

研究论文

薯蓣皂苷激活p38MAPK/FOXO3a信号抑制三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化及侵袭

方瑞 赵晶晶 盛飞凤 肖大立*

(广东省妇幼保健院药学部, 广州 511442)

摘要 该研究探讨了薯蓣皂苷(Dioscin)对三阴性乳腺癌MDA-MB-231、BT549细胞体外侵袭及上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的影响及其作用机制。以正常人乳腺上皮MCF-10A细胞为对照, 通过MTS法、克隆形成实验检测细胞增殖能力; Transwell实验检测细胞侵袭、迁移能力; Western blot法检测p38MAPK、p-p38MAPK、FOXO3a及上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)相关标志物的表达。结果显示, Dioscin能明显抑制MDA-MB-231、BT549细胞的增殖, 且具有浓度依赖性, 对MCF-10A细胞抑制作用较弱; Dioscin处理后肿瘤细胞的侵袭、迁移能力明显降低, Dioscin可显著下调细胞间质样标志物波形蛋白(vimentin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)并促进上皮样标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达, EMT关键转录因子Snail的表达也受到抑制。进一步研究发现, Dioscin能够上调p38MAPK磷酸化水平并促进转录因子FOXO3a的表达, 而干扰FOXO3a能够逆转Dioscin对细胞EMT及侵袭的抑制作用。以上研究表明, Dioscin能够抑制三阴性乳腺癌细胞EMT及体外侵袭、迁移能力, 其机制可能与Dioscin调控p38MAPK/FOXO3a信号有关。

关键词 三阴性乳腺癌; 薯蓣皂苷; 上皮-间质转化; 侵袭; p38MAPK; FOXO3a

Dioscin Inhibits EMT and Invasion of Triple Negative Breast Cancer Cells via Activation of p38MAPK/FOXO3a Signaling

Fang Rui, Zhao Jingjing, Sheng Feifeng, Xiao Dali*

(Department of Pharmacy, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, China)

Abstract The work was aimed to investigate the effect and molecular mechanism of Dioscin on invasion and epithelial to mesenchymal transition (EMT) of triple negative breast cancer cells MDA-MB-231 and BT549. Both cell lines were treated or untreated with Dioscin, normal human epithelial mammary cell line MCF-10A was used as control. Cell proliferation was detected by MTS assay and colony formation assay. The abilities of cell invasion and migration were evaluated by Transwell assay. The expression of p38MAPK, p-p38MAPK, FOXO3a, and EMT-associated biomarkers were analyzed by Western blot. The results showed that the cell proliferation was obviously reduced by Dioscin treatment in a dose dependent manner. Dioscin significantly inhibited the migration of both cells, downregulated the expression of EMT key transcription factor Snail, as well as mesenchymal makers

收稿日期: 2017-11-06 接受日期: 2018-02-07

广东省自然科学基金(批准号: 2016A030313785)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-39151819, E-mail: XNG9765@163.com

Received: November 6, 2017 Accepted: February 7, 2018

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2016A030313785)

*Corresponding author. Tel: +86-20-39151819, E-mail: XNG9765@163.com

网络出版时间: 2018-05-21 16:27:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1627.002.html>

vimentin and N-cadherin, but increased epithelial marker E-cadherin expression. Moreover, the phosphorylation level of p38MAPK and the expression of FOXO3a were dramatically increased upon Dioscin treatment, and knockdown of FOXO3a reversed the inhibition effects of Dioscin on cell EMT and their invasion and migration capabilities. These above results indicated that Dioscin could inhibit proliferation and mobility of triple negative breast cancer cells *in vitro*, and the potential mechanism was related to activation of p38MAPK/FOXO3a signaling.

Keywords triple negative breast cancer; Dioscin; EMT; cell invasion; p38MAPK; FOXO3a

乳腺癌为女性最为常见的恶性肿瘤。目前,我国乳腺癌发病率已跃居女性恶性肿瘤首位,死亡率达40%以上,成为危害我国妇女健康的重大疾病之一^[1]。随着对乳腺癌发生和发展过程中分子机制的深入研究,人们逐渐认识到乳腺癌具有不同的生物学行为亚型。2006年, Bryan等^[2]首先提出了三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)这一概念,其指的是雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)均为阴性的一类乳腺癌,占全部乳腺癌的15%~20%。TNBC形态上与肌上皮细胞相似,却表现出明显的间质特征,具有高度侵袭性,很容易发生远处转移^[3];又由于TNBC缺乏雌、孕激素受体的表达,没有HER2的过表达,导致无法实行内分泌治疗及靶向治疗,缺乏有效的系统治疗手段^[4]。因此,与其他类型的乳腺癌相比, TNBC有着最差的总生存率和无病生存期^[5]。若能围绕TNBC高侵袭力这一特点,寻找新型作用靶点和作用机制的抗肿瘤药物有可能是突破治疗现状的重要途径。

