

薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期与迁移的作用及机制研究

于轶睿, 温馨, 张甲蓉, 胡锦航*

(陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心 秦药特色资源研究开发
国家重点实验室(培育) 陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712000)

[摘要] 该研究旨在阐明中药来源的天然产物薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系的作用机制, 重点解析其诱导细胞周期阻滞及抑制细胞迁移的潜在分子机制。该研究综合运用多种实验方法, 包括 RNA 测序分析, 流式细胞术检测细胞周期, 划痕愈合实验评估细胞迁移能力, F-actin 染色观察细胞骨架变化, 透射电子显微镜观察细胞形态和伪足变化, 以及 Western blot 和免疫荧光染色检测相关蛋白表达等。RNA 测序结果显示, 薯蓣皂苷元处理组与对照组之间存在显著的基因表达差异, 通过 KEGG 和 GO 分析揭示差异表达基因主要富集于细胞周期和迁移相关通路。流式细胞术检测发现, 薯蓣皂苷元以剂量依赖性方式诱导 MDA-MB-231 细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 进一步的 Western blot 和免疫荧光实验表明, 薯蓣皂苷元通过调控细胞分裂周期蛋白 25A (CDC25A)-细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 2/4/6 轴影响细胞周期进程。划痕愈合实验结果显示, 薯蓣皂苷元显著抑制细胞迁移能力。F-actin 染色结果显示薯蓣皂苷元可抑制 F-actin 生成并破坏其结构。透射电镜观察表明, 薯蓣皂苷元能够减少细胞表面伪足的形成。此外, Western blot 和免疫荧光实验结果表明, 薯蓣皂苷元通过抑制上皮-间质转化 (EMT) 进程和 Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)-Rho 关联卷曲螺旋结合蛋白激酶 1 (ROCK1) 信号通路, 进而抑制细胞的迁移能力。综上所述, 薯蓣皂苷元通过调控细胞周期相关蛋白表达诱导 MDA-MB-231 细胞发生 G_0/G_1 期阻滞, 并且通过抑制 F-actin 生成, 减少细胞表面伪足形成、抑制 EMT 进程及 RhoA-ROCK1 信号通路, 显著抑制细胞的迁移能力。

[关键词] 三阴性乳腺癌; 薯蓣皂苷元; 周期阻滞; EMT; RhoA-ROCK1 通路

Effects and mechanisms of diosgenin on cell cycle and migration in triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells

YU Yi-rui, WEN Xin, ZHANG Jia-rong, HU Jin-hang*

(Shaanxi Innovative Drug Research Center, State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi Province & Ministry of Education, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China)

[Abstract] This study aimed to elucidate the mechanisms of diosgenin, a natural compound derived from traditional Chinese medicine, on the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231, with a focus on its induction of cell cycle arrest and inhibition of cell migration. Multiple experimental approaches were employed, including RNA sequencing analysis, flow cytometry for cell cycle detection, wound healing assays to evaluate migration capacity, F-actin staining to observe cytoskeletal changes, transmission electron microscopy (TEM) to examine cellular morphology and filopodia alterations, as well as Western blot and immunofluorescence staining to detect the expression of related proteins. RNA sequencing revealed significant gene expression differences between the diosgenin-treated group and the control group, with KEGG and GO analyses showing enrichment of differentially expressed genes mainly in

[收稿日期] 2025-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104230); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目(23JY027); 秦创原中医药产业创新聚集区项目(L2024-QCY-ZYYJJQ-X199)

[通信作者] *胡锦航, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理学, E-mail: hujinhanghi@126.com

[作者简介] 于轶睿, 硕士研究生, E-mail: yuyir11@163.com

pathways related to cell cycle and migration. Flow cytometry demonstrated that diosgenin induced G₀/G₁ phase arrest in MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner. Further Western blot and immunofluorescence assays indicated that diosgenin regulated the cell cycle via the CDC25A-CDK2/4/6 axis. Wound healing assays showed that diosgenin significantly inhibited cell migration. F-actin staining indicated that diosgenin suppressed F-actin formation and disrupted its structure. TEM observations revealed a reduction in filopodia formation on the cell surface after diosgenin treatment. Moreover, Western blot and immunofluorescence results demonstrated that diosgenin inhibited migration by suppressing epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the RhoA-ROCK1 signaling pathway. In conclusion, diosgenin induces G₀/G₁ phase arrest in MDA-MB-231 cells by regulating cell cycle-related proteins and significantly inhibits cell migration by suppressing F-actin formation, reducing filopodia on the cell surface, and inhibiting EMT and the RhoA-ROCK1 pathway.

[Key words] triple-negative breast cancer; diosgenin; cell cycle arrest; EMT; RhoA-ROCK1 pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250905.702

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤,其高度异质性体现在不同的分子亚群,这些亚群在临床行为、转移模式及治疗敏感性上存在显著差异^[1-2]。其中,三阴性乳腺癌(TNBC)因缺乏雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体2(HER2)的表达,成为乳腺癌中复发率和病死率最高、最具侵袭性和转移潜能的亚型^[3]。TNBC 占有乳腺癌病例的 15%~20%,其 5 年病死率约为 20%^[1]。目前,由于缺乏有效的靶向治疗手段,化疗仍然是 TNBC 的主要治疗方法,但存在易产生耐药性和不良反应等问题^[4]。临床上常用的基于紫杉醇和蒽环类药物的化疗方案,虽然应用广泛,但高复发率、低总生存率以及严重急性毒性反应(如不可逆的心脏毒性和骨髓毒性)等问题,限制了其临床应用和疗效发挥^[3]。因此,开发新型、高效且低毒的治疗策略显得尤为迫切。天然产物因其多靶点调控特性,可通过干预致癌转录因子及肿瘤微环境抑制肿瘤生长,且毒性较小^[2,5],在肿瘤治疗领域展现出巨大的应用潜力。从中药中提取的单体如青蒿素、人参皂苷、藤黄酸和薯蓣皂苷元等,已被证实对多种类型的癌细胞具有显著的体外细胞毒性^[6]。

