白头翁皂苷 B_4 与 5-氟尿嘧啶联用抗乳腺癌作用及机制

张 琦，田冲冲*

江苏医药职业学院 药学院，江苏 盐城 224005

摘 要：目的 从体内外水平探究白头翁皂苷 B_4（AB_4）与 5-氟尿嘧啶（5-Fu）联合用药对小鼠 4T1 乳腺癌细胞的作用及其分子机制。**方法** 体外分别采用细胞增殖抑制实验、细胞创伤愈合实验、Transwell 小室侵袭实验、流式细胞分析以及实时荧光定量 PCR 法（qRT-PCR）检测 AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 细胞功能和凋亡的影响；体内借助 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠模型，观察 AB_4 与 5-Fu 联合对移植瘤生长的影响；通过苏木精-伊红（HE）染色法分析联合用药对肿瘤组织形态学和微血管密度的影响；流式细胞术检测 AB_4 联合 5-Fu 对骨髓源性细胞（BMDCs）动员的影响；最后，通过 qRT-PCR 和 Western blotting 技术分析对肿瘤组织中相关因子 mRNA 及蛋白表达的影响。**结果** 体外实验证实 AB_4 联合 5-Fu 显著降低 4T1 乳腺癌细胞活力，并且抑制其迁移和侵袭能力，同时可诱导其凋亡（$P<0.01$）；体内实验表明 AB_4 联合 5-Fu 显著抑制 4T1 移植瘤的生长（$P<0.01$），减少肿瘤组织内微血管密度以及外周循环血液中促血管新生 BMDCs 的细胞计数（$P<0.01$），还能显著上调肿瘤组织中促凋亡因子的 mRNA 水平及降低抗凋亡因子的 mRNA 水平（$P<0.01$），同时抑制肿瘤血管新生相关因子蛋白的表达（$P<0.01$）。**结论** AB_4 与 5-Fu 联合使用可以协同抑制 4T1 肿瘤细胞的生长。机制可能与其对肿瘤细胞功能的直接抑制作用有关，同时也与其对 BMDCs 动员的抑制相关，这间接减少了肿瘤血管新生。

关键词： 白头翁皂苷 B_4；5-氟尿嘧啶；乳腺癌；协同作用；血管新生；凋亡

中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2024）11-2574-11

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.013

Study on synergistic anti-tumor effect and mechanism of anemoside B_4 combined with 5-fluorouracil in breast cancer

ZHANG Qi, TIAN Chongchong

College of Pharmacy, Jiangsu Medical College, Yancheng 224005, China

Abstract: Objective To examine the combined impact of Anemoside B_4 (AB_4) and 5-fluorouracil (5-Fu) on murine 4T1 breast cancer cells, both *in vitro* and *in vivo*, while also investigating the underlying molecular mechanisms. **Methods** A series of experiments, including cell proliferation, wound healing, matrigel invasion assays, and flow cytometry, were conducted to assess how the combination of AB_4 and 5-Fu influences 4T1 cell function and apoptosis *in vitro*. *In vivo*, a tumor model was created by subcutaneously injecting 4T1 cells into BALB/c mice to observe the combined effects of AB_4 and 5-Fu on tumor growth. HE staining was used to examine changes in tumor tissue microstructure, while flow cytometry analyzed the impact of AB_4 and 5-Fu on the mobilization of bone marrow-derived cells (BMDCs). Additionally, qRT-PCR and Western blotting were employed to measure mRNA levels of apoptosis-related factors and the protein expression of angiogenesis-related factors in tumors. **Results** The combination of AB_4 and 5-Fu significantly reduced the viability and the migration and invasion capacity of 4T1 breast cancer cells ($P < 0.01$). Moreover, the proportion of cells undergoing apoptosis was significantly increased when treated with AB_4 and 5-Fu together ($P < 0.01$). Besides, the combined treatment of AB_4 and 5-Fu led to a more significant tumor growth inhibition in 4T1 xenograft mouse model ($P < 0.01$). The intratumoral microvascular density in 4T1 xenograft was dramatically reduced according to the HE staining results ($P < 0.01$) and the cell count of BMDCs in peripheral blood of tumor-bearing mice was also reduced ($P < 0.01$). qRT-PCR analysis shown that AB_4 combined with 5-Fu significantly increased the mRNA expression of pro-apoptotic factors

收稿日期： 2024-05-06

基金项目： 江苏医药职业学院自然科学基金研究一般项目（20214107）；江苏高校哲学社会科学研究一般项目资助（2022SJYB2075）；江苏省盐城市卫生健康委员会 2023 年度医学科研立项项目（YK2023032，YK2023097）

第一作者： 张 琦（1988—），女，讲师，研究方向为中药药理学。E-mail：zhangqijsyy@163.com

***通信作者：** 田冲冲（1987—），女，讲师，研究方向为中药肿瘤药理学。E-mail：912969990@qq.com

and decreased the mRNA levels of anti-apoptotic factors in tumor tissues ($P < 0.01$), and the protein expression of tumor angiogenesis-related factors was inhibited. **Conclusions** The combined use of AB_4 and 5-Fu effectively inhibited the growth of 4T1 tumor cells in a synergistic manner. This effect is likely due to both the direct inhibition of tumor cell function and the suppression of BMDC mobilization, which in turn reduces tumor angiogenesis indirectly.

Key words: anemoside B_4; 5-fluorouracil; breast cancer; synergistic effet; angiogenesis; apoptosis

乳腺癌是全球范围内常见的恶性肿瘤之一，且死亡率较高，因而成为女性健康的重要威胁[1-2]。目前，乳腺癌的常规治疗方法包括手术、放化疗和免疫治疗[3-4]。根据患者的具体情况，联合多种治疗方法能够提升乳腺癌患者的总体生存率[5]。然而，传统的综合治疗难以进一步降低乳腺癌的转移和复发率，且常伴随明显的不良反应[6]。此外，乳腺癌细胞通常会产生耐药性，导致复发率不断上升[7]，因此仍需探索更为理想的乳腺癌治疗药物。

白头翁皂苷B_4（AB_4）是从毛茛科植物的白头翁中提取的，具有清热解毒、凉血止痢的功效，主要成分包括三萜皂苷和木脂素等[8-9]。作为一种三萜皂苷，白头翁皂苷具有抗肿瘤活性[10]，其中的主要活性成分AB_4被研究证实与诱导肝癌细胞凋亡密切相关[11-12]。在乳腺癌的临床治疗中，5-氟尿嘧啶（5-Fu）是一种常用的化疗药物[13-14]。虽然高剂量的5-Fu能够提高抗肿瘤效果并减少耐药性，但也伴随着严重的不良反应，限制了剂量的增加[15-16]。因此，将5-Fu与其他抗癌药物联合使用，不仅可以增强肿瘤细胞对化疗的敏感性，还能降低对正常细胞的毒性。本研究旨在以4T1乳腺癌细胞为研究对象，分别在体内外考察AB_4联合5-Fu对4T1细胞生长的影响，并探讨其潜在机制，为临床寻找高效低毒的乳腺癌治疗药物提供参考。

1 材料

1.1 动物

24只雌性BALB/c小鼠，体质量（18±2）g，购自江苏华创信诺公司[生产许可证号：SCXK（苏）2020-0009]，于江苏医药职业学院SPF实验动物房进行饲养。实验期间允许小鼠自由饮水和进食。本实验获得江苏医药职业学院动物伦理委员会批准（批准号2020011）。

