

# 山柰酚通过线粒体凋亡通路诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的机制研究

方雨潇,王淑美\*

重庆医科大学中医药学院 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016

**摘要:** 本文旨在探讨山柰酚对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的抑制作用及其可能的分子机制。用不同浓度的山柰酚处理细胞, CCK-8 法检测山柰酚对 MDA-MB-231 和人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 活力的影响, 倒置显微镜观察各组细胞形态变化, 克隆形成法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位的改变, Western blot 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) 和细胞周期蛋白 D1 (Cyclin D1) 的蛋白表达, 比色法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3) 以及半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9 (Caspase-9) 的活性。结果显示, 山柰酚体外可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 且对正常乳腺上皮细胞活力无影响, 降低细胞线粒体膜电位, 上调 Bax、Cyt C 的表达, 下降 Bcl-2 和 Cyclin D1 的表达, 增强 Caspase-3、Caspase-9 活性。结果表明, 线粒体凋亡信号通路的激活是山柰酚诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的途径之一。

**关键词:** 山柰酚; 三阴性乳腺癌; 线粒体凋亡通路; 细胞凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)3-0397-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.3.005

## Study on mechanism of kaempferol inducing apoptosis of triple negative breast cancer cells through mitochondrial apoptosis pathway

FANG Yu-xiao, WANG Shu-mei\*

Chongqing Key Laboratory of TCM for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the inhibitory effect of kaempferol on triple negative breast cancer cell MDA-MB-231 and its possible molecular mechanism. Cells were treated with kaempferol at different concentrations. CCK-8 method was used to detect the effect of kaempferol on the viability of MDA-MB-231 and human normal mammary epithelial cell MCF-10A. The morphological changes of cells in each group were observed by inverted microscope. Clone formation method was used to detect cell proliferation. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The changes of mitochondrial membrane potential were detected by JC-1 staining. Western blot was used to detect the protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt C) and Cyclin D1. Cysteiny l aspartate-specific protease 3 (Caspase-3) and cysteiny l aspartate-specific protease 9 (Caspase-9) activities were detected by colorimetry. The results showed that kaempferol significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells in vitro, induced apoptosis, and had no effect on the viability of normal mammary epithelial cells. It decreased the membrane potential of mitochondria, increased the expression of Bax and Cyt C, decreased the expression of Bcl-2 and Cyclin D1, and enhanced the activities of Caspase-3 and Caspase-9. It is suggested that the activation of mitochondrial apoptosis signal pathway is one of the pathways of kaempferol induced apoptosis in MDA-MB-231 cell.

**Key words:** kaempferol; triple negative breast cancer; mitochondrial apoptosis pathway; cell apoptosis

收稿日期: 2022-10-03

接受日期: 2023-01-12

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目 (CYS21242); 重庆市教委课题 (22SKGH058)

\* 通信作者 Tel: 86-018716369329; E-mail: wangshumei@cqmu.edu.cn

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TN-BC)作为乳腺癌的一种特殊亚型,约占乳腺癌总数的15%~20%<sup>[1]</sup>,具有总生存期短、恶性程度高、侵袭能力强、早期复发率高等临床特征<sup>[2]</sup>,一旦发生转移,患者的中位生存期仅为10~13个月<sup>[3]</sup>。由于TNBC对内分泌治疗和靶向治疗都不敏感,所以化疗是主要的治疗方法<sup>[4]</sup>,然而,耐药和治疗相关的副作用仍然是值得关注的问题。近年来,中医药因其具有独特的理论体系和擅长个体化的治疗方案,在预防和治疗TNBC中的作用日益受到重视<sup>[5]</sup>。本课题组通过前期研究发现柴胡桂枝汤加减方联合卡培他滨可以抑制三阴性乳腺癌裸鼠皮下移植瘤的生长<sup>[6]</sup>,进一步运用网络药理学方法分析得出山柰酚(kaempferol, KA)是柴胡桂枝汤加减方中的重要有效成分,这为我们使用山柰酚治疗三阴性乳腺癌提供了实验依据。

