

# 六味地黄丸通过MAPKKK1、KLF4抑制三阴乳腺癌的作用机制

郑里翔\*, 刘婷婷, 黄萍, 权威, 俞志鹏  
(江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的:探讨六味地黄丸通过丝裂原活化蛋白激酶激酶1(MAPKKK1)、锌指转录因子4(KLF4)抑制三阴乳腺癌的作用机制。方法:400只SPF级11.5月龄昆明种雌性种鼠,每3d触诊乳腺部位1次,自发瘤小鼠随机分为模型组(给予生理盐水)、紫杉醇组(0.025 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>腹腔注射21d)、六味地黄丸高、中、低剂量组(7.2、3.6、1.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃),饲养至濒死期剥离瘤组织,测瘤体积、质量、计算抑瘤率及发瘤小鼠生存期(6个月后未发瘤小鼠设为正常组);选用SPF级SD大鼠制备不同浓度六味地黄丸含药血清用于培养细胞,沉默MDA-MB-231细胞中MAPKKK1,免疫荧光及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测MAPKKK1和KLF4蛋白表达。结果:体内实验表明,与正常组比较,模型组肿瘤组织MAPKKK1、KLF4蛋白表达显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,各用药组肿瘤组织体积明显减小、质量明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),抑瘤率升高,发瘤小鼠生存期明显延长( $P<0.05$ ),MAPKKK1蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ),紫杉醇组及六味地黄丸高剂量组KLF4蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。体外实验表明,与正常大鼠血清比较,各用药组MDA-MB-231细胞中MAPKKK1、KLF4荧光强度明显增强,紫杉醇组及六味地黄丸高、中剂量组MAPKKK1蛋白表达明显升高,紫杉醇组及六味地黄丸高剂量组KLF4蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。沉默MAPKKK1后,与阴性质粒组(未沉默MAPKKK1)比较,阳性质粒组(沉默MAPKKK1)中MAPKKK1及KLF4荧光强度明显减弱( $P<0.05$ ),蛋白表达显著降低( $P<0.01$ );与阳性质粒组比较,各用药组MAPKKK1及KLF4荧光强度均有明显增强,蛋白表达均有明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论:六味地黄丸抑制三阴性乳腺癌的生长,其可能的分子机制是通过上调MAPKKK1的表达,从而激活KLF4的表达。

**[关键词]** 六味地黄丸; 三阴性乳腺癌; 丝裂原活化蛋白激酶激酶1; 锌指转录因子4; 质粒沉默

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)11-0016-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220728

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1448.011.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-30 9:27

## Inhibitory Effect of Liuwei Dihuangwan on Triple-negative Breast Cancer Through MAPKKK1 and KLF4

ZHENG Li-xiang\*, LIU Ting-ting, HUANG Ping, QUAN Wei, YU Zhi-peng  
(Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the underlying mechanism of Liuwei Dihuangwan in inhibiting triple-negative breast cancer through mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAPKKK1) and Krüppel-like factor 4 (KLF4). **Method:** Four hundreds SPF female Kunming mice aged 11.5 months were palpated once every 3 days. The model mice of spontaneous tumors were randomly divided into a model group (normal saline), a paclitaxel group (0.025 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, *ip*, 21 days), and high-, medium- and low-dose Liuwei Dihuangwan groups (7.2, 3.6, 1.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, *ig*). Tumor tissues were separated until the moribund stage. The tumor volume and weight were measured, and the tumor inhibition rate and the survival time of the tumor mice were calculated (after 6 months, tumor-free mice were assigned into the normal group). SPF SD rats were selected to prepare serum samples containing Liuwei Dihuangwan of different concentrations for cell culture,

**[收稿日期]** 2021-12-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160531);江西省科技厅重点研发项目(20203BBGL73205);江西省教育厅重点项目(GJJ180648)

**[通信作者]** \* 郑里翔,博士,教授,从事中医药抗肿瘤研究, E-mail:2992699831@qq.com

and MAPKKK1 in MDA-MB-231 cells was silenced. The protein expression of MAPKKK1 and KLF4 was detected by immunofluorescence and Western blot. **Result:** The *in vivo* experimental results showed that compared with the conditions of the normal group, the protein expression of MAPKKK1 and KLF4 in tumor tissues of the model group dropped ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, all medication groups showed reduced tumor volume and weight ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), increased tumor inhibition rate, prolonged survival time of tumor mice ( $P<0.05$ ), and increased protein expression of MAPKKK1 ( $P<0.01$ ). Additionally, the paclitaxel group and the high-dose Liuwei Dihuangwan group exhibited increased protein expression of KLF4 ( $P<0.01$ ). The *in vitro* experiments showed that compared with the conditions of the normal group, the fluorescence intensities of MAPKKK1 and KLF4 in MDA-MB-231 cells in all medication groups were potentiated, and the protein expression of MAPKKK1 in the paclitaxel group and the high- and medium-dose Liuwei Dihuangwan groups, and the protein expression of KLF4 in the paclitaxel group and high-dose Liuwei Dihuangwan group increased ( $P<0.01$ ). After silencing of MAPKKK1, compared with the conditions of the negative plasmid group (unsilenced MAPKKK1), the fluorescence intensities of MAPKKK1 and KLF4 and the protein expression decreased in the RNAi-27 positive plasmid group (silenced MAPKKK1) ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the RNAi-27 positive plasmid group, all medication groups had enhanced fluorescence intensities of MAPKKK1 and KLF4 and protein expression to different degrees ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can inhibit the growth of triple-negative breast cancer, and the underlying molecular mechanism is related to the up-regulation of MAPKKK1 and activation of KLF4 expression.

