

- Biochem*, 2018, 82(1): 57-64.
- [8] Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's Disease Facts and Figures[J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(3): 391-460.
- [9] Chen Z H, Wang X R, Du S M, et al. A review on traditional Chinese medicine natural products and acupuncture intervention for Alzheimer's disease based on the neuroinflammatory[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 35.
- [10] Ma X Y, Wang J J. Formononetin: A pathway to protect neurons[J]. *Front Integ Neurosci*, 2022, 16: 908378.
- [11] Cieslak M, Wojtczak A. Role of purinergic receptors in the Alzheimer's disease[J]. *Purinergic Signal*, 2018, 14(4): 331-344.
- [12] Sbai O, Djelloul M, Auletta A, et al. AGE-TXNIP axis drives inflammation in Alzheimer's by targeting A β to mitochondria in microglia[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 302.
- [13] Malenka R C, Bear M F. LTP and LTD: An embarrassing of riches[J]. *Neuron*, 2003, 44(1): 15-21.
- [14] Neves G, Cooke S F, Bliss T V. Synaptic plasticity, memory and hippocampus: A neural network approach to causality[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 65-75.
- [15] Querfurth H W, LaFerla F M. Alzheimer's disease[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
- [16] Sheng M, Kim E. The postsynaptic organization of synapses[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(12): a005678.
- [17] Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(6): 383-400.
- [18] Hansen K B, Wollmuth L P, Bowie D, et al. Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels[J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73(4): 298-487.
- [19] Gambrill A C, Storey G P, Barria A. Dynamic regulation of NMDA receptor transmission[J]. *J Neurophysiol*, 2011, 105(1): 162-171.
- [20] Jiao W Y, Wang Y C, Kong L H, et al. CART peptide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects hippocampal neurons in a rat model of Alzheimer's disease[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 5(4): 1016-1022.
- [21] Rojo A I, Pajares M, Rada P, et al. Nrf2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology[J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 444-451.

基于 Notch 信号通路探讨缬草酸对肝细胞癌 MHCC97H 细胞上皮间质转化的影响

陈玉梅, 杨静, 苏森, 张冰*
(衡水市人民医院消化内科, 河北衡水 053000)

摘要: 目的 探究缬草酸对肝细胞癌 MHCC97H 细胞上皮间质转化 (EMT) 的影响。方法 肝细胞癌 MHCC97H 细胞随机分为空白组、DAPT 组 (5 $\mu\text{mol/L}$) 及缬草酸低、中、高剂量组 (1、5、10 $\mu\text{mol/L}$), 给药组给予相应剂量药物, 空白组不做处理。采用 CCK-8 法和细胞集落形成实验检测细胞的增殖能力, Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 细胞划痕实验检测细胞迁移率, Western blot 法检测 N-cadherin、Vimentin、Notch1、HES1 和 HEY1 蛋白表达。结果 与空白组比较, 各给药组肝细胞癌 MHCC97H 细胞增殖、侵袭及迁移能力减弱 ($P < 0.05$), N-cadherin、Vimentin、Notch1、HES1、HEY1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论 缬草酸能够抑制肝细胞癌 MHCC97H 细胞 EMT, 该作用与调控 Notch 信号通路密切相关。

关键词: 缬草酸; 肝细胞癌; MHCC97H 细胞; Notch 信号通路; 上皮间质转化; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2026)02-0645-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.042

收稿日期: 2025-08-26

基金项目: 河北省 2023 年度医学科学研究课题计划项目 (20232171)

作者简介: 陈玉梅 (1981—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为内科胰腺、肝病、胃肠、消化内镜等。E-mail: cchenyumei@163.com

* 通信作者: 张冰 (1982—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为消化病。E-mail: zhb2011sy@126.com

肝细胞癌是全球高发病率与致死率的恶性肿瘤，其发生与慢性肝炎、代谢紊乱等密切相关，临床治疗面临高复发率、耐药性等挑战^[1-3]。近年来研究表明，Notch 信号通路在肝细胞癌进展中发挥关键作用^[4]，其异常激活与癌细胞的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程密切相关^[5-6]，因此以 Notch 信号通路为线索探索肝细胞癌的治疗方案具有重要意义。

