

基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路探讨蒲公英多糖对三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭的影响

刘晓燕¹, 龙凤^{1,2,3*}, 赵玉¹, 侯茜¹, 叶海琳¹, 周旋¹, 李雪¹

¹甘肃中医药大学; ²甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室;

³甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000

摘要:本研究通过观察蒲公英多糖(dandelion polysaccharide, DP)对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭的影响,探讨 DP 抑制乳腺癌细胞的分子机制。用 DP 处理人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 后,采用 CCK-8 方法检测不同浓度的 DP(0、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对细胞活力的影响;采用平板克隆实验检测 DP 对乳腺癌细胞克隆形成能力的影响;采用划痕实验和 Transwell 实验分别检测 DP 对乳腺癌迁移和侵袭能力的影响;蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 DP 作用 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,该细胞中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β)、磷酸化糖原合成激酶-3 β (p-GSK-3 β)蛋白表达情况,上皮间质转化(EMT)相关标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达情况。结果显示,与空白组相比,DP 组(100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞存活率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而对 MCF-10A 细胞的存活率无显著影响;与空白组相比,DP 组(200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)细胞克隆形成能力显著减弱($P < 0.01$);与空白组相比,DP 组(200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)迁移能力显著降低;与空白组相比,DP 组(200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)侵袭能力显著减弱($P < 0.01$);与空白组相比,DP 组(200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)p-PI3K、p-Akt 及 p-GSK-3 β 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),而 PI3K、Akt 及 GSK-3 β 总蛋白无明显变化;与空白组相比,DP 组(200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)E-cadherin 表达水平上调,N-cadherin 和 Vimentin 表达水平下调,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上,DP 能够有效抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程,其机制可能与抑制 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路活性有关。

关键词:磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/糖原合成激酶-3 β ;蒲公英多糖;乳腺癌;增殖;迁移;侵袭

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)7-1135-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.7.004

Effect of dandelion polysaccharide on migration and invasion of triple-negative breast cancer cells based on PI3K/Akt/GSK-3 β pathway

LIU Xiao-yan¹, LONG Feng^{1,2,3*}, ZHAO Yu¹, HOU Qian¹, YE Hai-lin¹, ZHOU Xuan¹, LI Xue¹

¹Gansu University of Chinese Medicine; ²Gansu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases;

³Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Disease and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Lanzhou 730000, China

Abstract: In this study, we investigated the molecular mechanism of dandelion polysaccharide (DP) inhibition of breast cancer cells by observing the effects of DP on the proliferation, migration and invasion of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. After treating human breast cancer MDA-MB-231 cells and normal breast epithelial cells MCF-10A with DP, the effect of different concentrations of DP (0, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cell viability was detected by CCK-8 meth-

od. the effect of DP on the clonogenic ability of breast cancer cells was detected by plate cloning assay. The effect of DP on the migration and invasion ability of breast cancer cells was examined by the scratch assay and Transwell assay. Western blotting was performed to detect phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), phosphorylated phosphatidylinositol 3 kinase (p-PI3K), protein kinase B (Akt), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β) protein expression, epithelial mesenchymal transition (EMT)-related marker proteins E-cadherin, N-cadherin and vimentin expression. The results showed that compared with the blank group, the DP group (100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was able to significantly inhibit the viability of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there was no significant effect on the viability of MCF-10A cells. compared with the blank group, the DP group (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was able to significantly reduce the ability of cell clone formation ($P < 0.01$). the DP group (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed significantly reduced migration and invasion ability ($P < 0.01$). the DP group (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed significantly reduced p-PI3K, p-Akt and p-GSK-3 β protein expression levels were decreased in the DP group (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared with the blank group ($P < 0.01$), while no significant changes were observed in PI3K, Akt and GSK-3 β total proteins. E-cadherin expression levels were upregulated, but N-cadherin and Vimentin expression levels were downregulated in the DP group (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared with the blank group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In conclusion, DP can effectively inhibit the proliferation, migration, invasion and EMT process of human breast cancer MDA-MB-231 cells, and the mechanism may be related to the inhibition of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway activity.

