

三七总皂苷联合三苯氧胺对人乳腺癌细胞的抑制作用及对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的影响

李军, 黄梅, 石新蕾

(广州中医药大学第一附属医院乳腺科, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨三七总皂苷(PNS)联合三苯氧胺(TAM)对人乳腺癌细胞的抑制作用及对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的影响。方法 70 只裸鼠于右胸部皮下接种乳腺癌 LCC₂ 细胞,选取造模成功的 66 只裸鼠随机分为 6 组,每组 11 只,分别为模型对照组、单纯 5 mg · kg⁻¹ TAM 组、100 mg · kg⁻¹ PNS 组、200 mg · kg⁻¹ PNS 组、5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组、5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组、连续给药 30 d,每周记录裸鼠体质量,肿瘤抑制率,给药结束后分离瘤体并称重,观察瘤体病理组织学结果,采用免疫组化法检测 HER-2,谷胱甘肽 S 转移酶(GST-π)及天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)的表达情况。结果 与 TAM 组相比较,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组和 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组肿瘤抑制率均大于单纯 TAM 组($P < 0.05$),5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组和 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 HER-2 及 GST-π 表达水平显著低于单纯 TAM 组($P < 0.05$),Caspase-3 表达显著高于单纯 TAM 组($P < 0.05$)。结论 PNS 能显著增加 TAM 抗乳腺癌的作用,其机制可能与调控 mTOR 信号通路有关。

关键词:三七总皂苷;乳腺癌;mTOR 信号通路;HER-2;谷胱甘肽 S 转移酶;天冬氨酸蛋白水解酶

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.10.007

The inhibitory effect of panax notoginseng saponins in combination with tamoxifen on human breast cancer cells and the effect on PI3K-AKT-mTOR signaling pathway

LI Jun, HUANG Mei, SHI Xinlei

(Department of Galactophore, The First Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Panax Notoginseng Saponins in combination with Tamoxifen on human breast cancer cells and the effect on PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. **Methods** 70 nude mice were inoculated subcutaneously in the right breast with LCC₂ cells. The 66 successful modeling nude mice were randomly divided into 6 groups and there were 11 rats in each group: model control group, 5 mg · kg⁻¹ TAM group, 100 mg · kg⁻¹ PNS group, 200 mg · kg⁻¹ PNS group, 5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS group, 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS group, administrated for 30 days. The weight of nude mice and tumor inhibitory rate were recorded per week. After the end of administration, the tumor was isolated and weighed. The histopathological results were observed and the expression of HER-2, GST-π and Caspase-3 were determined by immunohistochemistry. **Results** Compared to the TAM group, the tumor inhibition rates of 5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS group and 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS group were significantly higher than that in TAM group ($P < 0.05$). The expressions of HER-2 and GST-π were significantly lower than that in TAM ($P < 0.05$) and the expression of Caspase-3 was significantly higher than that in TAM ($P < 0.05$). **Conclusions** PNS can increase the effect of TAM to confront breast cancer, which mechanism may be associated with the regulation of mTOR signaling pathway.

Key words: PNS; Breast cancer; mTOR signaling pathway; HER-2; GST-π; Caspase-3

基金项目:广东省中医药管理局科研课题(20142043)

[8] 曹振平, 凌斌, 冯定庆. 去乙酰化酶抑制剂抗肿瘤作用研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2010, 37(4): 267-270.

[9] 黄庆, 胡荣林, 焦兴元, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过 Snail 诱导肝卵细胞上皮-间质转化[J]. 中华肝胆外科杂志, 2012, 18(12): 926-932.

[10] JIANG GM, WANG HS, ZHANG F, et al. Histone deacetylase inhibitor

induction of epithelial-mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression[J]. BBA, 2013, 1833(3): 663-671.

[11] KONG DJ, AHMAD A, BAO B, et al. Histone deacetylase inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45045.

