17-羟-岩大戟内酯B对人三阴性乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响Δ

龚　飞[1*]，吴思明[1]，徐　磊[2]，包亚男[1]，林　宇[1]，潘思文[1]，杨东兴[1]，韩翠翠[1#]（1.齐齐哈尔医学院药学院，黑龙江 齐齐哈尔　161006；2.齐齐哈尔市第一医院血管外科，黑龙江 齐齐哈尔　161006）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）12-1415-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.02

摘　要　目的　研究狼毒大戟活性成分17-羟-岩大戟内酯B（HJB）对人三阴性乳腺癌（TNBC）细胞MDA-MB-231、MDA-MB-468增殖及凋亡的影响。**方法**　用0（空白对照）、5、10、20、40、80 μmol/L的HJB分别处理MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞24、48、72 h，采用MTT法检测各组细胞的增殖抑制率。以0（空白对照）、10、20、40 μmol/L的HJB作用于上述2种细胞24 h后，采用激光共聚焦显微镜和流式细胞术检测细胞的凋亡情况和线粒体膜电位、活性氧水平的变化情况，并采用Western blot法检测B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、细胞色素C（Cyt-C）、胱天蛋白酶3（caspase-3）、活化的caspase-3（cleaved caspase-3）、caspase-9、cleaved caspase-9蛋白的表达水平。**结果**　与空白对照相比，5、10、20、40、80 μmol/L的HJB均可显著升高MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞的增殖抑制率（$P<0.05$），且有浓度和时间依赖趋势。10、20、40 μmol/L的HJB作用24 h后，2种细胞凋亡增多，总凋亡率均显著升高（$P<0.05$）；线粒体膜电位均显著降低（$P<0.05$）；活性氧水平均显著升高（$P<0.05$）；Bcl-2、caspase-3、caspase-9蛋白的表达均显著下调（$P<0.05$），Cyt-C、Bax、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9蛋白的表达均显著上调（$P<0.05$）。**结论**　HJB对MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞的增殖具有抑制作用，并可诱导其凋亡。

关键词　17-羟-岩大戟内酯B；三阴性乳腺癌；细胞凋亡；线粒体膜电位；活性氧

Study on the effects of 17-hydroxy-jolkinolide B on the proliferation and apoptosis of human triple-negative breast cancer cells

GONG Fei[1], WU Siming[1], XU Lei[2], BAO Yanan[1], LIN Yu[1], PAN Siwen[1], YANG Dongxing[1], HAN Cuicui[1]（1. College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2. Dept. of Vascular Surgery, the First Hospital of Qiqihar, Heilongjiang Qiqihar 161006, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of the active component 17-hydroxy-jolkinolide B (HJB) of *Euphorbia fischeriana* on the proliferation and apoptosis of human triple-negative breast cancers (TNBC) MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells. **METHODS** MTT assay was adopted to detect the inhibitory rate of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells proliferation after treated with 0 (blank control), 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L HJB for 24, 48 and 72 h. Laser confocal microscope and flow cytometry were adopted to detect the apoptosis, mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) of above 2 kinds of cells after treated with 0 (blank control), 10, 20, 40 μmol/L HJB for 24 h. Western blot assay was used to detect the expressions of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cytochrome-C (Cyt-C), caspase-3, cleaved caspase-3, caspase-9 and cleaved caspase-9. **RESULTS** Compared with blank control group, 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L HJB could significantly increase the inhibitory rate of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells proliferation ($P<0.05$), in dose- and time-dependent trend. After 24 h treatment of HJB (10, 20, 40 μmol/L), the apoptosis of above 2 kinds of cells increased, and the total apoptotic rate increased significantly ($P<0.05$); the mitochondrial membrane potential decreased significantly ($P<0.05$); the level of ROS increased significantly ($P<0.05$); the protein expressions of Bcl-2, caspase-3 and caspase-9 were decreased significantly ($P<0.05$), while the protein expressions of Cyt-C, Bax, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** HJB can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells, and induce their apoptosis.

KEYWORDS　17-hydroxy-jolkinolide; triple-negative beast cancer; apoptosis; mitochondrial membrane potential; reactive oxygen species

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.81903865）；齐齐哈尔市科技计划联合引导项目（No.LHYD-202003）；黑龙江省大学生创新创业训练计划项目（No.X202211230021）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：药效评价及体内过程分析。E-mail：1609896288@qq.com

＃**通信作者**　副教授，硕士生导师，博士。研究方向：药物抗肿瘤作用。E-mail：hancuicui-1234@163.com

近年来，乳腺癌的发病率持续上升，已成为世界第一大癌[1]。三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer，TNBC）是雌激素受体（estrogen receptor，ER）、孕激素受体（progesterone receptor，PR）和人表皮生长因子受体2（human epidermal growth factor receptor 2，HER-2）均呈阴性表达的乳腺癌亚型，在所有乳腺癌病理类型中占12%～20%，具有发病年龄小、复发率和远端转移率高的特点，为高侵袭性乳腺癌亚型[2－3]。由于临床治疗缺乏靶向性，常规内分泌治疗效果欠佳，故TNBC的治疗难度大，患者的生存率较低[4－6]。因此，发现有效抑制TNBC复发转移的药物、降低患者病死率成为临床亟待解决的问题。

