

马立威,陈哲,李旭,等. 十枣汤诱导乳腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2026, 36 (6): 1-10.

Ma LW, Chen Z, Li X, et al. Effect and mechanism of Shizao decoction on inducing apoptosis in breast cancer transplants in nude mice [J]. Chin J Comp Med, 2026, 36(6): 1-10.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2026.06.001

十枣汤诱导乳腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用及机制研究

马立威¹, 陈哲², 李旭¹, 刘吉成^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院 医药科学研究院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔医学院 公共卫生学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 探讨十枣汤诱导乳腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用及相关的分子机制。**方法** 培养乳腺癌 SKBR3 细胞并构建其裸鼠移植瘤模型;连续灌胃给药 4 周,观察小鼠肿瘤生长抑制情况;给药结束后处死裸鼠分离移植瘤组织,通过乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测移植瘤组织细胞的 LDH 生成量;Hoechst33342-PI 染色观察移植瘤组织细胞的形态学变化;DCFH-DA 染色评估组织细胞活性氧(ROS)含量变化;JC-1 染色评估细胞线粒体膜电位变化;ELISA 法检测肿瘤组织细胞中 Caspase3、Caspase8、Caspase9 酶活性表达;Western blot 法检测 Fas、FasL 蛋白表达变化;qPCR 法检测 Caspase3、Caspase8、Caspase9、Fas、FasL 基因表达变化。**结果** 与模型组比较,十枣汤干预后能使移植瘤组织细胞的 LDH 生成量增加($P<0.05$, $P<0.01$),组织细胞呈现典型的凋亡形态学特征,ROS 含量显著增加($P<0.05$),线粒体去极化程度变化显著($P<0.05$, $P<0.01$),Caspase3、Caspase8、Caspase9 基因/酶活性表达增高($P<0.05$, $P<0.01$),Fas、FasL 蛋白/基因表达增高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 十枣汤能诱导乳腺癌移植瘤组织细胞的凋亡,Caspase 途径及 Fas/FasL 途径介导了对乳腺癌组织细胞凋亡的调控。

【关键词】 十枣汤;乳腺癌;裸鼠;细胞凋亡;凋亡 Caspase 途径;Fas/FasL 途径

【中图分类号】 R737.9; R966; R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2026) 06-0001-10

Effect and mechanism of Shizao decoction on inducing apoptosis in breast cancer transplants in nude mice

MA Liwei¹, CHEN Zhe², LI Xu¹, LIU Jicheng^{1*}

(1. Research Institute of Medicine & Pharmacy, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China.

2. Public Health School of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006)

【Abstract】 Objective To investigate the effect and underlying mechanism of Shizao decoction (SZD) on inducing apoptosis in breast cancer transplants in nude mice. **Methods** SKBR3 cells were cultured and transplanted into nude mice to construct tumor models. SZD was applied by continuous intragastric administration for 4 weeks and

【基金项目】 国家自然科学基金(82174207);黑龙江省博士后科研启动基金(LBH-QY24005);齐齐哈尔医学院重点学科建设项目(QYZDXK-001)。

【作者简介】 马立威(1987—),男,博士,副研究员,研究方向:天然药物抗肿瘤研究。E-mail: maliwei@qmu.edu.cn

【通信作者】 刘吉成(1958—),男,博士,二级教授,研究方向:天然药物抗肿瘤研究。E-mail: jeliu@qmu.edu.cn

its effects on tumor growth were observed. After administration, the mice were killed and the transplanted tumor tissues were separated. Lactate dehydrogenase (LDH) levels in tumor tissues were detected using an LDH kit. Morphological changes in transplanted tumor tissues were observed by Hoechst33342-propidium iodide staining, reactive oxygen species (ROS) were evaluated by 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining, and mitochondrial membrane potential was evaluated by JC-1 assay. Caspase3, Caspase8, and Caspase9 activities in the transplanted tumor cells were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Fas and Fas ligand (FasL) protein expression were detected by Western blot. *Caspase3*, *Caspase8*, *Caspase9*, *Fas*, and *FasL* gene expression were detected by quantitative polymerase chain reaction. **Results** Compared with the model group, SZD significantly increased LDH production ($P<0.05$, $P<0.01$) by transplanted breast cancer cells in nude mice, induced apoptosis, increased the ROS content ($P<0.05$) and mitochondrial depolarization ($P<0.05$, $P<0.01$), increased the gene expression and enzyme activities of *Caspase3*, *Caspase8*, and *Caspase9* ($P<0.05$, $P<0.01$), and increased the gene/protein expression of Fas and FasL ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusions** SZD can induce apoptosis in transplanted breast tumors, possibly via the apoptotic caspase and Fas/FasL pathways tumor.

【Keywords】 Shizao decoction; breast cancer; nude mice; apoptosis; apoptotic caspase pathway; Fas/FasL pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

《癌症统计报告》中的数据显示,全球范围内新增乳腺癌病例约 226 万,超过了肺癌的新增病例数,成为全球第一大癌^[1,2]。据调查显示,乳腺癌是中国女性最常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势^[3]。近年来,虽然放射治疗和化学治疗在乳腺癌治疗领域取得了显著成就,但绝大多数药物仍具有较高的毒副作用和耐药性特征^[4]。因此,研究者当前特别关注的是寻找既能有效治疗乳腺癌又具有低毒性的新型天然药物^[5]。中药复方十枣汤是《伤寒论》中的一首方剂,是东汉时期医圣张仲景治疗悬饮、支饮水液代谢失常等病变的经典名方^[6]。方药由芫花、甘遂、京大戟、大枣组成。文献报道,十枣汤在临床上主要用于治疗恶性胸水和肝硬化腹水等^[7]。课题组前期研究发现,十枣汤对乳癌细胞确有一定的增殖抑制及诱导细胞凋亡作用,本研究将从体内实验的角度探讨十枣汤的抗乳腺癌肿瘤效应及可能的分子机制,使中医经典方药更好地得到应用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人源乳腺癌 SKBR3 细胞,购买于中国科学院上海细胞库,本研究室液氮内保存。

