

• 论 著 •

基于 miR21-5p 靶向 FAM13A 基因研究西黄丸含药血清干预 乳腺癌细胞的功能机制研究^{*}

程菊苓¹, 毛 杰², 贺 惠³, 彭嘉琪⁴, 许莹芊⁴, 彭欢子⁴, 王金全⁴, 李云豪⁴, 谢小兵^{4△}

1. 张家港市第一人民医院医学检验科, 江苏苏州 215600 ; 2. 常州市第一人民医院医学检验科, 江苏常州 213003; 3. 湘潭医卫职业技术学院, 湖南湘潭 411104; 4. 湖南中医药大学第一附属医院医学检验中心, 湖南长沙 410007

摘 要:目的 探讨基于微小 RNA(miR)21-5p 靶向 FAM13A 基因研究西黄丸含药血清干预乳腺癌细胞的功能机制研究。方法 利用生物信息学网站预测 FAM13A 基因的潜在 miRNA, 双荧光素酶报告实验验证 FAM13A 与预测 miRNA 之间的结合位点关系; 制备西黄丸含药血清, 培养人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 采用 CCK-8 实验检测西黄丸含药血清不同稀释比例浓度干预 MDA-MB-231 细胞的增殖情况, 选出西黄丸含药血清抑制乳腺癌细胞增殖的最佳稀释比例浓度; 通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测西黄丸含药血清干预后, MDA-MB-231 细胞内 FAM13A mRNA 和 miR21-5p 的相对表达水平; 应用细胞增殖(Edu)检测试验、细胞凋亡检测(TUNEL)试验检测西黄丸含药血清干预 MDA-MB-231 细胞后细胞增殖和凋亡功能的影响。对 MDA-MB-231 细胞行 siRNA 慢病毒转染, 敲减 FAM13A 基因, 应用 Edu 检测试验、TUNEL 试验检测慢病毒转染后, MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡能力的变化; 通过应用 RT-qPCR 技术检测 FAM13A 基因敲除后 MDA-MB-231 细胞内 miR21-5p 的表达水平。结果 TargetScan 在线网站预测在 FAM13A mRNA 的 3'UTR 中有潜在 miR21-5p 结合序列; 双荧光素酶报告实验验证 miR21-5p 与 FAM13A 存在互作关系。西黄丸含药血清干预 MDA-MB-231 细胞后, RT-qPCR 试验检测结果显示: 与对照组(NC 组)比较, 西黄丸含药血清组(XHW 组)下调 FAM13A mRNA 的表达水平($P < 0.05$); 上调 miR21-5p 的表达水平($P < 0.05$); 与 NC 组相比, XWH 组细胞增殖能力减弱, 并促进细胞凋亡。对 MDA-MB-231 细胞沉默 FAM13A 基因后, 与对照组(shCtrl 组)比较, shFAM13A 组中细胞增殖能力显著减弱, 并促进细胞凋亡; RT-qPCR 试验结果显示: 与 shCtrl 组比较, shFAM13A 组中 miR21-5p 表达水平显著上调($P < 0.05$)。结论 西黄丸可通过调节 miR21-5p 影响 FAM13A 基因表达水平参与乳腺癌抗肿瘤治疗。

关键词: 乳腺癌; FAM13A; 西黄丸; 微小 RNA21-5p

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2025.19.006

中图法分类号: R737.9

文章编号: 1673-4130(2025)19-2339-08

文献标志码: A

Functional mechanism of Xihuang pill drug containing serum in intervention of breast cancer cells based on miR21-5p targeting FAM13A gene^{*}

CHENG Juling¹, MAO Jie², HE Hui³, PENG Jiaqi⁴, XU Yingqian⁴, PENG Huanzi⁴,
WANG Jinquan⁴, LI Yunhao⁴, XIE Xiaobing^{4△}

1. Department of Medical Laboratory, the First People's Hospital of Zhangjiagang, Suzhou, Jiangsu 215600, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 3. Center of Medical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 4. Xiangtan Medical and Health Vocational and Technical College, Xiangtan, Hunan 411104, China

Abstract: Objective To explore the related functional mechanism of Xihuang pill containing serum intervention in breast cancer cells based on microRNA (miR)21-5p targeting FAM13A gene. **Methods** Bioinformatics websites was used to predict potential miRNAs of FAM13A gene, double luciferase reporter experiments were conducted to verify the binding site relationship between FAM13A and predicted miRNAs. The Xihuang pill containing serum was prepared, and human breast cancer MDA-MB-231 cells were cultured. The

