

金骨莲胶囊对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制作用及机制

邱剑飞^{1,2}, 杨珏¹, 张知音³, 刘务玲¹, 宋辉¹, 吴小森⁴, 李静⁴, 李艳梅^{1*}

(1. 贵州医科大学 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室,

贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;

2. 贵州医科大学 大学城医院, 贵阳 550025;

3. 贵航贵阳医院, 贵阳 550027;

4. 湖南省湘西自治州烟草公司永顺县分公司, 湖南 湘西自治州 416000)

[摘要] 目的:研究金骨莲胶囊对人三阴性乳腺癌(TNBC)细胞MDA-MB-231增殖的影响,探讨金骨莲胶囊对TNBC的治疗作用机制。方法:利用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)技术,对金骨莲胶囊的成分进行分析鉴定。通过用噻唑蓝(MTT)比色法观察金骨莲胶囊(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 g·L⁻¹)对人乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖抑制作用。采用Hoechst 33258染色检测金骨莲胶囊处理MDA-MB-231细胞24 h后的细胞核凋亡形态学的变化。采用流式细胞仪检测金骨莲胶囊不同质量浓度和作用时间对MDA-MB-231细胞凋亡及周期分布情况。通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP),原癌基因蛋白(c-Myc),细胞周期蛋白B₁(cyclin B₁)和磷酸化胞外信号调节激酶(p-ERK)的蛋白表达水平。结果:该研究利用UPLC-MS/MS技术鉴定了金骨莲胶囊提取物中113个化合物成分。MTT比色法显示,与空白组比较,金骨莲胶囊组(0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 g·L⁻¹)细胞抑制率显著增加(P<0.01),半数抑制浓度(IC₅₀)为(0.13±0.02)g·L⁻¹;流式细胞术结果显示,与空白组比较,金骨莲胶囊组(1 g·L⁻¹)细胞凋亡率显著升高(P<0.01),金骨莲胶囊组(0.5, 1 g·L⁻¹)细胞处于S期的数量明显增加(P<0.05, P<0.01);Western blot结果显示,与空白组比较,金骨莲胶囊组(0.5, 1 g·L⁻¹)细胞中的PARP, c-Myc, cyclin B₁蛋白表达水平显著降低(P<0.01),金骨莲胶囊组(1 g·L⁻¹)p-ERK蛋白表达水平显著降低(P<0.01)。结论:金骨莲胶囊可抑制MDA-MB-231细胞增殖,使细胞周期阻滞于S期,并诱导其凋亡,其机制可能与其抑制MDA-MB-231细胞MAPK信号通路有关。

[关键词] 金骨莲胶囊; MDA-MB-231细胞; 凋亡; S期阻滞

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0078-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212424 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211022.1327.003.html>

[网络出版日期] 2021-10-26 16:18

Inhibitory Effect and Mechanism of Jingulian Capsule on Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

QIU Jian-fei^{1,2}, YANG Jue¹, ZHANG Zhi-yin³, LIU Wu-ling¹, SONG Hui¹, WU Xiao-sen⁴,

LI Jing⁴, LI Yan-mei^{1*}

(1. *The State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants,*

*The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of
Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China;*

2. *The Higher Education Mega Center Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;*

3. *Guiyang Hospital of Guizhou Aviation Industry Group, Guiyang 550027, China;*

[收稿日期] 20210831(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81872772, 81960546, U1812403);贵州省自然科学基金项目(QKHJC[2018]1409);贵州省科技计划项目(QKHZC[2019]2762, QKHPTRC[2020]5008, 黔科合基础-ZK[2021]一般526, 黔科合基础-ZK[2021]一般448)

[第一作者] 邱剑飞, 硕士, 住院医师, 从事肿瘤药理研究, E-mail: qiujianfei120@163.com

[通信作者] *李艳梅, 博士, 研究员, 从事肿瘤药理研究, Tel: 0851-83834026, E-mail: liyanmei518@hotmail.com