缬草酸是一种天然短链脂肪酸，广泛存在于缬草根茎中。研究表明，缬草酸可能具有与丁酸、丙酸类似的表观遗传调控潜力，进而诱导肿瘤细胞凋亡^[7-8]。例如，有文献报道缬草酸能够通过调控 Notch 信号通路抑制口腔癌进展^[9]。然而，目前缬草酸是否能够调控 Notch 信号通路影响肝细胞癌 EMT，尚未明确，因此，本研究通过分析缬草酸对肝细胞癌 MHCC97H 细胞 EMT 的影响，以期对肝细胞癌的治疗提供参考。

1 材料

1.1 细胞 人肝细胞癌细胞系 MHCC97H 细胞于 2024 年 6 月购自广州博辉生物科技有限公司。

1.2 试剂 缬草酸 (上海优利科生命科学有限公司, 纯度>95.3%, 批号 YLK6650D)。Notch1 抗体 (武汉华美生物工程生物公司, 货号 CSB-RA599445A0HU); HES1 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 XY-1853R); β -actin 抗体 (武汉菲恩生物科技有限公司, 货号 P0067); 胎牛血清 (上海博尔森生物科技有限公司, 货号 BES-20275CR); Notch 通路阻断剂 DAPT (美国 MCE 公司, 货号 HY-13027); 结晶紫染料 (温州科森生物科技有限公司, 货号 KM11159649); N-cadherin 抗体 (武汉维克赛思科技有限公司, 货号 PAab05569); Vimentin 抗体 (广州奥瑞达生物科技有限公司, 货号 ARD00426)。

1.3 仪器 一体式凝胶成像仪 (型号 GenoSens S2, 上海勤翔科学仪器有限公司); 荧光显微镜 (型号 DM4000B, 德国徕卡公司); 酶标仪分析仪 (型号 DR-200B, 上海企晟医疗器械有限公司); 电子天平 (型号 Quintix, 德国赛多利斯公司)。

2 方法

2.1 细胞分组与给药 肝细胞癌 MHCC97H 细胞用含 9% 胎牛血清的培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。当 MHCC97H 细胞生长至占培养皿底部约 85% 时, 胰酶消化, 将 MHCC97H 细胞分为空白组、DAPT 组 (5 μ mol/L) 及缬草酸低、中、高

剂量组 (1、5、10 μ mol/L), 培养 24 h 后, 给药组给予相应药物干预 24 h, 空白组不作处理。缬草酸给药浓度根据课题组前期实验得到的细胞半抑制浓度 (IC₅₀) 5 μ mol/L 进行设置, 低、中、高剂量分别为 IC₅₀ 值的 0.5、1、2 倍; DAPT 组给药剂量参考文献 [4] 设置。

2.2 CCK-8 法和细胞集落实验检测细胞增殖能力

2.2.1 CCK-8 法 取“2.1”项下处理后的 MHCC97H 细胞, 按 1.0×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板中培养, 分别于 12、24、36 h 加入 4 μ L CCK-8 试剂, 继续置于培养箱中培养 6 h。最后通过 DR-200B 酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度 (OD) 值。

2.2.2 细胞集落实验 取“2.1”项下处理后的 MHCC97H 细胞, 每组选择 500 个接种于软琼脂培养基中, 培养 2 周后, 通过结晶紫溶液处理 15 min, 随后用无菌磷酸缓冲液轻轻漂洗, 在显微镜下观察 MHCC97H 细胞的集落形成情况。

2.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 收集“2.1”项下处理后的 MHCC97H 细胞并重悬, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种于基质胶包被的 Transwell 小室的进行培养, 每个小室 100 μ L。下室含有 600 μ L 含 30% 胎牛血清的培养基。在孵育 24 h 后分别通过甲醇、结晶紫固定和染色。移除上部腔室, 下室表面的细胞为侵袭细胞, 在显微镜下观察并记录, 实验独立重复 3 次, 最后通过 Image J (V1.8.0) 软件统计 MHCC97H 细胞的数量。