Key words: PI3K/Akt/GSK-3 β ; dandelion polysaccharide; breast cancer; proliferation; migration; invasion

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TN-BC)是一种雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子2受体(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)均为阴性的乳腺癌亚型,仅占有乳腺癌类型的15%~20%,但因其恶性程度高、侵袭性强、且缺乏特异性靶向药物,导致较其他类型乳腺癌更易复发、易转移,预后效果更差。目前,手术、放化疗仍是TNBC的主要治疗方法,但手术后仍面临复发与转移的风险,化疗药物毒副作用严重,易引起耐药性^[1]。因此,寻找新型高效靶向药物、筛选药物作用分子靶点、阐明药物靶向抗肿瘤分子机制无疑是目前临床治疗TNBC的有效策略。

近年来,中草药已成为抗肿瘤靶向药物的重要来源。与一般抗癌药物相比,传统中草药及其有效成分具有多靶点、多途径产生相互叠加或协同的抗癌药理活性特点,且具有易被机体吸收利用、毒副作用小等优势,已逐渐成为抗癌药物研发的热点^[2]。中药蒲公英为菊科植物蒲公英(*Taraxacum monogolicum* Hand. -Mazz)、碱地蒲公英(*T. borealisinense* Kitam)(或同属种植物)的一种干燥全草,具有清热解毒、消肿散结、利尿通淋的功效,可用于治疗乳痈、瘰疬、疔肿等疾病^[3]。传统中医临床研究发现,蒲公英在治疗乳腺癌^[4]、胃癌^[5]等多种恶性肿瘤中疗效显著。现代临床及药理学研究表明,蒲公英及其有效成分除了具有抗炎、抗氧化等药理活性外,其抗肿

瘤作用更为显著^[3]。蒲公英多糖(dandelion polysaccharide, DP)是从蒲公英根中提取的多糖类成分,由葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、葡糖糖醛酸组成^[6],具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化、降血糖、提高免疫力的药理活性^[7]。目前已有研究发现,DP可通过多靶点、多通路形式发挥其抗肿瘤药理学活性功能。DP可通过降低缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白的表达,从而抑制体内外肝癌血管生成^[6]。DP也可通过降低铁转运蛋白(Ferroportin)和铁负荷(iron burden)的表达抑制肝癌铁代谢,从而抑制HepG2和Huh7细胞的生长,同时,DP亦可显著降低肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织中的铁沉积^[8]。在乳腺癌中,DP能够通过抑制细胞增殖实现其对人乳腺癌MCF-7、SK-BR-3和T47D细胞的抑制作用^[9,10]。但目前关于DP抗TNBC的研究尚未见报道,且其抗肿瘤分子作用机制尚不清楚。

磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路异常激活已被证实与TNBC生长、迁移、侵袭和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)密切相关^[11]。PI3K是一种胞内磷酸酰肌醇激酶,能够被细胞外信号刺激激活,激活后的PI3K将Akt蛋白募集到细胞膜上,进而激活Akt蛋白,激活的Akt磷酸化下游底物糖原合成激酶-3 β (glycogen synthase

kinase-3 β , GSK-3 β), 使 GSK-3 β 失活, 失活的 GSK-3 β 参与多种信号通路的传递, 还诱导肿瘤细胞增殖、耐药性、迁移和侵袭, 是一种极具潜力和前景的药物靶点。迄今为止, 已经合成了大量 GSK-3 β 抑制剂, 但因大多数抑制剂选择性差, 并伴有副作用, 只有少数进入临床试验^[12], 故寻找高效、低毒的 PI3K/Akt/GSK-3 β 抑制剂对于治疗 TNBC 具有重要意义。EMT 是肿瘤细胞迁移和侵袭的关键过程, 在此过程中, 肿瘤细胞间的黏附性减弱, 上皮细胞特性减少, 而间质细胞特性增强, 使其能够进入血液循环侵袭其他器官。在分子水平上, 上皮样标志物 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达下降、间充质标志物 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 的表达增加即标志着细胞 EMT 的发生^[13], 因此, 寻找抑制 EMT 的药物成为阻止 TNBC 迁移和侵袭的必要条件。

因此, 本研究基于 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路, 以人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象, 通过观察 DP 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭及 EMT 的影响, 分析 DP 抗 TNBC 的关键分子作用靶点, 进而探寻 DP 抑制 TNBC 细胞增殖、迁移、侵袭的可能分子调控机制, 旨在为 DP 治疗乳腺癌提供药理学依据和科学参考, 为乳腺癌的临床治疗奠定科学理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 细胞系 (Procell, 批号: CL-0525); 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系 (Procell, 批号: CL-0150)。

1.1.2 药品

蒲公英多糖 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: SP5220, 纯度 $\geq 90\%$)。

1.1.3 试剂

MCF-10A 细胞专用培养基 (Procell, 批号: CM-0525); DMEM 高糖培养基、Trypsin-EDTA (0.25%) 溶液 (美国 Gibco 公司, 批号分别为: C11995500BT、25200-056); 胎牛血清 (南美 Lonsera 公司, 批号: S711-001S); 青霉素-链霉素混合溶液 (美国 Hy-Clone 公司, 批号: J180034); CCK-8 试剂盒 (日本同仁公司, 批号: CKO4); Transwell 小室和 Matrigel 基底胶 (美国 Corning 公司, 批号分别为: 3422、356234); 4 \times 蛋白上样缓冲液, 彩虹 245 广谱蛋白