1.2 材料与试剂

小鼠乳腺癌4T1细胞（批号：SCSP-5056，中国科学院上海细胞库）；胎牛血清（批号：U2742007RP，美国Gibco公司）；RPMI 1640培养基（批号：31800-022，美国Gibco公司）；白头翁皂苷B4（批号：abs47000024，HPLC测质量分数≥98%，上海爱必信生物科技有限公司）；5-Fu、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（批号：F8300、G1126，Solarbio公司）；Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、Trizol-总RNA抽提试剂（批号：C1062S、R0016，上海碧云天生物技术有限公司）；BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液（批号：AR0197A、AR0105，武汉博士德生物工程有限公司）；血管内皮生长因子受体-2（VEGFR2）、血管内皮生长因子受体-1（VEGFR1）、基质金属蛋白酶9（MMP9）、β-actin抗体（批号：9698T、64094、24317、4970，美国Cell Signaling Technology公司）；ECL化学发光液（批号：HY-K1005，美国MedChemExpress公司）。

1.3 仪器

BD056 Binder细胞培养箱（德国binder公司）；ELx800酶标仪（美国Bio Tek公司）；BTES-M1脱色摇床（其林贝尔仪器制造有限公司）；Dlab MX-S/MX-F涡旋仪（上海泱浩仪器有限公司）。

2 方法

2.1 4T1细胞培养

用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在细胞培养箱中培养4T1细胞，培养温度为37 ℃，CO_2浓度为5%。

2.2 细胞增殖实验

收集对数生长期的4T1细胞，常规消化、离心、计数，调整细胞密度为8×10^4个·mL^{-1}，取100 μL细胞悬液接种于96孔板中。培养24 h后，分别给予不同的药物进行干预，同时设置调零组（不接种细胞）。48 h后，每孔加入10 μL CCK-8溶液。孵育2 h后使用酶标仪（检测波长为450 nm）测定吸光度（A）值[17]。

2.3 划痕实验

收集对数生长期的4T1细胞接种于6孔板中，每孔8×10^4个，待细胞汇合度达80%时在孔正中作垂直划痕，去除旧培养基，用磷酸盐缓冲液（PBS）轻柔冲洗后，更换为无药物、含不同药物的无血清培养基，培养48 h后拍照并进行结果分析，实验单独重复3次[18]。

2.4 侵袭实验

参考张媛等[18]的实验方法并进行修改。将

Transwell 小室置于 24 孔板中，均匀铺入 50 μL Martrigel 基质胶，培养箱孵育 5 h 待胶凝固。4T1 细胞用无血清培养基重悬，取 200 μL（2×10^5 个）接种于上室中。下室加入 600 μL 不含药物以及含不同药物的完全培养基，48 h 后取出上室，采用结晶紫染色后于显微镜下观察、拍照。实验单独重复 3 次。

2.5 细胞凋亡检测

采用细胞凋亡检测试剂盒检测不同药物浓度干预后对 4T1 细胞凋亡的影响。细胞接种，给药方式同“2.3”项，取药物处理后的细胞，按照产品说明书进行操作，随后上机进行检测。

2.6 4T1 小鼠移植瘤模型的建立、分组与给药

参照课题组之前建立 4T1 荷瘤小鼠模型的方法[18]，收集对数生长期的 4T1 细胞后制备单细胞悬液，以每只 0.1 mL（1×10^6 个细胞）的量接种于 BALB/c 小鼠股沟皮下。接种后，每天观察小鼠状态与肿瘤的生长情况。待接种后第 7 天肿瘤长至豆粒大小，将 24 只小鼠随机分为模型组、50 $mg\cdot kg^{-1}$ AB_4 组、25 $mg\cdot kg^{-1}$ 5-Fu 组和 AB_4（50 $mg\cdot kg^{-1}$）＋5-Fu（25 $mg\cdot kg^{-1}$）组，每组 6 只。采用 ip 注射的方式给予相应的药物，之后每天 ip 给药 1 次，连续给药 10 d。

2.7 小鼠称体质量以及肿瘤样本的采集

用药后每天观察小鼠一般状态，如日常活动、精神状态以及体质量变化。每隔 1 天用游标卡尺测量肿瘤长径与短径，根据公式计算肿瘤体积。药物处理 10 d 后，麻醉小鼠后首先抽取腹腔静脉血用于流式分析，然后将肿瘤组织进行剥离，进行称质量后于 4% 多聚甲醛中固定。

肿瘤体积=1/2 肿瘤长径×短径^2

2.8 HE 染色

将固定的肿瘤组织经脱水、透明化处理后，进行石蜡包埋、切片。分别采用二甲苯、梯度乙醇脱蜡、脱水，再进行 HE 染色，最后用中性树胶封片。使用光学显微镜对切片进行观察并拍照分析血管密度。

2.9 流式细胞术

参考本课题组前期建立的方法以及 Zhou 等[18-19]的实验方法，将腹腔静脉血离心（1 000 $r\cdot min^{-1}$，5 min）后弃上清。加入 10 倍体积的红细胞裂解液，于冰上裂解 5 min。待裂解完成后进行离心（4 ℃，1 000 $r\cdot min^{-1}$，5 min），弃红色上清。加入 500 μL PBS 重悬，调整细胞数至 1×10^6 个·mL^{-1}。加入抗体稀释液于 4 ℃避光孵育 45 min 后，离心（1 000 $r\cdot min^{-1}$，5 min），弃上清，加入 500 μL PBS 重悬，重复洗涤 2 次后流式细胞仪进行检测。

2.10 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）法

使用 Trizol 试剂从肿瘤细胞或组织中提取 RNA，随后利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。以 GAPDH 作为内参基因，应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目标基因的 mRNA 相对表达量。实验步骤依据试剂盒说明书进行操作。引物序列见表 1。

2.11 Western blotting

使用 RIPA 裂解液在冰上对肿瘤组织进行匀浆，以提取总蛋白。蛋白定量后，取 30 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，转膜并封闭，然后将一抗在 4 ℃摇床上孵育过夜。随后用 TBST 洗膜，加入二抗在常温下孵育 1 h。再用 TBST 洗膜后，加入 ECL 显色液对蛋白条带进行显影并拍照。最后，分析条带的灰度值，并以 β-actin 作为内参计算各目的条带的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

基因	引物序列	产物长度/bp
Bcl-2	上游：ATCTGGGCCACAAGTGAAGT	152
	下游：GCTGATTCGAGGTTTTGCCT	
Bax	上游：TCATGGGCTGGACATTGGAC	114
	下游：GAGACAGGGACATCAGTCGC	
Caspase-3	上游：AGCACCTGGTTACTATTCCTGGAG	191
	下游：GGATCTGTTTCTTTGCGTGGA	
Caspase-9	上游：GTGTTCCAGGGAAGATCAGGG	106
	下游：GAGGAAGGGCAGAAGTTCACAT	
GAPDH	上游：CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游：TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

2.12　数据处理

所有的统计分析均使用 GraphPad Prism 软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用配对 t 检验。检验水准 α=0.05。用 Image-Pro Plus 软件分析染色图片，计算各组肿瘤组织中的微血管密度。

3　结果

3.1　AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 乳腺癌细胞活力的影响

采用 CCK-8 法检测 AB_4（0、50、100、200、400、800、1 600 μmol·L^{-1}）、5-Fu（0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μmol·L^{-1}）单独及联合给药对 4T1 细胞活力的影响。结果显示，当单独使用 AB_4 处理细胞后，AB_4 的半数抑制浓度(IC_{50})为392.45 μmol·L^{-1}(图1-A)。单独使用5-Fu处理细胞后，5-Fu 的 IC_{50} 为 18.92 μmol·L^{-1}（图 1-B)。基于此结果，选择400 μmol·L^{-1} AB_4与20 μmol·L^{-1} 5-Fu 联合（AB_4＋5-Fu）处理 4T1 细胞。由图 1-C 可以看出，与对照组比较，当分别用 400 μmol·L^{-1} AB_4、20 μmol·L^{-1} 5-Fu 以及 AB_4+5-Fu 处理细胞时，细胞的相对增殖率分别为 42.77%、53.02% 和 16.30%，差异均具有显著性(P<0.01)。其中，与单用AB_4或5-Fu比较，联合组 4T1 细胞的活力进一步降低，差异具有统计学意义（P<0.05、0.01）。提示 AB_4 增强 5-Fu 对 4T1 细胞的体外抗增殖作用。

