

· 基础研究 ·

鸡血藤通过调控 SNX9 及 β -catenin 抑制
三阴性乳腺癌细胞转移的作用机制姜 洋¹ 刘青青² 张 峰² 陈建萍²

摘要 目的 探索鸡血藤对乳腺癌细胞迁移及侵袭能力的影响,以及抑制三阴性乳腺癌转移发生可能的作用机制。方法 采用不同浓度(25、12.5、6.25、3.12、1.56 $\mu\text{g/mL}$)的鸡血藤提取物,干预三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231-luc,另设空白对照组。利用细胞划痕实验、Transwell 实验检测其对细胞迁移能力及侵袭能力的影响。利用 Western Blot 检测不同浓度鸡血藤提取物干预后,乳腺癌细胞中的分类连接蛋白 9(SNX9)和 β -catenin 的表达水平。结果 与空白对照组同期比较,12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 6 h 细胞迁移率降低($P<0.05$);3.12、6.25、12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 12 h 后细胞迁移率降低($P<0.05$, $P<0.01$);各剂量组给药 24 h 后细胞迁移率均降低($P<0.05$, $P<0.01$);3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组 β -catenin 表达降低($P<0.05$);25 $\mu\text{g/mL}$ 组 SNX9 表达增加($P<0.05$), β -catenin 表达降低($P<0.01$)。与 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 组同期比较,12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 12 h 后细胞迁移率降低($P<0.05$)。与 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,25 $\mu\text{g/mL}$ 组 β -catenin 表达降低($P<0.05$)。结论 鸡血藤可抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231-luc 的迁移及侵袭能力,其机制与调控 SNX9 及 β -catenin 表达有关。

关键词 鸡血藤; 乳腺癌 MDA-MB-231-luc 细胞; 迁移; 侵袭

Role and Mechanism of *Spatholobi Caulis* on Invasion and Migration of Triple Negative Breast Cancer Cell MDA-MB-231-luc JIANG Yang¹, LIU Qing-qing², ZHANG Feng², and CHEN Jian-ping²
1 Department of Traditional Chinese Medicine, Beijing Jishuitan Hospital(100035); 2 School of Traditional Chinese Medicine, Hong Kong University(999077)

ABSTRACT Objective To investigate the role of *Spatholobi Caulis*(SC) on invasion and migration of MDA-MB-231-luc, and to explore the possible mechanism of inhibiting breast cancer metastasis. **Methods** Different concentrations (0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$) of SC were selected for culturing MDA-MB-231-luc. And a blank control group was setup. The wounding healing assay and Transwell assay were used to examine changes of biological behaviors of MDA-MB-231-luc. Western Blot was used to determine the protein expression of sorting netin 9(SNX9) and β -catenin. **Results** Compared with the blank control group at the same time, the cell migration rate of the 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$ groups reduced after 6 hours ($P<0.05$); the cell migration rate of the 3.12, 6.25, 12.5, and 25 $\mu\text{g/mL}$ groups reduced ($P<0.05$, $P<0.01$); the cell migration rate of each dose group decreased after 24 hours of administration ($P<0.05$, $P<0.01$); β -catenin expression decreased in 3.12 $\mu\text{g/mL}$ group ($P<0.05$); SNX9 expression in 25 $\mu\text{g/mL}$ group increased ($P<0.05$), and β -catenin expression decreased ($P<0.01$). Compared with the 1.56 $\mu\text{g/mL}$ group at the same period, the cell migration rate of the 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$ groups decreased after 12 hours of administration ($P<0.05$). Compared with the 3.12 $\mu\text{g/mL}$ group, the expression of β -catenin decreased in the 25 $\mu\text{g/mL}$ group ($P<0.05$). **Conclusions** SC could inhibit the invasion and migration rate of MDA-MB-231-luc, the mechanism might be related to regulating the expression of SNX9 and β -catenin

KEYWORDS *Spatholobi Caulis*; MDA-MB-231-luc; invasion; migration

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81573663)

作者单位: 1. 北京积水潭医院中医科(北京 100035); 2. 香港大学中医药学院(香港 999077)