薯蓣皂苷元作为一种天然存在的甾体皂苷元,广泛分布于豆科胡芦巴种子、穿龙薯蓣及野生山药根茎等多种药用植物中^[7]。因其独特的类雌激素结构和广泛的生物活性,薯蓣皂苷元在多种人类疾病治疗中的应用备受关注^[7]。药理学研究表明,薯蓣皂苷元不仅具有心脏保护、神经保护、抗糖尿病、抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒及抗过敏等多方面的生物学作用,还展现出显著的抗肿瘤活性,它可以调节参与肿瘤形成和发展的多种分子途径,通过作用于肿瘤细胞中的多个分子靶点,抑制细胞周期进程,诱

导细胞凋亡并削弱肿瘤细胞迁移和侵袭能力^[8-11]。机制研究表明,薯蓣皂苷元具有“多靶点、多环节”的抗癌效应,这使其成为极具开发前景的天然多靶点抗肿瘤候选药物^[12]。然而,现有研究多聚焦于普通亚型乳腺癌或实体瘤,对于 TNBC 这一恶性程度高且缺乏有效靶向治疗的亚型,薯蓣皂苷元的抗癌作用,尤其是其调控细胞周期和转移的关键机制,尚未得到系统深入阐明。

前期研究发现,薯蓣皂苷元能够抑制 TNBC 细胞 MDA-MB-231 的增殖并诱导细胞发生凋亡,其机制涉及 AKT1 和 EGFR 蛋白调控以及 Bax/Bcl-2 蛋白表达失衡^[13]。基于此,本研究通过 RNA 测序分析发现薯蓣皂苷元显著影响 MDA-MB-231 细胞周期与迁移相关通路。进一步揭示其分子机制,深入探究薯蓣皂苷元对 TNBC 细胞周期阻滞及迁移抑制的作用途径,为薯蓣皂苷元治疗 TNBC 提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。采用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素混合液的 L-15 完全培养基进行细胞培养,置于 37 ℃ 培养箱中培养。

1.2 试剂与药物 薯蓣皂苷元对照品(货号 S229101,纯度 100%)购自美国 Selleck 公司,将 50 mg 的薯蓣皂苷元溶解于 12.059 2 mL 乙醇,终浓度为 10 mmol·L⁻¹, -20 ℃ 保存;胎牛血清(货号 10270106)购自美国 Gibco 公司;L-15 培养基(货号 KGL1801-500)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;青链霉素混合液、胰蛋白酶-EDTA 消化液、PBS 缓冲液、Hoechst 33342 染色液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(货号分别为 P1400、T1300、P1020、C0031、

P1200)均购自北京索莱宝科技有限公司;免疫染色固定液、免疫染色通透液(Triton X-100)、ECL 化学发光试剂盒(货号分别为 P0098-100 mL、P0096-100 mL、P0018FM)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;Phalloidin-Fluorescein Conjugate(货号 ATT-23101)购自美国 AAT Bioquest 公司;细胞周期检测试剂盒(货号 WLA010)购自沈阳万类生物科技有限公司;BCA 蛋白质定量试剂盒(货号 PA115)购自天根生化科技(北京)有限公司; β -actin、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、锌指 E-Box 结合同源盒蛋白 1(ZEB1)、Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)、Rho 关联含卷曲螺旋结合蛋白激酶 1(ROCK1)、细胞周期蛋白 25A(CDC25A)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A(p21)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)2、细胞周期蛋白(Cyclin)E1、CDK4、CDK6、Cyclin D1 抗体,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、FITC 标记的山羊抗兔 IgG(货号分别为 66009-1-Ig、22018-1-AP、10366-1-AP、10375-2-AP、21544-1-AP、10749-1-AP、21850-1-AP、55031-1-AP、10355-1-AP、10122-1-AP、11554-1-AP、11026-1-AP、14052-1-AP、26939-1-AP、SA00001-1、SA00001-2、SA00003-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 转录组测序 离心收集对照组和薯蓣皂苷元处理组 MDA-MB-231 细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μ L RNA 提取试剂, 反复吹打使细胞裂解完全。样品经液氮速冻后, 于干冰条件下寄送至广州基迪奥生物科技有限公司, 采用 Illumina NovaSeq X Plus 平台进行转录组测序, 使用动态实时交互式在线数据分析平台 Omicsmart 进行生物信息学分析。

1.4 富集分析 以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 作为筛选标准, 鉴定差异表达基因(DEGs)。对筛选获得的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析和 GO 基因功能富集分析。

1.5 流式细胞术检测细胞周期 将细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后, 分别给予不同浓度的薯蓣皂苷元处理, 48 h 后胰酶消化, 收集细胞至离心管内离心($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)。细胞沉淀用预冷的 75% 乙醇固定过夜($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)。固定后细胞用预冷的 PBS 洗涤, 加入 100 μ L RNaseA, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 再加入 500 μ L propidium iodide(PI)染色液混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避

光孵育 35 min。使用流式细胞仪检测细胞周期分布, 运用 Modifit LT 4.0 软件进行分析。

1.6 划痕愈合实验检测细胞迁移能力 将细胞接种于 6 孔板, 培养至汇合度约 90%, 用无菌 10 μ L 移液器吸头在单层细胞上沿直线划痕, PBS 洗涤 2 次以去除脱落细胞, 更换为含不同浓度薯蓣皂苷元(0、15、30、60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新鲜培养基。于划痕后 0、24 h, 通过倒置显微镜观察细胞迁移情况并且拍照。细胞迁移率 = $(D_0 - D_{24})/D_0$, 其中, D_0 表示 0 h 时的划痕宽度, D_{24} 代表 24 h 的划痕宽度。