薯蓣皂苷(Dioscin)是一种从天然植物中提取的皂苷类化合物,多存在于薯蓣科、百合科、蔷薇科植物中。近年来,有研究发现, Dioscin具有良好的抗肿瘤活性,现已证实, Dioscin可通过诱导细胞周期阻滞、DNA损伤等对胃癌^[6]、乳腺癌^[7]、肺癌^[8]、前列腺癌^[9]等多种肿瘤发挥拮抗作用。而Dioscin对TNBC这一极具侵袭性的肿瘤是否具有抑制效应尚未见报道。本实验旨在考察Dioscin对TNBC细胞上皮-间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)及体外侵袭的影响,并对相关分子机制进行初步探讨,以期对开发有效的TNBC治疗药物提供一定的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人三阴性乳腺癌MDA-MB-231、BT549细胞

购自中国科学院上海细胞库。人正常乳腺上皮MCF-10A细胞由中山大学药学院微生物与生化制药实验室馈赠。DMEM培养基、Opti-MEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司; Transwell 24孔细胞培养板(8 μm 孔径)、细胞培养皿及多孔培养板购自Corning公司; Dioscin购自Selleck公司; FOXO3a siRNA、Control siRNA购自CST公司; LipofectamineTM 2000、Trizol购自Invitrogen公司; FOXO3a、p38MAPK、p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK、Snail、 β -actin抗体购自CST公司; vimentin、N-cadherin、E-cadherin抗体购自Santa Cruz公司; HRP标记山羊抗鼠IgG、山羊抗兔IgG购自北京鼎国生物技术有限公司; 预染蛋白质Marker购自Fermentas公司; 小分子抑制剂SB203580购自上海碧云天生物技术有限公司; PVDF膜购自Bio-Rad公司; ECL化学发光底物试剂盒购自Pierce公司; Quick Start Bradford蛋白定量试剂购自Bio-Rad公司; Primescript RT Reagent Kit反转录试剂盒、SYBR Premix Ex TapTM试剂盒及RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司; PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; MTS购自Promega公司; RIPA细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯以上。

1.2 细胞培养

人三阴性乳腺癌MDA-MB-231、BT549细胞及人正常乳腺上皮MCF-10A细胞采用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱内培养。

1.3 MTS实验

取对数期生长细胞消化计数并制成细胞悬液接种于96孔板中(2×10^3 个/孔),培养过夜使细胞贴壁。向对应试验孔中加入不同浓度的Dioscin,对照孔中加入等量的溶媒DMSO,继续培养24~72 h后弃去培养基,加入100 μL 含0.5 mg/mL MTS的DMEM培养基,继续培养4 h。最后用酶标仪测定490 nm波长下的光密度(optical density, D)值,绘制增殖曲线,并计算 IC_{50} 值。

表1 实时荧光定量PCR用引物

Table 1 The primers used in Real-time PCR

基因名称 Name	引物序列(5'→3') Sequences (5'→3')
FOXO3a-F	GCG TGC CCT ACT TCA AGG ATA AG
FOXO3a-R	GAC CCG CAT GAA TCG ACT ATG
GAPDH-F	GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC
GAPDH-R	TGG TGA AGA CGC CAG TGG A

1.4 克隆形成实验

收集对数生长期细胞接种于6孔板中(200个/孔), 添加或不添加2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理。置于培养箱中培养, 每3天更换新鲜培养基和Dioscin。15天后收取培养板, 弃去培养基, PBS清洗3次后用4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min, 之后加入0.1%结晶紫染色2 h, 弃去染色液, 清水冲洗干净后晾干、显微镜下拍照。

1.5 细胞周期检测

收集对数生长期细胞接种于60 mm培养皿中(6.0×10^5 个/皿), 培养过夜后添加或不添加2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理24 h。消化制备单细胞悬液, 用预冷的70%乙醇4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜, 离心收集细胞, 过滤、重悬使其终浓度为 1×10^5 个/mL。每100 μL 细胞悬液中加入1 μL 50 $\mu\text{g/mL}$ 的PI和2 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 流式细胞仪检测各样品PI荧光强度。

1.6 细胞转染

收集对数生长期细胞接种于6孔板中(2×10^5 个/孔), 12 h后分别将 1×10^{-10} mol FOXO3a siRNA或Control siRNA与10 μL LipofectamineTM 2000混匀并加入1 mL Opti-MEM培养基中, 轻轻振荡5 min, 混匀制成转染液, 室温静置25 min后将转染液加入各培养孔, 轻轻混匀并孵育6 h后更换含10% FBS的DMEM继续培养24 h, 提取RNA检测转染效率或加入2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin继续处理。

1.7 Transwell实验

向Transwell培养板上室加入300 μL 预温的无血清培养基, 室温下静置15~30 min使基质胶水化。对数生长期的细胞血清饥饿12 h后, 消化收集细胞, 用无血清培养基重悬并调整细胞密度至 3×10^5 个/mL, 吸取200 μL 细胞悬液加入Transwell小室, 添加或不添加2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理。培养板下室加入500 μL 含5% FBS的DMEM培养基, 继续培养24 h后用4%多聚甲醛溶液固定小室30 min, 0.1%结晶紫染色30 min

