

黄芪多糖对人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤生长及肿瘤相关凋亡蛋白的影响

谢荣丹, 孙少伯, 何建新, 董静凝, 龙凤*

(甘肃中医药大学 中西医结合研究所, 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 观察黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)对人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤的生长抑制作用及其对肿瘤细胞凋亡的影响,研究 APS 抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 生长、诱导其凋亡的作用及其分子机制。**方法:** 通过将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 接种于 BALB/c-nu 雌性裸鼠右侧腋窝皮下建立人乳腺癌裸鼠移植瘤模型;18 只乳腺癌荷瘤裸鼠随机分为 3 组:模型组(每天予生理盐水),APS 低、高剂量组(200,400 mg·kg⁻¹),每组 6 只;每天灌胃给药 200 μL,连续 21 d。实验结束,观察比较 APS 低、高剂量组与模型组荷瘤鼠肿瘤质量、瘤体体积的变化,计算肿瘤抑制率;苏木精-伊红(HE)染色观察瘤体组织细胞形态学变化;原位末端标记法(TUNEL)检测乳腺癌肿瘤组织的凋亡;蛋白免疫印迹法检测肿瘤组织中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)等凋亡相关蛋白表达。**结果:** 与模型组比较,APS 低、高剂量组中的乳腺癌肿瘤体积、瘤重减小($P < 0.05$, $P < 0.01$),其肿瘤抑制率分别为 37.9%,57.57%;HE 染色观察 APS 干预组肿瘤组织均呈现明显形态学改变,组织细胞出现凋亡状态;TUNEL 染色显示 APS 组肿瘤组织细胞凋亡率增加;蛋白免疫印迹法发现,与模型组比较,APS 低、高剂量组肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax, Caspase-9, Caspase-7 蛋白表达水平上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** APS 能有效抑制 MDA-MB-231 乳腺癌裸鼠移植瘤生长,诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞发生凋亡,其作用机制与 APS 影响乳腺癌细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax, Caspase-9, Caspase-7 蛋白表达水平有关。

[关键词] 黄芪多糖; 乳腺癌; MDA-MB-231 裸鼠移植瘤; 肿瘤抑制; 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(2019)16-0037-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191622

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.0919.009.html>

[网络出版时间] 2019-05-07 17:10

Effect of Astragalus Polysaccharide on Growth and Tumor-related Apoptosis Protein of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Transplanted Tumor in Nude Mice

XIE Rong-dan, SUN Shao-bo, HE Jian-xin, DONG Jing-ning, LONG Feng*

(Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of astragalus polysaccharides (APS) on growth of human breast cancer MDA-MB-231 xenograft tumor in nude mice and its effect on the apoptosis of tumor cells, in order to study the effect of APS on growth and induction of apoptosis of triple negative breast cancer MDA-MB-231

[收稿日期] 20190125(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503377);甘肃省高等学校基本科研业务费专项(998602140604)

