

木犀草苷对 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制

陈建¹, 曾智锐¹, 雷珊¹, 薛燕², 陈腾祥¹, 王璐^{1*}

(1. 贵州医科大学基础医学院生理教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵阳市妇幼保健院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 目的 探究木犀草苷对 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其机制。方法 不同浓度(12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$)木犀草苷处理细胞后,采用 CCK-8、克隆形成、流式细胞术检测该成分对 MCF-7 细胞增殖、克隆形成、凋亡的影响。采用划痕和 Transwell 实验,检测 MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力。利用分子对接技术,预测木犀草苷与钙蛋白酶-2(Calpain-2)蛋白的结合能力。通过 Western blot 实验,检测木犀草苷对 MCF-7 细胞中 Calpain-2、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、细胞核增殖抗原蛋白(PCNA)、髓样细胞白血病蛋白-1(Mcl-1)、B 淋巴细胞瘤蛋白-2(Bcl-2)和 B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)表达的影响。结果 木犀草苷能抑制 MCF-7 细胞的增殖、克隆形成、迁移、侵袭,诱导细胞凋亡($P < 0.05$),与 Calpain-2 的活性口袋稳定结合,减少乳腺癌 MCF-7 细胞中 Calpain-2 蛋白、间充质标记蛋白 N-cadherin 和 Vimentin、细胞增殖相关蛋白 PCNA 及抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 Bcl-2 表达($P < 0.05$),增加上皮标记蛋白 E-cadherin 和促凋亡蛋白 Bax 表达($P < 0.05$)。结论 木犀草苷具有抑制乳腺癌 MCF-7 细胞生存能力、迁移、侵袭的作用,可能与其靶向抑制 Calpain-2 的蛋白表达有关。

关键词: 木犀草苷; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; Calpain-2

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0587-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.048

乳腺癌(breast carcinoma)是全世界女性面临的最普遍的恶性肿瘤^[1]。目前,诊断和治疗乳腺癌的技术手段有了很大的改善,使得早期乳腺癌患者的生存率大大提高,但是转移性乳腺癌患者的生存率仍然很低,导致其死亡率高的主要原因是肿瘤的转移和复发^[2]。因此,研发出抑制乳腺癌转移的药物对乳腺癌患者具有重要意义。近年来,中药及其活性提取物在抗乳腺癌中发挥着重要作用,其具有多途径、多靶点和毒副作用低等优点,有研究表明,多种中药成分对乳腺癌的生长、转移、复发和耐药性具有很好的抑制作用^[3]。

木犀草苷(cynaroside)又名木犀草素-7-O-葡萄糖苷(luteolin-7-O-glucoside),是一种广泛存在于忍冬科药用植物中的黄酮类化合物,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤以及心血管系统和神经系统保护等多种生物活性^[4]。研究发现,木犀草苷能显著抑制人白血病细胞系 K526 的增殖,且具有浓度依赖性^[5]。王婷婷等^[6]发现木犀草苷通过影响凋亡相关基因 cyclin D1、survivin、c-myc 和 p53 基因的表达,诱导细胞凋亡,改变人食管癌细胞 Ecol109 的细胞周期,从而抑制 Ecol109 细胞的生长。木犀草苷通过调控 MAPK 和 mTOR 信号通路抑制人宫颈癌细胞的增殖并促进其细胞凋亡^[7]。此外,木犀草苷还会影响肿瘤新生血管的形成,最

终使肿瘤细胞凋亡^[8]。因此,木犀草苷是一种具有抗肿瘤潜能的天然化合物。有研究表明,从决明子叶^[9]、鼠尾草^[10]和栝楼^[11]等多种植物中提取的木犀草苷成分对乳腺癌细胞的增殖有一定抑制作用,然而,木犀草苷对乳腺癌细胞的具体作用及其机制尚不明确,故本研究探索该成分对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力及其机制的影响,以期对乳腺癌新药研发提供新思路。

1 材料

1.1 细胞株 人乳腺癌 MCF-7 细胞株,购自中国科学院生物细胞库。

1.2 药物 木犀草苷对照品(纯度 98.67%,批号 HY-N0540),购自美国 MCE 公司,使用 DMSO 配制成 10 mmol/L 母液,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。使用时,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基将其稀释至不同浓度的工作液。

