

健脾化痰方体外通过外泌体影响肝癌细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化

冯坤良^{1,2,3}, 陈清莲^{1,2,3}, 谢春风^{1,2,3}, 钟崇^{2,3}(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院肝胆外科, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨健脾化痰方(JHD)通过外泌体对肝癌细胞迁移、侵袭及上皮间质转化(EMT)的影响。**方法** 利用转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)刺激 MHCC97H 细胞, 构建肝癌细胞 EMT 模型。根据处理条件, 将细胞分为 4 组, ①对照组: 不进行干预; ②模型组: TGF- $\beta 1$ (10 ng·mL⁻¹); ③JHD 低浓度组: TGF- $\beta 1$ (10 ng·mL⁻¹)+健脾化痰方(2 mg·mL⁻¹); ④JHD 高浓度组: TGF- $\beta 1$ (10 ng·mL⁻¹)+健脾化痰方(4 mg·mL⁻¹)。干预 48 h 后, 采用超速离心法提取各组细胞培养上清液的外泌体, 通过透射电镜(TEM)、纳米颗粒追踪分析(NTA)、Western Blot 法检测外泌体标志蛋白(CD63、CD81、HsP70、CD9), 以及外泌体内吞实验对外泌体进行鉴定。将提取的 4 组外泌体分别与 MHCC97H 细胞共培养 24 h/48 h 后, 分离 MHCC97H 细胞, 进行划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验及 Western Blot 法检测 EMT 相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、Vimentin)。**结果** 透射电镜下观察到外泌体的形态呈囊泡状, 分布不一, 有单个分布, 也有聚集成组, 背景清晰, 无明显污染物, 各组外泌体形态相近, 无明显差异, 直径在 30~140 nm 之间; 纳米颗粒追踪分析仪检测到 4 组外泌体粒径的峰值在 130~150 nm 之间, 与电镜观察结果基本一致; 各组均可检测到外泌体标志蛋白 CD63、CD81、HsP70、CD9 表达。被 PKH26 标记的外泌体可被 MHCC97H 细胞重新吸收内化。与对照组比较, 模型组的 MHCC97H 细胞迁移能力(24、48 h)及侵袭能力均显著增强($P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$), Vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较, JHD 高、低浓度组的 MHCC97H 细胞迁移能力(24、48 h)及侵袭能力显著减弱($P < 0.01$), E-cadherin 蛋白表达显著上调($P < 0.01$), Vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。**结论** 健脾化痰方体外可通过外泌体抑制 MHCC97H 细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化。

关键词: 健脾化痰方; 肝细胞癌; 外泌体; 上皮间质转化; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1745-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.002

Jianpi Huayu Decoction Inhibits Migration, Invasion and EMT of Hepatoma Carcinoma Cell through Regulation of Exosome

FENG Kunliang^{1,2,3}, CHEN Qinglian^{1,2,3}, XIE Chunfeng^{1,2,3}, ZHONG Chong^{2,3}(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 3. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the effects of *Jianpi Huayu* decoction(JHD) on migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition(EMT) of liver cancer cells by regulation of exosome. **Methods** The liver cancer cells of MHCC97H strain were stimulated with TGF- $\beta 1$ to establish the EMT model. The MHCC97H cells were cultured in

收稿日期: 2020-11-17

作者简介: 冯坤良, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与肿瘤。Email: kunlifeng@163.com。通信作者: 钟崇, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药药理与肿瘤。Email: zhongchong1732@gzucm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873303); 广东省基础与应用基础研究基金项目(2019A1515011013); 广东省教育厅普通高校重点项目(2019KZDXM045)。