1.1.2 实验动物

40 只 SPF 级、体质量 (15.0 ± 1.5) g 的 4~5

周龄雌性 BALB/c 裸鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司[SCXK(辽)2020-0001],在齐齐哈尔医学院实验动物中心[SYXK(黑)2021-013]适应性喂养 1 周后,用于后续实验。实验动物的处置过程按照医学伦理标准进行,并经齐齐哈尔医学院实验动物伦理委员会批准(QMU-AECC-2021-67),遵循 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

McCoy's 5A 培养基、胎牛血清(海星生物公司,批号分别为:220228S1、231008Y101);LDH 试剂盒、Hoechst33342-PI 染色试剂盒(南京建成生物公司,批号分别为:20211187、20230428);活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(invitrogen 公司,批号:E134892);JC-1 检测试剂盒、Caspase3、Caspase8、Caspase9 酶联免疫试剂盒(碧云天生物公司,批号分别为:082819191022、042821211029、046533012257、047428011934);PCR 反转录试剂盒、PCR 荧光定量试剂盒(TaKaRa 试剂公司,批号分别为:AJ60658A、AJG1421A);一抗 Anti-Fas、Anti-FasL(美国 Abcam 公司,批号分别为:82419、15285);Anti-GAPDH(美国 CST 公司,批号:#12)。

自动组织脱水机、组织包埋机(中国常州雅博电子设备有限公司,YAB0600 型、YAB0400 型);细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司,3111 型);倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司,IX51

型);荧光显微镜、激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司,Observer A1 型,LSM710 型),实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,Q5 型);全自动荧光及化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司,ChemiDoc MP 型);酶标仪(奥地利 TECAN 公司,Spark 型)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验药物及制备

十枣汤方药由芫花、甘遂、大戟及大枣组成,药材均购自齐齐哈尔市药材批发市场,经齐齐哈尔医学院天然药物化学实验中心郭丽娜教授鉴定后使用。十枣汤按照课题组前期文献^[6]方法制备,简述过程如下,取大枣 1 kg(约 200 枚)加 5 L 的蒸馏水浸泡,经煎煮、过滤、蒸发浓缩至 1 L 的枣汤,备用。另取甘遂、芫花、大戟药材饮片,粉碎后取各药粉 3 g,再加入 50 mL 枣汤混合煎煮、过滤后,制备成十枣汤。

1.3.2 裸鼠移植瘤构建及分组给药

裸鼠适应性喂养 1 周后,将对数生长期的 SKBR3 细胞用 0.9%氯化钠溶液调整浓度为 $4 \times 10^7/\text{mL}$ 。在超净台中用胰岛素注射器吸取含细胞悬液的 0.9%氯化钠溶液 0.2 mL,接种在裸鼠左前肢腋下,对应抽取 0.2 mL 不含细胞的 0.9%氯化钠溶液接种 3 只裸鼠。接种 10 d 后观察发现接种含细胞的裸鼠皮下位置可见大小均一的小肿块;而接种同体积不含细胞的裸鼠没有肿块出现,表示接种成功。接种裸鼠肿瘤生长至肉眼可见明显结节时,开始随机分组、给药;十枣汤按照实验药物急性毒性结果^[6],结合前期预实验结果分为低、中、高剂量组(150、300 和 600 mg/kg),每天灌胃给药 1 次(模型组给予等量蒸馏水),连续给药 4 周,观察肿瘤生长抑制情况。

1.3.3 移植瘤组织细胞的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)生成量检测

将质量相同的各组移植瘤新鲜组织取一小块,放入研钵中并倒入少量液氮后充分研磨至无明显沉淀,收集至无菌 EP 管中;按照试剂盒说明书方法操作,简述步骤:PBS 稀释各组样本,并取 150 μL 加入 96 孔板中,并对应加入反应试剂,室温下孵育 5 min,酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值;同时,用超纯水稀释标准品(丙酮酸)加入 96 孔板中,同样方法测定标准品浓度对应的 OD 值,绘制标准曲线,根据标准曲线及样本测得的 OD 值,

按照说明书中方法计算各组 LDH 的生成量。

1.3.4 移植瘤组织细胞的形态学变化检测

将浸泡在组织固定液中的各组组织样本取出,进行脱水、包埋制成蜡块;将组织蜡块切片并在水浴锅中展开至黏附载玻片上,放入烘箱 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤 2 h,然后依次放入二甲苯及不同浓度梯度的乙醇溶液中进行脱蜡、水化处理,最后 PBS 溶液冲洗后,制得肿瘤组织石蜡切片。按照试剂盒说明书方法,对各组切片进行 Hoechst33342-PI 染色,简述步骤如下,将各组切片依次滴加固定液、通透液处理,PBS 缓冲液冲洗后,分别滴加 Hoechst33342 染色液 20 μL 、PI 染色液 20 μL ,室温条件下避光反应 30 min,缓冲液冲洗,玻片自然晾干后,将防淬灭树脂胶滴加在玻片上,并用盖玻片进行封片处理;在荧光显微镜下进行观察并拍照分析。

