

本文引用: 覃妮, 刘怡江, 王万平, 黄丽银, 覃文晖, 胡正国, 陆世银. 白花蛇舌草多糖调节 CXCL12/CXCR4 轴对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(5): 778-784.

## 白花蛇舌草多糖调节 CXCL12/CXCR4 轴对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

覃妮<sup>1,2</sup>, 刘怡江<sup>1</sup>, 王万平<sup>1</sup>, 黄丽银<sup>1</sup>, 覃文晖<sup>1</sup>, 胡正国<sup>3</sup>, 陆世银<sup>1,2\*</sup>

1. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院)药学部, 广西柳州 545026; 2. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院), 中药(壮瑶药)制剂研发重点实验室, 中药(壮瑶药)制剂开发工程技术研究中心, 广西柳州 545026; 3. 柳州市中医医院(柳州市壮医医院)肿瘤科, 广西柳州 545026

**[摘要]** 目的 探讨白花蛇舌草多糖(*Hedyotis diffusa* Willd. Polysaccharide, HDP)对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭的影响以及对 CXCL12/CXCR4 轴的调控机制。方法 将乳腺癌细胞分为对照组, CXCL12/CXCR4 抑制剂组(AMD 3100 组), HDP 低、中、高剂量组(HDP-L 组、HDP-M 组、HDP-H 组), HDP 高剂量+CXCL12 组(HDP-H+CXCL12 组); 通过 CCK-8 检测细胞增殖情况; 划痕实验、Transwell 实验分别测定细胞的迁移和侵袭能力; Western blot 分析细胞中上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、CXCL12、CXCR4 蛋白的表达; 建立 BALB/c-nu 雌性裸鼠 MDA-MB-231 异种移植瘤模型并观察各组肿瘤生长情况, 采用 HE 染色观察裸鼠移植瘤细胞的形态学特征。结果 与对照组相比, AMD 3100 组和 HDP 各剂量组细胞增殖活性、迁移和侵袭数以及 Vimentin、CXCL12、CXCR4 蛋白表达显著抑制( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 而 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ ); 与 HDP-H 组相比, HDP-H+CXCL12 组细胞的增殖活力、迁移和侵袭数以及 Vimentin、CXCL12、CXCR4 蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ ), E-cadherin 蛋白表达水平被显著抑制( $P<0.01$ )。此外, 动物实验表明, 与模型组相比, AMD 3100 组和 HDP 各剂量组的肿瘤重量明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与 HDP-H 组相比, HDP-H+CXCL12 组裸鼠肿瘤重量明显增加( $P<0.01$ ); HE 染色显示, AMD 3100 组和 HDP 各干预组肿瘤组织坏死与凋亡细胞增多。结论 HDP 可以通过抑制 CXCL12/CXCR4 轴进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移及侵袭。

**[关键词]** 白花蛇舌草多糖; 乳腺癌; 异种移植瘤; CXCL12/CXCR4 轴; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.05.009

## Effects of *Hedyotis diffusa* polysaccharide on proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells by regulating CXCL12/CXCR4 axis

QIN Ni<sup>1,2</sup>, LIU Yijiang<sup>1</sup>, WANG Wanping<sup>1</sup>, HUANG Liyin<sup>1</sup>, QIN Wenhui<sup>1</sup>, HU Zhengguo<sup>3</sup>, LU Shiyin<sup>1,2\*</sup>

1. Department of Pharmacy, Liuzhou Hospital of Chinese Medicine (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China; 2. Preparations, Engineering Technology Research Center for the Development of Chinese Medicine (Zhuang and Yao) Preparations, Liuzhou Key Laboratory for Preparation Development of Chinese Medicine (Zhuang and Yao), Liuzhou Hospital of Chinese Medicine (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China; 3. Department of Oncology, Liuzhou Hospital of Chinese Medicine (Liuzhou Hospital of Zhuang Medicine), Liuzhou, Guangxi 545026, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effects of *Hedyotis diffusa* Willd. Polysaccharide (HDP) on proliferation, invasion, and migration of breast cancer cells MDA-MB-231 and the regulatory mechanism of HDP on CXCL12/CXCR4 axis. **Methods** Breast cancer cells MDA-MB-231 were assigned into control group, CXCL12/CXCR4 inhibitor group (AMD 3100 group), and low-,

**[收稿日期]** 2023-08-24

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(2020GXNSFBA297032); 广西中医药大学自然科学基金面上项目(2020MS055); 柳州市科技攻关与新产品试制(2020NBAA0802)。

