

· 论著 ·

月腺大戟素 A 通过干扰 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路抑制乳腺癌细胞增殖的研究

周 瑾¹, 李盛建¹, 覃福礼², 杨新颖¹, 张晓琳³, 赵 亮¹ (1. 上海市宝山区罗店医院药剂科, 上海 201908; 2. 广西医科大学药学院药理教研室, 广西 南宁 530021; 3. 上海市宝山区友谊街道社区卫生服务中心, 上海 201999)

[摘要] 目的 乳腺癌是世界上最致命的恶性肿瘤之一。月腺大戟素 A(EA)是从中药月腺大戟中提取的乙酰间苯三酚类化合物。探讨 EA 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的具体机制, 以期对乳腺癌的临床治疗提供新的思路。方法 在乳腺癌细胞 MCF-7 中添加不同浓度的 EA 药物, 检测 PKD1 蛋白表达水平的变化。构建 PKD1 的过表达质粒并转染至细胞, 用实时荧光定量 PCR 技术和 Western Blot 实验检测 PKD1 的 mRNA 和蛋白表达水平。CCK-8 实验用于检测细胞增殖能力的变化。Western Blot 实验用于检测 PKD1 介导的相关信号通路中关键蛋白的表达水平。结果 EA 以剂量依赖的方式抑制乳腺癌细胞中 PKD1 蛋白的表达($P < 0.05$)。当转染过表达质粒后, PKD1 在 mRNA 和蛋白水平上显著升高($P < 0.001$)。同时过表达 PKD1 显著逆转 EA 对 MCF-7 的增殖抑制作用($P < 0.001$)。信号通路分析证实 EA 通过抑制 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路活性影响乳腺癌细胞的增殖能力($P < 0.05$)。结论 EA 通过调控 PKD1 介导 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路, 能够抑制乳腺癌细胞的增殖。

[关键词] 乳腺癌; 月腺大戟素 A; PKD1

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)03-0241-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201912008

Inhibition of ebracteolatin A in the proliferation of breast cancer cells by interfering with PKD1-mediated MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways

ZHOU Jin¹, LI Chengjian¹, TAN Fuli², YANG Xinying¹, ZHANG Xiaolin³, ZHAO Liang¹ (1. Department of Pharmacy, Luodian Hospital of Baoshan District, Shanghai 201908, China; 2. Division of Pharmacology Sciences, College of Pharmaceutical Science, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Community Health Service Center, Youyi Street, Baoshan District, Shanghai 201999, China)

[Abstract] **Objective** Breast cancer is one of the deadliest malignancies in the world. ebracteolatin A (EA) is a kind of acetylphloroglucinol extracted from ebracteolatin. To explore the specific mechanism of EA inhibiting the proliferation of breast cancer cell MCF-7, so as to provide a new approach for the clinical treatment of breast cancer. **Methods** EA with different concentrations were added to breast cancer cell MCF-7 to detect changes in PKD1 protein expression. The plasmid with overexpressed PKD1 was constructed and transfected into cells, and the mRNA and protein expression levels of PKD1 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western Blot assay. CCK-8 assay was used to detect changes in cell proliferation capacity. Western Blot assay was used to detect the expression level of PKD1 and its related signaling pathways. **Results** EA inhibited the expression of PKD1 protein in breast cancer cells with a dose-dependent manner ($P < 0.05$). When transfected with the overexpressed plasmid, PKD1 was significantly increased in mRNA and protein levels ($P < 0.001$). At the same time, PKD1 overexpression significantly reversed inhibition of EA on MCF-7 proliferation ($P < 0.001$). It was confirmed by signaling pathway analysis that EA might affect the proliferation ability of breast cancer cells by inhibiting PKD1-mediated MEK/ERK and PI3K/AKT signaling activity ($P < 0.05$). **Conclusion** EA could inhibit the proliferation of breast cancer cells by regulating PKD1-mediated MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways.