1.7 透射电子显微镜(TEM)观察 将细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后给予薯蓣皂苷元处理 48 h。收集对照组和薯蓣皂苷元($30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组细胞, 加入电镜固定液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 4 h。固定后样品委托广州华银医学检验中心处理。即经磷酸缓冲液漂洗 3 次, 1% 锇酸室温固定 2.5 h, 再次用缓冲液漂洗, 梯度乙醇(50%、70%、80%、90% 和 100%)脱水, 100% 丙酮处理。使用包埋剂对样品进行包埋, 采用超薄切片机切片, 进行铀铅双染色, 室温干燥过夜。采用 HT7800 透射电子显微镜观察细胞超微结构并采集图像。

1.8 F-actin 细胞骨架染色 将细胞接种于 24 孔板, 培养 24 h 后给予薯蓣皂苷元处理 48 h。细胞经免疫染色固定液室温固定 30 min, PBS 洗涤 3 次。加入免疫染色通透液室温孵育 20 min 以增加细胞通透性。PBS 洗涤后, 采用 3% BSA 溶液(PBS 配制)室温封闭 1 h。PBS 洗涤 3 次, 加入 500 μ L Phalloidin-Fluorescein Conjugate 工作液室温避光染色 30 min。PBS 洗涤细胞 3 次以去除多余染料, 每孔加入 500 μ L Hoechst 33342 染色液, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 使用荧光显微镜观察细胞并拍照。

1.9 免疫荧光 细胞接种、处理、固定、透化和封闭步骤同 1.8 项。分别加入稀释好的抗体(anti-CDC25A 1 : 400、anti-CDK4 1 : 200、anti-Cyclin D1 1 : 1 000、anti-N-cadherin 1 : 200、anti-Vimentin 1 : 200), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG(1 : 500)室温避光孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 500 μ L Hoechst 33342 染色液, 孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 使用荧光显微镜观察细胞并拍照。

1.10 Western blot 实验 细胞接种于 6 孔板, 培养

24 h, 给予不同浓度薯蓣皂苷元处理, 48 h 后胰酶消化并收集细胞。细胞沉淀加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解细胞 30 min, 期间每 5 min 涡旋振荡 1 次。裂解液于 4 ℃、12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 取等量蛋白 (30 μg) 进行 SDS-PAGE 电泳, 随后转印至 PVDF 膜。膜经 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后, 使用相应的抗体 (anti-CDC25A、anti-p21、anti-CDK2、anti-Cyclin E1、anti-CDK4、anti-CDK6、anti-Cyclin D1、anti-N-cadherin、anti-Vimentin、anti-MMP9、anti-ZEB1、anti-RhoA、anti-ROCK1 1 : 1 000) 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 室温孵育 HRP 标记的二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次, 采用 ECL 发光液进行显影。使用 ChemiDoc XRS 成像系统采集图像并采用 Image Lab 软件进行数据分析。

1.11 统计学分析 利用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行统计处理, 数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way

ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转录组测序分析薯蓣皂苷元对基因表达的影响 对比对照组与薯蓣皂苷元处理组的基因表达差异, 筛选标准设定为 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 。共鉴定出 1 033 个 DEGs, 与对照组相比, 薯蓣皂苷元处理组细胞中有 683 个基因呈上调趋势, 350 个基因出现下调。DEGs 的 KEGG 通路富集分析显示, 相关基因主要富集在包括细胞周期、p53 信号通路、ECM-受体相互作用与 DNA 复制等多个关键通路中。GO 功能富集分析结果表明, 差异表达基因在生物学过程 (BP) 方面显著富集于细胞周期、细胞运动、有丝分裂细胞周期、细胞迁移、上皮细胞迁移等多个与细胞周期和迁移紧密相关的过程, 相关图见图 1 和中国知网本文增强出版附加材料。上述结果提示, 薯蓣皂苷元可能通过调控 MDA-MB-231 细胞周期进程与细胞迁移发挥其抑制乳腺癌的作用。