**[通信作者]** \* 陆世银, 男, 硕士, 副主任药师, E-mail: 1175463199@qq.com。

medium-, and high-dose HDP groups (HDP-L group, HDP-M group and HDP-H group), and HDP-H+CXCL12 group (HDP-H+CXCL12 group). CCK-8 was used to determine cell proliferation. Scratch assay and Transwell assay were applied to evaluate the cell migration and invasion ability. Western blot was employed to examine the protein expressions of E-cadherin, Vimentin, CXCL12, and CXCR4. MDA-MB-231 transplanted tumor model of BALB/c-*nu* female nude mice were established and the tumor growth of mice in each group was observed. HE staining was used to observe the morphological changes of transplanted tumor cells in nude mice. **Results** Compared with the control group, the cell proliferation activity, migration, and invasion number, as well as the expression levels of Vimentin, CXCL12, and CXCR4 proteins in AMD 3100 group and HDP groups of various doses decreased, while the expression level of E-cadherin protein distinctly increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the HDP-H group, the cell proliferation, migration, and invasion number, as well as the expression levels of Vimentin, CXCL12, and CXCR4 proteins in HDP-H+CXCL12 group were enhanced ( $P<0.01$ ), while the expression level of E-cadherin protein decreased ( $P<0.01$ ). Additionally, in xenograft tumor experiments, compared with the control group, the tumor weight of AMD 3100 group and HDP groups of various doses were significantly lower ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the tumor weight of HDP-H+CXCL12 group was significantly higher ( $P<0.01$ ). HE staining showed the increased necrosis and apoptosis of tumor tissue cells in each intervention group of AMD 3100 and HDP. **Conclusion** HDP may inhibit the proliferation, migration, and invasion of MDA-MB-231 cells by regulating CXCL12/CXCR4 axis.

[**Keywords**] *Hedyotis diffusa* polysaccharide; breast cancer; xenograft tumor; CXCL12/CXCR4 axis; migration; invasion

乳腺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,近年来发病率急剧攀升且呈现出年轻化趋势,在恶性肿瘤发病率中占第一位,死亡率位居第5<sup>[1]</sup>。目前,临床治疗乳腺癌的常规方式为手术治疗、内分泌治疗、化学药物治疗和放射治疗等<sup>[2]</sup>,其中化学药治疗与放射治疗最为常用,现有化学药物治疗药物在发挥抗肿瘤作用的同时,存在局部复发和转移的极大风险,威胁患者的生存质量与生命<sup>[3]</sup>。因此,积极探究安全有效、毒副作用小的创新辅助抗肿瘤药物具有重要意义。

壮药白花蛇舌草是茜草科植物白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd.的全草,收载于《广西中药志》,具有清热解毒、消痛散结、利尿除湿之功效,壮族民间常用于肿瘤治疗。现代药理学研究表明,壮药白花蛇舌草具有抗氧化、抗炎、免疫调节、神经保护等多种生物活性,尤其是抗肿瘤效果显著<sup>[4-6]</sup>,而白花蛇舌草多糖(*Hedyotis diffusa* Willd. Polysaccharide, HDP)是其主要成分和关键活性物质,有良好的抗肿瘤活性,在体内外均能抑制鼻咽癌、肺癌、结肠癌等多种恶性肿瘤的增殖和转移<sup>[7-9]</sup>,但目前HDP对乳腺癌细胞生物学行为的影响及其机制尚不清楚。本研究旨在探讨HDP对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、迁移及侵袭的影响,为其抗肿瘤机制研究提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 主要仪器

ACB-4A1型超净工作台(新加坡ESCO公司);XS205DU型电子分析天平(瑞士梅特勒公司);MI52-N型倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公

司);MULTISKAN MK3型酶联免疫检测仪(德国奥林巴斯公司);TGD-20MC型高速低温离心机(长沙湘锐离心机有限公司);TDL-5A型台式离心机(上海菲赫尔分析仪器公司);4590型包埋机(日本SAKURA精密技术公司);RM2235型病理组织切片机(德国徕卡公司);DYCZ-40D型蛋白电泳仪(北京六一生物科技有限公司);IMS-130型颗粒制冰机(常熟市雪科制冷设备有限公司);Azure 300型化学发光成像仪(美国Azure Biosystems公司);TS-8型摇床(江苏其林贝尔仪器制造有限公司);HH-8型电热恒温水浴锅(上海汗诺仪器公司);CLM-170B-8-CN型CO<sub>2</sub>培养箱(新加坡艺思高科技有限公司);GWB-1型纯水机(北京普析通用仪器有限责任公司)。

### 1.2 药物与试剂

HDP(纯度 $\geq 98\%$ ,批号:A20220213,南京泽朗医药科技有限公司);AMD 3100(批号:HY-10046)、胎牛血清(批号:ST200707,德国PAN-Biotech公司)、DMEM培养基(批号:20221208)、磷酸盐缓冲液(批号:20220110)、电化学发光(ECL)试剂盒(批号:20230505)、电泳液(批号:20230505)、转膜液(批号:20230505)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;CXCL12蛋白(批号:HYP73411,美国Med Chem Express公司);CCK-8细胞增殖检测试剂盒(批号:22266783,北京Biosharp生物科技有限公司);结晶紫(批号:4230403001,北京索莱宝科技有限公司);Transwell 12孔板(上海雅吉生物科技有限公司);上皮黏蛋白(E-cadherin)抗体(批号:AF0131)、波形蛋白(Vimentin)抗体(批号:AF7013)、CXCL12抗体(批号:AF5166)、CXCR4抗体(批号:AF5279)、GAPDH(批号:AF7021)、HRP标记的山羊抗兔IgG

