

丹栀逍遥散含药血清逆转乳腺癌MDA-MB-231细胞 能量代谢重编程

徐爽, 李然, 刘立萍*

(辽宁中医药大学 中医学院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:观察丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响,探讨其作用机制是否与干预能量代谢相关。方法:6周龄SD雄性大鼠30只,随机分为空白组、丹栀逍遥散水煎剂组(8.99 g·kg⁻¹)、西黄丸组(0.55 g·kg⁻¹),药物干预7 d,分离血清。噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力,流式细胞术检测细胞周期,Annexin V/碘化丙啶(PI)双染色法检测细胞凋亡,葡萄糖含量检测试剂盒检测细胞内葡萄糖含量,免疫荧光染色法检测细胞葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)表达情况,Seahorse XFe细胞能量代谢分析仪检测细胞胞外酸化率(ECAR)和耗氧率(OCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞已激糖酶2(HK2),丙酮酸激酶M2型(PKM2),乳酸脱氢酶A(LDHA)表达。结果:与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂含药血清可抑制MDA-MB-231细胞增殖,15%含药血清干预48 h效果最佳($P<0.01$)。与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂组细胞DNA暂停分裂期/DNA合成前期(G₀/G₁期)上调($P<0.01$),DNA合成期(S期),DNA合成后期/细胞分裂期(G₂/M期)下调($P<0.01$);降低MDA-MB-231细胞GLUT1表达;降低MDA-MB-231细胞的基础糖酵解,糖酵解能力值,糖酵解储备值,基础呼吸值,腺苷三磷酸(ATP)产量,储备呼吸值($P<0.01$);下调MDA-MB-231细胞HK2,PKM2,LDHA蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:丹栀逍遥散含药血清能够抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、促进细胞凋亡、使细胞周期阻滞,其作用机制可能与其逆转乳腺癌MDA-MB-231细胞能量代谢重编程有关。

[关键词] 乳腺癌;丹栀逍遥散;能量代谢重编程;糖酵解

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220321

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211125.1749.008.html>

[网络出版日期] 2021-11-26 9:39

Danzhi Xiaoyaosan-containing Serum Reverses Energy Metabolic Reprogramming of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

XU Shuang, LI Ran, LIU Li-ping*

(College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danzhi Xiaoyaosan-containing serum on MDA-MB-231 breast cancer cells, and to find out whether the action mechanism is related to its intervention in energy metabolism. **Method:** Thirty six-week-old male SD rats were randomly divided into the blank group, Danzhi Xiaoyaosan (8.99 g·kg⁻¹) group, and Xihuangwan (0.55 g·kg⁻¹) group. The serum was isolated after drug intervention for seven days. The cell viability was detected by methyl thiazolyl-tetrazolium (MTT) assay, the cell cycle by flow cytometry, and the apoptosis by Annexin V/propidium iodide (PI) double staining. Following the determination of intracellular glucose content using the glucose testing kit, the expression of glucose transporter 1 (GLUT1) was measured by immunofluorescence staining. Seahorse XFe cell energy metabolism analyzer was used to detect the extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate

[收稿日期] 20210728(016)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673876)

[第一作者] 徐爽,硕士,从事中医方药理论与效用机制研究,E-mail:603145884@qq.com

[通信作者] *刘立萍,教授,博士,硕士生导师,从事中医方药理论与效用机制研究,E-mail:fangji2013@163.com

(OCR). The expression levels of hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), and lactate dehydrogenase A (LDHA) were assayed by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, Danzhi Xiaoyaosan-containing serum inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells, with the best effect observed after intervention with 15% Danzhi Xiaoyaosan-containing serum for 48 h ($P<0.01$), blocked the MDA-MB-231 cells in G_0/G_1 phase ($P<0.01$), and down-regulated the GLUT1 expression, basal glycolysis, glycolysis capacity, glycolytic reserve, basal respiration, adenosine triphosphate (ATP) production, spare respiratory capacity ($P<0.01$), as well as the protein expression of HK2, PKM2, and LDHA in MDA-MB-231 cells ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Danzhi Xiaoyaosan-containing serum inhibits MDA-MB-231 cell proliferation, promotes apoptosis, and induces cell cycle arrest, which may be related to its reversal of energy metabolic reprogramming in MDA-MB-231 cells.

