

川楝素调节丙酮酸激酶 M₂ 抑制乳腺癌糖酵解

王红磊, 肖奕, 武力*, 马大昌
(兰州大学第一医院, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**观察川楝素对乳腺癌糖酵解的干预及糖酵解相关酶的影响。**方法:**采用人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, MCF-7;通过噻唑蓝(MTT)比色法考察川楝素(0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对乳腺癌细胞增殖的抑制作用,检测 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 川楝素干预后乳腺癌细胞中葡萄糖消耗,乳酸含量,评价川楝素对乳腺癌细胞糖酵解的干预作用;检测乳腺癌细胞中三磷酸腺苷(ATP)及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADH)水平,评价乳腺癌细胞能量供应水平;检测己糖激酶 2 及丙酮酸激酶活性,考察川楝素对糖酵解相关酶活性影响。蛋白免疫印迹法检测川楝素对乳腺癌细胞中丙酮酸激酶 M₂ 蛋白表达的调控作用。**结果:**川楝素对人乳腺癌 MDA-MB-231, MCF-7 细胞增殖具有明显抑制作用($P < 0.05$),并呈浓度依赖性;川楝素可以明显降低不同乳腺癌细胞株中葡萄糖消耗及乳酸含量($P < 0.05$),并降低细胞 ATP 含量($P < 0.05$),升高 NAD^+/NADH 含量($P < 0.05$),抑制肿瘤细胞糖酵解水平。此外川楝素可抑制丙酮酸激酶活性,但对己糖激酶 2 活性无影响,蛋白检测结果表明,川楝素可以下调丙酮酸激酶 M₂ 蛋白表达水平($P < 0.05$)。**结论:**川楝素可以明显抑制乳腺癌细胞增殖,并影响乳腺癌细胞糖酵解水平,其机制与其干预乳腺癌细胞中丙酮酸激酶 M₂ 的表达相关。

[关键词] 乳腺癌;糖酵解;川楝素;丙酮酸激酶 M₂;己糖激酶

[中图分类号] R273;R22;R285.5;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0177-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180796

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1516.016.html>

[网络出版时间] 2017-11-13 15:16

Toosendanin Inhibits Glycolysis in Breast Cancer by Regulating Pyruvate Kinase M₂

WANG Hong-lei, XIAO Yi, WU Li*, MA Da-chang
(The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of toosendanin on the glycolysis of breast cancer cells and the effect on glycolytic enzymes. **Method:** The human breast cancer cell line MDA-MB-231, MCF-7 were used in this experiment; the inhibitory effect of different concentrations of toosendanin (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on MDA-MB-231 and MCF-7 cells proliferation was investigated by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Glucose consumption and lactate content in MDA-MB-231 and MCF-7 cells were also detected after treatment with 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ toosendanin to evaluate its intervention effect on glycolysis of breast cancer cells. The levels of adenosine triphosphate (ATP) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) /reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH) in breast cancer cells were detected to evaluate the cell energy supply level. Hexokinase and pyruvate kinase activities were detected to evaluate the effect of toosendanin on glycolytic enzyme activity. Western blot was used to detect the regulatory effect of toosendanin on pyruvate kinase M₂ protein expression in breast cancer cells. **Result:** The results showed that toosendanin had obvious inhibitory effect on cell proliferation in MDA-MB-231 and MCF-7 cells in a concentration dependent manner ($P < 0.05$). Toosendanin could significantly reduce the consumption of glucose and lactic acid content in different breast cancer cell lines ($P < 0.05$), and reduce ATP content in cells ($P < 0.05$), increase

[收稿日期] 20170627(001)

[第一作者] 王红磊, 硕士, 副主任医师, 从事乳腺癌分子机制及治疗研究, Tel:0931-8356767, E-mail:wanghlzl@126.com

[通信作者] *武力, 主任医师, 从事乳腺癌分子机制及治疗研究, Tel:0931-8356767, E-mail:wuliliz@126.com

the content of NAD^+/NADH , and inhibit tumor cell glycolysis level ($P < 0.05$). In addition, it could inhibit the activity of pyruvate kinase, but had no effect on the activity of hexokinase 2, and the results of quantitative analysis showed that the expression of pyruvate kinase M_2 could be decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Toosendanin could significantly inhibit the proliferation of breast cancer cells and affect the level of glycolysis. Its mechanism may be associated with regulating the expression of pyruvate kinase M_2 in breast cancer cells.

