

# 岩大戟内酯 B 刺激 MCF-7 细胞条件培养基降低人脐静脉血管内皮细胞的增殖和迁移

沈雷<sup>1,2,3</sup>, 李永涛<sup>3</sup>, 张善强<sup>3</sup>, 孙宇<sup>1</sup>, 刘树民<sup>2\*</sup>, 刘吉成<sup>1\*</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院医药科学研究所, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040; 3. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的:观察岩大戟内酯 B(jolkinolide B,JB)刺激 MCF-7 条件培养基对人脐静脉血管内皮细胞的影响,并分析岩大戟内酯 B 的作用机制。方法:分别用 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> 岩大戟内酯 B 刺激 MCF-7 人乳腺癌细胞为 JB 刺激组,正常培养的 MCF-7 细胞为 MCF-7 组。获得 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 刺激的 MCF-7 细胞上清液为相应浓度的条件培养基。利用各组条件培养基分别培养人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)为 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组,正常培养的 HUVEC 为非条件培养基组。分别用噻唑蓝(MTT)比色法,Annexin V-FITC 细胞凋亡实验,细胞划痕实验和 transwell 细胞小室迁移实验观察 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组 HUVEC 增殖、凋亡、迁移的变化;并利用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 JB 对 MCF-7 细胞的作用机制,酶联免疫吸附试验(ELISA)分析各组条件培养基中血管内皮细胞生长因子(VEGF)的含量变化。结果:与正常组比较,25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组 HUVEC 细胞凋亡数目逐渐升高( $P < 0.01$ ),HUVEC 增殖显著降低( $P < 0.01$ );25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组 HUVEC 细胞划痕面积闭合率和细胞迁移率较非条件培养基组均显著降低( $P < 0.01$ )。与 MCF-7 比较,25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 均能够明显抑制 MSC-7 细胞蛋白激酶 B/信号传导及转录激活因子 3/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/STAT3/mTOR)信号通路表达,下调 MCF-7 细胞表达的 VEGF 因子。结论:岩大戟内酯 B 通过抑制 Akt/STAT3/mTOR 信号通路下调 MCF-7 细胞旁分泌 VEGF,抑制血管内皮细胞的增殖或迁移活性。

**[关键词]** 岩大戟内酯 B; MCF-7 乳腺癌细胞; 人脐静脉血管内皮细胞; 增殖; 迁移; Akt 信号通路

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0102-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017220102

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1401.052.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-06 14:01

## Effect of Conditioned Medium of MCF-7 Stimulated by Jolkinolide B in Reducing Proliferation and Migration of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

SHEN Lei<sup>1,2,3</sup>, LI Yong-tao<sup>3</sup>, ZHANG Shan-qiang<sup>3</sup>, SUN Yu<sup>1</sup>, LIU Shu-min<sup>2\*</sup>, LIU Ji-cheng<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China;

2. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

3. Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of conditioned medium of MCF-7 cells stimulated by jolkinolide B (JB) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and analyze the mechanism of JB. **Method:** The 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> of JB were used to stimulate MCF-7 human breast cancer cells, respectively. The cells stimulated by different concentrations of JB were taken as the JB groups, and the normal cultured MCF-7