[Keywords] breast cancer; Danzhi Xiaoyaosan; energy metabolic reprogramming; glycolysis

乳腺癌是女性最常被诊断出的癌症,在女性癌症相关死亡原因中排名第二^[1]。疏肝理脾方丹栀逍遥散(《内科摘要》)是临床常用抗乳腺癌的经典方剂,能够阻止或延缓乳腺癌病情的发展,改善乳腺癌患者的内分泌失调等症状^[2-3]。基于网络药理学分析,丹栀逍遥散从相关靶标、簇、生物过程和途径等发挥抗乳腺癌的分子协同作用^[4]。本课题组前期研究发现,丹栀逍遥散水煎剂及其含药血清能够延缓乳腺癌移植瘤裸鼠肿瘤组织生长、抑制乳腺癌细胞的增殖,可能与其影响肿瘤微环境、线粒体凋亡等相关^[5-7]。西黄丸为抗乳腺癌的常用中成药,西黄丸含药血清可以抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、干扰肿瘤细胞周期、对三阴性乳腺癌细胞株作用效果显著^[8-9]。三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株具有较强增殖、侵袭、转移能力,是乳腺癌研究常用细胞模型。能量代谢重编程(EMR)是肿瘤细胞重要特征之一,针对肿瘤细胞代谢的可塑性和灵活性特征,调控肿瘤代谢通路或某些代谢关键酶表达,成为乳腺癌治疗的可行性策略^[10]。本研究在前期研究基础上,探讨丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞能量代谢的影响及作用机制,以期为丹栀逍遥散水煎剂防治乳腺癌提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购买于中国科学院上海生命科学研究所以,编号 SCSP-5043,细胞传至第3代。用含有 10% 胎牛血清(FBS),1% 青链霉素混合液的 L-15 培养液,置于 37 °C,无 CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 动物 SPF 级 6 周龄 SD 雄性大鼠 30 只,体重(250±10)g,购买于辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SXCK(辽)2015-0001,饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,实验操作符合辽宁中医药大学

实验动物伦理委员会要求,批号 21000042019054。

1.3 药物 丹栀逍遥散水煎剂的药物组成:柴胡 15 g,当归 15 g,白芍 15 g,白术(炒)15 g,茯苓 15 g,炙甘草 7.5 g,牡丹皮 7.5 g,栀子(炒)7.5 g。以上中药饮片购买于辽宁中医药大学附属医院,经辽宁中医药大学中药教研室刘立萍教授鉴定均为正品。药物制备水煎剂,浓缩为含生药 0.75 g·mL⁻¹。西黄丸(中国天津天士力制药有限责任公司,国药准字 Z21021222),将药片研成粉末,蒸馏水溶解,生药含量为 0.07 g·mL⁻¹。

1.4 试剂 L-15 培养基,葡萄糖含量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 20190814,20190604);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128-250MG);葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)抗体,已激糖酶 2(HK2)抗体,丙酮酸激酶 M2 型(PKM2)抗体,乳酸脱氢酶 A(LDHA)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR3266142-4, GR3282430-1, GR109025-20, GR176934-14); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 Sc-4778);AnnexinV/碘化丙啶(PI)双染试剂盒(美国 BD 公司,批号 3337788);线粒体压力测试盒,糖酵解压力测试盒(美国 Aligent 公司,批号分别为 17124113,17092298);PI(美国 Sigma 公司,批号 MKBP1360V)。

1.5 仪器 XFe96 型 Seahorse XFe 细胞能量代谢分析仪(美国 Aligent 公司);BD FACSVerse™ 型流式细胞仪(美国 BD 公司);EPS600 型电泳仪, EPS600 型转膜仪, Tanon 5200 型蛋白质印迹成像系统(上海天能科技有限公司);TC 20 1450102 型全自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 制备含药血清 大鼠随机分为空白组、丹栀道

