

马立威,姚宏玉,陈哲,等. PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤抗不同分子表型乳腺癌中的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 27-35.

Ma LW, Yao HY, Chen Z, et al. Effects of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba against breast cancer of different molecular phenotypes via PI3k/Akt pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 27-35.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.03.004

PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤抗不同分子表型 乳腺癌中的调控作用

马立威¹,姚宏玉²,陈哲³,倪世宇⁴,陈颂²,李京⁵,刘吉成^{1*}

(1.齐齐哈尔医学院 医药科学研究院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;2.齐齐哈尔医学院 药学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;
3.齐齐哈尔医学院 公共卫生学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006;4.齐齐哈尔医学院附属第五医院,黑龙江 大庆 163001;
5.齐齐哈尔医学院附属第三医院,黑龙江 齐齐哈尔 161099)

【摘要】 目的 探讨 PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤 (decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba, DEFSJ) 抗雌激素受体 (ER) 阴性 (-) 和 ER 阳性 (+) 乳腺癌中的调控作用,为乳腺癌的针对性治疗提供参考。方法 制备 DEFSJ 提取液,采用 UHPLC-Triple Quad 仪进行质控分析。DEFSJ 含药血清 (containing serum, CS) 依照体外血清药理学方法进行获取,乳腺癌 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞分别用不同浓度 DEFSJ-CS 干预 48 h。流式细胞术检测细胞周期分布, DNA ladder 实验评估细胞凋亡程度, Western blot 法检测 PI3k/Akt 通路相关蛋白表达,实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测 FoxO3a、FoxO1a 及 Bim mRNA 表达;激光共聚焦显微镜观察 FoxO3a 蛋白核转位。**结果** UPLC 对 5 批 DEFSJ 提取物进行了分析,结果表明制备工艺可行,质量可控,保证了药理学实验结果的准确性。体外实验中发现,DEFSJ-CS 能阻断细胞在 G2/M 期 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); DNA ladder 实验中呈现典型的细胞凋亡梯带;与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 能使 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 及 p-FoxO1a 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bim 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 使 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Bim mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 并能使细胞中 FoxO3a 蛋白呈现显著的核转位变化;且各数据结果均显示 DEFSJ-CS 对 (ER-) MDA-MB-453 细胞比对 (ER+) MCF-7 细胞作用效果更好。**结论** PI3k/Akt 通路参与了大戟大枣汤抗乳腺癌作用的调控,作用效果因乳腺癌表型差异而不同。

【关键词】 狼毒大戟; MDA-MB-453 细胞; MCF-7 细胞; PI3k/Akt 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 03-0027-09

Effects of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba against breast cancer of different molecular phenotypes via PI3k/Akt pathway

MA Liwei¹, YAO Hongyu², CHEN Zhe³, NI Shiyu⁴, CHEN Song², LI Jing⁵, LIU Jicheng^{1*}

(1. Research Institute of Medical Science and Pharmacy, Qiqihaer Medical University, Qiqihaer 161006, China.

2. School of Pharmacy, Qiqihaer Medical University, Qiqihar 161006. 3. School of Public Health, Qiqihaer

Medical University, Qiqihaer 161006. 4. the Fifth Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Daqing 163001.

5. the Third Affiliated Hospital of Qiqihaer Medical University, Qiqihar 161099)

【Abstract】 Objective To explore the effect of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba (DEFSJ) against estrogen receptor (ER) negative (-) and ER positive (+) breast cancer via the PI3k/Akt pathway, and to provide

【基金项目】 国家自然科学基金 (82174207); 齐齐哈尔市科技局联合引导项目 (LHYD-202028); 黑龙江省中医药管理局科技计划项目 (ZHY2020-179)。

【作者简介】 马立威 (1987—), 男, 副研究员, 研究方向: 药物抗肿瘤。E-mail: maliwei@qmu.edu.cn

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

a reference for the targeted treatment of breast cancer. **Methods** DEFSJ extract was prepared and analyzed using UHPLC-Triple Quad. DEFSJ containing serum (CS) was prepared via a serum pharmacology method. Different concentrations of DEFSJ-CS were applied to (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 breast cancer cells *in vitro* for 48 h. The distribution of cells in different stages of the cellular cycle was evaluated using a Flow cytometer. DNA ladder assay was used to assess the degree of apoptosis, and the expression of PI3k/Akt pathway-related proteins was evaluated by Western blot assay. The expression of FoxO3a, FoxO1a, and Bim mRNA was detected by Real-time quantitative PCR. Nuclear transposition of FoxO3a protein was analysed using a confocal laser microscopy. **Results** Five batches of DEFSJ extract were analyzed using UPLC, and the result showed that the preparation technology was feasible and the quality was controllable, ensuring the accuracy of the pharmacological experiment result. DEFSJ-CS blocked cells in the G2/M phase ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Cells treated with DEFSJ-CS displayed the typical apoptotic ladder in the DNA ladder experiment. Compared with the negative control cells, the DEFSJ-CS group cells had decreased protein expression of p-PI3k, p-Akt, p-FoxO3a, and p-FoxO1a ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased protein expression of Bim ($P < 0.05$); decreased mRNA expression of FoxO3a and FoxO1a ($P < 0.05$, $P < 0.01$); increased mRNA expression of Bim ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and enhanced nuclear translocation of FoxO3a protein. The data showed that DEFSJ-CS had a stronger effect on (ER-) MDA-MB-453 cells than (ER+) MCF-7 cells. **Conclusions** The regulatory effect of DEFSJ extract on anti-breast cancer involves the PI3k/Akt pathway, and the effect varies with phenotypic differences.

