

千金藤素调控乳腺癌细胞进展的作用

Effects of Cepharanthine in regulating the progression of breast cancer cells

姜俊杰, 张 维, 常春佳,
计春慧, 张 冉

(沧州市中心医院 甲状腺乳腺外一科, 河北
沧州 061001)

JIANG Jun-jie, ZHANG Wei,
CHANG Chun-jia, JI Chun-hui,
ZHANG Ran

(First Department of Thyroid and Breast,
Cangzhou Central Hospital, Cangzhou
061001, Hebei Province, China)

基金项目: 沧州市科技计划基金资助项目
(222107003)

作者简介: 姜俊杰(1982-), 女, 主治医师, 主要
从事甲状腺乳腺方面的工作

通信作者: 张维, 主任医师, 硕士生导师
MP: 13832799906

E-mail: 13832799906@163.com

摘要:目的 研究千金藤素通过调控微小 RNA-378c(miR-378c)/高尔基体运输 1A 蛋白(GOLT1A)轴对乳腺癌细胞凋亡、能量代谢及血管生成的影响。方法 将处于对数生长期 MDA-MB-231 细胞分为对照组(不做任何处理)、NC inhibitor 组(转染 miR-378c 抑制剂阴性对照)、miR-378c inhibitor 组(转染 miR-378c 抑制剂)、si-NC 组(转染 si-NC 质粒)、si-GOLT1A 组(转染 si-GOLT1A 质粒)、千金藤素组(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的千金藤素)、千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组(千金藤素组基础上转染 miR-378c 抑制剂)和 miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组(千金藤素组基础上共转染 miR-378c 抑制剂和 si-GOLT1A 质粒)。用实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-378c、GOLT1A、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、血小板反应蛋白-1(THBS1)的 mRNA 相对表达水平,用试剂盒法检测能量代谢指标,用免疫荧光法检测 VEGFA、THBS1 蛋白相对表达水平。结果 对照组和千金藤素组的 miR-378c 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 和 3.26 ± 0.48 , GOLT1A mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 0.43 ± 0.07 。对照组、千金藤素组、千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组和 miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组的谷氨酰胺浓度分别为 (22.03 ± 3.14) 、 (8.27 ± 1.94) 、 (17.25 ± 2.86) 和 (13.11 ± 2.28) $\text{nmol} \cdot 10^{-7} \text{ cells}$, 乙酰辅酶 A 浓度分别为 (11.32 ± 2.06) 、 (5.71 ± 1.19) 、 (9.62 ± 1.85) 和 (6.67 ± 1.63) $\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cells}$, 琥珀酸浓度分别为 (53.67 ± 6.92) 、 (21.24 ± 3.87) 、 (39.82 ± 4.39) 和 (30.36 ± 4.21) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Pr}^{-1}$, 腺苷三磷酸生成量分别为 (2.32 ± 0.42) 、 (0.96 ± 0.12) 、 (1.91 ± 0.33) 和 (1.16 ± 0.26) $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Pr}^{-1}$, VEGFA mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.56 ± 0.10 、 0.84 ± 0.13 和 0.69 ± 0.10 , THBS1 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 、 3.43 ± 0.57 、 2.04 ± 0.36 和 3.10 ± 0.52 , VEGFA 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.11 、 0.37 ± 0.05 、 0.76 ± 0.09 和 0.48 ± 0.06 , THBS1 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.09 、 3.71 ± 0.62 、 1.88 ± 0.31 和 2.55 ± 0.37 ;对照组的上述指标与千金藤素组比较,千金藤素组的上述指标与千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组比较,千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组的上述指标与 miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。结论 千金藤素能够促进乳腺癌细胞凋亡并抑制其能量代谢及血管生成,可能与其调控 miR-378c/GOLT1A 轴有关。

关键词: 千金藤素;微小 RNA-378c;乳腺癌;高尔基体运输 1A 蛋白;细胞凋亡;能量代谢;血管生成

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.11.012

中图分类号: R28 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-6821(2025)11-1562-07

Abstract: Objective To investigate the effects of Cepharanthine on apoptosis, energy metabolism and angiogenesis of breast cancer cells by regulating the microRNA (miR) - 378c/Golgi transport 1A protein (GOLT1A) axis. **Methods** MDA-MB-231 cells in the logarithmic

growth phase were divided into the following groups: Control group (no treatment), NC inhibitor group (transfected with miR-378c inhibitor negative control), miR-378c inhibitor group (transfected with miR-378c inhibitor), si-NC group (transfected with si-NC plasmid), si-GOLT1A group (transfected with si-GOLT1A plasmid), Cepharanthine group ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cepharanthine), Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor group (Cepharanthine group with miR-378c inhibitor transfection) and miR-378c inhibitor combined with si-GOLT1A group (Cepharanthine group with co-transfection of miR-378c inhibitor and si-GOLT1A plasmid). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction was used to detect the relative expression levels of miR-378c, GOLT1A, vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and thrombospondin-1 (THBS1); kits were used to detect energy metabolism indicators; immunofluorescence was used to detect VEGFA and THBS1 expression levels.

