

本文引用: 谢珠珠, 杨柯鸿, 冯文静, 邹攀, 钱荣康, 钱荣华. 羟基积雪草酸对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和自噬的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 771-777.

羟基积雪草酸对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和自噬的影响

谢珠珠¹, 杨柯鸿¹, 冯文静¹, 邹攀², 钱荣康³, 钱荣华^{1*}

1. 湖南中医药大学医学院, 血管生物学与转化医学湖南省高校重点实验室, 湖南长沙 410208;

2. 广西壮族自治区南溪山医院, 广西桂林 541002; 3. 钱荣康诊所, 湖南娄底 417700

[摘要] **目的** 探讨羟基积雪草酸(madecassic acid, MA)对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及自噬的影响。**方法** 将 MCF-7 细胞分为阴性对照组、不同浓度的 MA(80、100、120、140、160 $\mu\text{mol/L}$)组、不同浓度的他莫昔芬(10、20、30、40、50、35 $\mu\text{mol/L}$)组, 干预 24、36、48 h。初步确定 MA 发挥抗乳腺癌作用的最佳浓度和最佳时间后, 采用 MTT 法检测细胞活力, 计算相应的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})值; 流式细胞术检测细胞凋亡; JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位变化; Western blot 法检测细胞增殖蛋白细胞核抗原蛋白(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、自噬蛋白苜蓿素-1(Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3- II/I (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I , LC3 II/I)、整合素 1(integrin $\alpha 5$, p62)的蛋白相对表达水平。透射电镜检测自噬小体。**结果** 发挥抗肿瘤作用的他莫昔芬最佳浓度为 35 $\mu\text{mol/L}$, MA 最佳浓度为 140 $\mu\text{mol/L}$, 最佳时间均为 48 h。与阴性对照组相比, MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组和他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率, 细胞荧光相对强度以及 LC3 II/I 、Beclin-1 蛋白相对表达水平均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); PCNA、P62 蛋白相对表达水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率、细胞荧光相对强度以及 Beclin-1 蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.01$), PCNA 蛋白相对表达水平明显降低($P < 0.01$)。阴性对照组 MCF-7 细胞膜完整, 核膜清晰, 细胞形态良好; MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞膜、细胞核形态不规则, 线粒体基质密度较高、嵴扩张, 可见自噬小体; 他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞膜局部溶解、破损, 可见双核仁, 线粒体肿胀、基质溶解, 可见自噬小体。**结论** MA 可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖、诱导细胞凋亡和自噬。

[关键词] 乳腺癌; 羟基积雪草酸; 增殖; 凋亡; 自噬; MCF-7 细胞

[中图分类号] R271

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.008

Effects of madecassic acid on proliferation, apoptosis, and autophagy of breast cancer MCF-7 cells

XIE Zhuzhu¹, YANG Kehong¹, FENG Wenjing¹, ZOU Pan², QIAN Rongkang³, QIAN Ronghua^{1*}

1. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin, Guangxi 541002, China; 3. Qian Rongkang Clinic, Loudi, Hunan 417700, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of madecassic acid (MA) on the proliferation, apoptosis, and autophagy of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-7 cells were assigned into negative control group, MA (80, 100, 120, 140, 160 $\mu\text{mol/L}$) groups with different concentrations, and tamoxifen (10, 20, 30, 40, 50, 35 $\mu\text{mol/L}$) groups with different concentrations, and they were treated for 24, 36, and 48 h respectively. After the optimal concentration and time of MA anti-breast cancer effect were preliminarily determined, the cell viability was checked by MTT, and the corresponding half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value was calculated. Flow cytometry was taken to detect apoptosis. JC-1 fluorescent probe was applied to check mitochondrial membrane potential changes. Western blot was used to determine the relative expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), autophagy protein Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3- II/I (LC3 II/I), and chelate 1

[收稿日期] 2023-11-17

[基金项目] 湖南省科技计划项目(2014FJ3085); 湖南省教育厅基金项目(14C0858); 湖南中医药大学重点项目(2021XJJ001); 广西壮族自治区中医药局自筹经费科研课题项目(GXZYC20230219)。

[通信作者] * 钱荣华, 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: rhqian@hnu.cm.edu.cn。