[**Key words**] breast cancer; glycolysis; toosendanin; pyruvate kinase M_2 ; hexokinase

乳腺癌是临床最常见的恶性肿瘤之一,流行病学研究表明乳腺癌占全部女性恶性肿瘤发病的 20% 以上;乳腺癌女性恶性肿瘤疾病中高发,且是导致女性因恶性肿瘤死亡的主要因素之一。在我国每年女性乳腺癌发病约 16.9 万,且呈逐年上升趋势^[1]。

肿瘤细胞增殖速率远高于正常细胞,因此足够的能量水平才能维持肿瘤细胞增殖所需,研究表明肿瘤细胞能量供应水平是正常细胞的数倍。糖酵解是肿瘤细胞能量供应的重要手段。有氧环境下,肿瘤细胞优先利用糖酵解供能,表现出较高的糖酵解活性,该现象被称为沃伯格(Warburg)效应。肿瘤糖酵解活性的升高在细胞水平表现为乳酸生成与葡萄糖消耗比的增加^[2]。肿瘤可迅速生成能量,同时糖酵解过程产生的中间代谢产物又可被肿瘤细胞利用,用于合成细胞增殖所需的原料,从而促进肿瘤的增殖、迁移等。Warburg 效应在各种恶性肿瘤细胞及肿瘤组织中普遍存在,例如乳腺癌、肝癌、白血病细胞、乳腺癌及结肠癌细胞、胃癌及脑组织恶性肿瘤等^[3-4]。研究发现,小鼠乳腺癌细胞的糖酵解活性约是正常细胞的 2~17 倍^[5]。川楝素是来源于川楝子或川楝韧皮的四环三萜类化合物,是川楝子、苦楝皮的主要有效成分。川楝素具有一定毒性,早期主要用于农业驱虫。川楝素可明显抑制菜虫幼虫中肠组织中微粒体多功能氧化酶活性,1950 年代起在我国川楝素用于临床驱蛔药物^[6]。近年研究体外研究发现其对川楝素对乳腺癌细胞、肝癌细胞、人白血病细胞等均有一定的抑制作用^[7-8]。有研究表明川楝素可抑制蛋白激酶 B(Akt)/GSK3 β 途径抑制结肠癌增殖,此外可通过雌激素受体 β 抑制恶性胶质瘤增殖^[9-10],针对乳腺癌的抑制作用机制尚待研究。川楝素对多种肿瘤细胞均体现一定的抑制作用,糖酵解是肿瘤细胞的主要特征,特别是乳腺癌细胞中糖酵解水平较高。因此本实验目的在于以乳腺癌细胞为研究对象,观察川楝素对乳腺癌细胞增殖与糖酵解水平的影响,以揭示川楝素抑制乳腺癌细胞增殖的作用机制,为川楝素抗肿瘤研究提供新的研究

方向。

1 材料

1.1 细胞、药物及试剂 川楝素购自阿拉丁公司(纯度 $\geq 98\%$,批号 16705)。人乳腺癌 MDA-MB-231, MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞库。RPMI 1640 培养基,胎牛血清(FBS)(Gibco 公司,批号分别为 8116383,1698221);葡萄糖,乳酸,三磷酸腺苷(ATP), NAD^+/NADH 检测试剂盒(美国 BioVision 公司,批号分别为 K606-100, E4340-100, K354-100, K958-400);己糖激酶(HK),丙酮酸激酶(PK)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170105, 20170110); M_2 型丙酮酸激酶(PKM $_2$)抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体(GAPDH)(美国 Abcam 公司,批号分别为 PR332141-14, GA451427-10),噻唑蓝(MTT,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号 20160311)。

1.2 仪器 力康 HF-90 型二氧化碳培养箱(上海力康生物医疗科技公司);Tecan Mpro200 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);BSC-II A2 型生物洁净工作台(苏州安泰空气有限公司);1658001 型垂直电泳槽及转移电泳槽,ChemiDoc MP 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司);IX53 型倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 MDA-MB-231, MCF-7 细胞常规培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱内常规传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 比色法检测细胞增殖 分别将 MDA-MB-231, MCF-7 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的川楝素,每孔加入不同浓度川楝素母液 20 μL 后,加入培养基 180 μL ,川楝素终浓度为(0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),每个浓度设 6 个复孔,分别培养 24, 48, 72 h 后,向每孔中加入 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μL ,继续培养 4 h,弃吸去上清液,向每孔中加入二甲基亚砜 100 μL ,振荡 10 min 后,待蓝紫色颗粒完全溶解后,

