

# 野马追内酯 O 诱导三阴性乳腺癌 BT-20 细胞凋亡的作用机制研究

赵亚萍<sup>1</sup> 陈湘<sup>1</sup> 傅利萍<sup>1</sup> 朱瑞<sup>2</sup>

1.浙江中医药大学附属绍兴中医院 浙江,绍兴 312000 2.浙江中医药大学药学院

**摘要:** [目的] 通过体内外实验探究野马追内酯 O (eupalinolide O, EO) 对人乳腺癌 BT-20 细胞的作用及机制。[方法] 采用噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 法测定 EO 对 BT-20 细胞的抑制作用及半数抑制浓度, 以确定 EO 浓度。将 BT-20 细胞分为空白对照组、EO 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组、EO 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组, 后两组以 EO 处理 24 h, 采用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 法检测细胞毒性; 流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况。24 只裸鼠通过乳腺脂肪垫注射 BT-20 细胞, 建立乳腺癌模型, 并随机分为对照组、阿霉素组 (7  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), EO 低剂量组 (15  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和 EO 高剂量组 (30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 每组 6 只。除对照组外, 各组裸鼠连续腹腔注射对应药物治疗 21 d, 期间测量体表肿瘤体积; 结束后称取肿瘤质量, 并采用免疫组化染色检测肿瘤组织中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和 Ki-67 表达。采用免疫印迹法检测细胞和裸鼠肿瘤组织中 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 关联 X (Bcl-2 associated X protein, Bax)、聚 ADP 核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、活化的半胱氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3, cleaved caspase-3) 和活化的半胱氨酸蛋白酶-9 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-9, cleaved caspase-9) 蛋白表达。[结果] EO 对 BT-20 细胞的抑制作用具有剂量-时间依赖性。与空白对照组比较, EO 5、10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞毒性和凋亡率增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 且 EO 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的细胞周期明显阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期 ( $P<0.01$ )。与对照组比较, 阿霉素组、EO 低剂量组、EO 高剂量组的裸鼠肿瘤质量显著降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 肿瘤组织内 PCNA 和 Ki-67 抗原表达显著降低 ( $P<0.01$ ), 肿瘤体积随治疗进展显著缩小 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。与空白对照组比较, 各组细胞的 Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), Bax、PARP、cleaved caspase-3 及 cleaved caspase-9 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ); 与对照组裸鼠比较, 各给药组的 Bcl-2 蛋白表达降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), Bax、PARP、cleaved caspase-3 及 cleaved caspase-9 蛋白表达升高 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。[结论] EO 在体内外抑制 BT-20 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 作用机制可能与其抑制 Bcl-2 蛋白表达, 促进 Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白表达有关。

**关键词:** 野马追内酯 O; 三阴性乳腺癌; 细胞凋亡; 细胞周期阻滞; 半胱氨酸蛋白酶; BT-20

中图分类号: R329 文献标志码: A 文章编号: 1005-5509(2022)11-1181-08

DOI: 10.16466/j.issn1005-5509.2022.11.002

**Study on the Mechanism of Eupalinolide O Inducing Apoptosis in Triple Negative Breast Cancer BT-20 Cells** ZHAO Yaping, CHEN Xiang, FU Liping, et al *Shaoxing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Shaoxing(312000), China*

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of eupalinolide O (EO) on human breast cancer BT-20 cells and explore its mechanism through *in vitro* and *in vivo* experiments. [Methods] Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the inhibitory effect of EO on BT-20 cells and its half inhibitory concentration, and to determine experimental concentration. BT-20 cells were divided into blank control group, EO 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group and EO 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group, the latter two groups were intervened with EO for 24 h, lactate dehydrogenase (LDH) release test was used to detect the cytotoxicity, and flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis. Twenty-four nude mice were injected BT-20 cells through mammary fat pad to establish breast cancer models, then the mice were randomly divided into control group, doxorubicin group (7  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), EO low-dose group (15  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and EO high-dose group (30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with six mice in each group. Except for control group, other groups mice were administrated abdominal injection treatment for 21 d, tumor volume was measured during the treatment period. After treatment, tumor weight was measured and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki-67 in tumor tissue were detected by immunohistochemical staining. Western blot was used to detect the B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), poly ADP-ribose polymerase (PARP), cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LGF20H280002); 浙江中医药大学校级科研基金项目 (2021ZZ04)

Fund projects: Zhejiang Province Natural Science Foundation Project (LGF20H280002); Zhejiang Chinese Medical University Research Fund Project (2021ZZ04)

