

藤梨根提取物通过 Akt-mTOR 介导的自噬信号通路抑制乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解

甘椿椿¹, 金湛¹, 魏晓鹏², 靳美娜^{2*} (1.衢州职业技术学院医学院, 浙江 衢州 324000; 2.天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要: 目的 探究藤梨根提取物对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖、迁移、侵袭及糖酵解的影响。方法 MDA-MB-231 细胞经藤梨根提取物处理后, MTT 试验与克隆形成试验检测细胞增殖能力; 划痕试验和 Transwell 试验检测细胞迁移和侵袭, Western blotting 检测基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)蛋白表达情况, 采用葡萄糖摄取试剂盒和乳酸检测试剂盒检测细胞葡萄糖摄取量和乳酸生成量, 采用 Western blotting 检测细胞内 M2 型丙酮酸激酶(PKM2), 葡萄糖转运体 1(GLUT1)和乳酸脱氢酶 A(LDHA)以及 Akt-mTOR 介导的自噬信号通路相关蛋白表达情况。结果 与对照组比较, 10 mg·mL⁻¹ 藤梨根提取物能显著抑制 MDA-MB-231 细胞的细胞活性($P<0.05$), 而浓度为 0.1 和 1 mg·mL⁻¹ 的藤梨根提取物则对细胞活性无明显影响。藤梨根提取物能够剂量依赖性地抑制 MDA-MB-231 细胞的克隆形成率、迁移率、侵袭细胞数量、葡萄糖摄取量和乳酸生成量(P 均 <0.05)。藤梨根提取物(1 μ g·mL⁻¹ 和 10 μ g·mL⁻¹)能够减少细胞迁移标记蛋白(MMP-2 和 MMP-9)的表达, 抑制糖酵解相关蛋白 PKM2, GLUT1 和 LDHA 的表达(P 均 <0.05)。此外, 藤梨根提取物抑制了 Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白的活性, 减少了 p-Akt 和 p-mTOR 表达, 促进 LC3I 转化为 LC3II, 上调自噬相关蛋白 Beclin1, 下调自噬标记蛋白 p62, 增强 MDA-MB-231 细胞自噬活性(P 均 <0.05)。结论 藤梨根提取物抑制细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解, 其作用可能与失活 Akt-mTOR 途径诱导的自噬有关。

关键词: 藤梨根提取物; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 糖酵解; Akt-mTOR

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)07-0799-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.07.005

引用本文: 甘椿椿, 金湛, 魏晓鹏, 等. 藤梨根提取物通过 Akt-mTOR 介导的自噬信号通路抑制乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(7): 799-806.

Actinidia Chinensis Root Extract Inhibits the Proliferation, Migration, Invasion and Glycolysis of Breast Cancer Cells Through the Akt-mTOR Mediated Autophagy Signaling Pathway

GAN Chunchun¹, JIN Zhan¹, WEI Xiaopeng², JIN Meina^{2*} (1.Department of Medicine, Quzhou College of Technology, Quzhou 324000, China; 2.Department of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of the *Actinidia chinensis* root extract(acRoots) on the proliferation, migration, invasion and glycolysis of breast cancer cells MDA-MB-231. **METHODS** MTT assay and clony formation assay were used to detect the proliferation ability of MDA-MB-231 cells treated with acRoots extract. The wound healing and Transwell assays were performed to detect cell migration and invasion. Western blotting was used to detect the protein levels of matrix metalloproteinase 2(MMP-2) and matrix metalloproteinase 9(MMP-9). Glucose uptake kit and lactate colorimetry kit were used to detect glucose intake and lactate production in cells. Western blotting was used to detect the expression of the level of glycolysis-related proteins pyruvate kinase M2(PKM2), glucose transporter1(GLUT1), lactate dehydrogenase A(LDHA) and Akt-mTOR mediated autophagy signaling pathway. **RESULTS** Compared with the control group, the acRoots extract (10 mg·mL⁻¹) could significantly inhibit the cell viability of MDA-MB-231 cells, while the cell activity of MDA-MB-231 cells was not affected by 0.1 and 1 mg·mL⁻¹ acRoots extract. The acRoots extract could significantly reduce the colony formation, migration rate, number of invasion cells, glucose uptake and lactic acid production of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner(all $P<0.05$). The extract of acRoots(1 μ g·mL⁻¹ and 10 μ g·mL⁻¹) could reduce the expression of cell migration marker proteins(MMP-2 and MMP-9), and inhibit the expression of glycolysis-related proteins PKM2, GLUT1 and LDHA(all $P<0.05$). In addition, the extract of acRoots inhibited the activity of key proteins in the Akt/mTOR signaling pathway, decreased the expression of p-Akt and p-mTOR, promoted the conversion of LC3I to LC3II, up-regulated the autophagy-related protein Beclin1, down-regulated the autophagic marker protein p62, enhanced MDA-MB-231 cell autophagy activity(all $P<0.05$). **CONCLUSION** The acRoots extract inhibit cell proliferation, migration, invasion and glycolysis, and its effect may be related