(收稿日期: 2017-02-12, 修回日期: 2017-03-25)

乳腺癌是全球女性高发的恶性肿瘤之一,发病范围极广^[1],内分泌治疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分,而三苯氧胺(TAM)是乳腺癌内分泌治疗的金标准^[2]。有研究显示,临床上有40%左右的乳腺癌患者不能获益,有相当一部分患者治疗失败是由于治疗后期获得性的TAM耐药导致的。TAM耐药与许多机制相关,其中,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路是参与乳腺癌耐药的最重要通路之一,mTOR信号通路广泛存在于正常细胞和恶性肿瘤细胞中,是参与细胞生长、增殖和分化调节的重要信号传导通路,乳腺癌细胞PI3K-AKT-mTOR通路活性的增强与内分泌耐药密切相关,可成为靶向治疗的位点^[3-4],因此,mTOR信号通路是乳腺癌治疗的一个重要环节。

三七总皂苷(PNS)是从五加科人参属多年生草本植物三七中提取的主要有效成分,在心脑血管系统、中枢神经系统、血液系统、免疫系统等方面具有广泛作用,前期研究证明PNS具有逆转耐药,抑制乳腺癌细胞生长,促进细胞凋亡等作用,然逆转机制尚不明确^[5]。人类HER-2基因在乳腺癌的发病过程中意义重大,30%左右的乳腺癌患者存在HER-2蛋白过表达,且HER-2蛋白过表达患者预后差,致死率高^[6-7]。谷胱甘肽S转移酶(GST- π)是肿瘤的特征性酶,在乳腺癌中表达率极高,能通过促进化疗药物的代谢而降低细胞毒作用,在肿瘤的发病进程中具有重要意义^[8-9]。含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)是一种介导细胞凋亡的蛋白水解酶,许多肿瘤的治疗都是通过Caspase-3实现的^[10-11]。本研究旨在探讨PNS联合TAM对人乳腺癌细胞的抑制作用及对PI3K-AKT-mTOR信号通路相关蛋白HER-2、GST- π 及细胞凋亡相关蛋白Caspase-3的影响,探究PNS逆转乳腺癌耐药的机制,为临床提供中药靶点逆转乳腺癌耐药的实验基础,使中药筛选高效低毒的多药耐药逆转剂成为可能。

1 材料与方法

1.1 药物 PNS(山西普德药业股份有限公司,批号:HB2016109);TAM(TAM,美国Sigma公司,批号:4319028)。

1.2 动物和细胞系 SPF级BALB/C裸鼠70只,雌性,体质量(20 $\pm$ 2)g,广州中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2016-0020,在SPF级实验条件下饲养并完成实验;雌激素受体阳性,对TAM耐药的人乳腺癌细胞系LCC2购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.3 试剂与仪器 不含酚的IMEM培养基(美国

Hyclone公司,批号:NZK5639);胎牛血清(美国Gibco公司,批号:8231650);0.25%的胰蛋白酶(美国Hyclone公司,批号:141527);原癌基因HER-2(批号:20160515),GST- π (批号:20160320),Caspase-3(批号:20160621),所有试剂盒均购于南京建成生物科技有限公司;超净台(哈尔滨东联电子科技发展有限公司);MCO175型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);CS-15R冷冻离心机(美国Beckman公司)。

2 实验方法

2.1 人乳腺癌LCC₂细胞培养 LCC₂采用不含酚IMEM培养基及10%的胎牛血清,加双抗(青霉素100 mg $\cdot$ L⁻¹,链霉素100 mg $\cdot$ L⁻¹)于温度为37℃,湿度为100%,CO₂浓度为5%的培养箱内培养,每天用倒置显微镜观察细胞生长状态。

2.2 建立裸鼠耐TAM人乳腺癌模型^[12] 将“2.1”中细胞传代后稳定培养24 h,0.25%胰蛋白酶消化对数期LCC₂细胞,吸管吹打,制成细胞混悬液,将细胞浓度调成每毫升5 $\times$ 10⁷个,加入等体积Matrigel,混匀后接种于70只裸鼠右胸部皮下,接种体积为200 μ L,观察肿瘤生长情况,所有操作均在超净台上完成。

2.3 分组及给药 接种2周后,70只接种裸鼠中有66只接种部位出现绿豆大小的结节,表明66只裸鼠建立乳腺癌皮下模型成功,随机将建模成功的裸鼠分为模型对照组11例和实验组55例,实验组又分为5个亚组,每组11只:分别为5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM组,100 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组,200 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组,5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM+100 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组,5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM+200 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组,其中5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM组腹腔注射TAM 5 mg $\cdot$ kg⁻¹,100 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS、200 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组分别灌胃给予PNS 100 mg $\cdot$ kg⁻¹及200 mg $\cdot$ kg⁻¹,5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM+100 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组和5 mg $\cdot$ kg⁻¹TAM+200 mg $\cdot$ kg⁻¹PNS组均腹腔注射TAM 5 mg $\cdot$ kg⁻¹,此外分别灌胃给予PNS 100 mg $\cdot$ kg⁻¹及200 mg $\cdot$ kg⁻¹,模型对照组给予等体积生理盐水(NS),每日1次,连续给药30 d。

