

桃叶珊瑚苷对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响及机制[△]

司运辉^{1*}, 蒋 凯², 钱立全¹, 陈永顺³, 别会杰¹ (1. 商丘医学高等专科学校解剖与组胚教研室, 河南 商丘 476000; 2. 商丘医学高等专科学校生理学教研室, 河南 商丘 476000; 3. 商丘医学高等专科学校药理学教研室, 河南 商丘 476000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)08-0918-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.08.04



摘要 目的 探讨桃叶珊瑚苷(Auc)调节周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)/周期蛋白B1(CCNB1)/Polo样激酶1(PLK1)信号通路对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响。方法 以人乳腺癌细胞MCF-7为对象,将其分为对照组,Auc低、中、高浓度组(Auc-L、Auc-M、Auc-H组,20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc),Auc-H+pcDNA-NC组(80 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc+转染pcDNA-NC质粒),Auc-H+pcDNA-CDK1组(80 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc+转染pcDNA-CDK1质粒),检测各组细胞的增殖、克隆形成、侵袭、迁移能力,凋亡情况及周期分布,凋亡、上皮-间充质转化(EMT)、CDK1/CCNB1/PLK1信号通路相关蛋白的表达情况。以BALB/c裸鼠为对象,通过皮下接种MCF-7细胞悬液建立移植瘤模型,并将其分为对照组和Auc组(每组12只),检测各组裸鼠肿瘤体积、质量及肿瘤组织中CDK1/CCNB1/PLK1信号通路相关蛋白的表达情况。结果 与对照组细胞相比,Auc各浓度组的细胞克隆形成数、增殖率、细胞侵袭数、划痕愈合率、G₁/G₀期和S期细胞占比以及B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、神经钙黏素、纤维连接蛋白、CDK1、CCNB1、PLK1蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$),细胞凋亡率、G₂/M期细胞占比以及Bcl-2相关X蛋白、上皮钙黏素蛋白的表达水平均显著增加($P<0.05$),呈浓度依赖性($P<0.05$);与Auc-H+pcDNA-NC组细胞相比,Auc-H组细胞上述指标的差异均无统计学意义($P>0.05$),而Auc-H+pcDNA-CDK1组细胞上述指标则显著逆转($P<0.05$)。与对照组裸鼠相比,Auc组裸鼠肿瘤体积、质量以及肿瘤组织中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$)。结论 Auc能抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移,诱导细胞周期阻滞,抑制EMT进程,该作用可能与抑制CDK1/CCNB1/PLK1信号通路激活有关。

关键词 桃叶珊瑚苷;乳腺癌;恶性生物学行为;CDK1/CCNB1/PLK1信号通路

Effects and mechanism of aucubin on malignant biological behavior of breast cancer cells

SI Yunhui¹, JIANG Kai², QIAN Liquan¹, CHEN Yongshun³, BIE Huijie¹ (1. Anatomy and Embryo Teaching and Research Office, Shangqiu Medical College, Henan Shangqiu 476000, China; 2. Physiology Teaching and Research Office, Shangqiu Medical College, Henan Shangqiu 476000, China; 3. Pharmacology Teaching and Research Office, Shangqiu Medical College, Henan Shangqiu 476000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of aucubin (Auc) on the malignant biological behavior of breast cancer cells by regulating cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)/cyclin B1 (CCNB1)/Polo-like kinase 1 (PLK1) signaling pathway. **METHODS** Human breast cancer cells MCF-7 were divided into control group, Auc low-, medium- and high-concentration groups (AUC-L, AUC-M, AUC-H groups, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ Auc), Auc-H+pcDNA-NC group (80 $\mu\text{mol/L}$ Auc+transfected pcDNA-NC plasmid), and Auc-H+pcDNA-CDK1 group (80 $\mu\text{mol/L}$ Auc+transfected pcDNA-CDK1 plasmid). Cell proliferation, clonal formation, invasion and migration abilities, apoptosis and cycle distribution, and the expressions of related proteins of apoptosis, epithelial-mesenchymal transformation (EMT) and CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway were detected in each group. The transplanted tumor model of BALB/c nude mice was established by subcutaneous inoculation of MCF-7 cell suspension, and the mice were divided into control group and Auc group (12 mice in each group). The tumor volume, mass and the expressions of related proteins of CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway in tumor tissues were detected. **RESULTS** Compared with control group, the number of clonal formation, proliferation rate, cell invasion number, scar healing rate, G₁/G₀ phase and S phase cell proportions, and the expressions of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), N-cadherin, fibronectin, CDK1, CCNB1 and PLK1 were decreased significantly ($P<0.05$). The apoptotic rate, G₂/M phase cell proportion and the expressions of Bcl-2 associated X protein and E-cadherin were significantly increased, in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the Auc-H+pcDNA-NC group, there was no statistical significance in the above indexes in the Auc-H group ($P>0.05$), while the above indexes in the Auc-H+pcDNA-CDK1 group were significantly reversed ($P<0.05$). Compared with the control group, the tumor volume and mass, and the expressions of CDK1, CCNB1 and PLK1 in tumor tissue of Auc group were significantly decreased ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Auc can inhibit the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells, induce cell cycle arrest, and inhibit the progression

of EMT, which may be related to inhibiting the activation of the CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway.

