

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.04.0520

• 短篇论著 •

消痰解郁方对乳腺癌前病变 MCF-10AT 细胞 PI3K/Akt 通路的影响及机制

赵婧¹, 魏品康¹, 修丽娟¹, 矫健鹏¹, 俞超芹^{2*}

1. 第二军医大学长征医院中医科, 上海 200003

2. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨消痰解郁方对乳腺癌前病变 MCF-10AT 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响及机制。**方法** 将 MCF-10AT 细胞分为消痰解郁方组、PI3K 激酶选择性抑制剂 LY294002 组(抑制剂组)、消痰解郁方+抑制剂组 and 对照组。给予相应药物干预 24、48 h 后, 采用 CCK-8 法观察各组细胞增殖及生长情况; 药物干预 48 h 后, 采用流式细胞仪检测各组细胞周期变化, 用蛋白质印迹法检测各组细胞 PTEN、PI3K、Akt 蛋白表达变化。**结果** 药物干预 24 和 48 h 后, 消痰解郁方组、抑制剂组和消痰解郁方+抑制剂组 MCF-10AT 细胞增殖受到抑制, 且消痰解郁方+抑制剂组抑制率高于消痰解郁方组和抑制剂组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 药物干预 48 h 后, 消痰解郁方组、抑制剂组和消痰解郁方+抑制剂组 MCF-10AT 细胞 G_0/G_1 期细胞比例增高, S 期及 G_2/M 期细胞比例下降, 与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 其中消痰解郁方+抑制剂组与其他各组相比差异有统计学意义($P<0.05$); 药物干预 48 h 后, 消痰解郁方组、抑制剂组、消痰解郁方+抑制剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达较对照组减弱, PTEN 蛋白表达较对照组增强, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 消痰解郁方可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路发挥其对 MCF-10AT 细胞的抑制及促凋亡作用。

[关键词] 乳腺肿瘤; MCF-10AT 细胞; PI3K/Akt 信号通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)04-0520-04

Effect of Xiaotan Jieyu Decoction on PI3K/Akt pathway of MCF-10AT cells and its mechanism

ZHAO Jing¹, WEI Pin-kang¹, XIU Li-juan¹, JIAO Jian-peng¹, YU Chao-qin^{2*}

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medicine University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of Xiaotan Jieyu (XTJY) Decoction on PI3K/Akt signal pathway of MCF-10AT cells of breast precancerous lesion and the related mechanism. **Methods** The MCF-10AT cells were randomly divided into following groups: XTJY group, PI3K/Akt inhibitor LY294002 (LY) group, XTJY+LY group and control (CON) group. After corresponding drug intervention, CCK-8 method was used to observe the MCF-10AT cell proliferation and growth inhibition at 24 h and 48 h, flow cytometry was used to detect the changes of cell cycle at 48 h, and the expression changes of PTEN, PI3K and Akt protein were detected by Western blotting analysis at 48 h. **Results** The proliferation of MCF-10AT cells were significantly inhibited at 24 h and 48 h in XTJY, LY and XTJY+LY groups, and the inhibitory rate of MCF-10AT cells in XTJY+LY group was significantly higher than those in XTJY and LY groups ($P<0.05$). Compared with CON group, the percentages of G_0/G_1 phase cells in XTJY, LY and XTJY+LY groups were significantly increased at 48 h ($P<0.05$), while the percentages of S phase and G_2/M phase cells were

[收稿日期] 2017-02-10 **[接受日期]** 2017-03-13

[基金项目] 上海市名老中医学术经验研究工作室建设项目(ZYSN XD-CC-MZY054), 军队中医药科研专项基金(2010z131). Supported by Construction Project of Academic Experience Research Workshop of Famous Veteran Doctors of TCM of Shanghai (ZYSN XD-CC-MZY054) and Special Fund for TCM Research of PLA (2010z131).

