

阳和化岩汤对 HER-2 高表达型乳腺癌细胞 PI3K/Akt 通路 HER-2, PI3K, p-Akt 表达的机制

王楠, 刘晓菲*, 张洋, 朱晴

(山东中医药大学第一临床医学院, 中医学院, 济南 250014)

[摘要] **目的:** 观察阳和化岩汤与磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 对乳腺癌细胞株 SK-BR-3 [人表皮生长因子受体-2 (HER-2) 高表达型] PI3K/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路中 HER-2, PI3K, 磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 表达的影响, 研究阳和化岩汤的干预机制。**方法:** 制备阳和化岩汤肠吸收液, 将乳腺癌细胞株 SK-BR-3 分为空白组, 阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组, 阳和化岩汤 ($125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), LY294002 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 阳和化岩汤 + LY294002 (阳和化岩汤 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, LY294002 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 用药干预 24 h 后通过免疫组化、蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达, 通过逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达。**结果:** 与空白组比较, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组均能抑制乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 阳和化岩汤组能抑制乳腺癌细胞株 HER-2, p-Akt 蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 但对 PI3K 的抑制作用不明显; 联用 LY294002 较单用 LY294002 具有进一步抑制 PI3K 表达的作用 ($P < 0.05$)。与阳和化岩汤组, LY294002 组比较, LY294002 + 阳和化岩汤组能够明显抑制 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。**结论:** 阳和化岩汤能够抑制乳腺癌脉管生成和侵袭, 主要作用机制为通过干预 PI3K/Akt 通路, 降低通路中 HER-2, PI3K, p-Akt 表达。

[关键词] 阳和化岩汤; 人表皮生长因子受体-2 (HER-2) 高表达型乳腺癌; 磷脂酰肌醇-3 羟基激酶 (PI3K) 抑制剂; 脉管生成与侵袭; PI3K/蛋白激酶 B (Akt) 通路

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0098-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190425

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1208.006.html>

[网络出版时间] 2018-11-05 10:24

Effect of Yanghe Huayan Tang Combined with PI3K Inhibitor on Expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in PI3K/Akt Pathway of High-expression HER-2 Breast Cancer Cell Lines

WANG Nan, LIU Xiao-fei*, ZHANG Yang, ZHU Qing

(School of Traditional Chinese Medicine (TCM), First Clinical Medical College, Shandong University of TCM, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Yanghe Huayan Tang and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 in intervening expressions of human epidermal growth factor receptor human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2), PI3K and phosphorylated serine/threonine kinase (p-Akt) in PI3K/Akt pathway of breast cancer cell line SK-BR-3 (HER-2 high expression) *in vitro*, and study intervention mechanism of Yanghe Huayan Tang. **Method:** Yanghe Huayan Tang intestinal absorption fluid was prepared, breast cancer cell

[收稿日期] 20181017(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403408, 81473687, 81573989); 山东省中医药科技发展计划项目(2013-ZDZK-024); 山东省高等学校科技计划项目(J111F53); 山东省自然科学基金项目(ZR2013HM038)

