

黄花香茶菜甲素靶向 c-Myc/CIP2A 轴抑制三阴性乳腺癌生长及诱导凋亡的作用机制

盛淞然¹, 张旭¹, 张亮¹, 钱琛¹, 司渊^{1, 2, 3*}

- (1. 湖北医药学院 基础医学院, 湖北 十堰 442000;
2. 湖北医药学院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000;
3. 湖北医药学院 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 该文旨在探究黄花香茶菜甲素(STA)对三阴性乳腺癌(TNBC)的抑制作用及分子机制。选用MDA-MB-436、MDA-MB-468细胞作为模型。通过MTT法、实时无标记细胞分析技术(RTCA)和克隆形成实验检测不同浓度STA对TNBC细胞增殖能力的影响;JC-1染色和Annexin V-FITC/PI双染结合流式细胞术检测STA对TNBC细胞凋亡的影响。蛋白免疫印迹法检测STA对TNBC细胞相关凋亡蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)-9、caspase-3和聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)及蛋白磷酸酶2A癌性抑制因子(CIP2A)/蛋白激酶B(AKT)信号通路蛋白CIP2A、AKT、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)的表达变化。为明确CIP2A在STA作用中的功能,在细胞中过表达或敲减CIP2A质粒,结合STA处理,通过CCK-8、流式细胞术和Western blot评估细胞增殖、凋亡及相关蛋白的变化。进一步RT-qPCR和Western blot结果均显示STA显著下调CIP2A的mRNA及蛋白水平,STA亦下调c-骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(c-Myc)蛋白表达;过表达c-Myc可拮抗STA对CIP2A蛋白和mRNA水平的下调作用,而敲减c-Myc则增强此效应。靶点稳定性的药物亲和反应实验(DARTS)和微量热泳动实验(MST)证实STA与c-Myc蛋白存在直接结合。结果表明STA能显著抑制TNBC细胞增殖与克隆形成,并诱导细胞凋亡,表现为凋亡比例升高,caspase-9和caspase-3前体蛋白表达下调及PARP切割增加。STA处理降低p-AKT水平,但不影响总AKT。功能上,敲减CIP2A增强STA的抑增殖和促凋亡作用,而过表达CIP2A则产生拮抗效应。机制上,STA通过直接靶向结合c-Myc,下调其表达,进而抑制CIP2A转录与翻译,最终阻断c-Myc/CIP2A信号通路。综上所述,STA通过靶向c-Myc/CIP2A信号轴抑制TNBC恶性进展。

[关键词] 黄花香茶菜甲素; 三阴性乳腺癌; CIP2A; c-Myc; p-AKT; 凋亡

Sculponeatin A inhibits growth and induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by targeting c-Myc/CIP2A axis

SHENG Song-ran¹, ZHANG Xu¹, ZHANG Liang¹, QIAN Chen¹, SI Yuan^{1, 2, 3*}

- (1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
2. Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;
3. Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] This article aims to investigate the inhibitory effect and molecular mechanism of sculponeatin A (STA) on triple negative breast cancer (TNBC). MDA-MB-436 and MDA-MB-468 were selected as cell models. The MTT assay, real-time cell analysis (RTCA), and colony formation assay were used to evaluate the effects of different concentrations of STA on the proliferation of TNBC cells. JC-1 staining and Annexin V-FITC/PI double staining combined with flow cytometry were used to measure the effect of STA on

[收稿日期] 2025-08-21

[基金项目] 湖北省自然科学基金-中医药创新发展联合基金项目(2025AFD516);国家自然科学基金项目(82372681);大学生创新创业训练项目(X202410929066);湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T2024017);十堰市科技局引导性项目(25Y006)

[通信作者] * 司渊 副教授, 硕士生导师, E-mail: siyuan138@126.com

[作者简介] 盛淞然 本科生, E-mail: songran0320@163.com

the apoptosis of TNBC cells. Western blot was employed to determine the expression changes of apoptosis-related proteins [cysteine-specific proteinase (caspase)-9, caspase-3, and poly-ADP-ribose polymerase (PARP)] and cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A (CIP2A)/protein kinase B (AKT) signaling pathway proteins [CIP2A, AKT, phosphorylated (p)-AKT] in TNBC cells after STA treatment. To clarify the function of CIP2A in the action of STA, a CIP2A overexpression or CIP2A knockdown plasmid was transfected into cells, which were then treated with STA. Cell proliferation, apoptosis, and protein expression changes were evaluated by CCK-8, flow cytometry, and Western blot. Further, RT-qPCR and Western blot both showed that STA significantly downregulated the mRNA and protein levels of CIP2A and the protein level of c-Myc. The overexpression of c-Myc antagonized the downregulating effects of STA on the protein and mRNA levels of CIP2A, while the knockdown of c-Myc enhanced this effect. The drug affinity-responsive target stability (DARTS) assay and microscale thermophoresis (MST) assay confirmed the existence of direct binding between STA and c-Myc protein. The results indicated that STA significantly inhibited the proliferation and colony formation and induced the apoptosis of TNBC cells, manifested by an increased apoptosis rate, downregulated precursor protein expression of caspase-9 and caspase-3, and increased PARP cleavage. STA treatment reduced the p-AKT level but did not affect total AKT. Functionally, the knockdown of CIP2A enhanced the STA effects of inhibiting proliferation and inducing apoptosis, while the overexpression of CIP2A produced antagonistic effects. From a mechanism perspective, STA directly targets and binds to c-Myc to downregulate its expression, thereby inhibiting the transcription and translation of CIP2A and ultimately blocking the c-Myc/CIP2A signaling pathway. In conclusion, STA inhibits the malignant progression of TNBC by targeting the c-Myc/CIP2A signaling axis.