KEYWORDS aucubin; breast cancer; malignant biological behavior; CDK1/CCNB1/PLK1 signaling pathway

[△] 基金项目 国家卫生健康委医药卫生科技发展研究中心课题 (No.W2022ZT726);河南省高等学校重点科研项目(No.23B310015)

* 第一作者 讲师。研究方向:中药药理。E-mail:yunhui1@163.com

乳腺癌是全球常见的恶性肿瘤,死亡率较高,是女性的主要健康问题之一^[1]。目前,乳腺癌的发病率仍在不断上升,且理想治疗药物仍需探索^[2]。桃叶珊瑚苷(aucubin, Auc)是从包括杜仲叶在内的多种药用植物中提取的一种低毒性天然化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物活性^[3]。研究表明, Auc能减轻乳腺癌引起的器官炎症性损伤,可诱导小鼠乳腺癌细胞4T1的凋亡^[4],但具体作用机制尚不清楚。

周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,其中CDK1能调节细胞周期,促进细胞增殖。研究指出, CDK1在乳腺癌细胞中呈过度表达,其表达水平与患者进展后的总体生存率和无复发生存率有关^[5]。周期蛋白B1(cyclin B1, CCNB1)是一种重要的细胞周期调节蛋白,其异常表达对细胞周期具有重要影响。研究指出, CCNB1在乳腺癌细胞中呈高度表达,相关药物可通过靶向CCNB1来抑制乳腺癌的进展^[6]。Polo样激酶1(Polo-like kinase 1, PLK1)是一种在乳腺癌细胞中过表达的蛋白激酶,抑制PLK1可诱导细胞阻滞于G₂/M期,并抑制乳腺癌细胞增殖^[7]。可见, CDK1/CCNB1/PLK1信号通路与细胞周期密切相关,抑制此通路可有效抑制乳腺癌的进展,但Auc能否通过该信号通路影响乳腺癌细胞的恶性生物学行为尚不清楚。此外有研究指出, 上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关,是乳腺癌发生发展的重要环节,抑制EMT进程可有效抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移^[8]。基于此,本研究拟从CDK1/CCNB1/PLK1信号通路出发,初步探讨Auc对乳腺癌细胞增殖、侵袭和转移等恶性生物学行为的影响及潜在机制,以期为乳腺癌的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括CS-160L型细胞培养箱(上海目尼实验设备有限公司)、SpectraMax iD5型酶标仪(美国Molecular Devices公司)、BX53型荧光显微镜(日本Olympus公司)、MI40型倒置生物显微镜(广州市明美光电技术有限公司)、FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD Bioscience公司)、GelDoc Go型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

Auc对照品(批号A31971,纯度≥98%)购自上海吉至生化科技有限公司;胰蛋白酶、RPMI 1640培养基、结晶紫染色液、RIPA裂解液(批号分别为T1300、31800、G1062、R0010)均购自北京索莱宝科技有限公司;1 mol/L的Tris缓冲液(批号T301502)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;CCK-8试剂盒(批号HB-CCK-8-1000)购自汉恒生物科技(上海)有限公司;Lipofectamine™ 2000转染试剂盒(批号11668019)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;pcDNA-NC、pcDNA-CDK1质粒(批号分

别为RB-VY-074、RB-VY-107)均购自广州锐博生物科技有限公司;5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxy-uridine, EdU)细胞增殖试剂盒(批号RCF043)购自上海茹创生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(批号SB-F6012)购自上海圣尔生物科技有限公司;兔上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏素(N-cadherin)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、CDK1、CCNB1、PLK1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(批号分别为A22333、A19083、A12977、A0208、A0207、A0220、A2056、A21082、AC001、AS029)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 细胞

人乳腺癌细胞MCF-7(批号bio-73090)购自北京百欧博伟生物技术有限公司。

1.4 动物

SPF级雌性BALB/c裸鼠,体重18~20 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号为SCXK(鲁)2022 0006。所有裸鼠均饲养于26~27℃、每12 h光照/黑暗交替的环境下,自由摄食、饮水。本实验方案经商丘医学高等专科学校实验动物伦理委员会批准(批号202205192106047)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养及Auc干预浓度、时间筛选

将乳腺癌细胞MCF-7置于含谷氨酰胺(300 mg/L)的RPMI 1640完全培养基(即含5%灭活的胎牛血清、10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液、1 mmol/L 丙酮酸钠和1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基)中培养(37℃, 5%CO₂)。取对数生长期细胞,按5×10³个/孔接种到96孔板中,以不同浓度Auc[0(对照)、10、20、40、80、160 μmol/L,浓度按相关文献^[9]设置,以Tris缓冲液为溶剂,下同]干预24、48、72 h,同时设置不含药物、不含细胞的空白组,每组设置6个复孔。随后,每孔加入CCK-8试剂适量,于37℃下培养1.5 h后,使用酶标仪于450 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并按下式计算细胞活力:细胞活力(%)=(OD_{药物组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组})×100%。据此结果确定后续实验Auc的干预浓度及时间。

2.1.2 细胞分组及处理

将细胞分为对照组、Auc低浓度组(Auc-L组)、Auc中浓度组(Auc-M组)、Auc高浓度组(Auc-H组)、Auc高浓度+过表达CDK1阴性对照组(Auc-H+pcDNA-NC组)和Auc高浓度+过表达CDK1组(Auc-H+pcDNA-CDK1组),每组设置6个复孔。参考“2.1.1”项下结果, Auc-L组、Auc-M组、Auc-H组分别用20、40、80 μmol/L的Auc处理48 h; Auc-H+pcDNA-NC组和Auc-H+pcDNA-

