

## 黄芩素通过抑制 YAP 入核调控三阴乳腺癌细胞克隆形成

刘英香<sup>1\*</sup>, 王丽辉<sup>2</sup>, 李晓惠<sup>1</sup>, 韦喜生<sup>1</sup>, 唐育群<sup>1</sup>, 郑晓君<sup>1</sup>

(1. 中国人民解放军陆军第七十四集团军医院, 广州 510320;

2. 复旦大学附属浦东医院, 上海 200120)

**[摘要]** 目的: 观察黄芩素对三阴乳腺癌 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响, 探讨 Yes 相关蛋白(YAP)在其中的介导作用。方法: 黄芩素处理 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞, 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖能力, 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力, 免疫荧光法检测细胞 YAP 的细胞核分布, 蛋白免疫印迹法检测细胞 YAP 大肿瘤抑制因子 1(LATS1), YAP, 磷酸化 Yes 相关蛋白(p-YAP)和磷酸化 YAP 大肿瘤抑制因子 1(p-LATS1)蛋白表达水平。结果: 与空白组相比, 5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖无明显影响。40, 80, 160  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素能显著抑制 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖能力( $P<0.01$ ), 抑制效应存在一定剂量依赖性。黄芩素对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别为(80.3±7.2), (70.4±6.5)  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与空白组比较, 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )明显剂量依赖性降低 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成率( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与空白组比较, 黄芩素(10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )显著剂量依赖性抑制 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞 YAP 细胞核表达( $P<0.01$ )。与空白组比较, 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )明显剂量依赖性上调 MDA-MB-468 细胞 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 同样, 黄芩素(10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )显著剂量依赖性上调 MDA-MB-231 细胞 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达( $P<0.01$ )。结论: 黄芩素可通过介导 YAP 入核减少, 从而抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成。

**[关键词]** 黄芩素; Yes 相关蛋白; 增殖; 三阴乳腺癌; 机制

**[中图分类号]** R22; R2-031; R285.5; R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0070-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202325

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200917.0909.005.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-17 10:01

### Baicalein Regulates Colony Formation of Triple-negative Breast Cancer Cells by Inhibiting YAP Entry into Nucleus

LIU Ying-xiang<sup>1\*</sup>, WANG Li-hui<sup>2</sup>, LI Xiao-hui<sup>1</sup>, WEI Xi-sheng<sup>1</sup>, TANG Yu-qun<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-jun<sup>1</sup>

(1. NO 74 Army Group Hospital of People's Liberation Army Groud Force, Guangzhou 510320, China;

2. Fudan University Pudong Medical Center, Shanghai 200120, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to observe the effect of baicalein on the clonal formation of triple negative breast cancer MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells, and to explore the mediation role of Yes-related protein (YAP) in it. **Method:** MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were treated with baicalein. Thiazole blue (MTT) colorimetric method was used to detect cell proliferation ability. Plate cloning experiments was used to detect the colony forming ability. Immunofluorescence method was used to detect the nuclear distribution of YAP, and Western blot test was used to detect the protein expression levels of YAP large tumor suppressor factor 1 (LATS1), YAP, phosphorylated Yes-related protein(p-YAP) and phosphorylated YAP large tumor suppressor factor 1 (p-LATS1). **Result:** Compared with the blank group, baicalein (40, 80, 160  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly inhibited the proliferation ability of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the

**[收稿日期]** 20200616(020)

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2014A030313780)

**[通信作者]** \* 刘英香, 硕士, 主治医师, 从事肿瘤学相关研究, E-mail: xiangyingliu7008@126.com

inhibitory effect was dose-dependent. The half inhibit concentration ( $IC_{50}$ ) of baicalein against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells were  $(80.3\pm 7.2)$ ,  $(70.4\pm 6.5)$   $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Compared with blank group, baicalein (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) had no significant effect on the proliferation of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells, and the difference was not statistically significant. Compared with the blank group, baicalein (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly dose-dependently reduced the cell colony formation rates of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and baicalein (10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly inhibited the nuclear expression of YAP in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner ( $P<0.01$ ). Also, baicalin (5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly up-regulated p-YAP and p-LATS1 protein expressions in MDA-MB-468 cells in a dose-dependent manner ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Baicalein (10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly up-regulated p-YAP and p-LATS1 protein expressions in MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Baicalein can inhibit colony formation of triple negative breast cancer MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells by mediating the reduction of YAP entry into the nucleus.