山柰酚是一种广泛存在于蔬菜、水果及中药材中的黄酮类化合物,具有防癌、抗癌、抗炎、抗氧化、抗病毒等多种功效<sup>[7,8]</sup>,可通过诱导细胞凋亡、调节细胞周期、抑制新生血管生成和肿瘤转移等作用抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭<sup>[9,10]</sup>。研究发现,KA通过激活MEK-MAPK诱导肺癌细胞生长抑制和凋亡,在体外和体内通过抑制AKT/PI3K和ERK通路,激活线粒体凋亡通路,增加辐射杀伤肺癌细胞<sup>[11]</sup>。在结肠癌中,KA通过增强结肠癌细胞连接蛋白43的表达和磷酸化来重建间隙连接的细胞间通讯,从而诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。KA还能通过下调人宫颈癌细胞的PI3K/AKT和hTERT通路诱导细胞凋亡和衰老<sup>[13]</sup>。在乳腺癌中,关于KA通过不同机制发挥抗肿瘤作用已有报道。KA能够通过阻断PKC $\delta$ /MAPK/AP-1级联以及随后基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达和活性来抑制乳腺癌细胞的侵袭<sup>[14]</sup>。Li等<sup>[15]</sup>发现,KA可通过调控Notch1蛋白抑制乳腺癌SK-BR-3细胞增殖。此外,KA还能抑制三氯生诱导的MCF-7乳腺癌细胞的上皮-间充质转化(EMT)和转移相关行为<sup>[16]</sup>。虽然KA在多种肿瘤中的抗癌作用已被证实,但关于其能否诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡及其分子机制的研究目前尚未见报道。本研究将以人源TNBC细胞MDA-MB-231为研究对象,观察山柰酚对MDA-MB-231细胞凋亡的影响以及可能机制是否与线粒体凋亡途径有关,为临床使用山柰酚治疗三阴性乳腺癌提供理论依据和实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

#### 1.1.1 主要试剂

人TNBC细胞MDA-MB-231、人正常乳腺上皮细胞MCF-10A,购自中国科学院上海生命科学研究所以。山柰酚(KA)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(纯度 $\geq 98\%$ )将10 mg KA溶解于350  $\mu$ L DMSO中,配制成浓度为100 mmol/L的母液。DMEM高糖培养基(Lot No.:06-1055-57-1ACS)、胎牛血清(Lot No.:C04001050X10)、青霉素-链霉素溶液(Lot No.:03-031-1BCS)、胰酶(Lot No.:06-03-050-1ACS)均购自上海Vivacell公司;MCF-10A细胞专用培养基(Lot No.:CM-0525)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(Lot No.:C0038)、二甲基亚砷(Lot No.:ST038)、吉姆萨染色液(Lot No.:C0131)、BCA蛋白定量试剂盒(Lot No.:P0010)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Binding Buffer(Lot No.:E-CK-A151)、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(Lot No.:E-CK-A211)、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(Lot No.:E-CK-A301)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)活性测定试剂盒(Lot No.:E-CK-A311)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(Caspase-9)活性测定试剂盒(Lot No.:E-CK-A313)、Bradford法蛋白含量检测试剂盒(Lot No.:E-BC-K168-M)均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)(Lot No.:4223)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)(Lot No.:2772)、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)(Lot No.:2922)、细胞色素C(Cyt C)(Lot No.:4272)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Lot No.:2118)均购自美国CST公司。

#### 1.1.2 主要仪器

Form371型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);SW-CJ-1FD型超净工作台(江苏苏州安泰空气技术有限公司);Synergy HTX全型自动酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX53型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司);Mini PROTEAN<sup>®</sup> Tetra System型垂直电泳装置、湿转仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

将人TNBC细胞MDA-MB-231培养于含10%

胎牛血清、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基中,人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 培养于含 5% 马血清、1% 乳腺上皮细胞生长添加物和 1% 青霉素-链霉素的 MCF-10A 细胞专用培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  及饱和湿度下培养细胞,2~3 d 传代 1 次,取对数期生长细胞用于后续实验。

### 1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的 MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞,调整细胞浓度,以每孔 5 000 个,体积 100  $\mu\text{L}$  接种至 96 孔板,常规培养 24 h 后加药。实验组加入不同剂量的 KA (0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),对照组加入等倍稀释的 DMSO,空白组加入完全培养基(不含细胞)。在培养的 24、48、72 h 加入 CCK-8 试剂(10  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ),继续培养 2~3 h。酶标仪检测 450 nm 处细胞 OD 值,计算细胞活力:细胞活力 =  $(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验每组设置 6 个复孔,重复 3 次。

### 1.2.3 细胞分组

参照 CCK-8 检测结果,将 MDA-MB-231 细胞分为对照组(control, Con)和山柰酚(KA)低、中、高剂量组。对照组加入等倍稀释的 DMSO 不添加 KA,低、中、高剂量组分别加入 25、50、100  $\mu\text{mol}/\text{L}$  KA 进行处理。取对数生长期的细胞进行药物干预,并在作用 48 h 后进行检测。