in vitro, and divided into four groups according to the stimulations, including Control group cells (no intervention), Model group cells (TGF- β 1 group, 10 ng·mL⁻¹), JHD low dose group (TGF- β 1 10 ng·mL⁻¹ + JHD 2 mg·mL⁻¹), and JHD high dose group (TGF- β 1 10 ng·mL⁻¹ + JHD 4 mg·mL⁻¹). After treatment for 48 hours, cell culture supernatants were collected and exosomes were isolated by ultracentrifugation. The exosomes were then identified using transmission electron microscope (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA). Western Blot was used to detect the marker proteins of exosomes (CD63, CD81, HsP70, and CD9); and were identified by endocytosis experiment. The exosomes from four groups isolated as above were respectively cocultured with MHCC97H cells for 48 hours, then the MHCC97H cells were collected for wound healing assay, transwell assay, and Western Blot was used to detect EMT related proteins (E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin). **Results** TEM observation showed that, the exosomes extracted from different groups were vesicles of different types, similar in morphology, some were singly distributed, and some were gathered together, with a diameter of 30–140 nm. The background was clear without obvious pollutants. NTA revealed the peak values of exosomes from four groups were between 130–150 nm, almost the same with those observed under TEM. All extracted nanoparticles expressed CD63, CD81, HsP70 and CD9, which were further confirmed that the isolated nanoparticles were exosomes. Exosomes labeled with PKH26 can be absorbed and internalized by MHCC97H cells. Compared with the Control group, the cell migration (24 h, 48 h) and invasion abilities of Model group cells were significantly increased ($P < 0.01$); expression of E-cadherin was significantly downregulated ($P < 0.01$); the expression levels of Vimentin and N-cadherin were upregulated obviously ($P < 0.01$). Compared with Model group, the vertically-migrating (24 h, 48 h) and invasion abilities of JHD low dose group and JHD high dose group were significantly reduced ($P < 0.01$). The expression levels of E-cadherin in JHD low dose group and JHD high dose group were higher ($P < 0.01$); the expression levels of Vimentin and N-cadherin were lower than those in Model group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Jianpi Huayu* decoction inhibits migration, invasion and EMT of MHCC97H cells possibly through regulation of exosomes.

Keywords: *Jianpi Huayu* decoction; hepatocellular carcinoma; exosome; epithelial-mesenchymal transition; migration; invasion

原发性肝癌(简称肝癌)是最常见的恶性肿瘤之一,根据最近的全球癌症统计数据^[1],2018年新增肝癌患者约84万人,在全部恶性肿瘤中排第6位,新增死亡人数约78万人,在肿瘤致死病因中排第4位。

上皮间质转化(EMT)是上皮肿瘤细胞失去上皮特征并获得间质表型的过程,它被认为是肿瘤细胞获得更高侵袭和转移能力的关键步骤^[2]。转化生长因子(TGF) β 1是TGF- β 家族最重要的成员之一,它可以导致癌细胞的上皮间质转化^[3-4]。外泌体是细胞分泌的一种微小囊泡(直径30~150 nm),其中包含大量的生物活性物质,包括DNA、RNA和蛋白质^[5]。外泌体通过多种机制在细胞间通讯中发挥重要作用,进而影响癌症的发生发展^[6]。肿瘤细胞分泌的外泌体可以通过自分泌、旁分泌和内分泌机制被相同或其他类型的细胞内化,从而促进肿瘤生长、侵袭和转移^[7]。外泌体在肝脏的生理、病理(尤其是肝细胞癌)

过程中发挥了重要作用。临床研究^[8]表明,健脾化癥方(JHD)联合西医手段治疗肝癌可以提高临床疗效。本课题组前期通过体内外实验研究^[9]发现,健脾化癥方可以抑制肝癌细胞的EMT,进而抑制其侵袭及转移。故本研究拟从外泌体分泌的角度探讨健脾化癥方抑制肝癌侵袭转移的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞 高转移性人肝癌细胞株 MHCC97H,购自中国科学院上海细胞库。

1.2 中药及其制备 健脾化癥方组成:人参 20 g(批号:201269)、白术 15 g(批号:201001)、茯苓 15 g(批号:2011010)、山药 12 g(批号:200901)、丹参 15 g(批号:YPB0C0002)、牡丹皮 10 g(批号:Q0970111)、莪术 10 g(批号:201201)、郁金 10 g(批号:201102681)、柴胡 15 g(批号:201101681)、甘草 6 g(批号:2011001061),均由广州中医药大学

第一附属医院中药房统一提供来源于道地产区的中药饮片,符合《中华人民共和国药典》标准。健脾化痰方药液制备:取 5 剂量药材,加 10 倍量的水煎煮、浓缩,微波真空干燥得到粗粉;用 PBS 配制成浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液(以生药量计),以 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径 16 cm)反复离心 3 次,每次 10 min;取上清液用滤膜过滤,灭菌备用。

1.3 主要试剂 TGF- β 1(货号:100-21),美国 Peprotech 公司;PKH26 荧光标记试剂盒(货号:MINI26-1KT),美国 Sigma-Aldrich 公司;BCA 蛋白定量检测试剂盒(货号:KGP903),南京凯基生物科技有限公司;兔一抗 CD63(货号:ab205718)、CD81(货号:ab109201)、HsP70(货号:ab194360)、CD9(货号:ab263019)、E-cadherin(货号:ab40772)、N-cadherin(货号:ab207608)及 Vimentin(货号:ab52942),均购自英国 Abcam 公司;兔抗 β -actin(货号:A01011)、羊抗兔 HRP 标记二抗(货号:A21020),均购自武汉 Abbkine 生物技术公司。