通讯作者: 陈建萍, Tel: 0852-95147068, Email: abchen@hku.hk

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200928. 186

乳腺癌是全球女性发病率较高的肿瘤之一,随着治疗手段的不断改进,乳腺癌患者的生存时间不断延长。但在晚期乳腺癌患者中,骨转移的发生率为 65%~75%^[1],肺转移的发生率约为 30%。而分类连接蛋白 9(sorting netin 9, SNX9)作为调控肿瘤细胞伪足生成及细胞侵袭和迁移的关键因子,被肿瘤界高度重视^[2]。本研究团队前期发现,鸡血藤(*Spatholobi Caulis*, SC)可明显抑制乳腺癌的增殖^[3]。故本研究旨在验证 SC 是否可以减低乳腺癌转移的发生率,并探索 SC 抑制乳腺癌转移发生可能的作用机制。

材料与方法

1 实验细胞 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231-luc,由中山大学肿瘤医院惠赠。于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中、37 ℃、5% CO₂ 细胞实验条件下常规培养。

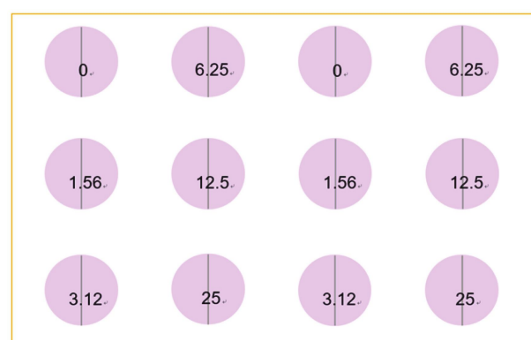
2 药物 本实验中 SC 药材产地广西,由香港大学中医药学院提供。经香港大学中医药学院陈建萍教授团队鉴定为豆科密花豆属植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn)的藤茎。采用低温渗漉法制作 SC 提取物,测定 SC 中的总黄酮和缩合鞣质的含量,作为 SC 药材的质量控制方案^[4]。

3 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基(货号:11960051)、胎牛血清(货号:12484028)、胰酶(货号:25200056)均购自美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(货号:2650)购自美国 Sigma 公司;Transwell 小室(货号:3402)购自美国 Corning 公司;Matrigel(货号:356234)购自美国 BD 公司;小鼠抗人 SNX9 单克隆抗体(货号:ab181856)、小鼠抗人 β -catenin 单克隆抗体(货号:ab32572)、小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(货号:ab8245)均购自美国 Abcom 公司;RIPA 蛋白裂解液(货号:P0013B)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:P0010)均购自碧云天生物技术有限公司。倒置显微镜,型号:BX43(日本 Olympus 公司),-80 ℃超低温冰箱,型号:MDF-U54V(日本 Panasonic 公司)。

4 药物配制 用 6 孔板稀释药物。根据前期研究^[5],先取 SC 水提物粉末 20 mg 溶解在 10 mL 培养基内,浓度 2 mg/mL,再 10 倍稀释至 200 μ g/mL,过滤除菌后,8 倍稀释至 25 μ g/mL。之后等梯度稀释至 12.5、6.25、3.12、1.56 μ g/mL。

5 细胞划痕实验 根据预实验结果,调整处于对数生长期的 MDA-MB-231-luc 乳腺癌细胞浓度至 1.5×10^5 个/mL。在 12 孔板中,每孔内加入 1 mL 细胞悬液,即 1.5×10^5 个细胞。将种板后的细胞置于

37 ℃、5% CO₂ 孵育箱中培养 24 h。培养过夜的细胞从孵育箱中取出,观察是否铺满板底。铺满后用 200 μ L 枪头沿直尺按图 1 划痕,枪头要垂直,不能倾斜,力量适中。划痕后显微镜下观察划痕是否成功,是否笔直。吸取培养基,用 PBS 轻柔地洗细胞 3 次,祛除划下的细胞。加 PBS 时枪头尽量贴壁,流速尽量缓慢,防止细胞被吹散。吸出 PBS 后缓慢轻柔地加入配好的含药饥饿血清培养基。给药后马上拍照,此为 0 h。拍照后将细胞培养板放入 37 ℃、5% CO₂ 孵育箱中培养。分别在给药后 6、12、24 h 拍照,观察细胞迁移率。



