

## · 基础研究 ·

## 启膈散对食管癌细胞微丝骨架重排的影响

史会娟<sup>1</sup> 石冬璇<sup>2</sup> 李 晶<sup>1</sup>

**摘要 目的** 研究启膈散对食管癌细胞微丝骨架的影响,并探讨其抑制转移的机制。**方法** 采用高分化人食管癌细胞 TE1、Eca109 及低分化人食管癌细胞 TE13,将细胞分为对照组(未加药)及启膈散(100  $\mu\text{g/mL}$ )组。应用免疫荧光法观察各组食管癌细胞形态的变化,激光共聚焦显微镜观察启膈散对食管癌细胞微丝排列的影响。采用细胞阻抗检测技术检测启膈散对食管癌细胞同基质黏附力及细胞迁移能力的影响。**结果** 启膈散组食管癌细胞 TE1、TE13 及 Eca109 中微丝排列更规则,伪足消失,对照组细胞中微丝排列混乱,且以细胞膜微丝排列不规则更为明显,在细胞膜上微丝排列缺乏同向性,向外伸出伪足。与对照组比较,启膈散组食管癌细胞 TE1 和 TE13 中形态规则的细胞数目明显增多( $P < 0.05$ ),TE1 与 TE13 细胞经启膈散作用后细胞与基质的黏附力及迁移能力均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 启膈散能够抑制食管癌细胞发生微丝骨架重排,使食管癌细胞同基质之间的黏附力降低,从而抑制细胞的迁移。

**关键词** 启膈散;食管癌;细胞微丝骨架;细胞迁移

Effect of Qigesan on the Rearrangement of the Actin Cytoskeleton in Esophageal Cancer Cells  
SHI Hui-juan<sup>1</sup>, SHI Dong-xuan<sup>2</sup>, and Li Jing<sup>1</sup> 1 Department of Traditional Chinese Medicine, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050011); 2 Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang (050011)

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of Qigesan (QGS) on the microfilament of esophageal cancer (ESCC) cells, and to explore its mechanism of inhibiting metastasis. **Methods** High differentiation human ESCC, Eca109, TE1, and low differentiation human ESCC, TE13 cell lines were used. Cells were divided into the control group (untreated) and the QGS group (100  $\mu\text{g/mL}$ ). The morphology of ESCC cells was observed by immunofluorescence. The expression of the microfilaments was determined by immunofluorescent staining method with confocal laser scanning fluorescence microscope. The adhesion and migration of the ESCC cells were observed by Electric cell-substrate impedance sensing. **Results** The microfilament array was more regular and the pseudopodia disappeared in the QGS group of the TE1, TE13 and Eca109 cells. In the control group the microfilaments demonstrated irregular array, and this irregularity was more evident in cell membrane, where the microfilaments were inordinate with different orientations extended pseudopodia. In the TE1 and TE13 cells, compared with the control group, the number of the regular-shaped cells was markedly increased in the QGS group ( $P < 0.05$ ). Electric cell-substrate impedance sensing showed that adhesion of stroma and ESCC cells treated with QGS was significantly lower than the control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the migration of ESCC cells with QGS was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** QGS can inhibit the rearrangement of microfilaments in ESCC cells, the adhesion between ESCC cells and the stroma, therefore significantly inhibit the migration of ESCC cells.

**KEYWORDS** Qigesan; esophageal cancer; microfilament cytoskeleton; cell migration

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81403310); 河北省科技厅课题资助项目(No. 13277718D)

作者单位: 1. 河北医科大学第四医院中医科(石家庄 050011); 2. 河北医科大学研究生学院(石家庄 050011)

通讯作者: 李 晶, Tel: 13931893011, E-mail: lijingtiger@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170802.194

