

淫羊藿苷下调 TGF- β /Smad 信号通路 抑制三阴性乳腺癌侵袭转移

肖增友^{1,2}, 杨泽安^{1,2}, 陈彩红³, 李佳贤², 何钰洁², 付品婷², 王杰^{1,2}

(¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062;

² 上海中医药大学附属普陀医院甲乳外科, 上海 200062;

³ 上海市宝山区顾村镇菊泉新城社区卫生服务中心, 上海 200436)

摘要 目的 探讨淫羊藿苷(ICA)下调转化生长因子- β /Smad(TGF- β /Smad)信号通路抑制人三阴性乳腺癌(TNBC)细胞侵袭转移的作用机制。方法 体外培养 TNBC 细胞(MDA-MB-231 和 MDA-MB-468),分为4组,加入 ICA(15 μ mol/L)设为实验组;加入 10 μ mol/L TGF- β 受体抑制剂 LY2109761 设为模型组;在模型组基础上,加入 15 μ mol/L ICA 设为 LY2109761 + ICA 组;另设对照组。CCK-8、平板克隆、5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)、细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力;免疫荧光和 Western blot 实验检测上皮-间质转化(EMT)相关蛋白以及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、Smad2 和磷酸化 Smad2(P-Smad2)通路蛋白表达水平。结果 CCK-8 结果显示随着 ICA 浓度增加,细胞的增殖能力逐渐减弱($P < 0.001$)。平板克隆与 EdU 法结果显示,与对照组相比,实验组细胞增殖能力减弱($P < 0.05$)。划痕实验和 Transwell 实验显示,与对照组相比,实验组细胞迁移和侵袭能力下降($P < 0.05$)。与模型组相比,LY2109761 + ICA 组细胞侵袭能力进一步下降($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示,与对照组相比,实验组细胞波形蛋白(Vimentin)表达下降($P < 0.05$)。与模型组相比,LY2109761 + ICA 组细胞 Vimentin 蛋白表达进一步下降($P < 0.01$)。Western blot 结果显示,与对照组相比,实验组细胞神经钙黏蛋白(N-cadherin)、基质金属蛋白酶-9(MMP9)、Vimentin 以及 TGF- β 1、Smad2、P-Smad2 蛋白表达量下降($P < 0.05$)。与模型组相比,LY2109761 + ICA 组细胞 N-cadherin、MMP9、Vimentin 以及 TGF- β 1、Smad2、P-Smad2 蛋白表达量进一步下降($P < 0.05$)。结论 ICA 通过下调 TGF- β /Smad 信号通路抑制 TNBC 细胞增殖、侵袭转移和 EMT。

关键词 淫羊藿苷;三阴性乳腺癌;TGF- β /Smad;侵袭转移;上皮间质转化;分子机制

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1574-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.002

全球每年约有 100 万名女性被诊断为乳腺癌,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)占 15%~20%^[1]。与其他乳腺癌亚型相比,TNBC 有较高的早期转移风险且预后较差^[2]。因此尽可能减少肿瘤转移是 TNBC 研究的主要目标之一,探索 TNBC 进展的潜在机制是开发新疗法的必要条件。

众所周知,上皮-间质转化(epithelial-mesen-

chymal transition, EMT) 是癌症发展中的一个关键过程,经过 EMT 的肿瘤细胞浸润到周围的基质中,形成有利于肿瘤生长转移的微环境^[3]。其中转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)被认为是 EMT 的有效诱导剂,是癌症转移的驱动因素^[4-6]。同时有研究^[7]表明,TNBC 中肿瘤细胞可自分泌过量的 TGF- β ,使其信号轴激活,从而通过 Smad2、磷酸化 Smad2 及其他下游因子诱导 EMT。鉴于 TGF- β 拥有对 EMT 强烈的诱导作用,抑制 TGF- β 信号通路的药物可能是治疗 EMT 引起 TNBC 转移的一种潜在方法。淫羊藿苷(icariin, ICA)是传统中药植物淫羊藿的化合物,具有抗肿瘤活性的药理作用^[8],对多种肿瘤均有明显的治疗作用^[9],但是对于 ICA 治疗 TNBC 的分子机制缺乏深入研究,因此该研究旨在探讨 ICA 能否通过调控 TGF- β /Smad 信号通路而抑制 TNBC 侵袭转移。

2025-05-21 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81973625);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(编号:YYZX2022164);上海市名老中医工作室建设项目(编号:SHGZS-202224)

作者简介:肖增友,男,硕士研究生;

王杰,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,通信作者,
E-mail: wangjie4177@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468(美国 ATCC 公司,货号: CRM-HTB-26、HTB-132); TGF- β 受体抑制剂 LY2109761(美国 Selleck 公司,货号: S2704); 青霉素/链霉素/庆大霉素溶液、CCK-8 试剂盒和 EdU 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号: C0223、C0038、C0085S); Transwell 小室(美国 Corning 公司,货号: 3464); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司,货号: A55860); PVDF 膜(美国 Millipore 公司,货号: IPVH00010); 超敏型 ECL 化学发光试剂盒(上海和元李记生物科技有限公司,货号: AP34L025); 神经钙黏蛋白(neural-cadherin, N-cadherin) 抗体(英国 Abcam 公司,货号: ab76011); 基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9, MMP9) 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号: WL03096); 波形蛋白(Vimentin) 抗体和磷酸化 Smad2(phosphorylated Smad2, P-Smad2)(美国 CST 公司,货号: 5741、55041); TGF- β 1 抗体、Smad2 抗体(美国 Selleck 公司,货号: F1624、F0309); GAPDH 抗体、山羊抗兔 IgG、和荧光抗兔 IgG(武汉爱博泰克公司,货号: A19056、AS014、AS053); CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher 公司,型号: Heracell 240i); 免疫倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号: CKX41/U-RFLT50); 细胞超声破碎机(美国 SONICS 公司,型号: VCX130); ChemiDoc MP 全能型成像系统(美国 BIO-RAD 公司,型号: ChemiDoc MP)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞在含有 1% 青霉素/链霉素/庆大霉素溶液和 10% 胎牛血清 L-15 培养基中放入 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱内贴壁培养。每 1~2 d 换液,待细胞融合度达到 90% 用胰酶进行消化,按 1:2 比例传代,取 3~6 代进行细胞实验。