3.2　AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

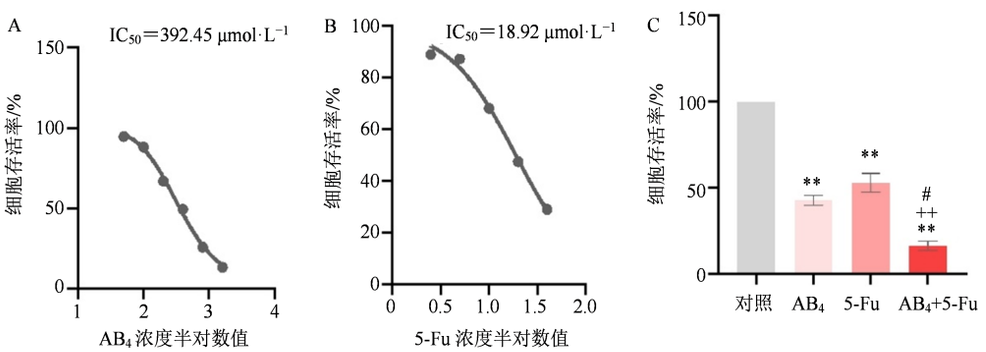
采用细胞划痕实验评估各组药物对 4T1 细胞迁移能力的影响。由图 2 可以看出，与对照组比较，AB_4（400 μmol·L^{-1}）、5-Fu（20 μmol·L^{-1}）以及 AB_4(400 μmol·L^{-1})＋5-Fu(20 μmol·L^{-1})组细胞划痕愈合率分别为（73.3±3.05)%、(62.67±3.05)%、(44.33±3.04)%，差异均具有极显著性（P<0.01）。其中 AB_4 与 5-Fu 单药处理组可见少量细胞的脱落坏死，细胞向中线迁移减慢；与两单药处理组相比，联合用药组脱落坏死的细胞增多，细胞迁移能力进一步减弱，几乎未见细胞向中线迁移，差异均具有统计学意义（P<0.05、0.01），提示 AB_4 与 5-Fu 联合能更有效地抑制 4T1 乳腺癌细胞的迁移。

采用侵袭实验考察药物处理对 4T1 细胞侵袭能力的影响。由图 3 可以看出，与对照组比较，AB_4 组与 5-Fu 组 4T1 细胞侵袭能力减弱，穿过胶层的细胞数明显减少（P<0.01）；AB_4 与 5-Fu 联合用药组细胞侵袭能力最弱，穿过胶层的细胞减少更为显著（P<0.01），且与各单药处理组比较，差异具有统计学意义（P<0.05、0.01）。提示联合用药组能更有效的抑制 4T1 细胞的侵袭能力，即 AB_4 能够增强 5-Fu 对乳腺癌 4T1 细胞的侵袭抑制作用。

3.3　AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 肿瘤细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪检测各组药物对 4T1 乳腺癌细胞凋亡的影响。由图 4 可以看出，与对照组比较，AB_4（400 μmol·L^{-1}）组、5-Fu（20 μmol·L^{-1}）组凋亡率分别增加了 29.89% 和 38.45%，差异具有极显著性(P<0.01)；而 AB_4(400 μmol·L^{-1})＋5-Fu（20 μmol·L^{-1}）联合用药组凋亡率进一步增加，达到 72.33%，与对照组和两单用组相比均具有极显著差异（P<0.05、0.01），提示 AB_4 能够增强 5-Fu 对乳腺癌 4T1 细胞的凋亡诱导作用。

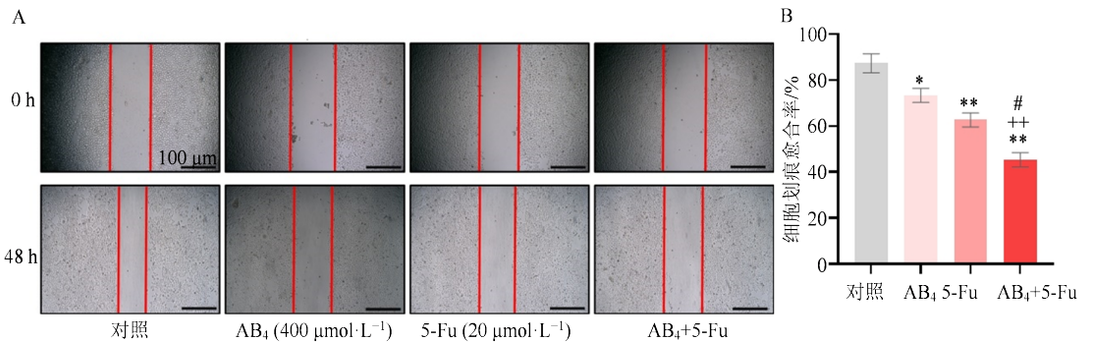
进一步通过 qRT-PCR 检测各给药组对 4T1 细胞凋亡因子的 mRNA 表达的影响。由图 5 可以看出，与对照组比较，AB_4（400 μmol·L^{-1}）组、5-Fu（20 μmol·L^{-1}）组及 AB_4（400 μmol·L^{-1}）＋5-Fu（20 μmol·L^{-1})组肿瘤细胞中的促凋亡因子 *Caspase-3*、*Caspase-9* 和 *Bax* mRNA 的表达均明显上调，差异具



A-AB_4的IC_{50}；B-5-Fu的IC_{50}；C-CCK-8法检测细胞存活率；与对照组比较：$^{**}P$<0.01；与AB_4组比较：^{++}P<0.01；与5-Fu组比较：$^{\#}P$<0.05。
A-IC_{50} of AB_4; B-IC_{50} of 5-Fu; C-Cell proliferation rate assessed by CCK-8; $^{**}P$<0.01 *vs* control group; ^{++}P<0.01 *vs* AB_4 group; $^{\#}P$<0.05 *vs* 5-Fu group.

图 1　5-Fu、AB_4 及 AB_4＋5-Fu 对 4T1 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

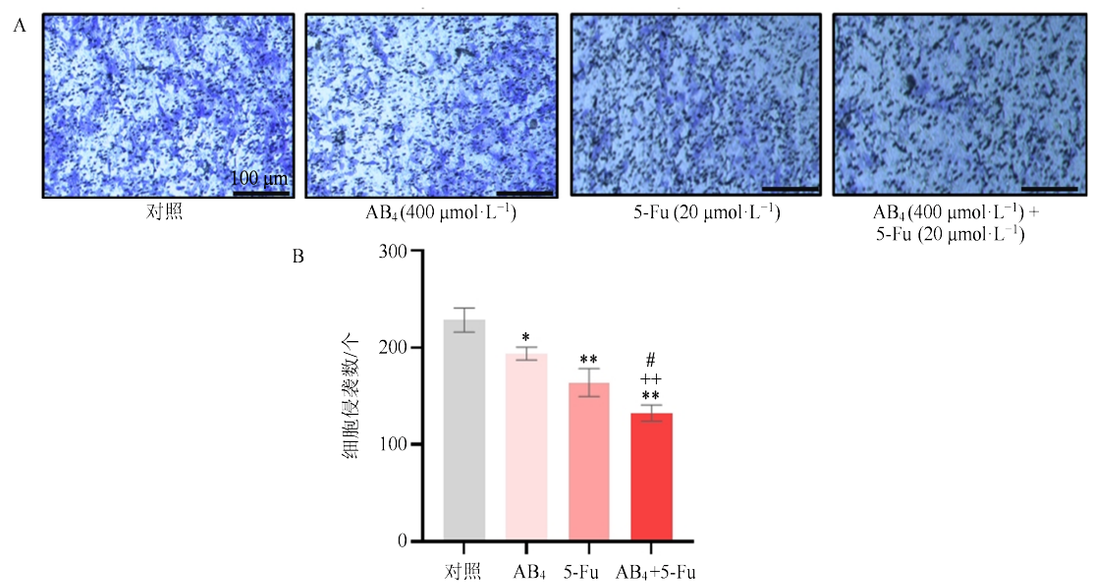
Fig. 1　Effect of 5-Fu, AB_4 and AB_4 + 5-Fu on proliferation of 4T1 cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)