[Key words] baicalein; Yes-related protein; proliferation; triple-negative breast cancer; mechanism

三阴乳腺癌(TNBC)是细胞孕酮受体(PGR), 雌激素受体(ER)和人表皮生长因子受体-2(HER-2)表达阴性的乳腺癌<sup>[1-2]</sup>。临床研究显示, TNBC具有高转移能力和高复发率, 在所有乳腺癌亚型中预后最差, 生存率最低<sup>[3-4]</sup>。并且由于TNBC缺乏PGR, ER和HER-2等治疗目标, TNBC患者很难进行内分泌治疗和靶向治疗<sup>[5-6]</sup>。因此, 开发新的治疗药物或寻找新的治疗靶点是当前临床TNBC治疗亟待解决的关键问题。黄芩素是从中药黄芩中提取的黄酮类化合物。研究显示, 黄芩素能通过抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达, 而抑制人TNBC细胞MDA-MB-231细胞增殖和迁移<sup>[7]</sup>。还有研究显示, 黄芩素可抑制同源框蛋白1(SATB1)表达, 从而抑制MDA-MB-231细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[8]</sup>。本课题组前期工作显示, 黄芩素通过G蛋白偶联雌激素受体(GPER)信号通路抑制雌激素诱导乳腺癌细胞的迁移、黏附和侵袭<sup>[9]</sup>。这些提示, 黄芩素能够抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为。Yes相关蛋白(YAP)为一种转录共激活因子, 主要在Hippo通路下游发挥细胞增殖和凋亡调控作用<sup>[10]</sup>。但目前还未有研究报道YAP与黄芩素调节乳腺癌细胞增殖存在关联, 有待于进一步证实。本研究以TNBC细胞MDA-MB-468和MDA-MB-231为研究模型, 观察黄芩素对模型细胞克隆形成能力的影响, 并探讨YAP在其中的作用。

## 1 材料

**1.1 药物与细胞** 黄芩素由江苏省中国药科大学肿瘤发生与干预重点实验室赠予, 纯度 $>98\%$ , 以酶解法提取<sup>[11]</sup>; 人乳腺癌细胞MDA-MB-468(目录号TCHu136)和MDA-MB-231(目录号SCSP-5043)购

自中国科学院上海细胞库, 细胞传至第4~5代。

**1.2 试剂** YAP抗体, 磷酸化YAP(p-YAP)(Ser127)(D9W2I)抗体, 磷酸化大肿瘤抑制因子1(p-LATS1)(Ser909)抗体(美国CST公司, 批号分别为12, 113, 27); 大肿瘤抑制因子1(LATS1)抗体(美国Abcam公司, 批号GR180296-1); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(南京Bioworld公司, 批号BM1806); RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司, 批号0521181005); BCA试剂盒(美国Thermo公司, 批号2322701); 广谱磷酸酶抑制剂混合物, 广谱蛋白酶抑制剂混合物(武汉博士德有限公司, 批号分别为11831712, 11821806); 多标记免疫荧光染色试剂盒(上海爱必信公司, 批号190506); 噻唑蓝(MTT, 上海碧云天公司, 批号1030); 结晶紫染色液(北京索莱宝公司, 批号1001809)

**1.3 仪器** Model310型恒温二氧化碳( $\text{CO}_2$ )培养箱, Multiskan™ FC型酶标仪(美国Thermo公司); SW-CJ-2FD型超净工作台(苏州净化公司); Powerpac型高电流电泳仪、电泳槽、转印槽(美国GE公司); CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司); GBOX-F3-E型凝胶成像系统(美国SynGene公司)。

## 2 方法

**2.1 MTT比色法检测黄芩素对细胞增殖能力** 将MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞按每孔9 000个接种于96孔板中, 5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素处理24 h, 设立空白组(加入溶剂), 每孔直接加入5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT溶液20  $\mu\text{L}$ , 放入细胞培养箱继续避光培养4 h, 弃上清, 每孔加二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ , 37  $^\circ\text{C}$ 振荡孵育20 min至颗粒溶解, 于酶标