[Key words] breast cancer; ebracteolatin A; PKD1

[基金项目] 国家自然科学基金-青年项目(81303300)

[作者简介] 周 瑾, 主管药师, Email: aglie@126.com

[通讯作者] 赵 亮, 副教授, 副主任药师, Tel: (021)66861212, Email: zhaoliangphar@163.com

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 近年来已经成为致女性死亡的第二大原因^[1]。虽然临床研究人员和基础科学家对乳腺癌进行了广泛研究, 同时手术切除、放射性同位素治疗、化学药物治疗、自体

免疫细胞治疗、靶向治疗等技术也已经成功应用于乳腺癌患者的治疗^[2]。然而,这些传统的治疗方法大多存在副作用,因此有必要寻找新方法改善患者预后和生活质量。由于中药中含有复杂的化合物,且在多种人体疾病中发挥作用,因此,中药在癌症患者的康复及术后放/化疗的辅助治疗等方面越来越引起人们的关注。

月腺大戟(*Euphorbia ebracteolata* Hayata)为金虎尾目大戟科大戟属的多年生草本植物,多分布在土坡、草地或者林下。在我国的安徽、河南、江苏、山东、湖北省常见。月腺大戟作为传统中药最早记载于《神农本草经》,到目前为止已经有 2 000 多年历史,它以根入药,具有逐水祛痰、散结杀虫的功效,可治疗水肿、哮喘、消化不良、皮癣等疾病。近来发现研究中药月腺大戟中的提取物具有抗肿瘤活性。月腺大戟中含有多种化学成分,包括萜类、脂类、酚类、苯乙酮类、黄酮类以及鞣质类。本课题组前期实验中,从月腺大戟中提取了一种乙酰间苯三酚类化合物月腺大戟素 A(EA),并证实它能抑制乳腺癌细胞的增殖能力^[3-4]。蛋白激酶 D1(PKD1)是一种新型的丝氨酸/苏氨酸激酶,在多种癌症组织中异常表达,可以通过作用于 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路,调控乳腺癌细胞的增殖能力^[5]。但是 EA 如何影响乳腺癌细胞增殖能力的具体机制,以及是否通过影响 PKD1 从而影响乳腺癌的增殖能力均不明确。

本研究根据前期实验对 EA 影响乳腺癌的具体机制的研究,结果表明 EA 具有通过干扰 PKD1 介导 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路以抑制乳腺癌细胞的增殖能力。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞(美国模式菌种收集中心, ATCC); DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗溶液(Gibco 公司); 转染试剂脂质体 2000 和 TRIzol(Invitrogen 公司); RNA 抽提、反转录、qRT-PCR 试剂盒以及 BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪公司); CCK-8 试剂(MedChemExpress 公司); RIPA 裂解液(碧云天公司); PKD1 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司), P-ERK1/2, ERK1/2, P-AKTAKT, GAPDH 抗体(Cell Signaling 公司); Western Blot 增强化学发光试剂盒(Millipore 公司)。PKD1 过表达质粒 pcDNA3.1-PKD1 由 Genescript 公司构建,载体为

pcDNA3.1。中药月腺大戟饮片购自安徽(产地:山东),其中,月腺大戟素 A 的制备采用课题组前期实验中的方法^[4]。

1.2 细胞培养、转染与药物处理

人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞培养在含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素溶液的 DMEM 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中进行贴壁培养。细胞转染时将处于对数生长期的细胞接种至 6 孔板中,提前混匀好转染试剂脂质体 2000 和质粒 pcDNA3.1-PKD1 或者对照质粒 pcDNA3.1,添加至细胞培养板中,混匀后放置培养箱中培养 6 h,换正常培养基继续培养。EA 药物处理时,首先将处于对数生长期的 MCF-7 细胞按照 1×10⁵ 个/孔的数目接种到 6 孔板中,待细胞贴壁后加入不同浓度的 EA 药物(1、5、10、15、20 μmol/L)处理细胞,待进行后续试验。

1.3 细胞增殖能力检测

通过 CCK-8 实验检测乳腺癌细胞增殖能力的变化。首先,将转染或加药处理的细胞按照每孔接种 10⁴/100 μl 的浓度接种至 96 孔板中,每隔 24 h 检测一次,连续检测 3 d,同时每个处理组在每个时间点均设置 3 个复孔,便于统计分析。每次检测前向 96 孔板中添加 10 μl CCK-8 试剂,在培养箱中孵育 1 h 后,放置酶标仪中震荡 1 min,检测其在 450 nm 处的吸光值(OD)。统计 3 d 的 OD 值评估细胞增殖能力的变化。