通信作者: 朱瑞, E-mail: ruizhu0517@zcmu.edu.cn

(cleaved caspase-3) and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-9(cleaved caspase-9) protein expression in BT-20 cells and tumor tissue of BT-20 nude mice. [Results] Compared with blank control group, the EO 5, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group cell cytotoxicity and apoptosis increased significantly( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the EO 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group cell cycle was arrested in G<sub>2</sub>/M phase( $P<0.01$ ). Compared with control group, doxorubicin, EO low-dose, EO high-dose groups tumor weight decreased markedly( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and the expression of PCNA and Ki-67 in tumor tissue also decreased remarkably( $P<0.01$ ), tumor volume decreased with the course of treatment( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). Compared with blank control group, the protein expression of Bcl-2 was decreased( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and the protein expression of Bax, PARP, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 was increased( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ) in each cell group. Compared with control group, the protein expression of Bcl-2 was decreased( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and the protein expression of Bax, PARP, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 was increased in each treatment nude mice group( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). [Conclusion] EO can inhibit proliferation and induce apoptosis in BT-20 cells *in vitro* and *in vivo*, which may be related to inhibition of Bcl-2 protein expression and up-regulation of Bax, PARP, cleaved caspase-3, and cleaved caspase-9 protein expression.

**Key words:** eupalinolide O; triple negative breast cancer; cell apoptosis; cell cycle arrest; caspase; BT-20

乳腺癌是全球范围内常见的肿瘤之一,是女性最常见的肿瘤,也是引起女性肿瘤患者死亡的主要原因<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)表达均为阴性的特殊类型乳腺癌,约占乳腺癌总确诊数量的15%~20%,其肿瘤异质性高,临床治疗效果差<sup>[2]</sup>。由于TNBC缺少ER、PR、HER-2的表达,因此不宜采用内分泌治疗和靶向治疗,主要以化疗方式进行治疗<sup>[2-3]</sup>。TNBC对化疗药物敏感性低,加上化疗药物引起的不良反应,是影响TNBC患者预后的主要原因<sup>[4-5]</sup>。因此,寻找和开发新药,改善TNBC治疗现状迫在眉睫。中药能够逆转肿瘤的多药耐药性并具有不良反应小等特点,在肿瘤的辅助治疗中受到广泛关注<sup>[5]</sup>。

野马追是菊科植物轮叶泽兰(*Eupatorium lidleyanum* DC.)的干燥地上部分,其有效部位及活性成分在抗肿瘤、抗炎、抗呼吸系统感染和治疗心血管疾病等方面具有重要的药用价值<sup>[6]</sup>。本课题组前期从野马追中分离出的吉马烷型倍半萜内酯类化合物野马追内酯O(eupalinolide O, EO)是一种具有抗乳腺癌细胞活性的新型化合物(专利公开号:CN 105294623A),其分子式为C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>,分子量为418.44,可通过线粒体途径引起线粒体膜电位下降,从而诱导细胞凋亡,但对正常乳腺细胞抑制作用微弱<sup>[7]</sup>。本研究拟在前期研究的基础上,以TNBC为研究对象,通过建立体内外乳腺癌模型,以进一步明确EO的抗TNBC活性,并初步探究其可能的作用机制,以期为EO的开发提供理论支持。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性裸鼠24只,6周龄,体质量(20±2)g,购于上海斯莱克动物实验有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005],饲养于杭州鹰吻生物科技有限公司动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2020-0024]。本研究严格按照动物实验伦理规范进行实验(伦理审查批准号:EYOUNG-20210628-02)。

**1.1.2 细胞** BT-20乳腺癌细胞购于ATCC(批号:HTB-19)。

**1.1.3 主要试剂** B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2关联X(Bcl-2 associated X protein, Bax)、聚ADP核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)、活化的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-3, cleaved caspase-3)、活化的半胱氨酸蛋白酶-9(cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase-9, cleaved caspase-9)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、Ki-67抗体均购于澳大利亚Affinity公司(批号:AF6139、AF0120、BF0719、AF7022、AF5240、AF7021、AF0239、AF0198);H&L辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG预吸附二抗购于美国Abcam公司(批号:ab97080);聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒购于北京Solarbio公司(批号:PC0020);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司(批号:C0017);噻

唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)细胞增殖检测试剂盒购于上海 BBI Life Sciences 公司(批号: E606334);流式细胞凋亡、细胞周期检测试剂盒均购于美国 BD 公司(批号: 556547、550825)。EO 由课题组分离得到,并经高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)鉴定纯度;阿霉素购于上海麦克林公司(批号: D807083)。

**1.1.4 主要仪器** Micro17R 型低温高速离心机、BB150 型细胞培养箱均为美国 Thermo 公司产品; CMaxPlus 型酶标仪为美国 MD 公司产品; 610020-9Q 型化学发光仪购于上海勤翔科学仪器有限公司; AE2000 型显微镜为厦门 Motic 公司产品; C6 型流式细胞仪为美国 BD 公司产品; 8015 型游标卡尺购于上海 SANTO 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** BT-20 细胞培养在含  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。