(protein 62, p62). Transmission electron microscopy was used to detect autophagosomes. **Results** The optimal concentration of tamoxifen and MA were 35 $\mu\text{mol/L}$ and 140 $\mu\text{mol/L}$ respectively, and the optimal time was 48 h. Compared with the negative control group, the apoptosis rate, fluorescence relative intensity, and relative expression levels of LC3 II/I and Beclin-1 protein in the MA 140 $\mu\text{mol/L}$ group and tamoxifen 35 $\mu\text{mol/L}$ group increased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the relative expression levels of PCNA and p62 decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the MA 140 $\mu\text{mol/L}$ group, the apoptosis rate, fluorescence relative intensity, and relative expression level of Beclin-1 protein in the tamoxifen 35 $\mu\text{mol/L}$ group were significantly higher ($P<0.01$), and the relative expression level of PCNA protein was significantly lower ($P<0.01$). In the negative control group, the cell membrane of MCF-7 was intact, the nuclear membrane was clear, and the cell morphology was good; the cell membrane and nuclear morphology of the MA 140 $\mu\text{mol/L}$ group were irregular, the mitochondrial matrix density was high, the ridge was expanded, and autophagosomes were visible; and the cell membrane of the tamoxifen 35 $\mu\text{mol/L}$ group was partially dissolved and damaged, mitochondrial were swelling, matrix lysis was seen, and the double nucleoli and autophagosomes were visible. **Conclusion** MA can inhibit the proliferation of breast cancer MCF-7 cells and induce cell apoptosis and autophagy.

[**Keywords**] breast cancer; madecassic acid; proliferation; apoptosis; autophagy; MCF-7 cells

据统计,2022年中国女性乳腺癌新增病例数约42万,死亡例数约12万^[1]。临床上治疗乳腺癌的方法包括乳腺癌根治术、放射治疗、化学治疗等^[2],但也存在较大的不良反应,患者预后不理想。细胞自噬在肿瘤中发挥双重作用,受肿瘤分期、突变和细胞环境的影响^[3]。细胞凋亡是对刺激、感染或损伤等正常生理细胞的死亡反应,主要由胱天蛋白酶家族、线粒体途径和死亡受体诱导配体途径调控^[4]。他莫昔芬是一种非甾体抗雌激素药物,其结构式与雌激素相似,可与雌二醇争夺雌激素受体,从而抑制雌激素的作用^[5]。近年来,中医药基于整体辨证观治疗乳腺癌有着独特的作用,如可以改善患者临床症状、降低患者脏器毒性,提高患者生活质量等^[5-6]。石见穿含有多种活性成分,如中药单体熊果酸^[7]、齐墩果酸^[8]、五味子甲素^[9]及羟基积雪草酸(madecassic acid, MA)^[10]。MA分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$,相对分子质量为504.7^[11]。已有研究表明,MA具有镇痛^[12]、抗氧化^[13]、预防急性肺损伤^[14]、抑制骨破坏^[15]等药理作用。课题组前期已证实,中药石见穿能通过抑制乳腺癌细胞的增殖、促使乳腺癌细胞凋亡起到抗乳腺癌的作用^[16-17]。本研究从细胞增殖、凋亡和自噬方面对MA抗乳腺癌的作用进行初步研究。

1 实验材料

1.1 细胞株

乳腺癌 MCF-7 细胞株,购于中科院上海细胞库,由课题组传代培养。

1.2 主要试剂与药物

RPMI-1640 基础培养基、50 mL 瓶装特级胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(双抗)、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(含酚红)、无血清非程序冻存液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为 PM150110、164210-50、PB180120、PB180226、PB180438-100); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、SDS-PAGE 凝

胶配制试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0010、P0012A);RIPA 裂解液(强)、膜联蛋白 V-FITC/P 细胞凋亡检测试剂盒、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、 β -actin(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G2002、G1511、GC203002、GB15003); 线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-CK-A301);兔抗细胞增殖蛋白细胞核抗原蛋白(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、自噬蛋白 1(Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 II/I(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II/I, LC3 II/I)、螯合蛋白 1(protein 62, p62)(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 60097-1-Ig、18420-1-AP、11306-1-AP、14600-1-AP);他莫昔芬粉剂标准品(美国 MCE 公司,批号:HY-13757A);MA 粉剂标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:B20970);山羊抗兔二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号:AWS0002a)。

1.3 主要仪器

CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:il60);台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:Eppendor5810R);多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司,型号:SPARK);化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司,型号:ChemiDocXRS+);干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司,型号:MK200-2);台式恒温振荡器(美国 Crystal Technology and Industries 公司,型号:IS-RDD3);倒置显微镜(德国 Carl Zeiss 公司,型号:Axio Vert.A1)。

2 实验方法

2.1 药物制备

MA 加入 396 μL DMSO 溶解,制备成 100 mmol/L 的储备液;他莫昔芬粉剂加入 20 mL DMSO 溶解,制备成 67.29 mmol/L 的储备液。药物分装避光保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,配药时用 1640 完全培养基稀释。

2.2 细胞培养

乳腺癌 MCF-7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养基,培养箱设置参数为 5% CO₂、37 ℃。

2.3 MTT 法检测细胞活力

用胰蛋白酶消化对数生长期的 MCF-7 细胞,制成细胞悬液,96 孔板每孔细胞密度为 4 000 个细胞,实验分组为:阴性对照组、不同浓度的 MA (80、100、120、140、160 μmol/L)组、不同浓度的他莫昔芬 (10、20、30、40、50 μmol/L)组。