[第一作者] 谢荣丹,在读硕士,从事中医药防治肿瘤研究,E-mail:rongdanxie6021@163.com

[通信作者] *龙凤,副教授,从事中医药防治肿瘤研究,E-mail: nicole.8808@163.com

and its possible molecular mechanism. **Method:** Human breast cancer cell MDA-MB-231 was inoculated into the right axillary subcutaneous of BALB/c-nu female nude mice to establish the transplanted tumor model of breast cancer. Eighteen nude mice were randomly divided into 3 groups: model group (saline per day), low-dose APS group ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ APS per day), and high-dose APS group ($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ APS per day), with 6 rats in each group. The drug was administered by gavage ($200 \mu\text{L}$) daily for 21 days. In the experiment, the length and diameter of breast cancer transplanted tumor were measured every two days, and the tumor volume was recorded and calculated. At the end of the experiment, the changes of tumor mass and tumor volume of the low and high-dose APS groups and the model group were observed and compared, and the tumor inhibition rate was calculated. The cell morphology in tumor tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) was used to verify the apoptosis of breast cancer tissues. The expressions of apoptosis-related proteins, such as B-cell lymphoma/leukemia-2 protein (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), Caspase in tumor tissues was detected by Western blot. **Result:** The tumor volume of breast cancer decreased in the low and high-dose APS groups, and the tumor inhibition rates were 37.9% and 57.57%, respectively, with statistically significant differences from the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE of tumor tissue cells showed that APS led to obvious morphological changes, with apoptosis in the tissue cells. TUNEL staining showed that the apoptosis rate of tumor cells in APS intervention groups was higher than that in control group. Western blot showed that expression of Bcl-2 protein decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and expressions of Bax, Caspase-9 and Caspase-7 were up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in tumor tissue of APS intervention groups. **Conclusion:** APS can effectively inhibit the growth of MDA-MB-231 breast cancer xenografts in nude mice and induce apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells. The mechanism may be related to the effect of APS on expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Caspase-9 and Caspase-7 in breast cancer cells.

[**Key words**] astragalus polysaccharide; breast cancer; MDA-MB-231 transplanted tumor in nude mice; tumor inhibition; apoptosis

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤之一。2018 年最新数据显示,全球癌症发病率中乳腺癌发病率以 11.6% 位居第 2,同时以 6.6% 的死亡率位居癌症死亡率第 5^[1]。在中国,乳腺癌现已发展为女性发病率第 1 位的恶性肿瘤,并随着发病率逐年上升,呈现出年轻化趋势^[2]。目前治疗乳腺癌的方法很多,如手术治疗、内分泌治疗、化疗和辐射等,但这些方法均不能达到一个完善的治疗效果,尤其对于三阴性乳腺癌。三阴性乳腺癌由于其特殊的结构异质性和对化疗药物的低敏感性^[3],其较高的局部和远处复发风险,以及多见的内脏和(或)脑转移^[4],乳腺癌患者术后生存期短、生存质量差等问题^[5],目前尚无有效的治疗方法。因此,研发安全有效的新型辅助治疗药物、筛选药物作用靶点、阐明药物干预乳腺癌分子机制是临床治疗三阴性乳腺癌和改善患者预后的有效策略,也成为当前迫切的需求和巨大的挑战。

天然草药中蕴含的许多生物活性成分已被证明能有效治疗各种癌症^[6-9]。研究显示,中药、中药提取物以及多种中药复方可以有效延长乳腺癌患者的

无病生存期,改善乳腺癌患者的术后免疫功能,提高乳腺癌患者的生存质量^[10-11]。黄芪,作为中国的传统中药,因其扶正固本功效,被广泛应用于乳腺癌的临床治疗^[12]。黄芪的中药汤剂被证实能明显提高临床乳腺癌患者预后的存活率^[13]。黄芪多糖(APS)作为黄芪的最主要生物活性成分之一,具有抗肿瘤、抗炎、氧化保护以及调节机体免疫功能等多重作用^[14]。近年来大量研究结果显示,APS 能有效地抑制肝癌、鼻咽癌、非小细胞肺癌等癌细胞系的增殖,通过调节包括 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)等凋亡相关蛋白的表达,诱导肿瘤细胞发生凋亡,抑制肿瘤的生长^[15-17]。目前已有研究表明,APS 在体外能有效抑制乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-468 细胞的增殖^[18-19],并通过调节细胞中 Bcl-2, Bax 蛋白的表达,诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡^[20]。然而,APS 在体内抗乳腺癌活性及其具体抗癌分子机制尚不清楚,尤其对三阴性乳腺癌的作用及其分子调控机制研究更鲜有报道。因此,本研究通过建立 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞株裸鼠移植瘤模型,探讨 APS 在体内抗

乳腺癌活性,通过观察 APS 对人乳腺癌移植瘤生长的影响,探讨 APS 抑制乳腺癌细胞增殖和其抗乳腺癌的可能分子机制,为 APS 治疗乳腺癌提供药理学依据,也为临床治疗乳腺癌探索更多有效治疗手段和策略。

