

## 【药效学评价】

## 西黄丸调节 JNK1/AP-1 通路抑制荷 4T1 小鼠乳腺癌细胞生长

苏亮<sup>1</sup>, 江一鸣<sup>1</sup>, 李新叶<sup>2</sup>, 徐钰<sup>2</sup>, 宋捷<sup>2</sup>, 曾常茜<sup>2</sup>, 梁文波<sup>1\*</sup>

1. 大连大学新华临床学院, 辽宁 大连 116000

2. 大连大学医学院, 辽宁 大连 116622

**摘要:** 目的 研究西黄丸抑制荷 4T1 小鼠乳腺癌肿瘤的生长及其可能机制。方法 建立荷 4T1 小鼠乳腺癌模型, 以低、中、高剂量 (0.39、0.78、1.95 g/kg) ig 给予西黄丸两周, 分离肿瘤组织, 称质量并计算抑瘤率; 切片, TUNEL 染色检测肿瘤细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肿瘤组织 JNK1、AP-1 mRNA 表达; 免疫荧光染色和 Western Blotting 检测肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达。结果 与模型组比较, 肿瘤质量随西黄丸剂量的升高显著下降; TUNEL 荧光染色结果显示, 肿瘤细胞凋亡数量随西黄丸剂量的升高显著升高; qRT-PCR 结果显示, 肿瘤组织中 JNK1、AP-1 mRNA 表达水平随西黄丸剂量的升高显著上调; 免疫荧光染色和 Western Blotting 结果显示, 肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达随西黄丸剂量的升高显著增加; 且高、中、低剂量组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 西黄丸显著抑制肿瘤生长, 其作用机制与激活 JNK1/AP-1 信号通路促进肿瘤细胞凋亡相关。

**关键词:** 西黄丸; 荷 4T1 小鼠乳腺癌细胞; JNK1; AP-1; 凋亡

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 02 - 0189 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.003

## Growth inhibition of of 4T1 breast cancer cells in mice by Xihuang Pills by regulating JNK1/AP-1 pathway

SU Liang<sup>1</sup>, JIANG Yiming<sup>1</sup>, Li Xinye<sup>2</sup>, XU Yu<sup>2</sup>, SONG Jie<sup>2</sup>, ZENG Changqian<sup>2</sup>, LIANG Wenbo<sup>1</sup>

1. Xinhua Clinical College, Dalian University, Dalian 116000, China

2. College of Medicine, Dalian University, Dalian 116622, China

**Abstract: Objective** To study the mechanism of Xihuang Pills on growth inhibition of 4T1 breast cancer cells in mice. **Methods** The model of 4T1 breast cancer mice was established. After administrating Xihuang Pills at low-, medium-, and high-dose level (0.39, 0.78, and 1.95 g/kg) for two weeks, tumor tissue was weighed, sliced, and homogenized. Tumor cell apoptosis was detected by TUNEL staining. The expression of mRNAs in JNK1 and AP-1 in tumor tissue was detected by Real-time quantitative PCR. The expression of JNK1 and AP-1 protein in tumor tissue was detected by immunofluorescence staining and Western Blotting. **Results** Comparing with model group, the tumor weights of Xihuang Pills group decreased significantly with the increase of doses. TUNEL staining results showed that the number of apoptosis of tumor cells increased with the increase of doses of Xihuang Pills. Real-time PCR results showed that the expression of JNK1 and AP-1 mRNA in tumor tissue increased with the increase of doses of Xihuang Pills. The results of immunofluorescence staining and Western Blotting showed that the expression of JNK1 and AP-1 protein in tumor tissue increased with the increase of doses of Xihuang Pills. The differences in the high, medium and low dose groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Xihuang Pills significantly inhibit the growth of tumor cells, which mechanism is related to the activation of JNK1/AP-1 signaling pathway, with view to promoting the apoptosis of tumor cells.

