

奈达铂对乳腺癌细胞增殖、侵袭转移、凋亡及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响*

杨莉 黄娇 彭媛 母立峰 刘福

(川北医学院附属医院药剂科, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨奈达铂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭转移及凋亡的影响, 并探讨相关作用机制。方法 体外培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株, 分为空白对照组、阳性对照组(1 μ mol/L 多西紫杉醇)及奈达铂低、中、高剂量组(15、30、45 μ g/mL 奈达铂)。MTT 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖能力; AnnexinV-FITC/PI 双染法检测 MDA-MB-231 细胞凋亡情况; Transwell 实验、划痕实验分别检测细胞侵袭、迁移能力; 蛋白免疫印迹法检测增殖细胞核抗原(PCNA)、凋亡相关蛋白[B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)]、侵袭迁移相关蛋白[E-钙粘附蛋白(E-cadherin)、N-钙粘附蛋白(N-cadherin)]及通路相关蛋白[Toll 样受体 4(TLR4)、髓样细胞分化蛋白 88(MyD88)、核转录因子 kappa B(NF- κ B)、白细胞介素(IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]的表达变化。结果 与空白对照组相比, 24、48 h 时奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率显著升高(均 $P < 0.05$), 呈剂量依赖性, 且高剂量组与阳性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白对照组比较, 奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞凋亡率、Bax、E-cadherin 蛋白表达显著升高, 侵袭细胞数、细胞迁移率及 PCNA、Bcl-2、N-cadherin、TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平显著降低(均 $P < 0.05$), 呈剂量依赖性, 且高剂量组与阳性对照组无显著差异($P > 0.05$)。结论 奈达铂可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭及迁移并促进细胞凋亡, 可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化实现的。

【关键词】 奈达铂; 乳腺癌; 增殖; 侵袭及迁移; 凋亡; Toll 样受体 4/核转录因子 kappa B 通路

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 026

Effects of nedaplatin on proliferation, invasion and metastasis, apoptosis and TLR4/NF- κ B signaling pathway in breast cancer cells

YANG Li, HUANG Jiao, PENG Yuan, MU Lifeng, LIU Fu

(Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of nedaplatin on the proliferation, invasion, metastasis and apoptosis of breast cancer MDA-MB-231 cells, and explore the related mechanism. **Methods** Human breast cancer cell line MDA-MB-231 was cultured in vitro and divided into blank control group, positive control group (1 μ mol/L docetaxel) and nedaplatin low, medium and high dose groups (15, 30, 45 μ g/mL nedaplatin). The proliferation of MDA-MB-231 cells was detected by MTT assay. The apoptosis of MDA-MB-231 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. Transwell test and scratch test were used to detect cell invasion and migration; the changes of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B cell-lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), invasion migration-associated proteins (E-cadherin), N-cadherin (N-cadherin) and Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), nuclear transcription factor-kappa B (NF- κ B), interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by Western blot. **Results** Compared with that in the blank control group, the proliferation inhibition rate of MDA-MB-231 cells in low, medium and high dose nedaplatin groups was significantly increased at 24 and 48 h ($P <$

基金项目: 中国药学会科技开发中心项目(CMEI2020KPYJ00112)

通信作者: 刘福, 硕士, 主任药师, E-mail: fe283p@163.com

引用本文: 杨莉, 黄娇, 彭媛, 等. 奈达铂对乳腺癌细胞增殖、侵袭转移、凋亡及 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(1): 140-

145.150. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 01. 026

0.05), in a dose-dependent manner, and there was no significant difference between the high-dose group and the positive control group ($P > 0.05$). Compared with those in the blank control group, the apoptosis rate of MDA-MB-231 cells and Bcl-2, E-cadherin protein expression in low, medium and high dose nedaplatin groups were significantly increased ($P < 0.05$), the invasive cell number, cell migration rate and the expression levels of PCNA, Bax, N-cadherin, TLR4, MyD88, NF- κ B, IL-1 β and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.05$), in a dose-dependent manner, there was no significant difference between high dose group and positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Nedaplatin can inhibit the proliferation, invasion and migration of MDA-MB-231 cells and promote cell apoptosis, which may be realized by inhibiting the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] Nedaplatin; Breast cancer; Proliferation; Invasion and migration; apoptosis; Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway

乳腺癌是一种乳腺上皮组织恶性肿瘤,对女性生命健康有较大威胁^[1-2]。目前,手术及放化疗是治疗乳腺癌的主要手段,其中顺铂是治疗多种实体瘤的一线化疗药,但由于肿瘤细胞原发或继发耐药性的产生,以及顺铂具有较明显的肾毒性、胃肠道反应等,使其治疗效果欠佳,目前临床也将多西紫杉醇作为乳腺癌、卵巢癌等恶性肿瘤的一线用药^[3-4]。奈达铂是日本研发的第二代铂类抗肿瘤药,具有抗癌谱广、活性强、肾毒性小、胃肠道反应低的特点,临床研究证实其对宫颈癌、乳腺癌等实体肿瘤均有效^[5-6]。然而,目前有关奈达铂对乳腺癌的治疗作用机制尚未统一。因此,本研究通过探讨奈达铂对乳腺癌细胞行为学的影响及可能的机制,旨在为临床治疗乳腺癌提供更多的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株(货号 BNCC337893)购自北京北纳创联生物技术研究院。

