

引用: 欧阳志, 郑裴凡, 李松莲. 菊藻丸对乳腺癌MCF-7细胞PTEN/PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中医导报, 2025, 31(4): 34-41.

菊藻丸对乳腺癌MCF-7细胞PTEN/PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响*

欧阳志¹, 郑裴凡², 李松莲¹

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005;

2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的: 探究菊藻丸含药血清通过调控PTEN/PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制人乳腺癌MCF-7细胞恶性行为的作用及机制。方法: 设计合成针对人PTEN基因的shRNA及阴性对照NC序列, 构建PTEN基因沉默的慢病毒载体, 分别感染MCF-7细胞。Real-time PCR和Western blotting验证PTEN敲减效果。将细胞分为正常对照组、空白血清组、菊藻丸含药血清组、LV-shNC组、LV-shNC+菊藻丸含药血清组、LV-shPTEN组、LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组、LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。CCK-8和集落形成实验检测细胞增殖能力, TUNEL染色检测凋亡水平, 流式细胞术分析细胞周期分布, 划痕实验和Transwell小室实验分别检测细胞迁移和侵袭能力, Western blotting检测PTEN/PI3K/Akt/mTOR通路关键蛋白表达变化。结果: Real-time PCR和Western blotting结果证实, PTEN shRNA转染MCF-7细胞后, PTEN mRNA和蛋白表达水平明显降低。与空白血清组比较, 菊藻丸含药血清组MCF-7细胞增殖、集落形成、迁移侵袭能力显著下降, 凋亡水平升高, G₁期阻滞更明显, PTEN表达量升高, p-PI3K、p-AKT、p-mTOR水平降低 ($P < 0.05$); LV-shNC组与空白血清组各指标比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组细胞增殖、集落形成、迁移侵袭能力受到抑制, 凋亡率及G₁期比例升高, PTEN表达上调, PI3K/Akt/mTOR通路活性下降 ($P < 0.05$); 与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较, LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组细胞增殖、侵袭转移能力增强, 凋亡水平及G₁期比例下降, PTEN表达量降低, PI3K/Akt/mTOR通路过度活化 ($P < 0.05$); LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组细胞恶性表型受到更明显抑制, PI3K/Akt/mTOR通路活性进一步降低 ($P < 0.05$)。结论: 菊藻丸含药血清可通过激活PTEN, 抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路, 进而抑制乳腺癌MCF-7细胞的增殖、侵袭转移, 促进其凋亡和G₁期阻滞。这可能是菊藻丸发挥抗乳腺癌作用的重要机制之一。

[关键词] 乳腺癌; 菊藻丸; PTEN; PI3K/Akt/mTOR; 细胞增殖; 侵袭转移; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R285.5; R737.9; R271.44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)3-0034-08

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.04.006

The Influence of Juzao Pill (菊藻丸) on the PTEN/PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells

OUYANG Zhi¹, ZHENG Peifan², LI Songlian¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410005, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects and mechanisms of Juzao Pill-containing serum on inhibiting the malignant behaviors of human breast cancer MCF-7 cells through regulating the PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Methods: shRNA targeting human PTEN gene and negative control NC sequences were designed and synthesized. Lentiviral vectors for PTEN gene silencing were constructed and used to infect MCF-7 cells. The knockdown effect of PTEN was verified by Real-time PCR and Western blotting. Cells were divided into control group, blank serum group, Juzao Pill-containing serum group, LV-shNC group, LV-shNC+Juzao Pill-containing serum group, LV-shPTEN group, LV-shPTEN+Juzao Pill-containing serum group, and LV-shPTEN+Juzao Pill-containing serum+MK2206 group. Cell proliferation was detected by CCK-8 and colony

*基金项目: 湖南省自然科学基金药科联合项目 (2022JJ80022)

formation assays. Apoptosis level was examined by TUNEL staining. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Scratch wound healing and Transwell assays were performed to assess cell migration and invasion abilities, respectively. Key protein expression changes in the PTEN/PI3K/Akt/mTOR pathway were detected by Western blotting. Results: Real-time PCR and Western blotting confirmed that PTEN mRNA and protein expression levels were significantly reduced after PTEN shRNA transfection in MCF-7 cells. Compared with the blank serum group, the Juzao Pill-containing serum group showed significantly decreased proliferation, colony formation, migration and invasion abilities, increased apoptosis level, more obvious G₁ phase arrest, upregulated PTEN expression, and reduced phosphorylation levels of p-PI3K, p-Akt, and p-mTOR ($P<0.05$). There was no statistical difference in each indicator between the LV-shNC group and the blank serum group ($P>0.05$). Compared with the LV-shNC group, the LV-shNC+Juzao Pill-containing serum group exhibited inhibited cell proliferation, colony formation, migration and invasion abilities, increased apoptosis rate and G₁ phase proportion, upregulated PTEN expression, and decreased PI3K/Akt/mTOR pathway activity ($P<0.05$). Compared with the LV-shNC+Juzao Pill-containing serum group, the LV-shPTEN+Juzao Pill-containing serum group showed enhanced cell proliferation, invasion and metastasis abilities, decreased apoptosis level and G₁ phase proportion, reduced PTEN expression, and hyperactivated PI3K/Akt/mTOR pathway ($P<0.05$). The LV-shPTEN+Juzao Pill-containing serum+MK2206 group exhibited more obvious suppression of malignant phenotypes and further reduced PI3K/Akt/mTOR pathway activity compared with the LV-shPTEN+Juzao Pill-containing serum group ($P<0.05$). Conclusion: Juzao Pill-containing serum can inhibit the proliferation, invasion and metastasis, and promote the apoptosis and G₁ phase arrest of breast cancer MCF-7 cells by activating PTEN and inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, which may be one of the important mechanisms of Juzao Pill in exerting anti-breast cancer effects.

