

· 药理 ·

阳和汤对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡 Egr1/p21 信号通路的影响

李康乐¹, 杨小蓓¹, 张愉², 杨硕³, 朱中博³, 窦建卫^{1*}

(1. 西安交通大学药学院, 西安 710061; 2. 西安交通大学第二附属医院, 西安 710004;
3. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 以早期生长反应基因 1(Egr1)/细胞周期蛋白依赖性抑制剂(p21)信号通路为基础,探讨古方阳和汤含药血清对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡的影响。**方法:** 制备阳和汤大鼠含药血清,体外培养三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞。设空白组,阳和汤高、中、低剂量组(23.4, 11.7, 5.85 g·kg⁻¹),分别干预 MDA-MB-231 细胞 24, 48, 72 h, 细胞增殖检测(CCK-8)法检测各组细胞增殖情况。设空白组,阳和汤高、中、低剂量组(23.4, 11.7, 5.85 g·kg⁻¹),干预 MDA-MB-231 细胞 48 h,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况以及细胞周期分布情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组细胞 Egr1, p21 mRNA 的表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞 Egr1, p21 蛋白的表达情况。**结果:** 阳和汤干预 MDA-MB-231 细胞 24, 48, 72 h, 与空白组相比,阳和汤高、中剂量组能显著抑制 MDA-MB-231 细胞增殖($P < 0.01$)。阳和汤干预 MDA-MB-231 细胞 48 h, 与空白组相比,阳和汤高、中剂量组细胞的凋亡率明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳和汤高、中剂量组细胞周期 G₀/G₁ 期所占比例降低, G₂/M 期所占比例升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);阳和汤高、中剂量组细胞 Egr1, p21 mRNA 和蛋白表达均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** 阳和汤可激活 MDA-MB-231 细胞中 Egr1/p21 信号通路,增加 Egr1, p21 的表达,引起 G₂/M 细胞周期阻滞,从而诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。

[关键词] 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 阳和汤; 早期生长反应基因 1(Egr1); 细胞周期蛋白依赖性抑制剂(p21)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0062-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200424

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191104.0933.001.html>

[网络出版时间] 2019-11-04 10:45

Effect of Yanghetang on Apoptosis of Triple Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 Based on Egr1/p21 Signaling Pathway

LI Kang-le¹, YANG Xiao-qian¹, ZHANG Yu², YANG Shuo³, ZHU Zhong-bo³, DOU Jian-wei^{1*}

(1. College of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

3. College of Basic Medical Sciences, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ancient recipe Yanghetang and its drug-contained serum on apoptosis of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 based on the signal pathway of early growth response gene 1(Egr1)/cyclin dependent inhibitor(p21). **Method:** The drug-containing serum of Yanghetang was prepared from rats, and MDA-MB-231 cells were cultured *in vitro*. The blank control group was set, and MDA-

[收稿日期] 20190708(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573983, 81873311);陕西省中医药管理局科研课题项目(2019-ZZ-JC029);西安市中医药科研项目(SZJ201709);西安市中医院课题项目(YJ201915)

[第一作者] 李康乐,在读硕士,从事中药药效学研究, E-mail:likangle1993624@163.com

[通信作者] * 窦建卫,博士,副教授,从事中药复方药效物质基础研究, E-mail:djw@mail.xjtu.edu.cn

MB-231 cells in Yanghetang high, middle, and low dose groups (23.4, 11.7, 5.85 g · kg⁻¹) were intervened for 24, 48, 72 h, respectively. After that, the cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the cell proliferation of each group. The blank control group was set, while MDA-MB-231 cells in Yanghetang high, middle, and low dose groups (23.4, 11.7, 5.85 g · kg⁻¹) were treated for 48 h, and then flow cytometry was used to detect the apoptosis of each group and the distribution of cell cycle. The expression of Egr1 and p21 mRNA in each group was detected by quantificational Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR), while the expression of Egr1 and p21 protein in each group was detected by Western blot. **Result:** After MDA-MB-231 cells were intervened by Yanghetang for 24, 48, 72 h, MDA-MB-231 cell proliferation was significantly inhibited in Yanghetang high and middle dose groups as compared with the blank control group ($P < 0.01$). After MDA-MB-231 cells were intervened by Yanghetang for 48 h, the apoptosis was significantly increased in Yanghetang high and middle dose groups as compared with the blank control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the Yanghetang high, middle dose groups, the proportion of cell cycle G₀/G₁ phase decreased, and the proportion of G₂/M phase increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mRNA and protein expressions of Egr1, p21 were increased in Yanghetang high and middle groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yanghetang can activate Egr1/p21 signaling pathway in MDA-MB-231 cells, increase the expression of Egr1 and p21, and cause G₂/M cell cycle arrest, thereby inducing apoptosis of MDA-MB-231 cells.