### 1.2.4 倒置显微镜观察细胞形态

分别取对照组和低、中、高剂量组干预处理 48 h 后的 MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞,在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

### 1.2.5 克隆形成法检测细胞增殖

分别向 6 孔板中接种 500 个 MDA-MB-231 细胞,孵育箱内培养 24 h 后按照药物分组给药,连续培养 14 d,弃掉培养基,用 70% 乙醇固定 10 min,接着用吉姆萨染色液染色 45 min,去离子水漂洗晾干后拍照并观察集落形成数:集落形成率 =  $(\text{集落形成数}/500) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

### 1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,孵育箱内培养 24 h 后按照药物分组给药,处理 48 h,用不含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化后收集细胞并重悬,加入 500  $\mu\text{L}$  Binding Buffer, Annexin V-FITC 和 PI 各 5  $\mu\text{L}$ ,避光反应 15~20 min。流式细胞仪检测各组细

胞凋亡情况。重复 3 次以上,计算每组细胞凋亡率。

### 1.2.7 JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位的改变

用不同浓度的 KA 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,弃掉培养基,用 JC-1 缓冲液洗涤 1 次后加入 1 mL JC-1 染色工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。孵育结束后,使用 JC-1 缓冲液洗涤 2 次,加入 2 mL 完全培养基,荧光显微镜下观察并拍照。采用 Image J 图像软件分析红绿荧光强度,以红绿荧光比值表示线粒体膜电位。

### 1.2.8 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、Cyt C 和 Cyclin D1 的蛋白表达

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,按照药物分组给药处理 48 h 后,加入蛋白裂解液处理细胞,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,取 35  $\mu\text{g}$  蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离,转膜,脱脂牛奶封闭,加入一抗 Bcl-2、Bax、Cyt C、Cyclin D1 (1:1 000 稀释)4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜,TBST 清洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 2 h,洗膜,加入 ECL 发光液显影曝光,以 GAPDH 为内参。采用 Image J 图像软件进行灰度值分析并计算相关蛋白表达。

### 1.2.9 比色法检测 Caspase-3、Caspase-9 活性

分组及给药同“1.2.3”。严格按照 Caspase-3、Caspase-9 活性测定试剂盒说明进行检测,消化收集细胞,加入裂解液,提取蛋白后用 Bradford 法测定蛋白浓度,酶标仪检测各组 405 nm 处细胞 OD 值,通过计算 OD 给药组/OD 对照组的倍数来确定其活化程度。实验重复 3 次。

### 1.2.10 统计学分析

采用 SPSS25.0 软件进行统计学分析,计量数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用  $t$  检验,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。

## 2 结果

### 2.1 KA 抑制 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞活力

采用 CCK-8 法检测 KA 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响,结果如图 1A 所示。结果表明,MDA-MB-231 细胞经浓度梯度 0、12.5、25、50、100、200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 KA 处理 24、48 和 72 h 后,随着 KA 浓度的增加,细胞活力逐渐降低,抑制效果具有药物浓度和时间依赖性。KA 作用 24、48 和 72 h 的 50% 细胞抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 值分别为 73.82、51.10 和 38.02  $\mu\text{mol}/\text{L}$

L, 后续实验采用 25、50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  的 KA 作为低、中、高剂量组及 48 h 作为处理时间。采用 CCK-8 法检测 KA 对 MCF-10A 细胞活力的影响, 确定其对正常乳腺上皮细胞是否有相同作用, 结果如图 1B 所示。在相同条件下, 不同剂量的 KA 对 MCF-10A 细胞活力无明显抑制作用, 无细胞毒性。

## 2.2 KA 对 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞的形态学变化。对照组 MDA-MB-231 细胞生长良好, 细胞形态清晰, 可见多层致密生长现象, 细胞

梭形可贴壁。而低、中、高剂量组经不同浓度 KA 干预 48 h 后, 随着药物浓度的增加, 可见细胞形态逐渐改变, 细胞数量逐渐减少。部分细胞变圆, 伸展不良, 细胞脱落、悬浮、贴壁疏松或死亡 (见图 2A)。提示 KA 对 MDA-MB-231 增殖有明显抑制作用, 且随着浓度增加, 抑制作用更明显。对照组 MCF-10A 细胞生长良好, 细胞形态均一, 多数细胞呈梭形, 胞体饱满, 增殖旺盛, 细胞贴壁紧, 以不同浓度 KA 干预 48 h 后, 细胞形态与对照组无明显差异 (见图 2B)。

