

灯盏花乙素增强4T1乳腺癌细胞对顺铂敏感性的体内外研究

张琦, 包小波, 田冲冲

Effect of Scutellarin on Promoting the Sensitivity of Breast Cancer 4T1 Cells to Cisplatin *in Vitro* and *in Vivo*

ZHANG Qi, BAO Xiaobo, and TIAN Chongchong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023050219>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

飞燕草素联合3-MA增敏抗HER-2阳性乳腺癌细胞效应

Delphinidin sensitizes anti-tumor effect to HER-2+breast cancer cells by combining with 3-MA

食品工业科技. 2017(02): 354-357 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.060>

飞燕草素对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞糖酵解的影响

Effect of Delphinidin on Glycolysis in Triple-Negative Breast Cancer Cell MDA-MB-231

食品工业科技. 2020, 41(20): 79-84 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.20.013>

莪术醇长循环脂质体的制备及体外抗乳腺癌作用研究

Preparation and Anti-Breast Cancer Effect of Curcumol PEGylated Liposomes *in Vitro*

食品工业科技. 2020, 41(15): 297-301,309 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.046>

黑果枸杞花色苷pH和氨气敏感性及其抗氧化活性

The pH and Ammonia Sensitivity and Antioxidant Activity of Anthocyanins from *Lycium ruthenicum*

食品工业科技. 2021, 42(1): 22-27 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030182>

HPLC测定半枝莲中野黄芩苷、黄芩素、木犀草素和芹菜素的含量

Determination of scutellarin, baicalein, luteolin and apigenin in Herba Scutellariae barbatae by HPLC

食品工业科技. 2017(12): 21-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.12.004>

玻璃和不锈钢容器发酵水豆豉的乙醇提取物对结肠癌细胞的体外凋亡诱导效果比较

In vitro apoptosis inducing effects comparison of ethanol extracts of glass and stainless steel vessels fermented Shuidouchi in colon cancer cells

食品工业科技. 2017(10): 345-350 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.10.058>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

张琦, 包小波, 田冲冲. 灯盏花乙素增强 4T1 乳腺癌细胞对顺铂敏感性的体内外研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 331–340.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050219

ZHANG Qi, BAO Xiaobo, TIAN Chongchong. Effect of Scutellarin on Promoting the Sensitivity of Breast Cancer 4T1 Cells to Cisplatin *in Vitro* and *in Vivo*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 331–340. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050219

· 营养与保健 ·

灯盏花乙素增强 4T1 乳腺癌细胞对顺铂敏感性的体内外研究

张琦, 包小波, 田冲冲*

(江苏医药职业学院药学院, 江苏盐城 224005)

摘要: 本文旨在从体内外探究灯盏花乙素 (Scutellarin, SCU) 增强乳腺癌细胞 4T1 对顺铂 (Cisplatin, CDDP) 敏感性的作用及可能的分子机制。采用 CCK-8 实验、划痕实验、Transwell 实验及流式细胞术体外分别探究 SCU 联合 CDDP 对 4T1 细胞增殖、迁移侵袭以及凋亡的影响; 同时采用 BALB/c 小鼠皮下接种 4T1 细胞, 建立荷瘤小鼠模型, 在体观察 SCU 联合 CDDP 对肿瘤生长的作用; 采用 H&E 染色方法对肿瘤组织进行形态学、坏死面积及微血管密度观察; 分别采用实时荧光定量 PCR 与 Western Blot 检测肿瘤组织中凋亡因子转录水平及蛋白水平的表达。结果显示, SCU (200 $\mu\text{mol/L}$) 联合 CDDP (80 $\mu\text{mol/L}$) 可极显著抑制 4T1 细胞的增殖 ($P<0.01$); SCU (200 $\mu\text{mol/L}$) 联合 CDDP (80 $\mu\text{mol/L}$) 还能够极显著抑制 4T1 肿瘤细胞的迁移和侵袭能力 ($P<0.01$), 并且促进肿瘤细胞凋亡; 60 mg/kg SCU 联合 3.0 mg/kg CDDP 能够极显著抑制在体肿瘤 4T1 的生长 ($P<0.01$); 且极显著抑制肿瘤微血管密度 ($P<0.01$); 同时还能极显著促进肿瘤组织中促凋亡因子 Caspase-3、Bax、Caspase-9、Cleaved-Caspase-3 和 Cleaved-Caspase-9 的表达 ($P<0.01$), 显著抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达 ($P<0.05$)。综上所述, SCU 通过增强 4T1 细胞对 CDDP 的敏感性, 抑制肿瘤细胞功能且调控凋亡因子从而抑制肿瘤细胞的生长。

关键词: 灯盏花乙素, 乳腺癌, 顺铂, 敏感性

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)05-0331-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023050219



本文网刊:

Effect of Scutellarin on Promoting the Sensitivity of Breast Cancer 4T1 Cells to Cisplatin *in Vitro* and *in Vivo*

ZHANG Qi, BAO Xiaobo, TIAN Chongchong*

(Department of Pharmacy, Jiangsu Vocational College of Medicine, Yancheng 224005, China)

Abstract: To detect the effect of scutellarin (SCU) on promoting the sensitivity of breast cancer 4T1 cells to cisplatin (CDDP), and the molecular mechanism as well. CCK-8, scratch assay, Transwell assay and flow cytometry were employed to investigate the effects of SCU combined with CDDP on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of 4T1 cells *in vitro*. Then, the 4T1 tumor-bearing mouse model was established to explore the effect of SCU combined with CDDP on tumor growth *in vivo*. The morphology, necrotic area and microvascular density of tumor tissues were observed by H&E staining. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western Blot were used to detect the mRNA and proteins expression of apoptosis factors in tumor tissues. The results showed that SCU (200 $\mu\text{mol/L}$) combined with CDDP (80 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the *in vitro* proliferation of 4T1 cells ($P<0.01$). Moreover, the migration and invasion capacity of 4T1 cell were apparently reduced and the apoptosis of tumor cells were significantly promoted when treated with SCU (200 $\mu\text{mol/L}$)

收稿日期: 2023-05-18

基金项目: 盐城市卫健委医学科研项目 (YK2023032, YK2023097); 江苏医药职业学院自然科学基金研究重点项目 (20214107, 20214103); 江苏医药职业学院校本教育科学研究课题 (Y202212, Y202322); 江苏高校哲学社会科学研究一般项目资助 (2022SJYB2075); 江苏省高职院校青年教师企业实践计划 (2023QYSJ047)。

作者简介: 张琦 (1988-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 肿瘤和心血管分子药理学, E-mail: zhangqijyy@163.com。

* 通信作者: 田冲冲 (1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 肿瘤和心血管分子药理学, E-mail: 912969990@qq.com。

combined with CDDP (80 $\mu\text{mol/L}$) ($P<0.01$). Besides, the growth of 4T1 cells *in vivo* was remarkably slower after administration of 60 mg/kg SCU combined with 3.0 mg/kg CDDP ($P<0.01$). Further H&E semi-quantitative results revealed the microvascular density of 4T1 tumor tissues was significantly decreased ($P<0.01$). What's more, the combination of SCU and CDDP significantly promoted the expression of pro-apoptotic factors Caspase-3, Bax, Caspase-9, Cleaved-Caspase-3 and Cleaved-Caspase-9 ($P<0.01$) and inhibited the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 in tumor tissues ($P<0.05$). In conclusion, SCU combined with CDDP could inhibit the function of tumor cells by enhancing the sensitivity of 4T1 cells to CDDP, and also regulate the expression of apoptosis factors, thus inhibiting the growth of tumor.