采用酶标仪在 570 nm 波长处测定每孔吸光度 A , 实验重复 3 次。

2.3 MDA-MB-231, MCF-7 细胞葡萄糖消耗及乳酸水平检测 将处于对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231, MCF-7 细胞接种于 12 孔板中, 每孔 4×10^6 个细胞, 培养液 1 mL, 培养 18 ~ 24 h。川楝素药物终浓度分别为 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 另设溶剂组。采用乳酸检测试剂盒检测细胞培养基中的乳酸含量, 操作按照试剂盒提供的操作说明进行; 操作过程, 收集细胞上清液, $2 \sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$, $1\ 000 \times g$ 离心上清液 20 min, 清除不溶性杂质和细胞碎片, 收集上清液, 按照说明书配置对照品及试剂, 在加入样品, 对照品前用 $1 \times$ 洗涤液清洗加样孔, 加入样品 50 μL 及对照品于孔中, 立即加入 Biotin 二抗 50 μL , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 45 min, 弃去反应液, 用 $1 \times$ 洗涤液清洗 3 次, 清洗后弃去清洗液, 加入辣根过氧化物酶 0.1 mL, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 30 min。弃去, 加入显色液 90 μL , 暗环境下, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 15 min, 加入终止液 50 μL , 在 450 nm 检测 A , 按照对照品标准曲线计算其样品含量。葡萄糖检测采用葡萄糖检测试剂盒提供的操作说明进行。操作过程, 配置对照液及葡萄糖检测液, 取川楝素上清液 2 μL , 加入 96 孔板, 加入葡萄糖检测缓冲液 48 μL , 加入葡萄糖检测液 50 μL , 混合 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 30 min, 在 570 nm 检测 A , 按照对照液标准曲线计算其样品含量。

2.4 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 ATP 含量检测 细胞分组及培养同 2.3 项, 收集细胞于离心管中, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 每管加入裂解液 100 μL 。待细胞充分裂解后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清用于测定。取新 96 孔板, 每孔加入 ATP 工作液 (1:100) 100 μL , 在室温下放置 5 min。避光条件下每孔加入 BCA 法蛋白定量后的样品 30 μL , 2 s 后检测。检测 570 nm 处 A , 计算其样品浓度, 并按照 BCA 检测蛋白结果, 计算 ATP 含量, 以上实验重复 3 次。

2.5 MDA-MB-231, MCF-7 细胞中 NAD^+/NADH 检测 细胞分组及培养同 2.3 项。采用 NAD^+/NADH Kit 检测细胞培养基中的 NAD^+ 及 NADH 含量, 操作按照实际盒提供的操作说明进行。细胞用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗, 加入 NADH/NAD^+ 提取液 400 μL 反应 20 min 后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $18\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液, 按照说明书比例加入 NADH 检测反应液及 NAD 检测液, 室温下反应 2 h 后, 于 450 nm 处检测 A , 分别得到 NADH 及 NAD , 按照