细胞贴壁后,空白孔只加 200 μL 的 1640 完全培养基,阴性对照组加入 200 μL 的 MCF-7 细胞悬液,各药物组加入相应的 200 μL 药液,干预 24、36、48 h 后,加入 50 μL MTT,5% CO₂、37 ℃培养箱孵育 4 h 后,弃上清液,加入 150 μL DMSO,490 nm 处检测 OD 值。细胞增殖率=(各实验组 OD 值-空白孔 OD 值)/(阴性对照组 OD 值-空白孔 OD 值)×100%。采用软件 Graphpad Prism 8.0 计算相应的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

选择对数生长期的 MCF-7 细胞,用胰蛋白酶消化成细胞悬液,均匀种在小皿中,将细胞分为 3 组:阴性对照组、MA 140 μmol/L 组、他莫昔芬 35 μmol/L 组,药物干预 48 h 后,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化液消化重悬细胞,以 1 000 r/min 离心 3 min (离心半径 9 cm)。

PBS 清洗 2 次,按照试剂盒说明,1×Binding buffer 重悬细胞,转移到 1.5 mL 离心管中,各孔加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 PI 染料,避光孵育 30 min 后上机检测,双荧光细胞分析仪软件分析数据,实验重复 3 次。

2.5 JC-1 线粒体膜电位检测细胞凋亡

相同方法处理细胞后,均匀种在 6 孔板中,药物分组同“2.4”,药物干预 48 h 后,按照试剂盒说明,先配制 JC-1 工作液和 1×JC-1 缓冲液,吸弃培养上清液,用 1×JC-1 缓冲液清洗细胞一次,每孔加入 1 mL JC-1 工作液,37 ℃孵育 20 min,孵育结束后,再用 1×JC-1 缓冲液清洗细胞一次,加入 2 mL 细胞培养基,荧光显微镜下拍照。

2.6 Western blot 检测细胞蛋白表达水平

将对数期细胞制成细胞悬液接种于大皿,药物分组同“2.4”,药物干预 48 h 后,提取蛋白,按照 BCA 定量试剂盒定量,配样、点样、电泳、转膜、封闭,4 ℃过夜孵育一抗 PCNA (1:30 000)、p62 (1:10 000)、Beclin-1 (1:5 000)、LC3 II/I (1:5 000)、β-actin (1:1 500)。洗膜、室温孵育二抗 (1:10 000)

1.5 h,洗膜,Image Lab 上机显影。Image J 分析条带灰度值,实验重复 3 次。

2.7 透射电镜检测自噬小体

将对数生长期的 MCF-7 细胞接种于小皿,药物分组同“2.4”,处理 48 h 后,弃旧培养基,加入胰酶消化,制成细胞悬液,以 1 000 r/min 低速离心 3 min (离心半径 9 cm)。弃上清液,加入电镜固定液,细胞团吹散重悬,室温避光固定 30 min,转入 4 ℃,离心、脱水、包埋、超薄切片后,透射电镜下观察细胞内自噬小体形成情况。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件及 Graphpad Prism 8.0 绘图软件分析,计量资料服从正态分布者,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法,设置检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 他莫昔芬和 MA 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的最佳浓度和时间

与阴性对照组比较,他莫昔芬各浓度组在干预 MCF-7 细胞 24、36、48 h 后对细胞活力有明显的抑制作用 ($P<0.01$),且随他莫昔芬浓度增加,MCF-7 细胞活力逐渐降低 ($P<0.01$)。详见图 1。经计算,24、36、48 h 的 IC₅₀ 值分别为 36.20、35.25、34.58 μmol/L,故选择 48 h 和 35 μmol/L 他莫昔芬作为后续实验条件。

与阴性对照组、MA 80 μmol/L 组、MA 100 μmol/L 组比较,在 MA 干预 24、36 h 后 MA 120 μmol/L 组、MA 140 μmol/L 组、MA 160 μmol/L 组细胞活力下降 ($P<0.01$)。MA 干预 36 h,与阴性对照组比较,MA 80 μmol/L 组、MA 100 μmol/L 组细胞活力下降 ($P<0.05, P<0.01$);与 MA 80 μmol/L 组比较,MA 100 μmol/L 组细胞活力明显下降 ($P<0.01$)。与 MA 120 μmol/L 组比较,干预 36、48 h 的 MA 140 μmol/L 组细胞活力下降 ($P<0.01$);与 MA 120 μmol/L 组、MA 140 μmol/L 组比较,干预 24、36、48 h 后的 MA 160 μmol/L 组细胞活力下降 ($P<0.01$)。与阴性对照组、MA 80 μmol/L 组、MA 100 μmol/L 组、MA 120 μmol/L 组、MA 140 μmol/L 组比较,他莫昔芬 35 μmol/L 组在他莫昔芬干预 24、36 h 后细胞活力明显降低 ($P<0.01$);与 MA 160 μmol/L 组比较,干预 24 h 后细胞活力明显降低 ($P<0.01$)。干预 48 h 后,与阴性对照组、MA 80 μmol/L 组、MA 100 μmol/L 组、MA 120 μmol/L 组比较,他莫昔芬 35 μmol/L 组细胞活力明显降低 ($P<0.01$);与 MA 160 μmol/L 组比较,他莫昔芬 35 μmol/L 组细胞活力明显升高 ($P<0.01$)。