2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 收集“2.1”项下处理后的 MHCC97H 细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 将 2 mL 细胞悬液接种于 6 孔板中进行培养。孵育 24 h 后, 使用移液器枪头 (规格 200 μ L) 垂直培养皿底部划痕 (宽度约为 500 μ m), 磷酸缓冲液漂洗后在显微镜下观察并记录, 通过 Image J (V1.8.0) 软件测定细胞划痕宽度。加入完全培养基, 继续培养 24 h, 再次测定划痕宽度。实验独立重复 3 次, 计算细胞迁移率, 公式为细胞迁移率 = $[(0 \text{ h 划痕宽度} - \text{培养结束时划痕宽度}) / 0 \text{ h 划痕宽度}] \times 100\%$ 。

2.5 Western blot 法检测 N-cadherin、Vimentin、Notch1、HES1 和 HEY1 蛋白的表达 取“2.1”项下处理后的 MHCC97H 细胞, 采用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白 (20 μ g), 并转移至 PVDF 膜, 用吐温 20 缓冲液稀释的脱脂乳在 21 °C 下封闭

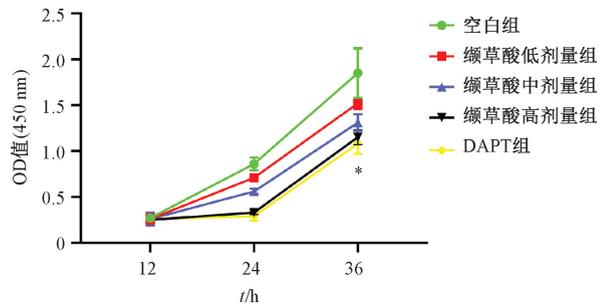
膜1 h。然后加入一抗，4℃孵育过夜。最后，加入二抗孵育。以β-actin作为内参，采用Image lab软件分析蛋白条带灰度值。

2.6 统计学分析 采用SPSS 23.0软件进行处理，所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用t检验，组间比较采用单因素方差分析，多组间两两比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

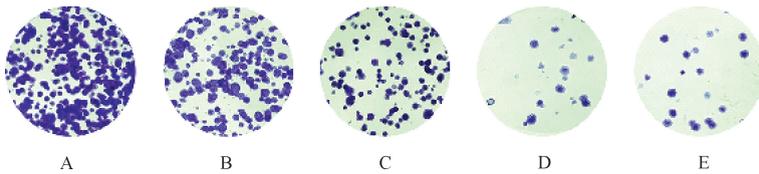
3.1 缬草酸对MHCC97H细胞增殖活性的影响 与空白组比较，缬草酸各剂量组和DAPT组MHCC97H细胞增殖能力降低($P < 0.05$)，集落形成数量减少($P < 0.05$)，见图1~2、表1。

3.2 缬草酸对MHCC97H细胞侵袭能力的影响 与



注：与空白对照比较，* $P < 0.05$ 。

图1 缬草酸对MHCC97H细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)
空白组比较，缬草酸各剂量组和DAPT组MHCC97H细胞侵袭数量减少($P < 0.05$)，见图3、表2。



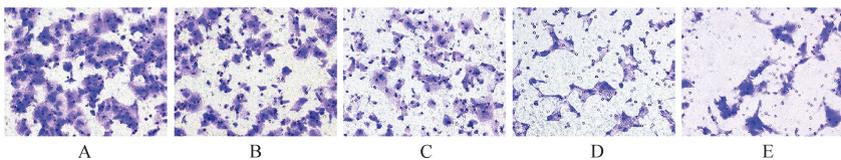
注：A为空白组，B~D为缬草酸低、中、高剂量组，E为DAPT组。

图2 各组MHCC97H细胞集落形成图($\times 200$)

