

马立威,陈哲,陈颂,等.狼毒大戟配伍大枣水煎液体外抗乳腺癌作用及机制研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(2):66-75.

Ma LW, Chen Z, Chen S, et al. Study of the anti-breast cancer effects and mechanisms of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba *in vitro* [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 66-75.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.009

## 狼毒大戟配伍大枣水煎液体外抗乳腺癌作用及机制研究

马立威<sup>1,6</sup>, 陈哲<sup>2</sup>, 陈颂<sup>3</sup>, 倪世宇<sup>4</sup>, 李京<sup>5</sup>, 葛鹏玲<sup>6</sup>, 刘吉成<sup>1\*</sup>

(1.齐齐哈尔医学院医药科学研究院(博士后工作站),黑龙江齐齐哈尔 161006;2.齐齐哈尔医学院公共卫生学院,黑龙江齐齐哈尔 161006;3.齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江齐齐哈尔 161006;4.大庆龙南医院,黑龙江大庆 163001;5.齐齐哈尔医学院附属肿瘤医院,黑龙江齐齐哈尔 161099;6.黑龙江中医药大学博士后流动站,哈尔滨 150040)

**【摘要】** 目的 探讨狼毒大戟配伍大枣水煎液(decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba, DEFSJ)体外抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并诱导其凋亡的可能分子机制。方法 通过血清药理学方法制备 DEFSJ 载药血清(containing serum, CS);光镜及电镜下观察细胞形态学变化;DEFSJ-CS 联合 LY294002(PI3k 信号通路抑制剂)作用后,采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制情况,流式细胞仪结合 Annexin V-FITC/PI 染色检测细胞凋亡情况,流式细胞仪结合免疫染色检测 PI3k/Akt 转导途径及 Bcl-2 家族相关蛋白的表达变化。结果 光镜及电镜下可见细胞形态学变化及典型的细胞凋亡形态学特征;与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 对 MCF-7 细胞的增殖有明显的抑制作用,联合 LY294002 后抑制作用更加显著( $P < 0.01$ );Annexin V-FITC/PI 染色结果显示,与阴性对照组比较,随着 DEFSJ-CS 含量的增加,细胞凋亡率明显增加,联合 LY294002 后凋亡作用更加显著( $P < 0.05, P < 0.01$ );免疫染色检测结果显示,PI3k、p-Akt、p-FoxO3a、Bcl-2 蛋白表达下调,Bax、Bim 蛋白表达上调( $P < 0.05, P < 0.01$ ),联合 LY294002 后 p-Akt、p-FoxO3a 蛋白表达下调更加显著。结论 PI3k/Akt 转导途径参与了 DEFSJ-CS 抑制 MCF-7 细胞的增殖并诱导其凋亡作用的调控。

**【关键词】** 狼毒大戟配伍大枣水煎液;载药血清;MCF-7 细胞;凋亡;PI3k/Akt 途径

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0066-10

### Study of the anti-breast cancer effects and mechanisms of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba *in vitro*

MA Liwei<sup>1,6</sup>, CHEN Zhe<sup>2</sup>, CHEN Song<sup>3</sup>, NI Shiyu<sup>4</sup>, LI Jing<sup>5</sup>, GE Pengling<sup>6</sup>, LIU Jicheng<sup>1\*</sup>

(1. Research Institute of Medical Science and Pharmacy (Postdoctoral Workstation), Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China. 2. School of Public Health, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006. 3. School of Pharmacy, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006. 4. Daqing Long Nan Hospital, Daqing 163001. 5. the Affiliated Cancer Hospital of Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161099. 6. Mobile Postdoctoral Stations, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040)

**【Abstract】 Objective** To explore the proliferation-inhibition and inducement of apoptosis efficacy of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba (DEFSJ) on the human breast cancer cell line MCF-7 and reveal the underlying

[基金项目] 齐齐哈尔市科技局联合引导项目(LHYD-202028)。

[作者简介] 马立威(1987—),男,副研究员,研究方向:药物抗肿瘤。E-mail:549133553@qq.com

[通信作者] 刘吉成(1958—),男,教授,研究方向:药物抗肿瘤。E-mail:jcliu@qmu.edu.cn

molecular mechanisms. **Methods** DEFSJ-containing serum (CS) was prepared via a serum pharmacology method. Cell morphology was observed by optical microscope and transmission electron microscope (TEM). After MCF-7 cells were treated with DEFSJ-CS and LY294002 (PI3k signaling pathway inhibitor), the CCK-8 method was used to detect proliferation, the apoptosis rate was detected with a flow cytometer, and the expression of PI3k/Akt signaling pathway and Bcl-2 family-related proteins were detected by immunostaining. **Results** Morphological changes and typical features of apoptosis were observed by optical microscope and TEM. DEFSJ-CS had a significant inhibitory effect on the proliferation of MCF-7 cells ( $P < 0.01$ ), and the inhibitory effect was more significant when combined with LY294002 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Annexin V-FITC/PI staining result showed that, compared with the negative control group, the apoptosis rate significantly increased with the increase of DEFSJ-CS, and the apoptosis rate was more significant when combined with LY294002. Immunostaining result showed that the protein expression levels of PI3k, p-Akt, p-FoxO3a, and Bcl-2 were down-regulated and the levels of Bax and Bim were up-regulated ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and p-Akt and p-FoxO3a were down-regulated more significantly after combined treatment with LY294002. **Conclusions** The PI3k/Akt signaling pathway is involved in the effect of DEFSJ-CS on proliferation inhibition and inducing apoptosis in MCF-7 cells.