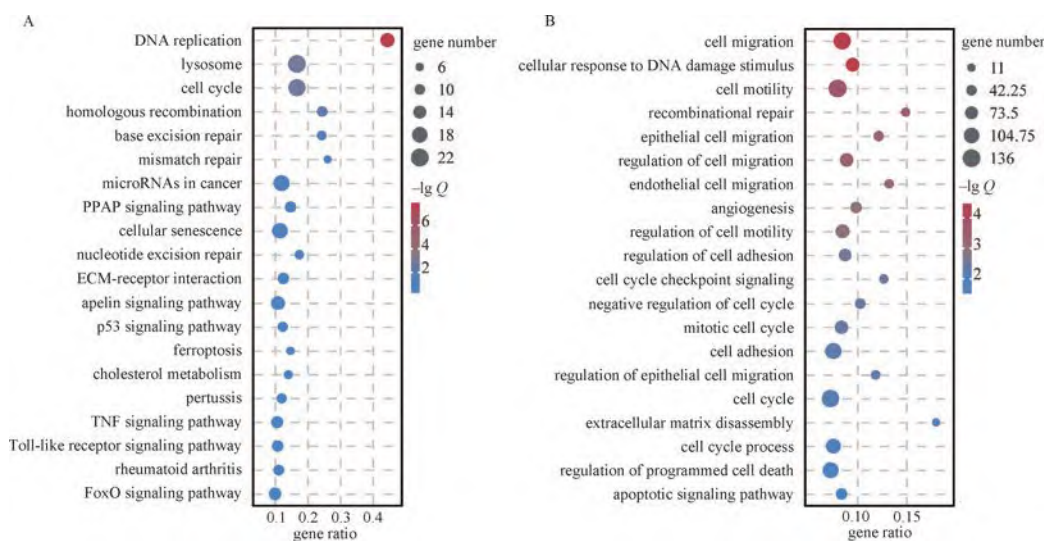


图 1 DEGs 的 KEGG(A) 通路和 GO(B) 功能富集分析

Fig. 1 KEGG(A) pathway and GO(B) functional enrichment analysis of DEGs

2.2 薯蓣皂苷元诱导细胞周期 G_0/G_1 期阻滞 采用流式细胞术检测不同浓度薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响, 见中国知网本文增强出版附加材料。对照组 G_0/G_1 期的细胞比例为 53.57%, 而经 15、30、60 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 薯蓣皂苷元处理后, G_0/G_1 期的细胞比例分别上升至 61.02%、

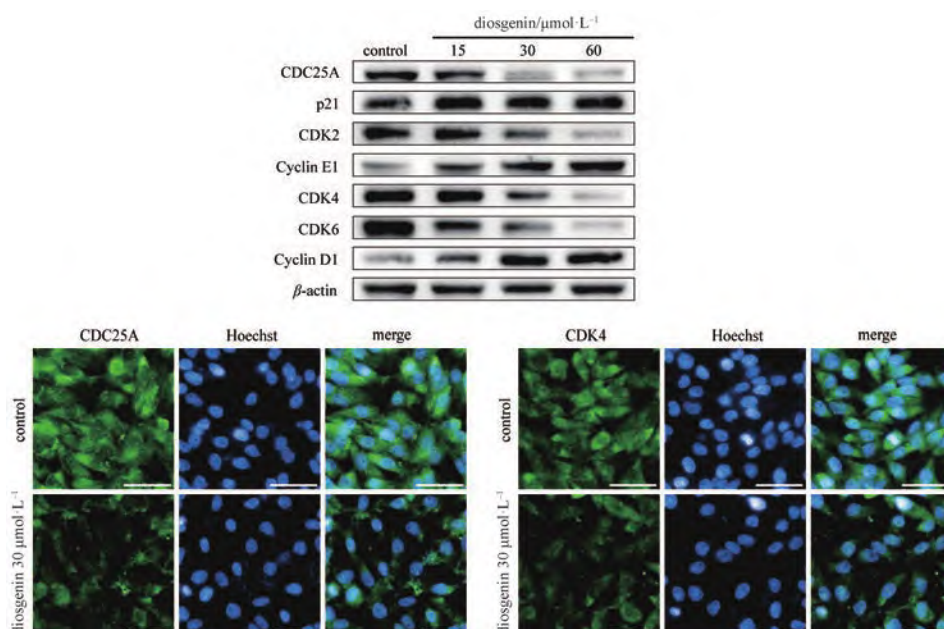
66.00%、73.69%。与对照组比较, 薯蓣皂苷元处理各组 MDA-MB-231 细胞中 G_0/G_1 期细胞比例显著上调, 且随着薯蓣皂苷元浓度的增加, G_0/G_1 期细胞比例也相应升高。实验结果表明, 薯蓣皂苷元可使 MDA-MB-231 细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 且其阻滞作用随薯蓣皂苷元浓度增加而增强, 见表 1。

表 1 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 1 Effect of diosgenin on the cell cycle of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

diosgenin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G ₀ /G ₁ 期/%	S 期/%	G ₂ /M 期/%
0 (control)	53.73 $\pm$ 0.15	33.30 $\pm$ 0.38	12.98 $\pm$ 0.31
15	61.35 $\pm$ 0.29 ³⁾	28.05 $\pm$ 0.13 ³⁾	10.60 $\pm$ 0.22 ³⁾
30	65.62 $\pm$ 0.40 ³⁾	24.25 $\pm$ 0.52 ³⁾	10.13 $\pm$ 0.30 ³⁾
60	73.19 $\pm$ 0.46 ³⁾	18.13 $\pm$ 0.34 ³⁾	8.69 $\pm$ 0.18 ³⁾

注: diosgenin. 薯蓣皂苷元; control. 对照组 (图 2~5、表 2~5 同)。
与 control 比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ (表 2~5 同)。

2.3 薯蓣皂苷元调控周期相关蛋白表达 与对照组相比, 经 15、30、60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 薯蓣皂苷元处理后, MDA-MB-231 细胞中 p21、Cyclin E1、Cyclin D1 蛋白表达水平均显著上调, 同时, CDC25A、CDK2、CDK4、CDK6 蛋白表达水平则显著下调。免疫荧光染色结果进一步证实, 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 薯蓣皂苷元处理可降低 MDA-MB-231 细胞中 CDC25A 和 CDK4 的表达。结果表明, 薯蓣皂苷元可显著下调 CDC25A 蛋白表达, 并抑制 CDK2/4/6 表达; 同时, p21、Cyclin E1 和 Cyclin D1 蛋白表达水平则显著上调, 见图 2、表 2。



标尺 50 μm (图 4 同)。

图 2 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞周期相关蛋白表达的影响 (免疫荧光)

Fig. 2 Effect of diosgenin on the expression of cell cycle-related proteins in MDA-MB-231 cells (immunofluorescence)