**[收稿日期]** 20170309(016)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573660)

**[第一作者]** 沈雷,博士,副教授,从事中药抗肿瘤的研究,Tel:0452-2663205,E-mail:shenleiby@126.com

**[通讯作者]** \*刘吉成,博士,教授,从事中药抗肿瘤机制研究,Tel:0452-2663103,E-mail:qybluije@126.com;

\*刘树民,教授,从事中药治疗肿瘤的研究,Tel:0451-82193000,E-mail:huemslui@163.com

cells were taken as control group. The supernatants of tumor cells stimulated by different concentrations of JB were collected as the conditioned medium (CM) of the corresponding concentrations. According to the corresponding concentrations of JB, the conditioned medium was used to culture HUVECs, and these cells were taken as 25-CM group, 55-CM group and 85-CM group, respectively. The normally cultured HUVECs were taken as the non-conditioned medium group (NCM). Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay, Annexin V-FITC, cell scratch and transwell chamber experiment were separately used to detect the proliferation, apoptosis and migration of HUVEC in the above groups. The Western blot assay was used to detect the mechanism of JB on MCF-7 cells, and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze the changes in the content of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the conditioned medium of each group. **Result:** Compared with NCM group, the apoptosis rate of HUVEC in 25-CM group, 55-CM group and 85-CM group were gradually increased ( $P < 0.01$ ), and the *A* values of HUVEC proliferation in the above groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); compared with NCM group, the closure rate and the migration rate of HUVEC in 25-CM group, 55-CM group and 85-CM group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). There were significant differences in apoptosis rate, the *A* value of cell proliferation, the scratch closure rate, and cell migration rate among 25-CM group, 55-CM group and 85-CM group ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, both JB with the concentrations of 25, 55, 85  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  can inhibit the expression of Akt/STAT3/mTOR signaling pathway in MCF-7 cells, and reduce the expression of VEGF in MCF-7 cells. **Conclusion:** JB can reduce the secretion of VEGF in MCF-7 cells by inhibiting the Akt/STAT3/mTOR signaling pathway, so as to inhibit the proliferation and migration of HUVEC.

**[Key words]** jolkinolide B; MCF-7 breast cancer cell; human umbilical vein endothelial cell; proliferation; migration; Akt signaling pathway

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率和死亡率逐年上升<sup>[1]</sup>。乳腺癌若发生血管转移,将对患者生命造成严重危害,放化疗虽然能够控制肿瘤进展,但副作用较大,因此,寻找副作用较小且具有确切疗效的药物尤为重要<sup>[2]</sup>。中药治疗肿瘤讲究辨证施治,整体调节,具有较少的副作用<sup>[3]</sup>,狼毒大戟具有良好的抗肿瘤、抗炎等作用<sup>[4]</sup>,应用狼毒大戟抗肿瘤组织血管生成,将对抑制乳腺癌细胞转移,降低治疗性副作用具有重要意义。狼毒大戟含有岩大戟内酯 A (jolkinolide A),岩大戟内酯 B (jolkinolide B, JB), 12-脱氧佛波醇 13-棕榈酸酯 (12-deoxyphorbol 13-palmitate) 等二萜类化合物<sup>[5]</sup>。JB 是有效的抗肿瘤化合物<sup>[6]</sup>,研究者主要从细胞、分子水平阐述 JB 抗白血病、胃癌等肿瘤细胞的作用效果和机制<sup>[7-9]</sup>,关于 JB 对肿瘤组织内血管内皮细胞的影响还鲜见报道。研究显示,JB 可以降低脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞炎症反应,抑制炎症因子分泌并减少组织液渗出,能够改善血管通透性<sup>[10]</sup>。本课题组研究发现,从狼毒大戟提取的 JB 不仅能够抑制人 A549 肺癌细胞的增殖,还能够下调 A549 细胞移植瘤中 VEGF 的表达,阻止肿瘤组织周围血管的新生<sup>[11]</sup>。乳腺癌组织的血管为肿瘤的生长和转移提供了适宜的条件<sup>[12]</sup>,JB 是否会抑制乳腺癌组织血

管生成,还有待深入研究。

为了阐明 JB 刺激的 MCF-7 细胞对血管内皮细胞活性的影响。本实验重点评价 JB 刺激的 MCF-7 细胞条件培养基对人脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 增殖、凋亡、迁移的影响和机制,为阐明狼毒大戟抗肿瘤血管转移的作用机制及临床应用提供药理学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** MCF-7 人乳腺癌细胞购于 ATCC 公司;HUVEC 购于武汉赛诺普生物公司。