**1.2.2 动物模型制备及给药** 24 只裸鼠由乳腺脂肪垫注入 BT-20 细胞(数量约  $2.5 \times 10^6$  个),待体表肿瘤体积生长至  $50 \sim 100 \text{ mm}^3$  时将裸鼠随机分为对照组、阿霉素组( $7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、EO 低剂量组( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、EO 高剂量组( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每组 6 只。各组裸鼠腹腔注射给药,对照组以等量 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射,每天 1 次,连续 21 d。

### 1.2.3 指标检测

**1.2.3.1 MTT 法检测细胞抑制情况** 取对数生长期的 BT-20 细胞悬液接种于 96 孔板内,细胞密度为  $1 \times 10^4$ /孔,常规培养 24 h 后弃除原有培养基,以  $200 \mu\text{L}$  分别含终浓度为 1、5、10、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EO 的培养基处理细胞 24、48、72 h。处理一定时间后,每孔加入  $20 \mu\text{L}$  MTT 试剂继续孵育 4 h,弃去培养基后,每孔加入  $200 \mu\text{L}$  二甲基亚砜,振荡 10 min 至结晶溶解,酶标仪 490 nm 波长处检测每孔吸光度(absorbance, A),每组设 6 个复孔。计算细胞增殖抑制率和 EO 半数抑制浓度(half inhibiting concentration,  $\text{IC}_{50}$ )值。细胞增殖抑制率( $\%$ ) =  $(A_0 - A_R) / A_0 \times 100\%$ ,其中  $A_R$  为各组 A 值,  $A_0$  为 EO 浓度为  $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时的 A 值。根据抑制率确定后续实验的 EO 浓度和作用时间。

**1.2.3.2 LDH 法检测细胞毒性** 将细胞分为空白对照组、EO  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组、EO  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组,后两组以 EO 处理 24 h,按照 LDH 试剂盒说明书检测细胞毒性。

**1.2.3.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集对数生长期的 BT-20 细胞,接种于 6 孔板内,密度为  $1.2 \times 10^6$ /孔,分组同 1.2.3.2,待细胞贴壁后干预 24 h,弃除培养基,胰酶消化后,收集细胞,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)清洗后,加入  $500 \mu\text{L}$  Binding buffer 混悬,随后分别加入  $5 \mu\text{L}$  Annexin V 和  $5 \mu\text{L}$  碘化丙啶(propidium iodide, PI)染料避光染色 15 min,最后加入  $400 \mu\text{L}$  Binding buffer,混匀后流式细胞仪检测。

**1.2.3.4 流式细胞术检测细胞周期** 收集对数生长期 BT-20 细胞,接种于 6 孔板内,密度为  $1.2 \times 10^6$ /孔,分组同 1.2.3.2,待细胞贴壁后干预 24 h,弃除培养基,胰酶消化后,收集细胞,以  $500 \mu\text{L}$  的 PBS 悬浮细胞,并加入 70% 的冰乙醇 3 mL,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存过夜,除去上清液,加入 PBS 1 mL 及适量的 RNase,最后加入  $5 \mu\text{L}$  PI 染料避光染色 30 min,离心清洗细胞,加入适量 PBS,过滤膜后流式细胞仪检测。

**1.2.3.5 肿瘤体积和质量测量** 治疗期间测量各组裸鼠肿瘤的长径与短径,并计算肿瘤体积,体积( $\text{mm}^3$ ) =  $(\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$ 。给药结束后,脱颈法处死裸鼠并解剖,称取肿瘤组织质量并记录。

**1.2.3.6 免疫组化检测肿瘤组织 PCNA、Ki-67 表达** 将分离的肿瘤组织制作成石蜡切片,加热进行抗原修复。自然冷却后以 pH 为 7.4 的 PBS 洗涤。室温避光,3% 双氧水孵育 25 min。PBS 清洗后滴加 3% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)均匀覆盖组织,室温下加入兔血清封闭 30 min。吸弃封闭液,加入 PCNA、Ki-67 抗体,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜。以 HRP 标记的二抗覆盖组织,室温孵育 50 min。脱色洗涤,苏木素复染,分化,返蓝,脱水透明,中性树脂胶封片。显微镜下观察并采集图像,进行定量分析。

**1.2.3.7 免疫印迹法检测 Bcl-2、Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白表达** 裂解细胞和肿瘤组织,提取总蛋白并测定蛋白浓度。电泳分离后转膜,封闭,洗膜,分别加入一抗稀释液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡过夜孵育,加入对应二抗,室温孵育 2 h,洗膜。以 GAPDH 为内参,电化学发光处理,采用 Chemi capture 软件采集图像。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 分析。以  $P < 0.05$



