香贝散通过激活AMPK/mTOR信号通路抑制人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231生长

谢锦欣[1,2]，王文艺[3]，全晓敏[3]，邢昊晴[3]，贾 智[3]，王 飞[1,2]，魏雪娇[1,2]，谭 鹏[1,2]，王柱国[1,2]，胡仲冬[2*]，安 超[3*]

1. 北京中医药大学 中药学院，北京 100029
2. 北京中医药大学 北京中医药研究院 中药现代研究中心，北京 100029
3. 北京中医药大学 东方医院 肿瘤科，北京 100078

摘 要：目的 探讨香贝散体外抗乳腺癌作用及其分子机制。**方法** 体外培养人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231，给予香贝散1、2、3、4、5 mg·mL^{-1}加药处理，对照组不加药。利用MTT法和克隆形成实验检测细胞增殖，利用流式细胞术检测细胞凋亡，细胞划痕和细胞侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力，借助吖啶橙染色法观察细胞自噬，借助转录组测序技术探索香贝散诱导乳腺癌细胞死亡的作用机制，并采用Western blotting法检测AMP依赖的蛋白激酶（AMPK）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）、LC-3、Beclin-1蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较，香贝散显著抑制人乳腺癌MCF-7、MDA-MB-231细胞活力（P＜0.05、0.001），48 h半数抑制浓度（IC_{50}）分别为2.344、1.961 mg·mL^{-1}，且具有时间、浓度相关性；显著抑制MCF-7、MDA-MB-231细胞的集落形成能力；显著诱导MCF-7、MDA-MB-231细胞凋亡（P＜0.001）；明显抑制人乳腺癌MCF-7、MDA-MB-231细胞的体外迁移能力和侵袭能力；吖啶橙染色实验结果提示香贝散能够诱导MCF-7、MDA-MB-231细胞发生自噬，Western blotting实验结果显示香贝散能够显著上调MCF-7、MDA-MB-231细胞中自噬关键蛋白Beclin-1和LC3-II的表达（P＜0.01、0.001）；转录组测序技术发现差异基因变化最明显的通路包括mTOR信号通路、自噬信号通路等，Western blotting实验结果显示香贝散显著下调mTOR的磷酸化水平（P＜0.001），显著上调AMPK的磷酸化水平（P＜0.001）。**结论** 香贝散能够显著抑制人乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力，能够诱导凋亡和自噬的发生，激活AMPK/mTOR信号通路可能是其重要机制。

关键词： 香贝散；乳腺癌；增殖；迁移；侵袭；凋亡；自噬；AMPK/mTOR信号通路

中图分类号： 285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）06-1249-10

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.009

Inhibitory effect of Xiangbeisan on growth of human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231 by activating AMPK/mTOR signaling pathway

XIE Jinxin[1,2], WANG Wenyi[3], QUAN Xiaomin[3], XING Haoqing[3], JIA Zhi[3], WANG Fei[1,2], WEI Xuejiao[1,2], TAN Peng[1,2], WANG Zhuguo[1,2], HU Zhongdong[2], AN Chao[3]

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. Department of Oncology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* anti-breast cancer effects of the Chinese herbal prescription Xiangbeisan and its molecular mechanisms. **Results** Human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells were treated with Xiangbeisan 1, 2, 3, 4, or 5 mg·mL^{-1}, with a control group not receiving any drug. MTT assay and clone formation assay were used to detect the effects of

收稿日期： 2024-03-08

基金项目： 中央高校基本科研业务费专项资金项目（2023-JYB-JBQN-051）；北京中医药大学国家级人才精准培育计划项目（JZ-PY202206）；教育部双一流引导专项经费-国际合作平台项目（90020361020006）

第一作者： 谢锦欣，硕士研究生。E-mail：xiejinxin156@126.com

***通信作者：** 胡仲冬，研究员，主要从事中药抗肿瘤研究。E-mail：huzhongdong@126.com

安 超，副主任医师，主要从事乳腺癌中西医结合防治研究。E-mail：Annie_bucm@126.com

Xiangbeisan on the proliferation of human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells, and flow cytometry was used to detect the changes in apoptosis of human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells after the administration of Xiangbeisan. Subsequently, the effects of Xiangbeisan on the migration and invasion ability of human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells were detected using cell scratch and cell invasion assays. Through acridine orange staining, the effect of Xiangbeisan on autophagy in human breast cancer cells was explored. Finally, the transcriptome sequencing technique was used to explore the mechanism of Xiangbeisan-induced breast cancer cell death, and the western blotting experiment was used to detect the protein levels of AMPK, mTOR, LC3, and Beclin-1. **Results** Compared with the control group, Xiangbeisan significantly inhibited the viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells (P < 0.05, 0.001), and the median inhibitory concentration (IC_{50}) at 48 h were 2.344 and 1.961 mg·mL^{-1}, respectively, with time and concentration correlation. The colony formation ability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was significantly inhibited. Apoptosis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells was significantly induced (P < 0.001). Xiangbeisan obviously inhibited the migration and invasion ability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells *in vitro*. The results of acridine orange staining indicated that Xiangbeisan induced autophagy in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Western blotting experiments showed that Xiangbeisan significantly up-regulated the expressions of Beclin-1 and LC3-Ⅱ, the key autophagy proteins, in MCF-7 and MDA-MB-231 cells (P < 0.01, 0.001). Transcriptome sequencing assay revealed that the most significant pathways with differential gene changes included the mTOR signaling pathway, autophagy pathway, etc. Western blotting experiment results showed that Xiangbeisan significantly down-regulated the phosphorylation level of mTOR (P < 0.001), and significantly up-regulated the phosphorylation level of AMPK (P < 0.001). **Conclusion** Xiangbeisan significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells, induced apoptosis and autophagy, and the activation of AMPK/mTOR signaling pathway may be an important mechanism.