后观察细胞并拍照。直径上取4个视野计算细胞迁移数, 结果取平均值。

1.8 实时荧光定量PCR

按照Trizol(Invitrogen)说明书方法提取细胞总RNA, 按Primescript RT Reagent Kit反转录试剂盒(TaKaRa)说明书将RNA逆转录为cDNA。引物由华大基因设计并合成, 引物序列见表1。Real-time PCR反应体系及条件参照SYBR Premix Ex TapTM试剂盒(TaKaRa), $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA的相对表达量, 以人GAPDH作为内参。每个实验组重复3次。

1.9 蛋白提取及Western blot实验

Dioscin(2.5 $\mu\text{mol/L}$)和/或SB302580(10 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞48 h后, 收集不同处理的细胞, PBS洗涤2次, 加入RIPA裂解液, 冰上放置30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心15 min后收集上清。Bradford法测定蛋白浓度后, 取等量蛋白样品经10% SDS-PAGE电泳分离, 转印至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h。FOXO3a、p38MAPK、p-p38MAPK、Snail、E-cadherin、N-cadherin、vimentin一抗与脱脂奶粉均以1:1 000比例稀释, β -actin一抗以1:4 000比例稀释, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBST洗膜3次, 每次10 min, 加入HRP标记的特异性二抗以1:5 000比例稀释, 室温下孵育2 h, PBST洗膜, 采用ECL化学发光试剂对X光片显影, 扫描图片。

1.10 统计学分析

所有实验均重复3次, 数据采用Graphpad Prim软件分析, 结果以平均数 \pm 标准差(mean \pm S.D.)表示。组间差异比较采用t检验分析, $P < 0.05$ 具有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 Dioscin抑制三阴性乳腺癌细胞增殖

采用不同浓度的Dioscin分别处理三阴性乳腺癌MDA-MB-231、BT549及乳腺上皮细胞, MTS试

验检测Dioscin对细胞增殖的抑制作用。结果表明, Dioscin能明显抑制上述乳腺癌细胞的增殖, 且具有浓度依赖性, 对乳腺上皮细胞的增殖抑制作用相对较弱(图1A)。克隆形成实验同样显示, Dioscin处理组的肿瘤细胞克隆形成数显著少于对照组, Dioscin处理组与对照组的MCF-10A细胞克隆数差异不明显(图1B)。2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin对乳腺癌细胞的增殖抑制作用明显, 并具有时间依赖性(图1C)。流式细胞术检测结果显示, Dioscin处理24 h可导致肿瘤细胞增殖周期停滞在S期(图1D)。