[**Key words**] triple negative breast cancer; MDA-MB-231 cells; Yanghetang; early growth response gene 1 (Egr1); cyclin dependent inhibitor (p21)

乳腺癌可以分为 Luminal A, Luminal B, HER2⁻/HER2⁺ 和三阴性 4 种类型^[1-2]。其中三阴性乳腺癌(TNBC)虽然在乳腺癌患者中占很少的比例,约占全部乳腺癌患者中的 10% ~ 14%^[3-4],但因其缺少雌激素受体、孕激素受体、人类表皮生长因子受体-2,具有强转移性和侵袭性以及缺乏靶向治疗等特点决定了 TNBC 患者 5 年内生存率较低,预后效果较差,目前临床上尚无有效的治疗方法^[5-8]。阳和汤出自清代王维德《外科证治全生集》,方由鹿角胶、麻黄、肉桂、白芥子、熟地黄、姜炭、甘草片等组成。现代临床研究结果表明,阳和汤用于乳腺癌及其并发症临床疗效确切^[9-10],阳和汤用诸临床,在治疗乳腺癌、乳腺癌骨转移、乳腺癌术后并发症以及乳腺癌术后放化疗期间(或后)的综合治疗中,能够改善机体免疫状态,增强放化疗疗效,减少放化疗毒副作用,降低复发转移率,提高生活质量和延长生命。本课题组此前研究发现,阳和汤对人乳腺癌裸鼠移植瘤具有显著抑瘤作用,能显著抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生长,诱导细胞凋亡,显著下调核转录因子- κ B(NF- κ B),白细胞介素(IL)-6,IL-8,趋化因子配体 1(CXCL1)等表达水平。国外最新研究发现,早期生长反应基因 1(Egr1)/细胞周期蛋白依赖性抑制剂(p21)信号通路在癌细胞的凋亡过程中发挥了关键作用。Egr1 即早期生长反应基因是一种能够抑制癌症发生发展的基因,其异常与许多肿瘤

的发生发展密切相关。直接调节多种生物过程,如细胞修复,血管生成,免疫反应,细胞周期,细胞凋亡等^[11-12]。p21 是位于 Egr1 下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子,其功能在于诱导细胞周期阻滞,有研究发现 p21 可以被上游的 Egr1 直接激活发挥作用^[13-14]。本次研究在 Egr1/p21 信号通路的基础上展开,通过阳和汤含药血清体外干预人 TNBC MDA-MB-231 细胞,探索阳和汤对人 TNBC 细胞凋亡的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 细胞株及动物 三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司(货号 CL-0150,第 4 代)。SPF 级雌性 SD 品系大鼠,体质量 180 ~ 220 g 购于西安交通大学医学部实验动物中心,合格证号 SCXK(陕)2017-0003。符合西安交通大学医学部生物医学伦理委员会指导原则与要求(批号 2018-191)。动物食水自由,食固体饲料,室温 18 ~ 20 °C,相对湿度 60% ~ 70%,12 h/12 h 光照黑暗循环。

1.2 药品及试剂 实验所需阳和汤处方中药材均购买自北京同仁堂(西安阳明国际店)。药品经西安交通大学药学院窦建卫副教授按照 2015 年版《中国药典》一部进行鉴定,均为正品,且药材形态色泽均正常。DMEM 培养基,青霉素-链霉素,0.25% 胰酶(美国 Hyclone 公司,批号分别为 J180009,15140-

122, AD21573271); 细胞增殖与毒性检测 (CCK-8) 试剂盒 (中国上海七海复泰生物科技有限公司, 批号 20160406); Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) (中国江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号 20190114); RNAiso Plus (日本 Takara 公司, 批号 9108); RNA 逆转录试剂盒 (北京康润诚业生物科技有限公司, 批号 8BC01); Egr1, p21, β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号分别为 4154T, 2947T, 4970T)。