[作者简介] 赵婧, 博士生, 主治医师. E-mail: tozj@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161959, E-mail: chqyu81@gmail.com

significantly decreased ($P < 0.05$); besides, there were significant differences between XTJY+LY group and the other two groups ($P < 0.05$). Compared with CON group, the expressions of PI3K and p-AKT protein in XTJY, LY and XTJY+LY groups were significantly decreased at 48 h ($P < 0.05$), and the expression of PTEN protein was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** XTJY prescription may exert inhibitory and apoptotic effect on MCF-10AT cells through inhibiting the PI3K/Akt signal pathway.

[Key words] breast neoplasms; MCF-10AT cells; PI3K/Akt signal pathway; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(4): 520-523]

据统计,乳腺癌发病率已位居女性恶性肿瘤发病率首位^[1]。目前认为,乳腺癌的发生是一个多阶段的模式,即“正常细胞→一般增生→不典型增生→癌”的逐渐演变过程^[2]。如果能在癌前病变阶段将其阻断,将有助于降低乳腺癌的发病率,意义深远。研究发现乳腺癌前病变的发生与发展和细胞的增殖与凋亡密切相关^[3],磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/Akt)信号通路参与并促进了肿瘤的侵袭与转移,PI3K、Akt 和 PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)几种功能不同的蛋白均参与了乳腺癌发生、发展的过程,是治疗乳腺癌的重要靶点^[4-6]。本课题组结合中医“治未病”的思想,将乳腺癌治疗关口前移,以中药组方消痰解郁方用于治疗乳腺癌前病变,临床效果显著^[7],但具体机制不明。本实验拟围绕 PI3K/Akt 通路,探讨消痰解郁方治疗乳腺癌前病变可能的作用机制和有效靶点,为其提供现代分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 LY294002(PI3K 激酶选择性抑制剂),Sigma 公司,货号 L9908-1MG; CCK-8 试剂盒,日本同仁化学研究所;DMEM/F-12 培养基、胎牛血清(FBS),Gibco 公司;胰蛋白酶(Trypsin)、DMSO,Amresco 公司;FITC-Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒,BD Pharmingen 公司;TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品,其余常规生化试剂均为国产分析纯。乳腺癌前病变细胞 MCF-10AT 由上海舜田生物公司提供。PTEN 抗体:Anti-PTEN antibody (Abcam,货号 ab31392,兔多抗);PI3K 抗体:Anti-PI3K p85 antibody (Abcam,货号 ab189403,鼠单抗);p-Akt 抗体:Anti-Akt (phospho T308) antibody (Abcam,货号 ab38449,兔多抗); β -actin 抗体:Anti- β -actin antibody (Abcam,货号 ab8226,鼠单抗)。

消痰解郁方浸膏由上海张江药谷药业制备。取制南星、制半夏、山慈菇、柴胡、杭白芍、炒白术、陈皮、茯苓、当归等 12 味中药,8 倍量水提取 3 次,第 1 次 2 h,后 2 次各 1 h,收集提取液,过滤、浓缩,浓缩

液加 2 倍量乙醇醇沉 48 h,取上清液滤过,回收乙醇制得浸膏(相当于生药材 3.35 g/mL)。浸膏加 5 倍量水,1 200 r/min 离心 10 min,弃去残渣,上清液过滤,-80 °C 冻干,培养液流通蒸汽灭菌 30 min,将浸膏冻干粉溶解其中,0.22 μ m 微孔滤膜除菌过滤,即得消痰解郁方浸膏保存液,浓度为 10 mg/mL(相当于生药材 0.22 g/mL)。

