

# 小白薇提取物通过诱导 DNA 损伤抑制三阴性乳腺癌生长

冯志惠<sup>1</sup>, 张铭修<sup>1\*</sup>, 杨清荣<sup>2</sup>, 张海军<sup>1</sup>, 张磊<sup>3</sup>, 张宏<sup>1\*</sup>

(1. 淮北师范大学生命科学院, 安徽 淮北 235000; 2. 西盟佤族自治县中医医院, 云南 普洱 665700; 3. 中国人民解放军海军军医大学药理学系, 上海 200433)

**摘要:** **目的** 探讨小白薇提取物 (TYE) 抗三阴性乳腺癌的作用。**方法** 采用 CCK8 法和平板克隆实验观察 TYE 对 BT549 细胞和 4T1 细胞活力及增殖的影响; 光学显微镜下观察细胞形态变化; 转录组学分析 TYE 对 BT549 细胞 mRNA 表达的影响; 免疫荧光染色和单细胞凝胶电泳检测细胞 DNA 损伤情况; 流式细胞术检测细胞周期变化; Western blot 法检测 p-Chk2、p-P53 和 P21 蛋白表达; 应用 DNA 损伤保护剂巯基丙酸 (MPA) 进行拮抗实验, 观察其对上述指标的拮抗作用。构建 4T1 细胞小鼠原位移植瘤模型, 观察 TYE 对乳腺癌体积、质量及主要脏器系数的影响, 免疫组化法检测 Ki67 和  $\gamma$ -H2AX 原位表达情况; 液质联用分析 TYE 中的主要成分。**结果** TYE 可抑制 BT549 细胞和 4T1 细胞活力、克隆增殖, 增加细胞质内颗粒物。GSEA 分析显示, TYE 抗肿瘤作用与 DNA 损伤修复和细胞周期调控相关通路 mRNA 表达相关。TYE 可升高  $\gamma$ -H2AX 荧光强度, 增加彗星拖尾长度, 诱导细胞周期阻滞, 促进 p-P53、p-Chk2 和 P21 蛋白表达; MPA 则拮抗了这些作用, 逆转了细胞活力的抑制和平板克隆的增殖。动物实验结果显示, TYE 可抑制肿瘤体积和质量, 对脏器系数无影响, 增加  $\gamma$ -H2AX 表达, 降低 Ki67 表达。**结论** TYE 通过诱导 DNA 损伤, 激活 Chk2/P53/P21 通路, 导致细胞周期阻滞, 引起细胞死亡, 从而抑制乳腺癌生长。

**关键词:** 小白薇; 乳腺癌; 增殖; 细胞周期; DNA 损伤; 转录组学; Chk2/P53/P21 通路;  $\gamma$ -H2AX

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0618-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.038

乳腺癌是一种源于乳腺上皮组织的恶性肿瘤, 其发病率持续攀升, 已成为女性癌症死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。根据分子特征, 乳腺癌可分为管腔型、HER-2 阳性型和三阴型<sup>[2]</sup>。其中, 三阴性乳腺癌 (TNBC) 因雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和人表皮生长因子受体 2 (HER-2) 均不表达而得名, 约占全部乳腺癌的 15%~20%<sup>[3-5]</sup>。该亚型具有高度异质性, 临床表现为恶性程度高、侵袭性强、易转移复发及预后不良等特征<sup>[3,6]</sup>。

小白薇为萝藦科娃儿藤属植物云南娃儿藤 *Tylophora yunnanensis* Schlechter 的干燥根, 主产于云南和贵州等地区, 是彝族常用药材, 味苦、辛, 性微温, 归肝、脾经。《云南中草药》记载小白薇具有舒筋活血, 调经止痛的功效, 治跌打损伤, 风湿骨痛, 肝炎, 胃溃疡, 虚癆, 恶性疟疾。研究发现, 小白薇可通过降低体质量、调节脂质水平、减轻炎症反应等改善非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)

大鼠症状、肠道微生物群失调和代谢紊乱<sup>[7-8]</sup>。

小白薇对乳腺癌的治疗作用及其机制均不清楚。本研究拟运用细胞活力分析、平板克隆形成实验、细胞周期检测、小鼠原位荷瘤实验等评价小白薇的抗乳腺癌活性; 并采用转录组学分析、免疫荧光分析、彗星实验、Western blot 分析、巯基丙酸拮抗和免疫组化检测等探索其作用机制。

## 1 材料

1.1 小白薇提取物 小白薇药材购自云南昆明市官渡区常真堂中药材经营部, 经海军军医大学药学院生药学教研室辛海量教授鉴定为萝藦科娃儿藤属植物云南娃儿藤 *Tylophora yunnanensis* Schlechter 的根。取小白薇干燥药材 100 g, 粉碎后用 10 倍量 75% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 合并提取液, 真空过滤, 旋转蒸发仪浓缩, -80 °C 真空冷冻干燥, 获得小白薇乙醇提取物浸膏粉 (*Tylophora yunnanensis* extract, TYE) 总计 19.57 g, 得率

收稿日期: 2025-09-22

基金项目: 国家自然科学基金 (82174023); 安徽省高等学校科学研究项目 (2023AH040055); 安徽省自然科学基金项目 (2308085MC79); 安徽省高校优秀创新团队 (2022AH010029)

作者简介: 冯志惠 (1999—), 女, 硕士, 研究方向为中药抗肿瘤药理。E-mail: feng18740536649@163.com

\*共同第一作者: 张铭修 (2002—), 男, 硕士生, 研究方向为中药抗肿瘤药理。E-mail: 1558531645@qq.com

\*通信作者: 张宏 (1969—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药抗肿瘤药理。E-mail: zhanghong@chnu.edu.cn

19.57%。使用时，以 DMSO 溶解（浓度不超过 0.1%），再用细胞培养基配制成相应浓度。

1.2 细胞 4T1 鼠源三阴性乳腺癌细胞系购自中国科学院上海细胞库，BT549 人三阴性乳腺癌细胞系由普诺赛武汉细胞库提供。BT549 细胞和 4T1 细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养，培养条件为 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>。

1.3 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠 20 只，雌性，4 周龄，购买及饲养于南通大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号 SCXK（苏）2023-0021，实验动物使用许可证号 SYXK（苏）2022-0045]，小鼠自由饮水及进食，照明及关灯每 12 h 交替进行以维持正常生物行为节律。本动物实验经南通大学动物实验伦理委员会批准（伦理号 S20240925-003）。