仪上测定各孔 490 nm 的吸光度  $A$ 。

**2.2 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力** 将 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞制备细胞悬液,按 350 个/孔接种于 6 孔板,5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素及空白组(加入溶剂)分别处理细胞,轻晃使细胞分散均匀,药物处理并置于培养箱培养 2~3 周,观察培养孔板内出现明显细胞集落时,丢弃上清,4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 2 遍, 0.1% 结晶紫染色液染色 15 min, 流水洗去, 空气干燥。拍照计数, 克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%。

**2.3 免疫荧光法检测细胞 YAP 细胞核表达水平** 将 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞接种于放好爬片的 6 孔培养板, 细胞分组及加药同 2.2 项, 培养 24 h, 除去培养基, PBS 浸洗, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 浸洗 2 次, 0.5% TritonX-100 室温通透 10 min, PBS 浸洗 2 次, 吸水纸吸干 PBS, 滴加封闭液(8% 山羊血清)封闭 0.5~1 h, 除去封闭液滴加入 YAP 一抗(1:500)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBST 浸洗 3 次, 滴加稀释好的荧光二抗(1:300), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, PBS 浸洗 3 遍, DAPI 染色 5 min, 洗去后封片, 倒置荧光显微镜观察记录荧光强度值并拍照。

**2.4 蛋白免疫印迹法检测细胞 LATS1, YAP 及二者磷酸化蛋白表达水平** 细胞分组及加药同 2.2 项, 培养 24 h, 利用 RIPA 细胞裂解液(使用前 RIPA, 蛋白抑制剂, 磷酸酶抑制剂, 多种蛋白酶抑制剂按照 100:1:1:1 配置), 冰上温孵育 20 min 使细胞裂解, 刮取细胞总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。以每孔蛋白 30  $\mu\text{g}$  上样, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白, 然后将分离蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2 h, 按抗体要求加入 LATS1(1:5 000), YAP(1:1 000), p-LATS1(1:1 000), p-YAP(1:1 000)4  $^{\circ}\text{C}$  摇晃过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入相应二抗(1:4 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min。通过化学发光试剂盒显色, Syngene Imaging 系统进行成像, 条带灰度处理分析。

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 11.5 统计软件对实验结果进行分析处理。数据进行正态性检验, 均为正态分布并以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组内两样本均采用  $t$  检验, 多样本采用单因素方差分析。  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 黄芩素对细胞增殖的影响** 与空白组比较,

40, 80, 160  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素显著降低 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞存活率( $P<0.01$ ), 黄芩素抑制效应存在剂量依赖性。二者黄芩素的半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )分别为(80.3 $\pm$ 7.2), (70.4 $\pm$ 6.5) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  黄芩素对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞无明显细胞增殖抑制作用, 差异无统计学意义, 因此选用上述 3 个浓度作为进一步实验浓度。见表 1。

表 1 黄芩素对 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of baicalein on proliferation of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