基金项目: 衢州市科技计划项目(2018k23); 天津市自然科学基金项目(18JCQNJC13800)

作者简介: 甘椿椿, 男, 博士, 讲师 Tel: (0570)8068053 E-mail: ganchunchun1990@163.com *通信作者: 靳美娜, 女, 博士, 讲师 Tel: (022)83336538 E-mail: songjinmeina@163.com

to autophagy induced by inactivating Akt-mTOR pathway.

KEYWORDS: *Actinidia chinensis* root extract; breast cancer; proliferation; migration; invasion; glycolysis; Akt-mTOR

乳腺癌是全世界妇女在发病率和死亡率方面最具威胁的健康问题^[1]。2012年,全球估计有160多万新病例被诊断为乳腺癌,521 907名女性死于乳腺癌^[2]。癌细胞的转移是恶性肿瘤的主要特征之一,也是引起乳腺癌患者死亡的主要因素^[3]。手术切除是治疗乳腺癌最有效的方法。化疗、放疗和内分泌治疗常用于清除残留的肿瘤细胞,抑制肿瘤生长,减少乳腺癌复发,提高了乳腺癌患者的长期生存率和生活质量^[4-5]。然而,有些患者会出现与治疗相关的不良反应或产生了耐药性。因此,寻找具有生物活性的天然药物可能为乳腺癌治疗提供另一种策略。

大量研究揭示了多种中草药的抗肿瘤活性,为天然化合物治疗肿瘤提供了新的途径^[6]。藤梨根为猕猴桃科植物硬毛中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* 的根,其性味苦、寒,是一种具有解毒、利尿、止血和抗肿瘤作用的中药^[7]。藤梨根的主要化学成分有三萜、多糖、黄酮类、甾体、萜烯和酚酸等^[8-13]。越来越多的研究表明,藤梨根处理对多种肿瘤细胞的生长具有很强的抑制作用,例如肝癌^[14-18]、胃癌^[19]、肺癌^[20]等。Akt-mTOR介导的自噬信号通路与乳腺癌的发生和肿瘤的发展密切相关^[21-22]。文献研究表明,藤梨根提取物能够调节PI3K/Akt和JNK/Akt信号通路^[23-24],推测其可能影响Akt-mTOR信号通路。然而关于藤梨根提取物对乳腺癌细胞的作用和机制尚不明确。

本研究以人乳腺癌MDA-MB-231细胞为研究对象,用不同浓度藤梨根提取物作用后,检测对细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解的影响,以及对Akt-mTOR介导的自噬信号通路的影响,以期为藤梨根应用于乳腺癌的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与药物

人乳腺癌MDA-MB-231细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。藤梨根药材(杭州华东中药饮片有限公司,批号:190211),经浙江中医药大学中药教研室主任宋捷民教授鉴定为猕猴桃科中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch 的干燥根。

1.2 试剂

RPMI-1640培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。噻唑蓝(MTT,上海恒斐生物科技有