^{*} 基金项目: 湖南中医药大学学科建设“揭榜挂帅”项目(22JBZ037)。

作者简介: 程菊苓, 女, 技师, 主要从事肿瘤分子生物学相关研究。 △ 通信作者, E-mail: xxiaobing888@163.com。

proliferation of MDA-MB-231 cells was interfered by the Xihuang pill containing serum with different dilution ratios by CCK-8 test, and the best dilution ratio concentration of Xihuang pill containing serum to inhibit the proliferation of breast cancer cells was selected. Real time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was applied to detect the relative expression levels of FAM13A mRNA, as well as the relative expression levels of miR21-5p, in MDA-MB-231 cells after intervention with Xihuang pill containing serum. Cell proliferation (Edu) assay and cell apoptosis detection (TUNEL) assay were used to detect the effects of Xihuang pill containing serum intervention on cell proliferation and apoptosis function in MDA-MB-231 cells. The siRNA lentiviral transfection on MDA-MB-231 cells was performed to knock down the FAM13A gene, and Edu assay and TUNEL assay were used to detect changes in proliferation and apoptosis ability of MDA-MB-231 cells after lentiviral transfection. The expression level of miR21-5p in MDA-MB-231 cells after FAM13A gene knock-out was detected by RT-qPCR technology. **Results** Target Scan online website predicted the potential miR-21-5p binding sequence in the 3'UTR of FAM13A mRNA, and dual luciferase reporter assay confirmed the interaction between miR-21-5p and FAM13A. After intervention of MDA-MB-231 cells with Xihuang pill drug containing serum, RT-qPCR results showed that compared with the control group (NC group), the Xihuang pill drug containing serum group (XHW group) downregulated the expression levels of FAM13A mRNA ($P<0.05$), and upregulated the expression level of miR21-5p ($P<0.05$). Compared with the NC group, the XWH group showed reduced cell proliferation ability and promoted cell apoptosis. ($P<0.05$). After silencing the FAM13A gene in MDA-MB-231 cells, compared with the control group (shCtrl group), the shFAM13A group showed a significant decrease in cell proliferation ability and promoted cell apoptosis. The RT-qPCR results showed that compared with the shCtrl group, the expression level of miR21-5p was significantly upregulated in the shFAM13A group ($P<0.05$). **Conclusion** Xihuang pill could participate in the anti-tumor treatment of breast cancer by regulating miR21-5p to affect the expression level of FAM13A gene.

Key words: breast cancer; FAM13A; Xihuang pill; microRNA21-5p

乳腺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤,也是引起女性癌症相关死亡的主要原因,占癌症病例的 24.2%,占癌症相关死亡病例的 15.0%^[1-2],由于其高发病率和病死率,乳腺癌一直以来是非常热门的研究课题,因此阐述其生物学过程和具体发病机制对于更好有效的治疗癌症患者仍然非常重要^[3-5]。中医中药可调节机体的内环境,提高机体免疫功能,并对促细胞分化和癌细胞逆转等方面具有调控作用。西黄丸是中医药抗肿瘤名方,由牛黄、麝香、乳香及没药组成,具有消肿止痛、解毒散痈、软坚散结之效,是临床上治疗“肺痈”、“痰核”、“瘰癧”及“乳岩”之名方^[6]。研究发现其在肝癌、肺癌、结肠癌和血液系统恶性肿瘤中均具有明显的抑制效果^[7-8]。

FAM13A(OMIM: 613299)基因定位于染色体 4q22,含有 25 个外显子,大小约为 332 kb,是控制细胞周期和增殖的相关细胞通路的重要开关元件。最近的全基因组关联研究(GWAS)表明,FAM13A 基因与多种肺部疾病有关,包括慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺癌和肺纤维化^[9]。然而关于 FAM13A 基因的生物学功能的研究还知之甚少。

微小 RNA(miRNA)是一类内源性、非编码的单链小分子 RNA,具有高度保守性、时序性、组织特异性,可调节细胞的生长发育,参与细胞分化,调控基因表达,指导肿瘤的诊断和预后,调控干细胞自我更

新^[10]。通过直接降解信使 RNA(mRNA)或抑制其转录后翻译调控靶基因表达,在肿瘤的发生发展中起重要作用^[11]。

关于 FAM13A 基因的研究主要在肺部功能和疾病领域,其他功能及相关 miRNA 如何影响肿瘤目前尚不明确,国内外关于该基因与肿瘤的研究报道除肺部疾病外极少,基于本课题组前期实验成果及 FAM13A 基因在人体生长发育、调控细胞免疫和增殖等方面的重要作用^[12-13],采用 TargetScan Human 7.2、TarBase 和 miRDB 等生信网站进行预测,结果提示 FAM13A 可能是 miR21-5p 的靶基因,但是否存在结合位点仍需双荧光素酶基因报告试验进行验证。因此本文试图探讨西黄丸含药血清是否基于 miRNA 靶向 FAM13A 基因对乳腺癌的生物学功能存在调控作用,同时进一步阐明 FAM13A 与 miRNA 分子调控机制,以为中医药防治乳腺癌提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购于武汉普诺赛生命科技有限公司(Procell,产品货号:CL-0150);SPF 级 SD 雄性大鼠 6 只,6 周,体重 180~200 g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(鄂)2022-0124。西黄丸购自北京同仁堂科技发展股份有限公司,其成分为牛黄、人工麝香、醋乳香、醋没药,产品批号:21041385。miR21-5p、

FAM13A 引物合成(擎科生物有限公司);荧光定量 PCR 仪(ABI, USA);倒置显微镜(Nikon);DMEM (Procell,货号 PM150210);细胞增殖(Edu)染色试剂盒(碧云天,货号:C0078s);细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒(Elabscience,货号:E-CK-A32)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株置于含有体积分数 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,将培养基置于 37℃、5% CO₂ 常规湿度的培养箱中,每间隔 48~72 h 传代 1 次,用于后续实验。

1.2.2 含药血清制备 称取药物西黄丸 1.458 g,西黄丸研磨成粉末状,并加入 18 mL 蒸馏水浸泡制成混悬液,配制成 0.081 g/mL 药液,大鼠称重后按体重灌胃,给药量为 0.810 g/kg,给药体积为 10 mL/kg,每日给药 2 次。连续给药 7 d,于第 7 天末次给药 2 h 后

腹主动脉取血(给药前禁食不禁水 12 h),静置 30 min 后,3 000 r/min(离心半径:15 cm)离心 10 min,收集血清,56℃灭活 30 min,用 0.22 μm 除菌滤器过滤灭菌,分装,-80℃保存备用;空白大鼠血清制备同含药血清制备方法一致,给予相同剂量的生理盐水灌胃。伦理批号:湖南中医药大学第一附属医院(HN-LL-YJLSW-2023-001)。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 FAM13A、miR21-5p 的相对表达量 Trizol 试剂盒提取空白血清对照组(NC 组)、含药血清组(XHW 组)乳腺癌细胞中总 RNA,并用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,采用 RT-qPCR 试剂盒进行扩增,引物序列见表 1, FAM13A 基因内参为 GAPDH, miR21-5p 内参为 U6,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。