NAD^+/NADH 计算其相对表达。

2.6 MDA-MB-231, MCF-7 细胞中 HK, PK 活性检测 细胞分组及培养同 2.3 项。HK, PK 活性检测按照试剂说明书, 采用紫外分光光度计在 340 nm 处测定 A_1 和 A_2 , 计算 HK, PK 酶活力。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PKM_2 蛋白水平 细胞分组及培养同 2.3 项, 收集细胞, 用预冷生理盐水洗 2 次, 用苯甲基磺酰氟 (RIPA) 细胞裂解液提取总蛋白质。提取液蛋白质浓度用 BCA 试剂盒定量。将蛋白提取液用 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行电泳分离, 将电泳分离胶通过电转方法将蛋白质转到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用 PKM_2 (1:500), GAPDH (1:1 000) 单克隆抗体孵育过夜, 之后再用带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。使用 Gel-pro32 软件对图像进行灰度值分析。以实验组 PKM_2 蛋白灰度值/ GAPDH 灰度值表示 PKM_2 蛋白在细胞中的相对含量。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计分析软件计算实验数据, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据差异性检验采用 one-way ANOVA, 组间均数两两比较应用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞增殖的影响 通过 MTT 比色法检测细胞的存活率, 给予川楝素 (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, MCF-7 细胞。实验结果表明, 随着川楝素浓度的增加, 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞增殖抑制率逐渐上升; 给药 48 h 半数抑制浓度 (IC_{50}), MDA-MB-231 给药浓度为 27.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MCF-7 为 42.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与给药 24 h 组比较, 不同浓度川楝素组给药 48 h 对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞增殖抑制率均明显升高 ($P < 0.05$), 与给药 48 h 组比较, 72 h 培养 MDA-MB-231 细胞中 (2.5, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 川楝素组, MCF-7 细胞中 (2.5, 5, 10, 20, 40, 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 川楝素组增殖抑制率明显升高 ($P < 0.05$)。因此川楝素对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, MCF-7 细胞增殖的抑制作用具有一定的时间依赖性。表 1, 2。

3.2 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞糖酵解水平的影响 给予人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 川楝素干预 24 h 后, 分别检测细胞中乳酸及葡萄糖消耗水平, 与空白组比较, 川楝素 (20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以明显

表 1 川楝素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖抑制率的影响作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
溶剂	-	0	0	0
川楝素	2.5	4.66 ± 0.72	9.03 ± 0.89 ¹⁾	16.67 ± 1.22 ^{1,2)}
	5	13.47 ± 2.55	21.05 ± 3.28 ¹⁾	27.34 ± 2.47 ^{1,2)}
	10	19.31 ± 5.12	32.43 ± 4.74 ¹⁾	41.26 ± 4.57 ^{1,2)}
	20	26.38 ± 6.47	45.71 ± 6.42 ¹⁾	53.33 ± 7.44 ¹⁾
	40	37.62 ± 5.18	57.57 ± 6.41 ¹⁾	65.76 ± 5.51 ¹⁾
	60	46.61 ± 6.41	64.47 ± 5.77 ¹⁾	72.83 ± 5.08 ¹⁾
	80	54.13 ± 7.15	68.22 ± 6.47 ¹⁾	75.55 ± 6.33 ¹⁾

注:与 24 h 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 48 h 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 川楝素对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
溶剂	-	0	0	0
川楝素	2.5	3.58 ± 0.24	8.81 ± 0.42 ¹⁾	12.54 ± 0.35 ^{1,2)}
	5	11.31 ± 1.82	19.15 ± 2.14 ¹⁾	27.13 ± 1.25 ^{1,2)}
	10	17.90 ± 3.75	28.64 ± 3.45 ¹⁾	39.15 ± 2.58 ^{1,2)}
	20	24.24 ± 7.94	36.88 ± 5.75 ¹⁾	45.82 ± 6.71 ^{1,2)}
	40	30.58 ± 7.78	44.34 ± 6.67 ¹⁾	56.43 ± 5.84 ^{1,2)}
	60	37.44 ± 6.18	55.35 ± 4.87 ¹⁾	67.43 ± 6.42 ^{1,2)}
	80	49.19 ± 5.59	61.15 ± 5.85 ¹⁾	69.14 ± 7.88 ¹⁾

降低 MDA-MB-231, MCF-7 细胞对葡萄糖的消耗 ($P < 0.05$); 与川楝素 (10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, 川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组乳腺癌细胞葡萄糖的消耗明显降低 ($P < 0.05$)。MDA-MB-231, MCF-7 细胞中, 与空白组、川楝素 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, 川

楝素 (20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组乳酸含量明显降低 ($P < 0.05$), 与川楝素 (10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, 川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组可进一步降低乳酸含量 ($P < 0.05$)。表明川楝素可以明显降低乳腺癌细胞糖酵解水平。见表 3。