2.4 指标观察 (1)观察裸鼠状态;(2)给药开始后每周称量裸鼠的质量并记录;(3)每周测量裸鼠肿瘤体积一次(肿瘤体积=ab²/2,其中a为肿瘤直径,b为肿瘤半径),利用所测得肿瘤体积计算肿瘤抑制率[肿瘤抑制率%=(模型对照组肿瘤体积-给药组肿瘤体积)/模型对照组肿瘤体积 $\times$ 100%];(4)实验结束后,分离肿瘤并称量;(5)用NS冲洗干净后,10%中性甲醛固定1周后,石蜡包埋并切片(4 μ m),HE染色后显微镜下观察组织结构变化情况;(6)免疫组

化法检测 HER-2, GST- π , Caspase-3 的表达情况,采用 SP 法,具体操作严格按照说明书进行。

2.5 统计学方法 SPSS17.0 进行统计分析。试验数据主要为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较为 HSD- q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 裸鼠状态观察 造模成功后,各组大鼠精神状态,活动情况及饮食饮水情况与造模前比较均无明显变化,裸鼠接种人乳腺癌细胞 LCC₂ 5 d 左右时,接种部位出现结节,结节逐渐增大,慢慢隆起。

3.2 药物安全性及毒性分析 如图 1 所示,给药后裸鼠体重质量变化不明显,没有显著下降,提示各组都没有产生药物毒性。

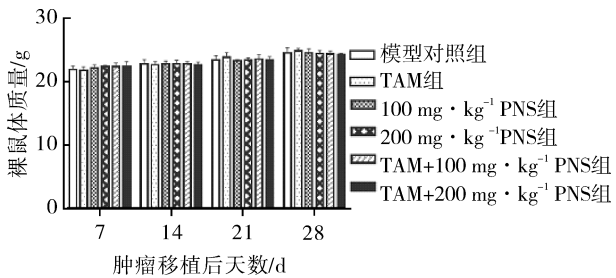


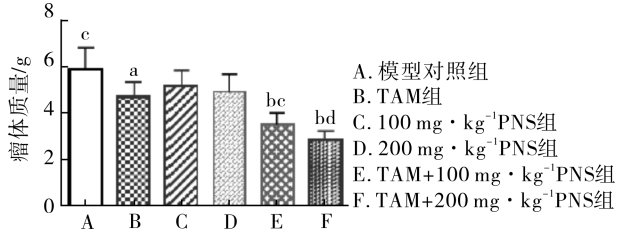
图1 给药后裸鼠体重质量变化情况

3.3 肿瘤抑制率 由已测出的肿瘤体积计算肿瘤抑制率:肿瘤抑制率 = (模型对照组肿瘤体积 - 给药组肿瘤体积)/模型对照组肿瘤体积 $\times 100\%$

如表 1 所示,与模型对照组相比,TAM 组、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组、TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组及 TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组 1、2、3 和 4 周肿瘤抑制率均显著高于模型对照组($P < 0.01$);与 TAM 组相比,给药 1 周时,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组的肿瘤抑制率显著高于 TAM 组($P < 0.05$);给药 2 周时,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组肿瘤抑制率显著高于 TAM 组($P < 0.01$),给药 3 周和 4 周时,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组均显著高于 TAM 组($P < 0.01$),提

示 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 均能显著增强 TAM 抗乳腺癌的效果。

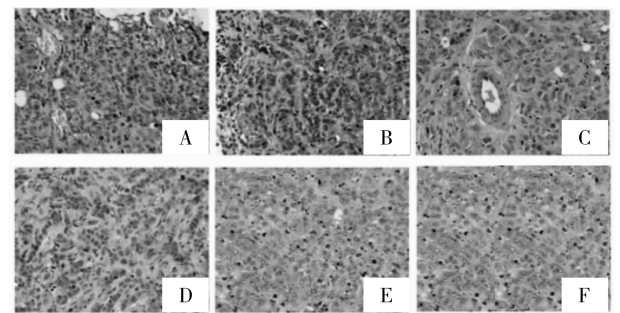
3.4 平均瘤体质量 如图 2 所示,与模型对照组相比,TAM 组,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组和 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组治疗结束后瘤体质量显著小于模型对照组($P < 0.05$),与 TAM 组相比较,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组和 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组治疗结束后,瘤体质量显著小于 TAM 组($P < 0.05$)。



注:与模型对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 TAM 组相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