[Key words] sculponeatin A; triple negative breast cancer; CIP2A; c-Myc; p-AKT; apoptosis

DOI: 10.19540/j.cnki.cjmm.20251011.702

乳腺癌(BC)是女性最常见的恶性肿瘤。据2024年全球癌症统计,2022年全球乳腺癌新发病例和新增死亡病例分别占女性恶性肿瘤的23.8%、15.4%,严重威胁女性健康^[1]。其中,三阴性乳腺癌(TNBC)是一种缺乏雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体2表达的特定乳腺癌亚型,占所有乳腺癌病例的10%~15%^[2]。由于缺乏有效的分子靶点,TNBC的治疗选择相对有限且易产生耐药性。TNBC具有高度转移性与侵袭性,转移性患者的中位总生存期仅为18个月左右^[3-4]。因此,寻求新型有效的靶向治疗药物是目前亟需解决的问题。

蛋白磷酸酶2A(PP2A)已被证实是一种关键的抑癌蛋白。研究显示,在肺癌、皮肤癌、结肠癌、肝癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤中存在PP2A功能丧失的现象^[5-7]。PP2A作为丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,可通过直接去磷酸化调节多种致癌蛋白,如c-骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(c-Myc)、细胞外信号调节激酶(ERK)和蛋白激酶B(AKT)的活性^[5,8-10]。蛋白磷酸酶2A癌性抑制因子(CIP2A)是PP2A的内源性抑制剂。CIP2A可与PP2A结合并抑制其磷酸酶活性^[11]。有研究发现,在HER2阳性乳腺癌细胞中,CIP2A高表达可导致癌细胞通过CIP2A/AKT反馈环产生对他莫西芬的耐药性^[12]。葫芦素B可在多种肿瘤细胞中下调CIP2A及其下游信号分子磷酸化AKT(p-AKT)的表达,进而促进肿瘤细胞凋

亡^[13]。多项研究证实,CIP2A在多种肿瘤组织中高表达,可作为潜在的肿瘤诊断与预后生物标志物,并参与多种肿瘤耐药性的形成^[14-18]。因此,抑制CIP2A的表达可能有助于抑制癌细胞增殖并逆转其耐药性。

骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(Myc)是一种转录因子,其家族包括c-Myc、B-Myc、L-Myc、N-Myc和s-Myc^[19-20]。其中,c-Myc作为编码转录因子,参与细胞周期进程、增殖、细胞凋亡及细胞转化^[21-22]。其蛋白产物在周期细胞中持续表达。在许多人类恶性肿瘤中发现了结构正常或某些突变形式的c-Myc持续表达的水平甚至高于正常周期细胞的水平^[23]。这种不异常表达是多步骤致癌过程的重要环节。GAO F Y等^[24]研究证实c-Myc介导乳腺癌细胞与肿瘤微环境之间的串扰从而调控乳腺癌的恶性进展。GUARDUCCI C等^[25]研究发现c-Myc可通过调控JAK/STAT信号通路来影响TNBC细胞的增殖、侵袭和凋亡。因此,筛选靶向c-Myc的药物可能为TNBC的靶向治疗提供新策略。

黄花香茶菜属于唇形科香茶菜属,是一种具有理气利湿和清热解毒作用的草本植物。黄花香茶菜甲素(STA)是从该植物中分离得到的新型二萜类化合物^[26]。对金黄色葡萄球菌、弗氏志贺菌、枯草芽孢杆菌有较强的抑制作用^[27]。此外,STA对A549、HepG2、K562等多种肿瘤细胞系具有抗肿瘤作

用^[28]。然而,目前尚未有关于STA在乳腺癌中作用及其机制的研究报道。本研究旨在探讨STA对乳腺癌细胞的作用及其潜在机制,为寻找乳腺癌治疗的新型靶点提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞 MDA-MB-468细胞株、MDA-MB-436细胞株均购自美国ATCC公司。MDA-MB-468、MDA-MB-436细胞用含有10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素、100 μg·mL⁻¹链霉素的DMEM培养,置于37℃,5% CO₂的恒温培养箱中。

1.2 药物及试剂 STA购自云南西力生物科技有限公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解至50 mmol·L⁻¹,储存于-20℃冰箱,批号B20210;胎牛血清、DMEM培养基均购自美国HyClone公司,批号SH30396、SH30021;结晶紫、细胞裂解液、青霉素和链霉素的双抗生素溶液(100×)、PVDF膜、Lipo8000TM转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C0121、C0037、P0013、C0222、FFP26、C0533;MTT购自北京索莱宝科技有限公司,批号M1020-500T;聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase-9、caspase-3、caspase-3前体(pro-caspase-3)、caspase-9前体(pro-caspase-9)抗体均购自美国Cell Signal Technology公司,批号分别为9542、9662、9508; p-AKT、AKT、CIP2A抗体均购自美国Santa Cruz Biotechnology公司,批号分别为sc-7985、sc-8312、J1012; GAPDH购自英国Abmart公司,批号M20006; HRP-兔二抗、鼠二抗及羊二抗购自美国EarthOx公司,批号分别为E030120-01、E030110-01、E030130; XBT医用X射线胶片,购自锐珂(上海)医疗器材有限公司,批号053802711。

1.3 仪器 CO₂恒温培养箱购自美国赛默飞科技有限公司,型号i160;多功能酶标仪购自美国Molecular Devices公司,型号SpectraMax i3; RTCA系统购自美国xCELLigence公司,型号RTCADP;流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司,型号Cytotflex);荧光定量PCR仪购自美国Bio-Rad公司,型号CFX 96 TOUCH;电泳仪、转膜仪购自北京六一生物技术有限公司,型号DYY-6D;电泳槽购自美国Bio-Rad公司,型号Mini-PROTEAN Tetra。

2 方法

2.1 MTT实验 将MDA-MB-436(6×10³个/孔)、

MDA-MB-468(8×10³个/孔)细胞接种到96孔板,每组设置3个复孔,于37℃,5% CO₂培养箱培养24 h,再用浓度递增的STA(终浓度分别为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、130 nmol·L⁻¹)处理细胞24、48 h后,加入MTT(每孔10 μL)于96孔板,于37℃,5% CO₂培养箱培养4 h,吸出上清液,加入DMSO(每孔150 μL)于96孔板,使用全自动酶标仪读取490 nm处的吸光度(A),计算STA对细胞生长的抑制率,抑制率=[1-(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})]×100%。