表 3 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞葡萄糖消耗及乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	葡萄糖消耗		乳酸含量	
		MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7
溶剂	-	10.88 ± 1.22	16.78 ± 1.86	18.22 ± 1.45	26.45 ± 2.35
川楝素	10	8.73 ± 1.36	14.87 ± 1.47	15.48 ± 2.21	22.68 ± 2.46
	20	7.24 ± 1.35 ¹⁾	13.44 ± 1.11 ¹⁾	12.24 ± 1.34 ^{1,2)}	17.29 ± 1.66 ^{1,2)}
	40	5.21 ± 0.68 ^{1,2,3)}	10.74 ± 1.23 ^{1,2,3)}	7.29 ± 1.08 ^{1,2,3)}	14.66 ± 1.34 ^{1,2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与川楝素 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与川楝素 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4, 6 同)。

3.3 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞线粒体能量生成的影响 与空白组比较, MDA-MB-231 细胞川楝素 (20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 ATP 含量明显降低 ($P < 0.05$); 在 MCF-7 细胞中, 川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组

ATP 含量明显降低 ($P < 0.05$)。与空白组比较, MDA-MB-231 细胞中, 川楝素 (10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组均可明显升高 NAD^+/NADH ($P < 0.05$); MCF-7 细胞中川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组可以升高 NAD^+/NADH ($P <$

0.05)。表明川楝素一定程度的影响 MDA-MB-231, MCF-7 细胞能量供应水平。见表 4。

表 4 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 ATP 含量及 NAD⁺/NADH 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ATP 含量		NAD ⁺ /NADH	
		MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7
溶剂	-	233.48 ± 24.5	289.36 ± 33.7	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
川楝素	10	199.45 ± 20.3	268.47 ± 24.7	0.11 ± 0.01 ¹⁾	0.12 ± 0.02
	20	168.50 ± 21.8 ¹⁾	223.40 ± 33.1	0.14 ± 0.02 ^{1,2)}	0.14 ± 0.04
	40	122.80 ± 18.2 ^{1,2,3)}	186.40 ± 25.5 ^{1,2)}	0.17 ± 0.02 ^{1,2)}	0.16 ± 0.03 ¹⁾

3.4 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞中丙酮酸激酶活性的影响 在 MDA-MB-231, MCF-7 细胞中, 川楝素对己糖激酶活性没有显著性影响, 与空白组比较, 川楝素 (10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组均可降低丙酮酸激酶活性 ($P < 0.05$); 与川楝素 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, 川楝素 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组丙酮酸激酶活性降低 ($P < 0.05$), 与川楝素 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较,

川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组丙酮酸激酶活性降低 ($P < 0.05$)。说明随着川楝素浓度的增加其对丙酮酸激酶的活性抑制作用增强。川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 MDA-MB-231, MCF-7 细胞中对丙酮酸的抑制作用还与作用时间有关, 与 12 h 组比较, 川楝素 (40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药 24 h 组丙酮酸激酶活性降低 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 川楝素对己糖激酶及丙酮酸激酶相对活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of toosendanin on relative activity of hexokinase and pyruvate kinase($\bar{x} \pm s, n = 3$)

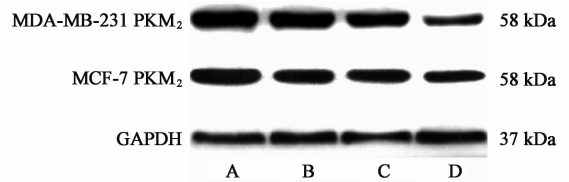
组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	时间/h	己糖激酶		丙酮酸激酶	
			MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7
溶剂	-	12	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
		24	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
川楝素	10	12	1.02 ± 0.02	0.98 ± 0.03	0.87 ± 0.02 ¹⁾	0.91 ± 0.03 ¹⁾
		24	0.99 ± 0.02	1.01 ± 0.02	0.81 ± 0.02 ¹⁾	0.87 ± 0.03 ¹⁾
	20	12	0.97 ± 0.03	0.99 ± 0.04	0.71 ± 0.02 ^{1,2)}	0.75 ± 0.04 ^{1,2)}
		24	1.03 ± 0.04	1.02 ± 0.05	0.67 ± 0.03 ^{1,2)}	0.69 ± 0.05 ^{1,2,4)}
	40	12	0.97 ± 0.03	1.03 ± 0.04	0.54 ± 0.01 ^{1,2,3)}	0.70 ± 0.02 ^{1,2,3)}
		24	0.96 ± 0.05	0.98 ± 0.03	0.48 ± 0.02 ^{1,2,3,4)}	0.66 ± 0.02 ^{1,2,3,4)}