【Keywords】 *Euphorbia fischeriana* Steud.; MDA-MB-453 cells; MCF-7 cells; PI3k/Akt pathway

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

在 2020 年《全球癌症统计报告》中的数据显示,全球范围内新增乳腺癌病例约 226 万,超过了肺癌的新增病例数,成为全球第一大癌^[1]。而现今,临床上针对乳腺肿瘤患者的治疗仍以手术为第一选择,辅以放、化疗及内分泌治疗等,但弊端是术后易出现复发的情况,且放、化疗易产生不良反应^[2]。激素依赖性乳腺肿瘤的发生发现,和雌激素的产生量关系密切。近些年,乳腺癌患者给予内分泌药物治疗能够有效改善病人的预后,特别作为主要的治疗方案针对激素受体为阳性的乳腺癌患者^[3]。有研究指出,在乳腺肿瘤患者中,按基因分型的雌激素受体阴性(ER-)患者占近 1/3,这部分人群中还以年轻女性为主^[4]。在临床上相比其它分型,高的侵袭性及不良的预后是 ER-乳腺癌的特点。因而,在乳腺癌的治疗研究中,有效治疗 ER-乳腺癌是重点和难点。

中药及其活性提取物在抗乳腺癌中发挥着重要作用,有报道证实,众多中药的活性成分均能抑制乳腺肿瘤细胞的增殖、迁移和复发,并影响其耐药性^[5]。中医药防治乳腺癌效果确切,将中医药的辨证论治及整体观思想与现代医学的精准治疗相结合,就能起到扬长避短发挥中西医各自优势的作用,在乳腺癌防治中有着重要意义^[6]。狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana* Steud.)为传统中草药,2020 年版药典记载其味辛、性平,有毒,归肝、脾经,能起到散结及杀虫的功效,作为外用药治疗淋巴结

核、皮癣;课题组前期从辨证论治的角度提出并证实了基于以毒攻毒理论,ER-乳腺癌是乳腺癌毒(癌毒、邪毒)性的表现形式,能够被狼毒大戟的毒(药性)所攻;本研究以此作为理论依据开展。同时前期研究也证实大戟大枣汤含药血清对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖有一定的抑制效果并能诱导其产生凋亡^[7];而它的抗乳腺肿瘤效果能否因分子表型不同呈现不同的治疗效果,将在本研究中探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

由哈尔滨医科大学实验动物医学部[SCXK(黑)2019-001]提供的 8~9 周龄的 20 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 300~330 g,按 SPF 级动物饲养要求在齐齐哈尔医学院下属的实验动物中心进行喂养及实验[SYXK(黑)2021-013],相关动物实验内容经齐齐哈尔医学院学术伦理委员会授权(QMU-AECC-2021-67),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞株

乳腺癌(ER+)MCF-7 细胞、(ER-)MDA-MB-453 细胞均采购自中国科学院细胞资源中心,在液氮中储藏备用。

1.2 主要试剂与仪器

L15 培养基、MEM 培养基(Hyclone 试剂公司,

批号: AF29500573、AH30050286); FBS 血清 (Clark 试剂公司, 批号: JC63436); DAPI 染料 (Thermo 生物公司, 批号: 1890342); 周期检测 kit (美国 BD 生物科学公司, 批号: 9283024); ActinGreen488 染料 (Gene Copoeia 试剂公司, 批号: 1501136 T); PrimeScript^{RT} reagent Kit、DNA 提取试剂盒、TBGreen PremixEx Tap、TRIzol (TaKaRa 生物技术公司, 批号: AJ60658A、AK1301、AJG1421A、AI51028A); 兔抗人 p-PI3k 单克隆抗体; 兔抗人 p-FoxO3a 多克隆抗体、兔抗人 Bim 单克隆抗体为美国 Abcam 公司产品; 兔抗人 p-FoxO1a 单克隆抗体、兔抗人 p-Akt 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 抗体为美国 CST 公司产品。

6500+型 UHPLC-Triple Quad (美国 AB SCIEX 公司); Spark 型酶标仪 (奥地利 TECAN 公司); 3111 型细胞培养箱 (美国 Thermo 生物公司); R-300 型旋转蒸发 (瑞士 Buchi 公司); Observer A1 型荧光显微镜、LSM710 型激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 仪器公司); Q5 型 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); FACSCalibur 型流式细胞仪 (美国 BD 生物科学公司); ChemiDoc MP 型荧光及化学发光成像系统 (美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物制备

狼毒大戟药材采摘于黑龙江省泰康县, 经郭丽娜教授 (本校天然药物化学实验中心) 鉴定后使用, 样品收集在齐齐哈尔医学院地方药物标本室 (标本号: 1123C0006000000128); 大枣采购于齐齐哈尔药材批发市场。大戟大枣汤 (DEFSJ) 制备已在前期研究中完成^[7]; 狼毒大戟根切片与医用大枣按重量比 1:1 的比例混合, 加入 10 倍量的蒸馏水, 混合后经浸泡、煎煮 (每次 2 h, 共煎煮 2 次)、旋蒸 5 倍浓缩后即得 DEFSJ 提取液 (1 g 生药/mL)。

1.3.2 含药血清制备

SD 大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。大戟大枣汤含药血清 (DEFSJ-CS) 的制备已在前期研究中完成^[7]; 简述制备过程如下, 阴性对照组 SD 大鼠灌胃适量生理盐水, DEFSJ 低、中、高剂量组分别灌胃给予 DEFSJ 提取液 2.5、5.0 和 10.0 g/kg, 每天间隔给药 2 次, 不间断持续 3 d, 最后 1 次给药 60 min 后, 麻醉大鼠并开腹找到腹主动脉取血、分离血清, 备用。