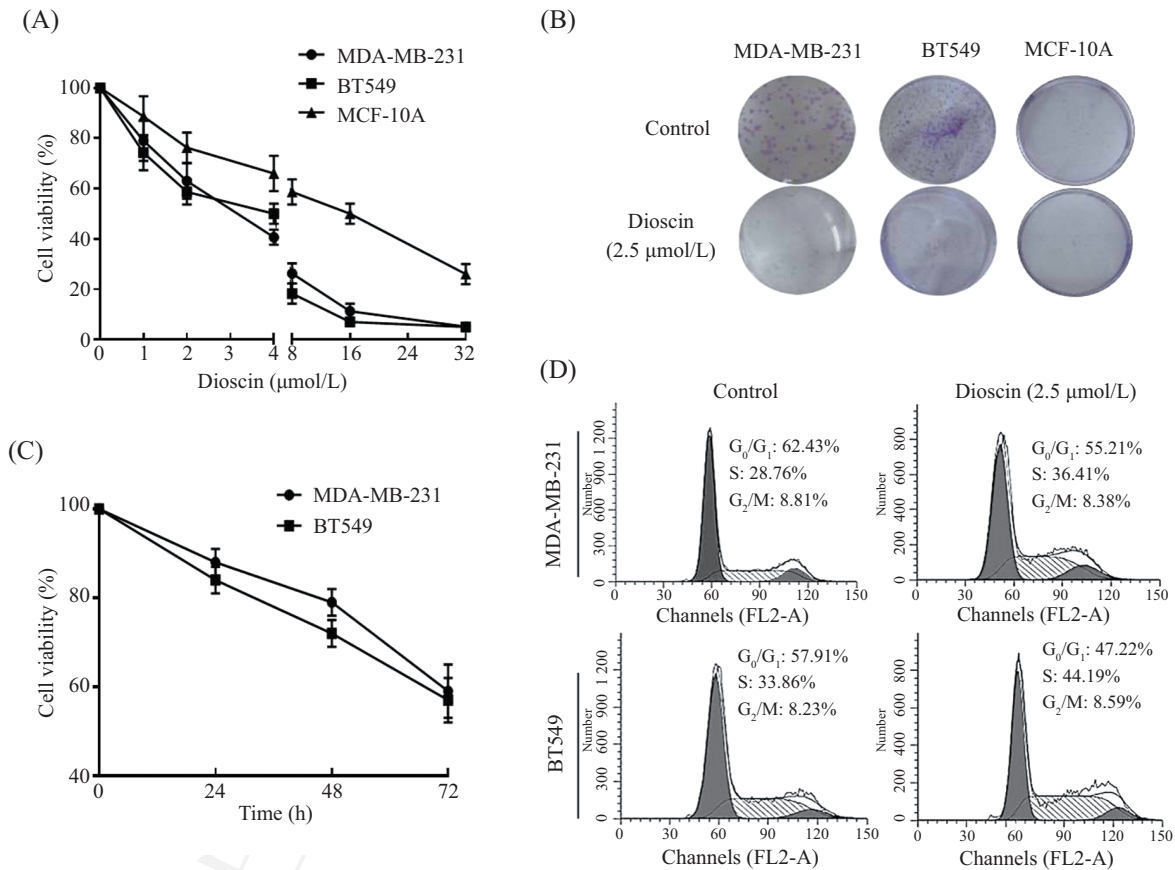
2.2 Dioscin抑制三阴性乳腺癌细胞侵袭迁移

肿瘤发展到一定阶段, 会向四周扩散并侵袭正常外周组织。这种侵袭能力的获得是肿瘤细胞恶性进展的一个重要环节。三阴性乳腺癌细胞恶性

程度较高, 并具有高度侵袭能力。因此, 我们采用Transwell小室实验对Dioscin处理后的MDA-MB-231及BT549细胞的侵袭及迁移能力进行了检测。结果显示, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理上述细胞24 h后, 穿越Transwell小室底层仿生基底膜的细胞数量与对照组相比显著减少($P < 0.05$)(图2), 说明Dioscin可抑制TNBC细胞的侵袭迁移能力。

2.3 Dioscin阻遏三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化

EMT往往是肿瘤细胞获得侵袭和迁移能力并向周围组织浸润、发生转移的起始。三阴性乳腺癌的高侵袭性可能与其具有某些EMT表型有关, 例如EMT关键转录因子Snail高度活化以及间质标志物vimentin、N-cadherin大量表达, 而上皮样标志物

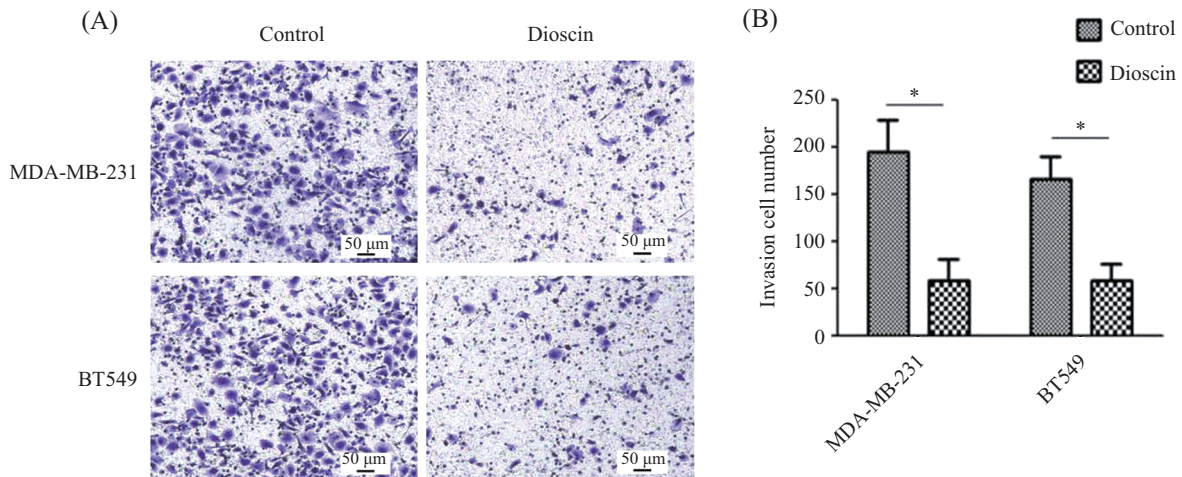


A: 0~32 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin分别处理MDA-MB-231、BT549、MCF-10A细胞72 h, MTS实验检测细胞存活率; B: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理15天后, 显微镜下观察细胞的克隆形成情况; C: 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Dioscin处理MDA-MB-231、BT549细胞0~72 h, MTS实验检测细胞存活率; D: 流式细胞术检测Dioscin对TNBC细胞周期的影响。

A: TNBC cells MDA-MB-231, BT549 and MCF-10A were treated with Dioscin (0-32 $\mu\text{mol/L}$) for 72 h, then the cell viability was evaluated by MTS assay; B: the cell colonies were observed with microscope after 15 days of treatment with Dioscin (2.5 $\mu\text{mol/L}$) or not; C: the viability of MDA-MB-231 and BT549 cells was evaluated after the cells treated with Dioscin (2.5 $\mu\text{mol/L}$) for 0 to 72 h; D: the effect of Dioscin treatment on the cell cycle of TNBC cell lines was detected by flow cytometry.