Marker (北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为: PI016、PR1920); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 8% 和 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 12.5% (上海翌圣生物科技有限公司, 批号分别为: 20324ES62、20326ES62); 兔抗人 Vimentin 多克隆抗体、兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体 (ImmunoWay Biotechnology Company, 批号分别为: YT4879、YT1454); 兔抗人 N-cadherin 单克隆抗体、兔抗人 GSK-3 β 单克隆抗体、兔抗人 p-GSK-3 β 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为: ab76011、ab32391、ab75814); 兔抗人 GAPDH 多克隆抗体、兔抗人 p-PI3K 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Affinity 公司, 批号分别为: AF7021、AF3241、S0001)。兔抗人 PI3K 单克隆抗体、兔抗人 Akt 单克隆抗体、兔抗人 p-Akt 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology, 批号分别为: 4249T、4691T、4060T)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养细胞

MCF-10A 细胞在 MCF-10A 细胞专用培养基中培养, 培养条件为 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C。人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在 DMEM 高糖培养基中培养 (培养基中含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素), 培养条件为 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C。当细胞生长达到 80% ~ 90% 融合度后, 用 Trypsin EDTA 溶液消化, 离心 5 min, 按 1:2 进行传代再培养。

1.2.2 蒲公英多糖母液及工作液配置

将 DP 溶于双蒸水中, 制备成 $5 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ 的母液, 经 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌后分装保存在 -20 $^{\circ}$ C。实验过程中, 将母液稀释成 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 工作液, 加入或不加入含血清的 DMEM 培养液, 空白组用 DMEM 培养液处理。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力

取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化后, 制成单细胞悬液, 将 3×10^3 个细胞接种到 96 孔培养板中使其贴壁过夜, 将细胞更换为对照 (control, Con) 组和各种浓度 DP (100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$) 的新鲜培养基。设置空白组 (不含细胞和待测药物的培养基), 每组设 4 个复孔。分别处理 12、24 和 48 h, 随后加入 CCK-8 工作液 (10 μL /孔), 培养箱中放置 2.5 h 后, 酶标仪 450 nm 下测量吸光度值 (OD), 并按照公式 (1) 计算细胞存活率 (对照孔中的细胞活力被认为是 100%)。

细胞存活率 =

$$\left[\frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}})}{(OD_{\text{空白组}} - OD_{\text{空白组}})} \right] \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4 平板克隆实验检测克隆形成能力

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 在含有 DMEM 高糖培养基的 6 孔板中每孔接种 1×10^3 个细胞, 培养 24 h 后除去培养基, 设置 Con 组和不同浓度的 DP (200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组, 48 h 后, PBS 洗涤细胞并补充新鲜培养基, 然后将细胞常规培养 10 d 左右, 直至菌落大到足以显现。将菌落用 0.1% 结晶紫染色。采用相机拍摄并进行细胞克隆计数, 并按照公式(2)计算克隆形成率。

$$\text{克隆形成率} = \text{克隆细胞数} / \text{细胞接种数} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 划痕实验检测细胞迁移

使用 Mark 笔在 6 孔板的背面作均匀穿过孔的直线, 每孔穿过 3 条线。取对数生长期的细胞, 0.25% 胰酶消化后, 将细胞以 1×10^6 个/孔接均匀接种于 6 孔板中并加入完全培养基, 待细胞长到 80% ~ 90%, 更换为无血清培养基培养细胞 12 h。随后用 200 μL 的无菌枪头作每孔中预先所画横线的垂线, PBS 清洗 2 遍以除去漂浮的细胞, 随后加入不含血清的培养基, 于倒置显微镜拍下 0 h 划痕照片, 然后按“1.2.4”的分组处理细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下分别培养 24 h、48 h 后, 随机选择 3 个独立视野拍下划痕愈合的照片。按照公式(3)计算细胞迁移率。

$$\text{细胞迁移率} = (\text{0 h 的划痕面积} -$$

$$48 \text{ h 的划痕面积}) / \text{0 h 的划痕面积} \times 100\% \quad (3)$$

1.2.6 Transwell 实验检测细胞侵袭

按 1:8 的比例将 Matrigel 基质胶、DMEM 培养基稀释混匀, 取 40 μL 均匀铺于 Transwell 上室底部, 放于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 h 待其凝固, 吸去上清液后, 将按“1.2.4”的分组处理过的 MDA-MB-231 细胞浓度调整为 5×10^5 个/ mL 。取 100 μL 加入上室中, 下室每孔加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 500 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 结束后用棉签拭子擦除小室上层未侵袭的细胞, 4% 组织细胞固定液固定, 0.1% 结晶紫染色。最后, 倒置显微镜下随机选择 5 个区域进行拍照。