抗体(批号:S0001)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;HE染色试剂盒(批号:20221217);快速凝胶试剂盒(批号:050623230510)、RIPA裂解液(批号:090121211229)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.3 细胞株

人乳腺癌MDA-MB-231细胞,由武汉普诺赛生命科技有限公司提供,编号H9XX570K08,第5代细胞。

### 1.4 实验动物

SPF级BALB/c-nu雌性裸鼠,7~8周龄,体质量(20±2)g,购于广东维通利华实验动物技术有限公司,使用许可证号SCXK(粤)2022-0063。动物饲养于SPF级实验动物房的小鼠独立通气笼(individually ventilated cages, IVC)中,室温(25±2)℃,相对湿度55%±5%,自然昼夜节律光照环境下自由进食饮水,适应性喂养1周后开始实验。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将人乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞用含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待细胞长满至瓶底90%后进行传代,将传至第3代的细胞用于后续研究。

### 2.2 CCK-8检测HDP对细胞的毒性

将细胞悬液按每孔100 μL均匀接种至96孔板(5 000个/孔)中,24 h后用不同浓度(0、50、100、200、400、800 mg/L)的HDP干预细胞48 h,每孔加入10 μL的CCK-8试剂,置于37℃条件下孵育1 h。采用酶标仪450 nm处检测每孔的吸光度值,计算HDP的IC<sub>50</sub>值。

### 2.3 细胞分组和处理

将MDA-MB-231细胞分为对照组、CXCL12/CXCR4抑制剂组(AMD 3100)、HDP-L组、HDP-M组、HDP-H组、HDP-H+CXCL12组。对照组细胞用含10% FBS的DMEM培养基培养,CXCL12/CXCR4抑制剂组用AMD 3100浓度为10 μg/mL的培养基培养,HDP低、中、高剂量组分别用HDP浓度为150、300、600 mg/L的培养基培养,HDP-H+CXCL12组用含有600 mg/L的HDP和100 ng/mL的CXCL12的培养基联合培养,另设空白孔(不加细胞)。

### 2.4 细胞增殖抑制率检测

将细胞悬液按每孔100 μL均匀接种至96孔板(5000个/孔)中,培养24 h后,去掉旧培养基,分别按

“2.3”项进行分组处理,每个浓度设置5个重复孔,分别继续培养12、24、48、72 h后,每孔加入10 μL CCK-8试剂孵育1 h,使用酶标仪检测每孔450 nm波长处吸光度值,计算细胞增殖抑制率。

### 2.5 迁移实验

取生长状态良好的MDA-MB-231细胞均匀接种于6孔板(1×10<sup>5</sup>个/孔)中,常规培养24 h待细胞生长融合至约80%,用移液器枪头垂直培养皿底部划间隔为5 mm的平行横线,PBS缓慢冲洗3次后,按“2.3”项方法分组干预,并将培养基更换为相应的不含FBS的培养基继续培养48 h,倒置显微镜下观察细胞迁移状况并拍照,通过Image J软件测量细胞间距离并分析。

### 2.6 侵袭实验

取生长状态良好的MDA-MB-231细胞,将细胞均匀接种至基质胶包被的Transwell小室(1×10<sup>4</sup>个/孔)中,按“2.3”项下方法将下室更换为含10% FBS的不同条件的培养液,共800 μL,置于细胞培养箱中培养48 h后,取出小室,湿棉球擦掉小室上层未穿出细胞,加入甲醇固定10 min,然后加入0.1%结晶紫染色液染色,使用PBS轻轻冲洗后,200×显微镜下随机选取5个视野区计数细胞侵袭数目。

### 2.7 Western blot检测细胞中E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白的表达水平

收集分组培养48 h后的细胞。加入RIPA裂解液提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品电泳后转至PVDF膜,将PVDF膜放入5%脱脂奶粉封闭液中室温封闭1 h后,将膜清洗后与一抗稀释液(E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4稀释比例为1:2 000)在4℃下孵育过夜。再分别与羊抗兔IgG二抗稀释液(1:1 000)在室温下孵育1 h后用ECL试剂显色。在凝胶成像仪中检测蛋白条带,以GAPDH为内参,ImageJ软件分析蛋白条带灰度值。

