



## 鸦胆子苦素D通过PI3K/Akt信号通路抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞的能量代谢研究

王雨, 罗璨, 吉兆宁

引用本文:

王雨, 罗璨, 吉兆宁. 鸦胆子苦素D通过PI3K/Akt信号通路抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞的能量代谢研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(5): 561-565.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.05.001>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 焦虑状态下去甲肾上腺素激活Akt信号通路对乳腺癌作用研究

Study on norepinephrine activating Akt signaling pathway in breast cancer under anxiety state

蚌埠医学院学报. 2019, 44(7): 841-845 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.07.001>

#### 钙蛋白酶抑制剂Calpeptin对乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移的影响

Effect of calpain inhibitor Calpeptin on the migration of MDA-MB-231 breast cancer cells

蚌埠医学院学报. 2016, 41(7): 841-844 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.07.001>

#### 厚朴酚葡萄糖苷对人乳腺癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响

Effect of magnolol glucoside on the proliferation, invasion and migration of human breast cancer cells

蚌埠医学院学报. 2018, 43(5): 567-572 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.05.002>

#### 鸦胆子油乳对胶质瘤U251细胞血管内皮生长因子表达水平的影响

Effect of brucea javanica oil emulsion on the expression of VEGF in U251 glioma cell

蚌埠医学院学报. 2017, 42(1): 34-35,56 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.01.009>

#### 低剂量LBH589通过PI3K/AKT途径诱导对上皮性卵巢癌细胞凋亡作用机制研究

Study on the mechanism of apoptosis induced by low-dose LBH 589 through PI3K/AKT pathway in epithelial ovarian cancer cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(6): 708-711 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.06.003>

# 鸦胆子苦素 D 通过 PI3K/Akt 信号通路抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的能量代谢研究

王 雨<sup>1</sup>, 罗 璨<sup>1</sup>, 吉兆宁<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的: 研究鸦胆子苦素 D 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞能量代谢的影响及作用机制。方法: 通过 MTT 法检测鸦胆子苦素 D 对细胞活力的影响。通过试剂盒测定葡萄糖消耗量、乳酸生成量、ATP 含量和己糖激酶(HK)、磷酸果糖激酶(PFK)、丙酮酸激酶(PK)、乳酸脱氢酶(LDH)活性。Western blotting 检测鸦胆子苦素 D 对 PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平的影响。结果: 鸦胆子苦素 D 可浓度依赖性地抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖活性( $P < 0.01$ )。与对照组相比, 1、2、4  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 均可降低 MDA-MB-231 细胞中 ATP 含量, 减少葡萄糖消耗量和乳酸生成量, 降低 HK、PFK、PK 和 LDH 的活性( $P < 0.05$ ); 2、4  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 可抑制细胞中 PI3K、p-Akt 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。结论: 鸦胆子苦素 D 抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 PI3K/Akt 信号通路, 进而抑制有氧糖酵解过程, 减少细胞能量供应。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; 鸦胆子苦素 D; MDA-MB-231 细胞; 能量代谢; PI3K/Akt 信号通路

**[中图分类号]** R 737.9

**[文献标志码]** A

**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.05.001

## Bruceine D inhibits energy metabolism in human breast cancer MDA-MB-231 cells via the PI3K/Akt signaling pathway

WANG Yu<sup>1</sup>, LUO Can<sup>1</sup>, JI Zhao-ning<sup>2</sup>

(1. Graduate School, Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241002; 2. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu Anhui 241002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of bruceine D on energy metabolism in breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism. **Methods:** MTT assay was used to detect the effect of bruceine D on cell viability. Glucose consumption, lactate production, ATP content and activities of hexokinase (HK), phosphofructokinase (PFK), pyruvate kinase (PK) and lactate dehydrogenase (LDH) were determined by kits. Western blotting was used to analyze the effect of bruceine D on the expression of PI3K, Akt and p-Akt protein. **Results:** Bruceine D inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells at a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, bruceine D (1, 2, 4  $\mu\text{mol/L}$ ) could reduce the ATP content, glucose consumption, lactate production, and the activities of HK, PFK, PK and LDH in MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ); 2, 4  $\mu\text{mol/L}$  bruceine D could inhibit the expression of PI3K and p-Akt protein in MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Bruceine D inhibits the PI3K/Akt signaling pathway in human breast cancer MDA-MB-231 cells, then suppresses the aerobic glycolysis and reduces cells' energy supply.

