

· 药理 ·

白花蛇舌草-半枝莲药对组分诱导三阴性 乳腺癌细胞凋亡的机制

杜江洋, 徐元, 王楠, 蒋义鑫, 杨月, 章丹丹*

(上海中医药大学 中药学院, 交叉科学研究院, 上海 201203)

[摘要] **目的:**考察白花蛇舌草-半枝莲药对的活性组分诱导三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡及其作用机制。**方法:**超高效液相色谱法对药对活性组分中化学成分进行测定, 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞体外增殖力, 克隆形成实验考察克隆形成的数量变化, 流式细胞仪检测凋亡细胞的比例, 蛋白质免疫印迹法检测蛋白及信号通路的变化。**结果:**制备药对以 3 种配比 (1:1, 1:2, 2:1) 进行水煎后脱脂浸膏的乙酸乙酯组分 (YDW11, YDW12, YDW21)。YDW11 含有对羟基苯乙酮、野黄芩苷、木犀草素和芹菜素 4 种成分。通过对比对这 3 个组分对乳腺正常上皮细胞 10A1 和三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外增殖的影响, 发现 YDW11 在 25 ~ 50 mg·L⁻¹ 对 10A1 细胞无细胞毒性, 且抑制 MDA-MB-231 的体外增殖 ($P < 0.01$), 其抑制活性强于 YDW12, YDW21。YDW11 呈质量浓度和时间依赖性抑制三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, HS578T, BT549 的体外增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但对 MCF-7 体外增殖影响不大。YDW11 呈浓度依赖性抑制 MDA-MB-231 的克隆形成 ($P < 0.01$), 并诱导其凋亡 ($P < 0.01$)。YDW11 提高 p21 mRNA 和蛋白表达的同时, 抑制增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路中 p38, c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), 细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 的磷酸化 ($P < 0.05$)。YDW11 处理 MDA-MB-231 后, VASP 在 Ser157 位点和 Ser239 位点的磷酸化水平提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示激活环状核苷酸 (cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 信号通路的活化。**结论:**白花蛇舌草-半枝莲药对比配伍的乙酸乙酯组分 (YDW11) 在对乳腺正常上皮细胞 10A1 无毒的剂量 25, 50 mg·L⁻¹, 呈剂量和时间依赖性显著抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外增殖、克隆形成并诱导凋亡。呈浓度依赖性提高周期抑制蛋白 p21 在 mRNA 和蛋白的表达水平, 抑制 PCNA 的表达, 抑制 p38, JNK, ERK 的磷酸化水平, 提高 VASP 在 Ser157 和 Ser239 位点的磷酸化, 部分通过 cAMP/cGMP 和抑制 MAPK 信号通路而诱导 MDA-MB-231 的凋亡。

[关键词] 白花蛇舌草-半枝莲药对; 三阴性乳腺癌; 细胞凋亡; 环状核苷酸 (cAMP) 信号通路; 环磷酸鸟苷 (cGMP) 信号通路; 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路

[中图分类号] R22; R24; R273; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2018)17-0099-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181519

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0910.005.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 16:52

Mechanism of Active Fractions from Hedyotis Herba-Scutellariae Barbatae Herba in Inducing Apoptosis of MDA-MB-231 Cells

DU Jiang-yang, XU Yuan, WANG Nan, JIANG Yi-xin, YANG Yue, ZHANG Dan-dan*

(1. School of Chinese Materia Medica, Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms of the active fractions from Hedyotis Herba-Scutellariae Barbatae Herba (YDW11) in inducing apoptosis of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Method:** Ultra high performance liquid chromatography (UPLC) was used to determine the chemical components

[收稿日期] 20171101 (013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81773946, 81573673, 81001666); 第九届上海中医药大学大学生科创项目 (201610268066); 上海教委创新项目 (13YZ048); 上海卫计委青年项目 (20144Y0143); 上海教委优秀项目 (SZY07029)

[第一作者] 杜江洋, 从事中药抗肿瘤的机制研究, Tel: 021-51322534, E-mail: dujiangyang@outlook.com

[通信作者] *章丹丹, 博士, 副研究员, 从事中药干预肿瘤微环境的机制研究, Tel: 021-51322534, E-mail: izhangdd@126.com