奈达铂(HY-13700,规格 50 mg)购自美国 MCE 公司;DMEM-H 培养基(GC3110-100ML)购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2-四甲基偶氮噻唑蓝(MTT)(1120-02-1)均购自美国 sigma 公司;蛋白提取试剂盒(BC3711-50T)、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒(556547)均购自上海谷研实业有限公司;兔抗人增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen,PCNA)(ATA 35203)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(BYFG-70R-36053)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)(RM-9106)、E-钙粘附蛋白(E-cadherin)(ACRO)、N-钙粘附蛋白(N-cadherin)(M00403-FCZ)、Toll 样受体 4(Toll-like receptor4, TLR4)(BYFG-70R-11717)、髓样细胞分化蛋白 88(Myeloid differentiation primary response gene88, MyD88)(310748-T08)、核转录因子 kappa B(Nuclear factor-kappa B, NF- κ B)(ATA33868)、白细胞介素(Interleu-

kin-1 β , IL-1 β)(ATA31401)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)(ATA38860)、GAPDH(ABP57456)多克隆抗体、山羊抗兔 HRP(SE12-0.1)二抗均购自北京索莱宝科技有限公司。

CO₂ 细胞培养箱(型号 NHD DYE1738)、酶标仪(型号 ELx800)购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏 MDA-MB-231 细胞,培养于含 10% FBS+90% DMEM-H 培养基中,置于 37℃ 饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中,每 2~3 天更换一次培养液,PBS 清洗两遍后,加入 6 mL(/100 mm 皿)胰酶,在显微镜下观察,期间禁止摇晃培养皿,细胞刚有脱落时,吸除大部分胰酶,留约 0.5 mL,移至培养箱消化,约 2 min 取出,加入 10% FBS+90% DMEM-H 培养基终止消化,吹打均匀,进行传代培养。

1.2.2 细胞分组及处理 取 1.2.1 对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,接种至 96 孔板(5×10⁴ 个/孔),当细胞生长至 60%~70% 融合时换无血清培养液继续培养 24 h,将细胞随机分成 5 组:①空白对照组:只含 MDA-MB-231 细胞,培养细胞 48 h。②阳性对照组:加入 1 μ mol/L 多西紫杉醇^[7]溶液,培养细胞 48 h。③奈达铂低、中、高剂量组:分别加入 32、64、96 μ g/mL 奈达铂^[8]溶液,培养细胞 48 h。收集细胞用于后续实验。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖能力 取 1.2.2 各组培养 48 h 的 MDA-MB-231 细胞重悬并接种于 96 孔培养板(5×10⁴ 个/孔),均于培养 12、24、48 h 后向各孔加入 20 μ L MTT,继续培养 4 h 后,弃去上清,加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min。于 490 nm 处测定各孔细胞光密度(Optic density, OD)值,每组设 6 个复孔,取平均值。计算细胞增殖抑制率(%)=(对照组 OD-实验组 OD)/对照组 OD×100%。试验重复 3 次。

1.2.4 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡情况 取 1.2.2 各组培养 48 h 的 MDA-MB-231 细胞,使用 AnnexinV-FITC/PI 双染试剂盒及流式细胞仪

检测细胞凋亡情况, PBS 溶液洗涤 2 次, 弃上清, 并调节浓度至 1×10^6 个/mL 的细胞悬液, 取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液加入 $5 \mu\text{L}$ 的 Annexin V/FITC 及 $10 \mu\text{L}$ 的 PI ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$) 混匀, 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测凋亡率。每组均设 3 个重复。

1.2.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 取液态 Matrigel 基质胶 ($50 \mu\text{L}$, $2.0 \text{ mg}/\text{mL}$) 于 Transwell 小室上层, 凝固 30 min ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), 取 1.2.2 各组培养 48 h 的 MDA-MB-231 细胞, 接种至小室上层 (3×10^3 个/孔), 小室下层加入含 10% FBS 的培养基 ($600 \mu\text{L}$), 孵育 24 h。用棉签擦除上层未迁移细胞, 下层用甲醛溶液 (4%) 固定 15 min; 结晶紫染色 (0.2%, 20 min), 冲洗、封片。拍照、统计各组侵袭细胞数。试验重复 3 次。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取 1.2.2 各组培养 48 h 的 MDA-MB-231 细胞重悬并接种于 24 孔板 (2.5×10^4 个/孔), 待细胞铺满底部时, 利用灭菌枪头 ($10 \mu\text{L}$) 呈做“一”字划痕, 分别于 0、24 h 后显微镜下取点, 观察并拍照。以初始距离为对比, 测量细胞迁移距离并计算细胞迁移率。细胞迁移率 (%) = $(d_{0h} - d_{24h}) / d_{0h} \times 100\%$, 每组设 6 个复孔, 取平均值。试验重复 3 次。