为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 EO对BT-20细胞的抑制作用** EO对BT-20细胞的抑制作用具有剂量-时间依赖性。与同时时间点  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  比较,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EO作用24 h对BT-20细胞的抑制作用差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 其他各浓度EO作用不同时间对BT-20细胞均有显著抑制作用 ( $P<0.01$ )。  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EO作用24 h的BT-20细胞抑制率优于  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EO作用48、72 h。见表1。因此, 采用5和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为EO干预BT-20细胞的浓度, 作用时间为24 h, 用于后续细胞实验。

**2.2 各组细胞毒性比较** 与空白对照组比较, EO  $5$ 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的细胞毒性显著增加 ( $P<0.01$ )。见表2。

**2.3 各组细胞凋亡比较** 与空白对照组比较, EO  $5$ 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组的细胞凋亡率显著增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 具有剂量依赖性。见图1。

**2.4 各组细胞周期分布比较** 随着EO剂量的升高, 细胞周期G<sub>2</sub>/M期的峰面积逐渐增加, 具有剂量依赖性。与空白对照组比较, EO  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组G<sub>2</sub>/M期的细胞比例明显增高 ( $P<0.01$ )。见图2。

**2.5 各组裸鼠肿瘤质量和体积比较** 与对照组比

较, 阿霉素组、EO低剂量组、EO高剂量组裸鼠肿瘤质量显著降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与对照组比较, 治疗6 d后, 阿霉素组裸鼠肿瘤体积显著缩小 ( $P<0.01$ ); 9 d后, EO高剂量组裸鼠肿瘤体积显著缩小 ( $P<0.05$ ); 12 d后, EO低剂量组裸鼠肿瘤体积显著缩小 ( $P<0.05$ )。见图3及表3~4。

**2.6 各组裸鼠肿瘤组织PCNA、Ki-67表达比较** 与对照组比较, 阿霉素组、EO低剂量组、EO高剂量组裸鼠肿瘤组织中的PCNA和Ki-67表达均显著降低 ( $P<0.01$ )。见图4、表5。

**2.7 各组Bcl-2、Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9蛋白表达比较** 体外实验部分, 与空白对照组比较,  $5$ 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EO组细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达显著降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 促凋亡蛋白Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9的表达均显著增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。动物实验部分, 与对照组比较, 阿霉素、EO低剂量组、EO高剂量组裸鼠肿瘤组织中抗凋亡Bcl-2蛋白的表达显著下降 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 而促凋亡蛋白Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9蛋白的表达显著增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见图5。

表1 不同条件下EO对BT-20细胞抑制率及IC<sub>50</sub>值比较

Tab.1 Comparison of inhibition rates and IC<sub>50</sub> values of EO on BT-20 cells

组别	24 h		48 h		72 h	
	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	抑制率(%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
$0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0±0.12		0±0.13		0±0.06	
$1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	8.5±0.11		29.5±0.07**		35.2±0.05**	
$5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	36.3±0.11**	12.51	42.5±0.04**	8.06	56.6±0.04**	3.98
$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	48.7±0.09**		55.3±0.07**		61.9±0.04**	
$20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	55.0±0.06**		58.5±0.03**		63.5±0.02**	

注: 与同时点  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组比较, \*\* $P<0.01$ 。

Note: Compared with  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group at same time, \*\* $P<0.01$ .

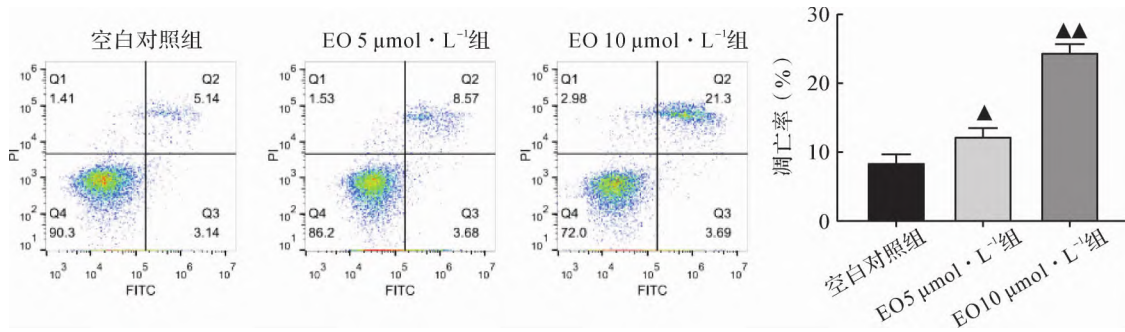
表2 各组细胞毒性比较

Tab.2 Comparison of cytotoxicity in each group

组别	细胞毒性 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )
空白对照组	13.42±1.67
$5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	25.21±3.06**
$10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	37.95±4.33**

注: 与空白对照组比较, \*\* $P<0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, \*\* $P<0.01$ .