注:圈内数字代表添加药物浓度,竖线为划痕,每 6 个孔为 1 组,重复 1 次

图 1 十二孔板细胞划痕实验示意图

6 Transwell 侵袭实验 待测细胞培养至对数生长期,消化细胞,用 PBS 和无血清培养基先后洗涤 1 次,用无血清培养基悬浮细胞,计数。调整细胞浓度为 3×10^5 个/mL。在 Transwell 上室加入 100~150 μ L 细胞悬液,在下室加入 600~800 μ L 完全培养基,继续孵育 24 h;取出 Transwell,慢慢吸出上层培养基,PBS 洗 2 遍,将其浸泡在 4% 多聚甲醛溶液中,室温下 2 min,取出在 PBS 中清洗 2 遍。将其下表面浸泡在 70% 甲醇溶液中,固定 30~60 min,PBS 清洗 2 遍。用结晶紫避光染色 20 min。PBS 洗 3 遍以上。取出 Transwell 小室,用棉签擦去 PVDF 膜靠近内室侧的细胞。在显微镜下观察细胞。

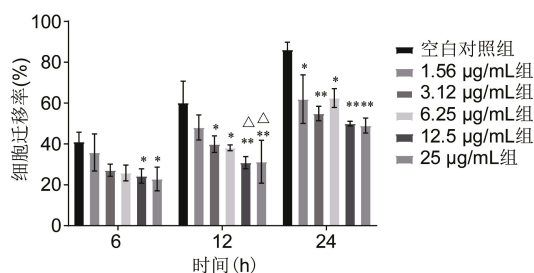
7 Western Blot 检测 MDA-MB-231-luc 细胞 SNX9、 β -catenin 表达水平 提取组织总蛋白,加入 RIPA 及蛋白酶抑制剂裂解细胞,检测蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜后 BSA 封闭过夜后,分别加入 SNX9、 β -catenin 的一抗(兔单克隆抗体,1:2 000)。4 ℃过夜后 TBST 摇洗 5 遍,加入二抗(山羊多克隆抗兔,1:10 000)室温下反应 2 h。显影拍照后分析。

8 统计学方法 划痕实验和 Transwell 实验利用 Imaging J 软件进行图像分析,Western Blot 用

Imaging Lab 进行图像分析,所有结果数据均采用 SPSS 22.0 及 GraphPad Prism7 进行数据统计分析,每次实验重复 3 次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验,方差不齐时采用 *Tamhanes T2* 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 MDA-MB-231-luc 细胞迁移率比较(图 2、3) 在细胞划痕实验中,6 组不同干预的 MDA-MB-231-luc 细胞的迁移率在不同时间点存在差异。与空白对照组同期比较,12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 6 h 细胞迁移率降低($P < 0.05$);3.12、6.25、12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 12 h 后细胞迁移率降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);各剂量组给药 24 h 后细胞迁移率均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 组同期比较,12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$ 组给药 12 h 后细胞迁移率降低($P < 0.05$)。



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 1.56 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 各组 MDA-MB-231-luc 细胞迁移率比较

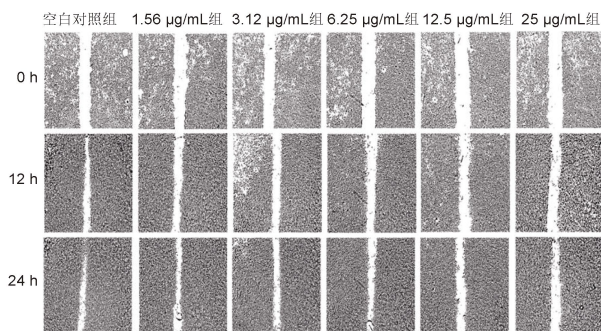


图 3 各组 MDA-MB-231-luc 细胞迁移率比较

2 各组细胞侵袭能力比较(图 4) 在细胞侵袭 Transwell 实验中,两组不同干预的 MDA-MB-231-luc 细胞的在干预 24 h 后表现出明显差异。空白对照组通过 Transwell 小室的细胞数较 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组明显增多。