遥散水煎剂组、西黄丸组^[7]。按人与大鼠等效临床剂量折算^[7],丹栀逍遥散水煎剂的等临床剂量为 $8.99\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,西黄丸等临床剂量为 $0.55\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,空白组给予生理盐水。连续灌胃7 d,1次/d,每次灌服 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。末次给药2 h后,腹主动脉取血,分离血清,灭活,过滤。

2.2 MTT比色法检测细胞增殖 细胞以 2.0×10^5 个/mL接种于96孔板,孵育24 h。各组加入10%,15%,20%的空白血清培养液或含药血清培养液,分别孵育24,48,72 h。加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$,孵育4 h。加入DMSO溶液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光震荡10 min,酶标仪490 nm处测定吸光度A。

2.3 流式细胞术检测细胞周期 细胞以 2.0×10^5 个/mL接种于6孔板,孵育24 h。给药孵育48 h。收集旧培养基及消化后的细胞, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,离心半径11 cm(下同)。细胞沉淀中加入预冷磷酸盐缓冲液(PBS) $300\text{ }\mu\text{L}$,重悬细胞,逐滴加入预冷无水乙醇 $900\text{ }\mu\text{L}$, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 固定24 h。 $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min去除固定液,加入预冷PBS 1 mL,震荡混匀, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,弃上清液。细胞沉淀中加入PI染色工作液 $300\text{ }\mu\text{L}$,震荡混匀,室温避光反应30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

2.4 Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡 细胞以 1.5×10^5 个/mL接种于6孔板,孵育24 h。给药孵育48 h。收集各组上清液、洗涤液及消化后的细胞, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,加入预冷PBS重悬细胞, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液,加入配置好的染色液 $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育15 min。各组加入 $1\times\text{AnnexinV-binding buffer}$ $300\text{ }\mu\text{L}$,流式细胞仪检测细胞凋亡。

2.5 葡萄糖含量检测试剂盒检测细胞内葡萄糖含量 细胞以 2.0×10^5 个/mL接种于6孔板,孵育24 h。给药孵育48 h。收集消化后的细胞, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,各组细胞计数后离心弃上清,按照细胞数量(1.0×10^4 个)-蒸馏水(mL)为500:1的比例加入蒸馏水,超声波破碎细胞。 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴10 min,冷却后, $8\ 000\times\text{g}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$ 离心10 min,取上清液备用。按试剂盒操作说明加样,充分混匀, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴10 min,在波长505 nm处,以空白管调零,读取校准管和样本管的吸光度。计算细胞内葡萄糖含量。

2.6 免疫荧光染色法检测细胞 GLUT1 表达 细胞以 1×10^5 个/mL接种于24孔板,孵育24 h。给药孵育48 h。细胞爬片,一抗GLTUI(1:500), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。加入二抗(1:200),室温孵育60 min。清除二