[第一作者] 王楠, 硕士, 从事中医外科学乳腺甲状腺研究, E-mail: 1156004128@qq.com

[通信作者] * 刘晓菲, 副教授, 副主任医师, 从事乳腺甲状腺外科的中医及中西医结合临床、教学及科研工作, E-mail: drliuxf@126.com

strain SK-BR-3 was divided into blank group, Yanghe Huayan Tang group, LY294002 group, LY294002 + Yanghe Huayan Tang group. The concentration was respectively $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for Yanghe Huayan Tang, $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for LY294002, $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ for Yanghe Huayan Tang + LY294002. The expressions of HER-2, PI3K and p-Akt protein were detected by immunohistochemistry and Western blot after 24 h. The most appropriate and effective concentration was obtained through extensive experiments. The expressions of HER-2, PI3K and p-Akt were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Compared with blank group, LY294002 group, and LY294002 + Yanghe Huayan Tang group could inhibit protein and mRNA expressions of HER-2, PI3K, p-Akt in breast cancer cell lines ($P < 0.05$). Yanghe Huayan Tang group could inhibit expressions of HER-2, p-Akt and mRNA ($P < 0.05$) in breast cancer cell lines, but inhibitory effect on PI3K was not obvious; combination with LY294002 could further inhibit PI3K expression compared with single administration with LY294002 ($P < 0.05$). Compared with LY294002 group, LY294002 + Yanghe Huayan Tang group had a more obvious inhibitory effect. The combined administration of Yanghe Huayan Tang and LY294002 could inhibit protein and mRNA expressions of HER-2, PI3K, p-Akt significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yanghe Huayan Tang can inhibit angiogenesis and invasion of breast cancer. Its main mechanism is expressed by intervening PI3K/Akt pathway, reducing expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in pathway.

[**Key words**] Yanghe Huayan Tang; human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) high-expression breast cancer; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor; vasculogenesis and invasion; PI3K/serine/threonine kinase (Akt) pathway

乳腺癌是危害女性健康并且死亡率逐年增高的恶性肿瘤,有研究表明,约 25% ~ 30% 的乳腺癌患者中人表皮生长因子受体-2 (HER-2) 高表达^[1]。HER-2 高表达型乳腺癌体现出恶性程度高,疾病进展迅速,化疗缓解期缩短,易侵袭脉管,预后多较差而且易复发。近年来磷脂酰肌醇-3 羟基激酶及处于其下游的磷酸化丝氨酸/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路成为研究热点,有研究表明,HER-2 受体激活的主要下游信号通路主要为 PI3K/Akt^[2],约 70% 的乳腺癌中存在 PI3K/Akt 通路的活化^[3],超过 70% 的乳腺癌患者存在着 PI3K/Akt 通路的至少一种成分的改变^[4],相关实验表明该通路可能影响乳腺癌的发生发展,在癌变过程中起着重要作用^[5],PI3K/Akt 信号通路参与肿瘤的血管生成,与肿瘤细胞的侵袭和转移等密切相关。乳腺癌中常见 PI3K/Akt 信号通路的异常激活,以此通路为靶点的药物成为治疗乳腺癌的研究热点。LY294002 作为经典的 PI3K 抑制剂,能有效降低 PI3K 表达抑制体内外肿瘤细胞生长,但因其水溶性较差、具有细胞毒性,加之出现耐药性故临床应用受限^[6]。温阳散结中药能够抑制肿瘤生长,与化疗联合应用具有良好的减毒增效作用^[7]。目前从温阳化痰解毒法干预微血管、淋巴管生成的相关研究较少,本课题组前期工作基础显示阳和化岩汤为代表的温阳化痰解毒法在体内、体外实验中均能抑制 HER-2 高表达型乳腺癌

细胞的生长,促进癌细胞凋亡,将细胞阻滞于 S 期,阻止细胞进入增殖有丝分裂期,并减少脉管生成(微血管密度、淋巴管密度降低),检测到半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 信号的上游 PI3K/Akt 信号通路有 PI3K 的异常活化^[8-10],故该课题从由 PI3K/Akt 介导的通路中探讨阳和化岩汤干预 HER-2 高表达型乳腺癌细胞的凋亡和增殖及脉管侵袭机制研究。

本实验主要采用温阳散结中药为代表的阳和化岩汤与 PI3K 抑制剂 LY294002,欲对 HER-2 高表达型乳腺癌细胞株脉管生成过程中 PI3K/Akt 通路的干预机制做相关探讨,进一步明确阳和化岩汤在乳腺癌治疗过程的作用。

1 材料

1.1 动物、细胞 SPF 级 6 周龄健康雄性 SD 大鼠 15 只,体质量 220 ~ 240 g,合格证号 SCXK(鲁)2016-0003,由山东中医药大学实验动物中心提供并饲养,经山东中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号 SZHYLL0302),符合实验动物伦理委员会规定。

乳腺癌细胞株 SK-BR-3 (HER-2 高表达型 ERa66-/Era36-PR-/HER2⁺/EGFR⁺),购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,批号 S7008。

