雷公藤甲素脂质体对乳腺癌的抑制作用及其对 PI3K/Akt/Cyclin D1 信号通路的影响

高欣丽，王淑晓，王锡辉，王永杰*
（山东大学第二医院药品供应科，山东济南 250033）

摘要：该研究采用薄膜分散法制备了雷公藤甲素脂质体（**1**-Lips），表征了其理化性质；并采用乳腺癌荷瘤小鼠考察了其抑瘤效应及对磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B/ 细胞周期蛋白 D1（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinaseB/Cyclin D1，PI3K/Akt/Cyclin D1）信号通路的影响。结果表明，**1**-Lips 具有磷脂双分子层与类球形结构，平均粒径为（113.7±2.0）nm，ζ 电位为（－1.1±0.6）mV，**1** 平均包封率为（90.48±1.24）%。抗乳腺癌试验结果显示，**1**-Lips 能显著减小荷瘤小鼠肿瘤体积，破坏肿瘤组织结构，抑制肿瘤细胞增殖，促进凋亡，并抑制 PI3K、p-Akt、Cyclin D1、CDK4 蛋白表达，增加 p21 蛋白表达。该结果证明 **1**-Lips 能够增强 **1** 的抗肿瘤作用，且抗肿瘤作用机制可能与抑制 PI3K/Akt/Cyclin D1 信号通路有关。

关键词：雷公藤甲素；乳腺癌；脂质体；增殖；细胞周期；PI3K/Akt/Cyclin D1 信号通路
中图分类号：R283.6；R285.5；R979.1+9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)05-0704-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.05.015

Inhibition of Triptolide Liposomes on Breast Cancer and Its Effect on PI3K/Akt/Cyclin D1 Signaling Pathway

GAO Xinli, WANG Shuxiao, WANG Xihui, WANG Yongjie*
(*Dept. of Pharmacy, Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033*)

ABSTRACT: Triptolide liposomes (**1**-Lips) were prepared by thin film dispersion method, and their physicochemical properties were characterized. The tumor inhibition and the effect of **1**-Lips on phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B/Cyclin D1 (PI3K/Akt/Cyclin D1) signaling pathway were investigated with breast cancer-bearing mice. The results showed that **1**-Lips had a phospholipid bilayer and a spherical structure with the average particle size of (113.7±2.0) nm, the ζ potential of (－1.1±0.6) mV, and the average encapsulation rate of (90.48±1.24) %. The results of anti-breast cancer effect showed that **1**-Lips could significantly reduce the tumor volume, destroy the tissue structure, inhibit the tumor cell proliferation, promote apoptosis, inhibit the expressions of PI3K, p-Akt, Cyclin D1, CDK4, and increase the expression of p21 protein. This demonstrated that **1**-Lips could enhance the antitumor effect of **1** and that the antitumor mechanism might be related to the inhibition of the PI3K/Akt/Cyclin D1 signaling pathway.

Key Words: triptolide; breast cancer; liposome; proliferation; cell cycle; PI3K/Akt/Cyclin D1 signaling pathway

乳腺癌是一种发病率较高的妇科恶性肿瘤，且患者呈年轻化趋势，恶性程度较高，5 年生存率仅为20%。目前临床上的主要治疗策略包括手术、化疗、放疗和靶向治疗等。其中，化疗可显著降低肿瘤复发，延长患者的生存期[1]。然而，在临床实践中，化疗因特异性差、毒性大等因素而受到限制[2]。因此，迫切需要寻求更安全的治疗策略来提高乳腺癌患者的生存时间和生活质量。近年来，利用中药延缓肿瘤进展受到了极大关注。中药具有多途径、多靶点

收稿日期：2023-10-07
基金项目：国家自然科学基金青年项目（82104503）
作者简介：高欣丽（1992—），女，硕士，药师，从事药理毒理学的研究。
通信作者：王永杰（1986—），男，博士，副主任药师，从事中药药理学的研究。
E-mail：jalaf64@126.com

抗肿瘤的作用，可延长肿瘤患者生存期，且不良反应小，可显著改善患者生活质量，逐渐成为该领域研究热点[3]。

雷公藤甲素（triptolide，**1**）是中药雷公藤的主要活性成分之一，属于环氧二萜内酯类化合物。现代药理学研究表明**1**具有抗肿瘤、抗炎及抗氧化等多种生物活性[4]。据文献[4—5]报道，**1**对多种不同类型的恶性肿瘤均具有抑制作用，包括乳腺癌、肝细胞癌、前列腺癌、膀胱癌和胰腺癌等。然而，**1**也具有一定的毒性，在抑制肿瘤细胞增殖、侵袭与转移的同时也会对生殖系统、消化系统、泌尿系统、血液循环系统等产生毒性，严重制约了其应用[4,6]。脂质体作为被广泛研究的纳米药物载体，在肿瘤精准治疗中具有重要的应用前景，具有改善药物生物利用度、延长循环时间、增强靶向能力等优势[7]。将**1**包载于脂质体的脂质空腔中是减轻毒性的有效手段。

磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）通路是一条与肿瘤细胞增殖、凋亡密切相关的分子转导途径，在乳腺癌、肝细胞癌等多种恶性肿瘤中高度活化，并靶向下游细胞周期关键蛋白D1（Cyclin D1），诱使肿瘤细胞异常增殖，从而促进肿瘤进展[8]。**1**可能通过影响PI3K/Akt/Cyclin D1信号通路而产生肿瘤抑制作用。因此，本研究首先借助纳米药物载体技术构建**1**脂质体（**1**-Lips），并从PI3K/Akt/Cyclin D1信号通路的角度探讨其抑制乳腺癌进展的分子机制。

1 仪器与试药

1260型HPLC仪（美国安捷伦公司）；JEM-1400型透射电镜（日本Tokyo公司）；RE-5210AA型旋转蒸发器（上海亚荣生化仪器厂）；JY92-IIDN型超声波细胞破碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Ti-S型倒置荧光显微镜（日本尼康公司）；Litesize DLS型纳米粒度及ζ电位分析仪（奥地利安东帕公司）；RM2235型石蜡切片机（德国Leica公司）；E-Gel型凝胶成像仪、Multiskan FC系列酶标仪（美国Thermo Fisher公司）；小型垂直电泳仪、转膜仪（美国Bio-Rad公司）。

1（成都普菲德生物技术有限公司，纯度≥98%，批号21030410）；大豆卵磷脂（批号20210329）、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇$_{2000}$（DSPE-PEG$_{2000}$，批号20220119）均购自西安瑞禧生物科技有限公司；葡聚糖G50凝胶、细胞组织快速裂解液（RIPA裂解液）均购自北京索莱宝生物科技有限公司；胆固醇（批号MB6750-Mar-129）、HE染色试剂盒、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒均购自大连美仑生物技术有限公司；Ki67、PI3K、Akt、p-Akt、CDK4、p21及GAPDH抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司；Cyclin D1（英国Abcam公司，批号1043287-21）；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记二抗（武汉博士德生物工程有限公司，批号BST15D03A18K08）；Cy3标记二抗（美国Jackson公司，批号00058005）；增强型化学发光（ECL）液（批号20230228-1）、BCA蛋白定量/浓度测定试剂盒（批号20230302-1）均购自大连德硕生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

人乳腺癌细胞（MCF-7细胞）购于赛百慷（上海）生物技术股份有限公司，于37 ℃，含5% CO_2的培养箱中培养。

32只SPF级雌性BALB/c裸鼠（体质量15～20 g）购于辽宁长生生物科技有限公司，动物许可证号：SCXK（辽）2021-0001。裸鼠单笼饲养，适应性饲养1周后用于试验。本研究依托山东大学第二医院动物中心完成，并且动物试验均经过山东大学第二医院科研伦理委员会［KYLL-2021（KJ）A-0264］批准。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备与表征

采用文献[2]报道的薄膜分散法制备**1**-Lips。称取大豆卵磷脂22 mg、胆固醇4 mg、**1**1 mg、DSPE-PEG$_{2000}$ 2 mg，置50 mL圆底烧瓶中，加入甲醇超声溶解，连接旋转蒸发仪，蒸干溶剂，于烧瓶底部可见一层薄膜；加入pH 7.4的PBS 5 mL，500 W超声处理5 min。转移至5 mL离心管中，利用超声波细胞破碎机，超声（450 W，超声10 s，间隔10 s）10 min，经0.22 μm微孔滤膜过滤2次，即得**1**-Lips。根据上述同样方法，不加入**1**，即得Blank-Lips。

利用透射电镜观察Blank-Lips、**1**-Lips的微观形态。分别取Blank-Lips、**1**-Lips各1 mL，稀释至合适浓度，滴至电镜铜网上，用2%磷钨酸染色，晾干，设置加速电压为120 kV，观察其形态并拍照。结果

如图 1 所示，Blank-Lips 与 **1**-Lips 均为类球形结构，可观察到较为清晰的磷脂双分子层结构。

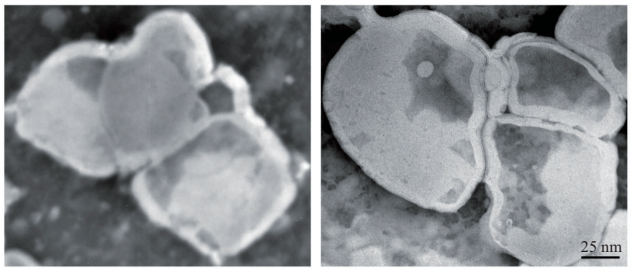


图 1　Blank-Lips（A）**和 1-Lips**（B）**的透射电镜图**（×1 000）

Fig.1　Transmission Electron Microscopy Images of Blank-Lips（A）and **1**-Lips（B）（×1 000）

分别取 **1**-Lips、Blank-Lips 各 1 mL，加入 2 倍量蒸馏水稀释，利用纳米粒度及 ζ 电位分析仪测定粒径与电位，每种脂质体平行测量 3 次。结果表明，Blank-Lips 与 **1**-Lips 的平均粒径分别为（108.3±1.4）和（113.7±2.0）nm，ζ 电位分别为（－1.0±0.7）和（－1.1±0.6）mV。