抗,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,滴加抗荧光淬灭剂,封片,荧光显微镜下观察拍照。

2.7 Seahorse XFe 细胞能量代谢分析仪检测细胞外酸化率(ECAR)和耗氧率(OCR) 细胞以 1×10^5 个/mL接种于96孔板,孵育过夜。给药孵育48 h。Seahorse XFe细胞能量分析仪预热过夜,取出检测板,每孔加入平衡水化液1 mL,将传感器盒倒置放入。按试剂盒说明书进行配液,过滤备用。各组加入新鲜的含药 assay 培养基 $500\text{ }\mu\text{L}$,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$,无 CO_2 培养箱孵育1 h。上机检测,ECAR,基线平衡后,机器按照时间点分别加入葡萄糖 $56\text{ }\mu\text{L}$,寡霉素 $62\text{ }\mu\text{L}$,2-脱氧-D-葡萄糖 $69\text{ }\mu\text{L}$ 。OCR,基线平衡后,机器按照时间点一次加入寡霉素 $56\text{ }\mu\text{L}$,线粒体解偶联剂 $62\text{ }\mu\text{L}$,鱼藤酮/抗霉素A $69\text{ }\mu\text{L}$ 。数据处理实验数据由Seahorse XFe 96 Wave software 处理。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HK2, PKM2, LDHA 蛋白表达 细胞以 1.5×10^5 个/mL接种于6孔板,孵育24 h。给药孵育48 h。提取细胞总蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。提取液中加入 $5\times\text{SDS}$ 上样缓冲液, $95\text{ }^\circ\text{C}$,10 min变性。上样,5%浓缩胶电泳电压调至70 V,30 min,恒流,10%分离胶电泳电压调至110 V,60 min,恒流。110 V,转膜40 min。5%牛血清白蛋白 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 封闭1 h。一抗HK2,PKM2,LDHA, β -actin(1:5 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗膜3次,二抗山羊抗兔HRP,二抗山羊抗鼠HRP, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育2 h,TBST洗膜3次。PVDF膜置于蛋白质印迹成像系统中滴加ECL发光液,采集图片。计算目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值。

2.9 统计学方法 采用SPSS 23.0软件进行统计分析,数据结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组数据之间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞增殖的影响 给药干预24 h,与空白组比较,15%丹栀逍遥散含药血清抑制MDA-MB-231细胞增殖($P<0.01$),20%抑制MDA-MB-231细胞增殖($P<0.05$)。给药干预48,72 h,与空白组比较,10%,15%,20%丹栀逍遥散含药血清抑制MDA-MB-231细胞增殖($P<0.01$)。最佳孵育时间和浓度为15%丹栀逍遥散含药血清孵育48 h。见表1。

3.2 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞周期的影响 与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂组细

表1 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞增殖A的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on cell proliferation of MAD-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积分数/%	24 h	48 h	72 h
空白	10	0.454±0.006	0.515±0.004	0.455±0.012
	15	0.455±0.005	0.509±0.009	0.476±0.003
	20	0.473±0.004	0.512±0.015	0.478±0.012
丹栀逍遥散水煎剂	10	0.452±0.008	0.340±0.008 ²⁾	0.335±0.002 ²⁾
	15	0.437±0.004 ²⁾	0.309±0.003 ²⁾	0.294±0.008 ²⁾
	20	0.456±0.008 ¹⁾	0.374±0.007 ²⁾	0.358±0.023 ²⁾
西黄丸	10	0.454±0.009	0.283±0.006 ²⁾	0.294±0.008 ²⁾
	15	0.405±0.010 ²⁾	0.261±0.009 ²⁾	0.285±0.003 ²⁾
	20	0.404±0.014 ²⁾	0.333±0.018 ²⁾	0.331±0.005 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2~7同)。

胞G₀/G₁期显著上调,差异有统计学意义($P<0.01$),S期,G₂/M期显著下调,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表明丹栀逍遥散含药血清将MDA-MB-231细胞阻滞于G₀/G₁期。见表2。

表2 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on cell cycle of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	G ₀ /G ₁ 期	S期	G ₂ /M期
空白	15	55.13±1.23	26.42±0.54	14.81±0.37
丹栀逍遥散水煎剂	15	78.31±1.60 ²⁾	7.92±1.35 ²⁾	9.45±0.45 ²⁾
西黄丸	15	79.91±1.39 ²⁾	7.37±0.67 ²⁾	8.76±0.31 ²⁾

3.3 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞凋亡的影响 与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂组细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。表明丹栀逍遥散含药血清能促进MDA-MB-231细胞凋亡。见表3。

表3 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	凋亡率/%
空白	15	2.22±0.10
丹栀逍遥散水煎剂	15	28.25±4.65 ²⁾
西黄丸	15	37.33±1.36 ²⁾

3.4 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞葡萄糖含量的影响 与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂组细胞内葡萄糖含量显著降低($P<0.01$)。表明丹栀逍遥散含药血清能降低MDA-MB-231细胞内葡萄糖含量。见表4。