2.2 实时无标记细胞分析技术(RTCA) 向E-Plate检测板中加入每孔50 μL DMEM培养基,测量基线1 min后,将MDA-MB-436(每150 μL 8×10³个)、MDA-MB-468(每150 μL 6×10³个)细胞分别铺于6孔板中,于37℃,5% CO₂培养箱中的检测台上培养24 h,然后按照浓度梯度加入STA(0、10、20、30、40、50 nmol·L⁻¹),每组设置2个复孔,实时监测记录STA处理60 h内的细胞生长状况,即可获得细胞增殖曲线。

2.3 克隆形成实验 将MDA-MB-436、MDA-MB-468细胞分别以500个/孔接种于6孔板中,于37℃,5% CO₂培养箱培养1周后,更换培养基,用增加浓度的STA(0、10、15、20 nmol·L⁻¹)处理细胞。1周后,4%多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色后计算克隆数,通过实验组与空白组克隆数的比值计算克隆形成率。

2.4 线粒体膜电位荧光探针染色(JC-1) 将MDA-MB-436、MDA-MB-468细胞(1.8×10⁵个/孔)接种于6孔板中,于37℃,5% CO₂培养箱中培养24 h,用STA(0、10、15、25、30 nmol·L⁻¹)处理细胞,于37℃,5% CO₂培养箱中的检测台上培养24 h,吸出培养基,加入PBS洗涤,每孔加入1 mL细胞培养基和1 mL JC-1染色工作液,将细胞均匀覆盖,37℃,5% CO₂的培养箱中孵育20 min,吸除上清液,用JC-1染色缓冲液洗2次,加入2 mL细胞培养液,荧光显微镜观察拍照分析。

2.5 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术 将MDA-MB-436、MDA-MB-468细胞(1.8×10⁵个/孔)接种于6孔板中,于37℃,5% CO₂培养箱中的检测台上培养24 h,用STA(0、10、15、25、30 nmol·L⁻¹)处理细胞,于37℃,5% CO₂培养箱培养24 h,吸出培养基并移至离心管内,加入PBS洗涤,用无EDTA

的胰酶消化细胞,离心 1 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 $5 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ 个重悬的细胞,离心 1 min,弃上清液,加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀。加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,流式细胞仪上机检测并分析结果。

2.6 蛋白免疫印迹实验 (Western blot) 将 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞 (1.8×10^5 个/孔) 接种于 6 孔板中,于 37°C 5% CO_2 培养箱中的检测台上培养 24 h,用 STA ($0, 10, 15, 25, 30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞,于 37°C 5% CO_2 培养箱培养 24 h,收集 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞,裂解细胞,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,加入对应体积的 $1 \times \text{SDS}$ loading buffer,混匀, 100°C 煮 10 min。SDS-PAGE 凝胶电泳分离,用 PVDF 膜转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4°C 冰箱摇床孵育过夜。用辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗室温孵育 2 h。ECL 试剂盒压片法显影检测蛋白的变化情况。

2.7 过表达 CIP2A 及 c-Myc OE-CIP2A 质粒及 HA-c-Myc 质粒均购自上海禾午生物科技有限公司。使用 Lipo8000™ 转染试剂将质粒转染 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞 6 h 后更换培养基培养 24 h,再用 STA ($0, 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h,收集细胞并进行后续实验。

2.8 敲减 CIP2A 及 c-Myc sh-CIP2A shRNA 及 si-c-Myc siRNA 均购自上海禾午生物科技有限公司。使用 Lipo2000 转染试剂将小分子 RNA 转染 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞 6 h 后更换培养基培养 24 h,再用 STA ($0, 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h,收集细胞并进行后续实验。

2.9 CCK-8 实验 将 MDA-MB-436、MDA-MB-468 (8×10^3 个/孔) 细胞接种到 96 孔板,于 37°C 5% CO_2 培养箱培养 24 h,设置对照组,将敲减/过表达 CIP2A 的质粒转染 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞 6 h 后更换培养基,STA ($0, 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理细胞 24 h,每组设置 3 个复孔。提前 2 h 加入 CCK-8 (每孔 10 μL) 于 96 孔板,使用全自动酶标仪读取 450 nm 处的吸光度,计算 STA 对细胞生长的抑制率,抑制率 = $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

2.10 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 将 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞用 STA ($0, 10, 15, 25, 30$

$\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h 后,TRIzol 法提取细胞总 RNA,检测总 RNA 浓度,使用 1st-STRAND cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,然后按照 SYBR-Green 试剂盒以 cDNA 为模板进行 qPCR。CIP2A 和 GAPDH 的 mRNA 水平通过 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 的方法进行标准化,每组设置 3 个复孔,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
CIP2A	F: GCGGCACTTGGAGGTAAT
	R: AGCACTTATCTTGGGGTCTTCA
GAPDH	F: GGTCTCTCTGACTTCAACA
	R: GTGAGGGTCTCTCTCTCTCT

2.11 微量热泳动实验 (MST) 用荧光标记的人源 c-Myc 纯化蛋白作为大分子配体,将 STA 作为小分子底物进行梯度稀释,将两者充分混合后室温下孵育。荧光分子的浓度保持不变,而结合物分子的浓度梯度增加。将样品填充到 MST 毛细吸管中,制造局部温度梯度,检测不同浓度的结合物分子对荧光分子热泳动平衡态分布的影响,获得这 2 个分子间相互作用的各种参数。通过互作仪检测解离常数 (K_d)、信噪比 (S/N)。

2.12 基于靶点稳定性的药物亲和反应实验 (DARTS) MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞生长至 80%~85% 后,加入裂解液于冰上裂解细胞 10 min 并收集细胞, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液。按照细胞 IC_{50} 的 5~10 倍加入 STA,混匀, 37°C 孵育 30 min。加入适当浓度的蛋白酶 37°C 孵育。最后,加入等体积的 SDS loading buffer 终止反应,高温裂解并提取总蛋白,Western blot 检测靶蛋白变化。

2.13 SwissADME 模拟预测 STA 的药代动力学参数 使用 SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) 预测 STA 的药代动力学性质,具体指标包括肠道吸收性、血脑屏障通透性、P-糖蛋白酶底物、细胞色素 (CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4) 抑制剂的作用、渗透系数和类药活性分析。