注: 与同时间空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与同时间川楝素 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与同时间川楝素 (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较³⁾ $P < 0.05$; 与同组内 12 h 时比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 PKM₂ 表达的影响 与空白组比较, MDA-MB-231, MCF-7 细胞中不同浓度的川楝素对细胞中 PKM₂ 的表达均具有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。见图 1, 表 6。

4 讨论

Warburg 效应是肿瘤细胞维持增殖能量供应的重要手段, 研究发现肿瘤细胞在有氧或无氧的情况下均可消耗大量葡萄糖并产生大量乳酸, 为细胞提供能量^[2], 虽然糖酵解相较于有氧化磷酸化反应产生 ATP 的效率低, 但在肿瘤细胞中糖酵解水平远高于正常细胞, 研究表明肿瘤细胞中糖酵解水平是正常细胞的百倍以上, 在有氧及外界葡萄糖等营养物



A. 溶剂组; B ~ D. 川楝素 (10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组

图 1 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 PKM₂ 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of toosendanin on protein expression of PKM₂ in MDA-MB-231 and MCF-7 cells

质充足的条件下, 肿瘤细胞更加倾向于糖酵解为其增殖提供所需能量^[11-12]。肿瘤细胞快速增殖需要足够的原料, 而通过糖酵解可以为其提供所需氨基酸, 核苷酸和脂类等。糖酵解的中间产物可通过

表 6 川楝素对 MDA-MB-231, MCF-7 细胞 PKM₂ 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of toosendanin on protein expression of PKM₂ in MDA-MB-231 and MCF-7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	PKM ₂ /GAPDH	
		MDA-MB-231	MCF-7
溶剂	-	1	1
川楝素	10	0.86 \pm 0.02 ¹⁾	0.64 \pm 0.03 ¹⁾
	20	0.64 \pm 0.02 ¹⁾	0.67 \pm 0.02 ¹⁾
	40	0.23 \pm 0.03 ¹⁾	0.43 \pm 0.02 ¹⁾

相应代谢通路转化为相应前体物质,用于合成蛋白质、核酸和脂类等肿瘤细胞增殖的原料。因此糖酵解是肿瘤细胞的特征也是其增殖的必要环节,且与其的浸润生长、侵袭转移和耐药密切相关^[13-14]。肿瘤细胞糖酵解伴随着葡萄糖消耗增加及大量乳酸的生成,同时产生丰富 ATP,供应其细胞增殖。

川楝子为楝科植物川楝 *Melia toosendan* 的干燥果实。川楝子为苦寒药,具有疏肝泄热、行气止痛、杀虫的功效,主要用于肝郁化火、胸胁、脘腹胀痛、疝气疼痛、虫积腹痛。川楝子中含有多种化学成分,主要包括萜类、挥发油、黄酮类、脂肪酸、酚酸类和多糖等。其中川楝素是传统中药川楝子中的四环三萜类化合物,近年来围绕川楝素在肿瘤的治疗研究逐渐增多,研究发现川楝素对乳腺癌细胞,MDA-MB-468,大肠癌细胞 SW480,肝癌细胞 SMMC-7721,前列腺癌细胞株 PC3 等均有一定的抑制作用,但是其作用机制还有待深入研究^[5]。川楝素属于四环三萜类化合物,多种萜类物质参与细胞糖代谢过程,而萜类物质是植物糖酵解等途径的次生代谢产物。因此本课题组考察川楝素与肿瘤细胞的糖酵解的关系。本课题组研究发现川楝素在乳腺癌 MDA-MB-231, MCF-7 细胞株中可以浓度依赖性的降低肿瘤细胞葡萄糖消耗,同时降低乳酸生成,并且降低细胞 ATP 含量,升高 NAD⁺/NADH。糖酵解反应通过 NAD⁺ 传递氢电子从而产生 ATP,其比值升高说明糖酵解 ATP 产生降低。该结果说明川楝素可明显抑制乳腺癌糖酵解途径,发挥其抑制作用。

己糖激酶与 PKM₂ 是调节 Warburg 效应的关键酶,其中己糖激酶是第 1 步限速酶,而丙酮酸激酶是最后一步限速酶,二者对肿瘤细胞糖酵解均具有重要调控作用^[15-16]。本研究发现川楝素对己糖激酶活性没有显著性影响,但对丙酮酸激酶活性具有明显降低作用。PKM₂ 在肿瘤细胞中的高表达及其低