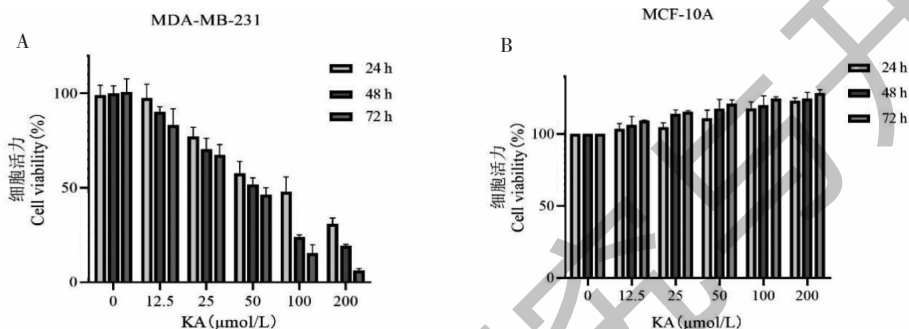


图 1 KA 对 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of KA on viability of MDA-MB-231 and MCF-10A cells

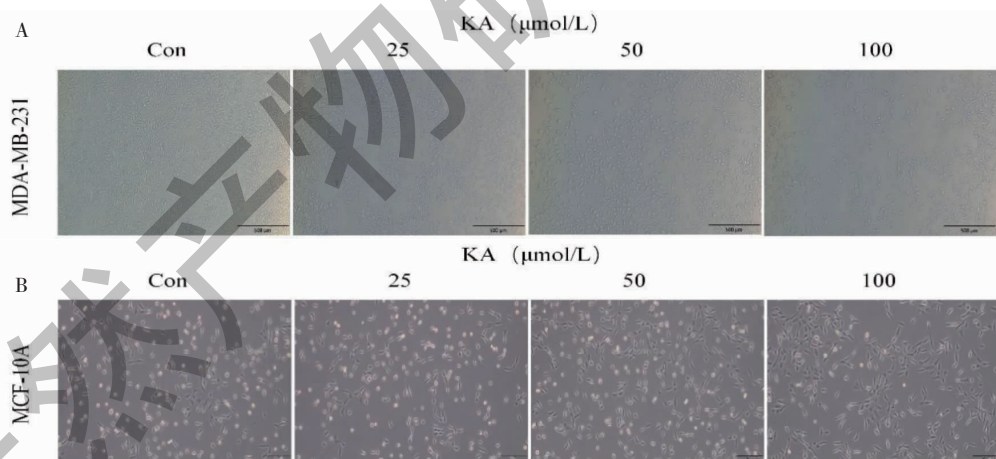


图 2 KA 对 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞形态的影响 ( $\times 100$ )

Fig. 2 Effect of KA on morphology of MDA-MB-231 and MCF-10A cells ( $\times 100$ )

## 2.3 KA 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖

采用克隆形成法检测 KA 对各组 MDA-MB-231 细胞增殖的影响, 结果如图 3 所示。与对照组相比较, 低、中、高剂量组细胞增殖率显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## 2.4 KA 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡

流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各

组细胞凋亡结果如图 4 所示。KA 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  组细胞凋亡率显著升高, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 2.5 KA 降低 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位

JC-1 聚集在线粒体的基质中, 形成聚合物, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, 此时的 JC-1 为单体, 产生绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿

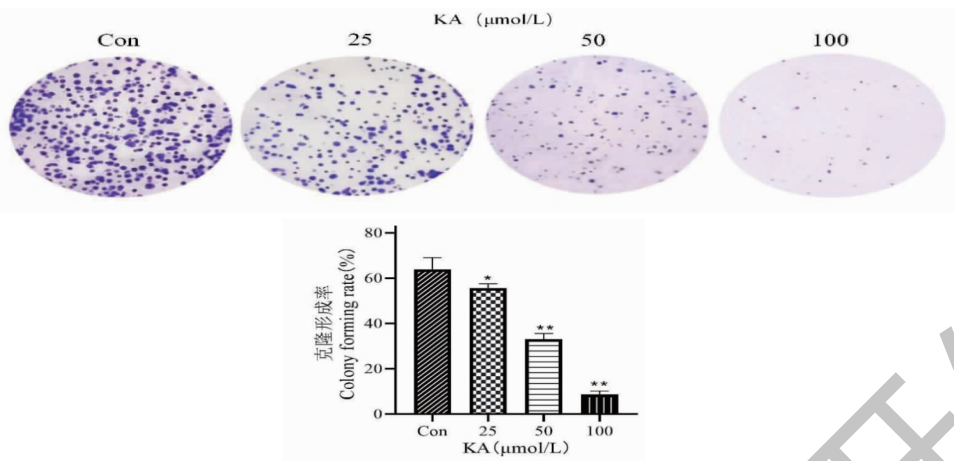


图3 KA对MDA-MB-231细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of KA on proliferations of MDA-MB-231 cells

注:与Con组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,下同。Note:Compared with Con group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,the same below.