**[Key words]** breast neoplasms; bruceine D; MDA-MB-231 cells; energy metabolism; PI3K/Akt signaling pathway

乳腺癌的发病率很高, 被认为是女性最常见的癌症之一<sup>[1]</sup>。其中, 三阴性乳腺癌(TNBC)易于复发且死亡率高, 被认为是最严重的乳腺癌亚型<sup>[2]</sup>。包括外科手术、化学疗法和放射疗法在内的多种疗法已被用于治疗乳腺癌。然而, 乳腺癌仍然是临床治疗中最具挑战性的肿瘤之一。化学疗法是乳腺癌术后的标准治疗方法, 但化疗药物通常会引起不良作用和耐药性。开发有效的天然抗肿瘤药物对于克

服耐药性至关重要。鸦胆子的种子被用作传统中药, 常用于治疗疟疾、痢疾和癌症<sup>[3]</sup>。鸦胆子苦素 D 是从鸦胆子的果实中提取的一种类胡萝卜素<sup>[4]</sup>。早期研究<sup>[5]</sup>表明, 鸦胆子苦素 D 对胰腺癌、慢性粒细胞性白血病、肝细胞癌和骨肉瘤等具有抑制作用。能量代谢重组(EMR)是癌症的最关键标志之一<sup>[6]</sup>。最近的研究<sup>[7]</sup>表明, EMR 可能是乳腺癌靶向治疗的潜在方向。目前尚无关于鸦胆子苦素 D 对肿瘤细胞能量代谢影响的研究。本研究探讨鸦胆子苦素 D 在 TNBC MDA-MB-231 细胞能量代谢中的作用及其分子机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料 MDA-MB-231 细胞购自江苏凯基生物

[收稿日期] 2019-12-16 [修回日期] 2020-04-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81241102)

[作者单位] 1. 皖南医学院 研究生学院, 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院第一附属医院 肿瘤内科, 安徽 芜湖 241002

[作者简介] 王 雨(1994-), 男, 硕士研究生。

[通信作者] 吉兆宁, 硕士研究生导师, 主任医师, 教授。E-mail: jzn2017102@163.com

科技有限公司(中国)。鸦胆子苦素 D 样品(纯度 > 98%)(暨南大学中医药与天然产物研究所,中国),二甲亚砜(DMSO)(久亿化学试剂有限公司,中国),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(Amresco,美国),RPMI-1640 培养基和胎牛血清(Gibco,美国),青霉素/链霉素溶液、顺铂、BCA 蛋白定量试剂盒、 $\beta$ -actin 抗体和抗兔免疫球蛋白(凯基生物科技有限公司,中国),葡萄糖试剂盒、乳酸试剂盒、ATP 试剂盒、己糖激酶(HK)试剂盒、磷酸果糖激酶(PFK)试剂盒、丙酮酸激酶(PK)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(建成生物科技有限公司,中国),PI3K 抗体(Affinity,美国),Akt 和 p-Akt 抗体(武汉三鹰生物有限公司,中国)。CO<sub>2</sub> 培养箱(Sanyo,日本),分光光度计(Thermo Fisher,美国),超声裂解仪(新芝生物科技股份有限公司,中国),高速冷冻离心机(Eppendorf,德国),生物倒置显微镜(Olympus,日本)。

**1.2 细胞培养** 将 MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素/链霉素溶液的 RPMI-1640 培养基中。置于在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中生长。每隔 3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

