

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

陆慧敏^{1*}, 孙文熙², 霍晨星³, 陈宝艳¹

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;

2. 广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广州 510405;

3. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405)

[摘要] **目的:**通过研究三七总皂苷对4T1乳腺癌荷瘤小鼠促分裂原激活的蛋白激酶的激酶1(MEKK1)/应激激活的蛋白激酶/细胞外信号调节的蛋白激酶(SAPK/Erk激酶, SEK1)/c-Jun氨基末端激酶1(JNK1)/激活蛋白-1(AP-1)通路的影响,探讨三七总皂苷抑制肿瘤的可能机制。**方法:**建立4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤模型,将48只造模成功的小鼠随机分为三七总皂苷低、中、高剂量组(10, 20, 40 mg·kg⁻¹)和模型组,每组12只,三七总皂苷各剂量组腹腔注射剂量为10 mL·kg⁻¹,模型组给予相同剂量的生理盐水,连续给药28 d。给药结束后分离肿瘤组织、称质量、切片、匀浆等,采用脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)染色检测肿瘤细胞凋亡;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤组织MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1蛋白表达。**结果:**与模型组比较,三七总皂苷中、高剂量组的肿瘤质量明显下降($P<0.05$);肿瘤细胞凋亡数量随三七总皂苷剂量的升高明显升高($P<0.05$);三七总皂苷中、高剂量组肿瘤组织中MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA和蛋白表达明显升高($P<0.05$)。**结论:**三七总皂苷对4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤模型具有抑制作用,其作用机制可能与激活MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1信号通路有关。

[关键词] 三七总皂苷; 4T1小鼠乳腺癌细胞; 促分裂原激活的蛋白激酶的激酶1(MEKK1)/应激激活的蛋白激酶/细胞外信号调节的蛋白激酶(SAPK/Erk激酶, SEK1)/c-Jun氨基末端激酶1(JNK1)/激活蛋白-1(AP-1)通路; 凋亡

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0075-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201966

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1416.026.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 14:35

Effect of Panax Notoginseng Saponins on Breast Cancer Cell Line 4T1 in Tumor-bearing Mice Through MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 Pathway

LU Hui-min^{1*}, SUN Wen-xi², HUO Chen-xing³, CHEN Bao-yan¹

(1. *The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405,*

China; 2. Clinical Medical College of Acupuncture Moxibustion and Rehabilitation, Guangzhou

University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. The First Clinical College,

Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential mechanisms of Panax Notoginseng Saponins (PNS) on growth inhibition of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice by investigating the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1)/stress activated protein kinase (SAPK)/extracellular regulated protein kinases (Erk) Kinase (SEK1)/c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1)/activator protein-1 (AP-1) signaling

[收稿日期] 20191231(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603653)

[通信作者] *陆慧敏, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合防治乳腺疾病研究, E-mail: 248129295@qq.com

pathways. **Method:** The 4T1 breast cancer mice model was established. Forty-eight mice with successful modeled and randomly divided into the low, medium and high-dose PNS groups (10, 20, 40 mg·kg⁻¹) and the model control group (12 mice in each group). The PNS groups received intraperitoneal injection with dosage of 10 mL·kg⁻¹, while the controlled group was given the same dosage of saline. After administration with PNS for 28 days, tumor tissues were isolated, weighed, sliced and homogenized. Tumor cell apoptosis was detected by TdT mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. The mRNA expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 in tumor tissue were detected by Real-time polymerase chain reaction(Real-time PCR). The protein expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 in tumor tissue were detected by immunofluorescence staining and Western blot. **Result:** Compared with model group, the tumor weights of medium-dose and high-dose PNS groups were decreased significantly ($P<0.05$). TUNEL staining showed that the number of apoptotic tumor cells increased with the rise of dosage of PNS ($P<0.05$). The medium-dose and high-dose PNS groups showed a significant increase in the mRNA expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 as well as the protein expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 in tumor tissues ($P<0.05$), with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion:** PNS could inhibit the tumor growth of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice, which may be related to the activation of MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 signaling pathways.