Results The relative expression levels of miR-378c in the control group and Cepharanthine group were 1.00 ± 0.14 and 3.26 ± 0.48 , respectively; the relative expression levels of GOLT1A mRNA were 1.00 ± 0.15 and 0.43 ± 0.07 , respectively. The glutamine concentrations in the control group, Cepharanthine group, Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor group and miR-378c inhibitor combined with si-GOLT1A group were (22.03 ± 3.14), (8.27 ± 1.94), (17.25 ± 2.86) and (13.11 ± 2.28) $\text{nmol} \cdot 10^{-7}$ cells, respectively; the acetyl coenzyme A concentrations were (11.32 ± 2.06), (5.71 ± 1.19), (9.62 ± 1.85) and (6.67 ± 1.63) $\text{nmol} \cdot 10^{-6}$ cells, respectively; the succinate concentrations were (53.67 ± 6.92), (21.24 ± 3.87), (39.82 ± 4.39) and (30.36 ± 4.21) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Pr}^{-1}$, respectively; the ATP production values were (2.32 ± 0.42), (0.96 ± 0.12), (1.91 ± 0.33) and (1.16 ± 0.26) $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Pr}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of VEGFA mRNA were 1.00 ± 0.14 , 0.56 ± 0.10 , 0.84 ± 0.13 and 0.69 ± 0.10 , respectively; the relative expression levels of THBS1 mRNA were 1.00 ± 0.12 , 3.43 ± 0.57 , 2.04 ± 0.36 and 3.10 ± 0.52 , respectively; the relative fluorescence intensities of VEGFA were 1.00 ± 0.11 , 0.37 ± 0.05 , 0.76 ± 0.09 and 0.48 ± 0.06 , respectively; and the relative fluorescence intensities of THBS1 were 1.00 ± 0.09 , 3.71 ± 0.62 , 1.88 ± 0.31 and 2.55 ± 0.37 , respectively. All the above indicators showed significant differences between the control group and the Cepharanthine group, the Cepharanthine group and the Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor group, the Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor group and the miR-378c inhibitor combined with si-GOLT1A group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Cepharanthine can promote apoptosis and inhibit energy metabolism and angiogenesis in breast cancer cells, which may be related to its regulation of the miR-378c/GOLT1A axis.

Key words: Cepharanthine; microRNA-378c; breast cancer; Golgi transport protein 1A; apoptosis; energy metabolism; angiogenesis

乳腺癌是一种起源于乳房腺上皮组织的常见恶性肿瘤类型,患病率、死亡率均较高且具有年轻化趋势。临床治疗方案包括手术、放化疗等,虽取得一定效果,但仍存在肿瘤复发和转移率高及药物不良反应多等问题^[1]。因此,积极寻找治疗药物对于乳腺癌治疗具有重要意义。千金藤素是由中药千金藤中分离得到的一种生物碱类物质,在多种肿瘤疾病如食管鳞状细胞癌、乳腺癌、肝癌等中可发挥抗癌作用^[2]。然而,其在乳腺癌中的具体作用机制尚未明确。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种小型非编码RNA,长度约为22个核苷酸大小,可参与调控乳腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移等生物学行为^[3]。miR-378c参与肿瘤疾病的发生发展^[4],但在乳腺癌中的具体作用并未明确。高尔基体运输1A蛋白(Golgi transport1A,

GOLT1A)在肺癌中表达上调^[5]。基于此,本研究拟从miR-378c/GOLT1A轴入手,旨在探究千金藤素对乳腺癌细胞凋亡、能量代谢及血管生成的影响。

材料与方法

1 材料

细胞 人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231),购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司;人胚肾细胞(293T),购自上海雅吉生物科技有限公司。

药品与试剂 千金藤素,规格:每瓶20 mg,纯度:98.0%(HPLC),批号:20240422,成都普思生物科技股份有限公司生产。兔抗人B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、兔抗人Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、兔抗人髓样细胞