1.2.7 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测蛋白表达水平

将处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以每孔 5×10^5 个的密度接种在 6 孔板上, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、

5% CO_2 条件下培养过夜, 细胞贴壁后, PBS 清洗 2 遍, 然后按“1.2.4”的分组培养细胞 48 h, 收集细胞, 提取细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度, 按照说明书加入合适比例的 4 \times 蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min, 使蛋白变性。12 000 r/min 离心 5 min, 取上清并分装保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。准确吸取蛋白样品 30 μg 加至浓缩胶, 以 100 V 的电压分离一定的时间, 然后转移至 PVDF 膜上以 400 mA 恒定电流转膜 20 ~ 30 min; 5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min 后加入相应的一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 一抗包括 GAPDH (1:3 000)、PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:2 000)、GSK-3 β (1:5 000)、p-GSK-3 β (1:1 000)、E-cadherin (1:1 000)、N-cadherin (1:5 000)、Vimentin (1:1 000), 第二天, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:3 000) 于室温摇床孵育 2 h 后, TBST 清洗 3 次, 10 min/次, 使用 ECL 化学法显色, Western 印迹成像系统进行拍照, Image J 软件测定蛋白条带的灰度值, 进行统计分析。

1.2.8 统计学分析

最终数据采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, 多样本比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义, 所有实验独立重复三遍。

2 结果

2.1 蒲公英多糖对 MDA-MB-231 细胞活力的影响

以不同浓度的 DP 处理 MCF-10A、MDA-MB-231 细胞后发现, 在 MCF-10A 细胞中, 与 Con 组相比, DP 处理组细胞活力无明显变化; 在 MDA-MB-231 细胞中, 与 Con 组相比, DP 浓度为 100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞活力呈时间和剂量依赖性降低, 且分析得出, DP 在 12、24、48 h 对 MDA-MB-231 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 1 653.0、1 313.0、805.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图 1), 因此, 后续实验选择对 DP 抑制作用更为敏感的 MDA-MB-231 细胞。

2.2 蒲公英多糖对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响

与 Con 组相比, 200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DP 处理组的细胞克隆形成数目显著减少, 且 DP 浓度越高, 克隆形成数目越少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图 2)。

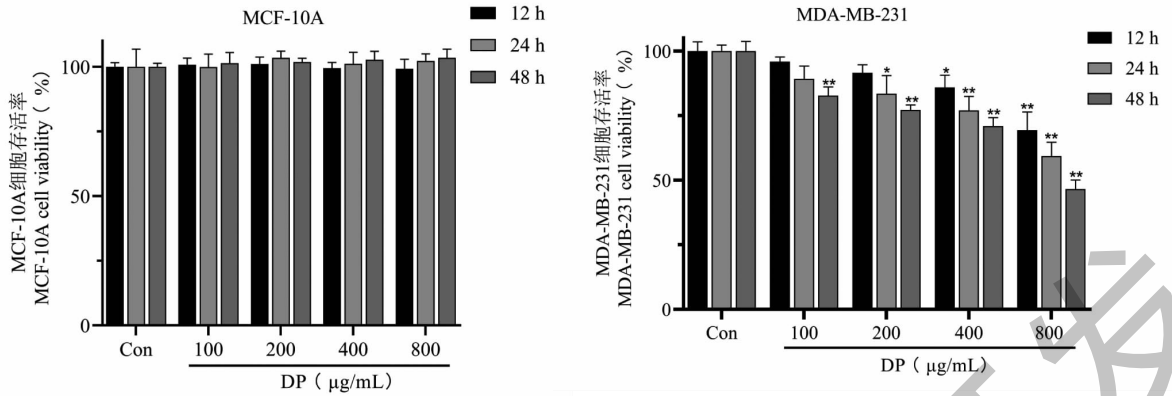


图1 DP对MCF-10A和MDA-MB-231细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 1 Effect of DP on the viability of MCF-10A and MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