1.4 RNA 提取及荧光定量 PCR 检测(qRT-PCR)

通过 qRT-PCR 实验检测乳腺癌细胞中 mRNA 的表达。在转染或加药处理的孔板中添加 TRIzol 试剂,放置 4 ℃ 摇床震荡 5 min 保证细胞充分裂解。利用抽提试剂盒提取细胞中的总 RNA,并将其反转录为 cDNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书在 ABI 7300 实时 PCR 系统上进行 qRT-PCR 检测。反应过程中以 GAPDH 作为内参,计算 PKD1 的相对表达量。反应中的引物序列为: PKD1, reverse, 5'-CCCACGTGATGGACTCAAA GA-3' forward, 5'-AAGGGTACGGGCCTCTCAA A-3'; GAPDH, reverse, 5'-AGGGGTCTACATGGC AACTG-3'和 forward: 5'-GGCCTCCAAGGAGTAA GACC-3'。

1.5 蛋白免疫印迹(Western Blot)检测蛋白表达

通过 Western Blot 检测细胞加药或转染后相关蛋白的表达。将加药或者转染处理好的细胞加入 RIPA 裂解液裂解提取总蛋白。收集细胞裂解

液,按照 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书检测蛋白浓度。垂直电泳槽上样的每孔中加 25 μg 蛋白进行凝胶电泳分离,电压设置为 80 V;待分离完成后将蛋白从凝胶中转至 PVDF 膜,电压设置为 110 V,时间为 120 min。转膜结束后将 PVDF 膜放置 5% 脱脂牛奶中进行封闭 2 h;在 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中孵育一抗过夜 (GAPDH 以 1:5 000 稀释,PKD1 以 1:500 稀释,其他抗体均按照 1:1 000 稀释),用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;室温摇床中用带有 HRP 标记的二抗 (羊抗兔 IgG 或者羊抗鼠 IgG 均按照 1:10 000 稀释)孵育 1 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用 ECL 显影液进行显影。

1.6 统计学分析

数据统计和分析均采用 SPSS 20.0 和 GraphPad Prism 7.0 软件进行,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 Student's *t* test 和单因素方差分析进行组间差异的比较。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 EA 抑制乳腺癌细胞中 PKD1 的表达

根据前期实验以及报道,推测 EA 通过调控 PKD1 的表达影响乳腺癌细胞的增殖能力,因此,在本研究中首先分析经不同浓度 EA 处理的乳腺癌细胞中 PKD1 蛋白水平的变化。结果如图 1 所示,EA 显著抑制乳腺癌细胞中 PKD1 蛋白的表达水平($P < 0.05$),且这种抑制呈剂量依赖性。同时,根据此实验结果 EA 在 15 $\mu\text{mol/L}$ 时能显著降低 PKD1 的表达,故采用此浓度进行后续研究。

