

夏枯草抗乳腺癌最佳组分筛选及其作用机制研究

林 艳¹, 闫庆梓^{1,2*}, 李亚梅¹, 赵灵佳¹, 傅榕赓¹, 吴 萍¹, 张智敏¹, 龚勇珍¹, 夏伯候¹, 廖端芳¹, 林丽美^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院 湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省湘潭市中心医院, 湖南 湘潭 411100

摘 要: **目的** 研究夏枯草多糖(P)、三萜(T)、挥发油(V)组分及不同配伍(PT、PV、TV、PTV)在小鼠体内抗乳腺癌的活性及作用机制。**方法** 采用4T1荷瘤小鼠乳腺癌模型,评价夏枯草各组分及配伍的体内抗乳腺癌活性。采用Micro CT检测小鼠乳腺癌肿瘤大小;HE染色法检测乳腺癌组织、各脏器的病理结构变化;TUNEL染色法检测肿瘤组织的凋亡指数;免疫组化法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、CD-31、E-cadherin蛋白表达;Elisa试剂盒检测血清雌二醇含量。**结果** 与模型组比较,T和PTV可显著抑制4T1荷瘤小鼠肿瘤的生长与大小,具体表现为T和PTV组荷瘤小鼠肿瘤组织炎症细胞浸润、变性坏死,肿瘤细胞凋亡;其机制可能为T和PTV可降低雌激素的含量,下调PCNA蛋白的表达,抑制荷瘤小鼠肿瘤细胞增殖;下调CD-31蛋白的表达,减少肿瘤组织内血管生成;上调E-cadherin蛋白的表达,抑制肿瘤细胞转移。**结论** T和PTV具有显著的抗肿瘤活性,可以作为抗乳腺癌的候选药物。

关键词: 夏枯草;乳腺癌;组分配伍;活体小动物 Micro CT

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5298-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.024

Antibreast cancer activity and mechanism study on appropriate components from *Prunella vulgaris*

LIN Yan¹, YAN Qing-zi^{1,2}, LI Ya-mei¹, ZHAO Ling-jia¹, FU Rong-geng¹, WU Ping¹, ZHANG Zhi-min¹, GONG Yong-zhen¹, XIA Bo-hou¹, LIAO Duan-fang¹, LIN Li-mei¹

1. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs, College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Xiangtan Central Hospital, Xiangtan 411100, China

Abstract: **Objective** To study antibreast cancer activity and the mechanism of appropriate components of polysaccharides (P), triterpenes (T), the essential oil (V), and different compatibilities (PT, PV, TV, and PTV) of *Prunella vulgaris* in vivo. **Methods** 4T1 breast cancer model was established to evaluate anti-breast cancer activity. The appropriate components of *P. vulgaris* were screened. The tumor volume and the shaded areas in breast cancer mice were detected by living small animal Micro-CT scan. The structural changes of each organ were detected by HE staining. TUNEL staining was used to detect apoptotic rate of tumor. The expression of PCNA, CD-31, and E-cadherin were detected by immunohistochemistry (IHC). Serum estradiol was detected by Elisa kit. **Results** T and PTV had significant anti-breast cancer activity. There were inflammatory cells infiltration, degeneration and necrosis, tumor cell apoptosis in the T and PTV groups. T and PTV could inhibit cell proliferation by reducing the estradiol level and downregulating the overexpression of PCNA proteins. T and PTV could also reduce tumor angiogenesis by downregulating the protein expression of CD-31. T and PTV also inhibited the metastatic process by upregulating the protein expression of E-cadherin. **Conclusion** T and PTV showed significant anti-breast cancer activities, suggesting that T and PTV can be a potential drug for breast cancer.

Key words: *Prunella vulgaris* L.; breast cancer; component compatibility; living small animal Micro CT

收稿日期: 2019-06-02

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项: 苦参等大宗中药材的综合利用技术研究(2017YFC1701900); 湖南省自然科学基金项目(2017JJ1023, 2017JJ4045, 2019JJ50449); 湖南省教育厅优秀青年基金(17B198); 长沙市科技计划项目(kq1801041, kq1801046); 湖南中医药大学中药学一流学科(2018ZYX05)

作者简介: 林 艳, 实验师, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制研究。Tel: (0731)88458230 E-mail: linyan198210@163.com

***通信作者** 闫庆梓, 药师, 从事临床药学研究。E-mail: yqz901106qd.outlook.com

林丽美, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制研究。E-mail: lizasmile@163.com

夏枯草为唇形科 (Labiateae) 夏枯草属 *Prunella* L. 植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的果穗。夏枯草为药食两用, 具有清热明目、消肿散结等功效, 可用于目赤肿痛、瘰疬、瘰瘤、乳痈肿痛等的治疗^[1]。夏枯草含有多糖类、三萜类、挥发油类等化学成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化、降血压及降血糖等药理作用^[2-3]。

乳腺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 已严重威胁女性的身心健康^[4]。中药可通过抑制肿瘤细胞增殖、抑制血管生成和侵袭转移、诱导肿瘤细胞凋亡等治疗乳腺癌等癌症^[5]。含夏枯草的乳癖散结颗粒、夏枯草膏对乳腺癌、乳腺增生等患者有治疗或辅助治疗作用, 能减轻患者临床症状及毒副作用、提高治疗效果、改善患者生活质量^[6-7]。三萜类成分能够诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖^[8], 多糖类成分可以抑制乳腺癌生长^[9], 挥发油类成分能诱导乳腺癌细胞凋亡^[10]。因此, 系统研究夏枯草的三萜类、多糖类、挥发油类成分的抗乳腺癌活性十分必要。中药有效组分配伍包括有效成分配伍和有效部位配伍, 本实验研究夏枯草三萜类成分、多糖类成分、挥发油类成分的单一组分及组分配伍的抗乳腺癌活性, 并筛选出最佳活性组分, 初步探讨其抗乳腺癌的作用机制, 为夏枯草抗乳腺癌的物质基础和开发利用提供依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