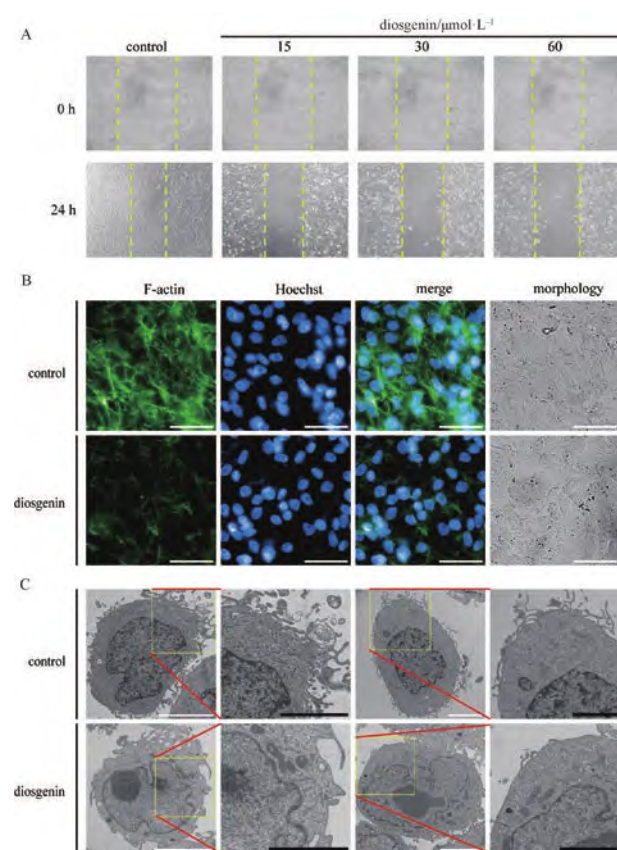
表 2 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞 CDC25A、p21、CDK2、Cyclin E1、CDK4、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 2 Effect of diosgenin on the protein expression levels of CDC25A, p21, CDK2, Cyclin E1, CDK4, CDK6, and Cyclin D1 in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

diosgenin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	CDC25A	p21	CDK2	Cyclin E1	CDK4	CDK6	Cyclin D1
0 (control)	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06
15	0.80 $\pm$ 0.06 ²⁾	1.52 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.92 $\pm$ 0.11	1.29 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.91 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.04 ³⁾	1.38 $\pm$ 0.07 ¹⁾
30	0.46 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.50 $\pm$ 0.09 ³⁾	0.67 $\pm$ 0.08 ²⁾	1.53 $\pm$ 0.09 ³⁾	0.50 $\pm$ 0.03 ³⁾	0.49 $\pm$ 0.05 ³⁾	2.42 $\pm$ 0.25 ³⁾
60	0.38 $\pm$ 0.02 ³⁾	1.55 $\pm$ 0.06 ³⁾	0.39 $\pm$ 0.05 ³⁾	1.89 $\pm$ 0.09 ³⁾	0.19 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.22 $\pm$ 0.01 ³⁾	2.54 $\pm$ 0.19 ³⁾

2.4 薯蓣皂苷元抑制 MDA-MB-231 细胞迁移, 抑制细胞内 F-actin 生成并减少细胞表面伪足 划痕愈合实验结果显示, 与对照组比较, 薯蓣皂苷元处

理组细胞迁移率显著降低, 表明薯蓣皂苷元可有效抑制 TNBC MDA-MB-231 细胞的二维迁移能力。采用 Fluorescein 耦联的鬼笔环肽和 Hoechst 33342

分别对 F-actin 和细胞核进行标记,与对照组相比,薯蓣皂苷元处理显著减少了细胞中的 F-actin 含量。对照组细胞可见清晰有序的 F-actin 纤维网络,而薯蓣皂苷元处理组细胞 F-actin 荧光强度显著减弱且排列紊乱。由于细胞表面伪足的形成是由肌动蛋白细胞骨架支持的,本研究进一步评估了薯蓣皂苷元处理是否会破坏 MDA-MB-231 细胞表面伪足。透射电子显微镜结果表明,对照组细胞表面存在大量伪足结构,而薯蓣皂苷元处理组伪足数量减少并出现断裂,同时,细胞还出现了凋亡特征,即细胞核中染色质凝集并向细胞核边缘移动,见图 3、表 3。



A. 0、24 h 划痕实验代表性图像; B. 对照组与薯蓣皂苷元处理组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 免疫荧光染色的 F-actin 细胞骨架 (绿色), 细胞核经 Hoechst 33342 染色 (蓝色), 标尺 $50 \mu\text{m}$; C. 对照组与薯蓣皂苷元处理组 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 伪足结构的代表性透射电子显微镜照片, 白色标尺 $5 \mu\text{m}$, 黑色标尺 $3 \mu\text{m}$ 。

图 3 薯蓣皂苷元抑制 MDA-MB-231 细胞迁移、抑制 F-actin 生成并减少伪足

Fig. 3 Diosgenin inhibits MDA-MB-231 cell migration, suppresses F-actin formation, and reduces filopodia

表 3 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of diosgenin on cell migration of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

diosgenin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞迁移率
0 (control)	1.00 ± 0.03
15	$0.79 \pm 0.05^{2)}$
30	$0.44 \pm 0.06^{3)}$
60	$0.22 \pm 0.03^{3)}$

2.5 薯蓣皂苷元调控上皮-间质转化 (EMT) 相关蛋白表达 EMT 被认为是乳腺癌转移的关键步骤,其特征为间质标志物 (N-cadherin 和 Vimentin) 表达增加。Western blot 实验结果显示,与对照组相比,薯蓣皂苷元处理的 MDA-MB-231 细胞中 N-cadherin、Vimentin、MMP9 和 ZEB1 蛋白表达水平均显著下调。免疫荧光染色结果进一步证实, $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 薯蓣皂苷元处理可降低 MDA-MB-231 细胞中 N-cadherin 和 Vimentin 的表达。结果表明,薯蓣皂苷元可通过抑制 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程而抑制细胞迁移能力,见图 4、表 4。