中药抗肿瘤具有悠久的历史，狼毒大戟 *Euphorbia fischeriana* Steud.是我国东北地区的传统多年生草本植物，为中药狼毒的基原植物，可用于水肿、腹水、肺结核和癌症的治疗[7－8]。相关基础研究证实，该药材中的狼毒素、狼毒素A、狼毒素C等成分可诱导TNBC细胞MDA-MB-231凋亡并抑制其增殖，且以狼毒素A的抑制作用最强[9－10]。研究指出，二萜类化合物是狼毒大戟的主要活性成分[11]，其中17-羟-岩大戟内酯B（17-hydroxy-jolkinolide B，HJB）对人肝癌HepG 2细胞、乳腺癌MCF-7细胞、胃癌SGC-7901细胞、胃癌MGC-803细胞、宫颈癌HeLa细胞、TNBC细胞等多种肿瘤细胞均具有较好的抑制作用，并可通过启动线粒体途径来诱导人胶质瘤U251细胞凋亡[12－13]，但对TNBC细胞的作用机制尚不明确。基于此，本研究以人TNBC细胞为对象，观察HJB对该细胞增殖和凋亡的影响，并初步探讨其发挥抗癌作用的相关机制，旨在为优化TNBC的临床治疗提供依据，为进一步挖掘传统中药狼毒抗肿瘤作用的物质基础及具体机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括311型CO_2恒温培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司），Axio Observer A1型倒置显微镜、LSM710型激光共聚焦显微镜（德国Zeiss公司），Safire2型多功能酶标仪（瑞士Tecan公司），Power/PAC3000型电泳仪、ChemiDoc MP型凝胶成像仪（美国Bio-Rad公司），FACS Calibur型流式细胞仪（美国BD公司）等。

1.2 主要药品与试剂

HJB原料药（纯度＞98%）由齐齐哈尔医学院医药科学研究院提供；L-15培养基（批号PYG0038）购自武汉博士德生物工程有限公司；活性氧检测试剂盒、细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）、细胞凋亡检测试剂盒（批号分别为KGT0101-1、KGA601、KGA101）均购自江苏凯基生物技术股份有限公司；MTT试剂（批号M8180）购自北京索莱宝科技有限公司；吖啶橙（acridine orange，AO）/溴化乙锭（ethidium bromide，EB）染色试剂盒（批号E607308-0200）购自生工生物工程（上海）股份有限公司；鼠源B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体，兔源磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）、胱天蛋白酶3（caspase-3）、细胞色素C（cytochrome C，Cyt-C）、活化的caspase-9（cleaved caspase-9）抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠免疫球蛋白G二抗（批号分别为15071S、5174S、5023S、9662S、4280T、7237T、7074S、7076P2）均购自美国Cell Signaling公司；兔源caspase-9抗体（批号10380-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔源cleaved caspase-3抗体（批号N09021992）购自沈阳万类生物科技有限公司；ECL发光试剂盒（批号CW0049）购自北京康为世纪生物科技股份有限公司；其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 细胞

人TNBC细胞系MDA-MB-231、MDA-MB-468均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞均接种于含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素-链霉素的L-15培养基中，于37 ℃、无CO_2的条件下培养（后续培养条件相同），并于细胞融合至85%左右进行传代。本研究选用传至6～10代的细胞进行后续实验。

2.2 细胞增殖抑制率的检测

采用MTT法进行检测。取处于对数生长期的MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞，按1×10^4个/孔接种于96孔板。待细胞贴壁后，将其分为空白对照组（不加药干预，即HJB 0 μmol/L）和不同浓度HJB组（5、10、20、40、80 μmol/L，药物浓度根据前期预实验结果设置），每组设置3个复孔。分别于培养24、48、72 h时，避光加入5 mg/mL的MTT溶液，继续培养4 h，弃去培养液，每孔加入二甲基亚砜150 μL，充分振荡，使用酶标仪于490 nm波长下检测各孔的光密度（OD）值并计算细胞的增殖抑制率。增殖抑制率（%）＝（1－实验组OD值/空白对照组OD值）×100%。用SPSS 25.0软件计算HJB作用于2种细胞24 h的半数抑制浓度（median inhibitory concentration，IC_{50}）值。

2.3 细胞凋亡情况检测

2.3.1 细胞凋亡形态 采用AO/EB双染色法进行观察。取处于对数生长期的MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞，按1×10^5个/孔接种于6孔激光共聚焦培养板。待细胞贴壁后，将其分为空白对照组（不加药物干预，即HJB 0 μmol/L）和不同浓度HJB组（10、20、40 μmol/L，药物浓

度根据本课题组前期预实验和“2.2”项下MTT实验结果设置，下同），每组设置3个复孔。培养24 h后，细胞用磷酸盐缓冲液洗涤2次，加入AO、EB染液各5 μL，轻柔混匀，于室温下避光孵育5 min，使用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的凋亡形态并拍照。

2.3.2　细胞总凋亡率　采用流式细胞术进行检测。取处于对数生长期的MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞，按1×10^5个/孔接种于6孔板。待细胞贴壁后，按“2.3.1”项下方法分组给药。培养24 h后，细胞用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化，以2 000 r/min离心5 min，弃去上清液；细胞用磷酸盐缓冲液洗涤2次，弃去上清液；细胞用binding buffer 500 μL重悬，依次加入Annexin Ⅴ-FITC、PI染液各5 μL，混匀，室温避光孵育10 min，使用流式细胞仪检测各组细胞的总凋亡率。