2.2　脂质体包封率的测定

采用葡聚糖凝胶柱（柱高 10 cm，直径 1.4 cm）法测定 **1**-Lips 的包封率 [9]。取 **1**-Lips 500 μL 上样，用 PBS 洗脱，收集 **1**-Lips 流出液，定容至 5 mL。另精密吸取上述流出液 500 μL，加入等体积甲醇破乳，通过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，待测。另取 **1**-Lips 500 μL，定容至 5 mL，取 500 μL，加入等体积甲醇破乳，通过 0.45 μm 的微孔滤膜滤过，待测。利用 HPLC 法测定，并按式①计算 **1**-Lips 包封率。

$$包封率（\%）=A_a/A_b \quad ①$$

式中：A_a 代表过柱后 **1** 峰面积，A_b 代表过柱前 **1** 峰面积。

HPLC 色谱条件 [9]：色谱柱 Aglient C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 甲醇和 0.1％磷酸溶液（体积比 45 ∶ 55）；检测波长 215 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。典型 HPLC 色谱图如图 2 所示。

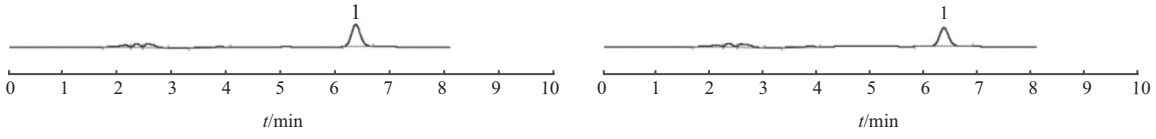
测得 **1**-Lips 中 **1** 的平均包封率为（90.48±1.24）％（n=3），符合 ChP 2020 年版的规定。

2.3　荷瘤裸鼠模型的建立、分组及干预

取对数生长期的 MCF-7 细胞，调整细胞密度为每 1 mL 含 5×10^7 个细胞的悬液，取 200 μL 接种于 BALB/c 裸鼠的右侧前肢腋窝。观察裸鼠肿瘤生长情况，记录肿瘤体积。待肿瘤体积长到约 100 mm^3 时，将其随机分为 4 组，每组 8 只，分别尾静脉注射生理盐水、Blank-Lips、**1**（溶剂为含 5％ DMSO 的 PBS 溶液）、**1**-Lips，每 2 日注射 1 次（给药制剂中 **1** 的质量浓度均为 0.2 mg/mL），共注射 7 次，**1** 剂量为 400 μg/kg（根据小鼠体质量与给药剂量计算注射体积，为 40 ～ 50 μL），作为空白处理组、空白脂质体处理组、**1** 治疗组、**1**-Lips 脂质体治疗组。末次注射后，测量肿瘤体积，按式②计算抑瘤率。

$$抑瘤率=（空白组平均体积－试验组平均体积）/空白组平均体积\times100\% \quad ②$$

各组制剂对 MCF-7 荷瘤裸鼠肿瘤体积的影响及其抑瘤率的结果如图 3 所示。与空白处理组相比，空白脂质体处理组裸鼠的肿瘤体积差异不具有统计学意义（P>0.05），而 **1** 治疗组、**1**-Lips 治疗组的裸鼠肿瘤体积均显著减小（P<0.05，P<0.01）。并且，**1**-Lips 治疗组裸鼠的肿瘤体积减小更为显著。抑瘤率计算结果也显示，**1**-Lips 治疗组的抑瘤率与 **1** 治疗组相比，差异具有统计学意义（P<0.05）。以上结

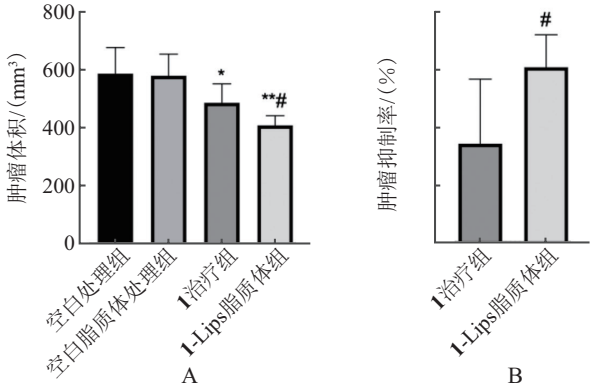


A—**1**-Lips 通过凝胶柱前的 HPLC 色谱图；B—**1**-Lips 通过凝胶柱后的 HPLC 色谱图。1—**1**。

图 2　1-Lips 的代表性 HPLC 谱图

Fig.2　Representative HPLC Chromatograms of **1**-Lips

果说明，**1**-Lips 抑制肿瘤体积增长的能力比 **1** 更强。



A—各组小鼠给药后的肿瘤体积（n=8）；B—**1** 和 **1**-Lips 治疗组的抑瘤率（n=8）。

图 3　1 和 1-Lips 对裸鼠肿瘤体积的影响（与空白组相比，*P<0.05, **P<0.01；与 **1** 组相比，$^{\#}P$<0.05）

Fig.3　Effects of **1** and **1**-Lips on Tumor Volume in Nude Mice (Compared with Blank Group, *P<0.05, **P<0.01; Compared with **1** Group, $^{\#}P$<0.05)