1.3 仪器 facscaliburTM 型流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司); PowerPacTM 型电泳仪电源, Trans-blot 型转印槽, CFX ConnectTM 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Centrifuge 5424R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 1510 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DS-11 型超微量分光光度计 (中国倍辉科技有限公司); ECLIPSE Ts2 型倒置显微镜 (日本尼康公司); Genegnome XRQ 型专业化学发光成像系统 (中国基因有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 培养基组成为 90% DMEM 基础培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 的青霉素-链霉素, 混合均匀即为完全培养基。MDA-MB-231 细胞复苏或传代后, 每培养瓶 (25 cm²) 中加完全培养基 4 mL, 放置 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验, 设空白组、阳和汤含药血清高、中、低剂量组。

2.2 含药血清的制备 成年人质量按 60 kg 计算, 阳和汤成人用量为 1.17 g·kg⁻¹, 动物药理实验取成人用量的 20, 10, 5 倍作为高、中、低剂量组^[15], 即含生药 23.4, 11.7, 5.85 g·kg⁻¹。大鼠每次灌胃体积为 10 mL·kg⁻¹。每天早晚各给药 1 次, 连续给药 7 d, 之后进行麻醉腹主动脉取血。收集血清, 血清灭活, -80 °C 冻存备用。

2.3 细胞增殖检测 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞, 胰酶消化, 收集细胞, 加入培养基配制成细胞悬浮液; 计数, 调整细胞密度为 2.5 × 10⁴ 个/mL, 接种 96 孔板中, 96 孔板边缘孔不设实验孔, 边缘孔全部加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 溶液, 防止实验组培养基的蒸发。每组 3 个复孔, 细胞接种后, 在细胞培养箱中培养过夜, 让细胞贴壁。贴壁后, 进行药物干预, 将培养基换成含 10% 含药血清的培养基, 细胞培养箱中培养 24 h。然后每孔加入 CCK-8 试剂 20 μ L, 培养箱中继续培养 4 h; 从培养箱中取出, 放

置酶标仪中, 振荡 1 min, 在 450 nm 波长下进行检测吸光度 A, 并计算细胞抑制率。重复上述步骤, 药物干预时间改变为 48, 72 h, 检测 A, 计算细胞抑制率。

2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 用不同剂量的阳和汤含药血清及不含药血清进行干预, 干预 48 h, 用胰酶 (无 EDTA) 消化, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞; 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 800 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集离心管底部细胞; 加入 Binding Buffer 400 μ L, 将 2 次收集的细胞制备成细胞悬液; 向细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 5 μ L, 轻轻混匀, 室温条件, 避光孵育 15 min; 再向其中加入 PI 染色剂 10 μ L, 混匀, 避光冰浴 5 min; 在 0.5 h 内用流式细胞仪进行凋亡检测。

2.5 流式细胞仪检测细胞周期分布 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 用阳和汤高中低剂量含药血清及不含药血清进行干预, 干预时间为 48 h, PBS 洗涤 2 次, 0.25% 胰酶消化, 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 收集细胞, 加 PBS 调整细胞密度为 1 × 10⁶ 个/mL, 取细胞悬液 1 mL, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加入 70% 预冷乙醇 500 μ L 固定, 4 °C 过夜; 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃固定液, 加 RNase A + PI 500 μ L, 混匀, 4 °C 避光放置 0.5 h; 上机检测。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Egr1, p21 蛋白表达 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 接种到 5 cm 培养皿中, 每皿 5 × 10⁶ 个细胞, 培养 24 h, 弃培养基。用阳和汤高中低剂量含药血清及不含药血清进行干预 48 h, 弃培养基, 消化离心, 洗涤 2 次, 收集细胞, 按蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。随后, 每孔上样量为 20 μ g, SDS-PAGE 电泳。电泳后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉 PBST 溶液封闭、过夜。次日, 加入一抗 (1:1 000), 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 5 次, 加入二抗, 室温孵育 2 h, 避光加入 ECL 发光液, 显影。 β -actin 为参照蛋白。

2.7 Real-time PCR 检测 Egr1, p21 mRNA 表达 从细胞培养箱中取出含药血清干预过的细胞, PBS 溶液洗涤 2 遍, 然后弃掉 PBS; 按总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。取 RNA 样品少量, 用核酸浓度测量仪测定其的浓度和纯度。测定结果显示样品 A₂₆₀/A₂₈₀ 均在 1.8 ~ 2.1, 符合样品纯度要求。各样品取 RNA 1 μ g, 与 5 × PrimerScript RT Master Mix, 无 RNase 水组成 10 μ L 反应体系, 轻摇混合均匀后进行反转录操作, 反应条件: 37 °C, 反转录反应 15 min;