1.4 主要仪器 NU-5800E 型细胞培养箱,美国 Nuair 公司;Epoch 全波长酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;1645050 型电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;GL-21B 型高速离心机,上海安亭科学仪器厂;Optima MAX-TL 超高速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;CKX53 型荧光显微镜,日本 Olympus 公司;JEM-1230 型透射电镜(TEM)显微镜,日本 JEOL 公司;Nanosight LM10 型纳米颗粒跟踪分析(NTA)仪,英国 Malvern 公司;WES 全自动蛋白质免疫印迹定量分析系统,美国 Proteinsimple 公司。

1.5 细胞分组及干预 将 MHCC97H 细胞按以下方法分为 4 组并进行相应干预,①对照组:不进行干预;②模型组:TGF- β 1($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$);③JHD 低浓度组:TGF- β 1($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)+健脾化痰方($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);④JHD 高浓度组:TGF- β 1($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)+健脾化痰方($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。干预 48 h 后,从细胞培养液提取外泌体,所得 4 组外泌体再分别与 MHCC97H 细胞共培养。

1.6 超速离心法提取外泌体 收集体外培养并经过不同干预处理的 4 组 MHCC97H 细胞培养液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $300 \times g$ 离心 10 min;取上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $2\,000 \times g$ 离心 10 min;取上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $10\,000 \times g$ 离心 30 min;取上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $100\,000 \times g$ 离心 70 min;吸弃上清,加入 PBS 重悬,4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 $100\,000 \times g$ 离心 70 min;吸弃上清,沉淀即为外泌体,保存备用。

1.7 透射电镜观察外泌体颗粒形态 将各组外泌体用 $100 \mu\text{L}$ 2%多聚甲醛重悬;取 $5 \mu\text{L}$ 外泌体悬液至封口膜上,将铜网有膜面漂浮在液滴上,室温下静止 20 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;以 1%戊二醛固定 5 min;双蒸水漂洗 10 次,每次 2 min;4%醋酸双氧铀负染 5 min;滤纸吸去残液,室温下晾干后,进行透射电镜观察。

1.8 纳米颗粒追踪分析仪检测外泌体大小及粒径分布 将各组外泌体用 $300 \mu\text{L}$ 的 PBS 进行重悬,向外泌体重悬液加入 10 mL 的 PBS 溶液进行稀释;向样品池加入 1 mL 的二次稀释液样品,启动纳米颗粒追踪分析仪完成测试。

1.9 WES 全自动蛋白质免疫印迹定量分析系统检测外泌体标志蛋白 分别提取 4 组外泌体蛋白,并进行蛋白定量、变性,取等量蛋白加入上样板中;稀释一抗(CD63、CD81、HsP70、CD9, 1:2 000)、二抗(1:3 000),并加入到 WES 全自动蛋白质免疫印迹定量分析系统。设置参数:分离胶吸取时间 200 s;浓缩胶吸取时间 15 s;样品吸取时间 9 s;电泳时间 25 min;电泳恒压 375 V;凝胶清除时间 230 s;洗涤 3 次,每次浸泡 150 s;封闭时间 5 min;一抗孵育时间 30 min;二抗孵育时间 30 min;发光液曝光时间:自动。

1.10 外泌体内吞实验 将对照组外泌体沉淀用 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬后,加入适量 PKH26 染料工作液,涡旋振荡器混匀 1 min,再静置孵育 10 min;向孵育后的外泌体-染料复合物中加入 10 mL 的 PBS,混匀;按照外泌体提取步骤再次提取外泌体以去除多余染料;取 $100 \mu\text{L}$ PBS 重悬沉淀物;将 PKH26 标记的外泌体与 MHCC97H 细胞共培养 48 h 后,用 4%多聚甲醛固定;加入 2 mL DAPI 染色液,孵育 10 min 后,用 PBS 漂洗 3 次;然后在荧光显微镜下观察、拍照。

1.11 细胞划痕实验 收集经过不同对应组别外泌体共培养处理的 4 组 MHCC97H 细胞,分别接种到 6 孔板(每孔 5×10^5 个细胞),待细胞铺满后进行划痕操作,显微镜下拍照记录;继续培养 24 h、48 h 后,再次在显微镜下拍照记录。采用 ImageJ 软件测量划痕宽度,计算:细胞迁移率(%)=(实验组给药前距离-实验组给药后距离)/(对照组给药前距离-对照组给药后距离) $\times 100\%$ 。

1.12 Transwell 细胞侵袭实验 收集经过不同对应组别外泌体共培养处理的 4 组 MHCC97H 细胞,分别接

种到铺有 Matrigel 胶的 24 孔板上室中(每孔 5×10^4 个细胞), 下室加入 500 μL 含 20% 血清的培养基; 继续培养 24 h 后, 取出小室并擦去上室细胞, 甲醇固定后以 0.1% 结晶紫染色; 显微镜下拍照记录, 采用 ImageJ 软件统计侵袭细胞数。