4. Yongshun County Branch of Hunan Xiangxi Autonomous Prefecture Tobacco Company,
Xiangxi Autonomous Prefecture 416000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Jingulian capsule on the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 cells and investigate its action mechanism against triple negative breast cancer (TNBC). **Method:** The ingredients of Jingulian capsule were identified by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The inhibitory effect of Jingulian capsule at different doses (0.125, 0.25, 0.5, 1, and 2 g·L⁻¹) against the proliferation of MDA-MB-231 cells were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. After treatment for 24 h, the morphological changes in nuclear apoptosis of MDA-MB-231 cells were detected by Hoechst 33258 staining. The effect of different concentrations of Jingulian capsule on the apoptosis and cycle of MDA-MB-231 cells after different treatment time were determined by flow cytometry. The protein expression levels of Poly-ADP-ribose polymerase (PARP), proto-oncogene c-Myc, cyclin B₁, and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) in each group were assayed by Western blot. **Result:** A total of 113 compounds in Jingulian capsule were identified by UPLC-MS/MS. As revealed by MTT assay, compared with blank group, Jingulian capsule (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 g·L⁻¹) significantly inhibited viability of MDA-MB-231 cells ($P < 0.01$), with the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of (0.13±0.02) g·L⁻¹. According to flow cytometry, compared with the blank group, Jingulian capsule at 1 g·L⁻¹ significantly induced the apoptosis of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$) and Jingulian capsule at 0.5, 1 g·L⁻¹ obviously increased the number of MDA-MB-231 cells in S phase ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of Western blotting demonstrated that the protein expression levels of PARP, c-Myc, and cyclin B₁ in 0.5, 1 g·L⁻¹ Jingulian capsule groups were remarkably down-regulated as compared with those in the blank group ($P < 0.01$), and the protein expression level of p-ERK in 1 g·L⁻¹ Jingulian capsule group was also down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jingulian capsule is able to inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells, induce S phase cell cycle arrest, and promote their apoptosis, which may be related to the inactivation of the MAPK signaling pathway.

[Keywords] Jingulian capsule; MDA-MB-231 cells; apoptosis; S phase arrest

在全球范围内,乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在女性恶性肿瘤中居首位并呈逐年上升的趋势^[1]。乳腺癌可分为 Luminal A, Luminal B 型,人表皮生长因子受体-2(HER-2)过表达型,三阴性及其他特殊类型乳腺癌^[2]。三阴性乳腺癌(TNBC)是雌激素受体(ER),孕激素受体(PR)及 HER-2 表达均为阴性的乳腺恶性肿瘤,是最受关注的分子亚型之一,占有乳腺癌的 15%~20%^[3]。TNBC 容易发生转移,是因为其缺乏 ER, PR 及 HER-2 这些受体作为药物靶点^[4-5]。目前,乳腺癌的治疗方面还有许多机制问题需要完善,西药治疗乳腺癌存在一定局限性,因此研究中药对乳腺癌的治疗具有很大的意义。中药治疗乳腺癌具有多靶点、毒副作用小、效果好等特点,近年来关于中药对乳腺癌的治疗受到广泛关注^[6]。中药复方含有多种活性成分,可发挥协同效应,降低 TNBC 的高转移性、高复发性,改善患者临床症状^[7]。近年来研究显示,西黄丸、追毒方、黄芪汤、温肾壮骨汤等传统方剂可

有效改善 TNBC 患者的症状,降低疾病复发率,延长患者生存期^[8]。金骨莲胶囊是一个经典苗族药组方,在《本草图经》《滇南本草》中有记载^[9]。由透骨香、汉桃叶、大血藤、八角枫、金铁锁等制成,具有祛风除湿、消肿止痛之功效^[10]。本课题组对金骨莲胶囊进行成分分析,研究探讨金骨莲胶囊对 MDA-MB-231 细胞增殖的作用,为 TNBC 的中医药治疗提供依据。

1 材料

1.1 细胞 人 TNBC 细胞 MDA-MB-231 为贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供,传至第 4 代。

1.2 药物和试剂 金骨莲胶囊(贵州益佰制药股份有限公司,批号 Z20123051); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司,批号 0315976); 二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝公司,批号 20201215); 细胞凋亡-Hoechst 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号