1.3 试剂 DMEM 细胞培养基(货号 C11995500BT),购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 货号 B1500),购自以色列 Bioind 公司;0.25% 胰酶(货号 325-043-EL),购自维森特生物技术(南京)有限公司;二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO, 货号 D2650),购自美国 Sigma 公司;细胞增殖与毒性检测试剂(cell counting kit-8, CCK8, 货号 MA0218),购自大连美伦生物技术有限

收稿日期: 2020-11-22

基金项目: 贵州省科学技术厅(黔科合 LH 字[2016]7351)

作者简介: 陈建(1996—),女,硕士生,从事药物抗肿瘤机制的基础研究。E-mail: 2084845131@qq.com

*通信作者: 王璐(1987—),女,博士,副教授,从事乳腺癌微环境对乳腺癌发生发展的影响研究。E-mail: wanglulemon@163.com

网络出版日期: 2021-08-17

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210817.1052.004.html>

公司；一次性细胞嵌入皿 24 孔 8 μm (货号 TCS003024)，购自广州洁特生物过滤股份有限公司；无 EDTA 胰蛋白酶消化液 (货号 T1350)、高效蛋白裂解液 (货号 P0013B)、蛋白酶抑制剂 PMSF (货号 ST505)、BCA 定量试剂盒 (货号 PC0020)、制胶试剂丙烯酰胺 (29 : 1, 30% 溶液) (货号 BL513B)、10% SDS 溶液 (货号 S1010)、APS、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8, 货号 T1020)，均购自北京索莱宝科技有限公司；PVDF 膜 (批号 ISEQ00010)，购自美国 Millipore 公司；单克隆抗体 N-cadherin (货号 66219-1-Ig)、E-cadherin (货号 60335-1-Ig)、Vimentin (货号 60330-1-Ig) 和 Bcl-2 (货号 60178-1-Ig)，均购自武汉三鹰生物技术有限公司；单克隆抗体 PCNA (货号 GB11010)，购自武汉塞维尔生物科技有限公司；多克隆抗体 Bax (货号 YT0459)、单克隆抗体 β -actin (货号 AP0060)，购自安诺伦 (北京) 生物科技有限公司；山羊抗兔 (货号 AS014)、山羊抗鼠二抗 (货号 AS003)，购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；ECL 超敏曝光液 (货号 36222ES60)，购自武汉聚能慧达生物有限公司；AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号 40302ES50)，购自上海翊圣生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 MCF-7 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)，待细胞汇合至 90% 以上时胰酶消化传代，取生长状态良好的细胞用于后续实验。

2.2 CCK-8 实验检测细胞活力 胰酶消化 MCF-7 细胞后离心，用含 10% FBS 的培养基重悬制成细胞悬液，按照每孔 3×10^3 个细胞的密度进行计数，铺于 96 孔板上，每个浓度重复 6 次，继续培养 24 h，分别用 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷溶液处理，以加入等体积 DMSO 的 DMEM 培养液 (即 0 $\mu\text{mol/L}$) 为对照组，加药后培养 48 h，每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基，放入培养箱中反应 2 h，采用酶标仪检测在 450 nm 波长处各孔光密度 (OD) 值。以 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照孔，只含 CCK-8 的 DMEM 培养基孔为调零孔，计算存活率，存活率 = [(给药组 OD 值 - 调零孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 调零孔 OD 值)] $\times 100\%$ 。

2.3 克隆形成实验检测细胞存活情况 胰酶消化 MCF-7 细胞后离心，加入含血清培养基制成细胞悬液，血球计数板计数后按照每皿 500 个细胞的密度接种于 6 cm 的小皿中。继续培养 5 d 后，分别用 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的木犀草苷溶液处理细胞，以加入等体积 DMSO 的 DMEM 培养液 (即 0 $\mu\text{mol/L}$) 为对照组，加药处理后继续培养。在第 10 天时吸出培养基，4% 多聚甲醛溶液固定 30 min，吸出固定液后，0.1% 结晶紫溶液染色 1 h (均在室温下进行)，双蒸水将多余结晶紫洗净，将小皿放入烘箱内烘干，拍照后计算克隆形成数。

2.4 流式细胞术检测 MCF-7 细胞凋亡率 取生长状态良好的 MCF-7 细胞，以每孔 4×10^4 个的密度接种于 6 孔板中，培养 24 h 后分别加入 12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷溶液