图1 Dioscin抑制三阴性乳腺癌细胞增殖

Fig.1 The proliferation of TNBC cells were inhibited by Dioscin

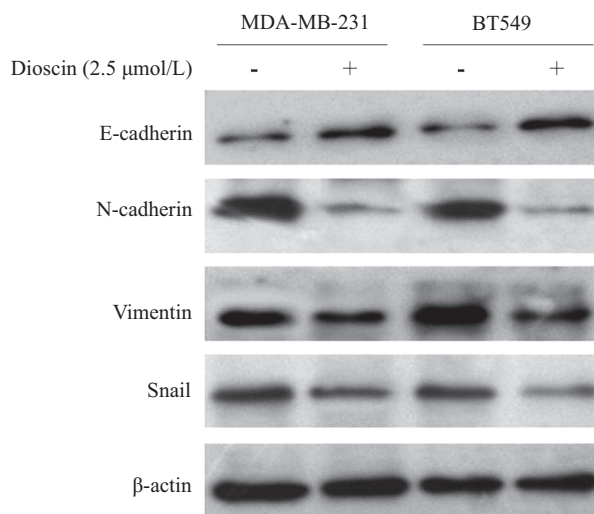


A: 对Dioscin(2.5 μmol/L)处理组和对照组侵袭并穿越小室基底膜的细胞进行固定、染色,显微镜下观察; B: 对各组发生侵袭、迁移的细胞进行计数并作统计分析, * $P < 0.05$ 。

A: after treated with Dioscin (2.5 μmol/L) or not, the TNBC cells migrated across basement membrane of transwell insert were fixed, stained and observed with microscope; B: the number of invasive and migrated cells in both group were counted and subjected to statistical analysis, * $P < 0.05$.

图2 Dioscin抑制MDA-MB-231及BT549细胞的侵袭及迁移能力

Fig.2 Dioscin inhibited invasiveness and migration of MDA-MB-231 and BT549 cells



2.5 μmol/L Dioscin处理MDA-MB-231、BT549细胞48 h后, Western blot检测上皮标志物E-cadherin, 间质标志物vimentin、N-cadherin及EMT关键转录因子Snail的表达。

The protein level of epithelial marker E-cadherin, mesenchymal markers vimentin, N-cadherin as well as EMT key transcription factor Snail were detected by Western blot in MDA-MB-231 and BT549 cells treated with Dioscin (2.5 μmol/L) for 48 h.

图3 Dioscin对MDA-MB-231、BT549细胞EMT标志物表达影响

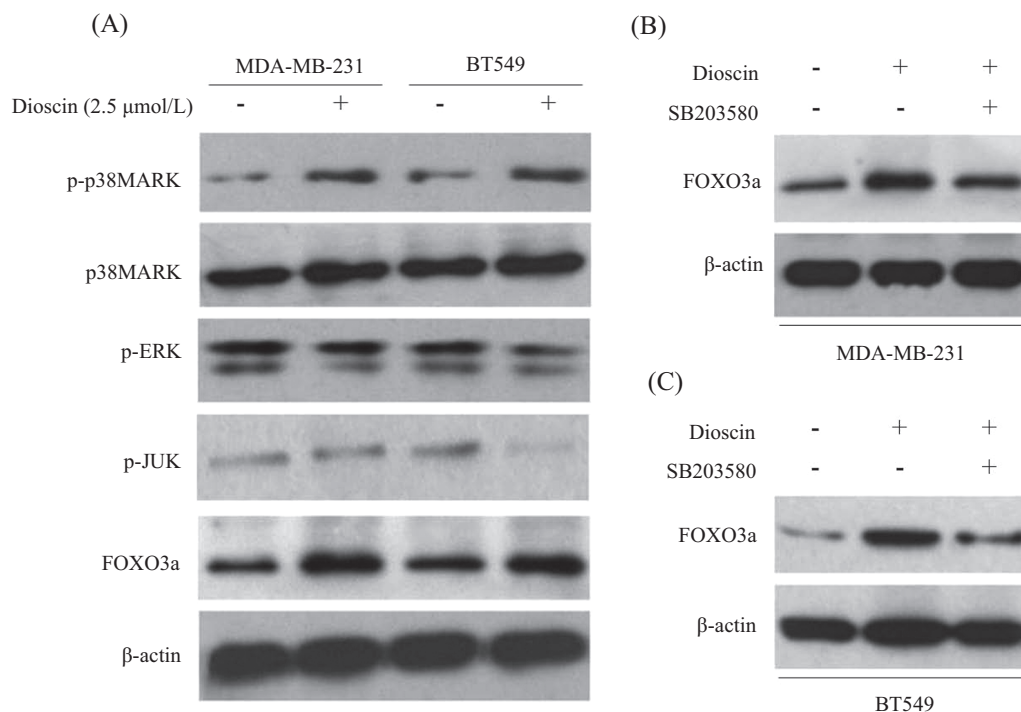
Fig.3 Effect of Dioscin treatment on EMT biomarkers expression in MDA-MB-231 and BT549 cells