白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)、兔抗人裂解的半胱氨酸蛋白酶(cleaved cysteine-aspartic acid protease, cleaved-caspase)-3、兔抗人血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、兔抗人血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, THBS1)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G、Alexa Fluor® 488 荧光标记的山羊抗兔免疫球蛋白G、Alexa Fluor® 594 荧光标记的山羊抗兔免疫球蛋白G,均为英国 Abcam 公司生产;兔抗人 cleaved-caspase-9,美国 Cell Signaling 公司生产;miR-378c 抑制剂(miR-378c inhibitor)及其阴性对照(NC inhibitor)、GOLT1A 干扰质粒(si-GOLT1A)及其阴性对照(si-NC)、miR-378c 模拟物(miR-378c mimic)及其阴性对照(NC mimic)、引物序列,均由吉玛基因公司提供;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、琥珀酸比色测定试剂盒,均为上海经科化学科技有限公司生产;小量总 RNA 提取试剂盒,简石生物技术(北京)有限公司生产;cDNA 第一链合成试剂盒,翌圣生物科技(上海)股份有限公司生产;EZMeta™ 双荧光素酶报告基因检测试剂盒,武汉佰瑞得生物技术有限公司生产;谷氨酰胺测定试剂盒,上海西格生物科技有限公司生产;乙酰辅酶A测定试剂盒,上海齐源生物科技有限公司生产;腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)含量测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司生产;二喹啉甲酸法试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司生产。

仪器 Infinite® M Nano 酶标仪,瑞士 TECAN 公司产品;DYCZ-24FN 电泳仪,北京六一生物技术有限公司产品;QuantStudio 3 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)系统、iBright™ CL1500 成像系统,均为美国赛默飞世尔科技公司产品;WYS-37XBY 倒置荧光显微镜,天津微仪光学仪器有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养

将 MDA-MB-231 细胞接种在含 10% 胎牛血清+1% 链青霉素的 L-15 培养基中,293T 细胞接种在含 10% 胎牛血清+1% 链青霉素的 RPMI-1640 培养基中,最后均置于 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

2.2 细胞转染、分组与处理方法

用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行 siRNA 转染,具体操作步骤及试剂用量依据说明书进行。si-NC 序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'和 5'-

ACGUGACACGUUCGGAGAA-3';si-GOLT1A 序列:5'-GAUUCUUCAGCCUCUUUAAGG-3'和 5'-UUAAGAGGCUGAAGAAUCCG-3'。将处于生长对数期 MDA-MB-231 细胞分为对照组、NC inhibitor 组、miR-378c inhibitor 组、si-NC 组、si-GOLT1A 组、千金藤素组、千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组、miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组。对照组细胞不做任何处理;NC inhibitor 组细胞转染 miR-378c 抑制剂阴性对照;miR-378c inhibitor 组细胞转染 miR-378c 抑制剂;si-NC 细胞转染 si-NC 质粒;si-GOLT1A 组细胞转染 si-GOLT1A 质粒;千金藤素组用 20 μmol·L⁻¹ 千金藤素处理细胞;千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组在千金藤素组基础上转染 miR-378c 抑制剂;miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组在千金藤素组基础上共转染 miR-378c 抑制剂和 si-GOLT1A 质粒。

2.3 CCK-8 法检测细胞存活率^[6]

取 MDA-MB-231 细胞调整密度为每孔 5×10^3 个接种至 96 孔板上,用 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μmol·L⁻¹ 千金藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,分别记为 0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 μmol·L⁻¹ 组,每孔加入 CCK-8 溶液 20 μL,置于细胞培养箱中孵育 2 h,用酶标仪检测波长 450 nm 处的光密度值。

2.4 qRT-PCR 检测 miR-378c、GOLT1A、VEGFA 和 THBS1 的 mRNA 相对表达水平^[6]

按照小量总 RNA 提取试剂盒说明书提取各组细胞中的总 RNA,再按照 cDNA 第一链合成试剂盒将其逆转录为 cDNA。以 U6 和 β-actin 为内参,以 cDNA 为模板进行扩增反应,扩增程序为 95℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共进行 40 个循环,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 miR-378c、GOLT1A、VEGFA 和 THBS1 的 mRNA 相对表达水平。

2.5 双荧光素酶报告基因法验证 miR-378c 和 GOLT1A 的靶向关系^[6]