**【Keywords】** DEFSJ; containing serum; MCF-7 cells; apoptosis; PI3k/Akt pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

2020 年国际癌症研究机构公开显示的全世界癌症负担数据:乳腺癌在全世界以 226 万例的新发病例,超过了肺癌的 220 万例,乳腺癌取代肺癌,成为全球第一大癌<sup>[1]</sup>。世界卫生组织也报道,中国女性乳腺癌发病人口以 17.6% 及致死人口以 15.6% 的比例均占全球首位<sup>[2]</sup>。近年来,中国地区女性的乳腺癌发病及致死率还在呈上升趋势<sup>[3]</sup>。对于乳腺癌的治疗,临床上目前仍主要以手术切除为主,但术后易复发转移,预后较差;其他治疗手段如放疗、化疗、靶向治疗和内分泌治疗等,虽有一定疗效,但长期使用毒副作用较大,费用较高,对患者造成了一定的经济、心理负担<sup>[4-5]</sup>。因此,对乳腺癌新的治疗方案的制定和高效、低毒的治疗药物的研究与开发仍然是急需解决的问题。中医在肿瘤的预防和治疗上扮演着不可替代的角色,中药是中医的一个重要组成部分,已经有千年的应用历史。近年来,中医药治疗乳腺癌取得了显著的成效,在改善患者的生存质量、延长生存期、控制病情发展等方面发挥了显著作用<sup>[6]</sup>。同时,中药植株内获得的单体成分可以靶向一条或多个途径的多个分子,和癌症化疗使用的单分子作为靶点的药比较,可在更好治疗效果基础上实现更少的毒副效应<sup>[7]</sup>。

狼毒大戟最早记载于《神农本草经》,作为大戟科的多年生草本植物,根入药,是传统的中药材;药材资源丰富,应用历史悠久,药理活性多样,民间主要用于癌症治疗、抗炎、驱虫等<sup>[8]</sup>。中药大戟类植株普遍有苦寒的药性,有清除机体水邪的功效,是祛水的典型中药材,有一定毒副作用,因而实际应用中大戟科药材常与枣类联合来减弱其迅猛的药

性作用;同时参照仲景的名方“十枣汤”的成方原理,将狼毒大戟与大枣配伍使用<sup>[8-9]</sup>。另外,在研究前期已证实,狼毒大戟中有效活性成分以萜类化合物为主,且目前发现的活性成分:岩大戟内酯 A、岩大戟内酯 B、17 羟基岩大戟内酯 B 等均有诱导乳腺肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[10]</sup>。为进一步从整体角度揭示其诱导细胞凋亡的作用及信号转导机制,使未来人们有可能对其信号通路进行人为的干预,从而为疾病治疗提供新的思路和手段。研究拟在此基础上进一步从细胞水平上探究其抗乳腺肿瘤效应及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重(300±30)g,购于哈尔滨医科大学实验动物中心[SCXK(黑)2019-001]的喂养在齐齐哈尔医学院实验动物实验室[SYXK(黑)2021-001],按无特定病原体级动物饲养规范饲养,饲养室环境:温度(22±2)℃,相对湿度 60%,12 h 光暗周期,本实验获齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会审批(QMU-AECC-2021-138),并依据实验动物 3R 原则进行人道主义关怀。

#### 1.1.2 细胞

MCF-7 细胞株,来源于中国科学院细胞库,在课题组中心实验室液氮罐中留样备用。

### 1.2 主要试剂与仪器

MEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号:AC10232463);CCK-8 试剂盒(中国 Biosharp 公司,

批号:DCM670718100);抗体(PI3k 批号:GR177867-5、荧光标记的抗兔二抗批号:GR267728-13、p-FoxO3a<sup>253</sup> 批号:GR324092-2、Bim 批号:GR255387-5、Bax 批号:GR287934-5、Isotype control 批号:GR262233-12、荧光标记的抗鼠二抗批号:GR247029-14)购自美国 Abcam 生物公司;p-Akt<sup>473</sup>、Bcl-2、LY2940042 为美国 cell signaling technology 生物公司,产品批号分别为:#16、#07、#15;细胞凋亡试剂盒(BD 公司,批号:0076884);4%多聚甲醛试剂(产品号:P0097)、细胞通透试剂(产品号:P0098)均购自中国碧云天公司;胎牛血清(美国 Clark 公司,批号:JC65936);紫杉醇:阳性药(新乡双鹭药业股份有限公司,产品批号:20170301)。

3111 型细胞培养箱(美国 Thermo fisher scientific 公司);VS-1300L-U 型超净台(中国苏净安泰仪器厂);Spark 型全波长酶标检测器(奥地利帝肯公司);IX51 型显微镜(日本奥林帕斯公司);HT7700 型电镜(日本日立公司);FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),R-300 型旋转蒸发(瑞士步琪公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验药物制备

中药狼毒大戟植株由课题组成员采摘自黑龙江省大庆市杜尔伯特县,药材植株由课题组成员郭丽娜教授认定,将其根加工成饮片,留存使用;大枣来源于齐齐哈尔市药材市场(药用枣的产品批号为 20160109-1,产地来自陕西)。狼毒大戟配伍大枣水煎液(DEFSJ)制备:取新鲜狼毒根切片与药用枣依据 1:1 的重量配比使用(狼毒根切片 1000 g,药用枣 1000 g,加灭菌水 5 L 搅拌均匀后再加水 5 L),浸泡至少 0.5 h,加热煮沸 1 次冷却后重复煮沸 1 次,每次加热煮沸持续至少 120 min,滤掉残渣后,旋转蒸发仪上 70℃ 条件浓缩到 2 000 mL,留存使用。

#### 1.3.2 载药血清制备

SD 大鼠 20 只,适应性喂养 3 d 后,进行实验。大鼠随机分成 4 组(阴性组、DEFSJ 高、中、低剂量组),每组 5 只;阴性组给予生理盐水每只 4 mL,DEFSJ 高、中、低剂量组分别灌胃给予 10.0、5.0、2.5 g/kg 的汤剂,每天早、晚分别给药一次,共给药 3 d,最后一次灌药 60 min 后,无菌全麻情况下,找到腹主动脉取血,离心获得载药血清,合并同组血清于-80℃ 下冷冻,留存使用;载药血清在 56℃ 条件下灭活 0.5 h;再过滤除菌后使用。

#### 1.3.3 细胞培养

MCF-7 细胞复苏后,MEM 的完全培养基(含 10% FBS,1%青/链霉素混合液)常规培养,2~3 d 传代一次。实验剩余细胞液氮中冻存备用。

#### 1.3.4 实验分组

本实验分组如下:空白对照组:10%胎牛血清+90% MEM 培养基;阴性对照组:10%阴性组载药血清+90% MEM 培养基;DEFSJ-CS 低、中、高剂量组分别为:10% DEFSJ 低剂量组载药血清+90% MEM 培养基、10% DEFSJ 中剂量组载药血清+90% MEM 培养基、10% DEFSJ 高剂量组载药血清+90% MEM 培养基;阳性(紫杉醇)对照组:8 mg/L 阳性药+10% 阴性组载药血清+90% MEM 培养基;阴性对照组+LY294002、DEFSJ-CS 低剂量组+LY294002、DEFSJ-CS 中剂量组+LY294002、DEFSJ-CS 高剂量组+LY294002;40 μm/L 的 LY294002 联合对应的载药血清。