1.2 试剂 PI3K 抑制剂 LY294002[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号 20153638];RPIM 1640 培养基,M 199 培养基(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为 R1123-3, R1167-7);青、链霉素,优

级胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 M77567, QH778, B1735748, S90868); PI3K, p-Akt 多克隆抗体, S-P 免疫组化试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司,批号分别为 K2267, R2234, sc6374); HER-2, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(博士德生物公司,批号分别为 H2234, D8327); 蛋白酶抑制剂(德国 Merck 公司,批号 33748); DAB 显色试剂盒, ECL 发光剂, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, trizol(南京凯基生物科技公司,批号分别为 153725, 22678, 88932, 16673); 逆转录, PCR 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 22378, 2274)。

1.3 仪器 CX21 型显微镜(重庆光学仪器厂), NYW-MB96 型酶标仪(美国 Biotek 公司), Tanon 2500 型凝胶成像分析系统(深圳天能公司), 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Precision 公司), ABI7500 型 IQTMS 型多重实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司), 221BR4452 型电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 中药制备 阳和化岩汤^[11]按鹿角霜-山慈菇-莪术-熟地黄-土贝母 3:2:2:2:2 称取饮片 50 g。因根据物质相似相溶特性,醇提药物含量较高,以体积比 1:20 加入 95% 乙醇回流提取 2 h,后自然冷却,抽滤,取得滤液。滤液 56 °C 旋转蒸发至干,以每 4 g 原生药材用 Tyrode 缓冲液 25 mL,超声混匀后得阳和化岩方供试液,生药含量 0.16 g·mL⁻¹, -20 °C 冰箱保存,使用前室温自然解冻。中药采购自山东省中医院药剂科,经山东中医药大学药学院中药系副教授王厚伟鉴定,符合 2015 年版《中国药典》要求。

2.2 肠吸收液制备 实验前将大鼠禁食(自由饮水)12 h,称质量后脱颈处死,打开腹腔,分离肠系膜,取出小肠,于回盲瓣以上 5 cm,继续往上选取 14 cm 肠段,tyrode 缓冲液冲洗,分离肠表面脂肪、血管,至没有肠内容物为止,将自制硅胶套管软端插入肠管并用丝线结扎,将肠道翻转,暴露黏膜层,tyrode 缓冲液冲洗,将另一端用丝线结扎成囊状,麦氏浴管中预先加入中药液 25 mL,通入混合气体(95% O₂, 5% CO₂),37 °C 恒温,于肠管中注入 tyrode 缓冲液 2 mL,放入麦氏浴管中,在 3 h 取样 40 μL,并补充等体积 tyrode 缓冲液,标记后 -20 °C 保存^[12]。

2.3 供试液制备 将所得阳和化岩汤肠吸收液利用氮气吹干,加入 80% 甲醇 1 mL 复溶,超声 3 min,涡旋 30 s。0.2 μm 滤膜过滤。用无菌滤膜将混合均匀后的肠吸收液滤过除菌,分装所得样品于无菌

的离心管中, -20 °C 保存待用。实验时药物加入以无血清培养基稀释的阳和化岩汤肠吸收液 125 g·L⁻¹, LY294002 同样以无血清培养基稀释,质量浓度为 0.05 g·L⁻¹。

2.4 细胞分组与培养 用含 10% 胎牛血清, 1% 青、链霉素的高糖 DMEM 细胞培养液在 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育乳腺癌 SK-BR-3 细胞,每 24 h 换液传代,随机选取对数期生长的乳腺癌细胞株,将 SK-BR-3 细胞随机分成空白组,阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组。取对数期生长的 SK-BR-3 细胞,在 96 孔板中加入细胞 200 μL/孔(约 2 × 10⁵ 个细胞),于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱内培养 24 h,待细胞贴壁后加入不同药物处理细胞,空白组加入磷酸盐缓冲液(PBS)10 μL,药物干预组分别加入阳和化岩汤(125 g·L⁻¹), LY294002(0.05 g·L⁻¹), 阳和化岩汤 + LY294002(阳和化岩汤 125 g·L⁻¹, LY294002 0.05 g·L⁻¹) 10 μL。药物剂量经前期实验核实,取得最适宜最有效质量浓度。药物干预 24 h。