in the active fractions, and methylthiazole tetrazolium (MTT) assay was used to evaluate the proliferation of cells *in vitro*. The colony formation assay was used to measure the changes of colony numbers. Flow cytometry combined with apoptosis detection kit was used to measure the ratio of apoptosis cells, and the changes in expression of proteins and signaling pathways were evaluated by Western blot. In addition, UPLC assay was carried out to identify the major constituents in YDW11. **Result:** The ethyl acetate fractions (YDW11, YDW12, YDW21) of the water extracts of *Hedyotis Herba-Scutellariae Barbatae Herba* were prepared with three different ratios (1:1, 1:2 and 2:1). YDW11 had four components: p-hydroxyacetophenone, scutellarin, luteolin and apigenin. By comparing the effect of these three fractions on the *in vitro* proliferation of normal mammary epithelial cells (10A1) and triple negative breast cancer cells (MDA-MB-231), it was found that YDW11 at 25 ~ 50 mg·L⁻¹ had no cytotoxicity to normal breast epithelial cells 10A1, but inhibited the *in vitro* proliferation of MDA-MB-231 ($P < 0.01$), and the inhibitory effect was stronger than that of YDW12 and YDW21. YDW11 inhibited the proliferation of three triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, HS578T, BT549) in a dose and time dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but it had little effect on the proliferation of MCF-7 *in vitro*. YDW11 inhibited the colony formation of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner and induced cells apoptosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$). YDW11 increased the mRNA and protein expression of p21, and simultaneously inhibited the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reduced the phosphorylation level of p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular regulated protein kinases (ERK) in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway ($P < 0.05$). The phosphorylation expression level of VASP at both Ser157 and Ser239 sites were up-regulated, indicating that cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signal pathways had been activated by YDW11 treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** YDW11 (25, 50 mg·L⁻¹) showed the strongest inhibition among fractions extracted from *Hedyotis Herba-Scutellariae Barbatae Herba* in different ratios. YDW11 can especially inhibit the proliferation, colony formation and induce cells apoptosis of MDA-MB-231 cells in a dose and time dependent manner without cytotoxicity, elevated the expression of p21 at the mRNA and protein level, suppressed the expression of PCNA and the phosphorylation level of p38, JNK and ERK, and up-regulated the phosphorylation level of VASP at Ser157 and Ser239 sites. YDW11 induced the apoptosis of MDA-MB-231 cells partly by activating cyclic adenosine monophosphate (cAMP) /cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and inhibiting MAPK signal pathways.

[**Key words**] *Hedyotis Herba-Scutellariae Barbatae Herba*; triple negative breast cancer; apoptosis; cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signal pathway; cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signal pathway; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal pathway

乳腺癌是最为常见的女性恶性肿瘤之一^[1]。据世界卫生组织国际癌症研究中心 (IARC) 统计, 2012 年全球女性乳腺癌新发病例达 167 万, 占全部女性恶性肿瘤发病的 25.2%; 52 万女性因患乳腺癌死亡, 占所有女性恶性肿瘤死亡的 14.7%^[2]。乳腺癌的治疗手段主要包括外科手术、放疗、化疗、内分泌治疗和分子靶向治疗等^[3]。但这些治疗方法产生的副作用显著降低患者生活质量, 包括疲乏、脱发、恶心和心脏功能不全等^[4]。中医药广泛用于乳腺癌的治疗, 在降低术后并发症、减轻化放疗副作用、降低复发转移、改善临床症状和提高患者生活质量方面有着明显的优势和特色^[5-6]。

白花蛇舌草性寒、味微苦; 半枝莲性寒、味辛微苦。二者皆属清热解毒类中药, 具有清热利湿、凉血

解毒、软坚散结等功效。多项研究表明二者在抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、增强机体免疫、降低端粒酶活性等方面具有协同作用^[7]。药对是历代医家长期用药实践的经验总结, 在中医临床上常用的、相对固定的两味药配伍应用的形式, 发挥增效减毒的功效。相关研究基于台湾人民健康保险研究数据库, 通过数据挖掘分析发现白花蛇舌草-半枝莲是乳腺癌治疗的核心药对^[8]。但白花蛇舌草和半枝莲联合用药对乳腺癌干预机制尚不明确。本文分析药对白花蛇舌草-半枝莲的活性组分对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外增殖的干预机制, 为该药对在临床治疗乳腺癌的应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药材及试剂 白花蛇舌草、半枝莲购买于上海