**1.3 鸦胆子苦素 D 配制** 将鸦胆子苦素 D 溶解在 DMSO 中,并储存在 -20 °C。使用前,用 RPMI-1640 培养基稀释至所需浓度。

**1.4 MTT 法测定细胞活力** 将 MDA-MB-231 细胞接种到 96 孔板(5 × 10<sup>3</sup>/孔)中并培养 24 h,然后加入不同浓度的顺铂(1.56 ~ 25.00 μmol/L)和鸦胆子苦素 D(1.56 ~ 25.00 μmol/L)培养 24 h,设立不加药物的对照组。随后,每孔加入 20 μL MTT 溶液,4 h 后,弃培养基并加入 150 μL DMSO。最后,测量各组在 490 nm 处的吸光度(OD)值以评价细胞活力。细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 × 100%。

**1.5 ATP 浓度的测定** 将细胞以 1 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种,并在 37 °C 用不同浓度的鸦胆子苦素 D(1、2、4 μmol/L)或 0.1% DMSO(对照组)处理 24 h。将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min,并收集细胞沉淀。然后将细胞沉淀物用 PBS 洗涤,并用超声仪裂解 5 min。将细胞裂解液在 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液储存在 -80 °C。使用 ATP 试剂盒测定细胞裂解液中的 ATP 含量,使用 BCA 蛋白定量试剂盒对细胞裂解液进行定量。

**1.6 葡萄糖消耗量和乳酸生成量测定** 细胞以 1 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种。在 37 °C 下用不同浓度的鸦胆子苦素 D(1、2 和 4 μmol/L)或 0.1% DMSO(对照组)处理 24 h 后收集培养基,并在 -80 °C 保存。使用葡萄糖和乳酸试剂盒测定培养基中葡萄糖和乳酸的浓度。葡萄糖消耗量和乳酸生成量为 24 h 培养期开始和结束时培养基含量的改变量。

**1.7 糖酵解关键酶活性测定** 将细胞以 1 × 10<sup>5</sup>/mL 的密度接种,并在 37 °C 用不同浓度的鸦胆子苦素 D(1、2、4 μmol/L)或 0.1% DMSO(对照组)处理 24 h。将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min,然后收集细胞沉淀。然后将细胞沉淀用 PBS 洗涤,并用超声仪裂解 5 min。将细胞裂解液在 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,并储存在 -80 °C。使用 HK、PFK、PK 和 LDH 试剂盒测定细胞裂解液中的 HK、PFK、PK 和 LDH 活性,使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞裂解液中的蛋白质浓度。

**1.8 Western blotting 分析蛋白表达** 使用总蛋白提取试剂盒提取 MDA-MB-231 细胞的总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒分析样品的总蛋白浓度。各组蛋白样品通过 10% SDS-PAGE 分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。在室温下将膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,然后用 TBST 洗涤 3 次。随后,将膜与 PI3K(1:1 000)、Akt(1:5 000)、p-Akt(1:5 000)和  $\beta$ -actin(1:400)抗体在 4 °C 孵育过夜。然后将膜与抗兔 IgG(1:2 000)孵育 1 h,用增强的化学发光法染色,使用 G: BOX chemiXR5 成像,并使用 Gel-Pro32 软件进行灰度分析。以  $\beta$ -actin 作为内参。

**1.9 统计学方法** 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

**2.1 不同浓度鸦胆子苦素 D 抑制 MDA-MB-231 细胞活力的比较** 鸦胆子苦素 D 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h 的 IC<sub>50</sub> 值为(44.25 ± 1.65) μmol/L。MTT 结果表明,在 1.56 ~ 25.00 μmol/L 浓度范围内,鸦胆子苦素 D 均可浓度依赖性地抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖活性(*P* < 0.01)(见表 1)。

**2.2 鸦胆子苦素 D 对 MDA-MB-231 细胞中 ATP 含量的影响** 与对照组相比,1、2、4 μmol/L 鸦胆子苦素 D 均可降低 MDA-MB-231 细胞中 ATP 含量(*P* < 0.05)(见表 2)。

**2.3 不同浓度鸦胆子苦素 D 抑制 MDA-MB-231 细胞有氧糖酵解作用的比较** 与对照组相比,1、2、

4  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 处理 MDA-MB-231 细胞的葡萄糖消耗量和乳酸生成量均减少 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