2.5 免疫细胞化学检测 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达 将细胞按常规方法制成 1 × 10⁵ 个/mL 细胞悬液,接种于 6 孔板,细胞加药同 2.4 项,干预 24 h 后进行爬片,观察 4 组 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达差异。共培养 72 h 后按 SABC 试剂盒说明书进行染色,细胞学涂片经去除内源性过氧化物酶和血清封闭后,分别滴加一抗(1:1 000),4 °C 过夜;次日分别滴加生物素化二抗和 HRP 标记链霉亲和素化三抗,DAB 显色室温 5 min,自来水冲洗;苏木素轻度复染细胞核;脱水、透明、封片。显微镜下观察。计算出灰度值阳性表达率 = 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

2.6 蛋白免疫印变法(Western blot)检测 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达 空白组,阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组处理 SK-BR-3 细胞 24 h,收集细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,分别加入预冷裂解缓冲液 200 μL,混和均匀后冰浴 30 min,离心,留取上清液并将其稀释到 50 mg·L⁻¹,取等量蛋白(70 μg/泳道)上样。电泳条件,分离胶 80 V 约 80 min,浓缩胶恒压 60 V 约 20 min。电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1:1 000)分别孵育 HER-2, p-Akt, PI3K, 4 °C 过夜。TEST 洗膜 5 min/次,3 次,孵育二抗(1:200)室温 1.5 h。TEST 洗膜 10 min/次,3 次,曝光显影。以目的蛋白条带的灰度值与内参 GAPDH 蛋白条带灰度值的

比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.7 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达 细胞处理同 2.6 项, 收集细胞, 各组加入 trizol 500 μ L, 提取总 RNA, 进行 RNA 完整性及纯度的鉴定。利用反转录试剂盒, 合成 cDNA。以 β -肌动蛋白 (β -actin) 作为内参照。紫外透射仪下拍照。采用图像分析软件分析电泳条带的光密度值, 各目标条带光密度与内参照 β -actin 光密度比值为目标 mRNA 的相对光表达量。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

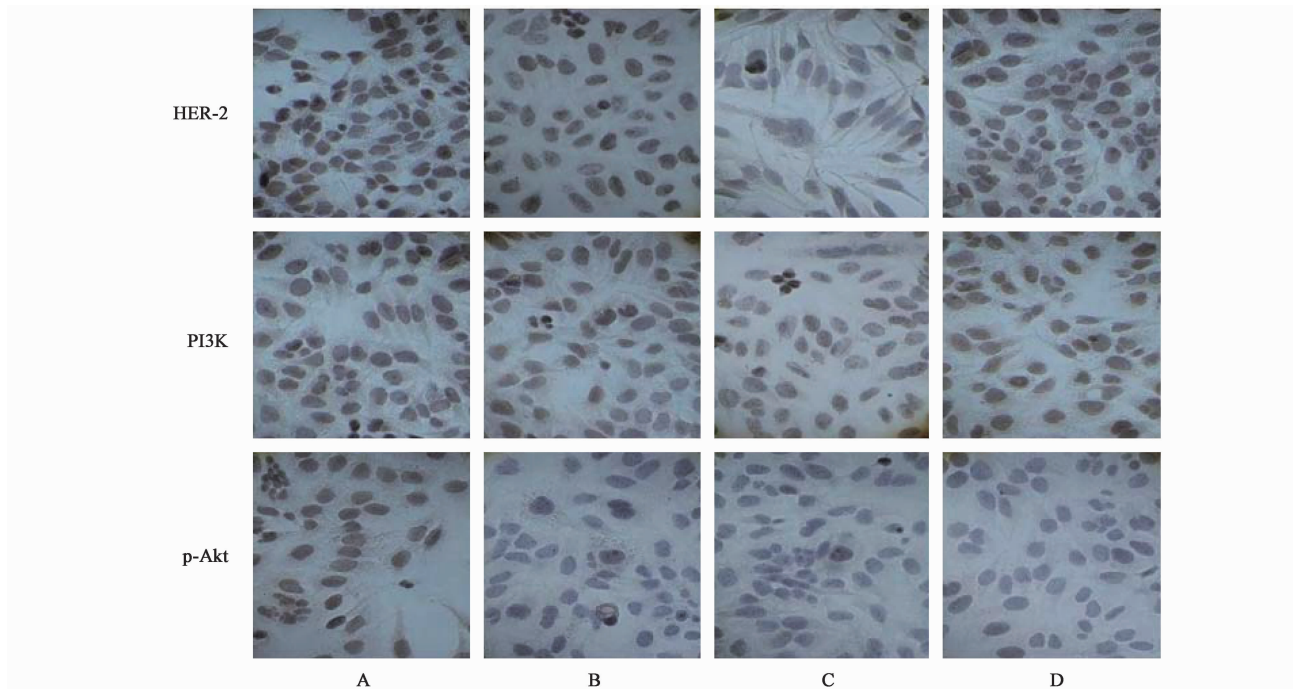
名称	序列	长度 /bp
β -actin	上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3'	491
	下游 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'	
p-Akt	上游 5'-ACTCCAGTTGCCAGTGAT-3'	386
	下游 5'-GACTTCGGCTGATAGACA-3'	
PI3K	上游 5'-GGGTACGATAACCGGGAGATA-3'	213
	下游 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'	
HER-2	上游 5'-CTCCTCAGCATCTTATCCGAGT-3'	456
	下游 5'-GCTGTCCGTCGCCAGTAGATTA-3'	