1.3.3 细胞培养

取出液氮中的 MCF-7 细胞用含 10% 血清的

MEM 完全培养基进行培养及传代; 同时取出 MDA-MB-453 细胞用含 10% 血清的 L15 完全培养基进行培养及传代, MCF-7 细胞置于 5% CO₂、95% 空气的培养箱中培养; MDA-MB-453 细胞置于 100% 空气的培养箱中培养, 细胞约 2~3 d 传代 1 次。

1.3.4 实验分组

实验分阴性对照组 (10% 阴性对照组含药血清 +90% 培养基)、DEFSJ-CS 低 (10% DEFSJ 低剂量组含药血清 +90% 培养基)、中 (10% DEFSJ 中剂量组含药血清 +90% 培养基)、高 (10% DEFSJ 高剂量组含药血清 +90% 培养基) 剂量组。

1.3.5 质控分析

按照“1.3.1”中的方法分别制备 5 批 DEFSJ 提取液, 取各批次提取液 100 μL 用 400 μL 蒸馏水稀释 1 倍, 旋涡 30 s, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。采用 UHPLC-Triple Quad 对 DEFSJ 提取液进行质控分析。ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm, Waters 公司), 在 40 °C 条件下, 流速为 0.4 mL/min, 注入量设置为 1.0 μL。流动相是由 A (含 0.1% 甲酸的超纯水) 和 B (含 0.1% 甲酸的乙腈) 组成。梯度洗脱条件: 0~2.5 min, 95% A, 5% B; 2.5~3.5 min, 75% A, 25% B; 3.5~4.5 min, 50% A, 50% B; 4.5~7.5 min, 25% A, 75% B; 7.5~8.0 min, 25% A, 75% B 和 8.0~17.0 min, 100% B。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期分布

将处于对数生长期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞用细胞计数仪计数 6 孔细胞培养板 2.0 × 10⁵/孔, 并添加 2 mL 完全培养基, 待细胞贴壁后进行实验, 实验分阴性对照组、DEFSJ-CS 低、中、高剂量组。待 DEFSJ-CS 作用细胞 48 h 后, 胰酶消化后收集细胞悬液至流式管中, 按试剂盒说明操作, 依次加入 250 μL 试剂 A 液, 室温下反应 10 min, 加入 200 μL 试剂 B 液, 室温下反应 10 min, 加入 200 μL 试剂 C 液, 室温避光反应 10 min 后, 上流式细胞仪检测, 并分析细胞各周期分布情况。

1.3.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析细胞凋亡

细胞准备及分组处理情况同“1.3.6”, 依据 DNA 提取试剂盒说明书简述实验方案如下, 向装有各组细胞的离心管中, 依次加入试剂 RNaseA、Protease K、裂解液轻轻混匀, 置于 70 °C 水浴中反应 10 min; 冷却后将无水乙醇滴加进各组离心管内, 管中呈现白色絮状沉淀, 随后将管内液体移到试剂盒提供的 DNA 纯化柱中; 将柱子离心弃上清并加入试

剂盒自带洗涤液洗涤,重复 2 次,随后将柱子镶套在 1.5 mL 的离心管中,滴加一定体积的洗脱液,在常温下静置 10 min,随后在离心机上低温离心,将洗脱下来的各组细胞的 DNA 收集。将纯化的 DNA 样品上样至预先配置的 1% 浓度的琼脂糖凝胶中,并加入电泳液在电泳仪上电泳约 30 min,然后在全自动荧光及化学发光系统中成像并拍照分析。

1.3.8 Western blot 法检测相关蛋白表达

将处于对数期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞,以 2.0×10^5 /mL 接种到 100 mm 的细胞培养皿中,每个皿中含 8.0 mL 完全培养基,放入培养箱中过夜后用于实验;消化、离心收集实验药物处理 48 h 的各组细胞置于 Ep 管内,每个 Ep 管内滴加 2.0 mL 的 RIPA 裂解液(含一定浓度的磷酸酶、蛋白酶抑制剂),置于冰浴中 0.5 h(每 10 min 混匀 1 次),随后将 Ep 管离心,将含有蛋白的上清液移到另一干净的 Ep 管中,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书,对提取的各组蛋白进行定量。将定量的蛋白样品依次经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜、封闭,一抗反应、二抗反应后,滴加 ECL 发光液在成像系统仪内发光,获取目的蛋白及内参蛋白(GAPDH)图像信息,通过 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.3.9 qRT-PCR 法检测 Bim、FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达

细胞准备及分组处理情况同“1.3.6”;取出 DEFSJ-CS 作用 48 h 的各组细胞。采用 TRIzol 法,将 1 mL TRIzol 溶液加到培养板的各孔中以获取总 RNA, RNA 的浓度和纯度通过微量分光光度计分析用 A_{260}/A_{280} 处的吸光度比值来评估,依据 PrimeScript^{RT} reagent Kit 说明书,进行 cDNA 的合成,然后以 cDNA 为模板,依据 PremixEx Tap 说明书执行定量 PCR 反应,将 β -actin 当做管家基因,检测 FoxO3a、FoxO1a、Bim 基因;待测基因引物序列及扩增长度见表 1。测得各组样本的 Ct 值,用如下公式进行相对定量计算:待测基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{对照基因}}) - (Ct_{\text{管家目的基因}} - Ct_{\text{管家对照基因}})$)。

1.3.10 激光共聚焦显微镜下观察 FoxO3a 蛋白核转位变化

将处于对数期的 (ER-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞,以 2.0×10^5 /mL 的密度移植置共聚焦 12 孔培养板(黑壁底透)内,每孔 1.0 mL 完全培养基,放入培养箱中过夜后用于实验,分组设置为阴

