

[药 理]

薯蓣丸联合依维莫司对 TGF- β 1 诱导三阴性乳腺癌细胞上皮间质转化的抑制作用

骆小珊¹, 谢 甦^{2*}, 冯豆豆¹, 蒙雁云¹, 赵晶哲¹, 谢 青², 凌湘力²

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的 探究薯蓣丸联合依维莫司抑制 TGF- β 1 诱导三阴性乳腺癌细胞 4T1、MDA-MB-231 上皮间质转化的作用。方法 分别将 4T1、MDA-MB-231 细胞分为空白组、诱导组, 诱导组用 TGF- β 1 细胞因子干预使细胞发生上皮间质转化。后续实验分为模型组、薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组, CCK8 法、平板克隆法、细胞划痕实验、Transwell 实验检测细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭能力, Western blot 法检测细胞上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP9、MMP2 及 PTEN、PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达。结果 与空白组比较, 诱导组 4T1、MDA-MB-231 细胞形态由上皮样转化为间质样, E-cadherin 蛋白表达降低 ($P < 0.01$), N-cadherin、Vimentin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组 2 种细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭能力降低 ($P < 0.01$), PTEN、E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PI3K、Akt、mTOR、N-cadherin、Vimentin、MMP9、MMP2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 以薯蓣丸联合依维莫司组更明显 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 薯蓣丸联合依维莫司可能抑制 TGF- β 1 诱导三阴性乳腺癌细胞上皮间质转化, 效果优于药物单用, 其机制可能与调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关。

关键词: 薯蓣丸; 依维莫司; 三阴性乳腺癌; TGF- β 1; 上皮间质转化; PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)07-2190-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.009

Inhibitory effects of Shuyu Pills combined with everolimus on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer cells

LUO Xiao-shan¹, XIE Su^{2*}, FENG Dou-dou¹, MENG Yan-yun¹, ZHAO Jing-zhe¹, XIE Qing², LING Xiang-li²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. The Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Shuyu Pills combined with everolimus on the epithelial mesenchymal transformation of triple negative breast cancer cells 4T1 and MDA-MB-231 induced by TGF- β 1. **METHODS** The 4T1 and MDA-MB-231 cells were divided into the blank group and the induction group to induce the epithelial mesenchymal transformation with TGF- β 1 cytokine treatment, followed by the assignment into the model group, the Shuyu Pills group, the everolimus group and the Shuyu Pills combined with everolimus group. CCK8 method, plate cloning method, cell scratch test and Transwell test were used to detect the proliferation, cloning formation, migration and invasion ability of the cells whose expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP9, MMP2 and pathway proteins PTEN, PI3K, Akt and mTOR were detected by

收稿日期: 2024-04-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81960834); 凌湘力全国名中医传承工作室建设项目 (国中医药办人教函 [2022] 245 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK [2022] 一般 442, 黔科合基础-ZK [2024] 一般 204); 贵州省中医药管理局项目 (QZYY-2023-001)

作者简介: 骆小珊 (1996—), 女, 硕士生, 从事中医药防治恶性肿瘤的基础、临床研究。Tel: 18089648716, E-mail: 1594270122@qq.com

* 通信作者: 谢 甦 (1969—), 女, 博士, 主任医师, 从事中医药防治恶性肿瘤的基础、临床研究。Tel: 13985506996, E-mail: 972254428@qq.com

Western blot. **RESULTS** Compared with the blank group, the induction group displayed a cell morphological change from epithelioid to stromal, decreased expression of E-cadherin protein ($P < 0.01$); and increased protein expressions of N-cadherin and Vimentin ($P < 0.05$). Compared with the model group, each group intervened with the medicine displayed decreased proliferation, clone formation, migration and invasion ability of both kinds of cells ($P < 0.01$); increased protein expressions of PTEN and E-cadherin ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and decreased protein expressions of PI3K, Akt, mTOR, N-cadherin, Vimentin, MMP9 and MMP2 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); and more significantly in the Shuyu Pills combined with everolimus group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** With a more ideal effect than the single uses in inhibiting the TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transformation of triple-negative breast cancer cells, the combination use of Shuyu Pills and everolimus may work through the regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

KEY WORDS: Shuyu Pills; everolimus; triple negative breast cancer; TGF- β 1; epithelial mesenchymal transformation; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