1 材料

1.1 细胞与动物 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,购于中国科学院上海细胞库,编号 TCHu227,第 2 代细胞;SPF 级 BALB/c-nu 雌性裸鼠,5~6 周龄,体质量 17~20 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)2014-0004。动物实验由甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准进行。动物实验在甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心完成,使用许可证号 SYXK(甘)2015-0005。

1.2 药物与试剂 APS 粉针剂(北京 Solarbio 公司,批号 608B031)。将 APS 粉末 80 mg 溶于生理盐水 100 mL 中,经 0.22 μm 微孔过滤器过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用时调至 200,400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

DMEM 培养基,胰蛋白酶消化液(美国 HyClone 公司,批号分别为 AC11018292, J170041);胎牛血清(南美 Lonsera 公司,批号 NU12955);原位末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(艾美捷科技有限公司,批号 AAT-22843); β -肌动蛋白(β -actin), Bax,半胱天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)抗体(美国 Affinity 公司,批号分别为 AF7018, AF0120, AF6348);Bcl-2,半胱天冬氨酸蛋白酶-7(Caspase-7),辣根过氧化物酶(HRP)山羊抗兔抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab32124, ab32522, ab6721);MinuteTM总蛋白提取试剂盒(美国 Invent 公司,批号 SD01705001);聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,电化学发光(ECL)发光试剂盒,磷酸盐缓冲液(PBS),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京 Solarbio 公司,批号分别为 20180530, BL520A, 1016K022, 20180523);脱脂奶粉(上海碧迪医疗器械有限公司,批号 4296916);0.22 μm 无菌过滤器(北京信生元生物医学科技有限公司,批号 170220031)。

1.3 仪器 HERAcell VIOS 160i 型 CO_2 恒温培养箱, Varioskan LUX 型酶标仪(美国 Thermo 公司);BX51TF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);PowerPacTM Basic 型电泳槽/电转移装置, Universal Hood II 型凝胶成像分析系统(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。当细胞

贴壁生长到对数生长期时,以 3.5×10^5 个/mL 接种于新培养基中进行传代培养。

2.2 乳腺癌裸鼠移植瘤模型的建立 对数生长期的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞,以生理盐水制成细胞悬液,调整细胞密度至 2.5×10^7 个/mL。吸取 MDA-MB-231 细胞悬液 200 μL ,于裸鼠背部右侧靠近腋窝处进行皮下注射接种,建立人乳腺癌裸鼠移植瘤模型。接种后每 2 d 称定荷瘤裸鼠质量,同时测量瘤体大小。当肿瘤体积达到 100 mm^3 时,即可用于相关实验。实验全程在 SPF 级环境下进行。

2.3 分组及给药 接种 10 d 后,可见裸鼠皮下肿瘤形成,成瘤率为 100%。当肿瘤瘤体达 100 mm^3 时,选 18 只荷瘤裸鼠随机分成 3 组,每组 6 只,分别为模型组(生理盐水),APS 低、高剂量组(200, 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。小鼠药量折算方法按照《药理实验方法学》中人与动物用药剂量公式换算,并通过反复预实验验证。模型组灌胃生理盐水,200 $\mu\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$;APS 低、高剂量组灌胃 APS 200 $\mu\text{L}\cdot\text{d}^{-1}$,连续给药 21 d。实验中各组裸鼠未出现死亡情况。

2.4 荷瘤鼠乳腺癌体积、瘤重测定 实验过程中,每 2 d 用游标卡尺对乳腺癌肿瘤的长径(L)和短径(d)进行测量,记录并计算实验进程中乳腺癌肿瘤的体积,瘤体积 $V = L \times d^2 / 2$ 。实验结束,对乳腺癌裸鼠采取安乐死,完整剥离肿瘤,称重并记录瘤体的质量;计算乳腺癌肿瘤抑制率。肿瘤抑制率 = (模型组瘤重均值 - 实验组瘤重均值) / 模型组瘤重均值 $\times 100\%$ 。