雌性 BABL/c 小鼠 (6~8 周) 购于长沙斯莱克景达实验动物中心, SPF 级, 体质量 18~22 g, 许可证编号 SCXK (湘) 2013-0004。

1.2 细胞

小鼠乳腺癌 4T1 细胞来源于中国科学院上海细胞库。

1.3 药材

夏枯草药材 (批号 20170602) 购于长沙高桥药材市场, 经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定为唇形科夏枯草属植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的果穗。

1.4 试剂与仪器

雌二醇-ELISA 测定试剂盒 (批号 228261243, 联科生物科技有限公司); TUNEL 试剂盒 (批号 40306ES60, 上海前尘生物科技有限公司); 苏木素-伊红染液 (批号 G1005, 武汉谷歌生物科技有限公司); CD-31 抗体 (批号 BS-20322R)、增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体 (批号 BSM-33035M)、E-cadherin

抗体 (批号 BS-10009R) 购于北京博奥森生物技术有限公司; 香菇多糖胶囊 (批号 43004700035089, 中国湖北创力药业有限公司, 0.185 g/粒); HL-2L-50IIB 超临界流体 (CO₂) 萃取装置 (杭州华黎泵业有限公司); FD-1 冷冻干燥机 (东京理化机械株式会社); QuantumGX 活体小动物 Mciro CT 仪 (PerkinElmer 公司); Multiskan MK3 多功能酶标仪 (Thermo 公司); RM2016 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); Nikon Eclipse CI 正置光学显微镜 (日本尼康公司)。

2 方法

2.1 夏枯草各组分制备

2.1.1 多糖组分 (P) 水提醇沉法提取分离得到夏枯草多糖组分, 减压浓缩得浸膏, 提取率为 9.3%, 主要由 D-甘露糖、核糖、L-鼠李糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、岩藻糖等单糖组成, -20 °C 储存待用。

2.1.2 三萜组分 (T) 10 倍水量加热回流提取 4 次, 合并滤液, 减压浓缩, 上大孔树脂柱, 75%乙醇洗脱至无色, 减压浓缩得浸膏, 冷冻干燥得到三萜组分, 提取率为 6.2%, 其主要成分熊果酸质量分数为 0.4%, 齐敦果酸为 0.085%, -20 °C 储存待用。

2.1.3 挥发油组分 (V) 将药材粉碎, CO₂ 超临界流体萃取得到夏枯草挥发油, 提取率为 4.3%, 其中主要成分角鲨烯的质量分数为 28.03%、亚油酸为 9.96%、亚麻酸为 9.95%、硬脂酸为 6.26%、油酸为 5.51%, -80 °C 储存待用。

2.1.4 组分配伍 多糖、三萜、挥发油提取率分别为 9.3%、6.2% 和 4.3%, 近似比例为 3:2:1.3, 按比例将多糖、三萜、挥发油配伍得到供试品, 多糖-三萜 3:2 (PT), 多糖-挥发油 3:1.3 (PV), 三萜-挥发油 2:1.3 (TV), 多糖-挥发油-三萜 3:2:1.3 (PTV)。

2.2 小鼠乳腺癌模型制备、分组及给药

实验动物适应性饲养 1 周, 将 100 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、香菇多糖组及 P、T、V、PT、PV、TV、PTV 组 (每组 10 只)。除对照组外, 将 100 μL (1.0×10⁶ 个细胞) 4T1 细胞 sc 于 BALB/c 小鼠右侧腋下^[11], 制备乳腺癌模型。造模开始前 1 d 开始给药, P、T、V、PT、PV、TV、PTV 组小鼠分别每天 ig 4 g/kg (按生药量计算)^[12-13], 香菇多糖组小鼠 (按成人用量按照体表面积换算) 每天 ig 0.2 g/kg, 对照组和模型组小鼠每天 ig 等量的生理盐水, 持续给药 21 d。处死小鼠前禁食 24 h,

自由饮水 8 h, 眼眶静脉采血, 断颈处死后剥离肿瘤组织, 并摘取心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏。

2.3 活体小动物 Micro CT 测定肿瘤大小

给药 21 d 后进行活体小动物 Micro CT 扫描, 扫描前将各组小鼠用异氟烷麻醉, 四肢伸展竖直固定于支架上, Micro-CT 扫描参数如下: X 射线的管电压为 90 V, 管电流 88 μ A, 探测器模式为 high resolution, 扫描模式为 14 min。

2.4 肿瘤质量及抑瘤率

连续给药 21 d 后, 将小鼠脱颈处死, 剥离肿瘤组织, 称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = (模型组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 模型组瘤质量

2.5 肿瘤组织病理学检查

将肿瘤组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 把固定好的肿瘤组织块修剪平整, 冲洗, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红 (HE) 染色, 在显微镜下观察并拍照。

2.6 原位细胞凋亡检测

采用 TUNEL 试剂盒, 按照说明书进行原位细胞凋亡检测^[4]。显微镜下观察并拍照。结果判定: 凋亡细胞细胞核呈 TUNEL 阳性反应, 细胞核呈现棕色。每组选取 2 张切片, 各随机选取 5 个视野计算凋亡细胞数、总细胞数。并按公式计算凋亡率。

凋亡率 = 视野内凋亡细胞数 / 视野内总细胞数

2.7 免疫组化法

用 PCNA、CD-31、E-cadherin 抗体染色观察肿瘤细胞的增殖、血管生成、迁移。将石蜡切片在 60 $^{\circ}$ C 水浴锅放置 1 h, 然后依次用二甲苯、酒精梯