[Key words] Panax Notoginseng Saponins (PNS); 4T1 breast cancer cells; mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1)/stress activated protein kinase (SAPK)/extracellular regulated protein kinases (Erk) Kinase (SEK1)/c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1)/activator protein-1 (AP-1) signaling pathways; apoptosis

乳腺癌是一种发生在乳腺腺上皮组织的恶性肿瘤,世界卫生组织2017年公布的数据表明,乳腺癌是全球女性发病率最高的恶性肿瘤,严重威胁女性的健康^[1]。目前临床治疗乳腺癌主要有手术切除、化疗、放疗、内分泌治疗等,对患者的生存质量和身心健康有一定的影响^[2],有研究表明,中医药联合化疗可以改善乳腺癌患者的生存质量^[3]。因此,寻找乳腺癌的中医治疗方法,探究中医药防治乳腺癌具有重要意义。三七总皂苷为五加科植物三七的主要有效成分^[4],在治疗心脑血管系统、中枢神经系统、免疫系统、肿瘤疾病中发挥着重要的药理作用^[5]。近期体内外实验发现,三七总皂苷具有下调癌细胞周期蛋白^[6],上调抑癌基因^[7],抑制肿瘤细胞信号传导^[8],增强机体免疫力清除肿瘤细胞^[9]等作用,但其对乳腺癌的作用机制尚未阐明。近年来研究发现,促分裂原激活的蛋白激酶的激酶1 (MEKK1)的激活可以增加细胞外信号调节的蛋白激酶(SAPK/Erk激酶,SEK1)的表达,减少肿瘤的发生,同时激活 c-Jun 氨基末端激酶1(JNK1)凋亡信号通路,促进细胞凋亡,增强激活蛋白-1(AP-1)的活性,调控下游凋亡相关蛋白的表达^[10-12]。可以推测乳腺癌的形成可能与肿瘤细胞凋亡密切相关。故本研究以 MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 信号通路为切入点,建立小鼠乳腺癌模型,阐明三七总皂苷抗乳

腺癌的可能作用机制,为三七总皂苷的临床推广应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 三七总皂苷,由山西普德药业股份有限公司提供,批号HB2016109,纯度98%。

1.2 动物与细胞 SPF级BALB/c雌性裸鼠,6周龄,体质量(20±2)g,广州中医药大学实验动物中心提供,本研究已经通过广州中医药大学动物实验伦理委员会通过,合格证号SCXK(粤)2018-0016。小鼠4T1乳腺癌细胞,购于中国科学院上海细胞库,传代至第5代。

1.3 试剂 DMEM培养基,热灭活胎牛血清(FBS),胰蛋白酶-EDTA混合消化液,磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2),实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒,蛋白免疫印迹法(Western blot)ECL化学发光试剂盒,BCA蛋白含量检测试剂盒,蛋白酶抑制剂,聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒(广州晶欣生物科技有限公司,批号分别为WBKLS52328, WBKLS26832, WBKLS52339, ISEQ00812, CSB-E08324r, CSB-E08453r, WBKLS06157, WBKLS05890, WBKLS22554);末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(德国Sigma公司,批号HGEB45214);蛋白Marker(美国CST公司,批

号 VSXHJKLas2589); 兔抗小鼠 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体, 兔抗小鼠 MEKK1 抗体, 兔抗小鼠 SEK1 抗体, 兔抗小鼠 JNK1 抗体, 兔抗小鼠 c-Jun 抗体 (广州欧慕生物科技有限公司, 批号分别为 GGSKCqwes6623, GGSKCqwes1326, GGSKCqwes9825, GGSKCqwes6423, GGSKCqwes6887); 基因特异性引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, 见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CCTCTATGCCAACACAGTGC	191
	下游 ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	
MEKK1	上游 AGGTTGGCATCAAAAGGAAC	198
	下游 GGCGAGATGATTGGAGTGT	
SEK1	上游 GGAGTTTGGGGATCACATTG	196
	下游 GGCCTTTTGGATTCATCCTT	
JNK1	上游 GCAGTTAGATGAGAGGGAGCA	200
	下游 TCGGATCTGTGGACATTGAA	
AP-1	上游 ACGACCTTCTACGACGATGC	110
	下游 GCCAGGTTCAAGGTCATGCT	