[Keywords] breast cancer; Juzao Pill; PTEN; PI3K/Akt/mTOR; cell proliferation; invasion and metastasis; apoptosis; cell cycle

乳腺癌是全球女性发病率最高的恶性肿瘤之一。尽管近年来乳腺癌的综合治疗取得了长足进步,但其死亡率依然居高不下^[1]。目前临床上主要采用手术、放化疗、内分泌治疗等方法治疗乳腺癌,但往往难以避免毒副作用和耐药性等问题^[2]。鉴于此,开发高效低毒的新型治疗策略对于改善乳腺癌患者的预后和生存质量具有重要意义。第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN)是一种重要的肿瘤抑癌基因,可通过去磷酸化作用负向调节多个信号通路^[3]。研究^[4]表明,PTEN在各类肿瘤组织中普遍表达降低或缺失,其表达水平与肿瘤预后紧密相关。在乳腺癌中,PTEN表达量普遍偏低,其缺失突变可促进乳腺癌的发生与进展^[5]。磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路是一条经典的肿瘤相关信号通路,可调控肿瘤细胞增殖、转移等诸多生物学过程^[6-7]。PTEN可通过脱磷酸化第二信使PIP₃,拮抗PI3K活性,进而抑制下游Akt、mTOR等效应分子的活化,发挥抑制肿瘤的作用^[7-8]。在乳腺癌中,该信号通路普遍处于异常活化状态,并与肿瘤分期及不良预后密切相关^[9]。由此可见,PTEN-PI3K/Akt/mTOR轴在乳腺癌中起着至关重要的作用,针对该信号通路的干预有望成为乳腺癌治疗的新策略。

在辅助抗癌治疗中,中医药疗法展现出独特价值。菊藻

丸作为肖梓荣教授多年临床实践的结晶,在抗肿瘤领域获得广泛认可。研究^[10]表明,菊藻丸能延长乳腺癌术后患者的无病生存期和总生存期,降低复发转移率,且无明显不良反应。这提示菊藻丸是一个安全有效的乳腺癌辅助治疗药物,在临床上具有良好的应用前景。基于上述临床证据,菊藻丸被纳入抗乳腺癌中药复方制剂的治疗指南和专家共识^[12]。此外,体外研究发现,菊藻丸含药血清能够抑制人乳腺癌MCF-7细胞的生长和转移,并能上调MCF-7细胞PTEN的表达^[13]。然而,菊藻丸抗乳腺癌的分子机制仍需深入探究。本研究旨在通过细胞学实验,探究菊藻丸对乳腺癌MCF-7细胞恶性表型的影响及其调控PTEN-PI3K/Akt/mTOR信号轴的作用机制,以期为临床开发抗乳腺癌中药复方制剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24只8周龄SPF级Wistar雌性大鼠,体质量(201.3±18.7)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2022-0009,质量合格证号:202209150001。动物饲养在湖南中医药大学动物实验中心,饲养条件:温度(20±2)℃、相对湿度45%~65%、光照周期为12 h/12 h明暗交替。实验方案经湖南中医药大学动物伦理委员会审核批准(批准号:IACUC-20220112)。

1.1.2 细胞株 人乳腺癌MCF-7细胞系源自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,采用添加10%胎牛血清的

DMEM培养基进行常规传代培养。

1.1.3 细胞及主要试剂 菊藻丸由湖南中医药大学第二附属医院药剂中心配制,湘药制备字:Z20210437000,批号:20231119,其组方包含:野菊花、海藻、黄连、黄柏各8 g,莪术、蜈蚣、山慈菇、紫重楼各4 g,紫草、三棱各8 g,马蔺子、漏芦、黄芪各12 g,党参8 g,制何首乌16 g。将菊藻丸以1:5的质量比例加入蒸馏水制成0.2 g/mL储备液,4℃储存待用。

DMEM高糖培养基(批号:2230514)、胎牛血清(批号:211001)、TRIzol试剂(批号:212015)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CCK-8细胞增殖与毒性检测试剂盒(日本Dojindo Laboratories公司,批号:C8130-100T);TUNEL凋亡检测试剂盒(瑞士Roche Diagnostics GmbH,批号:12156793001-20T);PrimeScript RT反转录试剂盒(批号:AK7802)、SYBR Premix Ex Taq II实时荧光定量PCR试剂盒(批号:AK8438)均购自日本Takara Bio公司;胰酶消化液(批号:20230715)、RIPA细胞裂解缓冲液(批号:20220622)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010)、ECL化学发光显色液(批号:P0018S)、SDS-PAGE电泳凝胶制备试剂盒(批号:P0012A)均购自南京碧云天生物技术有限公司;PVDF蛋白转印膜(美国Merck Millipore Corporation,批号:K5MA7566);预染蛋白分子量标记物(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:26616);抗PTEN单克隆抗体(批号:9188S)、抗PI3K单克隆抗体(批号:4249S)、抗p-PI3K单克隆抗体(批号:4228S)、抗Akt单克隆抗体(批号:4691S)、抗p-Akt单克隆抗体(批号:4060S)、抗mTOR单克隆抗体(批号:2983S)、抗p-mTOR单克隆抗体(批号:5536S)和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号:7074S)均购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.1.4 主要仪器 实时荧光定量PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司,型号:ABI 7500);CO₂培养箱(德国Binder公司,型号:CB 170);倒置显微镜(日本Nikon公司,型号:ECLIPSE Ti-S);流式细胞仪(美国BD公司,型号:FACSCalibur);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司,型号:Gel Doc XR+);酶标仪(美国Beckman Coulter公司,型号:DTX 880 Multimode Detector)。