**1.2 药物** 狼毒大戟购于齐齐哈尔市药材公司 (批号 120323)。经齐齐哈尔医学院郭丽娜教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* 的干燥根,从狼毒大戟根部提取 JB,经波谱学鉴定 JB 结构,并由色谱法确定 JB 纯度为 99.2%<sup>[13]</sup>。用二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司,批号 D2650) 溶解 JB,体外实验终质量浓度分别为 25, 55, 85  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,培养基中 DMSO 终体积分数  $< 0.1\%$ <sup>[7,11]</sup>。

**1.3 试剂** 噻唑蓝 (MTT), 羟基豚 (美国 Sigma 公司,货号分别为 M2128, H8627); 胎牛血清 (FBS), DMEM 培养基, Ham's F12K 培养基 (美国 Gbico 公司,货号分别为 10100139, 11995065, 21127022); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒, BCA 蛋白检测

试剂盒, PVDF 膜, ECL 化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号分别为 C1063, P0009, FFP32, P0018A); 单克隆小鼠抗人 Caspase-9 抗体, 小鼠抗人蛋白激酶 B (Akt) 抗体, 小鼠抗人信号传导及转录激活因子 3 (STAT3) 抗体, 小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体, 小鼠抗人 mTOR 抗体, HRP 标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白 (Ig) G (英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab28131, ab175354, ab119352, ab87540, ab8245, ab6789); 人血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (美国 Thermo 公司, 货号 BMS277-2TEN)。

**1.4 仪器** SunFire C<sub>18</sub> 色谱柱, e2695-UV2489 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Emax Plus 型酶标仪 (美国 Molecular 公司); Mini Protean 3 型垂直电泳仪及转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); BX53 型显微镜 (日本 Olympus 公司); 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo 公司); DV114C 型电子分析天平 (美国 OHAUS 公司)。

## 2 方法

**2.1 MCF-7 细胞培养和分组** MCF-7 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养。分别用 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 刺激 MCF-7 细胞为相应的 JB 刺激组, 正常培养的 MCF-7 细胞为空白组。

**2.2 条件培养基的获取** 分别将 1 × 10<sup>6</sup> 个 MCF-7 细胞用含 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 的 DMEM 培养基 (含 1% FBS), 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h 后, 提取不同质量浓度下 JB 刺激组 MCF-7 细胞的上清液, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 0.22 μm 滤器抽滤离心上清液。用含 1% FBS 的 Ham's F12K 培养基, 按照 1:5 稀释离心上清液<sup>[11]</sup>, 分别为 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 刺激的 MCF-7 细胞条件培养基。

**2.3 HUVEC 细胞培养** 含 10% FBS 的 Ham's F12K 培养基为 HUVEC 的基本培养基。HUVEC 实验按照 MCF-7 细胞条件培养基进行确定, 正常培养的 HUVEC 为非条件培养基组。

**2.4 HPLC 检测上清液** 收集 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 刺激的 MCF-7 细胞上清液, 采用 e2695-UV2489 液相色谱仪和 Sun Fire C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (70:30), 进样体积 10 μL, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 254 nm<sup>[13]</sup>。

**2.5 MTT 比色法检测细胞增殖** 在 96 孔细胞培养板每孔中加入 1 × 10<sup>4</sup> 个 HUVECs, 分别加入各组条件培养基, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加入 5 g·L<sup>-1</sup>

MTT 溶液 10 μL, 继续培养 4 h, 添加 DMSO 100 μL, EmaxPlus 酶标仪, 在 490 nm 波长检测细胞增殖吸光度 A。

**2.6 Annexin V-FITC 检测细胞凋亡** 24 孔板细胞培养板每孔中加入 1.5 × 10<sup>5</sup> 个 HUVECs, 将各组细胞在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后, 加入预冷 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (PBS), 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 重复 3 次后, 然后加入 Annexin V-FITC 10 μL, 4 °C 避光孵育 30 min。BX53 显微镜观察 Annexin V-FITC 标记的细胞, 使用 Image-Pro Plus 6.0 (IPP 6.0) 图像分析软件计算细胞凋亡数目。