2020年统计数据显示,乳腺癌是女性发病率最高的肿瘤^[1],其中三阴性乳腺癌是预后最差的亚型,因缺乏雌激素、孕激素、人表皮生长因子受体2表达使其治疗手段有限,仍以手术联合化疗为主^[2-3],同时转移是本病恶性程度高的主要原因,约有50%的早期患者可发展为转移性乳腺癌^[4]。上皮间质转化(EMT)是肿瘤细胞转移的重要途径,随着肿瘤不断进展而分泌诸多细胞因子,刺激细胞形态从上皮样转化为间质样,获得游走能力,并随血液或淋巴系统到达靶器官,最终形成转移灶^[5]。转化生长因子- β 1(TGF- β 1)是诱导三阴性乳腺癌细胞发生EMT的关键因素^[6];PI3K/Akt/mTOR信号通路在调控TGF- β 1和EMT中发挥着重要作用,有近30%的三阴性乳腺癌患者该通路过度激活^[7],故通过靶向PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制肿瘤细胞EMT是治疗本病的可能途径^[8]。

依维莫司是mTOR靶点抑制剂,将其联合其他疗法治疗三阴性乳腺癌是当前研究热点^[9-10]。课题组前期证实,薯蓣丸能抑制三阴性乳腺癌进展^[11-12],但具体机制尚不明确,而且联合靶点抑制剂是否具有协同增效的作用也未深入探索。本研究基于PI3K/Akt/mTOR信号通路及TGF- β 1与EMT之间的密切相关性,通过TGF- β 1体外诱导三阴性乳腺癌细胞发生EMT,考察薯蓣丸联合依维莫司的作用机制,以期对相关防治提供更多的思路和方法。

1 材料

1.1 细胞及动物 三阴性乳腺癌人源细胞株MDA-MB-231(批号ZQ0118)、鼠源细胞株4T1(批号ZQ0201)均购自上海中乔新舟生物科技有限公司。SPF级SD大鼠40只,雌性,体质量180~200g,购自广东维通利华实验动物技术有限

公司[实验动物生产许可证号SCXK(粤)2022-0063],饲养在贵州医科大学附属医院临床研究中心动物房,饲养环境为SPF级,温度22~24℃,相对湿度45%~50%,普通饲料和蒸馏水喂养。实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会批准(审批号1900650)。

1.2 药物 薯蓣丸为原方加减后使用,由广东一方制药有限公司提供颗粒剂,按饮片与其换算后组成,包括山药5g、当归6.67g、干地黄7.69g、鸡内金0.48g、川芎2g、阿胶3g、肉桂1.09g、柴胡1.50g、女贞子1.92g、芍药1.11g、白术3.84g、杏仁0.83g、人参2g、桔梗3.33g、茯苓0.40g、防风2.50g、生姜0.24g、白芍0.75g、大枣2.50g、甘草6g、莪术1.87g、白花蛇舌草3.77g。依维莫司(货号HY-10218/CS-0064)购自美国MedChemexpress公司。

1.3 试剂 Recombinant Human TGF- β 1(货号100-21)购自美国PeproTech公司;DMEM高糖培养基(货号C11995500BT)购自美国Gibco公司;胎牛血清(货号04-001-ACS)购自以色列BI公司;青-链霉素双抗(货号SV30010)购自美国HyClone公司;CCK8试剂盒(货号65162-13-2)购自大连美仑生物技术有限公司;高效RIPA裂解液(货号R0010)、二甲基亚砜(货号D8370)、SDS-PAGE凝胶快速配置试剂盒(货号P1200)均购自北京索莱宝科技有限公司; β -actin(货号81115-1-RR)、E-cadherin(货号20874-1-AP)抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司;PI3K(货号ab40776)、mTOR(货号ab32028)、Vimentin(货号ab92547)抗体均购自英国Abcam公司;MMP2(货号bs-22503R)、N-cadherin(货号bs-

1172R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;基质胶(货号356234)购自美国BD公司。

1.4 仪器 超净工作台(型号SW-CJ-2FD)购自苏州净化设备有限公司;恒温CO₂培养箱(型号Model310)购自美国Thermo公司;倒置显微镜(型号CKX41)购自日本Olympus公司;台式高速冷冻离心机(型号Allegra 64R Centrifuge)购自美国Beckman Coulter公司;多功能酶标仪购自美国BioTek公司;ChemiDoc MP凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司;水平电泳仪(型号DY-6C)购自北京六一生物科技有限公司。

2 方法

2.1 含药血清制备 将40只大鼠随机分为空白组、薯蓣丸组,每组20只,薯蓣丸组按人与动物间体表面积折算表的等效剂量换算大鼠用药剂量^[13],按3倍量进行灌胃,薯蓣丸组灌胃给予3.43 g/kg,空白组灌胃给予等体积蒸馏水,每天2次,连续7 d。末次灌胃1.5 h后,麻醉大鼠进行腹主动脉取血,分离血清,56℃水浴灭活30 min,0.22 μm 无菌微孔过滤器过滤,置于-80℃冰箱中保存。

2.2 细胞培养 复苏MDA-MB-231、4T1细胞,用含10%胎牛血清、1%青-链霉素双抗的DMEM培养基,于37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,当细胞生长融合至70%~80%时进行传代和保存,每1~2 d换液1次,后续实验取对数生长期者。