### 2.8 建立裸鼠乳腺癌移植瘤模型

取生长状态良好的人乳腺癌MDA-MB-231细胞,采用生理盐水制成细胞浓度为2.5×10<sup>7</sup>个/mL的悬液。每只裸鼠腋部皮下注射0.2 mL细胞悬液,完成接种后用消毒棉签轻压片刻。每天观察裸鼠与肿瘤的生长情况。待肿瘤体积达到米粒大小<sup>[3]</sup>,随机分为模型组、CXCL12/CXCR4抑制剂组(AMD 3100)、HDP-L组、HDP-M组、HDP-H组、HDP-H+CXCL12组,每组8只。2周后用1%戊巴比妥麻醉裸鼠,眼底静脉处采血,放进小鼠CO<sub>2</sub>处死箱处理后剥离肿瘤组织。血液室温静置后,以3 500 r/min离心(半

径 5 cm)15 min 取血清,于-80 °C超低温冰箱保存待检。肿瘤抑制率=(对照组瘤重均值-实验组瘤重均值)/对照组瘤重均值 $\times$ 100%。

## 2.9 HE 染色观察裸鼠肿瘤组织的病理学改变

取黄豆大小肿瘤组织置于 10%甲醛中固定过夜,经程序梯度脱水、透明,石蜡包埋制片,3  $\mu$ m 连续切片后浸入二甲苯脱蜡,梯度乙醇浸泡水化后,浸泡于水中,然后按试剂盒操作说明书进行 HE 染色。在光学显微镜下观察分析肿瘤细胞的形态变化。

## 2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。所有资料均作正态性与方差齐性检验,满足正态分布,多组间比较满足方差齐性时采用单因素方差分析检验,各组间均数多重比较采用 Tukey 检验;当方差不齐时,采用 Welch 和 Dunnett's T3 检验, $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 HDP 对 MDA-MB-231 细胞毒性的影响

与对照组相比,50、100、200、400、800 mg/L 的 HDP 干预 48 h 后细胞的增殖活力均明显降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),同时显示 HDP 干预 MDA-MB-231 细胞后的  $IC_{50}$  为 308 mg/L。因此,本实验选择浓度为 150、300、600 mg/L 作为后续实验中 HDP 的低、中、高剂量组(图 1A)。

### 3.2 HDP 对 MDA-MB-231 细胞增殖活性的影响

与对照组相比,AMD 3100 组和 HDP 各剂量组细胞的增殖活力显著降低,且 HDP 呈现良好的剂量依赖性( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),与 AMD 3100 组相比,HDP-H 组无统计学意义( $P>0.05$ ),HDP-H+CXCL12 组细胞的增殖活力明显增强( $P<0.05$ , $P<0.01$ );与 HDP-H 组相比,HDP-H+CXCL12 组细胞的增殖活力明显增强( $P<0.01$ )。详见图 1B。

### 3.3 HDP 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,与对照组相比,AMD 3100 组与 HDP 不同剂量组细胞迁移率显著降低( $P<0.01$ ),且 AMD 3100 组与 HDP-H 组差异无统计学意义( $P>0.05$ );与 HDP-H 组相比,HDP+CXCL12 组细胞的迁移率明显升高( $P<0.01$ )。详见图 2A、2C。

### 3.4 HDP 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

与对照组相比,AMD 3100 组和 HDP 不同剂量组细胞的侵袭数明显减少( $P<0.01$ ),AMD 3100 组与 HDP-H 组差异无统计学意义( $P>0.05$ );与 HDP-H 组相比,HDP-H+CXCL12 组细胞的侵袭数增多( $P<0.01$ )。详见图 2B、2D。

### 3.5 HDP 对 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4 蛋白表达的影响

与对照组相比,AMD 3100 组和 HDP 各剂量组细胞中 Vimentin、CXCL12、CXCR4 蛋白表达水平均明显下降( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),E-cadherin 蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ ),且 AMD 3100 组与 HDP-H 组无统计学意义( $P>0.05$ );与 HDP-H 组相比,HDP-H+CXCL12 组细胞中 Vimentin、CXCL12、CXCR4 蛋白表达水平均显著提升( $P<0.01$ ),而 E-cadherin 蛋白表达水平明显下降( $P<0.01$ )。详见图 3。

### 3.6 HDP 对 MDA-MB-231 细胞异种移植瘤生长的影响

与模型组相比,AMD 3100 组和 HDP 各剂量组大鼠肿瘤体质量、肿瘤体积均显著减小( $P<0.05$ , $P<0.01$ );与 HDP-H 组相比,HDP-H+CXCL12 组裸鼠肿瘤重量明显增加( $P<0.01$ )。详见表 1。

### 3.7 HDP 对移植瘤裸鼠肿瘤组织形态的影响

模型组裸鼠肿瘤组织中肿瘤细胞密集排列无序,肿瘤细胞呈不规则的团块状或条索状、弥散性分布,肿瘤细胞异型性明显,细胞核呈圆形或卵形,细胞核增大、深染,未显现坏死灶;AMD 3100 组和 HDP 各剂量组肿瘤细胞数量明显减少,肿瘤细胞细胞质