WHO《全球癌症报告 2014》报道,2012 年全球食管癌新发 456 000 例,中国发生 223 000 例,占 48.9%,中国是世界上食管癌患病率和死亡率最高的国家<sup>[1]</sup>。河北磁县、涉县是我国食管癌集中高发区,发病率是国内平均水平的 5 倍,是世界平均水平的 10 倍,是全球最低水平地区的 100 倍以上<sup>[2]</sup>。河北是食管癌的高发地区,河北省肿瘤医院每年都会收治大量的食管癌患者,本课题组通过长期的临床观察发现大多食管癌患者存在口干、便秘、消瘦、舌质红、脉细等阴虚症候,即使食管癌术后的患者,阴虚体质仍然无善,而应用启膈散治疗食管癌患者能够明显抑制转移,延长患者生存期<sup>[3,4]</sup>。结合临床所见患者症候,认为启膈散为“甘润濡养”的代表方,能够针对食管癌“胃脘干槁”的病机进行干预治疗,从而抑制食管癌的转移<sup>[5]</sup>。《医学心悟》中也指出“凡噎膈症,不出胃脘干槁四字”<sup>[6]</sup>,应用启膈散“甘润濡养”以治噎膈。从临床实践来看启膈散能够抑制食管癌转移,但具体机制不明确,本研究旨在探讨启膈散抑制食管癌转移的机制。

## 材料及方法

1 细胞 高分化人食管癌细胞 TE1、Eca109 及低分化人食管癌细胞 TE13 购买于中国科学院上海生科院细胞资源中心,于河北省肿瘤研究所保存、培养、传代,由河北省肿瘤研究所单保恩教授惠赠。

2 主要试剂及仪器 RPMI 1640 培养液(美国 Corning 公司);新生牛血清(美国 Biological 公司);荧光标记鬼笔环肽(Phalloidin-FITC 美国 Molecular Probes 公司,货号:A12379,批号:1456973);荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CX41);激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司,型号:OLS4500);ECIS 细胞动态分析仪(美国 ABP 公司,型号:ECIS Z)。

3 药物 启膈散组成为:郁金 75 g 沙参 75 g 丹参 50 g 浮小麦 15 g 浙贝母 30 g 茯苓 30 g 砂仁 30 g 荷叶 15 g,所有药物均购自石家庄乐仁堂总店,由石家庄以岭药业采用水提法制备提取物。分装并储存于 -80 ℃ 冰箱,应用时用完全培养基配置 1 mg/mL 储存液,并用滤器过滤,保存于无菌离心管中,封口膜封口,储存于 4 ℃ 冰箱,应用时用完全培养基倍比稀释。

## 4 方法

4.1 细胞培养及药物处理分组 食管癌细胞均用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,在 37 ℃、CO<sub>2</sub> 体积分数为 5% 的饱和湿度条件下培养。倒置显微镜下观察待细胞贴壁生长至融合度达 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化并传代。前期实验证实,在启膈

散浓度为 100 μg/mL 时能够明显抑制食管癌细胞侵袭<sup>[7]</sup>,故本次实验将细胞分为对照组(未加药组)及启膈散组(培养细胞,待细胞贴壁生长至融合度达 60% 时,采用 100 μg/mL 启膈散作用细胞 24 h)。

4.2 免疫荧光法观察细胞形态的变化 FITC 标记的鬼笔环肽(phalloidin-FITC)可特异的与细胞的 F-actin 结合,从而显示微丝骨架在细胞中的分布<sup>[8]</sup>,可应用鬼笔环肽标记观察食管癌细胞的形态。将食管癌细胞 TE1 和 TE13(1×10<sup>6</sup>)接种于 24 孔板,待细胞贴壁后用启膈散(100 μg/mL)作用细胞 24 h,并设对照组,每组 3 个复空。将细胞用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。1 mL 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,1 mL 0.3% Triton X-100,室温透膜 10 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。

1 mL 10% BSA 封闭 30 min,室温,加入用 2% BSA 1:100 稀释的鬼笔环肽,4 ℃ 过夜。用含 0.1% Tween20 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。PBS 洗涤 1 次,5 min,甘油封片。荧光显微镜下观察结果,采集图像。计数 10 个高倍视野(×200)中形态规则的细胞数。

4.3 激光共聚焦显微镜观察微丝排列变化 采用 FITC 标记的鬼笔环肽标记人食管癌细胞 TE1、TE13 及 Eca109,具体步骤同免疫荧光,应用激光共聚焦显微镜观察结果,采集图像。