**[Keywords]** Liuwei Dihuangwan; triple-negative breast cancer; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAPKKK1); Krüppel-like factor 4 (KLF4); plasmid silencing

乳腺癌为女性最常见的恶性肿瘤,严重危害女性健康,现已成为全球第一大癌症<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌(TNBC)是一种高异质性的乳腺癌亚型,其雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人类表皮生长因子受体-2(Her-2)表达均为阴性,临床症状与其他类型乳腺癌相似,多表现为乳腺肿块、边界不清呈毛刺状、乳房疼痛、皮肤改变、乳头出水出血等,但其恶性程度高,病情进展迅速,预后较差<sup>[2]</sup>。现阶段临床治疗采用手术疗法、化疗、放疗、靶向疗法、内分泌疗法等方式<sup>[3]</sup>。由于耐药率、远端转移率和复发率较高,治疗效果欠佳。故寻找新的治疗方法和作用靶点尤为重要。

临床实践证实,中医药治疗肿瘤具有独特优势,乳腺癌中医称“乳岩”等,该病无论是发病前、发病期间或放化疗后,均会有阴虚证候特征<sup>[4-5]</sup>。六味地黄丸为中医经典滋阴方,出自钱乙的《小儿要证直诀》,常用于治疗肾阴精不足之证。临床实践证实,六味地黄丸在乳腺癌防治方面发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。课题组前期研究发现,六味地黄丸可抑制三阴性乳腺癌小鼠肿瘤生长,延长患瘤小鼠生存期<sup>[8-9]</sup>,但其作用靶点尚不明确。丝裂原活化蛋白激酶激酶1(MAPKKK1)是隶属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的一种丝氨酸/苏氨酸激酶,锌

指转录因子4(KLF4)广泛存在于各种组织中,二者皆参与细胞的增殖、分化与凋亡等过程,且调控许多关键癌基因的转录,抑制乳腺癌的发生发展<sup>[10-12]</sup>。故本研究以此探讨六味地黄丸对三阴性乳腺癌的抑制作用及对MAPKKK1、KLF4表达的影响。

## 1 材料

**1.1 动物与细胞株** 已产仔的SPF级昆明种雌性种鼠400只,鼠龄约11.5个月,体质量(40±5)g,由江西中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(赣)2017-0001。SPF级雄性SD大鼠共60只,鼠龄63~83 d,体质量301~350 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2017-0011。本实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,编号JZLLSC20210029。三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞株,为中国科学院上海细胞所购置,目录号TCHu227,传至9代。

**1.2 药品与试剂** 六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂,国药准字Z19993068,批号13031844,规格360粒/瓶,0.2 g/粒),紫杉醇注射液[深圳万乐药业有限公司,国药准字H20056879,批号E170702,规格10 mL·(60 mg)<sup>-1</sup>], $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号#4970),KLF4抗体(美国Proteintech公司,批号

11880-1-AP), MAPKKK1 抗体、Alexa Fluor 647 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab32091、ab150079), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京全式金生物技术有限公司, 批号 #J10309), 高灵敏度化学发光 ECL 检测试剂盒(美国 Thermo 公司, 批号 KF136091), 质粒提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0500S), RPMI Medium 1640(美国 Gibco 公司, 批号 1786044), DAPI 溶液(北京索来宝科技公司, 批号 C0065)。

**1.3 仪器** H1650 型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司), Leica TCS SP8 型激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司), PowerPac(TW) 通用型 Bio-Rad 电泳仪、Mini-protean 型垂直电泳槽、Mini-protean 型转印电泳槽(美国 Bio-Rad 公司), Forma 3111 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Electron 公司), Fluor Chem M 凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司)。

## 2 方法

**2.1 自发三阴性乳腺癌小鼠模型建立及给药** 选取雌性昆明种小鼠于动物房饲养, 恒温恒湿, 光照每 12 h 明暗交替, 自由摄食饮水。每 3 d 触诊乳腺部位 1 次, 发现乳腺肿块后单独饲养(自发瘤小鼠)<sup>[13]</sup>。6 个月仍未发瘤的小鼠为正常组, 自发瘤小鼠随机分为模型组、紫杉醇组、六味地黄丸高、中、低剂量组。参照《中药药理研究方法学》<sup>[14]</sup>及实验室前期研究, 依据成人给药量换算的小鼠给药量设为中剂量组, 六味地黄丸高、中、低剂量组 7.2、3.6、1.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 每日灌胃 1 次, 正常组和模型组给予等量生理盐水, 紫杉醇组发瘤隔日起腹腔注射紫杉醇溶液 0.025 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 共 21 d。饲养至濒死状态处死, 剥离肿瘤组织及正常组小鼠乳腺组织, 水浸法测瘤体积, 称瘤质量并计算抑瘤率。选取 Basal-like 亚型即三阴性乳腺癌组织进行后续实验。

**2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MAPKKK1 和 KLF4 蛋白表达** 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 加入适量 6×Loading buffer, 沸水浴 10 min 后备用。每孔加入等量蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 分别滴加对应一抗(1:1 000), 4 °C 过夜。选择二抗(1:5 000), 37 °C 的恒温摇床中孵育 2 h。滴加显影液后拍照, 采用系统自带的图像分析软件 Alphaview SA 分析蛋白条带的灰度值。

**2.3 含药血清的制备** SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常血清组、六味地黄丸低、中、高剂量组, 每组

15 只。按临床等效用药剂量 1.07 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 为低剂量组, 六味地黄丸低、中、高剂量组灌胃 1.07、5.37、10.7 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 2 次/日, 连续 3 d, 末次给药 1 h, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 静置 4 h, 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C 离心 10 min(离心半径 4 cm), 收集上清, 同组混匀, 56 °C 水浴灭活 30 min, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 经过培养验证无微生物污染, 分装, 置于 -80 °C 冰箱保存备用<sup>[15-17]</sup>。

**2.4 细胞培养** MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中, 饱和湿度培养。

**2.5 含药血清对 MDA-MB-231 细胞中 MAPKKK1 和 KLF4 表达的影响**

**2.5.1 质粒载体转染及鉴定筛选** 选用由吉凯基因试剂公司所提供 4 条用于沉默 MAPKKK1 的质粒(RNAi, 即针对 MAPKKK1 的 shRNA 编码克隆干扰序列)和 1 条用于对照的阴性质粒。具体序列信息为 MAPKKK1-RNAi (ID: 20326-1) 5'-CTTTCGTA TCTCCATGAAA-3'、MAPKKK1-RNAi (ID: 20327-1) 5'-CTGTTGAAATCAGGTATAA-3'、MAPKKK1-RNAi (ID: 20328-2) 5'-ACTCTTATTGTGCAGGTTA-3'、MAPKKK1-RNAi (ID: 20329-1) 5'-GTCGTGA GATGGAGAATAA-3'。按质粒提取说明书制备不同组转染液, 取处于对数生长期细胞, 调整细胞悬液密度至 2.4×10<sup>5</sup> 个/mL, 每孔 2 mL 加入 6 孔板中培养 24 h, 待细胞生长密度达 70% 左右时, 弃培养基, 用 PBS 清洗后, 每孔加入含不同组转染液的培养基 2 mL, 培养 6~8 h 后换液继续培养 48 h。Western blot 筛选出沉默效果最好的质粒。

**2.5.2 体外实验分组** 含药血清对细胞中 MAPKKK1 及 KLF4 表达的影响, 分为胎牛血清组、正常血清组、紫杉醇组、六味地黄丸含药血清高、中、低组。培养于含 15% 相应血清、1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基; 紫杉醇组浓度 57 μmol·L<sup>-1</sup><sup>[18]</sup>。