表 1 各组细胞活力的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	细胞存活率/%	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
对照组	3	100.00 $\pm$ 1.20			
1.56 $\mu\text{mol/L}$	3	94.06 $\pm$ 1.79 *			
3.13 $\mu\text{mol/L}$	3	92.56 $\pm$ 1.45 *	191.48	<0.01	3.111
6.25 $\mu\text{mol/L}$	3	87.98 $\pm$ 1.79 **			
12.50 $\mu\text{mol/L}$	3	75.04 $\pm$ 2.13 ** $\Delta$			
25.00 $\mu\text{mol/L}$	3	62.17 $\pm$ 2.05 ** $\Delta$ $\square$			

*q* 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 3.13  $\mu\text{mol/L}$  组比较 #  $P < 0.05$ ; 与 6.25  $\mu\text{mol/L}$  组比较  $\Delta P < 0.05$ ; 与 12.50  $\mu\text{mol/L}$  组比较  $\square P < 0.05$

表 2 各组细胞中 ATP 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	ATP 含量/( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
对照组	3	1.94 $\pm$ 0.01			
1 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	1.71 $\pm$ 0.03 *			
2 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	1.43 $\pm$ 0.04 **	303.16	<0.01	0.001
4 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	1.24 $\pm$ 0.03 ** $\Delta$			

*q* 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 1  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较 #  $P < 0.05$ ; 与 2  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较  $\Delta P < 0.05$

表 4 各组细胞中 HK、PFK、PK、LDH 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ ; U/g)

分组	<i>n</i>	HK 活性	PFK 活性	PK 活性	LDH 活性
对照组	3	279.69 $\pm$ 4.47	118.81 $\pm$ 3.70	55.90 $\pm$ 3.49	233.87 $\pm$ 3.21
1 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	230.05 $\pm$ 4.54 *	101.30 $\pm$ 2.03 *	44.12 $\pm$ 2.03 *	202.00 $\pm$ 2.61 *
2 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	169.06 $\pm$ 6.09 **	80.00 $\pm$ 1.26 **	35.41 $\pm$ 2.81 **	176.53 $\pm$ 3.03 **
4 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	113.18 $\pm$ 5.19 ** $\Delta$	64.98 $\pm$ 3.88 ** $\Delta$	22.56 $\pm$ 4.56 ** $\Delta$	135.30 $\pm$ 3.88 ** $\Delta$
<i>F</i>	—	601.50	194.76	52.79	503.16
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	—	26.156	8.611	11.251	10.344

*q* 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 1  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较 #  $P < 0.05$ ; 与 2  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较  $\Delta P < 0.05$

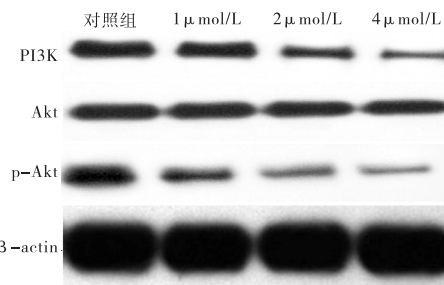


图 1 MDA-MB-231 细胞中 PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

### 3 讨论

尽管多种治疗方法被应用于 TNBC, 但是 TNBC 依然缺乏特定的靶向治疗, 预后较差。之前的研

表 3 各组细胞中葡萄糖消耗量和乳酸生成量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	葡萄糖消耗量/ (mmol/L)	乳酸生成量/ (mmol/L)
对照组	3	17.60 $\pm$ 0.18	25.53 $\pm$ 0.28
1 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	15.44 $\pm$ 0.56 *	20.98 $\pm$ 0.42 *
2 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	10.35 $\pm$ 0.24 **	14.87 $\pm$ 0.39 **
4 $\mu\text{mol/L}$ 鸦胆子苦素 D	3	7.11 $\pm$ 0.16 ** $\Delta$	10.48 $\pm$ 0.45 ** $\Delta$
<i>F</i>	—	644.37	697.02
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	—	0.106	0.150