表 1 引物序列(5'-3')

基因		引物序列	长度(bp)
Homo GAPDH	F:	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	21
	R:	TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT	20
Homo FAM13A	F:	TCCTCGTTTCTACGCTTATGG	21
	R:	TGTCACTGTGGGAAGGTCTGT	21
U6	F:	CGCTTCGGCAGCACATATAC	20
	R:	AAATATGGAACGCTTCACGA	20
hsa-miR21-5p	F:	TGCGTAGCTTATCAGACTGAT	22
	R:	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT	22

1.2.4 CCK-8 试验筛选西黄丸含药血清抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖稀释比例浓度 按如下处理对细胞进行分组:1 为正常对照组;2~9 为不同稀释比例西黄丸含药血清分组;10~17 为不同稀释比例空白大鼠血清分组,每组设置 3 个复孔。正常对照组培养基成分:89%DMEM+10%FBS+1%P/S;2.5%西黄丸含药血清培养基成分:96.5%DMEM+2.5%含药血清+1%P/S(双抗);2.5%空白大鼠血清培养基成分:96.5%DMEM+2.5%空白血清+1%P/S;其他稀释比例浓度 5.0%~20.0%按上述比例相应增减 DMEM 培养基比例。取处于对数生长期,生长状态良好的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,调整细胞最终浓度为 3×10³ 个/孔,同时设空白组,37℃、5%CO₂ 的培养箱培养过夜。加入含有不同稀释比例浓度的西黄丸含药血清和空白大鼠血清。药物干预 24 h、48 h,在试验终止前 4 h 在各试验组中加入 10 μL CCK-8 试剂,在每个实验组别中设置 3 个平行孔。应用酶标仪检测各实验组在 450 nm 波长时的吸光度值,并计算西黄丸含药血清抑制乳腺癌细胞增殖的最佳稀释比例浓度。计算细胞生长抑制率的公式为:细胞生长抑制率(%)=(空白大鼠血清组平均 A 值-西黄丸含

药血清组平均 A 值/正常对照组平均 A 值)×100%。

1.2.5 Edu 试验检测乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力变化 取处于对数期、生长状态良好的细胞调整细胞浓度为 10⁵ 个/毫升接种于 12 孔培养板(爬片事先放入 12 孔板中),按事先 CCK-8 试验筛选的最佳稀释比例浓度 12.5%含药血清、48 h 时间点干预乳腺癌细胞对应组,Edu 标记细胞后,按试剂盒操作步骤进行试验并在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.6 TUNEL 试验检测 MDA-MB-231 细胞凋亡能力的变化 取处于对数生长期,生长状态良好的细胞,调整细胞悬液浓度为 10⁵ 个/毫升接种于细胞培养 12 孔板(爬片事先放入 12 孔板中)。按事先 CCK-8 试验筛选的最佳稀释比例浓度 12.5%含药血清、48 h 时间点干预乳腺癌细胞对应组,按 TUNEL 试剂盒操作说明进行试验并在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验验证 FAM13A 和 miR21-5p 的靶向关系 首先采用 TargetScan 数据库预测 FAM13A 的潜在 miRNA。互补结合位点的碱基序列见图 1。结合位点:ATAAGCTA;突变位点:TTTACCAA。

hFAM13A-3'-UTR-WT:
5'-TAATAGCTCTCTTAAATAAGCTATGATATTAATCAGATC3'
Hsa-miR21-5p 5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA3'
hFAM13A-3'-UTR-MUT:
5'-TAATAGCTCTCTTAAATTACCAATGATATTAATCAGATC3'
Hsa-miR21-5p 5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA3'

图 1 碱基序列图

将野生型和突变型 FAM13A-3'-UTR 靶向区域构建至 pYr-MirTarget 载体(武汉华研生物)中,然后分别与 miR21-5p mimic 和 mimic NC 共转染至 MDA-MB-231 细胞。参考双荧光素酶试剂盒说明书,以萤火虫荧光值作为内参,采用酶标仪检测荧光素酶活性。每个样品中会有 3 个数值;RLUI-内参萤火虫荧光酶素酶反应强度;RLU2-海肾荧光素酶反应强度,计算 2 组数据比值,即 RLU2/RLU1。

1.2.8 慢病毒转染 MDA-MB-231 细胞,构建慢病毒低表达 FAM131A 基因载体 病毒感染前一天收集处于对数期、生长状态良好的 MDA-MB-231 细胞重悬,调整细胞悬液浓度为 3×10^5 个/毫升接种于 6 孔细胞培养板,当细胞铺板密度达 30%~60%时加入 10 μ L 病毒液,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h 后更换新鲜培养基;感染 48 h 后检测细胞荧光转染效率,选择最佳干扰序列组培养后进行后续试验。

本次使用的干扰序列是由上海吉玛生物公司设计,以 FAM13A 基因为模板,设计并合成 3 条 siRNA 和 1 条 NC,转染 MDA-MB-231 细胞,加上正常乳腺癌细胞培养组,共计 5 组为 NC 组、空载慢病毒转染组(shCtrl)组、慢病毒感染(shFAM13A1)组(2 498 组)、shFAM13A2 组(2 684 组)、shFAM13A3 组(1 404 组)。采用 RT-qPCR、WB 试验筛选出一条最佳序列用于后续实验。见表 2。