1.4 试剂 RPMI-1640 培养基（货号 C11875500BT）购自美国 Gibco 公司；PBS（货号 BL302A）购自合肥兰杰柯科技有限公司；甲基脯胺（methylproamine, MPA, 货号 HY-15620）购自美国 MedChemExpress 公司；DMSO、CCK8 试剂、 $\gamma$ -H2AX 试剂盒（货号 ST038-100ml、C0039-10ml、AF3010）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；ISEQ00010 PVDF 购自德国默克公司；P21、p-P53、p-Chek2、GAPDH 抗体（货号 10355-1-AP、28961-1-AP、29012-1-AP、10494-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.5 仪器 酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；倒置荧光显微镜、激光共聚焦显微镜（德国 Leica 公司）；ChemiDoc XRS+全自动化学发光成像系统（美国 Bio-Rad 公司）。

## 2 方法

2.1 细胞活力检测 细胞以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔板，在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 以贴壁，加入 1、3、5、10、20、30、40、50、100  $\mu$ g/mL TYE 继续孵育 24 h 或 48 h。根据试剂盒说明书，使用 CCK8 法检测细胞活力，通过酶标仪在 450 nm 波长处测定细胞的吸光度值。在拮抗实验中，培养基中同时添加 0.3  $\mu$ mol/L MPA，并设置单独的 MPA 对照组。细胞活力公式为，细胞活力 =  $[(OD_{\text{给药}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100\%$ 。

2.2 平板克隆实验 细胞以每孔  $1 \times 10^3$  个的密度接种于 12 孔板，于培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。分别用 5、10、20  $\mu$ g/mL TYE 处理 24 h，更

换新鲜培养基后每 3 d 换液 1 次。培养 14 d 后，用 PBS 洗涤细胞，4% 多聚甲醛固定 30 min，1% 结晶紫溶液染色 15 min，PBS 洗去多余染液，室温晾干后拍照记录各组的克隆形成情况。在拮抗实验中，培养基中同时添加 0.3  $\mu$ mol/L MPA，并设置单独的 MPA 对照组。

2.3 转录组学分析 将 BT549 细胞以每皿  $1 \times 10^6$  个的密度接种在 60 mm 培养皿中，于培养箱中培养过夜。用 10  $\mu$ g/mL TYE 处理 24 h 后，预冷的 PBS 清洗 1 次，加入 1 mL Trizol 收集细胞并转入 1.5 mL RNase-free 离心管中，于 -80 ℃ 冰箱保存。实验设对照组和给药组。样品在干冰冷冻条件下送至上海欧易生物医学科技有限公司，委托该公司进行转录组学检测分析。

2.4  $\gamma$ -H2AX 检测 细胞以每孔  $4 \times 10^4$  个的密度接种于 24 孔板，于培养箱中培养过夜。分别用 5、10、20  $\mu$ g/mL TYE 处理 24 h。参照  $\gamma$ -H2AX 试剂盒说明书，PBS 洗涤 1 次，4% 多聚甲醛固定 10 min，免疫染色封闭液封闭 20 min，加入  $\gamma$ -H2AX 兔单抗 4 ℃ 孵育过夜，次日洗涤 3 次后，加入 Alexa Fluor 488 标记二抗室温孵育，再次洗涤后用 DAPI 染核 5 min，使用倒置荧光显微镜采集荧光图像。在拮抗实验中，培养基中同时添加 0.3  $\mu$ mol/L MPA，并设置单独的 MPA 对照组。

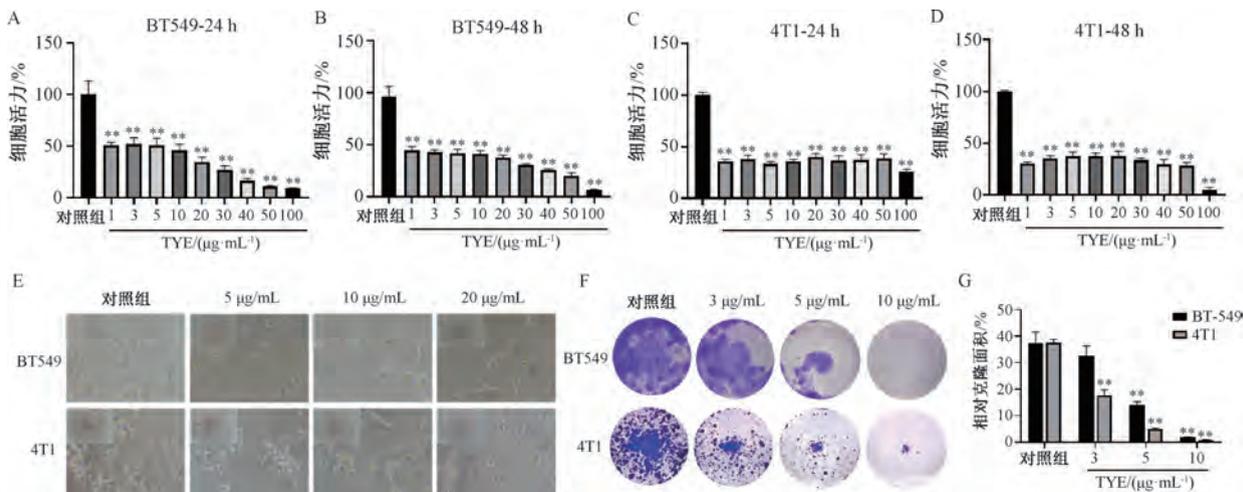
2.5 彗星实验 将细胞以每孔  $4 \times 10^5$  个的密度接种于 6 孔板，于培养箱中培养过夜。分别用 5、10、20  $\mu$ g/mL TYE 处理 24 h，经胰蛋白酶消化后用 PBS 重悬细胞。按照试剂盒说明书，先在载玻片上制备第一层正常熔点凝胶，再将细胞悬液与低熔点琼脂糖混合后滴加形成第二层凝胶。待凝胶凝固后进行裂解过夜处理，依次完成 DNA 解旋、电泳、中和及碘化丙啶染色步骤，最后使用激光共聚焦显微镜采集图像。

2.6 蛋白免疫印迹实验 采用不同剂量 TYE 处理 BT549 细胞 6 h 或 24 h 后收集细胞样本，使用 RIPA 裂解液提取总蛋白，BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后转印至 PVDF 膜，3% BSA 封闭，加一抗 4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤后加二抗室温孵育，应用超敏 ECL 显影，在 ChemiDoc XRS+全自动化学发光成像系统上进行检测分析。

2.7 动物实验 小鼠适应性饲养 1 周后，于右侧第二乳腺脂肪垫接种 4T1 细胞（ $1 \times 10^7$  个/mL，100  $\mu$ L/只）。待肿瘤体积达到 60~80 mm<sup>3</sup> 时，将