CDK1组按照相应转染试剂盒说明书方法分别转染pcDNA-NC和pcDNA-CDK1质粒48 h,待转染成功(即转染效率 $\geq 80\%$)后,再分别使用80 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc处理48 h。对照组用等体积生理盐水处理48 h。

2.1.3 细胞增殖与细胞克隆形成能力检测

取对数生长期的MCF-7细胞,按照“2.1.2”项下方法分组、处理48 h后,再按照EdU细胞增殖试剂盒说明书方法操作,以4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染核后,使用荧光显微镜观察并记录细胞总数及EdU阳性细胞(呈绿色)数,并按下式计算细胞增殖率:增殖率=EdU阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

取对数生长期的MCF-7细胞,按照“2.1.2”项下方法分组、处理10 d后,收集细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤2次后,用甲醇700 μL 固定15 min;干燥后,用0.1%结晶紫染色液染色30 min;吸弃染色液,细胞用水洗涤并风干30 s,使用显微镜观察细胞克隆形成情况并记录细胞克隆形成数(细胞数 > 50 为有效克隆)。

2.1.4 细胞侵袭与迁移能力检测

取对数生长期的MCF-7细胞,用不含血清的RPMI 1640培养基重悬至 1×10^4 个/mL,取该细胞悬液200 μL 置于Transwell上室,同时将含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基500 μL 置于Transwell下室,培养24 h。将上室细胞按照“2.1.2”项下方法分组、处理48 h后,去除上室底部未穿膜的细胞,将穿膜细胞(即侵袭细胞)用4%多聚甲醛固定,并用结晶紫染色液染色,在显微镜下观察细胞侵袭情况并记录侵袭细胞数(每个样本随机选取5个视野,以其平均值作为检测结果)。

取对数生长期的MCF-7细胞,以 4×10^5 个/mL、每孔300 μL 接种于6孔板中,待细胞铺满后,用移液器枪头在板内垂直划线。将细胞按照“2.1.2”项下方法分组、处理,分别于处理0、24 h时使用显微镜观察并测量各组细胞的划痕宽度,并按下式计算划痕愈合率:划痕愈合率=(0 h时的划痕宽度-24 h时的划痕宽度)/0 h时的划痕宽度 $\times 100\%$ 。

2.1.5 细胞凋亡及周期检测

取对数生长期的MCF-7细胞,按照“2.1.2”项下方法分组、处理48 h。收集细胞,加入Annexin V-FITC和PI试剂各5 μL ,于室温下避光孵育15 min,使用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

取对数生长期的MCF-7细胞,按照“2.1.2”项下方法分组、处理48 h。收集细胞,加入核糖核酸酶100 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min;加入PI试剂400 μL ,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育30 min,使用流式细胞仪进行细胞周期检测。

2.1.6 细胞相关蛋白表达检测

取对数生长期的MCF-7细胞,按照“2.1.2”项下方法分组、处理48 h。收集细胞,裂解后收集上清液。取上清液经蛋白定量、变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上。洗膜后,加入EMT相关蛋白(E-cadherin、N-cadherin、FN)、凋

亡相关蛋白(Bax、Bcl-2)、通路相关蛋白(CDK1、CCNB1、PLK1)和内参蛋白(GAPDH)一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:5 000、1:1 000、1:900、1:500、1:500、1:1 000、1:30 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:10 000),于室温下孵育2 h;经ECL显色后,使用凝胶成像系统成像。使用Image J软件进行蛋白条带灰度值分析,以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.2 裸鼠移植瘤实验

将裸鼠适应性喂养7 d后,于其左侧乳腺区域皮下注射 5×10^7 个/mL的MCF-7细胞悬液0.2 mL以建立乳腺癌移植瘤模型。待肿瘤体积增加到50~100 mm^3 时,将裸鼠随机分为对照组和Auc组,每组12只。Auc组裸鼠灌胃100 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 的Auc(以生理盐水为溶剂,浓度参考相关文献^[4]设置),对照组裸鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续15 d。实验过程中,每5 d测定裸鼠肿瘤体积1次;15 d后将其处死,取出瘤体,测定体积并称重,随后按“2.1.6”项下方法检测肿瘤组织中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白的表达水平。

2.3 统计学方法

使用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 Auc干预浓度及时间的筛选结果

培养24、48、72 h后,与对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc虽能降低细胞活力,但组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc均能显著降低细胞活力,且有一定的时间依赖性($P < 0.05$)。结果略。因10 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc对细胞活力的抑制作用不明显,160 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc作用不同时长以及20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的Auc作用72 h对细胞活力的影响较为明显,故经综合考虑,后续实验以20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 作为Auc的干预浓度,48 h作为其干预时间。

3.1.2 Auc对MCF-7细胞增殖与克隆形成的影响

与对照组相比,Auc各浓度组细胞的增殖率和克隆形成数均显著降低,且有一定的浓度依赖性($P < 0.05$);与Auc-H+pcDNA-NC组相比,Auc-H组细胞上述指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$),而Auc-H+pcDNA-CDK1组则显著升高($P < 0.05$)。结果见图1、图2。

3.1.3 Auc对MCF-7细胞侵袭与迁移能力的影响

与对照组相比,Auc各浓度组的细胞侵袭数和划痕愈合率均显著降低,且呈浓度依赖性($P < 0.05$);与Auc-H+pcDNA-NC组相比,Auc-H组细胞上述指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$),而Auc-H+pcDNA-CDK1组则显著升高($P < 0.05$)。结果见图3、图4。