122419200512);聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)抗体, DyLight™800 标记的二抗(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 15, 5151);原癌基因蛋白(c-Myc), 细胞周期蛋白 B₁(cyclin B₁), 胞外信号调节激酶(ERK), 磷酸化胞外信号调节激酶(p-ERK)抗体(美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR295111-50, GR3180236-11, GR3215675-8, GR3266039-1);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Affinity 公司, 批号#62u0922)。水为去离子水, 乙腈、甲醇为质谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 U3000型超高效液相色谱-高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司), NovoCyte 2040R 型流式细胞仪(美国 ACEA 公司), Synergy 2Multi-ModeReader 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司), Mini-PROTEAN Tetra System 型电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物配制 金骨莲胶囊用生理盐水(NS)配置成 200 g·L⁻¹ 的储备液, 加入 DMEM 培养液将储备液稀释至终质量浓度分别为 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 g·L⁻¹。

2.2 化学成分鉴定 利用超高效液相色谱系统对金骨莲胶囊的化学成分进行初步鉴定。采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子全扫描模式, 质量扫描范围 m/z 100~1 500, 分辨率 7×10^4 , 毛细管温度 320 °C, 加热器温度 350 °C, 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb。

2.3 细胞培养 MDA-MB-231 细胞使用含 5% 血清的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

2.4 细胞抑制率检测 取处于对数生长期的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞计数均匀铺板于 96 孔板中, 细胞每孔为 6 000 个; 将细胞分为空白组(加入溶剂)和金骨莲胶囊组, 金骨莲胶囊组终质量浓度为 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 g·L⁻¹。在 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24, 48, 72 h, 分别加入 5 g·L⁻¹ MTT 试剂 10 μL, 然后 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱培养 4 h, 2 500 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 13.5 cm, 下同), 收集细胞后加入二甲基亚砜(DMSO) 160 μL, 置于摇床 150 r·min⁻¹ 处理 15 min, 多功能酶标仪 490 nm 波长下测定吸光度 A ; 计算金骨莲胶囊对细胞系的半数抑制浓度(IC₅₀)及抑制率, 绘制生长曲线。

2.5 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞, 以每孔 2×10^5 个接种于 6

孔板, 以不同浓度的金骨莲胶囊分别处理细胞, 实验设空白组(加入溶剂)。细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞, 离心收集细胞, 用甲醇固定细胞 10 min, 再用 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 Hoechst 33258 处理细胞, 室温避光染色 10 min。去除染色液后用 PBS 洗涤 2 次, 置于荧光显微镜上检测并分析。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞计数并铺板于 6 孔板中, 细胞每孔 2×10^5 个; 待细胞贴壁后, 将不同浓度的药物作用于细胞。使其终质量浓度为 0.5, 1 g·L⁻¹, 以生理盐水组为空白组, 分别培养 24, 48 h 收集细胞, 使用预冷 PBS 洗 2 次, 采用 Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染法在流式细胞仪上检测 MDA-MB-231 细胞的凋亡率。

2.7 流式细胞仪检测细胞周期 取处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞计数并铺板于 6 孔板中, 细胞密度为 2×10^5 个/孔, 待细胞贴壁后, 将不同浓度的药物作用于细胞。使其终质量浓度为 0.5, 1 g·L⁻¹, 以生理盐水组为空白组, 分别培养 24, 48 h 收集细胞, 使用预冷 PBS 洗 2 次。再加入预冷 70% 乙醇 500 μL, -20 °C 过夜。离心去除乙醇, 再用预冷 PBS 洗 2 次, 然后在每管中加入细胞周期染液[RNaseA (100 mg·L⁻¹) + PI (50 mg·L⁻¹) + Triton X-100 (0.2%)]混合物 500 μL。混匀后避光, 37 °C 孵育 30 min。离心去除染料, 预冷 PBS 洗 2 次, 然后用 PBS 重悬 200 μL, 过滤后用流式细胞仪对细胞周期进行检测。