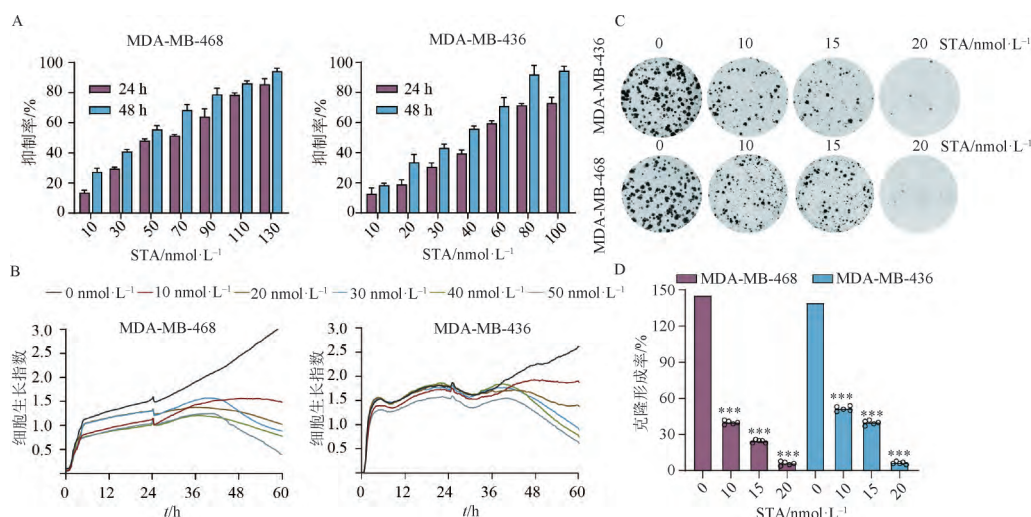
2.14 统计分析 实验结果用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 GraphPad Prism 8、SPSS 26.0、ImageJ 软件进行统计分析、作图。对非配对数据的 student's *t* 检验或单因素方差分析和 Bonferroni 检

验比较统计学上的相关性。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 STA 显著抑制 TNBC 细胞的增殖 通过 MTT 检测 STA 对 MDA-MB-231 和 MDA-MB-436 细胞增殖的影响,发现 STA 处理 24、48 h 后 2 种细胞的抑制率均显著增加,呈一定的剂量依赖性。STA 对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞 24 h 的 IC_{50} 分别为 48.96、54.11 $nmol \cdot L^{-1}$,见图 1A。采用 RTCA 系

统实时监测 STA 对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞生长的影响,结果显示细胞生长指数随药物浓度的增加呈下降趋势。与空白组 ($0 nmol \cdot L^{-1}$) 相比,STA 在 10 ~ 50 $nmol \cdot L^{-1}$ 时对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞的生长均有明显抑制作用,见图 1B。克隆形成实验结果显示,STA 显著抑制 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞的克隆形成能力,见图 1C、1D。总之,以上结果表明 STA 对 TNBC 细胞增殖具有显著的抑制作用。



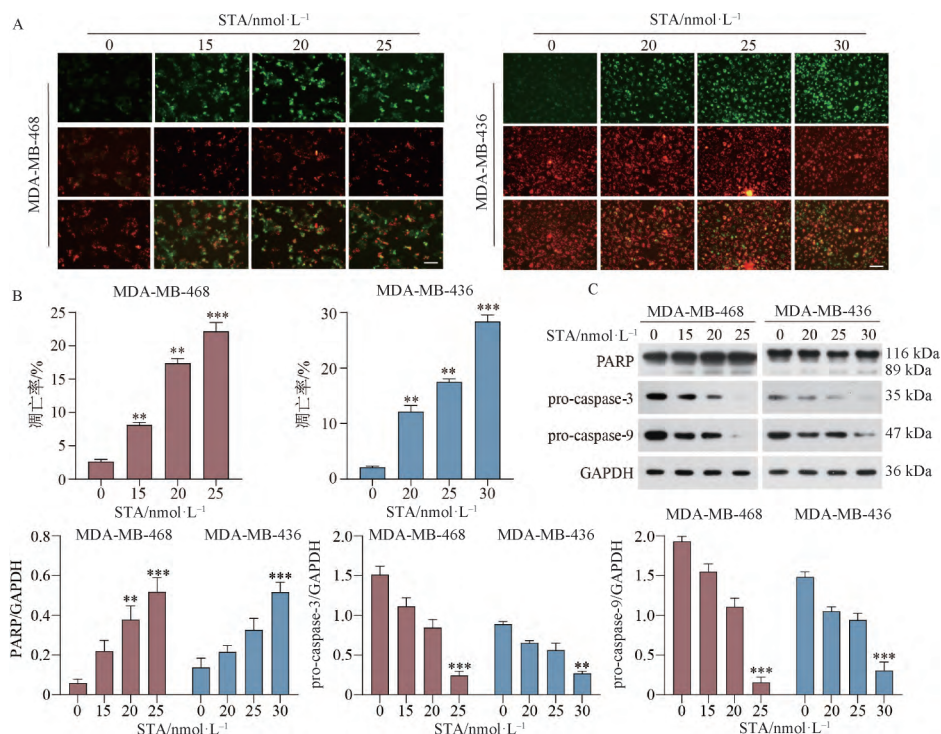
STA.黄花香茶菜(图 2~4 同)。A. MTT 法检测 STA 对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用; B. RTCA 监测 STA 对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞生长的影响; C、D. 平板克隆形成实验检测 STA 对 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞克隆形成能力的抑制作用。与空白组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图 2~4 同)。

图 1 黄花香茶菜甲素对三阴性乳腺癌细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$ $n = 5$)

Fig.1 Effect of sculponeatin A on the proliferation of triple-negative breast cancer cells ($\bar{x} \pm s$ $n = 5$)