图2 治疗结束后各组裸鼠瘤体质量

3.5 病理学观察 如图 3 所示,模型对照组(图 4A)癌细胞排列紧密,核仁体积大,颜色深,血管丰富,TAM 组,100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组,200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组癌细胞与模型对照组比较,癌细胞排列稍疏松,5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组及 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组癌细胞排列疏松,核固缩,血管较模型对照组明显减少。



注:A.模型对照组;B.TAM组;C.100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组;D.200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组;E.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组;F.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组。

图3 各组裸鼠瘤病理学观察情况(SP $\times 400$)

表1 给药期间裸鼠肿瘤抑制率情况

组别	鼠数/只	1周/(%, $\bar{x} \pm s$)	2周/(%, $\bar{x} \pm s$)	3周/(%, $\bar{x} \pm s$)	4周/(%, $\bar{x} \pm s$)
模型对照组	11	0	0	0	0
TAM组	11	17.9 $\pm$ 2.0 ^a	22.1 $\pm$ 3.7 ^a	23.3 $\pm$ 3.1 ^a	25.5 $\pm$ 2.9 ^a
100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组	11	16.8 $\pm$ 1.7 ^a	10.4 $\pm$ 1.4 ^a	9.1 $\pm$ 0.9 ^a	12.9 $\pm$ 1.3 ^a
200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组	11	16.9 $\pm$ 2.3 ^a	13.8 $\pm$ 1.9 ^a	15.4 $\pm$ 1.1 ^a	18.9 $\pm$ 1.7 ^a
TAM + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组	11	23.6 $\pm$ 3.9 ^a	27.9 $\pm$ 4.1 ^a	36.8 $\pm$ 5.4 ^{ac}	44.3 $\pm$ 8.2 ^{ac}
TAM + 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS组	11	23.8 $\pm$ 3.2 ^{ab}	35.6 $\pm$ 3.8 ^{ac}	49.2 $\pm$ 7.1 ^{ac}	53.3 $\pm$ 8.9 ^{ac}

注:与模型对照组比较,^a $P < 0.01$;与 TAM 组相比,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$ 。

3.6 各组 HER-2, GST- π , Caspase-3 的表达情况

3.6.1 HER-2 的表达情况 如图4及表2所示,与模型对照组比较,单纯 TAM 组,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组及 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 HER-2 表达量显著低于模型对照组 ($P < 0.05$);与 TAM 组相比,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组及 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 HER-2 表达量显著低于 TAM 组 ($P < 0.05$)。

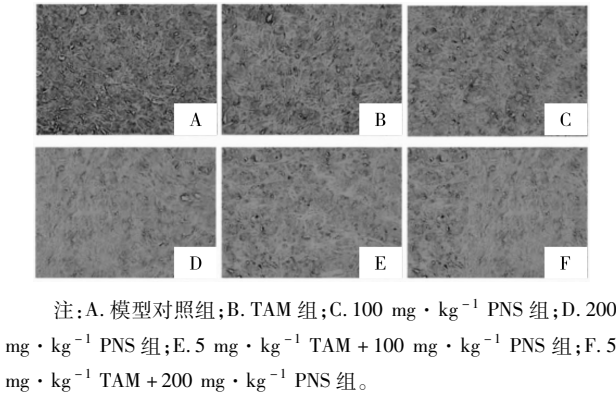


图4 HER-2 的表达情况 (SP × 400)

表2 各组裸鼠 HER-2 的表达情况比较		
组别	鼠数/只	AOD/ $\bar{x} \pm s$
模型对照组	11	0.396 ± 0.039 ^b
TAM 组	11	0.357 ± 0.032 ^a
100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.377 ± 0.041
200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.360 ± 0.048
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.337 ± 0.021 ^{ab}
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.318 ± 0.032 ^{ab}

注:与模型对照组相比,^a $P < 0.05$;与 TAM 组相比,^b $P < 0.05$ 。

3.6.2 各组裸鼠 GST- π 的表达情况 如图5及表3所示,与模型对照组比较,单纯 TAM 组,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组及 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 GST- π 表达量显著低于模型对照组 ($P < 0.05$);与 TAM 组相比,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组及 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 GST- π 表达量显著低于 TAM 组 ($P < 0.05$)。