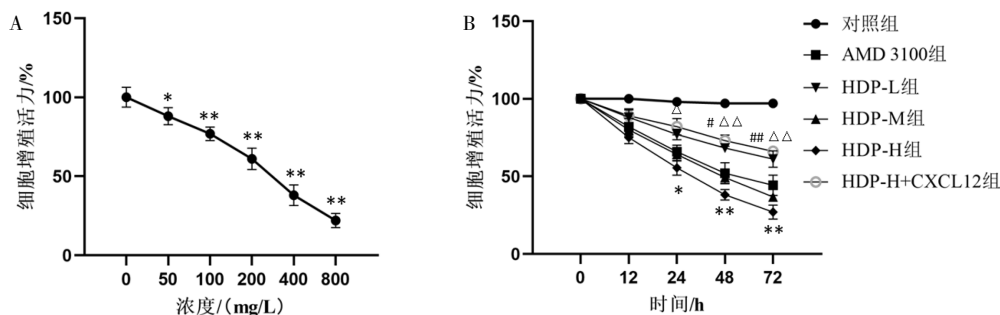


图 1 不同浓度 HDP(A)和不同时间点 HDP(B)对 MDA-MB-231 细胞增殖活力的影响

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 AMD 3100 组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;与 HDP-H 组比较, $\Delta P<0.05$ , $\Delta\Delta P<0.01$ 。

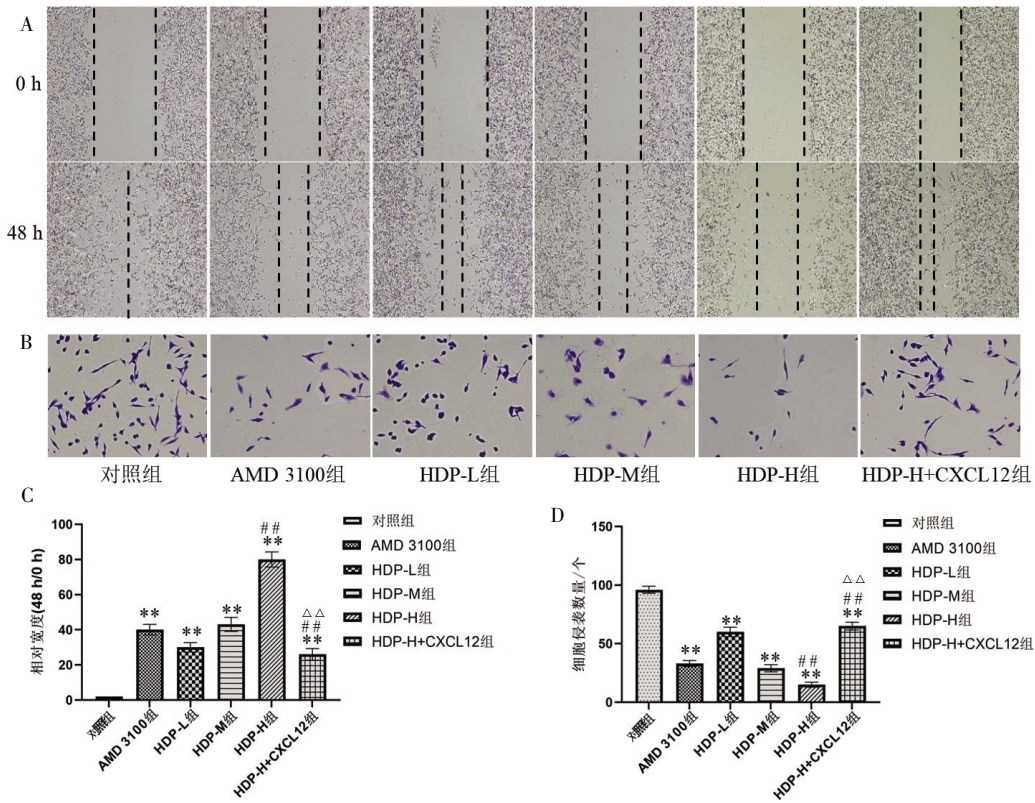


图2 HDP对MDA-MB-231细胞迁移与侵袭的影响

注:A、C为划痕实验检测各组MDA-MB-231细胞的迁移能力( $\times 40$ );B、D为Transwell实验观察各组MDA-MB-231细胞的侵袭数量( $\times 100$ )。与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与AMD 3100组比较,## $P < 0.01$ ;与HDP-H组比较,△△ $P < 0.01$ 。