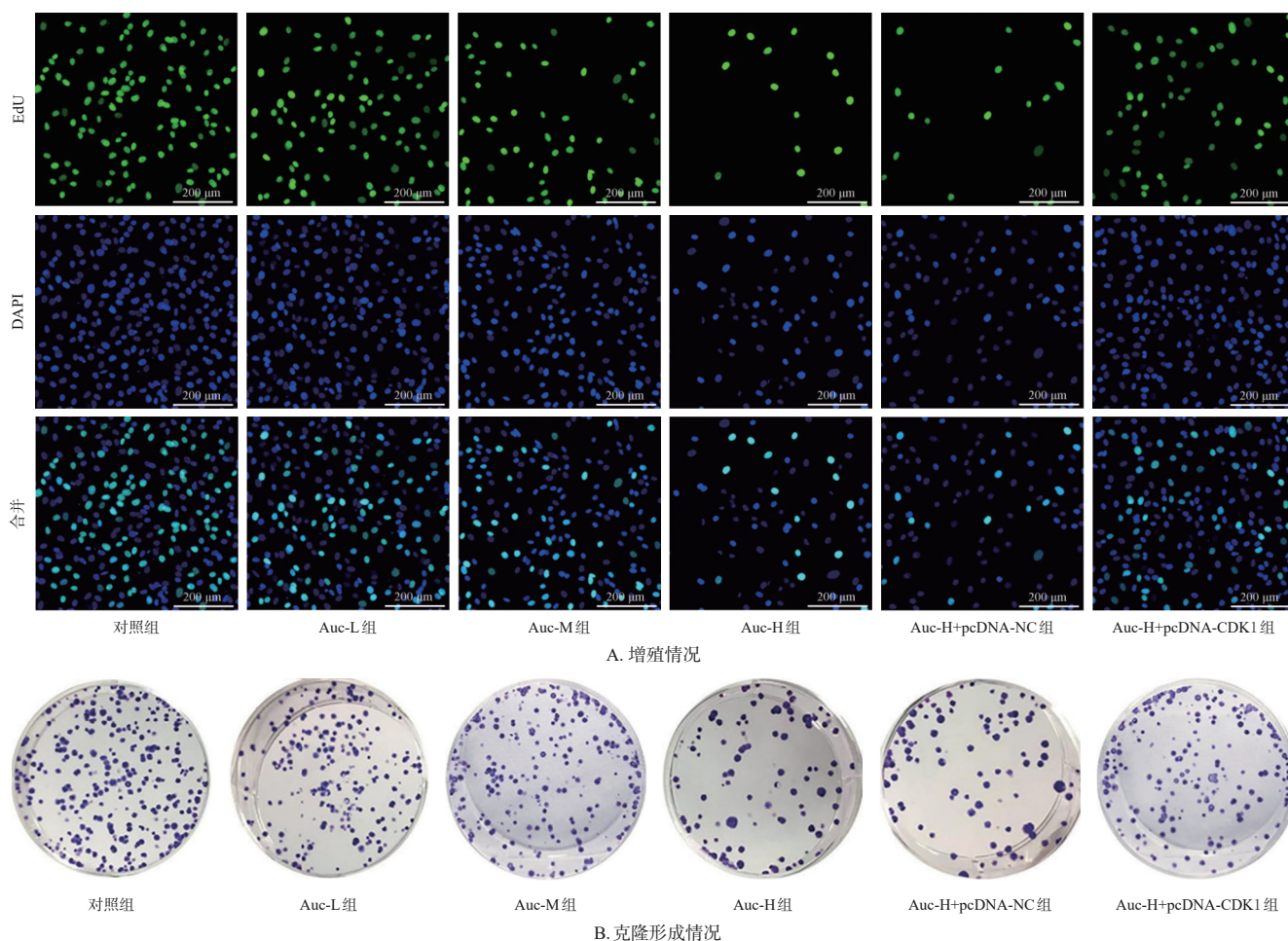
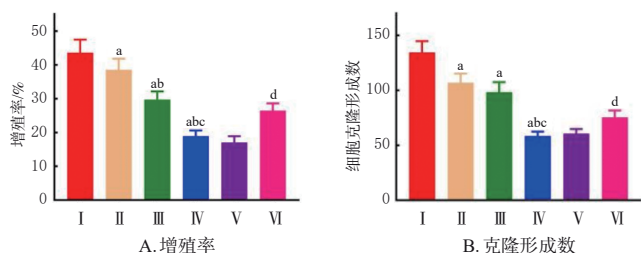


图1 Auc对MCF-7细胞增殖与克隆形成能力影响的观察图



I : 对照组; II : Auc-L组; III : Auc-M组; IV : Auc-H组; V : Auc-H+pcDNA-NC组; VI : Auc-H+pcDNA-CDK1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Auc-L组比较, $P < 0.05$; c: 与Auc-M组比较, $P < 0.05$; d: 与Auc-H+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图2 Auc对MCF-7细胞增殖与克隆形成能力影响的柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.1.4 Auc对MCF-7细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比, Auc各浓度组细胞的凋亡率及Bax蛋白表达水平均显著升高, Bcl-2蛋白表达水平均显著降低, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 与Auc-H+pcDNA-NC组相比, Auc-H组细胞上述指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$), 而Auc-H+pcDNA-CDK1组细胞的凋亡率及Bax蛋白表达水平均显著降低, Bcl-2蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。结果见图5。

