

野马追总黄酮的体内外抗乳腺癌活性及机制研究

王帅^{1,2}, 吴海霞², 楼泰岑², 俞淑芳³, 谢艳萍^{2*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.宁波市第一医院药学部, 浙江 宁波 315010; 3.浙江医药高等专科学校药学院, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 探究野马追总黄酮的体内外抗乳腺癌活性及相关的机制。方法 MTT 法检测野马追总黄酮对乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-468)和人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 增殖的影响; 流式细胞术检测野马追总黄酮对乳腺癌细胞周期和凋亡的影响; 吖啶橙(AO)染色法检测野马追总黄酮对细胞自噬的影响; Western blotting 检测细胞周期、凋亡、自噬相关蛋白的变化, 以及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的变化; 建立 MDA-MB-231 细胞的裸鼠移植瘤模型, 观察野马追总黄酮的体内抗肿瘤活性。结果 野马追总黄酮能明显抑制乳腺癌细胞增殖, 并呈剂量依赖性, 而对人正常乳腺上皮细胞无显著的抑制作用; 野马追总黄酮能增加 G₂/M 期细胞比例, 上调 p-cdc-2 蛋白表达, 下调 cdc-2 和 Cyclin B1 蛋白表达; 野马追总黄酮能显著增加乳腺癌细胞凋亡比例, 上调促凋亡蛋白 Bad 和 Bax 表达, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达; 野马追总黄酮能够诱导乳腺癌细胞产生自噬, 自噬相关蛋白 LC3-II 表达上升, p62 表达降低; 野马追总黄酮能够显著抑制 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平; 野马追总黄酮能够在体内抑制裸鼠肿瘤的体积。结论 野马追总黄酮通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 阻滞细胞周期、诱导凋亡和自噬, 进而在体内外抑制乳腺癌细胞的生长。

关键词: 野马追总黄酮; 乳腺癌; 细胞周期; 细胞凋亡; 自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)17-2073-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.17.005

引用本文: 王帅, 吴海霞, 楼泰岑, 等. 野马追总黄酮的体内外抗乳腺癌活性及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2073-2080.

Study on Anti-breast Cancer Activity and Mechanism of Total Flavonoids from *Eupatorium Lindleyanum* DC.

WANG Shuai^{1,2}, WU Haixia², LOU Taicen², YU Shufang³, XIE Yanping^{2*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Department of Pharmacology, Ningbo First Hospital, Ningbo 315010, China; 3.College of Pharmacy, Zhejiang Medical College, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the anti-breast cancer activity and related mechanism of total flavone from *Eupatorium lindleyanum* DC.(TFE). **METHODS** MTT assay was used to detect the effect of TFE on the proliferation of breast cancer cells (MCF-7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468) and human normal mammary cells(MCF-10A). Flow cytometry was used to determine the effect of TFE on cell cycle and apoptosis in breast cancer. Acridine orange(AO) staining was used to detect the effect of TFE on autophagy. The changes of cell cycle, apoptosis, autophagy related proteins, as well as the changes of PI3K/Akt signaling pathway related proteins were detected by Western blotting assay. Xenograft model in nude mice of MDA-MB-231 cells was established to observe the antitumor activity *in vivo* of TFE. **RESULTS** TFE could significantly inhibit the proliferation of breast cancer cells in a dose-dependent manner, but had no significant inhibitory effect on human normal mammary cells. TFE could induce cell cycle arrest at G₂/M phase, and the expression of cell cycle related proteins Cyclin B1 and cdc2 were decreased, while p-cdc2 was increased. TFE could significantly increase the apoptosis rate of breast cancer cells, and the expression of apoptotic protein Bad and Bax were increased, while the anti-apoptotic protein Bcl-2 was decreased. TFE could induce autophagy in breast cancer cells, and the expression of autophagy related protein LC3-II increases, while the expression of p62 decreases. TFE significantly inhibited the phosphorylation of PI3K and Akt. TFE inhibited tumor volume in nude mice *in vivo*. **CONCLUSION** TFE inhibits the growth of breast cancer cells *in vivo* and *in vitro* by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway, cell cycle arrest, inducing apoptosis and autophagy.

KEYWORDS: total flavonoids from *Eupatorium lindleyanum* DC.; breast cancer; cell cycle; apoptosis; autophagy

乳腺癌是发生在女性疾病中最普遍的恶性肿瘤之一, 占有所有恶性肿瘤的 7%~10%, 严重危害女

性健康, 甚至导致女性患者死亡^[1]。近几年来, 全世界乳腺癌的发病率在逐年递增, 并且越来越趋

基金项目: 浙江省教育厅一般科研项目(Y201636648)

作者简介: 王帅, 女, 主管药师 Tel: (0574)87085097 E-mail: wangshuai_8689@126.com *通信作者: 谢艳萍, 女, 副主任药师 Tel: (0574)87085097 E-mail: 1227606697@qq.com