1.2.2 CCK-8 实验检测细胞存活率 取对数生长期的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞,以 1×10^4 个/孔密度种于 96 孔板,放入培养箱孵育 24 h 后,按实验设计分别给予不同浓度 ICA 浓度(0、15、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$) 处理。培养箱中继续培养 48 h 后每孔加入 10% CCK-8 溶液,孵育 2 h,在 450 nm 处测出每孔光密度。计算细胞存活率。

1.2.3 实验分组 根据 CCK-8 实验结果分 2 批进行分组实验。第 1 批分为 2 组: 对照组和实验组(15 $\mu\text{mol/L}$ ICA), 用于检测细胞增殖、侵袭转移、EMT 和 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白水平。第 2 批分 3 组: 对照组、模型组(10 $\mu\text{mol/L}$ LY2109761) 和 LY2109761 + ICA 组(10 $\mu\text{mol/L}$ LY2109761 + 15 $\mu\text{mol/L}$ ICA), 检测 TNBC 细胞内 EMT 和 TGF- β 信号通路相关蛋白表达。

1.2.4 平板克隆实验检测细胞增殖 以 1 000 个/孔的密度将 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后按分组更换含药培养基,3 d 换液 1 次,持续培育 2 周。2 周后弃去上清液,用 PBS 冲洗 3 次,每孔加入 600 μL 4% 多聚甲醛溶液进行固定。15 min 后弃去多聚甲醛溶液, PBS 进行冲洗,每孔加入 600 μL 结晶紫溶液染色,30 min 后弃去结晶紫溶液, PBS 缓慢冲洗染料,至清洗干净,晾干后拍照,统计细胞克隆数量。

1.2.5 EdU 实验评估细胞增殖情况 把 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞以 1×10^4 个/孔密度接种于 24 孔板中,细胞贴壁后按照分组更换培养液,48 h 后按照 EdU 试剂盒说明书进行细胞固定和标记,染色后在倒置显微镜下拍照。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移 把 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞接种于 6 孔板中,待细胞长至均匀铺满皿底时,用枪头在 6 孔板内进行纵行“一”字划线, PBS 冲洗未贴壁细胞,在倒置显微镜下随机拍摄 3 个视野记录为 0 h。然后向各孔加入相应药物继续培养 24 h 后在倒置显微镜下观察划痕 0 h 同一位置细胞迁移情况并拍照。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞迁移侵袭 将小室置于 24 孔板中,细胞分组及给药按照“1.2.3”项, MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞按 1×10^5 个/孔密度接种在含 300 μL 无血清培养液的 Transwell 上室中,下室加入 700 μL 含有 20% FBS 的培养液。侵袭实验需在小室中先铺上基质胶。48 h 后将上清液吸出用 PBS 清洗,4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,0.1% 结晶紫染液染色 15 min,静置晾干,用棉签轻轻擦上室,在倒置显微镜下拍照。

1.2.8 细胞免疫荧光实验检测细胞上皮间质转化指标 细胞接种在 96 孔板中培养过夜。细胞分组及给药按照“1.2.3”项。用 PBS 洗涤 2 次,甲醛固定 15 min,0.2% TritonX 渗透 5 min,5% BSA 室温封

闭 1 h 后一抗(Vimentin, 1 : 100) 4 ℃ 孵育过夜, 然后用荧光二抗孵育 1 h。DAPI 复染, 在倒置荧光显微镜下拍照。

1.2.9 Western blot 检测 N-cadherin、MMP9、Vimentin、TGF- β 1、Smad2、P-Smad2 蛋白表达水平 将 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞按照“1.2.3”项进行分组和给药, 放入培养箱培养 48 h, 弃去上清液用 PBS 洗涤 2 次, 按照 1×10^6 个/孔的细胞密度分别加入 100 ~ 200 μ L 裂解液, 置于冰上充分裂解 15 min, 收入离心管, 12 000 r/min 离心 15 min, 取蛋白上清液用 BCA 法测定蛋白浓度并统一量为 2 mg/mL。取每组样本蛋白 10 μ L 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 随后将蛋白转至 PVDF 膜上, 再用 5% BSA 封闭液封闭 1 h, 加入相应一抗(N-cadherin、MMP9、Vimentin、TGF- β 1、Smad2、P-Smad2, 浓度均为 1 : 1 000) 4 ℃ 过夜, 第 2 天拿出吸取一抗后洗膜 3 次, 加入对应的山羊抗兔 IgG(1 : 2 000) 室温摇床孵育 1 h, 洗膜 3 次后用超敏型 ECL 化学发光液显影。

1.2.10 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8 软件统计实验数据, 结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组之间满足正态分布和方差齐性, 采用独立样本 t 检验分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 事后两两比较采用 Dunnett- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA 对 TNBC 细胞增殖能力的影响 CCK-8 实验显示(图 1A), 不同浓度 ICA(0、15、30、60、120 μ mol/L) 分别干预 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞 48 h 后, ICA 对两种细胞的增殖活性均有抑制作用且呈浓度依赖性($F_{趋势} = 241.1、779.8$, 均 $P < 0.05$), 为尽量消除 ICA 对 TNBC 细胞的毒性影响, 本实验选择低于半数抑制浓度的 15 μ mol/L 进行后续实验。细胞克隆实验结果显示(图 1B), 与对照组相比, 实验组 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞克隆形成受到抑制, 差异有统计学意义($t = 4.419、3.512$, 均 $P < 0.05$)。EdU 实验结果显示(图 1C), 与对照组相比, 实验组两种细胞棕色阳性的增殖细胞发生减少, 差异有统计学意义($t = 40.25、5.37$, 均 $P < 0.01$)。证明 ICA 能抑制 TNBC 细胞增殖。