3.5 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞GLUT1表达的影响 GLUT1表达呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。与空白组比较,丹栀逍遥散水煎剂组细胞GLUT1荧光表达水平降低。表明丹栀逍

表4 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞内葡萄糖含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

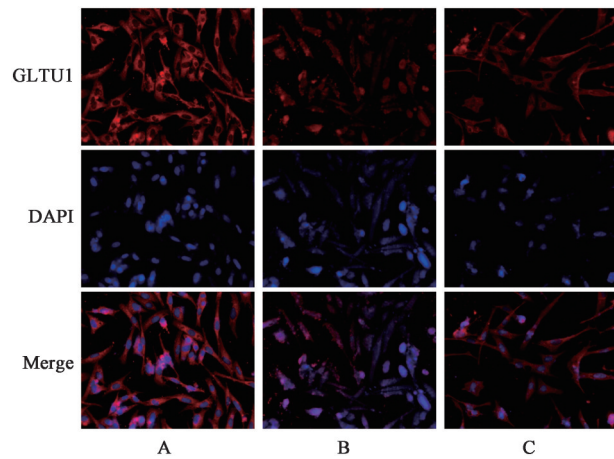
Table 4 Effect of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on glucose content in MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	体积分数/%	葡萄糖/ $\mu\text{mol}/10^4$ 个
空白	15	0.155±0.008
丹栀逍遥散水煎剂	15	0.119±0.001 ²⁾
西黄丸	15	0.084±0.002 ²⁾

遥散含药血清能降低MDA-MB-231细胞GLUT1表达水平。见图1。

3.6 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞ECAR的影响 与空白组比较,经丹栀逍遥散含药血清处理后的细胞,其基础糖酵解、糖酵解能力值、糖酵解储备值均有降低($P<0.01$)。表明丹栀逍遥散含药血清显著抑制MDA-MB-231细胞糖酵解能力。见表5。

3.7 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞OCR的影响 与空白组比较,丹栀逍遥散含药血清处理后,细胞基础呼吸值,ATP产量,储备呼吸值均有降低($P<0.01$)。表明丹栀逍遥散含药血清显著抑制MDA-MB-231细胞线粒体代谢水平。见表6。



A. 空白组; B. 丹栀逍遥散水煎剂组; C. 西黄丸组(图2同)
图1 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞GLUT1表达水平的影响(免疫荧光, ×400)
Fig. 1 Effect of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on GLUT1 expression in MDA-MB-231 cells (IF, ×400)

3.8 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞HK2, PKM2, LDHA蛋白表达的影响 与空白组比较, 丹栀逍遥散水煎剂组细胞HK2表达水平显著降

低($P < 0.01$), PKM2, LDHA蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。表明丹栀逍遥散含药血清能够下调MDA-MB-231细胞HK2, PKM2, LDHA表达水平。见图2, 表7。

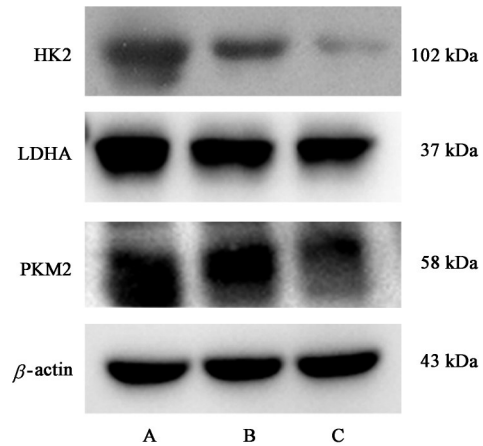


图2 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞HK2, PKM2, LDHA蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of serum containing Danzhi Xiaoyaosan on expression of HK2, PKM2 and LDHA in MDA-MB-231 cells