沉默 MAPKKK1 后含药血清对细胞中 MAPKKK1 及 KLF4 表达的影响, 分为胎牛血清组、阴性质粒组(未沉默 MAPKKK1)、阳性质粒组(沉默 MAPKKK1)、阳性质粒+紫杉醇组、阳性质粒+六味地黄丸含药血清高、中、低组、阴性质粒+正常血清组。培养于加入不同质粒转染液的含 15% 相应血清、无青-链霉素的 RPMI 1640 培养基。

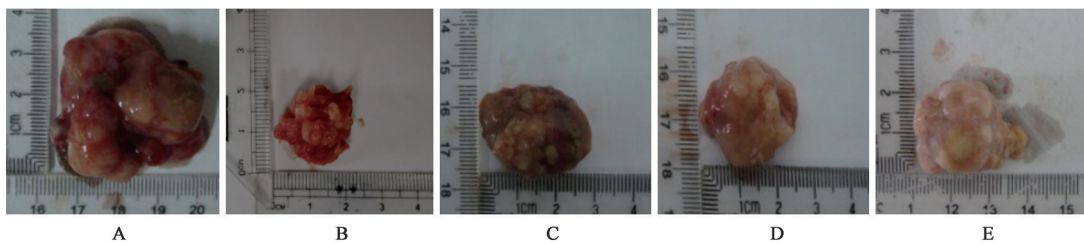
**2.5.3 免疫荧光法检测 MDA-MB-231 细胞中 MAPKKK1 和 KLF4 的荧光强度** 细胞免疫荧光取处于对数生长期的细胞, 调整细胞悬液密度至

5×10<sup>4</sup>个/mL,每孔2 mL接种到24孔板细胞爬片上,细胞贴壁后弃旧培养基,换新培养基继续培养24 h(未沉默)或48 h(沉默后),4%多聚甲醛固定,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,0.5% triton-100通透30 min,滴加血清,37℃恒温摇床封闭30 min。滴加稀释好的一抗(MAPKKK1 1:500, KLF4 1:50),置于4℃冰箱过夜。漂洗后滴加荧光标记二抗(Alexa Fluor 647 1:500),37℃恒温摇床中避光封闭1 h。漂洗后每孔滴加DAPI 200 μL,室温孵育3 min, PBS清洗后封片,使用激光共聚焦显微镜拍摄荧光图片。

2.6 统计学分析 数据分析均使用SPSS 22.0统计分析软件进行处理,组间采取单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对三阴性乳腺癌小鼠瘤体积、质量、抑瘤率及发瘤小鼠生存期的影响 与模型组比较,紫杉醇组及六味地黄丸高、中、低剂量组肿瘤组织体积明显减小、质量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抑瘤率明显升高,发瘤小鼠生存期明显延长( $P < 0.05$ )。见图1、表1。



注:A.模型组;B.紫杉醇组;C~E.六味地黄丸高、中、低剂量组(图2同)

图1 六味地黄丸对三阴性乳腺癌小鼠瘤组织的影响

Fig. 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on tumor tissue of TNBC mice

表1 六味地黄丸对三阴性乳腺癌小鼠瘤组织体积、质量、抑瘤率及发瘤小鼠生存期的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on tumor tissue volume, weight, tumor inhibition rate and survival time in TNBC mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肿瘤体/cm <sup>3</sup>	肿瘤质量/g	抑瘤率/%	存活天数/d
模型组		19.86±6.39	13.65±4.37	-	62.00±28.64
紫杉醇组	0.025	7.22±2.37 <sup>2)</sup>	4.34±1.61 <sup>2)</sup>	86	75.46±8.23 <sup>1)</sup>
六味地黄丸高剂量组	7.2	8.30±3.90 <sup>2)</sup>	6.35±2.62 <sup>2)</sup>	53	92.38±37.43 <sup>1)</sup>
六味地黄丸中剂量组	3.6	9.40±3.24 <sup>2)</sup>	8.71±2.71 <sup>2)</sup>	45	87.13±28.58 <sup>1)</sup>
六味地黄丸低剂量组	1.8	9.84±3.93 <sup>1)</sup>	9.84±3.74 <sup>1)</sup>	39	84.53±37.75 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^2)$  $P < 0.01$

3.2 对三阴性乳腺癌小鼠模型肿瘤组织中MAPKKK1及KLF4蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肿瘤组织中MAPKKK1及KLF4蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较,紫杉醇

组及六味地黄丸高、中、低剂量组MAPKKK1蛋白表达均有显著升高( $P < 0.01$ ),紫杉醇组及六味地黄丸高剂量组KLF4蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ )。见表2、图2。

表2 六味地黄丸对癌组织中MAPKKK1及KLF4蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of MAPKKK1 and KLF4 proteins in cancer tissue ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MAPKKK1/ $\beta$ -actin	KLF4/ $\beta$ -actin
正常组		0.980±0.050	1.206±0.034
模型组		0.165±0.041 <sup>2)</sup>	0.660±0.039 <sup>2)</sup>
紫杉醇组	0.025	0.888±0.036 <sup>4)</sup>	1.423±0.011 <sup>4)</sup>
六味地黄丸高剂量组	7.2	1.096±0.018 <sup>4)</sup>	1.170±0.050 <sup>4)</sup>
六味地黄丸中剂量组	3.6	0.564±0.006 <sup>4)</sup>	0.669±0.014
六味地黄丸低剂量组	1.8	0.678±0.015 <sup>4)</sup>	0.296±0.032

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^2)$  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05, ^4)$  $P < 0.01$

