

九香虫水煎液对乳腺癌细胞体外增殖、迁移、凋亡及其相关 mRNA 表达的影响*

田莹^{1,2**} 檀军² 马盛峰³ 赵帅¹ 蔡仁莲^{1,2} 郭建军^{1***}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025;

2. 遵义医科大学基础医学院, 遵义 563000; 3. 湖北省公安县农业农村科技服务中心, 荆州 434399)

摘要 【目的】探究九香虫 *Aspongopus chinensis* 水煎液对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 增殖、迁移、周期和凋亡的影响。【方法】采用细胞增殖-毒性检测试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 检测九香虫水煎液对两种乳腺癌细胞体外增殖的影响, 细胞划痕、流式细胞术检测乳腺癌细胞迁移能力、细胞周期分布和细胞凋亡的影响, 并通过实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*Bax* 和 *Bcl-2* (细胞凋亡相关的基因), *MMP-2* 和 *MMP-9* (细胞迁移相关的基因) 及 *CDK-1*、*CDK-2*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* (细胞周期相关的基因) 的表达变化。【结果】九香虫水煎液可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 体外增殖, 通过下调 *MMP-2* 和 *MMP-9* 抑制乳腺癌细胞的迁移能力, 并通过上调 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Bax* 及下调 *Bcl-2* 表达, 诱导乳腺癌细胞凋亡。九香虫水煎液可阻滞 MDA-MB-453 细胞于 G1 期, 阻滞 HCC1937 细胞于 G2 期, 作用机制可能是下调 *CDK-1*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* 表达。【结论】九香虫水煎液可通过抑制细胞增殖和迁移、阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡等多种途径抑制乳腺癌细胞生长。**关键词** 九香虫; 水煎液; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 凋亡; 机制

Effects of a decoction of *Aspongopus chinensis* on the proliferation, migration, apoptosis, and related mRNA expression, of breast cancer cells *in vitro*

TIAN Ying^{1,2**} TAN Jun² MA Sheng-Feng³ ZHAO Shuai¹
CAI Ren-Lian^{1,2} GUO Jian-Jun^{1***}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. College of Basic Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 3. Gong'an County Agriculture and Rural Science and Technology Service Center, Jingzhou 434399, China)

Abstract [Aim] To investigate the effects of a decoction of *Aspongopus chinensis* (ACD) on the proliferation, migration, cell cycle and apoptosis, of MDA-MB-453 and HCC1937 breast cancer cells. [Methods] The CCK-8 method was conducted to detect the effect of ACD on the proliferation of breast cancer cells *in vitro* and a cell wound healing assay was used to investigate the effect of ACD on their migratory ability. The cell cycle distribution and apoptosis rate were detected using flow cytometry. The mRNA expression of *Caspase-3*, *Caspase-8*, *Bax* and *Bcl-2* (Genes associated with apoptosis), *MMP-2* and *MMP-9* (Genes involved in cell migration), *CDK-1*, *CDK-2*, *CyclinA1* and *CyclinB1* (Cell cycle related genes) were detected using RT-PCR. [Results] ACD inhibited the proliferation and migration of breast cancer cells *in vitro* by down-regulating *MMP-2* and *MMP-9*. It also induced apoptosis by up-regulating *Caspase-3*, *Caspase-8* and *Bax* and by down-regulating *Bcl-2*. It blocked MDA-MB-453 cells in the G1 phase, and HCC1937 cells in the G2 phase, possibly by down-regulating *CDK-1*,

*资助项目 Supported projects: 贵州省教育厅青年项目 (黔教技[2022]242 号); 贵州省科技厅基础研究计划项目 (QKH-ZK[2023]—般 506); 贵州省高层次创新型人才项目 (黔科合平台人才-GCC[2022]029-1)

**第一作者 First author, E-mail: tianying_789@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jjguo@gzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2023-10-11; 接受日期 Accepted: 2024-08-03

CyclinA1 and CyclinB1. **[Conclusion]** ACD can inhibit the proliferation and migration of MDA-MB-453 and HCC1937 breast cancer cells, regulate the cell cycle of these cells and induce their apoptosis *in vitro*.

Key words *Aspongopus chinensis*; decoction; breast cancer; proliferation; migration; apoptosis; mechanism

《2023 年全球癌症报告》显示, 乳腺癌是女性中发病率最高的癌症, 约占 31% (Siegel *et al.*, 2023), 手术和化疗仍是乳腺癌的常用治疗方式, 但是存在手术后有易复发、化疗药物易产生耐药性的问题, 以及晚期乳腺癌患者无法进行手术和化疗等。部分中药具有抑制肿瘤增殖、毒副作用较小和增强患者免疫力的作用(刘晓宇等, 2021)。《2016 年中国恶性肿瘤流行情况分析》显示, 乳腺癌为当前中国最主要的五大癌症之一 (Zheng *et al.*, 2023), 探究中药抑制乳腺癌的机制是当今中药研究的趋势。虫类中药是中药的一类, 在抗肿瘤药的研究中发挥了重要作用(刘升长等, 2015; 谢振颖和赵晓珍, 2017), 九香虫 *Aspongopus chinensis* 是虫类中药之一, 具有抗肿瘤的作用。前期研究表明, 九香虫血淋巴和水提液可抑制乳腺癌和胃癌等细胞的体外增殖, 而且可诱导癌细胞凋亡(檀军等, 2013; 杨佳琪等, 2017a, 2017b; Tan *et al.*, 2019a; 田莹等, 2020a)。水煎液是九香虫临床中最常用的用药方式(刘庆芳, 2002), 九香虫水煎液中含多种抗肿瘤成分可多通路多靶点作用于肝癌, 并抑制肝癌细胞增殖(杨莎等, 2024)。前期检测九香虫水煎液中含有反丁烯二酸、3,4-二羟基苯甲酸、腺苷、尿苷和棕榈酸等具有抗肿瘤作用的成分, 可抑制乳腺癌细胞的增殖(田莹等, 2020b), 但九香虫水煎液抑制乳腺癌的机制仍不明确。因此, 本研究探究九香虫水煎液对 MDA-MB-453 和 HCC1937 两种乳腺癌细胞的体外增殖、迁移、凋亡及细胞周期等方面的影响, 并初步探究九香虫水煎液体外抗乳腺癌的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞和虫源

乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 购自中国科学院细胞库。

九香虫活虫购自贵州省遵义市习水县二郎镇 (28.32° N, 106.22° E)。

1.2 试剂和药物

RPMI-1640 培养基和 L-15 培养基 (武汉博士德生物工程有限公司), 胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司), CCK-8 细胞增殖检测试剂盒 (上海汉恒生物技术有限公司), DNA 含量检测试剂盒 (北京索莱宝生物技术有限公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂 (上海碧云天生物技术有限公司), HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (R212-01) (南京诺唯赞生物科技有限公司), iTaq Universal SYBR Green Supermix (美国 Bio-Rad 公司), TRIzol Reagent (北京康为世纪生物技术有限公司)。

1.3 仪器

生物安全柜 (BIO II ADVANCE, 西班牙 Telstar 公司), 冷冻离心机 (Sigma-3 K 30, 德国 Sigma 公司), 高压灭菌锅 (YXO-LS-50s II, 上海博讯实业公司), 超低温冰箱 (DW-86L328, 浙江捷盛制冷科技有限公司), 二氧化碳培养箱 (FORM3141, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 流式细胞仪 (FC500, 美国 Beckman Coulter 公司), 荧光定量 PCR 仪 (CFX96, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 九香虫水煎液的制备 九香虫活虫用去离子水清洗两遍, 滤纸吸干虫体表面水分, 置于电热恒温干燥箱中 80 °C 烘干, 用破壁机磨成粉末。称 20 g 虫粉于砂锅, 砂锅中加入 80 mL 去离子水, 室温浸泡 30 min 后煎煮 40 min, 过滤后浓缩至生药浓度为 1 g/mL 的九香虫水煎液。将九香虫水煎液以 6 000 r/min 离心 10 min, 保

留上清液并用 0.22 μm 滤头过滤除菌, 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4.2 CCK-8 法检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞增殖的影响 将对数生长期的 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞用 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度为 1×10^4 个/mL, 分别接种于 96 孔培养板中, 每孔接种 100 μL 细胞悬液。试验设置试验组、对照组 (无药物组) 和空白组 (无细胞组)。分别用 L-15 培养基和 RPMI 1640 培养基将九香虫水煎液稀释成生药浓度 0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.10 g/mL, 并用 0.22 μm 滤头过滤除菌。24 h 后, 吸去旧培养液, 对照组 (0 g/mL) 加完全培养基, 试验组分别加入上述浓度梯度的九香虫水煎液, 每个浓度设 5 个重复。24 h 后每孔加 10 μL CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h 后, 用酶标仪检测 450 nm 波长条件的吸光度 (OD) 值。计算细胞增殖率: 增殖率 = (试验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$, 用 GraphPad Prism 8.0 软件分别计算九香虫水煎液对两种乳腺癌细胞的半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.4.3 细胞划痕法检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞迁移的影响 将乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 消化并接种在 24 孔板, 接种细胞密度为 1×10^5 个/mL。待细胞长满 24 孔板底部 90% 时, 用 200 μL 的吸头沿孔的中轴垂直均匀划痕, 划痕后用无菌 PBS (pH=7.3) 洗去漂浮的细胞, 洗涤 3 次。划痕后试验组加入 0.02、0.04 和 0.06 g/mL 九香虫水煎液, 每组 4 个重复。因 MDA-MB-453 细胞和 HCC1937 细胞生长速度不一致, MDA-MB-453 生长速度较慢, 选择在 0、12 和 24 h 拍照 (40 $\times$), 而 HCC1937 细胞增殖速度较快, 选择在 0、8 和 24 h 拍照 (100 $\times$)。采用 Image J 1.53a 软件测量细胞划痕宽度, 计算细胞迁移率: 细胞迁移率 = (初始划痕宽度 - 最终划痕宽度) / 初始划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.4.4 九香虫水煎液对乳腺癌细胞周期的影响 试验组两种细胞中分别加入 0.02 和 0.04 g/mL 九香虫水煎液, 对照组加入完全培养液。作用细胞 24 h 后, 消化并收集细胞, PBS 清洗 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞并调整细胞浓度为

1×10^6 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液离心, 弃上清液后加入 500 μL 预冷的 70% 酒精, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h。染色前用 PBS 洗去固定液, 再用细胞筛网 (200 目) 过滤细胞悬液 1 次。在细胞沉淀中加入 100 μL RNase A 溶液, 重悬细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。再加入 400 μL 碘化丙啶 (PI) 染色液混匀, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞在各周期中占比。

1.4.5 Annexin V-FITC/PI 染色检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞凋亡的影响 将处于对数生长期的 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞用 0.25% 胰酶消化, 每孔接种 1 mL 于 6 孔板 (细胞密度为 1×10^6 个/mL), 继续培养。对照组加入完全培养液, 试验组分别加入 0.02、0.06 和 0.10 g/mL 九香虫水煎液, 每组 3 个重复。24 h 后把细胞培养液吸至无菌离心管内, PBS 洗涤细胞 1 次, 加入胰酶消化细胞。室温孵育 3 min, 再加入完全培养液终止消化并轻轻吹匀细胞, 收集上清至无菌离心管, 800 r/min 离心 5 min, 去上清, 留细胞沉淀, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。再加入 5 μL 荧光探针 Annexin V-FITC, 轻轻混匀后, 加入 10 μL PI 染色液, 轻轻吹打混匀。室温避光孵育 20 min。将上述细胞立即转移至加样管中, 流式细胞仪检测, Annexin V-FITC 为绿色荧光, PI 为红色荧光, 采用 ModFit LT 软件进行分析。

1.4.6 RT-PCR 检测九香虫水煎液对乳腺癌细胞凋亡、迁移和周期相关基因的 mRNA 表达影响 将生长状态良好的 MDA-MB-453 和 HCC1937 消化并分别接种至 6 孔培养板 (密度为 1×10^6 个/mL), 设置对照组和试验组, 对照组加入完全培养基, 试验组加入 0.04 g/mL 九香虫水煎液, 每组 3 个重复。24 h 后提取 MDA-MB-453 和 HCC1937 总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 检测 cDNA 浓度, 进行 RT-PCR 分析。引物利用 Primer 6.0 软件设计, 由上海生物工程有限公司合成, 引物序列如表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算上述基因在 mRNA 水平的表达情况 (Schmittgen and Livak, 2008), GAPDH 为内参基因。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Sequences of RT-PCR primers