2.4　HE 染色结果

取“**2.3**”项下各组裸鼠，腹腔注射 7% 水合氯醛处死，剥离肿瘤组织，制备石蜡切片，HE 染色后采用倒置显微镜观察各组裸鼠肿瘤组织的病理变化。

结果如图 4 所示，空白处理组与空白脂质体处理组裸鼠肿瘤组织中可见大量多核异常增殖细胞，细胞排列紧密，形态完整；**1**、**1**-Lips 治疗组裸鼠肿瘤细胞排列疏松，异常增殖细胞数量减少，细胞核皱缩，存在不同数量的坏死、凋亡细胞。上述结果说明，**1**、**1**-Lips 的干预能够破坏肿瘤组织结构，且 **1**-Lips 对肿瘤组织的破坏和杀伤能力更强。

2.5　TUNEL 染色结果

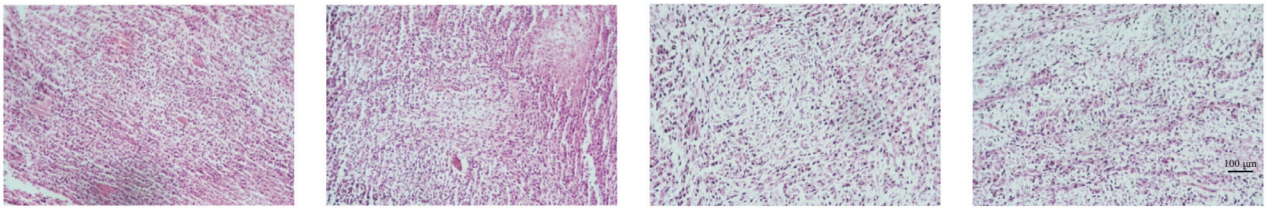
取肿瘤石蜡切片，脱蜡、水化，加入 proteinase K 工作液 100 μL，于 37 ℃孵育 30 min；加入末端转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT）反应液 50 μL，于 37 ℃避光孵育 60 min；加入异硫氰基荧光标记链霉亲和素标记液 50 μL，于 37 ℃避光孵育 30 min；用 DAPI 染色液对细胞核染色 10 min，封片，采用荧光倒置显微镜观察细胞凋亡情况。

TUNEL 染色结果如图 5 所示，空白处理组与空白脂质体处理组的肿瘤细胞几乎不可见凋亡细胞（TUNEL 阳性细胞），两组 TUNEL 阳性细胞数量不具有统计学意义（P>0.05）。而 **1**、**1**-Lips 干预后，肿瘤组织中 TUNEL 阳性细胞数量显著增加，与空白处理组相比，差异具有统计学意义（P<0.05，P<0.01），说明 **1**、**1**-Lips 干预可促进肿瘤细胞凋亡，且 **1**-Lips 促进肿瘤细胞凋亡的能力强于 **1**（P<0.05）。

2.6　免疫荧光染色结果

取上述肿瘤石蜡切片，脱蜡、水化后，浸于 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液中，微波炉加热至沸腾，保持 15 min 进行抗原修复；然后置质量分数为 3% 的过氧化氢溶液中，孵育 5 min，消除内源性过氧化物酶；再用 5% 的牛血清白蛋白溶液封闭 1 h。组织上滴加 Ki67 一抗稀释液（1 ∶ 300 稀释）50 μL，于 4 ℃孵育过夜；次日，滴加 Cy3 标记的二抗稀释液（1 ∶ 300 稀释）50 μL，于室温、避光孵育 1 h；用 DAPI 染色液对细胞核染色 10 min；用水性封片剂封片。采用倒置荧光显微镜观察各组裸鼠肿瘤组织 Ki67 阳性表达。