表5 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞ECAR的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	体积分数/%	基础糖酵解	糖酵解能力值	糖酵解储备值
空白	15	15.20±2.26	25.23±2.08	10.02±0.67
丹栀逍遥散水煎剂	15	7.81±0.70 ²⁾	10.19±1.52 ²⁾	2.39±1.22 ²⁾
西黄丸	15	13.43±1.26	21.73±1.47 ²⁾	8.30±0.78

表6 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞OCR的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	体积分数/%	基础呼吸值	ATP产量	线粒体质子漏	储备呼吸值
空白	15	20.47±1.99	15.79±1.56	4.68±0.58	27.42±2.00
丹栀逍遥散水煎剂	15	13.96±2.79 ²⁾	9.74±1.51 ²⁾	4.22±1.41	13.14±0.34 ²⁾
西黄丸	15	14.54±1.68 ²⁾	0.31±0.97 ²⁾	14.24±0.99 ²⁾	14.93±0.61 ²⁾

表7 丹栀逍遥散含药血清对MDA-MB-231细胞HK2, PKM2, LDHA蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	HK2/ β -actin	LDHA/ β -actin	PKM2/ β -actin
空白	15	1.070±0.002	1.227±0.018	1.208±0.008
丹栀逍遥散水煎剂	15	0.557±0.009 ²⁾	1.031±0.031 ¹⁾	1.152±0.009 ¹⁾
西黄丸	15	0.245±0.012 ²⁾	0.939±0.033 ²⁾	0.936±0.011 ²⁾

4 讨论

明·孙一奎《赤水玄珠》曰:“乳岩初患,用益气养荣汤、加味逍遥、加味归脾,可以内消。”清·高锦庭《疡科心得集》曰:“如能清心静养,无挂无碍,不

必勉治,尚可苟延,当以加味逍遥散、归脾汤或益气养荣汤主之。”临床上应用丹栀逍遥散加减水煎剂治疗乳腺癌及乳腺癌术后之乳痛和抑郁等,疗效良好^[11-13]。加味逍遥散(又名丹栀逍遥散)出自明·薛

已的《内科摘要》,具有疏肝解郁、健脾和营、兼清郁热之效。丹栀逍遥散由逍遥散化裁而来,宋·《太平惠民和剂局方》所载逍遥散的用法是药物为粗末后加水煮汤,《内科摘要》所载丹栀逍遥散的用法是水煎服。本研究丹栀逍遥散的用法亦为水煎服。

乳腺癌证属中医“乳岩”范畴,木郁克土,土性濡湿,木郁土湿,气化失司,病理产物积聚于乳,疏肝健脾法应贯穿乳腺癌防治始末^[14]。应用疏肝健脾解毒方含药血清,可抑制MDA-MB-231细胞的迁移及侵袭能力^[15]。课题组前期研究表明,15%体积分数的中剂量丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌细胞增殖抑制率最高^[16]。本研究结果表明,15%丹栀逍遥散含药血清作用MDA-MB-231细胞48 h,抑制细胞增殖效果最显著。

细胞周期与细胞凋亡功能的正常发挥能够维持机体健康发育及内环境稳定,靶向肿瘤细胞凋亡及细胞周期的机制紊乱是临床抗癌治疗策略之一。调控肿瘤细胞能量代谢水平,可能使细胞周期阻滞^[17]、诱导细胞凋亡^[18]。流式细胞术结果表明,丹栀逍遥散含药血清将MDA-MB-231细胞周期阻滞于G₀/G₁期,促进MDA-MB-231细胞凋亡。

异常快速增殖的肿瘤细胞为满足自身生长需求需要大量物质与能量作为代谢基础,肿瘤细胞及癌旁组织相关信号转导、代谢酶、癌基因异常表达以及肿瘤微环境适应性改变驱动肿瘤细胞EMR^[19]。肿瘤细胞糖代谢异常是肿瘤EMR的关键改变,主要表现为线粒体有氧氧化抑制、糖酵解增强、葡萄糖摄取和消耗增加等^[20]。有研究表明,逍遥散主要活性成分可调节糖酵解和三羧酸循环等能量途径发挥抗抑郁作用,能够降低葡萄糖的生成、减少无氧糖酵解^[21]。本实验研究结果表明,细胞内葡萄糖含量减少,丹栀逍遥散含药血清影响MDA-MB-231细胞糖酵解能力和线粒体代谢水平,经丹栀逍遥散含药血清处理后的MDA-MB-231细胞,其基础呼吸值,ATP产量,储备呼吸值,基础糖酵解,糖酵解能力值,糖酵解储备值均有降低。

