

# 益气扶正复方联合依维莫司对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 的增殖抑制作用及其对 Akt/mTOR 信号通路的影响\*

李甜<sup>1</sup>, 周钱梅<sup>2</sup>, 张卫红<sup>\*\*</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院宝山分院乳腺科 上海 201900;

2. 上海中医药大学中医复杂系统研究中心 上海 201203)

**摘要:**目的 探讨益气扶正复方(简称复方)联合依维莫司对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用及 Akt/mTOR 信号通路的影响。方法 高效液相色谱法(HPLC)制备益气扶正复方药物,以 MTT 比色法分别检测 10, 20, 40, 80, 160 mg·mL<sup>-1</sup> 复方药物及 1, 10, 100, 1000 nmol·L<sup>-1</sup> 依维莫司(Everolimus) 12, 24, 48 h 对 MDA-MB-468 细胞的增殖抑制作用;分别运用 IC<sub>50</sub> 浓度的复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 单独及联合干预 MDA-MB-468 乳腺癌细胞 48 h, 观察其对细胞增殖的抑制作用,流式细胞仪检测其对细胞周期和凋亡的影响;Western blot 法检测其对细胞 Akt/mTOR 信号通路的影响。结果 复方及 Everolimus 均呈剂量、时间依赖性地抑制了 MDA-MB-468 乳腺癌细胞增殖,选择 IC<sub>50</sub> 浓度的复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 单独及联合干预细胞,联合用药组显著抑制了 MDA-MB-468 乳腺癌细胞的增殖,同时联合用药组抑制了 p-mTOR 和 p-Akt 的活性,提高了 PTEN 的表达。结论 复方与 Everolimus 均能抑制 MDA-MB-468 乳腺癌细胞增殖,两药联用效果更为显著,其作用机制可能与复方与依维莫司联用抑制了 p-mTOR 和 p-Akt 的活性,提高了 PTEN 的表达有关。

**关键词:** 三阴性乳腺癌(TNBC) 益气扶正复方(复方) 细胞增殖抑制 Akt/mTOR 信号通路

doi: 10.11842/wst.2018.01.006 中图分类号: R33 文献标识码: A

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,据统计 2012 年全球女性新发乳腺癌有 167 万例,同一时期,约有 52 万例女性患者死亡,占女性癌症死亡率的首位<sup>\*\*\*</sup>。三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌中一种特殊的类型,是指雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)

和人表皮生长因子受体(human epidermal growth factor receptor-2, Her-2)表达均为阴性的乳腺癌,因缺乏相应的医治靶点,故死亡率较其他类型乳腺癌高<sup>[1]</sup>。临床上,中医药作为乳腺癌综合治疗的重要方法之一,在三阴性亚型中的干预显得尤为重要。

全国名老中医陆德铭教授在五十年诊治乳腺癌的临床实践中积累了丰富的经验,陆老认为乳腺癌的主要病机为:本虚标实,虚实夹杂,因此提倡使用“益气扶

收稿日期:2017-10-11

修回日期:2017-11-19

\* 上海市卫生和计划生育委员会科研课题面上项目:基于雌激素受体基因多态性的补肾中药防治芳香化酶抑制剂(AIs)引起的骨代谢异常的临床研究(201540036),负责人:张卫红;国家自然科学基金青年科学基金项目(8150150222):益气扶正法对三阴性乳腺癌 Akt/mTOR 信号通路的影响,负责人:张卫红;上海市宝山区中西医结合医院国家自然培育基金项目(GZRPYJJ-201702):从自噬角度探讨芒柄花素对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 紫杉醇耐药细胞株的作用机制,负责人:张卫红。

\*\* 通讯作者:张卫红,科主任,硕士,研究方向:中西医结合乳腺疾病的基础与临床研究。

\*\*\* <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

正”之法来治疗该疾病<sup>[2]</sup>,其创制的“乳癌术后方”被证实可以明显降低ER阴性患者无病生存率<sup>[3]</sup>,方中君药“黄芪”,李时珍言“黄芪为补药之长”,为益气扶正法的代表药,既能健脾消痰,又能补气活血,助邪外出,有效防治乳腺癌的转移和复发。陆教授在临证中用黄芪扶正时还常选配党参,《本草从新》记载党参:“补中益气、和脾胃、除烦渴。”前期研究发现以“黄芪、茯苓”为主要成分的“益气扶正小复方”与特罗凯(一种表皮生长因子受体EGFR酪氨酸激酶抑制剂)联合使用能通过下调p-EGFR、p-Akt1,上调PTEN的表达显著抑制三阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-468的细胞增殖<sup>[4]</sup>。

