

# 半边旗中二萜类化合物 5F 对乳腺癌生长和转移的体内抑制作用

何振辉<sup>1</sup>, 何太平<sup>2</sup>, 翁闪凡<sup>1</sup>, 黄越群<sup>1</sup>, 覃燕梅<sup>2</sup>, 梁念慈<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>佛山科学技术学院医学院医学检验系, 佛山 528000; <sup>2</sup>广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023; <sup>3</sup>广东天然药物研究与开发重点实验室, 湛江 524023)

**摘要** 为研究半边旗中二萜类化合物 5F 在体内对乳腺癌生长和转移的影响及其作用机制, 以 MDA-MB-231 乳腺癌原位移植模型观察 5F 抗乳腺癌的效应。在治疗的同时, 观察 5F 对裸鼠的不良反应。以 RT-PCR、Western blot 法检测 5F 对乳腺肿瘤组织血管内皮生长因子(VEGF)、激酶嵌入结构域受体(KDR)mRNA 和蛋白表达的影响。结果显示, 5F 通过减少原发肿瘤体积和肺转移结节数目, 显著抑制 MDA-MB-231 乳腺癌移植瘤的生长和肺转移。这种抑制转移的作用不依赖于其对原发肿瘤的生长抑制作用。5F 对裸鼠的肝肾功能无明显的影响。5F 抗 MDA-MB-231 乳腺癌作用机制与 5F 下调肿瘤组织 VEGF、KDR mRNA 和蛋白表达水平有关。

**关键词** 半边旗提取物 5F; 血管内皮生长因子; 激酶嵌入结构域受体; 转移; 乳腺癌

**中图分类号** R965    **文献标志码** A    **文章编号** 1000-5048(2014)01-0092-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140117

## Inhibitory effect of the diterperoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on breast cancer growth and metastasis *in vivo*

HE Zhenhui<sup>1</sup>, HE Taiping<sup>2</sup>, WENG Shanfan<sup>1</sup>, HUANG Yuequn<sup>1</sup>, QIN Yanmei<sup>2</sup>, Liang Nianci<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, Medical College, Foshan University, Foshan 528000; <sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023; <sup>3</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory for the Research and Development of Natural Drugs, Zhanjiang 524023, China

**Abstract** The aim of this study was to investigate the effect and its possible mechanism of the diterperoid compound 5F isolated from *Pteris semipinnata* L. on breast cancer growth and metastasis in MDA-MB-231 orthotopic breast tumor xenograft model. The potential side-effects were monitored in addition to its therapeutic effect. RT-PCR and Western blot were applied to detect the expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), kinase domain insert containing receptor (KDR) in breast cancer tissue. Results showed that 5F significantly suppressed breast cancer growth and metastasis in nude mice by reducing the volume of primary tumor and the number of metastatic nodules in lung. Furthermore, 5F suppressed metastases independent of its inhibitory effect on primary tumor growth. 5F treatment exhibited no toxic effect on liver or kidney in nude mice. 5F can suppress growth and metastasis of MDA-MB-231 breast cancer xenograft. Its mechanism may be involved in the deduction of the expression levels of VEGF and its main receptor KDR in tumor tissue.

**Key words** 5F from *Pteris semipinnata* L.; vascular endothelial growth factor; kinase domain insert containing receptor; metastasis; breast cancer

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39870900); the Foundation of Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province on the Construction of Chinese Medicine Strong Province (No. 20111057); and the Research Project of Foshan University (No. 2014006)

\* 收稿日期 2013-06-23    \*通信作者 Tel:0759-2388501 E-mail: neliang@gdmc.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 39870900); 广东省中医药局建设中医药强省课题资助项目(No. 20111057); 佛山科学技术学院校级科研基金资助项目(No. 2014006)

20世纪90年代初,本课题组从半边旗(*Pteris semipinnata* L., PsL)全草中分离出若干个二萜类化合物<sup>[1]</sup>。*11α*-羟基-15-氧-16-烯-*ent*-贝壳杉烷-19酸(*ent*-*11α*-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid)是分离得到的第5个有效成分(fract),故命名为5F。5F分子式为C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>,相对分子质量为332.4,结构式见图1。5F对肝癌、鼻咽癌、胃癌等多种肿瘤细胞具有杀伤作用,其作用机制与5F诱导肿瘤细胞凋亡有关<sup>[2-3]</sup>。但5F体内抗肿瘤效应的报道较少,5F对乳腺癌生长和转移的影响,未见文献报道。本研究以裸鼠动物模型研究了5F对乳腺癌生长和转移的影响并分析了其可能的作用机制。

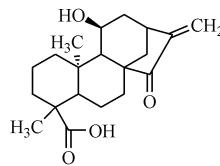


Figure 1 Chemical structure of 5F isolated from *Pteris semipinnata* L.