通过 Targetscan (<https://www.targetscan.org/>) 预测发现 miR-378c 和 GOLT1A 存在结合位点。根据两者的结合位点,构建含有靶向结合位点序列的野生型质粒(GOLT1A WT)或突变型质粒(GOLT1A MUT),将处于生长对数期 293T 细胞分为 NC mimic 组(50 nmol·L⁻¹ miR-NC 处理)和 miR-378c mimic 组(50 nmol·L⁻¹ miR-378c 模拟物处理),置于细胞培养箱中培养 48 h,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测荧光素酶活性。

2.6 蛋白质印迹 (Western blot, WB) 法检测凋亡相关蛋白相对表达水平^[7]

取各组 MDA-MB-231 细胞加入裂解液提取总蛋白,二喹啉甲酸法测定蛋白浓度,选取样本 30 μg 经凝胶电泳、转膜、封闭,加入 Bcl-2 (1:2 000)、Bax、(1:1 000)、Mcl-1 (1:1 000)、cleaved-caspase-3 (1:500)、cleaved-caspase-9 (1:1 000) 抗体稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h,洗涤 3 次,滴加化学发光液显影,再用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值。

2.7 试剂盒检测能量代谢指标^[7]

将对数生长期的 MDA-MB-231 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 12 孔板中,根据“2.1”中分组处理后,弃培养液,磷酸盐缓冲液冲洗,收集细胞悬液,离心取上清液,分别用谷氨酰胺测定试剂盒、乙酰辅酶 A 测定试剂盒、琥珀酸比色测定试剂盒、ATP 含量测定试剂盒检测各组细胞中谷氨酰胺、乙酰辅酶 A 和琥珀酸浓度及 ATP 生成量。

2.8 免疫荧光法检测 VEGFA 和 THBS1 的表达水平^[6]

取 MDA-MB-231 细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min、0.1% Triton X-100 透化 15 min、5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h,洗涤后加入 VEGFA (1:500)、THBS1 (1:1 000) 抗体稀释液 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗涤 3 次,加入荧光标记的相应二抗 (1:1 000) 室温避光孵育 1 h,洗涤 3 次,加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚进行细胞核染色 5 min,用含有抗荧光淬灭剂的封片液进行封片,用荧光显微镜观察。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 不同浓度千金藤素对 MDA-MB-231 细胞存活率的影响

CCK-8 结果显示,0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 4.53)\%$ 、 $(95.71 \pm 4.12)\%$ 、 $(89.14 \pm 6.53)\%$ 、 $(75.64 \pm 7.59)\%$ 、 $(64.21 \pm 8.94)\%$ 和 $(33.49 \pm 7.20)\%$ 。随着千金藤素浓度的增加,细胞存活率逐渐下降,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,当浓度为 5.0~40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率均显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.001$),计算半数抑制浓度 (50% inhibiting concentration, IC_{50}) 值为 26.33 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,后续选用 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为

千金藤素组的处理浓度。

2 千金藤素对 miR-378c 和 GOLT1A mRNA 在 MDA-MB-231 细胞表达的影响

对照组不做任何处理;NC inhibitor 组转染 miR-378c 抑制剂阴性对照;miR-378c inhibitor 组转染 miR-378c 抑制剂;si-NC 组转染 si-NC 质粒;si-GOLT1A 组转染 si-GOLT1A 质粒;千金藤素组用 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 千金藤素处理;千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组在千金藤素组基础上转染 miR-378c 抑制剂;miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组在千金藤素组基础上共转染 miR-378c 抑制剂和 si-GOLT1A 质粒。

对照组和千金藤素组的 miR-378c 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 和 3.26 ± 0.48 , GOLT1A mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 0.43 ± 0.07 ,千金藤素组与对照组相比,细胞中 miR-378c 相对表达水平显著升高, GOLT1A mRNA 相对表达水平显著降低 (均 $P < 0.001$)。

3 miR-378c 和 GOLT1A 的靶向关系验证

通过 Targetscan (<https://www.targetscan.org/>) 预测发现,miR-378c 和 GOLT1A 存在结合位点 (见图 1)。qRT-PCR 结果显示,NC mimic 组、miR-378c mimic 组中 miR-378c 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.10 和 6.27 ± 0.81 , miR-378c mimic 组与 NC mimic 组相比,miR-378c 的相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,NC mimic 组、miR-378c mimic 组 WT-GOLT1A 表达分别为 1.00 ± 0.13 和 0.53 ± 0.07 , Mut-GOLT1A 表达分别为 1.00 ± 0.12 和 0.96 ± 0.11 ,与 NC mimic 组相比,miR-378c mimic 与 WT-GOLT1A 共转染的荧光素酶活性明显降低 ($P < 0.001$),而 miR-378c mimic 与 Mut-GOLT1A 共转染的荧光素酶活性在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。qRT-PCR 结果显示,NC mimic 组和 miR-378c mimic 组的 GOLT1A mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 和 0.68 ± 0.10 , miR-378c mimic 组与 NC mimic 组相比, GOLT1A mRNA 相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。