目前研究已明确PI3K/Akt/mTOR信号转导通路在TNBC中的发生发展中有着非常重要的作用<sup>[5]</sup>,因此我们此次研究,选用益气复正大法中的“黄芪、党参”为主要药物,制备成益气复正复方(复方)与mTOR抑制剂依维莫司分别及联合作用于三阴性乳腺癌MDA-MB-468细胞,查看其对细胞的增殖抑制作用及对Akt/mTOR信号通路的影响。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品与试剂

黄芪、党参购自上海康桥中药饮片有限公司,DEME高糖培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国GIBCO公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙啶(PI)、牛胰岛素(Insulin)均购自美国Sigma公司;Annexin V/碘化丙啶(PI)试剂盒购自美国Beckman Coulter公司;抗体GAPDH及二抗购自康成生物;IRDye™ fluorescence antibodies(美国LI-COR Bioscience公司)。

### 1.2 实验仪器

恒温CO<sub>2</sub>细胞培育箱(Thermo Forma公司);低温高速离心机(KUBOTA公司),Synergy2酶标仪(Biotek公司);流式细胞仪(Beckman Coulter公司),TH4-200相差显微镜(OLYMPUS公司);全自动酶标仪MK3(Thermo Labsystems公司);Odyssey双色红外激光扫描成像系统(LICOR公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

MDA-MB-468人乳腺癌细胞购于上海生命科学研究院细胞库。在含10%胎牛血清、0.01 mg·mL<sup>-1</sup>牛胰岛素、100 U·L<sup>-1</sup>青霉素和10 mg·mL<sup>-1</sup>链霉素的DMEM高糖培养基中增殖MDA-MB-468细胞,37℃、

5% CO<sub>2</sub>恒温无菌培养箱中生长,每两天观察贴壁情况并换液。待细胞生长至80-90%时,0.25%胰酶消化后按比例传代。选取对数生长期的MDA-MB-468人乳腺癌细胞进行实验。

### 2.2 高效液相色谱法(HPLC)制备益气扶正复方药物

对益气扶正中药(黄芪:党参=10:6)复方进行提取、浓缩、干燥,以黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮、党参多糖、欧前胡索等成分含量为质控标准,采用高效液相色谱法(HPLC)制定提取物的质量标准,按此标准制备益气扶正中药复方。益气小复方药物干粉由上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心制备,对饮片质量、提取工艺、浓缩工艺和干燥工艺进行考察,以益气小复方药物黄芪、党参按照2:1的比例,加水回流提取3次,加水量为10倍,8倍,8倍,提取时间分别为1.5,1,1 h,滤过,滤液合并后减压浓缩,真空干燥,粉碎至中粉。采用高效液相法对所制备的益气小复方水提取物粉末进行有效成分(黄芪甲苷、芒柄花素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、党参炔苷)含量进行质量监测。本药物共使用5 kg生药药物,共制备获取250 g药物,每1 g粉末相当于生药20 g。药物于本实验室干燥器内保存。

### 2.3 细胞增殖检测

MTT法观察细胞增殖情况,将人乳腺癌MDA-MB-468细胞接种于96孔板(1×10<sup>4</sup>个细胞/孔),培养24小时至细胞贴壁后,更换培养液,分别运用10,20,40,80,160 mg·mL<sup>-1</sup>益气扶正中药(复方)干预细胞12,24,48 h,每一浓度做4个复孔,同时设阴性空白对照孔(只含细胞、培养液);配置0.5%MTT溶液,每孔加20 μL,37℃温育4 h后弃上清液,加入二甲基亚砷DMSO(150 μL/孔),震荡10 min使其充分溶解后,用全自动酶标仪于波长490 nm处测得各孔OD值,检测量效关系。计算复方药物对细胞生长的抑制率,并绘制效应曲线,同样的实验重复3次。计算公式:细胞生存率(%)=(OD药物组-OD空白对照)/(OD药物组-OD空白对照)×100%。用SPSS21.0软件拟合估计IC<sub>50</sub>值。同样的方法,运用1,10,100,1 000 nmol·L<sup>-1</sup>依维莫司(Everolimus)干预细胞12,24,48 h,观察其对细胞增殖的抑制作用,计算IC<sub>50</sub>值。用IC<sub>50</sub>浓度的复方40 mg·mL<sup>-1</sup>与Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>单独及联合干预MDA-MB-468乳腺癌细胞48 h,用Q值<sup>[6]</sup>估算合并用药的效果,判断是否存在协同作用,Q(%)=E<sub>a+b</sub>/(E<sub>a</sub>+E<sub>b</sub>-E<sub>a</sub>×E<sub>b</sub>)×100%,其中E<sub>a+b</sub>为两药联用组的增殖抑制率,E<sub>a</sub>、E<sub>b</sub>分别为复方40 mg·mL<sup>-1</sup>、Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>对MDA-MB-