Key words: scutellarin; breast cancer; cisplatin; sensitivity

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤^[1]。三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)及人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)均为阴性的一种特殊乳腺癌亚型,约占乳腺癌总数的15%^[2]。TNBC是乳腺癌治疗中最棘手一种,具有发病年龄早、恶性程度高、侵袭性强、复发率高、易发生肝脑器官转移等特点^[3]。TNBC患者的预后较差,如果患者在确诊时没有发生转移,其5年生存率可达65%~90%,但不幸的是,有约46%的患者会出现远处转移,而一旦发生转移,患者的中位生存期仅为13.3个月^[4-5]。由于其特殊的分子表型,TNBC对内分泌治疗和分子靶向治疗均不敏感,化疗仍然是TNBC的主要的系统治疗手段,但化疗效果却不尽如人意^[6-7]。顺铂(cisplatin, CDDP)是治疗TNBC的重要化疗药物。作为一种铂类烷化剂,CDDP通过与细胞的DNA结合,形成链内或链间交联,导致DNA双链断裂损伤,达到抗肿瘤作用^[8]。虽然CDDP对TNBC的治疗具有较好的疗效^[9-11],但是随着治疗时间延长,TNBC会对CDDP产生耐药性,导致疾病的进一步发展和预后不良^[12]。因此,提高机体对CDDP的化疗敏感性对TNBC的临床治疗具有重大意义。

灯盏花是中国传统中药材之一,除具备药用价值以外,其还被开发应用于食品如饮茶及化妆品领域^[13-15]。灯盏花乙素(scutellarin, SCU)是从灯盏花中提取的一种黄酮苷^[16]。研究指出,SCU具有重要而广泛的药理活性,包括抗炎^[17]、抗氧化^[18]、抗纤维化^[19]、抗凋亡^[20]和抗肿瘤^[21-22]等生物活性。此外,SCU还有一定的化疗增敏作用。比如姚侠等^[23]的研究表明SCU能通过下调三结构域蛋白(tripartite motif-containing protein 32, TRIM32)的表达增强卡铂的抗卵巢癌活性。Gao等^[24]也证实SCU能够以剂量依赖的方式增加前列腺癌细胞对CDDP的敏感性。但关于SCU联合CDDP在TNBC治疗方面,目前尚无报道。

因此,本研究采用乳腺癌细胞4T1为研究对象,体外探究SCU联合CDDP对4T1的直接作用,并且建立4T1荷瘤小鼠模型,体内观察两者联合用药对肿瘤生长的影响,从而探讨联合治疗抑制乳腺癌发生与发展的作用机制,为TNBC的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雌性BALB/c小鼠24只(体重 16 ± 2 g) 江苏华创信诺医药科技有限公司提供(动物许可证号:SCXK(苏)2020-0009)。饲养于江苏医药职业学院SPF级动物房(实验动物使用许可证:SYXK(苏)2018-0008)。饲养条件:温度 24.0 ± 1.0 ℃,相对湿度40%~70%,昼夜交替进行光照,自由饮水和进食。所有操作均符合动物伦理学要求和实验动物管理条例,本实验已通过江苏医药职业学院动物伦理委员会批准(编号2020011);4T1细胞株 中科院上海细胞库;胎牛血清、RPMI-1640培养基 美国Gibco公司;0.25%胰酶(1:250) Biosharp 生物科技公司;灯盏花乙素粉末 昆明龙津药业有限公司;顺铂 齐鲁制药(海南)有限公司;Martrigel 基质胶、Transwell 小室 Corning 公司;乌拉坦 上海山浦化工有限公司;肝素钠注射液 上海上药第一生化药业有限公司;多聚甲醛 天津科密欧化学试剂有限公司;Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒、PCR 引物 博士德生物工程有限公司;苏木素-伊红(H&E)染色液 Solarbio 公司;总RNA提取试剂 Trizol、RNA 逆转录合成cDNA 试剂盒 ThermoFisher 公司;PCR 试剂盒 Roche 公司; β -actin 抗体、Caspase-3 抗体、Bax 抗体、Caspase-9 抗体、Cleaved-Caspase-3 抗体、Cleaved-Caspase-9 抗体、Bcl-2 抗体 Abcam 公司。

HF90 细胞培养箱 上海力申仪器有限公司;医用超净工作台 江苏苏净集团有限公司;XD-202 倒置显微镜 德国 ZEISS 公司;游标卡尺 世达工具有限公司;ELX808 酶标仪 美国 BIOTEK 公司;TS-1000 脱色摇床 其林贝尔仪器制造有限公司;YB5001B 电子天平 上海衡际科学仪器有限公司;DY89-II 电动玻璃匀浆机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 4T1 细胞培养 将4T1细胞培养于含10%的胎牛血清的RPMI-1640培养基中,置于37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养。采用0.25%胰酶常规消化细胞并传代。

1.2.2 CCK-8 实验 参考Cao等^[25]的方法,取对数生长期的4T1细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种于

96 孔板中,每孔 100 μL ,置于培养箱中培养 24 h 后,分别加入不同浓度梯度的药物:CDDP(0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$)、SCU(0、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)以及联合用药组 CDDP+SCU(80 $\mu\text{mol/L}$ +200 $\mu\text{mol/L}$);同时设置空白对照组(无 4T1 细胞),每组 6 个复孔。48 h 后,向每孔中添加 CCK-8 溶液 10 μL ,孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(OD)值,计算细胞增殖率。上述实验单独重复 3 次。

1.2.3 细胞划痕实验评估细胞的迁移能力 参照张媛等^[26]的方法,取对数生长期的 4T1 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长密度达 80% 左右时用 100 μL 枪头在孔中划一条直线,PBS 冲洗后,分别加入 2 mL 不含血清的 RPMI-1640 培养基与 CDDP(80 $\mu\text{mol/L}$)组、SCU(200 $\mu\text{mol/L}$)组、联合用药组(CDDP+SCU)培养液,培养 24 h 后拍照,实验单独重复 3 次。

1.2.4 Transwell 实验评估细胞的侵袭能力 参考张媛等^[26]的实验方法并进行修改。将 Transwell 小室放入 24 孔板中,在小室的上室中加入 50 μL Matrigel 基质胶,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 5 h,待 Matrigel 基质胶凝固后,将收集到的 4T1 细胞用无血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞,按 2×10^5 个/孔的密度接种至 Transwell 上室中,并加入含 200 μL 无血清培养基。下室加入 600 μL 用完全培养基配制的不同浓度药物溶液(80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP, 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU, CDDP+SCU),于培养箱培养 48 h。取出上室,经无水酒精固定后,结晶紫染色,双蒸水冲洗后于显微镜下随机选取 5 个相同密度细胞的视野进行观察拍照,观察并计算各组细胞穿出膜的数量。每组设置 3 个复孔,实验单独重复 3 次。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 使用流式细胞术检测 SCU 联合 CDDP 对 4T1 细胞凋亡的影响。收集对数生长期的 4T1 细胞,0.25% 胰酶常规消化,1000 r/min 离心 5 min 去除上清,接种于 6 孔板中,培养 24 h 后使细胞汇合度达到 80% 左右,分别加入不同浓度的药物溶液进行干预。24 h 后分别收集 CDDP(80 $\mu\text{mol/L}$)组、SCU(200 $\mu\text{mol/L}$)组、联合用药组(CDDP+SCU)处理过的 4T1 细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,1500 \times g,5 min 离心去上清。加入预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞,4 $^{\circ}\text{C}$,1500 \times g,5 min 离心去上清,重复 2 次。利用双蒸水稀释 $5 \times$ Binding Buffer 为 $1 \times$ Binding Buffer,每管加入 500 μL 的 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞。每管加入 5 μL 的异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)及 10 μL 的碘化丙啶(Propidium Iodide, PI),轻柔混匀,室温避光孵育 10 min。最后,每管加入 400 μL 的 PBS 缓冲液稀释细胞,并于 1 h 内进行检测。