1.13 Western Blot 法检测 EMT 相关蛋白表达 收集经过不同对应组别外泌体共培养 48 h 处理的 4 组 MHCC97H 细胞; 以 RIPA 裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法进行蛋白质定量; 将等量蛋白通过 10% SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上; 以 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 90 min; 加入一抗 E-cadherin(1 : 1 000)、N-cadherin(1 : 1 000)、Vimentin(1 : 1000)、 β -actin(1 : 5 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入羊抗兔二抗(1 : 3 000), 室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 最后, 加入化学荧光发光试剂后曝光、显影, 以 β -actin 为内参, 采用 ImageJ 软件对目的蛋白进行半定量分析。

1.14 统计学处理方法 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 Tukey 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体的分离与鉴定 结果见图 1。透射电镜下观察到外泌体的形态呈囊泡状, 分布不一, 有单个分布, 也有聚集成组, 背景清晰, 无明显污染物, 各组外泌体形态相近, 无明显差异, 直径在 30~140 nm 之间(图 1-A)。纳米颗粒追踪分析仪检测到 4 组外泌体粒径的峰值在 130~150 nm 之间(图 1-B), 与电镜观察结果基本一致。WES 全自动蛋白质免疫印迹定量分析系统检测到各组外泌体标志蛋白 CD63、CD81、HsP70、CD9 均有表达(图 1-C)。上述结果说明, 超速离心法提取外泌体的方法可靠。