468细胞的增殖抑制率, Q值若在0.85–1.15为单纯相加,若 $Q > 1.15$ 为有协同作用, $Q < 0.85$ 为拮抗。

#### 2.4 细胞周期检测

运用复方的 $IC_{50}$ 浓度作用MDA-MB-468细胞,48 h后收集各药物干预后的细胞,胰酶消化,1000  $r \cdot \min^{-1}$ 离心2 min,吸除上清液,PBS洗涤2遍,再次离心2 min,1 000  $r \cdot \min^{-1}$ 后提取细胞,加70%冰乙醇固定,4℃静置一夜。取出固定的标本,离心1 500  $r \cdot \min^{-1}$ ,5 min,弃去上清,加PBS洗涤细胞2遍,离心1 500  $r \cdot \min^{-1}$ ,离心5 min,PBS洗2遍。再加入PI染液室温避光染色30 min,上流式细胞仪,使用Mcycle软件检测分析细胞周期。

#### 2.5 细胞凋亡检测

同样方式处理细胞,参照Annexin-v/PI细胞凋亡检测试剂盒方法实验,使用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

#### 2.6 Western blot

提取各实验组蛋白(复方40  $mg \cdot mL^{-1}$ , Everolimus 100  $nmol \cdot L^{-1}$ , 复方+ Everolimus), Bradford法定量后制备样品, Western blot法检测mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt、PETEN及GAPDH蛋白的表达,GAPDH作为内参。将等量蛋白样品进行SDS-PAGE常规电泳、转膜,用含5%脱脂牛奶的TBST封闭1 h后,弃去封闭液,加入一抗,封入杂交袋内,4℃摇荡过夜。PBST清洗3次后,加入荧光二抗(1:10000稀释),避光培育1 h,PBST洗涤3次,加入化学底物助其显影、Odyssey红外荧光扫描成像系统读膜,分析各条带灰度值。

#### 2.7 统计方法

以上实验重复3次,计量资料均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS21.0软件,两均数比较用*t*检验。

### 3 结果

#### 3.1 益气扶正复方对乳腺癌MDA-MB-468细胞生长的影响

为了观察复方对MDA-MB-468细胞增殖的影响,我们运用复方于不同时间点干预细胞。实验结果如图1–3所示,在12, 24, 48 h, 复方10, 20, 40, 80, 160  $mg \cdot mL^{-1}$ 呈剂量依赖性地抑制了MDA-MB-468细胞增殖。干预细胞48 h时复方的 $IC_{50}$ 浓度为40  $mg \cdot mL^{-1}$ 。分别运用依维莫司(Everolimus)1, 10, 100, 1 000  $nmol \cdot L^{-1}$ 干预细胞12, 24, 48 h, Everolimus呈剂量、时间依赖性地抑制了MDA-MB-468乳腺癌细胞增殖。其48 h的 $IC_{50}$ 浓度约为100  $nmol \cdot L^{-1}$ 。分别运用 $IC_{50}$ 浓度的复方