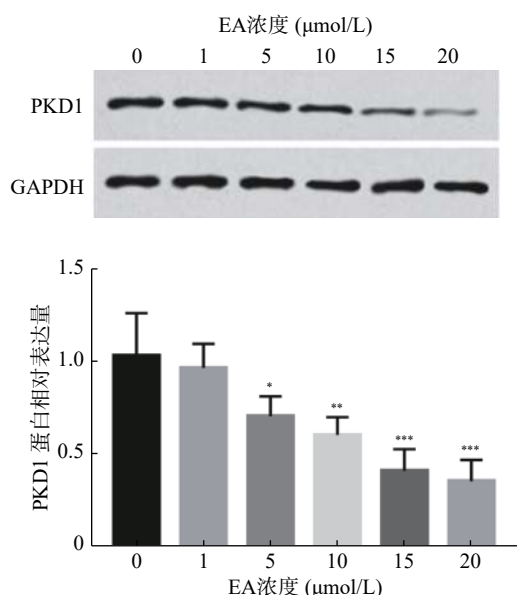


图 1 EA 对 MCF7 细胞中 PKD1 的调控作用

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

2.2 PKD1 恢复 EA 对乳腺癌细胞增殖能力的抑制作用

为了进一步研究 EA 是否通过 PKD1 调控乳腺癌细胞的增殖能力,课题组首先检测了 EA 的加药效果及过表达 PKD1 质粒是否转染成功。结果如图 2A、图 2B 所示:乳腺癌细胞转染过表达质粒后 PKD1 的 mRNA 和蛋白水平显著升高($P < 0.001$)。结果证实过表达 PKD1 的转染效率较高。研究还发现 EA 干预处理后 PKD1 在 mRNA 和蛋白水平上均受到抑制($P < 0.001$),但是此抑制作用在转染过表达 PKD1 后被显著逆转($P < 0.001$)。即 PKD1 能逆转 EA 对乳腺癌细胞中 PKD1 表达的抑制作用。通过 CCK-8 实验进一步验证 EA 是否通过 PKD1 影响乳腺癌细胞的增殖能力。结果如图 2C 所示,过表达 PKD1 后细胞的增殖能力显著升高。而 EA 药物干预后乳腺癌细胞的增殖能力显著被抑制($P < 0.01$),当转染过表达质粒 PKD1 后,EA 对乳腺癌细胞的增殖抑制作用被显著逆转($P < 0.01$)。

2.3 EA 通过干扰 PKD1 调控乳腺癌细胞增殖能力的机制研究

为了进一步阐明 EA 如何通过干扰 PKD1 影响乳腺癌细胞的体外增殖能力,课题组研究了 PKD1 调控的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路的变化。如图 3 所示:乳腺癌细胞过表达 PKD1 后, p-ERK1/2、p-AKT 表达水平显著升高($P < 0.01$);当 EA 药物处理后 p-ERK1/2、p-AKT 表达水平显著降低($P < 0.05$)。然而对 PKD1 过表达的细胞给予 EA 药物处理后,PKD1 能显著恢复 EA 药物处理对 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白表达水平的影响。实验结果证实了 EA 可能通过调控 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路来影响乳腺细胞的增殖能力。

3 讨论

虽然近年来在乳腺癌的早期发现和治疗中取得了重大进展,但是乳腺癌患者的 5 年生存率仍然较低。基于中药的中医治疗在过去几十年中已得到越来越多的应用,并因其在增强化疗过程中的功效和降低毒性方面的重要作用而被关注,并且在多种癌症的预防和治疗方面具有一定作用^[6-7]。据估计,美国国家癌症研究所(NCI)每年在中医相关研究项目上花费约 1.2 亿美元^[8]。乳腺癌患者的治疗除了手术、放射疗法、化学疗法以外,还经常将中药治疗视为一种治疗方法^[9]。