Ki67 染色结果如图 6 所示。空白处理组与空白脂质体处理组的肿瘤组织中可见大量 Ki67 阳性细

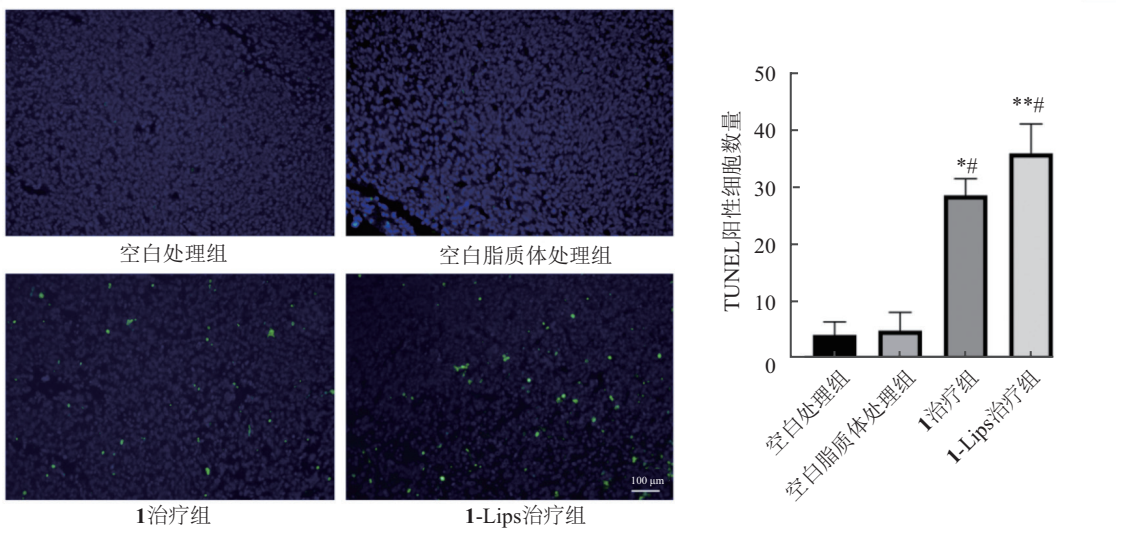


空白处理组　空白脂质体处理组　**1**治疗组　**1**-Lips治疗组

图 4　1 和 1-Lips 对裸鼠肿瘤细胞形态的影响

Fig.4　Effects of **1** and **1**-Lips on Tumor Cell Morphology in Nude Mice

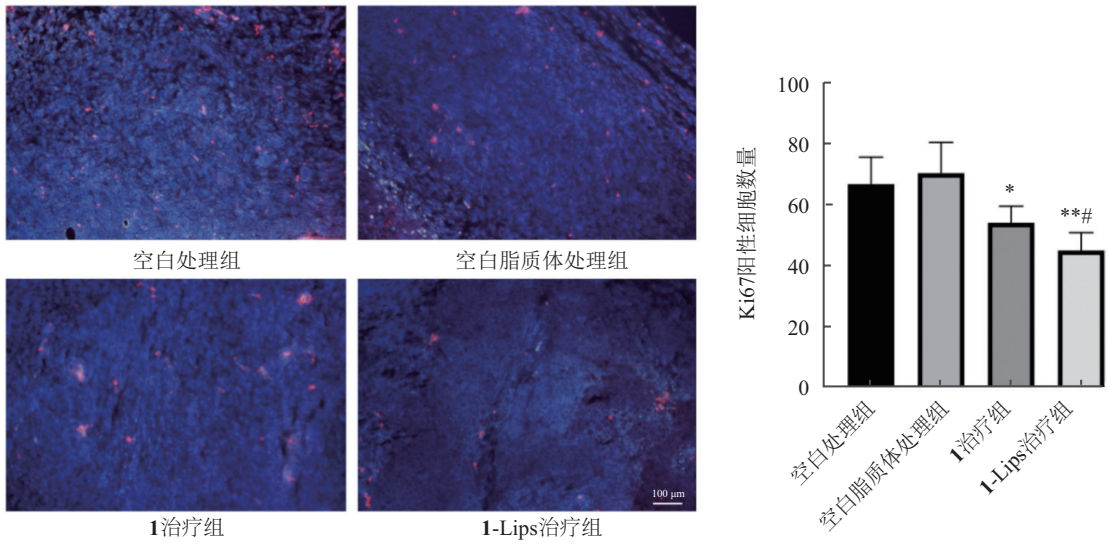
胞，说明肿瘤细胞增殖能力强；空白处理组与空白脂质体处理组的 Ki67 阳性细胞数量不具有统计学差异（*P*>0.05）。而 **1**、**1**-Lips 干预后，肿瘤组织中的 Ki67 阳性细胞数量显著降低，与空白处理组相比，差异具有统计学意义（*P*<0.05，*P*<0.01）。上述结果说明，**1**、**1**-Lips 干预能够抑制肿瘤细胞增殖，且 **1**-Lips



A—TUNEL 染色代表性图片；B—TUNEL 阳性细胞数量统计分析（*n*=8）。

图 5　1 和 1-Lips 对肿瘤细胞凋亡的影响（与空白处理组相比，*P<0.05，**P<0.01；与 **1** 治疗组相比，$^{\#}P$<0.05）

Fig.5　Effects of 1 and **1**-Lips on Apoptosis in Tumor Cells (Compared with Blank Group, *P<0.05, **P<0.01; Compared with **1** Group, $^{\#}P$<0.05)



A—Ki67 染色代表性图片；B—Ki67 阳性细胞数量统计分析（*n*=8）。

图 6　1 和 1-Lips 对裸鼠肿瘤细胞增殖能力的影响（*n*=8；与空白组相比，*P<0.05，**P<0.01；与 **1** 组相比，$^{\#}P$<0.05）

Fig.6　Effects of **1** and **1**-Lips on Tumor Cell Proliferative Capacity in Nude Mice (*n*=8; Compared with Blank Group, *P<0.05, **P<0.01; Compared with **1** Group, $^{\#}P$<0.05)

抑制肿瘤细胞增殖的作用比 **1** 更为显著（P<0.05）。

2.7 蛋白质印记法

用 RIPA 裂解液提取各组裸鼠肿瘤组织总蛋白，经 BCA 蛋白定量 / 浓度测定试剂盒定量检测蛋白浓度，并调整至一致；加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，于 95 ～ 100 ℃加热，使蛋白变性；短暂离心，取上清也进行 SDS-PAGE 电泳（蛋白上样量为 30 μg）。随后进行湿法转膜，PI3K、Akt、p-Akt、CDK4、Cyclin D1、p21、GAPDH 一抗稀释液（1 ∶ 2 000）孵育抗体；次日孵育二抗稀释液（1 ∶ 1 000）。用增强型化学发光试剂显色后，采用凝胶成像分析系统成像并拍照，利用 Image J 1.8.0 软件分析蛋白条带的灰度值，并对目的条带与内参蛋白甘油醛 -3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）条带灰度值的比值进行统计分析。