1.3.5 移植瘤组织细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)含量检测

肿瘤组织的处理按照“1.3.3”项中内容进行,按照试剂盒说明书方法进行 DCFH-DA 探针标记,简述步骤如下,向装有组织样本的各组离心管中加入细胞裂解液,离心后取裂解上清液,加入稀释好的 DCFH-DA 探针,室温下避光反应 30 min,各组样本加入 96 孔荧光板中,使用酶标仪的荧光模块,设置激发波长为 502 nm,发射波长为 530 nm,检测各组样本的荧光强度,以荧光强度值表示 ROS 含量,归一化处理后分析各组样本中 ROS 相对含量。

1.3.6 移植瘤组织细胞的线粒体膜电位检测

按照“1.3.4”项中内容制备组织切片,并按照试剂盒说明书方法进行 JC-1 染色,简述步骤如下,各组切片中依次滴加固定液、通透液处理,PBS 缓冲液冲洗后,滴加预先配置好的 JC-1 染料,室温下避光孵育 45 min,弃上清,并用预先配置好的洗涤缓冲液进行 3 次冲洗,待玻片自然晾干后,将防淬灭树脂胶滴加在玻片上,并用盖玻片进行封片处理,设置激光共聚焦显微镜在同一激光强度条件下进行拍照并分析。

1.3.7 酶标仪检测移植瘤组织细胞中 Caspase3、Caspase8、Caspase9 酶活性变化

肿瘤组织的处理按照“1.3.3”项中内容进行,使用 Caspase3、Caspase8、Caspase9 检测试剂盒进行

检测,按照试剂盒说明书简述步骤如下,将各组织蛋白用 Bradford 法进行蛋白定量,按照反应体系依次加入蛋白上清液 10 μ L,缓冲液 80 μ L,比色底物 (Ac-LEHD-pNA、Ac-DEVD-pNA、Ac-IETD-pNA) 10 μ L,将反应产生的黄色裂解物在酶标仪波长 405 nm 处检测反应物的 OD 值。同时用试剂盒提供的标准溶液绘制 pNA 定量标准曲线。将测得各样本 OD 值利用标曲分析 pNA 浓度,利用 pNA 浓度反应 Caspase 酶相对活性。

1.3.8 Western blot 法检测移植瘤组织细胞中相关蛋白表达

新鲜的肿瘤组织每组取 100 mg 将其放入含有液氮的研钵中,加入 RIPA 蛋白裂解液研磨至无沉淀,冰浴上反应 30 min,离心弃沉淀,获取含蛋白的上清液;BCA 试剂盒进行蛋白定量,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并电转至 PVDF 膜上,经封闭、一抗反应,二抗反应后,在成像系统上进行 ECL 化学发光,获取图像信息,并以 GAPDH 为内参蛋白,利用成像自带软件分析条带灰度值并计算蛋白的相对表达量。

1.3.9 qPCR 法检测移植瘤组织细胞中相关基因的表达变化

肿瘤组织的处理按照“1.3.3”项中内容进行,各样本中加入 1 mL 的 TRIzol 液充分混匀后,采用酚氯仿法提取组织细胞的总 RNA,并测定其浓度及纯度后,按照前期文献方法测定并分析目的基因的表达^[8],简述步骤如下,依据试剂盒说明书方法将各组 RNA 逆转录成 cDNA,再按照表 1 中引物序列(上海生工生物公司设计合成)结合

荧光定量试剂盒说明书,对产物进行扩增反应,测定各组样本 Ct 值,并依据 Ct 值计算目的基因相对表达量。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 软件进行数据分析、处理,数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,根据方差齐性检验结果,组间比较应用 Dunnett-*t* 方法,多组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 乳腺癌裸鼠肿瘤移植瘤构建

给药期间,模型组小鼠无明显异常;十枣汤连续灌胃后有的小鼠出现行为怠惰、呼吸急促,有的出现轻微抽搐的症状,数小时后可恢复;连续给药 2 周以后,小鼠出现食欲不振、精神不佳、大便稀塘、体质量降低等异常症状,且随剂量增加及给药时间的延长,上述症状越显著,持续时间越长。十枣汤治疗 4 周后,观察可见其对乳腺癌裸鼠移植瘤生长起到显著的抑制作用,经药物治疗的各组肿瘤体积增长较为缓慢,结果见图 1。给药结束后,分离瘤组织并称重计算抑瘤率,结果见表 2。

2.2 十枣汤对移植瘤组织细胞中 LDH 生成量的影响

对移植瘤组织细胞中 LDH 生成量检测发现,十枣汤的作用能增加移植瘤组织细胞中 LDH 生成,随着给药剂量的增加,LDH 生成量增加,与模型组比较,变化差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),结果见图 2。

表 1 引物序列及长度
Table 1 Primer sequence and length

基因 Gene	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	长度/bp Length/bp
β -actin	Forward: GTTGTGACGACGAGCG Reverse: GCACAGAGCCTCGCCTT	93
Caspase3	Forward: TCGCTTCCATGTATGATCTTTG Reverse: CTGCCTTTCCTCCCATCT	110
Caspase9	Forward: CATGCTCAGGATGTAAGCCA Reverse: AGGTTCTCAGACCGGAACA	93
Caspase8	Forward: AGGCCAGATCTTCACTGTCC Reverse: GGTCACTGAACCTTGGGAA	114
Fas	Forward: GCATCTGGACCCTCCTACCT Reverse: TCCTCAATTCCAATCCCTTG	108
FasL	Forward: GCACACAGCATCATCTTTGG Reverse: GGACCTTGAGTTGGACTTGC	109