2.4　细胞线粒体膜电位检测

2.4.1　细胞线粒体膜电位荧光变化情况　采用激光共聚焦显微镜进行观察。细胞培养及分组给药同“2.3.1”项。培养24 h后，细胞用磷酸盐缓冲液洗涤1次，每孔加入JC-1工作液1 mL，于37 ℃下孵育20 min，弃去上清液；细胞用incubation buffer洗涤2次，加入L-15培养基2 mL，使用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的荧光颜色及强度并拍照。

2.4.2　细胞线粒体膜电位变化情况　采用流式细胞术进行检测。细胞培养及分组给药同“2.3.2”项。培养24 h后，细胞用胰酶消化，用磷酸盐缓冲液洗涤2次，以2 000 r/min离心5 min，弃去上清液；细胞用JC-1工作液500 μL重悬，于37 ℃下孵育15 min；悬液于室温下以2 000 r/min离心5 min，弃去上清液；细胞用incubation buffer洗涤2次，再用incubation buffer 500 μL重悬，使用流式细胞仪检测各组细胞粒体膜电位的变化情况。

2.5　细胞活性氧检测

2.5.1　细胞活性氧表达情况　采用激光共聚焦显微镜进行观察。细胞培养及分组给药同“2.3.1”项。培养24 h后，细胞用10 μmol/L的2′，7′-二氯荧光黄双乙酸盐（2′，7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate，DCFH-DA）工作液（以无血清的L-15培养基稀释，下同）重悬，于37 ℃下孵育20 min；细胞用无血清的L-15培养基洗涤3次，使用激光共聚焦显微镜观察各组细胞的荧光强度并拍照。

2.5.2　细胞活性氧水平变化情况　采用流式细胞术进行检测。细胞培养及分组给药同“2.3.2”项。培养24 h后，细胞用胰酶消化，以10 μmol/L的DCFH-DA工作液重悬，于37 ℃下孵育20 min（每隔5 min颠倒混匀1次，使细胞与探针充分接触）；细胞用无血清的L-15培养基洗涤3次，采用流式细胞仪检测各组细胞的荧光强度，用以评估其活性氧水平的变化情况。

2.6　细胞凋亡相关蛋白表达情况检测

采用Western blot法进行检测。取处于对数生长期的MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞，按2×10^6个/皿接种于培养皿（直径100 mm）。待细胞贴壁后，按“2.3.1”项下方法分组给药。培养24 h，细胞用含蛋白酶抑制剂的裂解液于冰上裂解，每5 min振荡1次；裂解30 min后，于4 ℃下以12 000 r/min离心25 min，收集蛋白上清液，以BCA法测定浓度后进行变性处理。取变性后的蛋白适量，经凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，用牛血清白蛋白封闭液封闭2 h；加入Bcl-2、Bax、Cyt-C、caspase-3、cleaved caspase-3、caspase-9、cleaved caspase-9、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；洗膜，加入相应二抗（稀释比例均为1∶2 000），室温孵育1.5 h；洗膜，用ECL发光试剂显影后，于凝胶成像仪下成像，采用Image J软件分析条带灰度值，并计算目的蛋白相对于内参（GAPDH）的表达量。

2.7　统计学方法

使用SPSS 25.0软件对数据进行统计分析。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，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3　结果

3.1　HJB对TNBC细胞增殖的影响

与空白对照组比较，HJB各浓度组MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞各时间点的增殖抑制率均显著升高（$P<0.05$），且有一定的时间、浓度依赖趋势（表1）。HJB作用于上述2种细胞24 h的IC_{50}值分别为（21.57±1.04）、（18.99±0.53）μmol/L，故将后续HJB的干预浓度设置为10、20、40 μmol/L。

表1　HJB对2种TNBC细胞增殖抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	MDA-MB-231细胞增殖抑制率/%			MDA-MB-468细胞增殖抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0	0	0	0	0	0
HJB 5 μmol/L组	20.65±1.19[a]	32.15±1.96[a]	40.95±1.46[a]	17.84±1.81[a]	21.92±1.11[a]	27.35±2.08[a]
HJB 10 μmol/L组	32.91±1.65[a]	52.06±1.02[a]	57.56±1.57[a]	30.34±0.59[a]	42.71±6.31[a]	55.63±1.97[a]
HJB 20 μmol/L组	53.04±1.44[a]	61.12±2.02[a]	74.68±1.82[a]	54.52±1.82[a]	73.78±4.01[a]	79.83±1.20[a]
HJB 40 μmol/L组	64.34±1.03[a]	71.02±1.23[a]	81.75±1.64[a]	72.98±0.15[a]	81.96±2.15[a]	86.97±0.45[a]
HJB 80 μmol/L组	72.25±0.78[a]	83.47±0.98[a]	90.02±0.56[a]	79.92±1.31[a]	86.03±3.72[a]	92.11±1.45[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$

3.2　HJB对TNBC细胞凋亡的影响

AO/EB双染色法观察结果显示，空白对照组2种细胞的细胞核染色均一，呈绿色，且结构正常；随着给药浓度的增加，被染成橙红色的凋亡细胞逐渐增多。结果见图1（以MDA-MB-231细胞为例）。流式细胞术结果显示，与空白对照组比较，HJB各浓度组2种细胞的总凋亡率均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2（以MDA-MB-231细胞为例）、表2。