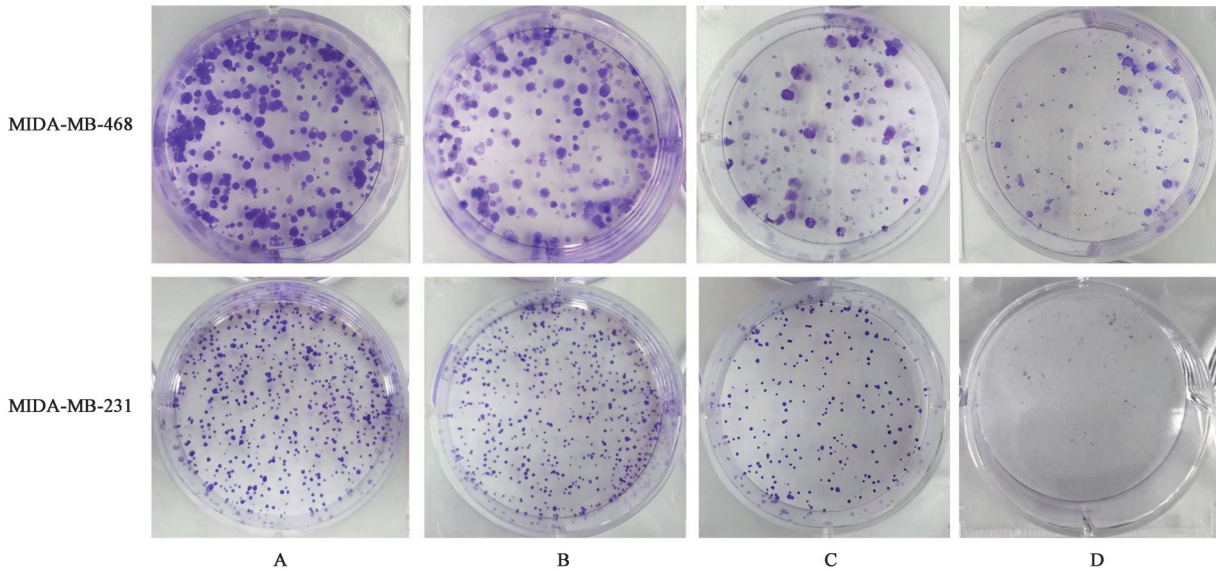
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA-MB-468 存活率	MDA-MB-231 存活率
空白		100.00	100.00
黄芩素	5	98.64 $\pm$ 9.69	97.93 $\pm$ 10.03
	10	94.85 $\pm$ 8.13	92.11 $\pm$ 8.02
	20	86.37 $\pm$ 9.02	84.74 $\pm$ 9.82
	40	66.84 $\pm$ 5.83 <sup>1)</sup>	63.84 $\pm$ 7.38 <sup>1)</sup>
	80	50.12 $\pm$ 4.58 <sup>1)</sup>	46.82 $\pm$ 4.92 <sup>1)</sup>
	160	23.84 $\pm$ 3.29 <sup>1)</sup>	19.34 $\pm$ 2.84 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ 。

**3.2 黄芩素对细胞克隆形成的影响** MDA-MB-468 细胞空白组, 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组克隆形成率分别为 100%, (62.5 $\pm$ 4.1)%, (29.6 $\pm$ 1.7)%, (18.2 $\pm$ 1.3)%; MDA-MB-231 细胞各组克隆形成率分别为 100%, (77.8 $\pm$ 6.5)%, (31.9 $\pm$ 4.3)%, (6.5 $\pm$ 0.5)%。与空白组比较, MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组克隆形成率均降低( $P<0.05, P<0.01$ ), 且呈剂量依赖性。见图 1。

**3.3 黄芩素对细胞 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达的影响** 在 MDA-MB-468 细胞, 与空白组比较, 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )明显剂量依赖性上调 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达( $P<0.05, P<0.01$ ); 在 MDA-MB-231 细胞中, 与空白组比较, 黄芩素(10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )显著剂量依赖性上调 p-YAP 和 p-LATS1 蛋白表达( $P<0.01$ )。见图 2, 表 2。

**3.4 黄芩素对细胞 YAP 入核的影响** MDA-MB-468 细胞空白组, 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组 YAP 荧光强度为(170 $\pm$ 14), (152 $\pm$ 12), (98 $\pm$ 8), (79 $\pm$ 6); MDA-MB-231 细胞各组 YAP 荧光强度分别为(158 $\pm$ 12), (143 $\pm$ 13), (95 $\pm$ 8), (70 $\pm$ 5)。与空白组比较, MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞黄芩素各组均能抑制 YAP 细胞核表达, 黄芩素(10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )



A. 空白组; B~D. 黄芩素(5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )组(图2, 3同)

图1 黄芩素对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞克隆形成能力的影响(结晶紫染色)

Fig. 1 Effect of baicalein on cplpny forming ability of MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells(crystal violet staining)