表 1 引物的组成和被扩增产物的长度
Table 1 Designed primer and amplified length

基因 Gene	引物序列 Primer sequences	长度/bp Length
β -actin	F: 5' -GTTGTCGACGACGAGCG-3' R: 5' -GCACAGAGCCTCGCCTT-3'	93
FoxO3a	F: 5' -AGTTCCTCATCTGACCC-3' R: 5' -CTTCAAGGATAAGGGCGACA-3'	102
FoxO1a	F: 5' -GCACACGAATGAACCTGCTG-3' R: 5' -AAGAGCGTGCCTACTTCAA-3'	106
Bim	F: 5' -GATAGTGGTTGAAGGCCTGG-3' R: 5' -CCTCCCTACAGACAGAGCCA-3'	102

性对照组、DEFSJ-CS 中剂量组、DEFSJ-CS 中剂量组 + LY294002 (PI3k 信号通路抑制剂) 组,置培养箱中继续孵育 48 h 后终止,进行免疫染色,具体步骤如下:培养板中的细胞经固定液固定,通透液通透,在室温中用含有 1% BSA 的磷酸盐缓冲液进行封闭 0.5 h;滴加 anti-FoxO3a 抗体,在 4 °C 环境中反应过夜,次日加入荧光二抗在室温条件下避光、孵育 1.5 h;并用 DAPI 染料对细胞核进行染色;激光共聚焦显微镜下获取接受不同处理的细胞形态变化、目的蛋白表达位置的变化并拍照,所有图片拍摄时激光强度设置相同。

1.4 统计学方法

实验结果数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 19.0 软件处理,根据方差齐性检验结果,多组间比较采用单因素方差分析,组间的对比采取 Dunnett-*t* 方法,数据的比较结果按照 $P < 0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UHPLC 对 DEFSJ 提取液质控分析结果

采用 UHPLC 对 5 批 DEFSJ 提取液进行质控分析,结果如图 1 所示,各批次提取液成分稳定,证明制备工艺可行,质量可控,保证了后续药理实验结果的准确性。

2.2 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞 DNA“梯带”形成的影响

通过琼脂糖凝胶电泳分析 DEFSJ-CS 作用后乳腺癌细胞的核酸片段化程度,以判断细胞凋亡程度。结果发现阴性对照组细胞无 DNA 损伤,电泳图显示为一条区带;DEFSJ-CS 作用后的各组细胞,电泳均呈现“梯形”条带,且“梯形”条带特征呈显著浓度依赖,结果如图 2 所示。

2.3 DEFSJ-CS 对细胞中 Bim、FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达的影响

由图 3 可知,与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 可浓度依赖性的对细胞中 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达下调,对 Bim mRNA 表达上调($P < 0.05, P < 0.01$),且对(ER-)MDA-MB-453 细胞中相关基因表达的作用趋势更为显著。

2.4 DEFSJ-CS 对细胞中 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a、p-FoxO1a 和 Bim 蛋白表达影响

通过 Western blot 法检测 DEFSJ-CS 对细胞中 PI3k/Akt 信号通路相关蛋白的表达变化,由图 4 可知,与阴性对照组比较,DEFSJ-CS 作用可抑制(ER+)MCF-7 细胞 p-PI3k、p-Akt 和 p-FoxO3a 蛋白的表

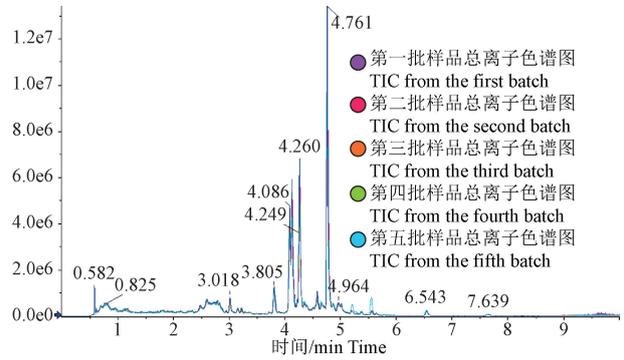
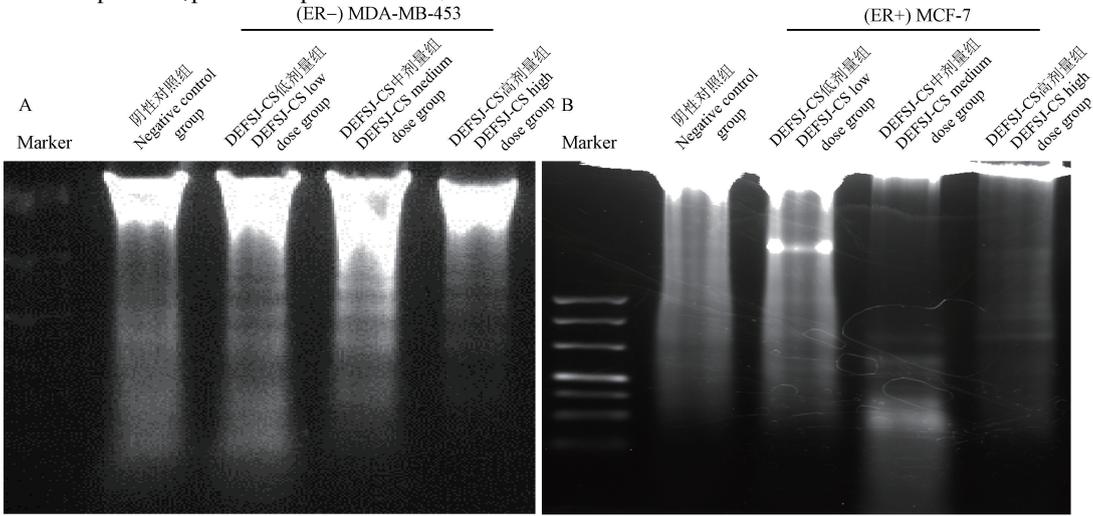