3.2 STA 诱导 TNBC 细胞凋亡 为明确 STA 抑制细胞增殖的原因,本研究采用梯度浓度 STA 处理 MDA-MB-436 和 MDA-MB-468 细胞 24 h 后,通过 JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位。荧光显微镜下观察发现 STA 处理组绿色荧光增强、红色荧光减弱,提示线粒体膜电位降低,表明 STA 诱导细胞发生早期凋亡,见图 2A。进一步通过 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测细胞凋亡,结果显示 STA 促进细胞凋亡率的增加并呈一定的剂量依赖性,见图 2B 及中国知网本文增强出版附加材料。Western blot 检测凋亡相关蛋白表达,发现 STA 处理下调了 pro-caspase-3 和 pro-caspase-9 的表达,并增加了 PARP 的切割,见图 2C。以上结果证实 STA 能够诱导 TNBC 细胞的凋亡。

3.3 STA 通过下调 CIP2A 抑制 TNBC 细胞增殖并促进细胞凋亡 Western blot 检测结果显示,STA 处理可下调 CIP2A 及其下游信号分子 p-AKT 的表达水平,见图 3A。CCK-8 实验结果表明,敲减 CIP2A 可增强 STA 对细胞增殖的抑制作用,而过表达 CIP2A 则拮抗了 STA 的增殖抑制作用,见图 3B。Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测发现,敲减 CIP2A 可增强 STA 诱导的细胞凋亡,而过表达 CIP2A 则拮抗了 STA 的促凋亡作用,见图 3C 及中国知网本文增强出版附加材料。Western blot 分析进一步发现,敲减 CIP2A 增强了 STA 对 CIP2A 和 p-AKT 表达的抑制效果,同时,敲减 CIP2A 增强了 STA 对凋亡相关蛋白表达的促进作用,而过表达 CIP2A 则削弱上述作用,见图 3D~3G。上述结果表



A. STA 处理 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞 24 h 并用 JC-1 染色评估 $\Delta\psi_m$ 标尺 50 μm ; B. STA 处理 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞 24 h, Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测细胞凋亡; C. Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达水平。

图 2 黄花香茶菜甲素对三阴性乳腺癌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Fig.2 Effect of sculponeatin A on the apoptosis of triple-negative breast cancer cells ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

明 STA 可能通过下调 CIP2A 的表达水平,进而抑制 TNBC 细胞增殖并促进其凋亡。

3.4 STA 通过靶向 c-Myc 下调 CIP2A 表达水平

基于 c-Myc 与 CIP2A 之间的关系,通过 RT-qPCR 检测发现 STA 下调 CIP2A mRNA 表达,见图 4A。Western blot 证实 STA 下调转录因子 c-Myc 蛋白表达,见图 4B。敲减 c-Myc 促进 STA 对 CIP2A 的下调作用,而过表达 c-Myc 则拮抗此效应,见图 4C、4D。且敲减 c-Myc 下调 CIP2A mRNA、过表达 c-Myc 上调其表达,见图 4E。DARTS 表明 STA 阻遏 pro-nase 对 c-Myc 的水解,见图 4F。MST 证实 STA 与 c-Myc 强结合 ($S/N > 10$),见图 4G。综上表明 STA 通过靶向 c-Myc 下调 CIP2A 的表达。

3.5 SwissADME 模拟预测 STA 的药代动力学参数

基于 SwissADME 平台对黄花香茶菜甲素进行药代动力学参数预测,重点评估其人体肠道吸收性 (HIA)、血脑屏障通透性 (BBB) 及细胞色素 P450 酶 (CYP450) 相互作用以分析类药性,见中国知网本文增强出版附加材料。模拟结果显示,STA 具有良好的口服肠道溶解性,但中枢神经系统渗透性低 (BBB

通透性差),且为 P-糖蛋白 (P-gp) 底物。针对 5 种主要 CYP450 亚型 (CYP1A2、CYP2C19、CYP2C9、CYP2D6、CYP3A4) 的代谢评估表明,STA 非上述酶系的抑制剂或底物,提示其肝脏毒性风险低、药物蓄积中毒可能性小、药物-药物相互作用潜力低,且自身代谢稳定性高。综合类药性分析结果,STA 展现出良好的成药潜力。

4 讨论

随着中医药的发展,越来越多的中药活性成分被应用于中西医临床治疗及辅助化疗中^[29-30]。如姜黄素衍生物 WZ35 通过激活 ROS/YAP/JNK 信号通路,诱导线粒体功能障碍和细胞凋亡抑制乳腺癌细胞生长^[31]。诱导凋亡触发细胞死亡是多数抗癌药物的常见作用机制^[32]。高三尖杉酯碱通过调控 miR-18a-3p/AKT/mTOR 信号通路,下调 pro-caspase-3、pro-caspase-9 及 PARP 的表达水平,促进细胞凋亡抑制乳腺癌细胞增殖^[33]。本研究结果表明,STA 能够显著抑制 TNBC 细胞的恶性增殖,并激活 caspase-9 介导的凋亡通路,提示其可通过诱导 TNBC 细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。进一步阐明了 STA 作用于乳