**2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力** 6 孔细胞培养板每孔中内加入 1 × 10<sup>6</sup> 个 HUVECs, 1 000 μL 枪头划痕, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 清洗 3 次。根据 HUVEC 分组情况而添加相应的条件培养基和 2 mmol·L<sup>-1</sup> 羟基脲, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温下固定 6 h。BX53 显微镜拍照, IPP 6.0 图像分析软件计算 24 h 细胞划痕面积变化率, 划痕面积变化率 = (24 h 划痕面积/0 h 划痕面积) × 100%。

**2.8 transwell 迁移实验观察细胞迁移** HUVEC 用含 1% FBS 的 Ham's F12K 培养基重悬, 1 × 10<sup>4</sup> 个 HUVECs 添加到孔径 8.0 μm 的 transwell 细胞小室内, 下层孔室内添加各组条件培养基, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h 后, 擦除 transwell 细胞小室内残留的细胞, 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 清洗 3 次。4% 多聚甲醛溶液固定 6 h, 1% 结晶紫染色。BX53 显微镜拍照, IPP 6.0 图像分析软件计算 12 h 细胞迁移率, 细胞迁移率 = (6 h 结晶紫染色细胞数目/1 × 10<sup>4</sup> 个细胞) × 100%。

**2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** JB 处理培养 MCF-7 细胞同 2.3 项, 细胞裂解缓冲液裂解, 4 °C, 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。BCA 蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度。蛋白 20 μg 转移至孔径 0.2 μm 的 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 60 min 后, 分别添加小鼠抗人 Caspase-9 抗体 (1:240), 小鼠抗人 Akt 抗体 (1:550), 小鼠抗人 STAT3 抗体 (1:500), 小鼠抗人 mTOR 抗体 (1:350) 和小鼠抗人 GAPDH 抗体 (1:300), 4 °C 过夜, 添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:200), 室温孵育 2 h; 添加 ECL 发光液显影, IPP 6.0 软件分析各蛋白条带灰度值, GAPDH 为内参对照。

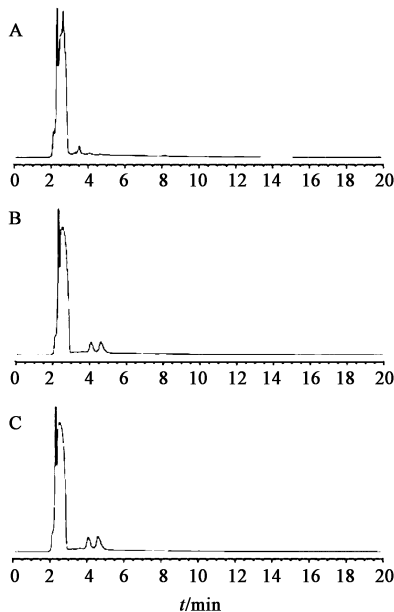
**2.10 ELISA 检测 VEGF 含量** 收集各组 MCF-7

细胞上清液,使用 ELISA 试剂盒检测各组上清液 VEGF 含量,正常培养的 MCF-7 细胞上清液为空白组。采用 Emax Plus 酶标仪进行测定,在 450 nm 波长读取 A,设置对照品曲线,计算 VEGF 含量。

**2.11 统计分析** 使用 SPSS 19.0 软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差分析;计数资料用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

### 3 结果

**3.1 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基对 HUVEC 增殖和凋亡的影响** HPLC 检测发现,各组 MCF-7 细胞上清液中并不含有残留的 JB 成分,见图 1。相对于空白组, HUVEC 细胞凋亡数目 ( $2.42 \pm 0.11$ ) 个/mm, 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组 HUVEC 的细胞凋亡数目分别为 ( $5.17 \pm 0.21$ ), ( $25.03 \pm 0.07$ ), ( $31.56 \pm 0.14$ ) 个/mm, JB 组 HUVEC 细胞凋亡数目显著增多 ( $P < 0.01$ )。见图 2。与非条件培养基组 HUVEC 的 A ( $2.38 \pm 0.28$ ) 比较, 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组 HUVEC 的 A 分别为 ( $0.85 \pm 0.43$ ), ( $0.47 \pm 0.13$ ), ( $0.21 \pm 0.12$ ), JB 组 HUVEC 的 A 显著降低 ( $P < 0.01$ )。