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

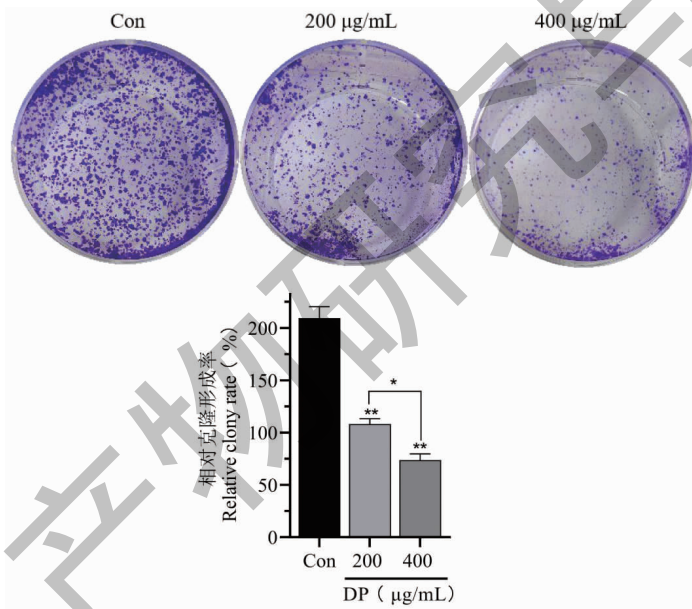


图2 DP对MDA-MB-231细胞克隆形成能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of DP on the clonogenic ability of MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 蒲公英多糖对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响

与Con组相比,200、400 $\mu\text{g/mL}$ DP处理组MDA-MB-231细胞的迁移能力显著下降,且呈时间和剂量依赖性,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(见图3)。

2.4 蒲公英多糖对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响

与Con组相比,200、400 $\mu\text{g/mL}$ DP处理组细胞侵袭能力显著降低,且呈剂量依赖性,差异具有统计学意义($P < 0.01$)(见图4)。

2.5 蒲公英多糖对MDA-MB-231细胞PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路关键蛋白表达的影响

与Con组相比,200、400 $\mu\text{g/mL}$ DP处理组细胞中p-PI3K、p-Akt及p-GSK-3 β 蛋白表达水平显著下调,差异具有统计学意义($P < 0.01$),而PI3K、Akt、GSK-3 β 蛋白的表达水平无明显变化(见图5)。

2.6 蒲公英多糖对MDA-MB-231细胞中EMT相关蛋白表达的影响

与Con组相比,200、400 $\mu\text{g/mL}$ DP处理组细胞中E-cadherin蛋白表达水平显著上调,N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显下调,且呈剂量依赖性,

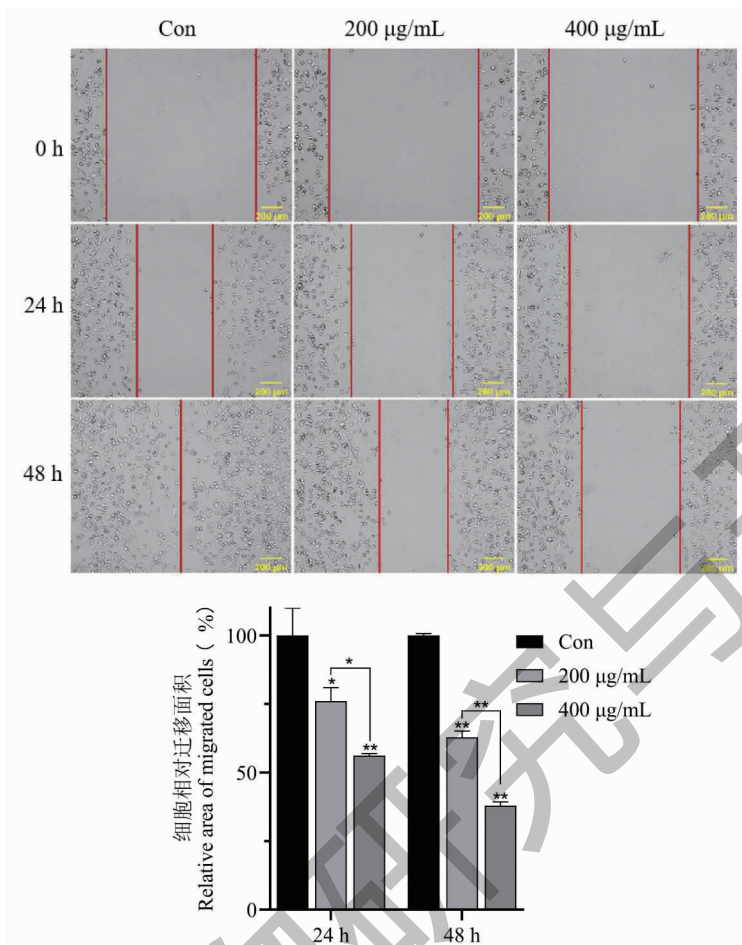


图3 DP对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响($200 \times, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of DP on the migration ability of MDA-MB-231 cells($200 \times, \bar{x} \pm s, n=3$)