3.1.5 Auc对MCF-7细胞周期的影响

与对照组相比, Auc各浓度组的G₁/G₀期和S期细胞

占比均显著降低, G₂/M期细胞占比均显著升高, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 与Auc-H+pcDNA-NC组相比, Auc-H组细胞上述指标的差异均无统计学意义($P > 0.05$), 而Auc-H+pcDNA-CDK1组的G₁/G₀期和S期细胞占比均显著升高, G₂/M期细胞占比显著降低($P < 0.05$)。结果见图6。

3.1.6 Auc对MCF-7细胞EMT相关蛋白表达的影响

与对照组相比, Auc各浓度组细胞中E-cadherin蛋白表达水平均显著升高, N-cadherin、FN蛋白表达水平均显著降低, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 与Auc-H+pcDNA-NC组相比, Auc-H组细胞中上述蛋白表达水平的差异均无统计学意义($P > 0.05$), 而Auc-H+pcDNA-CDK1组细胞中E-cadherin蛋白表达水平显著降低, N-cadherin、FN蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图7A、7B。

3.1.7 Auc对MCF-7细胞CDK1/CCNB1/PLK1信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比, Auc各浓度组细胞中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平均显著降低, 且呈浓度依赖性($P < 0.05$); 与Auc-H+pcDNA-NC组相比, Auc-H组细胞中上述蛋白表达水平的差异均无统计学意义($P > 0.05$), 而Auc-H+pcDNA-CDK1组细胞中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结果见图7C、7D。

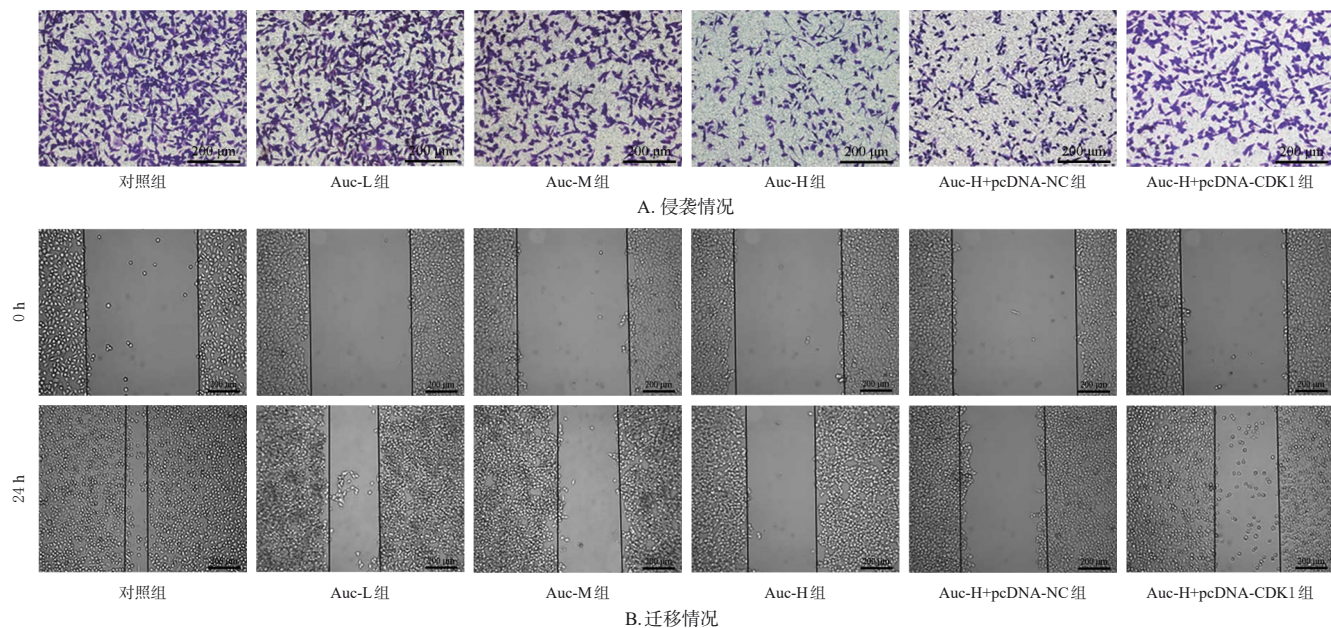
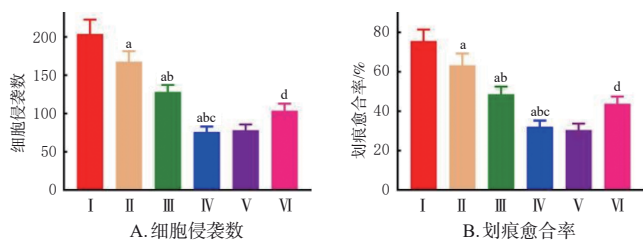


图3 Auc对MCF-7细胞侵袭与迁移能力影响的显微图



I : 对照组; II : Auc-L组; III : Auc-M组; IV : Auc-H组; V : Auc-H+pcDNA-NC组; VI : Auc-H+pcDNA-CDK1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Auc-L组比较, $P < 0.05$; c: 与Auc-M组比较, $P < 0.05$; d: 与Auc-H+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图4 Auc对MCF-7细胞侵袭与迁移能力影响的柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.2 动物实验结果

与对照组相比, Auc组裸鼠肿瘤体积、质量以及肿瘤组织中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见图8。