基因名称 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>GAPDH</i>	AAGCTCATTTCTGGTATGACAACG	TCTTCCTCTTGCTCTTGCTGG
<i>MMP-2</i>	TATGGGAACGCCGATGGG	CTGGAAGCGGAATGGAAA
<i>MMP-9</i>	TGACAGCGACAAGAAGT	AGGGCGAGGACCATAGA
<i>CDK-2</i>	CCTGGGCTGCAAATATTATTCC	TGGCTTGTAATCAGGCATAGAA
<i>CDK-4</i>	TTTTGAGCATCCCAATGTTGTC	TCGACGAAACATCTCTTGATCT
<i>CyclinA1</i>	GATGCTTGTCAGATACTACCA	GTAGATGTCAAACCCCTTGCTTG
<i>CyclinB1</i>	GACTTTGCTTTTGTGACTGACA	CCCAGACCAAAGTTTAAAGCTC
<i>Caspase-3</i>	GTTTCATCCAGTCGCTTTG	TTCTGTTGCCACCTTTTCG
<i>Caspase-8</i>	GGAGTTGTGTGGGGTA	GCTCTTCAAAGGTCGT
<i>Bax</i>	TTGCTTCAGGGTTTCATC	CACTCGCTCAGCTTCTTG
<i>Bcl-2</i>	CTGGTGGACAACATCGC	GGAGAAATCAAACAGAGGC

1.5 数据处理

数据使用软件 GraphPad Prism 8.0 进行统计学分析，采用单因素方差分析（One-way ANOVA），Dunnett 检验进行多重比较。实验数据用平均值±标准误（Mean±SE）表示， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 九香虫水煎液对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

与对照组（0 g/mL）相比，0.02、0.04、0.06、

0.08 和 0.10 g/mL 九香虫水煎液在体外作用于人乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 24 h 后，均有显著抑制乳腺癌细胞增殖的作用（ $P<0.0001$ ），且呈剂量依赖性（图 1：A，B）。九香虫水煎液作用 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞半抑制浓度（ IC_{50} ）分别为 0.036 和 0.024 g/mL。

2.2 九香虫水煎液对乳腺癌细胞迁移的抑制作用

细胞划痕试验结果显示（图 2：A-D），与对照组（0 g/mL）比较，不同浓度九香虫水煎液作用于 MDA-MB-453 细胞 24 h 后，0.02 和

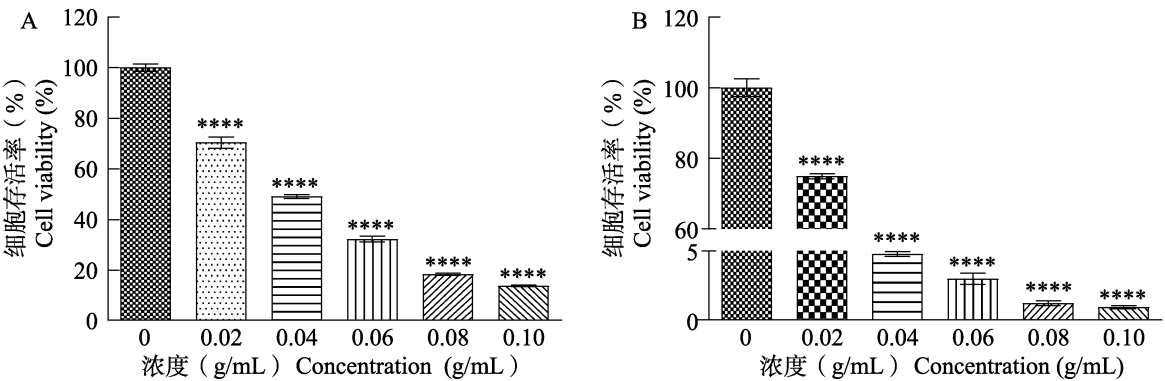


图 1 九香虫水煎液对 MDA-MB-453 细胞 (A) 和 HCC1937 细胞 (B) 增殖的影响
Fig. 1 Effect of *Aspongopus chinensis* decoction on the proliferation of MDA-MB-453 cells (A) and HCC1937 cells (B)

0 g/mL: 对照组，下图同。星号表示经单因素方差分析差异显著（**** $P<0.0001$ ）。图 4 同。0 g/mL: CK, the same below. Asterisk indicates that the difference is statistically significant by one-way ANOVA test（**** $P<0.0001$ ）。The same for Fig. 4.