## 1 材 料

### 1.1 药品和试剂

小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);PVDF膜(美国BD公司)。KDR、VEGF小鼠IgG单抗、 $\beta$ -actin山羊IgG多抗(美国Santa Cruz公司),使用时以TBST溶液按1:1 000~1:2 000稀释;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG、兔抗山羊IgG(北京中杉金桥生物有限公司),使用时以TBST溶液按1:4 000~1:10 000稀释。半边旗提取物5F(广东医学院天然药物开发中心),5F提取和纯化的方法参照文献[4]进行。

### 1.2 细胞株

人高转移乳腺癌细胞MDA-MB-231购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。细胞在含体积分数为10%小牛血清,1×10<sup>5</sup> U/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM完全培养基中,37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度孵箱培养。细胞经过消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

### 1.3 动 物

BALB/c(nu/nu)雌性裸鼠,6~8周龄,体质量18~20 g,由广东医学院实验动物中心提供并饲养于该中心SPF级动物房,自由摄取水和食物。实

验动物生产许可证号:SCXK(粤)2008-008;实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2008-007。

## 2 方 法

### 2.1 MDA-MB-231原位移植模型

将6~8周龄的雌性裸鼠随机分成4组,每组8只,在每只裸鼠的乳腺脂肪垫接种1.5×10<sup>6</sup>MDA-MB-231细胞,此后每周以0.5,10,20 mg/kg的5F腹腔注射两次,持续15周。接种细胞后以游标卡尺每周两次测量乳腺肿瘤的的长径(L)和宽径(W),按照公式:肿瘤体积(V)=L×W<sup>2</sup>×0.523 6<sup>[5]</sup>计算移植瘤的体积。接种细胞后第15周,处死动物,解剖后,剥离乳腺肿瘤并称重,同时剥离小鼠肺,在解剖显微镜下计数其表面白色转移结节的数目。

为排除乳腺原发肿瘤的生长速度对肺转移的影响,做了另外一个实验。接种细胞和5F治疗如前所述。但接种后每日监测乳腺肿瘤的体积,直到原发肿瘤体积达到2 100 mm<sup>3</sup>,处死动物,剥离小鼠肺,在解剖显微镜下计数其表面白色转移结节的数目。

### 2.2 对裸鼠的毒性试验<sup>[6]</sup>

将6~8周龄的雌性裸鼠随机分成4组,每组8只,以0.5,10,20 mg/kg的5F每周腹腔注射两次,持续16周。5F处理期间,每日观察裸鼠的摄食量、活动度等一般情况。每周两次测量小鼠的体重。每周一次使用毛细管从眼眶静脉丛采血,抗凝后分离血浆,在全自动生化分析仪上测量丙氨酸转氨酶(ALT)的活性及肌酐(CRE)的浓度,以评估裸鼠的肝肾功能。

### 2.3 Real-time PCR检测肿瘤组织mRNA表达水平

在乳腺肿瘤组织中加入Trizol匀浆,提取总RNA,逆转录为cDNA,按照试剂盒说明配置PCR反应体系,在Mx3000P实时定量荧光PCR仪上进行反应。反应参数为:94℃,10 s;55℃,20 s;72℃,15 s。其中,预变性5 min;共循环40次。引物序列如下:VEGF正义引物:5'-CTCGCAGTCCGAGC-CGGAGA-3',反义引物:5'-GCAGCCTGGGACCACT-TGGC-3';KDR正义引物:5'-AGGGTGG AGGT-GACTGAG-3',反义引物:5'-GAGTCAGT GGAGGT-GGGA-3';GAPDH正义引物:5'-TCATTGACCT-CAACTACATGGTTT-3',反义引物:5'-GAAGATGG

TGATGGGATTTC-3'。记录各管循环阈值(CT),采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法<sup>[7]</sup>进行相对定量。

#### 2.4 Western blot 分析肿瘤组织蛋白表达水平

在肿瘤组织 100 mg 中加入细胞裂解液 1 mL, 在匀浆器中匀浆后, 置于碎冰上冰育 30 min, 将裂解液收集于预冷的 1.5 mL 的 EP 管中, 冰上超声破碎细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min。上清液转移至另一个 1.5 mL 离心管中, 取少量上清液用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取相同含量蛋白样品和 4 × 上样缓冲液以 3:1 的比例混合, 100 °C 水中煮沸 5 min 使蛋白质变性。进行 Western blot, 以  $\beta$ -actin 为内参照分析目的基因的表达。