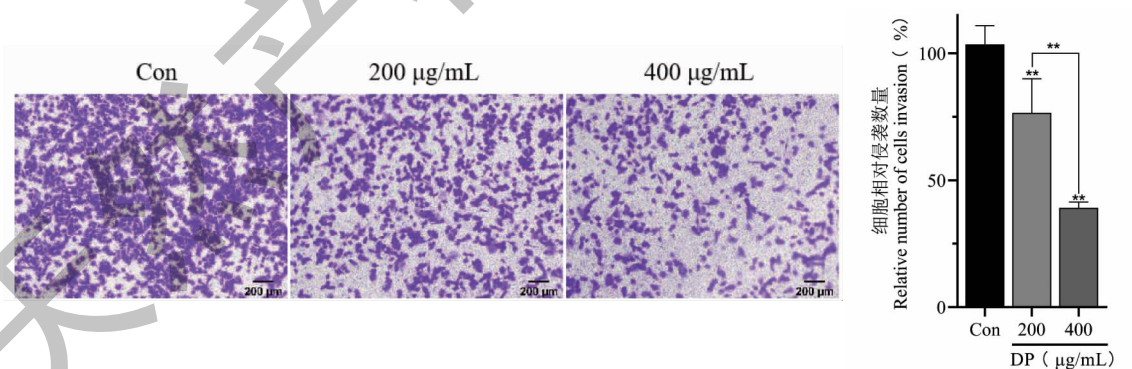


图4 DP对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响($200 \times, \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of DP on the invasive ability of MDA-MB-231 cells($200 \times, \bar{x} \pm s, n=3$)

差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见图6)。

3 讨论与结论

TNBC是一种侵袭性极强的乳腺癌,易复发和

转移、异质性强、缺乏有效治疗靶点。因此,深入解析驱动TNBC迁移、侵袭的潜在分子机制,并研发高效低毒的抗肿瘤新药是临床治疗TNBC的有效策略^[14]。已发现许多中药提取物及活性成分具有多

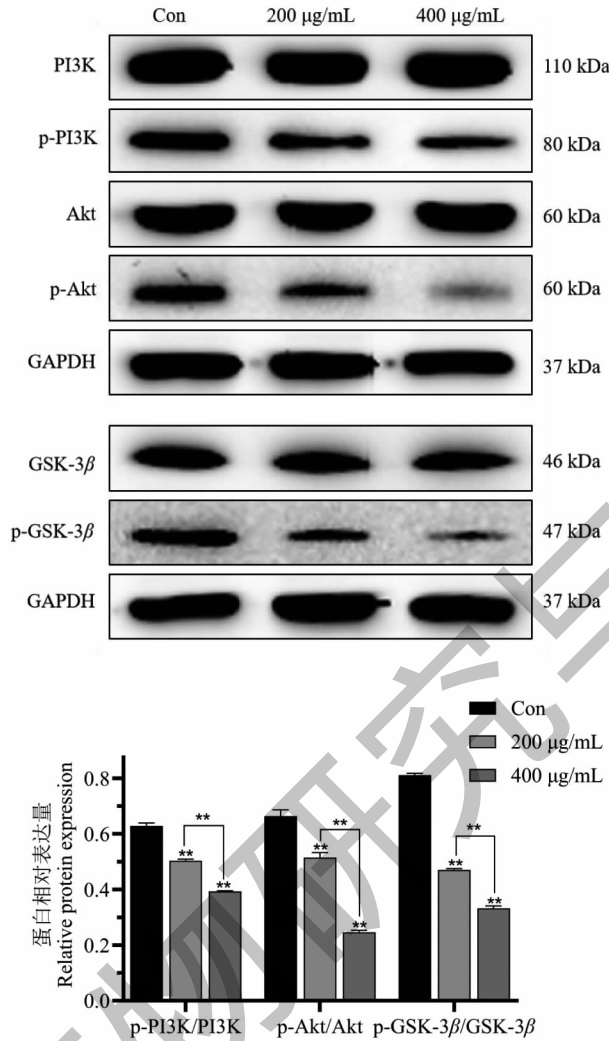


图5 DP对MDA-MB-231细胞PI3K/Akt/GSK-3 β 通路中关键蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of DP on expression levels of key proteins in PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in MDA-MB-231 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