**Key words:** Xihuang Pills; 4T1 breast cancer cells; JNK1; AP-1; apoptosis

收稿日期: 2017-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573664)

第一作者: 苏亮(1989—), 男, 在读硕士, 研究方向为抗肿瘤中药基础研究。Tel: 15242501389 E-mail: 455713299@qq.com

\*通信作者: 梁文波(1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药抗肿瘤药理研究, Tel: 13942666741 E-mail: dllwb@126.com

西黄丸是抗肿瘤经典名方之一,由牛黄、麝香、乳香、没药4味中药配制<sup>[1]</sup>,临床用于乳腺癌、肺癌、肝癌、白血病和大肠癌等恶性肿瘤的治疗及辅助治疗<sup>[2-3]</sup>。随着国际上对中医药认同度的增加,进一步阐明中药作用机制显得更为重要。近年来研究显示,JNK1/AP-1信号通路和肿瘤细胞凋亡密切相关<sup>[4-5]</sup>,本课题组通过KEGG高通量筛查发现,西黄丸对肿瘤组织中该信号通路有调节作用,故本研究以JNK1/AP-1信号通路为切入点,制备小鼠乳腺癌模型,进一步揭示西黄丸抗肿瘤作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

SPF级雌性BALB/c小鼠,体质量18~22g,购于大连医科大学动物实验中心,实验动物生产许可证号SCXK(辽)2013-0003。

小鼠4T1乳腺癌细胞,购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 药品与主要试剂

西黄丸,每20粒质量为1g,3g/瓶,批号1040991,北京同仁堂科技发展股份有限公司生产。胎牛血清(FBS,天津灏洋);含双抗的RPMI1640培养基、BCA含量检测试剂盒、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、4%多聚甲醛、Trizol(江苏凯基);Triton-X-100、TUNEL染色试剂盒(Sigma,德国);OCT包埋剂(Leica,美国);蛋白Marker(CST,美国)。一抗:兔抗小鼠 $\beta$ -Actin抗体(CST,美国),兔抗小鼠JNK1抗体(Invitrogen,美国),兔抗小鼠AP-1抗体(Abcam,美国);二抗:Alexafluor680标记驴抗兔抗体、Alexafluor790标记驴抗兔抗体(Abcam,美国),Alexafluor488标记驴抗兔抗体、Cy3标记驴抗兔抗体(Jackson,美国)。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix、Prolong diamond antifade mountant with dapi(Thermo,美国);基因特异性引物(表1),由北京奥科鼎盛生

表1 扩增基因引物序列

Table 1 Primers sequences utilized for amplification of respective genes

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物片段长度/bp
ACTIN	CCTCTATGCCAACACAGTGC	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	191
JNK1	GCAGTTAGATGAGAGGGAGCA	TCGGATCTGTGGACATTGAA	200
AP-1	ACGACCTTCTACGACGATGC	GCCAGGTTCAAGGTCATGCT	110

物科技公司合成。

### 1.3 主要仪器

CO<sub>2</sub>培养箱(NU-5820E, NAURE, 美国); Dounce匀浆器(Wheaton, 美国);多功能酶标仪(SpectraMax Plus384, Bio-tek, 美国); Western Blotting及转膜设备(DYY-6C, 北京六一, 中国);冰冻切片机(CM1850, Leica, 美国);Odyssey双色红外激光发光仪(S/N CLX-0926, LICOR, 美国);正置荧光显微镜BX51、倒置显微镜IX73(Olympus, 日本);Real-time PCR仪(CFX connect, BIO-RAD, 美国),低温高速离心机(CT15RE, Hitachi, 日本)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠乳腺癌模型的建立及分组给药

用含10%FBS 1640培养基将4T1小鼠乳腺癌细胞株于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养,于细胞对数生长期用含0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶将细胞消化并收集,PBS洗涤两遍后调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/mL备用。用1mL无菌注射器抽取上述浓度细

胞0.2mL(2×10<sup>5</sup>个)接种于小鼠右侧腋下,建立荷瘤小鼠模型(以造模后5d前后在小鼠腋下触摸到明显的肿瘤结节为造模成功标准)。

造模小鼠随机分为4组,每组10只,分别为模型组,西黄丸低、中、高剂量(0.39、0.78、1.95g/kg)组,根据小鼠与人的临床用药剂量换算,0.39g/kg为临床等效剂量,模型组给予等体积的蒸馏水。自造模后第2天,开始ig给药(2次/d),每次0.2mL,连续给药14d。末次给药当晚禁食,第15天脱颈处死小鼠,无菌剥离小鼠肿瘤组织<sup>[6]</sup>。