1.2 方法

1.2.1 菊藻丸含药血清制备 参照本课题组既往研究^[13]制备菊藻丸含药血清。24只大鼠适应性喂养1周后,随机分为菊藻丸组和对照组,各12只。按照“实验动物与人的体表面积比”计算,菊藻丸组和对照组分别以菊藻丸生药[5.4 g/(kg·d)]灌胃和等体积生理盐水灌胃,连续给药3 d。第4天末次给药后禁食不禁水,用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,行腹主动脉取血,用无菌EP管收集血液约6 mL。4 000 r/min离心10 min(离心半径10 cm),吸取上层血清。使用0.22 μm无菌滤膜过滤,获得菊藻丸含药血清和空白对照血清,储存在-20℃冰箱。

1.2.2 细胞培养 本研究使用人乳腺癌MCF-7细胞系作为实验对象。以20%胎牛血清强化的DMEM为培养基,维持标准培养条件(37℃、5%CO₂)。细胞每2~3 d分批传代,选择生长指数期细胞开展实验。

1.2.3 慢病毒载体构建及MCF-7细胞感染 设计并合成人PTEN基因的shRNA序列及阴性对照序列(NC),委托上海吉

凯基因有限公司构建成慢病毒载体。转染前以8 μg/mL聚凝胺处理细胞,按感染复数为10的比例加入PTEN-shRNA慢病毒或NC慢病毒,置37℃、5%CO₂孵育24 h后更换新鲜培养基,继续培养48 h后传代。采用qPCR和Western blotting检测PTEN基因沉默效率。

1.2.4 细胞分组与处理 将对数生长期的MCF-7细胞分为8组:(A)正常对照组,细胞在含20%胎牛血清的DMEM完全培养基中常规培养;(B)空白血清组,细胞在含20%空白血清的DMEM培养基中培养;(C)菊藻丸含药血清组,细胞在含20%菊藻丸含药血清的DMEM培养基中培养;(D)LV-shNC组,转染NC序列后加入含20%胎牛血清的DMEM完全培养基培养;(E)LV-shNC+菊藻丸含药血清组,转染NC慢病毒后加入加入含20%菊藻丸含药血清的DMEM培养基培养;(F)LV-shPTEN组,转染PTEN-shRNA慢病毒后加入含20%胎牛血清的DMEM完全培养基培养;(G)LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组,转染PTEN-shRNA慢病毒后加入含20%菊藻丸含药血清的DMEM培养基培养;(H)LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组,在转染PTEN-shRNA慢病毒后加入含20%菊藻丸含药血清和1 μmol/L Akt抑制剂MK2206的DMEM培养基培养。所有处理组的细胞均在37℃、5%CO₂的培养条件下继续培养48 h,然后进行后续相关实验。

1.2.5 细胞增殖活性检测 以CCK-8检测方法评估细胞生长状态。取对数生长期MCF-7细胞,按每孔 5×10^3 个密度种植到96孔板中,每组设6个平行孔。培养24 h,向各孔加入10 μL CCK-8试剂,避光孵育2 h。用酶标仪在450 nm波长测定各孔吸光度(OD)值。

1.2.6 细胞集落形成实验 将对数生长期细胞以1 000个/孔接种于6孔板。细胞贴壁后,按分组加入相应的处理培养基。培养10 d后,弃去培养上清,PBS洗涤,4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色10 min。自来水冲洗晾干,于低倍显微镜下观察并拍照计数直径>1 mm的克隆数。

1.2.7 细胞划痕实验 将MCF-7细胞以每孔 1×10^6 个的密度接种于6孔板中,培养至单层细胞铺满孔底。用无菌200 μL移液器枪头垂直于培养板划线,形成宽度一致的划痕。PBS轻轻冲洗脱落的细胞,按实验分组加入相应处理的培养基。在划痕形成时(0 h)及24 h时显微镜下拍照,用Image J软件测量划痕宽度,计算细胞迁移距离。迁移距离=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/2。

1.2.8 Transwell侵袭实验 应用预涂Matrigel的Transwell装置进行实验。上层注入200 μL不含血清的培养液与 5×10^4 个待测细胞的混悬液,底部加入含20%FBS的完全培养基600 μL。根据实验分组进行相应的处理,每组3个复孔。放入37℃、5%CO₂培养环境中孵育48 h。随后以PBS清洗,4%多聚甲醛进行固定,并采用结晶紫染液显色。通过倒置显微镜观察并采集图像,利用ImageJ分析软件统计迁移至膜下的细胞数量。

1.2.9 细胞凋亡检测 将各组细胞以 1×10^6 个/mL的密度接种于预处理的细胞爬片。待爬满细胞后使用PBS轻轻洗涤,4%多聚甲醛固定15 min,0.1% Triton X-100透膜处理5 min。然后参照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书,加入TUNEL反应

液,于37℃避光孵育1 h, PBS洗涤, DAPI染核10 min。封片置于荧光显微镜下观察。

1.2.10 细胞周期分析 各组细胞以 1×10^5 个/孔接种6孔板, 每组3个复孔, 细胞贴壁后进行分组处理, 培养48 h。胰酶消化收集细胞, PBS洗涤, 1 000 r/min离心5 min(离心半径10 cm), 弃上清。70%冰乙醇4℃固定过夜, 次日PBS洗涤, 1 000 r/min离心5 min(离心半径10 cm), 加入PI/RNase染色液, 避光孵育30 min后上流式细胞仪检测, FlowJo软件分析每个周期的细胞分布百分比。