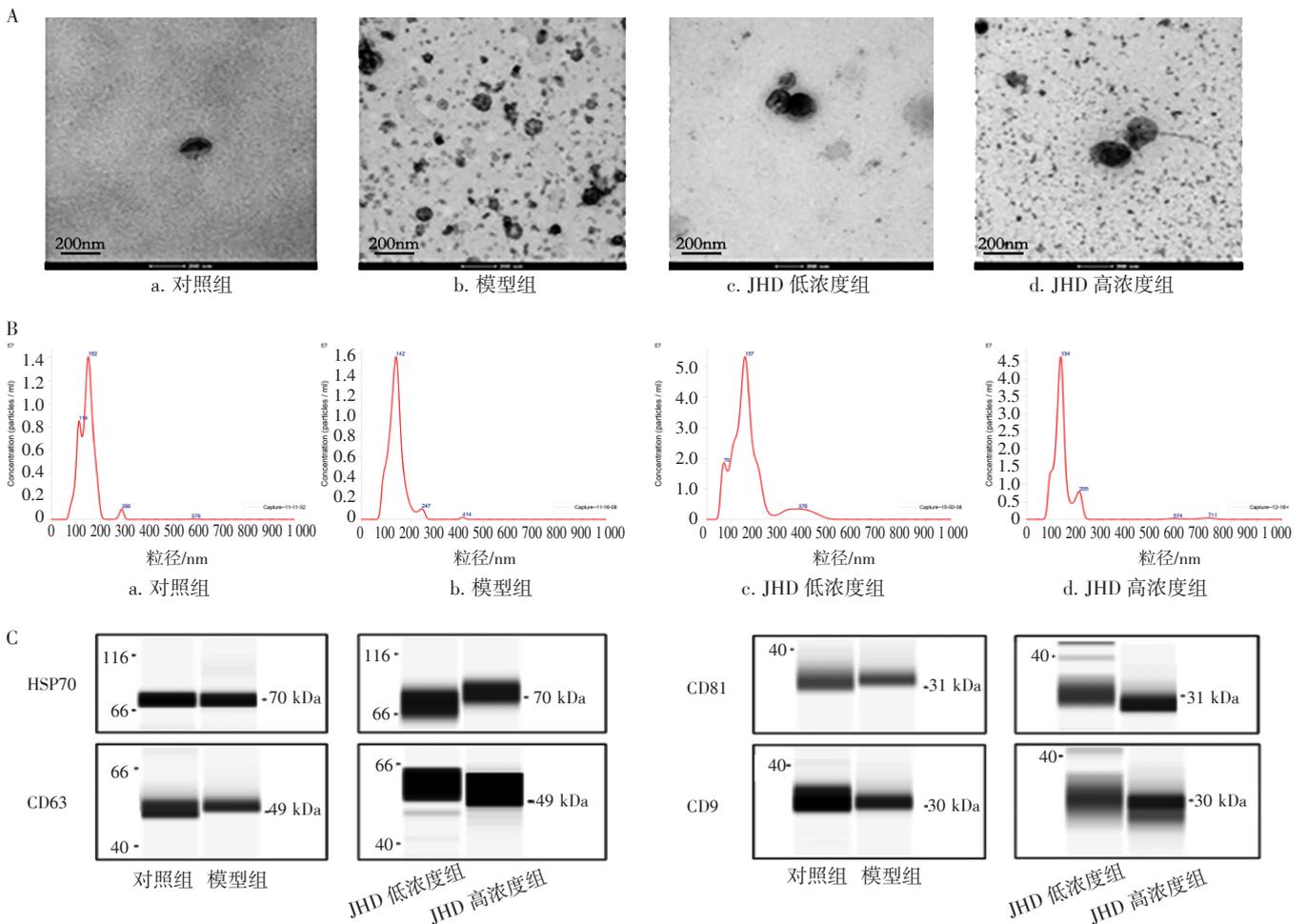


图 1 经健脾化痰方(JHD)干预后 MHCC97H 细胞来源外泌体的形态特征(A)、粒径分布(B)及标志蛋白表达(C)
Figure 1 Morphological characteristics, particle size distribution and related protein expression of MHCC97H cell-derived exosomes after Jianpi Huayu decoction intervention

2.2 外泌体内吞实验 结果见图 2。对提取所得的对照组外泌体进行了 PKH26 荧光探针标记，然后与 MHCC97H 细胞共培养 48 h 后，外泌体位于该细胞

的细胞质中。结果表明，MHCC97H 细胞来源的外泌体可被 MHCC97H 细胞重新吸收内化，“1.6”项下制备获得的外泌体是可靠的。

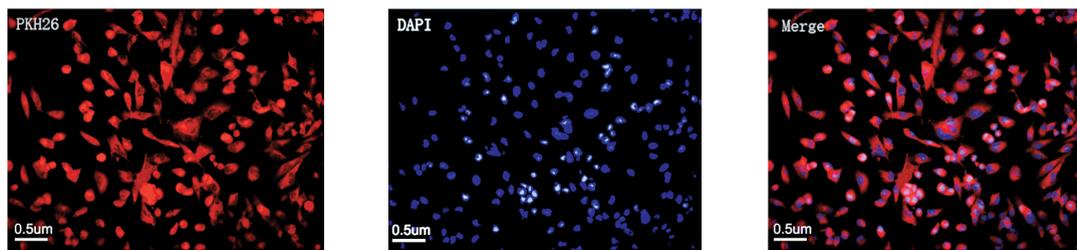
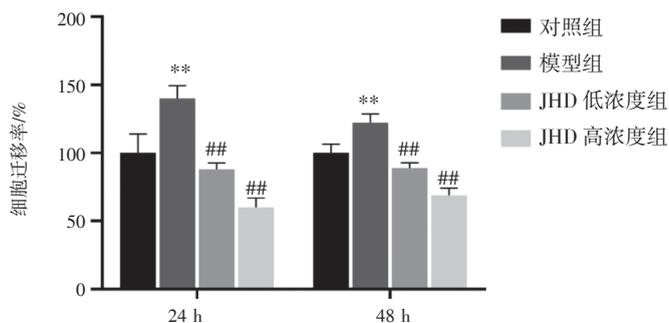
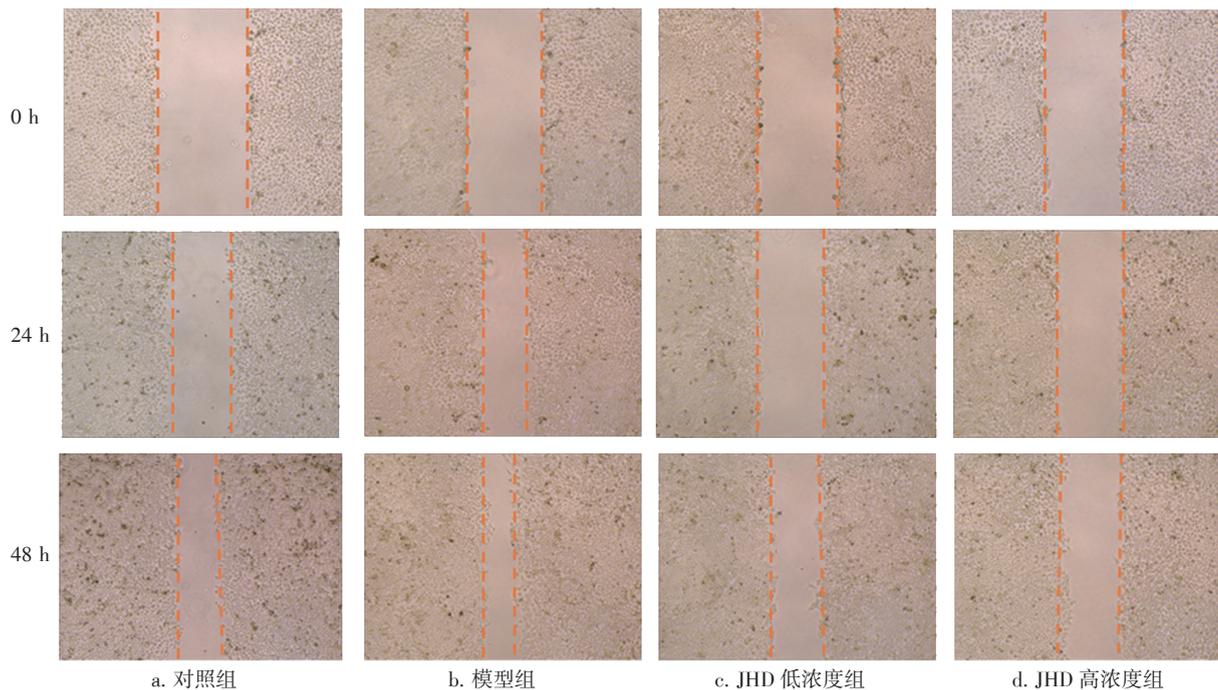