A-划痕实验检测细胞迁移能力;B-定量分析细胞划痕愈合率;与对照组比较:$^{*}P$<0.05 $^{**}P$<0.01;与AB_4组比较:^{++}P<0.01;与5-Fu组比较:$^{\#}P$<0.05。
A-Migration capacity of 4T1 cells evaluated by scratch assay; B-quantitative analysis of the wound healing rate; $^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; ^{++}P < 0.01 *vs* AB_4 group; $^{\#}P$ < 0.05 *vs* 5-Fu group.

图 2 5-Fu、AB_4及AB_4+5-Fu对 4T1 肿瘤细胞迁移的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3，×20）

Fig. 2 Migration capacity of 4T1 cells treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=3, ×20)



A-Transwell小室检测细胞的侵袭能力;B-定量分析细胞侵袭数;与对照组比较:$^{*}P$<0.05 $^{**}P$<0.01;与AB_4组比较:^{++}P<0.01;与5-Fu组比较:$^{\#}P$<0.05。
A-Invasion capacity of 4T1 cells evaluated by Transwell assay; B-quantitative analysis of numbers of invaded cells; $^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; ^{++}P < 0.01 *vs* AB_4 group; $^{\#}P$ < 0.05 *vs* 5-Fu group.

图 3 5-Fu、AB_4及AB_4+5-Fu对 4T1 细胞侵袭能力的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3，×20）

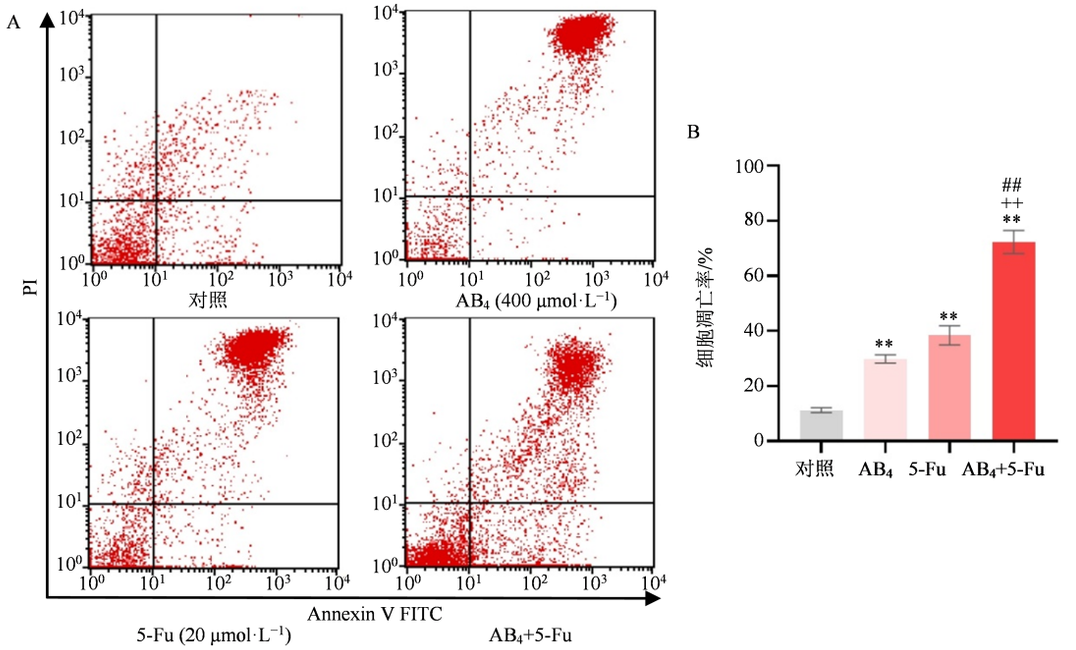
Fig. 3 Invasion capacity of 4T1 cells treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4 + 5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=3, ×20)

有极显著性（P<0.05、0.01）；而抗凋亡因子 *Bcl-2* mRNA表达则发生明显下调，差异具有极显著性（P<0.05、0.01）。其中，与两单用组相比，联合用药组对凋亡因子 mRNA 表达的影响最为明显（P<0.01），进一步证实AB_4能够增强 5-Fu 对乳腺癌 4T1 细胞的促凋亡作用。

3.4 AB_4与5-Fu联合对4T1荷瘤小鼠肿瘤生长的影响

为进一步验证两药的协同抗乳腺癌作用，在小鼠移植瘤模型上考察了AB_4与 5-Fu 联合对 4T1 肿瘤生长的影响。由图 6 可以看出，给药 10 d 后，与模型组比较，各给药组的瘤体积均明显减少，差异具有统计学意义（P<0.01）。其中，AB_4+5-Fu 联合用药组肿瘤体积最小，与两单用组相比差异具有显著性（P<0.05），提示AB_4能够增强 5-Fu 的体内抗肿瘤作用。在整个动物实验过程中，与模型组比较，除了 5-Fu 处理组小鼠出现明显体质量减轻外（P<0.05），其余各给药组的小鼠体质量均未发生明显变化（图 6），提示两药联合具有良好的耐受性。

进一步对瘤质量进行分析，结果如图 7 所示，各给药组的瘤质量均较模型组明显降低，差异具有极显著性（P<0.01）；其中AB_4+5-Fu 组的瘤质量最低，与两单药组相比，差异也具有极显著性（P<0.01）。进一步证实AB_4能够增强 5-Fu 对 4T1 的体内抗肿瘤作用。

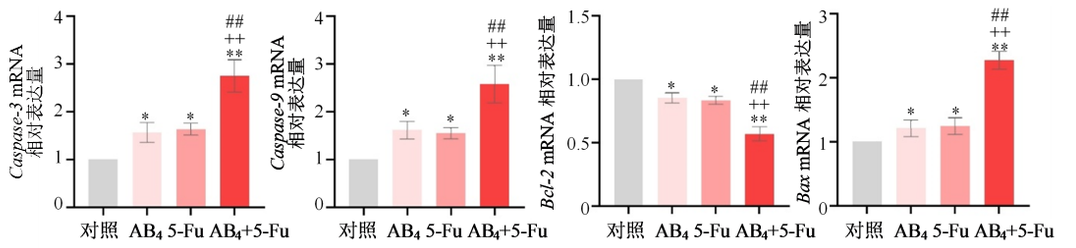


A-流式检测细胞凋亡；B-定量分析细胞凋亡；与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{++}P<0.01$；与 5-Fu 组比较：$^{\#\#}P<0.01$。

A-cell apoptosis evaluated by flow cytometry; B-quantitative analysis of apoptotic rate of 4T1 cells; $^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{++}P<0.01$ *vs* AB_4 group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5-Fu group.