2.2 ICA 对 TNBC 细胞侵袭、迁移能力的影响 细胞划痕实验结果显示(图 2A), 与对照组相比较,

实验组处理 24 h 后, MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞迁移距离受到抑制, 差异有统计学意义($t = 8.620、2.831$, 均 $P < 0.05$)。细胞 Transwell 实验结果显示(图 2B), 与对照组相比, 实验组 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞 48 h 穿过滤膜的数量下降, 差异有统计学意义($t_{迁移} = 3.460、7.156$, $t_{侵袭} = 6.995、3.011$, 均 $P < 0.05$)。证明 ICA 可减弱 TNBC 细胞迁移侵袭。

2.3 ICA 对 TNBC 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示(图 3A), 与对照组相比, 实验组 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中 N-cadherin、MMP9、Vimentin 蛋白相对表达含量均降低, 差异有统计学意义($t_{N-cadherin} = 9.818、42.850$, $t_{MMP9} = 3.111、2.914$, $t_{Vimentin} = 2.801、5.180$, 均 $P < 0.05$)。免疫荧光结果显示(图 3B), 与对照组相比, 实验组 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中 Vimentin 蛋白表达均下降, 差异有统计学意义($t = 3.489、8.234$, 均 $P < 0.05$)。证明 ICA 可抑制 TNBC 上皮间质转化。

2.4 ICA 对 TNBC 细胞中 TGF- β /Smad 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示(图 4), 相较于对照组, 实验组 TGF- β 1、Smad2、P-Smad2 蛋白相对表达含量发生下降($t_{TGF-\beta 1} = 16.56、4.227$, $t_{Smad2} = 4.588、6.675$, $t_{P-Smad2} = 4.612、2.799$, 均 $P < 0.05$)。证明 ICA 可能通过抑制 TGF- β /Smad 信号通路影响 TNBC 进展。

2.5 加入 TGF- β 受体抑制剂后 ICA 对 TNBC 细胞中侵袭、迁移、EMT 相关蛋白和 TGF- β /Smad 通路相关蛋白表达的影响 对实验进行二次分组后, Transwell 实验结果显示(图 5A), 相较于对照组, 模型组中细胞 48 h 迁移、侵袭能力下降($t_{MDA-MB-231} = 2.949、19.770$, $t_{MDA-MB-468} = 4.648、9.228$, 均 $P < 0.05$); 相较于模型组, LY2109761 + ICA 组细胞迁移侵袭能力进一步下降, 差异有统计学意义($t_{MDA-MB-231} = 3.234、17.100$, $t_{MDA-MB-468} = 3.228、5.932$, 均 $P < 0.05$)。细胞免疫荧光结果显示(图 5B), 相较于对照组, 模型组细胞中 Vimentin 蛋白表达下降($t_{MDA-MB-231} = 6.593$, $t_{MDA-MB-468} = 3.134$, 均 $P < 0.05$); 相较于模型组, LY2109761 + ICA 组细胞中 Vimentin 蛋白表达进一步下降, 差异有统计学意义($t_{MDA-MB-231} = 5.716、5.112$, 均 $P < 0.01$)。Western blot 结果显示(图 5C、5D): 相较于对照组, 模型组中

细胞 N-cadherin、MMP9、Vimentin、TGF- β 1、Smad2 和 P-Smad2 蛋白相对表达含量发生下降 ($t_{\text{MDA-MB-231}} = 4.379, 5.130, 17.080, 9.389, 6.041, 7.243, t_{\text{MDA-MB-468}} = 4.131, 3.741, 11.670, 6.185, 8.667, 3.598$, 均 $P < 0.05$) ; 相较于模型组, LY2109761 + ICA 组中细胞

N-cadherin、MMP9、Vimentin、TGF- β 1、Smad2 以及 P-Smad2 蛋白相对表达含量进一步下降 ($t_{\text{MDA-MB-231}} = 2.787, 4.461, 7.013, 4.612, 3.379, 6.829, t_{\text{MDA-MB-468}} = 3.738, 3.171, 5.252, 3.477, 2.901, 3.050$, 均 $P < 0.05$) 。证明 ICA 可能通过下调 TGF- β /Smad 通路