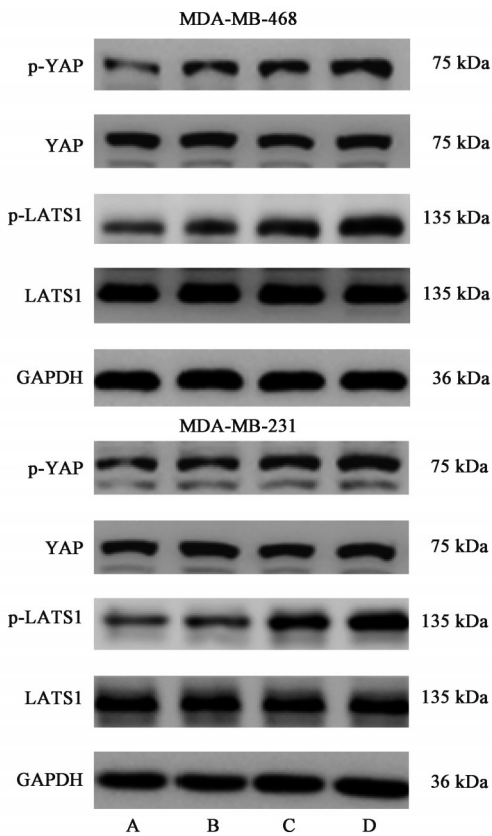


图2 黄芩素作用MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞p-YAP和p-LATS1蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of baicalein on expression of p-YAP and p-LATS1 proteins in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells

组作用显著( $P < 0.01$ )。见图3。

#### 4 讨论

自20世纪70年代末全球乳腺癌发病率一直呈

上升趋势。在我国,乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,严重威胁着女性的身心健康<sup>[12]</sup>。TNBC作为乳腺癌的亚型之一,占乳腺癌的15%~25%,并且具有转移能力强、进展快、生存时间短的临床特点<sup>[13-14]</sup>。由于TNBC缺乏PGR,ER和HER-2,患者往往无法进行内分泌治疗和靶向治疗<sup>[16]</sup>。因此,化疗及放疗仍然是TNBC的主要治疗手段,然而多数TNBC患者对化疗不敏感,这使得TNBC临床治疗面临严峻挑战<sup>[14]</sup>。

黄芩素作为黄芩的中药提取成分可对包括TNBC在内的乳腺癌细胞发挥抗肿瘤作用<sup>[7,9]</sup>。本研究发现,黄芩素能抑制MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞增殖,5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素对二者均为无明显细胞毒性,因此选择上述3个浓度进行后续实验。进一步观察发现,5, 10, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素处理后MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞克隆形成率逐渐降低。克隆形成率可反映细胞群体依赖性和增殖能力变化。提示,黄芩素可降低MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞群体依赖性和增殖能力。研究报道,沉默YAP表达可抑制三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭<sup>[15]</sup>。研究显示,在细胞核内YAP可影响多种生长相关因子的基因转录从而影响TNBC细胞MDA-MB-231和Hs578T增殖<sup>[16]</sup>。提示,YAP在TNBC增殖中发挥重要作用。为观察YAP与黄芩素诱导的TNBC细胞增殖抑制的关系。本研究进一步观察了p-YAP的蛋白表达变化。结果发现,黄芩素诱导MDA-MB-

表2 黄芩素对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞p-YAP和p-LATS1蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of baicalein on expression of p-YAP and p-LATS1 proteins in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA-MB-468		MDA-MB-231	
		p-YAP/YAP/GAPDH	p-LATS1/LATS1/GAPDH	p-YAP/YAP/GAPDH	p-LATS1/LATS1/GAPDH
空白		1.84±0.79	2.28±0.56	2.38±0.77	1.68±0.59
黄芩素	5	3.83±1.06 <sup>1)</sup>	2.67±0.68 <sup>1)</sup>	3.87±0.71	2.24±0.57
	10	4.01±1.27 <sup>2)</sup>	4.78±0.87 <sup>2)</sup>	5.06±1.24 <sup>2)</sup>	4.25±0.79 <sup>2)</sup>
	20	7.74±1.54 <sup>2)</sup>	8.77±1.34 <sup>2)</sup>	8.85±1.59 <sup>2)</sup>	8.38±1.29 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