小鼠随机分为对照组、奥沙利铂组和 TYE 低、高剂量组，每组 5 只，分别给予 1% CMC-Na（灌胃）、奥沙利铂 5 mg/kg（腹腔注射，隔天 1 次）和 TYE 25、50 mg/kg（灌胃）。给药期间每 2 d 测量 1 次肿瘤体积（长×宽<sup>2</sup>×0.5）和体质量。给药 21 d 后处死小鼠，剥离肿瘤组织，称定质量；取心、肝、脾、肺、肾等主要脏器，称定质量，计算脏器系数。肿瘤组织用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，进行 HE 染色及 Ki67、 $\gamma$ -H2AX 免疫组化分析。

2.8 统计学分析 通过 Excel、GraphPad Prism 8.0、CytExpert 2.4 和 Image J 软件进行处理，结果以均数±标准差（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，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。



注：A~D 为 TYE 处理 24、48 h 对 2 种乳腺癌细胞活力的影响；E 为 TYE 处理 24 h 后对 2 种乳腺癌细胞形态的影响；F~G 为 TYE 对乳腺癌细胞平板克隆形成的影响。与对照组比较，\*\*  $P<0.01$ 。

图 1 TYE 对乳腺癌细胞生长的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

3.2 TYE 对 DNA 损伤修复及细胞周期相关 mRNA 表达的影响 GESA 结果显示，TYE 影响了复制叉处理、剪切体、DNA 解旋酶及细胞周期相关通路 mRNA 的表达，同时也影响 RNA 聚合酶活性、核糖体大亚基生物发生及装配过程，见图 2。这些基因与 DNA 双链断裂和损伤修复、细胞周期调控及蛋白质合成等密切相关，提示 TYE 可能造成了 DNA 损伤和诱导细胞周期阻滞。

3.3 TYE 对乳腺癌细胞 DNA 损伤的影响 基于转录组学 GSEA 结果，对乳腺癌细胞 DNA 损伤进行检测。与对照组比较，10、20  $\mu\text{g/mL}$  TYE 增加了 BT549 细胞 DNA 损伤标记物  $\gamma$ -H2AX 的荧光强度（ $P<0.01$ ），见图 3A~3B；10、20  $\mu\text{g/mL}$  TYE 增加了 4T1 细胞 DNA 损伤标记物  $\gamma$ -H2AX 的荧光强度（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），见图 3C~3D。彗星实验

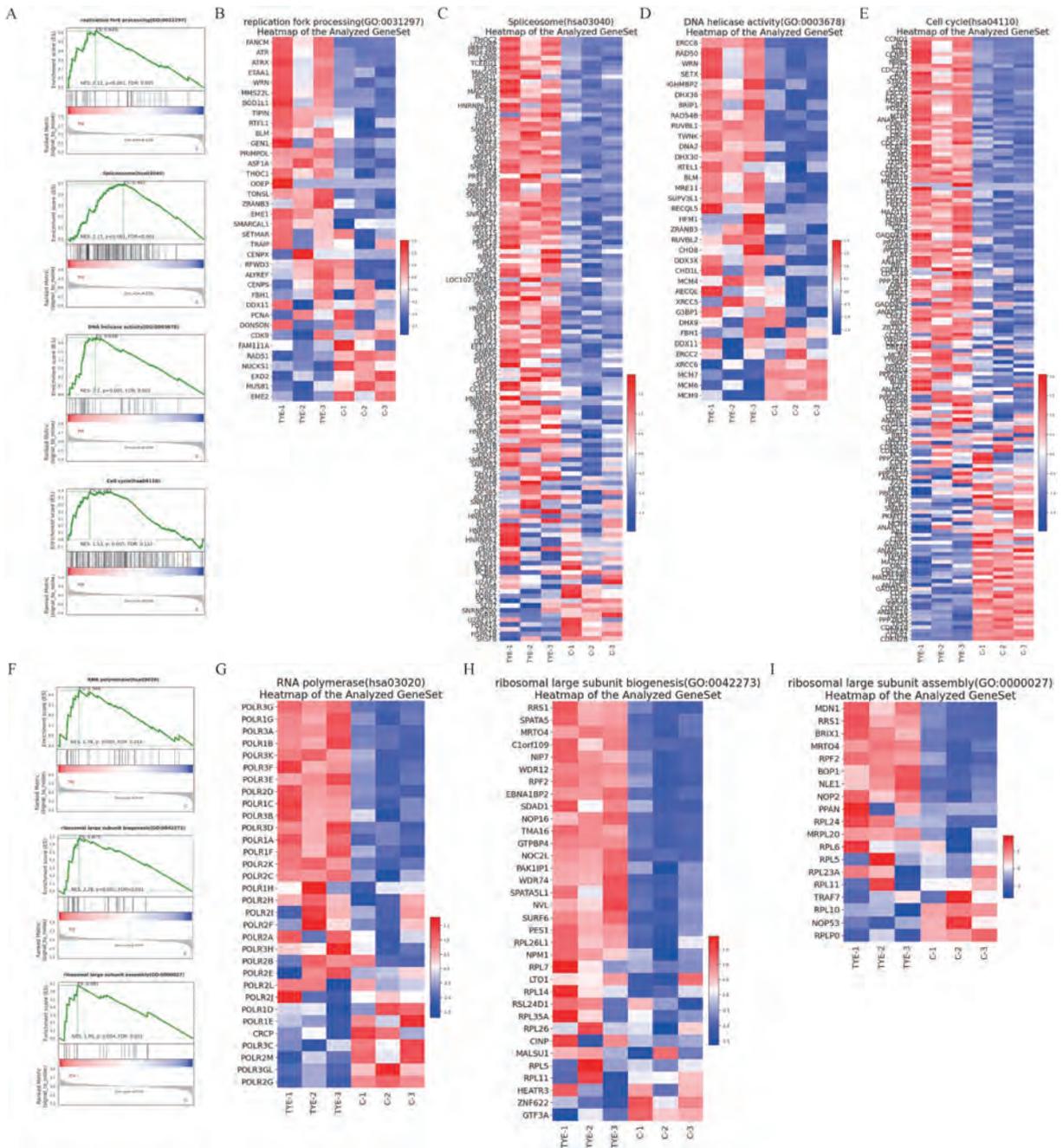
### 3 结果

3.1 TYE 对乳腺癌细胞生长的影响 不同质量浓度 TYE 均可抑制 BT549 细胞和 4T1 细胞活力（ $P<0.05$ ）；TYE 干预 BT549 细胞和 4T1 细胞 24 h 后， $\text{IC}_{50}$  值分别为 5.27、3.17  $\mu\text{g/mL}$ ；48 h 后， $\text{IC}_{50}$  值分别为 3.84、2.38  $\mu\text{g/mL}$ ，见图 1A~1D。显微镜下观察可见乳腺癌细胞体积增大，边缘不规则，细胞质内出现较多褐色颗粒物，未见明显的凋亡或坏死形态，见图 1E。平板克隆形成实验显示，与对照组比较，各质量浓度 TYE 组克隆面积均减少，且在 10  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度作用下，2 种乳腺癌细胞的克隆形成几乎完全消失，见图 1F~1G。这些结果表明，TYE 能抑制乳腺癌细胞生长。