#### 1.3.5 光镜下检测细胞形态学变化情况

MCF-7 细胞生长旺盛至对数生长期时,用完全培养基调整细胞浓度  $1.0 \times 10^5$  /mL,在 6 孔实验细胞板每孔加终体积为 2.0 mL 的完全培养基,待细胞贴壁稳定后进行实验。实验分 6 组,空白对照组、阴性对照组、DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组;各剂量组作用 48 h 后取出细胞培养板终止作用,光镜下初步观察各组细胞的形态学变化并拍照。

#### 1.3.6 电镜检测细胞凋亡情况

取生长状态良好的 MCF-7 细胞,均匀的铺在 6 孔板中。实验分为:阴性对照组、DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组;每个细胞培养孔移取 2.0 mL 含载药血清培养基后,放入孵育箱中 48 h 后停止反应。收集并调整各组细胞浓度  $2.0 \times 10^6$  /mL,缓慢加入 2.5% 的戊二醛;4℃ 冰箱过夜固定后,2% 四氧化锇固定 2 h,乙醇系列脱水,环氧树脂浸透、包埋,最后在 Epon812 中 37℃ 过夜,68℃,48 h。超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬铅双染,电镜下观察并拍照。

#### 1.3.7 CCK-8 法评估细胞增殖情况

MCF-7 细胞生长旺盛至对数生长期时,计数细胞  $2 \times 10^4$  /mL,按每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中,放入 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育至细胞均匀生长后执行后续操作。先将实验分 10 组依

次是:空白对照组、阴性对照组、DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组、阴性对照组+LY294002、DEFSJ-CS 低剂量组+LY294002、DEFSJ-CS 中剂量组+LY294002、DEFSJ-CS 高剂量组+LY294002;其中含 LY294002 各组,需在每个时间段实验结束前 1 h 加入;各组平行设置 6 个孔,达各时间(24, 48, 72 h)点后,每孔加 10  $\mu$ L 的 CCK-8 反应 4 h 后,全波长酶标测定仪检测各实验孔在 450 nm 处的光密度 OD 值,按公式评估细胞生长抑制率(%)=(1-OD 实验组/OD 空白组) $\times$ 100%。

### 1.3.8 Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,以  $1.0 \times 10^5$ /mL 的数量,按每皿 4.0 mL 的完全培养基加入到 60 mm 培养皿中。收集载药血清作用 48 h 后的各组细胞;其中含 LY294002 组,需在实验结束前 1 h 加入;按照试剂盒说明书,加样枪抽取 Annexin V-FITC 染色剂及 PI 染色剂,无光条件下静置 0.3 h 后,通过流式细胞分析仪评估每个实验组的细胞凋亡比例。

### 1.3.9 免疫染色法分析相关蛋白表达情况

MCF-7 细胞生长旺盛至对数生长期时,计数细胞  $2.0 \times 10^6$ /mL,按照每皿 8.0 mL 的量设置细胞培养大皿,待细胞贴壁稳定后,随机分为:阴性对照组、DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组;吸取对应的载药

血清放进对应的培养皿中,药物持续作用 2 d 后,取出培养皿弃掉载药培养基;收集细胞于流式管中,保证每个流式管至少含有  $1.0 \times 10^6$  个细胞,上机前经固定液固定,通透液通透后;加入待测一抗:Bax、Bel-2、Bim、p-FoxO3a、p-Akt、PI3k;室温孵育 1 h,对应加入荧光二抗室温避光孵育 30 min;另外在 p-Akt、p-FoxO3a 蛋白检测时增加 4 组 PI3k 特异性抑制剂(LY294002)作用的细胞,预先准备用于调试机器、划定仪器“门”位置的对照管,以及同型对照管(isotype)后上机检测。利用仪器分析软件,以 Y 轴细胞数对 X 轴荧光强度(fluorescence intensity, FI)建立单参数直方图。目的蛋白相对表达量以相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)值表示,即 RFI=目的蛋白的 FI 值-同型对照的 FI 值。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件处理,统计数据用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,依照方差齐性分析检验结果,组间比较应用 Dunnett *t* 方法,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  代表差异有统计学的意义。

## 2 结果

### 2.1 DEFSJ-CS 对细胞形态学变化影响

如图 1 所示:空白对照组、阴性对照组细胞镜下可见:胞浆丰富,细胞核较大,细胞生长密集,状态良好;DEFSJ-CS 低剂量组中细胞少量出现皱缩,形

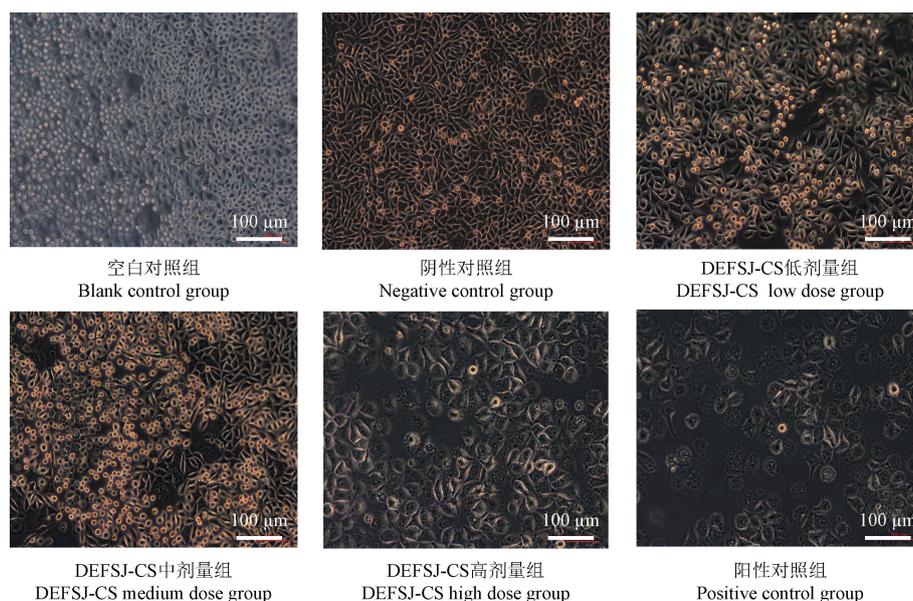


图 1 光学显微镜下观察 DEFSJ-CS 作用的 MCF-7 细胞形态学变化影响

Figure 1 Effect of DEFSJ-CS on morphological changes in MCF-7 cells under optical microscope