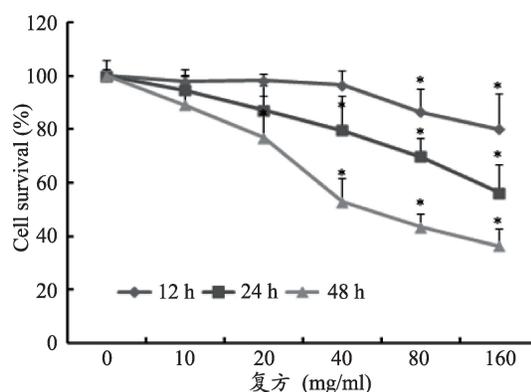


图1 复方对MDA-MB-468乳腺癌细胞存活率的影响  
复方与空白药物对照组比较, $P < 0.05$

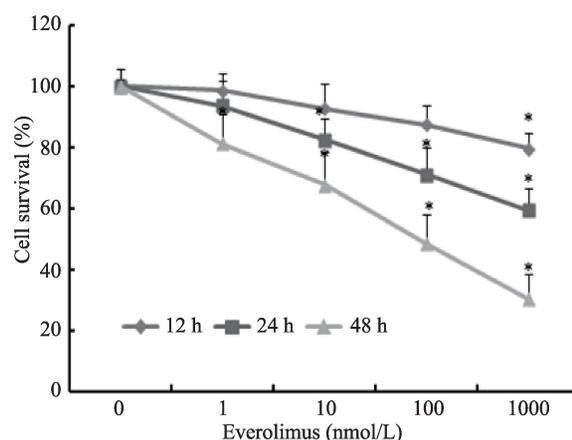


图2 Everolimus对MDA-MB-468乳腺癌细胞存活率的影响  
Everolimus与空白药物对照组比较, $P < 0.05$

表1 各药物组与空白药物对照组比较

组别	药物浓度	细胞生存率%		
		12 h	24 h	48 h
复方	10	72.05±2.56	94.64±7.66	89.14±10.74
	20	98.23±2.33	87.15±9.17	76.83±15.98*
	40	96.47±5.50	79.56±12.98*	52.92±8.83**
	80	86.43±8.60*	69.85±7.11**	43.42±4.97**
	160	79.96±13.65*	56.33±10.53**	36.36±6.63**
Everolimus	1	98.71±5.50	93.62±8.27	81.21±9.80**
	10	92.79±7.95	82.56±6.96**	67.78±10.58**
	100	87.45±6.28**	71.01±9.04**	48.44±9.63**
	1000	79.60±4.92**	59.38±7.36**	30.30±8.03**

\*, $p < 0.05$ , \*\*, $p < 0.01$

40  $mg \cdot mL^{-1}$ 与Everolimus 100  $nmol \cdot L^{-1}$ 单独及联合干预MDA-MB-468乳腺癌细胞48 h, 复方与Everolimus联合运用致MDA-MB-468乳腺癌细胞存活率降低至34%,并且两药合用Q值为43.89  $> 1.15$ ,表明两药有协同作用,结果如图4–5所示,两药合用提高了其对

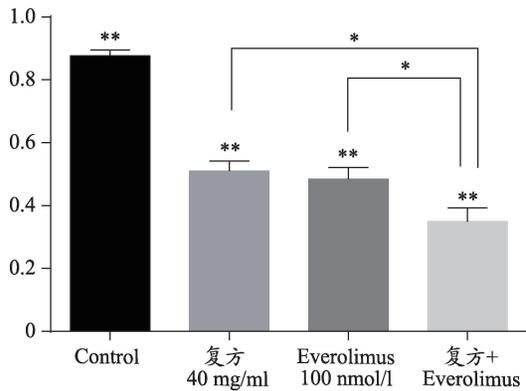


图3 益气扶正中药复方联合 Everolimus 对 MDA-MB-468 乳腺癌细胞存活率的影响

复方与 Everolimus 联合 vs. 复方单用; 复方与 Everolimus 联合 vs. Everolimus 单用, \* $P < 0.05$ , 各药物组与空白药物对照组比较, \*\* $P < 0.01$

表2 益气扶正中药复方单用、Everolimus 单用与两药联合使用比较

组别	细胞生存率%	P值	Q值
复方	54.21±7.89	<0.05	
Everolimus	51.00±9.02	<0.05	
复方+Everolimus	34.21±10.49		43.89