显示，对照组 2 种乳腺癌细胞 DNA 呈现圆形的荧光团，边缘光滑，无拖尾现象产生；不同质量浓度 TYE 处理后，DNA 边缘粗糙，出现拖尾现象，拖尾长度呈剂量依赖性增加（ $P<0.01$ ），以 20  $\mu\text{g/mL}$  最显著，见图 3E~3H。这些结果表明，TYE 诱导了乳腺癌细胞 DNA 损伤。

3.4 TYE 对乳腺癌细胞周期阻滞的影响 与对照组比较，5、10、20  $\mu\text{g/mL}$  TYE 处理 24 h 后，2 种乳腺癌细胞  $G_0/G_1$  期细胞比例增加（ $P<0.01$ ），S 期和  $G_2/M$  期细胞比例降低（ $P<0.01$ ），见图 4。

3.5 MPA 逆转 TYE 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用 与对照组比较，5~20  $\mu\text{g/mL}$  TYE 作用 24 h 抑制了 2 种乳腺癌细胞的活力（ $P<0.01$ ）；0.3  $\mu\text{mol/L}$  MPA 单独处理对细胞活力无明显影响（ $P>0.05$ ），但与 TYE 联用后逆转了 TYE 对细胞活



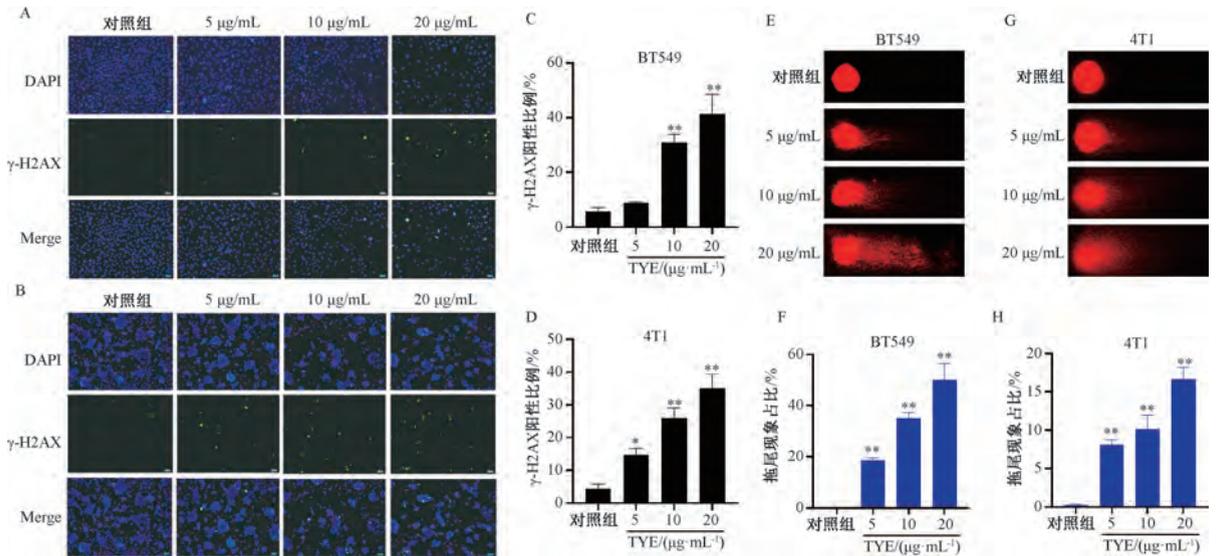
注：A 为复制叉处理、剪切体、DNA 解旋酶和细胞周期通路的 GSEA 统计图；B~E 为复制叉处理、剪切体、DNA 解旋酶和细胞周期通路 mRNA 表达热图；F 为 RNA 聚合酶、核糖体大亚基生物发生和装配 GSEA 统计图；G~I 为 RNA 聚合酶、核糖体大亚基生物发生和装配通路 mRNA 表达热图。

图 2 TYE 对 DNA 损伤修复及细胞周期相关 mRNA 表达的影响

力的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 见图 5A~5B。平板克隆实验也证实了这点, 与对照组比较, 10  $\mu\text{g/mL}$  TYE 抑制了细胞克隆形成能力 ( $P < 0.01$ ); 0.3  $\mu\text{mol/L}$  MPA 单独处理对细胞克隆形成能力无明显影响 ( $P > 0.05$ ), 但与 TYE 联用后拮抗了 TYE 对细胞克隆形成能力的抑制作用 ( $P < 0.01$ ), 见图 5C~5E。