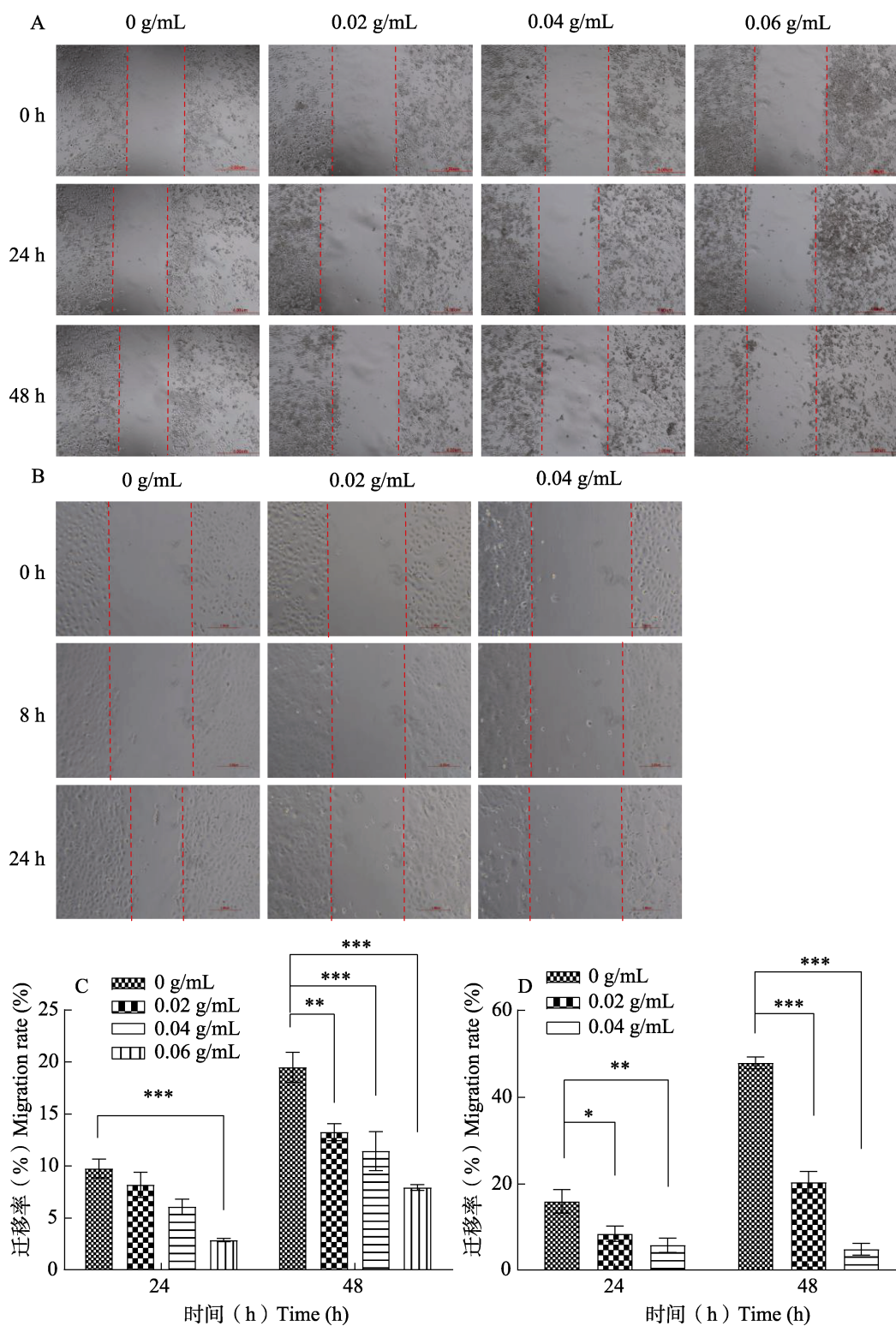


图 2 九香虫水煎液对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 (A, C) 和 HCC1937 (B, D) 迁移能力的影响
 Fig. 2 Effects of *Aspongopus chinensis* decoction on the migration of MDA-MB-453 (A, C) and HCC1937 (B, D) cells

星号表示经单因素方差分析差异显著 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。图 3, 图 5 同。

Asterisk indicates that the difference is statistically significant by one-way ANOVA test.

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). The same for Fig. 3 and Fig. 5.

0.04 g/mL 九香虫水煎液对细胞迁移无显著抑制作用 ($P=0.5207$), 0.06 g/mL 九香虫水煎液可显著抑制 MDA-MB-453 细胞迁移 ($P<0.001$)。MDA-MB-453 细胞加入 0.02、0.04、0.06 g/mL 九香虫水煎液 48 h 后, 试验组细胞迁移率均显著低于对照组 ($P<0.01$), 呈剂量依赖性。0.02 和 0.04 g/mL 九香虫水煎液分别作用于 HCC1937 细胞 8 和 24 h 后, 与对照组 (0 g/mL) 相比, 均显著抑制了 HCC1937 细胞的迁移能力 ($P<0.05$), 呈剂量相关。综上, 九香虫水煎液可降低乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 的迁移率, 呈剂量与时间依赖性。

2.3 九香虫水煎液对乳腺癌细胞周期的影响

通过流式细胞术检测 0.02 和 0.04 g/mL 九香虫水煎液处理乳腺癌 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞 24 h 后细胞周期分布情况。结果显示 (图 3: A-D), 0.02 g/mL 九香虫水煎液处理 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞 24 h 后, 2 种细胞在各周期的比例均无显著差异 ($P>0.05$); 0.04 g/mL 九香虫水煎液处理 MDA-MB-453 细胞 24 h 后, 与对照组比较 G1 期细胞比例显著增多 ($P<0.001$), S 期细胞比例显著减少 ($P<0.001$), G2 期细胞比例无显著差异 ($P>0.05$)。0.04 g/mL