图 4　5-Fu、AB_4 及 AB_4+5-Fu 对 4T1 肿瘤细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 4　Apoptotic rate of 4T1 cells treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu（$\bar{x}\pm s$, n=3）



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{++}P<0.01$；与 5-Fu 组比较：$^{\#\#}P<0.01$。

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{++}P<0.01$ *vs* AB_4 group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5-Fu group.

图 5　5-Fu、AB_4 及 AB_4 联合 5-Fu 对 4T1 肿瘤细胞中凋亡因子 mRNA 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

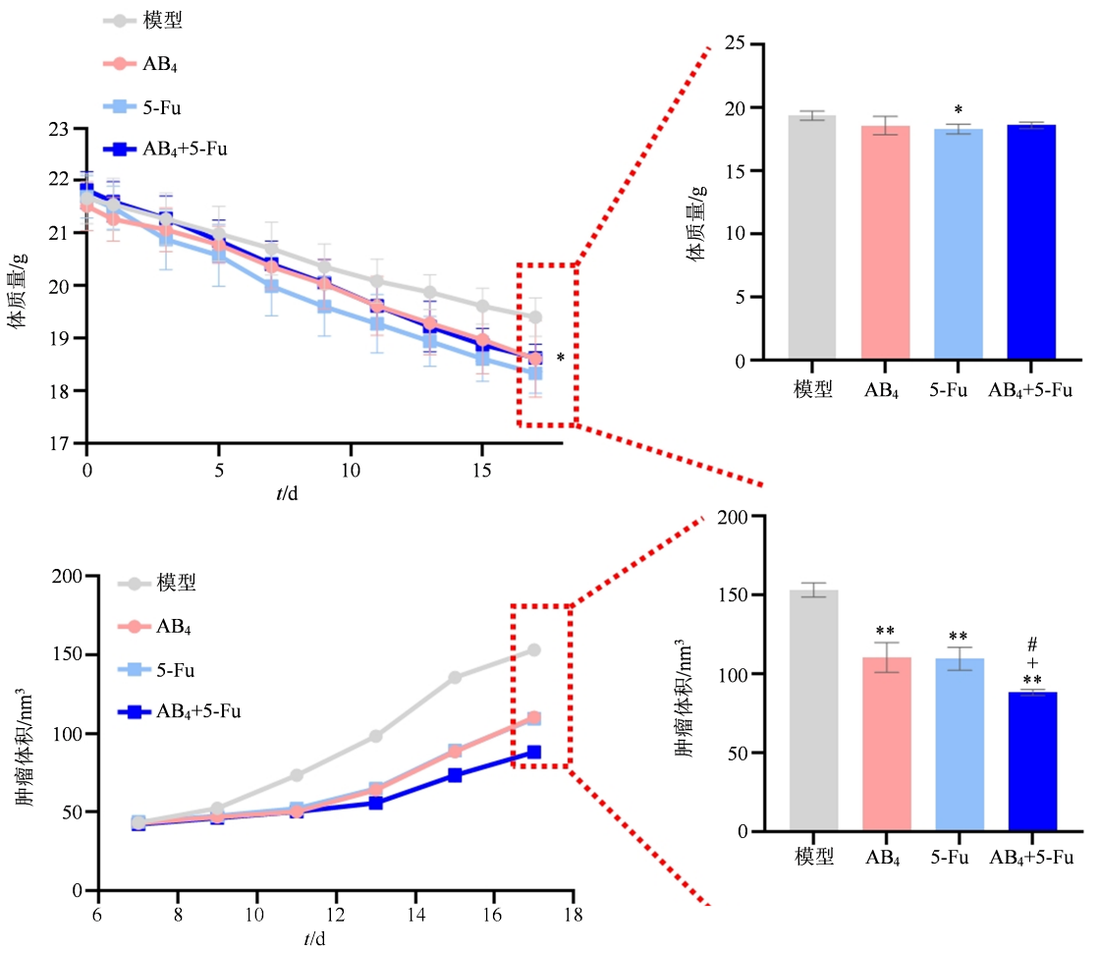
Fig. 5　mRNA levels of apoptotic factors in 4T1 cells treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu（$\bar{x}\pm s$, n=3）

3.5　AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡因子 mRNA 水平的影响

为探究凋亡诱导在药物体内抗肿瘤作用中所扮演的角色，采用 qRT-PCR 检测各给药组对 4T1 肿瘤组织中凋亡因子 mRNA 水平的影响。由图 8 可以看出，与模型组相比，各给药组肿瘤组织中促凋亡因子 *Caspase-3*、*Caspase-9* 以及 *Bax* 的 mRNA 的表达水平均发生明显上调，差异具有极显著性（$P<0.01$）；而抗凋亡因子 *Bcl-2* 的 mRNA 的表达则明显降低，差异具有极显著性（$P<0.01$）。与 AB_4 组比较，AB_4+5-Fu 组的促凋亡因子 *Capase-3*、*Casepase-9* 及 *Bax* 的 mRNA 含量均显著升高，抗凋亡因子 *Bcl-2* 的 mRNA 含量显著降低（$P<0.01$）；与 5-Fu 组比较，AB_4＋5-Fu 组的促凋亡因子 *Capase-3*、*Casepase-9* 及 *Bax* 的 mRNA 含量均显著升高，抗凋亡因子 *Bcl-2* 的 mRNA 含量显著降低（$P<0.01$）。提示 AB_4 与 5-Fu 联合可通过进一步增强 Bcl-2/Bax 比例失衡，促进 Caspase-3、Caspase-9 介导的凋亡发生，继而协同产生肿瘤抑制作用。

3.6　AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织形态学的影响

通过 HE 染色观察 AB_4 与 5-Fu 联合对肿瘤组织形态学影响。由图 9 可以看出，对照组肿瘤组织细胞排列紧密无序，形态完整，肿瘤细胞异质性明显，细胞体积较大，胞核清晰，核大而深染，未显现坏死灶，并可见大量微血管；与对照组相比，50 mg·kg^{-1}

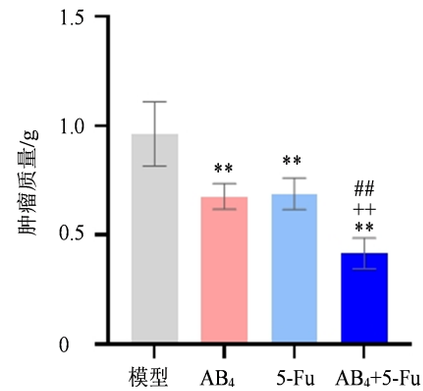


与对照组比较：$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{+}P<0.05$；与 5-Fu 组比较：$^{\#}P<0.05$。

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* control group；$^{+}P<0.05$ *vs* AB_4 group；$^{\#}P<0.05$ *vs* 5-Fu group.

图 6　5-Fu、AB_4 及 AB_4+5-Fu 对 4T1 荷瘤小鼠体质量和肿瘤体积的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Fig. 6　Body weight and tumor volume of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu（$\bar{x}\pm s$, n=6）



与模型组比较：$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{++}P<0.01$；与 5-Fu 组比较：$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* model group；$^{++}P<0.01$ *vs* AB_4 group；$^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5-Fu group.