2.3 分组及干预 课题组前期用2.5 ng/mL TGF-β1因子干预三阴性乳腺癌细胞24 h可诱导EMT^[14]。本实验将MDA-MB-231、4T1细胞分为空白组、诱导组,诱导组加入2.5 ng/mL TGF-β1,空白组加入等体积DMSO,干预24 h后观察细胞形态变化、24 h划痕愈合率,检测EMT相关标志蛋白,建立MDA-MB-231、4T1细胞EMT模型。后续实验所用细胞均加入2.5 ng/mL TGF-β1干预,分为模型组(10%空白血清)、薯蓣丸组(10%薯蓣丸含药血清)、依维莫司组(20 μmol/L依维莫司+10%空白血清)、薯蓣丸联合依维莫司组(20 μmol/L依维莫司+10%薯蓣丸含药血清),各组加入DMEM高糖培养基补足体系。

2.4 CCK8法检测细胞增殖和活性 取对数生长期MDA-MB-231、4T1细胞,以每孔5×10³个的密度接种于96孔板中,每组设置3个复孔,待细胞贴壁后加药干预,每孔加入10 μL CCK8试剂,37℃避光孵育1~2 h,在450 nm波长处检测吸光

度,计算细胞活性、增殖抑制率,重复3次。检测薯蓣丸含药血清对细胞的影响时,设立0、1.25%、2.5%、5%、10%、20%含药血清组,分别干预24、48、72 h;检测模型组、薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组对细胞增殖能力的影响时,加入药物后干预24、48 h。

2.5 平板克隆实验检测细胞增殖克隆能力 取对数生长期MDA-MB-231、4T1细胞,以每孔500个的密度接种于6孔板中,待24 h细胞贴壁后,各组加入药物干预24 h,弃去原培养基,加入普通完全培养基继续培养14 d,其间观察细胞状态,适时换液,于倒置显微镜下观察细胞增殖为团块后弃去培养基,PBS清洗2次,加入600 μL多聚甲醛固定后用结晶紫染色,PBS洗净晾干,拍照,重复3次。

2.6 划痕实验检测细胞迁移率 取对数生长期MDA-MB-231、4T1细胞,以每孔1×10⁶个的密度接种于6孔板中,于细胞培养箱中培养24 h至贴壁,使用200 μL无菌枪头垂直划线,弃去原培养基,加入含“2.3”项下分组的药物培养基,分别在培养0、24 h时于倒置显微镜下拍照,重复3次。

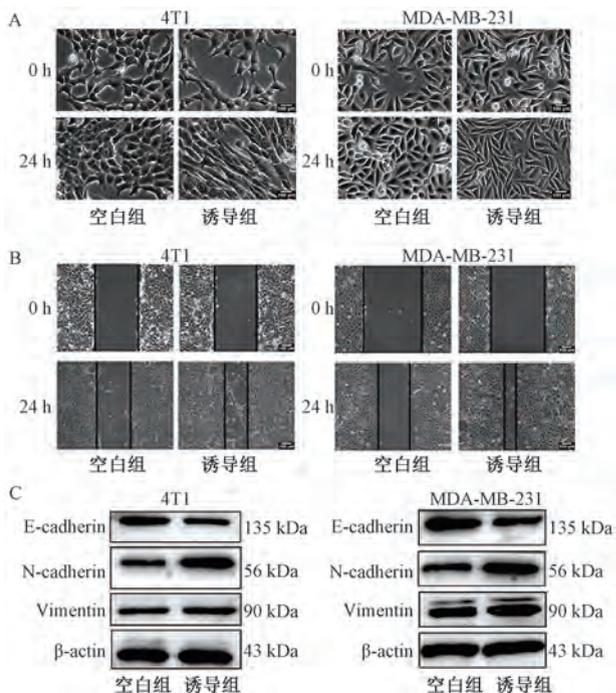
2.7 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力 将预冷基质胶液化后与无血清培养基按1:8比例稀释,加入50 μL至Transwell上室中,待其成为固态,上室中每孔加入200 μL含3×10⁵个经药物处理的细胞悬液,下室加入600 μL完全培养基,置于培养箱中24 h,取出小室,PBS清洗后用棉签小心擦拭内室细胞,加入600 μL多聚甲醛固定后用结晶紫染色,PBS洗净晾干,于倒置显微镜下取5个视野拍照,重复3次。