2.8 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计量资料正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据差异性比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达的影响 PI3K, p-Akt, HER-2 阳性信号表现为棕黄色或棕褐色均匀颗粒, 定位于细胞浆或细胞膜。空白组 PI3K, p-Akt, HER-2 染色深呈棕褐色, 且分布面积大数量多, 阳性率高, 阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组蛋白数量减少, 染色程度均减弱, 阳性率降低。与空白组比较, 各治疗组 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 阳和化岩汤组对 PI3K 抑制作用不明显, 差异无统计学意义。LY294002 + 阳和化岩汤组抑制作用最明显, LY294002 组次之, 阳和化岩汤组作用稍弱, 与 LY294002 组比较, LY294002 + 阳和化岩汤组 PI3K, p-Akt, HER-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 2。

3.2 对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达的影响 与空白组比较, 阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组均能够抑制 HER-2, p-Akt 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$);



A. 空白组; B. 阳和化岩汤组; C. LY294002 组; D. LY294002 + 阳和化岩汤组 (图 2, 3 同)

图 1 阳和化岩汤对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Yanghe Huayan Tang on protein expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in breast cancer cell lines (IHC, $\times 200$)

表 2 阳和化岩汤对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Yanghe Huayan Tang on protein expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in breast cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	HER-2	PI3K	p-Akt
空白	-	0.825 ± 0.146	0.749 ± 0.094	0.952 ± 0.083
阳和化岩汤	125	0.751 ± 0.034 ¹⁾	0.642 ± 0.147	0.743 ± 0.094 ¹⁾
LY294002	0.05	0.546 ± 0.189 ²⁾	0.434 ± 0.049 ²⁾	0.446 ± 0.189 ²⁾
LY294002 + 阳和化岩汤	0.05 + 125	0.374 ± 0.194 ^{2,3)}	0.286 ± 0.127 ^{2,3)}	0.331 ± 0.132 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 LY294002 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3, 4 同)。

LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组均能够有效抑制 PI3K 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 与 LY294002 组比较, LY294002 + 阳和化岩汤组 PI3K, p-Akt 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 3。

3.3 对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达的影响 与空白组比较, 阳和化岩汤组, LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组均能够降低 HER-2 mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); LY294002 组, LY294002 + 阳和化岩汤组均能够