1.2 细胞培养分组与药物干预 MCF-10AT 细胞以含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养液培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱,48 h 换液传代 1 次。实验分为消痰解郁方组、PI3K 激酶选择性抑制剂 LY294002 组(抑制剂组)、消痰解郁方+抑制剂组和对照组。将对数生长期的 MCF-10AT 细胞按 1×10^4 /mL 的密度接种到 96 孔板,每孔接种 100 μ L。消痰解郁方浓度的确定:加入不同浓度梯度的消痰解郁方处理 MCF-10AT 细胞,24 h 后用 CCK-8 检测光密度(D)值,重复 3 次,计算消痰解郁方对 MCF-10AT 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀),得到 IC₅₀ 值(以生药材计)为 11 mg/mL,确定为本实验消痰解郁方的浓度。抑制剂组 LY294002 浓度为 5 μ g/mL。

1.3 CCK-8 法检测药物对细胞的抑制率 将 MCF-10AT 细胞调整密度为 1×10^4 /mL,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,按照分组进行药物干预。细胞培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱,分别于培养 24 h 及 48 h 后更换培养液,加入 10 μ L CCK-8 继续培养 3 h,于 450 nm 处检测 D 值,重复 3 次。按下式计算细胞抑制率:细胞抑制率(%)=[1-(实验组 D 值/对照组 D 值)] $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞周期 各组细胞培养至 48 h 后,加入胰蛋白酶消化,与培养液一起制备细胞悬液,1 000 $\times g$ 、4 °C 离心 5 min,弃上清,收集各时间点细胞,分别用预冷的 PBS 洗 2~3 次。加碘化丙啶(PI)至终浓度为 50 mg/L,室温孵育 30 min,200 目滤网过滤,重复 3 次,用流式细胞仪测定 DNA 细胞周期分布。

1.5 蛋白质印迹法检测 PI3K、p-Akt、PTEN 蛋白表达 当细胞生长融合至 50%~60%时,向 MCF-10AT 细胞的培养液加入不同药物,作用 48 h,细胞

裂解后用 BCA 法测定蛋白浓度,定量后取等量样本进行 SDS-PAGE 分离,然后将蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭液室温封闭 2 h;用封闭液稀释一抗,稀释比 1 : 1 000,4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min × 3 次,加入 ECL 显影液后放入化学发光检测仪中进行检测,将目的蛋白所测值与内参(β -actin)相比进行半定量分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 消痰解郁方对 MCF-10AT 细胞增殖的影响 药物作用 24 h 后,消痰解郁方组、抑制剂组、消痰解郁方+抑制剂组 MCF-10AT 细胞的 *D* 值分别为 0.82 ± 0.03 、 0.89 ± 0.02 、 0.55 ± 0.04 ,3 个药物干预组与对照组(1.68 ± 0.02)相比均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);药物作用 48 h 后,消痰解郁方组、抑制剂组、消痰解郁方+抑制剂组 MCF-10AT 细胞的 *D* 值分别为 0.54 ± 0.02 、 0.61 ± 0.02 、 0.36 ± 0.04 ,3 组与对照组(2.48 ± 0.03)相比均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。由图 1 可见,24 h、48 h 时各给药组对细胞均有明显抑制,且 48 h 时的抑制率高于 24 h($P < 0.05$);消痰解郁方+抑制剂组的细胞增殖抑制率高于消痰解郁方组和抑制剂组($P < 0.05$),而消痰解郁方组与抑制剂组对细胞增殖的抑制率差异无统计学意义。

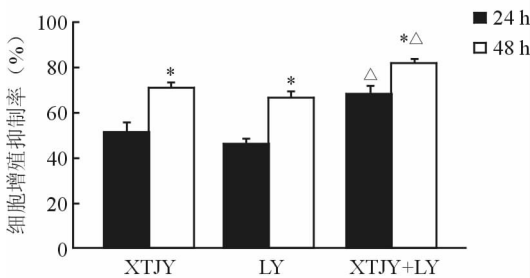


图 1 药物干预 24 h 和 48 h 各组对 MCF-10AT 细胞的增殖抑制率

XTJY: 消痰解郁方; LY: 抑制剂 LY294002. * $P < 0.05$ 与本组 24 h 比较; $\Delta P < 0.05$ 与 XTJY 组和 LY 组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.2 消痰解郁方对 MCF-10AT 细胞周期的影响 由图 2 可见,与对照组相比,药物作用 48 h 后消痰解郁方组、抑制剂组、消痰解郁方+抑制剂组的 G_0/G_1 期细胞比例升高,S 期及 G_2/M 期比例降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);消痰解郁方+抑制剂组对细胞周期的改变更为明显,与消痰解郁方组和抑制剂组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示

