

引用:张锦,方瑜,姜伊娜,等.姜黄素通过调节糖代谢重编程抑制三阴性乳腺癌细胞的恶性表型[J].现代中医药,2023,43(6):109-117.

姜黄素通过调节糖代谢重编程抑制 三阴性乳腺癌细胞的恶性表型^{*}

张锦¹ 方瑜² 姜伊娜² 李晨¹ 武向阳¹ 沈光辉¹ 肖海娟^{1**}

(1. 陕西中医药大学附属医院,陕西 咸阳 712000;

2. 陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 探讨姜黄素(curcumin)对三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer, TNBC)细胞增殖、迁移和凋亡的影响,并从糖代谢重编程关键靶点的改变角度阐明其作用机制。方法 采用细胞活性检测试剂盒(Cell Counting Kit 8, CCK-8 法)和 Transwell 法检测姜黄素对 TNBC 细胞 MDA-MB-231 (MB-231)增殖、迁移和侵袭的影响。流式细胞术和 Western blot (WB)检测姜黄素对 MB-231 细胞凋亡和细胞周期阻滞的影响。实时定量聚合酶链式反应(Real Time-Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)和 WB 法检测姜黄素对糖代谢重编程关键靶点的调控影响。结果 姜黄素剂量依赖性的抑制 MB-231 细胞的增殖和迁移,显著增加细胞凋亡,并导致 S 期阻滞,同时也下调了 MB-231 细胞中糖代谢重编程关键靶点 mRNA 表达。WB 结果显示,姜黄素也下调了抗凋亡蛋白表达(Bcl-2)和糖代谢重编程关键蛋白的表达,增加了促凋亡相关蛋白(Cleaved-Caspase3、Bax)的表达。结论 姜黄素能明显抑制 MB-231 细胞的增殖和迁移,并促进其凋亡,作用机制可能与下调 Bcl-2/Bax 蛋白的表达,诱导肿瘤细胞凋亡,下调乳腺癌有氧糖酵解,调节乳腺癌糖代谢重编程有关。

关键词:三阴性乳腺癌;姜黄素;糖代谢重编程;增殖;迁移;凋亡

中图分类号:R271.1 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)06-0109-09

DOI:10.13424/j.cnki.mtem.2023.06.022

Curcumin Inhibits Malignant Phenotype of Triple Negative Breast Cancer Cells by Regulating Glucose Metabolism Reprogramming

ZHANG Jin¹ FANG Yu² JIANG Yina² LI Chen¹

WU Xiangyang¹ SHEN Guanghui¹ XIAO Haijuan¹

(1. Department of Oncology, Hospital Affiliated to Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Department of Diagnostics, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xiangyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of curcumin on the proliferation, migration and apoptosis of triple negative breast cancer (TNBC) cells, and to elucidate its mechanism from the perspective of changes in key targets of glucose metabolism reprogramming. **Methods** Cell Counting Kit 8 (CCK-8 method) and Transwell method were used to detect the effects of curcumin on the proliferation, migration, and invasion of TNBC cells MDA-MB-231 (MB-231). Flow cytometry and Western blot (WB) were used to detect the effects of curcumin on apoptosis and cell cycle arrest in MB-231 cells. Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and WB methods were used to detect the regulatory effects of curcumin on key targets of glucose metabolism reprogramming. **Results** The results showed that curcumin dose-dependently inhibited the proliferation and migration of MB-231 cells, significantly increased cell apoptosis, and led to S-phase arrest. At the same time, it also downregulated the mRNA expression of key targets for glucose metabolism reprogramming in MB-231 cells. The WB results showed that curcumin also downregulated the expression of an-

* 基金项目:陕西中医药大学创新团队建设项目(2019-YL06)

** 通讯作者:肖海娟,副主任医师,副教授。E-mail:daisytcn@hotmail.com

ti apoptotic protein (Bcl-2) and key proteins for glucose metabolism reprogramming, and increased the expression of pro apoptotic related proteins (Cleared Caspase3, Bax). **Conclusion** Curcumin can significantly inhibit the proliferation and migration of MB-231 cells, and promote their apoptosis. The mechanism may be related to down-regulation of Bcl-2/Bax protein expression, induction of tumor cell apoptosis, down-regulation of aerobic glycolysis in breast cancer, and regulation of glycometabolism reprogramming in breast cancer.

Key words: Triple negative breast cancer; Curcumin; Reprogramming of glucose metabolism; Proliferation; Migration; Apoptosis

根据世界卫生组织国际研究机构 (IARC) 发布的 2020 年全球癌症负担最新数据,乳腺癌已超过肺癌,成为女性中最常见的癌症^[1],逐年攀升的乳腺癌发病带来了沉重的社会和经济负担。乳腺癌分子分型通常包括 Luminal A 型、Luminal B 型、HER2 阳性型和三阴性乳腺癌,其中三阴性乳腺癌多发生于群体基数更大的绝经前年轻女性,较其他类型乳腺癌具有更强的侵袭性,治疗选择性较少,内脏转移、骨转移、脑转移风险几率较高,预后差,死亡风险高^[2-3],成为乳腺癌诊疗领域的难点及研究热点。