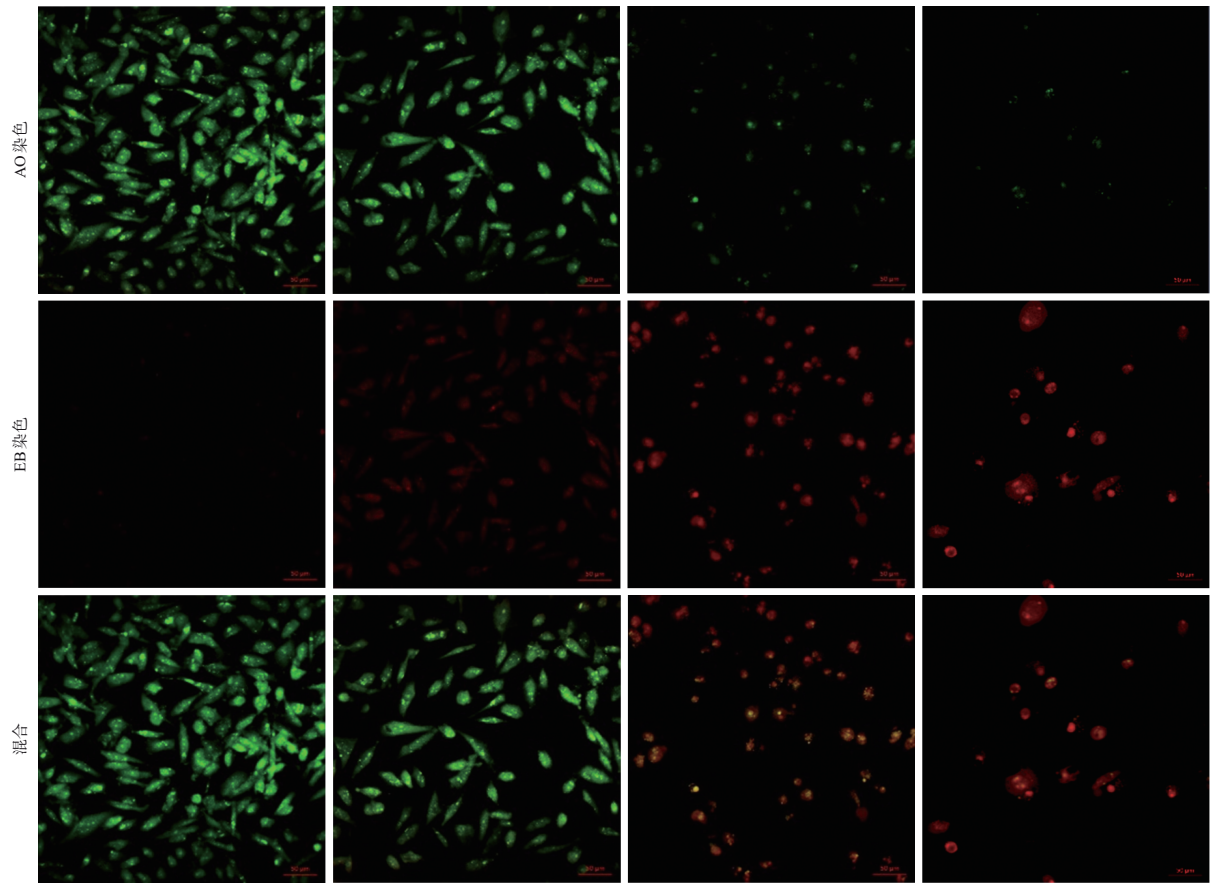


图1　HJB对MDA-MB-231细胞凋亡影响的显微图（AO/EB双染色，×200）

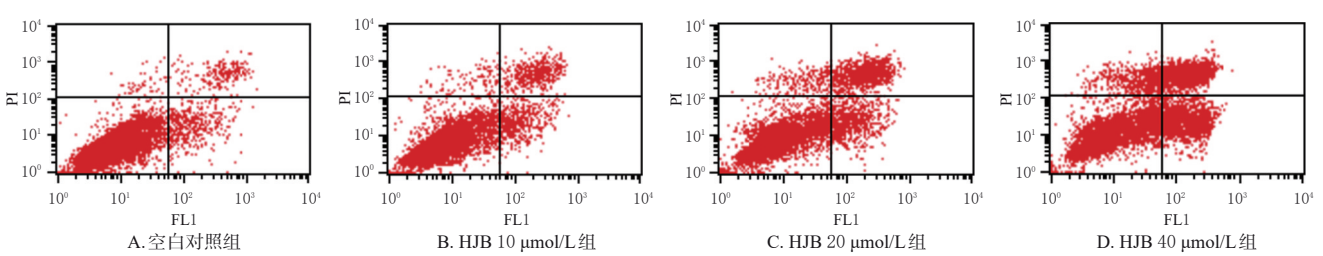


图2　HJB对MDA-MB-231细胞总凋亡率影响的流式细胞图

表2　HJB对2种TNBC细胞总凋亡率和线粒体膜电位的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	总凋亡率/%		线粒体膜电位	
	MDA-MB-231细胞	MDA-MB-468细胞	MDA-MB-231细胞	MDA-MB-468细胞
空白对照组	7.41±2.15	9.97±2.00	10.44±0.66	29.61±1.62
HJB 10 μmol/L组	13.92±3.48[a]	15.26±2.63[a]	6.27±0.82[a]	10.04±1.79[a]
HJB 20 μmol/L组	21.40±3.86[a]	23.65±2.63[a]	3.96±0.87[a]	2.87±0.54[a]
HJB 40 μmol/L组	35.28±3.48[a]	41.66±3.32[a]	2.64±0.49[a]	0.77±0.08[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$