表1 缬草酸对MHCC97H细胞生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	OD值(450 nm)			集落形成数量/个
	12 h	24 h	36 h	
空白组	0.27±0.02	0.86±0.07	1.85±0.27	125.22±5.17
缬草酸低剂量组	0.26±0.05*	0.71±0.02*	1.52±0.06*	98.83±3.57*
缬草酸中剂量组	0.26±0.07*	0.56±0.03*	1.31±0.09*	46.26±5.91*
缬草酸高剂量组	0.25±0.03*	0.33±0.02*	1.15±0.08*	22.83±3.57*
DAPT组	0.26±0.02*	0.29±0.05*	1.10±0.11*	23.86±2.95*

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。



注：A为空白组，B~D为缬草酸低、中、高剂量组，E为DAPT组。

图3 缬草酸对MHCC97H细胞侵袭的影响($\times 400$)

表2 缬草酸对MHCC97H细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	侵袭数量/个
空白组	127.36±5.27
缬草酸低剂量组	93.22±2.68*
缬草酸中剂量组	79.35±5.15*
缬草酸高剂量组	32.76±3.29*
DAPT组	33.85±6.21*

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。

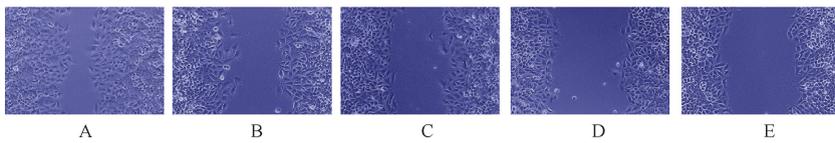
3.3 缬草酸对MHCC97H细胞迁移能力的影响 与空白组比较，缬草酸各剂量组和DAPT组

MHCC97H细胞迁移能力降低($P < 0.05$)，见图4、表3。

表3 缬草酸对MHCC97H细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	迁移率/%
空白组	62.37±5.32
缬草酸低剂量组	46.16±3.89*
缬草酸中剂量组	32.28±5.72*
缬草酸高剂量组	18.75±3.29*
DAPT组	19.06±2.83*

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。



注：A 为空白组，B~D 为缬草酸低、中、高剂量组，E 为 DAPT 组。

图 4 缬草酸对 MHCC97H 细胞迁移能力的影响 (×200)

3.4 缬草酸对 EMT 标志物相关蛋白表达的影响 与空白组比较，缬草酸各剂量组和 DAPT 组 MHCC97H 细胞中 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，见图 5、表 4。

表 5 缬草酸对 MHCC97H 细胞 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

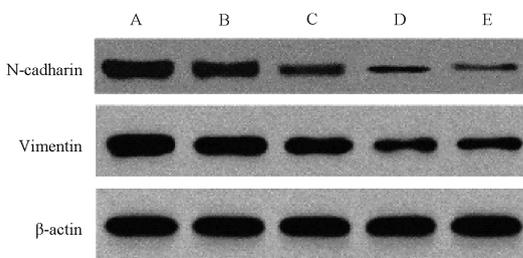
组别	Notch1	HES1	HEY1
空白组	0.81±0.12	0.78±0.06	0.82±0.11
缬草酸低剂量组	0.65±0.09*	0.69±0.08*	0.62±0.07*
缬草酸中剂量组	0.46±0.07*	0.39±0.05*	0.35±0.06*
缬草酸高剂量组	0.21±0.03*	0.19±0.03*	0.21±0.07*
DAPT 组	0.21±0.03*	0.20±0.05*	0.20±0.03*

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。

4 讨论

大量证据表明，EMT 在肝细胞癌的进展中起着关键作用，EMT 不仅是肝细胞癌转移过程中的关键机制，也是开发新型治疗策略的重要靶点^[10-11]。近年来研究发现，缬草酸能够通过调控 Notch 通路抑制口腔癌进展^[9]。此外，缬草酸对乳腺癌、肺癌均表现出较好的抑制作用^[12-13]，然而，关于缬草酸对肝细胞癌的抑制作用尚未明确。本研究使用缬草酸处理肝细胞癌 MHCC97H 细胞后发现，MHCC97H 细胞增殖、侵袭、迁移能力减弱，并且 EMT 标志物 (N-cadherin、Vimentin) 表达降低。由此可知，缬草酸对于肝细胞癌的 EMT 具有抑制作用，提示缬草酸可能是治疗肝细胞癌的潜在药物。