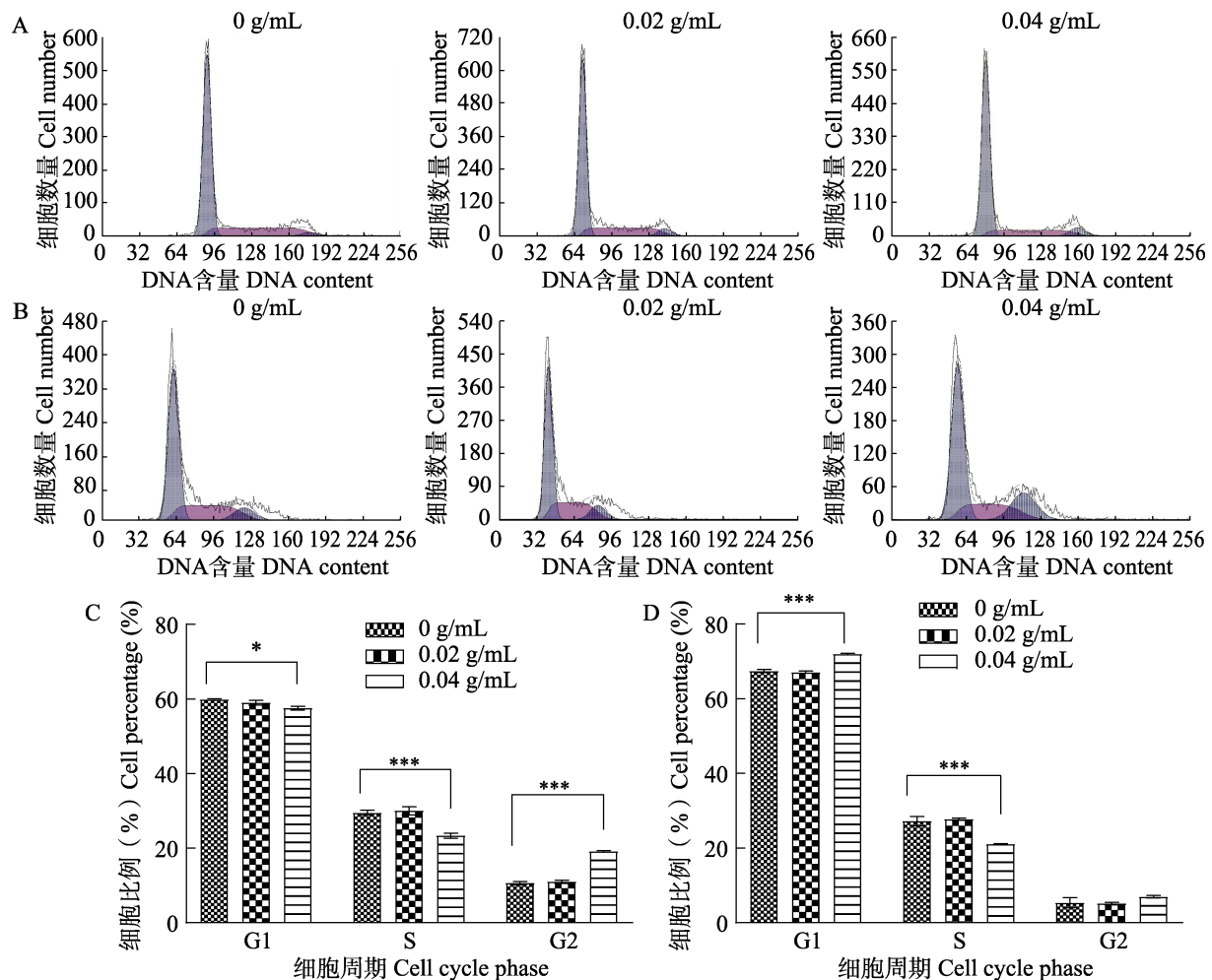


图 3 九香虫水煎液对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 (A, C) 和 HCC1937 (B, D) 细胞周期的影响

Fig. 3 Cell arrest in the G1-phase in MDA-MB-453 (A, C) and HCC-1937 cells (B, D) treated with *Aspongopus chinensis* decoction

G1: DNA 合成前期; S 期: DNA 合成期; G2 期: DNA 合成后期。

G1: DNA presynthetic phase; S: DNA synthesis phase; G2: DNA postsynthetic phase.

九香虫水煎液处理 HCC1937 细胞 24 h 后, 处于 G1 期和 S 期细胞比例较对照组显著减少 ($P<0.05$), 而处于 G2 期的细胞比例较对照组显著增加 ($P<0.001$)。上述结果表明, 九香虫水煎液可阻滞 MDA-MB-453 细胞周期于 G1 期, 可阻滞 HCC1937 细胞周期于 G2 期, 从而限制乳腺癌细胞恶性增殖。

2.4 九香虫水煎液对乳腺癌细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染经流式细胞仪检测九香虫水煎液作用乳腺癌细胞凋亡情况。结果显示 (图 4: A-D), 0.02、0.06 和 0.10 g/mL 九香虫水煎液分别作用于 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞 24 h 后, 细胞早期凋亡率均显著高于对照

组细胞早期凋亡率 ($P<0.0001$), 呈剂量依赖性; 0.10 g/mL 九香虫水煎液处理两种细胞 24 h 后, 细胞晚期凋亡率显著高于对照组 ($P<0.0001$)。上述结果表明, 九香虫水煎液可诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 凋亡, 且以诱导早期凋亡为主。

2.5 九香虫水煎液对乳腺癌细胞凋亡、迁移和周期相关 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果表明 (图 5: A, B), 0.04 g/mL 九香虫水煎液作用 24 h 后可显著下调 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞中 *Bcl-2*、*MMP-2*、*MMP-9*、*CDK-1*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* mRNA 的表达, 以及上调 *Caspase-3*、*Caspase-8* 和 *Bax* mRNA 的