1.2.6 荷瘤小鼠模型的建立 参考 Pulaski 等^[27]的方法建立 4T1 荷瘤小鼠模型,即 4T1 细胞经胰酶消化后,用 RPMI-1640 培养基重悬并调整细胞浓度为

1×10^7 个/mL,接种于 BALB/c 小鼠股沟皮下,每只 0.1 mL(1×10^6 个细胞)。

1.2.7 实验动物分组及给药 BALB/c 小鼠皮下注射接种 4T1 细胞后,根据前期预实验结果确定给药浓度,并随机分为 4 组,每组 6 只:对照组(生理盐水)、60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组和 SCU+CDDP 组,接种后第 7 d 肿瘤开始长出,按上述分组腹腔注射相应剂量的药物,之后每 24 h 腹腔给药一次,共给药 11 次。

1.2.8 小鼠称重以及采集肿瘤组织样本 小鼠每天称重;待小鼠体内肿瘤长出后,用游标卡尺每隔 1 d 测量肿瘤长径(a)与短径(b),记录并计算小鼠肿瘤体积($V=1/2ab^2$)。待小鼠肿瘤最大直径约为 10 mm 时,20%(w/v)乌拉坦腹腔注射麻醉小鼠,用 1 mL 注射器抽取腹腔静脉血,剥离肿瘤组织,称重并拍照,将肿瘤组织投入到预先配好的 4%(w/v)多聚甲醛中固定。

1.2.9 肿瘤组织病理染色 将肿瘤组织固定在 4% 多聚甲醛中,将固定的肿瘤组织在分级乙醇溶液中脱水,二甲苯透明,浸入石蜡,包埋制成蜡块。将组织蜡块切成约 5 μm 厚的组织切片,用二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,苏木素浸泡 3 min,1% 盐酸乙醇分化,0.6% 氨水返蓝,纯水洗涤。滴加伊红染液约 3 min,在 95% 乙醇中梯度脱水,二甲苯清洗 10 min,中性树脂胶封片。置于光学显微镜下观察并采集图像。用 Image-Pro Plus 软件分析染色图片,计算各组肿瘤组织中的微血管密度(microvascular area, MVA)。

1.2.10 实时荧光定量 PCR 检测肿瘤组织中凋亡因子转录水平的表达 Trizol 分离提取肿瘤组织中总的 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,反应在 20 μL 体系中进行,反应体系:1 μL qPCR 引物,1 μL cDNA 产物,10 μL SYBR Green qPCR Master Mix(2 \times)。扩增条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,循环 40 次。溶解曲线 60~95 $^{\circ}\text{C}$,每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}\text{C}$ 。以 GAPDH 为内参基因,通过目的基因定量拷贝数= $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法分析数据。基因引物序列见表 1。

表 1 本研究中使用的引物序列

Table 1 Sequences of primers used in the present study		
基因	引物序列	产物长度(bp)
<i>Bcl-2</i>	上游: ATCTGGGCCACAAGTGAAGT	152
	下游: GCTGATTTCGAGGTTTTCCT	
<i>Bax</i>	上游: TCATGGGCTGGACATTGGAC	114
	下游: GAGACAGGGACATCAGTCGC	
<i>Caspase-3</i>	上游: AGCACCTGGTTACTATTCTGGAG	191
	下游: GGATCTGTTTCTTTGCGTGGA	
<i>Caspase-9</i>	上游: GTGTTCCAGGGAAGATCAGGG	106
	下游: GAGGAAGGGCAGAAGTTCACAT	
<i>GAPDH</i>	上游: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游: TGAGGTCAATGAAGGGTTCGT	

1.2.11 Western Blot 检测肿瘤组织中凋亡因子蛋白水平的表达 称取肿瘤组织 50 mg, 加入 RIPA 组织裂解液, 在电动玻璃匀浆机中研磨, 提取总蛋白, 整个提取过程置于冰上进行。用 BCA 试剂盒检测各组样品蛋白浓度。各取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电转印法进行转膜, 脱脂奶粉封闭, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入二抗继续室温孵育 1 h, ECL 显色并拍照。Image J 分析条带灰度值, 以目的条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值反映目的蛋白的表达。

1.3 数据处理

所有细胞实验重复 3 次, 结果以平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS 23.0 统计软件对数据进行统计和分析; 采用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 SCU 联合 CDDP 对 4T1 肿瘤细胞增殖的影响

首先在体外采用 CCK-8 实验考察单独使用 SCU、CDDP 以及 SCU 联合 CDDP 给药对 4T1 细胞的增殖抑制作用。当使用浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 处理细胞 48 h 后, 与空白对照组相比, 各组 4T1 细胞的相对增殖率分别为 91.14%、80.23%、65.33% 和 41.83%。其中, 当 CDDP 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4T1 的增殖率明显减少, 差异具有显著意义 ($P < 0.05$); 增大浓度到 80 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4T1 的增殖率进一步降低, 与空白对照组相比, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$) (图 1A)。当使用浓度为 25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 SCU 处理细胞后, 与空白对照组相比, 各组 4T1 细胞的相对增殖率分别为 92.67%、88.12%、78.16% 和 62.50%。其中, 当 SCU 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4T1 的增殖率明显减少, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 增大浓度到 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4T1 的增殖率进一步降低, 与空白对照组相比, 差异具有极显著意义 ($P < 0.01$) (图 1B)。基于上述实验结果, 选择 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU 与 80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 联合 (SCU+CDDP) 作用于 4T1 细胞并观察其对细胞增殖的影响。实验结果如下: 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU、80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 以及 SCU+CDDP 对细胞的相对增殖率分别为 60.12%、58.23% 和 26.63%, 与空白对照组相比, 各组均具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。其中, 与 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU 及 80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 相比, SCU+CDDP 对 4T1 的抑制作用更为明显, 差异具极显著意义 ($P < 0.01$) (图 1C)。上述结果表明加入 SCU 联合用药后能够增强 CDDP 对 4T1 细胞的增殖抑制作用。

基于抗增殖实验的结果, 选择 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU、80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 以及 SCU+CDDP 进行后续的迁移与侵袭实验。

2.2 SCU 联合 CDDP 对 4T1 肿瘤细胞迁移和侵袭能力的影响

通过细胞划痕实验检测各组药物对 4T1 细胞迁

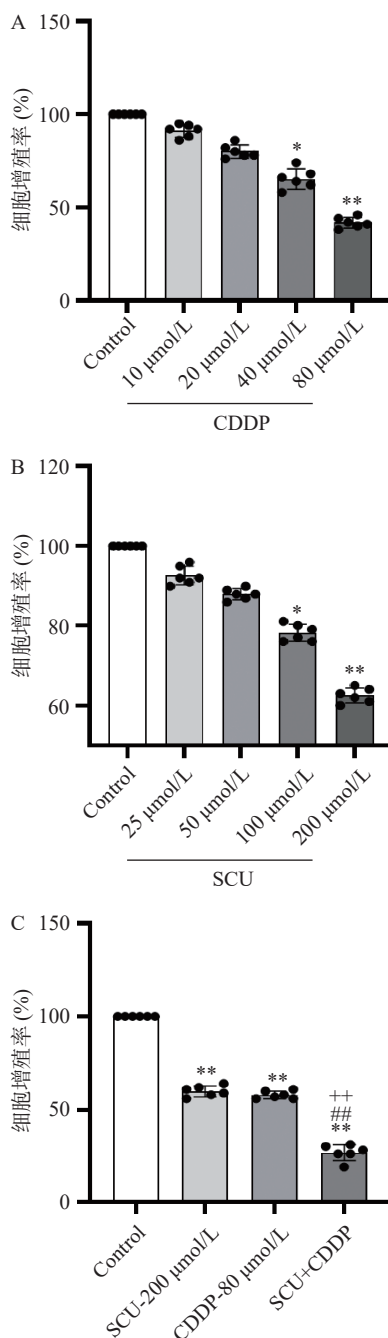


图 1 CDDP、SCU 及 SCU 联合 CDDP 对 4T1 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of CDDP, SCU and CDDP+SCU on the proliferation of 4T1 cells