3.3　HJB对TNBC细胞线粒体膜电位的影响

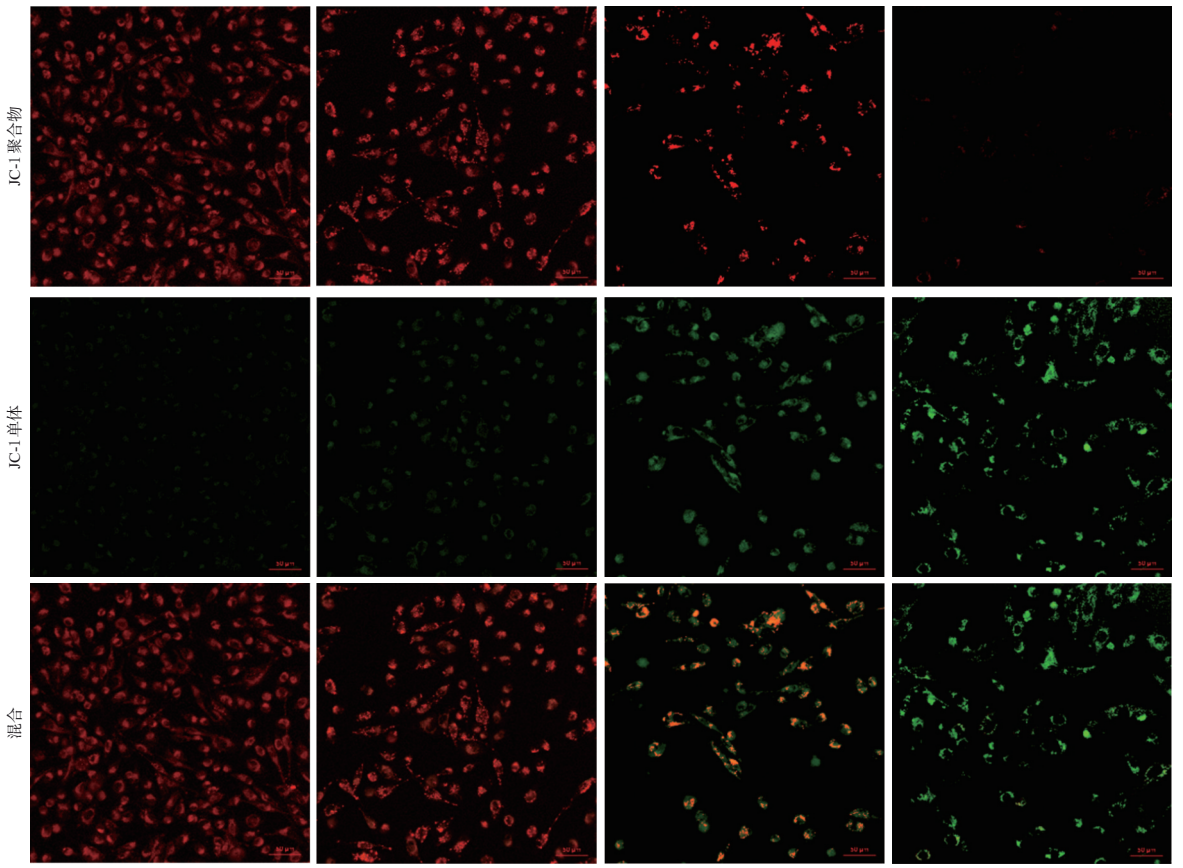
激光共聚焦显微镜观察结果显示，空白对照组2种细胞均为红色；经不同浓度的HJB处理后，绿色细胞增多，而红色细胞减少，提示2种细胞的线粒体膜电位有所下降。结果见图3（以MDA-MB-231细胞为例）。流式细胞术检测结果显示，与空白对照组比较，HJB各浓度组2种细胞的线粒体膜电位水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图4（以MDA-MB-231细胞为例）、表2。

3.4　HJB对TNBC细胞活性氧水平的影响

激光共聚焦显微镜观察结果显示，与空白对照组比较，经不同浓度的HJB处理后，2种细胞的绿色荧光均有所增强，且有随浓度增加而增强的趋势，提示各组细胞的活性氧水平均有所提高，且有一定的浓度依赖趋势。结果见图5（以MDA-MB-231细胞为例）。流式细胞术检测结果显示，与空白对照组比较，经不同浓度HJB作用后，2种细胞的活性氧水平均显著升高（$P<0.05$），且有一定的浓度依赖趋势。结果见图6（以MDA-MB-231细胞为例）、表3。

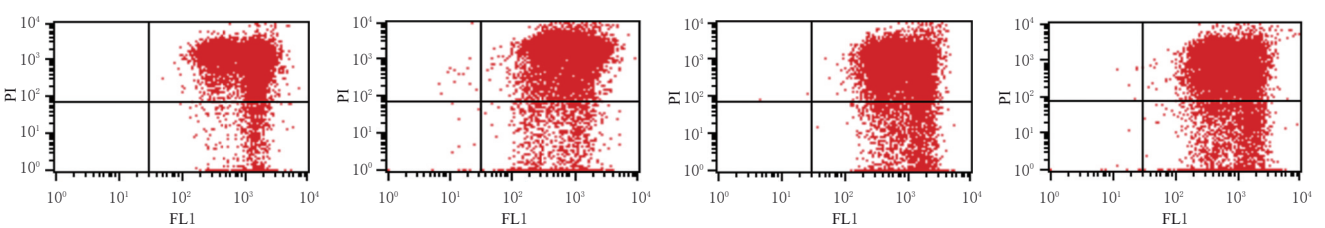
3.5　HJB对TNBC细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较，HJB各浓度组2种细胞中Bcl-2、caspase-9、caspase-3的表达均显著下调（$P<0.05$），Cyt-C、Bax、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3的表达均显著上调（$P<0.05$）。结果见图7（以MDA-MB-231细胞为例）、表4、表5。