1.2.7 蛋白免疫印迹法检测增殖、侵袭迁移、凋亡及 TLR4/NF- κB 通路相关蛋白表达变化 取 1.2.2 各组培养 48 h 的 MDA-MB-231 细胞, 每组均设 6 个重复, PBS 洗涤 2 遍, 冰上加裂解液, 裂解 30 min, 离心取上清, 取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 电泳分离, 电泳结束后, 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上 (95 mA 电流) 3 h, 脱脂牛奶 (5%) 封闭 3 h, 室温封闭 1 h, 加入 PCNA、caspase-3、Bcl-2、Bax、N-Cadherin、E-Cadherin、TLR4、MyD88、NF- κB 、IL-1 β 、TNF- α 、GAPDH 抗体作为一抗, 稀释比均为 (1:1000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 次日加入 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1:5000), 室温孵育 2 h, 显色、显影定影, 分析各蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析 数据采用 SPSS 22.0 进行统计分

析, 计量资料以均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 MDA-MB-231 细胞增殖能力比较 与空白对照组比较, 12 h 时各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率无显著差异 ($P > 0.05$), 24、48 h 时奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率显著升高 (均 $P < 0.05$), 呈剂量依赖性, 且高剂量组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$); 随着培养时间的延长, 奈达铂低、中、高剂量各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率显著升高 ($P < 0.05$), 有时间依赖性, 见图 1。

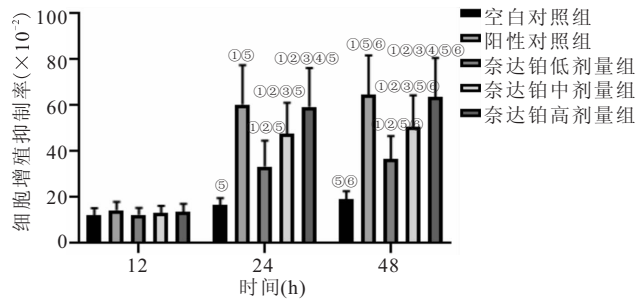


图 1 各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率比较

Figure 1 Comparison of inhibition rate of MDA-MB-231 cell proliferation in each group

注: 与空白对照组比较, ① $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ② $P < 0.05$; 与奈达铂低剂量组比较, ③ $P < 0.05$; 与奈达铂中剂量组比较, ④ $P < 0.05$ 。同组间, 与 12 h 比较, ⑤ $P < 0.05$; 与 24 h 比较, ⑥ $P < 0.05$

2.2 各组 MDA-MB-231 细胞凋亡情况比较 与空白对照组 [(8.66 ± 1.29)%] 比较, 阳性对照组 [(47.95 ± 7.19)%] 以及奈达铂低 [(16.77 ± 2.52)%]、中 [(33.73 ± 5.06)%]、高剂量组 [(48.25 ± 7.23)%] MDA-MB-231 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 奈达铂各组呈剂量依赖性, 且高剂量组 MDA-MB-231 细胞凋亡率与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 2。

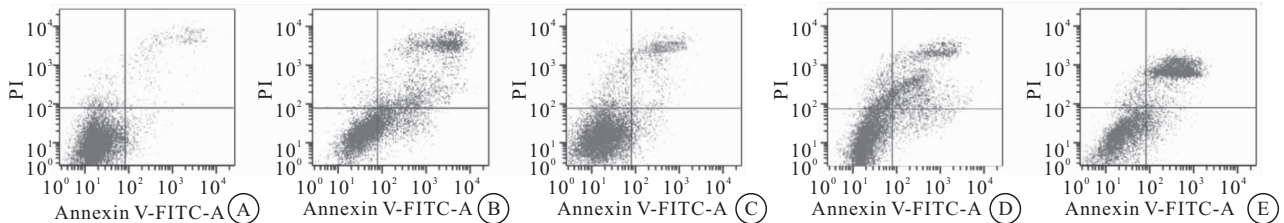


图 2 各组 MDA-MB-231 细胞凋亡情况比较

Figure 2 Comparison of apoptosis of MDA-MB-231 cells in each group

注: A. 空白对照组; B. 阳性对照组; C. 奈达铂低剂量组; D. 奈达铂中剂量组; E. 奈达铂高剂量组

2.3 各组 MDA-MB-231 细胞侵袭情况比较 与空白对照组 $[(310.15 \pm 46.52)$ 个] 比较, 阳性对照组 $[(125.83 \pm 18.87)$ 个] 以及奈达铂低 $[(278.97 \pm 41.85)$ 个]、中 $[(212.58 \pm 31.88)$ 个]、高剂量组