于年轻化^[2-3]。乳腺癌的病因和发病机制非常复杂,是由多种因素(如遗传因素、环境因素等)所导致^[4]。目前临床上针对乳腺癌的治疗方法主要以化疗为主,然而化疗会引起不良反应,严重危害人类的健康和生命,因此开发出一种低毒有效的天然药物极为重要。

野马追,又名毛泽兰、化食草,取自于菊科植物轮叶泽兰(*Eupatorium lindleyanum* DC.)的干燥地上部位,其性平、味苦、归肺经,具有降血压、清热解毒、止咳化痰平喘等作用^[5],目前已有文献指出野马追具有一定的抗肿瘤作用^[6]。野马追总黄酮(total flavone from *Eupatorium lindleyanum* DC., TFE)是野马追中的主要活性成分之一,目前关于 TFE 的药理活性研究较少,本研究从细胞水平和分子水平出发,旨在深入探究 TFE 的体内外抗乳腺癌活性及相关的机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

乳腺癌细胞 MCF-7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-468 以及人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 均购买于中国科学院上海细胞库;裸小鼠:Balb/c-nude, 4 周龄,♀,体质量(19±2)g,购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006;饲养于浙江中医药大学实验动物中心,SPF 级。

1.2 药物与试剂

TFE 由浙江中医药大学中药资源研究所提供;DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号分别为 AM1123, AH0643);RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司,批号分别为 P0013C, P0010S);四甲基亚砜(MTT)、DMSO、吖啶橙(acridine orange, AO)(美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, CK6635, A6014);抗体(p-cdc-2, cdc-2, Cyclin B1, Bad, Bax, Bcl-2, LC3, p62, GAPDH)(美国 CST 公司,批号分别为 4539T, 9116T, 12231T, 9292T, 2774S, 15071T, 4108S, 88588S, 5174T);细胞周期染色液、Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号分别为 190103, 190214)。

1.3 仪器

RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司);370 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);XK-8 型转移脱色摇床(江苏新康医疗器械

有限公司);PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);3300 Mini 化学发光成像系统(中国 CLInX 公司);ECLIPSE Ti 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 的胎牛血清、200 U·mL⁻¹ 青霉素、200 U·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 完全培养基培养乳腺癌细胞,培养箱设置为 37 °C、5% CO₂。每隔 2 d 更换一次培养液,待细胞长至 80%~90%,用 0.25% 胰蛋白酶进行消化,将细胞根据 1:3 的比例传代,放入培养箱内继续培养。而 MCF-10A 细胞株需用含 5% 的马血清、10 μg·mL⁻¹ 胰岛素、0.5 μg·mL⁻¹ 氢化可的松、200 U·mL⁻¹ 青霉素、200 U·mL⁻¹ 链霉素、100 ng·mL⁻¹ 霍乱毒素、20 ng·mL⁻¹ 内皮生长因子的 DMEM 完全培养基培养。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

取对数期的乳腺癌细胞(MCF-7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-468)以及人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A,经过胰酶消化离心后,制成细胞悬液,将浓度稀释为 3×10⁴·mL⁻¹,接种至 96 孔板中,每孔各加 100 μL 细胞悬液。待培养 24 h 后,观察细胞完全贴壁后,加入不同浓度的 TFE,每个浓度设 3 个重复,以不含药物培养基做空白对照,作用 48 h。计算细胞相对活力和 IC₅₀ 值。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

实验分组:空白对照组(TFE 0 μg·mL⁻¹)和 TFE 低剂量组(10 μg·mL⁻¹)、高剂量组(20 μg·mL⁻¹)。将状态良好的 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞用胰酶消化后,稀释成每孔 6×10⁵·mL⁻¹ 铺于 6 孔板中,待细胞贴壁后,按照分组要求用含不同浓度的 TFE 进行培养,每组各设 3 个重复,培养 24 h 后,先用 PBS 洗 3 遍,经胰酶消化将细胞重悬,离心后加入 70% 的冰乙醇固定细胞,4 °C 放置过夜,细胞固定完成后,将细胞悬液离心,去除乙醇,再用 PBS 清洗 3 次,加入 PI 染液(含有 RNase),室温下避光染色 30 min,上流式细胞仪进行检测。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度为每孔 6×10⁵·mL⁻¹,待细胞贴壁完全后,按照分组要求分别用含不同浓度的 TFE 进行培养,每组各设 3 个重复,培养 24 h 后,先用 PBS 洗 3 遍,再用胰酶消化将细胞重悬,

收集于离心管离心,离心后加入 600 μL $1\times\text{Binding buffer}$ 将细胞制成细胞悬液,先加入 15 μL Annexin V-FITC,再加 15 μL PI,避光孵育 15 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 AO 染色法检测细胞自噬