#### 2.5 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SAS V8.1 统计软

件进行重复测量方差分析或单因素方差分析。组间两两比较用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$  表示差别具有统计学意义。

### 3 结 果

#### 3.1 5F 对乳腺癌原发肿瘤生长和肺转移的影响

接种 MDA-MB-231 细胞后, 以 5F 持续治疗, 使肿瘤形成时间延长, 在 10, 20 mg/kg 的剂量下, 成瘤时间分别为 (14.4 ± 1.5) d 和 (15.6 ± 2.1) d, 而对照组为 (9.2 ± 2.2) d ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 10, 20 mg/kg 的 5F 使乳腺癌原发肿瘤生长更缓慢, 体积更小, 使肺转移结节数量明显减少。结果如图 2 所示。

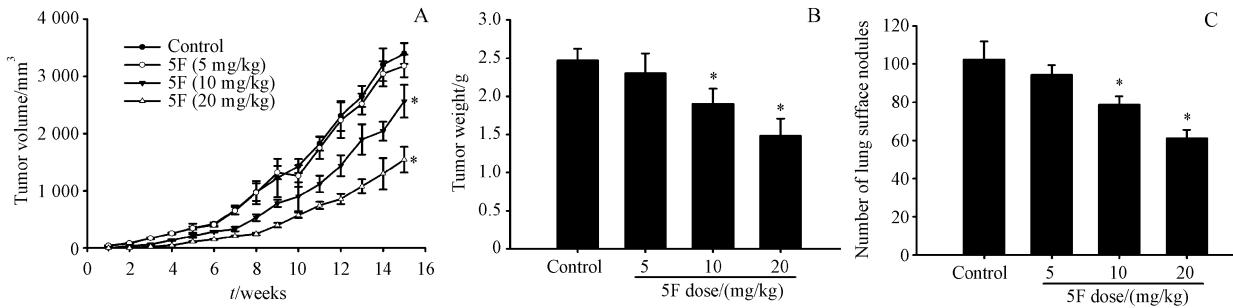


Figure 2 5F treatment inhibited primary tumor growth and lung metastasis in nude mice

Female BALB/c nu/nu mice were inoculated with MDA-MB-231 cells ( $1.5 \times 10^6$ /mouse) into the mammary fat pads and received intraperitoneal injection with different dose of 5F or PBS (control). A: Xenograft tumor grow curves; B: Primary tumor weight; C: Lung metastases. \*  $P < 0.05$  vs control group

#### 3.2 5F 抑制乳腺癌的肺转移不依赖于其对原发肿瘤的生长抑制效应

为了排除原发肿瘤的生长速度对肺转移的影响, 接种 MDA-MB-231 细胞后以 5F 持续治疗。让各组原发肿瘤长至大约 2 100 mm<sup>3</sup> (此时原发肿瘤的质量大致相等), 然后处死小鼠, 剥离小鼠肺, 计

数其表面的白色结节, 结果显示在原发肿瘤的体积(质量)相等情况下, 在 5F 10, 20 mg/kg 剂量组, 肺转移结节数量仍明显少于对照组, 如图 3 所示。该实验说明 5F 抑制裸鼠乳腺癌肺转移的作用独立于其抑制原发肿瘤生长的效应。

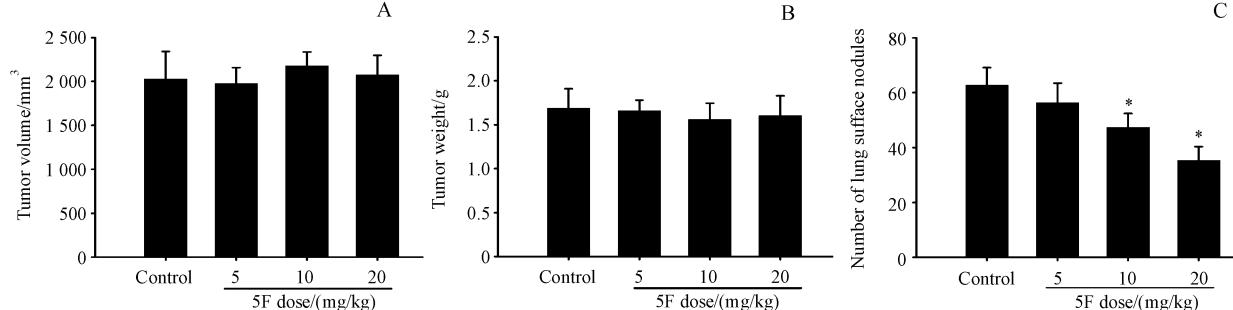


Figure 3 5F treatment inhibits lung metastasis independent of primary tumor growth in nude mice bearing breast cancer ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