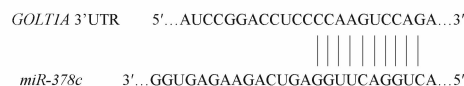


图1 微小 RNA (miR) - 378c 和高尔基体运输 1A 蛋白 (GOLT1A) 结合位点预测

Figure 1 Prediction of binding sites for microRNA (miR) - 378c and Golgi transport1A (GOLT1A)

4 千金藤素通过 *miR* - 378c/*GOLT1A* 轴对 MDA - MB - 231 细胞凋亡的影响

NC inhibitor 组和 *miR* - 378c inhibitor 组的 *miR* - 378c 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.12 和 0.24 ± 0.03 , *miR* - 378c inhibitor 组与 NC inhibitor 组相比, 细胞中 *miR* - 378c 的表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。si - NC 组和 si - *GOLT1A* 组细胞 *GOLT1A* mRNA 的表达水平分别为 1.00 ± 0.14 和 0.32 ± 0.05 , si - *GOLT1A* 组与 si - NC 组相比, 细胞 *GOLT1A* mRNA 相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$)。千金藤素组与对照组相比, 细胞 Bcl - 2 和 Mcl - 1 蛋白相对表达水平均显著降低, Bax、cleaved - caspase - 3 和 cleaved - caspase - 9 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$); 千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组与千金藤素组相比, 细胞 Bcl - 2 和 Mcl - 1 蛋白相对表达水平均显著升高, Bax、cleaved - caspase - 3 和 cleaved - caspase - 9 蛋白相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); *miR* - 378c inhibitor 联合 si - *GOLT1A* 组与千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组相比, 细胞 Bcl - 2 和 Mcl - 1 蛋白相对水平均显著降低

($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), Bax、cleaved - caspase - 3 和 cleaved - caspase - 9 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$)。结果见表 1。

5 千金藤素通过 *miR* - 378c/*GOLT1A* 轴对 MDA - MB - 231 细胞能量代谢的影响

千金藤素组与对照组相比, 细胞中谷氨酰胺的浓度显著降低 ($P < 0.001$), 千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组与千金藤素组相比, 细胞中谷氨酰胺的浓度显著升高 ($P < 0.001$), *miR* - 378c inhibitor 联合 si - *GOLT1A* 组与千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组相比, 细胞中谷氨酰胺的浓度显著降低 ($P < 0.01$)。千金藤素组与对照组相比, 细胞中乙酰辅酶 A 浓度、琥珀酸浓度和 ATP 生成量均显著降低 (均 $P < 0.001$), 千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组与千金藤素组相比, 细胞中乙酰辅酶 A 浓度、琥珀酸浓度和 ATP 生成量均显著升高 (均 $P < 0.001$), *miR* - 378c inhibitor 联合 si - *GOLT1A* 组与千金藤素联合 *miR* - 378c inhibitor 组相比, 细胞中乙酰辅酶 A 浓度、琥珀酸浓度和 ATP 生成量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$), 见表 2。

表 1 各组细胞凋亡相关蛋白的相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of relative expression levels of apoptosis - related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Bcl - 2	Bax	Mcl - 1	cleaved - caspase - 3	cleaved - caspase - 9
Control	8	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.14
Cepharanthine	8	$0.67 \pm 0.06^{***}$	$2.55 \pm 0.32^{***}$	$0.70 \pm 0.08^{***}$	$1.94 \pm 0.31^{***}$	$3.87 \pm 0.56^{***}$
Cepharanthine combined with <i>miR</i> - 378c inhibitor	8	$0.91 \pm 0.11^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.64 \pm 0.29^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.95 \pm 0.13^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.24 \pm 0.19^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.92 \pm 0.35^{\Delta\Delta\Delta}$
<i>miR</i> - 378c inhibitor combined with si - <i>GOLT1A</i>	8	$0.75 \pm 0.09^{\blacktriangle\blacktriangle}$	$2.04 \pm 0.34^{\blacktriangle}$	$0.83 \pm 0.08^{\blacktriangle}$	$1.49 \pm 0.20^{\blacktriangle}$	$2.79 \pm 0.43^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$