$[(123.37 \pm 18.51)$ 个] 侵袭细胞数显著减少 (均 $P < 0.05$), 奈达铂各组呈剂量依赖性, 且高剂量组 MDA-MB-231 细胞侵袭细胞数与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 3。

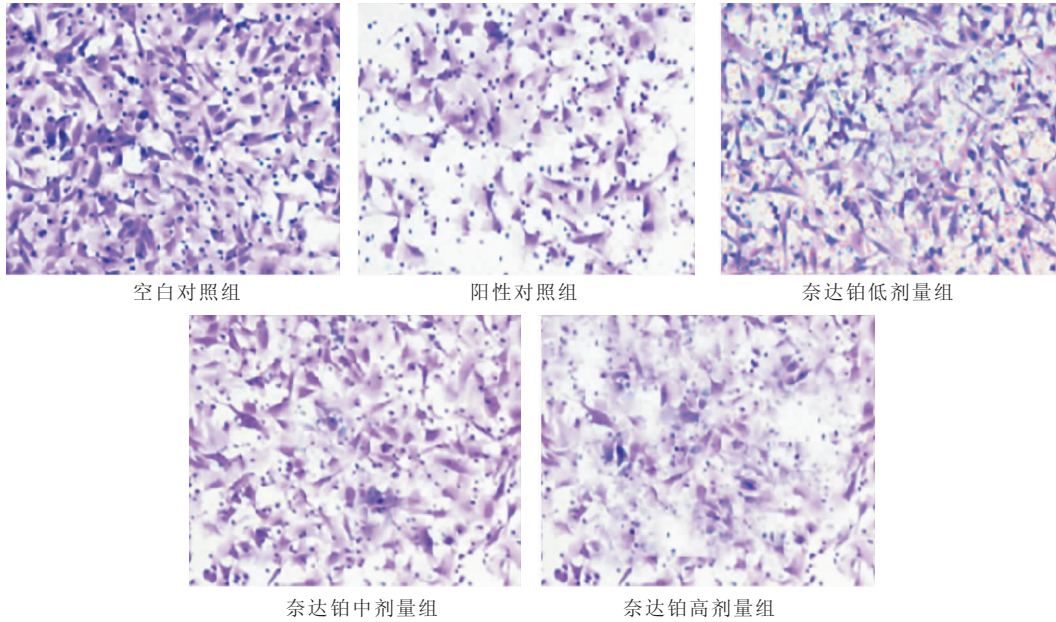


图 3 各组 MDA-MB-231 细胞侵袭情况比较 (200×)

Figure 3 Comparison of invasion of MDA-MB-231 cells in each group

2.4 各组 MDA-MB-231 细胞迁移情况比较 与空白对照组 $[(43.16 \pm 6.47)\%$] 比较, 阳性对照组 $[(15.66 \pm 2.35)\%$] 以及奈达铂低 $[(35.98 \pm 5.38)\%$]、中 $[(22.01 \pm 3.30)\%$]、高剂量组 $[(15.37$

$\pm 2.31)\%$] 细胞迁移率显著降低 (均 $P < 0.05$), 奈达铂各组呈剂量依赖性, 且高剂量组细胞迁移率与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 4。

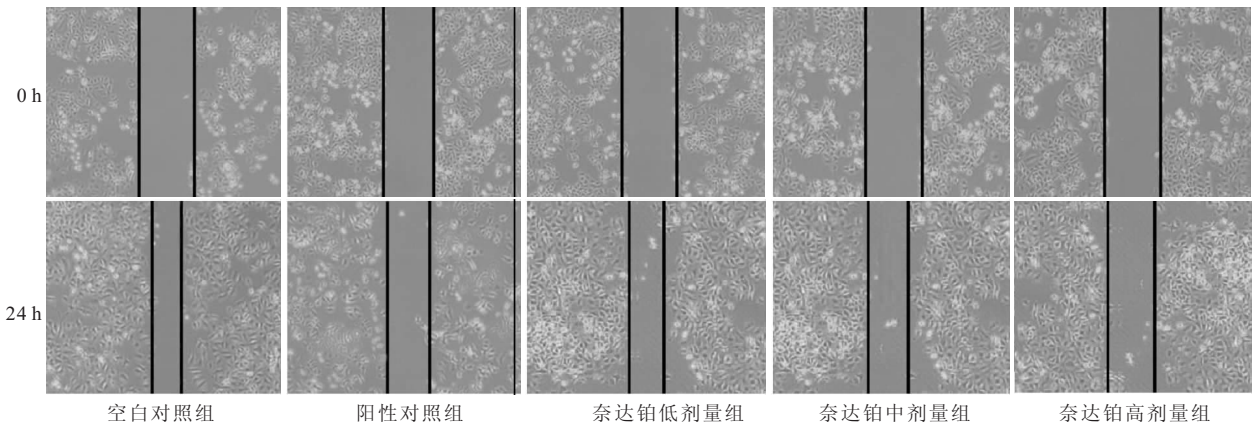


图 4 各组 MDA-MB-231 细胞迁移情况比较 (40×)