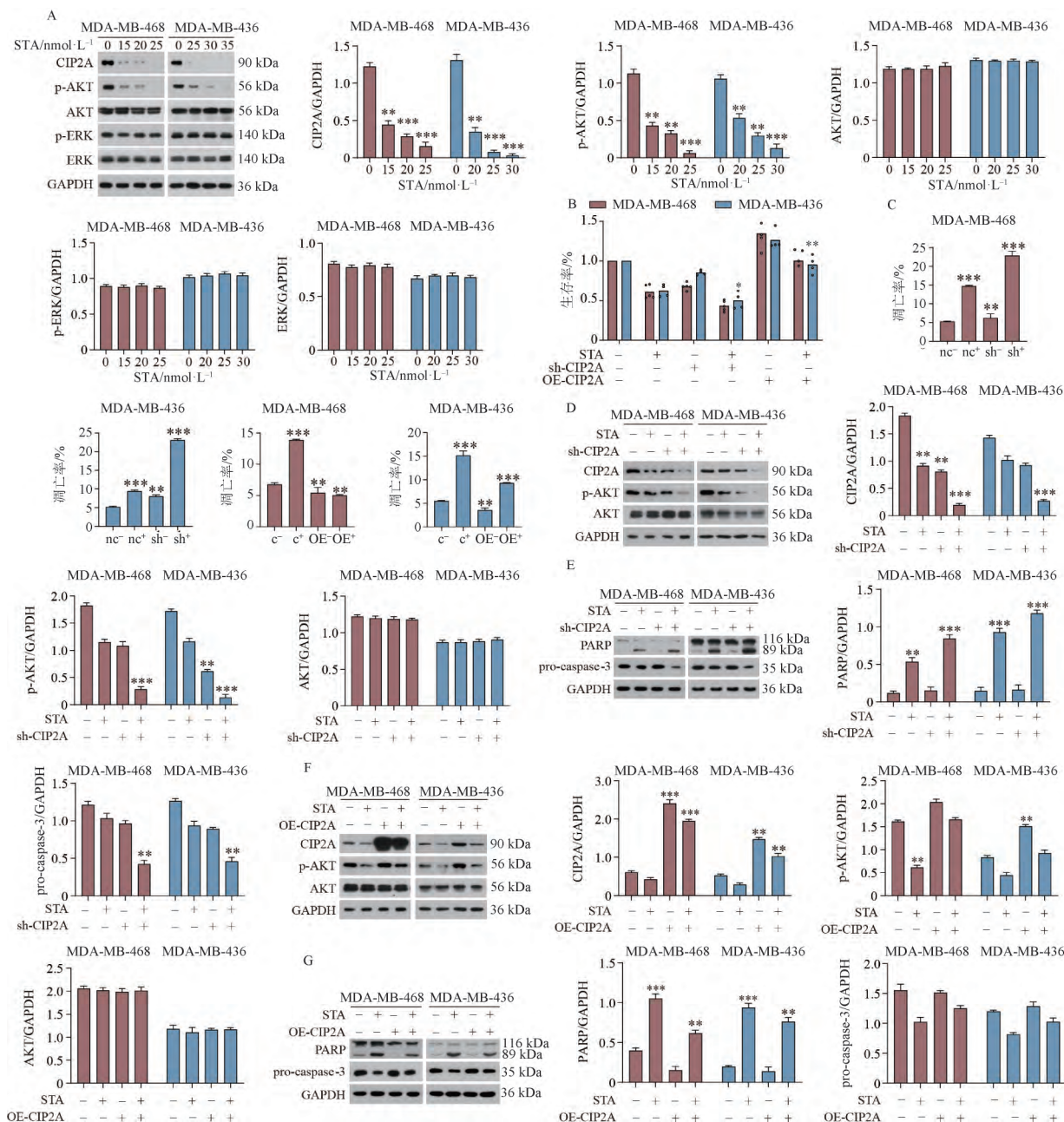


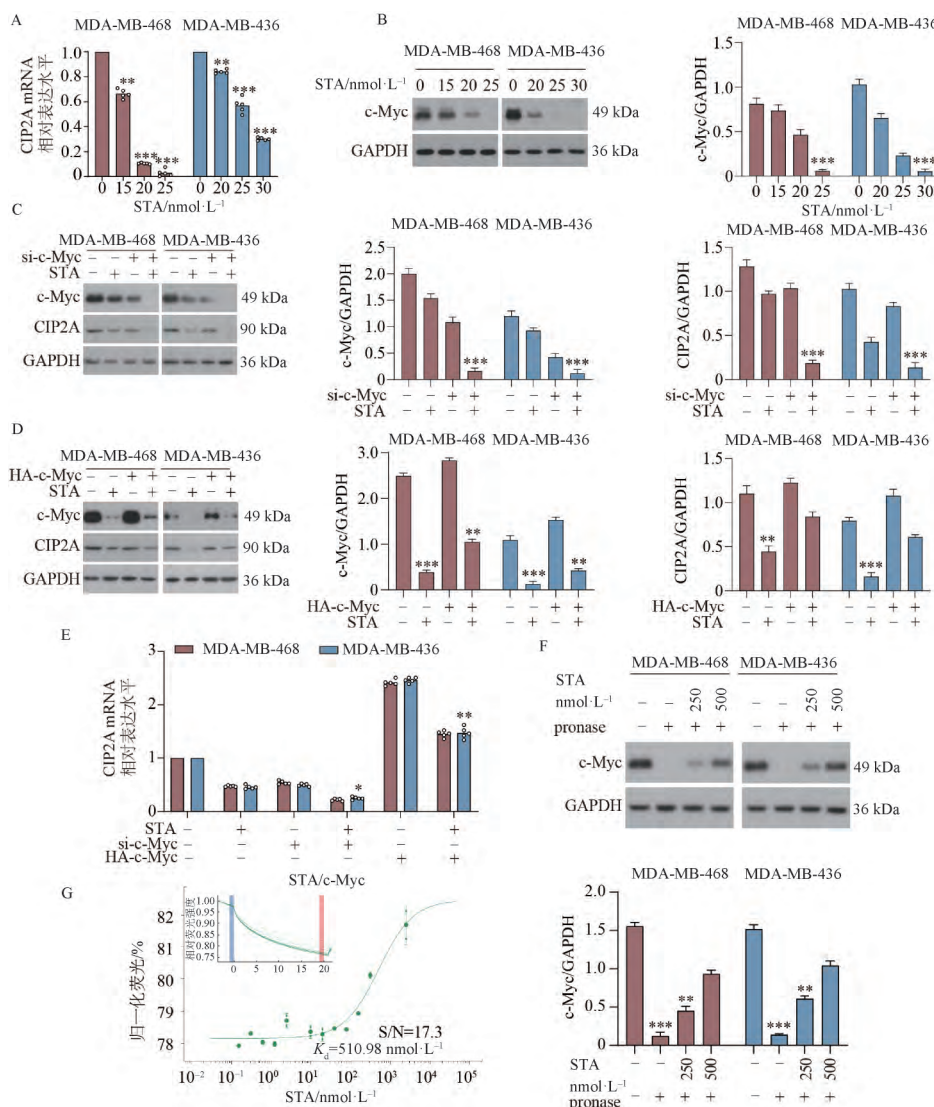
图 3 黄花香茶菜甲素下调 CIP2A 的表达对三阴性乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Fig.3 Effects of sculponeatin A on the proliferation and apoptosis of triple-negative breast cancer cells by downregulating the expression of CIP2A ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