图 1 5 批 DEFSJ 提取液的离子峰图拼图
Figure 1 Base peak chromatograms of the DEFSJ extract derived from five batches

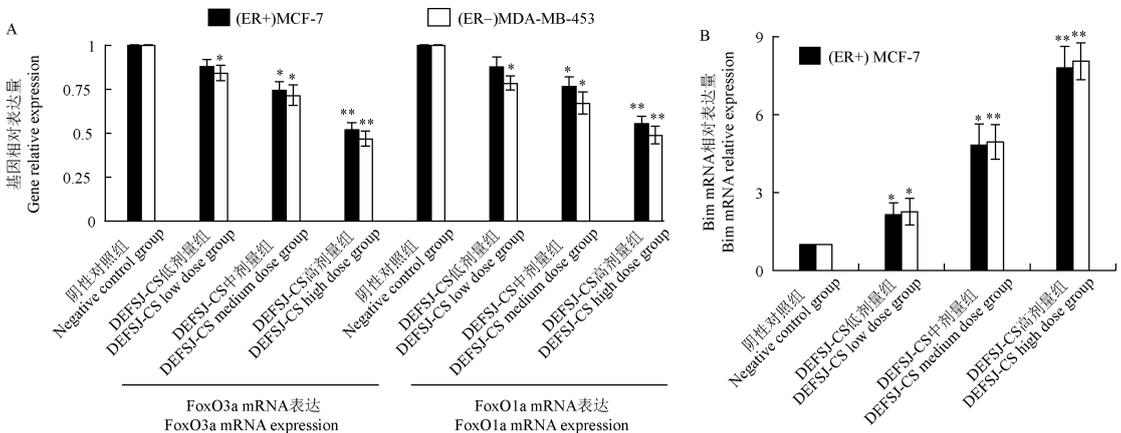


注:A:(ER-)MDA-MB-453 细胞效果图;B:(ER+)MCF-7 细胞效果图。

图 2 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 和(ER+)MCF-7 细胞 DNA ladder 形成的影响

Note. A, (ER-) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER+) MCF-7 cell drawing.

Figure 2 Effect of DEFSJ-CS on DNA ladder in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells



注:A:FoxO3a mRNA 和 FoxO1a mRNA 表达;B:Bim mRNA 表达。与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 和(ER+)MCF-7 细胞中相关 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, FoxO3a and FoxO1a mRNA rendering. B, Bim mRNA rendering. Compared with negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

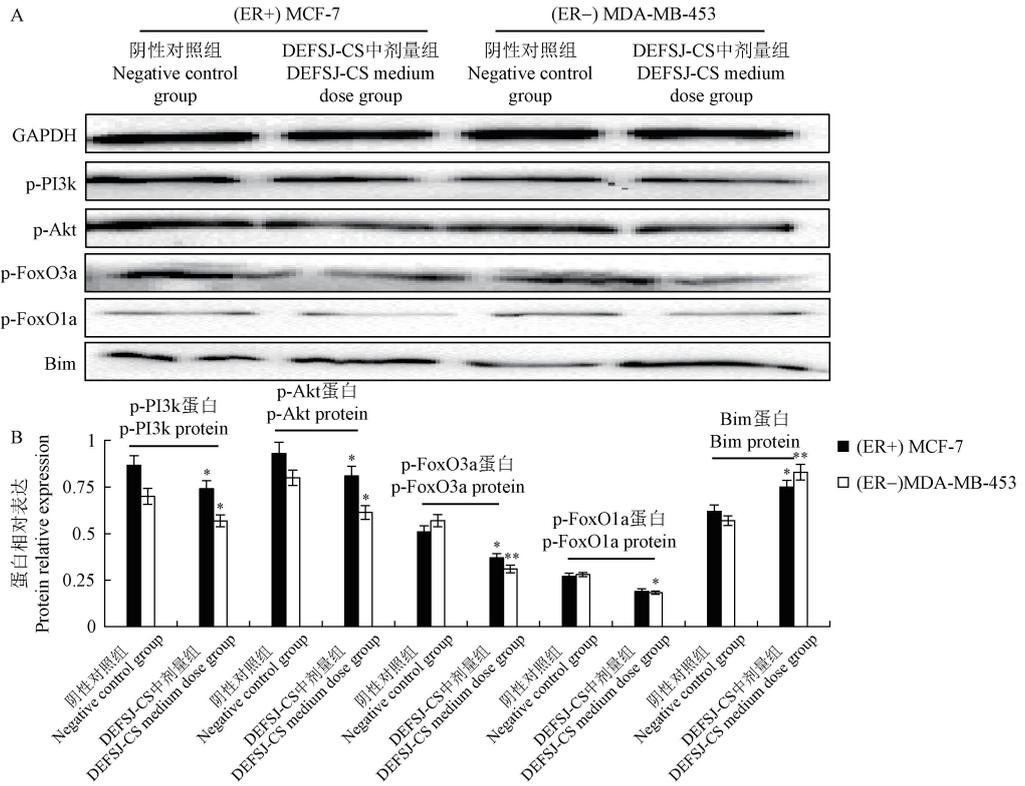
Figure 3 Effect of DEFSJ-CS on levels of related mRNA in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

达水平,上调 Bim 蛋白的表达 ($P < 0.05$);抑制(ER⁻)MDA-MB-453 细胞 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 和 p-FoxO1a 蛋白的表达水平,上调 Bim 蛋白的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),且对(ER⁻)MDA-MB-453 细胞中相