肿瘤糖代谢重编程是以Warburg效应为主要生化特征的一系列代谢改变。肝癌细胞在氧气充足情况下始终优先通过糖酵解代谢葡萄糖生成ATP,肿瘤细胞这种特殊生化表型,被称为Warburg效应,或有氧糖酵解^[22]。肿瘤细胞摄取葡萄糖进行Warburg效应,必须协同细胞膜表面的GLUT1来完成葡萄糖从细胞膜外转运到细胞膜内的过程^[23]。HK2是葡萄糖进入细胞后参与Warburg效应的第一

个不可逆限速酶,葡萄糖经HK催化磷酸化反应产生葡萄糖-6-磷酸,启动Warburg效应^[24]。PKM2是Warburg效应的最后一个限速酶,催化糖酵解途径中磷酸烯醇丙酮酸和二磷酸腺苷转化为丙酮酸、三磷酸腺苷^[25]。LDHA控制Warburg效应最后一步反应,即催化丙酮酸合成产物乳酸^[26]。GLUT1及糖酵解限速蛋白HK2,PKM2,LDHA均为乳腺癌MDA-MB-231细胞进行Warburg效应获取能量的关键蛋白^[27-30]。但另有研究认为,肿瘤微环境中髓系免疫细胞(主要是巨噬细胞)对葡萄糖的摄取最为显著,而并非肿瘤细胞^[31]。本研究结果表明,丹栀逍遥散水煎剂下调乳腺癌MDA-MB-231细胞糖酵解相关蛋白GLUT1, HK2, PKM2, LDHA的表达。

综上,以糖代谢重编程为主要改变的肿瘤细胞EMR是MDA-MB-231细胞的重要特征。丹栀逍遥散含药血清能够抑制细胞增殖,阻滞细胞周期于G₀/G₁期,促进细胞凋亡,可能通过下调乳腺癌MDA-MB-231细胞Warburg效应相关蛋白GLUT1, HK2, PKM2, LDHA的表达,进一步降低乳腺癌MDA-MB-231细胞糖酵解能力和线粒体代谢水平,逆转乳腺癌MDA-MB-231细胞EMR有关。中药复方具有多成分、多靶点的优势,防治乳腺癌效果好。因此,研究中药复方丹栀逍遥散含药血清干预乳腺癌细胞EMR的疗效及其机制,可以为丹栀逍遥散水煎剂防治乳腺癌提供科学依据。

[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, FUCHS H E, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA: Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33.
- [2] 何立丽,孙桂芝. 孙桂芝治疗乳腺癌经验[J]. 北京中医药, 2009, 28(1):18-19.
- [3] 徐咏梅,杨国旺,王笑民,等. 丹栀逍遥散加减治疗乳腺癌内分泌综合征65例临床观察[J]. 河北中医, 2005, 27(9):676.
- [4] YANG K, ZENG L, GE J. Exploring the pharmacological mechanism of Danzhi Xiaoyao powder on ER-positive breast cancer by a network pharmacology approach[J]. Evid Based Comple Alter Med, 2018, doi:10.1155/2018/5059743.
- [5] 李雪峰. 丹栀逍遥散通过凋亡途径抗乳腺癌及其分子机制的研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2018.
- [6] 李然,刘立萍,王哲,等. 丹栀逍遥散对人乳腺癌MCF-7细胞株裸鼠移植瘤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2):78-81.