将 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中,培养箱培养 24 h,至细胞完全贴壁,加入不同浓度的 TFE,药物处理 24 h 后,吸取上清液,用 PBS 洗涤 3 次,用 0.25%胰酶消化后,离心 ($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)收集细胞。再用 PBS 洗涤离心 3 次后,进行染色。PBS 再洗 2 次为了除去染料,避免背景颜色的影响。吸取少量细胞悬液于载玻片上,轻轻盖上盖玻片,在荧光显微镜下进行拍照。

2.6 Western blotting 检测细胞周期、凋亡、自噬以及 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白

取对数期 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞接种于 6 cm 培养皿中,调整细胞密度为每孔 $8\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$,待细胞贴壁之后,按照分组要求用含有不同浓度 TFE 的完全培养基进行培养,作用 24 h 后加入细胞裂解液,5 min 后将细胞收集进离心管,再将离心管置于冰上反应 30 min,离心取上清,根据 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度,对蛋白进行处理随后上样。用 SDS-PAGE 电泳法分离总蛋白,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBST 缓冲液洗 2 遍,二抗室温孵育 2 h 后显影。

2.7 建立裸鼠移植瘤模型检测 TFE 体内抗肿瘤活性

培养的 MDA-MB-231 细胞消化后,调整细胞密度为 $5\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$,用无血清培养基将细胞重悬,裸鼠背部每只皮下注射 0.1 mL 的细胞悬液,形成皮丘,造模完成。肿瘤体积达到 50 mm^3 后,随机将小鼠分为空白对照组(TFE $0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TFE 组、 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ TFE 组,每周腹腔给药 3 次,持续 30 d,每隔 2~3 d 用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,并且用天平称量裸鼠体质量。给药结束之后采用 CO_2 法处死裸鼠,解剖裸鼠取出肿瘤组织,称取肿瘤质量。肿瘤体积=(短径² $\times$ 长径)/2。

2.8 统计学处理

每组实验重复 3 次,实验结果用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,组间两两比较采用两独立样本 t 检验,不同组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TFE 对乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞的增殖活性影响

经过不同浓度的 TFE 处理后,乳腺癌细胞和正常乳腺上皮细胞的增殖情况见图 1。乳腺癌细胞 MCF-7、T47D、MDA-MB-231 以及 MDA-MB-468 的细胞活力随药物浓度的增大下降明显,而正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 的细胞活力下降较为平缓。TFE 对 MCF-7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-468 以及 MCF-10A 细胞抑制作用的 IC_{50} 分别为(18.12 ± 2.06), (40.24 ± 5.26), (22.64 ± 2.44), (39.88 ± 3.68) 以及 (188.62 ± 12.34) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其中 MCF-10A 的 IC_{50} 值最大,表明 TFE 对 MCF-10A 的抑制作用较小。MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的 IC_{50} 值最小,表明 TFE 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的抑制作用最强。

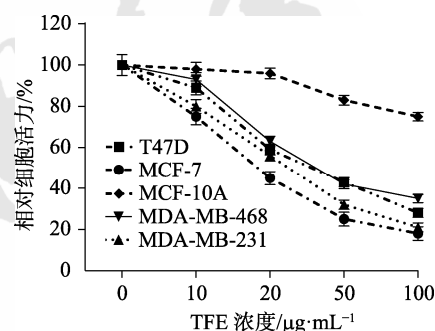


图 1 TFE 对乳腺癌细胞和人正常乳腺上皮细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of TFE on the proliferation of breast cancer cells and human normal breast epithelial cells

3.2 TFE 对乳腺癌细胞周期的影响

3.2.1 流式细胞术检测细胞周期情况 不同浓度的 TFE 作用于 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞后,能够在不同程度上增加 G_2/M 期细胞的含量,与空白对照组(TFE $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,TFE 加药组的 G_2/M 细胞含量均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 TFE 能够有效阻滞乳腺癌细胞于 G_2/M 期。结果见图 2。

3.2.2 周期相关蛋白变化 Western blotting 检测 TFE 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞周期相关蛋白的影响。结果显示,与空白对照组(TFE $0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比,TFE 加药组中 p-cdc-2 蛋白表达量显著上升($P<0.05$),cdc-2 和 Cyclin B1 蛋白表达量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),蛋白变化均具有剂量依赖性。结果见图 3。