Key words: Xiangbeisan; breast cancer; proliferation; migration; invasion; apoptosis; autophagy; AMPK/mTOR signaling pathway

据世界卫生组织统计，截至2020年底，在过去5年里，共有780万名在世妇女被诊断患有乳腺癌，使其成为世界上最常见的癌症。年龄增长、肥胖、乳腺癌家族史、辐射暴露史、生殖史（如月经开始的年龄和首次怀孕的年龄等）、使用烟草和绝经后激素治疗等因素均可增加患乳腺癌的风险[1]。乳腺癌的当前治疗手段主要集中在外科手术、化疗、放疗、内分泌治疗及靶向治疗等。对于转移性乳腺癌，靶向治疗是临床应用较多的方案[2-3]。总的来说，乳腺癌前期治疗以外科治疗为主，而乳腺癌后期及转移性乳腺癌，则以抑制癌细胞转移，延长患者生存期为主。目前，中医药在减少乳腺癌的复发和转移、逆转肿瘤耐药、改善患者生存质量、提高生存率等方面有着不可替代的优势[4]。

香贝散是北京中医药大学东方医院肿瘤科医生临床上用于治疗乳腺癌的经验方，组方思路主要来自于逍遥蒌贝散、二贝母汤、西黄丸、小金丸的核心药对[5-7]，具活血化瘀、扶正祛邪之功。其药物组成为香附、土贝母、浙贝母、白芍、黄芪、女贞子、淫羊藿、补骨脂、乳香、没药、木鳖子。方中香附与土贝母、浙贝母为君药，香附具有疏肝解郁、调经止痛的功效，尤其适用于气滞血瘀的患者。土贝母有散结消痈解毒的作用；浙贝母能清热化痰、散结解毒，两者共同起化痰散结的功效。白芍起柔肝缓急、滋阴的作用。黄芪和女贞子合用具有提升人体正气、保护骨髓和肾上腺皮质的功能。淫羊藿和补骨脂具有补肾阳、强筋骨的功效；乳香和没药，活血祛瘀；木鳖子散结消肿、攻毒疗疮，常用于治疗疮疡肿毒。研究发现，临床上常以香贝散基础方在辨证论治的基础上加减用于治疗乳腺癌[8]。目前，针对香贝散抗乳腺癌的作用及其机制尚未进行深入探究，本研究开展香贝散体外抗乳腺癌作用的初步探索，并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 实验药物

从北京中医药大学东方医院药房按照配比得到中药颗粒，药材包括醋香附（批号23003211）、土贝母（批号22029541）、浙贝母（批号23030181）、白芍（批号23003511）、黄芪（批号23030691）、酒女贞子（批号23005341）、炙淫羊藿（批号23000331）、醋乳香（批号23003441）、没药（批号23091602）、补骨脂（批号23028083）、木鳖子（批号20030611），经东方医院药房鉴定分别为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎、葫芦科植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum*（Maxim.）Franquet的干燥块茎、百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge. 的干燥根、木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实、小檗

科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.的干燥叶、橄榄科植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw.树皮渗出的树脂、橄榄科植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl.的干燥树脂、豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实、葫芦科植物木鳖 *Momordica cochinchinensis*（Lour.）Spreng.的干燥成熟种子。称取香贝散配方颗粒，一剂的量8.8 g，置于圆底烧瓶中，取8倍量纯水浸泡0.5 h后加热微沸回流2 h，取出圆底烧瓶放置于室温后，于1 000 r·min^{-1}离心30 min减压滤过，滤液使用旋转蒸发仪于60 ℃下浓缩，将黏稠物使用冻干机冻干，得到冻干粉的质量为1.73 g，得率为19.6%，随后将冻干物保存于−40 ℃待用。采用UPLC-MS高分辨液质联用仪对香贝散提取物的化学成分进行检测分析，根据相关文献、质谱数据库、Pubchem等发现香贝散中主要含补骨脂素、新补骨脂异黄酮、淫羊藿苷、朝藿定、芍药内酯苷、茉莉酮、芦丁、毛蕊异黄酮、东莨菪内酯、山栀子苷B等成分。其中芍药内酯苷、补骨脂素的质量分数为4.55%、2.8%。

1.2 细胞株

人乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7，均购买于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.3 实验仪器

SIM/F140AY65 37 ℃恒温培养箱（日本SANYO公司）；SQ510C超净工作台（上海博运医疗生物仪器股份有限公司）；高压蒸汽灭菌器（日本YAMATO公司）；Enspire多功能酶标仪（美国PerkinElmer公司）；AE200倒置显微镜（Motic公司）；ICC50正置显微镜、DMIL LED荧光倒置显微镜（德国Leica公司）；LSRFortessa™流式细胞仪（美国BD Biosciences公司）；低温高速离心机（美国Eppendorf公司）；常温低速离心机（上海安亭科学仪器厂）；ME204分析天平（瑞士METTLER TOLEDO集团）；电泳电转槽（美国Bio-Rad公司）。

1.4 实验试剂

MTT试剂盒（北京兰博利德商贸有限公司）；EdU细胞增殖试剂盒（碧云天生物技术公司）；细胞组织固定液、Super ECL Star特超敏化学发光检测试剂盒、Super ECL Plus、PAGE胶促凝剂、30%蛋白凝胶溶液29∶1（北京百瑞极生物科技有限公司）；DMEM基础培养基、RPMI 1640基础培养基（美国Gibco公司）；胎牛血清（北京翱擎生物科技有限公司）；青霉素-链霉素混合液、0.25%胰酶EDTA（美国Thermo Fisher公司）；细胞培养孔板、细胞培养瓶、细胞培养皿基质胶及Transwell小室均购于美国Corning公司；细胞凋亡试剂盒（美国BD公司）；快速封闭液（大连美仑生物技术有限公司）；结晶紫、SDS、DTT粉末、4×SDS-PAGE分离胶缓冲液、4×SDS-PAGE浓缩胶缓冲液（北京索莱宝科技有限公司）；Tris-HCl（北京兰博利德商贸有限公司）；Triton X-100通透液（北京博奥拓达科技有限公司）；磷酸盐缓冲液、1×免冰浴快速转膜缓冲液、TBS粉末（武汉赛维尔生物科技有限公司）；二甲基亚砜（天津致远化学试剂有限公司）。抗体：β-actin（C4）（sc-47778）、m-IgGK BP-HRP（sc-516102）、IgG-HRP（sc-2357）均购自日本Santa公司；AMP依赖的蛋白激酶（AMPK，Proteintech公司，10929-2-AP）；p-AMPK（50081S）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR，2972S）、p-mTOR（5536S）、LC-3（12741S）、Beclin-1（3738S）均购自美国CST公司。