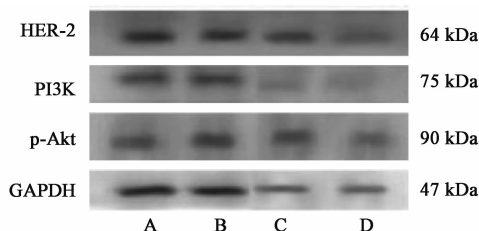


图 2 各组乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in breast cancer cell lines

表 3 阳和化岩汤对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Yanghe Huayan Tang on protein expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in breast cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	HER-2/GAPDH	PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH
空白	-	0.853 ± 0.027	0.876 ± 0.117	0.917 ± 0.074
阳和化岩汤	125	0.646 ± 0.040 ²⁾	0.686 ± 0.073	0.723 ± 0.066 ¹⁾
LY294002	0.05	0.690 ± 0.131 ¹⁾	0.480 ± 0.064 ¹⁾	0.749 ± 0.021 ¹⁾
LY294002 + 阳和化岩汤	0.05 + 125	0.571 ± 0.114 ²⁾	0.256 ± 0.058 ^{2,3)}	0.526 ± 0.036 ^{2,3)}

有效抑制 PI3K, p-Akt mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 LY294002 组比较, LY294002 + 阳和化岩汤组 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 4。

4 讨论

中医称乳腺癌为“乳岩”“乳石痈”, 其发病之本为正虚毒滞。肾阳亏虚, 冲任失调为本, 痰瘀毒结乳络为标。治疗以扶正祛邪, 温肾助阳、调摄冲任、化痰散结、活血解毒为基本原则。目前治疗中, 中药越来越多的参与进来, 中医药在减毒增效、减少并发症、

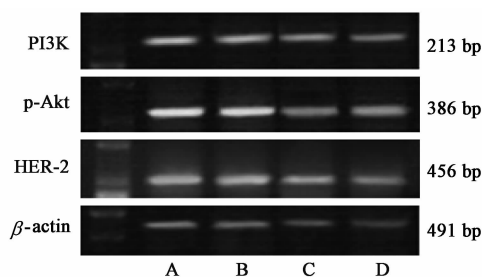


图 3 各组乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of HER-2, PI3K and p-Akt mRNA expressions in breast cancer cell lines

表 4 阳和化岩汤对乳腺癌细胞株 HER-2, PI3K, p-Akt mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Yanghe Huayan Tang on mRNA expressions of HER-2, PI3K and p-Akt in breast cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	HER-2/ β -actin	PI3K/ β -actin	p-Akt/ β -actin
空白	-	0.862 ± 0.081	0.848 ± 0.056	0.769 ± 0.022
阳和化岩汤	125	0.723 ± 0.003 ¹⁾	0.769 ± 0.109	0.713 ± 0.056
LY294002	0.05	0.560 ± 0.101 ¹⁾	0.424 ± 0.037 ²⁾	0.518 ± 0.149 ¹⁾
LY294002 + 阳和化岩汤	0.05 + 125	0.388 ± 0.068 ^{2,3)}	0.263 ± 0.028 ^{2,3)}	0.289 ± 0.009 ^{2,3)}

逆转耐药、减少复发转移等方面体现了重要作用^[13]。本课题所用阳和化岩汤系由《外科证治全生集》“阳和汤”化裁而来,在兼顾阳和汤温阳补血、散寒通滞的基础上,重加土贝母化痰散结而成。全方温肾助阳与化痰散结、活血祛瘀并用,现代药理学研究证实, β -榄香烯、鹿角霜、土贝母皂苷、熟地黄多糖、莪术醇、山慈菇中的秋水仙碱、姜黄素等成分可通过干预肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡、抑制转移以及脉管生成等多个靶点、环节,来阻断肿瘤的发生、发展^[14-18]。既往实验多采用血清药理学方法,而本实验制备阳和化岩汤肠吸收液,采用肠囊外翻技术,具备含药量高、成分多、干扰性成分少、活性显著等特点,有利于充分发挥中药药性^[19]。