### 2.2 各组肿瘤组织称质量并计算抑瘤率

脱颈处死小鼠,无菌剥离肿瘤组织称质量,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组平均瘤质量} - \text{给药组平均瘤质量}}{\text{模型组平均瘤质量}}$$

### 2.3 TUNEL荧光染色检测乳腺癌肿瘤细胞凋亡

剥离肿瘤组织后迅速包埋,速冻,切片(切片厚度为7 $\mu$ m),4%多聚甲醛室温固定20min、PBS洗涤30min、0.1%TritonX-100冰上透膜2min、PBS

漂洗 2 次后加入 TUNEL 反应混合液, 37 °C 避光孵育 1 h, PBS 漂洗, 加 Antifade Mountant with DAPI 复染细胞核、封片, 荧光显微镜下观察。

#### 2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测小鼠乳腺癌肿瘤组织中 JNK1/AP-1 mRNA 表达

取 100 mg 肿瘤组织切碎后放于杜恩斯玻璃研磨器内, 加入 1 mL Trizol 溶液冰上研磨组织成匀浆, 按照 Trizol 提取试剂盒说明书进行总 RNA 的提取, 紫外分光光度计测量 RNA 的浓度和纯度; 按照 Thermo 公司的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书将上述提取的总 RNA 转录为 cDNA 第一链; 配置 20 μL 反应体系: Power SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, JNK1/AP-1 上下游引物各 2 μL, cDNA 模版 4 μL, 无核酸酶水 2 μL; 扩增条件为: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 于 65~95 °C 生成溶解曲线, 每个基因设置 3 个复孔。以 β-actin 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析各目的基因相对表达量。

#### 2.5 免疫荧光染色检测小鼠乳腺癌肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达

4%多聚甲醛室温固定切片 30 min, PBS 洗涤, 1% TritonX-100 室温透膜 30 min, PBS 洗涤; 免疫染色封闭液室温封闭 30 min, PBS 洗涤, 分别加入兔抗小鼠 JNK1 抗体 (1:200)、兔抗小鼠 AP-1 抗体 (1:200), 4 °C 过夜; PBS 洗涤, 分别加入 Alexafluor 488 标记驴抗兔抗体 (1:200)、Cy3 标记驴抗兔抗体 (1:200), 室温避光孵育 1 h; PBS 洗涤, 滴加 Antifade Mountant with DAPI 复染细胞核、封片, 荧光显微镜下观察。

#### 2.6 Western Blotting 检测小鼠乳腺癌肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达

称取 100 mg 肿瘤组织, 剪碎后加入 500 μL 预

冷的 RIPA 裂解液于杜恩斯匀浆器中冰上手动匀浆, 充分匀浆后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 BCA 蛋白定量后煮沸变性, 取 80 μg 蛋白经 8% SDS-PAGE 胶分离后以 300 mA 2 h 将蛋白转印至 PVDF 膜。TBS 漂洗后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗涤, 分别加入兔抗小鼠 AP-1 抗体 (1:1 000)、兔抗小鼠 β-Actin 抗体 (1:1 000)、兔抗小鼠 JNK1 抗体 (1:1 000), 4 °C 过夜; TBST 洗涤, 分别加入 Alexafluor680 标记驴抗兔抗体 (1:10 000)、Alexafluor 790 标记驴抗兔抗体 (1:10 000), 室温避光孵育 1 h; TBST 洗涤, 膜晾干后于双色红外激光系统发光显色, 软件 Image J 分析目的条带灰度值, 以 β-Actin 作为内参比较各组间蛋白相对表达量变化。

#### 2.7 统计分析

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 对小鼠乳腺癌肿瘤生长的影响

如表 2 所示, 与模型组比较, 西黄丸中、高剂量组荷瘤质量明显下降 ( $P < 0.05$ ), 高剂量组抑瘤率达 32.89%, 抑瘤率呈剂量相关性。

#### 3.2 对小鼠乳腺癌肿瘤细胞凋亡的影响

如图 1 所示, 与模型组比较, 肿瘤细胞凋亡数

表 2 西黄丸对荷 4T1 小鼠乳腺癌肿瘤质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Xihuang Pills on tumor weight of 4T1 breast cancer mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	0.377±0.041	—
西黄丸	0.39	0.343±0.033	9.02
	0.78	0.297±0.043*	21.19
	1.95	0.253±0.044*	32.89