3 各组细胞 SNX9 及 β -catenin 表达水平比较(图 5) 与空白对照组比较,3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组 β -catenin 表达降低($P < 0.05$);25 $\mu\text{g/mL}$ 组 SNX9 表达增加($P < 0.05$), β -catenin 表达降低($P < 0.01$)。与 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,25 $\mu\text{g/mL}$ 组 β -catenin 表达降低($P < 0.05$)。

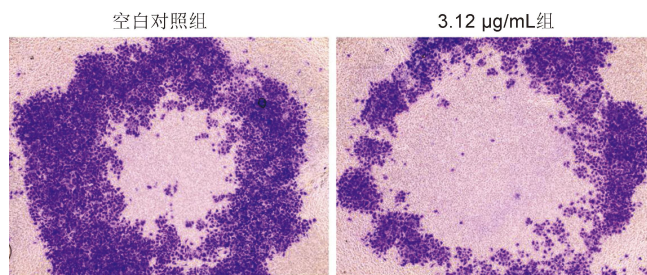
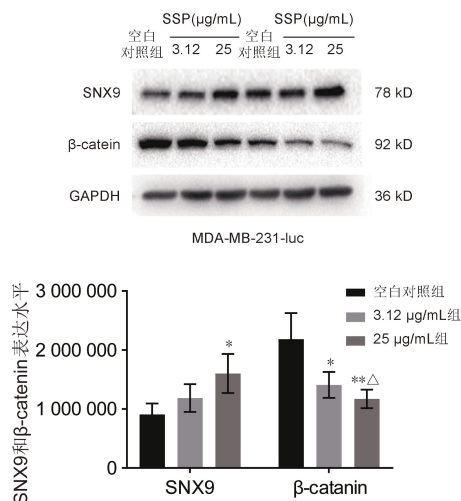


图 4 各组细胞侵袭能力比较



注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 5 各组细胞 SNX9 及 β -catenin 表达水平比较

讨 论

乳腺癌属中医“乳岩”范畴。一般发生在绝经妇女,近些年发病年龄亦有年轻化的趋势。三阴性乳腺癌指的是雌激素受体、孕激素受体和原癌基因 HER2 均无表达的乳腺癌,被认为是一种独立的临床病理类型,以侵袭性强、预后较差为主要特征。三阴性乳腺癌患者远处转移发生率显著增高,其中以肺转移及肝转移为主,而且三阴性乳腺癌患者的 5 年无病生存率和总生存率显著低于非三阴乳腺癌患者^[6]。目前虽进行了大量相关的临床试验,但仍然没有发现有针对性的治疗方案^[7]。

《药典》明确指出中药 SC 归肝、肾经,具活血补血,调经止痛,舒筋活络之功。本研究团队聚集 SC 的

研究近 20 年, 积累丰富, 包括提取、成分、代谢、分布以及抑制乳腺癌的工作, 利用探索肿瘤细胞迁移和侵袭能力的常用实验方法: 细胞划痕实验和 Transwell 实验来检测在不同药物浓度的干预下, 是否对肿瘤细胞产生影响。细胞划痕实验的原理是借鉴体外细胞致伤愈合实验模型, 利用细胞划痕法测定了肿瘤细胞的运动特性。Transwell 实验的原理是将 Transwell 小室分为内室和外室, 由于内外室营养成分的不同, 利用细胞对营养物质的趋化性及聚碳酸酯膜的通透性, 研究药物对细胞运动和侵袭的影响。细胞划痕实验显示, 不同浓度的 SC (3.12、6.25、12.5 及 25 $\mu\text{g/mL}$) 均可抑制 MDA-MB-231-luc 的迁移。本团队前期研究发现, 浓度为 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 的 SC 不会对正常 10A 细胞的生长和增殖产生影响。故根据细胞划痕实验, 本研究选取实验结果阳性且最小剂量 3.12 $\mu\text{g/mL}$ 作为 Transwell 的实验浓度。与空白对照组比较, SC 组可透过 matrigel 及聚碳酸酯膜的数量明显小于空白对照组, 说明 SC 干预后, MDA-MB-231-luc 细胞的侵袭能力明显降低。从体外实验中观察到 SC 可明显抑制 MDA-MB-231-luc 迁移及侵袭能力。