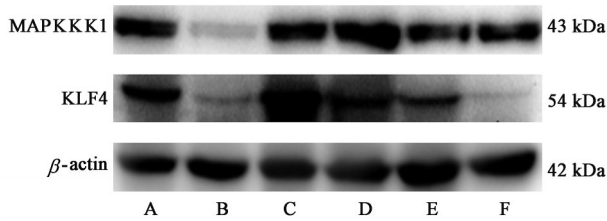
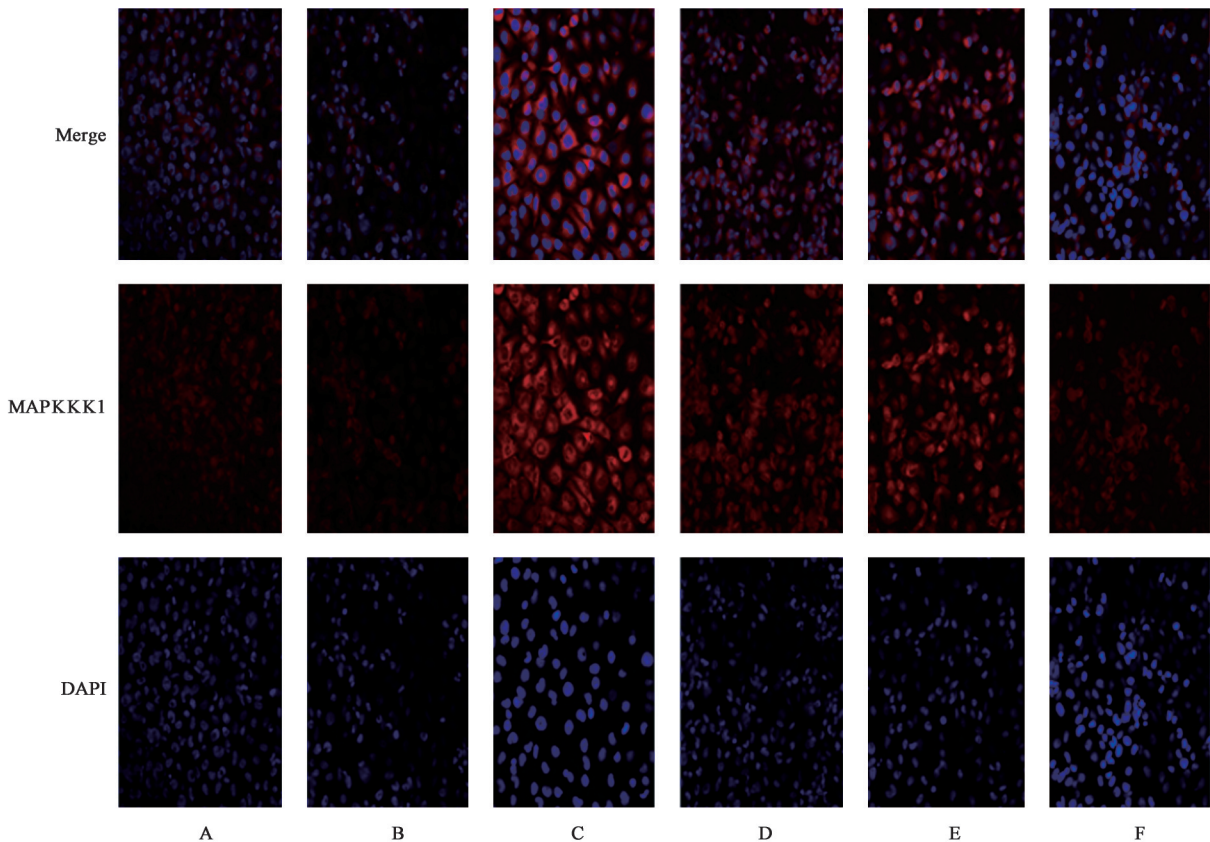


图2 六味地黄丸对肿瘤组织中MAPK3及KLF4蛋白电泳的影响

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on MAPK3 and KLF4 protein electrophoresis in cancer tissue

3.3 对MDA-MB-231细胞MAPK3及KLF4表达的影响 与正常血清组比较,紫杉醇组和六味地黄丸含药血清高、中、低组MAPK3及KLF4荧光强度均有不同程度增强( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),见图3、图4和表3。与正常血清组比较,紫杉醇组及六味地黄丸高、中组MAPK3蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),紫杉醇组及六味地黄丸高组KLF4蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。见图5和表4。



注:A. 胎牛血清组;B. 正常血清组;C. 紫杉醇组;D~F. 六味地黄丸含药血清高、中、低剂量组(图4、图5同)

图3 六味地黄丸含药血清对MAPK3表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 3 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of MAPK3 (IF, ×400)

### 3.4 质粒MAPK3-RNAi沉默鉴定及筛选结果

与阴性质粒组比较,其余4组MAPK3表达显著降低( $P<0.01$ ),其中MAPK3-RNAi(ID20327-1)组中MAPK3表达量较其他组更低。由此可知,质粒转染实验成功沉默了MDA-MB-231细胞中MAPK3,且以MAPK3-RNAi(ID20327-1)组沉默效果最好,故选定MAPK3-RNAi(ID20327-1, RNAi-27)进行后续实验。见图6、表5。

### 3.5 沉默MDA-MB-231细胞中MAPK3后六味地黄丸含药血清对MAPK3及KLF4表达的影响

与阴性质粒组比较,阳性质粒组中MAPK3及

KLF4荧光强度明显减弱( $P<0.05$ ),蛋白表达显著降低( $P<0.01$ )。与阳性质粒组比较,各用药组中MAPK3及KLF4荧光强度均有明显增强,蛋白表达均有不同程度升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见图7-图9和表6、表7。

## 4 讨论

我国乳腺癌多发于围绝经期前后女性,《黄帝内经》记载的女子七七“任脉虚,太冲脉衰”正是该年龄段女性的生理情况,此时女性多肾阴亏虚,出现潮热盗汗,烦躁失眠等阴虚火旺的症状。《诸病源候论》中指出“积聚者,由阴阳不和,脏腑虚弱,受于