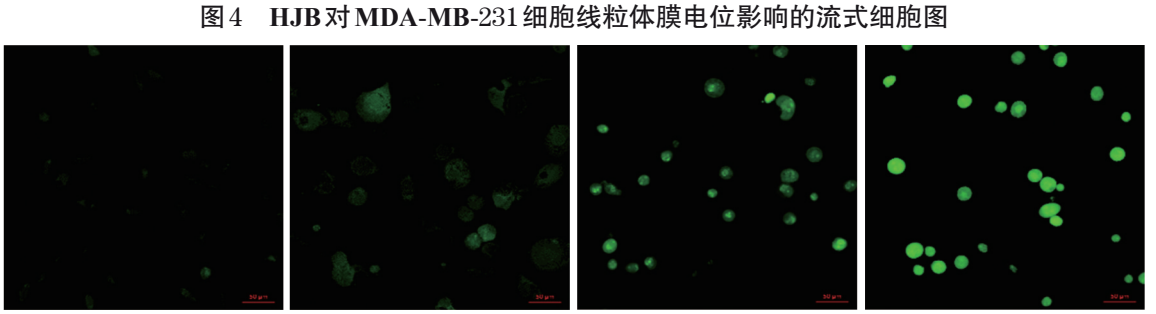
A.空白对照组　B. HJB 10 μmol/L组　C. HJB 20 μmol/L组　D. HJB 40 μmol/L组

图3　HJB对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位影响的显微图（JC-1染色，×200）



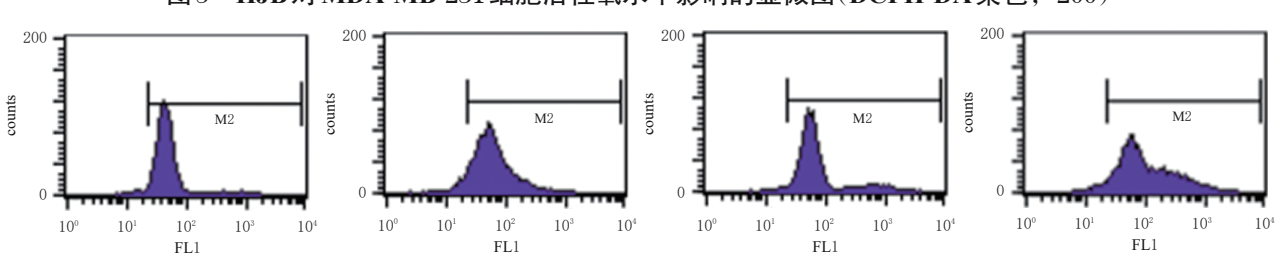
A.空白对照组　B. HJB 10 μmol/L组　C. HJB 20 μmol/L组　D. HJB 40 μmol/L组

图4　HJB对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位影响的流式细胞图



A.空白对照组　B. HJB 10 μmol/L组　C. HJB 20 μmol/L组　D. HJB 40 μmol/L组

图5　HJB对MDA-MB-231细胞活性氧水平影响的显微图（DCFH-DA染色，×200）



A.空白对照组　B. HJB 10 μmol/L组　C. HJB 20 μmol/L组　D. HJB 40 μmol/L组

图6　HJB对MDA-MB-231细胞活性氧水平影响的流式细胞图

表3　HJB对2种细胞活性氧的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	MDA-MB-231细胞	MDA-MB-468细胞
空白对照组	55.99±1.16	22.40±2.58
HJB 10 μmol/L组	71.92±1.76[a]	48.07±2.20[a]
HJB 20 μmol/L组	120.53±3.67[a]	86.53±4.27[a]
HJB 40 μmol/L组	171.03±1.60[a]	137.88±3.46[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$