2.6 薯蓣皂苷元调控 RhoA-ROCK1 信号通路 薯蓣皂苷元处理显著降低了 MDA-MB-231 细胞中 RhoA 和 ROCK1 的蛋白表达水平。结果表明,薯蓣皂苷元通过调节 RhoA-ROCK1 信号通路抑制乳腺癌细胞的 EMT 进程,进而抑制细胞迁移,见图 5、表 5。

3 讨论

乳腺癌作为全球女性中发病率及癌症相关病死率最高的恶性肿瘤,其高度异质性导致不同分子亚型在临床预后和治疗敏感性上存在显著差异^[14-15]。其中, TNBC 因缺乏有效的治疗靶点而成为最具侵袭性的亚型,具有分化差、易早期复发和转移的特点,超过 30% 的患者会出现远处转移。目前,临床主要依赖紫杉醇和蒽环类化疗方案治疗 TNBC,但肿瘤异质性与获得性耐药导致高复发率及低生存率。此外,免疫检查点抑制剂单药响应率不足 5%,加之化疗毒性的限制,亟需开发高效低毒的新型治疗策略^[3,4,16]。薯蓣皂苷元作为天然甾体皂苷元,除在代谢性疾病中表现出抗糖尿病、调血脂等活性外,近年来研究还揭示其通过多靶点抗肿瘤机制在胃癌、肝癌等恶性肿瘤中显著抑制肿瘤进展^[11,17]。然

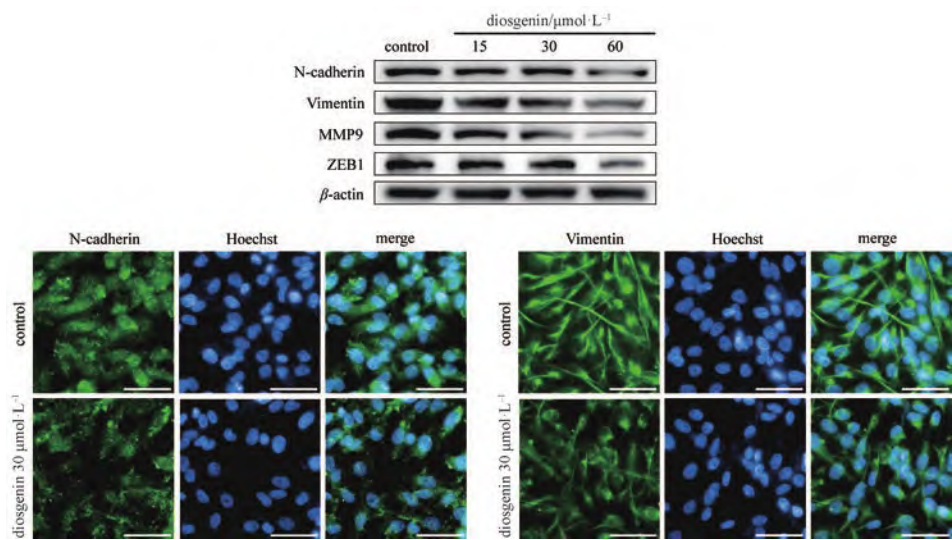


图 4 薯蓣皂苷元调控 MDA-MB-231 细胞 EMT 相关蛋白表达(免疫荧光)
Fig. 4 Diosgenin modulates EMT-related proteins in MDA-MB-231 cells(immunofluorescence)

表 4 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞 N-cadherin、Vimentin、MMP9 以及 ZEB1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 Effect of diosgenin on the protein expression levels of N-cadherin, Vimentin, MMP9, and ZEB1 in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

diosgenin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	N-cadherin	Vimentin	MMP9	ZEB1
0(control)	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.03
15	0.79 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.78 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.77 $\pm$ 0.08 ³⁾	0.90 $\pm$ 0.09
30	0.81 $\pm$ 0.05 ³⁾	0.75 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.54 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.87 $\pm$ 0.01 ¹⁾
60	0.73 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.72 $\pm$ 0.04 ²⁾	0.41 $\pm$ 0.02 ³⁾	0.66 $\pm$ 0.03 ³⁾

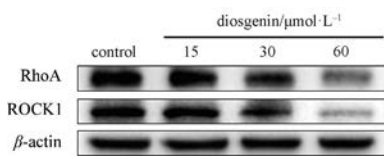


图 5 Western blot 检测 RhoA 和 ROCK1 蛋白表达
Fig. 5 Western blot detected the expression of RhoA and ROCK1 proteins

表 5 薯蓣皂苷元对 MDA-MB-231 细胞 RhoA 以及 ROCK1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Effect of diosgenin on the protein expression levels of RhoA and ROCK1 in MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

diosgenin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	RhoA	ROCK1
0(control)	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.01
15	0.90 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.02
30	0.79 $\pm$ 0.06 ²⁾	0.78 $\pm$ 0.02 ²⁾
60	0.50 $\pm$ 0.07 ³⁾	0.24 $\pm$ 0.10 ³⁾

而,薯蓣皂苷元在 TNBC 中的作用机制尚未系统阐明。前期研究发现,薯蓣皂苷元可抑制 TNBC 细胞增殖并诱导细胞发生凋亡^[13]。基于此,本研究结合转录组测序分析,深入探讨薯蓣皂苷元对 TNBC 细胞周期阻滞及迁移能力的调控机制。