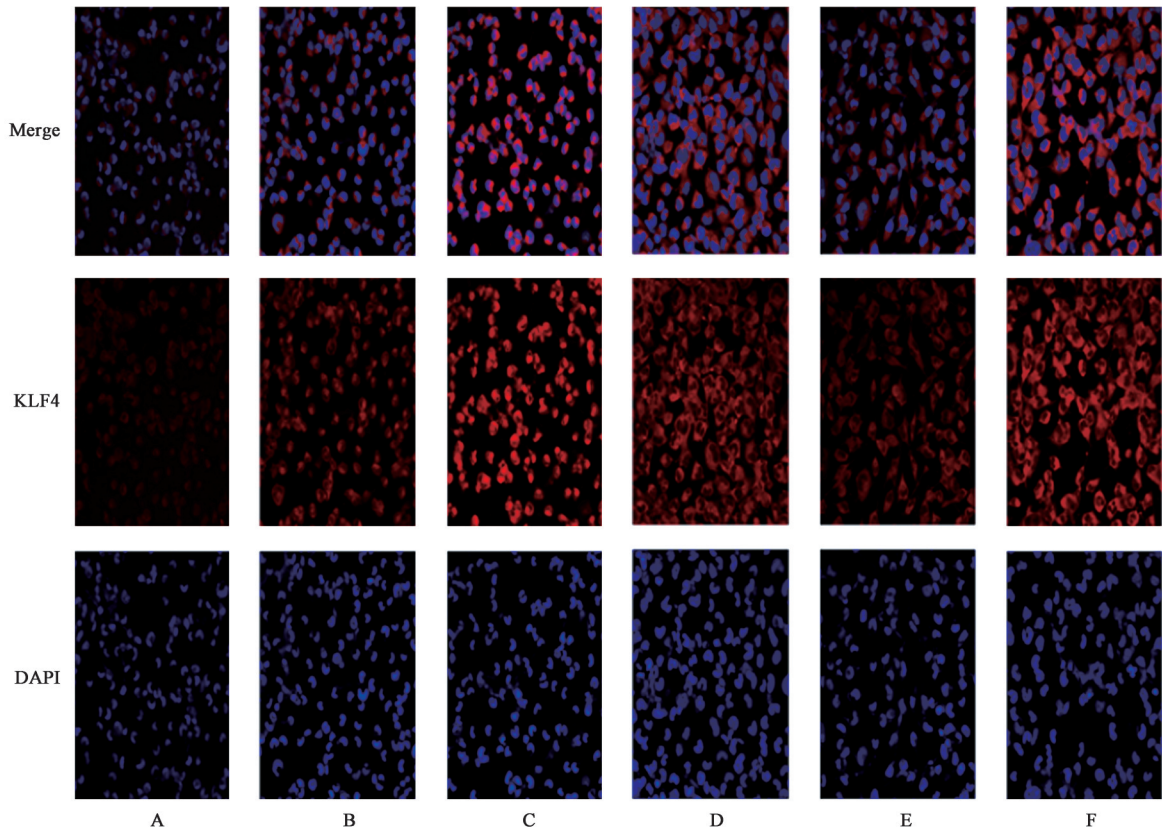


图4 六味地黄丸含药血清对KLF4表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of KLF4 (IF, ×400)

表3 六味地黄丸含药血清对MAPK3K1及KLF4荧光强度的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on fluorescence intensity of MAPK3K1 and KLF4 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分 数/%	MAPK3K1	KLF4
胎牛血清组	15	0.013±0.003	0.025±0.004
正常血清组	15	0.018±0.002	0.032±0.004
紫杉醇组	15	0.047±0.003 <sup>1)</sup>	0.073±0.003 <sup>2)</sup>
六味地黄丸含药血清高组	15	0.030±0.007 <sup>1)</sup>	0.049±0.002 <sup>1)</sup>
六味地黄丸含药血清中组	15	0.039±0.003 <sup>1)</sup>	0.041±0.003 <sup>1)</sup>
六味地黄丸含药血清低组	15	0.029±0.002 <sup>1)</sup>	0.060±0.003 <sup>1)</sup>

注:与正常血清组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表4同)

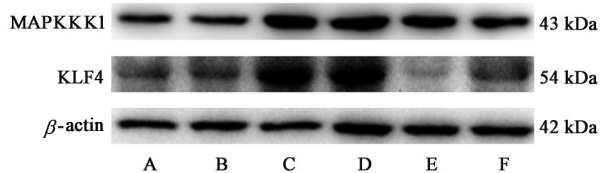


图5 MDA-MB-231细胞MAPK3K1及KLF4蛋白电泳

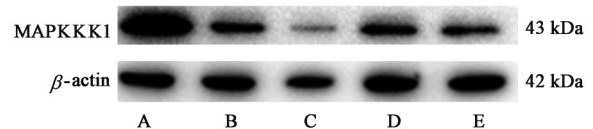
Fig. 5 Electrophoresis of MAPK3K1 and KLF4 protein electrophoresis in MDA-MB-231 cell

风邪,搏于脏腑之气所为也”,阴虚阳亢,冲任失调遂成乳腺癌<sup>[19]</sup>。六味地黄丸可滋阴补肾,壮水之主

表4 六味地黄丸含药血清对MAPK3K1及KLF4蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of MAPK3K1 and KLF4 proteins ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分 数/%	MAPK3K1 / $\beta$ -actin	KLF4 / $\beta$ -actin
胎牛血清组	15	0.807±0.024	0.795±0.035
正常血清组	15	0.747±0.031	0.756±0.009
紫杉醇组	15	1.211±0.041 <sup>1)</sup>	1.302±0.029 <sup>2)</sup>
六味地黄丸含药血清高组	15	0.971±0.026 <sup>1)</sup>	0.982±0.011 <sup>2)</sup>
六味地黄丸含药血清中组	15	0.991±0.013 <sup>2)</sup>	0.256±0.019
六味地黄丸含药血清低组	15	0.789±0.022	0.720±0.014



注:A. 阴性质粒组;B~E. MAPK3K1-RNAi(ID20326-1、ID20327-1、ID20328-2、ID20329-1)组

图6 不同的沉默靶点对MAPK3K1蛋白电泳的影响

Fig. 6 Effect of different silencing targets on MAPK3K1 protein electrophoresis

以治阳光。大量研究表明,六味地黄丸及其随证加减方治疗乳腺癌效果良好<sup>[20-22]</sup>。

表5 不同的沉默靶点对MAPKKK1表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of different silencing targets on the expression of MAPKKK1 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