处理细胞，以加入等体积的 DMSO (即 0 $\mu\text{mol/L}$) 为对照组，设置 3 组复孔，在培养箱中继续培养 48 h，不含 EDTA 的胰酶消化细胞，收集所有液体于离心管中，1 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 5 min，弃上清，PBS 洗涤，再离心 5 min，将细胞沉淀转入流式管中，每管加入 100 μL binding buffer 重悬细胞，再加入 5 μL FITC 染液、10 μL PI 染液，轻轻混匀，室温下染色 15 min，将流式管放在冰上保存，上流式细胞仪前再加入 400 μL binding buffer 液混匀，用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况，计算总凋亡率，总凋亡率 = 晚期凋亡率 (右上象限) + 早期凋亡率 (右下象限)。

2.5 划痕实验检测细胞迁移能力 MCF-7 细胞按照每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中，放入培养箱培养，待细胞密度达 95% 以上时，在单层细胞上用 200 μL 移液器枪头平行划 3 道痕，PBS 振荡漂洗 3 次，加入含不同浓度 (12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 木犀草苷的无血清 DMEM 培养液，对照组加入含等体积 DMSO 的无血清 DMEM 培养液 (即 0 $\mu\text{mol/L}$)。分别在划痕 0、48 h 后，给药组在倒置显微镜下随机选取 5 个视野进行拍照，划痕宽度在 Image Pro Plus 软件中测量，计算相对迁移率，相对迁移率 = [(给药组 0 h 划痕宽度 - 给药组 48 h 划痕宽度) / (对照组 0 h 划痕宽度 - 对照组 48 h 划痕宽度)] $\times 100\%$ 。

2.6 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力 按照 Matrigel 胶和无血清 DMEM 培养基为 1 : 8 比例混匀后，每个小室加 200 μL 稀释液，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中烘干 1 h，吸掉多余培养基，将 MCF-7 细胞重悬，计数后按每室 4×10^4 个细胞的密度取 200 μL 悬液滴于上室中，对应的 24 孔板下室每孔分别加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基，配制不同浓度 (12.5、25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 木犀草苷溶液各 800 μL ，对照组在有血清培养基中加入等体积 DMSO，36 h 后用 4% 多聚甲醛固定 Transwell 小室 30 min，将固定液吸出，加入 0.1% 结晶紫溶液染色 1 h，清洗干净后放入烘箱烘干，在显微镜下拍照，发现细胞染色较浅，故又用结晶紫复染 30 min，重复以上操作。每个浓度随机选取 5 个视野拍照计数。

2.7 计算机分子对接 从 Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) 数据库中下载 Calpain-2 蛋白晶体结构 (ID3BOW)，从 PubChem Compound 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>) 下载木犀草苷三级结构，将两者导入 SYBYL 软件，对蛋白晶体结构进行清除原结合分子、修复粘性末端、加氢处理后，以自动识别模式识别蛋白活性口袋，运用 DOCKING 功能对接木犀草苷与 Calpain-2 的活性口袋，根据结合打分判断分子与蛋白稳定结合的可能性，若在 4~5 分范围则可认为分子与蛋白能稳定结合^[12]。

2.8 Western blot 检测 Calpain-2、N-cadherin、Vimentin、Mcl-1、PCNA、E-cadherin、Bcl-2、Bax 蛋白表达 用不同浓度 (12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 木犀草苷溶液处理 MCF-7 细胞 48 h 后，吸出培养基，PBS 洗 2 次，加入预冷的含

2% PMSF 蛋白酶抑制剂的强效裂解液，在冰上裂解细胞 15 min，13 000 r/min 离心 30 min，吸取蛋白上清液，采用 BCA 法，以上样量 30 μg/10 μL 进行定量，30 μg 蛋白用 12% 分离胶在 80 V 恒定电压下电泳 30 min 后，转为 120 V 继续电泳 1.5 h，300 mA 恒流 2 h，将蛋白转至 PVDF 膜上，TBST 溶液新鲜配制 5% 牛奶室温封闭 2 h，将 PVDF 膜按照实验目的条带进行切膜并标记，加入稀释倍数为 1 : 1 000 的一抗 Calpain-2、N-cadherin、Vimentin、Mcl-1、PCNA、E-cadherin、Bcl-2、Bax、β-actin，在 4 °C 冰箱中孵育过夜，第 2 天用 TBST 溶液洗涤 3 次，每次 20 min，加入稀释倍数为 1 : 5 000 的二抗，在室温摇床中孵育 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 15 min，使用超敏 ECL 曝光液于多功能成像仪中进行曝光，通过成像仪自带的软件测量条带的灰度值后，以 β-actin 灰度值为内参，计算对应蛋白的相对表达。