各种制剂对 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响结果如图 7 所示。与空白处理组相比，**1** 治疗组、**1**-Lips 治疗组的肿瘤组织中 PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低，差异具有统计学意义（P<0.05）；与空白处理组相比，空白脂质体处理组的 PI3K、p-Akt 蛋白表达水平无显著变化（P>0.05）；各组 Akt 蛋白表达水平未见显著差异（P>0.05）。

各种制剂对细胞周期相关蛋白表达的影响结果如图 8 所示。与空白处理组相比，空白脂质体处理组的 Cyclin D1、CDK4、p21 蛋白表达水平不具有统计学意义（P>0.05）；而 **1** 治疗组、**1**-Lips 治疗组的肿瘤组织中 Cyclin D1、CDK4 蛋白的表达水平显著降低（P<0.05），并且 **1**-Lips 组肿瘤组织中 p21 蛋白表达水平显著增加（P<0.05）。

3 讨论

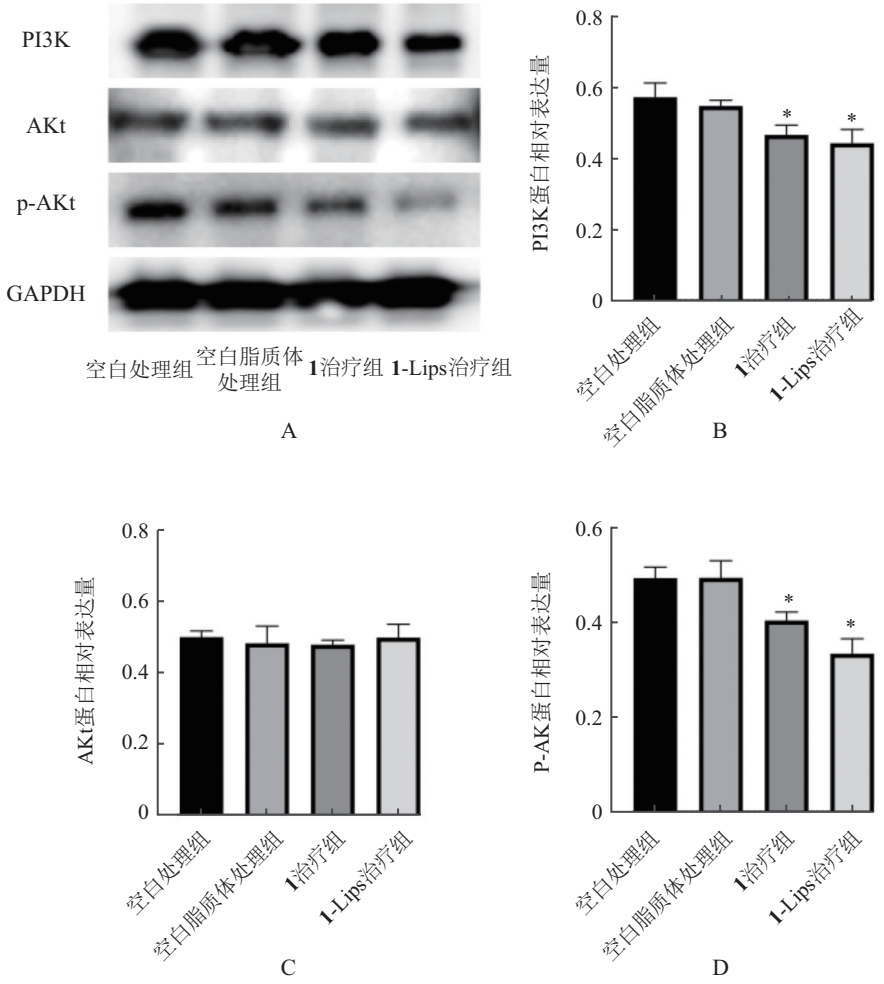
中药活性单体 **1** 含有 4 个异戊二烯单元。异戊二烯分子在生物合成过程中，会产生维生素 A 和维生素 E 的前体，可能是 **1** 具有抗肿瘤作用的原因之一[10]。有研究表明，**1** 能有效诱导乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌细胞凋亡，并抑制这些肿瘤细胞的迁移和侵袭[11]。**1** 也是单核细胞白血病和髓细胞白血病的有效化疗药物之一[12]。因此，**1** 有潜力成为治疗其他恶性肿瘤的药物。然而，**1** 在体内无选择性和靶向性，导致其在肝脏和肾脏积蓄，产生毒性；**1** 还能够抑制 cAMP/PKA 信号通路介导的雌激素合成酶表达，导致雌二醇合成减少和生殖功能障碍，且会增加乳腺癌发生的风险[13]。如何规避 **1** 在乳腺癌治疗过程中产生的不良反应是目前亟待解决的科学问题。