表 2 慢病毒信息

慢病毒分组	病毒编号	病毒滴度 (TU/mL)	病毒感染 用量(μ L)
shCtrl 组	pLVX-NC	10^6	10
shFAM13A3 组	pLVX-Homo-FAM13A-1404	10^6	10

1.3 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布的连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较若符合正态分布、满足方差齐性则采用独立样本 t 检验,不符合正态分布的连续变量以 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 秩和检验。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析,蛋白水平的相对表达采用灰度值做分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。本研究数据绘图采用 GraphPad Prism 8.0 绘制。

2 结 果

2.1 CCK-8 试验筛选西黄丸含药血清抑制乳腺癌细

胞增殖最佳稀释比例浓度结果 与正常组相比,西黄丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞增殖有明显的抑制作用,且随含药血清浓度增加抑制作用逐渐增强,12.5%的西黄丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用最显著($P < 0.001$),药物作用 24 h 后对细胞抑制率为 23.5%,作用 48 h 后对细胞抑制率为 29.3%,药物作用 48 h 对细胞增殖的抑制最显著($P < 0.001$)。其后随着西黄丸含药血清浓度增加,其对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用呈下降趋势,因此选取浓度为 12.5%的西黄丸含药血清作为后续药物干预 MDA-MB-231 细胞试验的药物浓度,作用时间为 48 h。见图 2。

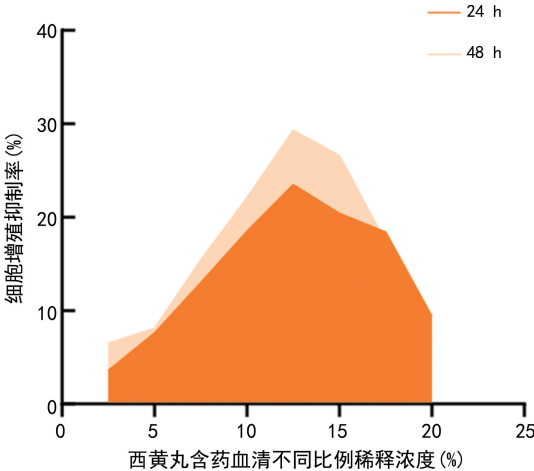
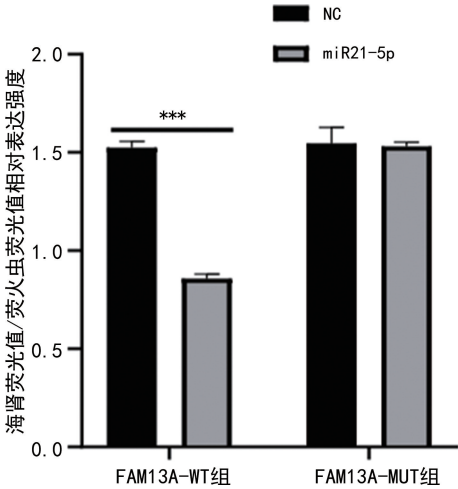


图 2 不同浓度西黄丸含药血清对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

2.2 miR21-5p 靶向负调控 FAM13A 基因的表达 TargetScan 数据库预测结果显示, FAM13A 是 miR21-5p 的潜在靶基因。双荧光素酶实验结果显示过表达 miR21-5p 显著抑制野生型 FAM13A 的表达水平($P < 0.001$),且 miR21-5p 组中突变型 FAM13A 的表达水平差异无统计学意义($P = 0.763$)。见图 3。



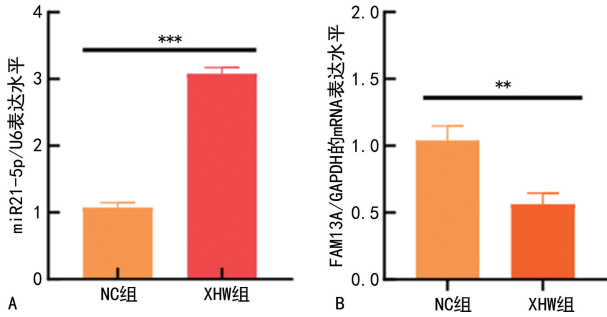
注:野生型为与 NC 组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 双荧光素酶实验验证 miR-21-5p 与 FAM13A 的互作关系

2.3 RT-qPCR 检测西黄丸含药血清干预乳腺癌细胞后的 FAM13A 和 miR21-5p 的相对表达水平变化 与 NC 组相比, XHW 组中 miR21-5p 表达水平上调, 且差异具有统计学意义 ($P<0.001$), 见图 4A; 与 NC 组相比, XHW 组中 FAM13A mRNA 表达水平下调, 且差异具有统计学意义 ($P=0.004$), 见图 4B。

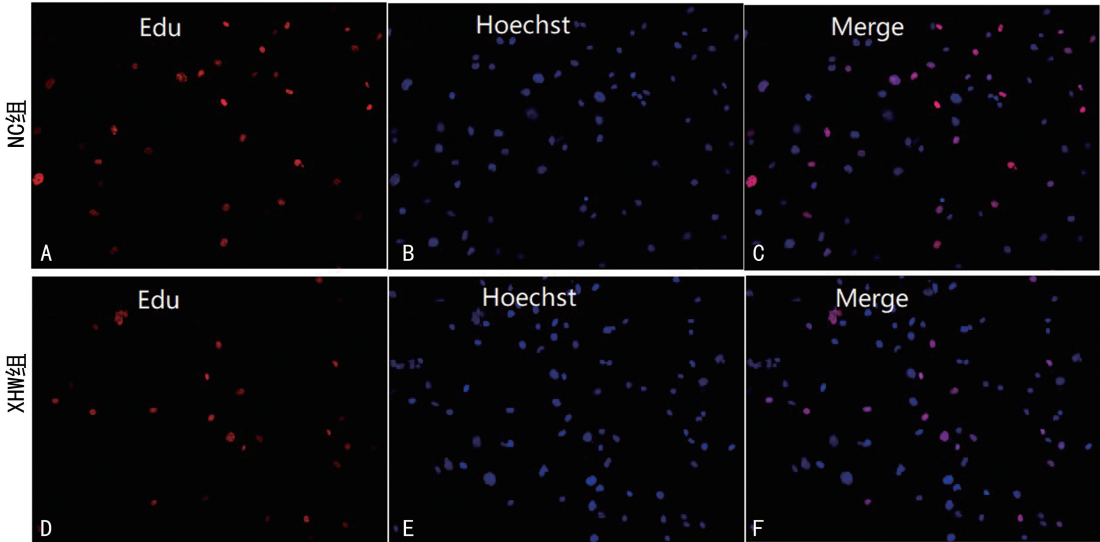
2.4 Edu 试验检测西黄丸含药血清干预乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力的变化 与 NC 组相比, XHW 组细胞增殖数显著减少, 见图 5。