度脱水, PBS 清洗; H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶, PBS 清洗; 用抗原修复液进行抗原修复, PBS 清洗; 正常血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 15 min; 滴加一抗, PBS 清洗, 滴加二抗, PBS 清洗; 滴加三抗, PBS 清洗; DAB 显色后自来水冲洗; 苏木素复染后自来水冲洗至返蓝, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 然后用加拿大树胶封片。在显微镜下观察并拍照, 并计算阳性表达率。

2.8 ELISA 试剂盒检测血清雌二醇含量

取各组小鼠血清, 室温下待血液凝固, 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液保存。按照试剂盒说明书操作, 检测血清中雌二醇含量。

2.9 脏器病理学检查

将小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏组织, HE 染色, 观察药物对小鼠各脏器的病理学变化。

2.10 数据统计

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时进行数据转换。

3 结果

3.1 夏枯草各组对荷瘤小鼠肿瘤体积及肿瘤阴影面积的影响

各组小鼠的肿瘤 CT 结果表明, 除对照组外, 其他各组小鼠右胸部处可见明显的阴影部位, 模型组小鼠肿瘤体积明显大于其他给药组 (图 1)。T、PTV 组小鼠肿瘤体积显著减小。与模型组比较, 各给药组小鼠肿瘤阴影面积明显缩小, 且 T 和 PTV 给药组小鼠的肿瘤阴影面积最小 (图 2)。

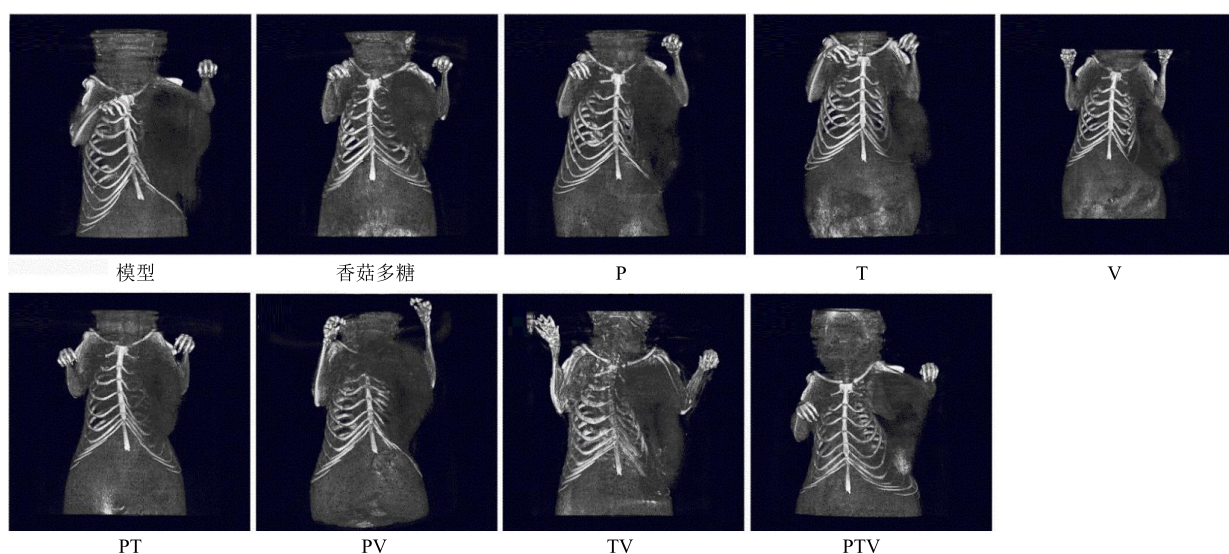


图 1 夏枯草各组对荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

Fig. 1 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on tumor volume in breast cancer mice

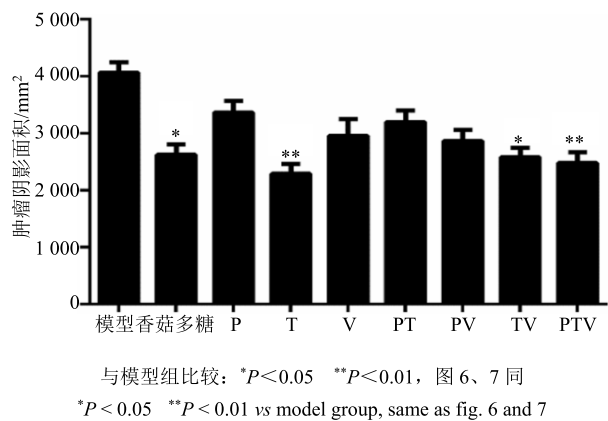


图 2 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤阴影面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 2 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on shaded areas in breast cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤质量的影响
在接种 4T1 细胞 5 d 后, 小鼠接种部位可见明显肿块, 表明乳腺癌小鼠模型建立成功。各实验组连续给药 21 d, 取肿瘤组织, 肉眼观察, 肿瘤大小差异显著, 与模型组比较, 所有给药组小鼠肿瘤组织均小于模型组, 且 T 和 PTV 组抑瘤效果最佳, 见图 3。称取各组小鼠肿瘤组织的质量, 并计算抑瘤率, 香菇多糖组的抑瘤率为 25.63%, T 和 PTV 给药组抑瘤率分别为 46.52% 和 41.14%。结果表明 T 和 PTV 抗肿瘤效果显著, 且优于香菇多糖(表 1)。

3.3 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤组织病理学结构的影响
取小鼠肿瘤组织, HE 染色后观察肿瘤组织病理学变化, 结果见图 4。模型组肿瘤细胞排列密集, 并且呈现细胞异型性, 内部肿瘤细胞生长旺盛, 可