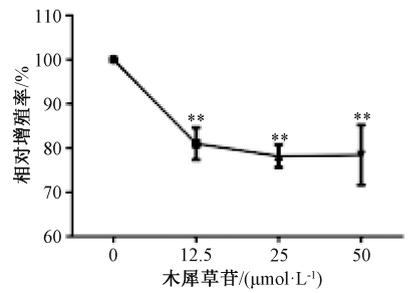
2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 6.01 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用多因素方差分析联合 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

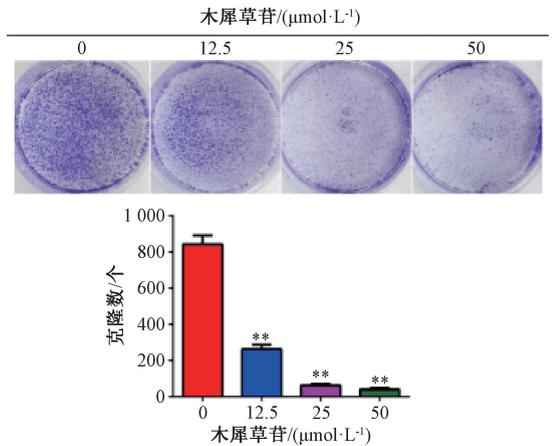
3.1 不同浓度木犀草苷对 MCF-7 细胞增殖的影响 如图 1 所示，与对照组 (0 μmol/L) 比较，给药组 MCF-7 细胞增殖率均降低 ($P < 0.05$)，提示木犀草苷能抑制细胞增殖。

3.2 木犀草苷对 MCF-7 细胞克隆形成的影响 如图 2 所示，与对照组 (0 μmol/L) 比较，给药组 MCF-7 细胞克隆形成数目均降低 ($P < 0.05$)，提示木犀草苷能抑制细胞克隆形成能力。

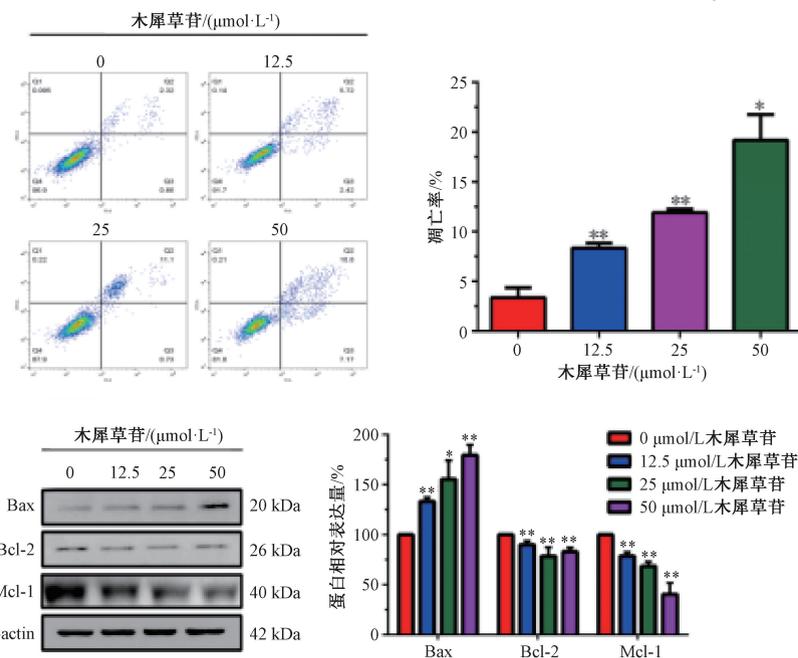
3.3 木犀草苷对 MCF-7 细胞凋亡的影响 如图 3 所示，12.5、25、50 μmol/L 木犀草苷溶液处理 48 h 后，MCF-7 细胞凋亡率分别为 (3.36 ± 0.58)%、(8.35 ± 0.29)%、