85 ℃, 反转录酶的失活反应 5 s, 反转录产物 cDNA 保存于 -20 ℃ 冰箱。PCR 反应条件: 95 ℃ 10 min, 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环, 应用 Thermal Cycler Dice Real Time System 扩增仪, 检测目的基因的相对表达, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 相对表达量。引物序列由宝生物工程大连有限公司合成, 见表 1。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析, 若数据符合正态分布, 采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据不符合正态分布, 采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 阳和汤含药血清对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 与空白组比较, 干预 24 h, 阳和汤高剂量组有

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CATGGAGTCTCTGGCATC	157
	下游 CAGGGCAGTGATCTCCTTCT	
Egr1	上游 TGACCGCAGAGTCTTTTCCT	236
	下游 GATGAGCTGGGACTGGTAGC	
p21	上游 ATTACAGCATTGTGGGAGGAG	131
	下游 TGGACTGTTTTCTCTCGGCT	

明显的抑制细胞作用 ($P < 0.05$); 干预 48 h, 阳和汤高、中、低剂量能够起到抑制 MDA-MB-231 细胞的作用 ($P < 0.05, P < 0.01$); 干预 72 h, 阳和汤高、中、低剂量能显著抑制细胞增殖 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 阳和汤对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Table 2 Effect of Yanghetang on proliferation of MDA-MB-231 cells

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		A($\bar{x} \pm s, n=3$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s, n=3$)	抑制率/%	A($\bar{x} \pm s, n=3$)	抑制率/%
空白	-	1.379 ± 0.051	-	1.328 ± 0.089	-	1.362 ± 0.043	-
阳和汤	23.4	0.698 ± 0.042 ¹⁾	49.38	0.389 ± 0.035 ²⁾	70.70	0.183 ± 0.023 ²⁾	86.56
	11.7	0.948 ± 0.061	31.25	0.649 ± 0.031 ¹⁾	51.13	0.445 ± 0.017 ²⁾	67.33
	5.85	1.224 ± 0.044	11.24	0.936 ± 0.072 ¹⁾	29.52	0.713 ± 0.086 ²⁾	47.65

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

3.2 阳和汤含药血清对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 与空白组比较, 阳和汤能够对目标细胞起到凋亡诱导作用, 阳和汤高、中剂量组细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且阳和汤高剂量效果最好, 提示阳和汤含药血清能够诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡。见表 3。

表 3 阳和汤对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
空白	-	2.13 ± 1.02
阳和汤	23.4	24.10 ± 1.13 ²⁾
	11.7	16.20 ± 1.21 ¹⁾
	5.85	5.71 ± 1.05

3.3 阳和汤含药血清对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 干预 48 h, 与空白组比较, 阳和汤高、中剂量组 G₀/G₁ 期细胞明显降低 ($P < 0.05$); 阳和汤高、中、低剂量组 G₂/M 期细胞明显增高 ($P < 0.05, P <$

0.01)。见表 4。

表 4 阳和汤对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Yanghetang on MDA-MB-231 cell cycle ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期
空白	-	75.41 ± 1.97	18.03 ± 1.02	6.56 ± 1.05
阳和汤	23.4	52.94 ± 1.88 ¹⁾	20.81 ± 1.21	26.25 ± 1.55 ²⁾
	11.7	61.11 ± 2.01 ¹⁾	19.53 ± 1.37	19.36 ± 1.67 ¹⁾
	5.85	69.89 ± 1.54	20.26 ± 2.12	9.85 ± 1.56 ¹⁾

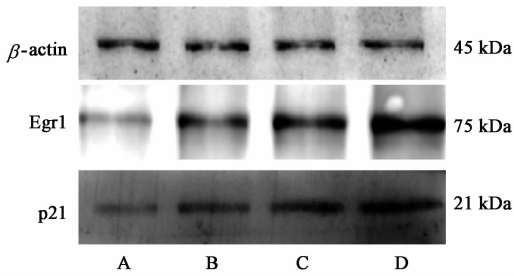
3.4 阳和汤含药血清对 MDA-MB-231 细胞 Egr1, p21 蛋白表达的影响 干预 48 h, 与空白组比较, 阳和汤高、中剂量组 Egr1, p21 蛋白表达均明显增多 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5, 图 1。