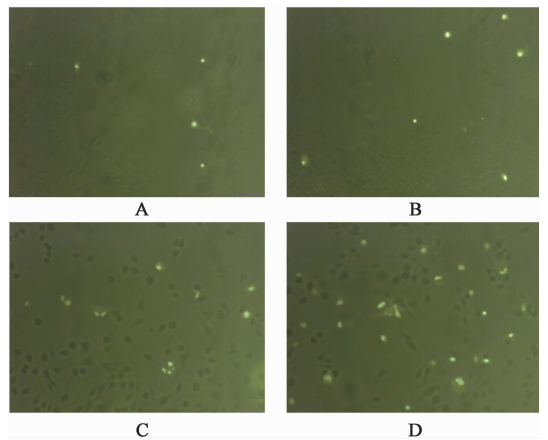


A ~ C. 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 组

图 1 MCF-7 细胞上清液中 JB HPLC

Fig.1 HPLC of JB in supernatants of MCF-7 cells

**3.2 各组条件培养基对 HUVEC 迁移的影响** 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组的 HUVEC 划痕面积变化率较空白组显著升高 ( $P < 0.01$ )。与非条件培养基组 HUVEC 比较, 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组的 HUVEC 细胞迁移率均降低, 迁移细胞数显著减少 ( $P < 0.01$ )。见图 3, 表 1。



A. 空白组; B ~ D. 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组 (图 3,4 同)

图 2 JB 刺激 MCF-7 细胞条件培养基对 HUVEC 细胞凋亡的影响 (免疫荧光,  $\times 100$ )

Fig.2 Effect of conditioned medium of MCF-7 cells stimulated by JB on HUVEC apoptosis (Immunofluorescence,  $\times 100$ )

表 1 各组条件培养基对 HUVEC 细胞划痕面积变化率和细胞迁移率的影响 ( $n = 10$ )

Table 1 Effect of each conditioned medium on closure rate and migration rate of HUVECs ( $n = 10$ )

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	细胞划痕面积变化率	细胞迁移率	%
空白	-	14.36	83.76	
JB	25	37.48 <sup>1)</sup>	61.35 <sup>1)</sup>	
	55	54.47 <sup>1)</sup>	38.56 <sup>1)</sup>	
	85	84.05 <sup>1)</sup>	12.46 <sup>1)</sup>	

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

**3.3 JB 对 MCF-7 细胞内 Akt/STAT3/mTOR 蛋白表达的影响** MCF-7 空白组上清液 VEGF 含量 ( $3.48 \pm 0.11$ ) ng·L<sup>-1</sup>, 25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组 MCF-7 上清液中 VEGF 含量分别为 ( $1.11 \pm 0.19$ ), ( $0.57 \pm 0.05$ ), ( $0.31 \pm 0.07$ ) ng·L<sup>-1</sup>, JB 刺激的 MCF-7 细胞上清液中 VEGF 含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。25,55,85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组 MCF-7 细胞 Akt, STAT3 和 mTOR 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 提示 MCF-7 细胞内 Akt/STAT3/mTOR 蛋白均呈现低表达趋势。见图 4, 表 2。

### 4 讨论

利用中医药抗肿瘤具有副作用小, 效果明显等优势, 因此中医药抗肿瘤作用日益受到人们关注<sup>[14]</sup>。肿瘤组织周围血管的生长为肿瘤迅速生长提供了良好的生长环境<sup>[15]</sup>, 如果即抑制肿瘤细胞增殖又阻止血管新生, 并减少药物副作用将对抗肿瘤具有重要意义。新生的血管为肿瘤的生长和转移提供了微环境<sup>[12]</sup>, 从狼毒大戟提取的 JB 对恶性肿瘤

