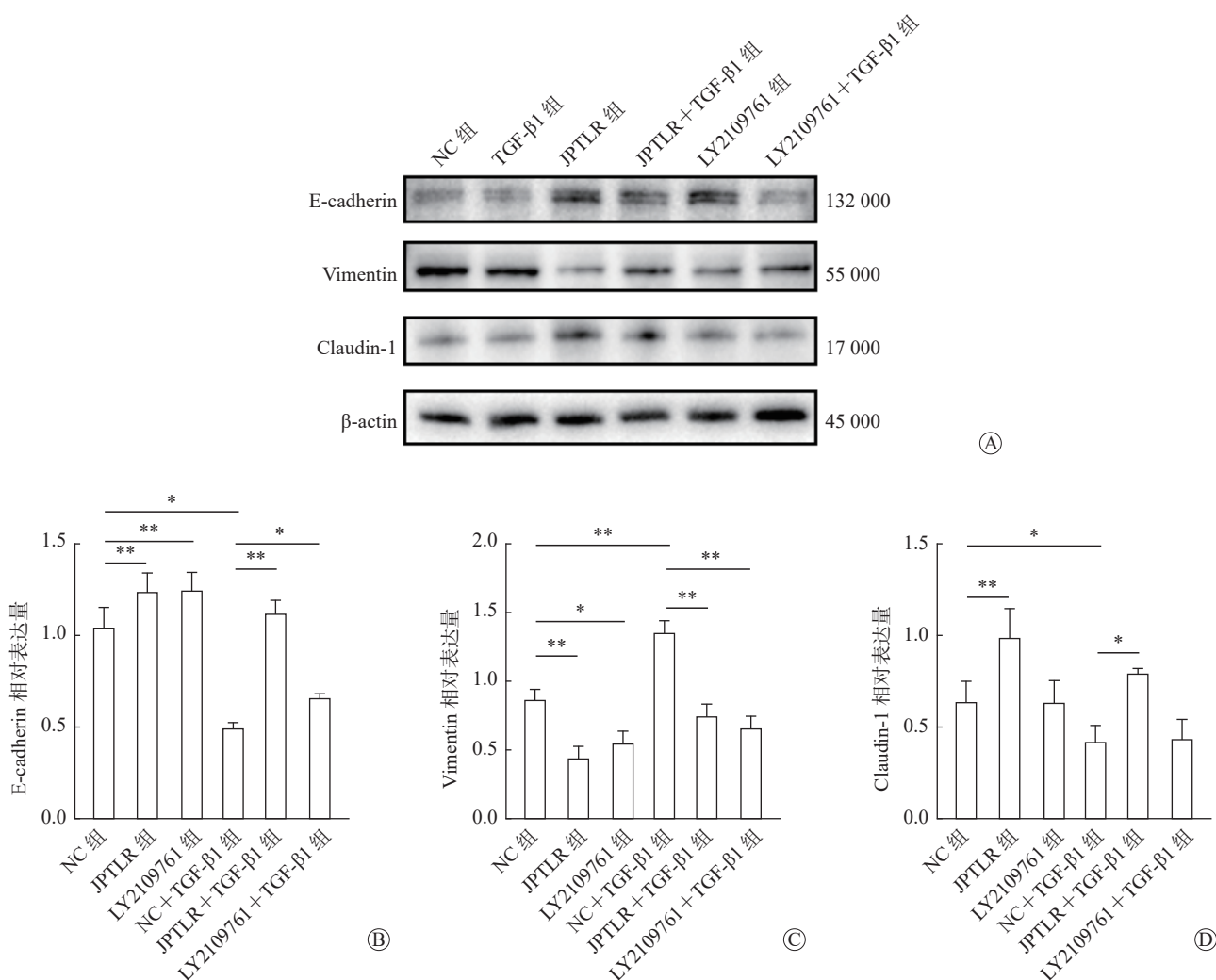
图4 JPTLR 对 HCT116 细胞中 TGF-β1/SMAD4 信号通路的影响 A 蛋白质印迹法检测各组细胞中 TGF-β1 表达水平 B 蛋白质印迹法检测各组细胞中 SMAD4 表达水平 C 各组细胞中 TGF-β1 表达水平的柱形图 D 各组细胞中 SMAD4 表达水平的柱形图

2.4 JPTLR 对 HCT116 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

本研究中蛋白质印迹法检测结果显示, NC 组、NC+TGF- β 1 组、JPTLR 组、JPTLR+TGF- β 1 组、LY2109761 组和 LY2109761+TGF- β 1 组细胞中 E-cadherin 表达水平分别为 1.045 ± 0.112 、 0.502 ± 0.026 、 1.242 ± 0.110 、 1.122 ± 0.078 、 1.251 ± 0.096 和 0.667 ± 0.023 ; 各组细胞中 Vimentin 表达水平分别为 0.867 ± 0.078 、 1.349 ± 0.084 、 0.441 ± 0.096 、 0.737 ± 0.097 、 0.548 ± 0.095 和 0.651 ± 0.098 ; 各组细胞中 Claudin-1 表达水平分别为 0.645 ± 0.111 、 0.422 ± 0.092 、 0.994 ± 0.160 、 0.797 ± 0.030 、 $0.636 \pm$