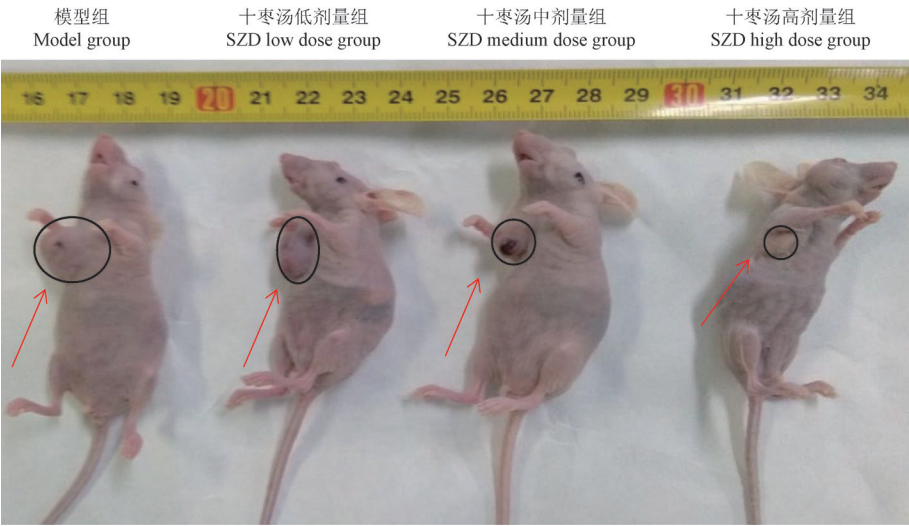


图 1 十枣汤对乳腺癌裸鼠移植瘤生长抑制作用效果图

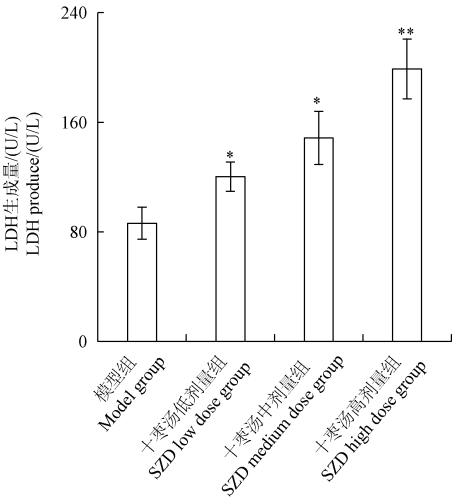
Figure 1 Effect of SZD on growth inhibition in transplanted tumor of nude mice with breast cancer

表 2 十枣汤的治疗对乳腺癌裸鼠移植瘤组织重量的影响及抑瘤率($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of SZD on the weight of transplanted tumor tissue in nude mice with breast cancer and the tumor inhibition rate ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别 Groups	肿瘤重量/g Tumor weight/g	抑瘤率/% Tumor inhibition rate/%
模型组 Model group	3.58±0.17	—
十枣汤低剂量组 SZD low dose group	3.03±0.24 *	15.38%
十枣汤中剂量组 SZD medium dose group	2.47±0.24 **	30.85%
十枣汤高剂量组 SZD high dose group	2.12±0.14 **	40.82%

注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.



注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 十枣汤对移植瘤组织细胞中 LDH 生成水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effect of SZD on produce of LDH in cells of xenografted tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.3 十枣汤对移植瘤组织细胞形态学变化的影响

显微镜下观察移植瘤组织细胞形态学变化发现,模型组中,肿瘤组织细胞密集,Hochest33342 染色的蓝色荧光均匀,有少量 PI 染色的红色荧光;十枣汤作用的各肿瘤组织中,随着药物剂量的增加,组织中的细胞变得松散,细胞蓝色亮染程度增加,红色亮染细胞增加,并可见细胞碎片增多等细胞凋亡的形态学特征,结果见图 3。

2.4 十枣汤对移植瘤组织细胞中 ROS 含量的影响

对乳腺癌移植瘤组织细胞中 ROS 含量变化检测发现,十枣汤的作用能增加组织细胞中 ROS 含量,随着给药剂量的增加,与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),结果见图 4。