代谢重编程是癌症的一个关键特征^[4]。有氧糖酵解是肿瘤细胞糖代谢重编程的主要方式。正常分化的细胞主要依靠线粒体的氧化磷酸化为细胞供能,而大多数肿瘤细胞即使在氧气足以支持线粒体氧化磷酸化的情况下仍然依赖有氧糖酵解产能,这种现象被称为“Warburg 效应”。尽管有氧糖酵解产生 ATP 的效率很低,但其快速产生 ATP 的特性却赋予肿瘤细胞更多的增殖优势。在有氧糖酵解中有几个重要的限速酶,如己糖激酶 (Hexokinase 2, HK2), 磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (PFKFB3), M2 型丙酮酸激酶 (PKM2), 这些关键酶调控着整个糖酵解过程的平衡,但在肿瘤疾病中,这些关键酶呈现出高表达的状态,并同乳腺癌患者的不良结局正相关^[5-6]。另外,有氧糖酵解产生的高乳酸微环境也会促进癌细胞的增殖侵袭及免疫逃逸,导致较差的临床预后^[7]。

姜黄素是一种从植物姜黄中提取的多酚,已被证明通过多种分子机制具有显著的抗肿瘤活性,包括对活性氧、炎症、内质网和线粒体应激的调节,细胞增殖和凋亡等^[8]。已有研究证实了姜黄素在卵巢癌、食管癌等肿瘤疾病中具有调节糖代谢的潜力^[9-10],然而姜黄素是否可以调节乳腺癌

尤其是 TNBC 的糖代谢重编程却不得而知,因此我们开展了本研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器 VARIOSKAN FLASH 全波长酶标仪 (赛默飞世尔); NovoCyte 流式细胞仪 (安捷伦); ABI 7900HT FAST 荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司); Mini-PROTEAN Tetra 垂直电泳系统 (美国伯乐); Maestro ZHT 细胞增殖测定仪 (Axion Bio-Systems 公司)。

1.2 试剂 DMEM 高糖培养基 (赛默飞世尔, 货号: 10313039); 10% 胎牛血清 (浙江天杭生物, 货号: 70220-8611); 1% 青/链霉素双抗 (赛默飞世尔, 货号: 15070063); 姜黄素 (Sigma-Aldrich, 货号: 08511-10MG); CCK-8 试剂盒 (美国 GLP 公司, 货号: GK10001); PCR 引物合成 (北京擎科生物); cDNA 逆转录试剂盒 (赛默飞世尔, 货号: K1621); Super SYBR Green qPCR Master Mix (上海奕杉生物, 货号: QP002); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海雅酶生物, 货号: ZJ101L); 超敏型显影液 (合肥白鲨生物, 货号: BL520A); 一抗包括 Beta Actin (美国 Proteintech 公司, 货号: 66009-1); Hexokinase II (英国 abcam 公司, 货号: ab209847); GLUT-1 (英国 abcam 公司, 货号: ab115730); PFKFB3 (杭州华安生物, 货号: ET1705-66); PKM2 (武汉赛维尔生物, 货号: GB11392); Bcl-2 (英国 abcam 公司, 货号: ab196495); Bax (英国 abcam 公司, 货号: ab32503); Cleaved-Caspase-3 (英国 abcam 公司, 货号: ab32042); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体 (上海碧云天, 货号: A0216); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 抗体 (上海碧云天, 货号: A0208)。

1.3 实验用细胞系 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 (以下简称 MB-231) 购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞增殖率 取胰酶消化后的对数生长期细胞,在 96 孔板每孔中加入 6×10^3 个细胞,待细胞贴壁后弃上清液,加入含不同浓度姜黄素(0 、 20 、 40 、 60 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)培养液,分别作用 24 h 及 48 h 后加入含 10% CCK-8 试剂的空白培养基,孵育 30 min 后在全波长酶标仪中 450 nm 波长处测定各孔 OD 值,并按以下公式计算细胞生存率: $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作为对照组,其他为实验组,空白组用以背景值校正。实验重复 3 次,取均值。

细胞增殖率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$

2.2 MB-231 细胞迁移力检测 将 Transwell 小室在 PBS 中湿化 30 min,取对数生长期的细胞用无血清培养基调整浓度为 $3 \times 10^6/\text{mL}$,每个小室上室中加入 200 μL 的细胞悬液,下室中加入 500 μL 含 20% 胎牛血清培养基。按试验分组加药, $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组作为对照组,其他浓度组(20 、 40 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)为实验组,作用 24 h 实验结束后,对小室底面穿膜的细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后,结晶紫染色 20 min,用 PBS 轻柔洗涤两次后在倒置显微镜下 $200 \times$ 视野观察并计数穿膜细胞,每样随机选取 5 个视野,取均值统计分析。

2.3 MB-231 细胞的凋亡流式检测 取对数生长期 MB-231 细胞,以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于培养瓶中,18 h 后加入含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液配制的各浓度姜黄素(0 、 20 、 40 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)培养 24 h,胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$,取 200 μL 细胞悬液用 PBS 离心洗涤 1 次,1000 rpm,4℃ 离心 5 min,弃上清。将细胞重悬浮于 200 μL 结合缓冲液中。加入 5 μg Annexin V 和 5 μg PI 轻轻混匀,避光室温反应 15 min 加入 300 μL 结合缓冲液,立即上流式细胞仪检测,激发波长 $E_x = 488 \text{ nm}$;发射波长 $E_m = 530 \text{ nm}$ 。检测每个样品 1×10^4 个细胞中正常细胞、早期凋亡、晚期凋亡、死亡细胞所占的比例。

2.4 MB-231 细胞的流式细胞周期检测 MB-231 细胞以 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 的密度接种于 6 孔板中,接种 18 h 待细胞贴壁后,换为不含药培养基及含有不同浓度姜黄素的培养基继续培养,每组设 3 个复孔。