注: 与空白对照组比, *表示差异显著 ($P < 0.05$), **表示差异极显著 ($P < 0.01$); 与 SCU 组相比, #表示差异显著 ($P < 0.05$), ##表示差异极显著 ($P < 0.01$); 与 CDDP 组相比, +表示差异显著 ($P < 0.05$), ++表示差异极显著 ($P < 0.01$); 图 2~图 9 同。

移能力影响, 结果如图 2 所示, 相比于空白对照组, 200 $\mu\text{mol/L}$ SCU 组与 80 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 组 4T1 细胞迁移能力均下降, 且结果具有极显著性差异 ($P < 0.01$), SCU 单药组细胞划痕面积愈合率为 $51.21\% \pm 4.32\%$, CDDP 单药组细胞划痕面积愈合率为 $40.33\% \pm 4.38\%$, 并伴随少量细胞的脱落坏死, 细胞向中线迁移减慢; 而 SCU+CDDP 联合用药组细胞迁移能力明显减弱, 细胞划痕面积愈合率为 $21.78\% \pm 4.18\%$, 几

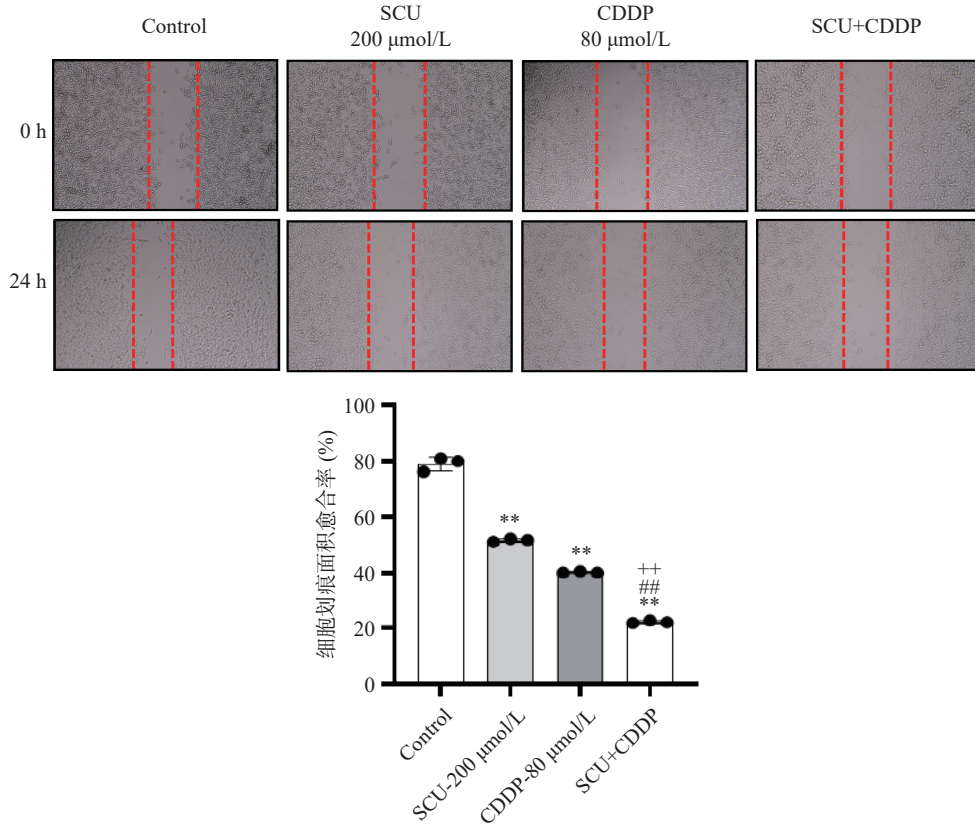


图 2 CDDP、SCU 及 SCU 联合 CDDP 对 4T1 肿瘤细胞迁移的影响

Fig.2 Effect of CDDP, SCU and SCU+CDDP on the migration capacity of 4T1 cells

乎未见细胞向中线迁移,表明 SCU 联合 CDDP 能更有效抑制乳腺癌 4T1 细胞的迁移能力,与空白对照组以及 SCU 和 CDDP 单用组相比,差异具有极显著意义($P<0.01$)。

本研究又进行了 Transwell 实验,检测各组药物作用于 4T1 细胞 48 h 后对肿瘤细胞侵袭能力的影响。如图 3 所示,与空白对照组相比,200 μmol/L SCU 组与 80 μmol/L CDDP 组穿过小室膜细胞数均极显著减少($P<0.01$),表明 4T1 细胞侵袭能力减弱;SCU 与 CDDP 联合用药组穿过小室膜细胞数减少更为显著,作用更明显,表明联合用药对 4T1 细胞的

侵袭能力抑制作用最强,加入 SCU 后能够增强 CDDP 对乳腺癌 4T1 细胞的抑制作用,差异具有极显著意义($P<0.01$)。

2.3 SCU 联合 CDDP 对 4T1 肿瘤细胞凋亡的影响

为了进一步考察 SCU 对 CDDP 抗肿瘤增敏作用,采用流式细胞术检测两药单用和联合对 4T1 肿瘤细胞凋亡的影响。检测结果如图 4 所示,与空白对照组相比,SCU 组、CDDP 组凋亡率增加,分别为 32.26%、47.87%,差异具有极显著性意义($P<0.01$);而 SCU+CDDP 联合用药组凋亡率更高,凋亡率为 71.53%,与单用 SCU 或 CDDP 组相比,差异具有极