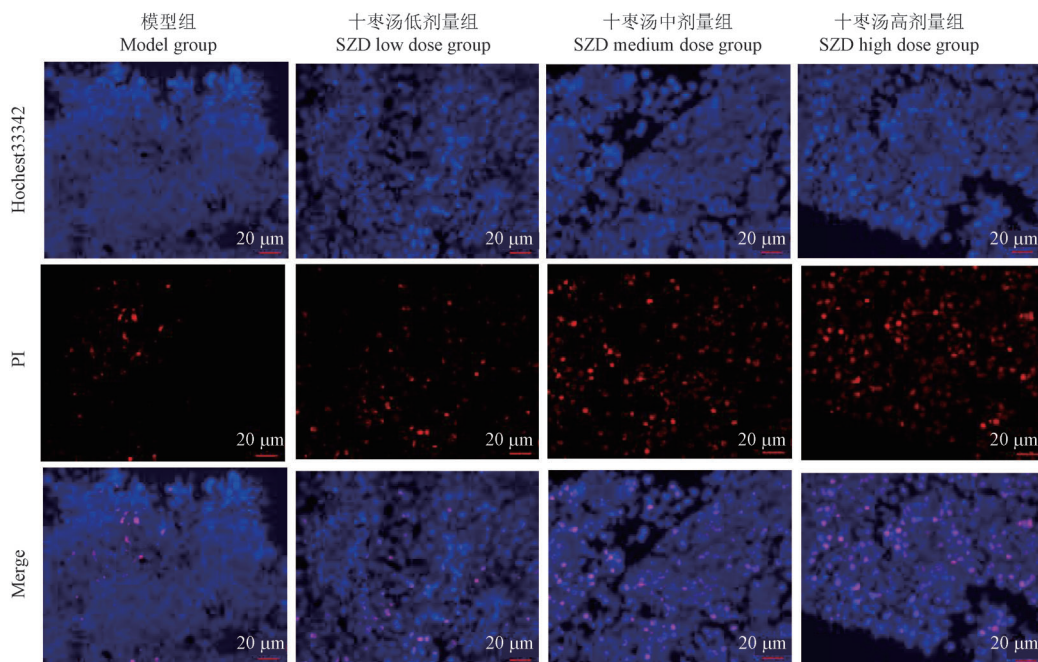


图3 十枣汤对移植瘤组织细胞凋亡的形态学变化的影响

Figure 3 Effect of SZD on morphological change in cells of xenografted tissue

2.5 十枣汤对移植瘤组织细胞线粒体膜电位变化的影响

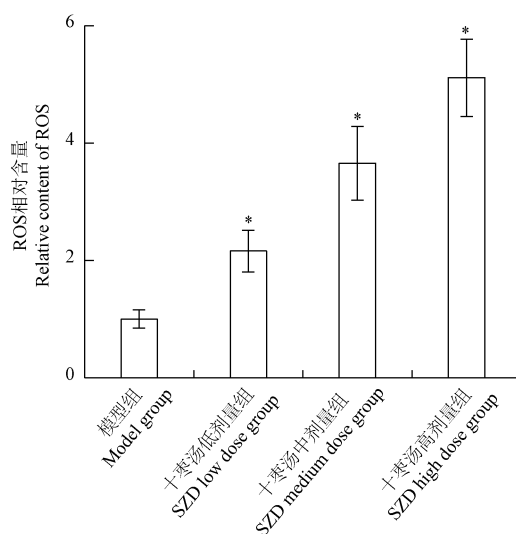
对乳腺癌移植瘤组织细胞线粒体膜电位检测发现,模型组中细胞的红色荧光较强,绿色荧光较弱,说明 JC-1 染料以聚合物形式存在较多,线粒体膜电位较高,随着十枣汤给药浓度的增加,细胞红色荧光逐渐减弱,绿色荧光逐渐增强,说明 JC-1 从聚合物形式逐渐向单体形式转变,即线粒体膜电位逐渐降低;降低程度由绿色荧光强度定量分析可知,与模型组比较,变化差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),结果见图 5。

2.6 十枣汤对移植瘤组织细胞中 Caspase 酶活性影响

对乳腺癌移植瘤组织细胞中 Caspase3、Caspase8、Caspase9 酶活性变化进行检测,结果如图 6 所示,随着给药剂量的增加,与模型组比较, Caspase3、Caspase8、Caspase9 酶活性逐渐增加($P<0.05$, $P<0.01$)。

2.7 十枣汤对移植瘤组织细胞中相关蛋白表达的影响

对乳腺癌移植瘤组织细胞中 Fas、FasL 蛋白的表达进行检测,结果如图 7 所示,随着给药剂量的增加,与模型组比较, Fas、FasL 蛋白表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。



注:与模型组相比, * $P<0.05$ 。

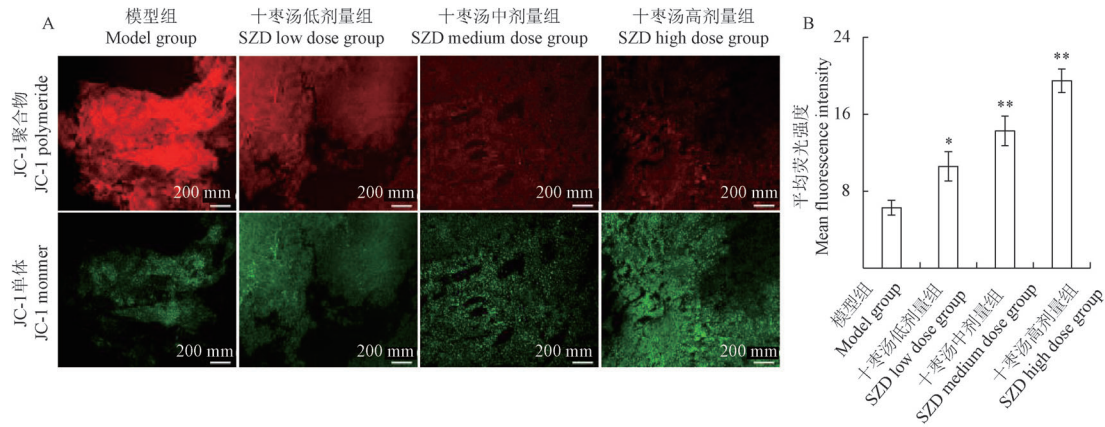
图4 十枣汤对移植瘤组织细胞中 ROS 含量变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. Compared with model group, * $P<0.05$.

Figure 4 Effect of SZD on contents of ROS and change in cells of xenografted tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.8 十枣汤对移植瘤组织细胞中相关基因表达的影响

对乳腺癌移植瘤组织细胞中 Caspase3、Caspase8、Caspase9、Fas、FasL 基因的 mRNA 表达进行检测,结果如图 8 所示,随着给药剂量的增