途径、多靶点、高效低毒的抗肿瘤活性^[2]。研究表明,DP可以通过降低HIF-1 α 和VEGF的表达从而抑制肝癌血管生成^[6];此外,DP不仅可抑制人乳腺癌SK-BR-3、T47D细胞的增殖^[10],而且还可通过下调凋亡相关蛋白P53、Bcl-2的表达、上调Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated x protein, Bax)的表达而抑制人乳腺癌MCF-7的细胞增殖、诱导细胞凋亡^[9]。本研究首次揭示DP具有抗TNBC的药理活性作用,发现DP可抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭,而对正常乳腺上皮细胞MCF-10A未见显著性毒性。

PI3K/Akt信号通路在恶性肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭和血管生成中发挥重要调控作用。PI3K/Akt信号通路的异常激活是最常见的致癌因

素之一,而在三阴性乳腺癌中,大约25%~30%患者中存在PI3K/Akt的激活突变,这意味着PI3K/Akt信号通路可能是TNBC治疗的有效靶点^[15]。已有研究表明,激活PI3K/Akt信号通路可促进乳腺癌细胞MCF-7和BT-20的细胞增殖、迁移和侵袭^[16],而抑制PI3K/Akt通路可诱导乳腺癌细胞自噬和凋亡^[17]。在本研究中,我们发现DP能够下调MDA-MB-231细胞中p-PI3K、p-Akt蛋白表达水平,提示DP可抑制该细胞PI3K/Akt信号通路的激活。此外,GSK-3是PI3K/Akt的下游底物,GSK-3是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,有GSK-3 α 和GSK-3 β 两个主要亚型,GSK-3 α 主要参与糖原代谢过程,GSK-3 β 则与癌症进程密切相关,它在包括乳腺癌在内的多种癌症中过度表达。p-Akt可将GSK3 β 磷酸化,

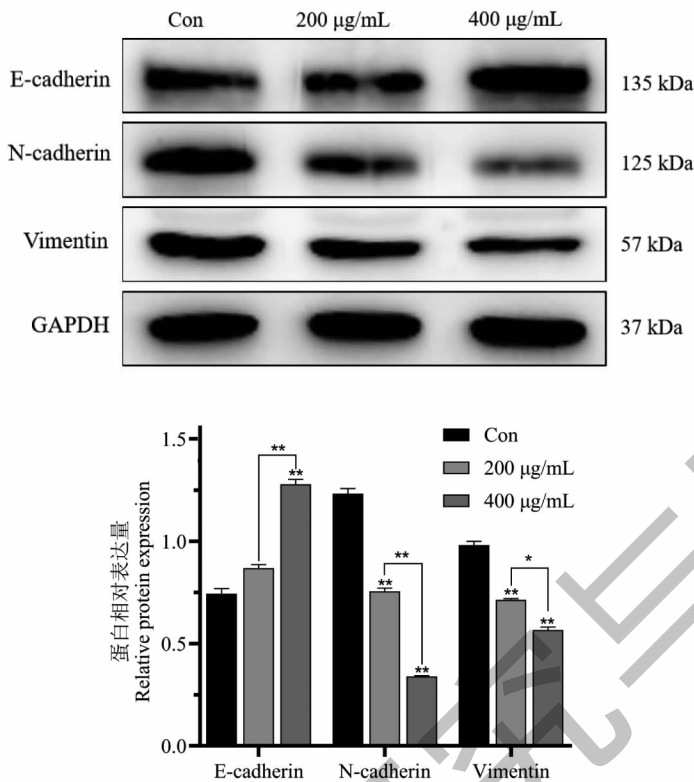


图6 DP对MDA-MB-231细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of DP on E-cadherin, N-cadherin, Vimentin protein expression levels in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

从而促进肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭^[18]。因此,抑制PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路的活性是抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的关键。本研究观察了DP对MDA-MB-231细胞中GSK-3 β 蛋白表达的影响,结果显示,DP显著降低了MDA-MB-231细胞中p-GSK-3 β 蛋白表达水平。由此可推测,DP抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭的分子机制可能与阻断PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路有关。

EMT进程是肿瘤细胞迁移和侵袭的重要机制之一,它与细胞间连接的结构变化有关,在分子水平上,上皮样标志物E-cadherin表达降低、间充质标志物N-cadherin和Vimentin表达升高标志着细胞EMT进程的发生。在EMT进程中,肿瘤细胞从无固定上皮表型转变为活动性和浸润性间充质表型,一旦激活EMT进程,肿瘤细胞就会发生一系列变化,包括紧密连接的溶解、顶端-基底极性的破坏和细胞骨架结构的重塑,这些变化都有利于肿瘤细胞迁移和侵袭^[19]。TNBC体内外研究显示,抑制Akt/GSK-3 β 信号通路可有效增加E-cadherin的表达和降低N-cadherin和Vimentin的表达水平,从而逆转