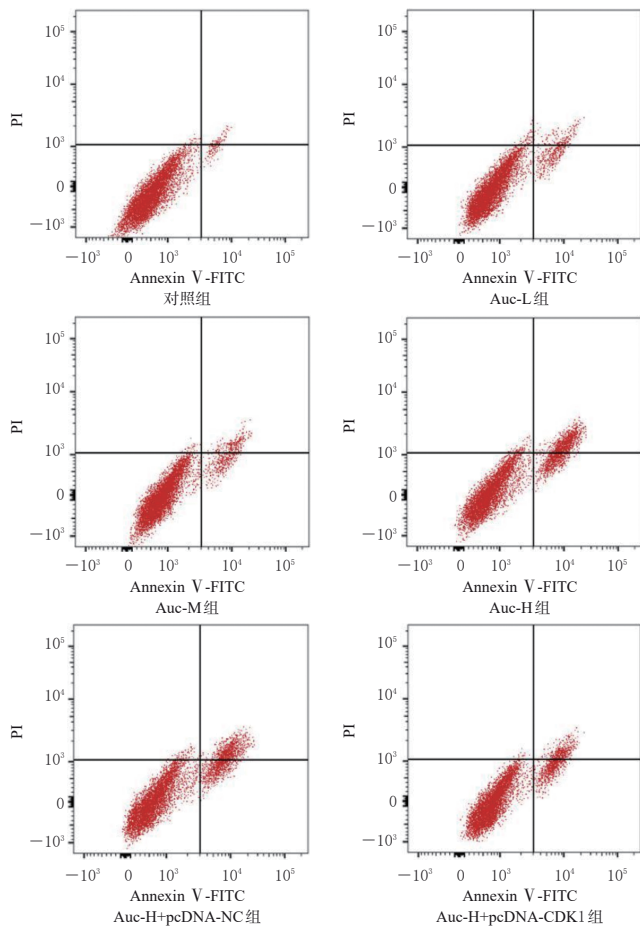
4 讨论

目前, 乳腺癌的治疗方式很多, 但放疗、化疗等治疗手段对泌乳功能、卵巢功能、生育能力等的影响仍是患者关注的主要问题^[10]。Auc是多种中草药的关键活性成分, 能减少活性氧的生成, 具有显著的抗肿瘤、抗炎作用, 可诱导细胞周期阻滞及凋亡, 抑制血管内皮生长因子表达, 抑制肿瘤细胞的增殖和迁移及肿瘤的发生发展^[9, 11]。本研究结果显示, Auc可显著降低乳腺癌细胞的活力, 减弱细胞的增殖、侵袭、迁移能力并促进其凋亡, 表明该成分可有效抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为。

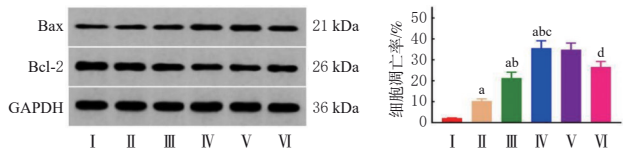
细胞周期由不同的细胞周期蛋白参与调控, 并由有丝分裂信号激活增殖所需的信号通路; 随后, 细胞周期蛋白直接与相应的CDK相互作用, CDK磷酸化靶蛋白, 从而激活转录因子, 最终驱动细胞周期进程^[12]。细胞周期进程异常是肿瘤发生的基本机制之一, 在各类肿瘤组织中均可检测到细胞周期蛋白D/E、PLK1的过表达^[13]。

EMT是肿瘤细胞侵袭和转移的重要因素, 当EMT发生时, 肿瘤细胞将失去上皮表型, 并获得间充质表型, 其迁移、侵袭能力明显增强, 故抑制EMT进程可抑制肿瘤细胞的生长^[14]。本研究结果显示, 经Auc干预后, G_2/M 期细胞占比及细胞中E-cadherin蛋白表达水平均较对照组显著升高, G_1/G_0 期、S期细胞占比及细胞中N-cadherin、FN蛋白表达水平均较对照组显著降低, 表明该成分能诱导细胞周期阻滞, 阻碍EMT进程。

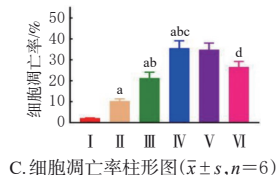
CDK1、CCNB1、PLK1是细胞周期进展中的关键蛋白: CDK1可参与调控 G_2/M 期检查点, 其表达上调与乳腺癌进展密切相关^[15]; CCNB1是细胞进入有丝分裂阶段的关键激酶, 可与CDK1形成复合物, 从而通过调节哺乳动物的细胞周期来促进恶性肿瘤进展^[16]; PLK1可参与细胞周期调节, 在肿瘤细胞异常增殖等过程中具有重要作用, 抑制或敲低PLK1表达可促进多种肿瘤细胞的凋亡^[17-18]。此外有研究显示, CDK1、CCNB1、PLK1在三阴性乳腺癌细胞中呈过表达, 并与患者较低的总生存率有关^[19]; Wu等^[20]研究显示, 通过抑制p53/CCNB1/PLK1途径可抑制三阴性乳腺癌细胞的周期阻滞, 促进细胞凋亡, 从而抑制三阴性乳腺癌的发生。本研究结果显示, 经Auc干预后, 细胞中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白的表达均较对照组显著下调, 其细胞周期及EMT进程亦受到抑制。裸鼠移植瘤实验结果也表明, Auc能抑制肿瘤生长, 并显著下调肿瘤组织中CDK1、CCNB1、PLK1蛋白的表达。本研究通过转染过表达CDK1质粒进一步验证了Auc对乳腺癌细胞恶性生物学行为的抑制作用是否与CDK1/CCNB1/PLK1信号通路有关。结果显示, 转染pcDNA-CDK1后, 细胞增殖、侵袭、迁移能力增强, 凋亡减少, Auc对乳腺癌细胞恶性生物学行为的抑制作用被逆转, 表明Auc可通过抑制CDK1/CCNB1/PLK1信号通路来抑制乳腺癌细胞恶性生物学行为。