1.4 仪器 CO₂培养箱(日本 Sanyo 公司); BT25S 型电子天平(德国 Sartorius 公司); CM1850 型冰冻切片机(美国 Leica 公司); Dounce 型匀浆器(美国 Wheaton 公司); IX81 型显微镜(日本 Olympus 公司); CS-15R 型冷冻离心机(美国 Beckman 公司); DYY-6C 型 Western blot 及转膜设备(北京六一生物科技有限公司); Odyssey Clx 型双色红外激光发光仪(美国 Licor 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统和成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 小鼠乳腺癌模型及分组给药 将4T1小鼠乳腺癌细胞株培养于10%FBS的DMEM培养基中,置于37℃,5%CO₂培养箱培养。取贴壁生长的对数期细胞,用含0.02% EDTA的0.25%胰蛋白酶将细胞消化并吹打成细胞悬液,PBS洗涤2遍,弃上清液,用无菌PBS溶液稀释,调整细胞密度为1×10⁷个/mL。60只裸鼠分为12只作为正常组,48只裸鼠用于造模。正常组小鼠,用1 mL无菌注射器抽取生理盐水0.1 mL接种于小鼠胸部皮下脂肪垫。其余48只裸鼠,用1 mL无菌注射器抽取上述密度细胞0.1 mL(约1×10⁶个)接种于小鼠胸部皮下脂肪垫,建立荷瘤小鼠模型,以造模后第5天小鼠接种部位可触摸到结节为造模成功标准^[13],48只裸

鼠全部成瘤,成瘤率100%。造模小鼠随机分为模型组、三七总皂苷低、中、高剂量组4组,每组12只,根据人与小鼠等效剂量折算方法^[14]确定各组给药剂量分别为10,20,40 mg·kg⁻¹。三七总皂苷组腹腔注射剂量为10 mL·kg⁻¹,模型组给予相同剂量生理盐水。自造模后第2天,每天用药1次,连续给药28 d。末次给药当晚禁食,第29天脱颈处死小鼠,无菌剥离肿瘤组织、称质量、迅速包埋、冻存。

2.2 各组肿瘤组织称质量并计算抑瘤率 脱颈处死小鼠后,剥离肿瘤瘤块,称取各组小鼠肿瘤质量,记录各组小鼠肿瘤组织平均质量。

2.3 TUNEL染色检测乳腺癌细胞凋亡水平 剥离肿瘤组织后,用无水乙醇和干冰速冻、包埋,制备厚度约7 μm的冰冻切片,然后用新鲜配置的4%多聚甲醛在室温下固定20 min,用PBS浸洗30 min,用0.1% Triton-X-100冰上透膜2 min,再用PBS洗涤2次后加入TUNEL反应混合液50 μL,在37℃下避光孵育1 h,PBS洗涤2次后滴加 Antifade Mountant with DAPI染液复染细胞核,封片,在荧光显微镜下观察肿瘤组织细胞的凋亡情况,随机取每张切片5个不重复视野计数凋亡细胞数目,取平均值。

2.4 Western blot检测乳腺癌组织中MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1蛋白表达 取冻存肿瘤组织,剪碎后加入RIPA裂解液400 μL,于Dounce匀浆器冰上充分匀浆,转移至离心管内,在4℃,12 000 r·min⁻¹离心5 min,测定上清液总蛋白的浓度。取蛋白80 μg经8% SDS-PAGE凝胶电泳分离后将蛋白转印至PVDF膜,然后用TBST溶液漂洗,用5%脱脂奶粉室温下封闭1 h,TBST再次洗涤,在4℃下分别加入兔抗小鼠MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1, β -actin单克隆抗体(1:1 000)孵育过夜,用TBST溶液清洗3次,分别加入Alexafluor488标记驴抗兔抗体(1:1万),Cy3标记驴抗兔抗体(1:1万),室温避光孵育1 h,再次用TBST溶液洗涤,膜晾干后于双色红外激光系统发光显色。采用软件Image J分析各蛋白条带的灰度值,以 β -actin作为内参比较各组间蛋白相对表达量变化。