养和堂药业公司,批号分别为050815,050621,经上海市食品药品检验所和上海中医药大学可燕教授鉴定,白花蛇舌草为茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* 的干燥全草(报告书编号20080338),半枝莲为唇形科植物半枝莲 *Scutellaria barbata* 的干燥全草(报告书编号20080337)。三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231,HS578T,BT549,正常乳腺上皮细胞株10A1,乳腺癌细胞株MCF-7(美国ATCC公司,货号分别为ATCC® HTB-26™,ATCC® HTB-126™,ATCC® HTB-122™,ATCC® CRL-10317™,ATCC® HTB-22™);DMEM培养基干粉,DMEM/F12培养基干粉,马血清,胰酶(美国Gibco公司,批号分别为1719978,1407119,1783307,1808024);胎牛血清(美国HyClone公司,批号JSM31147);重组人胰岛素,表皮生长因子,二甲基亚砜(DMSO),霍乱毒素(美国Sigma公司,批号分别为140633-201406,1215AFC05C0316,RNBF1402,026M4052);噻唑蓝(MTT,美仑生物公司,批号M0108A);trizol RNA提取试剂,HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kits(美国Life Technologies公司,批号分别为127905,00314800);RealMasterMix SYBR Green试剂盒(美国罗氏公司,批号18570700);姬姆萨染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号20161009);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒,BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,编号分别为C1052,P0009);p21抗体,增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(美国Abcam公司,批号分别为GR197547-36,GR244165-1);p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),磷酸化-p38 MAPK(p-p38 MAPK),c-Jun氨基端激酶(JNK),磷酸化-JNK(p-JNK),细胞外调节蛋白激酶(ERK),磷酸化-ERK(p-ERK),血管扩张刺激磷酸蛋白(VASP),p-VASP^{Ser157},p-VASP^{Ser239}(美国Cell Signal Technology公司,批号分别为23,20,15,14,26,28,2,5,5);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Proteintech公司,批号00044915);细胞凋亡试剂盒(美国BD公司,批号6155987);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 仪器 HEPA CLASS100型CO₂培养箱(美国Thermo公司);Delta series型生物安全柜(美国Labconco公司);IX 71型倒置显微镜(日本Olympus公司);Cellometer Auto T4型细胞计数仪(美国Nexcelom公司);Spectra MAX190型酶标仪(美国MD公司);REF 34295型流式细胞仪(美国BD公司);7500Fast System荧光定量PCR仪(美国

Applied Biosystems公司);PowerPac™ HC型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司);NIM2045型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 药对组分制备及活性组分化学成分测定

2.1.1 组分制备 白花蛇舌草和半枝莲分别以1:1,1:2,2:1比例进行多次煎煮,浓缩过滤后的水煎液,获得水提取物(1:1W,1:2W,2:1W),分别取适量浸膏用石油醚回流脱脂后,再以乙酸乙酯进行多次萃取,浓缩干燥后获得乙酸乙酯组分(YDW11, YDW12, YDW21),并计算得率。

2.1.2 化学成分测定 精确称取对照品对羟基苯乙酮、野黄芩苷、木犀草素、芹菜素以及供试品YDW11浸膏,加入甲醇1 mL溶解样品,将溶解的部分过滤、离心等处理后用于超高效液相色谱(UPLC)分析。UPLC色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3色谱柱,柱温40℃,流动相为乙腈(C)-0.1%甲酸(D),梯度洗脱(0~20 min,5% C和95% D;20~22 min,100% C;22~25 min,5% C和95% D)。

2.2 细胞培养 人乳腺癌细胞MDA-MB-231, HS578T, BT549, MCF-7细胞株培养于含10% FBS的DMEM完全培养基中,人乳腺正常上皮细胞株10A1培养于含5%马血清并加有表皮生长因子(20 μg·L⁻¹),氢化可的松(500 μg·L⁻¹),霍乱毒素(100 μg·L⁻¹),胰岛素(10 ng·L⁻¹)的DMEM/F12完全培养基中。置于37℃ 5% CO₂恒温培养箱中。

2.3 MTT比色法检测细胞增殖 处于对数生长期的10A1, MDA-MB-231, MCF-7细胞分别以5 000个/孔接种于96孔板中, BT549以2 500个/孔接种于96孔板中, HS578T以2 000个/孔接种于96孔板中,每孔均100 μL,培养过夜。YDW11, YDW12, YDW21分别以25, 50 mg·L⁻¹处理10A1和MDA-MB-231细胞24 h; YDW11以25, 50 mg·L⁻¹处理MDA-MB-231, HS578T, BT549, MCF-7细胞,分别处理24, 48, 72 h。每孔加入5 g·L⁻¹ MTT 10 μL,继续培养4 h,弃去上清,加入DMSO 100 μL后置于摇床上至结晶完全溶解,读取490 nm下的吸光度A,计算YDW11各质量浓度处理组对细胞活力的影响。各组设3个复孔,独立实验重复3次。以空白组为100%,计算各给药干预组对细胞活力的影响。

2.4 平板细胞克隆形成实验考察 MDA-MB-231细胞克隆形成 处于对数期的MDA-MB-231以200个/孔接种于6孔板中,分别设置空白组和

YDW11 组,贴壁生长过夜后,YDW11 在无血清条件下以 $25, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞,空白组用无血清 DMEM 培养细胞,培养 48 h 后,全部更换为新鲜含 10% FBS 的 DMEM 培养细胞。10 ~ 14 d 后,观察细胞克隆形成,弃去上清,清洗细胞,每孔加入甲醇 2 mL 固定 30 min,弃去固定液,洗涤后每孔加入适量姬姆萨染色液染色 30 min,自来水小心冲净染色液,干燥后对细胞克隆数进行计数,计算克隆形成率。独立实验重复 3 次。克隆形成率 = (细胞克隆数/接种细胞数)/(空白组细胞克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