2.8 Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞相关蛋白的表达 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞以每孔 4×10^5 个接种于 100 mm 细胞培养皿中, 细胞置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养过夜, 使用 0.25, 0.5, 1 g·L⁻¹ 金骨莲胶囊分别处理细胞, 置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h, 收集细胞, 用预冷 PBS 洗涤细胞, 离心收集细胞, 加入含 PMSF 的蛋白裂解液, 转移至 1.5 mL 离心管中。冰上裂解 40 min 后置于预冷离心机中 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液转移至新离心管中。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白样品浓度, 加入上样缓冲液, 100 °C 加热变性, 置 -80 °C 保存备用。用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样品后转移至 0.2 μm 的 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 抗体 4 °C 孵育过夜 (PARP 1:1 500, c-Myc 1:1 000, cyclin B₁ 1:2 000, p-ERK 1:1 000, ERK 1:1 000, GAPDH 1:5 000), 1×TBS

洗膜3次,每次5 min,用荧光标记抗兔二抗室温孵育2 h, TBS洗膜3次,每次5 min,用双色红外荧光成像系统检测和分析。取各蛋白的灰度值与内参蛋白GAPDH灰度值的比值,进行半定量分析。

2.9 统计学方法 使用GraphPad Prism 7软件进行数据分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本进行单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 金骨莲胶囊中化学成分的鉴定 金骨莲胶囊中共鉴定出113种化合物,其中苦参碱^[11]、没食子酸乙酯^[12]、红景天苷、原儿茶酸、咖啡酸、斑蝥素、丹皮酚、葛根素、鞣花酸、广藿香酮、野黄芩苷、山柰酚、柚皮苷、橙皮素、柚皮素、川陈皮素、大黄素共17种化合物在抗肿瘤活性方面有过相关报道。UPLC-MS/MS鉴定出来的金骨莲胶囊中的113个化学成分见增强出版附件。总离子流见图1。

3.2 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞增殖的影响 与空白组比较,金骨莲胶囊组MDA-MB-231细胞抑制率显著增加($P < 0.01$),并且呈浓度和时间依赖性。见表1,2。金骨莲胶囊处理MDA-MB-231细胞72 h的 IC_{50} 为 $(0.13 \pm 0.02) g \cdot L^{-1}$ 。

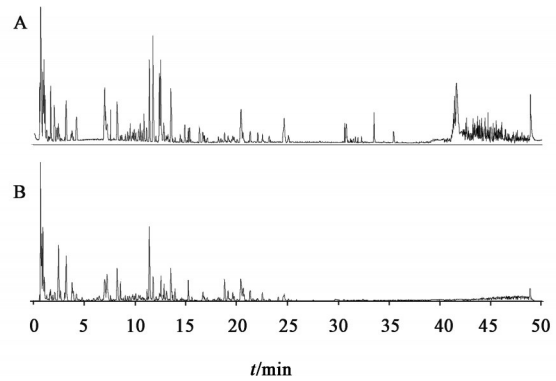
3.3 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞凋亡的影响 Hoechst 33258染色,凋亡细胞的细胞核皱缩,与空白组比较,金骨莲胶囊处理MDA-MB-231细胞后,凋亡现象更加明显。见图2。流式细胞术检测结果显示,处理24, 48 h,与空白组比较,金骨莲胶囊($1 g \cdot L^{-1}$)处理过的细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$)。见表3。

表2 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Effect of different concentrations of Jingulian capsule on proliferation of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | $A_{490\text{ nm}}$ | | | | | |
|-------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 12 h | 24 h | 36 h | 48 h | 60 h | 72 h |
| 空白 | | 0.60±0.08 | 0.64±0.08 | 0.70±0.09 | 0.88±0.16 | 1.08±0.09 | 1.40±0.17 |
| 金骨莲胶囊 | 0.25 | 0.62±0.06 | 0.54±0.01 | 0.53±0.04 | 0.51±0.06 ²⁾ | 0.48±0.10 ²⁾ | 0.46±0.03 ²⁾ |
| | 0.5 | 0.58±0.02 | 0.51±0.02 | 0.51±0.05 | 0.48±0.04 ²⁾ | 0.46±0.04 ²⁾ | 0.36±0.01 ²⁾ |
| | 1 | 0.52±0.05 | 0.44±0.05 ¹⁾ | 0.37±0.05 ²⁾ | 0.33±0.02 ²⁾ | 0.28±0.03 ²⁾ | 0.24±0.03 ²⁾ |
| | 2 | 0.35±0.02 ¹⁾ | 0.17±0.01 ²⁾ | 0.13±0.01 ²⁾ | 0.15±0.01 ²⁾ | 0.16±0.01 ²⁾ | 0.17±0.01 ²⁾ |