限公司);ECL增强发光和BCA蛋白定量试剂盒及Matrigel购自美国Thermo公司;Transwell小室(美国BD公司);葡萄糖摄取检测试剂盒(上海群己生物科技有限公司);乳酸检测试剂盒(上海源叶生物科技有限公司);兔多克隆抗体MMP-2(批号:ab92536)、MMP-9(批号:ab76003)、PKM2(批号:ab150377)、GLUT1(批号:ab40084)、LDHA(批号:ab125683)、LC3II(批号:ab48394)、LC3I(批号:ab48394)、Berclin1(批号:ab207612)、p62(批号:ab109012)、p-Akt(批号:ab38449)、Akt(批号:ab8805)、p-mTOR(批号:ab109268)、mTOR(批号:ab32028)和GAPDH(批号:ab8245)均购自美国Abcam公司。

1.3 仪器

CO₂湿化培养箱(日本SANYO公司);UV300自动酶标仪(美国Bio-Tek公司);CKX41光学倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.4 藤梨根正丁醇提取物制备

将藤梨根洗净切碎,通过粉碎机粉碎至10目,称取100g粉末,悬浮于10倍体积的双蒸馏水中,浸泡2h后,100℃加热1h,过滤汤剂以去除沉积物。整个提取过程重复2次。合并2次滤液,按1:1得浓缩液,用正丁醇萃取3次,合并萃取液,回收溶剂至干,得藤梨根正丁醇提取物,将得到的萃取物混合并制备成生药浓度为1g·mL⁻¹的母液,所有药液均用0.22μm微孔滤膜过滤。

1.5 细胞培养及分组

所有细胞置于添加10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,培养在37℃、5%CO₂的湿化培养箱中。将细胞分为对照组和药物处理组,细胞培养24h后吸出培养液,给药。MTT和克隆形成试验藤梨根提取物低、中、高剂量组加入用RPMI1640培养基稀释的藤梨根提取物,使之终浓度为0.1,1,10mg·mL⁻¹,对照组不加药物,加入等量的RPMI1640培养基处理;迁移,侵袭,糖酵解和Western blotting试验中藤梨根提取物低、中、高剂量组加入用RPMI1640培养基稀释的藤梨根提取物,使之终浓度为0.1,1,10μg·mL⁻¹,对照组不加药物,加入等量的RPMI1640培养基处理。

1.6 细胞增殖试验

按照 MTT 试剂盒说明书, 各组设置 3 个复孔, 细胞分组和处理同“1.5”项下方法, 培养 48 h 后加入 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$, 孵育 4 h 后, 弃上清加入二甲基亚砷后轻微震荡 15 min, 酶标仪检测 570 nm 下的吸光度($OD_{570\text{ nm}}$)值, 细胞活性 $=\frac{(OD_{\text{实验组}}-OD_{\text{对照组}})}{(OD_{\text{对照组}}-OD_{\text{空白组}})}\times 100\%$ 。

1.7 克隆形成试验

将细胞接种于 6 孔板中, 用不同浓度的藤梨根提取物处理 24 h, 然后在不同的 6 孔板中以每孔 400 个细胞培养 14 d, 每隔 2 d 换一次培养液。弃去细胞培养液, 用 PBS 清洗 2 次, 细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min, 用 0.5%结晶紫染色 15 min, 吸出染色液, 加入 PBS 洗涤 2~3 次, 洗去残留的染色液, 室温下自然干燥, 拍照并计数细胞克隆数目, 计算克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.8 细胞迁移试验

细胞分组和处理同“1.5”项下方法, 培养 24 h 后, 将 1×10^5 个细胞接种于 6 孔细胞培养皿中, 待细胞贴壁生长后, 各孔加丝裂霉素处理 1 h, 抑制细胞分裂。当细胞达到 90%融合时, 以 $200\text{ }\mu\text{L}$ 无菌移液枪枪尖进行细胞划痕, PBS 洗去漂浮细胞, 然后在无血清培养基中培养, 24 h 后计算细胞迁移率, 细胞迁移率 $=\frac{(0\text{ h 划痕距离}-24\text{ h 划痕距离})}{0\text{ h 划痕距离}}$ 。