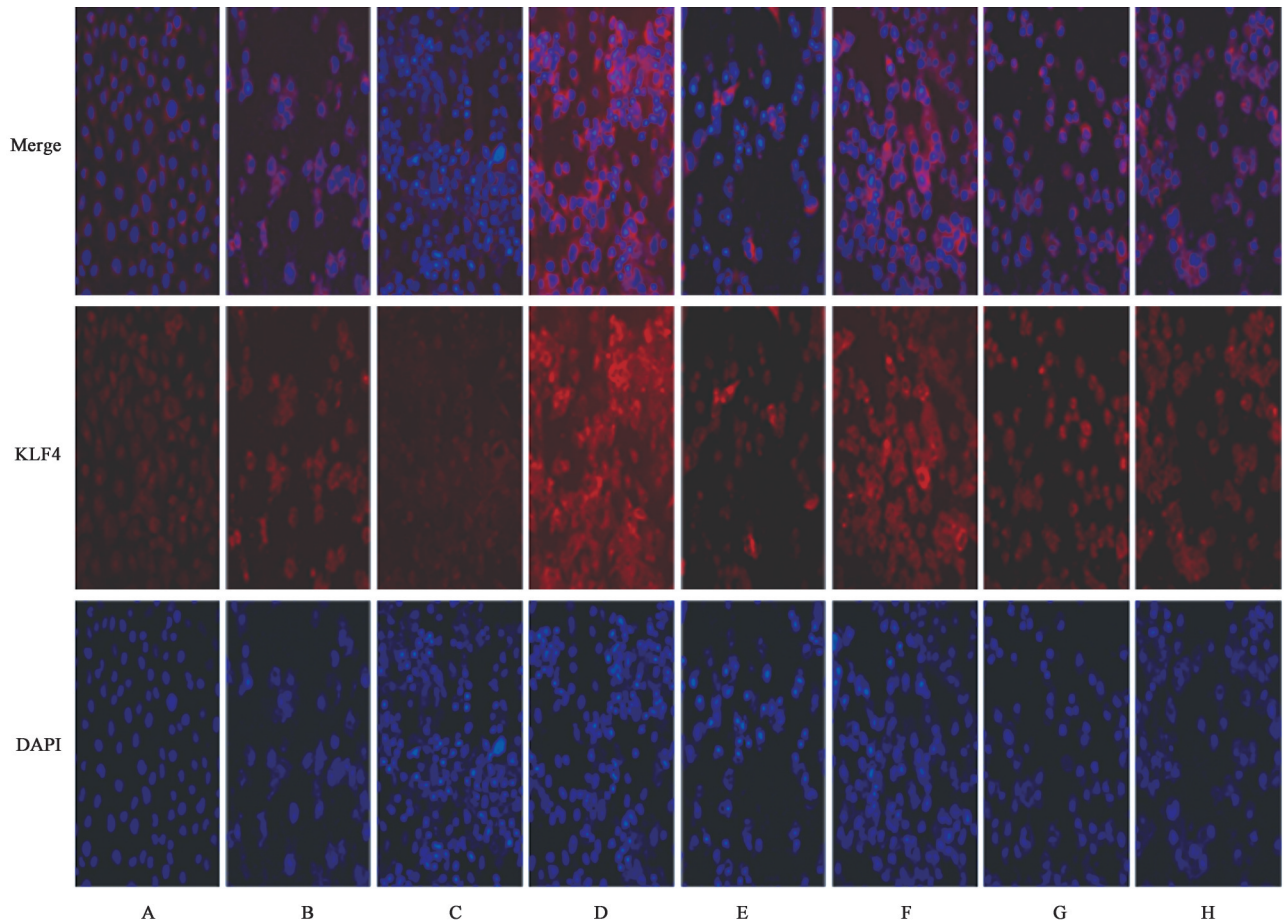
组别	MAPKKK1/ $\beta$ -actin
阴性质粒组	1.436 $\pm$ 0.002
MAPKKK1-RNAi(ID20326-1)组	0.692 $\pm$ 0.002 <sup>2)</sup>
MAPKKK1-RNAi(ID20327-1)组	0.307 $\pm$ 0.044 <sup>2)</sup>
MAPKKK1-RNAi(ID20328-2)组	0.615 $\pm$ 0.013 <sup>2)</sup>
MAPKKK1-RNAi(ID20329-1)组	0.488 $\pm$ 0.015 <sup>2)</sup>

注:与阴性质粒组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$

六味地黄丸以熟地黄为君,滋阴补肾,填精益髓,山茱萸补养肝肾,并能涩精,山药补益脾阴,并能固肾,共为臣药,佐以泽泻利湿泄肾浊并减熟地之滋腻,茯苓淡渗脾湿助山药之健运,牡丹皮清泄虚热并制山茱萸之温涩,三补三泻共奏滋补肝肾之功。研究表明,熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻均有抗肿瘤活性,可抑制乳腺癌的发生发展<sup>[23-28]</sup>。故本课题采用六味地黄丸,探究其抑制三

阴性乳腺癌的作用机制。

MAPKKK1是控制肿瘤增殖和转移信号级联中的关键调节因子,参与MAPK信号通路,调节细胞生长和存活等基本细胞过程<sup>[29]</sup>。MAPKKK1可通过ERK触发细胞衰老、凋亡和分化等肿瘤抑制途径,并激活KLF4的功能,且MAPKKK1可直接或间接调控下游信号通路使KLF4磷酸化及乙酰化发挥抗乳腺癌的作用<sup>[30-33]</sup>。KLF4调控细胞的增殖、分化及血管重构等,可通过其氨基酸端的特异性抑制结构域发挥转录调节功能,参与乳腺癌的发生发展过程<sup>[34]</sup>。研究表明,MAPKKK1及KLF4在乳腺癌组织中低表达,且KLF4表达与乳腺癌组织学分级和淋巴结转移呈负相关。MAPKKK1及KLF4还可抑制乳腺癌细胞的增殖及迁移,显著抑制乳腺癌的发生发展<sup>[35-36]</sup>。课题组前期研究发现,MAPKKK1及KLF4可能是抑制乳腺癌的作用靶点<sup>[37]</sup>,故本课题选用六味地黄丸作用于三阴性乳腺癌小鼠及MDA-MB-231细胞,并设计沉默MAPKKK1基因,探究六



注:A. 胎牛血清组;B. 阴性质粒组;C. 阳性质粒组;D. 阳性质粒+紫杉醇组;E~G. 阳性质粒+六味地黄丸含药血清高、中、低剂量组;H. 阴性质粒+正常血清组(图8、图9同)

图7 沉默MAPKKK1后六味地黄丸含药血清对MAPKKK1表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 7 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of MAPKKK1 when MAPKKK1 silenced (IF, ×400)