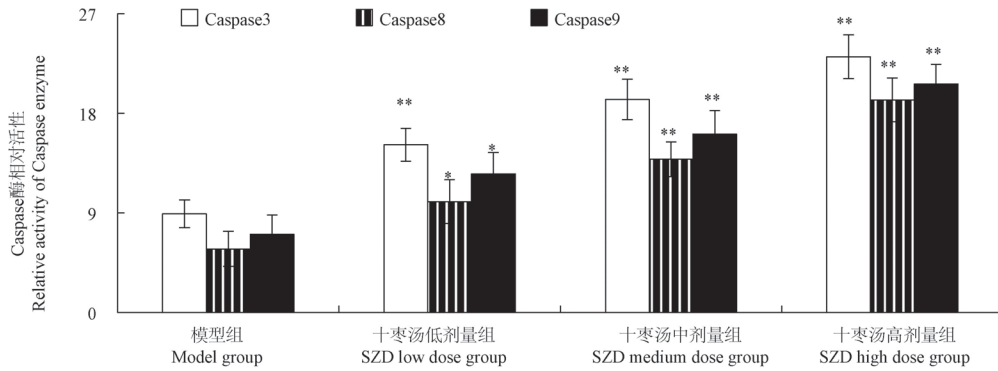


注:A:作用效果图;B:定量结果。与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图5 十枣汤对移植瘤组织细胞线粒体膜电位影响的结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. A, Rendering. B, Quantitive result. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Effect of SZD on change of mitochondrial membrane potential in cells of xenografted tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

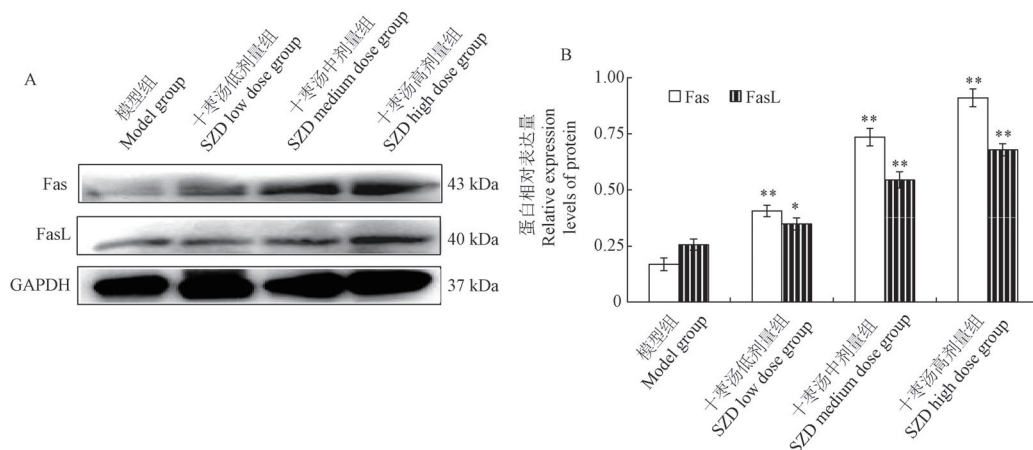


注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图6 十枣汤对移植瘤组织细胞中 Caspase 相关酶活性变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 Effect of SZD on relative activity of Caspase enzyme in cells of xenografted tissue($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

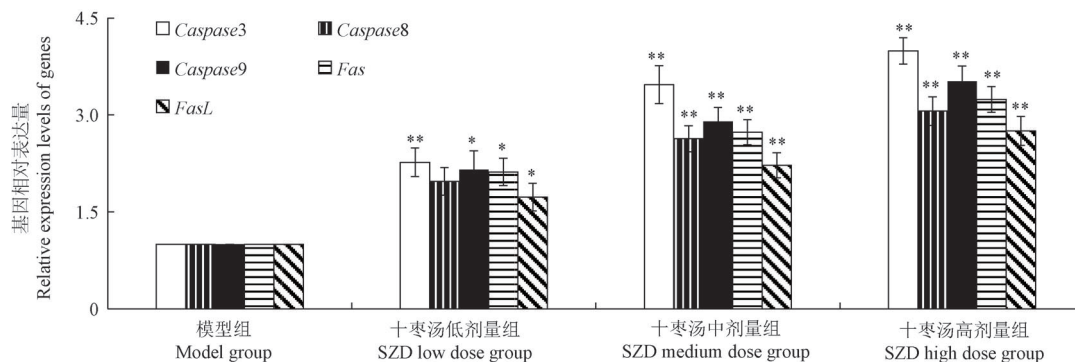


注:A:蛋白条带;B:定量结果。与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图7 十枣汤对移植瘤组织细胞中 Fas、FasL 蛋白表达的结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Note. A, Protein band. B, Quantitive result. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 7 Effect of SZD on expression of Fas, FasL protein in cells of xenografted tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注:与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 十枣汤对移植瘤组织细胞中相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Note. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 8 Effect of SZD on relative gene expression in cells of xenografted tissue($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

加,与模型组比较, *Caspase3*、*Caspase8*、*Caspase9*、*Fas*、*FasL* 基因的 mRNA 表达逐渐增加($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 讨论

目前,中药已成为肿瘤临床治疗的重要组成部分,并取得了令人满意的疗效^[9]。而在临床实践中已证实,单一药物治疗对于多机制引起的乳腺癌效果较差^[10]。因此,课题组基于中医以毒攻毒的治瘤原则,认为十枣汤能起到有效的抗乳腺癌作用。在十枣汤中,芫花、甘遂、京大戟均为毒性中药材,三药合用其性峻烈迅猛,易伤脾胃正气,故重用甘味大枣以健脾扶正,缓和峻药之毒,使峻下而不伤正。文献报道,芫花为瑞香科植物,瑞香烷型二萜为主要成分^[11];京大戟为大戟科植物,主要活性成分为二萜类化合物^[12];甘遂为大戟科植物,主要活性成分为二萜和三萜类化合物^[13]。综上,这些二萜类化合物可能是十枣汤抗乳腺肿瘤的物质基础。对于大戟科植物中的狼毒大戟课题组有较多的研究报道,发现其活性成分主要即为二萜类化合物^[14],目前被分离出的多数二萜类化合物均有抗肿瘤特别是抗乳腺肿瘤活性^[15]。对于十枣汤的抗乳腺癌活性成分的研究后续我们将深入探究。