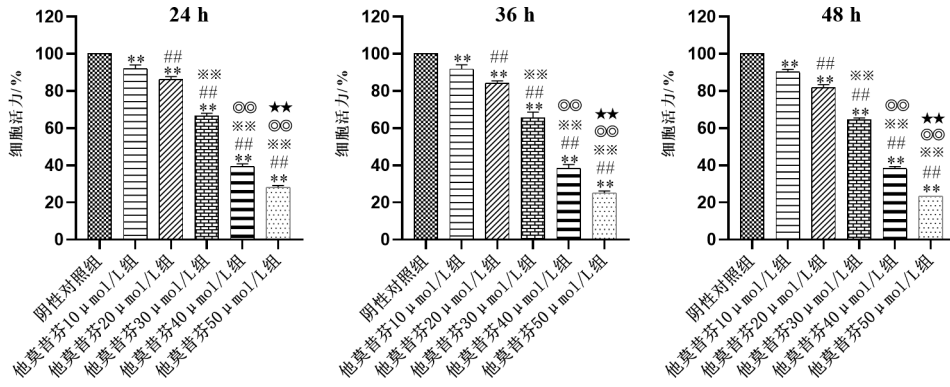


图 1 他莫昔芬对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响

注:与阴性对照组比较, ** $P<0.01$;与他莫昔芬 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P<0.01$;与他莫昔芬 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, @ $P<0.01$;与他莫昔芬 30 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P<0.01$ 。

详见图 2。经计算 24、36、48 h 的 IC_{50} 分别为 184.6、164.2、140.3 $\mu\text{mol/L}$, 选择 48 h 和 140 $\mu\text{mol/L}$ MA 作为后续实验条件。

3.2 MA 对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响

与阴性对照组比较, 干预 48 h 后 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组和他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$), 且他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率高

于 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P<0.01$)。详见图 3、表 1。

3.3 MA 对乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

与阴性对照组相比, 干预 48 h 后 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组和他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组视野下 MCF-7 细胞数量呈现不同程度的减少, 可见细胞碎片, 细胞的绿色荧光明显增多、红色荧光减少, 细胞荧光相对强度呈现不同程度的升高 ($P<0.01$); 与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$

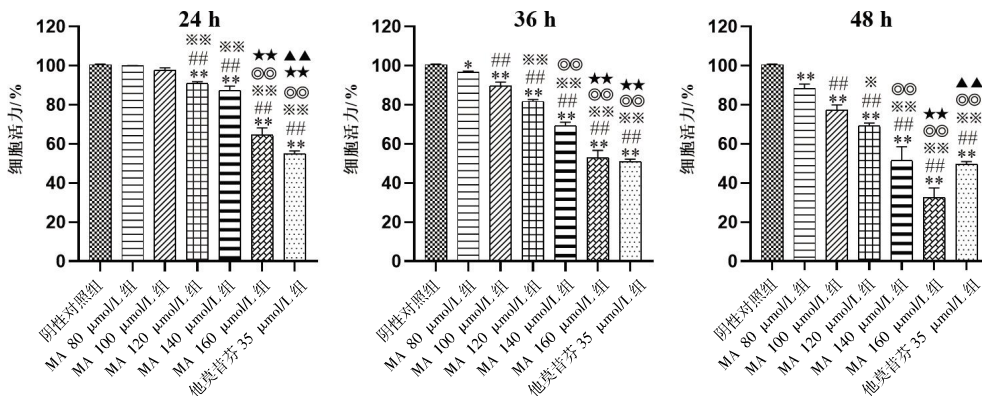
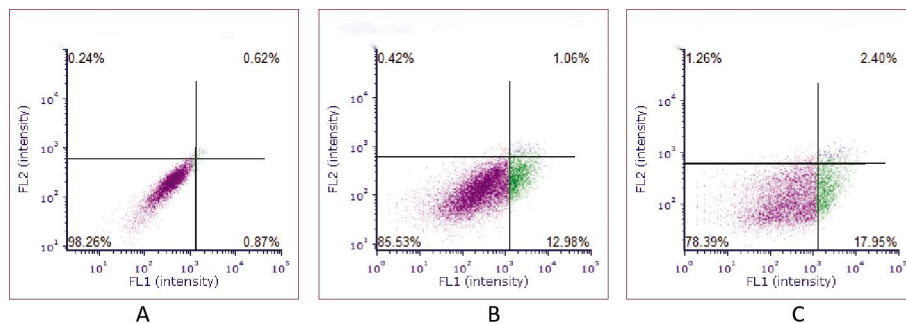