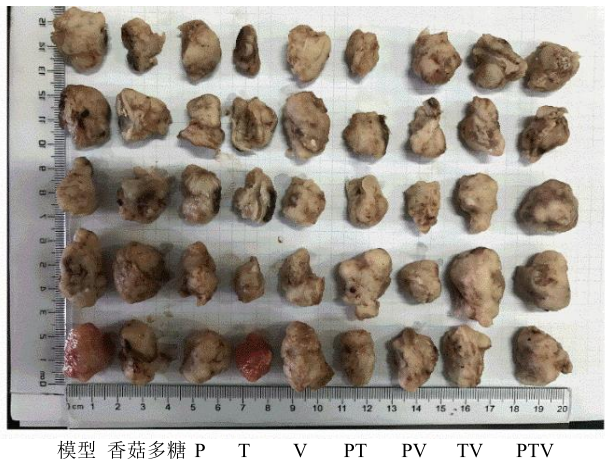


图 3 夏枯草各组分对小鼠肿瘤大小的影响
Fig. 3 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on tumor volume in breast cancer mice

表 1 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤质量及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on tumor weight and inhibiting rate in breast cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	3.16±0.61	0
香菇多糖	0.2	2.35±1.04*	25.63*
P	4.0	2.95±0.99	6.65
T	4.0	1.69±0.45**	46.52**
V	4.0	2.49±1.01	21.20
PT	4.0	3.02±1.02	4.43
PV	4.0	2.63±0.75	16.77
TV	4.0	2.86±1.05	9.49
PTV	4.0	1.86±0.34**	41.14**

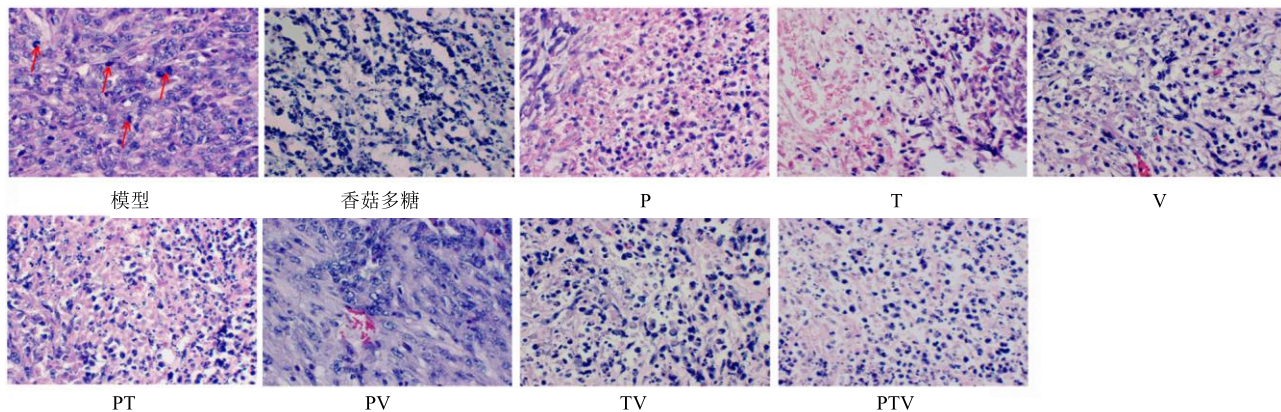


图 4 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤组织病理结构的影响 (×400)
Fig. 4 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on structural changes of tumor in breast cancer mice (×400)

以观察到大量细胞核分裂相(箭头所示)。与模型组比较,香菇多糖组可见大面积的坏死区域,其肿瘤组织松散,细胞排列不规则,细胞数量明显减少。其他给药组小鼠肿瘤组织松散,肿瘤细胞排列稀疏,可见坏死区域以及细胞核碎裂,部分细胞坏死以及炎性细胞浸润等特征,以 T 和 PTV 组较明显,说明 T 和 PTV 能够抑制肿瘤细胞增殖,具有显著的抗肿瘤作用。

3.4 夏枯草各组分对荷瘤小鼠乳腺癌细胞凋亡的影响

用 TUNEL 检测肿瘤组织原位肿瘤细胞凋亡

(图 5),所有给药组与模型组比较,TUNEL 阳性细胞明显增加,凋亡指数显著上升。T 和 PTV 给药组可见大量的绿色荧光,表明其能促进乳腺癌细胞凋亡。计算各组凋亡指数(图 6),各给药组小鼠乳腺癌细胞凋亡指数均有所增加,T 和 PTV 组小鼠乳腺癌细胞凋亡指数显著上升,其诱导凋亡的效果优于香菇多糖。