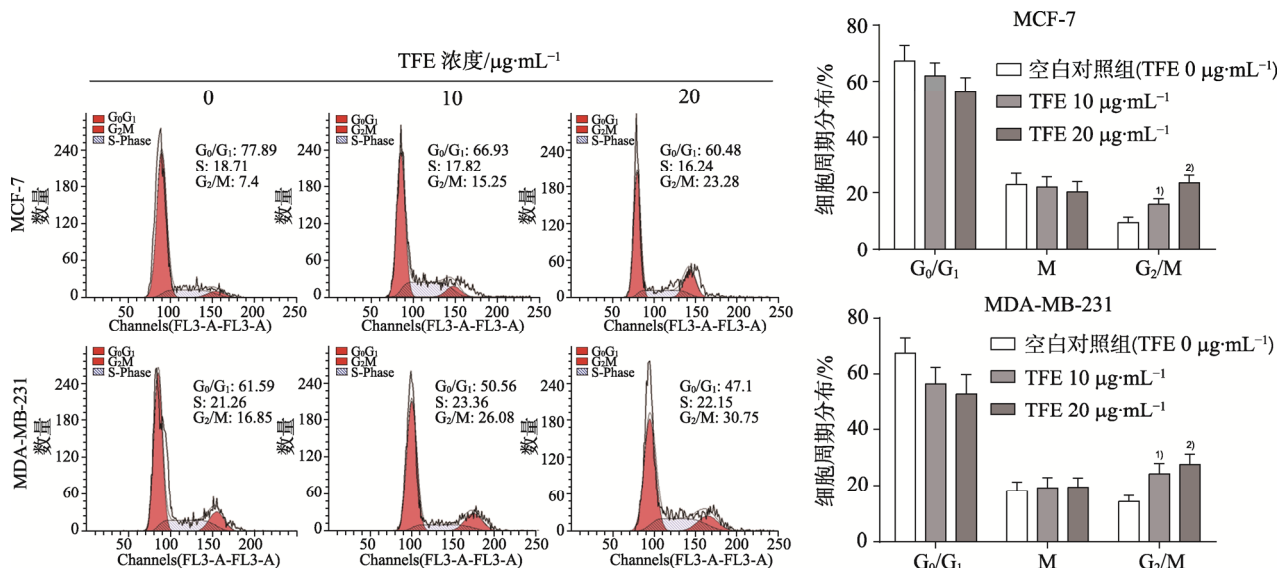


图2 TFE对乳腺癌细胞周期的影响

与空白对照组(TFE $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of TFE on cycle of breast cancer cell

Compared with blank control group(TFE $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

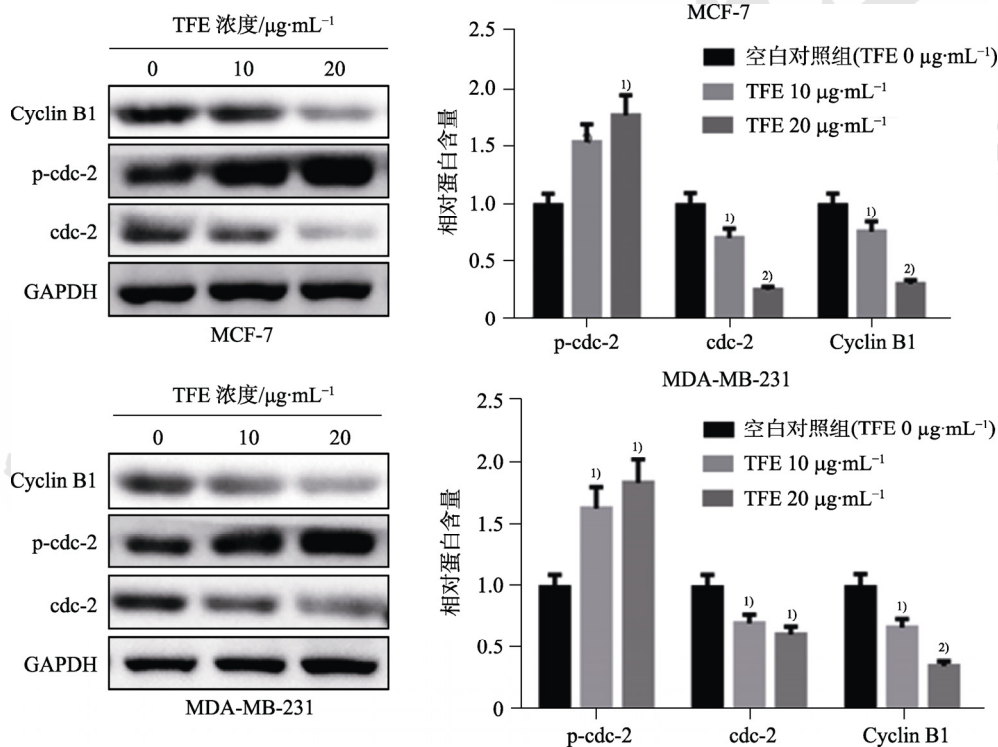


图3 TFE对乳腺癌细胞中周期相关蛋白表达的影响

与空白对照组(TFE $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of TFE on expression of cell cycle-related protein in breast cancer cells

Compared with blank control group(TFE $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 TFE对乳腺癌细胞凋亡的影响

3.3.1 流式细胞术检测细胞凋亡比例 不同浓度的TFE作用于MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞后,细胞凋亡比例明显上升。与空白对照组(TFE $0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,2种细胞TFE加药组的细

胞凋亡率均显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明TFE能够有效诱导乳腺癌细胞发生凋亡。结果见图4。

3.3.2 凋亡相关蛋白变化 Western blotting检测TFE对MCF-7和MDA-MB-231细胞凋亡相关蛋白

的影响。结果显示,与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,TFE 加药组中 Bax 和 Bad 蛋白表达量显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),蛋白变化均具有剂量依赖性。结果见图 5。