24 h 后终止培养,消化收集细胞后用 70% 冷乙醇 4℃ 固定过夜,RNaseI 处理,PI 室温避光染色 15 min,2 h 内用流式细胞仪检测各组细胞周期分布并统计分析。

2.5 MB-231 细胞糖代谢关键靶基因的 RT-qPCR 分析 将 MB-231 细胞按 $4 \times 10^5/\text{孔}$ 接种至 6 孔板中,贴壁后,按 0 、 20 、 40 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度梯度给药。培养 24 h 后,提取各浓度组细胞总 RNA 并进行浓度测定后将总 RNA 逆转录成 cDNA(逆转录条件为 25°C 5 min, 42°C 60 min, 70°C 5 min),cDNA 于 -80°C 备存。以 β -actin 为内参对各基因表达标准化。RT-qPCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 10 s,退火延伸 60°C ,30 s,40 个循环,溶解曲线使用默认,各引物序列见下表 1,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	正向序列	反向序列
mus-Glut-1	ACTGACGATCTGAGCTACGGG	CCAGTGTTATAGCCGAAC TGC
mus-PKM-2	ACTGACGTCGCGCTCTAGGTA	TCGGCATGGTTCCTGAAGTC
mus-PFKFB3	TCCCAAGATCGGAGTCTTTC	CCCCACCATCACATACGG
mus-HK-2	TCGCTTCTCTATTGGCCCC	GTGTGTGCTAGCTCTAGCC
mus- β -actin	TGCTGTCCCTGTATGCCTCTG	TGATGTCACGCACGATTTC

2.6 WB 法检测姜黄素对凋亡及糖代谢关键蛋白表达的影响 使用 0 、 20 、 40 、 60 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 姜黄素孵育 MB-231 细胞 24 h,裂解提取各组细胞总蛋白。BCA 法测定每个样品的蛋白浓度,每孔以 30 μg 蛋白进行上样。经 10% SDS-PAGE 电泳后,蛋白全部转膜至 PVDF 膜上。转膜完成后 5% 脱脂奶封闭液室温封闭 2 h。封闭完 4°C 孵育一抗过夜。次日 TBST 清洗 3 次,加入稀释好的二抗,室温孵育 2 h,TBST 清洗 3 次。ECL 成像系统显影成像,测定蛋白显影区域灰度值后进行统计分析。

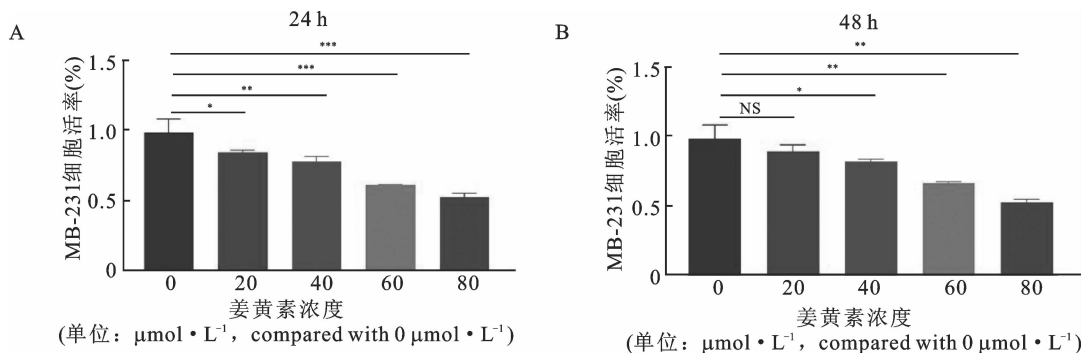
2.7 统计学方法 SPSS 19.0 统计学软件处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示数据,独立样本 t 检验用于各实验组组间均数分析,单因素方差分析多组数据, $P < 0.05$ 为在统计学有意义。

3 结果

3.1 姜黄素处理剂量依赖性抑制了 MB-231 细胞的增殖 我们分别观察了不同浓度姜黄素作用于 MB-231 24 h 及 48 h 后对细胞活力的影响。CCK-8 结果提示姜黄素以 20 、 40 、 60 、 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作用 24 h 后 MB-231 的活力均受到明显抑制(图

1A, P 值依次为 0.0227, 0.0018, < 0.001 , < 0.001 。姜黄素以 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作用 48 h 同样抑制了 MB-231 的增殖 (图 1B), 统计 P 值分别为 0.2310, 0.0484, 0.0053, 0.0015。24 h 和 48 h 的 CCK8 结果均提示细胞的活力均明显呈

梯度下降趋势, 但二者抑制增殖能力差异不大。相较 48 h, 24 h 的干预时长对 MB-231 显示出相对更强的活力抑制, 因此后续实验中均采用了 24 h 的实验观察时长。



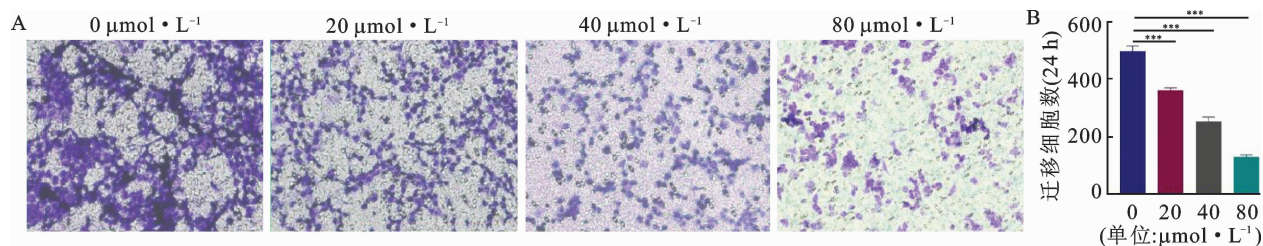
注:A. 姜黄素不同浓度干预 24 h 抑制了 MB-231 细胞的增殖;B. 姜黄素不同浓度干预 48 h 抑制了 MB-231 细胞的增殖;NS 为不显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,数据展示为均值 (Mean) \pm 标准误 (Standard Error of Mean, SEM)