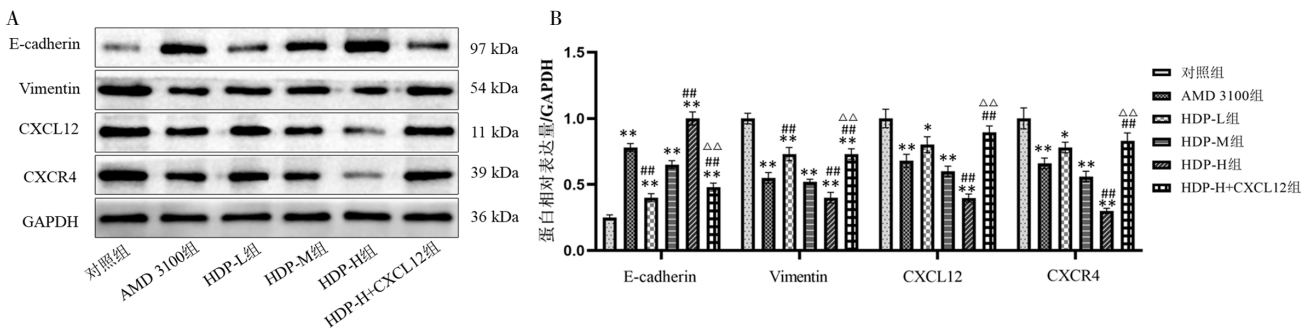


图3 各组E-cadherin、Vimentin、CXCL12、CXCR4蛋白的表达情况

注:A.各组不同蛋白表达电泳条带图;B.各组不同蛋白相对表达量。与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与AMD 3100组比较,## $P < 0.01$ ;与HDP-H组比较,△△ $P < 0.01$ 。

表1 HDP对MDA-MB-231细胞异种移植瘤生长的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	体质量/g	瘤重/g	抑瘤率/%
模型组	26.78±0.18	1.61±0.35	—
AMD 3100组	25.09±1.21	0.89±0.19**	44.72
HDP-L组	26.18±1.13	1.12±0.16*	30.43
HDP-M组	25.73±0.98	0.85±0.24**	47.20
HDP-H组	24.42±0.84	0.54±0.17***	66.46
HDP-H+CXCL12组	25.14±1.26	1.18±0.25***△△	26.71

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与AMD 3100组比较,## $P < 0.05$ ;与HDP-H组比较,△△ $P < 0.01$ 。

破裂、细胞核溶解,肿瘤细胞坏死区域较大,出现明显细胞凋亡;与HDP-H组相比,HDP-H+CXCL12组肿瘤细胞数量较多,且凋亡细胞较少。详见图4。

### 4 讨论

植物多糖具有丰富且复杂的结构特点,其在抗肿瘤领域越发受到广泛关注。在机体代谢活动中,多糖不仅作为能量储存与来源的功能,还与细胞的转化和凋亡、免疫功能调节、抗氧化等生物过程密切相关,发挥重要的生理生化调节作用<sup>[10]</sup>。当多糖类与免

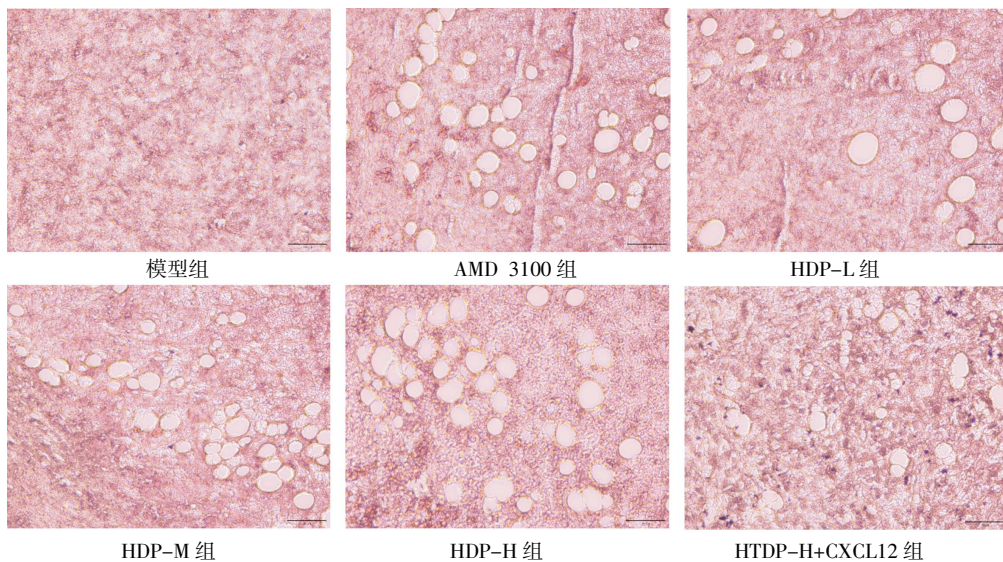


图4 移植瘤裸鼠肿瘤组织病理变化的影响(HE,  $\times 400$ , 比例尺=50  $\mu\text{m}$ )