为探索其可能的作用机制, 本研究选取了与肿瘤细胞转移密切相关的两个关键蛋白: SNX9 与 β -catenin, 通过观察不同浓度 SC 干预后, 是否会影响蛋白的表达水平。有研究认为, SNX9 通过调控 RhoGTPases 通路促进乳腺癌细胞的转移^[8]。随后, 其团队又发现, SNX9 能够负向调节乳腺癌细胞侵袭性伪足的形成和功能, 在原发乳腺肿瘤中相对于癌旁正常组织的表达降低, 在非小细胞肺癌侵袭性更强的阶段亦会逐渐降低^[9]。由于 SNX9 的表达在肿瘤中呈现了多样化的特征, 更加突出了其作为肿瘤细胞行为调控因子的重要性。Wnt/ β -catenin 是调控肿瘤形成及转移的经典通路之一, 在乳腺癌中亦是如此^[10-12]。肿瘤组织中 β -catenin 的表达水平要远高于癌旁正常组织。本研究发现, SNX9 在 SC 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时表达明显增加。 β -catenin 在 SC 浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时表达明显减少。说明 SC 可显著调控乳腺癌细胞中 SNX9 与 β -catenin 的表达水平, 为进一步深入探索提供依据。

综上所述, SC 水提物可抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231-luc 的迁移及侵袭能力, 亦可调控 SNX9 及 β -catenin 的表达水平。但是, 乳腺癌的侵袭转移是一个多基因、多靶点、多因素、多步骤共同作用的结果, 需要进一步探索侵袭转移机制, 进一步发掘中医药防治乳腺癌转移的潜力。

利益冲突: 不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 江泽飞, 陈佳艺, 牛晓辉, 等. 乳腺癌骨转移和骨相关疾病临床诊疗专家共识 (2014 版) [J]. 中华医学杂志, 2015, 95(4): 241-248.
- [2] Bendris N, Schmid SL. Endocytosis, metastasis and beyond: multiple facets of SNX9 [J]. Trends Cell Biol, 2017, 27(3): 189-200.
- [3] Wang ZY, Wang DM, Loo TY, et al. *Spatholobus suberectus* inhibits cancer cell growth by inducing apoptosis and arresting cell cycle at G2/M checkpoint [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(2): 751-758.
- [4] 程悦, 符影, 王志宇, 等. 鸡血藤提取物中缩合鞣质的含量测定及其抗肿瘤活性初步研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2011, 50(2): 75-80.
- [5] Peng F, Tang H, Liu P, et al. Isoliquiritigenin modulates miR-374a/PTEN/Akt axis to suppress breast cancer tumorigenesis and metastasis [J]. Sci Rep, 2017; 9022. doi: 10.1038/s41598-017-08422-y.
- [6] 袁中玉, 王树森, 高岩, 等. 305 例三阴性乳腺癌患者的临床特征及预后因素分析 [J]. 癌症, 2008, 27(6): 561-565.
- [7] 张继博, 史业辉, 贾勇圣, 等. 三阴性乳腺癌治疗进展 [J]. 肿瘤, 2017, 37(7): 788-794.
- [8] Bendris N, Williams KC, Reis CR, et al. SNX9 promotes metastasis by enhancing cancer cell invasion via differential regulation of RhoGTPases [J]. Mol Biol Cell, 2016, 27(9): 1409-1419.
- [9] Bendris N, Stearns CJ, Reis CR, et al. Sorting nexin 9 negatively regulates invadopodia formation and function in cancer cells [J]. J Cell Sci, 2016, 129(14): 2804-2816.
- [10] Pei YY, Li GC, Ran J, et al. Kinesin family member 11 enhances the self-renewal ability of breast cancer cells by participating in the Wnt/ β -catenin pathway [J]. J Breast Cancer, 2019, 22(4): 522-532.
- [11] Fatima I, El-Ayachi I, Playa HC, et al. Simultaneous multi-organ metastases from chemo-resistant triple-negative breast cancer are prevented by interfering with WNT-signaling [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(12): 2039.
- [12] Li K, Zhang J, Tian Y, et al. The Wnt/ β -catenin/VASP positive feedback loop drives cell proliferation and migration in breast cancer [J]. Oncogene, 2020, 39(11): 2258-2274.

(收稿: 2020-03-20 在线: 2020-10-24)

责任编辑: 赵芳芳