EMT进程^[20]。本研究结果显示,在MDA-MB-231细胞中,DP以剂量依赖的方式上调E-cadherin的表达、下调了N-cadherin和Vimentin的表达水平,表明DP可阻止该细胞EMT进程。

综上所述,DP可显著抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移、侵袭和EMT,这种抑制作用可能是通过抑制PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路来实现的,这为DP成为一种潜在的抗乳腺癌新药提供了新的靶向依据。目前的研究虽已表明DP发挥抗乳腺癌作用是通过多途径、多靶点实现的,但乳腺癌增殖、迁移和侵袭的分子调控机制复杂,其抗乳腺癌的具体作用机制还需进一步探究。此外,本研究只为DP通过抑制PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路抑制TNBC细胞增殖、迁移、侵袭和EMT提供了体外实验依据,若要更深入地揭示DP抗TNBC的分子作用机制,还需通过动物体内实验进一步验证。

参考文献

- 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]. Proc Natl Acad Sci USA,

- 2022, 119; e2114851119.
- 2 Yang MH, Baek SH, Ha IJ, et al. Brassinin enhances the anticancer actions of paclitaxel by targeting multiple signaling pathways in colorectal cancer cells[J]. *Phytother Res*, 2021, 35:3875-3885.
 - 3 Zhang SB, Kong LJ, Gu W, et al. A network pharmacological study on the analysis of chemical components of *Taraxacum officinale* and its anti-cancer mechanism based on HPLC-Q-TOF-MS/MS technique[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2022, 34:305-314.
 - 4 Liu BXZ, Jin ZC, Shao J, et al. Professor Wang Ruiping's experience in treating malignant tumors by using antidote to disperse nodules[J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*(陕西中医), 2021, 42:1601-1606.
 - 5 Chen Y, Xu M, Zhou LM, et al. Analysis of Chinese medicine symptoms in 76 patients with multiple tumors and analysis of Lin Shengyou's medication pattern[J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*(浙江中西医结合杂志), 2022, 32:364-367.
 - 6 Ren F, Wu K, Yang Y, et al. Dandelion polysaccharide exerts anti-angiogenesis effect on hepatocellular carcinoma by regulating VEGF/HIF-1 α expression[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:460.
 - 7 Liu WX, Chen S, Liu L, et al. Research progress of dandelion polysaccharide[J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2020, 41:214-219.
 - 8 Ren F, Yang Y, Wu K, et al. The effects of dandelion polysaccharides on iron metabolism by regulating hepcidin via JAK/STAT signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 7184760.
 - 9 Niu H. Effect of dandelion polysaccharide on proliferation and apoptosis of breast cancer cells[D]. Jinan: Shandong University(山东大学), 2017.
 - 10 Tian MM, Liu Y, Xiu HN, et al. Effect of dandelion extract on the proliferation of SK-BR-3 and T47D breast cancer cells [J]. *Jilin J Tradit Chin Med*(吉林中医药), 2020, 40:1343-1347.
 - 11 Yang Y, Gao M, Lin Z, et al. DEK promoted EMT and angiogenesis through regulating PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8:98708-98722.
 - 12 Liu R, Chen Y, Liu G, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11:797.
 - 13 Zhang H, Wang J, Yin Y, et al. The role of EMT-related lncRNA in the process of triple-negative breast cancer metastasis[J]. *Biosci Rep*, 2021, 41:BSR20203121.
 - 14 Shao F, Pang X, Baeg GH. Targeting the JAK/STAT signaling pathway for breast cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28:5137-5151.
 - 15 Pascual J, Turner NC. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30:1051-1060.
 - 16 Qu J, Li J, Zhang Y, et al. AKR1B10 promotes breast cancer cell proliferation and migration via the PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11:163.
 - 17 Abdullah ML, Al-shabanah O, Hassan ZK, et al. Eugenol-induced autophagy and apoptosis in breast cancer cells via PI3K/AKT/FOXO3a pathway inhibition[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22:9243.
 - 18 Jin F, Wu Z, Hu X, et al. The PI3K/Akt/GSK-3 β /ROS/eIF2B pathway promotes breast cancer growth and metastasis via suppression of NK cell cytotoxicity and tumor cell susceptibility[J]. *Cancer Biol Med*, 2019, 16:38-54.
 - 19 Zhang N, Ng AS, Cai S, et al. Novel therapeutic strategies: targeting epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2021, 22:e358-e368.
 - 20 He Y, Sun MM, Zhang GG, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6:425.