2.5 Real-time PCR检测相关mRNA表达 取冻存肿瘤组织100 mg,剪碎后放于匀浆器外筒,加入trizol溶液1 mL,于冰上充分研磨组织成匀浆,提取总RNA,使用紫外分光光度计测量总RNA的纯度和浓度,按照Thermo公司的RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书将上述提取的总RNA逆转录为cDNA第一链,配置PCR反应体系

20 μL (SYBR 荧光染料 10 μL , MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA, 内参 β -actin 上游引物, 下游引物各 2 μL , cDNA 模板 4 μL , 无核酸酶水 2 μL), 用 PCR 进行引物扩增(扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环), 于 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 生成溶解曲线, 每个基因设置 3 个复孔, 以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算, 分析各目的基因 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 的相对表达量。

2.6 统计学分析 实验数据采用 SPSS 25.0 软件分析, 符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠瘤质量的影响 与正常组比较, 模型组的肿瘤质量明显增加 ($P < 0.05$), 表明造模成功; 与模型组比较, 三七总皂苷中、高剂量组的肿瘤质量明显减少 ($P < 0.05$); 三七总皂苷高剂量组较低、中剂量组肿瘤质量明显减少 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡细胞数量的影响 与正常组比较, 模型组凋亡细胞数量明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 三七总皂苷低、中、高剂量组的凋亡细胞数量明显增加 ($P < 0.05$); 与三七总皂苷低剂量组比较, 三七总皂苷

表 2 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Panax Notoginseng Saponins on tumor weight of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤质量/g
正常	-	0.13 \pm 0.01
模型	-	0.42 \pm 0.04 ¹⁾
三七总皂苷	10	0.38 \pm 0.03
	20	0.33 \pm 0.02 ²⁾
	40	0.21 \pm 0.02 ^{2,3,4)}

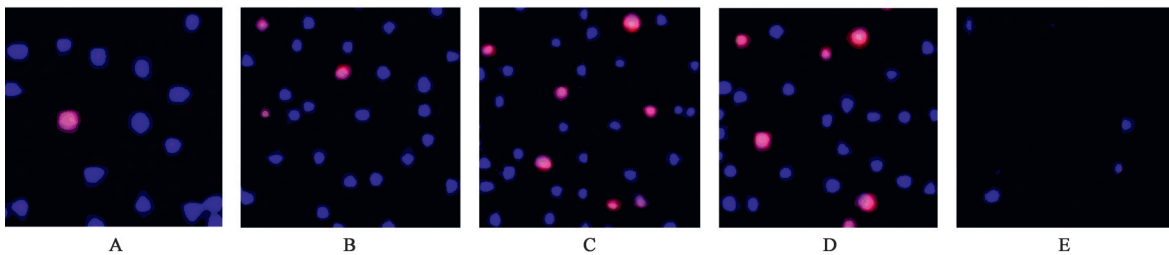
注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与三七总皂苷低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$; 与三七总皂苷中剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 3~5 同)。

中、高剂量组的凋亡细胞数量明显增加 ($P < 0.05$); 和三七总皂苷中剂量组比较, 三七总皂苷高剂量组的凋亡细胞数量明显增加 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 1。

表 3 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of Panax Notoginseng Saponins on number of apoptotic cells in tumor tissues of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	细胞凋亡数目/个/ mm^2
正常	-	45.21 \pm 16.82
模型	-	215.64 \pm 26.33 ¹⁾
三七总皂苷	10	344.22 \pm 41.75 ²⁾
	20	427.72 \pm 45.13 ^{2,3)}
	40	506.33 \pm 71.68 ^{2,3,4)}



A. 模型组; B~D. 三七总皂苷低、中、高剂量组; E. 正常组(图 2 同)

图 1 三七总皂苷对小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响(TUNEL, $\times 400$)