变不明显;DEFSJ-CS 中剂量组:部分细胞产生形变,透光度增加,贴壁能力下降;DEFSJ-CS 高剂量组:细胞数量明显减少,可以观察到凋亡细胞出现,阳性对照组细胞碎片增多,细胞数量也明显减少,细胞形变也较明显。

## 2.2 DEFSJ-CS 对细胞超微结构的影响

阴性对照组(如图 2A、2B) MCF-7 细胞镜下可见:细胞核异型性明显,核浆比大,细胞器丰富,细胞表面可见微绒毛,双层核膜明显,游离核蛋白体丰富;图 2C、2D、2E、2F 为载药血清作用 48 h,细胞器大量空泡变,胞质内出现大量脂质堆积,核内异染色质边集,核固缩,核周隙增宽,内质网扩张,线粒体空泡化,呈早期细胞凋亡的形态学特征。图 2G、2H 为含阳性药紫杉醇的阳性对照组细胞:细胞核异染色质聚集成“半月形”,细胞器广泛空泡变性。这些形态变化与文献报道的电镜下细胞的凋亡特征基本相同。

## 2.3 DEFSJ-CS 对细胞增殖的影响

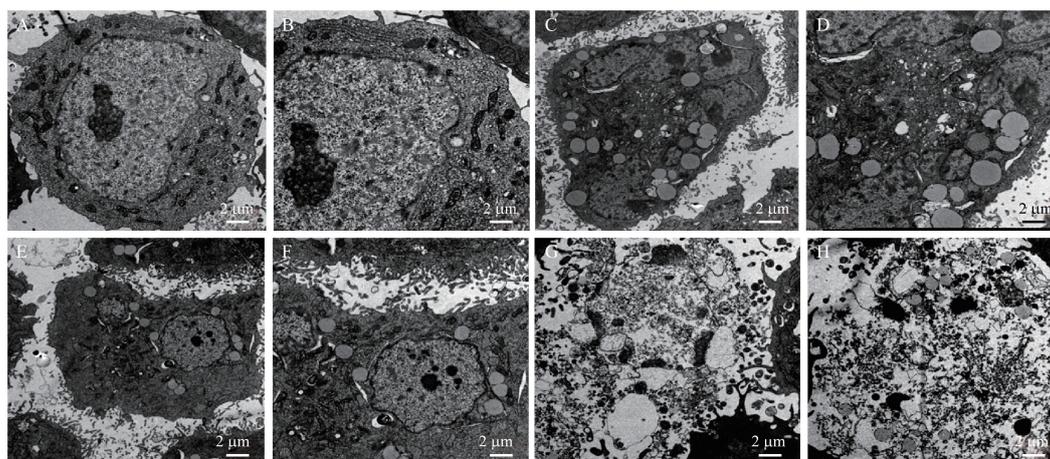
由表 1 可知,每个时间段(24、48、72 h)中,与阴性对照组比较,各组( DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组、阴性对照组 + LY294002、DEFSJ-CS 低剂量组 + LY294002、DEFSJ-CS 中剂量组 + LY294002、DEFSJ-CS 高剂量组 + LY294002)作用细胞后,OD 值均下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),空白对照与阴性对照组比较差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。而载药血清与 LY294002 联合组,与阴性对照组 + LY294002 比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 2.4 DEFSJ-CS 对细胞凋亡率影响

细胞凋亡率通过 Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞仪定量检测,结果如图 3 所示,DEFSJ-CS 及联合 LY294002 可诱导 MCF-7 细胞凋亡,与阴性对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),LY294002 剂量不变的情况下,DEFSJ-CS 中剂量组 + LY294002 与阴性对照组 + LY294002 比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );DEFSJ-CS 联合 LY294002 诱导细胞凋亡的作用效果比单独 DEFSJ-CS 组作用效果更佳。

## 2.5 DEFSJ-CS 对细胞 PI3k/Akt 通路及 Bcl-2 家族相关蛋白表达

DEFSJ-CS 低剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 高剂量组、阳性对照组 MCF-7 细胞中 PI3k/Akt 通路的 PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 蛋白相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)值与阴性对照组比较逐渐减小,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),如图 4 所示。同时, Bcl-2 家族中 Bcl-2 蛋白 RFI 值与阴性对照组比较逐渐减小,如图 5A 所示; Bim、Bax 蛋白 RFI 值与阴性对照组比较逐渐增大,如图 5B、5C 所示;差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。而与 LY294002 联合作用的各组细胞,抑制剂加入前后对 MCF-7 细胞的 p-Akt、p-FoxO3a 蛋白的 FI 值影响的检测结果,如图 6 所示,加入抑制剂后的各组(阴性对照组 + LY294002、DEFSJ-CS 中剂量组 + LY294002)细胞 p-Akt、p-FoxO3a 蛋白的 FI 值比单独阴性对照组或单独 DEFSJ-CS 中剂量组的 FI 值均有所降低。



注:A、B:阴性对照组;C、D、E、F:DEFSJ-CS 组;G、H:阳性对照组。

图 2 电镜下观察 DEFSJ-CS 作用的 MCF-7 细胞超微结构变化

Note. A/B, Negative control group. C/D/E/F, DEFSJ-CS group. G/H, Positive control group.