本研究采用薄膜分散法制备 **1**-Lips，并通过在脂质体表面修饰亲水性材料 DSPE-PEG2000 来实现被动靶向、减毒增效。有研究[2]表明，DSPE-PEG_{2000} 修饰于纳米载体表面后，能减少网状内皮系统（RES）的识别与摄取，降低磷脂双分子层与血浆蛋白结合率，从而延长药物半衰期，增加药物在肿瘤部位的积蓄，减少其他器官的非特异性积蓄，从而实现药物的被动靶向输送，进一步提高药物疗效并降低其潜在毒性。本研究结果显示，制备的 **1**-Lips 呈现类球形，形状规则、大小均一，磷脂双分子层明显，平均粒径为（113.7±2.0）nm。该尺寸的脂质体在实体肿瘤 EPR 的作用下，可实现药物的靶向递送[14]。**1**-Lips 的平均包封率也符合 ChP 2020 年版的要求。

乳腺癌异位肿瘤裸鼠模型试验结果表明，**1**、**1**-Lips 干预均能减小肿瘤体积，破坏肿瘤组织结构，抑制乳腺癌细胞增殖，促进乳腺癌细胞凋亡，且 **1**-Lips 的抗肿瘤效果更为显著；且空白脂质体未发挥任何的肿瘤抑制作用，排除了脂质体膜材对结果的影响。

PI3K/Akt 信号通路在维持乳腺癌细胞异常增殖与凋亡方面具有重要作用，是抑制乳腺癌进展的关键靶点[15—16]。基于 PI3K/Akt 信号通路对乳腺癌进展的积极作用，本研究推测 **1**-Lips 抑制乳腺癌细胞增殖、促进凋亡的分子机制与调控 PI3K/Akt 信号通路有关。蛋白质印记法结果显示，与空白处理组相比，裸鼠给予 **1**-Lips 后，PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低，表明 **1**-Lips 对乳腺癌细胞 PI3K/Akt 信号通路通路具有一定的抑制作用。

细胞周期的快速运转是乳腺癌细胞异常增殖的基础。在乳腺癌模型中，PI3K/Akt 信号通路活化，进而抑制 Cyclin D1 的降解，从而促进乳腺癌细胞增殖[17]。Cyclin D1 能促进细胞从 G_1 期迅速进入 S



A—蛋白印记法结果；B—PI3K 蛋白相对表达量统计分析（n=3）；C—Akt 蛋白相对表达量统计分析（n=3）；D—p-Akt 蛋白相对表达量统计分析（n=3）。

图 7　1 和 1-Lips 对 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响（与空白组相比，*P<0.05）

Fig.7　Effects of **1** and **1**-Lips on the Expression of Proteins Associated with the PI3K/Akt Pathway (Compared with Blank Group, *P<0.05)

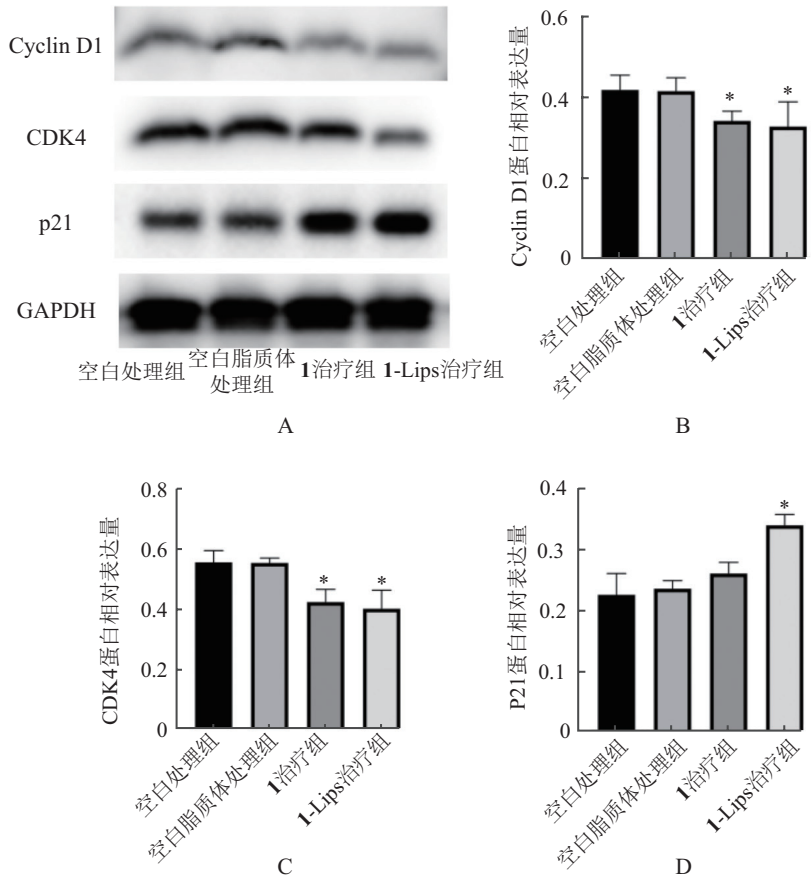
期，从而促进乳腺癌细胞增殖[18]。此外，抑癌基因 p21 可与 Cyclin D1、CDK4 结合，并抑制 Cyclin D1-CDK4 复合物的形成并降低其活性，使细胞周期停滞于 G_1 期，从而抑制乳腺癌细胞的异常增殖[19]。蛋白质印记法结果显示，**1**-Lips 处理后能显著降低裸鼠肿瘤组织中 Cyclin D1、CDK4 蛋白表达水平，并促进 p21 蛋白表达。

综上所述，说明 **1**-Lips 可通过调控 PI3K/Akt/Cyclin D1 信号通路，阻止细胞周期进入 S 期，从而抑制乳腺癌细胞增殖，并诱导其凋亡。但本研究仅利用动物模型对 **1**-Lips 的抗乳腺癌作用及分子机制进行了初步探讨，其具体的分子机制仍需要进一步验证。

参考文献：

[1] TRAYES K P, COKEBAKES S E H. Breast cancer treatment [J]. *Am Fam Physician*, 2021, **104**(2): 171-178.