2.5 细胞凋亡试剂盒考察细胞凋亡 处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,分组为空白组和 YDW11 组,贴壁生长过夜后,YDW11 在无血清条件下以 $25, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞,空白组采用无血清 DMEM 培养细胞。24 h 后,收集细胞,用 Binding buffer 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,取细胞悬液 100 μL 于流式管中,加入 FITC 标记的 Annexin V 和碘化丙啶(PI)各 5 μL ,冰上避光染色 30 min,加入 Binding buffer 400 μL 上流式细胞仪上检测。实验重复 3 次。

2.6 细胞周期与细胞凋亡检测 细胞处理及加药同 2.5 项。24 h 后,收集细胞,70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定细胞 24 h,PI 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min,上流式细胞仪上检测。独立实验重复 3 次。

2.7 实时荧光定量 PCR 检测 p21 mRNA 表达 处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,分组为空白组和 YDW11 组,贴壁生长过夜后,无血清处理 24 h,YDW11 以质量浓度 $25, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞,收取给药处理 24 h 的 RNA 样品。trizol 法提取 RNA,并测定 A_{260} 与 A_{280} ,计算其 A_{260}/A_{280} 检测 RNA 纯度后,计算 RNA 浓度,并调整质量浓度至 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据逆转录试剂盒说明书逆转为 cDNA 模板后,进行聚合酶链式反应。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环,结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示,并以内参为 100% 求相对表达量。引物序列见表 1。独立实验重复 3 次。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
p21	上游 TGAGCCGCGACTGTGATG	18
	下游 GTCTCGGTGACAAAGTCAAGTT	23
β -actin	上游 CTCCTCCTGAGCGCAAGTACTC	22
	下游 CGGACTCGTCATACTCTCTGCT	21

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 p21, PCNA, MAPK/VASP 信号通路蛋白表达 细胞处理及给药同 2.7 项,收取给药处理 24 h 的蛋白样品,用 BCA 蛋白测定试剂盒测定样品蛋白浓度。每孔上样蛋白 30 μg 在 SDS-PAGE 凝胶中电泳,转膜后用 5% 牛奶封闭,孵育一抗 p21, PCNA, VASP, p-VASP^{Ser157}, p-VASP^{Ser239}, p38 MAPK, p-p38 MAPK, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK(1:1 000),摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 慢摇过夜。用 TBST 清洗 3 遍后,孵育对应的二抗,室温 1 h。用 TBST 清洗 3 遍后,显影曝光,各目标蛋白的表达通过成像仪读取灰度值并就对应的内参进行数值校正。独立实验重复 3 次。

2.9 数据分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间资料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 药对组分制备 药对不同配比水提取物的乙酸乙酯组分分别浓缩干燥,为绿黄色或淡黄色粉末,白花蛇舌草和半枝莲以 1:1,1:2,2:1 质量配比的乙酸乙酯萃取物的得率分别为 YDW11(0.58%), YDW12(2.11%), YDW21(1.53%)。

3.2 YDW11 中化学成分测定 采用 UPLC 对 YDW11 中化学成分进行测定,确定了 YDW11 中的 4 种化合物:对羟基苯乙酮、野黄芩苷、木犀草素和芹菜素。见图 1。

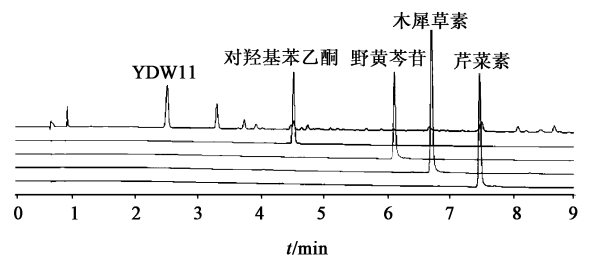


图 1 UPLC 分析谱

Fig. 1 UPLC analysis spectrum

3.3 YDW11, YDW12, YDW21 对乳腺正常上皮细胞 10A1 体外增殖的影响 与空白组相比,YDW11, YDW12, YDW21 在 $25 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对正常乳腺上皮细胞没有明显细胞增殖抑制作用。见表 2。

3.4 YDW11, YDW12, YDW21 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外增殖的影响 与空白组相比, YDW11, YDW12 在 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外增殖 ($P < 0.05, P < 0.01$), YDW11 抑制活性强于 YDW12 和 YDW21。见表 3。