2.5 HE 染色观察乳腺癌肿瘤组织细胞形态学改变 将部分肿瘤组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋、切片,常规 HE 染色,后切片脱水、透明、封片,光学显微镜观察肿瘤组织细胞形态学变化。

2.6 TUNEL 法检测乳腺癌肿瘤组织细胞凋亡 根据 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书方法对肿瘤组织石蜡包埋切片中细胞凋亡进行检测。显微镜下,凋亡细胞被鉴定为深棕色,未凋亡细胞呈蓝色。实验中以盲法和随机原则对每张切片选择检查了 5 个视野。通过放大拍摄,对每个视野中总细胞数和阳性染色细胞数进行计数。计算每个视野中阳性细胞数占总细胞数的百分比,并获得 APS 组和模型组凋亡细胞的平均值。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bax, Bcl-2, Caspase-9, Caspase-7 蛋白表达 称取乳腺癌肿瘤组

织,按试剂盒说明书加入适量组织蛋白提取裂解液,迅速置冰上研磨、匀浆;4 ℃,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,提取总蛋白。BCA 法测定蛋白质浓度。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转膜,4 ℃封闭 3 h,加入一抗 4 ℃过夜(β-actin, Bax, Bcl-2, Caspase-9, Caspase-7 依次为 1:1 000,1:1 000,1:500,1:1 000,1:500),加入二抗(1:5 000)4 ℃摇床孵育 2 h;通过凝胶成像分析系统检测蛋白表达。以β-actin作为内参,采用 Image J 软件进行条带灰度值的采集,取目的蛋白条带灰度值和内参条带灰度值的比值作为蛋白的相对表达量。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据符合正态分布,方差齐,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 APS 对乳腺癌裸鼠移植瘤体积的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	首次给药当天	首次给药 5 d	首次给药 9 d	首次给药 13 d	首次给药 17 d	首次给药 21 d
模型	-	0.20 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.68 ± 0.07	0.88 ± 0.04	1.34 ± 0.05	1.39 ± 0.05
APS	200	0.19 ± 0.01	0.41 ± 0.04 ¹⁾	0.60 ± 0.06 ¹⁾	0.63 ± 0.06 ¹⁾	0.69 ± 0.04 ¹⁾	0.78 ± 0.04 ¹⁾
	400	0.19 ± 0.01	0.32 ± 0.02 ¹⁾	0.37 ± 0.02 ¹⁾	0.45 ± 0.05 ¹⁾	0.56 ± 0.06 ¹⁾	0.67 ± 0.06 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 APS 对乳腺癌肿瘤组织形态的影响 模型组中肿瘤细胞呈现不规则的团块状或条索状分布,肿瘤细胞异型性明显,细胞核呈圆形或卵形,细胞核增大,核异型性明显;APS 低、高剂量组肿瘤细胞呈现不同程度退行性变,并可见细胞核碎片,凋亡细胞增多。见图 1。

3.3 APS 对乳腺癌肿瘤组织细胞凋亡的影响

镜下可见部分乳腺癌肿瘤组织细胞核被染成深棕色,此为凋亡的乳腺癌细胞,未凋亡细胞为蓝色。与模型组比较,APS 低、高剂量组乳腺癌肿瘤组织凋亡细胞数量显著增加,APS 低、高剂量组肿瘤组织凋亡细胞率显著升高($P < 0.01$),且呈现剂量依赖性。见图 2,表 3。

3.4 APS 对乳腺癌肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达水平的影响 与模型组比较,APS 低、高剂量组乳腺癌肿瘤组织中促凋亡蛋白 Bax 蛋白表达升高($P < 0.05, P < 0.01$),抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05, P < 0.01$),并且呈剂量依赖性;Bax/Bcl-2 升高($P < 0.05, P < 0.01$),Caspase-9 和 Caspase-7 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。见图 3,表 4。