EA 是从中药月腺大戟中提取的乙酰间苯三酚

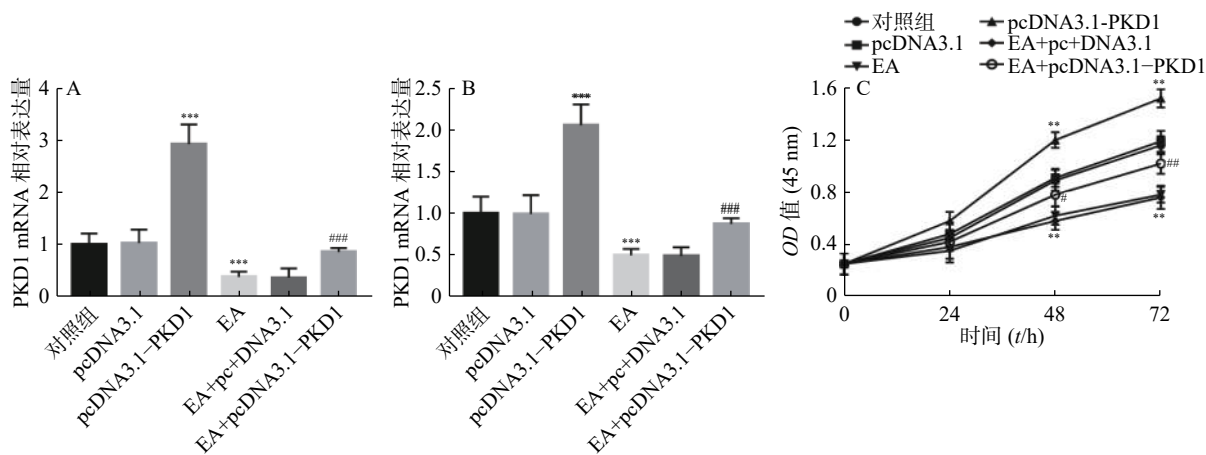


图2 PKD1 mRNA 和蛋白表达水平及对增殖的影响

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与 EA 组比较。

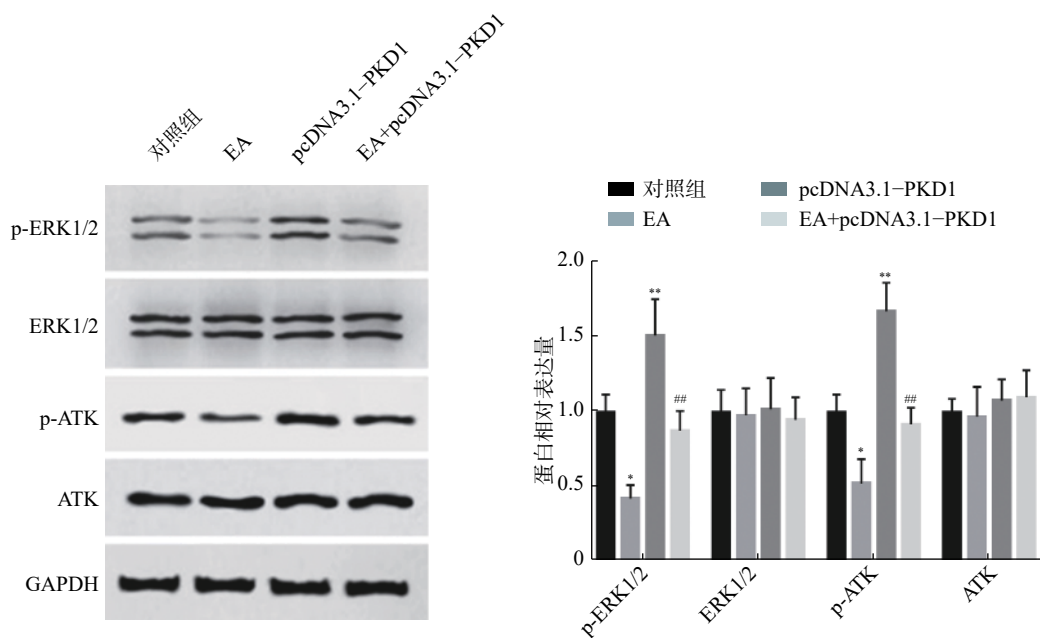


图3 EA 通过干扰 PKD1 介导的信号通路抑制细胞增殖的机制研究

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较; ## $P < 0.01$, 与 EA 组比较。

类化合物。在前期研究结果中证实 EA 可以抑制乳腺癌细胞的增殖能力。蛋白激酶 D(PKD)是一个进化保守的蛋白激酶家族,具有不同 PKC 家族成员的结构酶学和调控特性。PKD1 是其中研究最多的家族成员。研究发现 PKD1 可以通过作用于 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路调控乳腺癌细胞的增殖能力^[5]。因此,在本研究中首先验证了 EA 是否会影响 PKD1 的表达。结果显示 EA 呈剂量依赖的方式抑制乳腺癌细胞中 PKD1 蛋白表达。为了进一步证实 EA 是否通过影响 PKD1 的表达来调控乳腺癌细胞的增殖能力,课题组体外构建了 PKD1 过表达质粒转染乳腺癌细胞。在证实转染效率较高后,发现 PKD1 过表达能够逆转

EA 在 mRNA 和蛋白水平上对 PKD1 的抑制作用。同时,EA 能显著抑制乳腺癌细胞的增殖能力,这与前期研究结果一致。然而,原本受 EA 干预而降低的细胞增殖能力在 PKD1 过表达的情况下被显著逆转,证实 PKD1 能逆转 EA 对乳腺癌细胞的增殖抑制作用。