1.9 细胞侵袭试验

将 0.1 mL 0.5%Matrigel 基质胶加到 Transwell 小室上室板表面, 并 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。细胞分组和处理同“1.5”项下方法, 培养 24 h 后, 将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬浮液(2×10^4 个细胞)悬浮于不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基中接种于 Transwell 小室上室。随后将 $600\text{ }\mu\text{L}$ 含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基加入下室中。将细胞 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 用 95%乙醇洗涤, 1%多聚甲醛固定细胞并用 0.5%结晶紫染液染色。用棉签擦去上室及基质胶上的细胞, 显微镜下观察并拍照, 计数侵袭细胞数量。

1.10 葡萄糖消耗量、乳酸生成量的测定

细胞分组和处理同“1.5”项下方法, 培养 24 h 后, 将细胞培养液离心取上清, 按照试剂盒操作, 酶标仪检测波长 505 nm(葡萄糖)、530 nm(乳酸)下的吸光度值, 计算葡萄糖消耗量和乳酸生成量。

1.11 Western blotting 试验

细胞分组和处理同“1.5”项下方法, 培养 24 h 后, 从细胞中分离出总蛋白。采用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 并按照说明进行检测。样品经 12% SDS-PAGE 电泳。然后将蛋白转移到 PVDF 膜上。在脱脂乳中封闭 1 h 后, 加入 1:1 000 稀释的一抗 MMP-2, MMP-9, PKM2, GLUT1, LDHA, LC3I, LC3II, p62, Beclin1, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR 和 GAPDH, 并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 随后用 HRP 偶联的二级抗体室温下孵育 2 h。利用增强化学发光(ECL)检测系统观察蛋白质。GAPDH 作为内参蛋白质。

1.12 统计学处理

所有试验重复 3 次, 使用 SPSS 21.0 进行统计学分析。数据表示为 3 次独立试验的 $\bar{x}\pm s$ 。采用 t 检验进行 2 组之间的差异分析, 利用单因素方差分析的方法进行多组数据间的差异分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 藤梨根提取物对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响

MDA-MB-231 细胞经不同浓度的藤梨根提取物分别处理 48 h 后, MTT 试验结果显示, $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藤梨根提取物可以显著抑制 MDA-MB-231 细胞活性($P<0.05$), 而浓度为 0.1 和 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藤梨根提取物对细胞活性无明显影响, 结果见图 1。克隆形成试验检测 MDA-MB-231 细胞克隆形成情况, 与对照组相比, 藤梨根提取物处理可显著抑制细胞克隆形成, 随药物浓度增加, 克隆形成数量显著减少, 差异均有统计学意义, 结果见图 2。

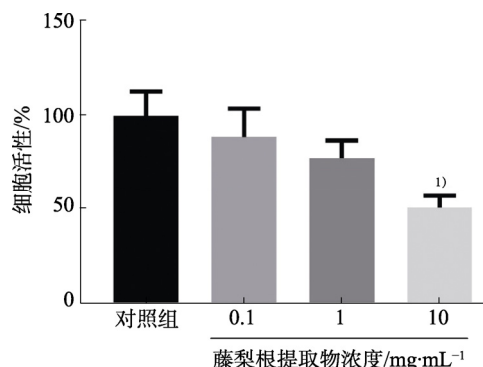


图 1 藤梨根提取物对 MDA-MB-231 细胞活力的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on the cell viability of MDA-MB-231 cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$.

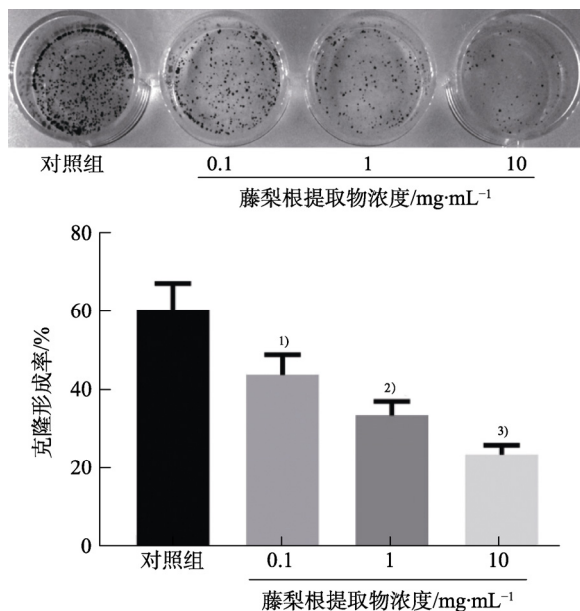


图2 藤梨根提取物对MDA-MB-231细胞克隆形成的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on clone formation of MDA-MB-231 cells
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