3 结果

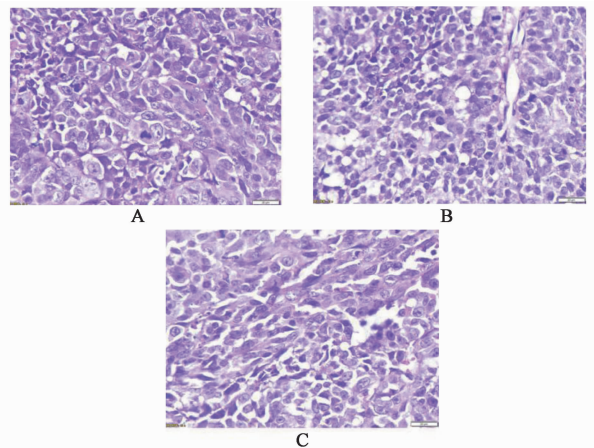
3.1 APS 对乳腺癌裸鼠移植瘤的影响 与模型组比较,APS 低、高剂量组裸鼠移植瘤的瘤体积极明显减小($P < 0.05$),平均瘤重明显减轻($P < 0.05, P < 0.01$),APS 低、高剂量组肿瘤抑制率明显增加($P < 0.05$),分别为 37.9%,57.57%,见表 1,2。

表 1 APS 对乳腺癌移植瘤重量的影响

Table 1 Effect of APS on quality of transplanted tumor of breast cancer

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤重($\bar{x} \pm s, n = 6$)/g	肿瘤抑制率/%
模型	-	1.94 ± 0.35	-
APS	200	1.20 ± 0.25 ¹⁾	37.90 ¹⁾
	400	0.78 ± 0.15 ²⁾	57.57 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表 4 同)。



A. 模型组;B. APS 低剂量组;C. APS 高剂量组(图 2,3 同)

图 1 APS 对乳腺癌裸鼠肿瘤组织形态的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of APS on tumor morphology in nude mice with breast cancer (HE, ×400)

4 讨论

天然产物,尤其是中草药,具有很好的抗肿瘤作用,且毒副作用小。黄芪在肿瘤治疗中发挥着重要的调节作用,黄芪提取物在体外和体内均能抑制多种癌细胞的生长,包括胃癌、肝癌、子宫内膜癌、鳞状

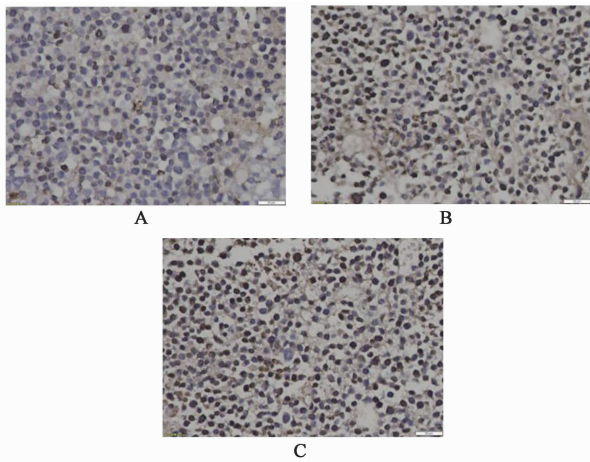


图 2 APS 对乳腺癌肿瘤组织细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 2 Effect of APS on apoptosis of breast cancer tissue (TUNEL, ×400)

表 3 APS 对乳腺癌肿瘤组织细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of APS on apoptosis rate of breast cancer tissue

($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	细胞凋亡率/%
模型	-	14.63 ± 0.67
APS	200	32.05 ± 0.95 ¹⁾
	400	62.87 ± 1.73 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.01。