酶促活性是肿瘤进行细胞有氧条件下糖酵解的必要条件^[17]。有氧条件下的糖酵解是肿瘤细胞的特征,相对于氧化磷酸化,肿瘤细胞可以通过高速率的糖酵解获取更多的 ATP,促进肿瘤生长,同时糖酵解反应还可以有效抑制细胞活性氧的生成,从而减少氧化应激导致的细胞损伤。此外,PKM₂ 的活性状态有利于肿瘤细胞积累糖酵解的中间产物,糖酵解代谢产物可进入糖酵解的代谢旁路,如甘油合成或磷酸戊糖途径^[18-19],大量糖酵解代谢产物的积累可以为肿瘤细胞增殖所需脂类、氨基酸等必需物质的合成提供原料。蛋白实验表明川楝素可以明显抑制 PKM₂ 表达,说明川楝素可通过调节 PKM₂ 发挥其抑制乳腺癌糖酵解的作用。PKM₂ 在肿瘤细胞中为二聚体形态,体现低活性水平,正常细胞中为四聚体为其高活性水平,二聚体促进糖酵解发生,四聚体促进线粒体氧化磷酸化^[20],川楝素对 PKM₂ 具有抑制作用,但其对 PKM₂ 具体分型的影响还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征[J]. 中国癌症杂志,2013,23(8):561-567.

[2] XU R H, Pelicano H, ZHOU Y, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (2): 613-621.

[3] Sabater B, Marin D. The cancer Warburg effect may be a testable example of the minimum entropy production rate principle[J]. *Phys Biol*, 2017, 14(2): 024001.

[4] Cutruzzolà F, Giardina G, Marani M, et al. Glucose metabolism in the progression of prostate cancer [J]. *Front Physiol*, 2017, 21(8): 97-103.

[5] De Rosa V, Iommelli F, Monti M, et al. Reversal of Warburg effect and reactivation of oxidative phosphorylation by differential inhibition of EGFR signaling pathways in non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(22): 5110-5120.

[6] 骆玮玮,陆金健,陈修平,等. 川楝素的药理作用及机制研究进展 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(4): 161-164.

[7] 李振华,鞠建明,华俊磊,等. 中药川楝子研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(1): 219-223.

[8] 刘小玲,王进,张伶,等. 川楝素提取物诱导 K562 细胞凋亡的实验研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 426-431.

- [9] CAO L, QU D, WANG H, et al. Toosendanin exerts an anti-cancer effect in glioblastoma by inducing estrogen receptor β -and p53-mediated apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11) : e1928.
- [10] WANG G, FENG C C, CHU S J, et al. Toosendanin inhibits growth and induces apoptosis in colorectal cancer cells through suppression of Akt/GSK-3 β / β -catenin pathway [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47 (5) : 1767-1774.
- [11] Nahm J H, Kim H M, Koo J S. Glycolysis-related protein expression in thyroid cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3) : 1010428317695922.
- [12] 何迎盈, 刘娜娜, 罗治彬, 等. 阿苯达唑对耐药卵巢癌细胞糖酵解的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(12) : 1426-1429.
- [13] Gatenby R A, Gillies R J. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(7/8) : 1358-1366.
- [14] Hsu P P, Sabatini D M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond [J]. *Cell*, 2008, 134(5) : 703-707.
- [15] LUO W, Semenza G L. Pyruvate kinase M₂ regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7) : 551-556.
- [16] Mathupala S P, Ko Y H, Pedersen P L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2009, 9(1) : 17-24.
- [17] Mazurek S. Pyruvate kinase type M₂: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells [J]. *Inter J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(7) : 969-980.
- [18] Mazurek S, Boschek C B, Hugo F, et al. Pyruvate kinase type M₂ and its role in tumor growth and spreading [J]. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15(4) : 300-308.
- [19] Christofk H R, Vander Heiden M G, Harris M H, et al. The M₂ splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008, 452(7184) : 230-233.
- [20] Anastasiou D, Ponlogiannis G, Asara J M, et al. Inhibition of pyruvate kinase M₂ by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses [J]. *Science*, 2011, 334(6060) : 1278-1283.

[责任编辑 张丰丰]