注：与对照组 (0 μmol/L) 比较，** $P < 0.01$ 。
图 1 不同浓度木犀草苷对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



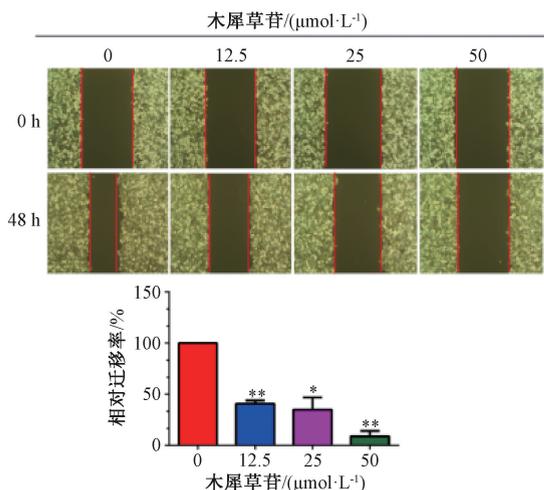
注：与对照组 (0 μmol/L) 比较，** $P < 0.01$ 。
图 2 木犀草苷对 MCF-7 克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) (11.91 ± 0.21)%、(19.18 ± 1.49)%；与对照组 0 μmol/L 比较，木犀草苷能使细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$)；木犀草苷可上调 Bax 蛋白表达，下调 Mcl-1、Bcl-2 蛋白表达，提示木犀草苷可诱导细胞的凋亡。



注：与对照组 (0 μmol/L) 比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 3 木犀草苷对 MCF-7 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

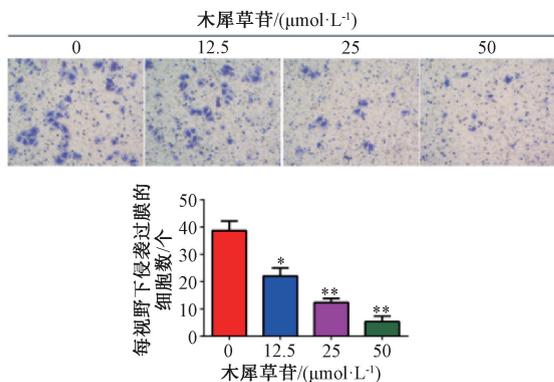
3.4 木犀草苷对 MCF-7 细胞迁移的影响 如图 4 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 给药组 MCF-7 细胞相对迁移率均降低 ($P < 0.05$), 提示木犀草苷能抑制细胞迁移。



注: 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 木犀草苷对 MCF-7 细胞迁移的影响 ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.5 木犀草苷对 MCF-7 细胞侵袭的影响 如图 5 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 给药组 MCF-7 细胞相对侵袭能力均减弱 ($P < 0.05$), 提示木犀草苷能抑制细胞侵袭。



注: 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 木犀草苷对 MCF-7 细胞侵袭的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6 木犀草苷与 Calpain-2 蛋白的分子对接 如图 6 所示, 木犀草苷能与 Calpain-2 活性口袋结合, 并被后者紧密包裹在内, 对接打分 (C-score) 为 5 分, 显示木犀草苷能稳定结合 Calpain-2 蛋白。

3.7 木犀草苷对 Calpain-2、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin、PCNA 蛋白表达的影响 如图 7 所示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 给药组 Calpain-2、N-cadherin、Vimentin、PCNA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 提示, 木犀草苷可能是通过靶向抑制 Calpain-2 表达来抑制 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭。