表 4 APS 对乳腺癌组织凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of APS on expressions of apoptosis-related proteins in breast cancer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Caspase-9/β-actin	Caspase-7/β-actin	Bax/Bcl-2
模型	-	0.37 ± 0.02	1.86 ± 0.14	0.22 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.20 ± 0.01
APS	200	0.48 ± 0.03 ¹⁾	1.51 ± 0.07 ¹⁾	0.40 ± 0.03 ²⁾	0.84 ± 0.04 ²⁾	0.32 ± 0.02 ¹⁾
	400	0.75 ± 0.07 ²⁾	1.26 ± 0.24 ²⁾	0.68 ± 0.07 ²⁾	1.67 ± 0.04 ²⁾	0.55 ± 0.08 ²⁾

提高, 迁移和侵袭特性明显下降; APS 能抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的生物学活性, 阻滞乳腺癌细胞的迁移和侵袭。本研究从三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 角度出发, 通过建立人乳腺癌裸鼠移植瘤模型, 发现 APS 在体内能有效抑制人乳腺癌移植瘤的生长, 通过 TUNEL 实验表明 APS 能诱导 MDA-MB-231 肿瘤组织细胞发生凋亡, 说明 APS 通过诱导肿瘤组织细胞凋亡抑制人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 移植瘤的生长。

细胞凋亡对肿瘤细胞增殖和肿瘤生长具有重要意义。自 Hickman^[29] 提出以诱导肿瘤细胞凋亡作为临床治疗恶性肿瘤的目标和手段以来, 医学界对干预性肿瘤细胞凋亡的研究逐渐重视, 并发展成为肿瘤治疗研究的新热点。有研究发现在临床三阴性

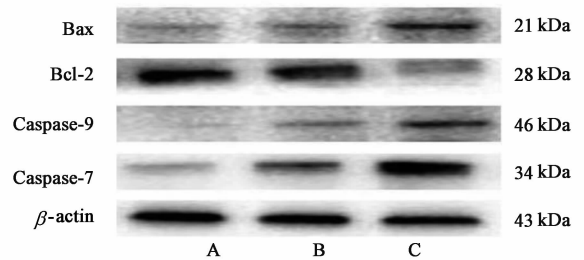


图 3 APS 作用乳腺癌肿瘤组织中凋亡相关蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of APS on expressions of apoptosis-related proteins in breast cancer

乳腺癌等^[21-24]。

近年来的研究显示, APS 对乳腺癌细胞的生长具有抑制作用。现已有研究表明 APS 可以浓度和时间依赖性诱导 MCF-7 乳腺癌细胞发生凋亡, 抑制乳腺癌生长^[25-26]。此外, 谷俊朝等^[27]用 APS 干预乳腺癌 MA-891 移植瘤小鼠, 体内实验发现 APS 可以明显增加乳腺癌荷瘤小鼠淋巴细胞的免疫活性, 同时 APS 还能抑制乳腺癌肿瘤血管的生成并减少癌细胞中凋亡相关因子热休克蛋白 70 (HSP70) 和 Bcl-2 的表达水平, 对 MA-891 乳腺癌肿瘤的生长有明显的抑制效果。周丽菁等^[28]则发现在巨噬细胞-MDA-MB-231 共培养体系中, APS 能使处于有丝分裂 S 期的 MDA-MB-231 细胞显著减少, 凋亡率显著

乳腺癌组织中, Caspase-9 和 Bax 呈现低表达, 而 Bcl-2 呈高表达, 3 种蛋白可能共同作用于乳腺癌细胞的增殖与凋亡, 促进三阴性乳腺癌的发生与发展^[30]。目前公认的关于细胞凋亡的信号途径主要有 2 条, 其中之一便是线粒体依赖途径, 即 Bcl-2/Bax 途径。Bcl-2 家族蛋白与相关的细胞质蛋白是线粒体凋亡途径中的关键调控因子^[31]。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中的典型蛋白, Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, Bax 是促进凋亡蛋白, Bcl-2 和 Bax 的平衡失调被认为是细胞凋亡发生的条件^[32]。同时, Bcl-2 对 Bax 诱导的线粒体凋亡途径有较强的拮抗凋亡的作用。因此, Bax/Bcl-2 高比例被认为是促进细胞凋亡发生的^[12]。而 Caspase 参与了线粒体凋亡途径的整个过程, 被认为是细胞凋亡发生的基础^[33]。在由