Figure 4 Comparison of MDA-MB-231 cell migration in each group

2.5 各组 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭迁移及凋亡相关蛋白表达情况比较 与空白对照组比较, 阳性对照组以及奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2、N-Cadherin 蛋白表达显著降低, Bax、E-Cadherin 蛋白表达显著升高 (均 $P < 0.05$), 奈达铂各组呈剂量

依赖性, 且高剂量组 MDA-MB-231 细胞 PCNA、Bax、Bcl-2、E-Cadherin、N-Cadherin 蛋白表达与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 5、表 1。

2.6 各组 MDA-MB-231 细胞 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达情况比较 与空白对照组比较, 阳性对照

组以及奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞 TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 奈达铂各组呈剂量依赖性, 且高

剂量组 MDA-MB-231 细胞 TLR4、MyD88、NF-κB、IL-1β、TNF-α 蛋白表达水平与阳性对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 6、表 2。

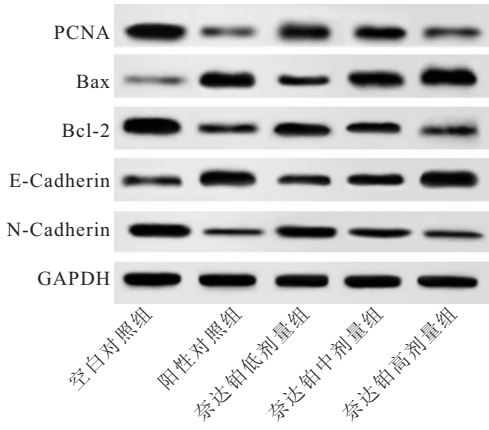


图 5 各组 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭迁移及凋亡相关蛋白表达情况比较

Figure 5 Comparison of proliferation, invasion and migration and apoptosis related protein expression of MDA-MB-231 cells in each group

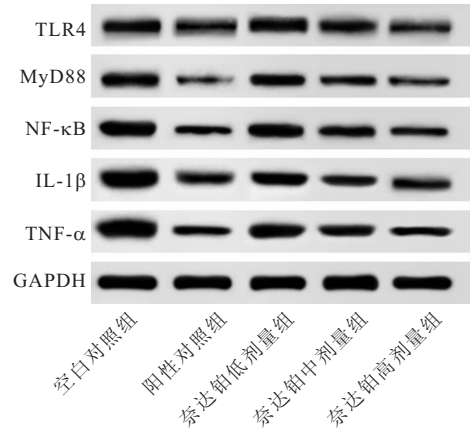


图 6 各组 MDA-MB-231 细胞 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达情况比较

Figure 6 TLR4 / NF-κB of MDA-MB-231 cells in each group- κ Comparison of the expression of B pathway related proteins

表 1 各组 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭迁移及凋亡相关蛋白表达情况比较 [$\bar{x} \pm s$, $n=6$]

Table 1 Comparison of MDA-MB-231 cell proliferation, invasion and migration and expression of apoptosis related proteins in each group

组别	PCNA/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	E-Cadherin/GAPDH	N-Cadherin/GADPH
空白对照组	1.28±0.19	0.27±0.04	1.26±0.19	0.38±0.06	1.15±0.17
阳性对照组	0.36±0.05 ^①	1.32±0.20 ^①	0.33±0.05 ^①	1.27±0.19 ^①	0.29±0.04 ^①
奈达铂					
低剂量组	0.93±0.14 ^{①②}	0.58±0.09 ^{①②}	0.98±0.15 ^{①②}	0.56±0.08 ^{②③}	0.83±0.12 ^{①②}
中剂量组	0.70±0.11 ^{①②③}	0.96±0.14 ^{①②③}	0.67±0.10 ^{①②③}	0.85±0.13 ^{②③④}	0.66±0.10 ^{①②③}
高剂量组	0.38±0.06 ^{①③④}	1.33±0.20 ^{①③④}	0.32±0.05 ^{①③④}	1.28±0.20 ^{②③④}	0.30±0.05 ^{①③④}
F	61.177	59.278	68.629	48.399	69.841
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阳性对照组比较,② $P < 0.05$;与奈达铂低剂量组比较,③ $P < 0.05$;与奈达铂中剂量组比较,④ $P < 0.05$

表 2 各组 MDA-MB-231 细胞 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达情况比较 [$\bar{x} \pm s$, $n=6$]

Table 2 TLR4 / NF-κB in MDA MB 231 cells in each group κ B pathway related protein expression