表 2 YDW11, YDW12, YDW21 对 10A1 体外增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of YDW11, YDW12, YDW21 on proliferation of 10A1 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活性率/%
空白	-	100
YDW11	25	111.94 ± 6.44
	50	96.32 ± 1.00
YDW12	25	117.86 ± 3.27
	50	98.68 ± 3.97
YDW21	25	148.72 ± 5.20
	50	110.56 ± 4.02

3.5 YDW11 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231, HS78T, BT549 和 MCF-7 体外增殖的影响 与空白组相比, YDW11 在 25 ~ 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈质量浓度和时间依赖

表 3 YDW11, YDW12, YDW21 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of YDW11, YDW12, YDW21 on proliferation of MDA-MB-231 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活性率/%
空白	-	100
YDW11	25	95.24 ± 2.48
	50	67.06 ± 1.99 ²⁾
YDW12	25	115.82 ± 1.60
	50	82.65 ± 1.64 ¹⁾
YDW21	25	119.25 ± 8.27
	50	110.60 ± 5.07

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 11 同)。

性抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231, HS578T, BT549 的体外增殖 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而对 MCF-7 体外增殖没有明显影响。见表 4。

表 4 YDW11 对不同乳腺癌细胞体外增殖细胞活性率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of YDW11 on proliferation rates of different breast cancer cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) %

细胞	组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
MDA-MB-231	空白	-	100	100	100
	YDW11	25	95.24 ± 2.48	68.24 ± 2.00 ²⁾	53.36 ± 1.00 ²⁾
		50	67.06 ± 1.00 ²⁾	54.55 ± 1.00 ²⁾	45.32 ± 0 ²⁾
HS578T	空白	-	100	100	100
	YDW11	25	89.39 ± 4.00	63.02 ± 2.00 ²⁾	72.72 ± 2.00 ²⁾
		50	63.41 ± 1.00 ²⁾	40.63 ± 3.00 ²⁾	41.69 ± 2.00 ²⁾
BT549	空白	-	100	100	100
	YDW11	25	90.22 ± 1.00 ²⁾	60.64 ± 1.00 ²⁾	70.49 ± 6.00 ¹⁾
		50	91.26 ± 1.00 ¹⁾	51.57 ± 2.00 ²⁾	45.77 ± 1.00 ²⁾
MCF-7	空白	-	100	100	100
	YDW11	25	109.58 ± 0.02	122.08 ± 0.01	106.67 ± 0.01
		50	115.05 ± 0.02	118.40 ± 0.03	100.48 ± 0.03

3.6 YDW11 对 MDA-MB-231 细胞克隆形成的影响

与空白组相比, YDW11 在 25 ~ 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度依赖性抑制 MDA-MB-231 细胞克隆形成 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 5, 图 2。

3.7 YDW11 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

与空白组比较, 随着 YDW11 质量浓度增加, 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$), YDW11 呈浓度依赖性诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。见表 6。

3.8 YDW11 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

与空白组比较, 经 YDW11 处理后, 凋亡细胞 (sub-G₁)

表 5 YDW11 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Effect of YDW11 on colony formation of MDA-MB-231 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	克隆形成率/%
空白	-	100
YDW11	25	32.47 ± 0.40 ¹⁾
	50	0

比例明显增加 ($P < 0.05$), YDW11 呈浓度依赖性诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。见表 7。

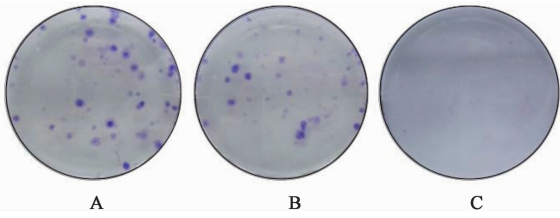


图 2 YDW11 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 克隆形成的影响
Fig. 2 Effect of YDW11 on colony formation of MDA-MB-231

表 6 YDW11 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Effect of YDW11 on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%
空白	-	17.48 ± 2.52
YDW11	25	65.55 ± 14.78 ¹⁾
	50	86.15 ± 15.49 ¹⁾

表 7 YDW11 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Effect of YDW11 on apoptosis of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	sub-G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白	-	0.20	74.55 ± 0.92	5.65 ± 0.03	18.15 ± 0.21
YDW11	25	2.07 ± 0.57 ¹⁾	64.10 ± 7.07	10.72 ± 3.23	18.05 ± 9.55
	50	4.49 ± 1.29 ¹⁾	68.80 ± 11.17	8.73 ± 0.53 ¹⁾	10.09 ± 0.45 ²⁾

3.9 YDW11 对 MDA-MB-231 中 p21 mRNA 表达的影响 与空白组相比, YDW11 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 明显提升 p21 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。见表 8。