2.8 Western blot法检测EMT和PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达 按“2.3”项下分组的药物培养基处理MDA-MB-231、4T1细胞24 h,用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解细胞,提取蛋白,BCA法检测蛋白含量,确定上样量,变性后冷冻保存。制备聚丙烯酰胺凝胶,加上样液,电泳分离,湿转法转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉溶液室温封闭1.5 h,分别加入β-actin、E-cadherin(1:1 000),Vimentin、PI3K、Akt、mTOR(1:5 000),N-cadherin、MMP2、MMP9(1:2 500)抗体,4℃摇床孵育过夜,次日加入二抗(1:1 000)室温孵育1 h,洗膜后放入ChemiDoc MP成像系统显影,以β-actin为内参,利用Image J软件分析条带蛋白相对表达量。

2.9 统计学分析 通过SPSS 26.0软件进行处理, 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。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 TGF- β 1对4T1、MDA-MB-231细胞发生EMT的影响 利用2.5 ng/mL TGF- β 1细胞因子干预4T1、MDA-MB-231细胞24 h后, 空白组细胞呈典型的上皮细胞样、多角形特点, 细胞间连接紧密, 成团生长; 诱导组细胞形态呈间质细胞梭形特点, 细胞间连接减少。与空白组比较, 诱导组24 h细胞迁移能力升高($P < 0.01$), 上皮细胞标志蛋白E-cadherin表达降低($P < 0.01$), 间质细胞标志蛋白N-cadherin、Vimentin蛋白表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明TGF- β 1 2.5 ng/mL干预24 h后可诱导细胞发生EMT, 见图1~2。

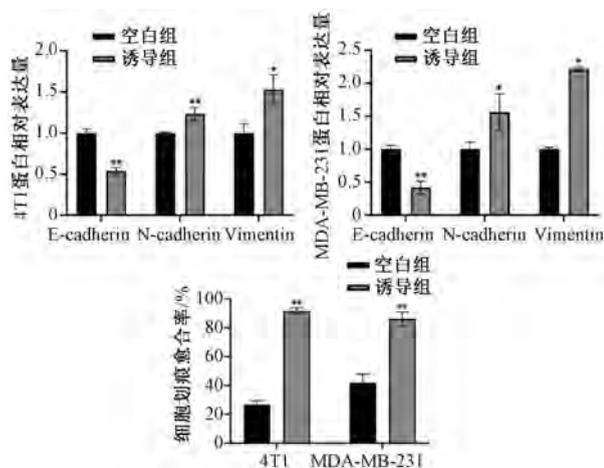


注: A为细胞形态, B为细胞迁移能力, C为细胞E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白电泳图。

图1 TGF- β 1诱导4T1、MDA-MB-231细胞发生EMT情况

Fig. 1 EMT conditions in 4T1 and MDA-MB-231 cells induced by TGF- β 1

3.2 薯蓣丸含药血清对4T1、MDA-MB-231细胞活性的影响 与0%薯蓣丸含药血清组比较, 1.25%~10%薯蓣丸含药血清组4T1、MDA-MB-231细胞24、48、72 h细胞活性降低($P < 0.01$), 且呈时间、浓度依赖性; 与10%薯蓣丸含药血清组比较, 20%薯蓣丸含药血清组抑制4T1细胞72 h



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图2 TGF- β 1对4T1、MDA-MB-231细胞E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白及细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effects of TGF- β 1 on E-cadherin, N-cadherin, Vimentin proteins and cell migration abilities of 4T1, MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

和MDA-MB-231细胞24、48、72 h细胞活性的能力并未持续升高。另外, 10%薯蓣丸含药血清抑制细胞增殖能力较其他更强, 且各时间段细胞活性均未低于50%, 说明该浓度对细胞具有较强抑制能力但毒性不大, 因此后续选用10%作为最佳剂量, 见表1。

3.3 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞增殖能力的影响 与模型组比较, 薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞增殖抑制率升高($P < 0.01$); 与依维莫司组比较, 薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞增殖抑制率升高($P < 0.01$), 见图3。

3.4 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞克隆形成能力的影响 与模型组比较, 薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞克隆形成能力降低($P < 0.01$); 与依维莫司组比较, 薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞克隆形成能力降低($P < 0.01$), 见图4。

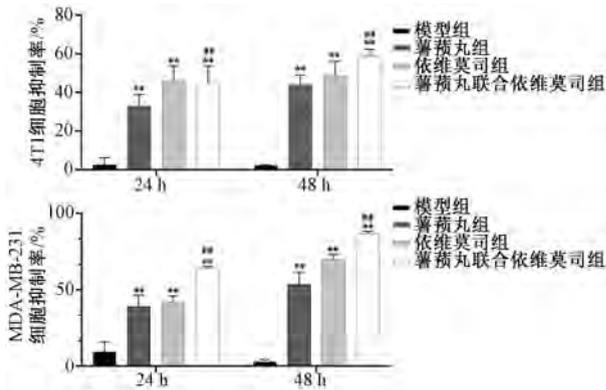
3.5 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞迁移能力的影响 与模型组比较, 薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞迁移能力降低($P < 0.01$); 与依维莫司组比较, 薯蓣丸组、薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞迁移能力降低($P < 0.05$,