3.4 TFE 对乳腺癌细胞自噬的影响

3.4.1 AO 染色检测自噬小体产生情况 空白对照组中 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞无明显自噬小体产生,而在 TFE 加药组中,自噬小体数量明

显增加,并且随着药物剂量的增加,自噬小体数量逐渐增多。结果见图 6。

3.4.2 自噬相关蛋白变化 Western blotting 检测 TFE 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞自噬相关蛋白的影响。结果显示,与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比,TFE 加药组中 LC3-II 蛋白表达量显著上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),p62 蛋白表达量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),蛋白变化均具有剂量依赖性。结果见图 7。

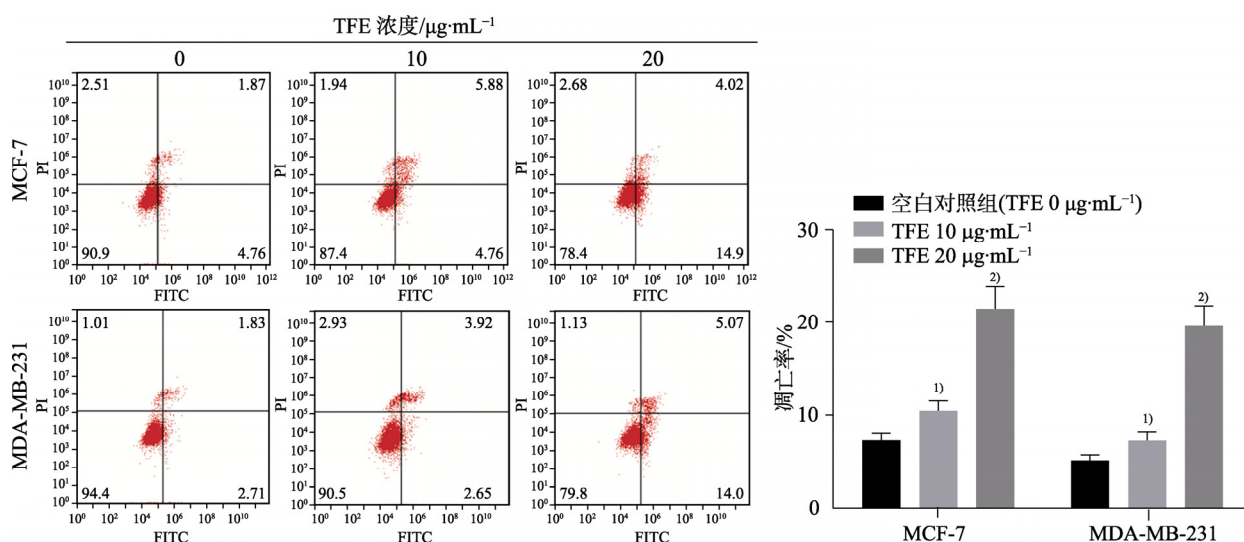


图 4 TFE 对乳腺癌细胞凋亡的影响

与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of TFE on apoptosis of breast cancer cells

Compared with blank control group(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