图 1 姜黄素抑制了 MB-231 细胞的增殖

3.2 姜黄素处理剂量依赖性抑制了 MB-231 细胞的迁移能力 肿瘤细胞活力的下降往往带来其侵袭迁移能力的下降。Transwell 实验镜下观察提示姜黄素以 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作用 MB-231 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 姜黄素各浓度干预组侵袭小室上室穿过 PET 膜迁移到下室的细胞数均明显较少 (图 2 A, B P 值均为 $P < 0.001$), 浓度越高, 穿膜细胞越少, 提示姜黄素浓度依赖地抑制了 MB-231 细胞的迁移能力。

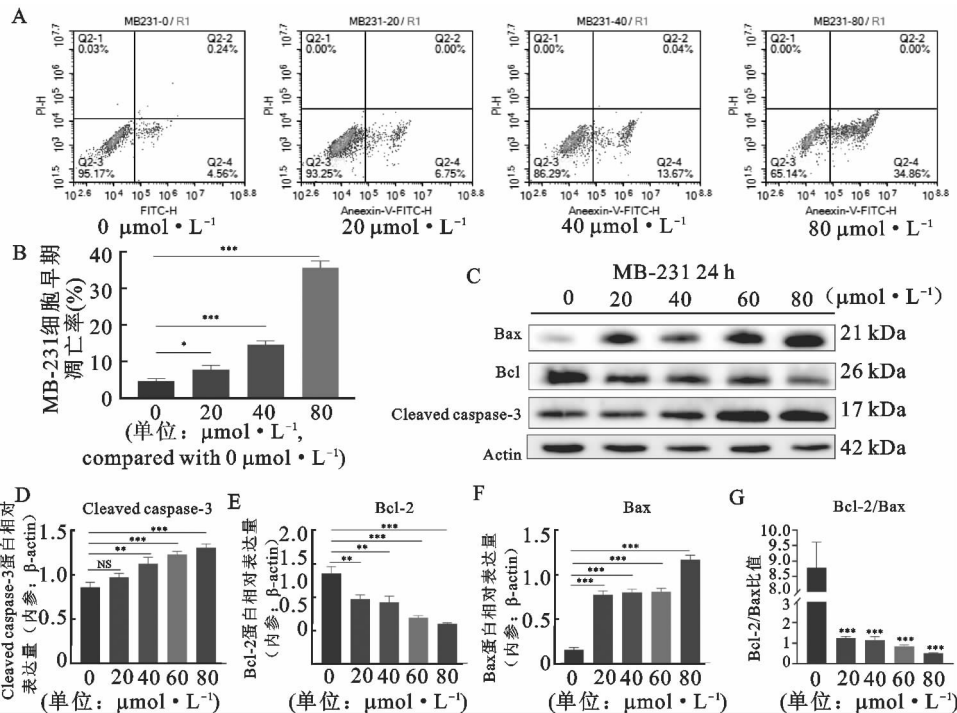
3.3 姜黄素处理剂量依赖性促进了 MB-231 细胞的凋亡 肿瘤细胞均具有明显的抗凋亡特征, 我们也观察了姜黄素是否增加了 MB-231 的凋亡。流式细胞分析结果提示, 对比空白对照组, 随着姜黄素浓度的升高 (20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) MB-231 细胞在干预 24 h 后其早期凋亡率逐渐升高 (图 3

A, B P 值依次为 0.0183, < 0.001 , < 0.001), 呈现剂量依赖性特征。我们同时也观察了 MB-231 细胞中凋亡相关蛋白的变化以验证流式分析的结果。WB 结果提示, 在姜黄素 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度条件下明显增加了促凋亡的功能蛋白 Cleaved-Caspase3 的表达 (图 3 C, D P 值依次为 0.0078, 0.0007, 0.0004)。抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平则随着姜黄素浓度增加而下降 (图 3 E, F P 值分别为 0.0052, 0.0056, 0.0004, 0.0002), 促凋亡蛋白 Bax 的表达水平随着姜黄素浓度增加而增加 (图 3 C, F P 值均为 $P < 0.001$), Bcl-2/Bax 比值在姜黄素各浓度组均呈剂量依赖性下降趋势 (图 3 G P 值均为 $P < 0.001$)。流式分析及 WB 分析的结果均提示姜黄素剂量依赖性促进了 MB-231 细胞的凋亡。



注:A. 不同浓度姜黄素干预 MB-231 细胞后的 Transwell 实验结果;B. Transwell 小室底面穿膜细胞数的统计分析;*** $P < 0.001$, 与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,数据展示为 Mean \pm SEM