Fig. 1 Apoptosis condition in tumor issue cells of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice(TUNEL, $\times 400$)

3.3 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 三七总皂苷中、高剂量组 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$)。和三七总皂苷低剂量组比较, 三七总皂苷高剂量组 MEKK1, SEK1, AP-1 蛋白表达量明显增加 ($P < 0.05$); 和三七总皂苷中剂量组比较, 高剂量组 AP-1 蛋白表达量增加明显 ($P <$

0.05)。见表 4, 图 2。

3.4 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 MEKK1, SEK1, JNK1 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 三七总皂苷中、高剂量组 MEKK1, SEK1, JNK1 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$)。与三七总皂苷低剂量组比较, 三七总皂苷高剂量组 MEKK1, SEK1, JNK1 mRNA 表达量增加明显 ($P < 0.05$)。与三七总皂苷中

表 4 PNS 对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 4 Effect of Panax Notoginseng Saponins on expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 in tumor tissues of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MEKK1/β-actin	SEK1/β-actin	JNK1/β-actin	AP-1/β-actin
正常	-	0.147±0.032	0.084±0.013	0.103±0.021	0.095±0.024
模型	-	0.365±0.082 ¹⁾	0.220±0.032 ¹⁾	0.454±0.067 ¹⁾	0.522±0.067 ¹⁾
三七总皂苷	10	0.489±0.061	0.321±0.063	0.612±0.083	0.683±0.038
	20	0.682±0.088 ²⁾	0.499±0.106 ²⁾	0.794±0.062 ²⁾	0.781±0.084 ²⁾
	40	0.793±0.059 ^{2,3)}	0.625±0.093 ^{2,3)}	0.816±0.074 ²⁾	0.969±0.072 ^{2,3,4)}

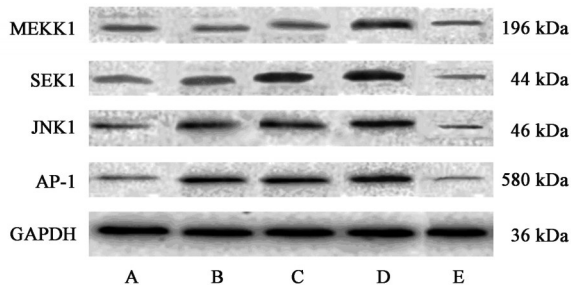


图 2 各组小鼠肿瘤组织 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 in tumor tissues of each group

剂量组比较,高剂量组 AP-1 mRNA 表达量增加明显 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 三七总皂苷对 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Effect of Panax Notoginseng Saponins on mRNA expressions of MEKK1, SEK1, JNK1 and AP-1 in tumor tissues of breast cancer cell line 4T1 in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MEKK1	SEK1	JNK1	AP-1
正常	-	0.346±0.024	0.632±0.012	0.553±0.037	0.324±0.152
模型	-	1.048±0.036 ¹⁾	1.032±0.024 ¹⁾	1.068±0.062 ¹⁾	1.589±0.234 ¹⁾
三七总皂苷	10	1.421±0.076	1.284±0.016	1.350±0.048	2.323±0.144
	20	1.667±0.069 ²⁾	1.620±0.013 ²⁾	1.852±0.043 ²⁾	3.256±0.285 ²⁾
	40	1.846±0.082 ^{2,3)}	2.073±0.024 ^{2,3)}	2.274±0.106 ^{2,3)}	4.988±0.411 ^{2,3,4)}

发现,三七总皂苷能下调肿瘤细胞周期蛋白、抑制肿瘤细胞增殖、改变肿瘤微环境、激发和增强机体免疫力等进而达到防治肿瘤的效果^[17]。也有研究显示,三七总皂苷可能通过下调 miRNA-21 表达进而减缓大鼠乳腺癌变进程。但目前三七总皂苷防治乳腺癌的研究仍不充分,机制尚未明确,故本研究利用 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤模型,观察三七总皂苷对乳腺癌小鼠 MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 通路的影响,以进一步探讨其可能存在的作用机制^[18]。