2 方法

2.1 MTT法检测细胞增殖

将生长状态良好的人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231消化吹打形成细胞悬液，将其稀释至一定的浓度后计数，调整细胞密度为3×10^4·mL^{-1}，将其均匀接种于96孔板中，每孔体积为100 μL。将接种完的96孔板放到细胞培养箱培养24 h后，吸弃旧培养基加入梯度稀释的含药（香贝散1、2、3、4、5 mg·mL^{-1}，对照组不加药）培养基，设置3个空白调零孔，于24、48、72 h后吸弃旧培养基，加入100 μL用基础培养基稀释的MTT溶液，置于培养箱孵育2～4 h，取出孔板吸除上清，每孔加入150 μL DMSO溶液，用锡箔纸包裹后于摇床摇晃10 min至紫色结晶完全溶解，多功能酶标仪测定490 nm波长下各孔吸光度（A）值，计算细胞存活率。

$$细胞存活率=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})$$

2.2 EdU检测细胞增殖能力

细胞融合度为80%时将人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231消化成2 mL单细胞悬液，以1×10^5·mL^{-1}密度接种于6孔板中，每孔2 mL完全培养，平移摇动使细胞均匀分散，置入培养箱中培养24 h贴壁后，更换为含香贝散质量浓度为2、4 mg·mL^{-1}的完全培养基，对照组不加药，于培养箱中继续培养48 h。将6孔板中的部分培养基吸弃至每孔只保留1 mL旧培养基，各加入1 μL浓度为10 mmol·L^{-1}的EdU工作液，轻摇均匀，使EdU的终浓度为10 μmol·L^{-1}，置入37 ℃培养箱中孵育2 h以完成标记。EdU标记完成后去除培养液，每孔加入1 mL组织/细胞固定液于

室温下固定15 min，去除固定液后用含3% BSA的洗涤液于摇床上摇晃清洗3次，每次3 min。吸除洗涤液后每孔用含0.3% Triton X-100的通透液，置于室温中透化15 min。去除通透液用含3% BSA的洗涤液清洗2次，每次3 min。严格按照说明书配制反应液后每孔加入500 μL的反应液，轻轻晃动6孔板以确保反应液能够均匀地覆盖样品，于室温下避光孵育30 min。吸掉反应液，用含3% BSA的洗涤液在摇床上摇晃清洗3次，每次3 min。将6孔板放置于荧光显微镜下进行拍照，使用Image J进行分析。

2.3 克隆形成实验

按照“2.2”项方法制备单细胞悬液，计数并调整密度，于每个6 cm培养皿中接种1 000个细胞。24 h贴壁后，将香贝散母液稀释成1 mg·mL^{-1}的工作液给药，对照组不加药，每组设置3个培养皿，细胞每隔4天换液。待给药12 d后，吸弃旧培养基后PBS清洗3次，4%组织细胞固定液室温固定15 min，再用0.1%结晶紫溶液染色30 min，用PBS溶液清洗3次后，用相机进行拍照，使用Image J进行计数。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞接种、给药操作同“2.2”项，细胞接种于6孔板中贴壁后给药48 h，收集细胞培养液到2 mL离心管内备用。PBS清洗细胞3次，消化细胞，加入前面收集的细胞培养液终止消化。吹打成细胞悬液后收集到2 mL离心管内。300 r·min^{-1}离心5 min，倒掉上清，加入约1 mL PBS，重悬细胞，300 r·min^{-1}离心5 min，倒掉PBS，重复2次。每管细胞凋亡试剂盒中的缓冲液300 μL混悬后加入Annexin V-FITC与PI染色液，轻轻吹匀，室温避光孵育30 min，用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 细胞迁移实验

细胞传代后，显微镜下观察培养皿中的细胞，细胞状态良好且融合度达到80%左右时，将细胞以3×10^{4}个·mL^{-1}传代至96孔板，待细胞融合度达到80%左右时更换基础培养基饥饿12 h。使用Incucyte活细胞分析系统配套的模块对长满细胞的96孔板进行划痕处理，PBS清洗3次后加入质量浓度为0、2、4 mg·mL^{-1}的含药基础培养基，将孔板放入Incucyte活细胞分析系统进行实时拍照及记录细胞迁移距离。

2.6 细胞侵袭实验

细胞传代后，显微镜下观察培养皿中的细胞，细胞状态良好且融合度达到80%左右时，更换基础培养基饥饿培养12 h。提前预冷基础培养基，并将Transwell小室置于24孔板上，待Matrigel胶融化后，按照Matrigel胶与基础培养基1∶12的比例混匀，每个Transwell小室上室加入70 μL，操作过程中不能产生气泡，将24孔板缓慢移入培养箱中孵育4 h，使Matrigel胶完全凝固。提前在Transwell小室下室加入750 μL完全培养基，再将已饥饿的细胞用胰酶消化后吹打成单细胞悬液并用细胞计数板计数，每个1.5 mL的EP管分装1.5×10^{5}个细胞，低温离心机于4 ℃、1 000 r·min^{-1}下离心5 min，弃去上清，每个EP管分别加入200 μL基础培养基配制成0、2、4 mg·mL^{-1}的香贝散含药培养基，轻轻吹打使细胞分散成单细胞悬液。倾斜24孔板，将Transwell小室上室多余液体吸尽，然后将EP管中的单细胞悬液均匀地铺入Transwell小室的上室。给药24 h后，从培养箱中取出Transwell小室，PBS溶液清洗3次，依次用4%多聚甲醛透化4 min，甲醇固定15 min，0.1%结晶紫溶液染色10 min。染色结束后，用PBS溶液洗去染料，将小室倒扣于桌面，棉球擦拭小室上室残留的细胞，用荧光倒置显微镜在白光下拍照，随机选取至少3个视野拍照，计数穿过小室的细胞数目并进行统计学分析。