关蛋白表达的作用趋势更为显著。

2.5 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞中 FoxO3a 蛋白核转位的影响

DEFSJ-CS或联合LY294002药理性封闭对(ER

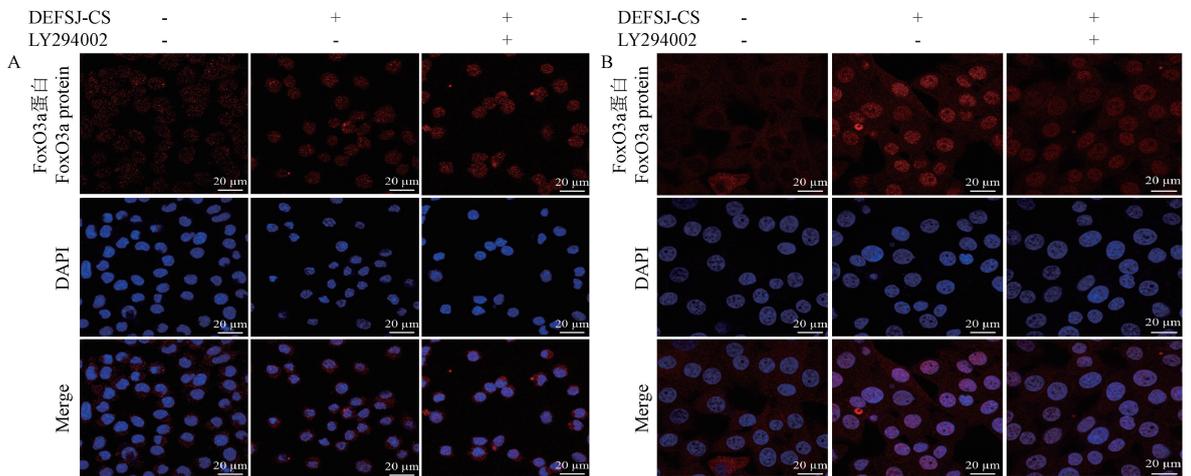


注:A:作用效果图;B:定量结果。与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 DEFSJ-CS 对(ER⁻)MDA-MB-453 和(ER⁺)MCF-7 细胞 PI3k/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, Rendering. B, Quantitive result. Compared with negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of DEFSJ-CS on levels of PI3k/Akt signal pathway related protein in (ER⁻) MDA-MB-453 and (ER⁺) MCF-7 cells



注:A:(ER⁻)MDA-MB-453 细胞效果图;B:(ER⁺)MCF-7 细胞效果图。

图 5 DEFSJ-CS 对(ER⁻)MDA-MB-453 或(ER⁺)MCF-7 细胞 FoxO3a 蛋白核转位的影响

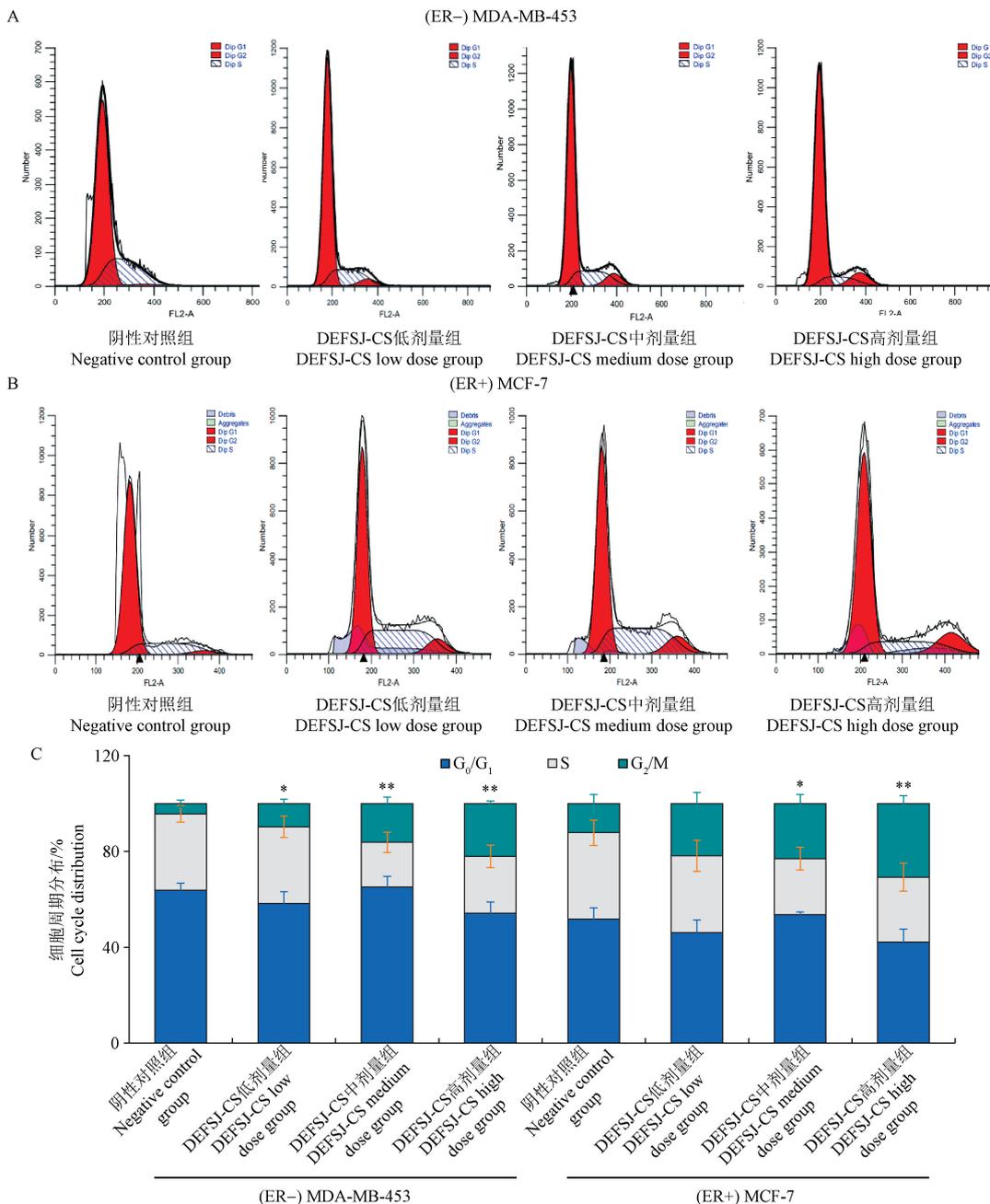
Note. A, (ER⁻) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER⁺) MCF-7 cell drawing.