3.5 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞凋亡和周期相关蛋白的影响 处理24 h,与空白比较,金骨莲胶囊($0.5, 1 g \cdot L^{-1}$)组MDA-MB-231细胞中的PARP, c-Myc, cyclin B₁蛋白表达水平降低($P < 0.01$);金骨莲胶囊($1 g \cdot L^{-1}$)组p-ERK蛋白表达水平降低($P <$



A. 正离子模式; B. 负离子模式

图1 金骨莲胶囊的UPLC-MS/MS总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of Jingulian capsule by UPLC-MS/MS

表1 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of different concentrations of Jingulian capsule on inhibition rate of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$) %

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 48 h抑制率 | 72 h抑制率 |
|-------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 金骨莲胶囊 | 0.125 | 11.21±2.95 ²⁾ | 45.85±2.79 ²⁾ |
| | 0.25 | 43.61±4.71 ²⁾ | 66.68±2.40 ²⁾ |
| | 0.5 | 48.91±4.35 ²⁾ | 73.98±0.94 ²⁾ |
| | 1 | 65.41±2.07 ²⁾ | 82.98±1.08 ²⁾ |
| | 2 | 83.74±0.66 ²⁾ | 87.76±0.62 ²⁾ |

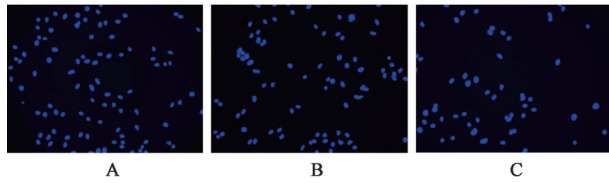
注:空白组抑制率为0;与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表3~6同)。

3.4 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞周期的影响 处理24, 48 h,与空白组比较,金骨莲胶囊组MDA-MB-231细胞处于S期的数量明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),且成浓度依赖性。见表4。

0.01)。见图3,表5。

4 讨论

TNBC患者由于缺乏明确的分子靶标,手术后不能进行内分泌及靶向治疗,目前普遍考虑化疗,但不良反应明显。有较多报道显示,中医药在防治



A. 空白组; B, C. 金骨莲胶囊组(0.5, 1 g·L⁻¹)(图 3 同)

图 2 金骨莲胶囊作用 MDA-MB-231 细胞 24 h 后凋亡细胞核形态变化(Hoechst 33258, ×200)

Fig. 2 Nuclear morphological changes of apoptosis cells induced by Jingulian capsule in MDA-MB-231 cells for 24 h (Hoechst 33258, ×200)

表 3 金骨莲胶囊对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Jingulian capsule on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 24 h 凋亡率 | 48 h 凋亡率 |
|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白 | | 5.77±1.66 | 7.53±2.52 |
| 金骨莲胶囊 | 0.5 | 6.68±0.81 | 11.20±3.13 |
| | 1 | 55.39±8.01 ²⁾ | 65.67±5.06 ²⁾ |

肿瘤方面具有独特的优势,其单独用药或与化疗药物联合用于 TNBC 的治疗,可有效降低毒性,还具有很好的化学保护作用^[8]。

金骨莲胶囊具有祛风除湿、消肿止痛之功效,在临床中被广泛应用于骨性关节炎的治疗^[13-14]。本

表 4 金骨莲胶囊对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Jingulian capsule on cell cycle of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

| 组别 | 质量浓度 /g·L ⁻¹ | 24 h | | | 48 h | | |
|-------|-------------------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|--------------------------|----------------|
| | | G ₁ | S | G ₂ | G ₁ | S | G ₂ |
| 空白 | | 42.43±2.50 | 36.66±1.53 | 16.28±1.44 | 47.27±1.10 | 41.08±1.00 | 10.80±1.00 |
| 金骨莲胶囊 | 0.5 | 24.14±2.01 | 51.76±2.04 ¹⁾ | 23.10±1.01 | 29.55±1.50 | 56.58±1.51 ²⁾ | 13.23±0.75 |
| | 1 | 20.3±1.13 | 58.60±1.51 ²⁾ | 19.02±1.00 | 28.02±1.00 | 60.58±1.51 ²⁾ | 10.53±1.50 |