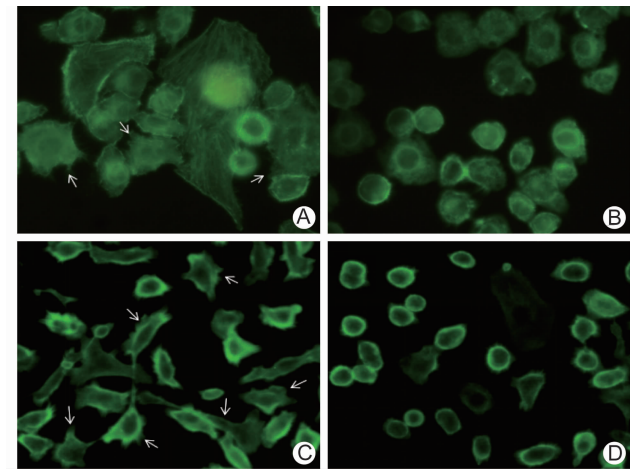
4.4 ECIS 法检测细胞与基质间的黏附力及细胞迁移能力 按照参考文献[9]的方法进行。将人食管癌细胞 TE1 及 TE13 分别接种于 ECIS 系统的 8 孔检测板上,以形成一个完整的单层。每个培养小孔的底板上含有一个金属膜电极片,ECIS 系统可以记录细胞与电极片接触后电极片上电阻值的变化。细胞种植后,细胞逐渐贴壁,引起电阻值的改变,记录电阻值的变化,可以反映细胞与小孔底部黏附力和黏附时间,从而反映经启膈散作用细胞在与基质间的黏附力上与对照组细胞的不同。当细胞贴满 8 孔检测板的底部,形成单细胞层,电阻值进入平台期。此时给予固定范围细胞持续 30 s、电压为 6 V 的电击,该局域细胞电击后死亡,引起电阻值降低。此后底部存活的细胞向周围延伸、爬行,电阻值再一次逐渐升高。电击后记录电阻值变化,反映了细胞的迁移能力。

5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组细胞中形态规则的细胞数目比较(表 1,

图 1) 与对照组比较,经启膈散作用的食管癌细胞,伪足消失,形状规则,更接近于正常的食管上皮细胞。与对照组比较,启膈散组人食管癌细胞 TE1 和 TE13 中形态规则的细胞数目明显增多( $P < 0.05$ )。



注:A 为 TE13 细胞对照组;B 为 TE13 细胞启膈散组;C 为 TE1 细胞对照组;D 为 TE1 细胞启膈散组;箭头所指为细胞伪足

图 1 各组鬼笔环肽免疫荧光结果 (FITC 标记,  $\times 200$ )

表 1 两组细胞中形态规则的细胞数目比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | TE1                | TE13               |
|-----|---|--------------------|--------------------|
| 对照  | 3 | 9.33 $\pm$ 3.05    | 7.66 $\pm$ 2.51    |
| 启膈散 | 3 | 26.00 $\pm$ 3.60 * | 27.33 $\pm$ 3.21 * |