The mice were sacrificed until the volume of primary tumor reached 2 100 mm<sup>3</sup>. Volume (A), weight (B), and numbers of lung metastases (C) in each group at the time of sacrifice. \*  $P < 0.05$  vs control group

### 3.3 5F对裸鼠的不良反应

以健康裸鼠为研究对象,观察5F对裸鼠潜在的不良反应。在整个治疗期间,未发现裸鼠的摄食量下降、活动度下降、体重减轻和其他明显的异常。图4显示了5F首次腹腔注射后第15日和第105日时ALT和CRE的平均水平。其他时间点的检测数据与之相似(数据未列出)。结果表明5F治疗对裸鼠无明显不良反应。

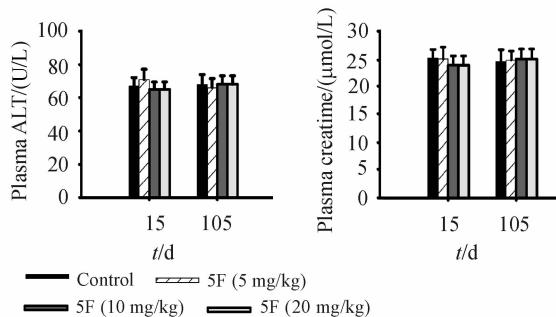


Figure 4 Plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and creatinine after 5F treatment ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Blood samples were collected in day 15, 105 after first injection of 5F. The mice received PBS treatment were used as controls

### 3.4 5F对乳腺癌原发肿瘤组织的VEGF、KDR表达的影响

治疗结束时对原发肿瘤组织匀浆后提取蛋白和mRNA。结果表明,5F显著下调原发肿瘤组织中VEGF及其主要受体KDR mRNA和蛋白的表达水平。见图5,6。

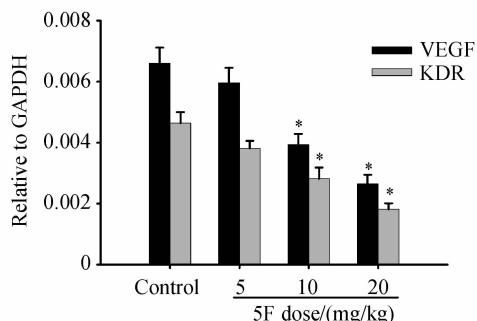
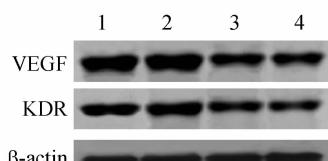


Figure 5 Effect of 5F on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), kinase domain insert containing receptor (KDR) mRNA in MDA-MB-231 orthotopic xenograft tissue ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

\*  $P < 0.05$  vs control group



1: Control; 2: 5F (5 mg/kg); 3: 5F (10 mg/kg); 4: 5F (20 mg/kg)

Figure 6 Effect of 5F on the expression of VEGF, KDR protein in MDA-MB-231 orthotopic xenograft tissue

## 4 讨论

以往的5F药理学研究多集中于对肝癌、肺癌等肿瘤细胞的直接杀伤作用<sup>[8]</sup>。本课题首次研究了5F在体内模型中抗乳腺癌的作用。结果表明5F能抑制裸鼠中乳腺癌的生长和转移,并且这种治疗无明显的不良反应,提示5F可以作为乳腺癌的潜在治疗药物。

研究表明,血管生成是乳腺癌等实体肿瘤生长和转移的基础。肿瘤血管生成的首要环节,是肿瘤血管生成因子与血管生成抑制因子失衡,血管生成表型(angiogenic phenotype)形成。在诸多血管生成因子中,血管内皮生长因子VEGF处于中心地位<sup>[9]</sup>。VEGF在体内能够调节血管的通透性,在体外能促进基质的降解、内皮细胞的增殖、迁移和血管腔样结构的形成。有研究报道:在乳腺癌中,VEGF与肿瘤微血管密度(MVD)、肿瘤体积及腋下淋巴结转移呈正相关,VEGF的含量是乳腺癌病人预后的独立预测因子之一<sup>[10]</sup>。本研究显示在裸鼠模型中5F下调肿瘤组织VEGF的表达,这一结果与5F在体外下调某些肿瘤细胞系VEGF表达的体外研究结果相一致<sup>[11-12]</sup>。这可能是5F抑制乳腺癌生长和转移的原因之一。