既往研究显示，Notch 通路的异常激活与多种癌症的增殖、侵袭、转移以及肿瘤微环境的调控密切相关。在肝细胞癌 EMT 过程中，Notch 通路扮演了重要角色^[5-6]。Notch1 激活后可通过调控 EMT 相关基因 (如 N-cadherin 和 Vimentin) 的表达，促进癌细胞的迁移和侵袭。此外，Notch 通路还通过与肿瘤微环境的相互作用，增强肿瘤细胞的干细胞特性^[14-16]。与既往研究结果相似，本研究使用 Notch 通路抑制剂处理肝细胞癌 MHCC97H 细胞后，细胞 EMT 过程受到抑制。这些研究结果表明，Notch 通路在肝细胞癌的 EMT 过程中具有关键的调控作用。目前，某些天然化合物已被证明可以通过直接作用于 Notch1 受体的基因表达调控区域，抑制其转录和翻译过程，进而影响其下游靶基因 HES1 和 HEY1 的表达，最终抑制肝癌细胞的生物学行为^[17-19]。本研究使用缬草酸处理肝细胞癌 MHCC97H 细胞后发现，Notch 通路受到抑制，表



注：A 为空白组，B~D 为缬草酸低、中、高剂量组，E 为 DAPT 组。

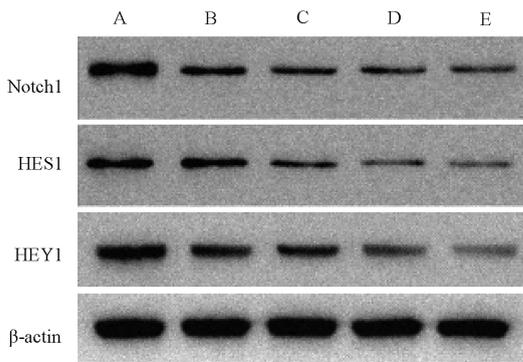
图 5 EMT 标志物相关蛋白条带

表 4 缬草酸对 EMT 标志物相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	N-cadherin	Vimentin
空白组	0.89±0.11	0.88±0.06
缬草酸低剂量组	0.72±0.15*	0.79±0.12*
缬草酸中剂量组	0.36±0.09*	0.46±0.07*
缬草酸高剂量组	0.19±0.05*	0.25±0.08*
DAPT 组	0.20±0.06*	0.23±0.05*

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ 。

3.5 缬草酸对 MHCC97H 细胞 Notch 信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较，缬草酸各剂量组和 DAPT 组 MHCC97H 细胞中 Notch1、HES1 和 HEY1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)，见图 6、表 5。



注：A 为空白组，B~D 为缬草酸低、中、高剂量组，E 为 DAPT 组。

图 6 Notch 信号通路相关蛋白条带

现为 Notch1、HES1 和 HEY1 表达降低。因此，缬草酸可能是通过抑制 Notch1 受体的表达，导致 Notch 信号通路传导受阻，影响 Notch1 下游靶基因转录（如 HES1、HEY1），进而抑制肝细胞癌 MHCC97H 细胞的 EMT。

此外，本研究结果显示，DAPT 与高剂量缬草酸对肝癌细胞增殖、侵袭、迁移的抑制作用相似，提示缬草酸对肝癌细胞的抑制作用可能依赖 Notch 信号通路。然而，要明确缬草酸对肝癌细胞的作用是否完全依赖 Notch 通路，还需要更多的研究来验证。在后续研究中，将通过干扰 Notch 通路中关键基因，进一步探讨 Notch 通路在缬草酸作用中的具体地位。目前，关于缬草酸的同类化合物在肝癌细胞方面的作用已有报道，例如，丁酸可将肝癌细胞周期阻滞在 G2/M 期，抑制肝癌细胞增殖，然而并未探究是否与 Notch 通路相关^[20]。本研究结果首次揭示了缬草酸在肝癌细胞方面的治疗潜力，同时相较于同类化合物（如丁酸）能够发挥独特的分子机制，不仅为肝癌的治疗提供了新的思路和潜在药物，也为同类化合物在肿瘤治疗的研究、开发过程中提供了重要的理论依据。

参考文献：

[1] 陈志文, 王龙蓉, 王 鲁. 肝细胞癌靶向治疗的现状和进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30 (2): 171-182.