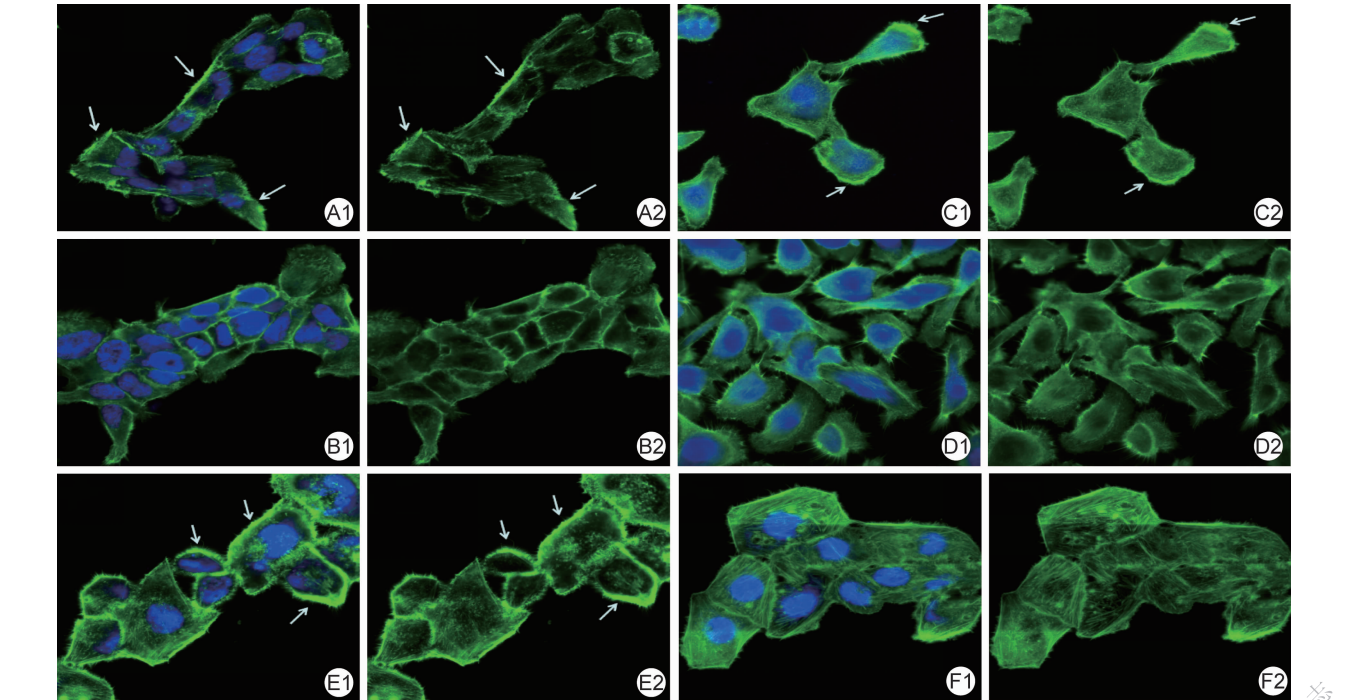
注:与对照组比较, \* $P < 0.01$

2 两组食管癌细胞微丝骨架比较(图 2) 食管癌细胞 TE13 中(图 2 A,B),启膈散组微丝排列更规则,对照组细胞中微丝排列混乱,且以细胞膜微丝排列不规则更为明显,在细胞膜上微丝排列缺乏同向性,向外伸出细小伪足。食管癌细胞 TE1 中(图 2 C,D),启膈散对微丝排列的影响并不十分明显,仅能够看到相较于启膈散组的细胞,对照组细胞微丝向细胞膜聚集的趋势更明显。食管癌细胞 Eca109(图 2 E,F)中,启膈散组细胞微丝排列的同向性增强,微丝排列规律,对照组细胞中微丝排列杂乱无章。

3 两组细胞与基质黏附力及细胞迁移能力比较(表 2,图 3) 与对照组比较,启膈散组 TE13 细胞、TE1 细胞与基质的黏附力及细胞迁移能力明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

讨 论

启膈散出自清·程国彭的《医学心悟》,其中沙参滋阴生津、清热凉血,能养胃阴而复津液。郁金芳香宣达,为血中之气药,故能行气化瘀,清心解郁,两药合用可滋润干槁之胃脘,调理阻滞之气机,为君药。茯苓渗湿化痰、益脾和胃、宁心安神;丹参活血祛瘀、清心除烦;川贝润肺化痰、泄热散结。三药共奏益脾和胃、活血化痰之功,合为臣药。砂仁,温脾胃,行滞气,为佐药,