4 讨论

乳腺癌是一类发病机制复杂且尚不明确的恶性肿瘤,

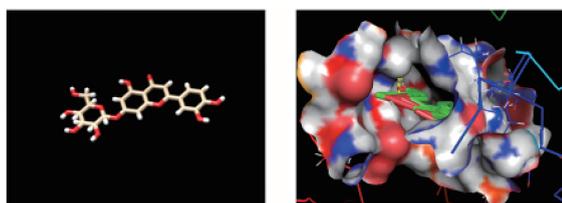
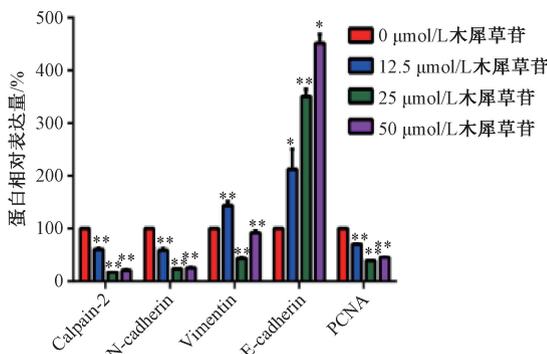
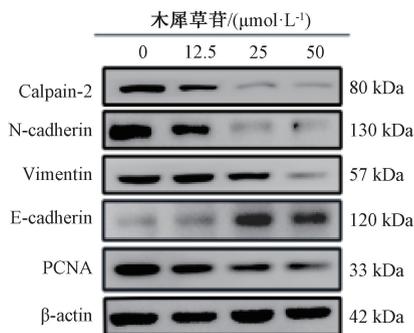


图 6 木犀草苷与 Calpain-2 蛋白的分子对接



注: 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 木犀草苷对 Calpain-2、N-cadherin、Vimentin、E-cadherin、PCNA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

由于其转移性高, 病死率呈逐年上升趋势, 并且越来越年轻化^[13]。目前, 乳腺癌的治疗主要采取手术、放化疗、内分泌药物及分子靶向药物等系统治疗方法, 这些方法虽然能够延长患者的生存期, 但因其毒副作用大以及预后较差, 患者复发转移率仍有 30% ~ 40%^[14]。因此, 深入探索乳腺癌的发病机制, 进一步寻找高效低毒抗乳腺癌的药物仍然是目前研究的热点。

近年来, 中药以其多途径、多靶点和毒副作用小等独特的优势受到了国内外众多研究者的重视, 目前已有大量关于中药及其有效成分抗乳腺癌的相关研究^[3]。黄恺飞等^[15]研究发现黄酮类化合物汉黄芩素通过降低 ICAM-1、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达, 从而抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖、迁移和侵袭。多酚类化合物姜黄素通过下调 MMP-9 的表达^[16]以及白藜芦醇通过逆转转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 诱导上皮细胞发生间质转化从而抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移^[17]。高欢等^[18]研究发现萜类化合物雷

公藤甲素通过激活 ERK1/2 而诱导 MCF-7 细胞发生自噬, 最终抑制其生长和增殖。生物碱类辣椒素以及其它类总丹参酮等中药有效成分均能影响 MCF-7 细胞的活力, 抑制其迁移和侵袭, 诱导细胞凋亡^[19-20]。

木犀草苷是一种存在于多种药用植物中的黄酮类化合物, 已有研究证明其具有显著的抗肿瘤作用。有研究表明, 从枯茗乙酸乙酯中提取出的木犀草苷成分, 具有很好的抗肿瘤活性, 能有效抑制乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 细胞增殖^[21]。Witkowska-Banaszczak 等^[22]从菊科植物当中分离出的木犀草苷单体化合物, 可通过抑制炎症因子 NF- κ B 在细胞核内的表达水平和 α -淀粉酶活性, 从而降低肝癌 HepG-2 细胞的存活率, 发挥抗癌作用。Velmurugan 等^[23]研究证明木犀草苷通过调节 MMP-2 的表达, 并抑制与细胞外信号传导相关的激酶的表达和活性, 从而抑制口腔癌细胞 FaDu 和 HSC-3 的迁移和侵袭。还有研究表明木犀草苷能引起非小细胞肺癌发生 G0/G1 期周期阻滞以及自噬的发生, 从而发挥抗癌作用^[24]。

Calpain-2 是 Calpains 家族的重要成员, 能促进肿瘤的发生和发展, 包括肿瘤细胞的存活、恶化和转移, 以及新生血管的形成^[25]。同时, Calpain-2 的水解底物, 如 paxillin、FAK、催乳素和 spectrin 等, 能促进细胞骨架重塑, 降低细胞粘附力, 增加 Calpain-2 的表达和活性, 最终增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力^[26-27]。本研究通过计算机分子对接技术发现木犀草苷可以稳定结合 Calpain-2 蛋白的活性口袋; 蛋白质免疫印迹结果进一步说明不同浓度的木犀草苷能够抑制 Calpain-2 的表达。