表1 不同体积分数薯蓣丸含药血清对细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 1 Effects of different volume fractions of serum containing Shuyu Pills on cell viability ($\bar{x}\pm s, n=3$)

薯蓣丸含药血清 体积分数/%	4T1 细胞活性/%			MDA-MB-231 细胞活性/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	100.03±3.71	100.13±5.30	100.00±3.71	100.00±1.95	100.03±8.32	100.13±3.87
1.25	87.18±0.87**	75.26±3.87**	72.34±1.17**	85.26±1.93**	76.09±1.54**	73.59±0.37**
2.5	82.90±4.22**	68.61±4.78**	67.85±0.13**	75.91±0.35**	66.75±1.41**	68.30±1.56**
5	77.28±0.30**	63.67±0.19**	56.67±2.75**	72.28±0.51**	62.71±2.34**	59.46±2.86**
10	63.41±4.40**	58.99±1.15**	51.99±0.62**	63.10±1.78**	56.79±1.33**	52.48±1.48**
20	62.66±4.03**	57.38±0.44**	52.04±0.21**	64.26±1.98**	56.96±0.38**	57.73±4.83**

注：与0%含药血清比较，** $P<0.01$ 。



注：与模型组比较，** $P<0.01$ ；与依维莫司组比较，### $P<0.01$ 。

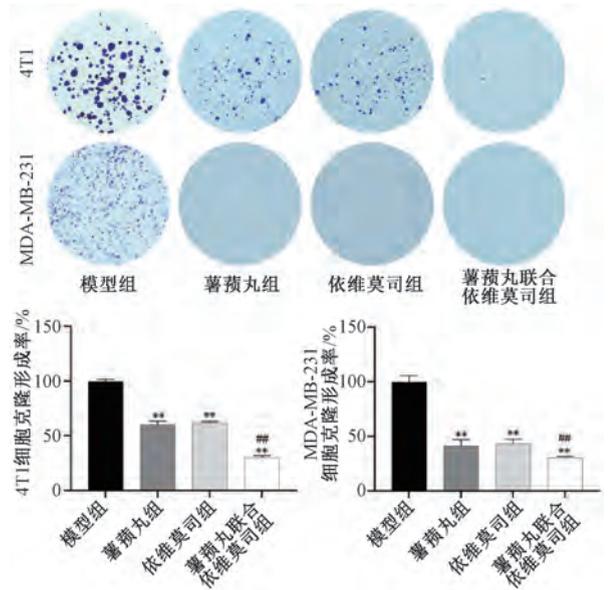
图3 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of Shuyu Pills combined with everolimus on the proliferation of 4T1, MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

$P<0.01$)，见图5。

3.6 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响 与模型组比较，薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞侵袭能力降低 ($P<0.01$)；与依维莫司组比较，薯蓣丸联合依维莫司组4T1、MDA-MB-231细胞侵袭能力降低 ($P<0.01$)，见图6。

3.7 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞EMT相关蛋白表达的影响 在4T1细胞中，与模型组比较，薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组 E-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.05, P<0.01$)，MMP9 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，薯蓣丸组、薯蓣丸联合依维莫司组 N-cadherin、Vimentin、MMP2 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)，依维莫司组 N-cadherin、Vimentin、MMP2 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与依维莫司组比较，薯蓣丸组、薯蓣丸联合依维莫司组 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)，薯蓣丸联合依维莫司组 MMP9 蛋白表达降



注：与模型组比较，** $P<0.01$ ；与依维莫司组比较，### $P<0.01$ 。

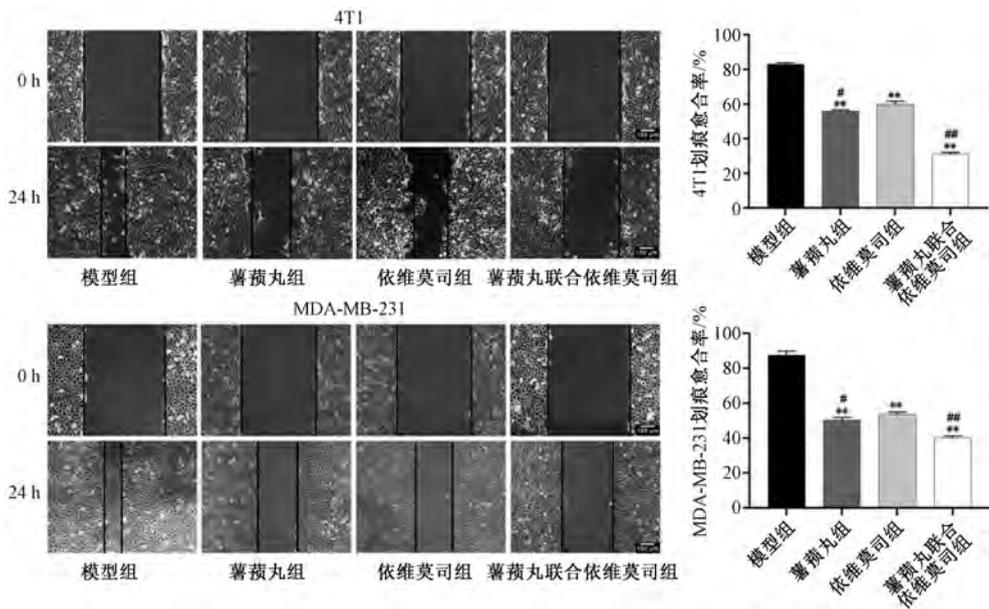
图4 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of Shuyu Pills combined with everolimus on clonogenesis of 4T1, MDA-MB-231 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