$P < 0.05$ , Q 值  $> 1.15$

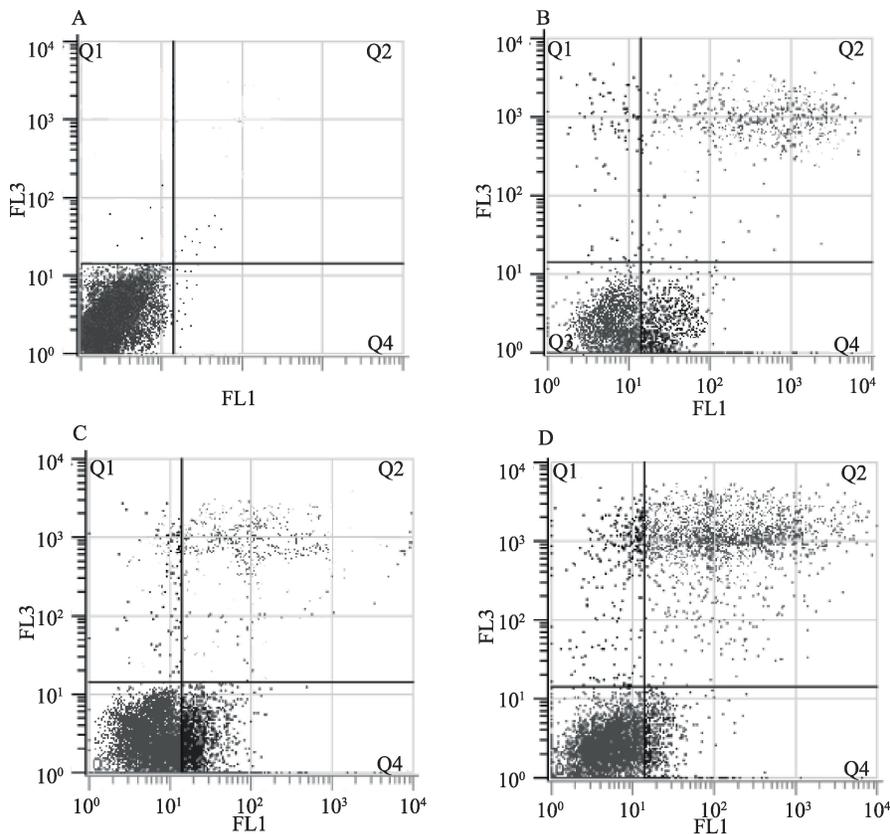


图4 益气扶正中药复方联合 Everolimus 对 MDA-MB-468 乳腺癌细胞凋亡的影响

A、空白对照; B、复方 40 mg·mL<sup>-1</sup>; C、Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>; D、复方 40 mg·mL<sup>-1</sup>+Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>。

MDA-MB-468 三阴性乳腺癌细胞的抑制作用。

### 3.2 益气扶正中药复方对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞凋亡的影响

分别运用 IC<sub>50</sub> 浓度的复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 干预 MDA-MB-468 乳腺癌细胞 48 h, 观察其对细胞凋亡的影响。实验结果如图 4 所示, 单独运用复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 和 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 诱导的细胞凋亡率分别为 20%、26%, 而联合运用后细胞凋亡率增至 41%。

### 3.3 益气扶正中药复方对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞周期的影响

分别运用 IC<sub>50</sub> 浓度的复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 干预 MDA-MB-468 乳腺癌细胞 48 h, 观察其对细胞周期的影响。实验结果如图 5 所示, 与空白对照比较, 复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 致 S 期细胞减少了 18%, 而 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 和联合用药分别致 G2/M 期和 S 期减少了 11% 和 15%。