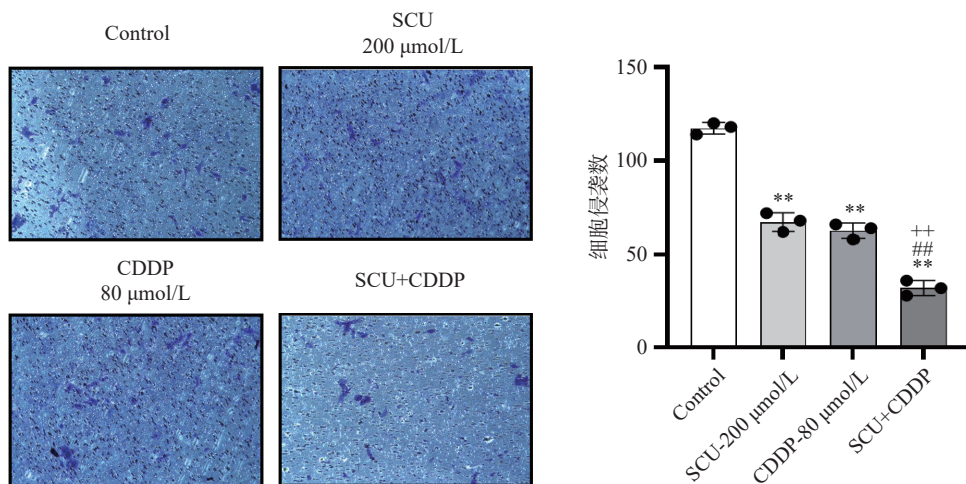


图 3 CDDP、SCU 及 SCU 联合 CDDP 对 4T1 肿瘤细胞侵袭的影响

Fig.3 Effect of CDDP, SCU and SCU+CDDP on the invasion capacity of 4T1 cells

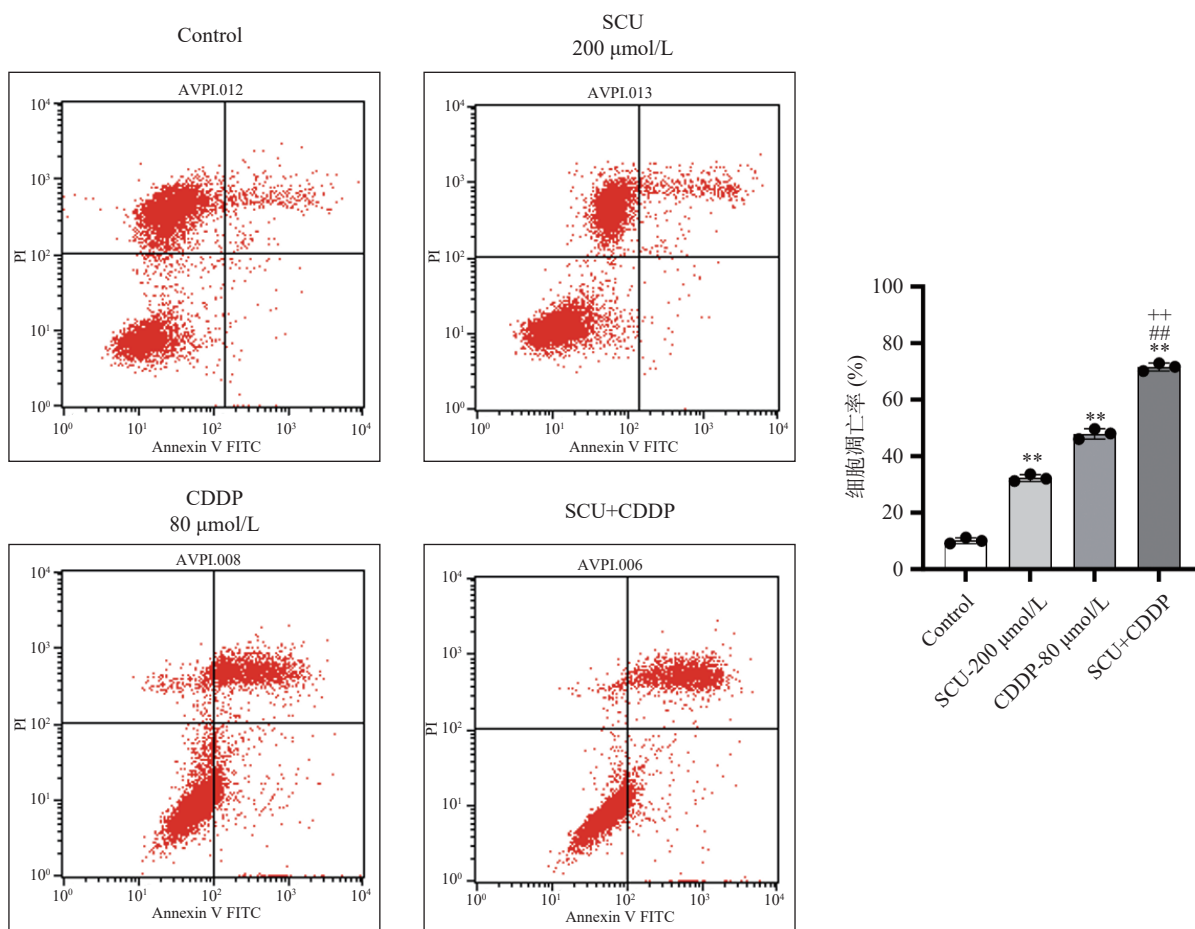


图4 CDDP、SCU及SCU联合CDDP对4T1肿瘤细胞凋亡的影响
Fig.4 Effect of CDDP, SCU and SCU+CDDP on apoptosis of 4T1 cells

显著性($P<0.01$),提示SCU能增强CDDP对乳腺癌4T1细胞的凋亡诱导作用。

2.4 SCU联合CDDP对4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

为了进一步验证SCU对CDDP抗4T1肿瘤细胞的增敏作用,接下来,在体内水平考察了SCU联合CDDP对4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的作用。结果如图5所示,在接种肿瘤17d后,与空白对照组相比,60 mg/kg SCU组、3.0 mg/kg CDDP组肿瘤平均体积分别减少了31.9%和36.6%,差异具有极显著意义($P<0.01$)。而SCU+CDDP联合用药组肿瘤平均体积减少的更多,减少了49.7%,与SCU组及CDDP组比较差异具有显著意义($P<0.05$),提示两药联合应用能够显著抑制4T1细胞体内的生长作用。同时,整个给药期间,各给药组均未引起小鼠体重明显的下降(图5A)。提示SCU联合CDDP在抑制4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的同时并未引起明显的毒性。

实验结束后处死小鼠并剥离肿瘤组织称重,如图6所示,空白对照组、60 mg/kg SCU组、3.0 mg/kg CDDP组以及SCU+CDDP给药组的瘤重分别为 1.17 ± 0.21 、 0.42 ± 0.13 、 0.34 ± 0.24 和 0.16 ± 0.15 g。与空白对照组相比,60 mg/kg SCU组、3.0 mg/kg CDDP组瘤重分别减少64.2%与70.5%,具有极显著性差异($P<0.01$);SCU+CDDP组瘤重减少86.2%,具有极

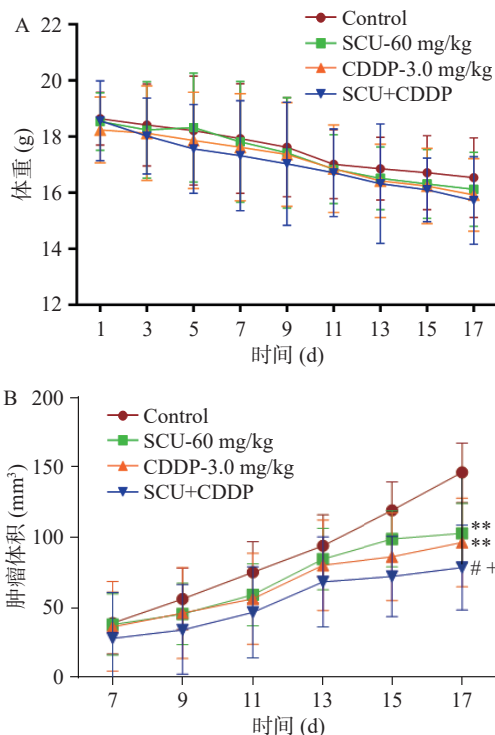


图5 SCU联合CDDP对B16荷瘤小鼠肿瘤体积和体重的影响

Fig.5 Effect of SCU+CDDP on tumor volume and weight of 4T1-bearing mice

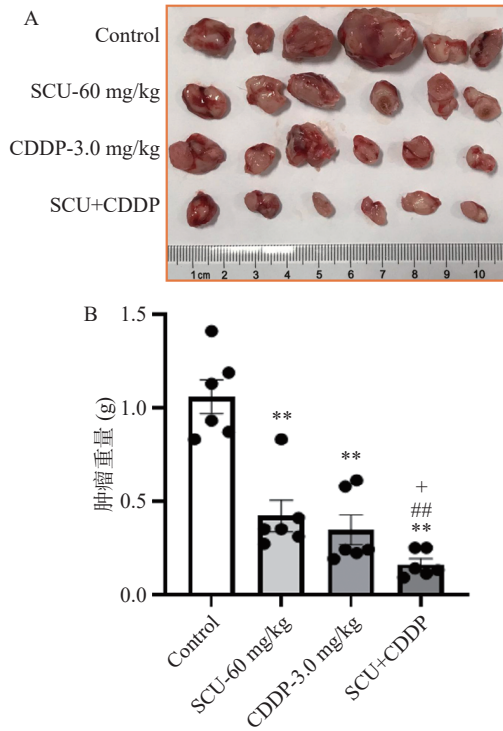


图 6 SCU 联合 CDDP 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响
Fig.6 Effect of the combination of SCU and CDDP on the growth of 4T1 tumor from mice