Figure 5 Effect of DEFSJ-CS on nuclear translocation of FoxO3a protein in (ER⁻) MDA-MB-453 and (ER⁺) MCF-7 cells

-) MDA-MB-453、(ER+) MCF-7 细胞中 FoxO3a 蛋白核转位的变化结果如图 5 所示。阴性对照组中 DAPI 染色的核区域内无明显红色荧光, 但胞质中红色荧光相对较明显, 而 DEFSJ-CS 作用后胞质及胞核中均可见红色荧光, DEFSJ-CS 联合 LY294002 共同反应的细胞核区域中可见红色荧光强度增加, 呈现蛋白的核转位变化。

2.6 DEFSJ-CS 对乳腺癌细胞周期分布的影响

如图 6 所示, 与阴性对照组比较, DEFSJ-CS 低、中、高剂量组能阻断 (ER-) MDA-MB-453 细胞于 G_2/M 期 ($P < 0.05, P < 0.01$), DEFSJ-CS 中、高剂量组能阻断 (ER+) MCF-7 细胞于 G_2/M 期 ($P < 0.05, P < 0.01$), 可见对 (ER-) MDA-MB-453 细胞的周期阻断效果更为显著。



注: A: (ER-) MDA-MB-453 细胞效果图; B: (ER+) MCF-7 细胞效果图; C: 定量结果。与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 DEFSJ-CS 对 (ER-) MDA-MB-453 和 (ER+) MCF-7 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, (ER-) MDA-MB-453 cell drawing. B, (ER+) MCF-7 cell drawing. C, Quantitative results. Compared with negative control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of DEFSJ-CS on cell cycle distribution in (ER-) MDA-MB-453 and (ER+) MCF-7 cells

3 讨论

在民间,狼毒蒸枣,食其枣来治疗实体瘤^[8],如今临床上对此说法并未得到证实。狼毒大戟被制成各种类型的制剂,用于治疗肺结核、坏血病、胸闷、溃疡等疾病^[9];但目前并没有治疗肿瘤的制剂上市。但有相关的文献报道,5.0 g/kg 狼毒大戟水提液对 S180 腹水瘤小鼠的抑瘤率达到 33.6%^[10]。另外,前期对大戟大枣汤(DEFJSJ)的急性毒性实验研究发现,DEFJSJ 在昆明小鼠上的半数致死量为 12.60 g/kg^[11],结合前期研究也证实 DEFJSJ 在体外有较好的抗乳腺肿瘤作用^[7-8]。这些为本研究用药剂量的确定奠定了基础。

本研究首先对 DEFJSJ 提取液进行了质控分析,结果证实其成分稳定,制备工艺可行,保证了后续药理学实验结果的准确性。研究发现,DEFJSJ-CS 作用 48 h 可阻滞乳腺癌(ER-)MDA-MB-453 细胞及(ER+)MCF-7 细胞于 G₂/M 期,且对 MDA-MB-453 细胞的阻断效果更为显著。文献报道,细胞周期出现异常对于肿瘤发生、发展的影响至关重要^[12]。抗肿瘤药物也可通过诱导 DNA 的异常嵌入和损伤,催化下游底物包括细胞周期相关因子等进一步磷酸化来实现抗肿瘤作用^[13]。研究中又通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳实验发现,DEFJSJ-CS 的作用也可使两种乳腺癌细胞呈现核酸片段化的 DNA ladder 梯带。而 DNA 损伤是许多药物发挥抗肿瘤作用的重要机制^[14-15]。抗癌药物亦可诱导癌细胞 DNA 双链断裂,进而促进肿瘤细胞的凋亡^[16]。研究证实,致使肿瘤细胞发生无限增殖的一个重要因素是细胞凋亡的失衡;因此,针对干预肿瘤细胞凋亡的研究也是肿瘤治疗研究中的热点^[12]。这与前期研究结果,“DEFJSJ 在体外可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的作用”^[7]相符合。

无论细胞周期阻断还是诱导细胞凋亡作用,都要受到相关信号通路的调控。有研究指出,作为人体内重要信号通路之一的 PI3k/Akt 信号通路影响甚广,其与机体内的生理、病理过程以及生物学过程如细胞的增殖、凋亡、蛋白质的翻译等均密切相关^[17]。FoxO1a 及 FoxO3a 均为 Fox 家族的重要成员,是 PI3k/Akt 通路下游的关键因子^[18]。FoxO1a 作为 PI3k/Akt 信号途径下游重要靶蛋白之一,随着 PI3K/Akt 通路的活化而被磷酸化激活后可影响细胞的增殖、凋亡等生物学活动^[19]。在 PI3k/Akt 转

导途径遭受抑制作用时,去磷酸化的 FoxO3a 就能从细胞浆中转入细胞核内,从而导致下游细胞中的 Bim 蛋白表达水平增多,进而使细胞出现凋亡状态^[20]。内源性 FoxO3a 核转位的发生也被公认成是细胞发生凋亡的显著特征^[21]。