VEGF的生物学活性是与其受体结合后发挥作用的。目前,VEGF受体已发现至少有5种:VEGFR-1(Flt-1),VEGFR-2(KDR/Flk-1),VEGFR-3(Flt-4),NP-1和NP-2<sup>[13]</sup>。KDR是受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine kinase,RTK),主要在血管内皮细胞上表达。VEGFR-2(KDR)是VEGF最重要的受体,处于信号转导的上游。KDR在VEGF所诱导的血管生成和血管通透性中起主要作用。VEGF结合KDR后通过PLC-γ和MAPK系统引发一系列的生物学效应,如内皮细胞的增殖、运动,血管通透性增加。单独使用KDR抑制剂,就能阻断VEGF和bFGF所诱导的血管生成<sup>[14]</sup>。近年来,有文献报道乳腺癌细胞中存在KDR、Flt-1等受体,且有VEGF自分泌现象,显示了VEGF系统在促进乳腺癌细胞运动、侵袭、存活方面的重要意义<sup>[15]</sup>。本研究表明,5F下调裸鼠肿瘤组织VEGF、KDR表达,显示5F对肿瘤血管生成的干扰作用。但5F抑制乳腺癌肺转移的作用独立于其抑制原发肿瘤生长的效应,提示5F抗乳腺癌转移可能存在其他机

制。关于5F抗乳腺癌转移的机制,仍有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] Li MY, Leung J, Kong AW, et al. Anticancer efficacy of 5F in NNK-induced lung cancer development of A/J mice and human lung cancer cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010, **88**(12):1 265 – 1 276.
- [2] Li MY, Liang NC, Chen GG. Ent-11 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid induces apoptosis of human malignant cancer cells [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, **13**(14):1 730 – 1 737.
- [3] Wu K, Liu Y, Lv Y, et al. Ent-11 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid induces apoptosis and cell cycle arrest in CNE-2Z nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, **29**(6):2 101 – 2 108.
- [4] Deng YF, Liang NC. Study on extraction and separation of diterpenoids from *Pteris semipinnata* [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2004, **39**(10):742 – 744.
- [5] Hou L, Zhao X, Wang P, et al. Antitumor activity of antimicrobial peptides containing CisoDGRC in CD13 negative breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(1):e53491.
- [6] Shen Z, Yang ZF, Gao Y, et al. The kringle 1 domain of hepatocyte growth factor has antiangiogenic and antitumor cell effects on hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(2):404 – 414.
- [7] Zhu JH, Yuan Y, Li D, et al. Targeting nuclear factor- $\kappa$ B suppresses the negative effect of toll-like receptor 4 signaling on antimetastasis therapy based on targeting  $\alpha$ v $\beta$ 3 [J]. *Cancer Sci*, 2012, **103**(7):1 319 – 1 326.
- [8] Chen GG, Leung J, Liang NC, et al. Ent-11 $\alpha$ -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid inhibits hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* via stabilizing IkB $\alpha$  [J]. *Invest New Drugs*, 2012, **30**(6):2 210 – 2 218.
- [9] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies [J]. *Genes Cancer*, 2011, **2**(12):1 097 – 1 105.
- [10] Hu Z, Fan C, Livasy C, et al. A compact VEGF signature associated with distant metastases and poor outcomes [J]. *BMC Med*, 2009, **7**:9.
- [11] He TP, Mo LE, Liang NC. Effect of 5F from *Pteris Semipinnata L* on invasion and metastasis of high metastatic ovarian carcinoma HO-8910PM cells *in vitro* [J]. *Chin J Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2005, **21**(5):540 – 544.
- [12] Li L, Lv YN, Liu Y, et al. Apoptosis in HepG2 cells induced by *Pteris semipinnata* extract 5F involves p53 activation and VEGF inhibition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2010, **41**(2):241 – 245.
- [13] Jin Y, Luan X, Liu H, et al. Pharmacokinetics and metabolite identification of a novel VEGFR-2 and Src dual inhibitor 6-chloro-2-methoxy-N-(2-methoxybenzyl) acridin-9-amine in rats by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2012, **89**:70 – 76.
- [14] Rastelli L, Valentino ML, Minderman MC, et al. A KDR-binding peptide (ST100,059) can block angiogenesis, melanoma tumor growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2011, **39**(2):401 – 408.
- [15] Perrot-Appelat M, Di Benedetto M. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: adhesion, survival, migration and invasion [J]. *Cell Adh Migr*, 2012, **6**(6):547 – 553.