2.7 吖啶橙染色法

细胞接种、给药操作同“2.2”项，继续培养24 h后吸除旧培养基，用PBS溶液清洗3次，加入1 mL 4%细胞固定液于室温固定15 min，再用吖啶橙染液（10 μg·L^{-1}）染色30 min，最后，将孔板置于倒置荧光显微镜下观察，并用40倍物镜拍照记录。

2.8 转录组测序

将人乳腺癌MCF-7细胞以3×10^{4}个·mL^{-1}接种于6 cm皿中，于细胞培养箱培养24 h贴壁后，加入2 mg·mL^{-1}的香贝散工作液处理细胞，对照组不加药。细胞培养箱中培养24 h后于冰上收集样品。采用RNeasy Mini Kit（Qiagen）并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品的总RNA提取，提取后保存于−80 ℃冰箱。将准备好的样品送至上海伯豪生物技术有限公司进行后续样品的处理和测序分析。将转录组测序结果的分析报告进行后期的整理比对，筛选出差异倍数大的功能基因，分析这些差异基因相关信号通路的京都基因与基因组百科全书（KEGG）富集分析结果。

2.9 Western blotting实验

处于对数生长期的人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231融合度长到80%时传代，将传代的细胞以3×10^{4}个·mL^{-1}加入6孔板中，摇匀后置于CO_2

培养箱过夜贴壁，然后将香贝散母液稀释至0、2、4 mg·mL^{-1}后给药。48 h后，弃培养基，PBS清洗后根据细胞密度加入对应量的细胞裂解液，于冰上静置裂解3 min后使用1 mL枪头上下左右来回刮动，使贴壁细胞充分裂解，然后将细胞裂解物用移液枪吸至1.5 mL EP管中。将1.5 mL EP管放置在已经预设好温度为99 ℃的加热块上加热10 min，最后分装并转存于−40 ℃冰箱。上样时拿出预先制好的含10%的分离胶随后拔出梳子，于每个上样孔上10 μL样品，将配好的电泳液倒满电泳槽，室温恒压100 V跑1.5 h后使用PVDF膜进行转膜。将电转液倒满电转槽后盖上盖子使用400 mA的电流恒流转45 min，将结束转膜的PVDF膜放入5%脱脂奶粉中恒温孵育2 h后切膜，随后置于4 ℃冰箱中孵育一抗过夜。第2天将PVDF膜取出用TBST溶液在脱色摇床中摇晃清洗10 min，重复3次，放于4 ℃使用二抗孵育4 h。TBST洗涤后条带置于曝光机显影。

2.10 数据分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析，结果采用$\bar{x}\pm s$表示，两组之间的统计学差异用t检验进行分析。

3 结果

3.1 香贝散抑制人乳腺癌细胞的增殖

3.1.1 香贝散抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞活力 结果如表1所示，与对照组比较，香贝散能显著抑制人乳腺癌MDA-MB-231、MCF-7的细胞活力（$P<0.05$、0.001），并具有时间和浓度相关性。香贝散作用于MDA-MB-231和MCF-7细胞48 h的半数抑制浓度（IC_{50}）分别为2.344、1.961 mg·mL^{-1}。

表1 香贝散对MDA-MB-231和MCF-7细胞活力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 1 Effects of Xiangbeisan on viability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

细胞株	组别	质量浓度/（mg·mL^{-1}）	24 h细胞存活率/%	48 h细胞存活率/%	72 h细胞存活率/%
MDA-MB-231	对照	—	100.00±3.12	100.00±1.96	100.00±1.64
	香贝散	1	97.98±1.15*	83.91±4.72*	78.53±1.69***
		2	73.96±3.24***	61.49±3.84***	36.87±0.64***
		3	34.36±3.78***	22.98±0.99***	18.87±1.64***
		4	13.96±0.82***	5.40±4.57***	2.32±0.49***
		5	5.64±1.18***	0.80±0.43***	0.80±0.56***
MCF-7	对照	—	100.00±1.03	100.00±2.90	100.00±0.41
	香贝散	1	92.01±1.98*	93.91±3.63*	71.35±6.11***
		2	82.13±3.06***	46.95±0.85***	44.65±5.09***
		3	68.27±5.48***	28.67±1.19***	5.69±0.54***
		4	25.52±3.08***	15.65±1.55***	1.17±0.45***
		5	7.85±0.27***	4.57±0.52***	0.57±0.08***

与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{***}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$ $^{***}P<0.001$ *vs* control group.

3.1.2 香贝散抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞的增殖能力 结果如图1所示，正在发生增殖的细胞可被EdU标记成绿色，而细胞核则可被Hoechst 33321标记成蓝色。与对照组相比，香贝散能抑制人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7的增殖能力（$P<0.001$）。