HER-2 为原癌基因,定位于染色体 17q12-21 上,具有信号传导功能,调节细胞的生长和分裂^[20]。研究发现癌细胞内的 HER-2 基因扩增时,HER-2 蛋白过度累积,增加细胞信号传导,刺激癌细胞的快速增殖,增加癌细胞转移的概率^[21]。在临床中发现 HER-2 阳性乳腺癌患者恶性程度高,预后较差,主要表现在肿瘤临床分期晚、肿瘤负荷大、组织分级差、对内分泌药物和化疗药物易耐药。本研究采用 HER-2 高表达乳腺癌细胞株,采用不同方法观察 HER-2 蛋白表达情况,免疫组化结果显示,空白组 HER-2 染色深呈棕褐色,且分布面积大数量多,阳性率高,阳和化岩汤与 LY294002 染色均不同程度减弱,阳性率降低,LY294002 与阳和化岩汤联用变化最明显,更有效的降低 HER-2 蛋白染色程度,阳性表达最低。Western blot 和 RT-PCR 结果表明阳和化岩汤与 LY294002 能够降低 HER-2 表达,阳和化岩汤作用不及 LY294002,但二者联用对 HER-2 抑制作用最明显。HER-2 蛋白表达作为判断乳腺癌治疗效果的一个独立因素,在临床具有重要意义,本实验结果可为今后临床使用阳和化岩汤辅助治疗提供理论支持。

相关研究表明,HER-2 介导的信号转导途径主要有 PI3K/Akt 通路等,通过自身激活,诱导下游 PI3K/Akt 信号通路,活化细胞内的 PI3K,在细胞膜内侧生成 PIP3 与 PIP2, Akt 和 PIP3 结合后被激活,激活的 Akt 从细胞膜转移到细胞质和细胞核,通过 p-Akt 作用激活或抑制其下游靶蛋白调节细胞的增殖、凋亡以及迁移等^[22],药物干预细胞后,通过调控 HER-2 受体家族及其下游信号 PI3K/Akt 转导通路以及改变凋亡相关蛋白,促进细胞凋亡,抑制细胞增殖^[2]。LY294002 来源于槲皮素,是经典的 PI3K

抑制剂,其在上游非特异性地阻断 PI3K/Akt 信号通路,是其吗琳代氧与 γ 链上的位点缬氨酸形成氢键,从而抑制 PI3K 的活性,诱导肿瘤细胞凋亡^[23]。本次研究观察 PI3K/Akt 通路中 PI3K 和 p-Akt 表达,实验结果示阳和化岩汤组对 PI3K 的抑制作用不具有统计学差异,作为 PI3K 抑制剂 LY294002 组能够降低 PI3K 表达,而阳和化岩汤在与 LY294002 联合应用明显降低 PI3K 表达,提示阳和化岩汤存在协同 LY294002 通过某种途径进一步降低 PI3K 的作用,但其具体作用机制还有待进一步探讨。免疫组化, Western blot 和 RT-PCR 均提示治疗组能够降低 p-Akt 蛋白表达,LY294002 作用优于阳和化岩汤,阳和化岩汤在 + LY294002 组增强了 LY294002 抑制 p-Akt 表达的功效。本课题组前期工作结果已表明阳和化岩汤能够抑制乳腺癌细胞的增殖、促进其凋亡,本次实验从 PI3K/Akt 通路的角度对乳腺癌细胞增殖和凋亡机制做了初步的研究,证实了阳和化岩汤的作用。

综上所述,阳和化岩汤抑制乳腺癌细胞生成和转移的机制主要在于干预 PI3K/Akt 信号通路,通过抑制通路中上游因子 HER-2 的表达,从而降低 PI3K, p-Akt 的表达,另外,在本实验中,阳和化岩汤与 PI3K 抑制剂 LY294002 联用发挥了更好的效果,因此在抑制 HER-2 高表达型乳腺癌脉管生成与侵袭中,可望成为提高高侵袭性乳腺癌治疗疗效的增效剂。

[参考文献]