显著性差异($P<0.01$)。由以上结果可知, SCU 能够增强 CDDP 对 4T1 在体肿瘤的抑制作用。

2.5 SCU 联合 CDDP 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤细胞形态、肿瘤组织坏死的影响

接下来, 通过 H&E 染色观察 SCU 联合 CDDP 对肿瘤细胞形态和肿瘤组织坏死的影响。首先观察肿瘤异型性, 结果如图 7 所示: 各组肿瘤细胞排列紊乱, 层次多, 失去方向性; 肿瘤细胞大小不一, 形态各异, 细胞核大小、形态及染色不一, 核质比例失调, 病理性核分裂多见, 呈不对称性、多极性分裂, 肿瘤异型性高。

观察肿瘤组织坏死及肿瘤间质情况, 对照组肿瘤组织核深染色, 肿瘤细胞密度减少, 可见核固缩、破碎, 胞浆外溢, 可见片状坏死区域及大量微血管; 60 mg/kg SCU 组及 3.0 mg/kg CDDP 组肿瘤组织核深染, 少见凋亡形态学改变, 少见核固缩及部分微血管; 而 SCU 联合 CDDP 组肿瘤组织核深染, 少见凋亡形态学改变, 少见核固缩并且几乎无血管。对各组血管密度进行分析, 可知 SCU 联合 CDDP 能够抑制肿瘤微血管的形成, 从而抑制在体肿瘤 4T1 的生长 ($P<0.01$)。

2.6 SCU 联合 CDDP 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡因子表达的影响

Bcl 家族是重要的凋亡相关基因, 在恶性肿瘤发生发展中扮演着重要的角色, 其中 *Bcl-2* 是阻止细胞凋亡的相关基因, 而 *Bax* 是促进细胞凋亡的相关基因^[28-29]。Caspase 家族是一组半胱氨酸蛋白酶, 在介导细胞凋亡过程中起到重要作用, 其中以 Caspase-3 与 Caspase-9 最为关键, 其激活是细胞凋亡的特异性标志^[30-31]。为进一步探讨 SCU 联合 CDDP 抑制 4T1 在体肿瘤发生及生长的可能机制, 本文采用实时荧光定量 PCR 法检测肿瘤组织中凋亡相关因子的表达, 进一步探讨 SCU 联合 CDDP 对肿瘤细胞凋亡的影响。

通过实时荧光定量 PCR 法检测各给药组对 4T1 肿瘤组织中细胞线粒体凋亡通路因子的表达变化。结果如图 8 所示, 与空白对照组相比, 60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组及 SCU+CDDP 组肿瘤组织中的 *Caspase-3* 与 *Caspase-9* 表达均上调, 其中 *Caspase-3* 分别增加 35.5%、57% 及 121%, 具有极显著性差异 ($P<0.01$), 而 *Caspase-9* 分别增加 42.3%、75.8% 及 129.5%, 具有极显著性差异 ($P<0.01$)。与 SCU 或 CDDP 单用组相比, 联合组(SCU+CDDP) *Caspase-3* 和 *Caspase-9* mRNA 表达水平明显增加, 差异具极显著性 ($P<0.01$)。

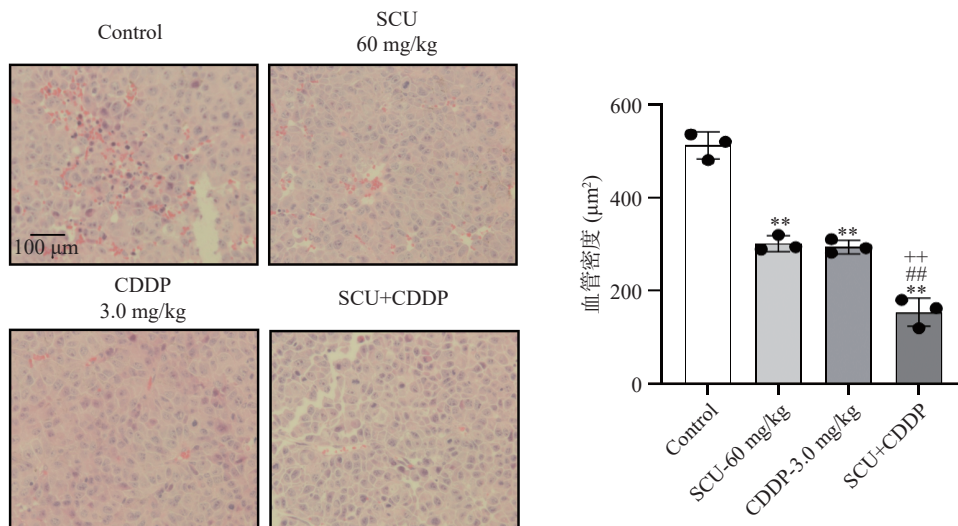


图 7 SCU 联合 CDDP 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤血管密度的影响

Fig.7 Effect of the combination of SCU and CDDP on the micro-vessel density in 4T1 tumor tissue

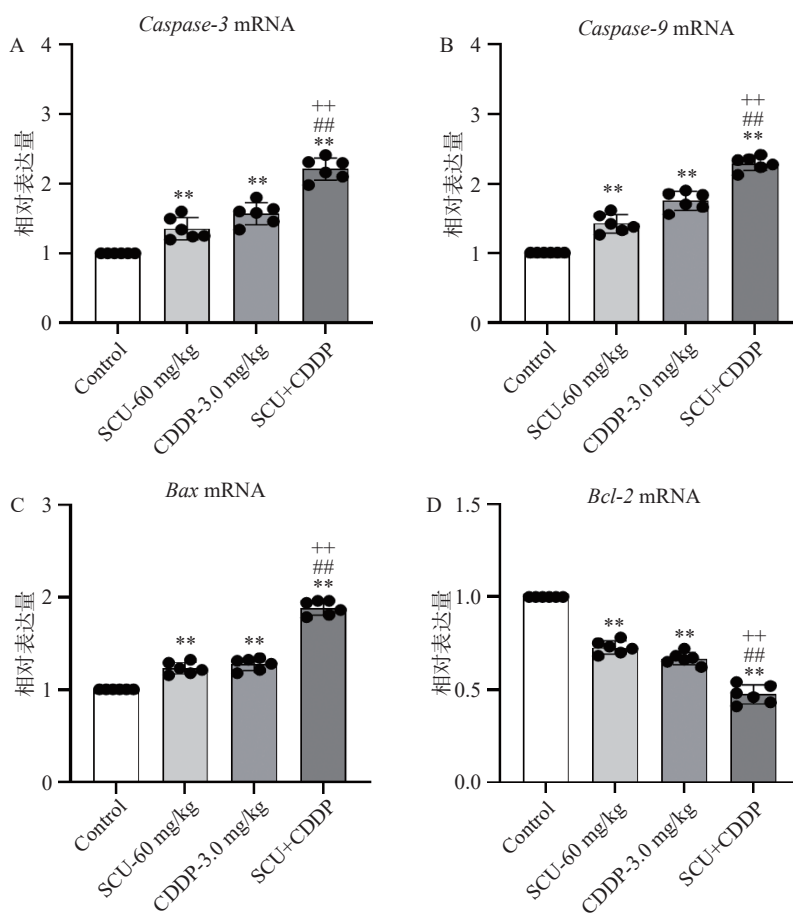


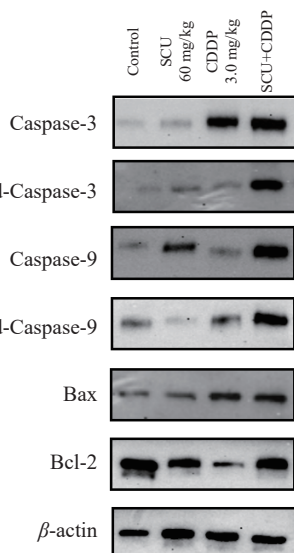
图8 SCU联合CDDP对4T1荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡因子 mRNA 水平的影响