3.5 夏枯草各组分对荷瘤小鼠乳腺癌细胞中 PCNA、CD-31、E-cadherin 蛋白表达的影响

PCNA 蛋白免疫组化染色法观察各给药组的抗增殖活性,如图 7 所示,PCNA 蛋白阳性呈棕色染

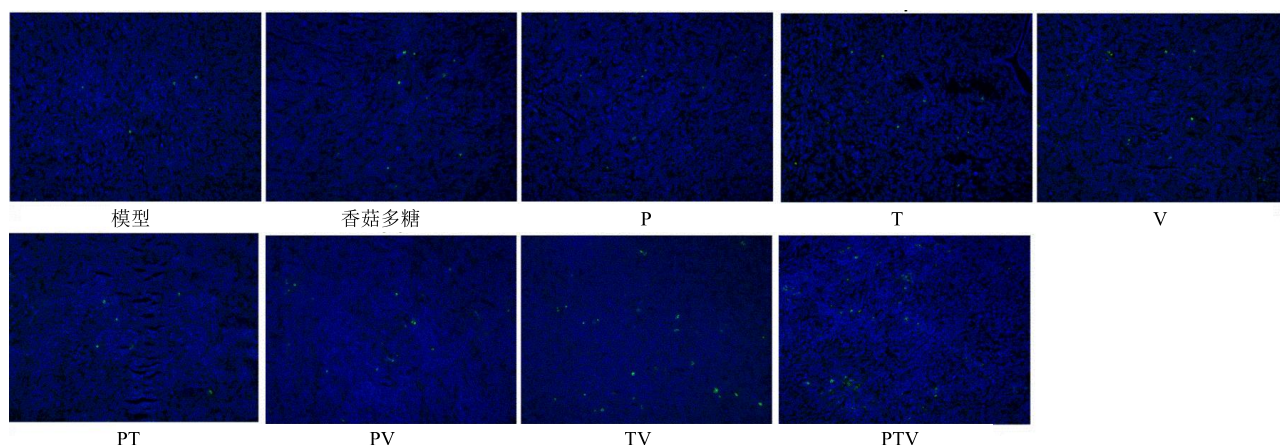


图 5 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡的影响 ($\times 200$)

Fig. 5 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on apoptotic rate of tumor in breast cancer mice ($\times 200$)

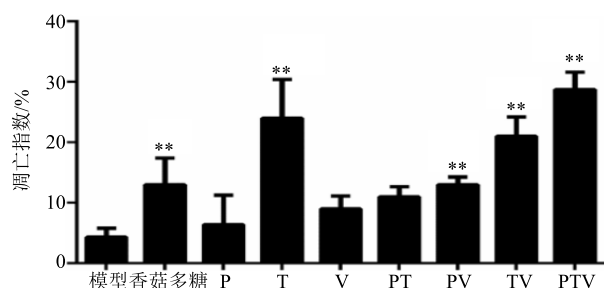


图 6 夏枯草各组分对荷瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on apoptotic index of tumor in breast cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

色,与模型组比较,给药组阳性细胞数都有所减少,以 T 和 PTV 较明显,阳性率分别为 24%和 26%,其阳性细胞数显著减少,表明 T 和 PTV 具有显著的抗乳腺癌细胞增殖活性。与香菇多糖组比较,T 和 PTV 组 PCNA 蛋白阳性表达率更低,表明其抗肿瘤细胞增殖活性更强。

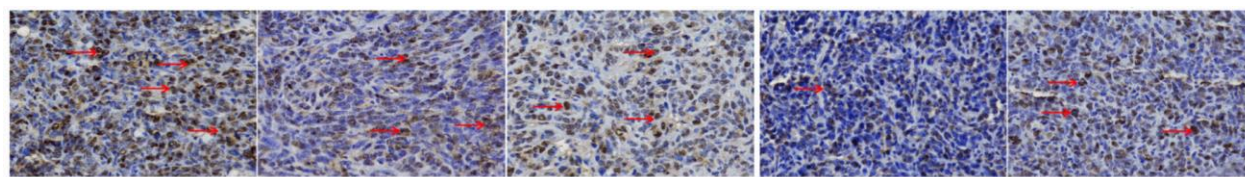
CD31 蛋白免疫组化染色法观察各给药组抗血管生成的活性,如图 7 所示,CD31 阳性表达呈棕色染色,血管周围有致密的内皮细胞,与模型组比较,香菇多糖组不具显著差异,但是,T 和 PTV 给药组棕色细胞数及血管内皮细胞显著减少,T 和 PTV 可抑制肿瘤内血管生成,表明 T 和 PTV 在抗血管生成的活性优于香菇多糖。

E-cadherin 免疫组化染色法观察药物抗肿瘤细胞迁移的活性,如图 7 所示,E-cadherin 蛋白阳性表达呈棕色或棕黄色染色,主要分布于细胞膜及细胞连接处。与模型组比较,除 P 组外,其他给药组 E-cadherin 蛋白的表达显著增加,其中香菇多糖组具有显著差异,T 和 PTV 组具有非常显著差异。与香菇多糖组比较,T 和 PTV 组在抗肿瘤细胞迁移活性方面具有一定的优势。