[2] 汤 婷, 李钰博, 张昕彤, 等. 基于转录组测序数据构建线粒体相关基因模型以评估肝细胞癌免疫、预后和治疗特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2025, 45 (1): 53-63.

[3] 马晓萱, 王荣琦. 代谢组学在肝细胞癌诊疗中的研究进展[J]. 中国全科医学, 2025, 28(8): 1017-1022.

[4] 刘建中, 胡广军, 时玲玲, 等. Notch 信号通路对肝癌细胞迁移的调控机制研究[J]. 癌症进展, 2016, 14 (10): 977-981.

[5] 崔普泽, 胡彦建, 贺 旺, 等. Notch 信号通路与肝癌细胞凋亡关系的研究进展[J]. 肝胆胰外科杂志, 2021, 33(9): 573-577.

[6] 吴德建, 杨 秋, 谢桂丹, 等. 紫草素调节 Notch 信号通路对肝癌细胞恶性生物学活性的影响[J]. 天津医药, 2023,

51(12): 1293-1299.

[7] Han R, Yang H X, Li Y, *et al.* Valoxalate acts as a novel HDAC3 inhibitor against prostate cancer[J]. *Med Oncol*, 2022, 39(12): 213.

[8] Shi F, Li Y, Han R, *et al.* Valerian and valoxalate inhibit growth of breast cancer cells possibly by mediating epigenetic modifications[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 2519.

[9] 刘光涛, 张玉琳, 赵海娇. 缬草酸对口腔癌 KB 细胞恶性生物学行为的影响及其机制研究[J]. 解剖科学进展, 2023, 29(6): 647-650.

[10] 冯伟涛, 杨鹏达, 白春英, 等. miRNA 调控肝细胞癌上皮间充质转化的研究进展[J]. 承德医学院学报, 2025, 42(1): 64-68.

[11] 谭亦成, 刘莉梅, 邱芷睿, 等. GLIS 转录因子家族与肝细胞癌的研究进展[J]. 人参研究, 2025, 37(1): 85-88.

[12] 李双健, 李 丹, 丰锦春, 等. 缬草酸通过抑制 DACT2 基因启动子甲基化影响乳腺癌细胞的体外转移活性[J]. 解剖科学进展, 2023, 29(6): 611-614.

[13] Chen H D, Wan J X, Chen D R. A novel targeted delivery of valeric acid using liposomal nanoparticles in treatment of lung cell carcinoma[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2022, 18 (1): 211-217.

[14] 商志浩, 钱景阳, 赖岳阳, 等. 基于单细胞转录组和类器官模型探讨沙蟾毒精通过 Notch 通路干预结直肠癌增殖的研究[J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(2): 112-116; 273.

[15] 文 竹, 李 军. 咪达唑仑调节 Notch/Snail 信号通路对结直肠癌细胞增殖、迁移和上皮间质转化的影响[J]. 河北医药, 2025, 47(1): 11-16.

[16] 黄 炆, 马 洪, 向 航. BMI1 经 NOTCH 信号通路诱导人口腔鳞癌细胞恶性生物学行为[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(12): 2117-2126; 2134.

[17] 王晓清, 袁国强, 潘亚文. 肿瘤 Notch 信号通路的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(7): 1025-1028.

[18] Subramaniam D, Ponnurangam S, Ramamoorthy P, *et al.* Curcumin induces cell death in esophageal cancer cells through modulating Notch signaling[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30590.

[19] 胡烘陶, 王 晶, 字成庭, 等. 天然化合物基于 Notch 通路抑制肿瘤的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(5): 138-146.

[20] Zhao C B, Zhang Z L, Ding R L, *et al.* Genes modulating butyrate metabolism for assessing clinical prognosis and responses to systematic therapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Biomolecules*, 2022, 13(1): 52.