Fig.8 Effect of the combination of SCU and CDDP on the mRNA levels of apoptotic factors in 4T1 tumor tissue

与此同时, 60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组及 SCU+CDDP 组肿瘤组织中的 *Bax* 表达也较空白对照组明显上调, 分别增加 23.2%、27.3% 及 88.5%, 差异具有极显著性意义 ($P < 0.01$)。且与 SCU 或 CDDP 单药组相比, SCU+CDDP 联合组的 *Bax* 水平上调更明显, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$); 抗凋亡蛋白 *Bcl-2* 的 mRNA 表达则正好相反。与空白对照组相比, 60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组及 SCU+CDDP

组肿瘤组织中的 *Bcl-2* 表达均下调, 分别减少 27.3%、33.3% 及 52.7%, 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。且 SCU+CDDP 联合组的 *Bcl-2* 水平较 SCU 和 CDDP 单药组极显著下调 ($P < 0.01$)。

通过 Western Blot 在蛋白水平上考察各给药组对 4T1 肿瘤组织凋亡相关蛋白表达的影响。结果如图 9 所示, 与空白对照组相比, 60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组及 SCU+CDDP 组肿瘤组织中的



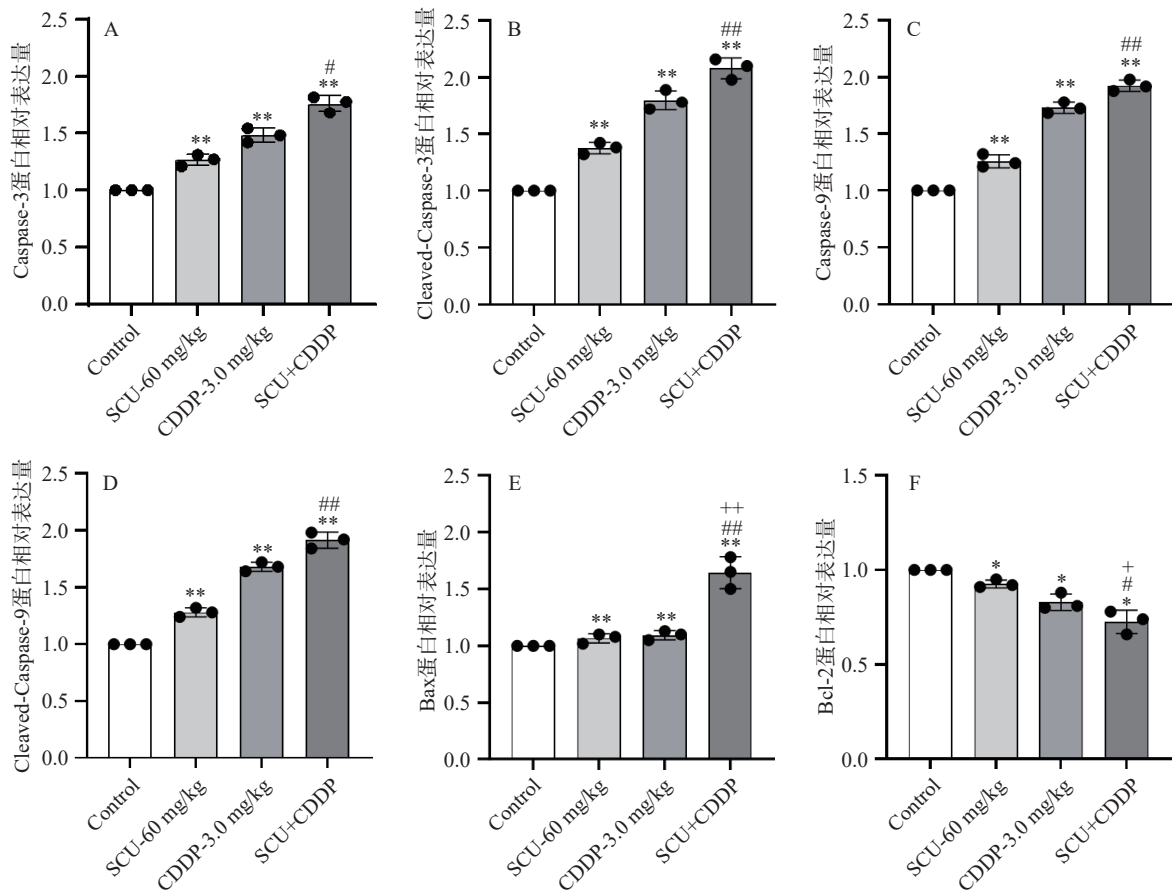


图 9 SCU 联合 CDDP 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡因子蛋白表达的影响

Fig.9 Effect of the combination of SCU and CDDP on the expression of apoptotic proteins in 4T1 tumor tissue

Caspase-3、Cleaved-Caspase-3、Cspase-9 以及 Cleaved-Caspase-9 蛋白表达均极显著上调 ($P < 0.01$)。其中, SCU+CDDP 联用组 Caspase-3 的表达较 SCU 单用组显著上调 ($P < 0.05$); Cleaved-Caspase-3、Cspase-9 以及 Cleaved-Caspase-9 蛋白表达均极显著上调 ($P < 0.01$)。与此同时, 60 mg/kg SCU 组、3.0 mg/kg CDDP 组及 SCU+CDDP 组肿瘤组织中的凋亡蛋白 Bax 的表达也较空白对照组极显著上调 ($P < 0.01$), 且联用组较 CDDP 单用组 Bax 的上调更明显, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。60 mg/kg SCU、3.0 mg/kg CDDP 及 SCU+CDDP 处理均导致抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调 ($P < 0.05$), 且联用组较 SCU 或 CDDP 单用组下调更明显, 差异具显著意义 ($P < 0.05$)。

以上结果证实了 SCU 联合 CDDP 可通过降低肿瘤细胞线粒体通路凋亡因子 Bcl-2/Bax 比例进而促进肿瘤细胞凋亡, 由此有可能进一步影响到肿瘤的发生和生长的过程。

3 结论

本实验对 SCU 联合 CDDP 的抗乳腺癌作用进行了体内外探究, 通过体外细胞实验发现, SCU 联合 CDDP 对乳腺癌的抑制作用明显优于单药。CCK-8 实验证实与单独使用 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 SCU 及 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 相比, 两者联合可显著抑制 4T1 细胞的增殖 ($P < 0.01$); 细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验也

进一步证实 SCU 与 CDDP 联合用药组较空白对照组和单药组能极显著抑制 4T1 细胞的迁移和侵袭能力 ($P < 0.01$); 流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示, 与对照组和单药组相比, 联合用药组的 4T1 细胞凋亡率最高。