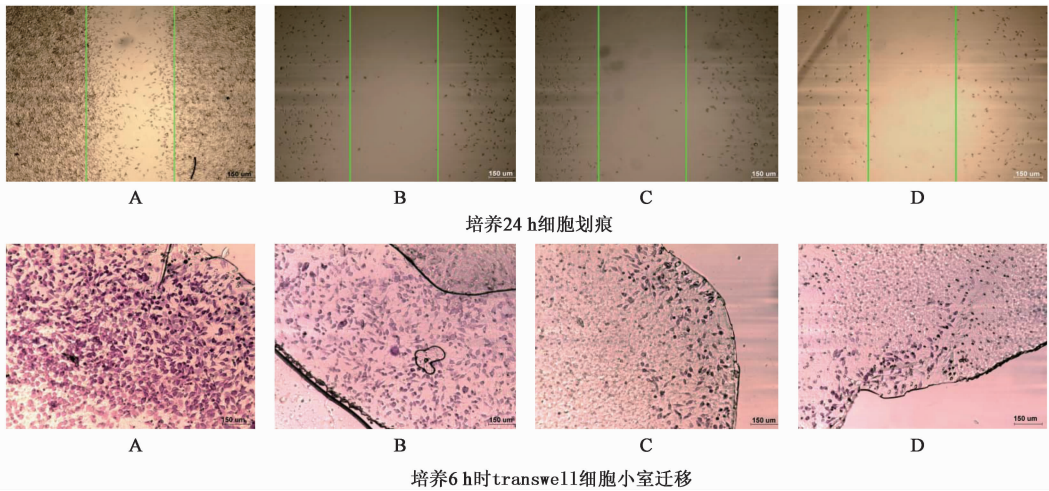


图 3 各组条件培养基对 HUVEC 划痕面积闭合率和迁移率的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 3 Effect of each conditioned medium on closure rate and migration rate of HUVECs(inverted microscope, ×100)

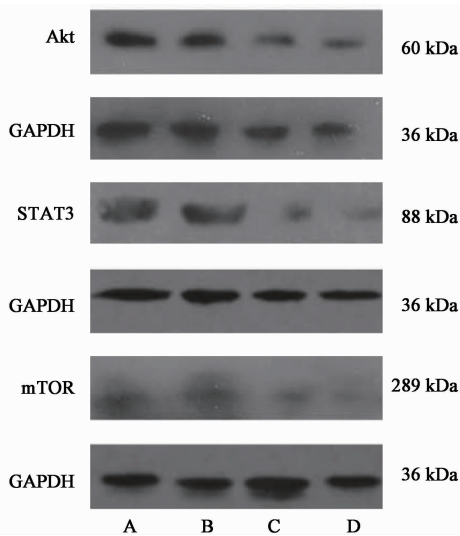


图 4 MCF-7 细胞 Akt, STAT3, mTOR 蛋白表达电泳

Fig. 4 Effect of JB on expressions of Akt, STAT3, and mTOR in MCF-7 cells

表 2 各组条件培养基对 MCF-7 细胞 Akt, STAT3, mTOR 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of each conditioned medium on expressions of Akt, STAT3 and mTOR proteins in MCF-7 cells of each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	Akt /GAPDH	STAT3 /GAPDH	mTOR /GAPDH
正常	-	1.34 ± 0.12	1.18 ± 0.15	0.65 ± 0.03
JB	25	1.12 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.51 ± 0.11 <sup>1)</sup>
	55	0.60 ± 0.07 <sup>1)</sup>	0.28 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.27 ± 0.14 <sup>1)</sup>
	85	0.43 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.17 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.08 ± 0.12 <sup>1)</sup>