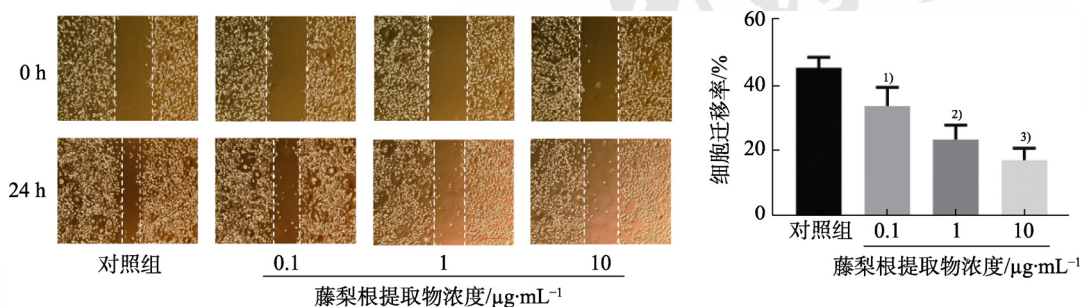


图3 藤梨根提取物对MDA-MB-231细胞迁移的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on migration of MDA-MB-231 cells
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

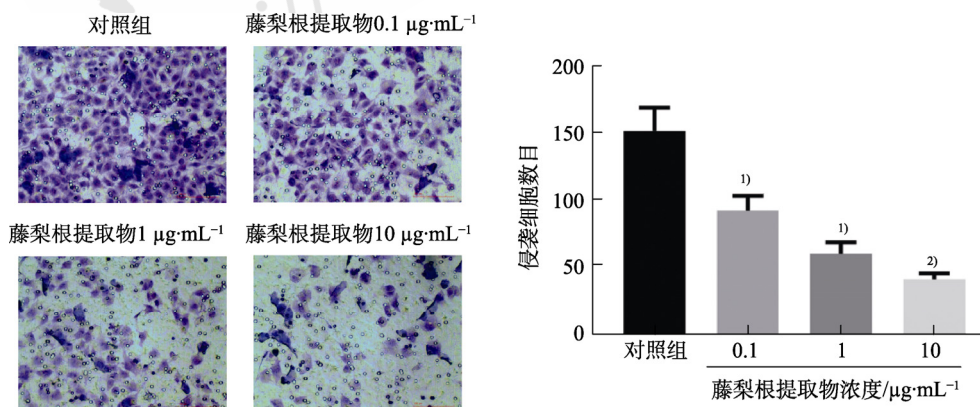


图4 藤梨根提取物对MDA-MB-231细胞侵袭的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on invasion of MDA-MB-231 cells
Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

2.2 藤梨根提取物对乳腺癌细胞MDA-MB-231迁移和侵袭的影响

划痕试验结果显示,藤梨根提取物作用MDA-MB-231细胞24 h后,与对照组相比,药物处理组“划痕”愈合速度慢。且随着藤梨根提取物处理浓度的增加,“划痕”宽度越大,即细胞迁移能力越弱。这表明藤梨根提取物对MDA-MB-231细胞的迁移能力有明显浓度依赖抑制作用,差异均有统计学意义,结果见图3。Transwell试验结果显示,藤梨根提取物组细胞侵袭个数明显少于对照组,且侵袭细胞个数随着藤梨根提取物浓度的增大而逐渐减少,差异均有统计学意义,结果见图4。Western blotting试验结果显示,浓度为1 μg·mL⁻¹和10 μg·mL⁻¹藤梨根提取物处理能够浓度依赖地下调细胞迁移标记蛋白MMP-2和MMP-9的表达,差异均有统计学意义,结果见图5。因此,证实了藤梨根提取物能浓度依赖性地抑制MDA-MB-231细胞的侵袭和转移。