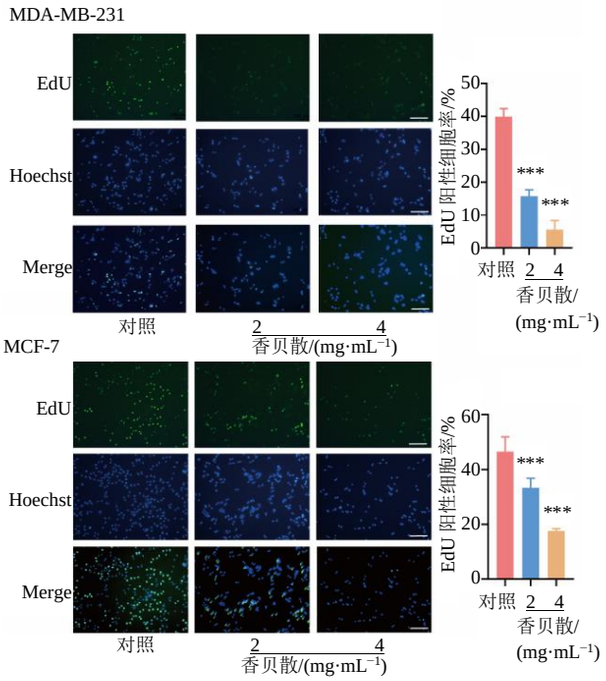
3.1.3 香贝散抑制MDA-MB-231和MCF-7细胞的集落形成能力 结果如图2所示，与对照组相比，香贝散可显著抑制人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7的体外增殖潜能（$P<0.001$）。

3.2 香贝散诱导人乳腺癌细胞凋亡

结果如图3所示，香贝散能够诱导人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7发生凋亡，与对照组比较，其凋亡率随着香贝散的给药浓度增加而逐渐升高，差异显著（$P<0.05$、0.001），见表2。

3.3 香贝散抑制人乳腺癌细胞的迁移与侵袭能力

细胞划痕实验结果显示，随着时间的延长，相比于对照组，香贝散给药组划痕愈合能力显著减弱（$P<0.001$），表明细胞的迁移能力受到了抑制，且具有浓度相关性（图4）。此外，细胞侵袭实验结果显示，与对照组相比，香贝散给药组穿过Transwell小室的细胞数目明显减少，随着给药浓度升高，穿过小室的细胞数目逐渐变少（图5）。因此，香贝散具有抑制人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7的体外迁移、侵袭能力。

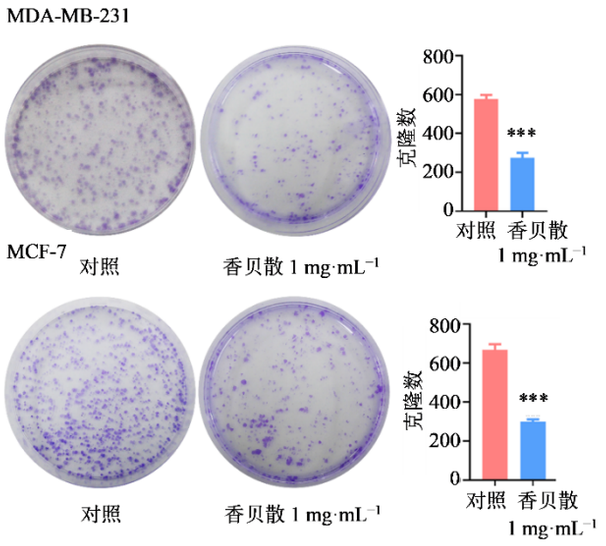


与对照组比较：$^{**}P<0.001$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 1　EdU 染色分析香贝散对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞增殖能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3，标尺=100 μm）

Fig. 1　Effect of Xiangbeisan on proliferative ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells analysed by EdU staining（$\bar{x}\pm s$，n=3，scale bar=100 μm）



与对照组比较：$^{***}P<0.001$。

$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

图 2　香贝散对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞集落形成能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 2　Effect of Xiangbeisan on colony forming ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

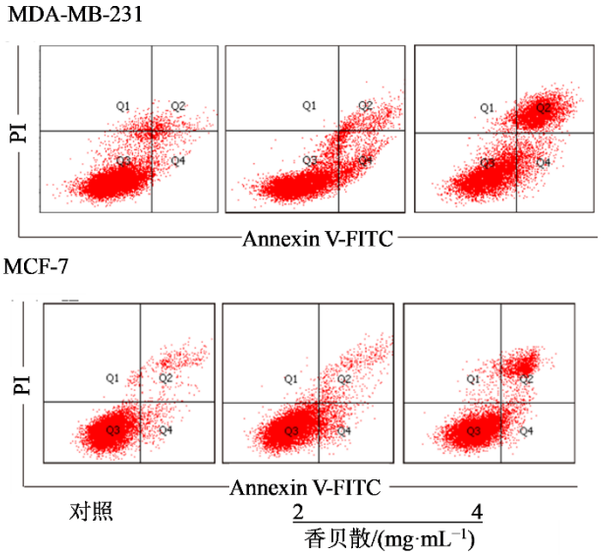


图 3　香贝散对 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞凋亡的影响

Fig. 3　Effect of Xiangbeisan on apoptosis of MDA-MB-231 and MCF-7 cells

表 2　香贝散对人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2　Effects of Xiangbeisan on apoptosis of human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

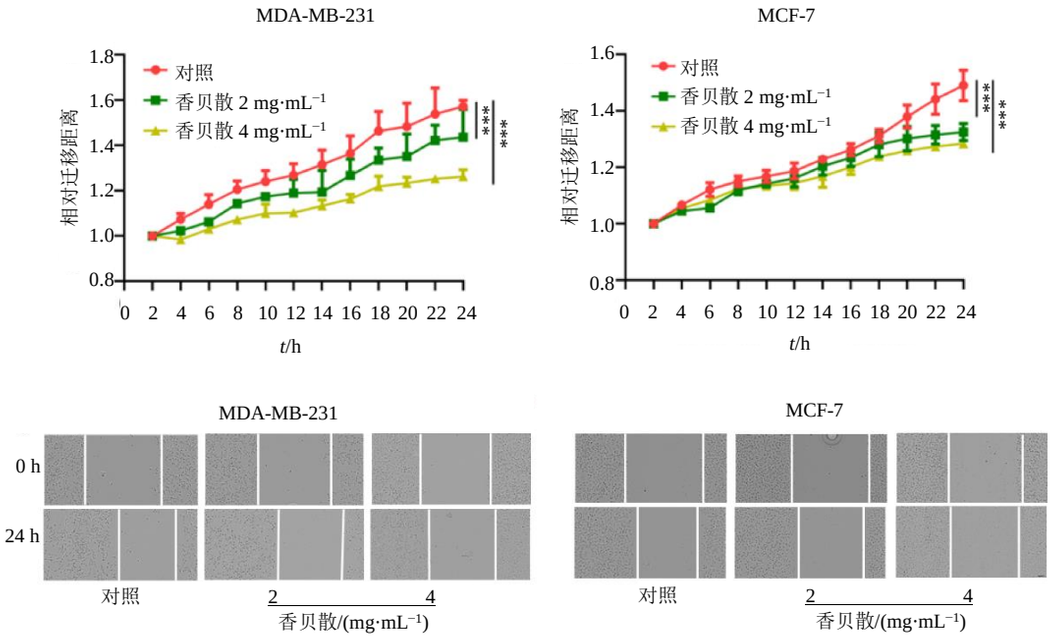
细胞	组别	质量浓度/(mg/mL⁻¹)	凋亡率/%
MDA-MB-231	对照	—	6.87±0.33
	香贝散	2	13.20±0.29*
		4	40.05±0.76***
MCF-7	对照	—	8.20±1.98
	香贝散	2	14.17±2.39
		4	19.03±3.85***