图 2 MA 对乳腺癌 MCF-7 细胞活力的影响

注:与阴性对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 MA 80 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P<0.01$;与 MA 100 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, @ $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 MA 120 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, @ $P<0.01$;与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ** $P<0.01$;与 MA 160 $\mu\text{mol/L}$ 比较, ^ $P<0.01$ 。



■ Lower left: live ■ Lower right: apoptosis ■ Uper right: necrotic ■ Uper left: debris

图 3 MA 对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响

注: A. 阴性对照组; B. MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组; C. 他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组。

表1 乳腺癌 MCF-7 细胞 48 h 后的凋亡率($\bar{x}\pm s$)

分组	细胞凋亡率/%
阴性对照组	1.327±0.4290
MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组	14.12±0.4454**
他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组	19.24±2.354**#

注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$;与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P<0.01$ 。

组比较,他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞数量更少,细胞碎片更多,荧光相对强度升高更明显($P<0.01$)。详见图4—5。

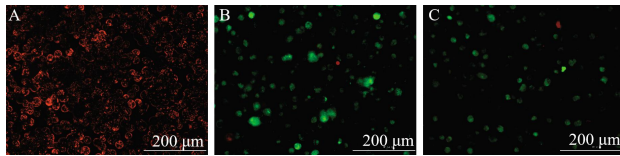


图4 MA对乳腺癌 MCF-7 细胞线粒体膜电位的影响

(JC-1 染色, $\times 200$)

注:A.阴性对照组;B. MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组;C.他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组。

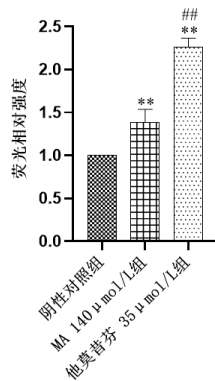


图5 MA对乳腺癌 MCF-7 细胞荧光相对强度的影响

注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$;与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,# $P<0.01$ 。

3.4 MA对乳腺癌 MCF-7 细胞 PCNA、p62、Beclin-1、LC3 II/I 蛋白相对表达量的影响

与阴性对照组相比,MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组和他莫昔

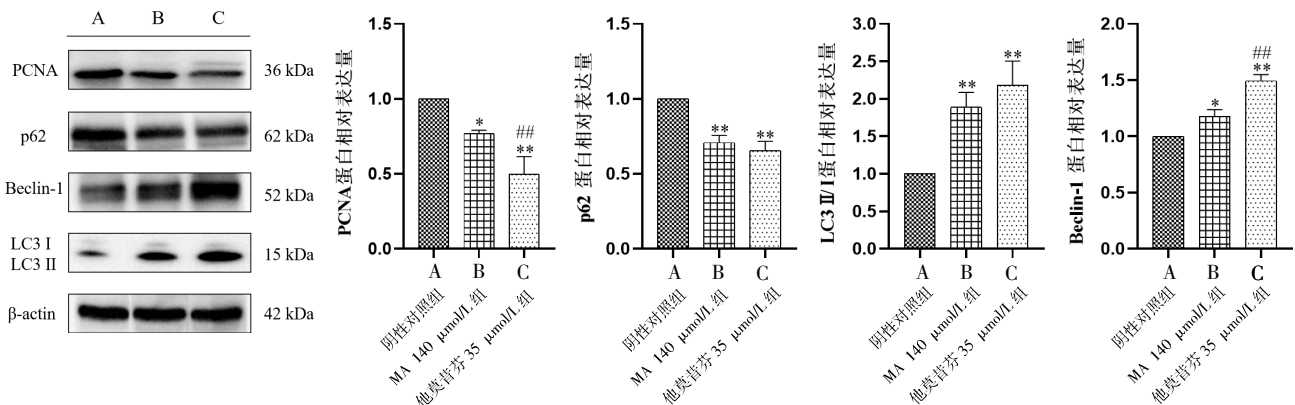


图6 MA对乳腺癌 MCF-7 细胞 PCNA、p62、Beclin-1 和 LC3 II/I 蛋白相对表达量的影响

注:A.阴性对照组;B. MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组;C.他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组。与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,# $P<0.01$ 。

芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组的自噬蛋白 p62、增殖蛋白 PCNA 的蛋白相对表达量呈不同程度的下降趋势($P<0.05$, $P<0.01$),自噬蛋白 Beclin-1 和 LC3 II/I 的蛋白相对表达量呈不同程度的升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与 MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,他莫昔芬组 35 $\mu\text{mol/L}$ 组的增殖蛋白 PCNA 相对表达量降低更明显($P<0.01$),自噬蛋白 Beclin-1 的相对表达量升高更明显($P<0.01$)。详见图 6。