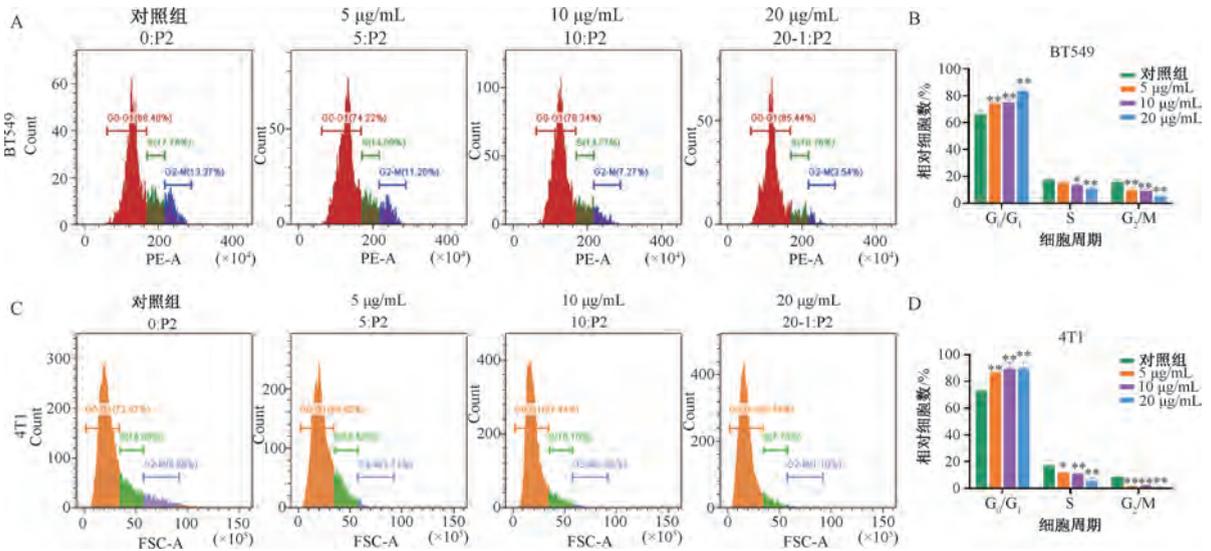
### 3.6 MPA 逆转 TYE 诱导乳腺癌细胞 DNA 损伤的

作用 与对照组比较, 10  $\mu\text{g/mL}$  TYE 处理乳腺癌细胞 24 h 后, 增加了 2 种乳腺癌细胞中 DNA 双链断裂标志物  $\gamma\text{-H2AX}$  的表达 ( $P < 0.01$ ); 0.3  $\mu\text{mol/L}$  MPA 单独处理对  $\gamma\text{-H2AX}$  表达无明显影响 ( $P > 0.05$ ), 但与 TYE 联用后逆转了 TYE 对  $\gamma\text{-H2AX}$  表达的上调 ( $P < 0.01$ ), 见图 6A~6D。彗星实验进一步证实, 与对照组比较, 10  $\mu\text{g/mL}$  TYE 能诱导细胞出现典型的 DNA 断裂电泳拖尾现



注：A~D为TYE处理24 h后2种乳腺癌细胞γ-H2AX表达情况；E~H为TYE处理24 h后2种乳腺癌细胞DNA拖尾情况。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

图3 TYE对乳腺癌细胞DNA损伤的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



注：A~B为TYE对BT549细胞周期的影响；C~D为TYE对4T1细胞周期的影响。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

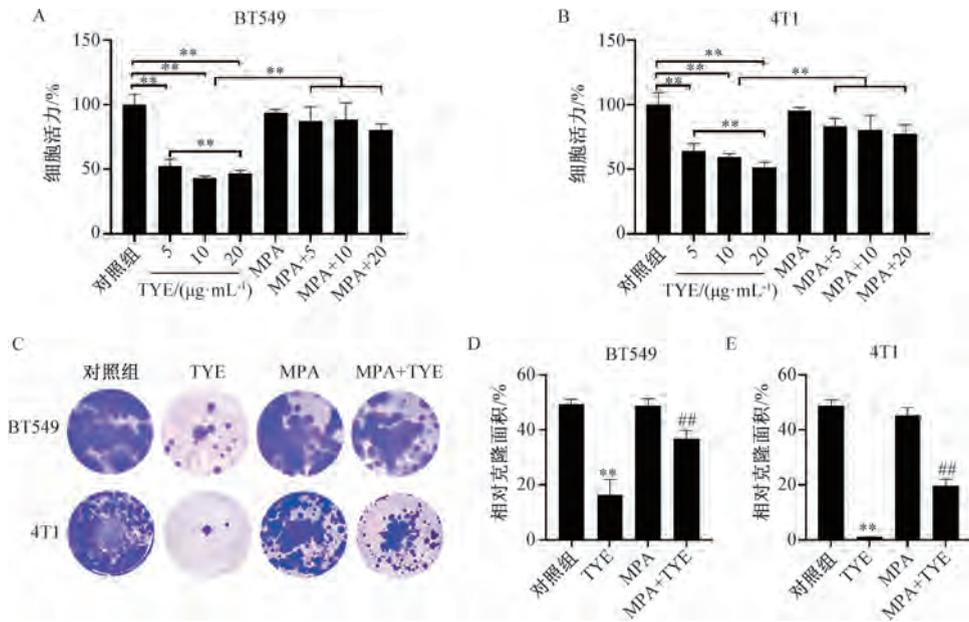
图4 TYE对乳腺癌细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

象 ( $P < 0.01$ )；而  $0.3 \mu\text{mol/L}$  MPA 单独处理不会引起DNA拖尾现象 ( $P > 0.05$ )，但与TYE联用后几乎完全阻断了TYE诱导的DNA拖尾产生 ( $P < 0.01$ )，见图6E~6H。

3.7 MPA逆转TYE诱导乳腺癌细胞周期阻滞的作用 与对照组比较， $10 \mu\text{g/mL}$  TYE诱导细胞阻滞于 $G_0/G_1$ 期 ( $P < 0.01$ )； $0.3 \mu\text{mol/L}$  MPA单独处理对细胞周期无明显影响 ( $P > 0.05$ )，但与TYE联用后减弱了TYE对细胞 $G_0/G_1$ 期的阻滞效应 ( $P < 0.01$ )，见图7A~7D。进一步Western blot实验结果显示，与对照组比较， $10 \mu\text{g/mL}$  TYE处理

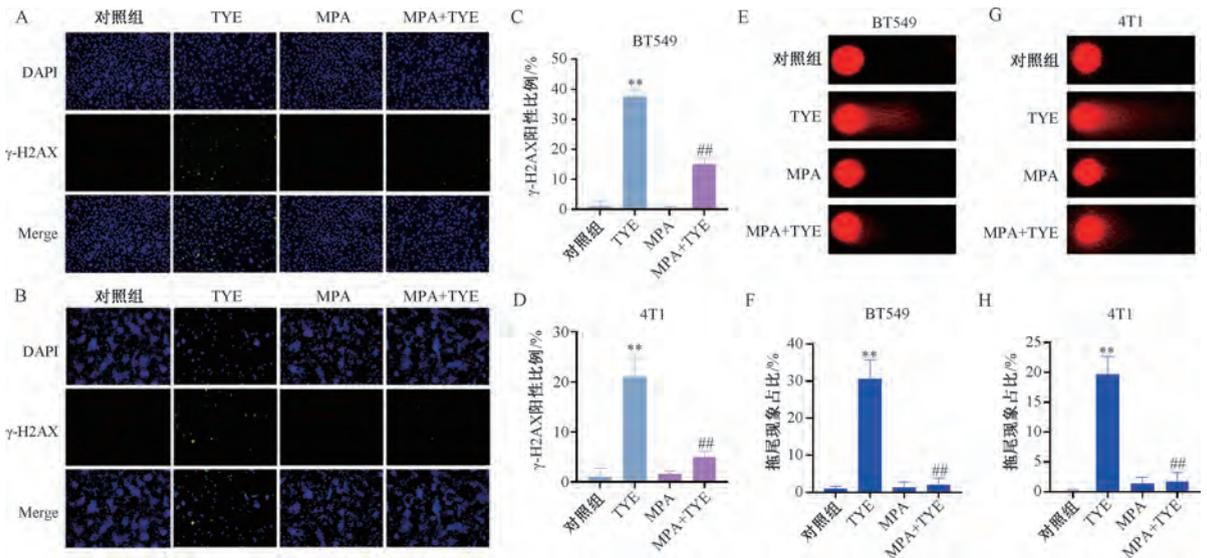
BT549细胞6 h后升高了p-Chek2和p-P53蛋白表达 ( $P < 0.01$ )，处理细胞24 h后则升高了P21蛋白表达 ( $P < 0.01$ )；而 $0.3 \mu\text{mol/L}$  MPA单独处理对p-Chek2、p-P53和P21蛋白表达无明显影响 ( $P > 0.05$ )，但与TYE联用后拮抗了TYE对p-Chek2、p-P53和P21蛋白表达的上调 ( $P < 0.01$ )，见图7E~7H。