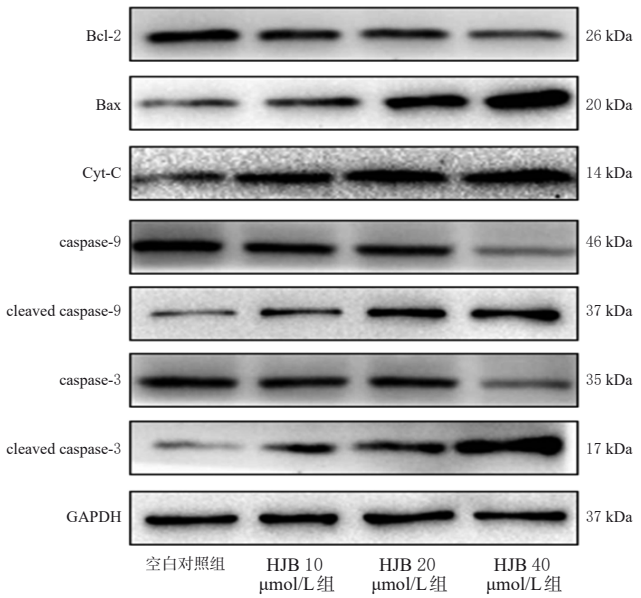


图7　HJB对MDA-MB-231细胞凋亡相关蛋白表达影响的电泳图

表4　HJB对MDA-MB-231细胞凋亡相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bcl-2	Bax	Cyt-C	caspase-9	cleaved caspase-9	caspase-3	cleaved caspase-3
空白对照组	1.34±0.10	0.30±0.02	0.37±0.06	0.69±0.03	0.39±0.03	1.30±0.07	0.32±0.03
HJB 10 μmol/L组	0.92±0.04[a]	0.51±0.03[a]	0.91±0.08[a]	0.52±0.03[a]	0.74±0.10[a]	1.07±0.05[a]	0.57±0.06[a]
HJB 20 μmol/L组	0.75±0.04[a]	0.73±0.05[a]	1.15±0.07[a]	0.42±0.03[a]	0.80±0.04[a]	0.90±0.03[a]	0.69±0.04[a]
HJB 40 μmol/L组	0.58±0.05[a]	1.50±0.16[a]	1.44±0.13[a]	0.21±0.03[a]	1.06±0.12[a]	0.67±0.11[a]	1.35±0.09[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$

表5　HJB对MDA-MB-468细胞凋亡相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	Bcl-2	Bax	Cyt-C	caspase-9	cleaved caspase-9	caspase-3	cleaved caspase-3
空白对照组	1.44±0.10	0.51±0.06	0.54±0.06	1.26±0.08	0.44±0.02	1.24±0.07	0.10±0.03
HJB 10 μmol/L组	1.14±0.05[a]	0.78±0.06[a]	0.81±0.03[a]	1.10±0.07[a]	0.55±0.03[a]	1.12±0.05[a]	0.31±0.03[a]
HJB 20 μmol/L组	0.91±0.04[a]	0.86±0.13[a]	1.07±0.07[a]	0.78±0.05[a]	0.67±0.06[a]	0.82±0.03[a]	0.40±0.03[a]
HJB 40 μmol/L组	0.59±0.03[a]	1.13±0.11[a]	1.24±0.09[a]	0.68±0.04[a]	1.14±0.09[a]	0.60±0.08[a]	0.82±0.09[a]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$

4　讨论

TNBC异质性强，恶性程度、复发率和转移率均高，严重危害女性健康，因此有效抑制TNBC复发转移、降低患者病死率成为临床亟待解决的问题[6,14-15]。研究表明，中药抗癌具有突出优势[16]。狼毒大戟为2020年版《中国药典》（一部）记载的中药狼毒的基原植物，是符合中医“以毒攻毒法”的常用肿瘤治疗药物[17]。HJB是从狼毒大戟根部提取的二萜类化合物，是重要的抗肿瘤活性成分之一[18]。王晓丽等[19-20]研究发现，HJB可浓度依赖性地抑制人脑胶质瘤U251、白血病K562细胞增殖，并诱导其凋亡；马玉坤等[21]从狼毒大戟中分离得到了HJB单体，并发现该成分对人肝癌BEL-7402细胞、肺癌NCI-H460细胞均具有较好的抑制活性；Wang等[22]发现，HJB可抑制人肝癌HepG-2细胞增殖并诱导其凋亡。由此可见，HJB有可能成为治疗癌症的候选药物。本课题组在前期研究中选择了4种TNBC细胞和1种正常人乳腺细胞，筛选结果显示，HJB对正常人乳腺细胞MCF-10A的IC_{50}为（45.60±3.52）μmol/L，对MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞均表现出明显的增殖抑制作用，且较对于MDA-MB-436、BT-549细胞的作用更明显，故选择前2种TNBC细胞作为研究对象。本研究结果显示，HJB对MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞的IC_{50}分别为（21.57±1.04）、（18.99±0.53）μmol/L。综合前期研究和本研究结果发现，HJB对正常人乳腺细胞的毒性作用较弱，但对2种TNBC细胞的增殖具有抑制作用，且有一定的时间-浓度依赖趋势。

活性氧水平升高和线粒体膜电位下降是促进肿瘤细胞凋亡的关键因素[23]。与正常细胞相比，肿瘤细胞对外源性活性氧更为敏感[24]。可见，促进肿瘤细胞产生活性氧的药物可表现出一定的抗癌作用。研究指出，活性氧的过量产生与线粒体功能障碍有关[25]。肿瘤细胞最常见的代谢异常是线粒体功能障碍，当细胞被凋亡信号诱导刺激破坏时，其线粒体膜电位将首先发生下降[26]。因此，降低线粒体膜电位可促进肿瘤细胞凋亡。激光共聚焦显微镜观察和流式细胞术实验结果表明，HJB可提高2种TNBC细胞的凋亡率，降低线粒体膜电位，升高活性氧水平。这提示HJB的促凋亡作用可能与降低线粒体膜电位和升高活性氧水平有关。

线粒体凋亡通路的调控与Bcl-2家族促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例有关。研究表明，Bcl-2为抗凋亡蛋白，Bax为促凋亡蛋白，当细胞接收到凋亡刺激信号后，Bcl-2和Bax可形成多聚体，从而可增加细胞线粒体膜的通透性，导致Cyt-C从线粒体转移到细胞质，进一步激活caspase信号通路[27]。其中，当caspase-9被激活后，其发生自身裂解产生cleaved caspase-9，并促使下游凋亡执行因子caspase-3转化为cleaved caspase-3，最终导致细胞凋亡[28]。Western blot实验结果表明，HJB可下调2种TNBC细胞中Bcl-2的表达，上调Bax的表达，促进Cyt-C的释放和caspase-9、caspase-3的活化，提示HJB可能是通过激活线粒体凋亡通路来促进TNBC细胞的凋亡。