2.5 TUNEL 试验检测 MDA-MB-231 细胞凋亡能力的变化 与 NC 组相比, XHW 组细胞凋亡数显著增加, 见图 6。



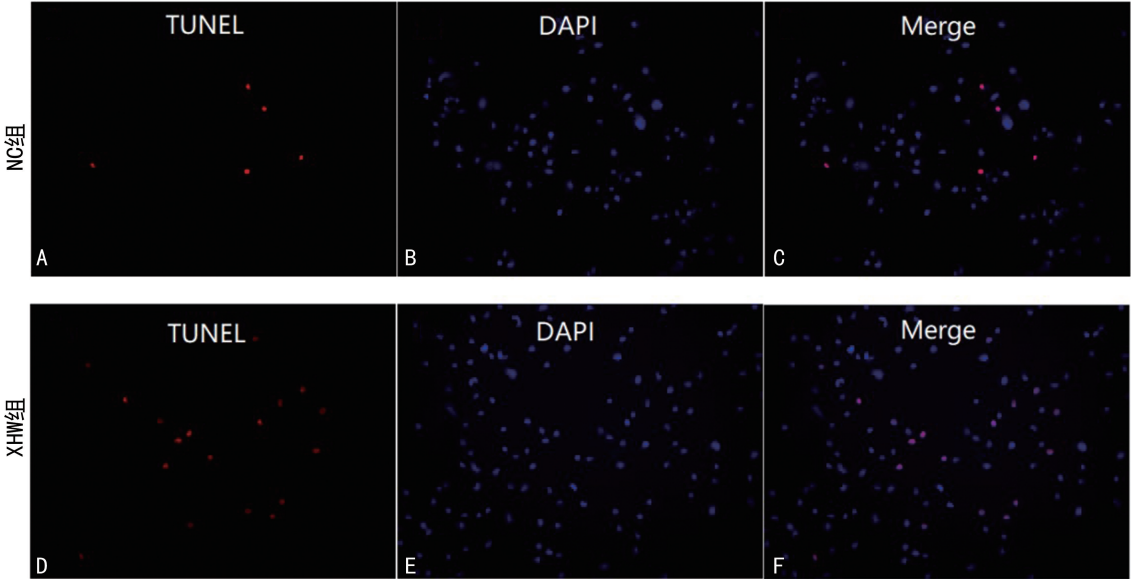
注: A 为两组中 miR21-5p 的相对表达水平; B 为两组中 FAM13A 的 mRNA 表达水平。与 NC 组相比, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图 4 NC 组、XHW 组中 miR21-5p、FAM13A mRNA 相对表达量



注: A~C 为 NC 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 Edu 标记细胞阳性, 蓝色为细胞核, 荧光视野 $\times 200$); D~F 为 XHW 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 Edu 标记细胞阳性, 蓝色为细胞核, 荧光视野 $\times 200$)。

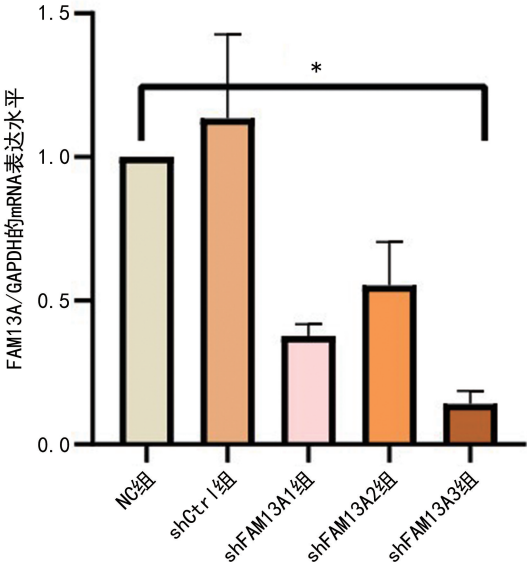
图 5 两组荧光显微镜下细胞增殖数量对比结果



注: A~C 为 NC 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 TUNEL 标记凋亡细胞阳性, 蓝色为细胞核, 荧光视野 $\times 200$); D~F 为 XHW 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 TUNEL 标记凋亡细胞阳性, 蓝色为细胞核, 荧光视野 $\times 200$)。