组别	TLR4/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF-κB/GAPDH	IL-1β/GAPDH	TNF-α/GAPDH
空白对照组	1.18±0.18	1.07±0.16	1.22±0.18	1.30±0.19	1.36±0.21
阳性对照组	0.25±0.04 ^①	0.18±0.03 ^①	0.41±0.06 ^①	0.47±0.07 ^①	0.51±0.08 ^①
奈达铂					
低剂量组	0.93±0.14 ^{①②}	0.88±0.13 ^{①②}	0.95±0.13 ^{①②}	0.98±0.15 ^{②③}	1.03±0.15 ^{①②}
中剂量组	0.61±0.09 ^{①②③}	0.53±0.08 ^{①②③}	0.67±0.09 ^{①②③}	0.70±0.09 ^{②③④}	0.85±0.13 ^{①②③}
高剂量组	0.26±0.04 ^{①③④}	0.19±0.03 ^{①③④}	0.43±0.06 ^{①③④}	0.47±0.05 ^{②③④}	0.52±0.08 ^{①③④}
F	79.730	95.296	56.229	51.510	40.259
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组比较,① $P < 0.05$;与阳性对照组比较,② $P < 0.05$;与奈达铂低剂量组比较,③ $P < 0.05$;与奈达铂中剂量组比较,④ $P < 0.05$

3 讨论

乳腺癌是最常见乳腺导管上皮恶性肿瘤,发病率呈逐年上升趋势,已成为全世界女性死亡的主要原因之一^[9-10]。顺铂能损伤肿瘤细胞的 DNA 诱导肿瘤细胞凋亡,但其反复应用也易诱导乳腺癌细胞产生耐药性,严重影响治疗效果^[11-12]。奈达铂即顺-甘醇酸二氨

合铂,与顺铂比较,其毒副作用较小,治疗乳腺癌有一定疗效及安全性^[13-14]。莫远群等^[15]研究显示,与顺铂+吉西他滨治疗组比较,奈达铂+吉西他滨治疗组三阴性乳腺癌患者治疗有效率升高,不良反应显著降低,且安全性较好。然而目前有关奈达铂治疗乳腺癌具体机制尚未统一。TLR4 介导信号转导途径主要是

炎症信号通路,与肿瘤关系密切^[16-17]。张祥建等^[18]研究显示,由黄芪、党参、白术等制成的冻干粉制剂可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路促进细胞凋亡,进而增加乳腺癌细胞对紫杉醇的化疗敏感性。本研究通过体外培养乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,分析奈达铂对其生物学行为及 TLR4/NF- κ B 通路的影响,旨在为临床提高乳腺癌治疗效果提供参考。

肿瘤发生和发展被认为是细胞增殖与凋亡失衡、细胞发生侵袭转移等因素共同作用的结果^[19]。PCNA 能够调节肿瘤细胞 DNA 复制,在癌变组织中呈高表达,Bcl-2 能够阻碍细胞皱缩、DNA 是内源性抗凋亡因子,Bax 是人体最主要促凋亡基因,caspase-3 是细胞凋亡过程关键执行者之一,处于凋亡途径的核心环节^[20-21]。E-cadherin、N-cadherin 是上皮-间充质转化生物学过程的分子学标志物,介导细胞连接作用,E-cadherin 蛋白表达降低,N-cadherin 蛋白表达升高,胞间黏附作用减弱,进一步促使细胞向周边组织侵袭、转移^[22]。本研究结果显示,与空白对照组比较,24、48 h 时奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率显著升高,呈剂量依赖性;随着培养时间的延长,奈达铂低、中、高剂量各组 MDA-MB-231 细胞增殖抑制率显著升高,呈时间依赖性。与空白对照组比较,48 h 时奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞凋亡率、Bax、E-cadherin 蛋白水平显著升高,侵袭细胞数、细胞迁移率及 PCNA、Bcl-2、N-cadherin 蛋白水平显著降低,有剂量依赖性。这说明奈达铂可能抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭及迁移,并诱导细胞凋亡。

TLR4/NF- κ B 是一条炎症信号通路,与 TLR4 相应配体如内毒素结合后再与 MyD88 的 C 末端链接形成复合体,进一步使复合体发生磷酸化反应,使 NF- κ B 激活处于游离状态,进而透过核膜从胞质进入核内,促使 IL-1 β 、TNF- α 等发生基因转录。炎症因子又可反作用于信号分子 TLR4,导致炎症反应循环往复,造成 DNA 不可逆损伤或突变,使肿瘤细胞增殖^[23-24]。张祥建等^[25]研究显示,扶正类中药(黄芪、党参、白术等)制备而成的冻干粉制剂可抑制乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,逆转细胞对紫杉醇的耐药性,可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化有关。本研究结果显示,与空白对照组比较,奈达铂低、中、高剂量组 MDA-MB-231 细胞 TLR4、MyD88、NF- κ B、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平显著降低,呈剂量依赖性,与既往相关研究结果一致。这说明奈达铂可抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭及迁移并诱导凋亡,可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路活化实现的。但本