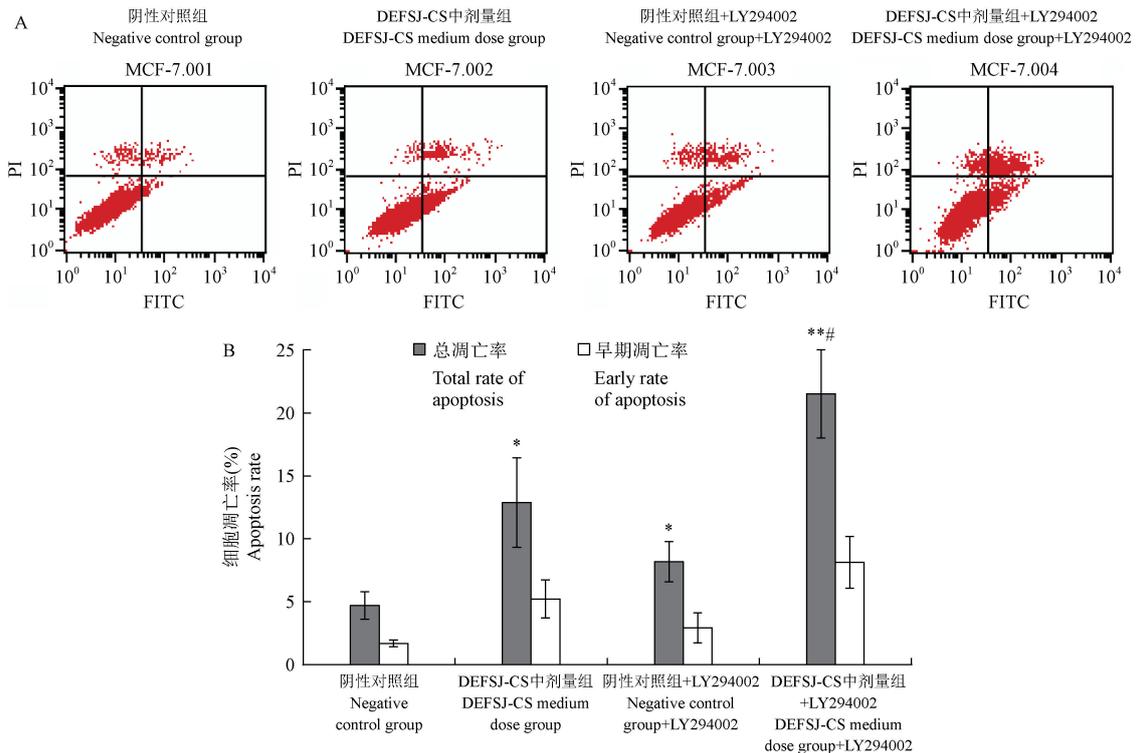
Figure 2 Effect of DEFSJ-CS on ultrastructural changes in MCF-7 cells observed under TEM

**表 1** DEFSJ-CS 联合 LY294002 对 MCF-7 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
**Table 1** Effect of DEFSJ-CS in combination with LY294002 on the proliferation in MCF-7 cells

组别 Groups	24 h		48 h		72 h	
	OD	抑制率 (%) Inhibition ratio	OD	抑制率 (%) Inhibition ratio	OD	抑制率 (%) Inhibition ratio
空白对照组 Blank control group	1.324±0.026	/	1.671±0.033	/	2.116±0.048	/
阴性对照组 Negative control group	1.301±0.060	/	1.640±0.045	/	2.172±0.052	/
DEFSJ-CS 低剂量组 DEFSJ-CS low dose group	1.250±0.052	3.92	1.501±0.056**	8.48	1.644±0.064**	24.32
DEFSJ-CS 中剂量组 DEFSJ-CS medium dose group	1.160±0.061**	10.84	1.402±0.062**	14.51	1.210±0.053**	44.30
DEFSJ-CS 高剂量组 DEFSJ-CS high dose group	1.020±0.056**	21.60	1.220±0.057**	25.61	0.898±0.059**	58.66
阳性对照组 Positive control group	0.861±0.037**	33.52	1.014±0.032**	38.17	0.498±0.051**	77.06
阴性对照组+LY294002 Negative control group+LY294002	1.152±0.042**	11.45	1.430±0.050**	12.80	1.954±0.045**	10.03
DEFSJ-CS 低剂量组+LY294002 DEFSJ-CS low dose group+LY294002	1.066±0.035**#	18.06	1.289±0.042**#	19.94	1.531±0.060**#	29.50
DEFSJ-CS 中剂量组+LY294002 DEFSJ-CS medium dose group+LY294002	0.95±0.036**#	26.98	1.123±0.040**#	30.25	1.010±0.056**#	53.51
DEFSJ-CS 高剂量组+LY294002 DEFSJ-CS high dose group+LY294002	0.821±0.031**#	36.89	0.981±0.038**#	39.07	0.733±0.059**#	66.26

注:与阴性对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与阴性对照组+LY294002 比较, #  $P < 0.01$ 。

Note. Compared with negative control group, \*\*  $P < 0.01$ . Compared with negative control group+LY294002, #  $P < 0.01$ .