Bcl - 2; B - cell lymphoma - 2; Bax; Bcl - 2 associated X protein; Mcl - 1; Myeloid cell leukemia - 1; Cleaved - caspase; Cleaved cysteine - aspartic acid protease; Control group; MDA - MB - 231 cells received no treatment; Cepharanthine group; MDA - MB - 231 cells were treated with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cepharanthine; Cepharanthine combined with *miR* - 378c inhibitor group; *miR* - 378c inhibitor was transfected into cells in addition to the Cepharanthine treatment; *miR* - 378c inhibitor combined with si - *GOLT1A* group; *miR* - 378c inhibitor and si - *GOLT1A* plasmid were co - transfected into cells in addition to the Cepharanthine treatment; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with Cepharanthine group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with Cepharanthine combined with *miR* - 378c inhibitor group, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

表 2 各组细胞中谷氨酰胺 (Gln)、乙酰辅酶 A (acetyl CoA) 和琥珀酸浓度以及腺苷三磷酸 (ATP) 产生比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of glutamine, acetyl coenzyme A (acetyl CoA), succinate concentrations and adenosine triphosphate (ATP) production in cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Gln ($\text{nmol} \cdot 10^{-7} \text{ cell}$)	Acetyl CoA ($\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{ cell}$)	Succinic acid [$\text{nmol} \cdot (\text{mg Pr})^{-1}$]	ATP production [$\text{mmol} \cdot (\text{mg Pr})^{-1}$]
Control	22.03 ± 3.14	11.32 ± 2.06	53.67 ± 6.92	2.32 ± 0.42
Cepharanthine	$8.27 \pm 1.94^{***}$	$5.71 \pm 1.19^{***}$	$21.24 \pm 3.87^{***}$	$0.96 \pm 0.12^{***}$
Cepharanthine combined with <i>miR</i> - 378c inhibitor	$17.25 \pm 2.86^{\Delta\Delta\Delta}$	$9.62 \pm 1.85^{\Delta\Delta\Delta}$	$39.82 \pm 4.39^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.91 \pm 0.33^{\Delta\Delta\Delta}$
<i>miR</i> - 378c inhibitor combined with si - <i>GOLT1A</i>	$13.11 \pm 2.28^{\blacktriangle\blacktriangle}$	$6.67 \pm 1.63^{\blacktriangle\blacktriangle}$	$30.36 \pm 4.21^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$	$1.16 \pm 0.26^{\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle}$

Dose and *n* refer to table 1; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with Cepharanthine group, $\Delta P < 0.001$; Compared with Cepharanthine combined with *miR* - 378c inhibitor group, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

表3 各组细胞血管内皮生长因子 A (VEGFA)、血小板反应蛋白-1 (THBS1) 的 mRNA 相对表达水平和相对荧光强度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of relative mRNA levels and fluorescence intensity of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and thrombospondin-1 (THBS1) in cells of each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	VEGFA mRNA	THBS1 mRNA	VEGFA relative fluorescence intensity	THBS1 relative fluorescence intensity
Control	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.09
Cepharanthine	0.56 $\pm$ 0.10 ***	3.43 $\pm$ 0.57 ***	0.37 $\pm$ 0.05 ***	3.71 $\pm$ 0.62 ***
Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor	0.84 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta\Delta$	2.04 $\pm$ 0.36 $\Delta\Delta\Delta$	0.76 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	1.88 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta\Delta$
miR-378c inhibitor combined with si-GOLT1A	0.69 $\pm$ 0.10 Δ	3.10 $\pm$ 0.52 $\Delta\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta\Delta$	2.55 $\pm$ 0.37 $\Delta\Delta$

Dose and n refer to tablet 1; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with Cepharanthine group, $\Delta P < 0.001$; Compared with Cepharanthine combined with miR-378c inhibitor group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

6 千金藤素通过 miR-378c/GOLT1A 轴对 MDA-MB-231 细胞血管生成相关标志物水平的影响

qRT-PCR 结果显示:千金藤素组与对照组相比,细胞中 VEGFA mRNA 相对表达水平显著降低,THBS1 mRNA 相对表达水平显著升高(均 $P < 0.001$),千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组与千金藤素组相比,细胞中 VEGFA mRNA 相对表达水平显著升高,THBS1 mRNA 相对表达水平显著降低(均 $P < 0.001$),miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组与千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组相比,细胞中 VEGFA mRNA 相对表达水平显著降低($P < 0.05$),THBS1 mRNA 相对表达水平显著升高($P < 0.001$)。