MEKK1 基因定位于 5q11.2,是 MAPK 信号通路中的丝氨酸/苏氨酸激酶,其通过磷酸化下游信

4 讨论

乳腺癌是由乳房组织发展成的癌症,其发生、发展为多基因共同作用的结果,原癌基因和抑癌基因的突变和异常扩增是正常细胞转化为肿瘤细胞的主因^[13]。乳腺癌作为女性最常见的癌症,近年来发病率呈上升趋势,其死亡率仍占全球女性癌症的首位^[14],是全人类共同关注的健康问题。目前,乳腺癌的临床和理论研究取得了很大的进展,但在乳腺癌治疗方面,西医尚无特效根治方法^[15-16]。而近年研究已证明中医药辨证治疗本病的临床疗效及独特优势但其有效抑制乳腺癌进展的分子生物学机制更待进一步研究。三七总皂苷是中药三七的有效成分,具有活血化瘀、通脉活络的功效。研究

号,激活其他蛋白激酶和调控转录因子,使特定基因活化,介导细胞生长、分化、凋亡等生物学行为^[19]。作为 MEKK1 下游激酶,SEK1 通过依次磷酸化酪氨酸,丝氨酸残基来激活 JNK1,将细胞外刺激信号转导至细胞及细胞核内,并激活转录因子 AP-1 介导细胞的生物学反应^[20]。

作为 T 细胞受体信号 TCR 通路的重要组成部分,MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1 信号通路的激活能促进 T 细胞凋亡^[21-23]。有研究发现敲除小鼠 MEKK1 基因可使其肝脏、脾脏中的 NKT 细胞,CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞增多,这与 MEKK1 促进 T 细胞的凋

亡相关^[24]。本实验研究发现三七总皂苷可增加4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤组织凋亡的细胞数量,且呈剂量依赖性;MEKK1在三七总皂苷中、高剂量组的mRNA表达水平及其蛋白表达显著上调,说明了三七总皂苷诱导乳腺癌细胞凋亡。此外,激活MEKK1可促进SEK1的活化^[25]。而SEK1的活化可通过激活JNK1以调节JUN凋亡信号通路,并使其下游核转录因子AP-1活化^[26],活化后的AP-1可与T细胞核内的DNA结合并促进凋亡相关基因转录,最终使一系列凋亡蛋白如FasL, Bam, P53, TNF等表达,进而诱导肿瘤细胞凋亡^[27-28]。且本实验研究结果显示三七总皂苷中,高剂量组肿瘤组织中MEKK1, SEK1, JNK1, AP-1 mRNA表达水平及其蛋白表达明显上调,而三七总皂苷低剂量组则无明显增加,说明了三七总皂苷可能通过MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1信号通路诱导乳腺癌细胞凋亡以抑制肿瘤生长。

综上所述,本研究通过PNS治疗4T1乳腺癌荷瘤小鼠后,三七总皂苷对4T1乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤模型有抑制作用,其机制与MEKK1/SEK1/JNK1/AP-1信号通路有关,促进了肿瘤细胞的凋亡,进而抑制肿瘤的生长,为三七总皂苷抗乳腺癌的进一步临床和实验研究提供依据。

[参考文献]

- [1] GHONCHEH M, POURNAMDAR Z, SALEHINIYA H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(S3): 43-46.
- [2] 陈敬贤, 林国珍. 乳腺癌伴焦虑抑郁的中西医治疗研究[J]. *吉林中医药*, 2012, 32(12):1225-1227.
- [3] 张波, 徐继宗, 屈有山, 等. 自拟中药扶正散结方联合化疗对乳腺癌的治疗效果观察及对生存质量的影响[J]. *中国中医药科技*, 2020, 27(1):67-69.
- [4] HUANG J W, DU Y Q, LI C J, et al. Neuroprotective triterpene saponins from the leaves of *Panax notoginseng* [J]. *Nat Prod Res*, 2019, doi: 10.1080/14786419.2019.1677657.
- [5] 李青融, 王子好. 三七总皂苷药理作用的研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(9):216-218.
- [6] HE N W, ZHAO Y, GUO L, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic activities of a saponin extract derived from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen [J]. *J Med Food*, 2012, 15(4):350-359.
- [7] YANG Q B, WANG P W, CUI J G, et al. *Panax*

notoginseng saponins attenuate lung cancer growth in part through modulating the level of Met/miR-222 axis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, doi: 10.1016/j.jep.2016.08.040.