综上所述，HJB对MDA-MB-231、MDA-MB-468细胞的增殖具有抑制作用，并可诱导其凋亡。但本研究并未设计通路抑制剂和阳性对照药，且仅在细胞层面进行了初步研究，具体体内作用机制尚有待进一步探讨。

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] VAGIA E,MAHALINGAM D,CRISTOFANILLI M. The landscape of targeted therapies in TNBC[J]. Cancers (Basel),2020,12(4):916.
[3] SINGH D D,YADAV D K. TNBC:potential targeting of multiple receptors for a therapeutic breakthrough,nanomedicine,and immunotherapy[J]. Biomedicines,2021,9(8):876.
[4] RIGIRACCIOLO D C,NOHATA N,LAPPANO R,et al. IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP transduction signaling prompts growth effects in triple-negative breast cancer (TNBC) cells[J]. Cells,2020,9(4):1010.
[5] KEENAN T E,TOLANEY S M. Role of immunotherapy in triple-negative breast cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw,2020,18(4):479-489.
[6] 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.
[7] JIAN B Y,ZHANG H,LIU J C. Structural diversity and biological activities of diterpenoids derived from *Euphorbia fischeriana* Steud[J]. Molecules,2018,23(4):935.
[8] 王晓阳,康廷国,孟宪生. 狼毒大戟萜类化学成分及抗肿瘤活性研究进展[J]. 中华中医药学刊,2021,39(8):30-35.
[9] ZHANG T T,YU H Y,DONG G L,et al. Chamaejasmine arrests cell cycle,induces apoptosis and inhibits nuclear NF-κB translocation in the human breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. Molecules,2013,18(1):845-858.
[10] 李美男. 狼毒大戟提取物对人乳腺癌细胞株增殖和凋亡影响及其机制研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2019.
[11] 马玉坤,白丽明,郭丽娜,等. 狼毒大戟中二萜成分的研究[J]. 化工时刊,2017,31(1):12-14.
[12] 王蒙,李静,魏晴,等. 狼毒大戟中松香烷型二萜内酯的抗肿瘤活性研究[J]. 中国药师,2015,18(8):1260-1262.
[13] 王晓丽,岳丽玲,周丽,等. 17-羟-岩大戟内酯B对U251细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):254-257.
[14] GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S,PÉREZ-MIES B,CARRETERO-BARRIO I,et al. Molecular features of metaplastic breast carcinoma:an infrequent subtype of triple negative breast carcinoma[J]. Cancers (Basel),2020,12(7):1832.
[15] 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.
[16] FAN Y Q,MA Z,ZHAO L L,et al. Anti-tumor activities and mechanisms of traditional Chinese medicines formulas:a review[J]. Biomedecine Pharmacother,2020,132:110820.
[17] XIANG Y N,GUO Z M,ZHU P F,et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment:modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med,2019,8(5):1958-1975.
[18] 林世翼,贾景明,王安华. 狼毒二萜类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2020,51(1):256-264.
[19] 王晓丽,韩翠艳,李宏铃,等. Fas/FasL信号途径参与17-羟-岩大戟内酯B诱导U251细胞凋亡[J]. 中药药理与临床,2017,33(1):46-49.
[20] 王晓丽,周丽,刘吉成. 17-羟-岩大戟内酯B对K562细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):197-200.
[21] 马玉坤,马天成,孙宇,等. 狼毒大戟抗肿瘤活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(7):156-164.
[22] WANG Y,MA X Q,YAN S S,et al. 17-hydroxyjolkinolide B inhibits signal transducers and activators of transcription 3 signaling by covalently cross-linking Janus kinases and induces apoptosis of human cancer cells[J]. Cancer Res,2009,69(18):7302-7310.
[23] GIZEM ÖZKAN H,THAKOR V,XU H G,et al. Anticancer aminoferrocene derivatives inducing production of mitochondrial reactive oxygen species[J]. Chemistry,2022,28(30):e202104420.
[24] PERILLO B,DI DONATO M,PEZONE A,et al. ROS in cancer therapy:the bright side of the moon[J]. Exp Mol Med,2020,52(2):192-203.
[25] RIZWAN H,PAL S,SABNAM S,et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes[J]. Life Sci,2020,241:117148.
[26] JEONG Y,LIM J W,KIM H. Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated NF-κB signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Nutrients,2019,11(4):762.
[27] KAPLAN P,TATARKOVA Z,SIVONOVA M K,et al. Homocysteine and mitochondria in cardiovascular and cerebrovascular systems[J]. Int J Mol Sci,2020,21(20):7698.
[28] 邹鑫,余霞,付加伟,等. 薏苡附子败酱散对结肠癌细胞HCT116凋亡的影响及机制[J/OL]. 中国实验方剂学杂志(2022-11-28)[2022-12-10]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=3uoqIhG8C45S0n9fL2suRadTyEVl2pW9UrhTDCdPD64-COn474GzIn-k2aGviUr9mUI4cC2qDZzJHGzUVBV71ktqUWisBKhk&uniplatform=NZKPT. DOI:10.13422/j.cnki.syfix.20230222.

(收稿日期:2022-12-30 修回日期:2023-04-17)
(编辑:张元媛)