与模型组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs model group

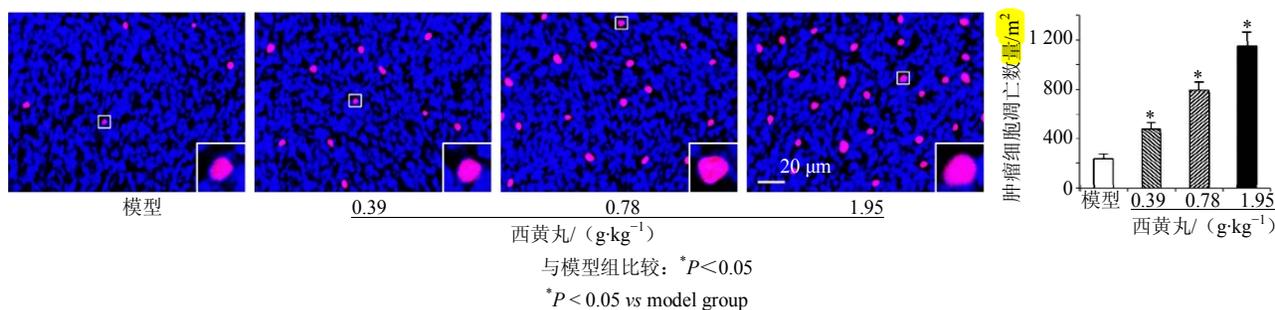


图 1 TUNEL 染色检测小鼠乳腺癌肿瘤细胞凋亡 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 1 TUNEL staining for detection of apoptosis of breast cancer cells in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

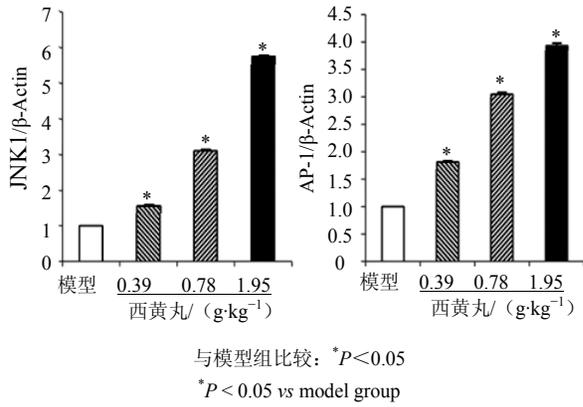


图2 基因表达相对定量分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Relative quantitative analysis of genes expression ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

量随着西黄丸剂量的升高而升高,低、中、高剂量组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

3.3 对肿瘤组织 JNK1、AP-1 mRNA 水平的影响

如图2所示,与模型组比较,肿瘤组织中 JNK1、AP-1 mRNA 表达水平随西黄丸剂量的升高上调,低、中、高剂量组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

3.4 对肿瘤组织 JNK1、AP-1 蛋白表达的影响

3.4.1 免疫荧光染色结果 如图3所示,免疫荧光染色结果显示,与模型组比较,肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达随着西黄丸剂量的升高而增加,低、中、高剂量组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