本研究通过构建乳腺癌裸鼠移植瘤模型探讨十枣汤的抗乳腺癌作用。裸鼠作为一种免疫缺陷型实验动物,因其繁殖周期短、饲养成本低且基因组与人类具有高度同源性,已成为肿瘤学研究领域的重要动物模型^[16]。文献报道,对肿瘤

细胞的抑制作用可通过诱导细胞凋亡实现^[17];无论是传统的细胞毒药物或靶向药物均可以通过诱导细胞凋亡实现抗肿瘤效应^[18]。细胞内 ROS 含量升高可增加线粒体的损伤程度与细胞凋亡的发生密切相关^[19];线粒体膜电位的降低被认为是细胞凋亡发生的早期阶段^[20]。本研究结果证实,十枣汤能抑制乳腺癌裸鼠移植瘤生长;并能诱导肿瘤组织细胞的凋亡,增加组织细胞中 ROS 含量,降低细胞线粒体膜电位,这与文献^[17-20]报道的内容一致。细胞凋亡是一个复杂的生物学过程,受内源性线粒体途径和外源性死亡受体介导途径调控^[21]。而 *Fas*/*FasL* 信号通路属于肿瘤细胞经典死亡受体途径;该途径中通过 *Fas* 与其配体 *FasL* 相互作用调节细胞凋亡,参与细胞生理、病理过程^[22]。*Fas* 与 *FasL* 均表达于细胞表面,当 *Fas* 与 *FasL* 交联后,复合体与 *FAS* 相关死亡结构域衔接并进一步招募 *Caspase8* 产生凋亡信号;该过程又继续激活 *Caspase3*、*Bcl-2* 和 *Bax* 等内源性凋亡途径相关凋亡因子,最终使细胞降解导致癌细胞凋亡^[23]。本研究通过 Western blot 和 qPCR 实验证实了十枣汤能增加乳腺癌裸鼠移植瘤组织细胞中 *Fas*、*FasL* 蛋白/基因的表达。因此,推测 *Fas*/*FasL* 途径可能参与十枣汤抗乳腺癌作用的调控。另外,*Caspase* 家族与细胞凋亡密切相关,*Caspase* 家族是一组结构上相似的蛋白酶,能够切割并活化蛋白质,已鉴定在人类中存在的共有 11 个成员,根据不同的主要作用可分为炎症 *Caspases* 和凋亡 *Caspases*^[24]。其中, *Caspase3* 是凋亡 *Caspase* 家族的重要一员,是诱发细胞凋亡

的关键,也是细胞凋亡的主要执行者^[25]。对于细胞凋亡,2 个传统的细胞凋亡途径为内源性线粒体途径和外源死亡受体途径^[26];其中凋亡酶 Caspase8 是死亡受体途径的关键酶,凋亡酶 Caspase9 是线粒体途径的关键酶而凋亡酶 Caspase3 是两条凋亡路径的共同交汇点,Caspase8、Caspase9 参与细胞凋亡的起始,Caspase3 参与细胞凋亡的执行^[27]。在本研究中,通过 ELISA 法及 qPCR 法检测证实,十枣汤能增加乳腺癌移植瘤组织细胞中 *Caspase3*、*Caspase8*、*Caspase9* 基因表达及酶活性。因此,推测凋亡 Caspase 途径可能参与了十枣汤抗乳腺癌作用的调控。

综上所述,十枣汤能抑制裸鼠移植瘤的生长,并通过诱导肿瘤组织细胞的凋亡起到抗乳腺癌的作用,且 Fas/FasL 途径及凋亡 Caspase 途径可能参与了十枣汤抗乳腺癌作用的调控。然而,中药抗肿瘤作用具有多靶点、多途径的特点,后续研究中我们将继续探讨其抗乳腺癌作用的相关机制。

参考文献:

- [1] 马立威,姚宏玉,陈哲,等. PI3k/Akt 通路在大戟大枣汤抗不同分子表型乳腺癌中的调控作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(3): 27-35.
MA L W, YAO H Y, CHEN Z, et al. Effects of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and jujuba against breast cancer of different molecular phenotypes via PI3k/Akt pathway [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(3): 27-35.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] ZHANG Y N, XIA K R, LI C Y, et al. Review of breast cancer pathological image processing [J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 1994764.
- [4] LIN H C, LIN J Y. GSF3, a polysaccharide from guava (*Psidium guajava* L.) seeds, inhibits MCF-7 breast cancer cell growth via increasing Bax/Bcl-2 ratio or Fas mRNA expression levels [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 161: 1261-1271.
- [5] 苏坤俊,林德安,韦星. β -苦茄碱通过 Fas 介导的死亡受体途径诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡 [J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(4): 497-502.
SU K J, LIN D A, WEI X. β -Solamarine induces apoptosis in breast cancer MCF-7 cells via the Fas-mediated death receptor pathway [J]. J Youjiang Med Univ Natl, 2024, 46(4): 497-502.
- [6] MA L W, CHEN Z, SHI G S, et al. Evaluation of acute toxicity and antitumour efficacy of Ten-Jujube Decoction [J]. J Chin Pharm Sci, 2024, 33(4): 329-338.
- [7] 王艳萍,李文静,洪博. 基于网络药理学探讨十枣汤治疗肝硬化腹水的作用机制 [J]. 中国医药导报, 2021, 18(19): 32-35, 198.
WANG Y P, LI W J, HONG B. The mechanism of Shizao Decoction on treating hepatic ascites based on network pharmacology [J]. China Med Her, 2021, 18(19): 32-35, 198.
- [8] MA L, ZHANG J, WANG X, et al. Design and synthesis of diosgenin derivatives as apoptosis inducers through mitochondria-related pathways [J]. Eur J Med Chem, 2021, 217: 113361.
- [9] PAN X, TAO H, NIE M, et al. A clinical study of traditional Chinese medicine prolonging the survival of advanced gastric cancer patients by regulating the immunosuppressive cell population: a study protocol for a multicenter, randomized controlled trail [J]. Medicine, 2020, 99(16): e19757.
- [10] PARK M, KIM D, KO S, et al. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12): 6806.
- [11] ZHANG S, LI X, ZHANG F, et al. Preparation of yuanhuacine and relative *Daphne* diterpene esters from *Daphne genkwa* and structure-activity relationship of potent inhibitory activity against DNA topoisomerase I [J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14(11): 3888-3895.
- [12] LIANG Q, HU J X, LIANG Z S, et al. *Euphorbia peginensis* Rupr. roots: a comprehensive review of botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, quality control, and toxicology [J]. Nat Prod Res, 2025, 39(10): 2912-2928.
- [13] SHEN J, KAI J, TANG Y, et al. The chemical and biological properties of *Euphorbia kansui* [J]. Am J Chin Med, 2016, 44(2): 253-273.
- [14] MA T C, MA Y K, ZHANG J L, et al. Integrated strategy of UHPLC-Q-TOF-MS and molecular networking for identification of diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* steud. and prediction of the anti-breast-cancer mechanism by the network pharmacological method [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 3829434.
- [15] CHEN G, MA T, MA Y, et al. Chemical composition, anti-breast cancer activity and extraction techniques of entabietane diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* steud [J]. Molecules, 2022, 27(13): 4282.
- [16] 张静,王常松. 人胃癌裸鼠移植模型的研究进展 [J]. 中国现代医生, 2023, 61(19): 115-117, 121.