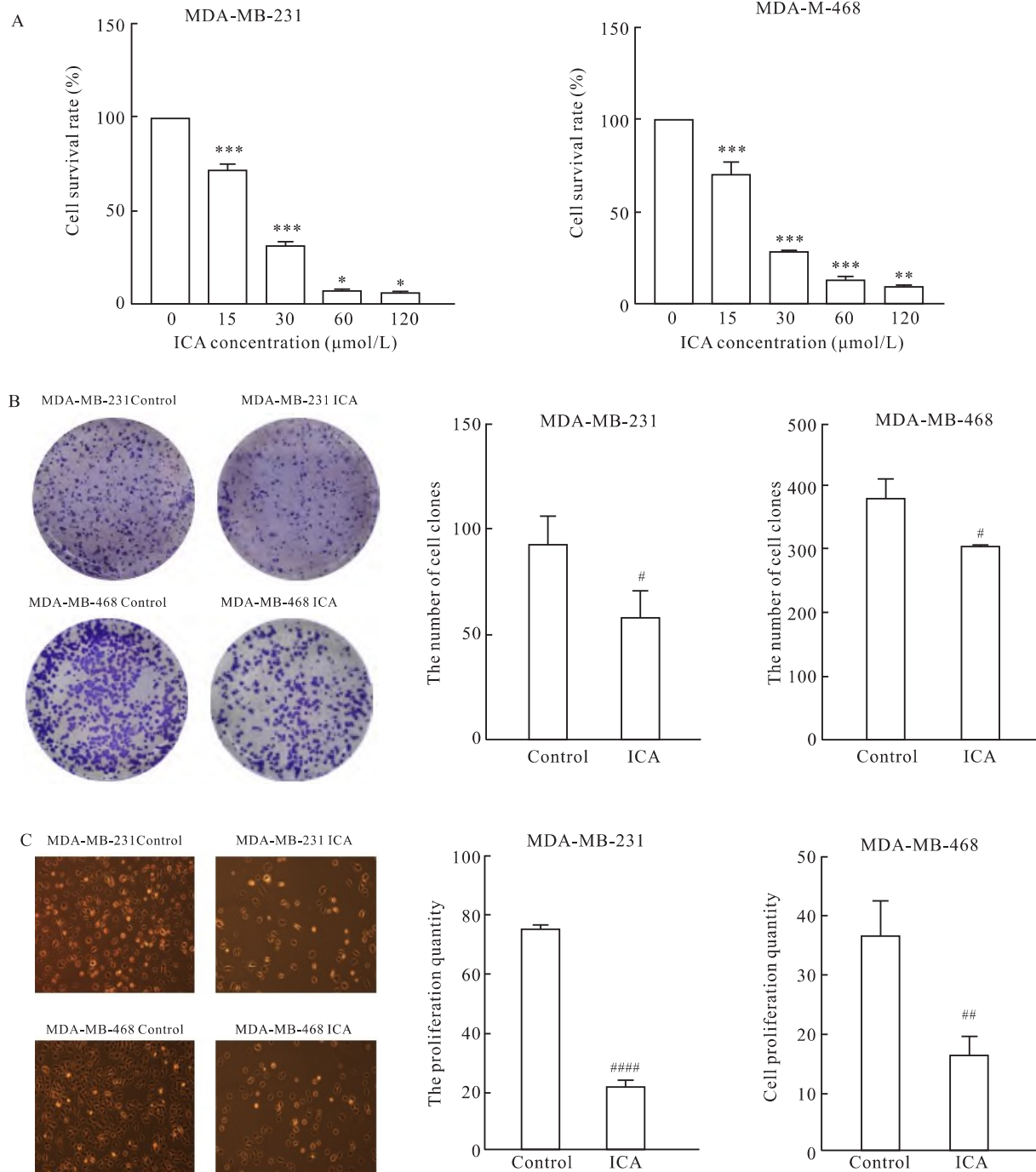


图1 ICA对TNBC细胞增殖活性的影响

Fig.1 The effects of ICA on the proliferative activity of TNBC cells

A: Proliferation inhibition rates of MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells treated with ICA; B: Representative images of colony formation assay ($\times 100$) and quantitative histogram analysis; C: EdU incorporation assay with DAB staining ($\times 100$) and quantitative histogram analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ vs Control group.