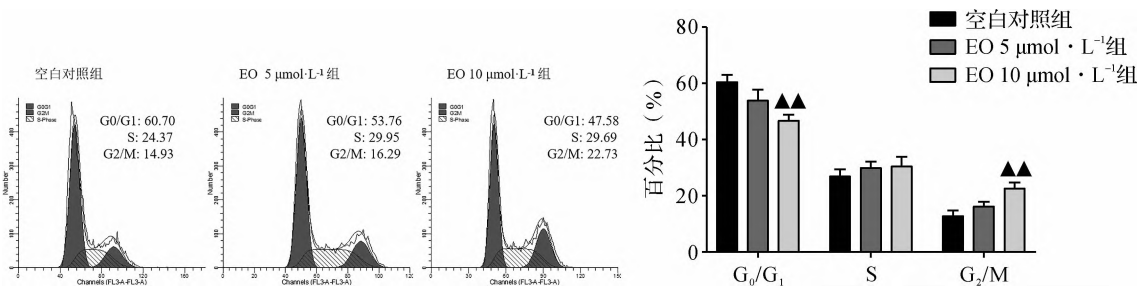


注:与空白对照组比较, ▲P<0.05, ▲▲P<0.01。

Note: Compared with blank control group, ▲P<0.05, ▲▲P<0.01.

图1 各组细胞凋亡比较

Fig.1 Comparison of cell apoptosis in each group



注:与空白对照组比较, ▲▲P<0.01。

Note: Compared with blank control group, ▲▲P<0.01.

图2 各组细胞周期分布比较

Fig.2 Comparison of cell cycle distribution in each group

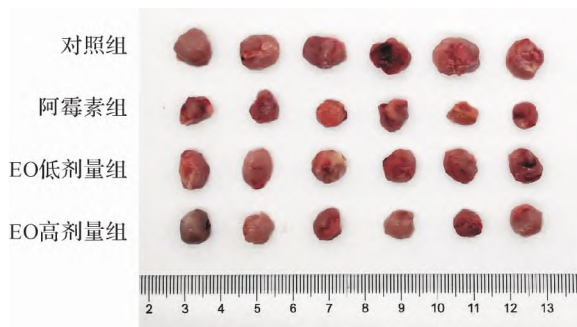


图3 各组裸鼠肿瘤生长情况

Fig.3 Tumor growth of mice in each group

### 3 讨论

TNBC好发于特定的年轻女性群体,与非三阴性乳腺癌相比,TNBC缺乏标准的化疗方案,早期远处器官转移风险高,5年生存率低<sup>[4,8]</sup>,治疗难度大。凋亡为人体清除肿瘤细胞的一种方式,诱导凋亡已被认为是治疗乳腺癌的有效途径之一,探索诱导乳腺癌细胞凋亡的药物对于治疗TNBC具有积极意义<sup>[4]</sup>。

本课题组前期研究显示,EO通过G<sub>2</sub>/M期阻滞可

抑制人乳腺癌MDA-MB-468细胞增殖,并诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。本研究在前期基础上探究EO对人TNBC细胞的体内外抑制作用及机制。研究结果表明,EO对BT-20细胞的IC<sub>50</sub>值较低,5 μmol·L<sup>-1</sup>即可显著抑制BT-20细胞活性。阿霉素为一种抑制肿瘤细胞RNA合成的广谱抗肿瘤药物,抗肿瘤效果好,本研究采用阿霉素作为阳性对照,以对比观察EO在体内的抗肿瘤效果。结果发现,阿霉素与EO均可明显抑制裸鼠肿瘤的生长,虽然高剂量EO对裸鼠肿瘤生长的抑制效果不及阿霉素,但也能够有效减少肿瘤组织内PCNA和Ki-67抗原表达。Ki-67抗原表达程度与乳腺癌治疗敏感性和预后相关,Ki-67低表达患者的无病生存率较高<sup>[9]</sup>。PCNA在增殖期细胞和乳腺癌细胞中高表达,参与乳腺癌的发生和复发过程<sup>[10]</sup>。本研究结果提示,EO在体内具有抑制乳腺癌生长的作用,因此推测EO用于辅助治疗对于提高患者生存率、降低复发可能具有一定益处。

近年来研究报道,中药活性成分对乳腺癌细胞的

赵亚萍,等:野马追内酯O诱导三阴性乳腺癌BT-20细胞凋亡的作用机制研究

表3 各组裸鼠肿瘤质量比较

Tab.3 Comparison of tumor weight of mice in each group

( $\bar{x}\pm s, g$ )

组别	肿瘤质量
对照组	0.38±0.02
阿霉素组	0.13±0.02 <sup>△△</sup>
EO 低剂量组	0.34±0.03 <sup>△</sup>
EO 高剂量组	0.21±0.04 <sup>△△</sup>

注:与对照组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ .

表4 各组裸鼠肿瘤体积比较

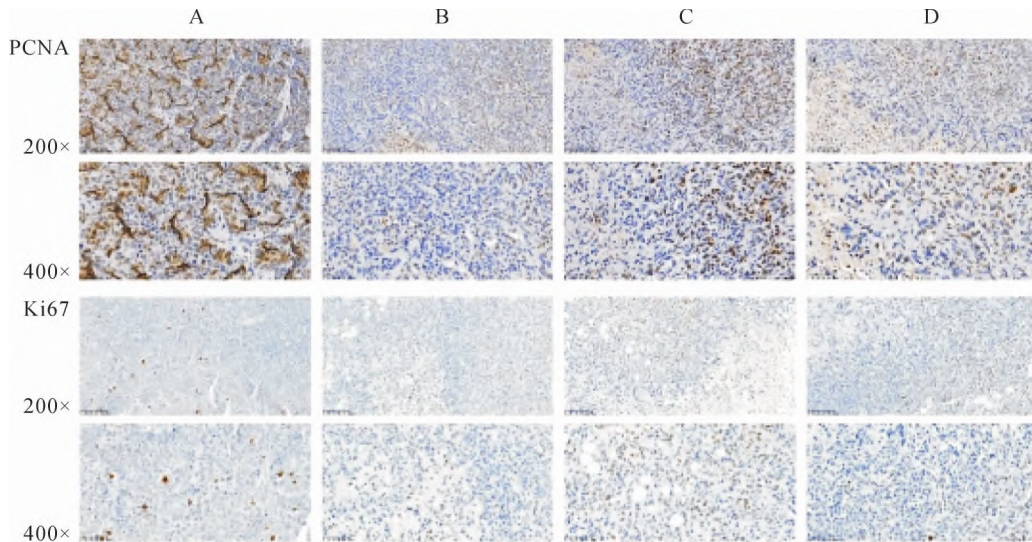
Tab.4 Comparison of tumor volume of mice in each group

( $\bar{x}\pm s, mm^3$ )

组别	肿瘤体积					
	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	21 d
对照组	104.3±13.77	149.89±29.22	208.67±37.76	249.79±21.03	302.46±27.95	375.61±32.79
阿霉素组	63.98±7.63 <sup>△△</sup>	72.11±9.13 <sup>△△</sup>	76.24±8.49 <sup>△△</sup>	80.09±7.93 <sup>△△</sup>	91.92±6.61 <sup>△△</sup>	99.96±6.85 <sup>△△</sup>
EO 低剂量组	93.49±11.71	128.49±29.37	163.05±20.71 <sup>△</sup>	196.1±26.72 <sup>△△</sup>	236.4±28.08 <sup>△△</sup>	271.59±29.71 <sup>△△</sup>
EO 高剂量组	88.61±12.87	109.99±21.28 <sup>△</sup>	123.54±18.33 <sup>△△</sup>	144.74±18.01 <sup>△△</sup>	167.74±16.44 <sup>△△</sup>	193.96±20.86 <sup>△△</sup>

注:与同时点对照组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group at same time, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ .



注:A.对照组;B.阿霉素组;C.EO低剂量组;D.EO高剂量组。

Note: A. Control group; B. Doxorubicin group; C. EO low-dose group; D. EO high-dose group.

图4 各组裸鼠肿瘤组织中PCNA和Ki-67表达情况(免疫组化染色)

Fig.4 Expression of PCNA and Ki-67 in mice tumor tissue in each group (Immunohistochemistry staining)

抑制作用与阻滞细胞周期并增加凋亡有关<sup>[11]</sup>。本研究发现,EO干预后停留于G<sub>2</sub>/M期的细胞比例增加,同时细胞凋亡数量显著增加,结合前期观察,更加证实了EO是一类可有效阻滞乳腺肿瘤细胞周期,并能够诱

导凋亡的新型抗肿瘤化合物。凋亡在调节细胞生长和组织形成中起着关键作用<sup>[12]</sup>。约75%的原发性乳腺癌细胞高表达抗凋亡蛋白Bcl-2<sup>[13]</sup>,特异性下调Bcl-2的表达,有助于增强各类乳腺癌细胞对化疗药物的敏感