表 8 YDW11 对 MDA-MB-231 中 p21 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 8 Effect of YDW11 on p21 mRNA expression of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p21
空白	-	1
YDW11	25	4.09 ± 1.26 ¹⁾
	50	3.81 ± 0.49 ¹⁾

3.10 YDW11 对 MDA-MB-231 中 p21, PCNA 蛋白表达的影响 与空白组相比, YDW11 浓度依赖性增加细胞周期蛋白激酶抑制蛋白 p21 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 抑制 PCNA 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 9。

3.11 YDW11 对 MDA-MB-231 中 MAPK 信号通路

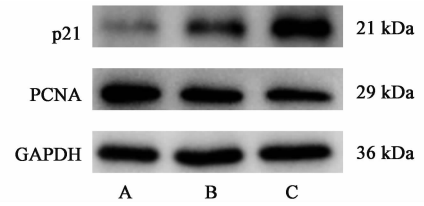


图 3 YDW11 作用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 p21 和 PCNA 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of YDW11 on p21 and PCNA protein expression of MDA-MB-231 cells

表 9 YDW11 对 MDA-MB-231 中 p21 和 PCNA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 9 Effect of YDW11 on p21 and PCNA protein expression of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p21/GAPDH	PCNA/GAPDH
空白	-	1	1
YDW11	25	2.30 ± 0.42 ²⁾	0.69 ± 0.02 ²⁾
	50	3.75 ± 0.05 ²⁾	0.58 ± 0.02 ²⁾

的影响 与空白组相比, YDW11 浓度依赖性抑制 MAPK 信号通路中 JNK, p38 MAPK 和 ERK 的磷酸化 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4, 表 10。

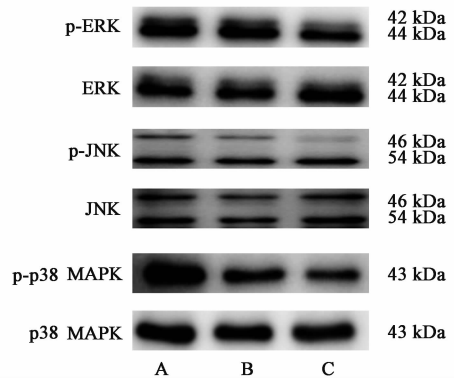


图 4 YDW11 作用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of YDW11 on protein expression related to MAPK signaling pathway of MDA-MB-231 cells

3.12 YDW11 对 MDA-MB-231 中 VASP 在 Ser157 和 Ser239 位点磷酸化的影响 VASP 在 Ser157 位点 (蛋白激酶 A, PKA 作用位点) 和 Ser239 位点 (蛋白激酶 G, PKG 作用位点) 的磷酸化水平提高, 提示环腺苷酸 (cAMP) 和环鸟苷酸 (cGMP) 信号通路的活化。与空白组相比, YDW11 呈浓度依赖性提高 VASP 在 Ser157 和 Ser239 位点磷酸化水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 5, 表 11。

表 10 YDW11 对 MDA-MB-231 中 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of YDW11 on MAPK signaling pathway of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	p-ERK /ERK	p-JNK /JNK	p-p38 MAPK /p38 MAPK
空白	-	1	1	1
YDW11	25	1.14 ± 0.32	0.88 ± 0.02 ¹⁾	0.59 ± 0.14 ²⁾
	50	0.70 ± 0.31 ²⁾	0.61 ± 0.04 ²⁾	0.35 ± 0.06 ²⁾

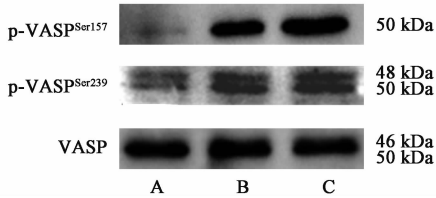


图 5 YDW11 作用三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 VASP 磷酸化水平蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of YDW11 on phosphorylation level of VASP on MDA-MB-231 cells

表 11 YDW11 对 MDA-MB-231 中 VASP 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effect of YDW11 on protein expression related to VASP signaling pathway of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	p-VASPSer157 /VASP	p-VASPSer239 /VASP
空白	-	1	1
YDW11	25	2.35 ± 0.51 ¹⁾	1.66 ± 0.23 ²⁾
	50	4.07 ± 0.91 ¹⁾	2.90 ± 0.71 ²⁾

4 讨论

白花蛇舌草和半枝莲在中医临床中常以药对的形式出现,二者均有清热解毒、软坚散结等功效。大量的实验研究发现白花蛇舌草可促进癌细胞的凋亡、抑制癌细胞增殖、降低细胞迁移能力等抗肿瘤作用^[9-10],半枝莲具有抑制癌细胞增殖、促进癌细胞凋亡、抗炎、抗血管生成活性等作用^[11-12],临床也表明双药联用的形式用于治疗乳腺癌疗效确切^[8]。然而,白花蛇舌草和半枝莲联合用药对乳腺癌干预机制尚不明确。故本研究考察该药对活性组分对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外干预作用,并探讨其可能的作用机制。