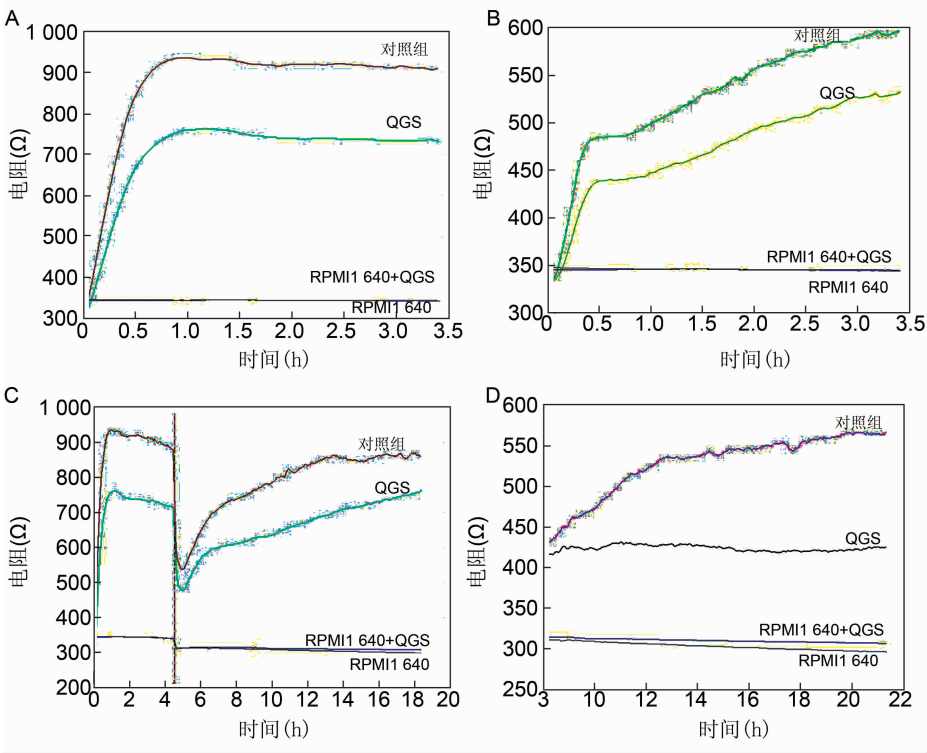
注:A1~F1 为用 DAPI 染细胞核图片,A2~F2 为 DAPI 未显色,单纯鬼笔环肽标记细胞微丝骨架显色结果;A 为 TE13 细胞对照组;B 为 TE13 细胞启膈散组;C 为 TE1 细胞对照组;D 为 TE1 细胞启膈散组;E 为 Eca109 细胞对照组;F 为 Eca109 细胞启膈散组;箭头所指为细胞微丝在细胞膜聚集并伸出细小伪足

图 2 激光共聚焦显微镜观察启膈散对食管癌细胞中微丝排列的影响 (油镜,  $\times 600$ )

表 2 两组细胞与基质黏附力及细胞迁移能力比较 (Ω,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | 黏附力               |                  | 迁移能力              |                  |
|-----|---|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
|     |   | TE1               | TE13             | TE1               | TE13             |
| 对照  | 3 | 911.00 ± 32.51    | 607.33 ± 33.6    | 911.00 ± 32.51    | 607.33 ± 33.6    |
| 启膈散 | 3 | 701.66 ± 29.02 ** | 511.33 ± 27.15 * | 701.66 ± 29.02 ** | 511.33 ± 27.15 * |

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$



注:A 为两组 TE1 细胞基质黏附力比较;B 为两组 TE13 细胞基质黏附力比较;C 为两组 TE1 细胞迁移力比较;D 为两组 TE13 细胞迁移力比较

图 3 ECIS 法观察食管癌细胞与基质间的黏附及食管癌细胞迁移

能辅诸药,使气血行而不滞。荷叶、浮小麦醒脾开胃,为使药。全方针对干槁之胃脘共同起到了甘润濡养之功,为治疗食管癌的经典方剂。针对启膈散治疗食管癌的研究涉及细胞连接、免疫调节、细胞增殖及对血管内皮的影响等方面<sup>[7,10-12]</sup>,但针对进一步的机制研究开展较少。

微丝是由肌动蛋白分子螺旋状聚合成的纤丝,又称肌动蛋白丝,与微管和中间纤维共同组成细胞骨架,与细胞贴附、内吞、细胞分裂及细胞极性、黏附与迁移等密切相关<sup>[13]</sup>。细胞微丝骨架重构,不仅影响细胞形态,而且会改变细胞的运动能力,使肿瘤细胞更易发生迁移,侵袭和转移<sup>[14]</sup>,因此细胞微丝骨架重构是肿瘤进展的一个重要方面<sup>[15]</sup>。启膈散中应用沙参、茯苓等甘淡之品,稍佐砂仁等芳化之物,针对食管癌“胃脘干槁”之病机能够做到“养阴不滋腻,化痰不燥湿”,明显抑制食管癌细胞迁移。本次实验进一步证实经启膈散作用后食管癌细胞形态的变化,从而明确启膈散抑制食管癌细胞

迁移的机制。用鬼笔环肽标记细胞微丝,比较食管癌细胞经启膈散作用前后细胞形态的变化。结果证实,经启膈散作用后食管癌细胞形态明显改变,伪足减少,细胞形态变得更规则。有研究表明,中药及其复方对于恶性肿瘤细胞骨架重组具有良好的抑制作用<sup>[16,17]</sup>,但目前针对启膈散对细胞微丝骨架的影响尚无相关报道。