转录组测序分析提示,薯蓣皂苷元可能通过调控细胞周期与迁移通路抑制 MDA-MB-231 细胞恶性进展。鉴于诱导细胞周期阻滞是抑制肿瘤增殖的有效策略,本研究聚焦薯蓣皂苷元对 TNBC 细胞周期的调控机制。已有研究表明,薯蓣皂苷元在不同肿瘤模型中可诱导特异性周期阻滞:在前列腺癌细胞中,其通过泛素-蛋白酶体途径降解 UHRF1 蛋白,上调了 p21、p16 和 LXN 等抑癌基因,导致 S 期阻滞与细胞衰老^[6];在胰腺癌细胞中,薯蓣皂苷元可引发细胞周期 G₂/M 期阻滞^[18];在乳腺癌细胞(MCF-7 和 Hs578T)中,其通过 CDC25C-CDC2-Cyclin B 通路介导 G₂/M 期阻滞^[19]。本研究结果表明,薯蓣皂苷

元以剂量依赖性方式显著诱导 TNBC MDA-MB-231 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,这与其他乳腺癌亚型的周期阻滞模式存在显著差异。为阐明其分子机制,检测了 G_0/G_1 期关键调控因子。Cyclins 和 CDKs 是细胞周期的直接调节因子,Cyclin-CDK 复合物的序贯激活是驱动细胞周期进程的核心^[20]。其中,CDC25A 作为上游激活因子,通过去磷酸化激活 CDK2 和 CDK4/6,进而促进 Cyclin E-CDK2 和 Cyclin D-CDK4/6 复合物形成,加速 G_1/S 期转换^[21-22]。p21 作为 CDK 抑制蛋白,可直接结合并抑制 Cyclin D1-CDK4 复合物活性,诱导 G_0/G_1 期阻滞^[23]。本研究发现,薯蓣皂苷元处理可显著下调 CDC25A、CDK2、CDK4、CDK6 蛋白表达,同时上调 p21、Cyclin E1 与 Cyclin D1 表达。结果表明,薯蓣皂苷元通过降低 CDC25A 表达,减少 CDK2/4/6 的活化及其与 Cyclin E/D 的复合物形成。Cyclin-CDK 复合物的减少直接导致细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。同时因 Cyclin-CDK 复合物减少,游离的 Cyclin E1 和 Cyclin D1 表达增多。

除诱导细胞周期阻滞外,薯蓣皂苷元还可显著抑制肿瘤细胞的迁移能力。研究表明,在卵巢癌细胞(OVCAR-3)中,薯蓣皂苷元可通过下调 MMP2、MMP9 的表达抑制癌细胞侵袭和迁移^[7];在结肠癌细胞中,薯蓣皂苷元作为 STAT3 靶向调节因子,通过抑制 STAT3 蛋白表达抑制增殖和迁移并促进凋亡^[10];此外,薯蓣皂苷元对胰腺癌细胞的迁移和侵袭也具有抑制作用^[18]。在乳腺癌中,薯蓣皂苷元被证实可抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 Skp2 的表达,降低乳腺癌细胞活力和运动能力并诱导细胞凋亡。然而,在上述研究中,薯蓣皂苷元抑制 MDA-MB-231 细胞迁移的具体分子机制,特别是其对 F-actin 聚合、伪足形成及 EMT 进程的影响,尚未被深入讨论^[24]。本研究中,划痕愈合实验结果证实薯蓣皂苷元可有效抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移能力。F-actin 是细胞骨架的核心组分,在细胞的极化、迁移、分化和形态发生中起关键作用^[25]。细胞中伪足的形成由 F-actin 的聚合和极化驱动^[26]。本研究结果显示,薯蓣皂苷元能显著抑制 F-actin 的表达并抑制细胞表面伪足形成。进一步,探究了薯蓣皂苷元对 EMT 的调控作用。EMT 是肿瘤细胞获得迁移、侵袭和转移能力的重要过程,其特征是上皮标志物(如 E-cadherin)下调,间充质标志物(如 N-cad-

herin、Vimentin)上调^[27],并伴随 MMP9 等蛋白酶对细胞外基质的降解^[28]。此外,ZEB1 是激活 EMT 程序的关键因子之一^[29]。Rho 信号通路(尤其是 RhoA-ROCK1 轴)在调控细胞迁移、形态改变及细胞骨架重组中具有重要作用,活化的 RhoA 通过影响肌动球蛋白收缩性调节肌动蛋白应力纤维的形成^[30],其下游效应因子 ROCK1 则参与调控各种细胞过程,包括细胞转录、细胞黏附、侵袭和迁移等^[31]。RhoA-ROCK1 信号通路被证实与细胞骨架调节、癌症转移密切相关^[32]。本研究分析了薯蓣皂苷元对 EMT 相关蛋白及 RhoA-ROCK1 信号的调控作用,证实薯蓣皂苷元可抑制 MDA-MB-231 细胞 EMT 进程并抑制 RhoA-ROCK1 信号通路。

综上所述,本研究阐明了薯蓣皂苷元对 TNBC 细胞周期和迁移的调控机制:一方面,其通过下调 CDC25A-CDK2/4/6 轴诱导 G_0/G_1 期阻滞;另一方面,通过减少 F-actin 和伪足形成、抑制 EMT 进程及 RhoA-ROCK1 信号通路,进而抑制细胞迁移能力。这些发现为薯蓣皂苷元抗 TNBC 的分子机制提供了新见解,支持其作为潜在治疗药物的开发价值。值得注意的是,本研究对迁移机制的探讨主要集中于 EMT 以及 RhoA-ROCK 信号通路,而薯蓣皂苷元对其他迁移相关调控因子(如 MLC、MYPT、FAK)的作用尚未充分阐明。此外,KEGG 富集分析提示薯蓣皂苷元可能影响 p53 信号通路、铁死亡及 micro-RNAs 等通路,其具体调控机制及生物学意义有待进一步验证。后续研究将探究薯蓣皂苷元对迁移相关关键蛋白的作用,并阐明其在 p53 信号通路、铁死亡等通路中的调控作用,以期更全面地揭示薯蓣皂苷元的抗肿瘤效应分子网络,为其临床应用转化提供更坚实的实验基础。