Bcl-2 蛋白家族包括促凋亡因子和抗凋亡因子, Parton 等^[28]研究发现抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达, 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 和细胞增殖蛋白 PCNA 的表达, 能促进乳腺癌的发生和发展。邱晓晓等^[29]运用血管紧张素转化酶抑制剂抑制 Calpain-2 的激活和蛋白表达, 从而降低 Bax 蛋白表达量, 增加 Bcl-2 的蛋白表达, 最终抑制糖尿病小鼠心肌细胞的凋亡。此外, Mcl-1 也是 Bcl-2 蛋白家族中重要的抗凋亡蛋白, 参与调控肿瘤细胞和正常组织细胞的存活^[30-31]。Young 等^[32]研究发现, 使用 Mcl-1 抑制剂能诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-468-2A 凋亡, 并抑制 MDA-MB-231-2A 的侵袭和肺转移, 从而抑制乳腺癌的远处转移, 增强对抗肿瘤药物达沙替尼的敏感性。Sapili 等^[33]研究发现, Calpain-2 的激活和蛋白表达上调能显著增加线粒体膜通透性, 诱导 Mcl-1 的表达上调, 使肿瘤细胞对抗癌药物的耐药性增加。本研究发现木犀草苷可能通过靶向抑制 Calpain-2, 使 Bcl-2 和 Mcl-1 的蛋白表达下调, Bax 蛋白的表达上调, 从而诱导乳腺癌细胞 MCF-7 发生凋亡。

上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是肿瘤细胞发生转移的重要过程, 其中 E-cadherin 属于上皮生物标记物, N-cadherin 和 Vimentin 属于间质生物标记物。Chen 等^[34]研究发现, 使用 Calpain-2 的抑制剂或沉默了 CAPN2 基因后, 能使 E-cadherin 的表达上调, 同时降低

N-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达, 抑制肿瘤细胞的上皮间质转化过程, 从而抑制乳腺细胞 MCF-10A 的侵袭和迁移。本研究发现木犀草苷能降低 Calpain-2 的蛋白表达, 同时促进 E-cadherin 的表达, 并下调 Vimentin 和 N-cadherin 的蛋白表达, 从而抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的迁移和侵袭。该结果预示, 木犀草苷可能成为一种有效的抑制乳腺癌转移的中药成分。

综上所述, 木犀草苷可能通过靶向调控 Calpain-2 从而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进乳腺癌细胞的凋亡, 有望成为一种治疗乳腺癌的有效活性成分。

参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] Shieh Y, Tice J A. Medications for primary prevention of breast cancer[J]. *J Am Med Assoc*, 2020, 324(3): 291-292.
- [3] 李云祥, 梁引库, 高飞雄, 等. 中药治疗乳腺癌疾病研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(3): 211-219.
- [4] 管仁伟, 曲永胜, 顾正位, 等. 木犀草苷的药理作用研究[J]. *中国野生植物资源*, 2014, 33(1): 1-3.
- [5] 韩宁宁, 叶文博. 木犀草素和木犀草苷对 K562 细胞增殖的影响[J]. *上海师范大学学报 (自然科学版)*, 2008, 37(6): 622-626.
- [6] 王婷婷, 王少康, 黄桂玲, 等. 木犀草素对人食管癌 Eca109 细胞生长抑制作用的研究 [C] //中国营养学会第十一次全国营养科学大会暨国际 DRIs 研讨会学术报告及论文摘要汇编 (下册) ——DRIs 新进展: 循证营养科学与实践学术. 杭州: 中国营养学会, 2013: 178.
- [7] Shao J L, Wang C X, Li L Q, et al. Luteoloside inhibits proliferation and promotes intrinsic and extrinsic pathway-mediated apoptosis involving MAPK and mTOR signaling pathways in human cervical cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1664.
- [8] 冯旭琴, 胡兴胜, 张磊. 木犀草素抗肿瘤作用研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2017, 38(3): 79-82.
- [9] Rejiya C S, Cibin T R, Abraham A. Leaves of *Cassia tora* as a novel cancer therapeutic—an *in vitro* study[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(6): 1034-1038.
- [10] Tundis R, Iacopetta D, Sinicropi M S, et al. Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp. *thomasi* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 106(Pt A): 155-164.
- [11] Minh C V, Nhiem N X, Yen H T, et al. Chemical constituents of *Trichosanthes kirilowii* and their cytotoxic activities [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(8): 1443-1448.
- [12] Li Y Z, Huang Y, Tu C S. Systems-pharmacology-based identification of antitumor necrosis factor effect in Mimeng flower decoction for the treatment of diabetic retinopathy [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 5107103.
- [13] 王晋慧, 吕邵娃, 李孟, 等. 中药有效成分体外抗乳腺癌