低 ($P<0.05$)，见图7~8。

在MDA-MB-231细胞中，与模型组比较，薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组 E-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，Vimentin、MMP9 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，薯蓣丸组、薯蓣丸联合依维莫司组 N-cadherin、MMP2 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)，依维莫司组 N-cadherin、MMP2 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与依维莫司组比较，薯蓣丸联合依维莫司组 N-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9 蛋白表达降低 ($P<0.05, P<0.01$)，见图7~8。

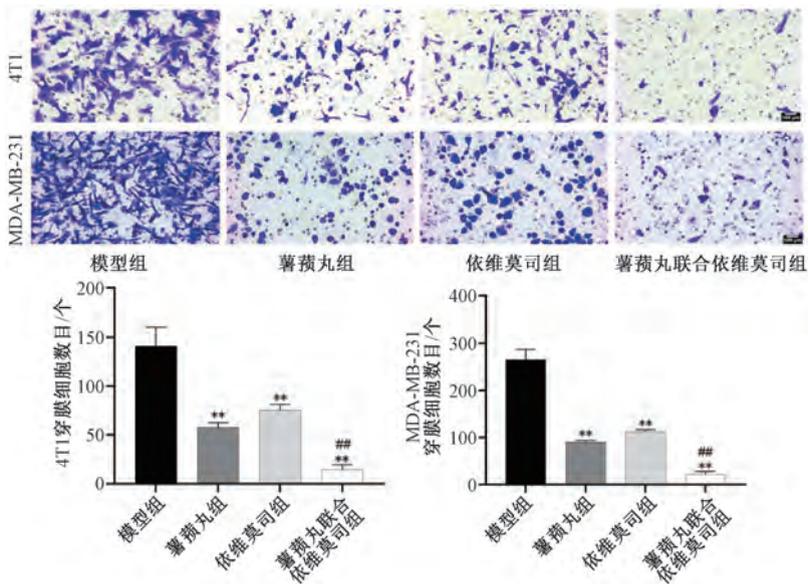
3.8 薯蓣丸联合依维莫司对4T1和MDA-MB-231细胞PI3K/Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响 在4T1细胞中，与模型组比较，薯蓣丸组、依



注：与模型组比较，** $P < 0.01$ ；与依维莫司组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图5 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞迁移能力的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effects of Shuyu Pills combined with everolimus on migration abilities of 4T1, MDA-MB-231 cells ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与模型组比较，** $P < 0.01$ ；与依维莫司组比较，## $P < 0.01$ 。

图6 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effects of Shuyu Pills combined with everolimus on invasion abilities of 4T1, MDA-MB-231 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组 PTEN 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与依维莫司组比较, 薯蓣丸联合依维莫司组 PTEN 蛋白表达升高 ($P < 0.01$), Akt、mTOR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 9~10。

在 MDA-MB-231 细胞中, 与模型组比较, 薯蓣丸组、依维莫司组、薯蓣丸联合依维莫司组 PTEN 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与依维莫司组比较, 薯蓣丸组 PI3K 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 薯蓣丸联合依维莫司组 PTEN 蛋白表

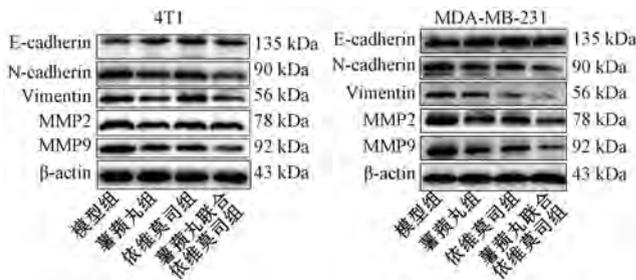
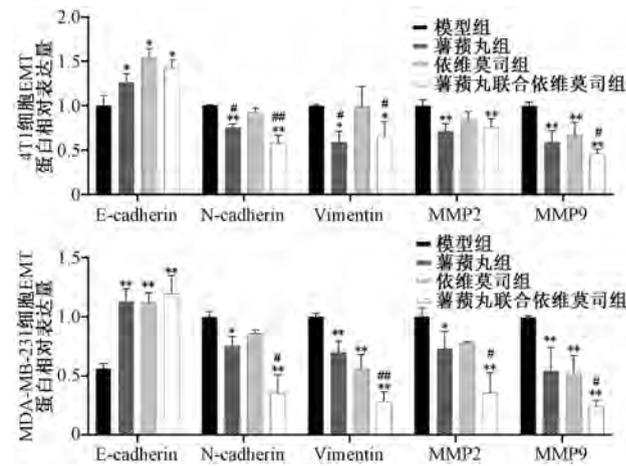