3.8 TYE对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 与对照组比较，TYE各剂量组荷瘤小鼠体质量无明显变化，奥沙利铂组荷瘤小鼠体质量降低 ( $P < 0.01$ )；TYE各剂量组和奥沙利铂组荷瘤小鼠肿瘤



注：A~B为MPA对TYE抑制乳腺癌细胞活力的拮抗作用；C~D为MPA对TYE抑制乳腺癌细胞克隆形成的拮抗作用。与对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与TYE组比较，## $P < 0.01$ 。

图5 MPA逆转TYE对乳腺癌细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



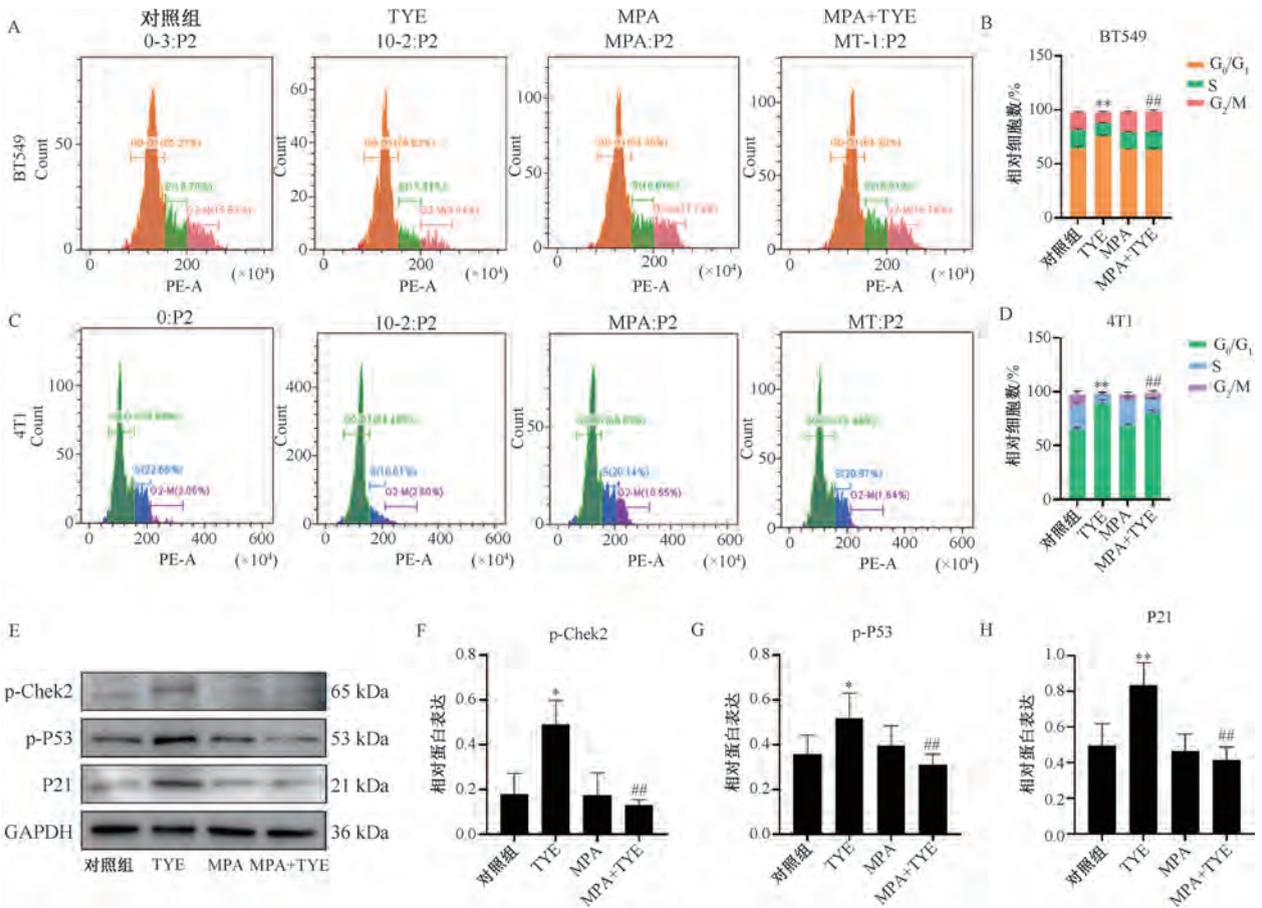
注：A~D为MPA对TYE诱导乳腺癌细胞γ-H2AX增加的拮抗作用；E~H为MPA对TYE诱导乳腺癌细胞DNA拖尾产生的拮抗作用。与对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与TYE组比较，## $P < 0.01$ 。

图6 MPA逆转TYE诱导乳腺癌细胞DNA损伤的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

体积、肿瘤质量和肿瘤组织Ki67阳性细胞数量均降低 ( $P < 0.01$ )，γ-H2AX阳性细胞数量增加 ( $P < 0.01$ )；除奥沙利铂组荷瘤小鼠脾脏系数降低外 ( $P < 0.01$ )，其余各组荷瘤小鼠心、肝、脾、肺、肾脏系数均无明显变化 ( $P > 0.05$ )，见图8。这些结果提示，TYE具有良好的抑制乳腺癌生长作用，且无明显毒性。