3.5 阳和汤含药血清对 MDA-MB-231 细胞 Egr1, p21 mRNA 表达的影响 干预 48 h, 与空白组比较, 阳和汤高、中、低剂量组 Egr1, p21 mRNA 表达均明显增多 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

表 5 阳和汤对 MDA-MB-231 细胞中 Egr1, p21 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Yanghetang on expression of Egr1, p21 proteins in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Egr1/ β -actin	p21/ β -actin
空白	-	0.304 ± 0.011	0.325 ± 0.017
阳和汤	23.4	1.573 ± 0.024 ²⁾	1.286 ± 0.013 ²⁾
	11.7	1.215 ± 0.046 ¹⁾	1.035 ± 0.033 ¹⁾
	5.85	0.853 ± 0.025	0.649 ± 0.012



A. 空白组; B. 阳和汤低剂量组; C. 阳和汤中剂量组; D. 阳和汤高剂量组

图 1 阳和汤作用 MDA-MB-231 细胞 Egr1, p21 蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of Yanghetang on expression of Egr1, p21 proteins in MDA-MB-231 cells

表 6 阳和汤对 MDA-MB-231 细胞中 Egr1, p21 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of Yanghetang on expression of Egr1, p21 mRNA in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Egr1	p21
空白	-	1.012 ± 0.080	1.079 ± 0.420
阳和汤	23.4	4.043 ± 0.381 ²⁾	3.895 ± 0.047 ²⁾
	11.7	2.521 ± 0.175 ²⁾	2.371 ± 0.216 ²⁾
	5.85	1.434 ± 0.236 ¹⁾	1.380 ± 0.115 ¹⁾

4 讨论

乳腺癌在全球女性恶性肿瘤中发病率和死亡率都是第 1 位,在中国女性恶性肿瘤当中,乳腺癌发病率位于第 1 位,死亡率位于第 5 位^[16]。目前,乳腺癌的治疗仍以手术为主,放、化疗等为辅,虽然能在一定程度上控制病情的发展,但疾病的高复发率及转移率大大影响着患者的生存质量与生存周期。中医药作为一种补充与替代疗法,目前治疗乳腺癌的各种方法中大多都配合中药的治疗。清·王维德在《外科证治全生集》中对“乳岩”即乳腺癌的发病及转归进行了详细的阐述,并根据治疗经验创立阳和汤。临床上辨证 TNBC 患者属阳虚寒凝者,多用温

阳散寒,化痰散结之法,可予以阳和汤方加减。现已有大量的实验对其抗癌机制进行研究。

阳和汤组方为肉桂、姜炭、熟地黄、麻黄、鹿角胶、甘草片、白芥子、土贝母等。王维德认为,乳岩之体,气血内耗,阴损及阳,痰凝血滞,其临床表现既虚且寒。阳和汤针对血虚阳伤之本,重用熟地黄温补营血,同时恐草木之品补力不足,加选血肉有情之鹿角胶,补髓养血益精,壮筋健骨,二药配伍,于“阴中求阳”,使阳得阴助,生化无穷,则温阳之功速达。且肾藏精主骨,肝藏血主筋,精血充足则肝肾旺,肝肾旺则筋骨强,附着于筋骨之寒邪则自驱。寒邪附于肌肉、筋骨及血脉之中,姜炭、肉桂、麻黄、白芥子等温热之品共用可驱散寒邪。综观本方,用熟地黄、姜炭、肉桂、鹿角以为温补之品,用麻黄以开腠理,用白芥子以消皮里膜外之痰;且熟地黄得麻黄则补血不腻膈,麻黄得熟地黄则通络而不发表,用治诸疽积块,如日光一照,使寒凝悉解,故有阳和之名。

越来越多的研究发现 Egr1 在许多恶性肿瘤中表达较少或不表达,外源性引入 Egr1 可以抑制相关癌细胞的生长;现代研究表明 Egr1 作为 p21 的上游介质,通过核转位与 p21 启动子位点结合上调 p21 的表达^[13-14]。本研究表明 Egr1 和 p21 是阳和汤诱导的三阴性乳腺癌细胞凋亡的关键信号分子。以往的研究表明, Egr1 通过下调下游靶基因,特别是那些参与细胞周期停滞和细胞凋亡的基因,如 p21,揭示了 Egr1 的肿瘤抑制功能^[17-19]。相关研究证明 Egr1 与 p21 相互作用是通过直接结合和反式激活 p21 启动子,促进促凋亡信号通路^[20]。此外,本研究证实 Egr1 在诱导细胞凋亡中发挥了重要作用。