0.121 和 0.437 ± 0.107 。

与 NC 组相比, JPTLR 组和 LY2109761 组细胞中 E-cadherin 表达水平均显著升高, 而 Vimentin 蛋白表达水平均显著降低; 与 NC+TGF- β 1 组相比, JPTLR+TGF- β 1 组和 LY2109761+TGF- β 1 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平均显著升高, 而 Vimentin 蛋白表达水平均显著降低, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。JPTLR 组、JPTLR+TGF- β 1 组细胞中的 Claudin-1 蛋白表达水平分别高于 NC 组、NC+TGF- β 1 组, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。见图 5。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 5 蛋白质印迹法检测 JPTLR 对 HCT116 细胞 EMT 相关蛋白的影响 A 蛋白质印迹法检测各组细胞中 E-cadherin、Vimentin、Claudin-1 蛋白表达水平 B 各组细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平的柱形图 C 各组细胞中 Vimentin 蛋白表达水平的柱形图 D 各组细胞中 Claudin-1 蛋白表达水平的柱形图

3 讨论

近年来的研究表明, EMT 与肿瘤进展关系密切, EMT 赋予细胞迁移、侵袭能力, 使其具有干细胞特征并减少凋亡, 不仅在细胞发育过程中起着关键作用, 而且还参与了组织愈合、器官纤维化和肿瘤发生等过程^[2]。EMT 过程中, 上皮细胞丧失极化表型, 并下调细胞间黏附分子表达, 从而获得间充质细胞特性, 促进细胞的侵袭与迁移^[7]。EMT 是一个多步骤的复杂过程, 涉及多种上皮细胞标志物和间充质细胞标志物的表达变化^[8]。E-cadherin 和 Claudin-1 均是上皮细胞标志物, 而 Vimentin 是一种间充质细胞标志物^[9-10]。上皮细胞标志物的丢失及间充质细胞标志物的获得均与肿瘤进展密切相关^[11]。EMT 受多种信号通路调控, 如 TGF- β 1 信号通路。研究表明, TGF- β 1 信号通路可下调 E-cadherin 表达, 并可上调 Vimentin 表达^[12]; 此外, TGF- β 1 是 CRC 细胞发生 EMT 的主要诱导因子^[13]。研究表明, SMAD4 等信号分子在 TGF- β 1 诱导的 EMT 过程中具有差异性调节作用^[14-16]。EMT 过程中, 细胞失去紧密连接, 致使其更容易穿透周围组织, 从而进入血管或淋巴管, 这与络病理理论中的“癌毒由络转经”有相似之处。本研究结果显示, 给予 HCT116 细胞 TGF- β 1 受体抑制剂可降低细胞侵袭、迁移能力; 而给予 JPTLR 干预能通过下调 SMAD4、Vimentin 表达, 上调 E-cadherin、Claudin-1 表达, 从而抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭; 在此基础上给予 TGF- β 1 后, 可以部分恢复 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力。以上结果提示 JPTLR 可以通过抑制 HCT116 细胞发生 EMT 而减弱其侵袭、迁移能力。

综上所述, JPTLR 可以通过下调 HCT116 细胞中 SMAD4 的表达, 使 E-cadherin、Claudin-1 表达上调, Vimentin 表达下调, 从而抑制 CRC 细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT。本研究阐明了 JPTLR 与 TGF- β 1/SMAD4 信号通路的关系, 验证了 JPTLR 对于 CRC 细胞 EMT 的抑制作用, 为开展 JPTLR 靶向 TGF- β 1/SMAD4 信号通路治疗 CRC 的研究提供了参考依据。本研究主要关注 JPTLR 的整体疗效, 尚未对其中的具体有效成分进行深入探索, 今后将尝试结合药理学, 进一步探寻 JPTLR 中可能对 EMT 有抑制作用的活性单体。

参考文献

- and immunotherapy for metastatic colorectal cancer[J]. *Cells*, 2024, 13(3): 245.
- Franco DL, Mainez J, Vega S, et al. Snail1 suppresses TGF- β -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 20): 3467-3477.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890.
- Tsushima H, Kawata S, Tamura S, et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression[J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(2): 375-382.
- 张彦博, 刘宣, 季青, 等. 健脾解毒方联合化疗治疗转移性结肠直肠癌临床研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(6): 2090-2093.
- 陈文婷, 任建琳, 石齐, 等. 中西医结合治疗大肠癌的回溯性研究及对生存预后影响因素的分析 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(2): 234-238, 242.
- Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, et al. Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 286.
- Bullock MD, Sayan AE, Packham GK, et al. MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression[J]. *Biol Cell*, 2012, 104(1): 3-12.
- Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(12 Pt 1): 4125-4133.
- Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 91.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5): 548-558.
- Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(10): 1512-1520.
- Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 22-29.
- Xie L, Law BK, Chytil AM, et al. Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT *in vitro*[J]. *Neoplasia*, 2004, 6(5): 603-610.
- Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29): 11851-11856.
- Park KS, Dubon MJ, Gumbiner BM. N-cadherin mediates the migration of MCF-10A cells undergoing bone morphogenetic protein 4-mediated epithelial mesenchymal transition[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3549-3556.

(收稿日期: 2024-07-03)

(本文编辑: 周骏)