与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{***}P<0.001$。

$^{*}P<0.05$　$^{***}P<0.001$ *vs* control group.

3.4　香贝散能够诱导人乳腺癌细胞发生自噬

吖啶橙是一种细胞渗透性绿色荧光团，其向红色荧光的异色转移是具有浓度相关性的。因此，吖啶橙在酸性囊泡细胞器中发出红色荧光，例如自身溶酶体[9]。在本实验中吖啶橙染色结果显示，与对照组比较，香贝散给药后人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 中红色荧光的强度逐渐增加，表明酸性的自噬溶酶体逐渐增多，细胞自噬被促进（图 6）。此外，借助 Western blotting 法检测自噬关键蛋白水平的变化情况，结果均显示，与对照组比较，自噬关键调控蛋白 Beclin-1 和自噬标志物 LC3-II的蛋白水平均被显著上调（$P<0.01$、0.001）（图 7 和表 3）。因此，香贝散能够促进人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 自噬的发生。



与对照组比较：$^{***}P<0.001$。

$^{***}P < 0.001$ *vs* control group.

图4 香贝散对MDA-MB-231和MCF-7细胞迁移能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3，标尺=100 μm）

Fig. 4 Effect of Xiangbeisan on migration ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3，scale bar=100 μm）

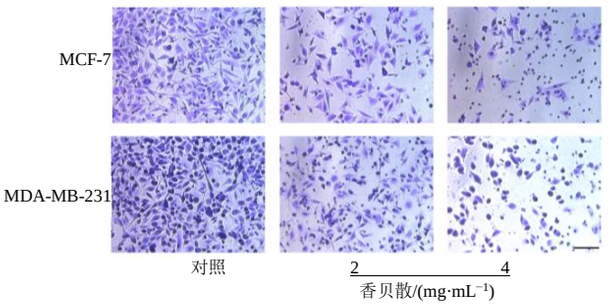


图5 香贝散对MDA-MB-231和MCF-7细胞侵袭能力的影响（标尺=100 μm）

Fig. 5 Effect of Xiangbeisan on invasive ability of MDA-MB-231 and MCF-7 cells（scale bar=100 μm）

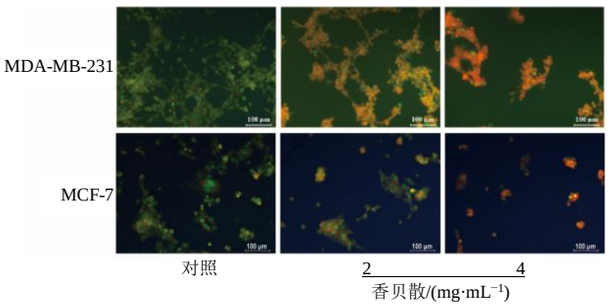


图6 香贝散对MDA-MB-231和MCF-7细胞自噬的影响（标尺= 100 μm）

Fig. 6 Effect of Xiangbeisan on autophagy in MDA-MB-231 and MCF-7 cells（scale bar = 100 μm）

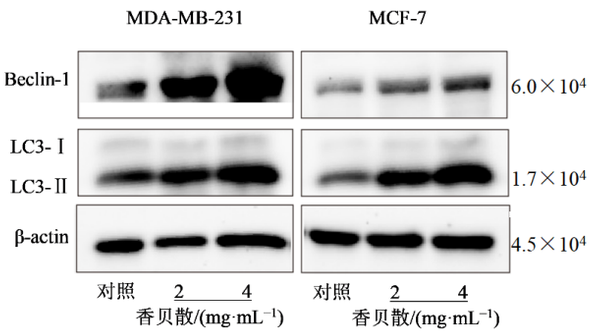


图7 香贝散对MDA-MB-231和MCF-7细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

Fig. 7 Effect of Xiangbeisan on expression levels of autophagy-related proteins in MDA-MB-231 and MCF-7 cells

3.5 香贝散对人乳腺癌细胞中AMPK/mTOR信号通路的影响

为了探究香贝散发挥抗乳腺癌作用的潜在机制，进一步开展了转录组测序研究。结果如图7所示，对转录组测序结果进行KEGG富集分析，差异基因变化最明显的通路包括mTOR信号通路、自噬信号通路等（图8）。借助Western blotting法进一步验证发现，与对照组比较，香贝散给药能够显著下调人乳腺癌细胞中mTOR的磷酸化水平（$P<0.001$），即香贝散能够抑制人乳腺癌细胞中mTOR信号（图9和表4）。已知在营养信号传导中，AMPK和mTOR可通过感知细胞ATP和营养（葡萄糖和氨