免疫荧光结果显示:千金藤素组与对照组相比,细胞中 VEGFA 的表达显著降低,THBS1 的表达显著升高(均 $P < 0.001$),千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组与千金藤素组相比,细胞中 VEGFA 的表达显著升高,THBS1 的表达显著降低(均 $P < 0.001$),miR-378c inhibitor 联合 si-GOLT1A 组与千金藤素联合 miR-378c inhibitor 组相比,细胞中 VEGFA 的表达显著降低($P < 0.001$),THBS1 的表达显著升高($P < 0.01$),见表 3。

讨 论

乳腺癌早期症状缺乏典型性,主要表现为皮肤异常、乳房肿块及乳头溢液等,多数患者确诊时已为中晚期,此阶段接受治疗的患者预后不佳。因此,有必要深入探索其发病机制并开发新型治疗药物,以期改善乳腺癌患者的预后状况。千金藤素是一种天然活性生物碱,展示出显著抗炎、抗氧化及抗癌等效果,近年来其抗癌特征备受关注,可能的作用机制包括诱导癌细胞自噬、抑制癌细胞增殖和迁移及逆转化疗耐药等^[8]。张岩昊等^[9]研究发现,千金藤素能够增加乳腺

癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-468 对多柔比星的敏感性,诱导癌细胞内大量活性氧的产生、线粒体自噬体的堆积,导致线粒体受损,进而诱导细胞凋亡。本研究发现,不同浓度的千金藤素处理后,MDA-MB-231 细胞存活明显被抑制,这表明,千金藤素可能成为乳腺癌治疗的新型药物,具体作用机制需进一步阐明。

研究显示,miRNA 能够与靶 mRNA 结合而诱导其降解或抑制其翻译过程,进而调控癌细胞增殖、转移等生物学行为^[10]。miR-378c 在多种癌症中存在异常表达,能够发挥肿瘤抑制因子或肿瘤启动因子的作用。刘平等^[11]研究发现,miR-378c 在宫颈癌组织中表达升高,过表达 miR-378c 可通过靶向伪足富非典型激酶 1 表达来促进癌细胞迁移、愈合。而 YU 等^[12]研究发现,过表达 miR-378c 可通过负调控钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2 表达,进而抑制肾母细胞瘤细胞转移。研究表明,高尔基体相关蛋白对于调控癌症进展具有重要意义^[13-14]。柯淑红等^[15]研究发现,GOLT1A 在甲状腺癌组织和细胞中表达上调,可促进癌细胞的增殖、迁移以及上皮-间充质转化过程。另有研究表明,GOLT1A 在乳腺癌组织中表达上调,低表达 GOLT1A 与乳腺癌患者生存率良好有关,miR-378a-3p 可以通过靶向调节 GOLT1A 表达来提高乳腺癌细胞 MCF-7 对他莫昔芬的敏感性^[16]。本研究发现,千金藤素能上调 miR-378c 表达,下调 GOLT1A 表达,并且 miR-378c 和 GOLT1A 存在结合位点,经过验证可知 miR-378c 可负向调控 GOLT1A 表达,猜测 miR-378c/GOLT1A 轴可能是千金藤素发挥抗癌作用的重要靶标。

研究显示,肿瘤细胞的一个重要特征是能量代谢重编程,这一过程涉及脂肪酸合成、谷氨酰胺代谢及糖酵解等多条代谢通路,以此来满足肿瘤细胞快速增殖的需求^[17]。其中,糖酵解是葡萄糖代谢的主要途

径,生成的丙酮酸在丙酮酸脱氢酶催化下,通过脱羧氧化转化为乙酰辅酶A,进入三羧酸循环生成大量ATP以供细胞能量需求^[18]。此外,血管生成可为肿瘤微环境提供所需营养物质和氧气,对肿瘤细胞的侵袭、生长等过程具有重要影响^[19-20]。VEGFA是促血管生成因子中最强的亚型,能够促进肿瘤生长^[21]。THBS1是一种细胞外基质蛋白,能够抑制血管生成及肿瘤的发生^[22]。本研究发现,经过千金藤素处理后,促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-9水平和THBS1 mRNA水平显著升高,抗凋亡蛋白Mcl-1、Bcl-2水平、谷氨酰胺浓度、乙酰辅酶A浓度、琥珀酸浓度、ATP生成量和VEGFA mRNA水平显著降低,同时miR-378c低表达后结果相反,而进一步低表达GOLT1A可逆转miR-378c低表达对乳腺癌细胞凋亡、能量代谢及血管生成的作用,猜测千金藤素可能通过miR-378c/GOLT1A轴来影响乳腺癌细胞凋亡、能量代谢及血管生成过程。