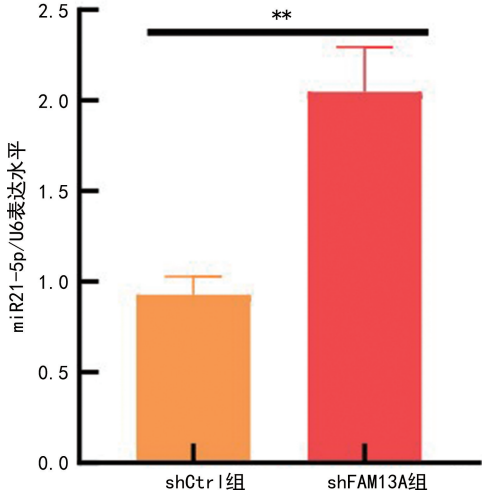
图 6 两组荧光显微镜下细胞增殖数量对比结果

2.6 慢病毒转染 MDA-MB-231 细胞,构建慢病毒低表达 FAM13A 载体 从 RT-PCR 检测结果可以得出,在 MDA-MB-231 细胞中,与 NC 组相比,shFAM13A1 组(2 498 组)、shFAM13A2 组(2 684 组)、shFAM13A3 组(1 404 组)FAM13A mRNA 表达水平显著下调,敲减效率分别达 62. 3%、44. 6%、86. 0%,因此选取 shFAM13A3 组作为后续实验组($P=0.037$),说明基因表达抑制具有显著效果。见图 7。



注:与 NC 组相比, * $P<0.05$ 。
图 7 FAM13A 敲减后 FAM13A mRNA 表达丰度柱状图

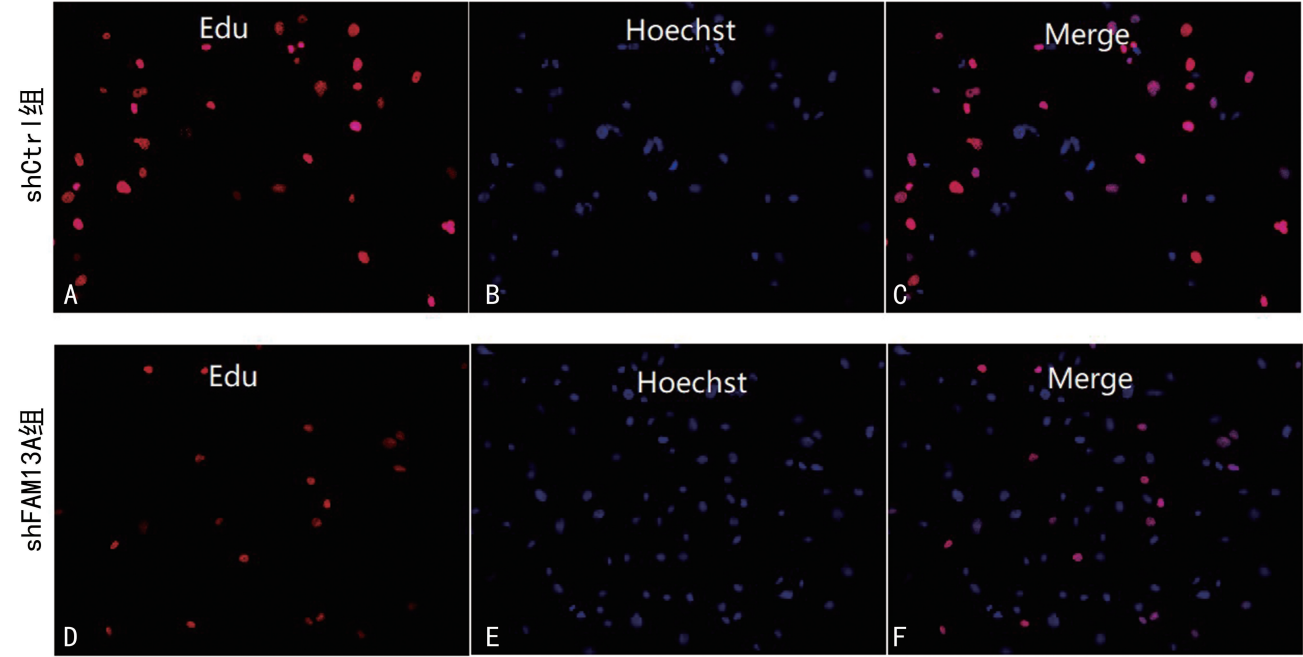
2.7 应用 RT-qPCR 检测 FAM13A 基因敲减后 miR21-5p 的相对表达水平 与 shCtrl 组相比,shFAM13A 组中 miR21-5p 表达水平上调,且差异具有统计学意义($P=0.002$)。见图 8。



注:与 shCtrl 组相比, * * $P<0.01$ 。
图 8 应用 RT-qPCR 检测 FAM13A 基因敲减后 miR21-5p 的相对表达水平

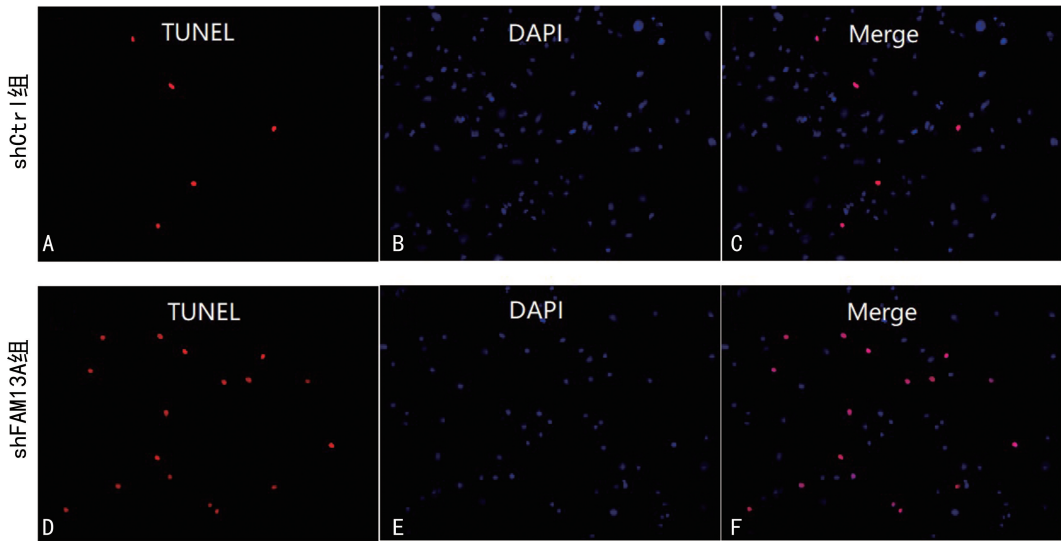
2.8 Edu 试验检测 MDA-MB-231 细胞增殖能力的变化 与 shCtrl 组相比,shFAM13A 组细胞增殖数显著减少。见图 9。