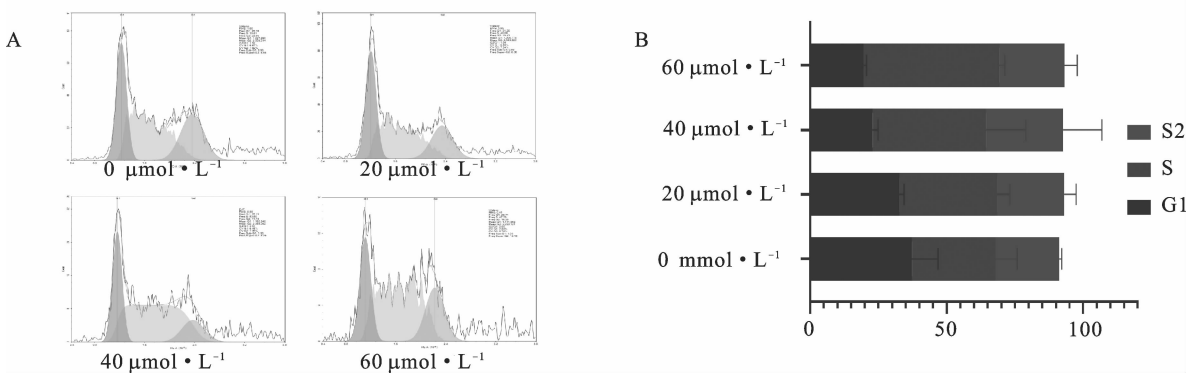
图 2 姜黄素处理抑制了 MB-231 细胞的迁移能力



注:A. 不同浓度姜黄素干预 MB-231 细胞后的流式凋亡分析;B. 不同浓度姜黄素干预 MB-231 细胞的流式早期凋亡统计分析;C. WB 检测 Bax、Bcl-2 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达水平;D, E, F, G. MB-231 细胞中 Cleaved-Caspase, Bcl-2 和 Bax 的蛋白定量分析统计及 Bcl-2/Bax 比值的统计分析;NS 为不显著, $^{*}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$;与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比,数据展示为 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$

图 3 姜黄素处理增加了 MB-231 细胞的凋亡

3.4 姜黄素处理诱导了 MB-231 细胞的细胞周期阻滞 细胞周期调控异常与乳腺癌的发生、发展密切相关^[11],我们在流式分析中发现姜黄素以 $20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度作用 MB-231 细胞 24 h,剂量依赖性逐渐增加了处于 S 期细胞的比例,而减少了 G1 期细胞比例(图 4A, B)。



A. 不同浓度姜黄素干预 MB-231 细胞后的流式细胞周期分析;B. 不同浓度姜黄素处理对 MB-231 细胞周期影响的统计分析

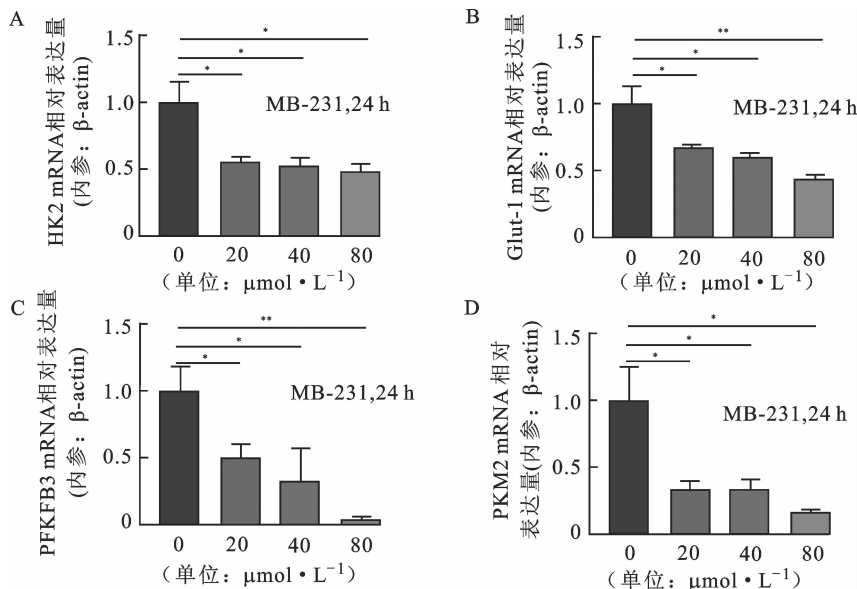
图 4 姜黄素处理诱导了 MB-231 细胞的周期阻滞

3.5 姜黄素处理抑制三阴性乳腺癌糖酵解关键基因的表达 已有许多研究证实了糖酵解途径在乳腺癌中的诊断和治疗价值^[12-13]。姜黄素分别以 $20, 40, 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度干预 MB-231 细胞 24 h 后,我们分析了糖酵解途径中 3 个关键的调控基因 HK2, PFKFB3, PKM2 及关键的功能基因 Glut-1 的变化。RT-qPCR 分析结果提示: HK2, PFKFB3, PKM2 的表达水平相较空白对照组在姜黄素干预后明显呈剂量依赖性下调。HK2 各浓度组统计 P 值分别为 $0.0399, 0.0397, 0.0261$ 。PFKFB3 各浓度组统计 P 值分别为 $0.0418, 0.0475, 0.0017$ 。PKM2 各浓度组统计 P 值分别为 $0.0427, 0.0450, 0.0161$ 。Glut-1 表达也随药物浓度增加梯度降低 (P 值分别为 $0.0491, 0.0283, 0.0063$),表明胞内