[2] YAO X M, NIU F J, KONG L, *et al*. GGP modified daunorubicin plus dioscin liposomes inhibit breast cancer by suppressing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, **46**(6): 916-930.



A—蛋白印记法结果；B—Cyclin D1 蛋白相对表达量统计分析（n=3）；C—CDK4 蛋白相对表达量统计分析（n=3）；D—p21 蛋白相对表达量统计分析（n=3）。

图 8　1 和 1-Lips 对细胞周期相关蛋白表达的影响（与空白组相比，*P<0.05）

Fig.8　Effects of **1** and **1**-Lips on the Expression of Cell Cycle-related Proteins (Compared with blank group, *P<0.05)

[3] YANG L N, WU Z L, YANG Z J, *et al*. Exploring mechanism of key Chinese Herbal Medicine on breast cancer by data mining and network pharmacology methods [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, **27**(12): 919-926.

[4] JIANG W, CHEN M J, XIAO C C, *et al*. Triptolide suppresses growth of breast cancer by targeting HMGB1 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, **42**(6): 892-899.

[5] HOU Z Y, TONG X P, PENG Y B, *et al*. Broad targeting of triptolide to resistance and sensitization for cancer therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **104**: 771-780.

[6] WU B, LU S T, ZHANG L J, *et al*. Codelivery of doxorubicin and triptolide with reduction-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for *in vitro* and *in vivo* synergistic cancer treatment [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**: 1853-1862.

[7] FOROUHARI S, BEYGI Z, MANSOORI Z, *et al*. Liposomes: ideal drug delivery systems in breast cancer [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, **69**(5): 1867-1884.

[8] YUAN Y, FAN YL, GAO ZC, *et al*. SHP2 promotes proliferation of breast cancer cells through regulating cyclin D1 stability via the PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway [J]. *Cancer Biol Med*, 2020, **17**(3): 707-725.

[9] GUO R B, ZHANG X Y, YAN D K, *et al*. Folate-modified triptolide liposomes target activated macrophages for safe rheumatoid arthritis therapy [J]. *Biomater Sci*, 2022, **10**(2): 499-513.

[10] ZHENG W, WANG C, DING R H, *et al*. Triptolide-loaded nanoparticles targeting breast cancer *in vivo* with reduced toxicity [J]. *Int J Pharm*, 2019, **572**: 118721.

[11] NOEL P, VON HOFF D D, SALUJA A K, *et al*. Triptolide and its derivatives as cancer therapies [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2019, **40**(5): 327-341.

［12］ CHAN S F, CHEN Y Y, LIN J J, *et al*. Triptolide induced cell death through apoptosis and autophagy in murine leukemia WEHI-3 cells *in vitro* and promoting immune responses in WEHI-3 generated leukemia mice *in vivo*［J］. *Environ Toxicol*, 2017, **32**(2): 550-568.

［13］ ZHANG J, LIU L, MU X M, *et al*. Effect of triptolide on estradiol release from cultured rat granulosa cells［J］. *Endocr J*, 2012, **59**(6): 473-481.

［14］ CHEN Y Y, GUO M F, QU D, *et al*. Furin-responsive triterpenine-based liposomal complex enhances anticervical cancer therapy through size modulation［J］. *Drug Deliv*, 2020, **27**(1): 1608-1624.

［15］ 吴沁航, 鲍 刚, 朱丽文, 等. 蓝萼甲素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡［J］. 中国药理学通报, 2020, **36**(9): 1227-1232.

［16］ ALKAFAAS S S, LOUTFY S A, DIAB T, *et al*. Vasopressin induces apoptosis but does not enhance the antiproliferative effect of dynamin 2 or PI3K/Akt inhibition in luminal A breast cancer cells［J］. *Med Oncol*, 2022, **40**(1): 35.

［17］ 刘 兵, 马英创. 消癌解毒方提取物对乳腺癌细胞增殖活力、细胞周期蛋白、PI3K/AKT 通路的调节作用［J］. 中国处方药, 2021, **19**(7): 7-9.

［18］ LI S Q, LIN J W, WEI J F, *et al*. Sinigrin impedes the breast cancer cell growth through the inhibition of PI3K/AKT/mTOR phosphorylation-mediated cell cycle arrest［J］. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2022, **41**(3): 33-43.

［19］ PEEK G W, TOLLEFSBOL T O. Down-regulation of hTERT and cyclin D1 transcription via PI3K/Akt and TGF-β pathways in MCF-7 cancer cells with PX-866 and raloxifene［J］. *Exp Cell Res*, 2016, **344**(1): 95-102.

广告索引

封二：上海现代药物制剂工程研究中心有限公司
封三：鲁南厚普制药有限公司
封底：中国医药工业信息中心
603 页：公益广告