消痰解郁方和抑制剂可导致 MCF-10AT 细胞在 G_0/G_1 期阻滞。

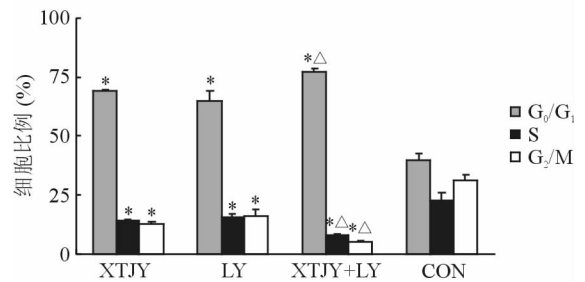


图 2 药物干预 48 h 后各组细胞周期变化

XTJY: 消痰解郁方; LY: 抑制剂 LY294002; CON: 对照组. * $P < 0.05$ 与 CON 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 XTJY 组和 LY 组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 消痰解郁方对 MCF-10AT 细胞 PI3K、p-Akt、PTEN 蛋白表达的影响 由图 3 可见,与对照组比较,消痰解郁方组、抑制剂组、消痰解郁方+抑制剂组 PI3K、p-Akt 蛋白表达均减弱,PTEN 蛋白表达均增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中消痰解郁方+抑制剂组对 PI3K、p-Akt 蛋白表达减弱和 PTEN 蛋白表达增强作用最明显,与抑制剂组和消痰解郁方组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

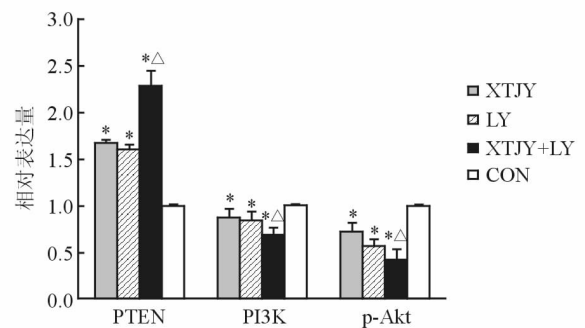
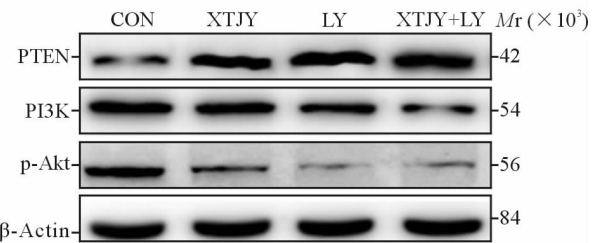


图 3 药物干预 48 h 后各组蛋白相对表达量

CON: 对照组; XTJY: 消痰解郁方; LY: 抑制剂 LY294002. * $P < 0.05$ 与 CON 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 XTJY 组和 LY 组比较. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

消痰解郁方是魏品康教授经过多年的临床观察及经验总结确立的经验处方,该方是根据药物功效命名。临床工作发现消痰解郁方可有效治疗乳腺癌

前病变,减轻甚至逆转病理状态^[7]。初步药效学实验也证明消痰解郁方对 S180 荷瘤小鼠具有一定的抑瘤作用^[8]。本研究用消痰解郁方干预人乳腺癌前病变细胞 MCF-10AT,结果发现消痰解郁方能够抑制 MCF-10AT 细胞增殖,将细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期而不能进入 S 期,诱导细胞凋亡,从诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖的角度佐证了消痰解郁方在乳腺癌前病变中的治疗作用。