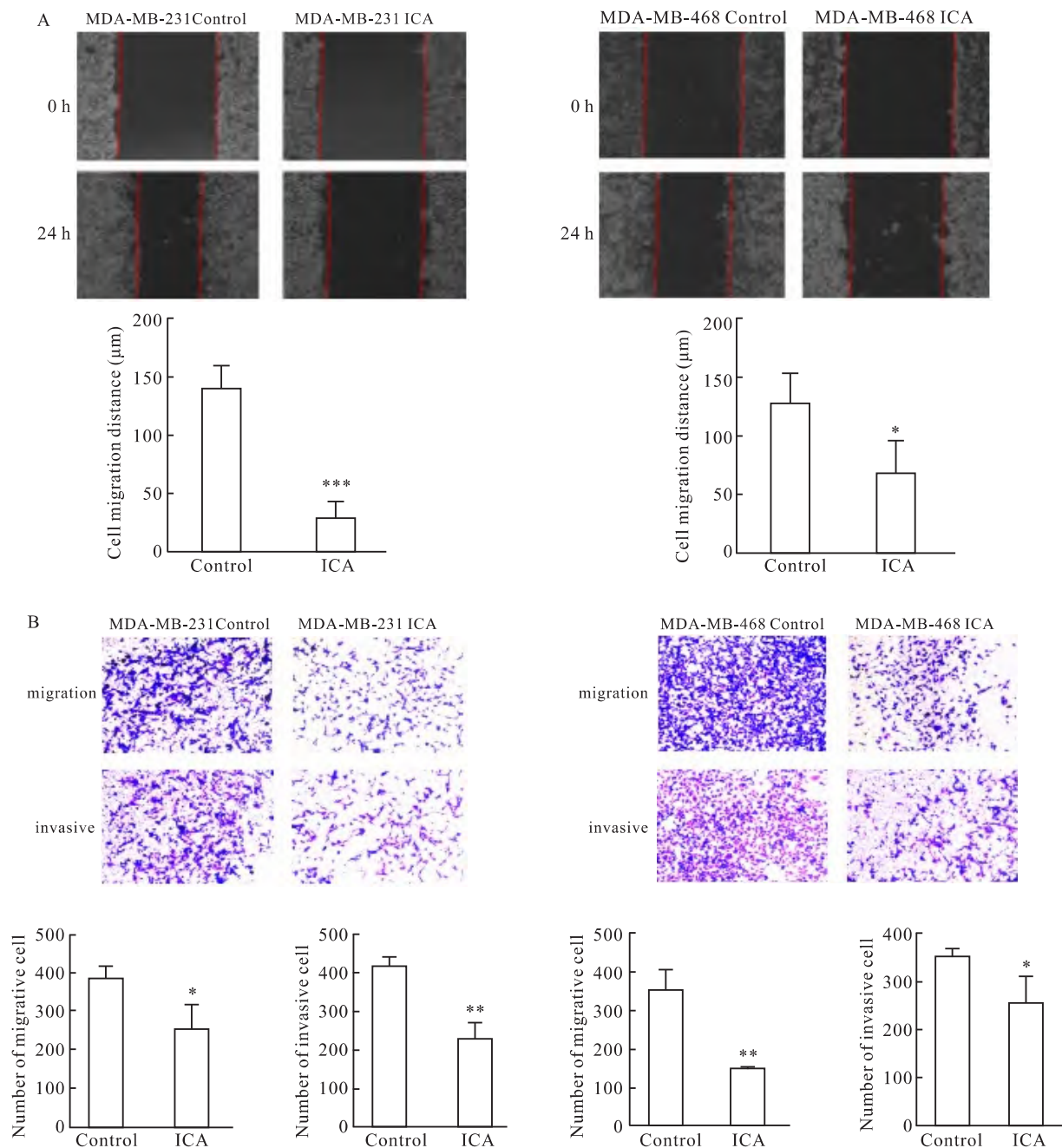


图2 ICA对TNBC细胞迁移侵袭能力的影响

Fig. 2 The effects of ICA on the migratory and invasive capacities of TNBC cells

A: Representative images of wound healing assay (×100) and quantitative histogram analysis; B: Transwell invasion assay with crystal violet staining (×100) and quantitative histogram analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

抑制TNBC细胞侵袭转移。

3 讨论

转移是影响恶性肿瘤预后的重要因素,有数据显示,女性转移性乳腺癌的五年生存率仅为29%^[1]。EMT被认为是促进肿瘤进展和转移的重要因素,因此探索EMT相关的抑制药物具有重要的

临床意义^[10-11]。ICA作为传统中药淫羊藿的有效成分,具有抗肿瘤和抗骨质疏松等多种药理作用^[12-13],并且ICA作为治疗肝癌抗肿瘤药物已进入临床应用^[14]。但是有关ICA对TNBC的研究仍较少,因此本研究通过CCK-8、平板克隆、EdU实验观察了ICA对TNBC细胞增殖能力的影响,结果显示ICA作用后的TNBC细胞增殖能力明显减弱。然

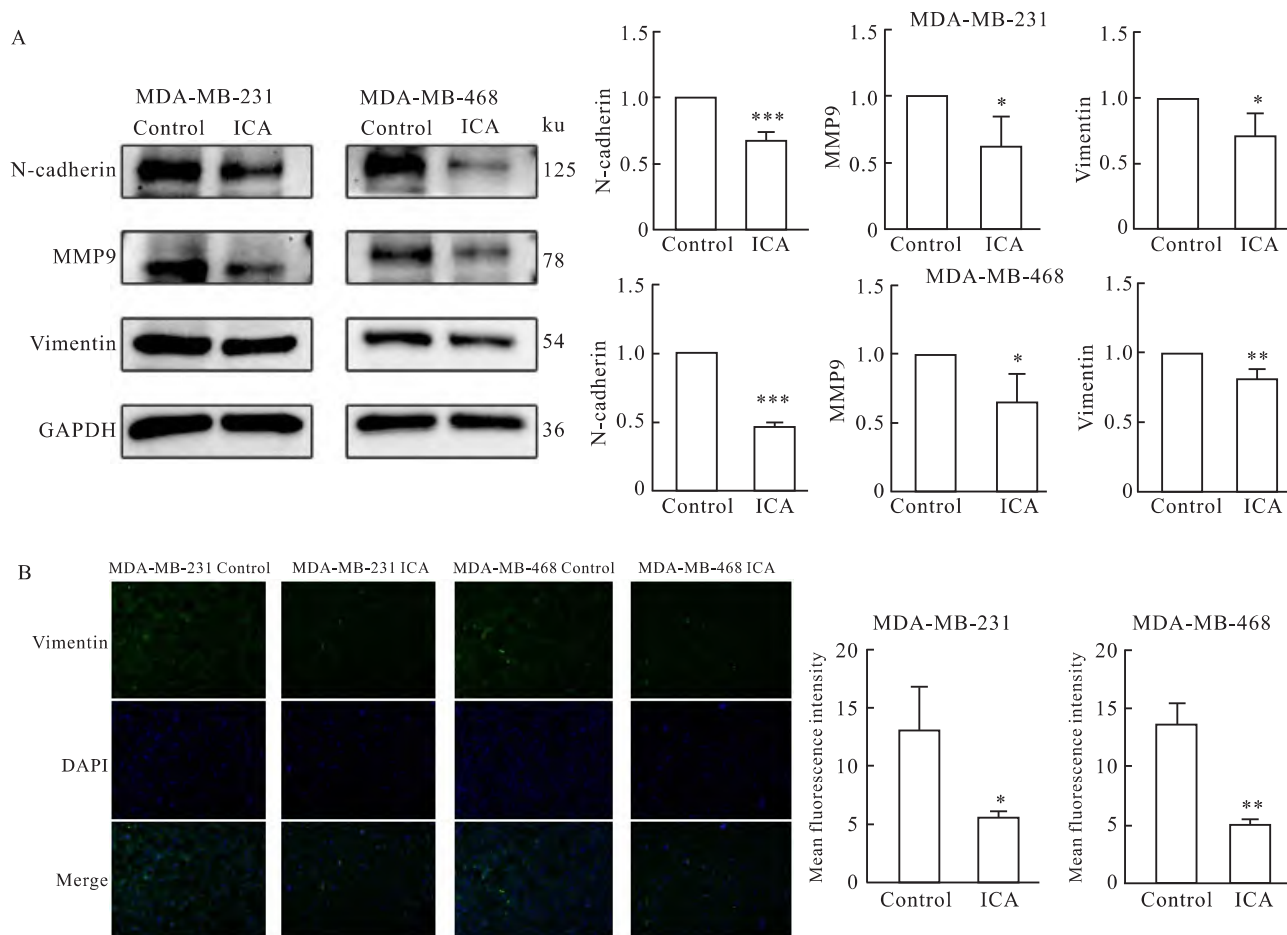
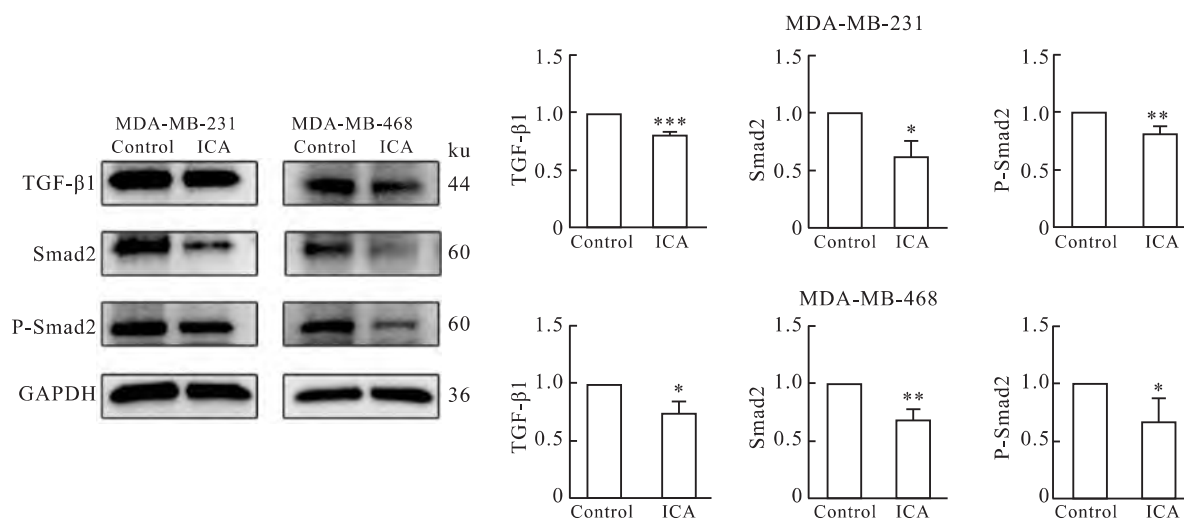