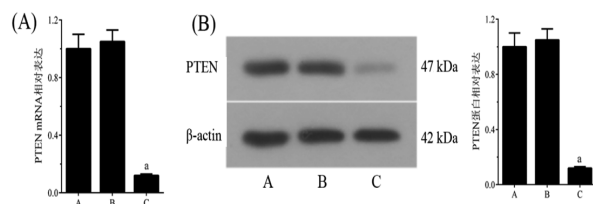
1.2.11 qPCR检测mRNA相对表达量 采用TRIzol法提取总RNA, 紫外分光光度计检测RNA浓度和纯度。采用逆转录试剂盒反转录合成cDNA。反应体系包括1 μg总RNA、4 μL 5×PrimeScript Buffer、1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix、1 μL Oligo dT Primer、1 μL随机六聚体引物以及12 μL RNase Free d H₂O。反应条件: 70℃预变性5 min, 冰上快速冷却2 min; 37℃反转录15 min, 85℃灭活反转录酶5 s。设计并合成引物(PTEN-F: 5'-ACCATAACCCACACAGC-3'; PTEN-R: 5'-CAGTTCGTCCCTTCCAG-3'; β-actin-F: 5'-GGCAC-CCAGCACAATGAA-3'; β-actin-R: 5'-TAGAAGCATTTGCG-GTGG-3')。qPCR反应体系: cDNA 2 μL, 正、反引物(10 μmol/L)各0.4 μL, 2×SYBR Premix Ex TaqTMII 10 μL, RNase Free H₂O补足至20 μL。反应程序: 95℃预变性3 min; 95℃变性15 s, 55℃退火40 s, 72℃延伸30 s, 共40个循环。检测目的基因PTEN和内参β-actin的扩增曲线和融解曲线, 以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算PTEN相对表达量。

1.2.12 Western blotting法检测蛋白表达 用RIPA裂解液提取各组细胞的总蛋白, BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行SDS-PAGE电泳分离, 转膜至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭1 h后, 加入一抗4℃孵育过夜: PTEN(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、mTOR(1:1 000)、p-mTOR(1:1 000)、β-actin(1:2 000)。TBST洗膜, 与HRP标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h。TBST洗涤后, ECL发光试剂显影, 凝胶成像系统采集图像。Image J软件分析目的蛋白相对于β-actin内参的灰度值比值。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料以“均数±标准差”表示, 多组间比较用单因素方差分析或Kruskal-Wallis H检验, 两两比较采用LSD-t检验或Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

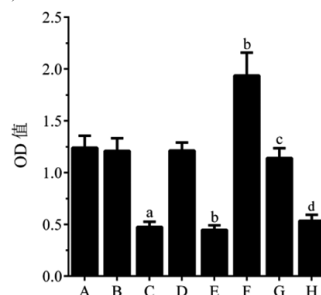
2.1 PTEN shRNA慢病毒转染MCF-7细胞的效率鉴定 Real-time PCR结果显示, LV-shNC组MCF-7细胞中PTEN mRNA表达量与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与LV-shNC组比较, 转染PTEN shRNA的MCF-7细胞中PTEN mRNA表达量下降88.07%($P < 0.05$)。Western blotting结果进一步证实, LV-shNC组中PTEN蛋白表达量与正常对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与LV-shNC组比较, PTEN shRNA转染后PTEN蛋白表达水平降低($P < 0.05$)。上述结果表明PTEN shRNA慢病毒转染MCF-7细胞的沉默效率较好。(见图1)



注: A. 正常对照组; B. LV-shNC组; C. LV-shPTEN组。与LV-shNC组比较, $^a P < 0.05$ 。

图1 qPCR和Western blotting方法检测PTEN敲减效率检测

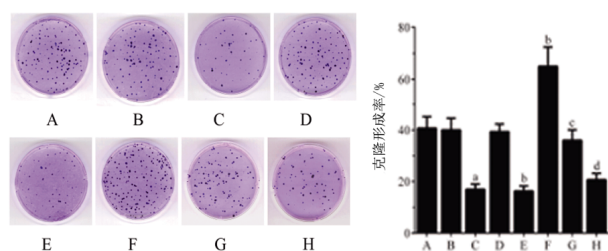
2.2 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞增殖和凋亡的影响 CCK-8实验结果显示, 与正常对照组比较, 空白血清组MCF-7细胞增殖活性无明显变化($P > 0.05$), 而菊藻丸含药血清组细胞增殖活性显著下降($P < 0.05$); LV-shNC组与空白血清组细胞增殖活性比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组细胞增殖明显受到抑制($P < 0.05$); LV-shPTEN组细胞增殖活性显著高于LV-shNC组($P < 0.05$); 与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较, LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组细胞增殖抑制作用减弱($P < 0.05$), 提示PTEN参与了菊藻丸抑制MCF-7细胞增殖的过程; LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组细胞增殖活性降低($P < 0.05$), 说明菊藻丸可能通过PTEN抑制PI3K/Akt通路而发挥抗MCF-7细胞增殖的效应。(见图2)



注: A. 正常对照组; B. 空白血清组; C. 菊藻丸含药血清组; D. LV-shNC组; E. LV-shNC+菊藻丸含药血清组; F. LV-shPTEN组; G. LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组; H. LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与LV-shNC组比较, $^b P < 0.05$; 与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较, $^c P < 0.05$; 与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较, $^d P < 0.05$ 。

图2 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

集落形成实验结果显示, 与正常对照组比较, 空白血清组MCF-7细胞集落形成能力无明显改变($P > 0.05$), 而菊藻丸含药血清组细胞集落形成能力显著降低($P < 0.05$); LV-shNC组与空白血清组集落形成比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组集落形成明显减少($P < 0.05$); LV-shPTEN组集落数量明显多于LV-shNC组($P < 0.05$); LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组集落数量明显多于LV-shNC+菊藻丸含药血清组($P < 0.05$), 而LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组集落形成数量减少($P < 0.05$), 再次证实了PTEN-PI3K/Akt轴在菊藻丸抑制MCF-7细胞增殖中的重要性。(见图3)