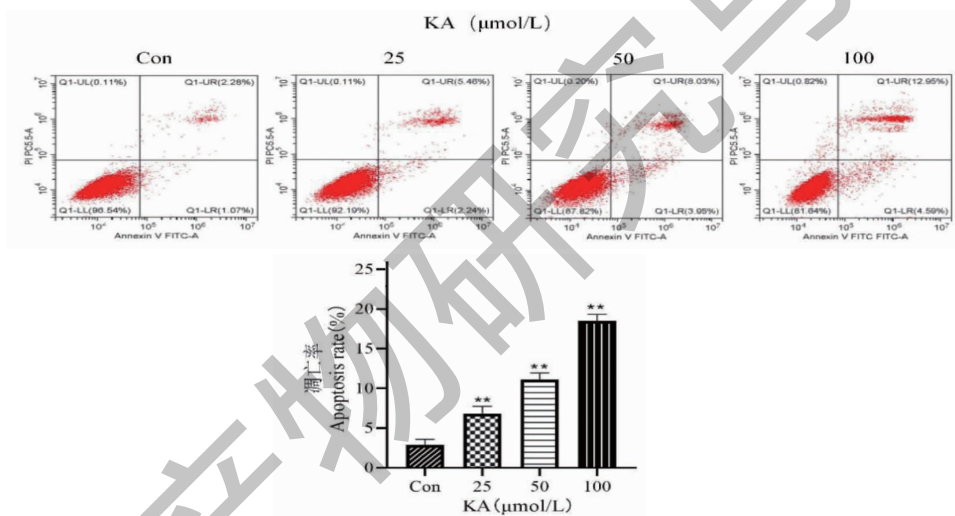


图4 KA对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of KA on apoptosis of MDA-MB-231 cells

色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的下降,常用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。这种转变可作为细胞凋亡早期的一个检测指标。JC-1染色法检测结果如图5所示,与对照组比较,低、中、高剂量组经不同浓度KA干预48h后,红绿荧光的相对比例显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。表明KA可以显著降低MDA-MB-231细胞线粒体的膜电位水平,从而激活线粒体凋亡途径。

## 2.6 KA对MDA-MB-231细胞Bcl-2、Bax、Cyt C和Cyclin D1蛋白表达的影响

Western blot结果显示(见图6),KA 25、50、100

μmol/L组MDA-MB-231细胞凋亡蛋白Bax、Cyt C表达显著上调,抗凋亡蛋白Bcl-2和周期蛋白Cyclin D1表达显著下调,与对照组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 2.7 KA增强MDA-MB-231细胞Caspase-3、Caspase-9活性

比色分析结果显示(见图7),KA 25、50、100 μmol/L组MDA-MB-231细胞Caspase-3、Caspase-9活性明显增高,与对照组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。随着药物浓度的增加,Caspase-3的活性从对照组的1.85倍增加到4.08倍;Caspase-9的活性从对照组的1.44倍增加到2.53倍。