图3 ICA对TNBC细胞迁移侵袭及EMT相关蛋白的影响

Fig. 3 The effects of ICA on TNBC cell migration, invasion, and EMT-related protein expression

A: N-cadherin, MMP9, and Vimentin protein levels in two cell lines were analyzed by Western blot with corresponding histograms; B: Representative immunofluorescence assay images ($\times 100$) and quantitative histogram analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

图4 Western blot 检测 ICA 对 TNBC 细胞中 TGF- β /Smad 通路相关蛋白的影响Fig. 4 Western blot assay investigated the effects of ICA on the TGF- β /Smad pathway-related proteins in TNBC cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

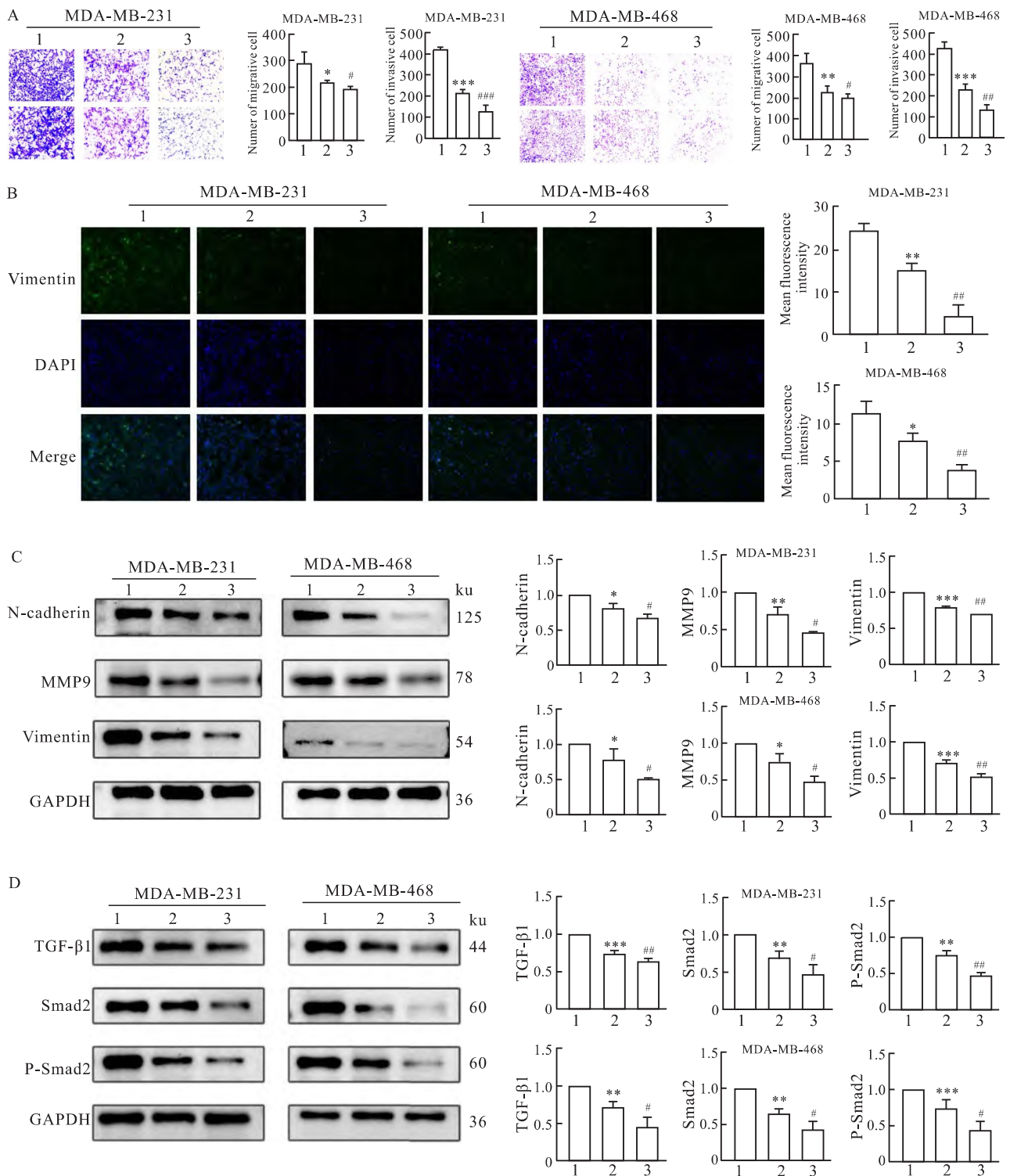


图5 加入 TGF- β 受体抑制剂后, ICA 对 TNBC 细胞侵袭转移、EMT 及 TGF- β /Smad 通路相关蛋白的影响

Fig.5 The effects of ICA combined with TGF- β receptor inhibitor on TNBC cell invasion, EMT, and TGF- β /Smad pathway-related proteins

A: The Transwell invasion assay was performed with crystal violet staining (magnification, $\times 100$), and quantitative histogram analysis was conducted; B: Representative immunofluorescence assay images were captured (magnification, $\times 100$), and quantitative histogram analysis was conducted; C: The protein levels of N-cadherin, MMP9, and Vimentin were analyzed by Western blot in three treatment groups, and quantitative histogram analysis was conducted; D: The protein levels of TGF- β 1, Smad2, and P-Smad2 were examined by Western blot in three treatment groups, and quantitative histogram analysis was conducted; 1: Control; 2: LY2109761; 3: LY2109761 + ICA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs LY2109761 group.

后进一步采用划痕愈合、Transwell 实验发现 ICA 处理的 TNBC 细胞侵袭转移能力也明显减弱。免疫荧光和 Western blot 实验结果显示 ICA 作用后 TNBC 细胞中 EMT 相关蛋白 N-Cadherin、MMP9 和 Vimentin 表达也明显降低。

据报道^[15],癌症晚期中的 TGF- β 过度表达与癌症侵袭转移性呈正相关。且有研究^[16]表明,自分泌的 TGF- β 信号传导已被证明是促进乳腺癌细胞存活的关键要素之一。例如,RUNX2 转录因子被发现通过调节 TGF- β 信号通路影响乳腺癌干细胞的特性,进而导致化疗耐药性^[17]。TGF- β /Smad 信号通路作为一个重要的细胞内信号转导通路,在 TNBC 发展中发挥着关键作用^[18]。从机制上,TGF- β 1 通过与其 II 型受体相结合,活化 I 型受体,进而与 Smad2 相互作用,发生 Smad2 的磷酸化,从而调控多种下游基因的表达,促进肿瘤发生发展^[19-20]。本研究 Western blot 实验结果显示 ICA 能够明显抑制 TGF- β /Smad 通路相关蛋白 TGF- β 1、Smad2 和 P-Smad2 表达,且联合 TGF- β 受体抑制剂后该通路受到进一步抑制、TNBC 细胞的 EMT 相关蛋白及细胞侵袭转移能力进一步降低,验证了 ICA 及联合 TGF- β 受体抑制剂 LY2109761 对 TGF- β /Smad 通路相关蛋白和 TNBC 侵袭转移能力的影响。

综上所述,本研究证实 ICA 可靶向抑制 TGF- β /Smad 信号通路进而抑制 TNBC 细胞侵袭迁移和 EMT,为 ICA 开发应用于抗 TNBC 临床治疗提供一定的理论和数据支撑。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA A Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708.
- [2] Visvader J E, Rosen J M, Aparicio S. Breast cancer [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2024, 14(8): a041729. doi: 10.1101/cshperspect. a041729.
- [3] Ray I, Michael A, Meira L B, et al. The role of cytokines in epithelial-mesenchymal transition in gynaecological cancers: a systematic review [J]. *Cells*, 2023, 12(3): 416. doi: 10.3390/cells12030416.
- [4] Kundu M, Greer Y E, Dine J L, et al. Targeting TRAIL death receptors in triple-negative breast cancers: challenges and strategies for cancer therapy [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3717. doi: 10.3390/cells11233717.