研究表明,阳和汤可以抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖,引起 MDA-MB-231 细胞周期 G₂/M 期阻滞,诱导三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的凋亡。阳和汤含药血清干预 MDA-MB-231 细胞之后,与空白组比较,MDA-MB-231 中 Egr1 和 p21 的表达明显升高,表明阳和汤可以促进 MDA-MB-231 细胞中 Egr1 和 p21 的表达。因此,阳和汤治疗三阴性乳腺癌的作用机制可能是通过激活 Egr1/p21 信号通路,从而发挥抗癌的作用。

本实验从 Egr1/p21 信号通路阐述阳和汤治疗三阴性乳腺癌的分子生物学机制,为临床应用提供了一定的实验支持。但是,乳腺癌发病机制复杂,涉及多条通路、多靶点的共同作用,需要在进一步的实验中,探索新方法,进一步完善其生物学机制。

[参考文献]

- [1] 黄亮亮, 吕俊远, 唐应麒, 等. 乳腺癌分子分型与临床病理特征的相关性研究[J]. 重庆医学, 2019, 48(10): 1701-1704.
- [2] 卢振东, 孙晓晓, 谢龙祥, 等. 乳腺癌分子分型研究进展[J]. 河南大学学报: 医学版, 2018, 37(4): 229-233.
- [3] 吴小红, 杨嘉嘉, 罗宇飞, 等. 三阴性乳腺癌靶向信号通路最新研究进展[J]. 海峡药学, 2019, 31(4): 1-3.
- [4] 李云祥, 梁引库, 高飞雄, 等. 中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 211-219.
- [5] 吴雨洁, 刘敏, 高静东. 三阴性乳腺癌分子靶向治疗研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47(2): 217-220.
- [6] 陈锡康, 田华琴. 三阴性乳腺癌的治疗现状及进展[J]. 西部中医药, 2018, 31(11): 135-140.
- [7] 何建林, 梅振宇, 盛勇, 等. 三阴性乳腺癌新辅助治疗研究进展[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2018, 10(5): 330-332.
- [8] 窦建卫, 黄芊, 赵天一, 等. 阳和汤对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 NF- κ B、IL-8 表达的影响[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 44-47.
- [9] 付剑江, 刘婷, 墨啸箏, 等. 左归丸抗乳腺癌破骨性骨转移机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 123-127.
- [10] 李阳, 黄立中, 龚辉, 等. 加味阳和汤治疗乳腺癌骨转移的临床观察[J]. 中南药学, 2015, 13(10): 1105-1108.
- [11] YUAN L, MU P, HUANG B, et al. EGR1 is essential for deoxynivalenol-induced G₂/M cell cycle arrest in HepG2 cells via the ATF3 Δ Zip2a/2b-EGR1-p21 pathway[J]. Toxicol Lett, 2018, 299(10): 95-103.
- [12] KO H, KIM J M, KIM S, et al. Induction of apoptosis by genipin inhibits cell proliferation in AGS human gastric cancer cells via Egr1/p21 signaling pathway[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(19): 4191-4196.
- [13] KIM S J, KIM J M, SHIM S H, et al. Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3): 1064-1071.
- [14] 杜江洋, 徐元, 王楠, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 99-107.
- [15] 孙敬方. 动物实验方剂学[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司出版, 1997: 722.
- [16] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34.
- [17] CHEN D, ZHU B, LV S, et al. Inhibition of EGR1 inhibits glioma proliferation by targeting CCND1 promoter[J]. J Exp Clin Canc Res, 2017, 36(1): 186-198.
- [18] 崔亚凤, 严云勤, 李树峰, 等. Egr1 对小鼠成肌细胞 C2C12 分化的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(1): 25-32.
- [19] SHAJAHANHAQ A N, BOCA S M, JIN L, et al. EGR1 regulates cellular metabolism and survival in endocrine resistant breast cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(57): 96865-96884.
- [20] 袁程敏, 柴娟, 李平, 等. 含 Egr-1 基因启动子的报告质粒的构建及 Pur α 对 Egr-1 基因表达的调控[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(4): 368-373.

[责任编辑 张丰丰]