- [7] 杨佳慧. 丹栀逍遥散调控肿瘤相关成纤维细胞抑制乳腺癌生长、转移及分子机制[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2020.
- [8] 何丽娟, 王煜炜, 张京彦, 等. 西黄丸含药血清对三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231细胞增殖、凋亡、迁移的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1):463-466.
- [9] 何丽娟, 李晋生, 陈霞, 等. 西黄丸含药血清对人乳腺癌细胞株MDA-MB-435和MCF-7细胞增殖的影响[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13):2784-2788.
- [10] WANG Y P, LEI Q Y. Perspectives of reprogramming breast cancer metabolism [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1026:217-232.
- [11] 马旭辉, 杨曦. 郑玉玲应用丹栀逍遥散治疗恶性肿瘤举隅[J]. 实用中医药杂志, 2002, 17(6):36.
- [12] 董新刚, 李小江, 贾英杰. 贾英杰丹栀逍遥散治疗乳腺癌[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(5):11-12.
- [13] 陈伍端. 加味丹栀逍遥散治疗乳癌[J]. 福建中医药, 1959, 4(10):45.
- [14] 徐爽, 刘立萍, 李然. 从“气化”论疏肝理脾法干预能量代谢重编程延缓肿瘤进程[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(3):56-58.
- [15] 李琳霏, 张真, 潘博, 等. 基于PI3K/Akt/mTOR信号通路探讨疏肝健脾解毒方含药血清对三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(15):22-28.
- [16] 李然, 杜娜, 刘立萍, 等. 丹栀逍遥散含药血清对乳腺癌MCF-7细胞自噬的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3):98-101.
- [17] LUCIA C L, LLUIS F. Cell cycle regulators in cancer cell metabolism [J]. *Bba Mol Basis Dis*, 2020, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165715.
- [18] GUIDO K, JACQUES P. Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6):472-482.
- [19] SAMERI S, MOHAMMADI C, MEHRABANI M, et al. Targeting the hallmarks of cancer: the effects of silibinin on proliferation cell death, angiogenesis, and migration in colorectal cancer [J]. *BMC Complement Altern*, 2021, 21(1):160.
- [20] DEBERARDINIS R J, LUM J J, HATZIVASSILIOU G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation [J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1):11-20.
- [21] 高耀, 许腾, 吴丹, 等. 基于中医药整合药理学研究平台研究逍遥散治疗抑郁症的能量代谢机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(7):481-491.
- [22] WARBURG O. On the origin of cancer cells [J]. *Science*, 1956, 123(3191):309-314.
- [23] KOCH H, WEBER Y G. The glucose transporter type 1 (Glut1) syndromes [J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 91:90-93.
- [24] GARCIA S N, GUEDES R C, MARQUES M M. Unlocking the potential of HK2 in cancer metabolism and therapeutics [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(41):7285-7322.
- [25] ZHANG Z, DENG X, LIU Y, et al. PKM2, function and expression and regulation [J]. *Cell Biosci*, 2019, 9:52.
- [26] URBANSKA K, ORZECZOWSKI A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2085.
- [27] LAUDANSKI P, SWIATECKA J, KOVALCHUK O, et al. Expression of GLUT1 gene in breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 [J]. *Ginekol Pol*, 2003, 74(9):782-785.
- [28] 张丹. 沉默HK2基因表达对乳腺癌MDA-MB-231细胞放疗敏感性影响的体外研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2017.
- [29] XIAO H, ZHANG L, CHEN Y, et al. PKM2 promotes breast cancer progression by regulating epithelial mesenchymal transition [J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2020, doi:0.1155/2020/8396023.
- [30] MACK N, MAZZIO E A, BAUER D, et al. Stable shRNA silencing of lactate dehydrogenase A (LDHA) in human MDA-MB-231 breast cancer cells fails to alter lactic acid production, glycolytic activity, ATP or survival [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(3):1205-1212.
- [31] REINFELD BRADLEY I, MADDEN MATTHEW Z, et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2021, 593(7858):282-288.

[责任编辑 张丰丰]