- [8] WU Q, DENG J J, FAN D D, et al. Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.004.
- [9] 刘玫君, 陈勇, 庞丹清, 等. 三七多糖研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(7):137-140.
- [10] THULASI D K, LI X, ZHANG Y. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(16):2981-2989.
- [11] 江一鸣, 苏亮, 徐钰, 等. 西黄丸调节MEKK1/SEK1通路抑制小鼠乳腺癌生长机制研究[J]. *现代中药研究与实践*, 2019, 33(1):24-29.
- [12] 董宏丹. 苦参碱对荷4T1小鼠乳腺癌肿瘤模型JNK1/AP-1信号通路的影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2019, 21(11):64-68.
- [13] 苏亮, 江一鸣, 李新叶, 等. 西黄丸调节JNK1/AP-1通路抑制荷4T1小鼠乳腺癌细胞生长[J]. *药物评价研究*, 2018, 41(2):189-193.
- [14] 章元沛. 药理实验方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 1996, 238.
- [15] 王宁, 刘硕, 杨雷, 等. 2018全球癌症统计报告解读[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2019, 5(1):87-97.
- [16] 曾召琼, 易帆, 李萍, 等. 中医药防治乳腺癌的研究进展[J]. *中医药导报*, 2019, 25(23):109-111.
- [17] 杨松, 洪勇. 三七总皂苷与乳腺癌治疗[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(9):1454-1457.
- [18] 杨泽娟, 张宏, 黄水才, 等. 三七总皂苷对大鼠乳腺癌变进程及miRNA-21表达影响的研究[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(13):1-3.
- [19] MATSUI K, XIAO S, FINE A, et al. Role of activator protein-1 in TCR-mediated regulation of the murine FasL promoter [J]. *J Immunol*, 2000, 164(6): 3002-3008.
- [20] BLONSKA M, LIN X. CARMA1-mediated NF-kappaB and JNK activation in lymphocytes [J]. *Immunol Rev*, 2009, 228(1):199-211.
- [21] ENZLER T, CHANG X, FACCHINETTI V, et al. MEKK1 binds HECT E3 ligase Itch by its amino-terminal RING motif to regulate Th2 cytokine gene expression [J]. *J Immunol*, 2009, 183(6): 3831-3838.
- [22] SUDDASON T, ANWAR S, CHARLAFTIS N, et

- al. T-cell-specific deletion of Map3k1 reveals the critical role for Mekk1 and Jnks in Cdkn1b-dependent proliferative expansion [J]. *Cell Rep*, 2016, 14(3): 449-457.
- [23] OWEN G R, ACHILONU I, DIRR H W. High yield purification of JNK1 β_1 and activation by in vitro reconstitution of the MEKK1 \rightarrow MKK4 \rightarrow JNK MAPK phosphorylation cascade [J]. *Protein Expr Purif*, 2013, 87(2):87-99.
- [24] 王一尧,任征远,焦战,等. 西黄丸对肿瘤迁移微环境的影响[J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(4):11-13.
- [25] ZHOU Z W, LU X J, WANG J, et al. microRNA let-7c is essential for the anisomycin-elicited apoptosis in Jurkat T cells by linking JNK1/2 to AP-1/STAT1/STAT3 signaling [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep24434.
- [26] BAUMANN S, HESS J, EICHHORST S T, et al. An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22(9): 1333-1339.
- [27] 鲁明骞,许新华. MKK4与恶性肿瘤相关性的研究进展[J]. *山东医药*, 2011, 51(19):110-111.
- [28] RAMAN M, CHEN W, COBB M H. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22):3100-3112.

[责任编辑 张丰丰]