图 2 外泌体被 MHCC97H 细胞重新吸收内化(PKH26 荧光探针, ×200)

Figure 2 Exosomes can be endocytosed by MHCC97H cells(PKH26 fluorescent probe, ×200)

2.3 健脾化痰方通过外泌体抑制 MHCC97H 细胞的迁移、侵袭及 EMT 结果见图 3、图 4、图 5。与对照组比较，模型组的 MHCC97H 细胞迁移能力(24、48 h)及侵袭能力均显著增强($P < 0.01$)，E-cadherin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)，Vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较，JHD

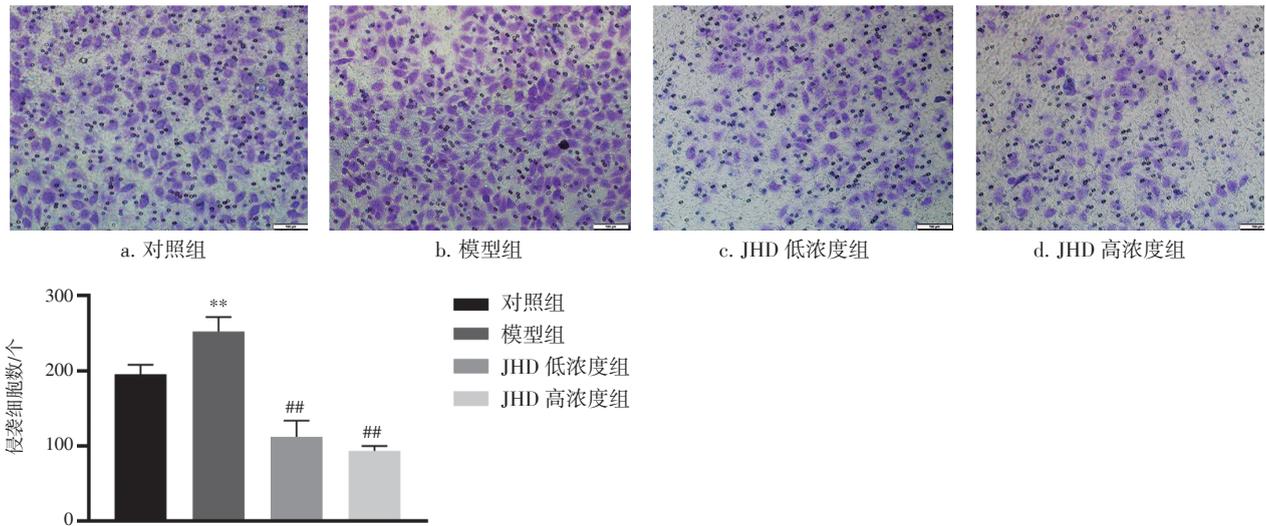
高、低浓度组的 MHCC97H 细胞迁移能力(24、48 h)及侵袭能力显著减弱($P < 0.01$)，E-cadherin 蛋白表达显著上调($P < 0.01$)，Vimentin、N-cadherin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。结果表明，健脾化痰方体外可通过外泌体抑制 MHCC97H 细胞的迁移、侵袭及 EMT。



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$

图 3 健脾化痰方(JHD)体外通过外泌体抑制 MHCC97H 细胞的迁移($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