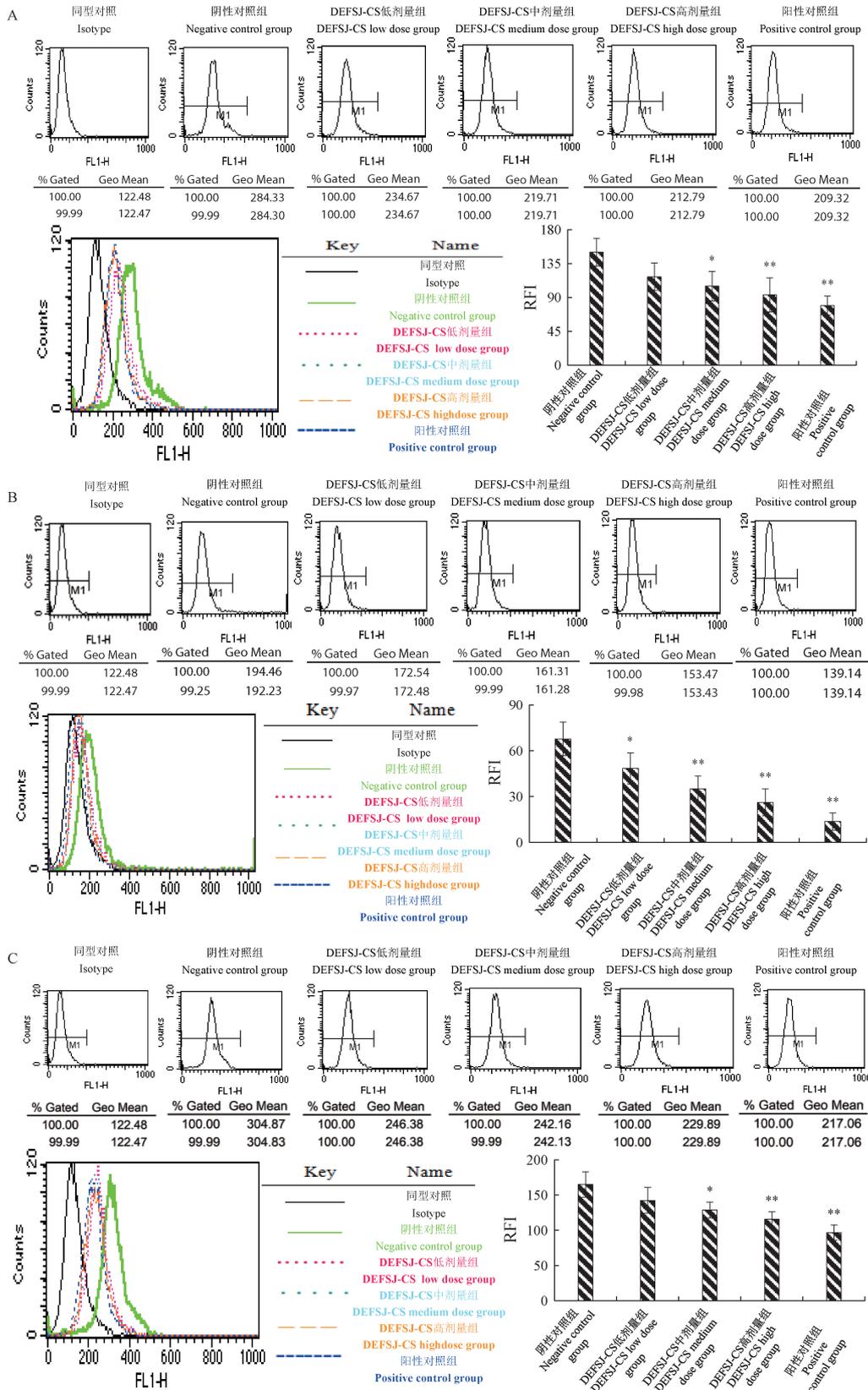


注:A:作用效果图,B:柱状图表示组间差异。与阴性对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与阴性对照组+LY294002 比较, #  $P < 0.01$ 。

**图 3** DEFSJ-CS 联合 LY294002 对 MCF-7 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Rendering. B, Histogram shows differences between groups. Compared with negative control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ . Compared with negative control group+LY294002, #  $P < 0.01$ .

**Figure 3** Effect of DEFSJ-CS combine with LY294002 on the apoptosis in MCF-7

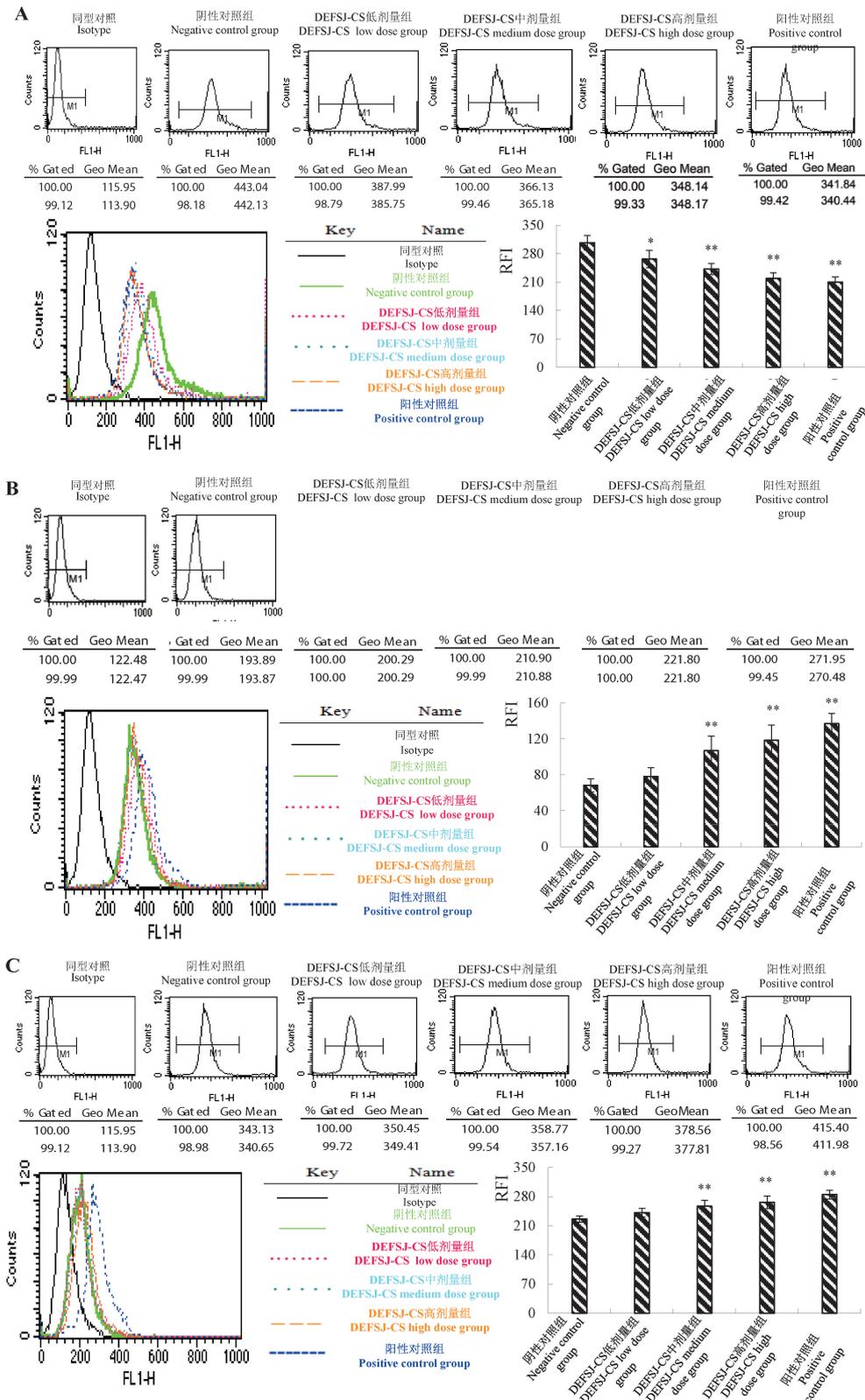


注:A:PI3k;B:p-Akt;C:p-FoxO3a。与阴性对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 DEFSJ-CS 对 MCF-7 细胞中 PI3k、p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. A, PI3k. B, p-Akt. C, p-FoxO3a. Compared with negative control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 4 Effect of DEFSJ-CS on the expression of PI3k, p-Akt and p-FoxO3a protein in MCF-7 cells