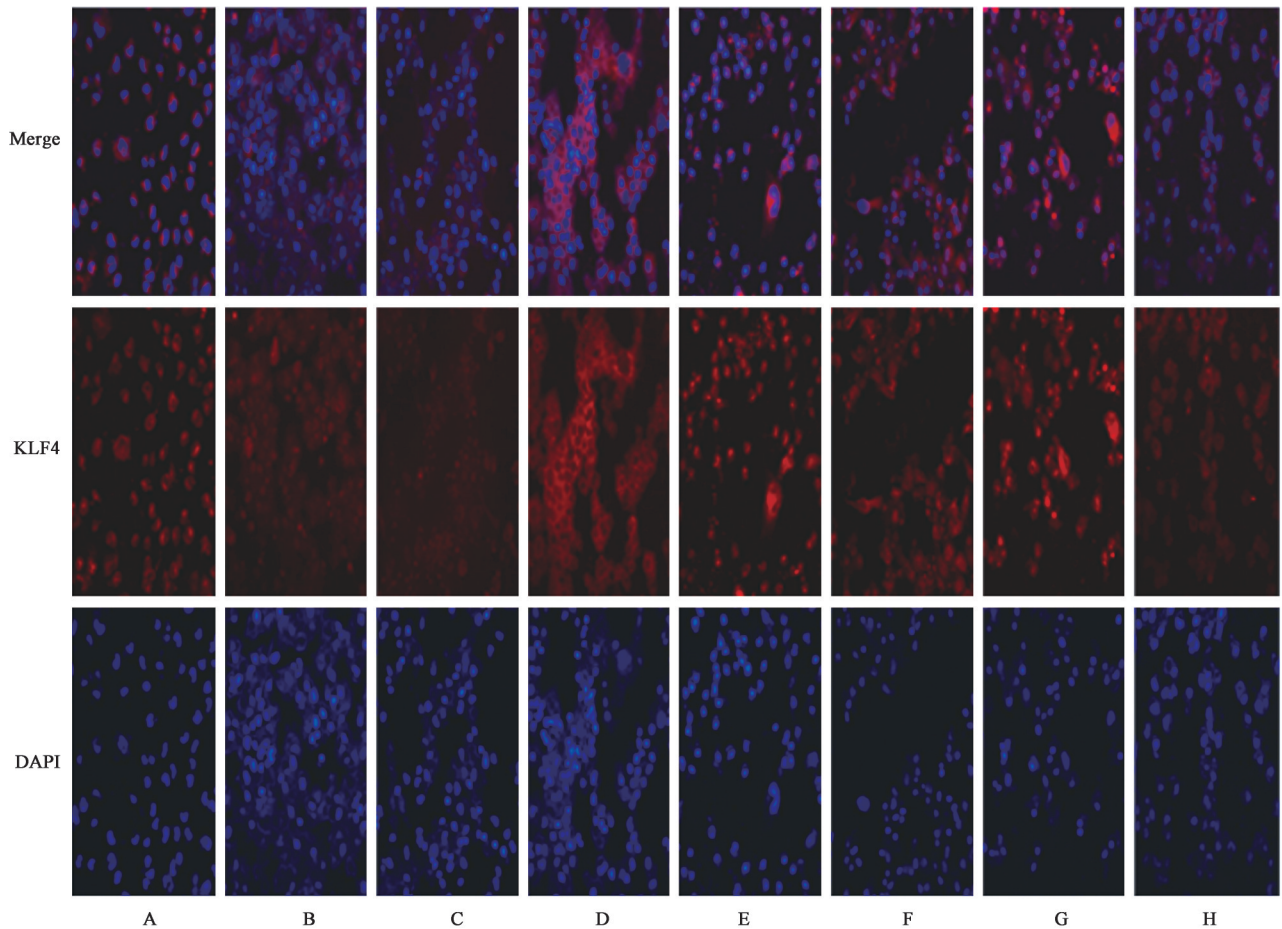


图8 沉默MAPKKK1后六味地黄丸含药血清对KLF4表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 8 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of KLF4 when MAPKKK1 silenced (IF, ×400)

表6 沉默MAPKKK1后六味地黄丸含药血清对MAPKKK1及KLF4荧光强度的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on fluorescence intensity of MAPKKK1 and KLF4 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	MAPKKK1	KLF4
胎牛血清组	15	0.018±0.002	0.019±0.002
阴性质粒组	15	0.018±0.001	0.019±0.003
阳性质粒组	15	0.011±0.002 <sup>1)</sup>	0.014±0.002 <sup>1)</sup>
阳性质粒+紫杉醇组	15	0.048±0.005 <sup>3)</sup>	0.053±0.006 <sup>4)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清高组	15	0.034±0.002 <sup>3)</sup>	0.047±0.007 <sup>3)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清中剂量组	15	0.040±0.001 <sup>3)</sup>	0.030±0.005 <sup>3)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清低剂量组	15	0.035±0.002 <sup>3)</sup>	0.035±0.003 <sup>3)</sup>
阴性质粒+正常血清组	15	0.017±0.001	0.019±0.002

注:与阴性质粒组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与阳性质粒组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表7同)

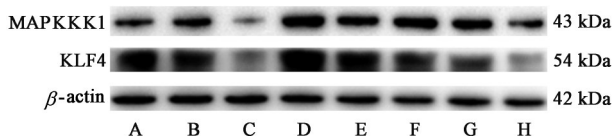


图9 沉默MAPKKK1后六味地黄丸含药血清对MAPKKK1及KLF4蛋白表达的影响

Fig. 9 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on MAPKKK1 and KLF4 protein electrophoresis when MAPKKK1 silenced

味地黄丸通过MAPKKK1、KLF4抑制三阴乳腺癌的作用机制。

研究结果显示,自发三阴性乳腺癌小鼠经六味地黄丸治疗至濒死期,肿瘤生长明显被抑制,患瘤小鼠生存期明显延长,肿瘤组织中MAPKKK1和KLF4的表达明显上调。为进一步明确六味地黄丸是否通过MAPKKK1、KLF4抑制三阴性乳腺癌生

表7 沉默MAPKKK1后六味地黄丸含药血清对MAPKKK1及KLF4蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of serum containing Liuwei Dihuangwan on expression of MAPKKK1 and KLF4 proteins when MAPKKK1 silenced ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	MAPKKK1/ $\beta$ -actin	KLF4/ $\beta$ -actin
胎牛血清组	15	0.574 $\pm$ 0.005	0.964 $\pm$ 0.017
阴性质粒组	15	0.681 $\pm$ 0.022	0.893 $\pm$ 0.014
阳性质粒组	15	0.207 $\pm$ 0.002 <sup>2)</sup>	0.396 $\pm$ 0.004 <sup>2)</sup>
阳性质粒+紫杉醇组	15	1.081 $\pm$ 0.011 <sup>4)</sup>	1.216 $\pm$ 0.014 <sup>4)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清高组	15	0.920 $\pm$ 0.015 <sup>4)</sup>	1.061 $\pm$ 0.016 <sup>4)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清中组	15	1.292 $\pm$ 0.013 <sup>4)</sup>	0.947 $\pm$ 0.010 <sup>4)</sup>
阳性质粒+六味地黄丸含药血清低组	15	1.013 $\pm$ 0.031 <sup>3)</sup>	0.659 $\pm$ 0.002 <sup>4)</sup>
阴性质粒+正常血清组	15	0.696 $\pm$ 0.023	0.330 $\pm$ 0.011

长,体外采用六味地黄丸含药血清作用于MDA-MB-231细胞,发现MAPKKK1和KLF4的表达明显上调;沉默MAPKKK1基因KLF4表达明显降低,而六味地黄丸含药血清作用后,MAPKKK1的表达明显上调,同时KLF4的表达也明显升高。

综上,表明六味地黄丸可能是通过上调MAPKKK1的表达,从而激活KLF4功能来抑制三阴性乳腺癌的发生发展,为六味地黄丸治疗乳腺癌的进一步临床及基础研究提供了实验依据。

[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] LIAO H Y, ZHANG W W, SUN J Y, et al. The clinicopathological features and survival outcomes of different histological subtypes in triple-negative breast cancer[J]. J Cancer, 2018, 9(2): 296-303.