细胞的活性会产生显著的抑制效果<sup>[6]</sup>, 不仅抑制 A549 细胞增殖, 还能够下调 A549 细胞移植瘤中 VEGF 的表达, 降低人脐静脉血管内皮细胞的活性,

抑制肿瘤组织血管新生<sup>[11]</sup>, 但 JB 是否会通过刺激乳腺癌细胞细胞而发挥抗血管新生的效应, 有待深入研究。

为阐明 JB 刺激的 MCF-7 细胞能否对血管内皮细胞产生抑制效果, 本研究首先利用液相色谱证明 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 刺激组 MCF-7 细胞上清液中不含有 JB, 避免了 JB 对条件培养基培养 HUVEC 的干扰。接下来, 利用 JB 刺激的 MCF-7 条件培养基培养 HUVEC, 结果发现, 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组 HUVEC 增殖降低, 而 25, 55, 85 mg·L<sup>-1</sup> JB 条件培养基组 HUVEC 细胞凋亡数目明显升高; 此外, 还发现 JB 刺激的 MCF-7 条件培养基均能够抑制 HUVEC 划痕闭合率或迁移率, 这些影响随着 JB 质量浓度的增高而明显。

以上实验结果提示, JB 刺激的 MCF-7 细胞上清液都具有抑制血管内皮细胞的效应。这说明 JB 可能会引起 MCF-7 分泌的细胞因子发生变化。本实验发现, JB 抑制 Akt 通路的 Akt, STAT3, mTOR 蛋白的表达, 调控下游的 VEGF 基因转录, 导致 MCF-7 细胞分泌的 VEGF 等细胞因子降低。12-脱氧佛波醇 13-棕榈酸酯二萜类化合物也能够明显抑制 Akt/mTOR 信号通路, 降低 MCF-7 细胞分泌 VEGF 或 HIF-1α<sup>[16]</sup>, 这与本研究结果有些类似。并发现岩大戟内酯 A 尚可以抑制 A549 细胞内 Akt 信号通路, 发挥抑制 A549 细胞活性的作用, 具有相似的化学结构的二萜类化合物, 对抗肿瘤血管新生也有类似的机制。

Akt 信号通路的激活能促使肿瘤细胞和组织血管的异常增生<sup>[17]</sup>, STAT3/mTOR 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 属于 Akt 通路的重要下游分

子<sup>[18]</sup>, STAT3 在肿瘤的发展和进展中发挥关键作用,是癌症治疗中重要的靶点<sup>[19]</sup>。在肿瘤组织异常增生等导致组织缺氧过程中,肿瘤细胞会激活 Akt/STAT3/mTOR,促进下游的 HIF-1 $\alpha$  或 VEGF 细胞因子表达,加速血管新生<sup>[20]</sup>。总结文献报道和本课题组研究结果,本课题组认为从狼毒大戟提取的二萜类单体将成为新的抗血管生成靶点。当然本研究并不排除二萜类化合物还可能会通过 NF- $\kappa$ B, Erk 等信号通路,抑制 MCF-7 等肿瘤细胞的生物活性<sup>[21]</sup>,在接下来的实验中,本研究将着重研究 JB 对血管生成的影响,为广泛利用狼毒大戟等植物抗肿瘤生长或抑制血管生成奠定基础。

[参考文献]

[ 1 ] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [ J ]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 ( 2 ) : 115-132.

[ 2 ] 曹慧娟,李君,孙淑军,等. 黄芩素对人肺腺癌 a549 细胞的药效作用及机制探讨 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 ( 2 ) : 98-103.

[ 3 ] 崔立然,徐浩,刘吉成,等. 狼毒多糖对 S180 荷瘤鼠免疫功能的调控作用 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 ( 2 ) : 255-258.

[ 4 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [ M ]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:269.

[ 5 ] Vasas A, Hohmann J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012) [ J ]. Chem Rev, 2014, 114 ( 17 ) : 8579-8612.