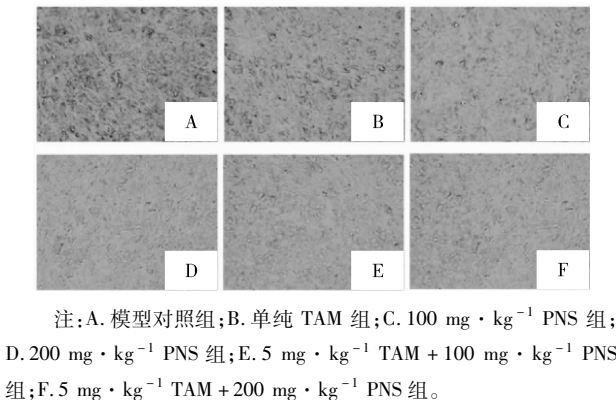


图5 各组 GST- π 的表达情况 (SP × 400)

表3 各组 GST- π 的表达情况		
组别	鼠数/只	AOD/ $\bar{x} \pm s$
模型对照组	11	0.292 ± 0.032 ^b
TAM 组	11	0.246 ± 0.029 ^a
100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.269 ± 0.033
200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.257 ± 0.042
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.236 ± 0.039 ^{ab}
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.211 ± 0.021 ^{ab}

注:与模型对照组相比,^a $P < 0.05$;与 TAM 组相比,^b $P < 0.05$ 。

3.6.3 各组裸鼠 Caspase-3 的表达情况 如图6及表4所示,与模型对照组比较,单纯 TAM 组,5 mg · kg⁻¹ TAM + 100 mg · kg⁻¹ PNS 组及 5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 Caspase-3 表达量显著高于模型对照组 ($P < 0.05$);与 TAM 组相比,5 mg · kg⁻¹ TAM + 200 mg · kg⁻¹ PNS 组 Caspase-3 表达量显著高于 TAM 组 ($P < 0.05$)。

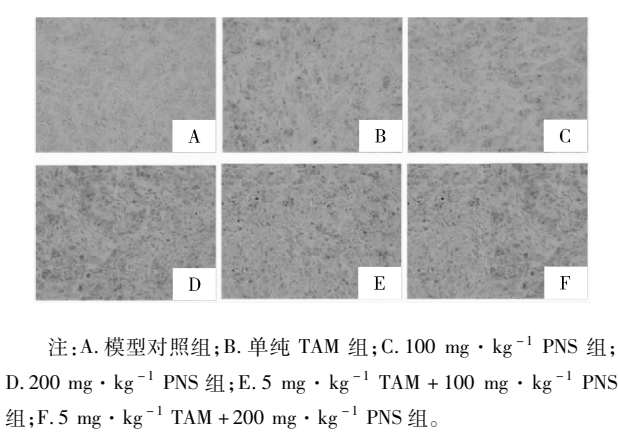


图6 各组裸鼠 Caspase-3 的表达情况 (SP × 400)

表4 各组裸鼠 Caspase-3 的表达情况		
组别	鼠数/只	AOD/ $\bar{x} \pm s$
模型对照组	11	0.177 ± 0.023 ^b
TAM 组	11	0.201 ± 0.019 ^a
100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.198 ± 0.017
200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.189 ± 0.034
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 100 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.211 ± 0.025 ^a
5 mg · kg ⁻¹ TAM + 200 mg · kg ⁻¹ PNS 组	11	0.223 ± 0.011 ^{ab}

注:与模型对照组相比,^a $P < 0.05$;与 TAM 组相比,^b $P < 0.05$ 。

4 讨论

乳腺癌已成为全球女性发病率最高的癌症之一,我国乳腺癌的发病率虽然处于全球较低水平,但乳腺癌在我国的增长速度却逐年上升^[13,15]。乳腺癌的治疗方式主要有三种:手术,化疗及内分泌治疗和靶向药物相结合的综合治疗,其中,内分泌治疗已成为乳腺癌综合治疗重要的组成部分,然而,TAM 作为内分泌治疗的主要药物,其耐药性问题却导致相当一部分患者最初 TAM 治疗有效,但是最后因获得性的 TAM

耐药导致治疗失败。本研究通过探讨 PNS 联合 TAM 对人乳腺癌细胞的抑制作用及对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路相关蛋白 HER-2、GST- π 及细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 的影响,以期为临床提供中药靶点逆转乳腺癌耐药的应用提供理论指导。

人类 HER-2 基因定位于 17 号染色体上,HER-2 蛋白上酪氨酸残基的磷酸化产物能作用于特异性信号蛋白,激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路,该机制被认为与 TAM 耐药有关^[14-15]。本研究结果显示,HER-2 在 $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组及 $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组表达水平显著低于 TAM 组 ($P < 0.05$)。提示 PNS 增加 TAM 的抗肿瘤效果可能与降低 HER-2 表达水平有关。