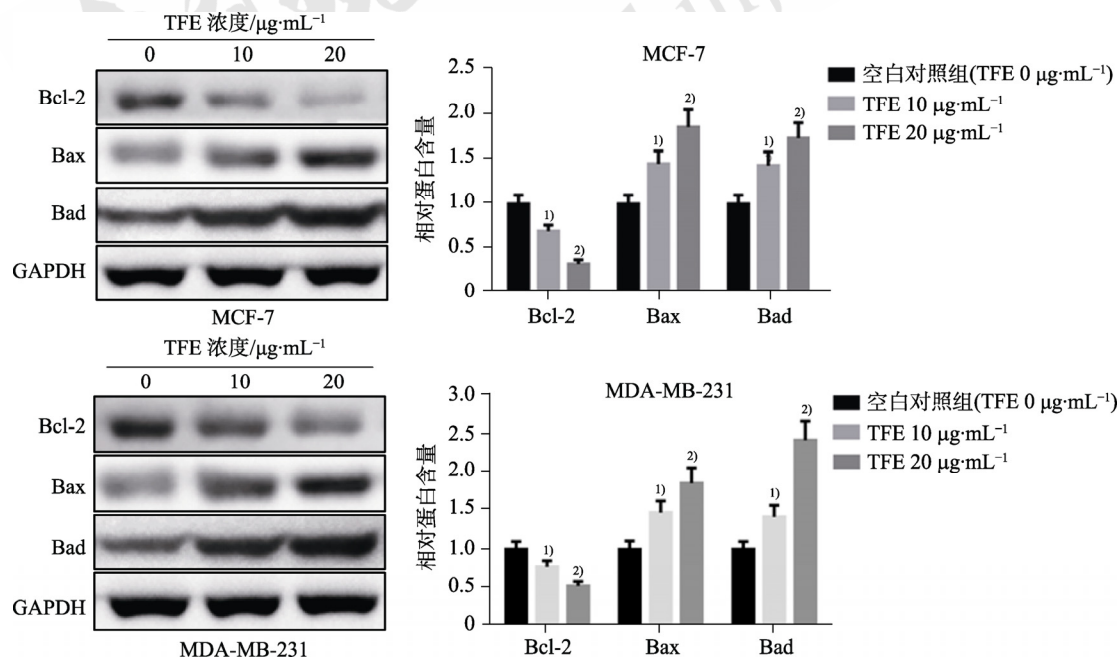


图 5 TFE 对乳腺癌细胞中凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effects of TFE on expression of apoptosis-related proteins in breast cancer cells

Compared with blank control group(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

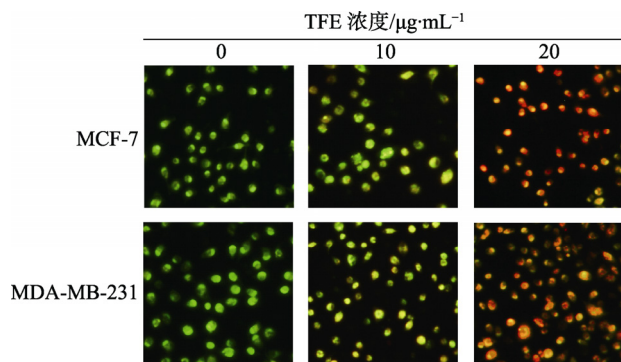


图 6 TFE 对乳腺癌细胞自噬的影响

Fig. 6 Effect of TFE on autophagy of breast cancer cells

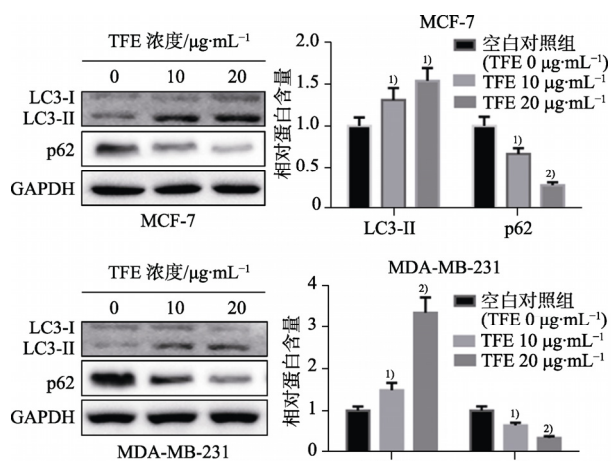


图 7 TFE 对乳腺癌细胞中自噬相关蛋白表达的影响

与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 7 Effects of TFE on expression of autophagy-related proteins in breast cancer cells

Compared with blank control group(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.5 TFE 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Western blotting 检测 TFE 对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响。结果显示, 与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, TFE 加药组中 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平显著下降($P<0.05$)。表明 TFE 能够有效抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞 PI3K/Akt 信号通路活性。结果见图 8。

3.6 TFE 对裸鼠移植瘤体积的影响

采用裸鼠移植瘤实验研究 TFE 的体内抑瘤效应, 由图 9A 可知, TFE 给药组裸鼠肿瘤体积增长速度明显低于空白对照组(TFE 0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 且高剂量组肿瘤体积增长速度低于低剂量组; 由图 9B 可知, TFE 给药组裸鼠肿瘤质量较空白对照组(TFE 0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)显著降低($P<0.05$)。结果表明 TFE 能够在体内有效抑制移植瘤的生长。

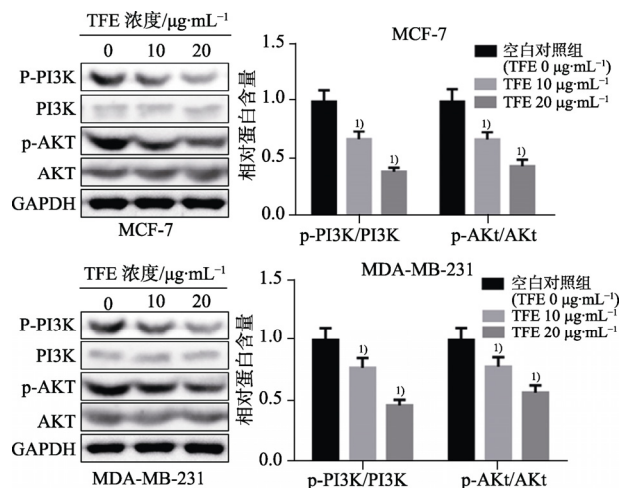


图 8 TFE 对乳腺癌细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

与空白对照组(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 8 Effects of TFE on the expression of PI3K/Akt signaling pathway related proteins in breast cancer cells

Compared with blank control group(TFE 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$ 。