葡萄糖转运水平的下降。RT-qPCR 分析表明姜黄素的干预明显抑制了三阴性乳腺癌 MB-231 细胞中的糖代谢重编程水平。

3.6 姜黄素处理抑制三阴性乳腺癌糖酵解途径关键蛋白的表达 我们也通过 WB 分析了糖酵解途径关键蛋白的表达水平,结果同 RT-qPCR 分析一致。HK2,PFKFB3,PKM2,Glut-1 蛋白表达的表

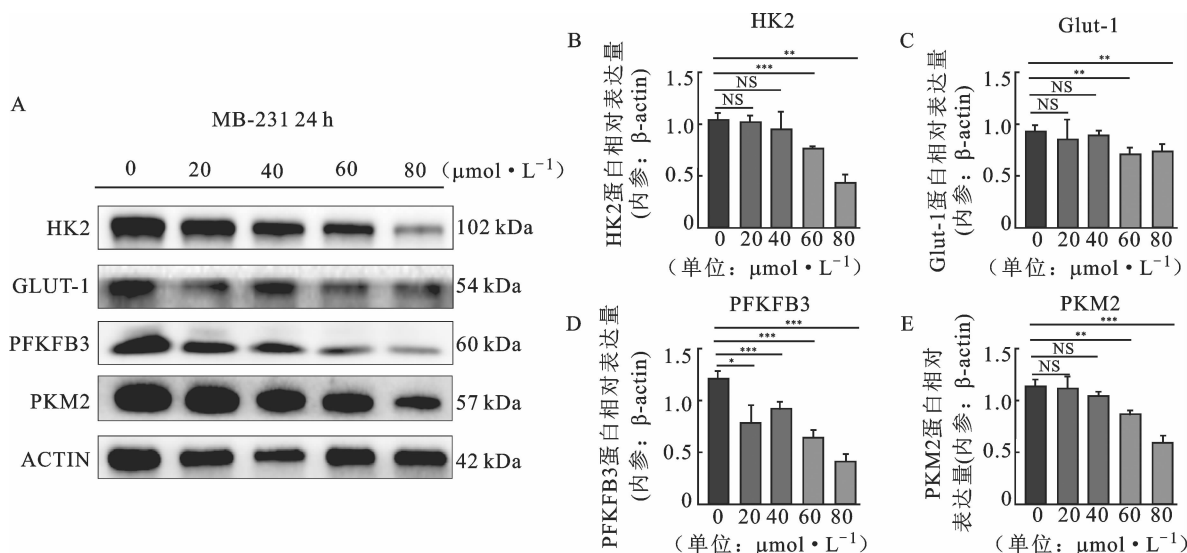
达水平均随姜黄素浓度增加而逐渐降低,差异具有统计学意义。HK2 各浓度组统计 P 值分别为 0.6739,0.5138, <0.001 ,0.0011。PFKFB3 各浓度组统计 P 值分别为 0.0220,0.0009,0.0002, <0.001 。PKM2 各浓度组统计 P 值分别为 0.8672,0.1280,0.0046,0.0008。Glut-1 各浓度组统计 P 值分别为 0.5315,0.4913,0.0031,0.0056。综合上述结果,我们认为姜黄素不仅在转录水平而且在蛋白翻译水平抑制了 MB-231 乳腺癌细胞的糖代谢重编程,从而抑制了其增殖并促进了凋亡及细胞周期阻滞。



注:A,B,C,D. 不同浓度姜黄素对 MB-231 细胞中 HK2,Glut-1,PFKFB3 和 PKM2 mRNA 表达水平的影响;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比. 数据展示为 Mean \pm SEM

图 5 姜黄素对糖代谢重编程途径关键基因表达水平的影响



注:A. WB 检测不同浓度姜黄素干预 MB-231 细胞 24 h 后 HK2,Glut-1,PFKFB3,PKM2 蛋白表达水平变化;

B ~ E. HK2,Glut-1,PFKFB3,PKM2 的蛋白表达水平定量统计分析;NS 为不显著,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组相比. 数据展示为 Mean \pm SEM

图 6 姜黄素对糖代谢重编程途径关键蛋白表达水平的影响

4 讨论

作为最常见的女性恶性肿瘤疾病,且随着社会经济,医疗卫生条件进步等发展因素影响,乳腺癌发病率逐年攀升,呈现年轻化态势。在常见的乳腺癌分子分型中,三阴性乳腺癌占比约 10% ~ 20%,因其可选治疗策略受限,化疗响应差并容易出现耐药,预后较其他分子类型差。因此,研究一些效优价廉,新颖安全,作用广泛的肿瘤疾病防治或增效药物,对乳腺癌的诊疗实践具有重要意义,而姜黄素因其明确的抗肿瘤效用,已成为目前肿瘤疾病研究中的一个热点^[14-15]。

不受程序性死亡调控而无限增殖是肿瘤疾病的显著特征^[16],我们首先验证了姜黄素在三阴性乳腺癌细胞系 MB-231 细胞中的增殖抑制作用。结果发现姜黄素在 20 ~ 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内作用 24 h 和 48 h 后呈剂量依赖性的增加了对 MB-231 乳腺癌细胞增殖的抑制,随着姜黄素浓度的增加,同空白对照组相比,MB-231 的活力明显下降,这明确证实了姜黄素具有抗乳腺癌的药理作用。肿瘤细胞具有明显的侵袭转移能力,是肿瘤发生进展转移的重要生理病理基础。远处转移的发生也是乳腺癌治疗失败的一个重要因素^[17]。乳腺癌细胞活力的下降往往伴随其侵袭力的下降,我们检测了姜黄素干预 24 h 后 MB-231 细胞的迁移能力的变化。Transwell 实验镜下观察结果提示,给予 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的姜黄素干预后 MB-231 细胞后穿入小室下层的数目明显减少,且呈浓度依赖性。