- [5] Wang X, Eichhorn P J A, Thierry J P. TGF- β , EMT, and resistance to anti-cancer treatment [J]. *Semin Cancer Biol*, 2023, 97: 1-11. doi: 10.1016/j.semcancer.2023.10.004.
- [6] Liu H, Chen Y G. Spermine attenuates TGF- β -induced EMT by downregulating fibronectin [J]. *J Biol Chem*, 2025, 301(4): 108352. doi: 10.1016/j.jbc.2025.108352.
- [7] Luo D, Zeng X, Zhang S, et al. Pirfenidone suppressed triple-negative breast cancer metastasis by inhibiting the activity of the TGF- β /SMAD pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(3): 456-69. doi: 10.1111/jcmm.17673.
- [8] Liu S P, Li Y F, Zhang D, et al. Pharmacological actions of the bioactive compounds of Epimedium on the male reproductive system: current status and future perspective [J]. *Asian J Androl*, 2025, 27(1): 20-9. doi: 10.4103/aja20248.
- [9] Xu F, Wu Q, Li L, et al. Icariside II: anticancer potential and molecular targets in solid cancers [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 663776. doi: 10.3389/fphar.2021.663776.
- [10] 孙恒星, 熊梦婷, 谢栓栓, 等. 上皮间充质转化: 肺癌侵袭转移及耐药性的生物学基础与临床展望 [J]. *中国肺癌杂志*, 2025, 28(2): 155-64. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2025.102.07.
- [10] Sun H X, Xiong M T, Xie S S, et al. Epithelial-mesenchymal transition: biological basis and clinical prospects of lung cancer invasion, metastasis, and drug resistance [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2025, 28(2): 155-64. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2025.102.07.
- [11] Tan T, Shi P, Abbas M N, et al. Epigenetic modification regulates tumor progression and metastasis through EMT (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2022, 60(6): 70. doi: 10.3892/ijo.2022.5360.
- [12] Wang Y, Shang C, Zhang Y, et al. Regulatory mechanism of icariin in cardiovascular and neurological diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 158: 114156. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114156.
- [13] 安庆, 刘国雄, Bikash Kumar Sah, 等. 淫羊藿苷对 MC3T3-E1 细胞增殖分化的影响及机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(6): 893-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.012.
- [13] An Q, Liu G X, Sah B, et al. Effects of icariin on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells and its mechanism [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2019, 54(6): 893-8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.012.
- [14] Reyes-Hernández O D, Figueroa-González G, Quintas-Granados L I, et al. New insights into the anticancer therapeutic potential of icaritin and its synthetic derivatives [J]. *Drug Dev Res*, 2024, 85(2): e22175. doi: 10.1002/ddr.22175.
- [15] Wang J, Xu Z, Wang Z, et al. TGF-beta signaling in cancer radiotherapy [J]. *Cytokine*, 2021, 148: 155709. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155709.
- [16] Du L, Li J, Tian Y, et al. Pleckstrin-2-promoted PPM1B degradation plays an important role in transforming growth factor- β -induced breast cancer cell invasion and metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(6): 2429-44. doi: 10.1111/cas.15791.
- [17] Lv F, Si W, Xu X, et al. RUNX2 prompts triple negative breast cancer drug resistance through TGF- β pathway regulating breast cancer stem cells [J]. *Neoplasia*, 2024, 48: 100967. doi: 10.