*q* 检验:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 1  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较 #  $P < 0.05$ ; 与 2  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 组比较  $\Delta P < 0.05$

2.4 鸦胆子苦素 D 对糖酵解关键酶活性的抑制作用 与对照组相比, 1、2、4  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 均可降低 MDA-MB-231 细胞中 HK、PFK、PK 和 LDH 的活性 ( $P < 0.05$ ) (见表 4)。

2.5 鸦胆子苦素 D 对 MDA-MB-231 细胞中 PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白的抑制作用 与对照组相比, 2、4  $\mu\text{mol/L}$  鸦胆子苦素 D 处理 MDA-MB-231 细胞 24 h, 均可抑制细胞中 PI3K、p-Akt 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ) (见图 1、表 5)。

究<sup>[7]</sup>表明, 乳腺癌的能量代谢过程可能作为潜在的靶向治疗目标。本研究初步探讨了鸦胆子苦素 D 对于 TNBC 细胞能量代谢的影响, 并证实鸦胆子苦素 D 能明显抑制 MDA-MB-231 细胞的有氧糖酵解过程。

Warburg 效应指出, 肿瘤细胞倾向于利用有氧糖酵解来产生能量, 而不是通过氧化磷酸化作用。这种现象存在于包括乳腺癌在内的多种癌症细胞内<sup>[8]</sup>。有氧糖酵解过程中 1 分子葡萄糖分解产生 2 分子 ATP, 而肿瘤细胞的生长和增殖需要 ATP<sup>[9]</sup>。本研究结果表明, 在鸦胆子苦素 D 处理后, MDA-MB-231 细胞中 ATP 含量减少, 可能出现供能不足。

有氧糖酵解是葡萄糖转变为丙酮酸, 最终生成



乳酸的过程<sup>[10]</sup>。葡萄糖作为有氧糖酵解底物,可以为机体提供能量,是细胞主要能量来源。乳酸是有氧糖酵解最终产物,同时在能量调节中发挥关键作用。用鸦胆子苦素 D 处理后,MDA-MB-231 细胞葡萄糖消耗量和乳酸生成量都明显减少,提示 MDA-MB-231 细胞中有氧糖酵解过程被鸦胆子苦素 D 抑制。

表 5 各组细胞中 PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	PI3K	Akt	p-Akt
对照组	3	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.02
1 μmol/L 鸦胆子苦素 D	3	0.16 ± 0.01 *	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.01
2 μmol/L 鸦胆子苦素 D	3	0.09 ± 0.02 **	0.20 ± 0.01	0.07 ± 0.02 **
4 μmol/L 鸦胆子苦素 D	3	0.04 ± 0.01 **△	0.19 ± 0.02	0.02 ± 0.01 **△
F	—	76.41	2.91	132.12
P	—	<0.01	>0.05	<0.01
MS <sub>组内</sub>	—	0.000	0.000	0.000

q 检验:与对照组比较 \* P < 0.05; 与 1 μmol/L 鸦胆子苦素 D 组比较 # P < 0.05; 与 2 μmol/L 鸦胆子苦素 D 组比较 △ P < 0.05

有氧糖酵解过程通过 HK、PFK、PK、LDH 4 种关键酶进行调节,它们在调节过程中发挥不同的作用<sup>[11]</sup>。糖酵解的第一步是将葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖,HK 在其中起关键作用<sup>[12]</sup>。PFK 催化糖酵解的另一个限速步骤,即 6-磷酸葡萄糖转变为 1,6-二磷酸果糖<sup>[13]</sup>。PK 催化磷酸烯醇丙酮酸转化为丙酮酸,并在此过程中生成 ATP<sup>[14]</sup>。LDH 催化糖酵解途径中的最后一步,将丙酮酸转化为乳酸。在用鸦胆子苦素 D 处理后,MDA-MB-231 细胞中的 HK、PFK、PK、LDH 活性均明显降低。