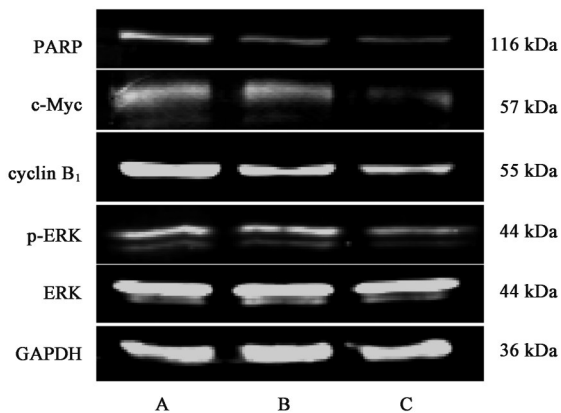


图 3 金骨莲胶囊对 MDA-MB-231 细胞凋亡和周期相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Jingulian capsule on expressions of apoptosis and cell cycle related proteins in MDA-MB-231 cells

研究通过超高效液相色谱系统对金骨莲胶囊化学成分进行鉴定,发现其中含有多种抗肿瘤活性成分。

PARP 是一类蛋白质翻译后修饰酶,其主要功能是保持基因组的稳定性、参与 DNA 损伤修复,及调控细胞的增殖和凋亡等^[15]。研究表明,PARP 抑制剂通过影响 DNA 损伤修复,造成基因转录缺失,导致肿瘤细胞凋亡。目前临床已经开展联合 PARP 抑制剂来治疗乳腺癌的研究^[16]。乳腺癌是典型上皮细胞来源的恶性肿瘤,c-Myc 是调控上皮细胞极性转化的原癌基因,高表达于 TNBC 在内的多种实体瘤之中,c-Myc 蛋白的高表达及对 TNBC 的增殖、迁移等功能的明显促进作用^[17]。cyclin B₁ 在细胞生长发育过程中发挥着重要的作用,细胞进行有丝分裂必须由细胞核中释放 cyclin B₁^[18]。MAPK/ERK 通路是由激酶级联反应介导的信号传导通路,可将胞外刺激信号传导至细胞核,激活靶基因转录,与细胞增殖、凋亡等生理病理过程密切相关^[19]。多项研究表明,MAPK/ERK 通路的激活与乳腺癌的增殖、侵袭相关^[20-21]。

实验结果表明金骨莲胶囊可显著抑制人 TNBC 细胞 MDA-MB-231 的活性增殖,金骨莲胶囊可以致 MDA-MB-231 细胞凋亡,并且诱导 MDA-MB-231

细胞发生 S 期周期阻滞,为其潜在新功效的开发提供参考。金骨莲胶囊可使 MDA-MB-231 细胞中 PARP 蛋白表达下调,可能是促使其发生细胞凋亡的重要原因。金骨莲胶囊可显著下调 MDA-MB-231 细胞 c-Myc 蛋白的表达,从而能够调控 TNBC 的发展。金骨莲胶囊可显著下调 MDA-MB-231 细胞 cyclin B₁ 表达水平,从而抑制细胞的分裂。本实验结果表明,金骨莲胶囊可下调 p-ERK 的表达,对乳腺癌的治疗有十分重要的意义。

综上,金骨莲胶囊可诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-231 发生凋亡,能够使细胞分裂阻滞在 S 期,并且可以下调 PARP, c-Myc, cyclin B₁ 和 p-ERK 的表达水平。为金骨莲胶囊对 TNBC 的临床治疗提供实验基础。