### 3.4 益气扶正中药复方对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞 Akt/mTOR 信号通路的影响

分别运用 IC<sub>50</sub> 浓度的复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus

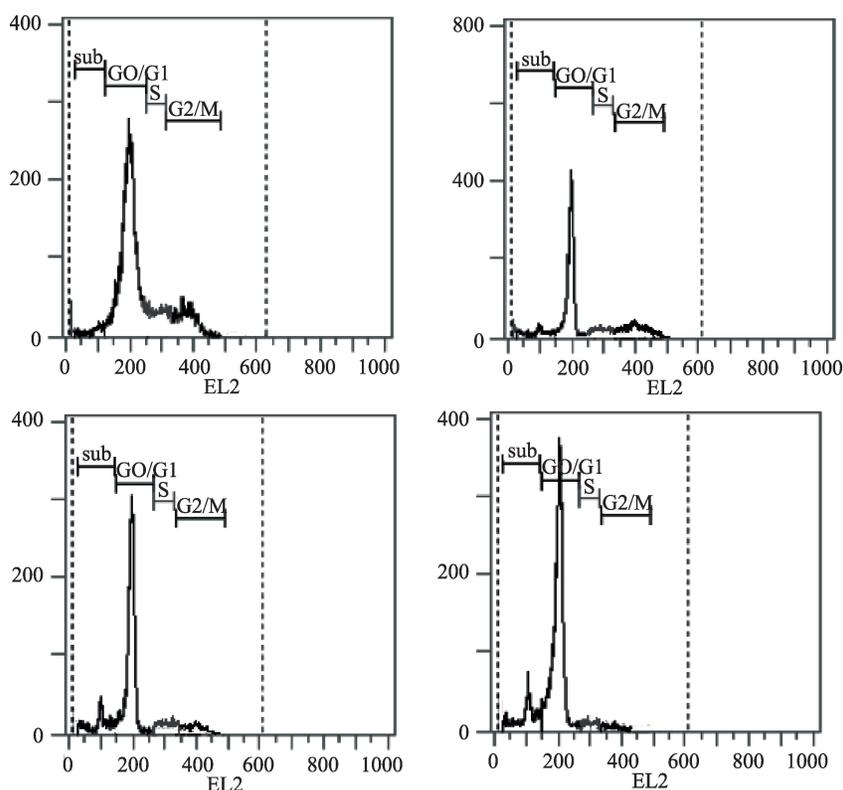


图5 益气扶正中药复方联合 Everolimus 对 MDA-MB-468 乳腺癌细胞周期的影响

A、空白对照;B、复方 40 mg·mL<sup>-1</sup>;C、Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>;D、复方 40 mg·mL<sup>-1</sup>+Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup>。

表3 益气扶正中药复方联合 Everolimus 对 MDA-MB-468 乳腺癌细胞周期的影响

组别	Sub	G0/G1	S	G2/M
对照组	0.53±0.13	43.88±3.85	36.22±6.97	19.38±3.49
复方	11.14±3.54**	48.71±3.18	13.11±2.42**	26.97±3.77
Everolimus	16.38±3.44**	56.9±6.47*	12.3±1.38**	14.43±3.08
复方+Everolimus	26.20±9.15**	53.86±9.68	9.94±1.71**	10±2.54*

各药物组与对照组比较,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$

100 nmol·L<sup>-1</sup> 干预乳腺癌 MDA-MB-468 细胞 48 h, 观察其对细胞 Akt/mTOR 信号通路的影响。实验结果显示, 在乳腺癌 MDA-MB-468 细胞中 mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt 均呈高表达趋势, 复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 与 Everolimus 100 nmol·L<sup>-1</sup> 联用显著抑制了 p-mTOR 和 p-Akt 的活性, 提高了 PTEN 的表达; 而单独运用复方 40 mg·mL<sup>-1</sup> 则显著提高了 PTEN 的表达, 同时抑制了 p-mTOR 和 p-Akt 的活性。

#### 4 讨论

全国名老中医陆德铭教授在五十年诊治乳腺癌的临床实践中创制了益气扶正大法。党参联合黄芪, 能使黄芪益气化痰散浊作用增强。现代中药药理研究<sup>[4]</sup>,

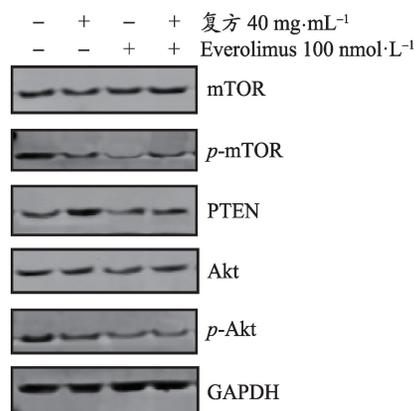


图6 益气扶正中药复方对 MDA-MB-468 乳腺癌细胞 Akt/mTOR 信号通路的影响

黄芪作为益气扶正法的代表药, 其抗肿瘤机制则主要是通过正向调节机体的功能, 从而达到抑制肿瘤的作用。陆教授临床中使用黄芪扶正同时还常选配党参, 以黄芪、党参为主的益气扶正复方具有显著的临床疗效<sup>[7]</sup>, 但其作用机制尚不明确。

我们此次研究发现, 复方单独作用于三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞株, 对其有增殖抑制作用, 复方与 m-TOR 抑制剂 Everolimus 联用具有协同作用, 对细

细胞的增殖抑制作用更为明显。前期研究发现,以黄芪、茯苓为主要成分的益气小复方对于三阴性乳腺癌MDA-MB-231 移植瘤有一定的抑瘤作用,益气小复方联合特罗凯,能提高特罗凯抑瘤作用<sup>[8]</sup>。这提示了以益气复药物对三阴性乳腺癌有抑制其增殖作用,而与西药联用抑瘤作用更为显著,我们以上实验只选取了黄芪、党参或黄芪、茯苓作为益气复正代表药物,而联用的西药则分别为 Everolimus 和特罗凯,是否以益气复正为主要作用的其它药物复方也能有类似的抑瘤作用,与其他抗肿瘤西药联用是否也存在协同作用,还有待后续探讨。