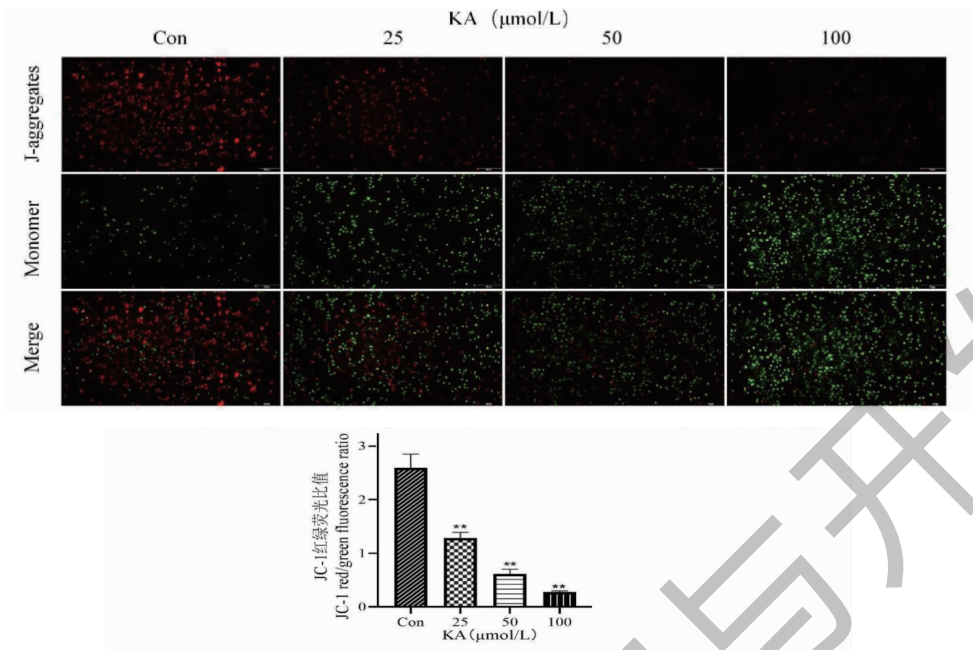


图5 KA对MDA-MB-231细胞线粒体膜电位的影响( $\times 100$ )

Fig. 5 Effect of KA on mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells( $\times 100$ )

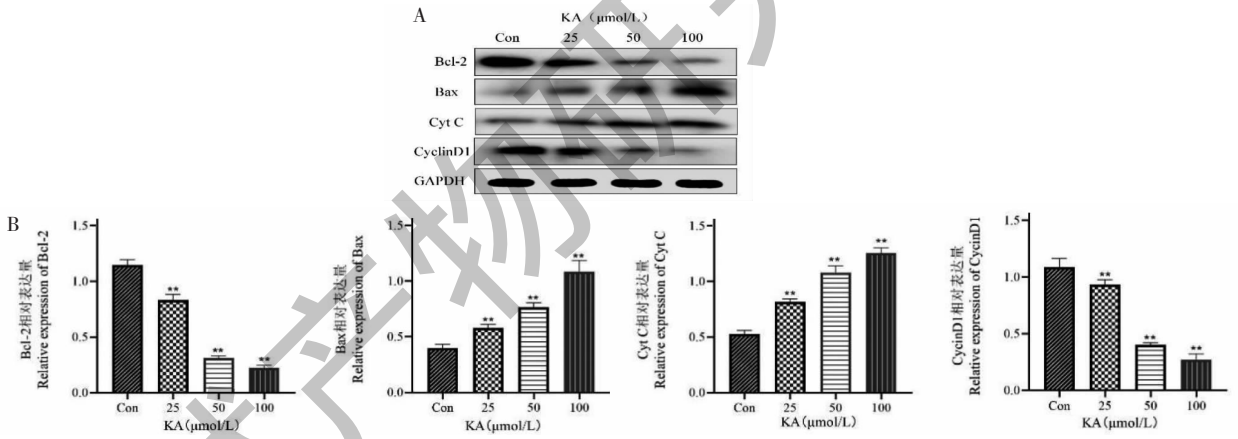


图6 KA对MDA-MB-231细胞Bcl-2、Bax、Cyt C和Cyclin D1蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of KA on protein expressions of Bcl-2, Bax, Cyt C and Cyclin D1 in MDA-MB-231 cells

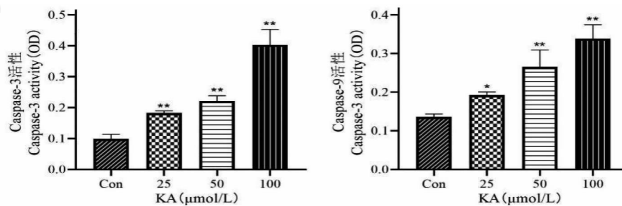


图7 KA对MDA-MB-231细胞Caspase-3、Caspase-9活性的影响

Fig. 7 Effect of KA on activities of Caspase-3 and Caspase-9 of MDA-MB-231 cells

### 3 讨论与结论

山奈酚作为一种广泛存在于多种植物中的多酚羟基黄酮类化合物,不仅可以有效抑制肿瘤细胞生

长并诱导其凋亡,还能保持正常细胞的生长活力<sup>[17]</sup>。Chen等<sup>[18]</sup>研究显示,KA能够通过诱导前列腺癌细胞周期阻滞,抑制细胞增殖,并且对正常细

胞人包皮成纤维细胞(HFF)的活力没有影响,提示KA具有良好抗肿瘤疗效且低毒。Tu等<sup>[19]</sup>发现,KA可有效抑制人宫颈癌细胞增殖和转移,而对癌胚肾细胞、肝细胞正常细胞的细胞毒作用较小,提示KA有较高的癌细胞靶向性。关于KA在三阴性乳腺癌细胞中的研究较少,因此本研究通过对MDA-MB-231和MCF-10A细胞体外研究证实,KA能显著抑制TNBC细胞的增殖,促进细胞凋亡,而对正常乳腺上皮MCF-10A细胞增殖无影响。