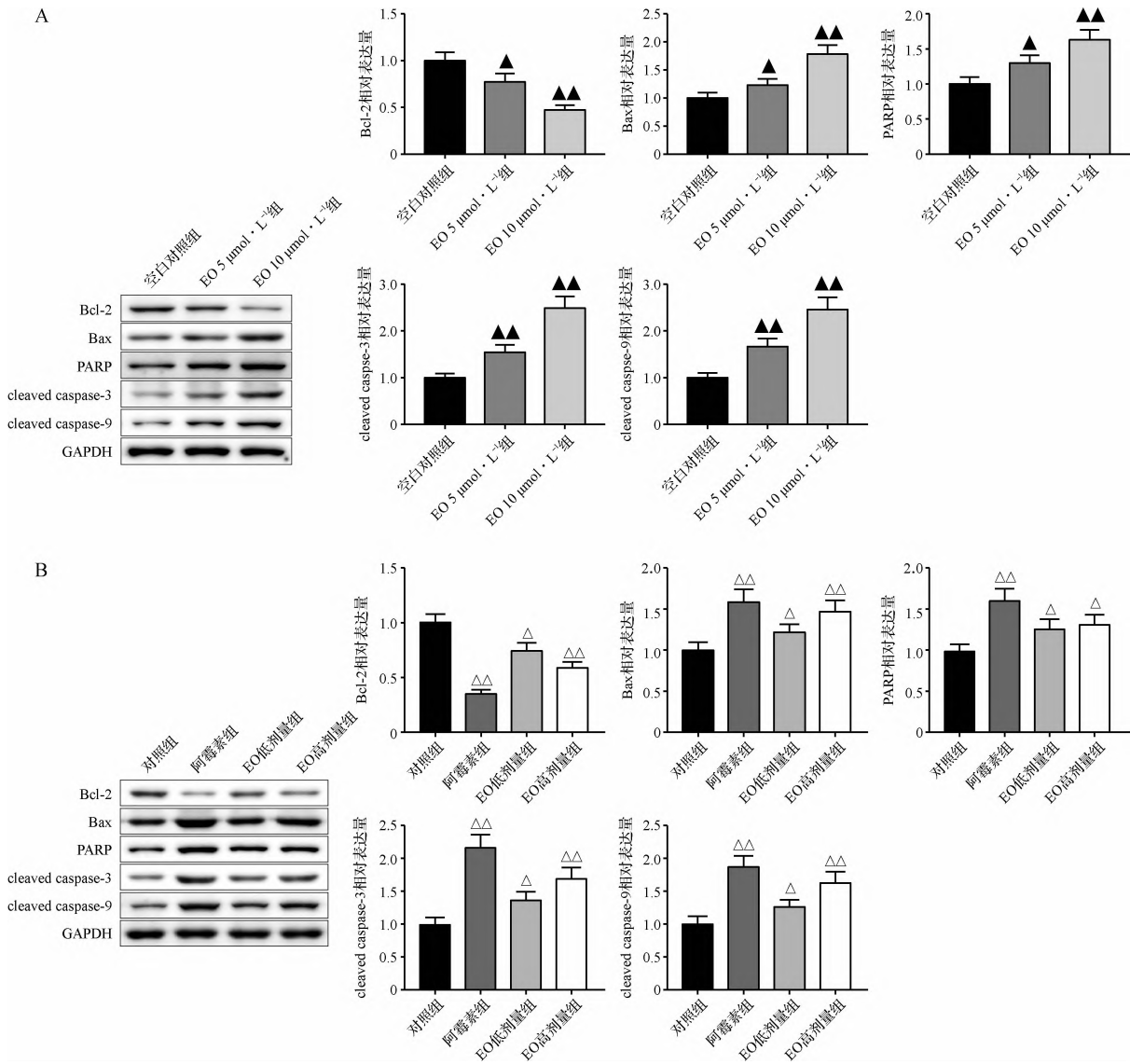
表5 各组裸鼠肿瘤组织中PCNA和Ki-67相对表达比较

Tab.5 Comparison of related expression of PCNA and Ki-67 in mice tumor tissue in each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	PCNA	Ki-67
对照组	0.42±0.04	0.35±0.04
阿霉素组	0.26±0.02 <sup>△△</sup>	0.21±0.03 <sup>△△</sup>
EO 低剂量组	0.34±0.04 <sup>△△</sup>	0.28±0.03 <sup>△△</sup>
EO 高剂量组	0.29±0.03 <sup>△△</sup>	0.26±0.03 <sup>△△</sup>

注：与对照组比较，<sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, <sup>△△</sup> $P<0.01$ .