细胞微丝参与的细胞骨架的重组不仅会使细胞形态改变,伸出伪足,还会使细胞膜表面粗糙度增加<sup>[18]</sup>,从而导致肿瘤细胞与细胞外基质黏附性和迁移能力增强。本次实验证实启膈散能够明显抑制食管癌细胞微丝骨架重排。经启膈散作用后的食管癌细胞中微丝排列更规则,而对照组细胞中微丝排列混乱,且以细胞膜微丝排列不规则更为明显,在细胞膜上微丝排列缺乏同向性,向外伸出细小伪足。本次实验进一步通过细胞阻抗检测技术证实了经启膈散作用后食管癌细胞与基质的黏附力明显降低,食管癌细胞的迁移能力也显著下降。

综上所述,启膈散是治疗食管癌的传统中药复方,本研究认为该方为“甘润濡养”之品,能够针对食管癌“血液衰耗,胃脘干槁”的根本病机给予治疗,从而达到抑制食管癌细胞转移的作用。但本研究仍处于基础研究阶段,有待临床试验的进一步证实。

### 参 考 文 献

- [1] Stewart BW, Wild CP. World Cancer Report 2014 [M]. Lyon: IARC Press, 2014: 374-382.
- [2] Liu P, Gao Y, Huan J, et al. Upregulation of PAX2 promotes the metastasis of esophageal cancer through Interleukin-5 [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 740-754.
- [3] 张侨. 启膈散联合化疗治疗晚期食管癌的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [4] 陈高阳, 张志胜, 曹乃宪. 启膈散加减联合同步放化疗治疗中晚期食管癌 30 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2011, 43(10): 31-32.
- [5] 李晶, 史会娟. 以甘润濡养立法的启膈散治疗食管癌概况 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(18): 2198-2120.
- [6] 清·程钟龄. 医学心悟 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2003: 138.
- [7] Shi H, Shi D, Wu Y, et al. Qigesan inhibits migration and invasion of esophageal cancer cells via inducing connexin expression and enhancing gap junction function [J]. Cancer Letters, 2016, 380(1): 184-190.
- [8] Xiong D, Liou Y, Shu J, et al. Down-regulating ribonuclease inhibitor enhances metastasis of bladder cancer cells through regulating epithelial-mesenchymal transition and ILK signaling pathway [J]. Exp Mol Pathol, 2014, 96(3): 411-421.
- [9] Jiang WG, Ye L, Ke Ji, et al. Inhibitory effects of Yangzheng Xiaoji on angiogenesis and the role of the focal adhesion kinase pathway [J]. Int J Oncol, 2012, 41(5): 1635-1642.
- [10] 杨联河, 赵雪艳, 郭彬, 等. 低氧条件下启膈散与顺铂抑制食管癌细 EC9706 增殖的协同效应 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2098-2100.
- [11] 吕翠田, 董志斌, 陈玉龙. 启膈散对食管癌小鼠生存质量及免疫调节的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1806-1809.
- [12] 崔姗姗, 尹素改, 吴耀松, 等. 食管癌 EC9706 细胞启膈散与六君子汤条件培养基对脐静脉内皮细胞的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 4(31): 1230-1233.
- [13] Ouderkirk JK, Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis [J]. Cytoskeleton (Hoboken), 2014, 71(8): 447-463.
- [14] Maes H, Van Eygen S, Krysko DV, et al. BNIP3 supports melanoma cell migration and vasculogenic mimicry by orchestrating the actin cytoskeleton [J]. Cell Death Dis, 2014, 13(5): e1127.
- [15] Peckham M. How myosin organization of the actin cytoskeleton contributes to the cancer phenotype [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(4): 1026-1034.
- [16] 高静, 毕蕾, 江玉翠, 等. 人参水提液对 TAMs 与肿瘤细胞共培养体系肺癌 A549 细胞生物学行为的影响 [J]. 中国中西医结合志, 2017, 37(3): 345-350.
- [17] 杨珺超, 徐璐, 宋康, 等. 虎杖苷对 TGF- $\beta_1$  诱导的人类肺泡上皮 A549 细胞 EMT 的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(4): 466-470.
- [18] LeBaron RG, Athanasiou KA. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials [J]. Tissue Eng, 2000, 6(2): 85-103.

(收稿: 2016-03-24 修回: 2017-07-29)

责任编辑: 白 霞