Caspase 介导的线粒体凋亡通路中, Caspase-9 是细胞凋亡过程中的重要介质, 通过调节肿瘤细胞中 Caspase-9 的表达, 裂解信号通路中下游执行子而触发肿瘤细胞凋亡^[34]。而 Caspase-7 是一种重要的凋亡执行因子^[35]。本研究表明, APS 改变了乳腺癌肿瘤组织中凋亡相关蛋白的表达量, Bcl-2 表达下降, Bax, Caspase-7, Caspase-9 表达明显上调, Bax/Bcl-2 升高; 同时, APS 抑制 Bcl-2 表达, 促进 Bax 表达的效果随 APS 剂量增加而增强。此研究结果表明 APS 可以通过线粒体通路诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞发生凋亡, 从而对乳腺癌的生长起到抑制作用。

综上所述, APS 能在体内有效抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠移植瘤的生长, 诱导人乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤组织细胞发生凋亡。APS 可以通过下调凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达, 上调 Bax, Caspase-7, Caspase-9 的表达水平, 参与线粒体凋亡途径诱导 MDA-MB-231 乳腺癌细胞发生凋亡, 这一结果与本课题组前期体外细胞实验研究结果相符。此研究结果为临床治疗研究 APS 对三阴性乳腺癌的肿瘤抑制效应提供了新的实验依据, 说明 APS 是一种有效的抗癌及辅助治疗生物活性成分。关于 APS 对乳腺癌抑制作用分子机制的具体信号通路及关键作用靶点有待进一步深入研究与探讨。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30.

[2] JIANG X, TANG H, CHEN T. Epidemiology of gynecologic cancers in China[J]. J Gynecol Oncol, 2018, 29(1):e7.

[3] 文习武. 三阴性乳腺癌的临床病理特征及治疗进展[J]. 三峡大学学报:自然科学版, 2017, 39(S1):120-121.

[4] Foulkes W D, Smith I E, Reisfilho J S. Triple-negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 363(20):1938-1948.

[5] 王蓓, 傅健飞, 吕晓皓. 74 例三阴性乳腺癌临床特征及预后分析[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(11):1005-1008.

[6] YANG Y, QIU S, QIAN L, et al. OCF can repress tumor metastasis by inhibiting epithelial-mesenchymal transition involved in PTEN/PI3K/Akt pathway in lung cancer cells[J]. PLoS One, 2017, 12(3):1-17.

[7] BAI H, SUN S, ZHANG Y, et al. Inhibitory effect of *Dendrobium officinale* polysaccharide on growth of human breast cancer MCF-7 cells and the related mechanism

[J]. Biomed Res, 2017, 28(4):1922-1926.

[8] LUO J, CHENG Z, RONG L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide alleviating colorectal cancer by alteration of special gut bacteria and regulation of gene expression of colonic epithelial cells[J]. J Funct Foods, 2018, 47:127-135.

[9] 朱元章, 张贵彪, 朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16):227-234.

[10] 周思颖, 张思杰, 徐寒子, 等. 中医药治疗乳腺癌进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(10):1489-1492.

[11] 张奕萌, 谢小红, 高秀飞. 中医药治疗三阴性乳腺癌进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(1):77-80.

[12] 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.

[13] 张俊林. 黄芪桃红汤联合 CEF 方案化疗对乳腺癌术后免疫功能的影响[J]. 国医论坛, 2017, 32(5):47-49.

[14] PU X, MA X, LIU L, et al. Structural characterization and antioxidant activity *in vitro* of polysaccharides from angelica and astragalus[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137:154-164.