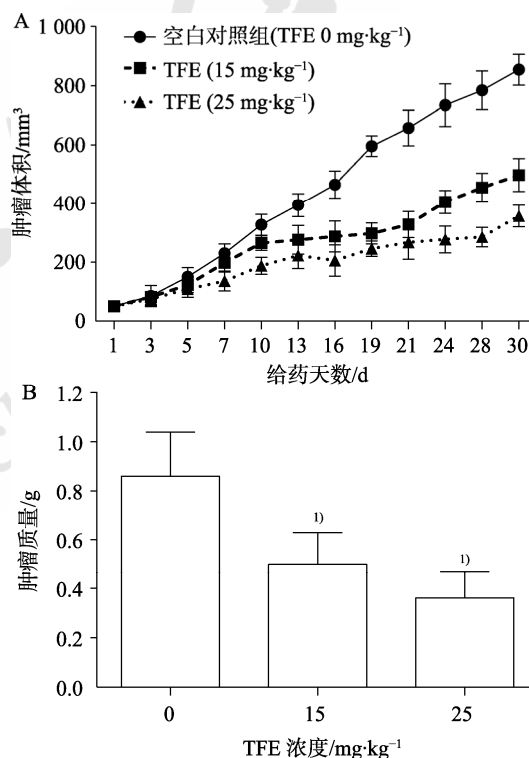


图 9 TFE 的体内抑瘤效应

A-给药期间各组裸鼠肿瘤体积生长情况; B-给药结束后各组裸鼠肿瘤质量情况; 与空白对照组(TFE 0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 9 *In vivo* tumor suppressive effect of TFE

A-tumor volume growth of nude mice in each group during the drug administration; B-tumor weight of nude mice in each group; Compared with blank control group(TFE 0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ¹⁾ $P<0.05$ 。

4 讨论

中医药在肿瘤综合治疗中具有良好的治疗效果, 能够减少不良反应、降低耐药发生以及降低乳腺癌复发率^[7]。中医药治疗适用于手术放化疗的

患者,以及对肿瘤前发生病变的高危人群也起到关键作用^[8-9]。紫杉醇、羟基喜树碱等药物已用于临床治疗,这些药物都提取于天然药物^[10-13]。有研究表明,传统中草药配合疗法能够有效地改善乳腺癌患者病情,从而提高患者的生活质量^[14]。近年来关于中药野马追的化学成分已有较多研究,主要包括倍半萜内酯类、黄酮类、挥发油等化合物^[15]。其中对于黄酮类化合物抗肿瘤的作用研究已有诸多报道^[16],野马追中黄酮类化合物主要包括泽兰素、叶黄素、槲皮素等^[17-18]。关于 TFE 抗肿瘤活性的研究少有报道。因此,本研究从野马追中提取总黄酮,探究其抗乳腺癌作用并进一步探讨其作用机制。通过 MTT 试验发现,TFE 能够有效抑制乳腺癌细胞的增殖,表明 TFE 具有一定的抗乳腺癌活性。在开发新的抗肿瘤药物过程中,不仅需要考虑到其抗肿瘤作用,也应该考虑新药对正常细胞的影响。为此,笔者选用人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 进行研究,结果显示,TFE 对 MCF-10A 细胞的增殖影响较小,这为以后进行安全性评价奠定一定的理论基础。

诱导细胞周期阻滞和凋亡是抗肿瘤药物常见的的作用机制^[19]。Cyclin B1 与 cdc-2 结合的复合物是调节细胞从 G₂ 期进入 M 期的一个重要的调节靶点,cdc-2 的磷酸化能激活该复合物,并迅速进入细胞核内,启动有丝分裂^[20]。本研究发现,TFE 能够显著上调乳腺癌细胞中 p-cdc-2 蛋白表达,下调 cdc-2 和 Cyclin B1 蛋白表达,进而阻滞细胞周期于 G₂/M 期。细胞周期阻滞可以抑制细胞增殖,最终导致细胞凋亡。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主性有序的死亡方式,能清除受损细胞,以维持细胞内环境稳定^[20]。在线粒体途径诱导细胞凋亡过程中,线粒体结构和功能的改变可通过 Bcl-2 家族蛋白调控。Bcl-2 家族蛋白包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,两者平衡一旦被打破,则会导致线粒体等功能丧失或者促凋亡因子的大量释放,最终导致细胞凋亡。本研究发现,TFE 能够显著升高促凋亡蛋白 Bad 和 Bax 表达,降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,从而增加细胞凋亡比例,诱导细胞凋亡。自噬属于非凋亡性细胞死亡方式,是一种高度调控的过程,也参与肿瘤的治疗^[21]。本研究结果显示,TFE 能够显著增加自噬小体含量,增加 LC3-II/LC3-I 比例,降低 p62 蛋白表达,表明 TFE 能够诱导乳腺癌细胞产生自噬。