- 作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 197-203.
- [14] 苗贤媛, 郭秋生, 王晓稼. 乳腺癌非特异性免疫治疗研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(6): 685-690.
- [15] 黄恺飞, 庄 媛, 黄亦琦, 等. 汉黄芩素抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1485-1489.
- [16] 亓小改, 韩 翔, 郝娟芝, 等. 姜黄素抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2018, 25(17): 1211-1216.
- [17] Sun Y, Zhou Q M, Lu Y Y, *et al.* Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 11-31.
- [18] 高 欢, 曲晓宇, 张月明, 等. Erk 信号传导通路在雷公藤甲素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞自噬与凋亡中的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(9): 930-933.
- [19] 毛岸云, 陈茂剑, 覃庆洪, 等. 辣椒碱通过下调 SIRT1 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的迁移和侵袭[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 94-99.
- [20] 李虎业, 孔德元, 窦增花, 等. 总丹参酮通过线粒体途径诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的实验研究[J]. 中药材, 2019, 42(1): 184-188.
- [21] Goodarzi S, Tabatabaei M J, Mohammad J R, *et al.* *Cuminum cyminum* fruits as source of luteolin-7-O-glucoside, potent cytotoxic flavonoid against breast cancer cell lines[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(11): 1602-1606.
- [22] Witkowska-Banaszczak E, Krajka-Kuźniak V, Papierska K. The effect of luteolin 7-glucoside, apigenin 7-glucoside and *Succisa pratensis* extracts on NF- κ B activation and α -amylase activity in HepG2 cells[J]. *Acta Biochim Pol*, 2020, 67(1): 41-47.
- [23] Velmurugan B K, Lin J T, Mahalakshmi B, *et al.* Luteolin-7-O-glucoside inhibits oral cancer cell migration and invasion by regulating matrix metalloproteinase-2 expression and extracellular signal-regulated kinase pathway [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 502-517.
- [24] Zhou M L, Shen S Y, Zhao X, *et al.* Luteoloside induces G0/G1 arrest and pro-death autophagy through the ROS-mediated AKT/mTOR/p70S6K signalling pathway in human non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 494(1-2): 263-269.
- [25] Leloup L, Wells A. Calpains as potential anti-cancer targets[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(3): 309-323.
- [26] Chan K T, Bennin D A, Huttenlocher A. Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(15): 11418-11426.
- [27] Cortesio C L, Chan K T, Perrin B J, *et al.* Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion[J]. *J Cell Biol*, 2008, 180(5): 957-971.
- [28] Parton M, Dowsett M, Smith I. Studies of apoptosis in breast cancer[J]. *BMJ*, 2001, 322(7301): 1528-1532.
- [29] 邱晓晓, 李剑敏, 赵 竞, 等. ACEI 对 Calpain 介导的糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及心功能的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(4): 359-362; 388.
- [30] Perciavalle R M, Opferman J T. Delving deeper: Mcl-1's contributions to normal and cancer biology [J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(1): 22-29.
- [31] Xiang W, Yang C Y, Bai L. Mcl-1 inhibition in cancer treatment [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 10(11): 7301-7314.
- [32] Young A I J, Law A M K, Castillo L, *et al.* Mcl-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib[J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 125.
- [33] Sapili H, Ho C S, Malagobadan S, *et al.* Geranylated 4-phenylcoumarins extracted from *Mesua elegans* induced caspase-independent cell death in prostate cancer cell lines through Calpain-2 and cathepsin B [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 394-424.
- [34] Chen Y, Chen L, Hong D Y, *et al.* Baicalein inhibits fibronectin-induced epithelial-mesenchymal transition by decreasing activation and upregulation of Calpain-2 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 341-355.