3.4.2 Western Blotting 结果 如图4所示,与模型组比较,肿瘤组织中 JNK1、AP-1 蛋白表达量随西

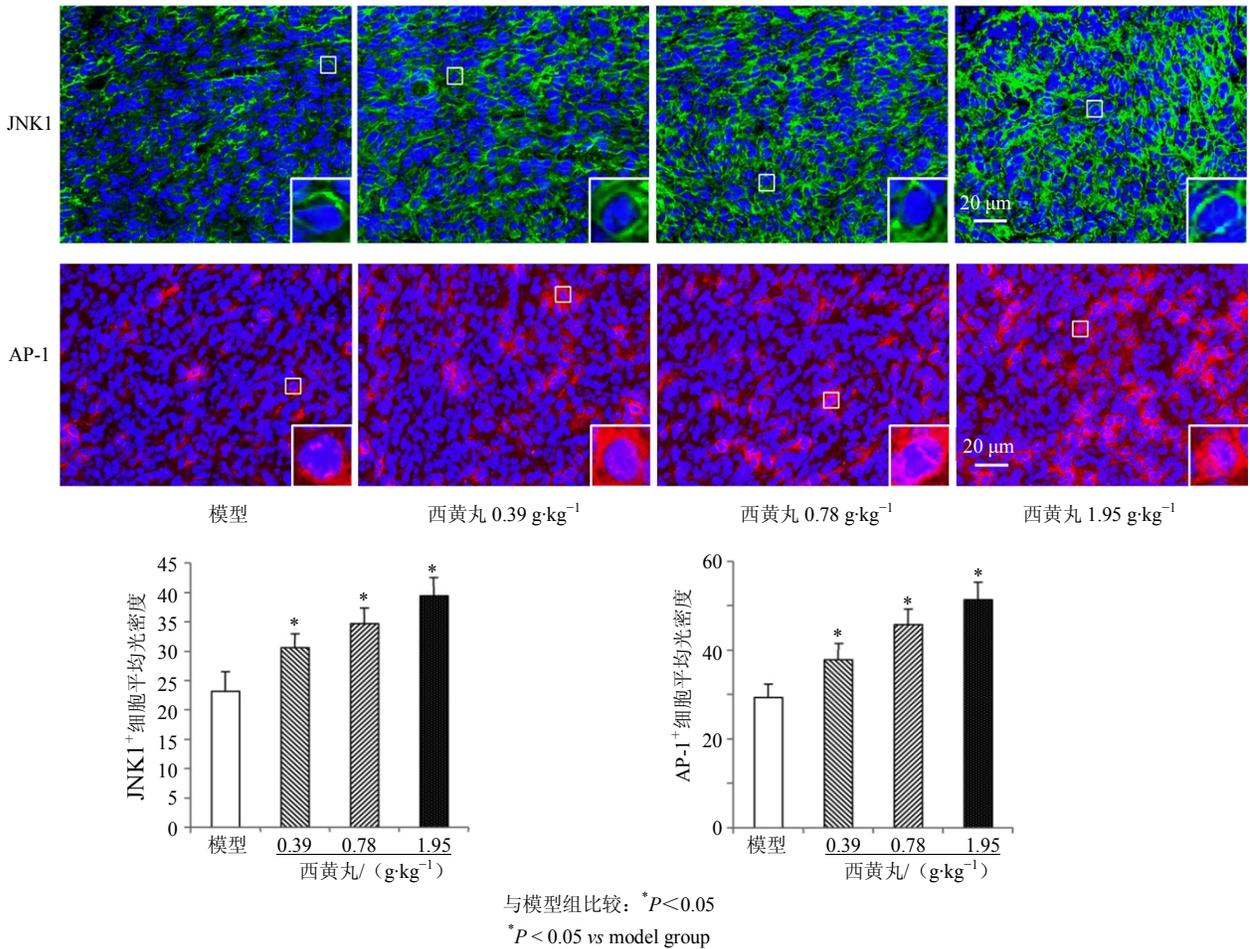


图3 免疫荧光染色结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Immunofluorescence staining results ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

黄丸剂量的升高而增加,低、中、高剂量组差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

4 讨论

本研究建立荷4T1小鼠乳腺癌模型并予以西黄

丸治疗,两周后对肿瘤组织中细胞凋亡和 JNK1/AP-1 信号通路进行研究,结果显示,西黄丸可以明显抑制肿瘤的生长,其机制与上调 JNK1/AP-1 信号通路进而促进肿瘤细胞的凋亡相关。近年来研究显