3.5 MA对乳腺癌 MCF-7 自噬小体的影响

阴性对照组细胞膜完整,膜周围可见微绒毛,染色质均匀,核膜清晰,线粒体膜完整,基质均匀,嵴存在,粗面内质网未见明显扩张。MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞形态不规则,细胞核不规则,局部凹陷,线粒体膜及膜内基质密度较高,嵴轻微扩张,粗面内质网略扩张,可见自噬小体。他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞形态明显不规则,细胞膜局部明显溶解、破损,细胞核不规则,可见双核仁,线粒体明显肿胀,基质较多溶解,嵴断裂、消失,粗面内质网略扩张,脂滴数量较多,形态皱缩,可见自噬小体。详见图 7。

4 讨论

临床上将乳腺癌分为 Luminal A 型、Luminal B 型、人表皮生长因子受体 2 型和三阴性乳腺癌 4 种亚型^[18]。乳腺癌的发生与肥胖^[19]、激素水平^[20]、血管内皮生长因子^[21]等因素相关,体内的乳腺癌易感基因 1 和乳腺癌易感基因 2 发生基因突变则女性患乳腺癌的概率会比普通人增加数倍^[22]。手术、放射治疗和化学治疗是治疗乳腺癌的首选,但治疗后仍存在一定的不良反应^[23]。中医药管理局认可的 95 种中药中,有许多被证实对乳腺癌具有一定的疗效,其中,活血化瘀类中药能够改善微循环,纠正肿瘤组织的缺氧状态^[24-25]。中药方剂具有多成分、多靶点、协同作用的特点^[26-28]。近年来中医药被证实在治疗乳腺癌

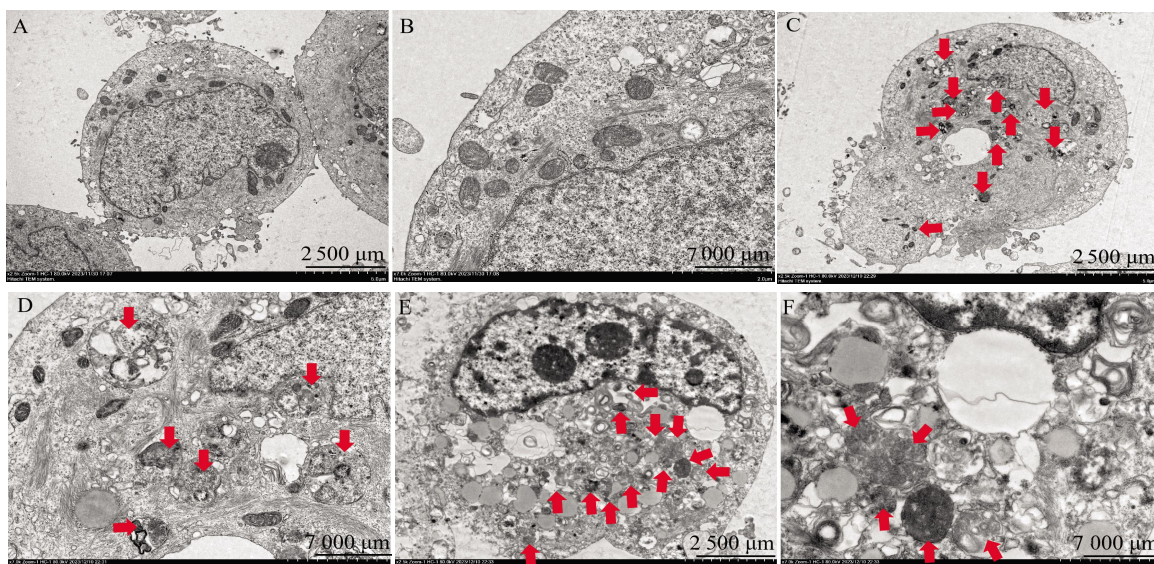


图7 MA对乳腺癌MCF-7细胞内自噬小体的影响(透射电镜)

注:A、B.阴性对照组;C、D. MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组;E、F.他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组。

方面具有多种独特作用,如改善患者生存期、减轻化学治疗不良反应^[6]、缓解乳腺癌术后上肢淋巴水肿^[29]、减少术后皮下积液产生^[30]、延长乳腺癌患者内分泌耐药的无进展生存期^[31]等。中医药可通过汤剂、中药注射液、穴位、针灸、食疗、足浴等方法改善乳腺癌患者化学治疗后的相关不良反应^[32]。本研究在课题组前期基础上,选取中药单体MA——石见穿提取物活性化学成分之一进一步实验。