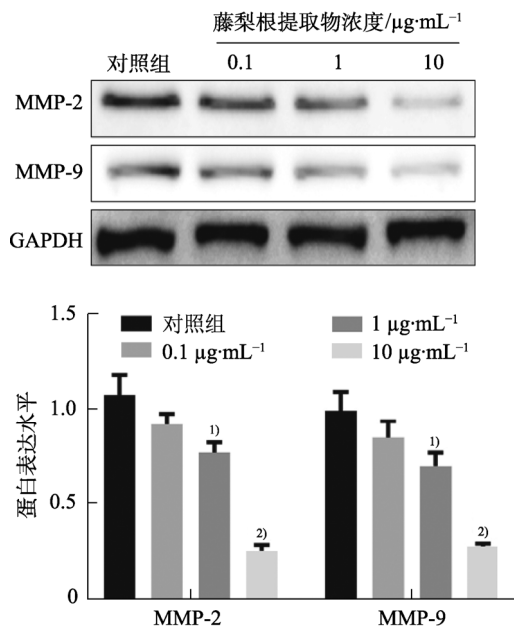


图 5 藤梨根提取物对 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 5 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on MMP-2 and MMP-9 expression in MDA-MB-231 cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

2.3 藤梨根提取物对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 糖酵解的影响

与对照组比较, MDA-MB-231 细胞经藤梨根提取物处理后, 葡萄糖摄取量和乳酸生成量明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 其作用呈浓度依赖性, 结果见图 6。Western blotting 试验结果显示, 与对照组相比, 浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藤梨根提取物下调了关键糖酵解酶 PKM2 和 LDHA 的表达以及葡萄糖转运蛋白 GLUT1 的蛋白的表达, 差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 结果见图 7。因此, 藤梨根提取物能够抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 糖酵解。

2.4 藤梨根提取物调节乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 Akt/mTOR 介导的自噬信号通路

采用 Western blotting 法检测藤梨根提取物对 MDA-MB-231 细胞的 Akt/mTOR 介导的自噬信号通路相关蛋白的表达。与对照组比较, 浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 藤梨根提取物抑制了 Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白的活性, 降低了 p-Akt 和 p-mTOR 蛋白的表达, 促进 LC3I 转化为 LC3II, 上调自噬相关蛋白 Beclin1, 下调自噬标记蛋白 p62, 增强 MDA-MB-231 细胞的自噬活性,

差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 结果见图 8。

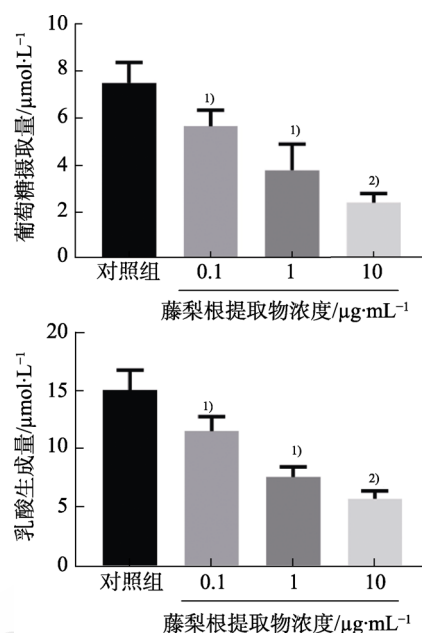


图 6 藤梨根提取物对 MDA-MB-231 细胞葡萄糖摄取与乳酸生成的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 6 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on glucose uptake and lactate production in MDA-MB-231 cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

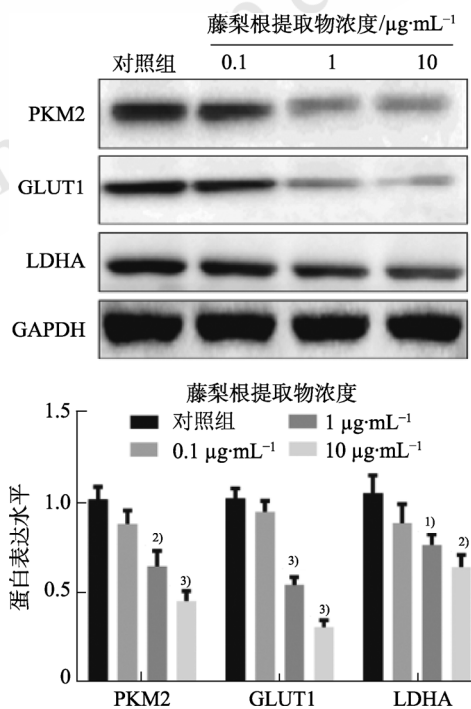


图 7 藤梨根提取物对 MDA-MB-231 细胞中 PKM2, GLUT1 和 LDHA 表达的影响

与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 7 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on PKM2, GLUT1 and LDHA expression in MDA-MB-231 cells Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