图 7　5-Fu、AB_4 及 AB_4+5-Fu 对 4T1 荷瘤小鼠瘤质量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

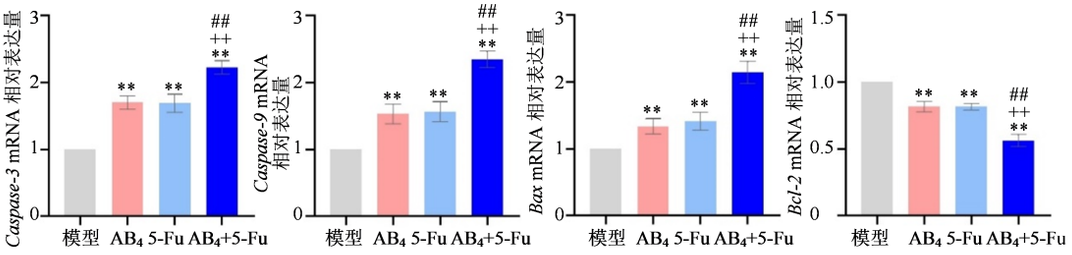
Fig. 7　Tumor weight of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu（$\bar{x}\pm s$, n=6）

AB_4 组及 25 mg·kg^{-1} 5-Fu 组细胞排列稀疏，细胞膜基本完整，部分区域出现坏死区域，表现为核深染、固缩以及无结构的片状区域，并可见微血管减少；AB_4 与 5-Fu 联合组肿瘤组织结构明显疏松，细胞形态不完整或消失，可见明显无结构的坏死区，其面积较前面处理组明显增大，胞核深染、固缩、崩解，凋亡肿瘤细胞最多，微血管明显减少。

对各组血管密度进行分析，可知 AB_4 与 5-Fu 联合较单用组进一步抑制肿瘤微血管的形成，从而抑制移植瘤 4T1 的体内生长（$P<0.01$）。

3.7　AB_4 与 5-Fu 联合对骨髓源性细胞动员与招募的影响

采用流式细胞技术分析 AB_4 联合 5-Fu 对 4T1 荷瘤小鼠外周循环血液中血管内皮生长因子受体 2 阳性（VEGFR2^{+}）BMDCs 细胞计数的影响。结果如图 10 所示，模型组、50 mg·kg^{-1} AB_4 组、25 mg·kg^{-1} 5-Fu 组及 AB_4＋5-Fu 组 VEGFR2^{+}BMDCs 所占平均比例

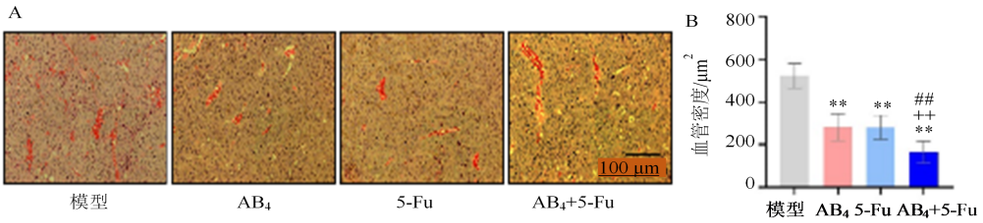


与模型组比较：$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{++}P<0.01$；与 5-Fu 组比较：$^{\#\#}P<0.01$。

$^{**}P<0.01$ *vs* model group；$^{++}P<0.01$ *vs* AB_4 group；$^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5-Fu group.

图 8　5-Fu、AB_4 及 AB_4 联合 5-Fu 对 4T1 肿瘤组织中凋亡因子 mRNA 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Fig.8　mRNA levels of apoptosis-related factors in tumor tissue of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=6)



A-4T1 荷瘤小鼠肿瘤 HE 染色结果；B-定量分析微血管密度；与模型组比较：$^{**}P<0.01$；与 AB_4 组比较：$^{++}P<0.01$；与 5-Fu 组比较：$^{\#\#}P<0.01$。

A-HE staining results of tumor tissue of 4T1 bearing-mice; B-quantitative analysis of microvessel density; $^{**}P<0.01$ *vs* model group; $^{++}P<0.01$ *vs* AB_4 group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* 5-Fu group.

图 9　5-Fu、AB_4 及 AB_4 联合 5-Fu 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤血管密度的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 9　Micro-vessel density in tumor tissue of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=3)

分别为 53.82%、28.46%、27.03%、18.08%。与模型组相比，50 mg·kg^{-1} AB_4 组、25 mg·kg^{-1} 5-Fu 组及 AB_4+5-Fu 组 VEGFR2$^+$BMDCs 计数分别减少 47.11%、49.77% 以及 66.41%，差异具有统计学意义（P<0.01）。与 AB_4 组和 5-Fu 组比较，AB_4+5-Fu 组骨髓源性细胞 VEGFR2 数量均显著降低（P<0.05）。上述结果表明 AB_4 联合 5-Fu 可以减少 4T1 荷瘤小鼠外周循环血中 VEGFR2$^+$BMDCs 水平。

3.8　AB_4 联合 5-Fu 对血管新生相关因子蛋白表达的影响

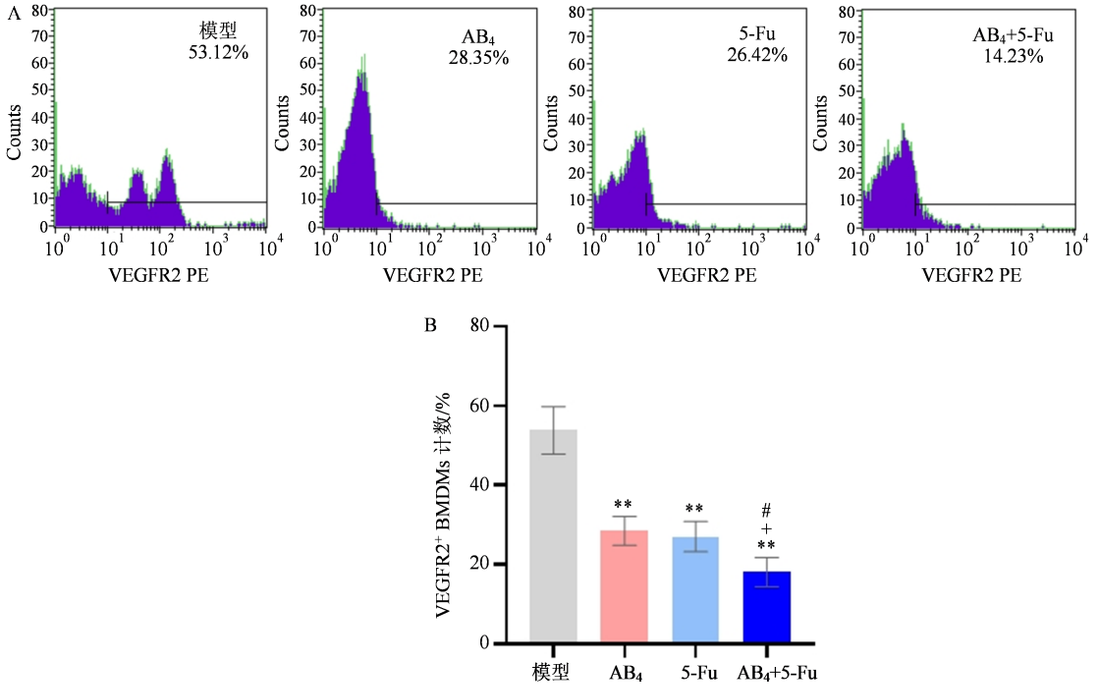
采用 Western blotting 方法测定 AB_4 联合 5-Fu 对 4T1 肿瘤组织中 MMP-9、VEGFR1 和 VEGFR2 蛋白表达的影响。结果如图 11 所示，与模型组比较，50 mg·kg^{-1} AB_4 组、25 mg·kg^{-1} 5-Fu 组及 AB_4+5-Fu 组肿瘤组织中 MMP-9、$VEGFR_1$ 和 $VEGFR_2$ 蛋白表达水平明显降低，与 AB_4 组和 5-Fu 组比较，AB_4+5-Fu 组 MMP-9、VEGFR1 和 VEGFR2 的蛋白表达均显著降低，并具有统计学意义（P<0.05、0.01）。