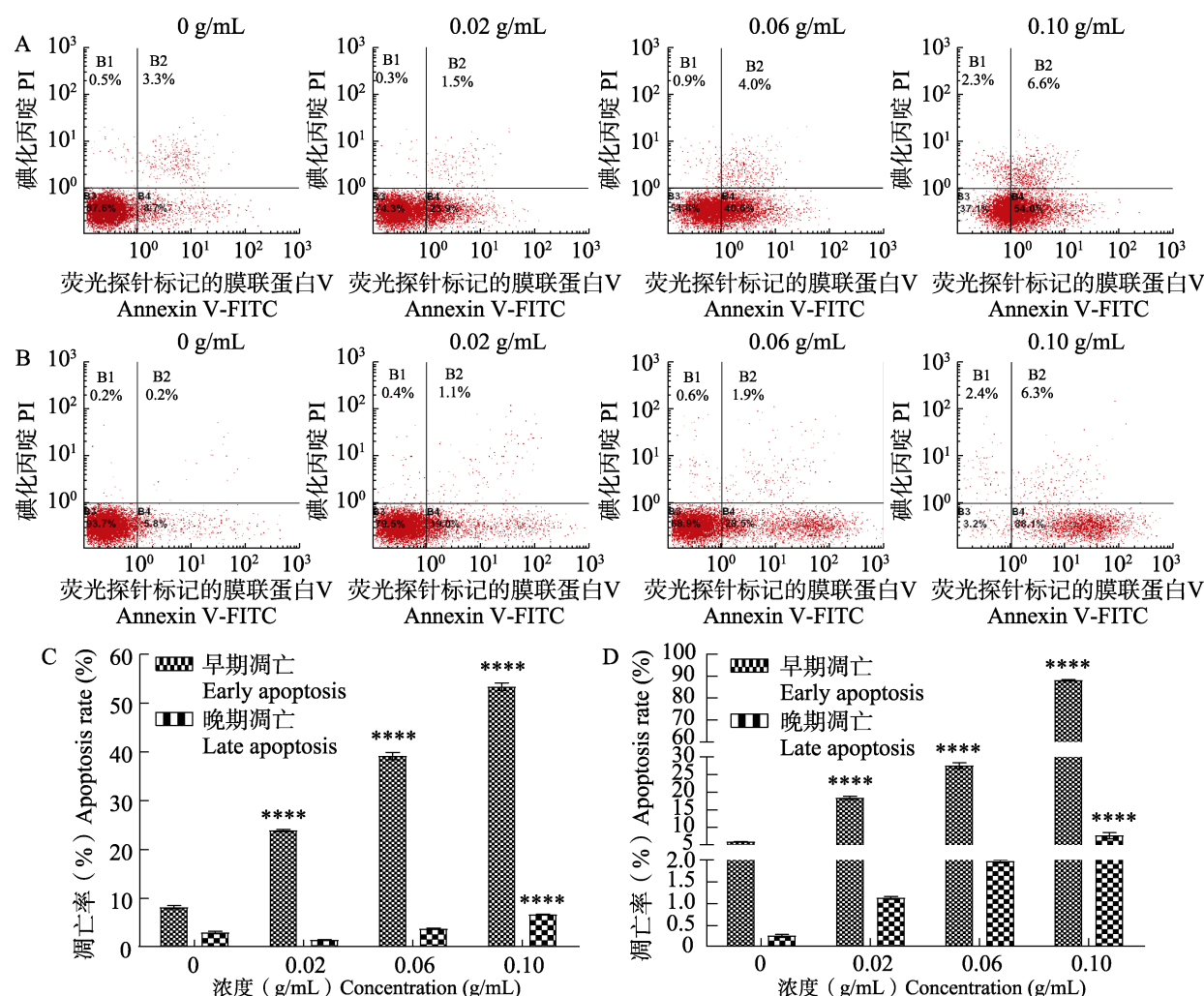


图 4 九香虫水煎液对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 (A, C) 和 HCC1937 (B, D) 凋亡的影响

Fig. 4 Induce apoptosis effect of *Aspongopus chinensis* decoction on MDA-MB-453 (A, C) and HCC1937 cells (B, D)

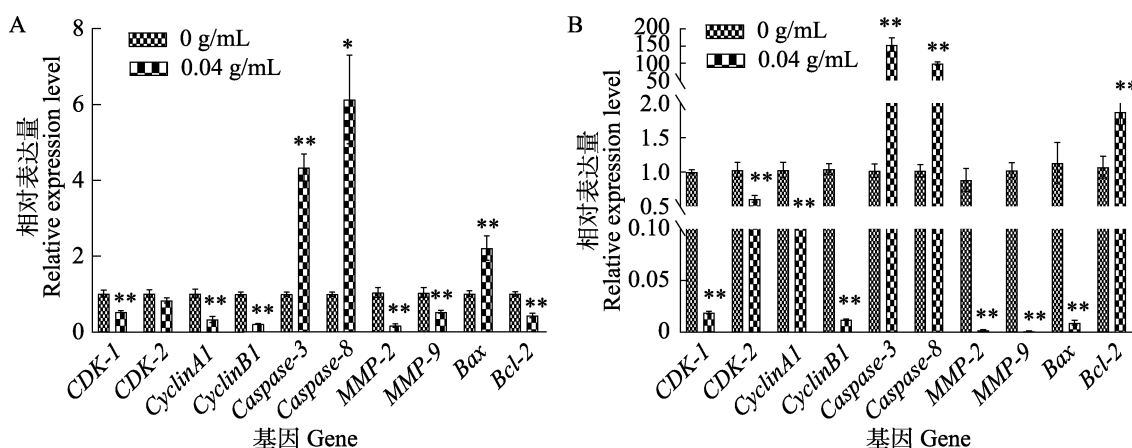


图5 九香虫水煎液对 MDA-MB-453 (A) 和 HCC1937 (B) 细胞凋亡相关基因 (Caspase-3、Caspase-8、Bax 和 Bcl-2)、迁移相关基因 (MMP-2 和 MMP-9) 及周期相关基因 (CDK-1、CDK-2、CyclinA1 和 cyclinB1) 的影响

Fig.5 Effect of *Aspongopus chinensis* decoction on apoptosis-related genes (Caspase-3, Caspase-8, Bax and Bcl-2), migration-related genes (MMP-2 and MMP-9), and cell cycle-related genes (CDK-1, CDK-2, CyclinA1 and CyclinB1) in MDA-MB-453 (A) and HCC1937 (B)

表达。Bcl-2 下调和 Caspase-3、Caspase-8 和 Bax 上调促进乳腺癌细胞凋亡；MDA-MB-453 细胞 CDK-2 和 CyclinA1 均下调，细胞由 G1 期进入 S 期的比例减少；HCC1937 细胞中 CDK-1 与 CyclinB1 的下调可减少细胞由 G2 期进入 M 期。MMP-2 和 MMP-9 下调，因此细胞迁移能力降低。

3 结论与讨论

本研究通过 CCK-8 法检测不同浓度的九香虫水煎液对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 和 HCC1937 增殖的抑制作用。结果表明，九香虫水煎液可抑制这 2 种乳腺癌细胞体外增殖。细胞的迁移能力也能反映细胞的增殖能力，迁移能力越强细胞增殖越快，反之则细胞增殖越慢。本研究通过细胞划痕试验探究九香虫水煎液对乳腺癌细胞迁移能力的影响，结果显示，九香虫水煎液可显著降低 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞的迁移能力。前期研究报道显示，九香虫血淋巴、有机溶剂提取物、纯化蛋白、多糖、纯化小分子物质等均可抑制癌细胞增殖（侯晓晖等，2012，2013；檀军等，2013；刘川燕等，2014；Tan *et al.*, 2019a, 2019b；田莹等，2020a, 2020b；Zhao *et al.*, 2021；于姮梅等，2023；Cai *et al.*, 2024），如：九香虫血淋巴可诱导胃癌细胞和乳腺癌细胞凋亡（杨佳琪等，2017a, 2017b；Zhao *et al.*, 2021），