研究未能明确 TLR4/NF- κ B 通路在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的具体作用机制,后期仍需进一步研究。

4 结论

奈达铂可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路活化抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、侵袭及迁移并诱导细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] QASEEM A, LIN JS, MUSTAFA RA, *et al*. Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Screening for Breast Cancer in Average-Risk Women: A Guidance Statement From the American College of Physicians[J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(8):547-560.
- [2] 黄育北, 佟仲生, 陈可欣, 等. 《中国女性乳腺癌筛查指南》解读(精简版)[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(9):433-441.
- [3] WANG Z, XU L, WANG H, *et al*. Lobaplatin-based regimens outperform cisplatin for metastatic breast cancer after anthracyclines and taxanes treatment[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(5):909-916.
- [4] ATHAK K, AKHTAR N. Nanocarriers for the Effective Treatment of Cervical Cancer: Research Advancements and Patent Analysis[J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2018, 12(2):93-109.
- [5] 范姝婕, 刘俊雅, 王俊, 等. HSP90 靶向抑制剂 P7 与多西紫杉醇联用对三阴性乳腺癌细胞的协同抗肿瘤作用[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(5):659-663.
- [6] 蔡志强, 杨继元, 苏小岩, 等. 中晚期宫颈癌用奈达铂、顺铂同期放疗效果分析[J]. *中国继续医学教育*, 2019, 11(8):131-134.
- [7] 王丽丽, 欧阳明玥, 赵松, 等. 多西紫杉醇诱导的多倍体非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及凋亡特性研究[J]. *肿瘤研究与临床*, 2020, 32(9):606-612.
- [8] 曾娅. 奈达铂对人卵巢癌顺铂耐药细胞株 SKOV3/DDP 的作用及其作用机制的初步研究[D]. 南京:东南大学, 2013.
- [9] SOMASHEKHAR SP, SEPÚLVEDA MJ, PUGLIELLI S, *et al*. Watson for Oncology and breast cancer treatment recommendations: agreement with an expert multidisciplinary tumor board [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(2):418-423.
- [10] 潘瑞金, 杨格, 林佳慧, 等. MYPT1 通过 RLC-NMHCIIA 参与乳腺癌转移的调控[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(4):617-619.
- [11] QIN T, LI B, FENG X, *et al*. Abnormally elevated USP37 expression in breast cancer stem cells regulates stemness, epithelial-mesenchymal transition and cisplatin sensitivity[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):287-291.
- [12] GUO XL, KANG XX, WANG YQ, *et al*. Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by covalently conjugating with polyamidoamine dendrimer for enhanced synergistic cancer therapy [J]. *Acta Biomater*, 2019, 84(15):367-377.
- [13] 敖睿, 朱学强, 刘浩, 等. 奈达铂对比顺铂同步调强放疗治疗局部晚期头颈部鳞癌 r 临床观察[J]. *医药前沿*, 2018, 8(19):122-124.

考区间,可能会导致妊娠期间假阳性率升高,引起误诊和漏诊。

4 结论

本研究初步建立了正常孕妇不同孕期 PT、APTT、FIB、TT、DD、AT、FDP 水平的参考区间,有利于了解妊娠期妇女凝血与纤溶系统的变化,为妊娠期出血及血栓相关疾病的诊断提供了实验室依据。

【参考文献】

[1] CUI C J, YANG S, ZHANG J, *et al.* Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy[J]. *Thromb Res*, 2017, 156: 82-86.

[2] WILES K, BRAMHAM K, SEED PT, *et al.* Serum creatinine in pregnancy: a systematic review[J]. *Kidney Int Rep*, 2019, 4(3): 408-419.

[3] 黄秀群. 妊娠期女性凝血功能 4 项指标检测的临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(2): 87.

[4] CUI C, YANG S, ZHANG J, *et al.* Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy[J]. *Thromb Res*, 2017, 156: 82-86.

[5] YANG Y, JIANG H, TANG A, *et al.* Changes of serum homocysteine levels during pregnancy and the establishment of reference intervals in pregnant Chinese women, *Clin Chim Acta*, 2019, 489: 1-4.

[6] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学(第 9 版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 43-45.

[7] DAI Y, LIU J, YUAN E, *et al.* Gestational age-specific reference intervals for 15 biochemical measurands during normal pregnancy in China[J]. *Ann Clin Biochem*, 2018, 55(4): 446-452.

[8] Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the

Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition. CLSI document C28-A3[R]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.

[9] 夏薇, 陈婷梅. 临床血液学检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 236-278.