3.6 夏枯草各组分对荷瘤小鼠血清雌二醇含量的影响

内源性雌激素水平持续增高或外源性补充雌激

PCNA



模型

香菇多糖

P

T

V

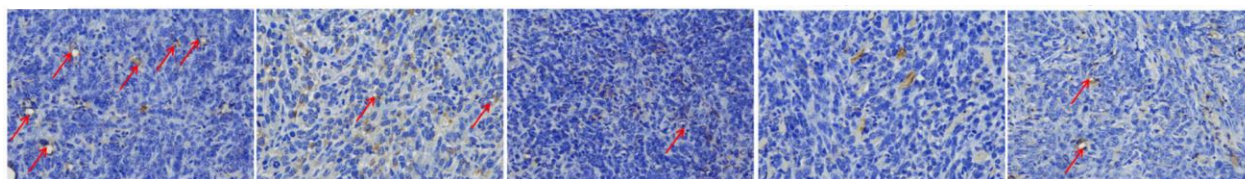
PT

PV

TV

PTV

CD-31



模型

香菇多糖

P

T

V

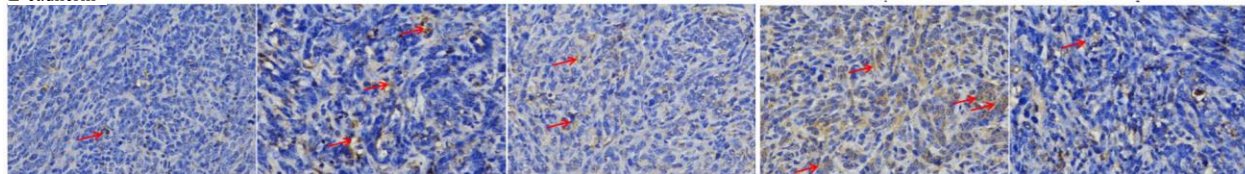
PT

PV

TV

PTV

E-cadherin



模型

香菇多糖

P

T

V

PT

PV

TV

PTV

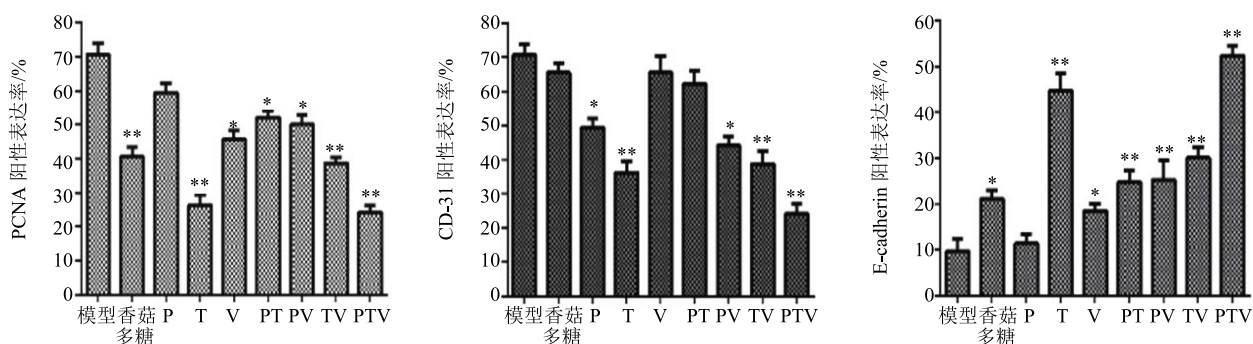


图 7 夏枯草各组分对荷瘤小鼠乳腺癌肿瘤组织 PCNA、CD-31、E-cadherin 蛋白表达的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 7 Effect of P, T, V, PT, PV, TV and PTV of *P. vulgaris* on PCNA, CD-31, E-cadherin positive expression of tumor in breast cancer mice ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

素均可增加乳腺癌发病率, 雌激素致乳腺癌的重要机制之一就是刺激乳腺癌组织的生长和抑制凋亡, 因此降低内源性雌激素水平对于乳腺癌的防治具有积极的意义^[15-17]。Elisa 试剂盒检测给药后小鼠血清中雌激素中雌二醇水平, 结果如图 8 所示, 和对照组比较, 模型组雌二醇水平显著升高。与模型组比较, T 和 PTV 给药组雌二醇水平显著降低, 并可降低至正常水平, 而香菇多糖组小鼠血清雌二醇水平降低不明显。结果表明, T 和 PTV 在降低雌二醇水平方面优于香菇多糖, 可用于乳腺癌的防治。

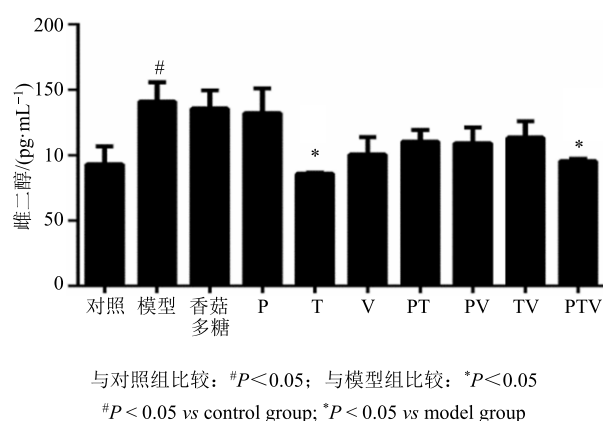


图 8 夏枯草各组分对荷瘤小鼠血清雌二醇的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 8 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on estradiol in breast cancer ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3.7 脏器病理学评价

连续给药 21 d 后, 处死小鼠, 摘取小鼠心脏、肝脏、脾脏和肾脏, 并称质量, 脏器质量有一定波动, 但均在正常范围内。HE 染色后观察病理学结构改变, 如图 9 所示, 模型组及所有给药组心脏都未见明显肿瘤转移, 未见明显结构改变。肾脏出现大量红细胞, 中性粒细胞、巨噬细胞以及大量炎症细胞浸润, 肾脏皮质、髓质、肾小球结构正常, 病变主要发生在肾小管上皮细胞, 表现为细胞肿胀, 颗粒变性, 未见明显的组织结构破坏。肝、脾出现大量红细胞, 中性粒细胞、巨噬细胞以及大量炎症细胞浸润, 未见显著的组织结构改变。4T1 移植瘤模型有肺部高转移特性, 在肺组织中, 模型组可观察到大量肿瘤细胞, 生长活跃, 且有大量红细胞、中性粒细胞等炎症细胞浸润。各给药组也可观察到不同程度的肿瘤细胞转移, 中性粒细胞等炎症细胞浸润。与其他各给药

组比较, T 给药组和 PTV 给药组转移结节较少, 表明 T 和 PTV 可明显减少肿瘤细胞转移数量, 每个视野中, T 和 PTV 给药组转移结节数量也明显少于其他给药组, 表明 T 和 PTV 能抑制 4T1 乳腺癌小鼠模型中肿瘤细胞的转移。