4　讨论

乳腺癌的发病率在我国女性肿瘤中居于首位。虽然目前对乳腺癌的治疗手段较多，临床疗效也有很大提高，但仍存在复发、转移以及耐药的风险，因此寻找安全有效的治疗药物仍是乳腺癌治疗中亟待解决的重要问题[1-2]。AB_4 是毛茛科植物白头翁中的主要活性成分之一。既往研究报道 AB_4 具有抗肝癌活性，其抗肝癌机制与诱导肝癌细胞凋亡密切相关[12]。5-Fu 是乳腺癌临床治疗中常用的一种化疗药物[13-14]，高剂量 5-Fu 虽能提高抗肿瘤疗效且减少耐药性的发生，但严重的不良反应成为制约其临床应用的限制性因素[15-16]。在这种情况下，将 5-Fu 同其他抗肿瘤药物联合的治疗方案，一方面可以降低 5-Fu 的使用剂量，降低其对正常细胞的毒性，另一方面又可以增加肿瘤细胞的化疗敏感程度，更加凸显出其临床重要意义。

在此背景下，本研究从体内外水平对 AB_4 与 5-Fu 联合抗乳腺癌的作用及其机制进行了探究。

体外细胞实验结果提示 AB_4 与 5-Fu 联合所产生的抗肿瘤作用最佳。通过细胞增殖抑制实验可知，与单独用药相比，AB_4 与 5-Fu 联合对 4T1 细胞增殖的抑制作用则更加明显；细胞愈合实验则提示，单药组细胞的迁移能力较对照组减弱，划痕区域细胞愈合能力减弱，AB_4 与 5-Fu 联合用药组细胞迁移能力进一步降低，划痕区几乎未见细胞向中线增长；Transwell 侵袭实验结果表明，与对照组相比，AB_4、5-Fu 单药组细胞侵袭能力均降低，穿过小室的细胞数目明显减少，而联合用药组的 4T1 细胞侵袭

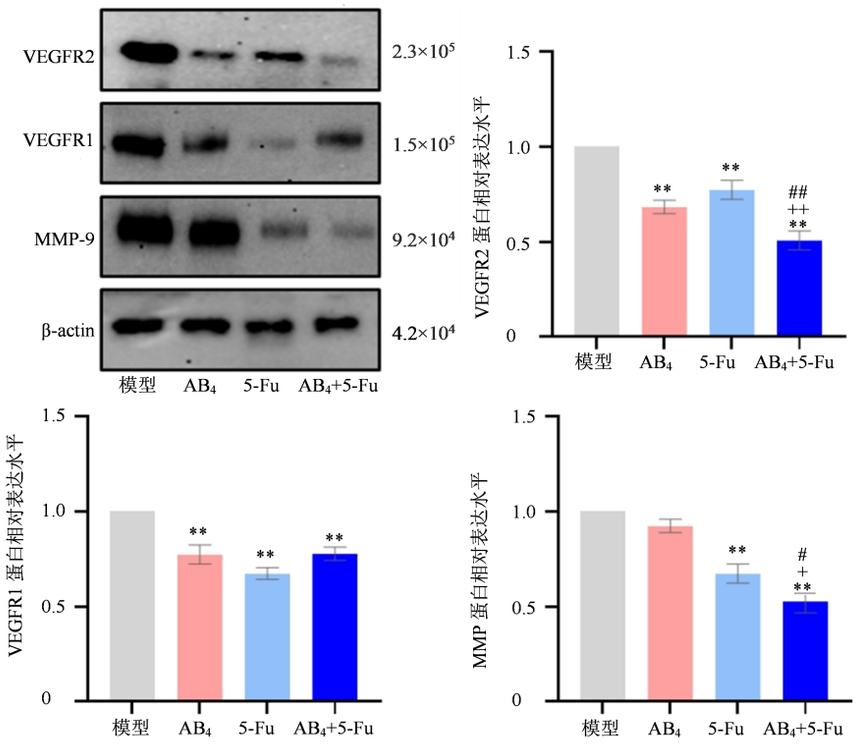


A-流式检测外周血VEGFR2$^+$BMDCs计数;B-定量分析VEGFR2$^+$BMDCs计数; 与模型组比较:$^{**}P$<0.01;与AB_4组比较:^+P<0.05;与5-Fu组比较:$^\#P$<0.05。

A-numbers of VEGFR2$^+$BMDCs determined by flow cytometry; B-quantitative analysis of peripheral VEGFR2$^+$BMDCs; $^{**}P$ < 0.01 *vs* model group; ^+P < 0.05 *vs* AB_4 group; $^\#P$ < 0.05 *vs* 5-Fu group.

图 10 5-Fu、AB_4及AB_4联合 5-Fu 对 4T1 荷瘤小鼠 VEGFR2$^+$BMDCs 计数的影响（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Fig. 10 Numbers of VEGFR2$^+$BMDCs in peripheral blood of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=6)



与模型组比较:$^{**}P$<0.01;与AB_4组比较:^+P<0.05 ^{++}P<0.01;与5-Fu组比较:$^\#P$<0.05 $^{\#\#}P$<0.01。

$^{**}P$ < 0.01 *vs* model group; ^+P < 0.05 ^{++}P < 0.01 *vs* AB_4 group; $^\#P$ < 0.05 $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* 5-Fu group.

图 11 5-Fu、AB_4及AB_4联合 5-Fu 对肿瘤血管新生相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 11 Protein expression of tumor angiogenesis-related factors in tumor tussue of 4T1 bearing-mice treated with 5-Fu, AB_4 and AB_4+5-Fu ($\bar{x}\pm s$, n=3)

能力最低，穿过小室的细胞也最少；进一步采用流式细胞仪检测单药治疗和联合用药对细胞凋亡的影响，结果显示，与对照组相比，AB_4、5-Fu单药组细胞凋亡率均升高，而联合用药组的4T1细胞凋亡率最高。

接下来，在体内水平验证AB_4联合5-Fu对移植瘤的作用并探讨其机制。由体内移植瘤实验结果可以看出，与模型组相比，各处理组均可显著降低瘤体积和瘤质量，其中以联合用药组作用最为明显，进一步在体内证实两药联合的协同抗肿瘤作用。Bcl家族是细胞凋亡信号转导途径中关键的凋亡调节因子，其中Bcl-2是关键的抗凋亡因子，可以保护细胞避免凋亡发生，而Bax是重要的促凋亡因子，Bcl-2/Bax比值是决定凋亡是否发生的“分子开关”[20-21]。瘤组织qRT-PCR的结果表明无论是AB_4或5-Fu单药组还是联合用药组均可引起Bcl-2/Bax比值的降低，其中联合用药组的变化最为显著，提示AB_4可以通过促进Bcl-2/Bax比值失衡增强5-Fu的促凋亡作用。Caspase依赖性的凋亡通路是肿瘤细胞死亡的经典途径，也是肿瘤治疗的主要靶点之一。凋亡信号诱发Caspase级联反应，最终导致细胞死亡的发生。其中较为关键的是作为启动蛋白的Caspase-9以及作为执行蛋白的Caspase-3[23-24]。本实验结果表明在分别单药应用在体肿瘤4T1细胞后，Caspase-3及Caspase-9表达水平均增高，而联合用药组升高最为明显，提示AB_4可通过上调Caspase家族基因表达促进4T1细胞发生凋亡，从而发挥抗乳腺癌的作用。