[10] MILOVANOV A P, KUZNETSOVA N B, FOKINA T V. Role of Immune Distribution of Tissue Factor in the Development of Hemostasis during the First Trimester of Normal Pregnancy[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 166(4): 503-506.

[11] 赵宗瑞, 李严, 靳增明, 等. 妊娠妇女血清 TSH、FT3、FT4、TT3、TT4 参考区间的建立及变化趋势探究[J]. *国际医药卫生导报*, 2019, 25(22): 3738-3741.

[12] 荆晶, 李瑞, 赵媛, 等. 西安地区妊娠女性孕早、中、晚期血液学相关参数参考区间建立[J]. *临床检验杂志*, 2019, 37(6): 453.

[13] 徐殿琴, 冉连会, 杨元, 等. 妊娠妇女出凝血相关指标的影响因素及参考范围[J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(8): 955-959, 964.

[14] 樊凤娇, 宋睿, 吴秉毅, 等. 孕期凝血功能参考区间的建立及在静脉栓塞和产后出血中的运用[J]. *广东医学*, 2019, 40(2): 250-255.

[15] SZECSI P B, RGENSEN M, KLAJNBARD A, *et al.* Haemostatic reference intervals in pregnancy[J]. *Thrombosis & Haemostasis*, 2010, 103(4): 718-727.

[16] 郑园园. 低危妊娠女性孕晚期 D-二聚体和纤维蛋白原的参值范围及意义[J]. *医学研究志*, 2017, 46(10): 166-170.

[17] VAN DER POL L M, MAIRUHU A T A, TROMEUR C, *et al.* Use of clinical prediction rules and D-dimer tests in the diagnostic management of pregnant patients with suspected acute pulmonary embolism[J]. *Blood Rev*, 2017, 31(2): 31-36.

[18] 李帅, 吕时铭, 汤杰英. 浙江地区汉族孕产妇 D-二聚体参考区间的建立及应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2011(7): 580-585.

[19] 孙秋瑾, 岳育红, 王怡然, 等. 妊娠期凝血筛查 4 项参考区间的建立与分析[J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(2): 174-176.

(收稿日期: 2021-01-05; 修回日期: 2021-02-04; 编辑: 郭翠)

(上接第 145 页)

[14] 蒋楠. 吉西他滨联合顺铂治疗复发转移性乳腺癌的疗效观察[J]. *中国现代药物应用*, 2019, 13(19): 81-82.

[15] 莫远群. 吉西他滨联合奈达铂治疗紫杉类耐药的三阴乳腺癌的近期疗效和不良反应[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(39): 138-139.

[16] FACCHINI FA, COELHO H, SESTITO SE, *et al.* Co-administration of Antimicrobial Peptides Enhances Toll-like Receptor 4 Antagonist Activity of a Synthetic Glycolipid[J]. *Chem Med Chem*, 2018, 13(3): 280-287.

[17] LV W, CHEN N, LIN Y, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes breast cancer metastasis via activation of HMGB1/TLR4/NF kappa B axis[J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 245-255.

[18] 张祥建, 张欣欣, 马海广, 等. 扶正中药逆转 TLR4 过表达乳腺癌紫杉醇耐药的机制[J]. *温州医科大学学报*, 2019, 49(11): 826-831.

[19] YAO Y, SHEN H, ZHOU Y, *et al.* MicroRNA-215 suppresses the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung carcinoma cells through the downregulation of matrix metalloproteinase-16 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3239-3246.

[20] AYDOGAN A, OZMEN O, HALIGUR M, *et al.* Immunohistochemical evaluation of bcl-2, ER-alpha, caspase -3, -8, -9, PCNA and Ki-67 expressions in canine mammary carcinomas[J]. *Biotech Histochem*, 2018, 93(4): 286-292.

[21] ZHANG T, ZHENG X, WANG X, *et al.* Maternal Exposure to PM2. 5 during Pregnancy Induces Impaired Development of Cerebral Cortex in Mice Offspring[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): 257-261.

[22] 郑丹, 范春妮, 雷影, 等. E-cadherin、PI20ctn 在乳腺癌组织中的表达及其意义[J]. *中国实验诊断学*, 2019, 23(2): 376-378.

[24] KOCHUMON S, WILSON A, CHANDY B, *et al.* Palmitate Activates CCL4 Expression in Human Monocytic Cells via TLR4/MyD88 Dependent Activation of NF-κB/MAPK/ PI3K Signaling Systems[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(3): 953-964.

[24] SU Q, LV X, SUN Y, *et al.* Role of TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in coronary microembolization-induced myocardial injury prevented and treated with nicorandil[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106(138): 776-784.

[25] 张祥建, 张欣欣, 马海广, 等. 扶正中药逆转 TLR4 过表达乳腺癌紫杉醇耐药的机制[J]. *温州医科大学学报*, 2019, 49(11): 826-831.

(收稿日期: 2021-02-01; 修回日期: 2021-11-29; 编辑: 郭翠)