体内移植瘤实验结果表明, SCU 联合 CDDP 用药可明显抑制 4T1 肿瘤生长, 与空白对照组相比, 60 mg/kg SCU 组与 3.0 mg/kg CDDP 组瘤重分别减少 64.2% 与 70.5%, SCU 联合 CDDP 组瘤重减少 86.2%。同时 SCU 联合 CDDP 组还可显著降低肿瘤组织的微血管密度 ($P < 0.01$), 证实 SCU 在体内水平也具有抗乳腺癌的作用。通过实时荧光定量 PCR 法以及 Western Blot 法检测肿瘤组织中凋亡相关因子的基因及蛋白表达发现, SCU 及 CDDP 单药组作用后, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平均下调, 而促凋亡蛋白 Bax 水平明显上调, Caspase-3 及 Caspase-9 表达水平均增高, 这一结果在 SCU 联合 CDDP 用药组更为显著, 提示 SCU 能够促进 CDDP 乳腺癌 4T1 细胞凋亡诱导作用。

综上所述, 本研究表明 SCU 体内外均具有抑制 4T1 肿瘤的生长作用, 这一作用不仅与其体外直接抑制肿瘤细胞增殖、迁移侵袭能力及促进细胞凋亡有关, 也与其抑制肿瘤微血管密度、激活凋亡因子通路促进细胞凋亡密切相关。本次研究仅仅是从体内

外实验的角度初步研究了 SCU 对 4T1 肿瘤生长的抑制作用, 后续还需要对具体的作用机制进行更为深入的研究和验证, 以便全面、准确地掌握 SCU 的药理作用规律, 提高肿瘤治疗效果并减少不良反应。

参考文献

- [1] SHIEN T, IWATA H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2020, 50(3): 225-229.
- [2] LEE J S, YOST S E, YUAN Y. Neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer: Recent progresses and challenges[J]. *Cancers*, 2020, 12(6): 1404.
- [3] 于红, 张龙梅. 正元胶囊联合新辅助化疗治疗三阴性乳腺癌临床观察[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(5): 129-132.
- [YU H, ZHANG L M. Clinical observation on Zhengyuan capsule combined with neoadjuvant chemotherapy in the treatment of triple negative breast cancer[J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2023, 21(5): 129-132.]
- [4] BAI X, NI J, BERETOV J, et al. Triple-negative breast cancer therapeutic resistance: Where is the Achilles' heel?[J]. *Cancer Letters*, 2021, 497: 100-111.
- [5] ZHANG R, YANG Y, DONG W, et al. D-mannose facilitates immunotherapy and radiotherapy of triple-negative breast cancer via degradation of PD-L1[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2022, 119(8): e2114851119.
- [6] WON K A, SPRUCK C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives[J]. *International Journal of Oncology*, 2020, 57(6): 1245-1261.
- [7] YIN L, DUAN J J, BIAN X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. *Breast Cancer Research*, 2020, 22(1): 61.
- [8] 祁治, 潘海婷, 王秀梅. SCR7 对三阴性乳腺癌顺铂化疗的增敏作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2023, 48(2): 220-225. [QI Y, PAN H T, WANG X M. Study on the sensitizing effect of SCR7 on cisplatin chemotherapy in triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2023, 48(2): 220-225.]
- [9] ECKSTEIN N. Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011, 30: 1-11.
- [10] CAMELO O, SILVA C, CAMELO F, et al. The effect of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in BRCA mutated triple negative breast cancers-systematic review and meta-analysis[J]. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2019, 17: 1-10.
- [11] TORRISI R, ZURADELLI M, AGOSTINETTO E, et al. Platinum salts in the treatment of BRCA-associated breast cancer: A true targeted chemotherapy[J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2019, 135: 66-75.
- [12] REDDY S M, BARCENAS C H, SINHA A K, et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity[J]. *British Journal of Cancer*, 2018, 118(1): 17-23.
- [13] 刘涛. 一种游戏茶饮及其制备方法: 云南, CN107006648A [P]. 2017-08-04. [LIU T. A kind of tea drink and its preparation method: Yunnan, CN107006648A [P]. 2017-08-04.]
- [14] 苟秀芹. 一种即食荆条豆干: 山东, CN201510999706.8 [P]. 2016-04-13. [GOU X Q. A kind of instant dried tofu with chopped chili: Shandong, CN201510999706.8 [P]. 2016-04-13.]
- [15] 钱卫萍. 一种抑菌牙膏: 江苏, CN201711204455.5 [P]. 2018-02-09. [QIAN W P. A kind of bacteriostatic toothpaste: Jiangsu, CN201711204455.5 [P]. 2018-02-09.]
- [16] DAI J, LI C, ZHAO L, et al. Scutellarin protects the kidney from ischemia/reperfusion injury by targeting Nrf2[J]. *Nephrology*, 2022, 27(8): 690-700.
- [17] PENG L, WEN L, SHI Q F, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κ B/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(11): 978.
- [18] ZENG S, CHEN L, SUN Q, et al. Scutellarin ameliorates colitis-associated colorectal cancer by suppressing Wnt/ β -catenin signaling cascade[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 906: 174253.
- [19] ZHANG G Y, CHEN W Y, LI X B, et al. Scutellarin-induced A549 cell apoptosis depends on activation of the transforming growth factor- β 1/smad2/ROS/caspase-3 pathway[J]. *Open Life Sciences*, 2021, 16(1): 961-968.
- [20] CHEN S, LI R, CHEN Y, et al. Scutellarin enhances anti-tumor immune responses by reducing TNFR2-expressing CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 151: 113187.
- [21] JU S H, TAN L R, LIU P W, et al. Scutellarin regulates osteoarthritis *in vitro* by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2021, 23(1): 1.
- [22] 田冲冲, 张琦, 包小波, 等. 灯盏花乙素对黑色素瘤 B16 体内外的作用及机制研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(17): 406-412. [TIAN C C, ZHANG Q, BAO X B, et al. Effect of scutellarin on melanoma B16 *in vitro* and *in vivo* and its mechanism[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(17): 406-412.]
- [23] 姚侠, 方杭, 金鑫. 灯盏花乙素通过下调 TRIM32 的表达增强卡铂的抗卵巢癌活性研究[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(3): 282-287. [YAO X, FANG H, JIN X. Scutellarin enhances carboplatin-induced cytotoxicity against ovarian cancer by decrease the expression of TRIM32[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2020, 37(3): 282-287.]
- [24] GAO C, ZHOU Y, JIANG Z, et al. Cytotoxic and chemosensitization effects of scutellarin from traditional Chinese herb *Scutellaria altissima* L. in human prostate cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2017, 8(3): 1491-1499.
- [25] CAO Y, FENG Y H, GAO L W, et al. Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 70: 110-116.
- [26] 张媛, 禹卓玥, 孙立新, 等. 卵巢癌组织 MEOX1 表达对细胞增殖和侵袭及迁移影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2020, 27(4): 262-268. [ZHANG Y, YU Z Y, SUN L X, et al. Expression of MEOX1 in ovarian cancer and its effect on the proliferation, invasion and migration[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2020, 27(4): 262-268.]
- [27] PULASKI B A, OSTRAND-ROSENBERG S. Mouse 4T1 breast tumor model[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2000, 39(1): 20.2. 1-20.2. 16.
- [28] CHANGIZI Z, MOSLEHI A, ROHANI A H, et al. Chlorogenic acid induces 4T1 breast cancer tumor's apoptosis via p53, Bax, Bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in BALB/c mice[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2021, 35(2): e22642.
- [29] DA SILVA LAWISCH G K, BIOLCHI V, et al. The role of FASL, BCL-2 and BAX polymorphisms in Brazilian patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(10): 9445-9451.
- [30] WANG H W, ZHAO W P, LIU J, et al. Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice[J]. *Chemosphere*, 2017, 186: 911-918.
- [31] WANG S, ZHANG Y, GAO J, et al. The enantioselective study of the toxicity effects of chiral acetochlor in HepG2 cells[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 218: 112261.