GST- π 是肿瘤的标志酶^[16],在乳腺癌患者体内的水平最高,且与肿瘤耐药性的产生密切相关,能通过和亲脂性细胞毒物的结合而促进其代谢,降低化疗药物的细胞毒作用而产生耐药^[17-18]。此外,有文献研究表明,GST- π 的阳性表达与 PI3K-AKT-mTOR 通路的活化呈正相关^[19]。本研究结果显示, $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组及 $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组 GST- π 表达水平显著低于 TAM 组 ($P < 0.05$),提示 PNS 协同 TAM 的抗肿瘤作用还可能与阻碍 GST- π 表达有关。

Caspase-3 是半胱氨酸依赖的蛋白酶家族中的一员,在细胞的凋亡中发挥着重要作用,许多肿瘤的治疗是通过 Caspase-3 介导的凋亡诱导途径实现的^[10]。本研究结果显示, $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ TAM + $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PNS 组 Caspase-3 表达量显著高于 TAM 组 ($P < 0.05$),提示 PNS 对 TAM 的抗肿瘤作用也可能与提高 Caspase-3 表达水平相关。

综上所述,PNS 能显著增加 TAM 抗乳腺癌的作用,其机制可能与调控 mTOR 信号通路相关蛋白 HER-2、GST- π 及细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3 有关。

参考文献

- [1] 张欣,张蒲蓉,陈洁,等. 丹参酮 II A 对乳腺癌抑制作用的体内实验研究[J]. 四川大学学报(医学版),2010,41(1):62-67.
- [2] JORDAN VC. Is tamoxifen the rosetta stone for breast cancer [J]. Natl Cancer Inst,2003,95(5):338-340.
- [3] PÉREZ-TENORIO G, STÁL O. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients [J]. Br J Cancer,2002,86(4):540-545.
- [4] STÁL O, PÉREZ-TENORIO G, AKERBERG L, et al. AKT kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy [J]. Breast Cancer Res,2003,5(2):R37-R44.
- [5] 刘丽丽,刘艳娥,房国涛. 三七总皂苷逆转乳腺癌细胞 MCF-7/-ADM 多药耐药的实验研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):954-956.
- [6] LEYLAND-JONES B, SMITH BR. Serum HER2 testing in patients with HER2-positive breast cancer; the death knell tolls [J]. Lancet Oncol,2011,12(3):286-295.
- [7] WOLFF AC, HAMMOND ME, HICKS DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update [J]. J Clin Oncol,2013,31(31):3997-4013.
- [8] MORCEAU F, DUVOIX A, DELHALLE S, et al. Regulation of glutathione S-transferase PI-1 gene expression by NF-KappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells [J]. Biochem Pharmacol,2004,67(7):1227-1238.
- [9] STEWART DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2010,75(3):173-234.
- [10] HUANG WW, KO SW, TSAI HY, et al. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. Int J Oncol, 2011,38(4):1067-1073.
- [11] FRIEDRICH K, WIEDER T, VON HAEFEN C, et al. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance [J]. Oncogene,2001,20(22):2749-2760.
- [12] 湛海燕,侯丽,陈信义. 耐三苯氧胺乳腺癌异种移植动物模型的建立与评价[J]. 现代生物医学进展,2011,11(5):841-843.
- [13] LINDERHOLM B, ANDERSON J, LINDH B, et al. Overexpression of C-erbB-2 is related to a higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive breast cancer after adjuvant systemic treatment [J]. Eur J Cancer,2004,40(1):33-42.
- [14] TAI W, MAHATO R, CHENG K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery [J]. J Control Release,2010,146(3):264-275.
- [15] KUNITOMO K, INOUE S. A case of metastatic breast cancer with out growth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) combined with docetaxel [J]. Hum Pathol,2004,35(3):379-381.
- [16] MORCEAU F, DUVOIX A, DELHALLE S, et al. Regulation of glutathione S-transferase PI-1 gene expression by NF-KappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells [J]. Biochem Pharmacol,2004,67(7):1227-1238.
- [17] STEWART DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol,2010,75(3):173-234.
- [18] KIM SU, LEE KM, PARK SK, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferase PI and breast cancer risk [J]. J Biochem Mol Biol,2004,37(5):582-585.
- [19] 王鲁建,孙丽梅. 乳腺癌中 AKT 激活与耐药蛋白表达相关性 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2012,21(4):401-405.

(收稿日期:2016-09-17,修回日期:2016-11-07)