疫细胞的表面多糖受体结合时,通过激活细胞的信号转导途径,促进巨噬细胞生成细胞因子,从而触发与调控生物体免疫反应,抑制肿瘤细胞的生长增殖、迁移及侵袭<sup>[11]</sup>。HDP为壮药白花蛇舌草的主要活性成分,已有多项研究证实HDP具有抗氧化、免疫调节、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[12-14]</sup>,HDP具有抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,诱导肿瘤细胞凋亡等抗肿瘤作用途径<sup>[8,15]</sup>,但其对乳腺癌的作用尚未阐明。本研究利用人乳腺癌MDA-MB-231细胞模型及其BALB/c-nu雌性裸鼠异种移植瘤模型,探讨HDP对MDA-MB-231细胞的影响及对荷瘤裸鼠的抑瘤作用。

本实验使用MDA-MB-231细胞探讨了HDP对乳腺癌的作用,结果显示HDP处理组细胞的增殖活性显著低于对照组,增殖抑制作用随着剂量增加而增大,提示HDP可以通过抑制MDA-MB-231细胞的增殖,从而阻止乳腺癌的进展。据研究证实,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)作为一种可塑性表型过程,促使上皮细胞在乳腺癌的进展中具有迁移和侵袭的特性,从而导致癌细胞从原发部位迁移并侵入血管或其他组织<sup>[16]</sup>。E-cadherin水平异常下调和Vimentin含量异常增加是EMT发生的标志,且E-cadherin和Vimentin可通过介导癌细胞的增殖、迁移和侵袭影响肿瘤的发生发展<sup>[17]</sup>。本研究通过Transwell小室和Western blot实验发现,与对照组相比,HDP干预组细胞的迁移和侵袭数减少,E-cadherin蛋白表达水平显著升高,Vimentin蛋白表达水平明显降低,提示HDP可能通过抑制上皮细胞向间充质转化来阻滞MDA-MB-231细胞的迁移和侵袭,从而阻止乳腺癌转移,但具体的分子机制还尚未被证实。

研究表明,趋化因子作为具有独特性质的蛋白质,能系统调控免疫细胞的趋化作用,参与细胞的增殖、迁移和凋亡等重要生物学过程。在众多趋化因子受体中,CXCR4对促进乳腺癌生成、增殖、转移等多个过程发挥关键作用<sup>[18]</sup>。CXCL12为一种细胞外稳态趋化因子,其作为CXCR4配体,两者相互作用后能够加剧乳腺癌细胞迁移、侵袭并抑制其凋亡<sup>[19]</sup>。而临床研究也证实,高水平CXCR4的乳腺癌患者具有更高的肿瘤复发率与转移率<sup>[20]</sup>。CXCL12/CXCR4信号轴的激活可以促进EMT,诱导癌症的侵袭和转移,从而导致预后不良<sup>[21]</sup>。AMD 3100是美国食品药品监督管理局批准上市的CXCR4特异抑制剂,其可有效阻滞CXCL12/CXCR4轴而发挥抗癌作用<sup>[22]</sup>。本研究结果表明,与对照组相比,HDP干预组的细胞明显抑制CXCL12、CXCR4蛋白的表达明显被抑制,且CXCL12/CXCR4轴抑制剂AMD 3100组的细胞增殖活力、迁移和侵袭细胞数以及CXCL12、CXCR4蛋白含量均与HDP-M组无统计学意义,提示HDP可能与AMD 3100的作用途径相同,通过抑制CXCL12与CXCR4结合发挥抗肿瘤作用。在HDP-H剂量组中加入CXCL12后,HDP抑制MDA-MB-231细胞增殖、迁移、侵袭的作用被明显逆转,这进一步提示了HDP可能是通过阻断CXCL12/CXCR4信号轴来抑制MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的。此外,本研究探讨了HDP对异种移植瘤的抑制作用,与模型组相比较,HDP各剂量组可明显抑制裸鼠肿瘤重量的增加,肿瘤组织HE染色显示经HDP干预可诱导肿瘤细胞的凋亡,表明HDP在体内也可有效抑制乳腺癌的发展。