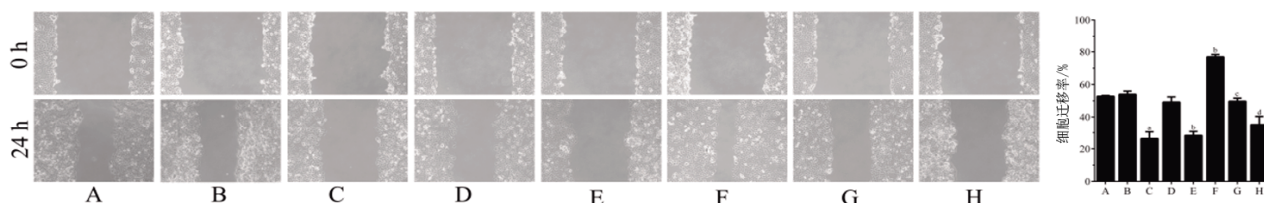
注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;

D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图3 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞集落形成能力的影响

2.3 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞侵袭转移能力的影响 划痕实验结果显示,与正常对照组比较,空白血清组MCF-7细胞迁移能力无明显变化($P>0.05$),而菊藻丸含药血清组细胞迁移能力明显受到抑制($P<0.05$);LV-shNC组迁移率与空白血清组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);LV-shPTEN组细胞迁移率显著高于LV-shNC组($P<0.05$);LV-shNC+菊藻丸含药血清组迁移率低于LV-shNC组($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组细胞迁移率显著高于LV-shNC+菊藻丸含药血清组($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组迁移能力下降($P<0.05$)。(见图4)

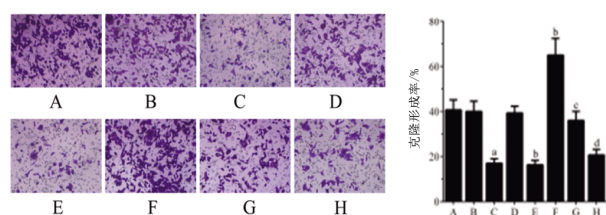
Transwell小室实验结果显示,空白血清组MCF-7细胞的侵袭能力与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),而经过菊藻丸含药血清处理后,细胞的侵袭能力被显著抑制($P<0.05$);LV-shNC组侵袭能力与空白血清组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);LV-shPTEN组细胞展现出了较LV-shNC组更强的侵袭性($P<0.05$),而在LV-shNC组细胞中加入菊藻丸含药血清可以有效降低其侵袭能力($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组侵袭能力明显强于LV-shNC+菊藻丸含药血清组($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组侵袭细胞数减少($P<0.05$)。以上结果提示,菊藻丸含药血清可通过激活PTEN,进而抑制PI3K/Akt通路,从而抑制MCF-7细胞的迁移和侵袭能力。(见图5)



注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。

与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图4 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞迁移能力的影响



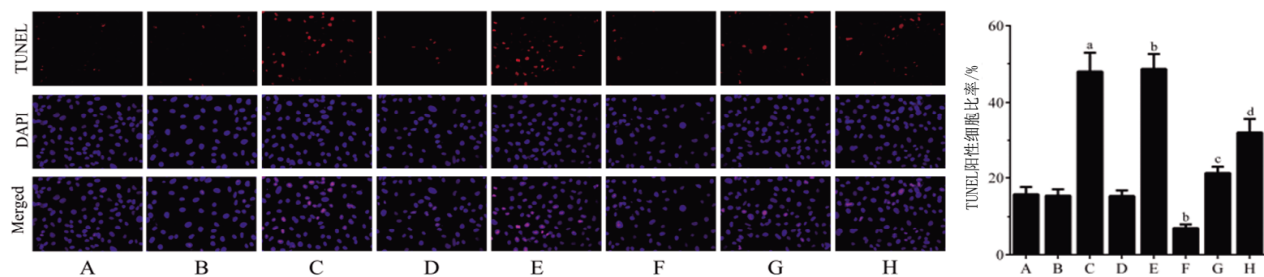
注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;

D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图5 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞侵袭转移能力的影响