我们实验研究还发现,复方  $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  致 S 期细胞减少了 18%,而 Everolimus  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和联合用药分别致 G2/M 期和 S 期减少了 11% 和 15%,其机制有可能与复方能将细胞阻滞于 G0/G1 期有关。关于细胞周期的阻滞作用,有文献报道黄芪含药血清抑制了乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖,使细胞阻滞于 G0/G1 期<sup>[9]</sup>;党参通过将细胞阻滞于 G0/G1 期并诱导细胞凋亡来抑制肿瘤细胞的增殖作用<sup>[10]</sup>。王萌等发现<sup>[11]</sup>明党参根皮 5 种呋喃香豆素对人乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 表现出不同程度的增殖抑制作用,具有明显的抗肿瘤活性。而黄芪的有效成分之一芒柄花素也被证实可通过减少乳腺癌细胞 G1/S 期正调控因子 cyclin D1 和 cyclin E 的基因和蛋白表达,促进负调控因子 p21 和 p27 的基因和蛋白表达,从而将乳腺癌细胞阻滞于 G1 期,进而达到抑制乳腺癌细胞增殖目的<sup>[12]</sup>。我们此次的研究进一步证实了以黄芪和党参为主要药物的复方能将

细胞阻滞于 G0/G1 期。

PI3K/Akt/mTOR 作为细胞内一条重要的信号传导途径,普遍存在于细胞中。该通路过度激活后可促进细胞过度增殖、抑制细胞凋亡、促使细胞分化异常以及参与细胞自噬等导致肿瘤形成和促进肿瘤转移<sup>[13]</sup>。在我们前期对益气扶正法代表药黄芪及其成分的实验研究中,发现黄芪注射液和黄芪有效成分芒柄花素、黄芪甲苷都能抑制乳腺癌细胞增殖<sup>[14]</sup>,可以上调一些能抑制 Akt 磷酸化的相关抑癌基因,如能上调 PTEN 的基因和蛋白水平从而抑制 p-Akt(Thr308) 的表达,能上调 PP2A 的基因和蛋白水平从而抑制 p-Akt(Ser 473) 的表达<sup>[15]</sup>。前期研究还发现黄芪多糖能抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的增殖,下调 MDA-MB-468 细胞 Akt 磷酸化的水平,其抑制 MDA-MB-468 细胞增殖的机制可能与通过对 MDM2 正负反馈环的调节从而上调 p53 和 PTEN 蛋白的表达有关<sup>[16]</sup>。本研究发现,复方  $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  单独及与 Everolimus  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  联用都能抑制 p-mTOR 和 p-Akt 的活性,提高了 PTEN 的表达,说明复方及复方与 Everolimus 联用也可能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上的相关蛋白抑制乳腺癌 MDA-MB-468 细胞生长。

综上,实验结果显示,复方对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞增殖呈时间、剂量依赖性地抑制,复方与 Everolimus 联用增殖抑制效果更为显著,其机制可能与其能将乳腺癌细胞阻滞于 G0/G1 期、抑制 p-mTOR 和 p-Akt 的活性,提高 PTEN 的表达有关。

## 参考文献

- 张继博,史业辉,贾勇圣,等.三阴性乳腺癌治疗进展.肿瘤,2017,37(7):788-794.
- 刘静,Liu J.陆德铭教授运用扶正祛邪法治疗乳腺癌经验.中医学报,2016,31(4):470-473.
- 高晴倩,万华,李欣荣,等.“乳癌术后方”对乳腺癌术后患者无病生存期的影响.上海中医药杂志,2011(10):49-52.
- Liao M J, Ye M N, Zhou R J, et al. Yiqi formula enhances the antitumor effects of erlotinib for treatment of triple-negative breast cancer xenografts. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, (2014-10-19), 2014, 2014(2): 628712.
- Montero J C, Esparísogando A, Relouhau M F, et al. Active kinase profiling, genetic and pharmacological data define mTOR as an important common target in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, 2014, 33(2): 148-156.
- 张效文,严名,王芷芬,等.用Q值估计合并用药效果的新方法——“双30法”.上海交通大学学报(医学版),1985(5).
- 刘静.陆德铭教授治疗乳腺癌的经验总结及乳癌术后方治疗三阴性乳腺癌108例临床观察.上海:上海中医药大学博士学位论文,2015.
- Liao M J, Ye M N, Zhou R J, et al. Yiqi formula enhances the antitumor effects of erlotinib for treatment of triple-negative breast cancer xenografts. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2014(2): 628712.
- 谢长生,周雪明.黄芪含药血清对人乳腺癌 MCF-7 细胞的实验研究.浙江中医杂志,2013,48(5):365-367.
- Wang L, Xu M L, Hu J H, et al. Codonopsis lanceolata extract induces G0/G1 arrest and apoptosis in human colon tumor HT-29 cells--involvement of ROS generation and polyamine depletion. *Food Chem Toxicol*, 2011,49(1):149-154.
- 王萌,陈建伟,李祥.明党参根皮中5种呋喃香豆素类成分的体外抗