[ 6 ] LI Y, LIU X L, CAI Z G, et al. LC-ESI-MS/MS analysis and pharmacokinetics of jolkinolide B, a potential antitumor active component isolated from Euphorbia fischeriana, in rat plasma [ J ]. Biomed Chromatogr, 2014, 28 ( 2 ) : 193-196.

[ 7 ] 王晓丽,岳丽玲,周丽,等. 17-羟-岩大戟内酯 B 对 U251 细胞增殖及凋亡作用的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 ( 18 ) : 254-257.

[ 8 ] HAN M H, Lee W S, Nagappan A, et al. Polyphenols from Korean prostrate spurge *Euphorbia supina* induce apoptosis through the Fas-associated extrinsic pathway and activation of ERK in human leukemic U937 cells [ J ]. Oncol Rep, 2016, 36 ( 1 ) : 99-107.

[ 9 ] LIU J, SUN Y, LIU L, et al. A water-soluble polysaccharide (EFP-AW1) from the alkaline extract of the roots of a traditional Chinese medicine, *Euphorbia fischeriana*; fraction and characterization [ J ]. Carbohydr Polym, 2012, 88 ( 4 ) : 1299-1303.

[ 10 ] YANG H, LI Y, HUO P, et al. Protective effect of jolkinolide B on LPS-induced mouse acute lung injury

[ J ]. Int Immunopharmacol, 2015, 26 ( 1 ) : 119-124.

[ 11 ] SHEN L, ZHANG S Q, LIU L, et al. Jolkinolide A and jolkinolide B inhibit proliferation of A549 cells and activity of human umbilical vein endothelial cells [ J ]. Med Sci Monit, 2017, doi:10.12659/MSM.902704.

[ 12 ] Casey S C, Amedei A, Aquilano K, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment [ J ]. Semin Cancer Biol, 2015, 35 ( Suppl ) : 199-223.

[ 13 ] 洪博,李文静,刘树民,等. 狼毒大戟二萜类成分 HPLC 指纹图谱及聚类分析 [ J ]. 天然产物研究与开发, 2015, 27 ( 4 ) : 617-620.

[ 14 ] 樊慧婷,林洪生. 扶正中药治疗肿瘤的基础研究现状 [ J ]. 世界中医药, 2014, 9 ( 7 ) : 825-827.

[ 15 ] Ausprunk D H, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis [ J ]. Microvasc Res, 1977, 14 ( 1 ) : 53-65.

[ 16 ] YANG Y, CONG H, HAN C, et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibits the expression of VEGF and HIF-1 $\alpha$  in MCF-7 cells by blocking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [ J ]. Oncol Rep, 2015, 34 ( 4 ) : 1755-1760.

[ 17 ] Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, et al. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression [ J ]. Cancer Res, 2015, 75 ( 5 ) : 813-823.

[ 18 ] Haddad D, Socci N, Chen C H, et al. Molecular network, pathway, and functional analysis of time-dependent gene changes associated with pancreatic cancer susceptibility to oncolytic vaccinia virotherapy [ J ]. Mol Ther Oncolytics, 2016, 3 ( 3 ) : 16008.

[ 19 ] Bedogni B, O'Neill M S, Welford S M, et al. Topical treatment with inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt and Raf/mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways reduces melanoma development in severe combined immunodeficient mice [ J ]. Cancer Res, 2004, 64 ( 7 ) : 2552-2560.

[ 20 ] XU H Y, PAN Y M, CHEN Z W, et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of VEGFR-2-signaling pathway [ J ]. J Ethnopharmacol, 2013, 146 ( 3 ) : 724-733.

[ 21 ] WANG Y, XU X, WANG H B, et al. 17-Hydroxy-jolkinolide A inhibits osteoclast differentiation through suppressing the activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs [ J ]. Int Immunopharmacol, 2015, 29 ( 2 ) : 513-520.

[责任编辑 张丰丰]