4 讨论

为了筛选夏枯草抗乳腺癌的活性组分, 本实验在小鼠脂肪垫下注射 4T1 细胞制备乳腺癌模型, 其乳腺微环境与人类相似, 能更好地模拟人类乳腺的组织学、血管供应和对治疗的应答。本实验结果证明, T 和 PTV 具有较好的体内抗肿瘤作用。对于肿瘤的治疗, 诱导细胞凋亡和增殖的比例恢复正常是很好的治疗策略^[18-19]。本实验通过 HE 染色分析了肿瘤组织的病理结构改变, 观察到 T 和 PTV 组出现大面积细胞膜破裂、细胞缺失、炎性细胞浸润等变化, 说明 T 和 PTV 能抑制肿瘤细胞增殖。结合 TUNEL 法检测乳腺癌小鼠模型原位细胞凋亡后发现, PTV 可显著增强单独用药的活性, 促进肿瘤细胞凋亡。

PCNA 是一种周期蛋白, 是细胞 DNA 合成所必需的一种蛋白质, 它的出现与细胞增殖相关, 其表达水平可直接反映肿瘤细胞的增殖程度, 是检测细胞增殖状态有效的标志之一^[20-23]。本实验结果表明, T 和 PTV 可以显著抑制 PCNA 蛋白的表达, 抑制肿瘤细胞 DNA 的合成, 进而抑制乳腺癌细胞增殖。CD31 能精确、稳定地反映肿瘤微血管数量, 是用于评估肿瘤血管生成的重要指标之一^[24-25]。T 和 PTV 可以显著抑制 CD31 的表达, 抑制肿瘤内微血管的生成, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。E-cadherin 属于跨膜蛋白, 是钙黏蛋白家族的一员, 主要分布于乳腺、甲状腺等非神经性上皮组织中, 在细胞外信号向内传导、维持上皮细胞形态及结构等方面起重要作用^[20]。大量研究发现, E-cadherin 与肿瘤的发生发展, 浸润及转移密切相关, E-cadherin 的下调会导致细胞间黏附性连接减少、极性减弱, 肿瘤组织完整性受损, 促进肿瘤细胞的迁移运动, 肿瘤细胞侵袭力增强, 促进转移的发生^[26-27]。因此, E-cadherin 是一个检测肿瘤细胞迁移的重要指标。本研究中发现 T 和 PTV 可以显著上调其表达, 提示 T 和 PTV 具有显著的抗肿瘤迁移的活性。

综上所述, T 和 PTV 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞向肺部的转移,

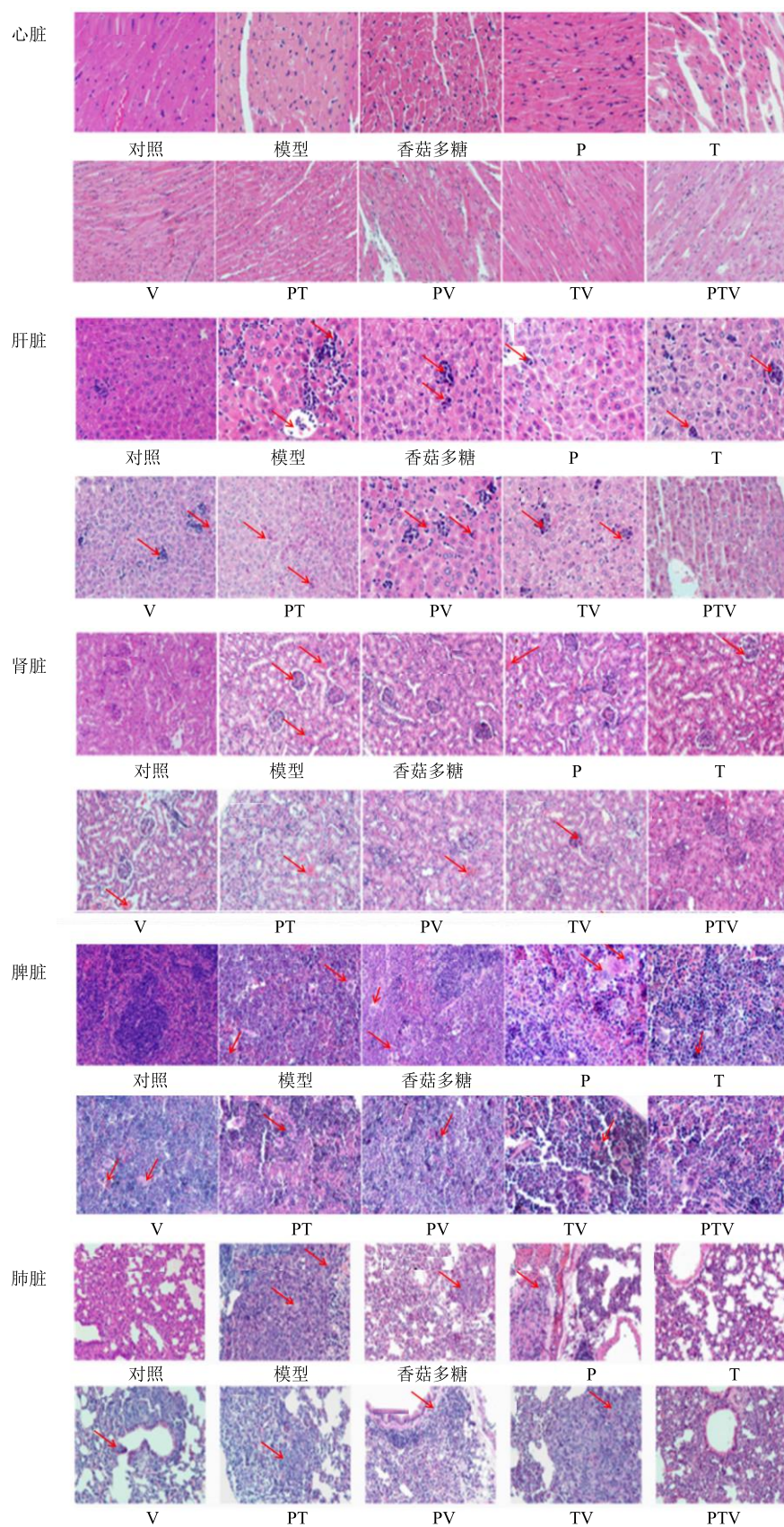


图 9 夏枯草各组分对荷瘤小鼠各脏器病理结构的影响 (×200)