最后,课题组对 EA 如何通过干扰 PKD1 影响乳腺癌细胞增殖能力的机制进一步研究。既往的研究已经证明 PKD1 可以通过作用于 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路调控乳腺癌细胞的增殖能力^[10]。因此,我们分析了 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路中关键蛋白的变化。实验结果证实 EA

(下转第 276 页)

- [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1611-1614.
- [9] 谢新芳, 温燕, 高守红, 等. 丙戊酸钠及其代谢产物的体外肝毒性研究[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(1): 43-47, 53.
- [10] GAO S H, MIAO H J, TAO X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabol-

ites in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(21): 1939-1944.

[收稿日期] 2019-10-25 [修回日期] 2019-12-24

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 244 页)

药物作用于乳腺癌细胞时 p-ERK1/2、p-AKT 表达水平显著降低,说明 EA 能抑制 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路活性。但是,当 EA 药物和 PKD1 过表达同时处理时,PKD1 过表达能显著恢复 EA 对 p-ERK1/2、p-AKT 的抑制作用。实验结果证实 EA 可能通过干扰 PKD1 介导 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路活性,从而抑制了乳腺癌细胞增殖。

此外,肿瘤的发生和发展是一个复杂的过程,本研究证实 PKD1 能显著促进乳腺癌细胞的增殖能力,这与已有的文献报道中 PKD1 会促进乳腺癌细胞增殖能力的结果是吻合的。但是在其他文献中报道过表达 PKD1 会显著抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭过程^[11]。也就是说在肿瘤发生转移和侵袭前,肿瘤细胞大量增殖的阶段可以通过药物抑制 PKD1 的表达和活性,从而抑制肿瘤细胞的增殖。因此,在乳腺癌发生转移和侵袭前,使用 EA 抑制 PKD1 的表达和活性,可能具有抑制乳腺癌细胞增殖的功能。但是,如果肿瘤发生转移和侵袭后,药物抑制 PKD1 的表达,可能会产生促进肿瘤转移和侵袭的结果,使得肿瘤疾病向更加恶化的方向发展。因此,EA 在乳腺癌中的应用应该严格注意肿瘤病理状态,在未发生转移和侵袭的患者中 EA 可通过抑制 PKD1 发挥抗肿瘤作用,而在已发生肿瘤转移和侵袭的患者中则应该谨慎使用调控 PKD1 的药物。

综上所述,经过一系列研究证实 EA 以剂量依赖的方式抑制乳腺癌细胞中 PKD1 的表达,而 PKD1 过表达能恢复 EA 对乳腺癌细胞增殖能力的抑制作用。同时,EA 可能通过干扰 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路的活性抑制乳腺癌细胞的增殖能力。总之,本研究首次揭示了 EA 药物通过抑制 PKD1 的表达及其介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路发挥抑制乳腺癌细胞的增殖作用。

【参考文献】

- [1] GBD Causes Of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1736-1788.
- [2] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2014, 64(4): 252-271.
- [3] 曹青青, 李盛建, 李云青, 等. 月腺大戟的化学成分及其乳腺癌细胞毒活性研究[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(3): 309-313.
- [4] 李盛建, 王莹, 王强利, 等. 月腺大戟素 A 抗乳腺癌活性[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(7): 765-769.
- [5] EISELER T, DÖPPLER H, YAN I K, et al. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): R13.
- [6] GAO S M, LI X Y, DING X, et al. Cepharanthine induces autophagy, apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1633-1648.
- [7] MENG H, PENG N, YU M W, et al. Treatment of triple-negative breast cancer with Chinese herbal medicine: A prospective cohort study protocol[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(44): e8408.
- [8] QI F H, ZHAO L, ZHOU A Y, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer[J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1): 16-34.
- [9] LI X, YANG G Y, LI X X, et al. Traditional Chinese medicine in cancer care: a review of controlled clinical studies published in Chinese[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60338.
- [10] KARAM M, LEGAY C, AUCLAIR C, et al. Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF-7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(5): 558-569.
- [11] DURAND N, BORGES S, STORZ P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 4369-4382.

[收稿日期] 2019-12-03 [修回日期] 2019-12-27

[本文编辑] 李睿旻