表 3 香贝散对人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞自噬相关蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3 Effect of Xiangbeisan on expression levels of autophagy-related proteins in human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	质量浓度/（mg·mL^{-1}）	MDA-MB-231		组别	质量浓度/（mg·mL^{-1}）	MCF-7	
		Beclin-1/β-actin	LC3-II/β-actin			Beclin-1/β-actin	LC3-II/β-actin
对照	—	1.00±0.04	1.00±0.02	对照	—	1.00±0.02	1.00±0.02
香贝散	2	2.49±0.06***	1.57±0.02***	香贝散	2	1.78±0.02***	1.69±0.10***
	4	4.65±0.04***	2.23±0.07***		4	2.91±0.02***	2.46±0.29**

与对照组比较：**P<0.01 ***P<0.001。

**P < 0.01 ***P < 0.001 *vs* control group.

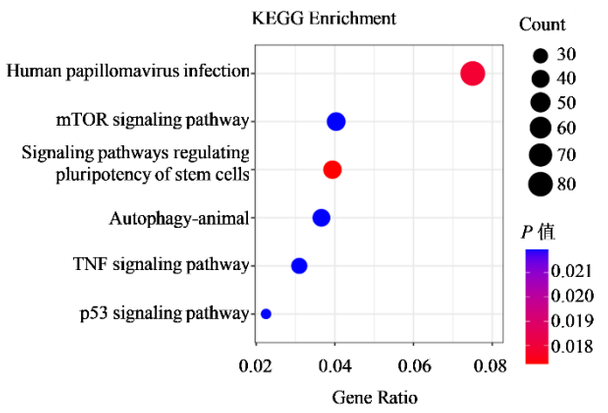


图 8 香贝散对 MCF-7 细胞 KEGG 信号通路的影响

Fig. 8 Effect of Xiangbeisan on KEGG signaling pathway in MCF-7 cells

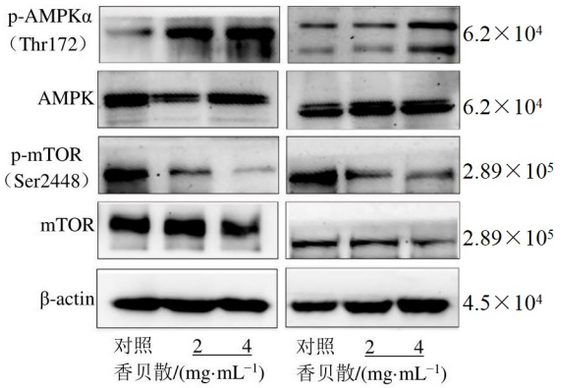


图 9 香贝散对人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effect of Xiangbeisan on the protein expression levels of AMPK/mTOR signaling pathway in human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells

基酸）水平，平衡细胞能量稳态[10]。此外，AMPK 通过调节 mTOR 活性在控制细胞增殖、自噬等生物学过程中发挥了重要作用[11]。接下来对 AMPK 的磷酸化水平也进行了检测，结果显示，与对照组比较，香贝散给药能够显著上调人乳腺癌细胞中 AMPK 的磷酸化水平（P<0.001）（图 9 和表 4）。结果显示香贝散给药能够显著上调人乳腺癌细胞中 AMPK 的磷酸化水平并显著下调 mTOR 的磷酸化水平。因此，激活 AMPK/mTOR 信号通路可能是香贝散发挥抗乳腺癌作用的重要机制。

4 讨论

恶性肿瘤细胞不受调控而出现异常和持续的细胞分裂和增殖，使得肿瘤细胞无限制地生长，从而形成肿瘤块[12]。增殖是癌症的关键部分，主要表现在肿瘤细胞中的某些基因发生突变导致关键调控基因的功能改变，从而促进细胞增殖[13]。乳腺癌细胞具有失控的增殖能力，其持续的增殖和分裂能力会影响组织的正常功能，因此抑制癌细胞的增殖能力在乳腺癌的治疗中具有重要作用[14]。乳腺癌前期治疗以抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡为主要治疗思路，而对于乳腺癌后期及转移性乳腺癌，则以抑制转移，延长患者生存期为主。本研究发现香贝散能够显著抑制人乳腺癌细胞的增殖，对

表 4 香贝散对人乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞 AMPK/mTOR 信号通路蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 4 Effect of Xiangbeisan on the protein expression levels of AMPK/mTOR signaling pathway in human breast cancer MDA-MB-231 and MCF-7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	给药浓度/（mg·mL^{-1}）	MDA-MB-231		组别	给药浓度/（mg·mL^{-1}）	MCF-7	
		p-AMPK/β-actin	p-mTOR/β-actin			p-AMPK/β-actin	p-mTOR/β-actin
对照	—	1.00±0.02	1.00±0.01	对照	—	1.00±0.03	1.00±0.11
香贝散	2	1.18±0.03***	0.78±0.02***	香贝散	2	4.25±0.04***	0.54±0.05***
	4	3.63±0.25***	0.26±0.03***		4	4.56±0.04***	0.22±0.07***