表5 金骨莲胶囊对MDA-MB-231细胞PARP,c-Myc,cyclin B₁,p-ERK和ERK表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Jingulian capsule on expressions of PARP, c-Myc, cyclin B₁, p-ERK and ERK protein in MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/g·L ⁻¹ | PARP/GAPDH | c-Myc | cyclin B ₁ /GAPDH | p-ERK/GAPDH | ERK/GAPDH |
|-------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------|
| 空白 | | 1.00±0.05 | 1.00±0.03 | 1.00±0.04 | 1.00±0.06 | 1.00±0.02 |
| 金骨莲胶囊 | 0.5 | 0.75±0.09 ²⁾ | 0.67±0.12 ²⁾ | 0.71±0.08 ²⁾ | 0.95±0.05 | 1.03±0.07 |
| | 1 | 0.42±0.08 ²⁾ | 0.21±0.06 ²⁾ | 0.53±0.05 ²⁾ | 0.46±0.09 ²⁾ | 0.97±0.04 |

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [2] SERRA K P, RAMALHO S, TORRESAN R, et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando luminal A [J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2014, 36(12): 575-580.
- [3] BEAUPARLANT P, SHORE G C. Therapeutic activation of caspases in cancer: a question of selectivity[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003, 6(2): 179-187.
- [4] 吴雨洁, 刘敏, 高静东. 三阴性乳腺癌分子靶向治疗研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(2): 217-220.
- [5] ELSAMANY S, ABDULLAH S. Triple-negative breast cancer: future prospects in diagnosis and management[J]. Med Oncol, 2014, 31(2): 834.
- [6] 王晋慧, 吕邵娃, 李孟, 等. 中药有效成分体外抗乳腺癌作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 197-203.
- [7] 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.
- [8] 吴沁航, 朱丽文, 李铭轩, 等. 中药抗三阴性乳腺癌及其分子作用机制研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2021(4): 602-608.
- [9] 李思翰, 练东银, 张广平, 等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨金骨莲提取物抑制脂多糖诱导RAW264.7细胞炎症反应的作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14): 29-35.
- [10] 彭旭, 杨继滨, 尤奇, 等. 金骨莲灌胃对兔骨关节炎模型软骨细胞凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(8): 1188-1194.
- [11] 阮寅正, 甘甜, 叶泽耀. 苦参碱调节胃癌细胞糖代谢改变其生物学特性的机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(10): 1201-1204.
- [12] 简白羽, 岳丽玲, 韩翠艳, 等. 没食子酸乙酯通过线粒体通路诱导人结肠癌LoVo细胞凋亡的机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(6): 463-467.
- [13] 李伟. 金骨莲胶囊治疗骨性关节炎的临床观察[J]. 中医临床研究, 2019, 11(1): 75-77.
- [14] 王胜民, 刘毅, 刘波, 等. 金骨莲胶囊对兔膝关节软骨保护作用的研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(26): 3611-3615.
- [15] BAI P, CANTÓ C. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease[J]. Cell Metab, 2012, 16(3): 290-295.
- [16] O'SHAUGHNESSY J, OSBORNE C, PIPPEN J E, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3): 205-214.
- [17] 李常有, 于志强, 崔军威, 等. c-Myc蛋白对三阴性乳腺癌增殖迁移的影响[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2019, 40(2): 129-134.
- [18] STRAUSS B, HARRISON A, COELHO P A, et al. Cyclin B1 is essential for mitosis in mouse embryos, and its nuclear export sets the time for mitosis. [J] Cell Biol, 2018, 217(1): 179-193.
- [19] ARTHUR J S C, LEY S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(9): 679-692.
- [20] QIU S, HU W, MA Q, et al. TIPE1 suppresses the invasion and migration of breast cancer cells and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition primarily via the ERK signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(10): 1008-1015.
- [21] YEH H T, TSAI Y S, CHEN M S, et al. Flavopereirine induces cell cycle arrest and apoptosis via the Akt/p38 MAPK/ERK1/2 signaling pathway in human breast cancer cells [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 863: 172658.

[责任编辑 张丰丰]