PI3K/Akt 信号途径参与多种生物学过程,包括葡萄糖代谢、细胞周期、细胞凋亡和血管生成,在肿瘤的生长和增殖中起着重要的作用<sup>[15]</sup>。Akt 被认为是 Warburg 激酶,被激活后发生磷酸化转变为 p-Akt,通过刺激 HK 和 PFK 促进葡萄糖代谢。PI3K 是一种脂质激酶,可以增强 HK 和 PFK 活性从而增加糖酵解通量<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>表明,PI3K/Akt 信号通路还可以调节 PK 和 LDH 活性。本研究结果表明用鸦胆子苦素 D 处理后,MDA-MB-231 细胞中的 PI3K、p-Akt 表达均降低,提示 MDA-MB-231 细胞中 PI3K/Akt 信号通路活性被鸦胆子苦素 D 所抑制。结合前面的实验结果,提示鸦胆子苦素 D 可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,进而降低有氧糖酵解关键酶活性并抑制有氧糖酵解,减少 MDA-MB-231 细胞能量供应。

综上所述,鸦胆子苦素 D 通过抑制 MDA-MB-231 细胞中 PI3K/Akt 信号通路,从而降低有氧糖酵解水平,减少细胞能量供应。本研究结果提示鸦胆子苦素 D 可能作为治疗 TNBC 的潜在抗肿瘤药物,为未来药物开发提供理论基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA-Cancer J Clin, 2019, 69(1):7.
- [2] CAO MD, LAMICHHANE S, LUNDGREN S, et al. Metabolic characterization of triple negative breast cancer [J]. BMC Cancer, 2014, 14(941):2014, 14:941.
- [3] ZHANG JY, LIN MT, TUNG HY, et al. Bruceine D induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia K562 cells via mitochondrial pathway [J]. AM J Cancer Res, 2016, 6(4):819.
- [4] TAN B, HUANG Y, LAN L, et al. Bruceine D induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulating JNK pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117:109089.
- [5] WANG S, HU H, ZHONG B, et al. Bruceine D inhibits tumor growth and stem cell-like traits of osteosarcoma through inhibition of STAT3 signaling pathway [J]. Cancer Med, 2019, 8(17):7345.
- [6] HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5):646.
- [7] LONG JP, LI XN, ZHANG F. Targeting metabolism in breast cancer: How far we can go? [J]. World J Clin Oncol, 2016, 7(1):122.
- [8] POTTER M, NEWPORT E, MORTEN KJ. The Warburg effect: 80 years on [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(5):1499.
- [9] MOOKERJEE SA, GERENCSEK AA, NICHOLLS DG, et al. Quantifying intracellular rates of glycolytic and oxidative ATP production and consumption using extracellular flux measurements [J]. J Biol Chem, 2017, 292(17):7189.
- [10] YELLEN G. Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism [J]. J Cell Biol, 2018, 217(7):2235.
- [11] GANAPATHY-KANNIAPPAN S, GESCHWIND JF H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects [J]. Mol Cancer, 2013, 12:152.
- [12] ROBERTS D J, MIYAMOTO S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akt on mitochondria and TORCing to autophagy [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(2):248.
- [13] ANDREJC D, MOŽIR A, LEGIŠA M. Effect of the cancer specific shorter form of human 6-phosphofructo-1-kinase on the metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. BMC Biotechnol, 2017, 17(1):41.
- [14] YU Z, ZHAO X, HUANG L, et al. Proviral insertion in murine lymphomas 2 (PIM2) oncogene phosphorylates pyruvate kinase M2 (PKM2) and promotes glycolysis in cancer cells [J]. J Biol Chem, 2013, 288(49):35406.
- [15] XIE Y, SHI X, SHENG K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review) [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2):783.