本研究首先用MTT法确定了MA和他莫昔芬干预乳腺癌MCF-7细胞的最佳浓度和处理时间,即48 h,他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 、MA 140 $\mu\text{mol/L}$,以此为实验条件。用Annexin V-FITC/PI双荧光染色法检测MA诱导乳腺癌MCF-7细胞的凋亡率。结果显示,MA能明显诱导MCF-7细胞发生凋亡,细胞以早期凋亡为主,而他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组MCF-7细胞凋亡效果优于MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组,其晚期凋亡和死亡细胞数量均多于MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组。在正常细胞内,线粒体膜电位较高,JC-1以多聚体形式存在于线粒体基质中,显示红色荧光;凋亡早期,线粒体膜电位降低,JC-1以单体形式存在于线粒体基质中,产生绿色荧光。结果提示,阴性对照组红色荧光多、视野内细胞聚集,而MA 140 $\mu\text{mol/L}$ 组和他莫昔芬 35 $\mu\text{mol/L}$ 组均呈现了不同程度的绿色荧光增多,视野内细胞数量减少,可见细胞碎片,表明MA和他莫昔芬处理MCF-7细胞48 h后使细胞的线粒体膜电位降低,他莫昔芬比MA降低更明显。PCNA是检测细胞增殖的常用指标^[33],Western blot结果显示,MA干预MCF-7细胞后增殖蛋白PCNA的相对表达水平呈现下降趋势,表明MA抑制了MCF-7细胞的增殖。

细胞自噬在肿瘤中具有双重作用,生理条件下一定程度的自噬能够清除机体中的代谢废物,但病理条件下的自噬不足或自噬过度则会使细胞内环境稳态失衡,甚至导致细胞死亡^[34]。自噬过程受自噬相关蛋白(autophagy-related proteins, ATG)的调控。为确定MA干预乳腺癌MCF-7细胞后对细胞自噬的效应,采用Western blot检测细胞自噬相关蛋白p62、Beclin-1、LC3 II/I的表达水平。p62与LC3是自噬形成的关键蛋白^[35],Beclin-1是自噬关键调节因子,Beclin-1的表达水平可以影响自噬反应^[36]。Western blot结果显示,与阴性对照组相比,MA和他莫昔芬处理MCF-7细胞后使自噬p62的蛋白相对表达量呈下降趋势,Beclin-1和LC3 II/I的蛋白相对表达量呈升高趋势,表明MA能够诱导乳腺癌MCF-7细胞发生自噬,而他莫昔芬诱导MCF-7细胞发生自噬的效果强于MA。自噬的特征在于形成有双膜囊泡的自噬体,可以降解和回收细胞内物质^[37]。通过透射电镜观察乳腺癌MCF-7细胞内的自噬小体情况,结果显示,与阴性对照组相比,加入MA和他莫昔芬后MCF-7的细胞膜、线粒体、核仁、染色质等形态呈现不规则变化,可见自噬小体,表明MA和他莫昔芬使乳腺癌MCF-7细胞的自噬水平升高,他莫昔芬诱导MCF-7细胞自噬水平发生高于MA。

综上所述,通过MTT法、流式细胞术、线粒体膜电位染色、透射电镜、Western blot法证实了MA能够抑制乳腺癌MCF-7细胞增殖、诱导细胞凋亡和自噬,与降低增殖蛋白PCNA、自噬p62蛋白表达水平,升高自噬蛋白Beclin-1和LC3 II/I的蛋白表达水平有关。本研究初步探讨了MA抗乳腺癌的作用,后