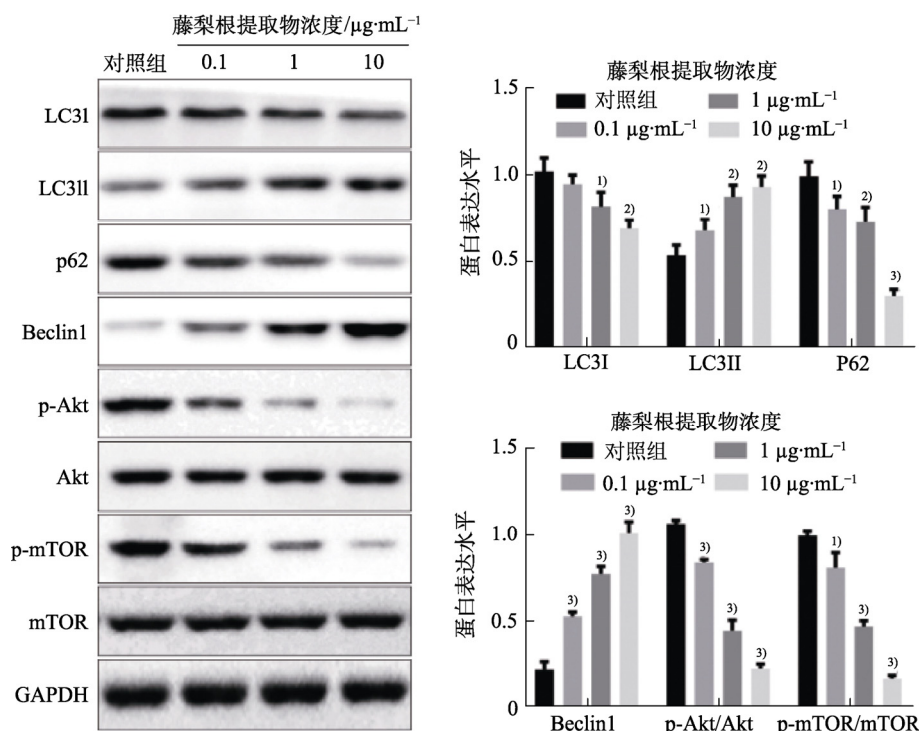


图8 藤梨根提取物对MDA-MB-231细胞Akt/mTOR介导的自噬信号通路的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

Fig. 8 Effect of the *Actinidia chinensis* root extract on Akt/mTOR mediated autophagy signaling pathway in MDA-MB-231 cells
Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$.

3 讨论

肿瘤转移是恶性肿瘤患者生存率低的主要原因,也是恶性肿瘤临床治疗的瓶颈。大量研究表明,复发性和转移性肿瘤与原发肿瘤相比具有许多可变的生物学特征,其中葡萄糖代谢的变化是其中最重要的部分。肿瘤细胞中葡萄糖代谢的特征之一是有氧糖酵解,又被称为“Warburg效应”,肿瘤细胞即使在氧含量很高的情况下也主要通过糖酵解产生能量^[25]。与原发肿瘤相比,转移瘤细胞的有氧糖酵解更为突出。如何抑制糖酵解,逆转“Warburg效应”已成为目前肿瘤治疗的研究热点。本研究首次发现藤梨根提取物通过Akt-mTOR途径诱导的自噬对乳腺癌细胞糖酵解的抑制作用。