- [1] 张杰,郑慧,卢仁泉,等. 不同 HER-2 表达水平对乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(3):201-206.
- [2] 胡升芳,谷焕鹏,陈红凤,等. 乳宁 II 号方对 HER-2 过表达型乳腺癌 PI3K/Akt 信号通路的作用机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4):980-983.
- [3] 曾佳佳,杨润祥,刘蓉. 乳腺癌的靶向治疗研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(1):7-11.
- [4] Garcia C, Ibrahim Y H, Serra V, et al. Dual mTORC1/2 and HER-2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER-2 therapy [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(9):2603-2612.
- [5] 张刚,李中,林晓萌,等. PI3K/Akt 信号通路在乳腺癌中的表达及其意义[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(20):3475-3478.
- [6] 肖洋炯,张萍,黄明辉,等. 两种常用 PI3K 抑制剂对人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/MIT 耐药性的不同影响

- [J]. 肿瘤, 2009, 29(7): 620-625.
- [7] 卞磊, 陈光伟, 马阳. 温阳法治恶性肿瘤体会[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(10): 872-873.
- [8] 刘晓菲, 殷玉琨, 王蕾, 等. 阳和化岩汤对大鼠乳腺癌前病变的抑制作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 284-287.
- [9] 李静蔚, 刘晓菲, 陈宏志. 温阳散结法干预乳腺癌前病变 MCF-10AT 细胞的生长抑制及诱导凋亡研究[J]. 中医药学报, 2013, 41(4): 41-45.
- [10] 李静蔚, 刘晓菲, 梁栋, 等. 阳和化岩汤对大鼠乳腺癌前病变细胞超微结构的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(1): 42-46.
- [11] 刘晓菲, 李静蔚, 李湘奇, 等. 阳和化岩汤对 HER-2 高表达型裸鼠荷瘤模型肿瘤血管生成的影响及机制的研究[J]. 中药材, 2018, 41(6): 1468-1471.
- [12] 黄斌, 李耿, 郭宇飞, 等. 脑心通胶囊中 4 个成分肠吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 889-893.
- [13] 周阿高, 李琰. 中医药对乳腺癌患者生存质量影响的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 220-222.
- [14] 鲍悦, 高久堂, 孙佳明, 等. 中药鹿角胶的研究进展[J]. 吉林中医药, 2016, 36(2): 173-175, 204.
- [15] 梁颖, 徐绍娜, 徐放, 等. 熟地黄多糖对环磷酰胺诱导小鼠的抗突变作用研究[J]. 中医药信息, 2010, 27(4): 110-112.
- [16] 陈洋洋, 王瑞莉, 王斌, 等. 土贝母皂苷乙诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的研究[J]. 中国中医急症, 2017, 26(8): 1336-1339.
- [17] 袁理春, 陈保生, 吕丽芬. 丽江山慈菇栽培技术研究初报[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 98-99.
- [18] 赵志梅, 张立杰, 夏天, 等. 莪术主要单体成分抗炎、抗肿瘤作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 119-124.
- [19] 陈晓鹏, 李昂, 褚扬, 等. 养血清脑颗粒中有效成分的肠外翻吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4): 159-162.
- [20] Nuciforo P, Thyparambil S, Aura C, et al. High HER-2 protein levels correlate with increased survival in breast cancer patients treated with anti-HER-2 therapy [J]. Mol Oncol, 2016, 10(1): 138-147.
- [21] Nitta H, Kelly B D, Allred C, et al. The assessment of HER-2 status in breast cancer: the past, the present, and the future[J]. Pathol Int, 2016, 66(6): 313-324.
- [22] Garcia-Garcia C, Ibrahim Y H, Serra V, et al. Dual mTORC1/2 and HER-2 blockade results in antitumor activity in preclinical models of breast cancer resistant to anti-HER-2 therapy[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(9): 2603-2612.
- [23] HU L, Zaloudek C, Mills G B, et al. *In vivo* and *in vitro* ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3 kinase in-hibitor (LY294002) [J]. Clin Cancer Res, 2009, 6(3): 880-886.

[责任编辑 张丰丰]