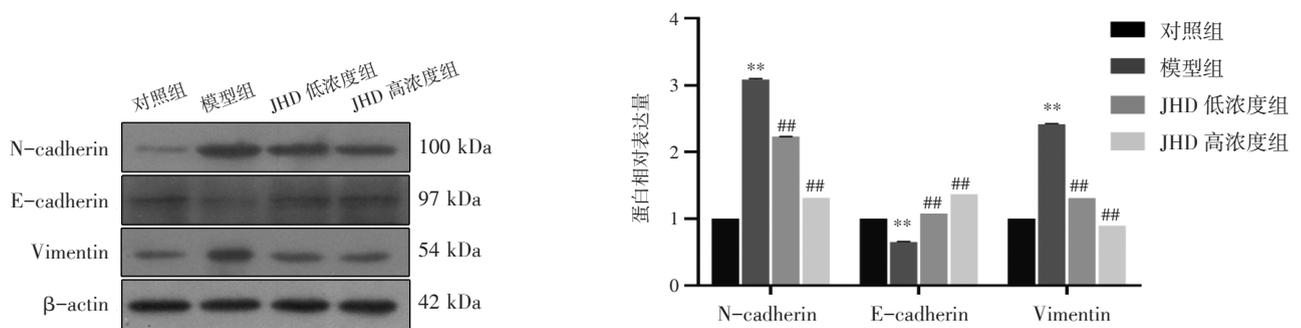
Figure 3 Jianpi Huayu decoction inhibits invasion of MHCC97H cell through regulation of exosomes ($\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图4 健脾化痰方(JHD)体外通过外泌体抑制 MHCC97H 细胞的侵袭(结晶紫染色, $\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 4 *Jianpi Huayu* decoction inhibits metastasis of MHCC97H cell through regulation of exosomes(Crystal violet staining, $\times 200$; $\bar{x} \pm s, n=3$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图5 健脾化痰方(JHD)体外通过外泌体对 MHCC97H 细胞上皮间质转化相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 5 *Jianpi Huayu* decoction regulates the expression of EMT related proteins in MHCC97H cells through regulation of exosomes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，目前西医对肝癌的治疗方法主要有肝癌切除术、肝动脉插管化疗栓塞术、消融、放疗、分子靶向药物等^[10]。但由于肝癌细胞侵袭能力强，导致其早期转移率及术后复发率较高，2012~2015 年中国肝癌患者 5 年生存率仅有 12.1%^[11]。近年来，临床研究^[12]表明，中西医结合治疗肝癌可改善患者的症状及预后。

肝癌属中医的“积聚”范畴，病位主要在于肝脾。“正气亏虚”为肝癌发生的基本病机之一，“健脾益气”是其治疗的重要原则。此外，积聚的主要病理变化为气滞、血瘀、痰结，其中聚证以气滞为主，而积证以血瘀为主，因此“化痰消癥”也是治疗肝癌的重要方法。健脾化痰方正是针对“肝郁脾虚”“气滞血瘀”两大基本证型而组方，具有活血化

瘀，健脾益气的功效。其中人参为君药以大补脾气，山药、白术、茯苓三药为臣，共奏健脾渗湿之功；牡丹皮、丹参、郁金及莪术用于活血、止痛、化痰，均为佐药；柴胡引诸药入肝经，甘草调和诸药，为使药。临床研究^[8, 13]表明，健脾化痰法配合化疗、手术治疗，可提高肝癌患者生活质量，改善预后。

研究^[14-16]表明，健脾化痰方可通过诱导凋亡、抑制上皮间质转化、抑制细胞增殖、抑制肿瘤新生血管生成等多种机制来抑制肝癌进展。近年来大量研究^[17-19]表明，外泌体被认为是肝癌的潜在治疗靶点，外泌体能够通过多种途径促进肝细胞癌的进展，包括上皮间质转化、血管生成、免疫应答等。此外，外泌体是细胞膜衍生的纳米颗粒，免疫原性低，可作为药物载体^[20]。外泌体在肝癌微环境的建立以及肝癌的发生、发展、侵袭、转移乃至诊断、治疗和预后

中起着重要作用。本课题组前期研究^[8]发现, 健脾化痰方可抑制肝癌细胞的迁移、侵袭及转移。故本研究尝试从外泌体的角度探讨了健脾化痰方抑制肝癌侵袭转移的机制。

本研究采用超高速离心法提取健脾化痰方处理后的 MHCC97H 细胞的外泌体, 并通过透射电镜观察、纳米颗粒追踪分析仪检测及 WES 全自动蛋白质免疫印迹定量分析系统检测证明, 所获得的外泌体是可靠的。此外, 进一步通过外泌体内吞实验显示, PKH26 标记的外泌体可被 MHCC97H 细胞重新吸收内化。研究结果显示, 经过健脾化痰方处理的肝癌细胞所分泌的外泌体能重新进入肝癌细胞并发挥抑癌作用, 使肿瘤细胞的 E-cadherin 蛋白表达上调, N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达下调, 上皮间质转化水平降低, 从而显著降低了肝癌细胞的迁移及侵袭能力。本研究验证了健脾化痰方可体外通过外泌体抑制 MHCC-97H 细胞的迁移、侵袭及上皮间质转化, 进一步阐明了健脾化痰方抑制肝癌进展的机制。