细胞周期蛋白激酶 (CDK) 抑制蛋白 p21 的功能主要是通过抑制 CDK 的活性来阻滞细胞周期进程,在细胞 DNA 修复、周期调控、转录调节、细胞凋亡、细胞运动调控中发挥着重要作用。当其位于

细胞核中,p21 作为细胞周期负性调控因子促进细胞凋亡,从而作为肿瘤抑制因子^[13-14]。本研究结果表明,药对活性组分能提高 MDA-MB-231 细胞中 p21 的基因表达水平和蛋白表达水平。

PCNA 是一种存在于细胞核内的酸性蛋白,在 DNA 复制、损伤修复和细胞周期进程等过程中发挥着重要作用^[15]。PCNA 代表细胞的增殖活性,可作为反映肿瘤细胞增殖状态的良好指标^[16]。研究表明 PCNA 的阳性表达还可以反映肿瘤组织的浸润程度,在肿瘤的发生发展过程中发挥重要的调控作用^[17]。在本研究中,经药对活性组分处理后,MDA-MB-231 细胞中 PCNA 的蛋白表达水平呈浓度依赖性降低。

MAPK 信号通路是生物体内重要的信号转导系统之一,是接收膜受体转换与传递的信号并将其带入细胞核内的一类重要分子,参与介导细胞的生长、分裂和分化等多个生命过程,与炎症、肿瘤等多类疾病的发生密切相关^[18]。在哺乳动物细胞中 MAPK 亚族主要包括 ERK1/2, JNK, p38 MAPK 和 ERK5。ERK 广泛存在于各种组织,参与细胞增殖与分化的调控。多种生长因子受体、营养相关因子受体等都需要 ERK 的活化来完成信号转导过程。JNK 是细胞对各种应激原诱导的信号转导的关键分子,参与细胞对辐射、渗透压、温度变化等应激反应。p38 MAPK 介导炎症、凋亡等应激反应,因而成为开发抗炎药物的靶位。研究证明 ERK 通路可以刺激细胞增殖和侵袭,促进肿瘤进程,其信号传导节点可以作为肿瘤抑制因子以及更常见的致突变性信号^[19]; JNK 和 p38 MAPK 的异常表达与恶性肿瘤的形成、发展有着密切的联系^[20],抑制 MAPK 信号通路中 ERK, JNK 和 p38 MAPK 的磷酸化可以抑制乳腺癌细胞的增殖、转移并诱导凋亡^[21-23]。MAPK 信号通路中 JNK, p38 MAPK 和 ERK 可被肿瘤坏死因子- α , 白细胞介素-1, 表皮生长因子等多种因素激活,在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用^[24]。本研究结果表明,经 YDW11 处理后,MDA-MB-231 细胞中 JNK, p38 MAPK 和 ERK 的磷酸化水平呈浓度依赖性降低,提示 YDW11 抑制 MDA-MB-231 细胞体外增殖并诱导其凋亡可能与抑制 MAPK 信号通路的活化相关。

cAMP, cGMP 是重要的细胞内第二信使,在生物体各组织中普遍存在,分别激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 和 cGMP 依赖性蛋白激酶 (PKG),对靶细胞发挥生理效能。cAMP 参与调节细胞的多

种新陈代谢和生理机能,对细胞的增殖和分化发挥重要调节作用。cAMP 信号系统的激活已被证明能抑制胰腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的迁移^[25], WANG 等^[26]研究认为维持高水平的 cAMP 浓度并阻止其外排和分解可以选择性地抑制三阴性乳腺癌发展。cGMP 已被证明在一些类型的癌症包括乳腺癌中是异常调节的,有研究显示,催化 cGMP 水解的磷酸二酯酶(PDE)表达增加与体内乳腺癌的肿瘤分级、阶段以及淋巴结参与相关^[27-28]。本研究结果表明,经 YDW11 处理后,MDA-MB-231 细胞中 VASP 在 Ser157 位点和 Ser239 位点的磷酸化水平显著提升,提示 YDW11 抑制 MDA-MB-231 细胞体外增殖并诱导其凋亡可能部分是通过活化 cAMP/cGMP 信号转导途径实现的。

综上所述,清热解毒药对白花蛇舌草-半枝莲以等比配伍提取的乙酸乙酯组分(YDW11)可选择性抑制三阴性乳腺癌的体外增殖、克隆形成和诱导凋亡,不仅抑制细胞增殖加速的 PCNA 的表达,同时提高细胞周期抑制蛋白 p21 的表达,可能是通过抑制 MAPK 信号通路、活化 cAMP 和 cGMP 信号通路而发挥作用。

[参考文献]

[1] Taherian-Fard A, Srihari S, Ragan M A. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis [J]. *Brief Bioinform*, 2015, 16(3):461-474.