E-cadherin表达较弱等。为探究Dioscin对TNBC体外侵袭、迁移的抑制效应是否与其阻遏细胞的EMT进程有关,我们采用2.5 μmol/L Dioscin处理MDA-MB-231、BT549细胞48 h,分别提取处理组和对照组细胞总蛋白,Western blot检测E-cadherin、vimentin、N-cadherin和转录因子Snail的表达变化。结果如图3所示, Dioscin能明显促进E-cadherin的表达、抑制

vimentin、N-cadherin、Snail的表达,提示Dioscin能够阻遏三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化,逆转其间质样表型,从而发挥抑制细胞侵袭的生物学效应。

2.4 Dioscin激活p38MAPK/FOXO3a信号

我们对Dioscin处理后TNBC细胞中EMT相关的MAPK信号通路的活性进行了检测,并发现Dioscin能明显诱导胞内p38MAPK的磷酸化,而对p38MAPK



A: 2.5 μmol/L Dioscin处理细胞48 h后, Western blot检测MAPK通路关键信号分子p38MAPK、ERK和JUK磷酸化水平及肿瘤抑制因子FOXO3a的表达; B、C: Dioscin或p38MAPK抑制剂SB203580处理MDA-MB-231(B)和BT549(C)细胞后, FOXO3a的表达变化。

A: the MDA-MB-231 and BT549 cells treated with Dioscin (2.5 μmol/L) for 48 h were subjected to Western blot analysis respectively for detection of tumor suppressor factor FOXO3a expression as well as phosphorylation of p38MAPK, ERK and JUK; B,C: expression of FOXO3a in MDA-MB-231 (B) and BT549 (C) cells treated with Dioscin or p38MAPK inhibitor SB203580.

图4 Dioscin激活p38MAPK/FOXO3a信号通路

Fig.4 Dioscin induces activation of p38MAPK/FOXO3a signaling

总蛋白的表达无影响;此外, Dioscin处理并不增加ERK、JNK的磷酸化水平(图4A)。这一结果提示, Dioscin抑制TNBC侵袭、迁移及EMT表型主要由p38MAPK介导, 而并非MEK/ERK和JUK通路。进一步研究显示, Dioscin能显著上调p38MAPK下游重要的肿瘤抑制因子FOXO3a的表达(图4A), 而加入p38MAPK小分子抑制剂SB203580可拮抗Dioscin对FOXO3a的上调作用(图4B和图4C)。以上结果提示, Dioscin可能通过活化p38MAPK/FOXO3a信号发挥肿瘤抑制效应。

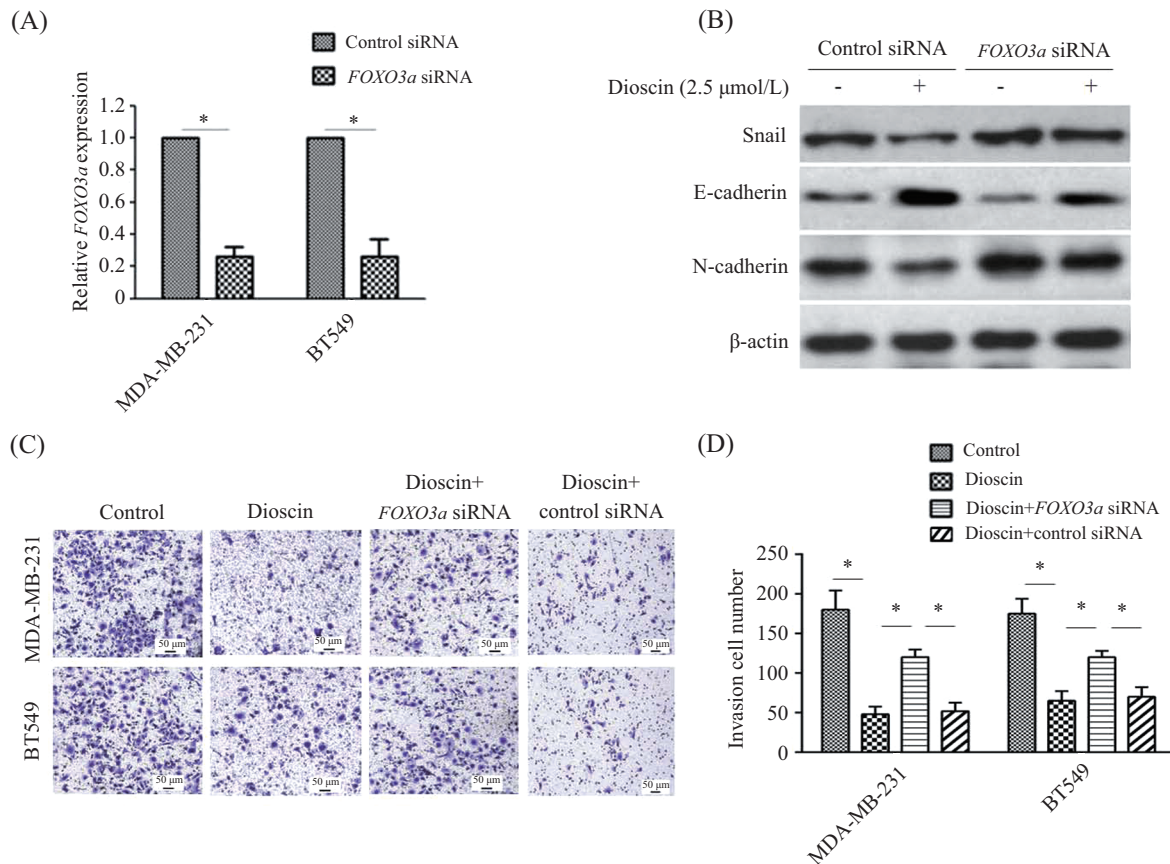
2.5 干扰FOXO3a表达逆转Dioscin对TNBC细胞EMT及侵袭的抑制作用