- ZHANG J, WANG C S. Research progress of nude mice transplantation model of human gastric cancer [J]. China Mod Dr, 2023, 61(19): 115-117, 121.
- [17] MA L, CHEN Z, FENG M, et al. A diverse treatment with the extract of *Euphorbia fischeriana* Steud. and *Ziziphus jujuba* Mill. for breast cancer nude mice of MCF-7 (ER+) cells or MDA-MB-453 (ER-) cells via modulation of the PI₃k/Akt signalling pathway [J]. Pharmacol Res Mod Chin Med, 2022, 5: 100198.
- [18] MA L, WANG H, WANG J, et al. Novel steroidal 5 α , 8 α -endoperoxide derivatives with semicarbazone/thiosemicarbazone side-chain as apoptotic inducers through an intrinsic apoptosis pathway: design, synthesis and biological studies [J]. Molecules, 2020, 25(5): 1209.
- [19] WANG W, CHEN Z, CHEN X, et al. DG-8d, a novel diosgenin derivative, decreases the proliferation and induces the apoptosis of A549 cells by inhibiting the PI₃k/Akt signaling pathway [J]. Steroids, 2021, 174: 108898.
- [20] SHI G, CHEN Z, FENG M, et al. Potential anti-gastric cancer properties of modified Lichong decoction based on metabolomics, network pharmacology, and pharmacological verification [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 347: 119806.
- [21] 马立威, 陈哲, 王文豹, 等. 从表型差异探讨大戟大枣汤含药血清抗乳腺癌的作用 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2373-2378.
- MA LW, CHEN Z, WANG WB, et al. Effect of decoction of *Euphorbia fischeriana* Steud. and *jujuba* against breast cancer of different molecular [J]. Chin Trad Patent Med, 2023, 45(7): 2373-2378.
- [22] ABOU SHOUSA S, BAHEEG S, GHONEIM H, et al. The effect of Fas/FasL pathway blocking on apoptosis and stemness within breast cancer tumor microenvironment (preclinical study) [J]. Breast Dis, 2023, 42(1): 163-176.
- [23] 金元元, 孟德胜, 刘雅恬. 基于 Fas/FasL 信号通路探究雷帕霉素对食管癌裸鼠瘤体抑制及放疗增敏的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(1): 15-22.
- JIN Y Y, MENG D S, LIU Y T. Effect of rapamycin on inhibiting esophageal cancer tumor in mice and sensitizing radiotherapy based on Fas/FasL signaling pathway [J]. Drugs Clin, 2025, 40(1): 15-22.
- [24] 田森, 陈雨, 陶朋, 等. Caspase 家族与失神经支配骨骼肌萎缩的研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(1): 84-87.
- TIAN M, CHEN Y, TAO P, et al. Research advances in the Caspase family and denervated skeletal muscle atrophy [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2024, 41(1): 84-87.
- [25] 马立威, 陈哲, 李京, 等. 12-去氧佛波醇-13-棕榈酸酯通过 Fas/FasL 通路调控 K562 细胞凋亡 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(3): 684-688.
- MA LW, CHEN Z, LI J, et al. 12-deoxyphocopol-13-palmitate regulates apoptosis of K562 cells through the Fas/FasL pathway [J]. Chin J Geron, 2023, 43(2): 684-688.
- [26] MA L, CHEN Z, LI J, et al. DP from *Euphorbia fischeriana* S. mediated apoptosis in leukemia cells via the PI3k/Akt signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 113889.
- [27] 朱宏亮, 姜剑伟, 张建军. 盐酸度洛西汀对大鼠应激性胃溃疡保护作用机制的初步探究 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(13): 1612-1618.
- ZHU H L, JIANG J W, ZHANG J J. Protective mechanism of duloxetine hydrochloride on stress gastric ulcer in rats [J]. Chin J New Drugs, 2019, 28(13): 1612-1618.

[收稿日期] 2025-08-14