[3] 蔡列,毛大华. 三阴性乳腺癌治疗方案的研究进展[J]. 当代医药论丛, 2020, 18(5): 60-61.

[4] 杨萍,张吉利,赵学龙,等. 乳腺增生症中医辨证分型与钼靶X线表现的相关性研究[J]. 广州中医药大学学报, 2020, 37(7): 1259-1263.

[5] 马然,张立清,鲁海燕. 乳腺癌患者体质与证型分布情况及相关性研究[J]. 中医药导报, 2017, 23(19): 99-101.

[6] 朱明玥,吕志刚. 近代名老中医治疗乳腺癌经验浅析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(7): 3162-3166.

[7] 侯公楷. 中医药防治乳腺癌进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(5): 249-253.

[8] ZHENG L, LIU H, GONG Y, et al. Effect of Liuweidihuang pill and Jinkuishenqi pill on inhibition of spontaneous breast carcinoma growth in mice[J]. J

Tradit Chin Med, 2015, 35(4): 453-459.

[9] ZHENG L, ZHENG Q, YU Z, et al. Liuwei Dihuang pill suppresses metastasis by regulating the wnt pathway and disrupting  $\beta$ -catenin/T cell factor interactions in a murine model of triple-negative breast cancer [J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39 (6) : 826-832.

[10] WITOWSKY J A, JOHNSON G L. Ubiquitylation of MEK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (3) : 1403-1406.

[11] ROBERTS M S, ANSTINE L J, FINKE V S, et al. KLF4 defines the efficacy of the epidermal growth factor receptor inhibitor, erlotinib, in triple-negative breast cancer cells by repressing the EGFR gene [J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1): 66.

[12] NAGATA T, SHIMADA Y, SEKINE S, et al. KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer [J]. Breast Cancer, 2017, 24 (2): 326-335.

[13] ZHENG L, ZHOU B, MENG X, et al. A model of spontaneous mouse mammary tumor for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast cancer [J]. Int J Oncol, 2014, 45 (6) : 2241-2249.

[14] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 445.

[15] 国锦,高燕,赵渤年. 中药复方血清药理学研究方法进展[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1656-1658.

[16] 刘胜,宋晓耘,吴春宇,等. 蛇床子和补骨脂含药血清对乳腺癌高转移细胞MDA-MB-231BO与骨髓基质细胞ST2的影响[J]. 中西医结合学报, 2010, 8(9): 877-882.

[17] 黄玉海,刘海涛. 菊藻丸含药血清对人乳腺癌细胞影

- 响的体外实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(2):37-41.
- [18] 俞志鹏. 沉默SOX2后六味地黄丸对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231迁移及细胞中MAPKKK1、SOX2、FOXD3、KLF4表达的影响[D]. 南昌:江西中医药大学, 2019.
- [19] 周露, 曾荣华, 黄萍. 试论三阴性乳腺癌阴虚证及方药治疗[J]. 光明中医, 2016, 31(21):3078-3080.
- [20] 富琦, 张青, 赵文硕. 郁仁存应用六味地黄汤加减治疗乳腺癌经验[J]. 北京中医药, 2015, 34(11):867-868.
- [21] 张立平, 王蓓, 马建文, 等. 六味地黄汤联合多西他赛和卡培他滨及曲妥珠单抗治疗晚期乳腺癌患者的效果及安全性分析[J]. 中国医药, 2019, 14(1):96-99.
- [22] 朱明玥, 吕志刚. 当代乳腺癌中医专家治疗乳腺癌术后并发症经验分析[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(6):888-891.
- [23] 朱中博, 赵刚, 杨硕, 等. 浅谈生熟地于乳腺癌中医治疗应用区别[J]. 环球中医药, 2019, 12(1):84-86.
- [24] 孙浩, 李宏峰, 宋林, 等. 山药提取物联合树突细胞-细胞因子诱导的杀伤细胞对荷MDA-MB-231乳腺癌干细胞瘤裸鼠的治疗作用研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(12):2312-2316.
- [25] 谢静静, 张金花, 金剑英, 等. 山茱萸提取物对乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭和转移的抑制作用及机制研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30(5):369-374, 440-441.
- [26] 胡康, 罗清, 朱晓峰, 等. 茯苓多糖对人乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(21):5316-5319.
- [27] 张爱凤, 盛玉青, 邹明畅. 泽泻醇B抗4T1乳腺癌细胞侵袭转移的体外研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(2):178-180.
- [28] 尚雯倩, 张艾民, 华玉双, 等. 丹皮酚抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(9):2864-2869.
- [29] PHAM T T, ANGUS S P, JOHNSON G L. MAPKKK1: genomic alterations in cancer and function in promoting cell survival or apoptosis [J]. *Genes Cancer*, 2013, 4(11/12): 419-426.
- [30] 陆慧敏, 孙文熙, 霍晨星, 等. 基于MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1通路探讨三七总皂苷对4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤模型的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24):75-81.
- [31] SU L, JIANG Y, XU Y, et al. Xihuang pill promotes apoptosis of Treg cells in the tumor microenvironment in 4T1 mouse breast cancer by upregulating MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 1111-1119.
- [32] ZHANG R, HAN M, ZHENG B, et al. Krüppel-like factor 4 interacts with p300 to activate mitofusin 2 gene expression induced by all-trans retinoic acid in VSMCs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(10): 1293-1302.
- [33] 单系金, 张景华, 李玉凤, 等. 线粒体融合蛋白2及Ras-MAPK信号通路与乳腺癌的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(4):371-374.
- [34] TAI S K, YANG M H, CHANG S Y, et al. Persistent Krüppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(4): 895-902.
- [35] SONG X, XING Y M, WU W, et al. Expression of Krüppel-like factor 4 in breast cancer tissues and its effects on the proliferation of breast cancer MDAMB231 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 2463-2467.
- [36] 黄胜超, 邱璞, 陈英毓, 等. 真核细胞起始因子4E和Krüppel样因子4在乳腺癌的表达及其临床意义[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(4):623-625.
- [37] 曾美芳, 周易, 王晓敏, 等. 逍遥散合八珍汤对自发乳腺癌小鼠肿瘤生长的影响及分子机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7):3812-3815.

[责任编辑 张丰丰]