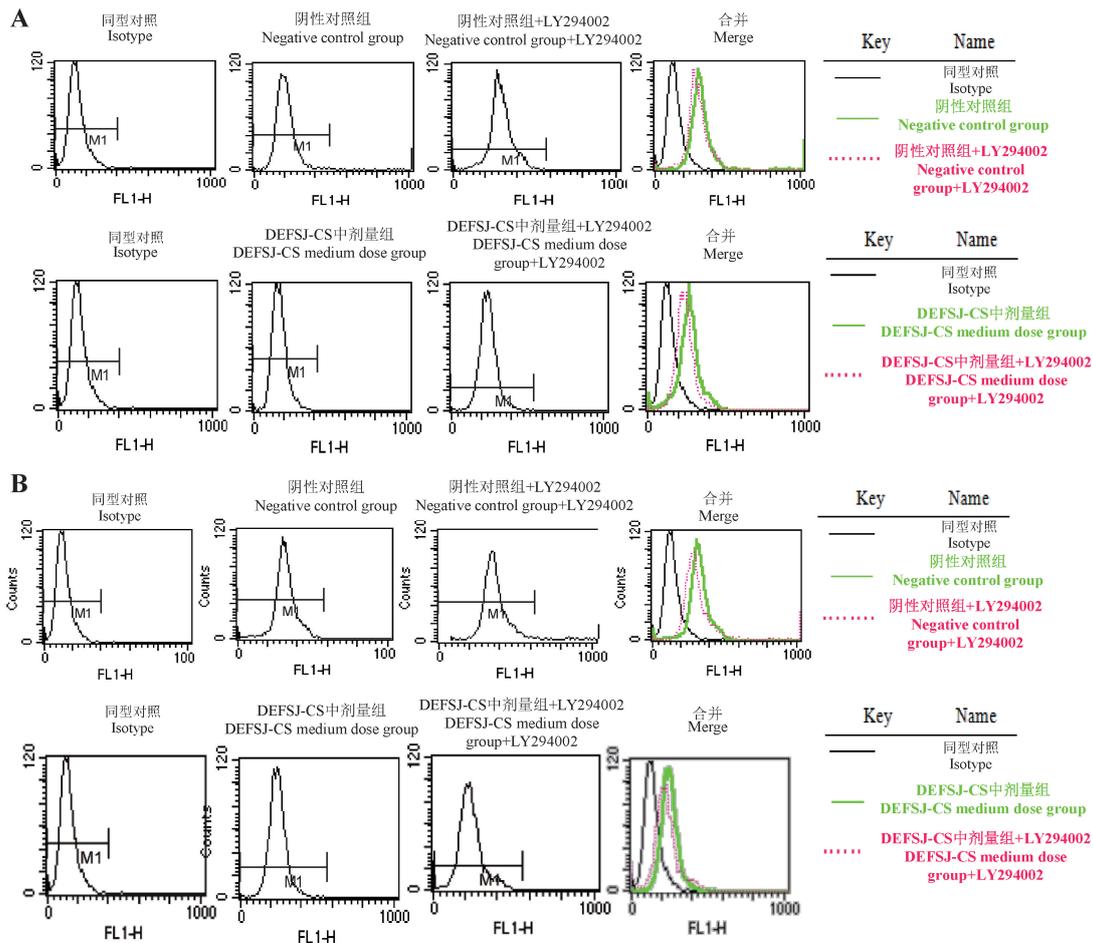


注: A, Bcl-2; B, Bim; C, Bax。与阴性对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 DEFSJ-CS 对 MCF-7 细胞中 Bcl-2、Bim 和 Bax 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Note. A, Bcl-2. B, Bim. C, Bax. Compared with negative control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 5 Effect of DEFSJ-CS on the expression of Bcl-2, Bim and Bax protein in MCF-7 cells



注:A:p-Akt;B:p-FoxO3a。

图6 DEFSJ-CS 或联合抑制剂 (LY294002) 对 MCF-7 细胞 p-Akt、p-FoxO3a 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Note. A, p-Akt. B, p-FoxO3a.

Figure 6 Effect of DEFSJ-CS or combine with inhibitor (LY294002) on the protein expression of p-Akt and p-FoxO3a in MCF-7 cells

### 3 讨论

研究前期多以从狼毒大戟中分离的活性单体来探究其抗肿瘤的活性;而对于中药特别是中药复方的应用,水煎剂是最常用的服药形式,临床上中药的应用更多的也是水煎剂。但无论是单体形式还是复方制剂,对中医药的研究与应用都起到了关键的作用,两者相辅相成,促进、推动了中医药的现代化。药用植物具备作用靶点多、作用通路广、作用效果明确和毒副作用少等优点的同时也使得其药理作用机制的复杂<sup>[11]</sup>。而对于中药复方药理学的评价不仅是中药新药研发的前提,也是中医药现代化重要的基础<sup>[12]</sup>。体外获取载药血清的血清药理学常被作为研究中药及其复方制剂药理活性的常用试验手段<sup>[13]</sup>;鉴于血清药理学能较真实的反映实验药物在机体内的复杂代谢过程,以及模拟肿瘤细胞在体内的复杂内环境,因此我们能够更好的分

析药物的抑癌过程<sup>[14]</sup>,也可以较好的避免体外研究手段的短板<sup>[15]</sup>。将载药血清执行体外细胞实验时可直接与细胞反应,这比直接将药物接触培养体系更具有可拟性<sup>[16]</sup>。故在研究中将狼毒大戟配伍大枣的水煎液转化成的载药血清当成实验受试物,探究其抗乳腺癌的作用。