研究发现 PI3K-Akt 信号通路在乳腺癌中活化高达 70%^[9]。PI3K-Akt 信号通路是调节乳腺癌细胞存活、生长、增殖的主要通路,通过对肿瘤细胞的高度激活,进一步对乳腺癌细胞的生长、增殖起促进作用。在乳腺癌中,这条通路最主要的基因变异体现在 PI3K 的突变、Akt 的磷酸化以及 PTEN 活性缺失^[10-11]。LY294002 是应用最早、最广泛的 PI3K-Akt 信号通路抑制剂,通过竞争性抑制 PI3K 的 ATP 结合位点,对 Akt 磷酸化的过程进行抑制并诱导细胞凋亡^[12-13]。

本研究结果显示,消痰解郁方组 PI3K、p-Akt 蛋白表达均较对照组下降,PTEN 蛋白表达上升,说明消痰解郁方对 PI3K-Akt 信号通路有影响,其作用与 PI3K-Akt 通路抑制剂 LY294002 类似。表明消痰解郁方抑制乳腺癌前细胞 MCF-10AT 的作用机制与 PI3K-Akt 信号通路密切相关,可能是一种 PI3K-Akt 信号通路的天然抑制剂。组间比较结果提示:消痰解郁方+抑制剂组对 MCF-10AT 细胞及细胞内 PI3K-Akt 通路的抑制作用较消痰解郁方组和抑制剂组强,印证消痰解郁方在与抑制剂联合用药时能更有效地抑制细胞增殖和蛋白表达,提示消痰解郁方可能通过多靶点多通道发挥对癌前病变的治疗作用。我们下一步将通过检测消痰解郁方对 PI3K-Akt 信号通路下游靶点的影响,进一步探讨消痰解郁方治疗乳腺癌前病变的机制。

[参考文献]

[1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics[J].

CA Cancer J Clin, 2011, 61: 69-90.

- [2] 北京协和医院. 北京协和医院医疗诊疗常规: 乳腺疾病诊疗常规[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 18.
- [3] 李静蔚, 刘晓菲, 陈宏志. 温阳散结法干预乳腺癌前病变 MCF-10AT 细胞的生长抑制及诱导凋亡研究[J]. 中医学报, 2013, 41: 41-45.
- [4] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路和肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. 癌症, 2008, 27: 331-336.
- [5] 龚晓萌, 王黎明. 乳腺癌组织中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2011, 20: 76-79.
- [6] 廖明娟, 陈红风. PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制剂在乳腺癌中的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19: 230-233.
- [7] 赵婧, 魏品康. 魏品康运用消痰解郁方治疗乳腺癌前病变经验[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49: 15-17.
- [8] 修丽娟, 魏品康. 消痰解郁方对小鼠强迫游泳不动时间及 S180 肉瘤生长的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31: 343-345.
- [9] LÓPEZ-KNOWLES E, O'TOOLE S A, MCNEIL C M, MILLAR E K, QIU M R, CREA P, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality[J]. Int J Cancer, 2010, 126: 1121-1131.
- [10] WANG L L, HAO S, ZHANG S, GUO L J, HU C Y, ZHANG G, et al. PTEN/PI3K/AKT protein expression is related to clinicopathological features and prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases[J]. Hum Pathol, 2017, 61: 49-57.
- [11] PATEL L, PASS I, COXON P, DOWNES C P, SMITH S A, MACPHEE C H. Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN[J]. Curr Biol, 2001, 11: 764-768.
- [12] 陈培, 张钦宪. PTEN-PI3K/AKT 细胞信号转导通路与肿瘤[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22: 484-487.
- [13] 种树彬, 杨柳. 乳腺癌癌前病变的癌变机制研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16: 3758-3759.

[本文编辑] 孙 岩