2.9 TUNEL 试验检测 MDA-MB-231 细胞凋亡能力的变化 与 shCtrl 组相比,shFAM13A 组细胞凋亡数显著增加。见图 10。



注:A~C 为 shCtrl 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 Edu 标记细胞阳性,蓝色为细胞核,荧光视野 $\times 200$);D~F 为 shFAM13A 组细胞随机单个荧光视野图(红色为 Edu 标记细胞阳性,蓝色为细胞核,荧光视野 $\times 200$)。

图 9 两组荧光显微镜下细胞增殖数量对比结果



注：A~C 为 shCtrl 组细胞随机单个荧光视野图（红色为 TUNEL 标记凋亡细胞阳性，蓝色为细胞核，荧光视野×200）；D~F 为 shFAM13A 组细胞随机单个荧光视野图（红色为 TUNEL 标记凋亡细胞阳性，蓝色为细胞核，荧光视野×200）。

图 10 两组荧光显微镜下细胞增殖数量对比结果

3 讨 论

乳腺癌是导致女性癌症相关死亡的主要原因，其肿瘤发生和发展的分子机制的复杂性决定了癌症的异质性。在分子水平上，这种多样性对治疗方案的选择和疾病预后提出了挑战，也是导致其病死率和复发率居高不下的主要原因^[14-16]。孙方正等^[17]和席忠孝等^[18]研究指出 miRNA 异常表达与乳腺癌的发生、转移及预后关系密切，miR-21-5p 可在转录后或翻译水平抑制乳腺癌 MCF-7 细胞 Spry1 蛋白的表达，促进 ERK 磷酸化，可能是乳腺癌发生的分子机制之一。有研究关于 miR21-5p 在肿瘤细胞生长发育、调节细胞分化等方面的作用也给出了类似的结论^[10,19-20]。FAM13A 亚型 1 含有 Ras 同源 GTP 酶激活蛋白 (Rho GAP) 结构域，该结构域对细胞增殖和存活的调节至关重要，并在维持肺部功能稳态方面起着重要作用^[21-23]。

西黄丸又名犀黄丸，为治疗“乳岩”、“瘰疬”、“痰核”、“肺癰”之名方^[24-25]。随着研究的深入，其临床应用也更加广泛，现代医学研究表明，中药及中药复方制剂成分复杂，干扰因素多，药效物质基础不明，药物药理作用机制、代谢反应过程等问题难以完全阐明，缺乏相关的药理学、毒理学临床验证数据，而西黄丸含药血清可以有效地抑制乳腺癌细胞增殖，另外传统的体外药效学实验方法如中药水提液或醇提液直接加入体外反应体系中不如整体动物口服或静脉给药后检测其含药血清化学成分活性更具合理性^[26-29]。因此，本研究根据人与动物的剂量转换关系，制备了西黄丸含药血清，并通过 CCK-8 实验验证了不同浓度的西黄丸含药血清可以对 MDA-MB-231 细胞的增殖产生抑制作用，后续实验选用 12.5% 的西黄丸含药血清干预乳腺癌 MDA-MB-231 细胞，药物干预时间

为 48 h。通过 Edu、TUNEL 细胞试验验证发现，西黄丸含药血清组细胞增殖能力减低，并促进细胞凋亡，说明西黄丸含药血清对乳腺癌细胞增殖能力的抑制效果显著，影响乳腺癌细胞的发展进程，发挥抗肿瘤的作用。西黄丸含药血清干预乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后，RT-qPCR 实验结果显示，FAM13A 基因的 mRNA 表达水平均显著下调，miR21-5p 的相对表达水平显著上调。双荧光素酶报告实验结果显示，miR21-5p 与 FAM13A 3'UTR 存在结合位点，说明 miR21-5p 可以靶向调控 FAM13A 基因。由此可以推测，FAM13A 基因在乳腺癌中可能发挥致癌的作用，而西黄丸可以通过上调 miR21-5p 进而抑制 FAM13A 基因的表达发挥抗肿瘤的作用。后续试验过程中，通过慢病毒转染对 FAM13A 基因进行敲减，观察沉默 FAM13A 基因对乳腺癌细胞增殖、凋亡能力的影响及对 miR21-5p 表达水平的影响。研究发现，在乳腺癌细胞中，与 shCtrl 组相比，shFAM13A 组细胞的增殖能力均显著下降，且细胞凋亡数量显著增加。而敲减 FAM13A 基因后，miR21-5p 的表达水平显著上调。由此推测 miR21-5p 通过靶向 FAM13A 基因影响乳腺癌的发生发展，FAM13A 可以作为乳腺癌治疗的一个分子靶点，其表达水平的降低，可对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞产生一系列的影响，包括抑制细胞增殖，促进细胞凋亡。

在本次实验研究中，以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为研究对象，乳腺癌细胞在体外易于培养、周期短，试验操作方便，细胞增殖分化稳定，本次试验所得结论均来自体外试验的结果，未进一步加用动物实验验证。因此在后续的研究中，应补充动物实验，以增加动物模型，更好模拟人体疾病的发生变化过程和发展规律，获得准确、可重复的实验结果，以期临床为乳

腺癌患者的预后和治疗提供数据支持,为乳腺癌抗肿瘤药物的筛选和抗肿瘤药物的发现提供理论基础和研究依据。

综上所述,西黄丸可能通过上调 miR21-5p 的表达水平,进而抑制 FAM13A 基因的表达发挥抗肿瘤的作用。

参考文献

[1] FINN R S, CROWN J P, LANG I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(1): 25-35.