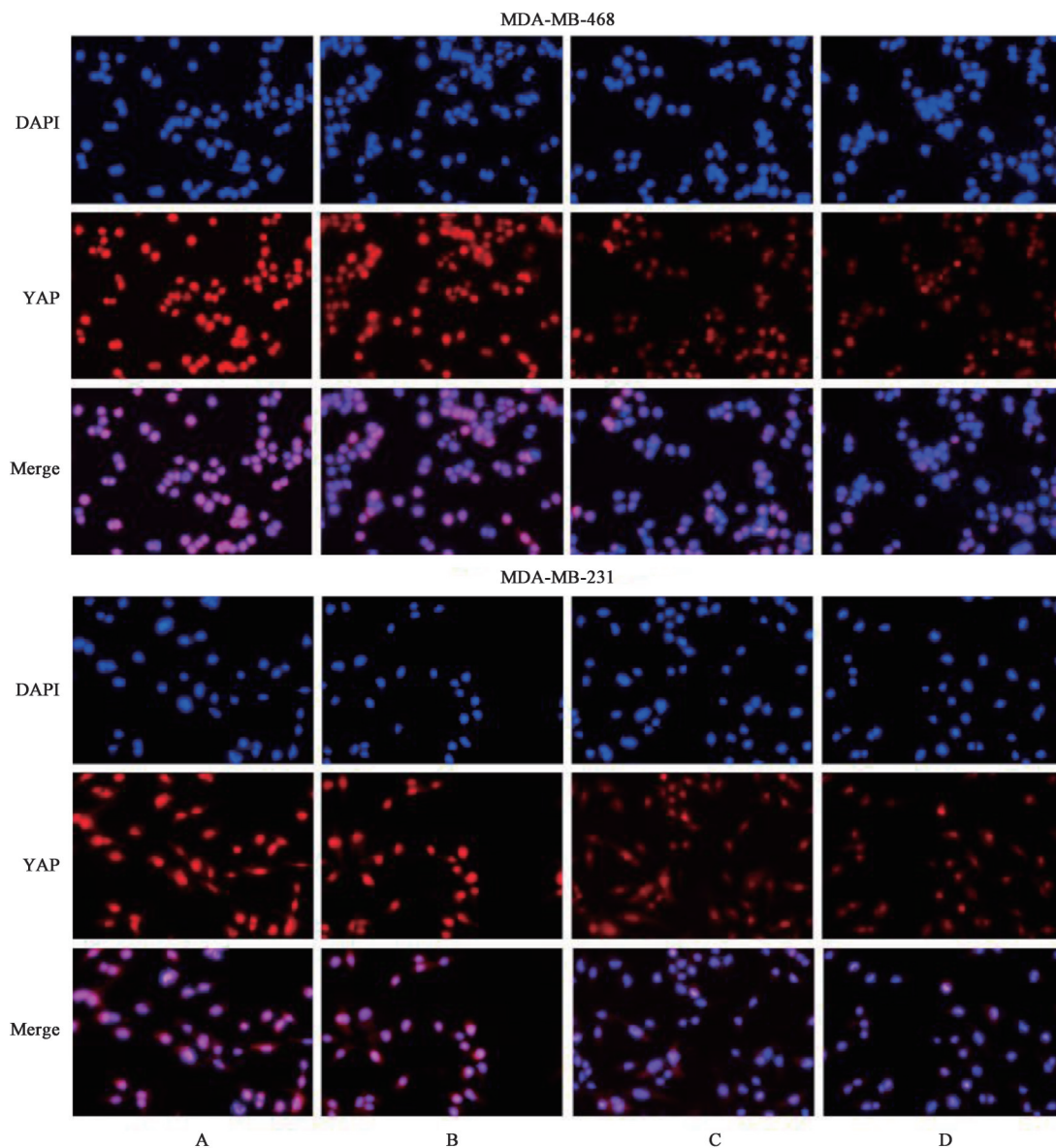


图3 黄芩素对MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞YAP核表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of baicalein on nucleus of YAP in MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cells (immunofluorescence, ×200)

468和MDA-MB-231细胞p-YAP蛋白表达上调,且呈剂量依赖性。YAP是Hippo信号通路的主要效应分子,当其被磷酸化后与细胞质内的14-3-3蛋白结合而不能进入细胞核,从而不再发挥其促增殖作

用<sup>[17-18]</sup>。提示,黄芩素可能通过诱导MDA-MB-468和MDA-MB-231细胞YAP入核减少从而抑制细胞克隆形成。LATS1/2是YAP的上游信号靶点,当LATS1/2磷酸化后可引起下游效应物YAP磷酸化,