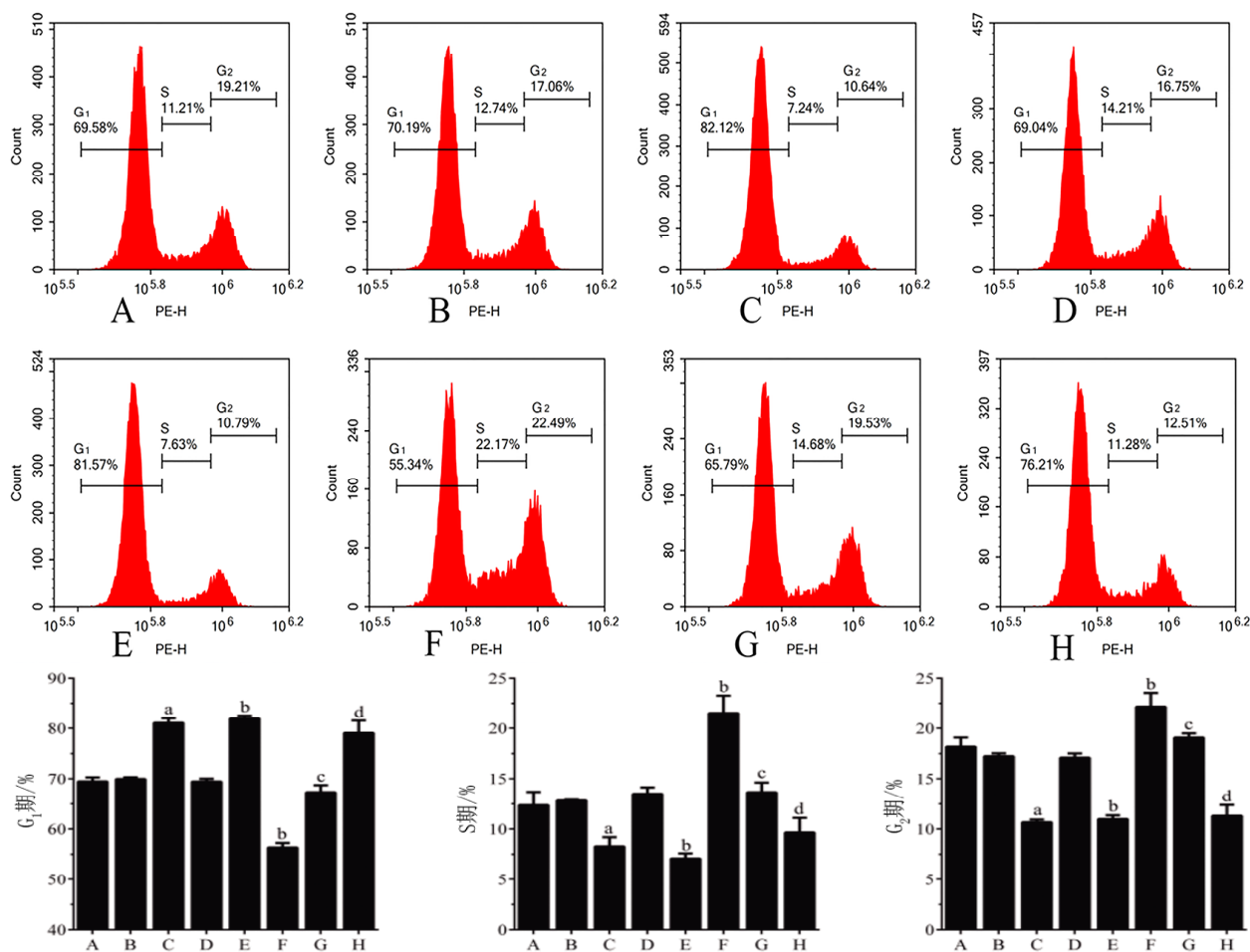
2.4 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞凋亡及细胞周期分布的影响 TUNEL染色结果显示,与正常对照组比较,空白血清组MCF-7细胞凋亡率无明显变化($P>0.05$),而菊藻丸含药血清组细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);LV-shNC组凋亡率与空白血清组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组凋亡水平明显上升($P<0.05$);LV-shPTEN组凋亡水平显著低于LV-shNC组($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组凋亡率显著低于LV-shNC+菊藻丸含药血清组($P<0.05$),提示PTEN参与调控了菊藻丸促进MCF-7细胞凋亡的过程;LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组凋亡水平高于LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组($P<0.05$),表明PI3K/Akt通路在菊藻丸诱导MCF-7细胞凋亡过程中发挥了重要作用。(见图6)

流式细胞术检测结果显示,与正常对照组比较,空白血清组MCF-7细胞周期分布无明显改变($P>0.05$),而菊藻丸含药血清组G₁期比例显著上升,S期和G₂/M期比例下降($P<0.05$);LV-shNC组细胞周期分布与空白血清组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组G₁期阻滞更明显($P<0.05$);与LV-shNC组比较,LV-shPTEN组MCF-7细胞G₁期比例显著下降,S期和G₂/M期比例上升($P<0.05$);与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组G₁期比例下降,S期和G₂/M期比例上升($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组G₁期阻滞程度高于LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组($P<0.05$)。(见图7)上述结果表明,菊藻丸含药血清可通过PTEN/PI3K/Akt通路调控MCF-7细胞周期分布。



注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图6 菊藻丸含药血清对 PTEN 敲减后 MCF-7 细胞凋亡的影响

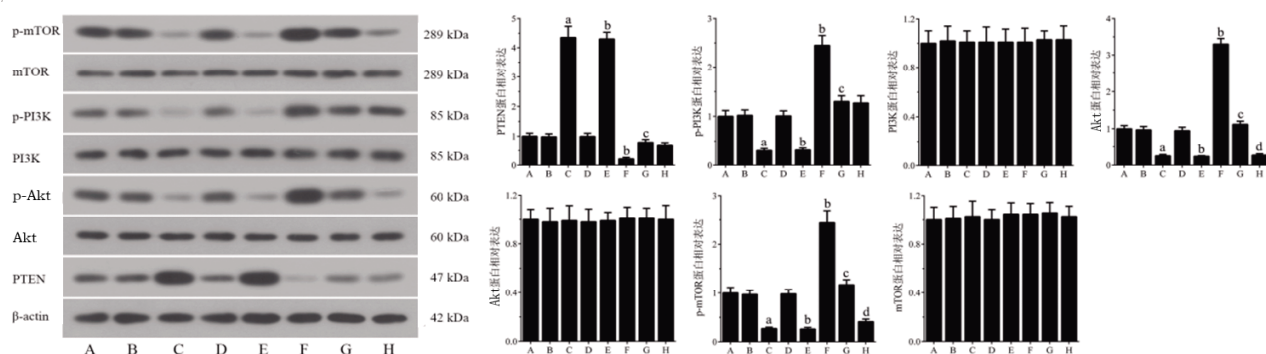


注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图7 菊藻丸含药血清对 PTEN 敲减后 MCF-7 细胞周期分布的影响

2.5 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达的影响 Western blotting结果显示,与正常对照组比较,空白血清组PTEN、p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达水平无明显改变($P>0.05$),而菊藻丸含药血清组PTEN表达上调,p-PI3K、p-Akt、p-mTOR水平显著下降($P<0.05$);LV-shNC组各蛋白表达与空白血清组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);LV-shNC+菊藻丸含药血清组较LV-shNC组PTEN表达量升高,p-PI3K、p-Akt、p-mTOR水平降低($P<$

0.05);与LV-shNC组比较,LV-shPTEN组PTEN表达量下降,p-PI3K、p-Akt、p-mTOR水平上调($P<0.05$);与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组PTEN表达下调,p-PI3K、p-Akt、p-mTOR磷酸化程度上升($P<0.05$);LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组较LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组p-Akt、p-mTOR水平降低($P<0.05$)。(见图8)综上所述,菊藻丸含药血清可通过PTEN激活,负性调控PI3K/Akt/mTOR信号通路,从而抑制乳腺癌MCF-7细胞的恶性表型。