九香虫甲醇提取物和石油醚提取物可阻滞胃癌细胞周期（刘川燕等，2014），九香虫活性蛋白组分 CHP，可抑制胃癌细胞增殖，诱导胃癌细胞凋亡（Tan *et al.*, 2019b）。细胞的生长和增殖受细胞周期的调控，细胞周期紊乱是导致肿瘤发生的原因之一（Otto and Sicinski, 2017）。九香虫甲醇和石油醚提取物可使胃癌细胞阻滞于 S 期（刘川燕等，2014），而九香虫水煎液可使乳腺癌 MDA-MB-453 细胞周期阻滞于 G1 期以及阻滞 HCC1937 细胞周期于 G2 期。九香虫水煎液不仅制备简单易获得，性状稳定，且无有机溶剂残留，具有较大的应用优势。本研究为发掘九香虫抗乳腺癌的作用与应用提供了理论参考。

本研究表明九香虫水煎液可诱导 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞凋亡，可能与 Caspase-3、Caspase-8 和 Bax 的表达上调，以及 Bcl-2 的表达下调有关。Bax 可促进线粒体膜通透性，引起细胞色素 C 的释放（Lalier *et al.*, 2022），通过级联反应激活 Caspase-3，从而诱导线粒体途径细胞凋亡，因此，本研究显示 Caspase-3、Caspase-8 和 Bax 的表达上调可促进乳腺癌细胞发生线粒体途径细胞凋亡。相反，Bcl-2 是抑制凋亡的蛋白（Warren *et al.*, 2019），本研究两种细胞中 Bcl-2 mRNA 下调，表明细胞调控抑制凋亡的作用降低。此外，Caspase-8 的激活是诱导细胞发生死

亡受体途径凋亡的关键过程 (Fritsch *et al.*, 1999)。因此, 本研究 中乳腺癌 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞 *Caspase-8* 上调, 表明乳腺癌细胞发生死亡受体途径细胞凋亡。MMP-2 和 MMP-9 是主要的细胞外基质蛋白水解酶 (Conlon and Murray, 2019), 与细胞迁移相关。九香虫水煎液作用于 MDA-MB-453 和 HCC1937 细胞后, *MMP-2* 和 *MMP-9* 表达下调, 表明九香虫水煎液抑制乳腺癌细胞迁移的作用可能与下调 *MMP-2* 和 *MMP-9* 有关。细胞周期异常可能会导致细胞恶性增殖和肿瘤的发生, 调控细胞周期可减少细胞恶性增殖 (Otto and Sicinski, 2017)。九香虫水煎液可显著下调 MDA-MB-453 细胞 *CDK-2*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* mRNA 的表达水平和下调 HCC1937 细胞中 *CDK-1*、*CDK-2*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* mRNA 的表达。*CDK-1*、*CDK-2*、*CyclinA1* 和 *CyclinB1* 是 G1/S 期和 G2/M 期的关键检查点蛋白, *CDK-2* 和 *CyclinA1* 结合调控细胞由 G1 期进入 S 期, *CDK-1* 和 *CyclinB1* 结合调控细胞由 G2 期进入 M 期 (高磊等, 2010)。因此九香虫水煎液可调控细胞周期, 抑制细胞恶性生长。

综上, 九香虫水煎液成分多, 导致其抗乳腺癌的作用具有多靶点、多途径的特点。不仅可抑制乳腺癌细胞体外增殖和迁移能力, 阻滞 MDA-MB-453 细胞周期于 G1 期, 阻滞 HCC1937 细胞周期于 G2 期, 而且九香虫水煎液可通过线粒体和死亡受体途径诱导乳腺癌细胞凋亡。

参考文献 (References)

- Cai RL, Chen XM, Khan S, Li HY, Tan J, Tian Y, Zhao S, Yin ZY, Jin D, Guo JJ, 2024. *Aspongopus chinensis* Dallas induces pro-apoptotic and cell cycle arresting effects in hepatocellular carcinoma cells by modulating miRNA and mRNA expression. *Heliyon*, 10(6): e27525.
- Conlon GA, Murray GI, 2019. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *Journal of Pathology*, 247(5): 629–640.
- Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R, Albert MC, Schorn F, Werthenbach JP, Schiffmann LM, Stair N, Stocks H, Seeger JM, Lamkanfi M, Krönke M, Pasparakis M, Kashkar H, 2019. *Caspase-8* is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*, 575(7784): 683–687.
- Gao L, Shi YZ, Ren YH, Fan RW, Wang AR, 2010. Function of CDKs at cell cycle regulation. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 29(2): 41–42, 45. [高磊, 石有珍, 任玉红, 范瑞文, 王爱荣, 2010. CDKs(细胞周期依赖性蛋白激酶)调控细胞周期中的作用. 畜牧兽医杂志, 29(2): 41–42, 45.]
- Hou XH, Sun T, Li XF, 2012. Effects of *Aspongopus chinensis* Dallas extracts on cell proliferation and cell cycle of SGC-7901 and HepG2 cell lines. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 34(12): 2278–2281. [侯晓晖, 孙廷, 李晓飞, 2012. 九香虫三氯甲烷浸提物对两种癌细胞增殖和周期的影响. 中成药, 34(12): 2278–2281.]
- Hou XH, Sun T, Li XF, 2013. The effect of *Aspongopus chinensis* Dallas crude extract on proliferation and cell cycle of SGC-7901 and HepG2 cells. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 1(24): 108–109. [侯晓晖, 孙廷, 李晓飞, 2013. 九香虫粗提物对 SGC-7901 和 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响. 时珍国医国药, 1(24): 108–109.]
- Lalier L, Vallette F, Manon S, 2022. Bcl-2 family members and the mitochondrial import machineries: The roads to death. *Biomolecules*, 12(2): 162.
- Liu CS, Zhu JH, Hou JH, Pan RB, Xie B, 2015. Discusses the activating blood efficacy and application in tumor of the insect Chinese medicine. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 11(19): 52–54. [刘升长, 朱金华, 侯吉华, 潘荣斌, 谢斌, 2015. 虫类药活血功效及抗肿瘤应用探析. 亚太传统医药, 11(19): 52–54.]
- Liu CY, Zhang Li, Hou XH, Chang Y, Sun ZC, 2014. The effects of petroleum ether and methanol crude extracts of *Aspongopus chinensis* Dallas on the proliferation and cell cycle of SGC7901 cells. *Shandong Medical Journal*, 54(6): 32–34. [刘川燕, 张莉, 侯晓晖, 昌艺, 孙志诚, 2014. 九香虫的石油醚及甲醇粗提物对 SGC7901 细胞增殖和细胞周期的影响. 山东医药, 54(6): 32–34.]
- Liu QF, 2002. Modern clinical research and application of *Aspongopus chinensis*. *Journal of Henan University (Medical Science)*, 21(4): 66–67. [刘庆芳, 2002. 九香虫现代临床研究与应用. 河南大学学报(医学科学版), 21(4): 66–67.]
- Liu XY, Li JW, Liu XF, Sun YA, 2021. Research progress of Chinese medicine joined with neoadjuvant chemotherapy in treating breast cancer. *Global Traditional Chinese Medicine*, 14(2): 357–362. [刘晓宇, 李静蔚, 刘晓菲, 孙贻安, 2021. 中药联合新辅助化疗治疗乳腺癌的研究进展. 环球中医药, 14(2): 357–362.]
- Otto T, Sicinski P, 2017. Cell cycle proteins as promising targets in

- cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 17(2): 93–115.
- Schmittgen TD, Livak KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6): 1101–1108.
- Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A, 2023. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1): 17–48.
- Tan J, Guo JJ, Wei C, Yang JQ, 2013. The inhibitory effects of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on *in vitro* proliferation of gastric carcinoma cell SGC-7901. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 32(2): 119–122. [檀军, 郭建军, 魏超, 杨佳琪, 2013. 九香虫血淋巴对胃癌 SGC-7901 细胞体外增殖的抑制作用. *山地农业生物学报*, 32(2): 119–122.]
- Tan J, Tian Y, Cai RL, Luo R, Guo JJ, 2019a. Chemical composition and antiproliferative effects of a methanol extract of *Aspongopus chinensis* Dallas. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 30: 2607086.
- Tan J, Tian Y, Cai RL, Yi TC, Jin DC, Guo JJ, 2019b. Antiproliferative and proapoptotic effects of a protein component purified from *Aspongopus chinensis* Dallas on cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3: 1–12.
- Tian Y, Tan J, Zhao S, Guo JJ, 2020a. Chemical constituents of aqueous extract from *Aspongopus chinensis* and their anti-proliferative activities on breast cancer cells. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 42(4): 943–948. [田莹, 檀军, 赵帅, 郭建军, 2020a. 九香虫水提液对乳腺癌细胞增殖的作用. *中成药*, 42(4): 943–948.]
- Tian Y, Tan J, Zhao S, Guo JJ, 2020b. Main components and anti-proliferative activities of *Aspongopus chinensis* decoction on breast cancer cells. *Journal of Environmental Entomology*, 42(2): 299–305. [田莹, 檀军, 赵帅, 郭建军, 2020b. 九香虫水提液化学成分及其对乳腺癌细胞增殖的抑制作用. *环境昆虫学报*, 42(2): 299–305.]
- Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA, 2019. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, 10(3): 177.
- Xie ZY, Zhao XZ, 2017. New progress in anti-tumor treatment of insect traditional Chinese medicine. *World Latest Medicine Information*, 17(A1): 136. [谢振颖, 赵晓珍, 2017. 虫类中药抗肿瘤治疗新进展. *世界最新医学信息文摘*, 17(A1): 136.]
- Yang JQ, Tan J, Cao ML, Jin DC, Guo JJ, 2017a. The inhibitory effect of haemolymph from *Aspongopus chinensis* Dallas on growth of human breast cancer MCF-7 by CCK-8. *Journal of Environmental Entomology*, 39(1): 193–197, 220. [杨佳琪, 檀军, 曹米兰, 金道超, 郭建军, 2017a. CCK-8 法检测九香虫血淋巴对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用. *环境昆虫学报*, 39(1): 193–197, 220.]
- Yang JQ, Tan J, Cao ML, Jin DC, Song X, Guo JJ, 2017b. Apoptosis rules of MCF-7 and SGC-7901 cell line induced by haemolymph from *Aspongopus chinensis* detected by ELISA. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 42(12): 48–52. [杨佳琪, 檀军, 曹米兰, 金道超, 宋欣, 郭建军, 2017b. ELISA 法检测九香虫血淋巴诱导两种肿瘤细胞凋亡规律. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 42(12): 48–52.]
- Yang S, Zhao S, Tian Y, Cai RL, Chen XM, Guo JJ, 2024. Network pharmacology analysis of the components and mechanism of *Aspongopus chinensis* decoction against hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 61(1): 177–187. [杨莎, 赵帅, 田莹, 蔡仁莲, 陈绪美, 郭建军, 2024. 基于网络药理学九香虫水煎液抗肝癌成分及可能机制分析. *应用昆虫学报*, 61(1): 177–187.]
- Yu HM, Deng Y, Zhao S, Guo JJ, 2023. Extraction conditions of polysaccharides from *Aspongopus chinensis* (Hemiptera: Dinidoridae) and their inhibitory effects on human breast cancer HCC1937 cells. *Acta Entomologica Sinica*, 66(1): 45–54. [于姮梅, 邓扬, 赵帅, 郭建军, 2023. 九香虫多糖提取条件筛选及其对人乳腺癌 HCC1937 细胞的抑制作用. *昆虫学报*, 66(1): 45–54.]
- Zhao S, Tan J, Yu HM, Tian Y, Wu YF, Luo R, Guo JJ, 2021. *In vivo* and *in vitro* antiproliferative and antimetastatic effects of hemolymph of *Aspongopus chinensis* Dallas on breast cancer cell. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 41(4): 523–529.
- Zhang SW, Sun KX, Chen R, Wang SM, Li L, Zeng HM, Wei WW, He J, 2023. Cancer statistics in China, 2016. *Zhong Hua Zhong Liu Za Zhi*, 45(3): 212–220. [郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 陈茹, 王少明, 李荔, 曾红梅, 魏文强, 赫捷, 2023. 2016 年中国恶性肿瘤流行情况分析. *中华肿瘤杂志*, 45(3): 212–220.]