肿瘤的发生发展与细胞凋亡有关,肿瘤细胞具有明显的抗凋亡特征,增加肿瘤细胞的凋亡是癌症治疗效果实现的方式之一。李新等^[18]研究发现姜黄素能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路降低乳腺癌 MCF-7 细胞活力并诱导凋亡。Ramachandran 等^[19]报道,姜黄素通过改变 104 种凋亡相关基因的表达诱发乳腺癌细胞的凋亡。Bcl-2 家族包括以 Bcl-2 为代表的抑制凋亡的蛋白^[20]以及 Bax 为代表的促凋亡蛋白^[21],同时, Bcl-2 也可以抑制 ROS 诱导的细胞凋亡^[22]。Bax 可以通过增加细胞色素 C 释放活化 Caspase-3^[23],而 Caspase-3 也被认为是细胞凋亡的最终执行蛋白^[24]。我们在流式

分析中发现,姜黄素干预 MB-231 细胞 24 h 后,其早期凋亡率由 6.75% 提高至 34.86%,呈现明显的剂量依赖。另外,随着姜黄素浓度增加,MB-231 细胞中促凋亡的 Cleaved-Caspase3, Bax 蛋白表达逐渐增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达逐渐减少,表明姜黄素剂量依赖性的促进了 MB-231 细胞的凋亡。

细胞周期分为 G1 期、S 期、G2 期和 M 期, G1 期为有丝分裂前期, S 期为 DNA 合成期, G2 期合形成子细胞必要物质, M 期将所有遗传物质分配到子代细胞中^[25]。许多化疗药通过对肿瘤细胞的周期阻滞实现其药理作用^[26]。另外,处于不同细胞周期的肿瘤细胞对化疗药物的敏感性也有所差异^[11]。我们的研究通过流式分析发现姜黄素剂量依赖性的增加了 S 期细胞的比例,而减少了 G1 期细胞比例,这表明姜黄素具有一定的抑制肿瘤细胞 DNA 合成的效果。

糖酵解途径作为肿瘤细胞利用 ATP 的主要来源,在乳腺癌细胞生长、增殖、侵袭和转移过程中发挥重要作用。TNBC 是乳腺癌中最恶性的亚型,具有显著的代谢紊乱^[27],有研究发现在 TNBC 中糖酵解通量显著上调,表现出更强的恶性生物学行为^[28-29]。因此,干预 TNBC 中的糖酵解相关靶点有望成为一种有效的乳腺癌治疗策略,如有研究人员使用小分子抑制剂 BAY-876 干预糖酵解途径的 GLUT1 靶点,显著抑制了 17 个三阴性乳腺癌细胞系的生长^[30]。HK, PFK, PK 是糖酵解途径中 3 个不可逆的关键限速酶,其中 HK2, PFKFB3, PKM2 是各限速酶的重要亚型。乳腺癌组织 HK2 表达明显高于正常乳腺组织, HK2 的高表达促进乳腺癌细胞增殖并减少凋亡^[31]。PFKFB3 参与了乳腺癌的增殖、迁移、侵袭和血管生成,在乳腺癌组织中高表达,且与较差的生存预后相关^[32]。抑制 PKM2 的表达使 ERK1/2 磷酸化失活,显著减弱了 Warburg 效应,从而抑制乳腺癌 MCF7 和 MB-231 细胞的细胞增殖和集落形成^[33]。Glut-1 对于乳腺癌细胞摄取葡萄糖至关重要,有报道称 Glut-1 基因高表达与较高的恶性潜能、侵袭性及较差的预后在很强的相关性^[34]。总之,较高的糖酵解水平往往意味着更高的肿瘤恶性程度,这也使得干预

糖代谢重编程进程有望成为治疗乳腺癌的潜在靶点。我们的研究中通过 RT-qPCR 及 WB 分析证实了姜黄素从转录层面及蛋白翻译水平均剂量依赖性的抑制了糖代谢关键靶点 HK2, PFKFB3, PKM2 的表达水平及葡萄糖转运蛋白 Glut-1 的水平, 因此可以认为姜黄素对 MB-231 细胞的糖代谢重编程有明显的调控作用。

综合上述实验结果可以得出, 姜黄素对三阴性乳腺癌细胞 MB-231 的糖代谢重编程具有调控作用, 剂量依赖性的抑制了该细胞系中升高的糖酵解水平, 导致乳腺癌细胞的增殖迁移能力下降, 同时也增加了早期凋亡率并诱导细胞出现 S 期阻滞, 减少了三阴性乳腺癌的高增殖, 易转移, 抗凋亡的恶性表型。作为一个潜在的可转化的治疗策略, 姜黄素的调控糖代谢重编程的能力也为今后通过干预糖酵解途径治疗乳腺癌提供了一些理论基础。

5 结论

姜黄素能明显抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖和迁移, 促进乳腺癌细胞的凋亡。姜黄素的作用机制可能与通过下调 Bcl-2/Bax 蛋白的表达, 诱导肿瘤细胞凋亡, 下调乳腺癌有氧糖酵解, 调节乳腺癌糖代谢重编程有关。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] Peddi PF, Ellis MJ, Ma C. Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy [J]. International Journal of Breast Cancer, 2012, 2012: 217185.
- [3] Wahba HA, El-Hadaad HA. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer [J]. Cancer Biology & Medicine, 2015, 12 (2): 106-116.
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144 (5): 646-674.
- [5] O'Neal J, Clem A, Reynolds L, et al. Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses glucose metabolism and the growth of HER2 + breast cancer [J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2016, 160 (1): 29-40.
- [6] Wang GN, Xu ZL, Wang CH, et al. Differential phosphofructokinase-1 isoenzyme patterns associated with glycolytic

efficiency in human breast cancer and paracancer tissues [J]. Oncology Letters, 2013, 6 (6): 1701-1706.