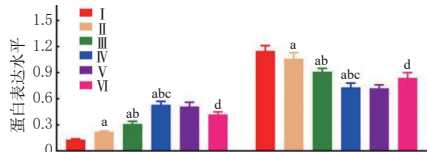
A. 细胞凋亡流式图



B. 细胞凋亡相关蛋白表达电泳图



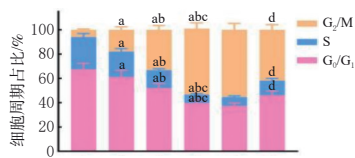
C. 细胞凋亡率柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)



D. 细胞凋亡相关蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)

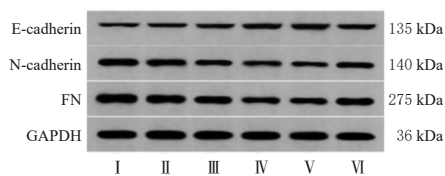
I : 对照组; II : Auc-L组; III : Auc-M组; IV : Auc-H组; V : Auc-H+pcDNA-NC组; VI : Auc-H+pcDNA-CDK1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Auc-L组比较, $P < 0.05$; c: 与Auc-M组比较, $P < 0.05$; d: 与Auc-H+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

图5 Auc对MCF-7细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响

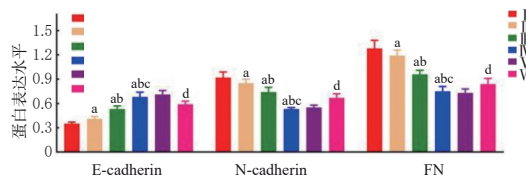


I : 对照组; II : Auc-L组; III : Auc-M组; IV : Auc-H组; V : Auc-H+pcDNA-NC组; VI : Auc-H+pcDNA-CDK1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Auc-L组比较, $P < 0.05$; c: 与Auc-M组比较, $P < 0.05$; d: 与Auc-H+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

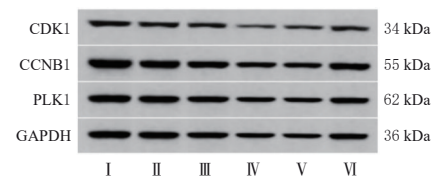
图6 Auc对MCF-7细胞周期分布的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)



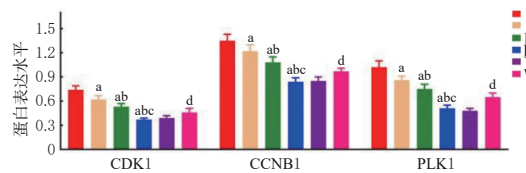
A. 细胞EMT相关蛋白表达电泳图



B. 细胞EMT相关蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)



C. 细胞通路相关蛋白表达电泳图



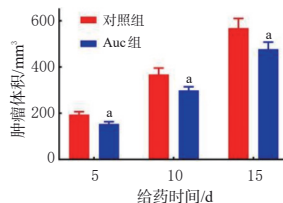
D. 细胞通路相关蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=6$)

I : 对照组; II : Auc-L组; III : Auc-M组; IV : Auc-H组; V : Auc-H+pcDNA-NC组; VI : Auc-H+pcDNA-CDK1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Auc-L组比较, $P < 0.05$; c: 与Auc-M组比较, $P < 0.05$; d: 与Auc-H+pcDNA-NC组比较, $P < 0.05$ 。

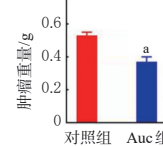
图7 Auc对MCF-7细胞EMT、CDK1/CCNB1/PLK1信号通路相关蛋白表达的影响



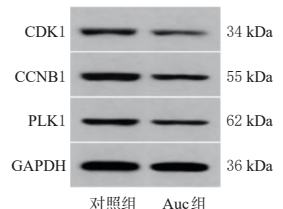
A. 裸鼠移植瘤图



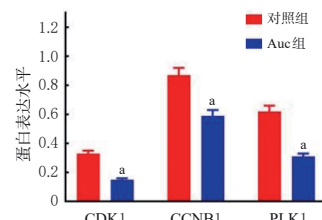
B. 裸鼠肿瘤体积柱形图($\bar{x} \pm s, n=12$)