我们进一步考察Dioscin是否通过调控p38MAPK/FOXO3a信号抑制三阴性乳腺癌细胞EMT和侵袭迁移。向MDA-MB-231、BT549细胞中转染FOXO3a siRNA(1×10^{-10} mol), Real-time PCR检测FOXO3a基因水平(图5A)。转染24 h后, Dioscin(2.5 μmol/L)继续处理细胞48 h, 收集蛋白进行Western blot检测。结果显示, 干扰FOXO3a表达能够逆转Dioscin对EMT相

关蛋白的调控作用, vimentin、N-cadherin、Snail的表达得到恢复, E-cadherin的蛋白水平有所抑制(图5B)。Transwell实验结果显示, FOXO3a敲低之后, Dioscin处理无法有效抑制细胞迁移及穿越Transwell小室, 与Dioscin单独用药组或对照siRNA组相比, 差异均具有显著性(图5C和图5D)。结果说明, FOXO3a作为一个肿瘤抑制因子, 在Dioscin阻遏三阴性乳腺癌细胞EMT和侵袭迁移的过程中起到关键作用。

3 讨论

我国TNBC的发病率高于世界平均水平, 约有25%的乳腺癌为TNBC患者^[10]。TNBC具有侵袭性高、恶性程度高、易转移和复发、预后差、生存率低等特点。目前, 临床上对于TNBC仍没有统一的标准治疗方案, TNBC靶向治疗和相关药物研究也非常有限^[11]。天然药用植物一直是抗肿瘤药物开发的重要来源^[12]。天然药物可作用于肿瘤发生、发展的多个环节, 具有多靶点、多效应、不良反应轻、不易产生耐药性等特点^[13]。从天然产物及其生物活性成分中找寻可能



A: *FOXO3a* siRNA或control siRNA转染进入MDA-MB-231、BT549细胞, Real-time PCR检测*FOXO3a*基因水平; B: 细胞转染*FOXO3a* siRNA或Control siRNA 24 h后, Dioscin继续处理48 h, Western blot检测EMT相关分子的表达情况; C: Transwell实验检测干扰FOXO3a表达对于细胞侵袭迁移的影响; D: 对各处理组侵袭的细胞进行计数并作统计分析, * $P < 0.05$ 。

A: *FOXO3a* siRNA or control siRNA were transfected into MDA-MB-231 and BT549 cells, and the gene level of *FOXO3a* was detected with Real-time PCR; B: after transfected for 24 h, the TNBC cells were treated with Dioscin (2.5 μmol/L) or not for another 48 h, the expression of EMT markers were detected with Western blot; C: the effect of down-regulation of FOXO3a on cell invasion and migration was evaluated with Transwell assay; D: the number of invasive cells in each group were counted and subjected to statistical analysis, * $P < 0.05$.

图5 干扰FOXO3a表达逆转Dioscin对三阴性乳腺癌细胞EMT和侵袭的抑制作用

Fig.5 Down-regulation of FOXO3a revised inhibition effect of Dioscin on TNBC cell EMT and invasion

的高效、低毒新药, 研究其抗肿瘤作用靶点及分子机制, 一直是药学研究人员孜孜以求的目标。

薯蓣皂苷片已在临床应用多年, 其适应症为改善冠状动脉供血不足, 高血压、心绞痛等。最近, 由于Dioscin被发现能够有效抑制多种肿瘤细胞增殖、诱导凋亡, 且无明显的毒副作用, 因而越来越受到关注, 并被认为是一种潜在的抗癌药物。诱导凋亡是Dioscin发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。研究发现, Dioscin在乳腺癌、肺癌、前列腺癌中可通过激活线粒体凋亡通路, 激活caspase-3, 调节Bcl-2蛋白^[7-8]; 激活前列腺癌雌激素受体^[9]; 抑制胆囊癌细胞中活性氧介导的PI3K/AKT通路活性等启动凋亡程序^[14], 发挥抗肿瘤效应。本实验首次观察到Dioscin可抑制三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化(EMT)及体外侵袭