#### 4 讨论

小白薇为萝藦科娃儿藤属植物云南娃儿藤 *Tylophora yunnanensis* Schlechter 的干燥根，是彝族常用药材。本研究发现，TYE明显抑制三阴性乳腺癌细胞活力，减少细胞克隆增殖数量，诱导DNA损伤，阻滞细胞周期在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。TYE还能减轻乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤体积和质量，但对小鼠体质量和脏器系数无明显影响，提示其具有良好的抗乳腺癌临床应用价值。



注：A~D为MPA对TYE诱导乳腺癌细胞周期阻滞的拮抗作用；I~H为MPA对TYE诱导乳腺癌细胞周期阻滞相关蛋白表达上调的拮抗作用。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与TYE组比较，## $P < 0.01$ 。

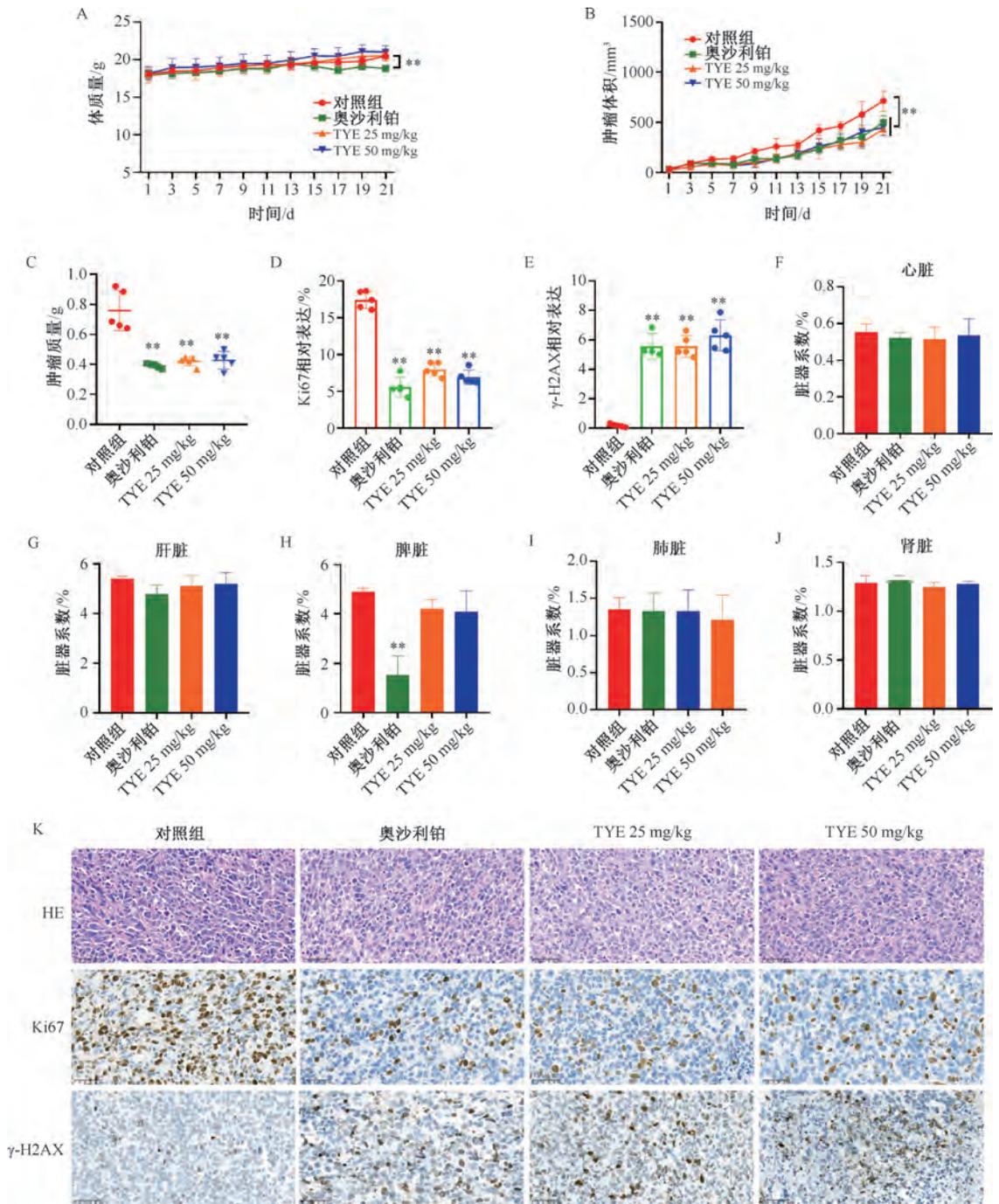
图7 MPA逆转TYE诱导乳腺癌细胞周期阻滞的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

为了探索作用机制，本研究进行了转录组学分析。GSEA结果显示，TYE明显影响了与DNA双链断裂、损伤修复和细胞周期阻滞密切相关的通路基因表达，提示其可能通过损伤DNA诱导细胞周期阻滞。DNA损伤导致的细胞周期阻滞在越来越多的抗肿瘤天然药物中被发现<sup>[9]</sup>。细胞周期作为高度调控的生物学过程，协调着细胞分化、分裂和增殖等关键事件<sup>[10-11]</sup>。该过程由一系列有序分子事件组成，其中Cyclin-CDK复合物通过精确调控细胞周期进程发挥核心作用<sup>[12-13]</sup>。为保障细胞周期正常运转，机体进化出多重检查点机制，通过调控Cyclin-CDK复合物活性确保各阶段有序转换<sup>[14]</sup>。值得注意的是，检查点功能异常可导致细胞丧失对DNA损伤和外界信号的敏感性<sup>[15]</sup>。DNA损伤后，细胞通过2种机制防止突变传递：一是短暂或永久阻滞细胞周期以促进损伤修复，或者永久性地停滞并进入衰老状态；二是通过凋亡清除严重受损的细胞<sup>[16]</sup>。本研究结果显示，TYE诱导乳腺癌细胞阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期，而MPA几乎完全拮抗了

TYE引起的细胞周期阻滞。

DNA损伤可导致细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期或G<sub>2</sub>期，以修复DNA，Chk2/P53/P21通路在其中起着重要调控作用。Chk2可以直接磷酸化P53的Ser-20位点，抑制P53与MDM2结合，从而增加P53的稳定性<sup>[17-19]</sup>。DNA损伤后，未敲除Chk2的结直肠癌细胞磷酸化P53高表达，但在敲除Chk2的细胞中，磷酸化P53表达降低<sup>[20]</sup>。激活后的P53诱导CDK抑制剂P21的表达，进而介导细胞周期停滞<sup>[21-22]</sup>。P21作为关键的CDK抑制剂，能够与多种Cyclin-CDK复合物结合<sup>[23]</sup>，其水平升高可导致这些复合物失活或降解，引发G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞<sup>[24-26]</sup>。本研究结果显示，TYE升高了乳腺癌细胞p-Chk2、p-P53和P21表达，而MPA则拮抗了TYE的这种作用，提示TYE通过激活Chk2/P53/P21通路诱导了细胞周期阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。