续将对 MA 是否通过信号通路发挥抗乳腺癌的作用进一步研究,为中医药治疗乳腺癌提供新的方案。

参考文献

- [1] XIA C F, DONG X S, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants[J]. *Chinese Medical Journal*, 2022, 135(5): 584–590.
- [2] KERR A J, DODWELL D, MCGALE P, et al. Adjuvant and neoadjuvant breast cancer treatments: A systematic review of their effects on mortality[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2022, 105: 102375.
- [3] DEBNATH J, GAMMOH N, RYAN K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(8): 560–575.
- [4] MORANA O, WOOD W, GREGORY C D. The apoptosis paradox in cancer[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1328.
- [5] 李萍萍. 中医药治疗乳腺癌述评[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(11): 1616–1622.
- [6] 杨国旺. 乳腺癌中西医结合治疗研究进展[J]. *北京中医药*, 2024, 43(1): 2–6.
- [7] 周文静, 马艳苗, 张 萌, 等. 石见穿治疗肺癌的网络药理学机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(6): 677–684.
- [8] 刘利艳, 施 旻, 陈 力, 等. 利用网络药理学与分子对接技术分析石见穿在治疗癌症中的作用机制[J]. *实用癌症杂志*, 2021, 36(10): 1572–1576.
- [9] 彭 勃, 任钧国, 刘建勋. 石见穿化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(7): 82–84.
- [10] 黄雯洁, 阮 帅, 温 芳, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的石见穿化学成分分析及其治疗胃癌的网络药理学探究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2020, 57(6): 1198–1208.
- [11] 金贝贝, 刘馨. 羟基积雪草酸抑制人舌癌 Tca8113 细胞增殖的机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(11): 1528–1530.
- [12] 白溪山, 邓超锐, 李育晓, 等. 羟基积雪草酸的镇痛活性及其作用机制研究[J]. *中国药科大学学报*, 1–8[2024-04-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1157.R.20240227.0917.002.html>.
- [13] 郑 旭, 李世豪, 王雨萌, 等. 羟基积雪草酸抗氧化作用及机制研究[C]//中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十八届年会摘要集. 天津: 大学化工学院食品科学与工程系, 2022: 2.
- [14] 韩 振, 宋卫东, 梁宇平, 等. 羟基积雪草酸预防脓毒症小鼠急性肺损伤的作用[J]. *遵义医科大学学报*, 2023, 46(9): 841–845, 855.
- [15] 喻伟光, 田振峰, 李彦敏, 等. 羟基积雪草酸通过调控 MMPs 的表达抑制大鼠炎性骨破坏的作用研究[J]. *医学动物防制*, 2021, 37(1): 57–60, 103.
- [16] 刘 媛. 石见穿诱导乳腺癌细胞凋亡及其分子机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2018.
- [17] 刘 媛, 钱荣康, 钱荣华. 石见穿及其提取物抗肿瘤的研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(30): 3417–3420.
- [18] QIU D, ZHANG G J, YAN X X, et al. Prospects of immunotherapy for triple-negative breast cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 797092.
- [19] 阮 慧, 邓显光, 范洪桥, 等. 肥胖影响乳腺癌发病的机制研究进展[J]. *浙江医学*, 2024, 46(4): 429–433.
- [20] 魏 万, 唐 杰, 封紫玉, 等. 雄激素受体有望成为乳腺癌中新的生物标志物[J]. *安徽医药*, 2023, 27(12): 2343–2346.
- [21] 周小妹, 罗 波. 影响三阴性乳腺癌免疫检查点抑制剂疗效的潜在生物学因素[J]. *肿瘤*, 2023, 43(2): 143–150.
- [22] 杨琛攀, 宋 颖, 申培红, 等. 乳腺癌易感基因 1/2 和特异性基因 1 与乳腺癌发生发展的相关性[J]. *河南医学研究*, 2019, 28(5): 956–958.
- [23] KHOSRAVI-SHAHI P, CABEZÓN-GUTIÉRREZ L, APARICIO SALCEDO M I. State of art of advanced triple negative breast cancer[J]. *The Breast Journal*, 2019, 25(5): 967–970.
- [24] BAI J, KWOK W C, THIERY J P. Traditional Chinese Medicine and regulatory roles on epithelial-mesenchymal transitions[J]. *Chinese Medicine*, 2019, 14: 34.
- [25] ZHAI B T, ZHANG N N, HAN X M, et al. Molecular targets of β -elemene, a herbal extract used in traditional Chinese medicine, and its potential role in cancer therapy: A review[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2019, 114: 108812.
- [26] JIANG M Y, ZHAO S J, YANG S S, et al. An "essential herbal medicine"-licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 249: 112439.
- [27] JIANG M Y, SHENG F Y, ZHANG Z, et al. *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees and its major constituent andrographolide as potential antiviral agents[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 272: 113954.
- [28] JIANG H J, LI J, WANG L, et al. Total glucosides of paeony: A review of its phytochemistry, role in autoimmune diseases, and mechanisms of action[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 258: 112913.
- [29] 陈虎虎, 周姣含, 邱 倩, 等. 中医药治疗乳腺癌的研究进展[J]. *西部中医药*, 2023, 36(12): 152–155.
- [30] 杨 帆, 全建峰. 中医药治疗乳腺癌根治术后相关并发症研究进展[J]. *河北中医*, 2023, 45(11): 1924–1928.
- [31] 王鲁娇, 李育林, 司文涛, 等. 中医药治疗乳腺癌内分泌耐药的研究进展[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2023, 5(5): 84–94.
- [32] 李晶晶, 孙 涛. 中医药改善乳腺癌化疗不良反应概况[J]. *中医临床研究*, 2020, 12(14): 133–135.
- [33] 李红玉, 陈硕然, 戴 安, 等. PCNA 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*, 2020, 41(1): 118–119, 122.
- [34] DEBNATH J, GAMMOH N, RYAN K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(8): 560–575.
- [35] 罗 成, 叶远航, 涂晋文, 等. 中药调控自噬相关通路抗肺癌的研究进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(11): 1155–1164.
- [36] PRERNA K, DUBEY V K. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 204: 258–273.
- [37] HOLLENSTEIN D M, KRAFT C. Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2020, 65: 50–57.