图7 4T1、MDA-MB-231细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9 蛋白条带

Fig. 7 Protein bands of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP2 and MMP9 in 4T1, MDA-MB-231 cells



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与依维莫司组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图8 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effects of Shuyu Pills combined with evolimus on E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP2 and MMP9 protein expressions in 4T1, MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

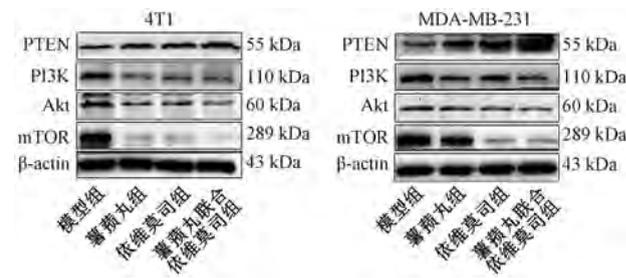
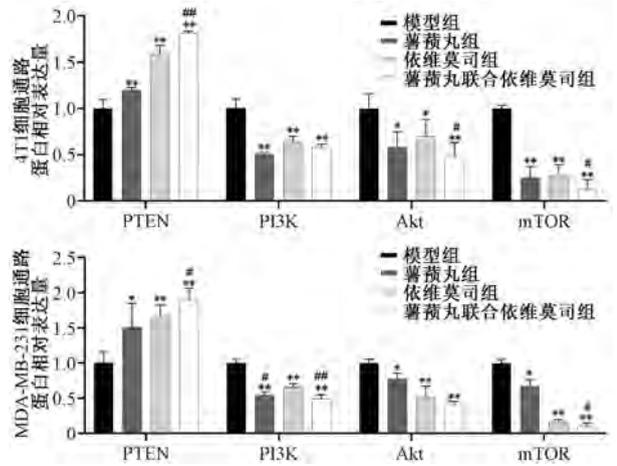


图9 4T1、MDA-MB-231细胞 PTEN、PI3K、Akt、mTOR 蛋白条带

Fig. 9 Protein bands of PTEN, PI3K, Akt, and mTOR in 4T1, MDA-MB-231 cells

达升高 ($P < 0.05$)，PI3K、mTOR 蛋白表达降低



注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与依维莫司组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图10 薯蓣丸联合依维莫司对4T1、MDA-MB-231细胞 PTEN、PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effects of Shuyu Pills combined with evolimus on PTEN, PI3K, Akt and mTOR protein expressions in 4T1, MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

($P < 0.05, P < 0.01$)，见图9~10。

4 讨论

中医认为，三阴性乳腺癌病机特点为“内虚与毒聚并存”，其中正气亏虚为本，并贯穿疾病始终，课题组前期采用薯蓣丸治疗本病，获得良效。同时，患者虽以本虚为重，但仍有药毒、癌毒残留，故加入莪术、白花蛇舌草等具有明确抗癌作用的中药，使薯蓣丸集补脾益气、攻补兼施、寒热并用、阴阳气血共调之功，共同抑制肿瘤发展。

EMT是促使三阴性乳腺癌细胞侵袭、转移的关键因素，其标志主要是以 E-cadherin 为代表的上皮细胞分子失去保持细胞完整性和极性的作用，肿瘤细胞间粘附降低，游走能力更强；间充质细胞标志物 Vimentin、N-cadherin 表达升高，使细胞形态发生改变，更易侵入血液或淋巴系统；肿瘤细胞中高表达的 MMP2、MMP9 等通过降解细胞外基质，使 EMT 更具侵袭性^[5,15]。TGF- β 1 是促使癌细胞肺转移的启动子^[6]，在三阴性乳腺癌中可作为 MMPs 的调节剂来诱导癌细胞高表达 MMP2 和 MMP9，使肿瘤细胞发生 EMT^[16-17]。本研究发现，体外使用 TGF- β 1 处理三阴性乳腺癌细胞后，细胞形态由上皮样变为间质样，迁移能力增强，E-cadherin 表达降低，Vimentin、N-cadherin 表达升高，表明 TGF- β 1 诱导了 EMT 过程。