注:A.正常对照组;B.空白血清组;C.菊藻丸含药血清组;D.LV-shNC组;E.LV-shNC+菊藻丸含药血清组;F.LV-shPTEN组;G.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组;H.LV-shPTEN+菊藻丸含药血清+MK2206组。与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LV-shNC组比较,^b $P<0.05$;与LV-shNC+菊藻丸含药血清组比较,^c $P<0.05$;与LV-shPTEN+菊藻丸含药血清组比较,^d $P<0.05$ 。

图8 菊藻丸含药血清对PTEN敲减后MCF-7细胞PI3K/Akt/mTOR通路相关蛋白表达的影响

3 讨 论

乳腺癌是威胁女性健康的主要恶性肿瘤,其发病率不断攀升,给患者的身心健康造成严重影响^[1]。尽管近年来治疗手段不断进步,但复发转移、耐药和毒副作用等问题依然严峻^[2]。深入研究乳腺癌的分子病理机制,探索新的治疗靶点和策略,对于改善预后至关重要。

PTEN是目前为止发现的最重要的抑癌基因之一^[3],可脱磷酸化第二信使PIP3,从而拮抗PI3K活性,抑制下游Akt/mTOR等信号通路的过度激活^[7-8]。此外,PTEN还可通过非依赖PI3K/Akt的机制参与调控MAPK、FAK、p53等多条信号通路,在维持基因组稳定性、抑制肿瘤细胞恶性行为等方面发挥重要作用^[14-16]。研究^[17]表明,PTEN在39%以上的乳腺癌组织中表达缺失或存在功能失活性突变,与肿瘤的不良预后密切相关。因此,如何有效激活PTEN功能,靶向抑制其调控的PI3K/Akt等效通路活性,对于乳腺癌的防治具有重要意义。

乳腺癌的病因复杂,中医学者普遍认为其发病与多种病理因素密切相关。中医学理论指出,乳房经络与肺经相连,因此情志失调、作息紊乱等因素可导致气血运行不畅,瘀滞于乳;而湿热之邪侵袭或饮食失节则会引起湿毒内蕴;脾胃功能失调还会导致痰湿凝聚。这些病理改变会阻碍乳房经脉,使瘀血积聚,日久化热,损伤乳腺,最终导致肿瘤的形成^[18-19]。菊藻丸是目前临床治疗乳腺癌的常用中药复方之一^[10-11]。该方中野菊花、黄柏、黄连、海藻等清热泻火解毒之品,有助于清除机体内的毒邪;莪术、三棱、蜈蚣善于破血行瘀,消散肿瘤;山慈菇、紫草、紫重楼、漏芦可软坚散结;党参、黄芪、何首乌益气养血,促进正气恢复。诸药合用,相得益彰,在清热解毒、活血化瘀的同时,又能健脾益气、扶正培本。

现代药理学研究证实,菊藻丸对多种肿瘤细胞的生长和转移具有明显的抑制效果。杨邵波等^[20]发现,菊藻丸含药血清能够有效抑制前列腺癌PC-3细胞的增殖,并对其细胞周期进程产生调节作用。本课题组前期研究^[13]也表明,菊藻丸含药血清可上调乳腺癌MCF-7细胞中PTEN的表达水平,并抑制肿瘤细胞的生长和转移能力。菊藻丸中多味中药及其活性成分能够通过靶向调控PTEN和PI3K/Akt/mTOR通路发挥抗肿瘤药效。如WUFUER Y等^[21]通过网络药理学分析发现,野菊花的

黄酮类化合物可能通过调节PI3K/Akt信号通路发挥抗癌效果。黄连中的小檗碱能够靶向激活PTEN,诱导乳腺癌细胞凋亡^[22]。黄柏中的生物碱类成分如延胡索乙素可直接抑制PI3K活性,导致Akt磷酸化水平下降,从而抑制乳腺癌细胞增殖并促进凋亡^[23]。这些研究提示,菊藻丸的抗乳腺癌作用可能与其多组分靶向调节PTEN/PI3K/Akt/mTOR信号轴有关。然而,菊藻丸的整体作用及其与该通路的关系尚待系统研究证实。

为了更加贴近人体内环境,避免非药效成分的干扰,并体现菊藻丸多成分、全身调节的特点,本研究采用了含药血清干预乳腺癌MCF-7细胞的方法。本研究利用RNA干扰技术,通过慢病毒shRNA转染的方法,在乳腺癌MCF-7细胞中成功敲减了PTEN的表达。细胞功能学实验结果揭示,PTEN沉默后,菊藻丸含药血清对MCF-7细胞增殖和侵袭转移的抑制效果明显削弱,促进细胞凋亡和G₁期阻滞的效应也显著降低,提示PTEN在菊藻丸发挥抗乳腺癌作用中具有重要作用。Western blotting结果显示,菊藻丸含药血清可显著上调PTEN蛋白水平,降低关键通路蛋白p-PI3K p85、p-AKT、p-mTOR水平,而这些调节效应在PTEN沉默后明显减弱甚至消失。以上结果表明,菊藻丸可能通过激活PTEN,负性调控PI3K/Akt/mTOR通路,从而发挥抑制乳腺癌细胞恶性表型的作用。

为进一步验证PI3K/Akt轴在菊藻丸抗乳腺癌作用中的关键地位,我们在PTEN敲减的同时,联合应用了特异性Akt抑制剂MK2206。结果显示,MK2206可在一定程度上逆转PTEN沉默对菊藻丸疗效的拮抗作用,使菊藻丸对肿瘤细胞的杀伤活性部分恢复。这进一步证实,Akt是菊藻丸发挥抗肿瘤效应的重要下游效应分子,提示联合PI3K/Akt抑制剂可能是提高菊藻丸治疗乳腺癌疗效的有效策略。近年来,靶向PI3K/Akt通路的小分子抑制剂如PI3K抑制剂Buparlisib、Akt抑制剂Ipatasertib等已进入乳腺癌临床试验阶段,为乳腺癌精准治疗提供了新的思路^[24-25]。中药复方制剂菊藻丸与PI3K/Akt抑制剂联合应用能否产生协同增效作用,减轻毒副作用,值得在后续研究中深入探讨。