迁移。EMT是指上细胞失去细胞极性及基底膜连接等上皮样特性, 而获得高迁移、侵袭及降解细胞外基质能力等间质样特性的过程, 是肿瘤侵袭转移的关键起始步骤^[15]。该发现提示, Dioscin可能通过抑制EMT, 进而抑制三阴性乳腺癌细胞的侵袭转移, 这对于已发现的Dioscin在乳腺肿瘤中的生物学作用及机制^[7]是一有力补充。

FOXO3a是叉头转录因子O亚家族重要成员, 可通过诱导肿瘤细胞周期阻滞和细胞凋亡发挥抑癌作用^[16-17], 并受PI3K/AKT、MAPK等多条信号通路的调节^[18-20]。FOXO3a在大多数肿瘤中表达及活性受到抑制, 但我们发现, Dioscin能诱导p38MAPK的磷酸化, 显著促进TNBC细胞FOXO3a的表达, 而干扰FOXO3a可逆转Dioscin对TNBC细胞间质化及

体外侵袭的抑制作用。由此提示, Dioscin可通过激活p38MAPK/FOXO3a信号抑制三阴性乳腺癌细胞EMT及侵袭、迁移。

综上, 本研究首次发现Dioscin能有效抑制三阴性乳腺癌细胞EMT及侵袭迁移能力, 其作用机制可能与激活p38MAPK/FOXO3a信号有关。而Dioscin促进p38MAPK磷酸化的机制以及Dioscin是否在体内同样具有抑制三阴性乳腺癌细胞侵袭转移的作用, 还有待进一步深入研究, 以期为临床联合应用化疗药物抑制三阴性乳腺癌提供实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, St Louis J, Finkelstein DM, Yu KD, *et al.* Breast cancer in China. *Lancet Oncol* 2014; 15(7): e279-89.
- 2 Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol* 2006; 19(5): 617-21.
- 3 Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, *et al.* Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 161(2): 279-87.
- 4 Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(8): 1275-81.
- 5 Kirkpatrick P. Targeting triple-negative breast cancer. *Nat Rev Drug Discovery* 2009; 8(1): 21.
- 6 Zhao X, Xu L, Zheng L, Yin L, Qi Y, Han X, *et al.* Potent effects of dioscin against gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 2016; 23(3): 274-82.
- 7 Kim EA, Jang JH, Lee YH, Sung EG, Song IH, Kim JY, *et al.* Dioscin induces caspase-independent apoptosis through activation of apoptosis-inducing factor in breast cancer cells. *Apoptosis* 2014; 19(7): 1165-75.
- 8 Hsieh MJ, Tsai TL, Hsieh YS, Wang CJ, Chiou HL. Dioscin-induced autophagy mitigates cell apoptosis through modulation of PI3K/Akt and ERK and JNK signaling pathways in human lung cancer cell lines. *Arch Toxicol* 2013; 87(11): 1927-37.
- 9 Chen J, Li HM, Zhang XN, Xiong CM, Ruan JL. Dioscin-induced apoptosis of human LNCaP prostate carcinoma cells through activation of caspase-3 and modulation of Bcl-2 protein family. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014; 34(1): 125-30.
- 10 袁中玉, 王树森, 高 岩, 苏争艳, 罗文标, 管忠震. 305例三阴性乳腺癌患者的临床特征及预后因素分析. *癌症(Yuan Zhongyu, Wang Shusen, Gao Yan, Su Zhengyan, Luo Wenbiao, Guan Zhongzhen. Chinese Journal of Cancer)* 2008; 27(6): 561-5.
- 11 Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol* 2016; 13(11): 674-90.
- 12 Sultana S, Asif HM, Nazar HM, Akhtar N, Rehman JU, Rehman RU. Medicinal plants combating against cancer-a green anticancer approach. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(11): 4385-94.
- 13 Wang CY, Bai XY, Wang CH. Traditional Chinese medicine: a treasured natural resource of anticancer drug research and development. *Am J Chin Med* 2014; 42(3): 543-59.
- 14 Song X, Wang Z, Liang H, Zhang W, Ye Y, Li H, *et al.* Dioscin induces Gallbladder Cancer apoptosis by inhibiting ROS-mediated PI3K/AKT signaling. *Int J Biol Sci* 2017; 13(6): 782-93.
- 15 Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(12): 2153-60.
- 16 Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(3): 752-7.
- 17 Santo EE, Stroeken P, Sluis PV, Koster J, Versteeg R, Westerhout EM. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. *Cancer Res* 2013; 73(7): 2189-98.
- 18 Yang JY, Zong CS, Xia W, Yamaguchi H, Ding Q, Xie X, *et al.* ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol* 2008; 10(2): 138-48.
- 19 Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo J* 2004; 23(24): 4802-12.
- 20 Liu H, Zhou BH, Qiu X, Wang HS, Zhang F, Fang R, *et al.* T63, a new 4-arylidene curcumin analogue, induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of the reactive oxygen species-FOXO3a pathway in lung cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(12): 2204-17.