在此基础上,本实验进一步探究KA对MDA-MB-231细胞的凋亡诱导机制。目前研究发现,细胞凋亡根据启动过程主要涉及三种方式:线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径,而线粒体途径在介导细胞凋亡中承担着重要角色<sup>[20]</sup>。线粒体膜电位是反映线粒体内膜通透性的最佳指标之一,线粒体膜电位下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,一旦线粒体膜电位崩溃,则细胞凋亡不可逆转<sup>[21,22]</sup>。Feng等<sup>[23]</sup>从茵陈蒿中分离出一种阿拉伯半乳糖,能够通过使线粒体膜电位丧失实现对人鼻咽癌CNE-2细胞的杀灭作用。本研究发现KA具有降低MDA-MB-231细胞线粒体膜电位的作用,提示山柰酚抑制细胞增殖,促进细胞凋亡的机制之一可能是通过线粒体介导的细胞凋亡途径实现的。为了进一步探讨KA诱导MDA-MB-231细胞凋亡与线粒体凋亡信号通路的关系,本研究对Bcl-2、Bax、Cyt C、Cyclin D1表达及Caspase-3、Caspase-9活性进行了检测。

Bcl-2家族蛋白包括抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax,作为线粒体外膜完整性的调节器,在对线粒体凋亡途径的调控中发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。接收到凋亡信号后,胞质中的Bax易位到线粒体,抗凋亡蛋白Bcl-2引导细胞色素C从线粒体释放,促进Caspase-9前体的自身活化,活化的Caspase-9激活Caspase-3,最终导致细胞凋亡<sup>[25,26]</sup>。Liu等<sup>[27]</sup>研究表明,KA通过线粒体凋亡途径抑制人胆囊癌细胞的增殖并诱导其凋亡。在本研究中,我们观察到KA可增加MDA-MB-231细胞中Bax的表达,降低Bcl-2的表达,促进线粒体凋亡途径中Cyt C释放到胞质,从而表达升高。与此同时,线粒体膜通透性增加,膜电位降低,凋亡前因子释放,引发下游Caspase3和Caspase-9的激活,最终导致细胞凋亡的发生。此外,细胞凋亡与细胞异常增殖密切相关,而细胞增殖的主要原因是细胞周期异常<sup>[28]</sup>,Cyclin D1

作为细胞周期重要的调节蛋白,可促进细胞从G1期到S期的转变,加速细胞周期进程,其上调可引起细胞异常增殖,诱导线粒体膜电位改变<sup>[29]</sup>,导致肿瘤发生<sup>[30,31]</sup>。本实验结果表明,KA能下调MDA-MB-231细胞中凋亡相关蛋白Cyclin D1、Bcl-2的表达,降低线粒体膜电位,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

综上所述,本研究明确了山柰酚体外对三阴性乳腺癌细胞的抗癌作用,且具有一定的安全性,阐明了KA通过线粒体凋亡信号通路诱导MDA-MB-231细胞凋亡的机制,后期可通过体内实验进一步研究KA对TNBC的抑制作用,为KA的开发和临床应用提供实验依据。

### 参考文献

- 1 Carey L, Winter E, Viale G, et al. Triple negative breast cancer: disease entity or title of convenience? [J]. *Rev Clin Oncol*, 2010, 7: 683-692.
- 2 Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363: 1938-1948.
- 3 Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review [J]. *JAMA*, 2019, 321: 288-300.
- 4 Cho B, Han Y, Lian M, et al. Evaluation of racial/ethnic differences in treatment and mortality among women with triple-negative breast cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7: 1016-1023.
- 5 Wang YL, Mao XY. Research progress in traditional Chinese medicine for triple-negative breast cancer [J]. *J Liaoning TCM Univ (辽宁中医药大学学报)*, 2022, 24: 129-132.
- 6 Fang YX, Wang SM, Yang Q, et al. Chaihu Guizhi Decoction plus or minus formula combined with capecitabine inhibits IL-6/STAT3 signaling to suppress triple-negative breast cancer xenografts in nude mice [J]. *J South Med Univ (南方医科大学学报)*, 2022, 42: 905-912.
- 7 Wang HJ, Chen L Y, Zhang X Y, et al. Kaempferol protects mice from d-GalN/LPS-induced acute liver failure by regulating the ER stress-Gp78-CHOP signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2019, 111: 468-475.
- 8 Han X, Liu CF, Gao N, et al. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2018, 108: 809-816.
- 9 Palacz-Wrobel M, Borkowska P, Paul-Samojedny M, et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 1205-1212.