前期研究也发现,PI3k/Akt 通路可能参与了 DEFSJ 对乳腺癌增殖及凋亡的调控^[7];本研究进一步通过 Western blot 法及 qRT-PCR 法检测了 PI3k/Akt 通路相关因子的表达,发现 DEFSJ-CS 能使两种不同表型的乳腺癌细胞中 p-PI3k、p-Akt、p-FoxO3a 及 p-FoxO1a 蛋白表达降低,使 Bim 蛋白表达升高,使 FoxO3a、FoxO1a mRNA 表达降低,使 Bim mRNA 表达升高;并进一步通过激光共聚焦显微镜观察到 DEFSJ-CS 作用后细胞呈现显著的 FoxO3a 蛋白核转位;且各数据结果均显示 DEFSJ-CS 对(ER-)MDA-MB-453 细胞比对(ER+)MCF-7 细胞作用效果更好。

综上,DEFJSJ 在体外可通过 PI3k/Akt 通路参与对激素受体阴性和激素受体阳性乳腺癌细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用的调控,且作用效果因乳腺癌表型的差异而不同。本研究将为乳腺癌的个体化精准治疗研究提供思路和依据。

参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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] 辛雨濛,梁恒熙,孙震晓.甘草干姜汤抗小鼠乳腺癌实验研究[J].癌变·畸变·突变,2022,34(2):88-92.
XIN Y M, LIANG H X, SUN Z X. Effectiveness of licorice and dried ginger decoction against mouse breast cancers [J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2022, 34(2): 88-92.
- [3] 邹辣,吴绮楠.激素受体阳性乳腺癌的内分泌治疗[J].重庆医科大学学报,2021,46(1):91-96.
ZOU L, WU Q N. Endocrine therapy in hormone receptor positive breast cancer [J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(1): 91-96.
- [4] GARCIA-CLOSAS M, COUCH F J, LINDSTROM S, et al. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci [J]. Nat Genet, 2013, 45(4): 392-398, 398e1-398e2.
- [5] 李云祥,梁引库,高飞雄,等.中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):211-219.
LI Y X, LIANG Y K, GAO F X, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating breast cancer [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(3): 211-219.
- [6] 卢雯平,卓至丽.乳腺癌的中医药防治现状及展望[J].中国

- 医药, 2022, 17(3): 321-325.
- LU W P, ZHUO Z L. Current situation and prospect of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of breast cancer [J]. *China Med*, 2022, 17(3): 321-325.
- [7] 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 L W, 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.
- [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.
- MA L W, CHEN Z, LI J, et al. Effects of Decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and *Ziziphus jujuba* Mill. medicated serum on apoptosis of breast cancer cells via p13k/Akt pathway [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2020, 42(10): 2584-2591.
- [9] LI Y N, HE J, ZHANG J, et al. Existing knowledge on *Euphorbia fischeriana* Steud. (Euphorbiaceae): traditional uses, clinical applications, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114095.
- [10] 邢世江, 王镜, 李兴玉. 复方狼毒对小鼠移植性肿瘤生长的影响 [J]. *兰州医学院学报*, 1998(1): 13-14.
- XING S J, WANG J, LI X Y. Effect of compound *Euphorbiae ebracteolatae Radix* on the growth of transplanted tumors in mice [J]. *J Lanzhou Med Coll*, 1998(1): 13-14.
- [11] 马立威, 樊丽, 倪世宇, 等. 狼毒粉、狼毒大枣汤的单次给药毒性研究 [J]. *中国医药导报*, 2018, 15(2): 4-8, 18.
- MA L W, FAN L, NI S Y, et al. Study on single drug toxicity of *Euphorbia fischeriana* Steud Powder and Decoction of Compatibility of *Euphorbia fischeriana* Steud and *Jujubae* [J]. *China Med Her*, 2018, 15(2): 4-8, 18.
- [12] 李霖枫, 陈重华, 李天平. 牛蒡子苷对三阴性乳腺癌 MDA-MB-453 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(8): 602-608.
- LI L F, CHEN C H, LI T P. Effect and mechanism of arctiin on cell proliferation and apoptosis of triple negative breast cancer MDA-MB-453 cells [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 35(8): 602-608.
- [13] FOSTIRA F, TSITLAIDOU M, PAPADIMITRIOU C, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria; a Hellenic Cooperative Oncology Group Study [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(1): 353-362.
- [14] 戴奇男, 张景红. 肿瘤多药耐药与自噬、DNA 修复和肿瘤干细胞相关的分子机制研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(4): 69-77.
- DAI Q N, ZHANG J H. Advances in molecular mechanisms related to tumor multi-drug resistance, autophagy, DNA repair and tumor stem cells [J]. *China Biotechnol*, 2020, 40(4): 69-77.
- [15] RUDOLF E, KRALOVA V, RUDOLF K, et al. The role of p38 in irinotecan-induced DNA damage and apoptosis of colon cancer cells [J]. *Mutat Res*, 2013, 741/742: 27-34.
- [16] BARBOSA F A R, SIMINSKI T, CANTO R F S, et al. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 503-515.
- [17] MAETANI Y, ASANO S, MIZOKAMI A, et al. Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 552: 106-113.
- [18] FU Z, TINDALL D J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(16): 2312-2319.
- [19] HE F, ZHANG N, LV Y, et al. Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 1443-1452.
- [20] SEDDING D G. FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing-a new fork on the way to longevity? [J]. *Biol Chem*, 2008, 389(3): 279-283.
- [21] LIU Z, SHI Z, LIN J, et al. Piperlongumine-induced nuclear translocation of the FOXO3A transcription factor triggers BIM-mediated apoptosis in cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 101-110.

[收稿日期]2023-04-19