研究中首先通过 CCK-8 实验及 Annexin V-FITC/PI 染色实验证实了 DEFSJ-CS 能够时间剂量依赖性的抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导细胞凋亡,这一点可以依靠诱导肿瘤细胞凋亡而达到,而对于细胞凋亡的调控线粒体信号传导途径是经典的细胞凋亡信号传导途径之一<sup>[17]</sup>。Bcl-2 家族的因子在参与细胞内源性线粒体调控途径中担当着非常重要的角色。为验证这一点,研究通过光镜及电镜下观察载药血清作用后细胞的形态学变化,并通过流式细胞仪对线粒体信号传导途径相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Bim 进行检测,初步证实了其载药血清可诱

导细胞发生凋亡。现代研究发现,更多的研究者去探究细胞转导途径和癌症进程的内在联系,包括与癌细胞凋亡关系密切的 PI3k/Akt 信号转导途径<sup>[18-19]</sup>。该途径可参与其下游的多个因子的表达变化效应,包括 *Bcl-2* 基因、Caspase 家族基因等,调控癌细胞的生长、分裂增殖和凋亡等效应<sup>[20]</sup>。PI3K/Akt 信号通路是调控细胞增殖和凋亡的重要通路,有着“抗凋亡途径”之称,近年来的研究指出,PI3K/Akt 转导途径的连续活化状态可直接与细胞的增殖分裂、癌变等活动有关,这直接致使细胞发生癌变<sup>[21-22]</sup>。也有研究指出,乳腺癌中 PI3k/Akt 信号通路的活化高达 70%<sup>[23]</sup>。在 CCK-8 实验及细胞凋亡率检测实验中通过与 PI3k 的抑制剂 LY294002 共同药理性干预结果可见,LY294002 组对比同剂量单独载药血清组产生的抑制及诱导凋亡作用明显增强;这证明 PI3k/Akt 通路可能参与了载药血清对细胞抑制及凋亡的调控作用,又进一步通过流式细胞仪检测了细胞中 PI3k/Akt 通路相关蛋白 PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 的表达,以及联合 LY294002 加以佐证,结果发现 DEFSJ-CS 可抑制 PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 蛋白的表达,LY294002 加入后,对比同剂量单独载药血清组,PI3K/Akt 转导途径的相关蛋白表达均降低。

综上所述,PI3K/Akt 转导途径参与调控 DEFSJ-CS 诱导乳腺癌细胞的凋亡,这为狼毒大戟作为抗癌药物的进一步研发提供了基本的实验和理论依据。但是乳腺癌的发生机制复杂,影响因素较多,因此对狼毒大戟抗乳腺癌机制进行更为深入和清晰的探讨将是下一阶段的研究方向。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [ 2 ] World Health Organization. Global Cancer Observatory (GCO): Cancer Today [EB/OL]. [2020-04-01]. <http://gco.iarc.fr/today/home>.
- [ 3 ] 张雪,董晓平,管雅喆,等. 女性乳腺癌流行病学趋势及危险因素研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48(1): 87-92.
- [ 4 ] 刘楠,朱琳,李纳,等. 红花多糖通过阻断 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(18): 4374-4379.
- [ 5 ] 罗燕,蒋益兰,李勇敏,等. 柴胡皂苷 D 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、周期及周期相关调控因子表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(5): 572-576.
- [ 6 ] 胡向阳,胡卫,甘声通,等. 探讨透骨草总生物碱对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长、迁移侵袭的作用及其机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(5): 1071-1074.
- [ 7 ] 马强,陈洁,熊书,等. 去氢木香内酯诱导乳腺癌 SK-BR-3 细胞凋亡的机制研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(2): 200-207.
- [ 8 ] 马立威,陈哲,李京,等. 大戟大枣汤含药血清通过 PI3k/Akt 通路对乳腺癌细胞凋亡的影响 [J]. *中成药*, 2020, 42(10): 2584-2591.
- [ 9 ] 马立威,陈哲,李京,等. 线粒体通路在大戟大枣汤对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖抑制及凋亡诱导中的调控作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(4): 289-296.
- [ 10 ] Jian B, Zhang H, Han C, et al. Anti-cancer activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* steud [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 387.
- [ 11 ] 田璐. 扶正抗癌汤含药血清调节 EMT 进程抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞转移及侵袭作用的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(1): 43-49.
- [ 12 ] 王勇,李春,李栋,等. 基于生物网络与证结合的中药复方药理学研究对策 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(4): 552-555.
- [ 13 ] 李凡,张学林,冯静茹,等. 四君子汤含药血清通过抑制 RhoA/Rac1/Cdc42 通路影响卵巢癌细胞的上皮间质转化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 29-37.
- [ 14 ] 吴沅峰,刘维,赵文甲. 血清药理学方法对药理、药效学和新药研发的贡献 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(24): 3914-3920.
- [ 15 ] 牛俐燃,李冠聪,张婉婷,等. 镰形棘豆黄酮含药血清对人肺癌 A549 细胞活力、凋亡及周期的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(7): 790-795.
- [ 16 ] 赵秀梅,冯文茹,胡人杰. 异种动物血清对体外培养人肿瘤细胞生长的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(6): 35-38.
- [ 17 ] 金晶玉,朱成杰,权英实,等. 罗哌卡因通过线粒体通路诱导人结直肠癌 SW620 细胞株凋亡的实验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(8): 88-92.
- [ 18 ] Zhang QZ, Guo YD, Li HM. Protection against cerebral infarction by Withaferin A involves inhibition of neuronal apoptosis, activation of PI3K/Akt signaling pathway, and reduced intimal hyperplasia via inhibition of VSMC migration and matrix metalloproteinases [J]. *Adv Med Sci*, 2017, 62(1): 186-192.
- [ 19 ] Moradzadeh M, Hosseini A, Erfanian S. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/AKT and telomerase [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(5): 924-928.
- [ 20 ] 杨志强,陈路,张雅茜,等. 紫草素通过调节 PI3K/AKT 途径抑制骨肉瘤生长和作用机制研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(1): 68-74, 96.
- [ 21 ] Spangle JM, Roberts TM, Zhao JJ. The emerging role of PI3K/AKT-mediated epigenetic regulation in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2017, 1868(1): 123-131.
- [ 22 ] Gai JQ, Sheng X, Qin JM, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 338-348.
- [ 23 ] López-Knowles E, O' Toole SA, McNeil CM, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1121-1131.

[收稿日期]2022-03-27