综上所述,HDP可以通过阻断CXCL12/CXCR4

轴抑制MDA-MB-231细胞增殖、侵袭和迁移。本研究可为壮药白花蛇舌草中的多糖成分用于乳腺癌治疗的临床应用提供科学依据。此外,有研究表明<sup>[23]</sup>, CXCL12/CXCR4轴与下游诸多调节细胞生长的信号通路密切相关,如PI3K/AKT/mTOR。因此,该信号轴在乳腺癌中的具体调控机制有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] RACHMAN A, FIANTORO Z H, SUTANDYO N, et al. Metabolic profile and negatively association between insulin resistance and metastatic incidence in Indonesian primary invasive breast cancer: A cross-sectional study[J]. *International Journal of General Medicine*, 2023, 16: 3257-3265.
- [2] CAKIR Y, TALU C K, TRABULUS D C, et al. The immunohistochemical Galectin-3 expression in tumor and cancer-associated fibroblasts in invasive ductal carcinomas of breast and their relationship with clinicopathological parameters[J]. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 2023, 66(3): 456-464.
- [3] NÓBREGA-PEREIRA S, SANTOS F, OLIVEIRA SANTOS M, et al. Mitochondrial metabolism drives low-density lipoprotein-induced breast cancer cell migration[J]. *Cancer Research Communications*, 2023, 3(4): 709-724.
- [4] WANG X, ZHAO J, ZHANG R, et al. Protective effect of *Hedyotis diffusa* Willd. ethanol extract on isoniazid-induced liver injury in the zebrafish model[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2022, 16: 1995-2015.
- [5] LI D Q, GUO Y J, ZHANG C P, et al. N-butanol extract of *Hedyotis diffusa* protects transgenic *Caenorhabditis elegans* from A $\beta$ -induced toxicity[J]. *Phytotherapy Research*, 2021, 35(2): 1048-1061.
- [6] 李燕华, 李丛元, 赵方允, 等. 白花蛇舌草多糖对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠 Th1/Th2 漂移及肿瘤微血管形成的影响[J]. *中药材*, 2023, 46(3): 747-752.
- [7] 钟伦坤, 周兴玮, 朱佳丽, 等. 基于 ROS/HIF-1 通路探讨白花蛇舌草多糖对鼻咽癌裸小鼠肿瘤的抑制作用及机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(15): 2698-2706.
- [8] LIN L Y, CHENG K L, HE Z, et al. A polysaccharide from *Hedyotis diffusa* interrupts metastatic potential of lung adenocarcinoma A549 cells by inhibiting EMT via EGFR/Akt/ERK signaling pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 706-714.
- [9] 谢冬冰, 郭玉婷. 白花蛇舌草提取物多糖和总黄酮对于结肠癌 HT-29 细胞的抑制作用[J]. *中国药物与临床*, 2021, 21(19): 3217-3220.
- [10] MEENA J, KUMAR R, SINGH M, et al. Modulation of immune response and enhanced clearance of *Salmonella typhi* by delivery of Vi polysaccharide conjugate using PLA nanoparticles[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2020, 152: 270-281.
- [11] YANG S, SUN S Q, XU W Q, et al. Astragalus polysaccharide inhibits breast cancer cell migration and invasion by regulating epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(4): 1819-1832.
- [12] ZHANG J, HUO J Y, ZHAO Z Z, et al. An anticomplement homogeneous polysaccharide from *Hedyotis diffusa* attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury and inhibits neutrophil extracellular trap formation[J]. *Phytomedicine*, 2022, 107: 154453.
- [13] LIN L Y, CHENG K L, XIE Z Q, et al. Purification and characterization a polysaccharide from *Hedyotis diffusa* and its apoptosis inducing activity toward human lung cancer cell line A549[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 122: 64-71.
- [14] 张林超. 白花蛇舌草多糖对肾癌荷瘤小鼠肿瘤生长及免疫调节作用的影响[J]. *中成药*, 2021, 43(3): 765-769.
- [15] 赵小燕, 吴彩琴, 任晓勇, 等. 白花蛇舌草多糖提取物诱导 Hep-2 细胞凋亡与抑制侵袭机制[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2018, 32(2): 84-87.
- [16] ZHANG Z X, LIN M, WANG J L, et al. Calycosin inhibits breast cancer cell migration and invasion by suppressing EMT via BATF/TGF- $\beta$ 1[J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16009-16023.
- [17] HASHEMI M, ARANI H Z, OROUEI S, et al. EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2022, 155: 113774.
- [18] CAVE D D, HERNANDO-MOMBLONA X, SEVILLANO M, et al. Nodal-induced L1CAM/CXCR4 subpopulation sustains tumor growth and metastasis in colorectal cancer derived organoids[J]. *Theranostics*, 2021, 11(12): 5686-5699.
- [19] WANG D, WANG X H, SI M H, et al. Exosome-encapsulated miRNAs contribute to CXCL12/CXCR4-induced liver metastasis of colorectal cancer by enhancing M2 polarization of macrophages[J]. *Cancer Letters*, 2020, 474: 36-52.
- [20] AKONNOR A, MAKISE M, KUNYASU A. CXCR4-targeted necrosis-inducing peptidomimetic for treating breast cancer[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(27): 24467-24476.
- [21] QIN Y, WANG F, NI H L, et al. Cancer-associated fibroblasts in gastric cancer affect malignant progression via the CXCL12-CXCR4 axis[J]. *Journal of Cancer*, 2021, 12(10): 3011-3023.
- [22] FENG W B, HUANG W J, CHEN J, et al. CXCL12-mediated HOXB5 overexpression facilitates colorectal cancer metastasis through transactivating CXCR4 and ITGB3[J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2612-2633.
- [23] YU D H, CHEN C, LIU X P, et al. Dysregulation of miR-138-5p/RPS6KA1-AP2M1 is associated with poor prognosis in AML[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 641629.