- [7] Fu DY, He CL, Wei JL, et al. PGK1 is a potential survival biomarker and invasion promoter by regulating the HIF-1 α -mediated epithelial-mesenchymal transition process in breast cancer [J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2018, 51 (5): 2434-2444.
- [8] Giordano A, Tommonaro G. Curcumin and cancer [J]. Nutrients, 2019, 11 (10): 2376.
- [9] 刘小平, 王劲进, 王铭远, 等. 姜黄素逆转卵巢癌细胞紫杉醇耐药的机制研究 [J]. 湖南师范大学学报 (医学版), 2021, 18 (3): 109-113.
- [10] 张凤娟. 糖代谢机制在丹参酮 II A 和姜黄素抑制食管癌细胞增殖的作用研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2016.
- [11] Shen H, Perez RE, Davaadelger B, et al. Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e59848. from 86 studies [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2019, 145 (4): 967-999.
- [12] Yu M, Chen S, Hong W, et al. Prognostic role of glycolysis for cancer outcome: evidence from 86 studies [J]. Journal of cancer research and clinical oncology, 2019, 145 (4): 967-999.
- [13] Gomez LS, Zancan P, Marcondes MC, et al. Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase [J]. Biochimie, 2013, 95 (6): 1336-1343.
- [14] 苗淑涵, 高晋生. 姜黄素药理作用的研究进展 [J]. 光明中医, 2017, 32 (15): 2284-2287.
- [15] 吴山, 戚益铭, 胡林峰. 姜黄素抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. 生物技术世界, 2014, 11 (7): 124-125.
- [16] Giridhar KV, Liu MC. Available and emerging molecular markers in the clinical management of breast cancer [J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2019, 19 (10): 919-928.
- [17] Park H, Chang SK, Kim JY, et al. Risk factors for distant metastasis as a primary site of treatment failure in early-stage breast cancer [J]. Chonnam Medical Journal, 2014, 50 (3): 96-101.
- [18] 李新, 牛冰, 李庆辉, 等. 姜黄素联合 KLF8 基因 siRNA 调控 JAK2/STAT3 信号通路对乳腺癌细胞生长抑制

作用的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(1): 69-73.

[19] Ramachandran C, Rodriguez S, Ramachandran R, et al. Expression profiles of apoptotic genes induced by curcumin in human breast cancer and mammary epithelial cell lines[J]. Anticancer Research, 2005, 25(5): 3293-3302.

[20] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(1): 49-63.

[21] Zhai DY, Jin CF, Huang ZW, et al. Differential regulation of Bax and Bak by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Bcl-B and Mcl-1[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(15): 9580-9586.

[22] Xin MG, Deng XM. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of bax through phosphorylation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(11): 10781-10789.

[23] Cao G, Minami M, Pei W, et al. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism; Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2001, 21(4): 321-333.

[24] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome C and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice[J]. The Journal of Neuroscience; the Official Journal of the Society for Neuroscience, 1999, 19(9): 3414-3422.

[25] Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, et al. The cell cycle-regulated genes of Schizosaccharomyces pombe[J]. PLoS Biology, 2005, 3(7): e225.

[26] Varna M, Lehmann-Che J, Turpin E, et al. p53 dependent cell-cycle arrest triggered by chemotherapy in xenografted breast tumors[J]. International Journal of Cancer, 2009, 124(4): 991-997.

[27] Du Y, Wei N, Ma RL, et al. A miR-210-3p regulon that controls the Warburg effect by modulating HIF-1 α and p53 activity in triple-negative breast cancer[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11(9): 731.

[28] Xiao Y, Ma D, Yang YS, et al. Comprehensive metabolomics expands precision medicine for triple-negative breast cancer[J]. Cell Research, 2022, 32(5): 477-490.

[29] Lai YW, Hsu WJ, Lee WY, et al. Prognostic value of a glycolytic signature and its regulation by Y-box-binding protein 1 in triple-negative breast cancer[J]. Cells, 2021, 10(8): 1890.

[30] Wu Q, ba-alawi W, Deblois G, et al. GLUT1 inhibition blocks growth of RB1-positive triple negative breast cancer[J]. Nature Communications, 2020, 11: 4205.

[31] Coelho RG, Calaça IC, Celestrini DM, et al. Hexokinase and phosphofructokinase activity and intracellular distribution correlate with aggressiveness and invasiveness of human breast carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(30): 29375-29387.

[32] Peng F, Li Q, Sun JY, et al. PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis[J]. International Journal of Oncology, 2018, 52(3): 945-954.

[33] Li Z, Yang LN, Zhang S, et al. Valproic acid suppresses breast cancer cell growth through triggering pyruvate kinase M2 isoform mediated Warburg effect[J]. Cell Transplantation, 2021, 30: 9636897211027524.

[34] Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, et al. Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers[J]. Pathology & Oncology Research, 2012, 18(3): 721-728.

(修回日期: 2022-02-23 编辑: 崔春利)