[参考文献]

- [1] RUIZ-MARTINEZ S, RIBAS X, COSTAS M, et al. Characterization and targeting of chemoresistant triple-negative breast cancer subtypes using amino-pyridine compounds [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(6): 167899.
- [2] 卜明,任文康,王璐,等. 过氧亚角甾醇线粒体靶向衍生物体内外抗乳腺癌作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(15): 4139.
- [3] ZHOU J Z, WEN J Y, XU X W, et al. Dual inhibition of AKT and autophagy sensitizes triple negative breast cancer cells to carboplatin [J]. *Transl Oncol*, 2025, 58: 102434.
- [4] XU X, ZHOU H, HONG R, et al. A self-accelerating 'copper bomb' strategy activated innate and adaptive immune response

- against triple-negative breast cancer [J]. *Bioact Mater*, 2025, 49: 193.
- [5] SETHI G, SHANMUGAM M K, WARRIER S, et al. Proapoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review [J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 645.
- [6] PENG Y, TANG R, DING L, et al. Diosgenin inhibits prostate cancer progression by inducing UHRF1 protein degradation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 942: 175522.
- [7] FANG F, ZHANG X, FANG Y. Diosgenin inhibits proliferation and migration of ovarian cancer cells and induce apoptosis via upregulation of PTEN [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2024, 103(3): e14459.
- [8] TANG Y N, HE X C, YE M, et al. Cardioprotective effect of total saponins from three medicinal species of *dioscorea* against isoprenaline-induced myocardial ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 175: 451.
- [9] DA SILVA M F, DE LIMA L V A, DE OLIVEIRA L M, et al. Regulation of cytokinesis and necroptosis pathways by diosgenin inhibits the proliferation of NCI-H460 lung cancer cells [J]. *Life Sci*, 2023, 330: 122033.
- [10] LAI Z, WANG H, TANG X, et al. Study on the mechanism of diosgenin targeting STAT3 to inhibit colon cancer proliferation and migration [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 7494887.
- [11] CUI N, DING F. Co-expression network analysis and molecular docking demonstrate that diosgenin inhibits gastric cancer progression via SLC1A5/mTORC1 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3157.
- [12] HE Z, CHEN H, LI G, et al. Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6): 871.
- [13] 温馨, 胡锦航, 程敏, 等. 基于网络药理学, 分子对接技术及体外实验验证探讨龙葵治疗乳腺癌的作用机制[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(10): 1782.
- [14] XIONG X, ZHENG L W, DING Y, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 49.
- [15] 王浩阳, 郭琳, 赵晖, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路靶向的中药有效成分及中药复方防治乳腺癌特点分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(5): 282.
- [16] CHOUPANI E, MAHMOUDI GOMARI M, ZANGANEH S, et al. Newly developed targeted therapies against the androgen receptor in triple-negative breast cancer: a review [J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(2): 309.
- [17] CHEN L, LAN J, LI Z, et al. A novel diosgenin-based liposome delivery system combined with doxorubicin for liver cancer therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(8): 1685.
- [18] GUO W, CHEN Y, GAO J, et al. Diosgenin exhibits tumor suppressive function via down-regulation of EZH2 in pancreatic cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(15): 1745.
- [19] LIAO W L, LIN J Y, SHIEH J C, et al. Induction of G₂/M phase arrest by diosgenin via activation of Chk1 kinase and Cdc25C regulatory pathways to promote apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 172.
- [20] PAN Z, QU C, CHEN Y, et al. Bufotalin induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human malignant melanoma A375 cells [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4): 2409.
- [21] TAN H, GAO S, ZHUANG Y, et al. R-phycoerythrin induces SGC-7901 apoptosis by arresting cell cycle at S phase [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(9): 25.
- [22] SHEN T, HUANG S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(6): 631.
- [23] HONG Y, FAN D. Ginsenoside Rk₁ induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells [J]. *Toxicology*, 2019, 418: 22.
- [24] LIU Y, ZHOU Z, YAN J, et al. Diosgenin exerts antitumor activity via downregulation of Skp2 in breast cancer cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020(2): 1.
- [25] MANINOVA M, CASLAVSKY J, VOMASTEK T. The assembly and function of perinuclear actin cap in migrating cells [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(3): 1207.
- [26] LIU X, YANG J, KONG M, et al. CD9 negatively regulates collective electrotaxis of the epidermal monolayer by controlling and coordinating the polarization of leader cells [J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkad012.
- [27] GU Q Y, LIU Y X, WANG J L, et al. LLGL2 inhibits ovarian cancer metastasis by regulating cytoskeleton remodeling via ACTN1 [J]. *Cancers*, 2023, 15(24): 5880.
- [28] SCHROTEROVA L, JEZKOVA A, RUDOLF E, et al. Inositol hexaphosphate limits the migration and the invasiveness of colorectal carcinoma cells *in vitro* [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(4): 1625.
- [29] WU W S, YOU R I, CHENG C C, et al. Snail collaborates with EGR-1 and SP-1 to directly activate transcription of MMP9 and ZEB1 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17753.
- [30] RIDLEY A J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration [J]. *J Microsc*, 2013, 251(3): 242.
- [31] CHOI E K, KIM J G, KIM H J, et al. Regulation of rhoA GTPase and novel target proteins for ROCK [J]. *Small GTPases*, 2020, 11(2): 95.
- [32] YU X, WANG D, WANG X, et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of RhoA signaling by sponging miR-133a-3p [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 32.

[责任编辑 陈玲]