最终使 YAP 核转位至细胞质中,从而使后者失去转录活性<sup>[17-19]</sup>。本研究发现,黄芩素可诱导 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞 p-LATS1 蛋白表达上调,且呈剂量依赖性。但 p-LATS2 蛋白表达未发生变化,因此未在结果呈现。提示,本研究中黄芩素通过磷酸化 LATS1 而诱导 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞 p-YAP 蛋白表达上调。为进一步分析 YAP 的核质分布表达情况,本研究采用免疫荧光技术观察了 YAP 的细胞核表达,结果显示,黄芩素能诱导 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞核内 YAP 表达下调。综上所述,黄芩素可通过磷酸化 LATS1 介导 YAP 入核减少,从而抑制三阴乳腺癌 MDA-MB-468 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成。但黄芩素抑制 TNBC 细胞增殖的信号机制还不完善,本研究后续将以 YAP 为支撑点继续探讨,为临床治疗 TNBC 提供基础理论支持。

[参考文献]

[1] KARAAYVAZ M, CRISTEA S, GILLESPIE S M, et al. Unravelling subclonal heterogeneity and aggressive disease states in TNBC through single-cell RNA-seq [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 29-33.

[2] TOMIOKA N, AZUMA M, IKARASHI M, et al. The therapeutic candidate for immune checkpoint inhibitors elucidated by the status of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and programmed death ligand 1 (PD-L1) expression in triple negative breast cancer (TNBC) [J]. *Breast Cancer*, 2018, 25(1): 34-42.

[3] WILSON T R, UDYAVAR A R, CHANG C W, et al. Genomic alterations associated with recurrence and TNBC Subtype in high-risk early breast cancers [J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 97-108.

[4] USCANGA-PERALES G I, SANTUARIO-FACIO S K, SANCHEZ-DOMINGUEZ C N, et al. Genetic alterations of triple negative breast cancer (TNBC) in women from northeastern Mexico [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(3): 3581-3588.

[5] WU L, MENG F, DONG L, et al. Disulfiram and BKM120 in combination with chemotherapy impede tumor progression and delay tumor recurrence in tumor initiating cell-rich TNBC [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 248-254.

[6] XIONG G, STEWART R L, CHEN J, et al. Collagen prolyl 4-hydroxylase 1 is essential for HIF-1 $\alpha$

stabilization and TNBC chemoresistance [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4456.

[7] 高美花, 林贞花, 续云洁, 等. 黄芩素对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外增殖与迁移的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(6): 1389-1390.

[8] 张淑群, 高晓燕, 薛兴欢, 等. 黄芩素对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株 SATB1 表达的影响 [J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(6): 355-358.

[9] SHANG D, LI Z, ZHU Z, et al. Baicalein suppresses 17- $\beta$ -estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor 30 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 2077-2085.

[10] 梁明, 张亦磊, 范志刚, 等. 乳腺癌组织中 Yes 相关蛋白的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4): 914-916.

[11] 刘云华, 黄志芳, 陈燕, 等. 酶解法提取黄芩中黄芩素的工艺研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19(4): 688-691.

[12] 王珊, 石红宇, 孔雯雯, 等. 中国高发乳腺癌危险因素的最新进展 [J]. *临床护理杂志*, 2017, 16(1): 72-75.

[13] 王子航, 陈丽艳, 米旭光. p21 蛋白激活激酶 4 在三阴乳腺癌增殖中的作用及机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(5): 636-639.

[14] 钟辉凤, 陈晓品. 三阴乳腺癌治疗现状 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(4): 488-490, 493.

[15] 花开尧, 宋洪明, 宋佳璐, 等. RNA 干扰 YAP 基因对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生物学行为的影响 [J]. *同济大学学报: 医学版*, 2016, 37(1): 12-17.

[16] CHANG S S, YAMAGUCHI H, XIA W, et al. Aurora A kinase activates YAP signaling in triple-negative breast cancer [J]. *Oncogene*, 2017, 36(9): 1265-1275.

[17] QIN X, LI J, SUN J, et al. Low shear stress induces ERK nuclear localization and YAP activation to control the proliferation of breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(2): 219-223.

[18] FERRARI N, RANFTL R, CHICHEROVA I, et al. Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 646-674.

[19] YUAN W C, PEPE-MOONEY B, GALLI G G, et al. NUA2 is a critical YAP target in liver cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(10): 2054-2060.

[责任编辑 张丰丰]