与对照组比较：***P<0.001。

***P < 0.001 *vs* control group.

于乳腺癌患者，减缓乳腺癌细胞的增殖速度是治疗的一个重要目标，可用于指导香贝散的临床应用。

乳腺癌转移是乳腺癌预后不良的主要原因，对乳腺癌转移的深入研究以探寻更好的治疗措施对于乳腺癌临床治疗意义重大[15]。细胞划痕实验和Transwell侵袭实验能够简单模拟肿瘤细胞在体内的迁移侵袭行为，常被用于评价药物对肿瘤细胞迁移侵袭能力的作用，本研究发现香贝散能够显著抑制人乳腺癌细胞的迁移侵袭能力。细胞凋亡与自噬为细胞死亡的主要形式，诱导肿瘤细胞凋亡或自噬已成为抗肿瘤药物研究的重要方向[16-17]。mTOR是一个重要的蛋白激酶，在细胞营养充足和生长因子刺激的情况下能够被激活，而激活的mTOR能够调控蛋白合成、细胞增殖、凋亡、自噬、肿瘤转移等生物学过程[18]，其抑制剂依维莫司于2012年获得美国食品药品管理局批准用于治疗内分泌治疗耐药患者的晚期乳腺癌[19]，在临床前模型和临床试验中均显示出能显著抑制乳腺癌患者肿瘤的生长[20]。AMPK是一种关键的能量传感器，可调节细胞代谢以维持能量稳态[11]。研究发现AMPK可以通过抑制mTOR信号通路进而调控细胞增殖、凋亡、自噬等过程[10]。西红花苷可通过LKB1/AMPK/mTOR通路抑制食管癌细胞的增殖、凋亡和侵袭[21]。黄芪有效成分可通过自噬和p53/AMPK/mTOR信号通路在肺癌治疗中发挥作用[22]。本研究发现香贝散能够显著诱导人乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞发生凋亡和自噬，而且借助转录组测序技术和Western blotting实验发现香贝散在人乳腺癌细胞中能够激活AMPK/mTOR信号通路。因此，AMPK/mTOR信号通路上调可能参与了香贝散对人乳腺癌细胞增殖、凋亡、自噬等调控作用。

本研究针对香贝散初步开展了其体外抗乳腺癌作用及其分子机制研究。研究发现香贝散能够显著抑制人乳腺癌细胞的增殖和迁移、侵袭能力，能够诱导凋亡和自噬的发生，并且激活AMPK/mTOR信号通路可能是其发挥抗乳腺癌作用的重要机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Trapani D, Ginsburg O, Fadelu T, et al. Global challenges and policy solutions in breast cancer control [J]. Cancer Treat Rev, 2022, 104: 102339.

[2] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, et al. Breast cancer [J]. Lancet, 2021, 397(10286): 1750-1769.

[3] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389 (10074): 1134-1150.

[4] 来保勇, 吕灵艳, 赵静, 等. 10种口服中成药联合化疗治疗乳腺癌的网状Meta分析 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6609-6624.
Lai B Y, Lv L Y, Zhao J, et al. A network Meta-analysis of 10 kinds of oral Chinese patent medicine combined with chemotherapy in treatment of breast cancer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(21): 6609-6624.

[5] 贾颖, 李丽, 赵尚华. 赵尚华应用逍遥蒌贝散治疗乳腺增生经验 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(1): 10-12.
ia Y, Li L, Zhao S H. Zhao Shanghua's experience in treating hyperplasia of mammary glands with Xiaoyao Loubei Powder [J]. World J Integr Tradit West Med, 2010, 5(1): 10-12.

[6] 杨雨婷, 曾瑾, 陈平, 等. 西黄丸抗肿瘤临床应用及药理作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (3): 250-258.
Yang Y T, Zeng J, Chen P, et al. Anti-tumor application and pharmacological mechanism of xihuangwan: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med For, 2022, 28(3): 250-258.

[7] 柳芳, 鞠海, 苗颖, 等. 小金丸及其组成药味抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(13): 1844-1846.
Liu F, Ju H, Miao Y, et al. Research progress on anti-tumor effect of Koganamaru and its components [J]. China Pharm, 2015, 26(13): 1844-1846.

[8] 贾智, 刘传波, 周琴, 等. 肝动脉介入术联合香贝散治疗难治性乳腺癌肝转移1例报告及文献复习 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(1): 101-104.
Jia Z, Liu C B, Zhou Q, et al. Hepatic arterial intervention combined with Xiangbei San in the treatment of refractory breast cancer with liver metastasis: A case report and literature review [J]. Chin J Cancer Biother, 2024, 31(1): 101-104.

[9] Thomé M P, Filippi-Chiela E C, Villodre E S, et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy [J]. J Cell Sci, 2016, 129(24): 4622-4632.

[10] Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18): 9765.

[11] Han D, Li S J, Zhu Y T, et al. LKB1/AMPK/mTOR signaling pathway in non-small-cell lung cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(7): 4033-4039.

[12] Lüönd F, Tiede S, Christofori G. Breast cancer as an example of tumour heterogeneity and tumour cell plasticity during malignant progression [J]. Br J Cancer,

2021, 125(2): 164-175.

[13] Allred D C, Clark G M, Elledge R, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1993, 85(3): 200-206.

[14] Beresford M J, Wilson G D, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: Practicalities and applications [J]. Breast Cancer Res, 2006, 8(6): 216.

[15] Ibragimova M K, Tsyganov M M, Kravtsova E A, et al. Organ-specificity of breast cancer metastasis [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(21): 15625.

[16] Su Z Y, Yang Z Z, Xu Y Q, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis [J]. Mol Cancer, 2015, 14: 48.

[17] Zhou J, Jiang Y Y, Chen H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Cell Prolif, 2020, 53(2): e12739.

[18] Lepore Signorile M, Sanese P, di Nicola E, et al. SMYD3 modulates AMPK-mTOR signaling balance in cancer cell response to DNA damage [J]. Cells, 2023, 12(22): 2644.

[19] Alvarez R H, Bechara R I, Naughton M J, et al. Emerging perspectives on mTOR inhibitor-associated pneumonitis in breast cancer [J]. Oncologist, 2018, 23(6): 660-669.

[20] Liu J, Li H Q, Zhou F X, et al. Targeting the mTOR pathway in breast cancer [J]. Tumour Biol, 2017, 39(6): 1010428317710825.

[21] 冯玉, 冯南, 郭义锦, 等. 西红花苷通过 LKB1/AMPK/mTOR 通路抑制食管癌细胞的增殖、凋亡和侵袭 [J]. 解剖学研究, 2023,45(5): 447-453.
Feng Y, Feng N, Guo Y J, et al. Saffronin inhibits the proliferation, apoptosis and invasion of esophageal cancer cells through the LKB1/AMPK/mTOR pathway [J]. Anat Res, 2023, 45(05): 447-453.

[22] Yang B, Yang N, Chen Y, et al. An integrated strategy for effective-component discovery of *Astragali Radix* in the treatment of lung cancer [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 580978.

[责任编辑 兰新新]