综上所述,本研究以乳腺癌MCF-7细胞为研究对象,采用RNA干扰技术和PI3K通路抑制剂等多种手段,较为全面地阐释了菊藻丸抑制乳腺癌细胞增殖、诱导凋亡的分子机制,

证实了PTEN/PI3K/AKT信号轴在其抗肿瘤效应中的核心地位,为菊藻丸的临床应用和新药开发提供了科学基础。然而,本研究尚存在一些不足之处:一是缺乏动物水平的实验验证;二是对菊藻丸有效成分的分离鉴定有待深入;三是PTEN上游调控因子如p53、PPAR γ 等对菊藻丸疗效的影响尚未涉及。因此,下一步研究拟在裸鼠皮下和乳腺原位移植瘤模型中,进一步探讨菊藻丸各有效中药组成和化学成分的抗乳腺癌作用及其对PTEN上下游信号分子的调控网络,以期为后续开发治疗乳腺癌的新型中药复方制剂奠定更加坚实的理论和实践基础。

参考文献

- [1] WANG J, WU S G. Breast cancer: An overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives [J]. *Breast Cancer*, 2023, 15: 721–730.
- [2] BARZAMAN K, KARAMI J, ZAREI Z, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84: 106535.
- [3] KIM M, KIM J, SEO A N, et al. Comparison of immunohistochemistry and next-generation sequencing results in oncogenic PTEN missense mutations[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 251: 154879.
- [4] WUD, HUANG C J, GUANK F. Mechanistic and therapeutic perspectives of miRNA-PTEN signaling axis in cancer therapy resistance [J]. *Biochem Pharmacol*, 2024, 226: 116406.
- [5] CHAI C S, WU H H, ABUETABH Y, et al. Regulation of the tumor suppressor PTEN in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2022, 527: 41–48.
- [6] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 138.
- [7] ÁLVAREZ-GARCIA V, TAWIL Y, WISE H M, et al. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 66–79.
- [8] ERTAY A, EWING R M, WANG Y H. Synthetic lethal approaches to target cancers with loss of PTEN function[J]. *Genes Dis*, 2023, 10(6): 2511–2527.
- [9] MIRICESCU D, TOTAN A, STANESCU-SPINU I I, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 173.
- [10] 向丽萍, 欧阳恒, 肖毅良. 菊藻丸抗乳腺癌术后复发转移的临床观察[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2002, 7(1): 63–64.
- [11] 肖毅良, 杨邵波. 菊藻丸治疗乳腺癌术后转移的临床研究[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 1998, 4(5): 292–293.
- [12] 朱世杰, 陈武进. 中西医结合乳腺癌长期用药专家共识[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2024, 31(13): 785–799.
- [13] 欧阳志, 王赫, 欧阳慧婷. 菊藻丸含药血清调控PTEN对乳腺癌MCF-7细胞生长和转移的作用研究[J]. *中国医药导报*, 2024, 21(9): 1–8.
- [14] EBBESEN S H, SCALTRITI M, BIALUCHA C U, et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(11): 3030–3035.
- [15] CHETRAMMA, HINTON C V. PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2012, 32(4): 190–195.
- [16] SHIN J W, KIMS H, YOON J Y. PTEN downregulation induces apoptosis and cell cycle arrest in uterine cervical cancer cells[J]. *Exp Ther Med* 2021, 22(4): 1100.
- [17] ANDRIKOPOULOU A, CHATZINIKOLAOU S, PANOURGIAS E, et al. “The emerging role of capivasertib in breast cancer”[J]. *Breast*, 2022, 63: 157–167.
- [18] 戴燕, 丘嫦, 郭倩倩, 等. 林毅教授从脾胃论治乳腺癌经验介绍[J]. *新中医*, 2016, 48(4): 215–216.
- [19] 周月玲, 翟怡然, 蒋士卿. 蒋士卿治疗乳腺癌用药规律[J]. *中医学报*, 2023, 38(5): 1032–1037.
- [20] 杨邵波, 刘海涛, 董树猛, 等. 菊藻丸含药血清对人激素非依赖性前列腺癌细胞增殖和周期的影响[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(8): 1254–1255, 1266.
- [21] WUFUER Y, YANG X, GUO L Y, et al. The antitumor effect and mechanism of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* nutt (snow Chrysanthemum) on lung cancer using network pharmacology and molecular docking[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 761785.
- [22] ZHAO Z, MENG M, YAO J, et al. The long non-coding RNA keratin-7 antisense acts as a new tumor suppressor to inhibit tumorigenesis and enhance apoptosis in lung and breast cancers[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 293.
- [23] LIN X, CHEN D, CHU X Y, et al. Oxypalmitine regulates proliferation and apoptosis of breast cancer cells by inhibiting PI3K/AKT signaling and its efficacy against breast cancer organoids[J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154752.
- [24] LUO Q, LU H, ZHOU X, et al. The efficacy and safety of neoadjuvant buparlisib for breast cancer: A meta-analysis of randomized controlled studies [J]. *Medicine*, 2019, 98(44): e17614.
- [25] TURNER N, DENT R A, O'SHAUGHNESSY J, et al. Ipatasertib plus paclitaxel for PIK3CA/AKT1/PTEN-altered hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer: Primary results from cohort B of the IPATunity130 randomized phase 3 trial[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2022, 191(3): 565–576.

(收稿日期: 2024-09-28 编辑: 罗英姣)