[15] LAI X, XIA W, WEI J, et al. Therapeutic effect of *Astragalus polysaccharides* on hepatocellular carcinoma H22-bearing mice[J]. Dose Response, 2017, 15(1):1-6.

[16] 庄梦婕, 刘丹, 陈彦文, 等. 黄芪多糖联合顺铂对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤 Caspase-3, Smac/Diablo 表达的影响[J]. 解剖学报, 2018, 49(1):63-69.

[17] ZHOU Z, MENG M, NI H. Chemosensitizing effect of astragalus polysaccharides on nasopharyngeal carcinoma cells by inducing apoptosis and modulating expression of Bax/Bcl-2 ratio and Caspases[J]. Med Sci Monit, 2017, 23:462-469.

[18] 吴小进, 米燕燕, 杨辉, 等. 黄芪多糖抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和诱导凋亡[J]. 中华生物医学工程杂志, 2014, 20(2):106-109.

[19] YE M N, CHEN H, ZHOU R, et al. Effects of astragalus polysaccharide on proliferation and Akt phosphorylation of the basal-like breast cancer cell line[J]. J Chin Integr Med, 2011, 9(12):1339-1346.

[20] LI W, SONG K, WANG S, et al. Anti-tumor potential of astragalus polysaccharides on breast cancer cell line mediated by macrophage activation[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019, 98:685-695.

- [21] 杜军辉. 黄芪注射液辅助免疫化疗对子宫内膜癌患者免疫功能及血清肿瘤分子的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(11):101-103.
- [22] 吕心明, 徐金芬, 闫呈新, 等. 黄芪多糖联合放疗对小鼠 H22 肝癌移植瘤的放射增敏及免疫功能的影响[J]. 云南中医学院学报, 2017, 40(6):9-13.
- [23] 郭英. 黄芪甲苷通过抑制 Akt 和 NF- κ B 通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19):2341-2344.
- [24] JING Z, LIU L, JING W, et al. Formononetin, an isoflavone from *Astragalus membranaceus* inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cells[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 221:91-99.
- [25] 张虹, 季有波, 孙晓琪, 等. 黄芪多糖对乳腺癌细胞抑制作用实验研究[J]. 中国社区医师, 2017, 33(36):9-10,13.
- [26] 张虹, 季有波, 杨琪, 等. 黄芪多糖诱导乳腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国社区医师, 2017, 33(34):5,7.
- [27] 谷俊朝, 余微波, 王宇, 等. 黄芪多糖对 TA2 小鼠乳腺癌 MA-891 移植瘤生长及 HSP70 表达的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2006, 13(20):1534-1537.
- [28] 周丽菁, 汪志学, 龙婷婷, 等. 黄芪多糖在体外巨噬细胞-乳腺癌细胞共培养体系中的作用[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(6):469-476.
- [29] Hickman J A. Apoptosis induced by anticancer drugs [J]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11(2):121-139.
- [30] 张丙信, 赵霞, 陈雪, 等. Caspase-9、Bcl-2 和 Bax 在基底细胞样乳腺癌组织中的表达及意义[J]. 山东医药, 2014, 54(46):8-10.
- [31] 黄兆宇, 武睿超, 冉江华, 等. 线粒体调控细胞凋亡的相关研究综述[J]. 吉林医学, 2018, 39(7):1356-1357.
- [32] 阎力君, 洪涛, 雒江菡, 等. 黄芪多糖对结肠癌 SW620 细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22):97-101.
- [33] Knight T, Luedtke D, Edwards H, et al. A delicate balance-The BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics [J]. Biochem Pharmacol, 2019, 162:250-261.
- [34] Mondal A, Bennett L L. Resveratrol enhances the efficacy of sorafenib mediated apoptosis in human breast cancer MCF7 cells through ROS, cell cycle inhibition, Caspase-3 and PARP cleavage [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:1906-1914.
- [35] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展[J]. 浙江医学, 2018, 40(18):2083-2087,2091.

[责任编辑 张丰丰]