Fig. 9 Effect of P, T, V, PT, PV, TV, and PTV of *P. vulgaris* on structural changes of each organ in breast cancer mice (× 200)

保持肿瘤组织的完整性,不致使肿瘤细胞发生侵袭与迁移。由此可见,T和PTV具有良好的体内抗肿瘤的作用,在抗乳腺癌方面具有很大的潜力,值得进一步深入的研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Bai Y, Xia B, Xie W, *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella* [J]. *Food Chem*, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.047.
- [3] Tan J, Haizhi Q I, Jiangdon N I. Extracts of endophytic fungus xkc-s03 from *Prunella vulgaris* L. spica inhibit gastric cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2): 945-949.
- [4] Mezencev R. Epidemiology of gliomas in women diagnosed with breast cancer supports the protective role of estrogenic exposure [J]. *Bratisl Med J*, 2018, 119(8): 463-468.
- [5] Mao X, Wang G, Zhang W, *et al.* A study on inhibitory effect of spica *Prunellae* extract on T lymphoma cell EL-4 tumour [J]. *Afr J Tradit Compl Alter Med Ajtcam*, 2013, 10(5): 318-324.
- [6] 张颖, 王觉, 王萌, 等. 乳癖散结颗粒联合化疗治疗乳腺癌术后患者的效果及对其生活质量的影响 [J]. 癌症进展, 2019, 17(6): 686-688.
- [7] 刘桂华. 夏枯草膏联合桂枝茯苓胶囊治疗乳腺增生症 300 例 [J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(8): 7-8.
- [8] Kim H I, Quan F S, Kim J E, *et al.* Inhibition of estrogen signaling through depletion of estrogen receptor alpha by ursolic acid and betulinic acid from *Prunella vulgaris* var. *lilacina* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(2): 282-287.
- [9] 苏畅, 贾英杰, 李小江, 等. 香菇多糖联合 AdIRF3 通过刺激 IFN- β 表达抑制乳腺癌生长 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1145-1150.
- [10] 麻艳芳, 邵邻相, 张均平, 等. 佛手挥发油对 MDA-MB-435 人乳腺癌细胞体外增殖的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(22): 1737-1741.
- [11] Ye T, Xiong Y, Yan Y, *et al.* The anthelmintic drug niclosamide induces apoptosis, impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85887.
- [12] 闫庆梓, 张凯强, 李强, 等. 夏枯草配伍蒲公英抗乳腺癌最佳配伍比例筛选及体内抗肿瘤研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(10): 776-782.
- [13] Wei L, Zheng L, Zhuang Q, *et al.* Spica *prunellae* promotes cancer cell apoptosis, inhibits cell proliferation and tumor angiogenesis in a mouse model of colorectal cancer via suppression of stat3 pathway [J]. *BMC Compl Alter Med*, 2013, 13(1): 144-144.
- [14] Peng Q, Cai H, Sun X, *et al.* *Alocasia cucullata* exhibits strong antitumor effect *in vivo* by activating antitumor immunity [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75328.
- [15] Samavat H, Kurzer M S. Estrogen metabolism and breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 231-243.
- [16] Liang J, Shang Y. Estrogen and cancer [J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 71(1): 225-240.
- [17] Yang S, Zhang D, Xu Y, *et al.* Discriminating the endogenous and exogenous urinary estrogens in human by isotopic ratio mass spectrometry and its potential clinical value [J]. *Steroids*, 2013, 78(2): 297-303.
- [18] Mkandawire M M, Lakatos M, Springer A, *et al.* Induction of apoptosis in human cancer cells by targeting mitochondria with gold nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(24): 10634-10640.
- [19] Grosse J, Warnke E, Wehland M. Mechanisms of apoptosis in irradiated and sunitinib-treated follicular thyroid cancer cells [J]. *Apoptosis*, 2014, 19(3): 480-490.
- [20] Van Roy F. Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 121-134.
- [21] Inoue A, Kikuchi S, Hishiki A, *et al.* A small molecule inhibitor of monoubiquitinated proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibits repair of interstrand DNA cross-link, enhances DNA double strand break, and sensitizes cancer cells to cisplatin [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(10): 7109-7120.
- [22] Gu L, Smith S, Li C, *et al.* A PCNA-derived cell permeable peptide selectively inhibits neuroblastoma cell growth [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94773.
- [23] Moldovan G L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork [J]. *Cell*, 2007, 129(4): 665-679.
- [24] Nishishita R, Morohashi S, Seino H, *et al.* Expression of cancer-associated fibroblast markers in advanced colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6195-6202.
- [25] Lee C, Liu A, Miranda-Ribera A, *et al.* NEU1 sialidase regulates the sialylation state of CD31 and disrupts CD31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(13): 9121-9135.
- [26] Bhatt T, Rizvi A, Batta S P, *et al.* Signaling and mechanical roles of E-cadherin [J]. *Cell Commun Adhes*, 2013, 20(6): 189-199.
- [27] Liu Y N, Lee W W, Wang C Y, *et al.* Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression [J]. *Oncogene*, 2005, 24(56): 8277-8290.