- 1016/j. neo. 2024. 100967.
- [18] 谷泽慧, 王亚帝, 谭琦, 等. 干预 miR-206/MECOM/TGF- β /smad3 轴对三阴性乳腺癌恶性进展的影响机制[J]. 锦州医科大学学报, 2024, 45(5): 93–9. doi: 10.13847/j.cnki.lnmu.2024.05.013.
- [19] Shi X, Yang J, Deng S, et al. TGF- β signaling in the tumor metabolic microenvironment and targeted therapies [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 135. doi: 10.1186/s13045-022-01349-6.
- [20] Chan M K, Chung J Y, Tang P C, et al. TGF- β signaling networks in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Lett*, 2022, 550: 215925. doi: 10.1016/j.canlet.2022.215925.
- [21] Gu Z H, Wang Y D, Tan Q, et al. Effect and mechanism of miR-206/MECOM/TGF- β /smad3 axis in inhibiting the malignant progression of triple-negative breast cancer [J]. *J Jinzhou Med Univ*, 2024, 45(5): 93–9. doi: 10.13847/j.cnki.lnmu.2024.05.013.

Icariin inhibits the migration and invasion of triple negative breast cancer by down-regulating the TGF- β /Smad signalling pathway

Xiao Zengyou^{1,2}, Yang Zean^{1,2}, Chen Caihong³, Li Jiaxian², He Yujie², Fu Pinting², Wang Jie^{1,2}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

²Dept of Thyroid and Breast Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of

Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ³Juquan New Town Community

Health Service Center, Gucun Town, Baoshan District, Shanghai 200436)

Abstract Objective To investigate the mechanism by which icariin (ICA) inhibits the invasion and metastasis of human triple-negative breast cancer (TNBC) cells *via* downregulation of the transforming growth factor- β /Smad (TGF- β /Smad) signaling pathway. **Methods** TNBC cells (MDA-MB-231 and MDA-MB-468) were cultured *in vitro* and divided into four groups: an experimental group treated with 15 μ mol/L ICA; a model group treated with 10 μ mol/L TGF- β receptor inhibitor LY2109761; a combination group (LY2109761 + ICA) treated with both 15 μ mol/L ICA and 10 μ mol/L LY2109761; and a control group. Cell proliferation, migration, and invasion were assessed using CCK-8, colony formation, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), wound healing, and Transwell assays. The expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins, as well as TGF- β 1, Smad2, and phosphorylated Smad2 (P-Smad2) were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** CCK-8 results showed that cell proliferation decreased gradually with increasing concentrations of ICA ($P < 0.05$). Colony formation and EdU assays indicated significantly inhibited proliferation in the ICA-treated group compared to the control ($P < 0.05$). Wound healing and Transwell assays demonstrated reduced migration and invasion capabilities in the experimental group relative to the control ($P < 0.05$). Compared to the model group, the LY2109761 + ICA group exhibited further suppression of invasion ($P < 0.05$). Immunofluorescence revealed decreased Vimentin expression in the experimental group ($P < 0.05$), with an even more pronounced reduction in the LY2109761 + ICA group ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that the protein levels of N-cadherin, matrix metalloproteinase-9 (MMP9), Vimentin, TGF- β 1, Smad2, and P-Smad2 were downregulated in the experimental group compared to the control ($P < 0.05$). These proteins were further suppressed in the LY2109761 + ICA group compared to the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** ICA inhibits TNBC cells proliferation, invasion, metastasis, and EMT by downregulating the TGF- β /Smad signaling pathway.

Key words icariin; triple-negative breast cancer; TGF- β /Smad; invasion and metastasis; epithelial-mesenchymal transition; molecular mechanisms

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81973625); “Xinglin Scholar” Discipline Talent Research Enhancement Program of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (No. YYZX2022164); Project for the Construction of Studio for Shanghai Famous TCM Expert (No. SHGZS-202224)

Corresponding author Wang Jie, E-mail: wangjie4177@126.com