近期还有研究发现, 外泌体的促癌作用与其携带的小分子相关, You 等^[21]发现, Linc00161 可通过抑制 miR-590-3p, 激活 ROCK2 信号通路, 从而促进肝癌的发生; Fang 等^[22]发现, 高转移肝癌细胞可通过外泌体分泌 miR-1247-3p, 调节 B4GALT3, 进而促进癌症进展。推测健脾化痰方通过外泌体抑制肝癌细胞的上皮间质转化可能与抑制外泌体的形成, 从而减少一些促癌分子的传递, 以及调控外泌体中某些促癌分子的表达有关。

综上所述, 健脾化痰方可能通过外泌体途径抑制肝癌细胞的侵袭、转移及上皮间质转化, 但其调控外泌体的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献:

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[2] MAJUMDAR A, CURLEY S A, WU X, et al. Hepatic stem cells and transforming growth factor beta in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(9): 530-538.

[3] SHI C, ZHANG Y, YANG H, et al. Combined effect of ultrasound/SonoVue microbubble on CD4(+) CD25(+) regulatory T cells viability and optimized parameters for its transfection[J]. *Ultrasonics*, 2015, 62: 97-102.

[4] MASSAGUE J. TGFβ in cancer[J]. *Cell*, 2008, 134(2): 215-230.

[5] SIMONS M, RAPOSO G. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575-581.

[6] KALLURI R. The biology and function of exosomes in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1208-1215.

[7] ZENG A L, YAN W, LIU Y W, et al. Tumour exosomes from cells harbouring PTPRZ1-MET fusion contribute to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastoma[J]. *Oncogene*, 2017, 36(38): 5369-5381.

[8] 钟崇, 李惠东, 陈智远, 等. 健脾化痰中药治疗肝癌临床研究[J]. *新中医*, 2013, 45(12): 129-132.

[9] ZHONG C, ZHANG Y F, HUANG J H, et al. The Chinese medicine, *Jianpi Huayu* decoction, inhibits the epithelial mesenchymal transition via the regulation of the Smad3/Smad7 cascade[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2694-2711.

[10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. *中国实用外科杂志*, 2020, 40(2): 121-138.

[11] ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries[J]. *The Lancet Global Health*, 2018, 6(5): 555-567.

[12] 姜天奇, 张洪亮. 原发性肝癌的中西医治疗现状[J]. *医学信息*, 2019, 32(13): 35-38.

[13] 苏小康, 叶小卫, 林谋清, 等. 健脾化痰法抗肝癌术后复发82例临床研究[J]. *中医杂志*, 2006, 47(9): 673-675.

[14] 潘宇, 王瑞平, 凌博凡, 等. 健脾化痰方对肝癌HepG2细胞生物行为学的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(10): 57-59.

[15] 郑东升, 郑小伟, 国佳. 健脾疏肝活血方对H22肝癌小鼠瘤组织VEGF-C基因表达的影响[J]. *浙江中医药大学学报*, 2011, 35(1): 66-68.

[16] 凌博凡, 侯茜, 邹玺, 等. 健脾化痰方对肝癌耐药细胞P-糖蛋白的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(7): 2577-2580.

[17] CHEN L, GUO P, HE Y, et al. HCC-derived exosomes elicit HCC progression and recurrence by epithelial-mesenchymal transition through MAPK/ERK signalling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5): 513-521.

[18] DENG H, KAN A, LYU N, et al. Dual vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor inhibition elicits antitumor immunity and enhances programmed cell death-1 checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Cancer*, 2020, 9(3): 338-357.

[19] YUKAWA H, SUZUKI K, AOKI K, et al. Imaging of angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by uptake of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): e6765.

[20] YU Z, ZHAO S, REN L, et al. Pancreatic cancer-derived exosomes promote tumor metastasis and liver pre-metastatic niche formation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(38): 63461-63483.

[21] YOU L N, TAI Q W, XU L, et al. Exosomal LINC00161 promotes angiogenesis and metastasis via regulating miR-590-3p/ROCK axis in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2021, 737(28): 1-18.

[22] FANG T, LV H, LV G, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 191-202.

(编辑: 邹元平)