[2] CHEN Z, WU W, HUANG Y, et al. RCC2 promotes breast cancer progression through regulation of Wnt signaling and inducing EMT[J]. *J Cancer*, 2019, 10(27): 6837-6847.

[3] SUN Y S, ZHAO Z, YANG Z N, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(11): 1387-1397.

[4] CRISCITIELLO C, CORTI C. Breast cancer genetics: diagnostics and treatment[J]. *Genes (Basel)*, 2022, 13(9): 1593-1602.

[5] OLIVA G, GIUSTINIANI A, DANESIN L, et al. Cognitive impairment following breast cancer treatments: an umbrella review[J]. *Oncologist*, 2024, 29(7): e848-e863.

[6] 朱正春, 姚梦群, 严芳莉, 等. 西黄丸对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭及 STAT3 信号通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(12): 1875-1878.

[7] 陈怡名, 瞿光友, 王连芝, 等. 中医经典名方西黄丸处方考证、历史沿革应用及其质量标志物预测分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(6): 65-72.

[8] 王俊亮, 马学莉, 陶蕊, 等. 西黄丸活性成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(22): 259-269.

[9] ZHANG Y, WANG S, WANG C, et al. High expression of FAM13A was associated with increasing the liver cirrhosis risk[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(3): 543-551.

[10] FUKADA M, MATSUHASHI N, TAKAHASHI T, et al. Postoperative changes in plasma miR21-5p as a novel biomarker for colorectal cancer recurrence: a prospective study[J]. *Cancer Sci*, 2021, 112(10): 4270-4280.

[11] 张宝文, 雷香丽, 李瑾娜, 等. miR-21-5p 靶向调控 TIMP3 抑制 2 型糖尿病肾病小鼠肾脏系膜细胞增殖及细胞外基质堆积[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(7): 7-14.

[12] LI P, XIE XB, CHEN Q, et al. MiRNA-15a mediates cell cycle arrest and potentiates apoptosis in breast cancer cells by targeting synuclein- γ [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16): 6949-6954.

[13] LI P, XU T, ZHOU X, et al. Downregulation of miRNA-141 in breast cancer cells is associated with cell migration

and invasion; involvement of ANP32E targeting[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(3): 662-672.

[14] KAWIAK A. Molecular research and treatment of breast cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9617-9625.

[15] ZANNETTI A. Breast cancer: from pathophysiology to novel therapeutic approaches 2. 0[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 254-270.

[16] BODEWES F, VAN ASSELT A A, DORRIUS M D, et al. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Breast*, 2022, 66(15): 62-68.

[17] 孙方正, 檀军, 陆祥, 等. miR-21-5p 靶向调控 Spry1 影响人乳腺癌细胞 ERK 的磷酸化[J]. *遵义医科大学学报*, 2021, 44(1): 21-27.

[18] 席孝忠, 李国强, 肖雷, 等. miR-21-5p 调控 FGF18 表达对结肠癌肿瘤干细胞生物学行为影响[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2021, 57(6): 886-891.

[19] BERETTA F, HUANG Y F, PUNGA A R. Towards personalized medicine in myasthenia gravis: role of circulating microRNAs miR-30e-5p, miR-150-5p and miR-21-5p [J]. *Cells*, 2022, 11(4): 740-752.

[20] YAN Q, LIU J, LIU Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived exosomal miR21-5p promotes tumor angiogenesis by regulating YAP1/HIF-1 α axis in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 179-191.

[21] EISENHUT F, HEIM L, TRUMP S, et al. FAM13A is associated with non-small cell lung cancer (NSCLC) progression and controls tumor cell proliferation and survival [J]. *Oncoimmunology*, 2017, 6(1): 1256-1252.

[22] LIANG C, WANG G, RAZA S, et al. FAM13A promotes proliferation of bovine preadipocytes by targeting Hypoxia-Inducible factor-1 signaling pathway [J]. *Adipocyte*, 2021, 10(1): 546-557.

[23] GONG L, BATES S, LI Y, et al. AKT phosphorylates FAM13A and promotes its degradation via CUL4A/DDB1/DCAF1 E3 complex[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2023, 68(5): 577-590.

[24] 顾媛媛, 孙阳, 韩玉生, 等. 西黄丸的化学成分分析及其抗肿瘤药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(3): 30-33.

[25] 刘子夜, 罗毅, 曹桂云, 等. 西黄丸溶出度测定及不同制剂方法比较[J]. *宁夏医科大学学报*, 2024, 46(7): 745-750.

[26] 何丽娟, 王煜炜, 张京彦, 等. 西黄丸含药血清对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡、迁移的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 463-466.

[27] 孙志华. 乳腺癌靶向治疗的研究进展[J]. *生命科学研究杂志*, 2017, 21(3): 275-282.

[28] 国锦, 高燕, 赵瀚年. 中药复方血清药理学研究方法进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1656-1658.

[29] 卢磊, 刘晓丹, 张培影. 中药血清药理学及血清药物化学研究进展[J]. *中国中医急症*, 2018, 27(1): 178-181.