## PD-L1 对肝细胞癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响

周万飞<sup>1</sup>, 刘高峰<sup>2</sup>, 秦中强<sup>1</sup>, 胡小梅<sup>2</sup>, 谈 燚<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:** 探讨程序性死亡配体(PD-L1)在肝癌细胞增殖、侵袭、迁移中的作用。**方法:** 转染有效的 PD-L1 基因 siRNA 干扰片段进入人肝细胞癌 HepG2 细胞中, 下调细胞中 PD-L1 表达。采用荧光定量 PCR 法检测 HepG2 细胞中 PD-L1 基因表达情况, 采用 Western blotting 法检测 HepG2 细胞中 PD-L1 蛋白表达情况。通过 MTT 实验观察其对 HepG2 细胞增殖能力的影响, 采用细胞划痕实验检测细胞融合率, 采用 Transwell 小室进行侵袭实验, 观察其对 HepG2 细胞迁移及侵袭能力影响。**结果:** 下调 PD-L1 后, HepG2 细胞 PD-L1 基因表达量、PD-L1 蛋白表达量和细胞增殖能力、迁移能力及侵袭能力均明显低于阴性对照组和空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 阴性对照组和正常对照组上述指标差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论:** 下调 PD-L1 后, 肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力有一定程度下降, PD-L1 可能成为肝细胞肝癌免疫治疗中的一个新基因靶位。

**[关键词]** 肝细胞肿瘤; PD-L1; 侵袭; 迁移; 增殖**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.05.002**Effect of PD-L1 on the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells**ZHOU Wan-fei<sup>1</sup>, LIU Gao-feng<sup>2</sup>, QIN Zhong-qiang<sup>1</sup>, HU Xiao-mei<sup>2</sup>, TAN Yi<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 2. School of Life Sciences, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of PD-L1 in the proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** The effective PD-L1 gene siRNA interference fragment was transfected into the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells to down-regulate PD-L1 expression. The expression levels of PD-L1 gene and protein in HepG2 cells were detected using the real-time PCR and Western blotting, respectively. The cells proliferation and fusion rate of HepG2 cells were observed using the MTT assay and cell scratch test, respectively. The invasion experiment was implemented using Transwell chamber, and the migration and invasion ability of HepG2 cells were observed. **Results:** After the expression level of PD-L1 gene was down-regulated, the expression levels of PD-L1 gene and protein in HepG2 cells, and proliferation, migration and invasion abilities of HepG2 cells in PD-L1 interference group were significantly lower than those in negative control group and blank control group ( $P < 0.01$ ), and there was no statistical significance in the above indicators between the negative control group and normal control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** After the down-regulation of PD-L1, the proliferation, migration and invasion abilities of the human hepatocellular carcinoma cells decrease to a certain extent, and PD-L1 may become a new gene target in the immunotherapy of hepatocellular carcinoma.

**[Key words]** hepatocellular neoplasms; PD-L1; invasion; migration; proliferation

肝细胞癌为全球性健康问题<sup>[1]</sup>, 其发病率在全球排名第五, 死亡率排名第二<sup>[2]</sup>。由于肝细胞癌早

期无特征性临床表现, 因此在发病早期难以发现, 往往在病人就诊时已处于疾病晚期, 失去了手术治疗的最佳时间<sup>[3]</sup>。因此, 深入研究肝细胞癌的发病机制及发现新的治疗手段有重大意义。随着肿瘤免疫治疗突飞猛进, 新型细胞免疫治疗技术得到飞速发展。近年来, 在肿瘤免疫治疗研究中发现程序性死亡受体-1 (programmed death receptor-1, PD-1) / 程序性死亡配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1/B7-H1) 信号通路的激活可以诱导发生肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤快速生长, 在免疫耐受调节中扮演重要

[收稿日期] 2019-06-17 [修回日期] 2019-09-24

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究重大项目 (KJ2018ZD022); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2017A228, KJ2018A0993)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 肝胆外科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院 生命科学学院, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 周万飞 (1991-), 男, 硕士研究生。

[通信作者] 谈 燚, 硕士研究生导师。E-mail: doctortanyi2007@sina.

[16] ROBEY RB, HAY N. Is Akt the "Warburg kinase"? —Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis [J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(1): 25.

of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways [J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25755.

[17] YANG L, HOU Y, YUAN J, et al. Twist promotes reprogramming