C. 裸鼠肿瘤质量柱形图($\bar{x} \pm s, n=12$)



D. 裸鼠肿瘤组织中通路相关蛋白表达电泳图



E. 裸鼠肿瘤组织中通路相关蛋白表达水平柱形图($\bar{x} \pm s, n=12$)

a: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图8 Auc对裸鼠移植瘤生长及相关蛋白表达的影响

综上所述,Auc能抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移,诱导细胞周期阻滞,抑制EMT进程,该作用可能与抑制CDK1/CCNB1/PLK1信号通路激活有关。本研究基于CDK1/CCNB1/PLK1信号通路初步探讨了Auc对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响,但乳腺癌病理机制复杂,具体机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] 刘军兰. 乳腺癌首次成为全球最常见的癌症[J/OL]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2020, 14(6): 389[2023-09-17]. <https://qikan.cqvip.com/Qikan/Article/Detail?id=710390-7778>. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2020.06.013.
LIU J L. Breast cancer has become the most common cancer in the world for the first time[J/OL]. Chin J Breast Dis Electron Ed, 2020, 14(6): 389[2023-09-17]. <https://qikan.cqvip.com/Qikan/Article/Detail?id=7103907778>. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2020.06.013.
- [2] BRITT K L, CUZICK J, PHILLIPS K A. Key steps for effective breast cancer prevention[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(8): 417-436.
- [3] 朱志铭, 任朝兴, 马博. 桃叶珊瑚苷药理作用及分子机制研究进展[J]. 生物加工过程, 2021, 19(5): 482-490.
ZHU Z M, REN C X, MA B. Pharmacology and molecular mechanism of aucubin: a review[J]. Chin J Bioprocess Eng, 2021, 19(5): 482-490.
- [4] SHAO M, KUANG Z Y, WANG W L, et al. Aucubin exerts anticancer activity in breast cancer and regulates intestinal microbiota[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 4534411.
- [5] XING Z Y, WANG X, LIU J Q, et al. Expression and prognostic value of CDK1, CCNA2, and CCNB1 gene clusters in human breast cancer[J]. J Int Med Res, 2021, 49(4): 300060520980647.
- [6] ZHOU X, ZHAO Q, XIAO M. Hsa_circ_0137652 regulates miR-1205/CCNB1 axis to accelerate the malignancy of breast cancer[J]. Mol Biotechnol, 2023, 65(11): 1824-1835.
- [7] WANG B Y, HUANG X T, LIANG H P, et al. PLK1 inhibition sensitizes breast cancer cells to radiation via suppressing autophagy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2021, 110(4): 1234-1247.
- [8] 王春晖, 楚爱景, 朱振宇, 等. 雄黄外用对三阴性乳腺癌上皮间质转化的调控作用研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(11): 1027-1034.
WANG C H, CHU A J, ZHU Z Y, et al. Study on the regulatory effect of realgar for external use on epithelial-mesenchymal transformation in triple-negative breast cancer[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2022, 38(11): 1027-1034.
- [9] 尹恒, 罗全慧, 殷浩, 等. 桃叶珊瑚苷通过活化miR-1294/YWHAZ信号通路抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移[J]. 医学研究杂志, 2023, 52(4): 53-58.
YIN H, LUO Q H, YIN H, et al. Aucubin inhibits the proliferation and migration of cervical cancer cells by activating miR-1294/YWHAZ signaling pathway[J]. J Med Res, 2023, 52(4): 53-58.
- [10] 方依寒, 赵毅. 乳腺癌临床治疗与生殖保护相关问题[J]. 中国实用外科杂志, 2019, 39(8): 864-867.
FANG Y H, ZHAO Y. Problems related to clinical treatment and reproductive protection of breast cancer[J]. Chin J Pract Surg, 2019, 39(8): 864-867.
- [11] 梅凡, 姚峰, 朱磊, 等. 桃叶珊瑚苷对肺癌细胞增殖、侵袭的抑制作用及对TGF- β /SOX7通路的影响[J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(4): 10-14.
MEI F, YAO F, ZHU L, et al. Inhibitory effect of aucubin on the proliferation and invasion of lung cancer cells and its effect on TGF- β /SOX7 pathway[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2021, 23(4): 10-14.
- [12] ZHENG K, HE Z D, KITAZATO K, et al. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy[J]. Theranostics, 2019, 9(1): 104-125.
- [13] LIU J, PENG Y H, WEI W Y. Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy[J]. Trends Cell Biol, 2022, 32(1): 30-44.
- [14] LÜÖND F, SUGIYAMA N, BILL R, et al. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy[J]. Dev Cell, 2021, 56(23): 3203-3221.e11.
- [15] REN L W, YANG Y H, LI W, et al. CDK1 serves as a therapeutic target of adrenocortical carcinoma via regulating epithelial-mesenchymal transition, G₂/M phase transition, and PANoptosis[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 444.
- [16] LIU Y H, XU J, WANG Y N, et al. USP14 regulates cell cycle progression through deubiquitinating CDK1 in breast cancer[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2022, 54(11): 1610-1618.
- [17] YU Z L, DENG P, CHEN Y F, et al. Inhibition of the PLK1-coupled cell cycle machinery overcomes resistance to oxaliplatin in colorectal cancer[J]. Adv Sci, 2021, 8(23): e2100759.
- [18] ZHANG Z Z, CHENG L J, LI J, et al. Targeting Plk1 sensitizes pancreatic cancer to immune checkpoint therapy[J]. Cancer Res, 2022, 82(19): 3532-3548.
- [19] LU Y B, YANG G, XIAO Y, et al. Upregulated cyclins may be novel genes for triple-negative breast cancer based on bioinformatic analysis[J]. Breast Cancer, 2020, 27(5): 903-911.
- [20] WU Y H, ZHOU T, QIAN D, et al. Z-guggulsterone induces cell cycle arrest and apoptosis by targeting the p53/CCNB1/PLK1 pathway in triple-negative breast cancer[J]. ACS Omega, 2023, 8(2): 2780-2792.

(收稿日期: 2023-10-07 修回日期: 2024-03-05)

(编辑: 张元媛)