PI3K/AKT 信号通路在肿瘤发生发展过程中发挥着重要的作用,目前已证实其与肿瘤的发生、侵袭、迁移以及血管生成等都密切相关^[22]。因此,以 PI3K/AKT 信号通路为靶点的肿瘤治疗方案已成为国内外研究的热点之一,针对该通路中各个信号分子为靶点的抑制剂越来越应用于临床试验^[23]。本研究发现 TFE 能够显著 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平,表明 TFE 可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路从而发挥其抗乳腺癌作用。

另外,本研究采用裸小鼠移植瘤模型移植 MDA-MB-231 细胞研究 TFE 在体内的抗乳腺癌作用。通过 30 d 腹腔给药后,将裸小鼠解剖取出肿瘤进行实验,肿瘤的体积能够直观地反映肿瘤生长情况。最后的测量结果显示,TFE 能够显著抑制裸小鼠体内肿瘤的生长,并且裸小鼠的体质量无明显的变化。综上所述,本研究表明 TFE 能够在体内外抑制乳腺癌细胞的生长,其作用机制可能是通过调控 PI3K/Akt 信号通路,阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡和自噬来实现的。本研究为发展新的抗乳腺癌药物提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA A Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China [J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): e279-e289. DOI:10.1016/s1470-2045(13)70567-9.
- [4] DUMALAON-CANARIA J A, HUTCHINSON A D, PRICHARD I, et al. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors [J]. Cancer Causes Control, 2014, 25(7): 771-785.
- [5] CHEN W Q, ZHENG R S. Incidence, mortality and survival analysis of breast cancer in China [J]. Chin J Clin Oncol(中国肿瘤临床), 2015, 42(13): 668-674.
- [6] LU M Y, TIAN S S. Advances in research on chemical components and pharmacological effects of *Eupatorium lindleyanum* DC [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药), 2019, 28(9): 37-42.
- [7] LIU X J, TIAN H Q, WANG B. Overview of comprehensive therapeutic effect of traditional Chinese medicine for treatment of breast cancer [J]. J Oncol Chin Med(中医肿瘤学杂志), 2019, 1(2): 85-88.
- [8] FU X X, ZHEN H D, ZHANG A Q, et al. Research progress of Chinese medicine for breast cancer [J]. J New Chin Med(新中医), 2018, 50(12): 46-48.
- [9] SHEN W F, ZHU Z H, ZHU R, et al. Effect and mechanism of jatamanvaltrate P on proliferation of T47D cells to breast

- cancer [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(1): 10-14.
- [10] BARREIRO E J. What is hidden in the biodiversity? The role of natural products and medicinal chemistry in the drug discovery process [J]. An Acad Bras Ciênc, 2019, 91(suppl 3): e20190306. Doi:10.1590/0001-3765201920190306.
- [11] ZHANG X Y, ZHONG H J, OUYANG T, et al. Paclitaxel microemulsion for injection using solutol HS 15 as surfactant: preparation and hemolysis study [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(13): 1629-1634.
- [12] KIM W, LEE W B, LEE J W, et al. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: A systematic review [J]. Complementary Ther Med, 2015, 23(4): 626-632.
- [13] ZHANG X D, DENG B, HUAI H Y. Analysis of ecological factors affecting the production of *Eupatorium lindleyanum* DC. var. trifoliolatum -an authentic and superior medicinal plant from Jiangsu province [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2005, 24(5): 52-55.
- [14] 路晓庆, 杨芮, 李妍正, 等. 黄酮类物质的生物功能及作用机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(22): 3283-3286.
- [15] QIAN S H, YANG N Y, DUAN J A, et al. Study on the flavonoids of *Eupatorium lindleyanum* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(1): 50-52.
- [16] WU S Q, SUN Q, CHU C J, et al. Chemical constituents of *Eupatorium lindleyanum* [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2012, 37(7): 937-940.
- [17] CHU C J, REN H L, WU T W, et al. Chemical constituents and antipyretic effect of *Eupatorium lindleyanum* DC [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2015, 27(5): 816-821.
- [18] WANG Y, WANG S X, SONG R Z, et al. Ginger polysaccharides induced cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 123: 81-90.
- [19] ZENG G F, LIU J, CHEN H G, et al. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells [J]. Oncol Rep, 2014, 31(6): 2713-2719.
- [20] GALI-MUHTASIB H, HMADI R, KAREH M, et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis [J]. Apoptosis, 2015, 20(12): 1531-1562.
- [21] NAGELKERKE A, BUSSINK J, GEURTS-MOESPOT A, et al. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: Pharmacological modulation of treatment-induced autophagy [J]. Semin Cancer Biol, 2015(31): 99-105.
- [22] SHI Y, FENG X L, XIE L F, et al. Research progress on PI3K/AKT signal transduction pathway in tumors [J]. Chem Life(生命的化学), 2018, 38(3): 421-426.
- [23] FAES S, DORMOND O. PI3K and AKT: Unfaithful partners in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21138-21152.

收稿日期: 2020-01-26
(本文责编: 李艳芳)