PI3K/Akt/mTOR 是三阴性乳腺癌进展的关键信号通路, mTOR 在调控肿瘤细胞 EMT 中起到重要作用^[18], 一方面, 通过改变 PKC 磷酸化, 调控细胞骨架, 使肿瘤细胞获得侵袭、迁移能力^[19]; 另一方面, 通过磷酸化 Ser473 上的 Akt 激活 mTOR 促使细胞 EMT^[20], 故调控 mTOR 靶点、抑制 EMT 是治疗本病的可能途径。本研究发现, 薯蓣丸、依维莫司及两者联合用药可抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路活化, 提示上述药物可能通过此通路发挥作用, 并且联用时具有协同效果。依维莫司是临床用于治疗乳腺癌的 mTOR 靶点抑制剂, 但单用不能抑制三阴性乳腺癌进展, 而将其联合其他手段是目前研究热点^[10], 如联合紫杉醇能延长患者生存期, 效果优于单用后者, 但不良反应也随之增加^[21]。本研究发现, 依维莫司不能抑制 4T1 细胞中 Vimentin、N-cadherin、MMP2 蛋白表达及 MDA-MB-231 细胞中 N-cadherin、MMP2 蛋白表达, 可能是该药物无法抑制三阴性乳腺癌进展的潜在因素, 而与薯蓣丸联用后能有效调控通路, 增强对 EMT 的抑制作用, 呈现协同增效作用。

综上所述, 薯蓣丸联合依维莫司可抑制三阴性乳腺癌细胞 EMT 并降低增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为, 效果优于单用后者, 其机制可能与调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关, 但在体内是否具有同样作用有待进一步研究。

参考文献:

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 陈茂山, 吕青. 《基于人口登记数据 2000—2020 年全球乳腺癌发病和死亡率分析》要点解读[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2022, 29(4): 401-406.

[3] Yin L, Duan J J, Bian X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22(1): 61.

[4] Li Y, Zhang H, Merkher Y, et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 121.

[5] Nieto M A, Huang R Y, Jackson R A, et al. EMT: 2016[J]. *Cell*, 2016, 166(1): 21-45.

[6] Zarzynska J M. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 141747.

[7] Bergholz J S, Wang Q W, Wang Q, et al. PI3Kβ controls immune evasion in PTEN-deficient breast tumours[J]. *Nature*, 2023, 617(7959): 139-146.

[8] 黄佳欢, 陈俊青, 杨紫烟, 等. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在三阴性乳腺癌中的作用及靶向治疗研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2020, 26(9): 784-790.

[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] Singh J, Novik Y, Stein S, et al. Phase 2 trial of everolimus and carboplatin combination in patients with triple negative metastatic breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2014, 16(2): R32.

[11] 林金棠, 谢甦, 李丽红, 等. 薯蓣丸协助乳腺癌术前化疗的临床观察[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(11): 1214-1216.

[12] 黄雅珍, 朱曼荆, 朱久龙, 等. 薯蓣丸联合紫杉醇抑制三阴性乳腺癌侵袭转移的作用机制[J]. *中成药*, 2023, 45(5): 1454-1462.

[13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

[14] 朱久龙, 谢青, 黄雅珍, 等. 鳖甲-莪术药对对 TGF-β1 诱导的 MDA-MB-231 细胞侵袭转移能力及其上皮间质转化的作用及机制[J]. *贵州医科大学学报*, 2022, 47(11): 1264-1273.

[15] Huang Y H, Hong W Q, Wei X W. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 129.

[16] Dudas J, Ladanyi A, Ingruber J, et al. Epithelial to mesenchymal transition: a mechanism that fuels cancer radio/chemoresistance[J]. *Cells*, 2020, 9(2): 428.

[17] Wendt M K, Allington T M, Schiemann W P. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-β [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(8): 1145-1168.

[18] Serrano I, McDonald P C, Lock F E, et al. Role of the integrin-linked kinase (ILK) /ricor complex in TGF-β-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Oncogene*, 2013, 32(1): 50-60.

[19] Kwasnicki A, Jeevan D, Braun A, et al. Involvement of mTOR signaling pathways in regulating growth and dissemination of metastatic brain tumors via EMT[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2): 689-696.

[20] Martelossi Cebinelli G C, Paiva Trugilo K, Badaró Garcia S, et al. TGF-β1 functional polymorphisms: a review[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2016, 27(4): 81-89.

[21] Jovanovic B, Mayer A, Mayer E L, et al. A randomized phase II neoadjuvant study of cisplatin, paclitaxel with or without everolimus in patients with stage II/III triple-negative breast cancer (TNBC): Responses and long-term outcome correlated with increased frequency of DNA damage response gene mutations, TNBC subtype, AR status, and Ki67[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15): 4035-4045.