血管新生是肿瘤重要的生物学特征之一。新生血管不仅为肿瘤组织提供营养，促进肿瘤组织快速生长，同时还有利于肿瘤细胞的浸润和转移[25]。抑制肿瘤血管新生是公认的一种有效的抗肿瘤策略。在接下来的实验中，采用HE染色观察药物对肿瘤组织血管密度的影响。结果显示AB_4联合5-Fu组还可较单用组显著降低肿瘤组织的微血管密度，证实抑制肿瘤血管生成参与了AB_4联合5-Fu的抗肿瘤作用的发挥。

继续在体内水平探讨AB_4联合5-Fu抑制肿瘤血管生成的机制。BMDCs在肿瘤血管新生和肿瘤生长过程发挥着重要的作用[26]。这些源于骨髓组织的细胞被招募滞留在肿瘤组织局部，可通过分泌多种生长因子等方式促进肿瘤血管新生[27-28]。后续的细胞流式术分析结果证实，AB_4联合5-Fu组可明显减少4T1荷瘤小鼠循环血液中$VEGFR2^+$BMDCs的计数，提示AB_4联合5-Fu的抗肿瘤作用可能也与与其抑制BMDCs的动员，从而间接减少了肿瘤血管新生有关。

血管新生主要由相关细胞和组织调节因子进行调节，包括血管内皮生长因子家族、成纤维细胞生长因子家族、血管生成素家族以及血小板衍生生长因子等[29-30]。最后，考察联合用药对肿瘤组织中促血管新生因子的蛋白的表达情况。结果显示AB_4联合5-Fu可明显下调MMP-9、VEGFR1和VEGFR2等促血管新生因子的蛋白表达。进一步证实AB_4联合5-Fu的抗肿瘤作用与减少肿瘤血管新生有关。

综上，本研究表明AB_4能够在体内外增强5-Fu对4T1乳腺癌的的生长抑制作用，这一作用不仅与其体外协同增强肿瘤细胞增殖抑制、降低细胞迁移、侵袭能力以及促进凋亡发生有关，也可能与其降低肿瘤微血管密度，减少BMDCs的动员、抑制肿瘤血管新生，从而间接抑制肿瘤生长有关。后续还需要更为深入的研究和分析，以充分理解AB_4的作用机制和作用特点，从而为AB_4的临床开发提供一定参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Shien T, Iwata H. Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2020, 50(3): 225-229.

[2] Montemurro F, Nuzzolese I, Ponzone R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? [J]. Expert Opin Pharmacother, 2020, 21(9): 1071-1082.

[3] Marra A, Curigliano G. Adjuvant and neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer with chemotherapy [J]. Cancer J, 2021, 27(1): 41-49.

[4] Wang H, Mao X Y. Evaluation of the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 2423-2433.

[5] Bredin P, Walshe J M, Denduluri N. Systemic therapy for metastatic HER2-positive breast cancer [J]. Semin Oncol, 2020, 47(5): 259-269.

[6] Goldner M, Pandolfi N, Maciel D, et al. Combined endocrine and targeted therapy in luminal breast cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2021, 21(11): 1237-1251.

[7] John P, Osani M C, Kodali A, et al. Comparative effectiveness of adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer: A network meta-analysis [J]. Clin Breast Cancer, 2021, 21(1): e22-e37.

[8] He L, Zhang Y, Kang N X, et al. Anemoside B4 attenuates nephrotoxicity of cisplatin without reducing anti-tumor activity of cisplatin [J]. Phytomedicine, 2019, 56: 136-146.

[9] Li W, Sun Y N, Yan X T, et al. Isolation of nematicidal triterpenoid saponins from *Pulsatilla koreana* root and

their activities against *Meloidogyne* incognita [J]. Molecules, 2013, 18(5): 5306-5316.

[10] 高翔, 陈厦特,王琴琴, 等. 白头翁皂苷B4治疗大鼠子宫肌瘤的作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(7): 1444-1451.
Gao X, Chen X T, Wang Q Q, et al. Study on mechanism of *Pulsatilla* saponin B4 in treatment of uterine fibroids in rats [J]. Drug Eva Res, 2024, 47(7): 1444-1451.

[11] Yao D C, Li H W, Gou Y L, et al. Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression [J]. FEBS J, 2009, 276(9): 2599-2614.

[12] Xue S Y, Zhou Y, Zhang J, et al. Anemoside B4 exerts anti-cancer effect by inducing apoptosis and autophagy through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Am J Transl Res, 2019, 11 (4): 2580-2589.

[13] Guerrero-Zotano Á, Belli S, Zielinski C, et al. CCNE1 and PLK1 mediate resistance to palbociclib in HR+/ HER2- metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2023, 29(8): 1557-1568.

[14] Rader R K, Anders C K, Lin N U, et al. Available systemic treatments and emerging therapies for breast cancer brain metastases [J]. Curr Treat Options Oncol, 2023, 24(6): 611-627.

[15] Velusamy R, Nolan M, Murphy A, et al. Screening for coronary artery disease in cancer survivors: *JACC: CardioOncology* state-of-the-art review [J]. JACC CardioOncol, 2023, 5(1): 22-38.

[16] Li F, Wang J, Yan Y Q, et al. CD147 promotes breast cancer migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition *via* the MAPK/ERK signaling pathway [J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 1214.

[17] Cao Y, Feng Y H, Gao L W, et al. Artemisinin enhances the anti-tumor immune response in 4T1 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 70: 110-116.

[18] 张媛, 禹卓玥, 孙立新, 等. 卵巢癌组织MEOX1表达对细胞增殖和侵袭及迁移影响 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(4): 262-268.
Zhang Y, Yu Z Y, Sun L X, et al. Expression of MEOX1 in ovarian cancer and its effect on the proliferation, invasion and migration [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2020, 27(4): 262-268.

[19] 张琦, 包小波, 田冲冲. 灯盏花乙素增强4T1乳腺癌细胞对顺铂敏感性的体内外研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 331-340.
Zhang Q, Bao X B, Tian C C. Effect of scutellarin on promoting the sensitivity of breast cancer 4T1 cells to cisplatin *in vitro* and *in vivo* [J]. Sci Technol Food Ind, 2024, 45(5): 331-340.

[20] Zhuo Y C, Li X Q, Zheng Q W, et al. Estrogen enhances tumor growth and angiogenesis indirectly *via* mediation of bone marrow-derived cells as well as directly through stimulation of tumor and endothelial cells [J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 2147-2156.

[21] Changizi Z, Moslehi A, Rohani A H, et al. Chlorogenic acid induces 4T1 breast cancer tumor's apoptosis *via* p53, Bax, Bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in BALB/c mice [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(2): e22642.

[22] da Silva Lawisch G K, Biolchi V, Kaufmann G, et al. The role of FASL, BCL-2 and BAX polymorphisms in Brazilian patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(10): 9445-9451.

[23] Wang H W, Zhao W P, Liu J, et al. Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice [J]. Chemosphere, 2017, 186: 911-918.

[24] Wang S S, Zhang Y, Gao J F, et al. The enantioselective study of the toxicity effects of chiral acetochlor in HepG2 cells [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 218: 112261.

[25] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. New Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.

[26] Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis [J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0225472.

[27] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[28] Sun X T, Yuan X W, Zhu H T, et al. Endothelial precursor cells promote angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(35): 4925-4933.

[29] Zhang L R, Xu J L, Zhou S Q, et al. Endothelial DGKG promotes tumor angiogenesis and immune evasion in hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2024, 80(1): 82-98.

[30] Fang J H, Chen J Y, Zheng J L, et al. Fructose metabolism in tumor endothelial cells promotes angiogenesis by activating AMPK signaling and mitochondrial respiration [J]. Cancer Res, 2023, 83(8): 1249-1263.

[责任编辑 齐静雯]