本研究提示:千金藤素能够促进乳腺癌细胞凋亡并抑制其能量代谢及血管生成,其机制可能与调控miR-378c/GOLT1A轴有关。

参考文献:

- [1] 潘小娟,史晓光,汪唐顺,等. 基于肉瘤基因信号通路探讨槲皮素对乳腺癌MCF-7细胞的作用机制[J]. 世界中医药,2023,18(20):2892—2898.
- [2] 潘岑,王庆兰,邓杨清,等. 千金藤素通过靶向GLUT1干扰葡萄糖摄取抑制非小细胞肺癌细胞增殖的研究[J]. 湖北中医药大学学报,2023,25(3):15—19.
- [3] 雷志鑫,杨海旖,谢浩,等. miRNA在乳腺癌中的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2024,43(5):149—156.
- [4] MA C, ZHANG W, WU Q, et al. Identification of a microRNA signature associated with survivability in cervical squamous cell carcinoma [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193625. 2018-03-07[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29513728/>.
- [5] ZI H, CHEN L, RUAN Q. Lidocaine represses the malignant behavior of lung carcinoma cells via the circ_PDZD8/miR-516b-5p/GOLT1A axis[J]. *Histol Histopathol*, 2022, 37(5):461—474.
- [6] 罗杰,杨玲,刘晓曦,等. LncRNA MALAT-1调控miR-125a-5p及其靶基因Rab25参与非小细胞肺癌EGFR-TKIs耐药机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2020,27(22):1782—1791.
- [7] 何能婷,秦燕萍,李昊,等. 裂果薯皂苷I通过干预谷氨酰胺代谢影响人肝癌BEL-7404细胞增殖的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(9):1232—1236.
- [8] 卢丹,张宏方,王媛媛. 千金藤素抗肿瘤与抗病毒药理作用的研究进展[J]. 广西医学,2023,45(4):465—468.
- [9] 张岩昊,胡金娇,高宁. 千金藤素增敏多柔比星抑制三阴性乳腺癌细胞增殖活性的机制研究[J]. 第三军医大学学报,2019,41(22):2229—2237.
- [10] DAOUD A Z, MULHOLLAND E J, COLE G, et al. MicroRNAs in pancreatic cancer: Biomarkers, prognostic, and therapeutic modulators[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1):1130.
- [11] 刘平,柯小平,马成斌,等. miR-378c对宫颈癌细胞增殖、迁移和愈合的影响及其机制[J]. 山西医科大学学报,2022,53(6):663—668.
- [12] YU Q, ZHENG B, JI X, et al. miR-378c suppresses Wilms tumor development via negatively regulating CAMKK2[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(6):739—747.
- [13] BAJAJ R, WARNER A N, FRADETTE J F, et al. Dance of the Golgi: Understanding Golgi dynamics in cancer metastasis [J]. *Cells*, 2022, 11(9):1484.
- [14] SPANO D, COLANZI A. Golgi complex: A signaling hub in cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(13):1990.
- [15] 柯淑红,徐朱俊,周杨,等. 高尔基运输1A蛋白促进甲状腺癌细胞的增殖和转移[J]. 中山大学学报(医学科学版),2024,45(1):69—75.
- [16] IKEDA K, HORIE-INOUE K, UENO T, et al. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5:13170. 2015-08-10[2024-10-22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26255816/>.
- [17] YANG K, WANG X, SONG C, et al. The role of lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment[J]. *Theranostics*, 2023, 13(6):1774—1808.
- [18] 刘珊,李璇,尹晓岚,等. 基于生物信息学的中药调控糖酵解用药规律探究及实验验证[J]. 世界中医药,2024,19(18):2762—2770.
- [19] LUGANO R, RAMACHANDRAN M, DIMBERG A. Tumor angiogenesis: Causes, consequences, challenges and opportunities[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(9):1745—1770.
- [20] 李辉,黄俊峰,周静,等. 促血管和血管拟态生成因子VEGFA、MMP-14在肺癌中的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报,2023,58(7):1171—1177.
- [21] 苏伟谦,刘泳琪,刘思颖,等. IL-23、VEGFA和TGF-β对小鼠肿瘤免疫微环境的影响[J]. 中国兽医科学,2025,55(2):263—271.
- [22] 张宏明,廖妍琪,连继勤,等. m6A甲基化修饰在前列腺癌中的研究进展[J]. 检验医学与临床,2024,21(18):2775—2779.

(收稿日期 2024-12-25)