注:A. 免疫印迹法检测各组细胞内目标蛋白表达;B. 免疫印迹法检测各组裸鼠肿瘤组织内目标蛋白表达。与空白对照组比较, <sup>▲</sup> $P<0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ;与对照组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ 。

Note: A. Western blot detected the target protein expression in BT-20 cells in each group; B. Western blot detected target protein expression in tumor tissue of mice in each group. Compared with blank control group, <sup>▲</sup> $P<0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P<0.01$ ; compared with control group, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$ .

图5 各组Bcl-2、Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9蛋白表达比较

Fig.5 Comparison of Bcl-2, Bax, PARP, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 protein expression in each group

性<sup>[14-15]</sup>。Bax为Bcl-2蛋白家族的促凋亡蛋白<sup>[13]</sup>,能够促进细胞凋亡。caspase家族可被Bax的信号激活,从而诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[13]</sup>,caspase-9能够激活下游的caspase-3,从而激活细胞凋亡信号通路<sup>[16]</sup>。前期发现,加入caspase抑制剂后,EO对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用明显减弱,提示EO上调caspase表达是促进TNBC细胞发生凋亡的关键<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,EO在体内外均能够显著抑制Bcl-2蛋白表达,促进Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9蛋白表达,同时能明显抑制裸鼠体内肿瘤的生长,提示EO能够诱导细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡,从而发挥抗TNBC的作用。

综上所述,EO具有抑制BT-20细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用,其作用机制可能与上调促凋亡蛋白Bax、PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9,下调抗凋亡蛋白Bcl-2有关。本课题组将进一步探究EO诱导TNBC细胞凋亡的机制,为中药治疗乳腺癌提供更多依据。

#### 参考文献:

#### References:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] 刘子梅,沈赞.三阴性乳腺癌靶向治疗最新进展[J].中国癌症杂志, 2017, 27(1):36-40.  
LIU Zimei, SHEN Zan. The latest developments in targeted therapy for triple-negative breast cancer[J]. Chin Oncol, 2017, 27(1):36-40.
- [3] 王怡,刘胜.刘胜教授治疗三阴性乳腺癌经验[J].浙江中医药大学学报, 2019, 43(7):675-678.  
WANG Yi, LIU Sheng. Professor LIU Sheng's experience in treating triple-negative breast cancer[J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2019, 43(7):675-678.
- [4] 赵相轩,温锋,卢再鸣.细胞凋亡在乳腺癌治疗中的研究进展[J].临床肿瘤学杂志, 2017, 22(2):175-179.  
ZHAO Xiangxuan, WEN Feng, LU Zaiming. Progression of the roles of apoptosis in breast cancer therapy[J]. Chin Clin Oncol, 2017, 22(2):175-179.
- [5] 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.  
LI Yunxiang, LIANG Yinku, GAO Feixiong, et al. Research progress of traditional Chinese medicine in treating breast cancer[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(3):211-219.
- [6] 陆梦圆,田莎莎.中药野马追化学成分及药理作用研究进展[J].中国民族民间医药, 2019, 28(9):37-42.  
LU Mengyuan, TIAN Shasha. Advances in research on chemical components and pharmacological effects of *Eupatorium lindleyanum* DC[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2019, 28(9):37-42.
- [7] YANG B, ZHAO Y, LOU C, et al. Eupalinolide O, a novel sesquiterpene lactone from *Eupatorium lindleyanum* DC., induces cell cycle arrest and apoptosis in human MDA-MB-468 breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5):2807-2813.
- [8] FOULKES W D, SMITH I E, REIS-FILHO J S. Triple-negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 363(20):1938-1948.
- [9] NISHIMURA R, OSAKO T, OKUMURA Y, et al. Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis[J]. Breast Cancer, 2010, 17(4):269-275.
- [10] GUO J L, GU S Q, LI Y, et al. Evaluation of clinical significance of endoglin expression during breast cancer and its correlation with ER and PCNA[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(23):5402-5407.
- [11] 于蕾,韩爽,郎朗,等.中药有效成分对乳腺癌细胞G<sub>2</sub>/M期调控的研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4):205-215.  
YU Lei, HAN Shuang, LANG Lang, et al. Research progress on G<sub>2</sub>/M arrest in breast cancer cells by active compounds of traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(4):205-215.
- [12] FIANDALO M V, KYPRIANOU N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis[J]. Exp Oncol, 2012, 34(3):165-175.
- [13] MERINO D, LOK S W, VISVADER J E, et al. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Oncogene, 2016, 35(15):1877-1887.
- [14] LIMA R T, MARTINS L M, GUIMARÃES J E, et al. Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(5):309-316.
- [15] INAO T, IIDA Y, MORITANI T, et al. Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin[J]. Oncotarget, 2018, 9(39):25545-25556.
- [16] FUJITA E, EGASHIRA J, URASE K, et al. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(4):335-344.

(收稿日期:2022-04-11)