- 肿瘤活性. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 203-205.
- 12 周瑞娟, 陈红风, 叶媚娜, 等. 芒柄花素对不同亚型乳腺癌细胞周期基因和蛋白表达的影响. 药物评价研究, 2016, 39(3): 362-366.
- 13 Qiang W U, Zhao Q N, Song W D. The research and progress of PI3K/Akt/mTOR signal transduction pathway in tumors. *Journal of Diseases Monitor & Control*, 2013.
- 14 Zhou R, Xu L, Ye M, *et al.* Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways. *Horm Metab Res*, 2014, 46(11): 753.
- 15 邓樱, 陈红风. 黄芪注射液及其有效成分对乳腺癌细胞增殖和Akt磷酸化的影响. 结合医学学报(英文), 2009, 7(12): 1174-1180.
- 16 叶媚娜, 陈红风, 周瑞娟, 等. 黄芪多糖对基底细胞样乳腺癌细胞增殖和Akt磷酸化的影响. 结合医学学报(英文), 2011, 09(12): 1339-1346.

## Proliferation Inhibition Effect of Yiqi Fuzheng Formula Combined with Everolimus on Proliferation of Triple Negative Breast Cancer Cell Line MDA-MB-468 Cells and Its Impact on Akt/mTOR Signaling Pathway

Li Tian<sup>1</sup>, Zhou Qianmei<sup>2</sup>, Zhang Weihong<sup>\*</sup>

(1. Breast Surgery Department, Shuguang Hospital Baoshan Branch Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201900, China; 2. Complex System Research Center Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** This study was aimed to explore effects of *Yiqi Fuzheng* formula (YFF) joint with Everolimus on cell cycle and apoptosis of triple negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-468 cells, and to observe its impact on Akt/mTOR signal pathway. High performance liquid chromatography (HPLC) was used for the preparation of YFF. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the MDA-MB-468 cell proliferation inhibition of 10, 20, 40, 80, 160 mg · mL<sup>-1</sup> YFF and 1, 10, 100, 1000 nmol · L<sup>-1</sup> of Everolimus for 12, 24 and 48 h. MDA-MB-468 breast cancer cells were treated with IC<sub>50</sub> YFF of 40 mg · mL<sup>-1</sup> and Everolimus of 100 nmol · L<sup>-1</sup> for 48 h. And then, the inhibition of cell proliferation was observed and the cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the effect of Akt/mTOR signal pathway on cells. The results showed that YFF and Everolimus inhibited the proliferation of MDA-MB-468 breast cancer cells in a dose- and time-dependent manner. Intervened individually and jointly by IC<sub>50</sub> YFF of 40 mg · mL<sup>-1</sup> and Everolimus of 100 nmol · L<sup>-1</sup>, the combined treatment group significantly inhibited the proliferation of MDA-MB-468 breast cancer cells. At the meantime, it inhibited the activity of *p*-mTOR and *p*-Akt and increased the expression of PTEN. It was concluded that both YFF and Everolimus can inhibit proliferation of TNBC cell line MDA-MB-468, while the combination group had more significant effect. The antiproliferation mechanisms may be related to its effects of repressing the activity of *p*-mTOR and *p*-Akt, and also up-regulating the expressions of PTEN.

**Keywords:** Triple negative breast cancer, *Yiqi Fuzheng* formula, proliferation inhibition effect, Akt / mTOR signal pathway

(责任编辑:张娜娜, 责任译审:王 晶)