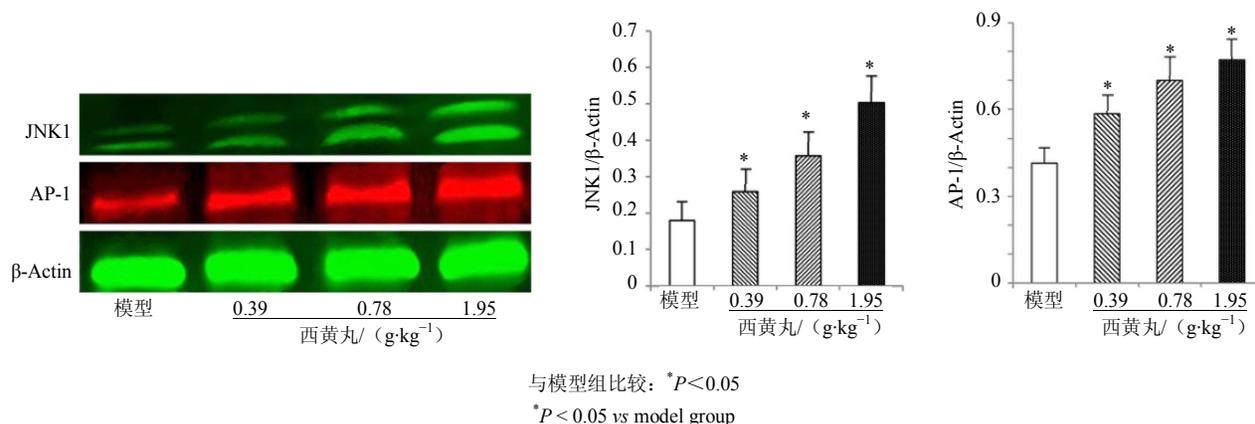


图4 Western Blotting 检测肿瘤组织 JNK1、AP-1 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Western Blotting analysis of expression of JNK1 and AP-1 protein in tumor tissues ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

示, 中药可以通过调节细胞凋亡信号转导诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[7]</sup>。其中 JNK1/AP-1 信号通路的激活在细胞凋亡发生发展过程中具有重要作用<sup>[8-10]</sup>, JNK1 激活后会使其下游靶蛋白 AP-1 活化, 活化后的 AP-1 可以通过促使一系列凋亡蛋白如 P53、FasI、Bax、TNF 等的表达诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[11-13]</sup>。本课题组前期通过高通量筛查初步发现, 西黄丸治疗小鼠乳腺癌后, 肿瘤组织中 JNK1/AP-1 信号通路相关基因表达上调, 本研究通过 qRT-PCR、免疫荧光染色、Western Blotting 法验证了 KEGG 高通量筛查实验结果的准确性, 此外通过 TUNEL 染色证实西黄丸可以促进肿瘤细胞的凋亡, 且肿瘤的大小在药物治疗后明显减小。由此可见, 西黄丸通过上调 JNK1/AP-1 信号通路相关蛋白的表达, 促进了肿瘤细胞的凋亡, 进而抑制肿瘤的生长。

参考文献

[1] 周杰, 商雪莹, 佟玲, 等. 西黄丸 HPLC-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2219-2224.  
[2] 马杰, 王一尧, 杨伟, 等. 西黄丸抗肿瘤作用及其免疫清除功能的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1499-1501.  
[3] 金娟, 李志鸿. 西黄丸联合化疗治疗乳腺癌 30 例 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 715-716.

[4] 苏富琴, 陈晓光. MEKK1 在肿瘤 MAPK 信号传导通路中作用的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(7): 555-558.  
[5] 古鉴, 郭军. JNK 信号级联的诱导性失活机制 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(9): 1128-1131.  
[6] 王一尧, 任征远, 焦战, 等. 西黄丸对肿瘤迁移微环境的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(4): 11-13.  
[7] 邱淑敏, 陈涛, 刘美玲, 等. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制研究进展 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 83-86.  
[8] 焦俊霞, 高维娟. 细胞凋亡的信号转导机制研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(6): 853-856.  
[9] 闫恩志, 金英, 范莹, 等. 阿魏酸钠对淀粉样 β 蛋白片段 1~40 引起的大鼠海马 MAP 激酶信号传导通路及凋亡蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(5): 385-392.  
[10] Lu Z, Chen H, Zheng X M, et al. Experimental study on the apoptosis of cervical cancer Hela cells induced by juglone through c-Jun N-terminal kinase/c-Jun pathway [J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(06): 641-644.  
[11] 鲁明骞, 许新华. MKK4 与恶性肿瘤相关性的研究进展 [J]. 山东医药, 2011, 51(19): 110-111.  
[12] 叶冬青, 高维娟. c-jun 氨基末端激酶信号通路与细胞凋亡 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(7): 894-896.  
[13] Raman M, Chen W, Cobb M H. Differential regulation and properties of MAPKs [J]. Oncogene, 2007, 26(22): 3100.