综上所述，TYE通过诱导DNA损伤，激活Chk2/P53/P21信号通路，引起细胞周期阻滞，造成细胞死亡，进而阻止乳腺癌进展。



注：A~C为各组小鼠体质量、肿瘤体积和肿瘤质量比较；D~E为各组小鼠肿瘤组织Ki67和γ-H2AX原位表达比较；F~J为各组小鼠心、肝、脾、肺、肾脏器系数比较；K为各组小鼠肿瘤组织HE、Ki67和γ-H2AX染色典型图像。与对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

图8 TYE对乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

参考文献:

[1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.

[2] Sharma M, Tollefsbol T O. Combinatorial epigenetic mechanisms

of sulforaphane, genistein and sodium butyrate in breast cancer inhibition[J]. *Exp Cell Res*, 2022, 416(1): 113160.

[3] Bianchini G, Balko J M, Mayer I A, et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(11): 674-690.

[4] Harris M A, Savas P, Virassamy B, et al. Towards targeting the breast cancer immune microenvironment[J]. *Nat Rev Cancer*, 2024, 24(8): 554-577.

- [ 5 ] Garrido-Castro A C, Lin N U, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer; improving patient selection for treatment[J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(2): 176-198.
- [ 6 ] Yang T, Jiang Y X, Wu Y, *et al.* Resibufogenin suppresses triple-negative breast cancer angiogenesis by blocking VEGFR2-mediated signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 682735.
- [ 7 ] Lin Y, Fang Q, Xue Y, *et al.* Effects of *Tylophora yunnanensis* Schltr on regulating the gut microbiota and its metabolites in non-alcoholic steatohepatitis rats by inhibiting the activation of NOD-like receptor protein 3[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116145.
- [ 8 ] 乔 雪, 李欣坪, 薛咏梅, 等. 小白薇不同萃取物对非酒精性脂肪性肝炎的改善作用及机制[J]. *中国药房*, 2023, 34(10): 1182-1186.
- [ 9 ] Li Q Z, Chen Y Y, Liu Q P, *et al.* Cucurbitacin B suppresses hepatocellular carcinoma progression through inducing DNA damage-dependent cell cycle arrest[J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155177.
- [ 10 ] Arnoult N, Correia A, Ma J, *et al.* Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN[J]. *Nature*, 2017, 549(7673): 548-552.
- [ 11 ] Kumari N, Kaur E, Raghavan S C, *et al.* Regulation of pathway choice in DNA repair after double-strand breaks[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2025, 80: 102496.
- [ 12 ] Mouery B L, Baker E M, Mei L, *et al.* APC/C prevents a noncanonical order of Cyclin/CDK activity to maintain CDK4/6 inhibitor-induced arrest[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(30): e2319574121.
- [ 13 ] Sun C, Wang J, Xia T, *et al.* Mitochondrion-targeted NIR therapeutic agent suppresses melanoma by inducing apoptosis and cell cycle arrest *via* E2F/Cyclin/CDK pathway[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(12): 1589.
- [ 14 ] Roberts E L, Greenwood J, Kapadia N, *et al.* CDK activity at the centrosome regulates the cell cycle[J]. *Cell Rep*, 2024, 43(4): 114066.
- [ 15 ] Drew Y, Zenke F T, Curtin N J. DNA damage response inhibitors in cancer therapy: lessons from the past, current status and future implications[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2025, 24(1): 19-39.
- [ 16 ] Boon N J, Oliveira R A, Körner P R, *et al.* DNA damage induces P53-independent apoptosis through ribosome stalling[J]. *Science*, 2024, 384(6697): 785-792.
- [ 17 ] Wang Z, Zhang X, Luo Y, *et al.* Therapeutic targeting of ARID1A-deficient cancer cells with RITA (Reactivating P53 and inducing tumor apoptosis) [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 375.
- [ 18 ] Yang S, Li A, Lv L, *et al.* Exosomal miRNA-146a-5p derived from senescent hepatocellular carcinoma cells promotes aging and inhibits aerobic glycolysis in liver cells *via* targeting IRF7[J]. *J Cancer*, 2024, 15(14): 4448-4466.
- [ 19 ] Caipa Garcia A L, Kucab J E, Al-Serori H, *et al.* Tissue organoid cultures metabolize dietary carcinogens proficiently and are effective models for DNA adduct formation[J]. *Chem Res Toxicol*, 2024, 37(2): 234-247.
- [ 20 ] Xu P, Sun D, Gao Y, *et al.* Germline mutations in a DNA repair pathway are associated with familial colorectal cancer[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(18): e148931.
- [ 21 ] Wei S J, Schell J R, Chocron E S, *et al.* Ketogenic diet induces P53-dependent cellular senescence in multiple organs[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(20): eado1463.
- [ 22 ] Fan C, Wang W, Yu Z, *et al.* M1 macrophage-derived exosomes promote intervertebral disc degeneration by enhancing nucleus pulposus cell senescence through LCN2/NF- $\kappa$ B signaling axis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 301.
- [ 23 ] Chang S, Ren D, Zhang L, *et al.* Therapeutic SHPRH-146aa encoded by circ-SHPRH dynamically upregulates P21 to inhibit CDKs in neuroblastoma[J]. *Cancer Lett*, 2024, 598: 217120.
- [ 24 ] Yoshimura T, Hirano Y, Hamada T, *et al.* Exercise suppresses head and neck squamous cell carcinoma growth *via* oncostatin M[J]. *Cancers (Basel)*, 2024, 16(6): 1187.
- [ 25 ] Khalifa A, Sheweita S A, Namatalla A, *et al.* Ruthenium (II) complex with 8-hydroxyquinoline exhibits antitumor activity in breast cancer cell lines[J]. *Cancers (Basel)*, 2025, 17(2): 195.
- [ 26 ] Doan C C, Le T L, Hon Q C, *et al.* Cytotoxic effects of the standardized extract from *Curcuma aromatica* Salisb. rhizomes *via* induction of mitochondria-mediated caspase-dependent apoptotic pathway and P21-mediated G0/G1 cell cycle arrest on human gastric cancer AGS cells[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2025, 88(6): 227-249.