腺癌细胞的具体分子机制,为乳腺癌的靶向治疗提供了理论依据。

CIP2A 是一种 90 kDa 的癌蛋白,最初被命名为

KIAA1524 或 p90,由位于人类染色体 3q13.13 的 KIAA1524 基因编码^[34]。该蛋白在恶性肿瘤中过表达,通过促进锚定非依赖性生长和体内肿瘤形成,与



A. RT-qPCR 检测 STA 对 CIP2A mRNA 表达水平的影响; B. Western blot 检测 STA 对 c-Myc 蛋白表达的影响; C、D、E. si-c-Myc 和 HA-c-Myc 质粒转染 MDA-MB-436、MDA-MB-468 细胞 6 h 后, STA 处理 24 h, Western blot 和 RT-qPCR 检测 c-Myc 的表达对 CIP2A mRNA 和蛋白水平的影响; F. 靶点稳定性的药物亲和反应实验检测 STA 与 c-Myc 的结合作用; G. 微量热泳动实验检测 STA 与 c-Myc 的直接结合作用。

图 4 黄花香茶菜甲素靶向 c-Myc 对 CIP2A 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Fig.4 Effect of sculponeatin A targeting c-Myc on the expression level of CIP2A ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

细胞恶性增殖密切相关^[35]。CÔME C 等^[36]证实, p90/CIP2A 的高表达与乳腺癌细胞的高增殖速率呈正相关,且在乳腺癌样本中观察到其表达与 p53 突变、高 Scarff-Bloom-Richardson 分级及 Ki-67 表达的正向关联。庞荣等^[37]发现异丙酚通过下调 CIP2A 并上调 PP2A 表达,有效抑制肝癌细胞 HepG2 的恶性进展。本研究结合药物处理与 CIP2A 基因干预(敲减/过表达)发现,敲减 CIP2A 可显著抑制 TNBC 细胞增殖、诱导凋亡并增强药物敏感性,而过表达 CIP2A 则促进细胞增殖、拮抗药物诱导的凋亡并降

低药物敏感性,进一步证实 CIP2A 在驱动 TNBC 增殖及化疗耐药中的重要作用。LIN Y 等^[38]研究指出, CIP2A 过表达通过上调 p-AKT 保护头颈部鳞状细胞癌免受硼替佐米诱导的凋亡,而沉默 PP2A 可消除硼替佐米对 AKT 的抑制及促凋亡作用,且动物异种移植模型证实硼替佐米能下调肿瘤细胞的 CIP2A 及 p-AKT 的表达。本研究发现, STA 可在转录与翻译水平显著抑制 TNBC 细胞中 CIP2A 及其下游 p-AKT 的表达。这表明 STA 可能通过抑制 CIP2A 重激活 PP2A,进而阻断 AKT 癌信号通路活

性,最终诱导 TNBC 细胞凋亡并抑制其恶性进展。然而,STA 介导的 TNBC 细胞凋亡是否依赖于 CIP2A/p-AKT 调控轴,仍需未来研究深入验证。

癌蛋白 c-Myc 是一种多效性转录因子,通过调控全局基因表达参与细胞增殖、分化、周期进程、代谢及凋亡等关键生物学过程^[39]。临床研究显示,在 CIP2A 高表达的肿瘤患者中,CIP2A 可直接与 c-Myc 相互作用,阻断 PP2A 对 c-Myc Ser62 位点(S62)的去磷酸化功能,从而稳定 c-Myc 蛋白^[40]。因此,抑制 c-Myc 可降低 CIP2A 表达、重激活 PP2A 并抑制细胞增殖,达到有效的抗肿瘤效果^[41]。本研究发现 STA 可显著下调 c-Myc 表达。过表达 c-Myc 能有效拮抗 STA 对 CIP2A 的抑制作用,而敲减 c-Myc 则增强该效应,表明 c-Myc 是 STA 抑制乳腺癌恶性进展的关键靶点。鉴于敲减/过表达 c-Myc 可显著调控 CIP2A 表达水平,进一步采用 DARTS 与 MST 验证 STA 与 c-Myc 的直接结合作用。上述结果证实 STA 能靶向 c-Myc,进而调控 CIP2A 表达。

SwissADME 是一种网络工具,可用于计算分子的关键物理化学、药物代谢动力学、类药性和相关参数,进而预测药物的药用价值。通过选取高质量的实验数据集对化合物的理化性质进行分析总结,并经过实验验证,SwissADME 具有良好的预测性能和实用性^[42]。SwissADME 模拟结果显示,STA 具有良好的肠道溶解性,具有潜在的类药活性。

综上,本研究发现 STA 可通过靶向 c-Myc 下调 CIP2A 及其下游蛋白 p-AKT,显著抑制 TNBC 细胞的恶性增殖并诱导其凋亡。然而,鉴于 TNBC 成因复杂,且不同来源的肿瘤细胞系存在差异,STA 抗 TNBC 的作用仍需在其他多个乳腺癌细胞系中进行验证。同时,需结合 STA 在动物体内的作用机制,获取药代动力学相关参数,检测药物对动物重要脏器的影响,并对 STA 在其他癌症治疗中的应用进一步全面探索。

[致谢] 湖北医药学院生物医药研究院刘雪文和李方舟为该论文提供了技术支持。

[参考文献]