[2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):E359-E386.

[3] Newman L A, Reisfilho J S, Morrow M, et al. The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the cure symposium: triple-negative breast cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(3):874-882.

[4] 方琼,吴蓓雯,沈坤炜,等.乳腺癌病人生活质量及其影响因素现况调查[J]. *外科理论与实践*, 2010, 15(5):508-513.

[5] 任红艳,方肇勤,梁超.白花蛇舌草、半枝莲、蒲公英治疗肿瘤体外研究近况[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(11):2381-2383, 2398.

[6] Kim W, Lee W B, Lee J W, et al. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for breast cancer: a systematic review [J]. *Complement Ther Med*, 2015, 23(4):626-632.

[7] 闫辉,吕青涛.白花蛇舌草、半枝莲及其药对抗肿瘤活性的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(22):

3353-3356.

[8] Yeh Y C, CHEN H Y, YANG S H, et al. Hedyotis diffusa combined with Scutellaria barbata are the core treatment of Chinese herbal medicine used for breast cancer patients: a population-based study [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014(3):202378.

[9] Sunwoo Y Y, Lee J H, Jung H Y, et al. Oldenlandia diffusa promotes antiproliferative and apoptotic effects in a rat hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015(3):501508.

[10] CAI Q, LIN J, WEI L, et al. Hedyotis diffusa Willd inhibits colorectal cancer growth *in vivo* via inhibition of STAT3 signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12):6117-6128.

[11] Shiao A L, SHEN Y T, Hsieh J L, et al. Scutellaria barbata inhibits angiogenesis through downregulation of HIF-1 α in lung tumor [J]. *Environ Toxicol*, 2014, 29(4):363-370.

[12] JIANG Q, LI Q, CHEN H, et al. Scutellaria barbata D. Don inhibits growth and induces apoptosis by suppressing IL-6-inducible STAT3 pathway activation in human colorectal cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4):1602-1608.

[13] Dutto I, Tillhon M, Cazzalini O, et al. Biology of the cell cycle inhibitor p21 (CDKN1A): molecular mechanisms and relevance in chemical toxicology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(2):155-178.

[14] Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J]. *Dna Repair*, 2016, 42(6):63-71.

[15] Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(3):605-613.

[16] 魏昕,杨举伦. Ki-67 和 PCNA 表达与乳腺癌及乳腺癌化疗敏感性关系的关系 [J]. *中国免疫学杂志*, 2014, 30(11):1549-1551.

[17] Gonzalez-Angulo A M, Iwamoto T, LIU S, et al. Gene expression, molecular class changes, and pathway analysis after neoadjuvant systemic therapy for breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4):1109-1119.

[18] Kim E K, Choi E J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(6):867-882.

[19] Mauricio Burotto I, Victoria L. Chiou I, Jung-Min Lee,

- et al. The MAPK pathway across different malignancies; a new perspective [J]. *Cancer*, 2014, 120 (22): 3446-3456.
- [20] SUI H, FAN Z Z, LI Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells[J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(2):426-435.
- [21] GU X D, XU L L, ZHAO H, et al. Cantharidin suppressed breast cancer MDA-MB-231 cell growth and migration by inhibiting MAPK signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(7):e5920.
- [22] Borah N, Gunawardana S, Torres H, et al. 5,6,7,3',4',5'-Hexamethoxyflavone inhibits growth of triple-negative breast cancer cells via suppression of MAPK and Akt signaling pathways and arresting cell cycle[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(6):1685-1693.
- [23] 郑蕾,何昊,方怡等. 木鳖子抗肿瘤有效作用部位筛选及作用机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(9):152-157.
- [24] Weston C R, Davis R J. The JNK signal transduction pathway [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12 (1): 14-21.
- [25] Dong H, Claffey K P, Brocke S, et al. Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152 (1):17-28.
- [26] WANG W, LI Y, ZHU J Y, et al. Triple negative breast cancer development can be selectively suppressed by sustaining an elevated level of cellular cyclic AMP through simultaneously blocking its efflux and decomposition [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (52): 87232-87245.
- [27] Perrin F. Windham, Heather N. Tinsley. cGMP signaling as a target for the prevention and treatment of breast cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 31(2):106-110.
- [28] 钟子劭,黄穗平,张望,等. 脾虚证功能性消化不良大鼠胃窦平滑肌 CNP-NPRB-cGMP 通路改变及四君子汤的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (13):133-137.

[责任编辑 张丰丰]