- 10 Yao W, Ba Q, Li XA. Natural CCR2 antagonist relieves tumor-associated macrophage-mediated immunosuppression to produce a therapeutic effect for liver cancer[J]. *Bio Medicine*, 2017, 22:58-67.
- 11 Kuo WT, Tsai YC, Wu HC, et al. Radiosensitization of non-small cell lung cancer by kaempferol[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34:2351-2356.
- 12 Yoshida T, Konishi M, Horinaka M, et al. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375:129-133.
- 13 Kashafi E, Moradzadeh M, Mohamadkhani A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89:573-577.
- 14 Li C, Zhao Y, Yang D, et al. Inhibitory effects of kaempferol on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-9[J]. *Biochem Cell Biol*, 2015, 93:16-27.
- 15 Li YF, Zeng SB, Qiu HP, et al. Effect and mechanism of kaempferol on proliferation and apoptosis of breast cancer cells[J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2020, 36:3679-3682.
- 16 Lee GA, Choi KC, Hwang KA. Kaempferol, a phytoestrogen, suppressed triclosan-induced epithelial-mesenchymal transition and metastatic-related behaviors of MCF-7 breast cancer cells[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 49:48-57.
- 17 Wang JJ. The mechanism of kaempferol in promoting autophagy and apoptosis of non-small cell lung cancer [D]. Guangzhou:Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2021.
- 18 Chen JQ. Study on the mechanism of kaempferol extracted from Zhuang medicine Shannai on prostate cancer [D]. Guangxi:Guangxi University of Chinese Medicine (广西中医药大学), 2022.
- 19 Tu LY, Bai HH, Cai JY, et al. The mechanism of kaempferol induced apoptosis and inhibited proliferation in human cervical cancer SiHa cell: From macro to nano [J]. *Scanning*, 2016, 38:644-653.
- 20 Zhang L, Lu RR, Wang HH, et al. Protective effect and mechanism of rehmannioside D on PC-12 cells injury induced by corticosterone[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53:3385-3393.
- 21 Zhu LL, Zhang MM, Guo GG, et al. Study on regulation mechanism of glaucocalyxin A on the autophagy and apoptosis of HCCLM3 hepatocellular carcinoma cells through Bcl-2/Beclin1 target[J]. *China Pharm* (中国药房), 2022, 33:1082-1087.
- 22 Xu NN, Lu MM, Wang JX, et al. Ivermectin induces apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma via mitochondrial pathway[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21:1307.
- 23 Feng GF, Wang XQ, You CX, et al. Antiproliferative potential of *Artemisia capillaris* polysaccharide against human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92:1040-1045.
- 24 Liu X, Yang CY, Deng Y, et al. Polygoni Multiflori Radix Preparat delays skin aging by inducing mitophagy [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:5847153.
- 25 Liu SH, Guo RJ, Liu F, et al. Gut microbiota regulates depression-like behavior in rats through the neuroendocrine-immune-mitochondrial pathway[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16:859-869.
- 26 Li XM, Rong H, Pan SW, et al. The combination of gastrodin and isorhynchophylline inhibits PC12 cells from MPP<sup>+</sup> induced apoptosis via mitochondrial events[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33:1096-1101.
- 27 Liu ZQ, Yao GL, Zhai JM, et al. Kaempferol suppresses proliferation and induces apoptosis and DNA damage in human gallbladder cancer cells through the CDK4/CDK6/cyclin D1 pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25:1311-1321.
- 28 Liu F, Han SE, Liu JH. Mechanism of CDX2 gene expression regulated by miR-16-5p on proliferation and apoptosis of leukemia cells[J]. *Chin J Biomed Eng* (中华生物医学工程杂志), 2019, 25:306-312.
- 29 Zhu JW, Sun Y, Lu Y, et al. Glaucocalyxin A exerts anticancer effect on osteosarcoma by inhibiting GLI1 nuclear translocation via regulating PI3K/Akt pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9:708.
- 30 Chen L, Chen XC. Mechanism of long non-coding RNA 01535 targeting microRNA-483-3p to regulate lung cancer cell proliferation and apoptosis [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2022, 38:2429-2433.
- 31 Zhang S, Xia WJ, Dong GC, et al. Cyclic RNA molecule circ-0007766 promotes the proliferation of lung adenocarcinoma cells by up-regulating the expression of Cyclin D1/Cyclin E1/CDK4[J]. *Chin J Lung Cancer* (中国肺癌杂志), 2019, 22:271-279.