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229.
- [2] SIEGEL R, MILLER K, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7.
- [3] SWAIN S, KIM S, CORTÉS J, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(6): 461.
- [4] 焦卓亚, 祝永福, 陈姝同, 等. 基于上皮间充质转化研究复方守宫散抑制三阴性乳腺癌恶性表型作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(14): 3868.
- [5] MUMBY M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor[J]. Cell, 2007, 130(1): 21.
- [6] SWITZER C, RIDNOUR L, CHENG R Y, et al. Dithiolethione compounds inhibit Akt signaling in human breast and lung cancer cells by increasing PP2A activity[J]. Oncogene, 2009, 28(43): 3837.
- [7] SESHACHARYULU P, PANDEY P, DATTA K, et al. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 335(1): 9.
- [8] JANSSENS V, GORIS J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling[J]. Biochem J, 2001, 353(Pt 3): 417.
- [9] RANGARAJAN A, HONG S, GIFFORD A, et al. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation[J]. Cancer Cell, 2004, 6(2): 171.
- [10] CHEN K F, YE H P, HSU C, et al. Bortezomib overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells in part through the inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. J Biol Chem, 2009, 284(17): 11121.
- [11] YANG X, QU K, TAO J, et al. Inhibition of CIP2A attenuates tumor progression by inducing cell cycle arrest and promoting cellular senescence in hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(2): 1807.
- [12] LIU C Y, HUNG M H, WANG D S, et al. Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(5): 431.
- [13] QIN S, LI J, SI Y, et al. Cucurbitacin B induces inhibitory effects via CIP2A/PP2A/Akt pathway in glioblastoma multiforme[J]. Mol Carcinog, 2018, 57(6): 687.
- [14] TIAN Y, CHEN H, QIAO L, et al. CIP2A facilitates the G₁/S cell cycle transition via B-Myb in human papillomavirus 16 oncoprotein E6-expressing cells[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(9): 4150.
- [15] CLARK R, BASABRAIN A, AUSTIN G, et al. Validation of CIP2A as a biomarker of subsequent disease progression and treatment failure in chronic myeloid leukaemia[J]. Cancers, 2021, 13(9): 2155.
- [16] GUO B, WU S, ZHU X, et al. Micropeptide CIP2A-BP encoded

- by LINC00665 inhibits triple-negative breast cancer progression [J]. *EMBO J*, 2020, 39(1): e102190.
- [17] NISHIO E, HAYASHI T, AKAZA M, et al. Upregulation of CIP2A in estrogen depletion-resistant breast cancer cells treated with low-dose everolimus [J]. *FEBS Open Bio*, 2020, 10(10): 2072.
- [18] ZHU Z, WEI Z. CIP2A silencing alleviates doxorubicin resistance in MCF7/ADR cells through activating PP2A and autophagy [J]. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(8): 1542.
- [19] OSTER S, HO C, SOUCIE E L, et al. The myc oncogene: marvelous MY complex [J]. *Adv Cancer Res*, 2002, 84: 81.
- [20] FACCHINI L, PENN L. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights [J]. *FASEB J*, 1998, 12(9): 633.
- [21] DALLA-FAVERA R, BREGNI M, ERIKSON J, et al. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in burkitt lymphoma cells [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1982, 79(24): 7824.
- [22] 张顺荣, 李东芳, 何寄琴, 等. 胃复方对人胃癌 BGC-823 细胞移植瘤裸鼠作用及其对 c-Myc、人端粒酶逆转录酶基因表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(10): 2618.
- [23] THOMPSON E. The many roles of c-Myc in apoptosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 575.
- [24] GAO F Y, LI X T, XU K, et al. C-MYC mediates the crosstalk between breast cancer cells and tumor microenvironment [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 28.
- [25] GUARDUCCI C, NARDONE A, RUSSO D, et al. Selective CDK7 inhibition suppresses cell cycle progression and MYC signaling while enhancing apoptosis in therapy-resistant estrogen receptor-positive breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2024, 30(9): 1889.
- [26] PENG P, REN Y, WAN F, et al. Sculponeatin A promotes the ETS1-SYVN1 interaction to induce SLC7A11/xCT-dependent ferroptosis in breast cancer [J]. *Phytomedicine*, 2023, 117: 154921.
- [27] JIANG H, WANG W, ZHOU M, et al. Enmein-type 6, 7-secoent-kauranoids from *Isodon sculponeatus* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(11): 2113.
- [28] JIANG H, WANG W, ZHOU M, et al. Diterpenoids from *Isodon sculponeatus* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93: 142.
- [29] 黄婧漪, 刘玥彤, 李贺, 等. 中医药改善肿瘤化疗耐药研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(10): 105.
- [30] 舒阳春, 李丽琳, 王端玉, 等. 西黄丸加减联合新辅助放化疗治疗局部晚期直肠癌疗效及安全性观察 [J]. *今日药学*, 2022, 32(9): 702.
- [31] WANG L, WANG C, TAO Z, et al. Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 460.
- [32] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603.
- [33] WANG L, WANG D, WU L, et al. Homoharringtonine inhibited breast cancer cells growth via miR-18a-3p/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(4): 995.
- [34] YI F, NI W, LIU W, et al. Expression and biological role of CIP2A in human astrocytoma [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(5): 1376.
- [35] JUNTILA M, PUUSTINEN P, NIEMELÄ M, et al. CIP2A inhibits PP2A in human malignancies [J]. *Cell*, 2007, 130(1): 51.
- [36] CÔME C, LAINE A, CHANRION M, et al. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5092.
- [37] 庞荣, 周全, 李茂. 异丙酚通过调节 CIP2A/PP2A 通路抑制 HepG2 细胞增殖 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2020, 42(12): 1207.
- [38] LIN Y, CHEN K, CHEN C, et al. CIP2A-mediated Akt activation plays a role in bortezomib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(7): 585.
- [39] LLOMBART V, MANSOUR M. Therapeutic targeting of "undruggable" MYC [J]. *EBioMedicine*, 2022, 75: 103756.
- [40] SOOFIYANI S, HEJAZI M, BARADARAN B. The role of CIP2A in cancer: a review and update [J]. *Biomed Pharm*, 2017, 96: 626.
- [41] LUCAS C, HARRIS R, GIANNODIS A, et al. C-Myc inhibition decreases CIP2A and reduces BCR-ABL1 tyrosine kinase activity in chronic myeloid leukemia [J]. *Haematologica*, 2015, 100(5): e179.
- [42] 胡百淳, 田金鑫, 张逸腾, 等. 化合物成药性的在线预测 [J]. *中国药物化学杂志*, 2022, 32(2): 90.

[责任编辑 陈玲]