先前的研究表明,藤梨根提取物在肿瘤的进展中发挥重要的作用。He等^[16]发现藤梨根提取物通过提高PCSK9的表达减少LDLR转录后水平,抑制低密度脂蛋白的摄取,降低细胞内总胆固醇浓度,抑制肝癌细胞的活性。Hou等^[17]研究发现,藤梨根提取物能够抑制LAMB3表达从而抑制肝癌细胞增殖、促进细胞S期周期阻滞和凋亡。此外,近期的研究表明藤梨根提取物通过下调DLX2的表达可抑制肝癌细胞增殖、侵袭、迁移、克隆

和上皮间质转化,促进细胞凋亡^[18]。然而,藤梨根提取物对乳腺癌细胞增殖和转移的抑制作用还缺乏直观、系统的验证。本研究结果表明,藤梨根提取物有效地抑制了乳腺癌细胞的细胞活性和克隆形成,通过抑制与肿瘤转移相关的重要蛋白MMP-2和MMP-9的表达,有效地抑制了乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

肿瘤细胞通过有氧糖酵解获得转移所需的能量,同时增加葡萄糖摄取以确保能量供应以弥补糖酵解产生的ATP短缺,从而在肿瘤细胞中产生大量乳酸^[26-27]。PKM2是糖酵解过程最后一个步骤的标志性限速酶,是肿瘤细胞糖酵解的一个关键调节因子,可以催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸并释放ATP,促进肿瘤生长^[28]。下调PKM2的表达,调节糖酵解的最终步骤,可以抑制肿瘤进展^[29-30]。GLUT1是人体细胞膜上的葡萄糖转运蛋白,葡萄糖进入细胞需要GLUT1的协助,在多种肿瘤进展中起着至关重要的作用,并且已经证明GLUT1的敲除可以有效抑制细胞糖酵解和增殖^[31-32]。LDHA是糖酵解途径中的关键糖酵解酶之一,其能够促进丙酮酸转化为乳酸^[33]。LDHA在多种肿瘤细胞中高表达,并且对LDHA的抑制可能

是肿瘤治疗中的潜在治疗靶标^[34]。本研究发现藤梨根提取物可有效抑制乳腺癌细胞葡萄糖的摄取水平和乳酸的产生,并下调糖酵解相关蛋白 PKM2、GLUT1 和 LDHA 的表达,从而阻断乳腺癌细胞糖酵解。由于预防转移是治疗肿瘤的关键方法之一,因此推测藤梨根提取物抑制糖酵解以降低肿瘤微环境的酸度,从而限制了肿瘤细胞的迁移。但是,相关的调节机制仍不清楚,因此在本研究中进行了进一步的探索。

Akt-mTOR 通路在大多数肿瘤细胞中被激活,参与抑制自噬和促进糖酵解^[35-36]。自噬是通过双层膜结构将衰老的蛋白和受损的细胞器分离并转运至溶酶体,从而维持自身的稳定性,为细胞提供能量循环的过程^[37]。自噬与肿瘤的转移密切相关^[37]。例如,Zhang 等^[38]研究表明,百里酞通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导自噬,抑制肾癌细胞的转移。SOCS5 通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导自噬从而抑制肝癌细胞的转移^[39]。除此之外,自噬还在调节糖酵解代谢中发挥重要作用。Qin 等^[40]报道自噬的抑制通过诱导活性氧促进胃癌细胞转移和糖酵解。Jiao 等^[41]发现自噬受损和糖酵解水平升高在肝癌中普遍存在,细胞自噬与糖酵解呈负相关。因此,通过调节细胞糖酵解和细胞迁移,Akt-mTOR 通路介导的自噬调控是一个重要的研究领域。Fang 等^[23]研究表明,藤梨根提取物通过抑制 JNK/Akt 通路抑制肝癌的增殖和转移。此外,藤梨根提取物能够通过抑制 Ang II 处理的心肌细胞 ERK1/2 和 PI3K/Akt 信号通路来实现对缺氧诱导的心肌细胞凋亡的保护作用^[24]。鉴于藤梨根提取物能够抑制 Akt 信号通路,与文献研究类似,本研究进一步发现藤梨根提取物通过灭活 Akt-mTOR 通路,诱导 MDA-MB-231 细胞发生明显的自噬,表现为 LC3I 向 LC3II 的明显转化,增加了 Beclin1 的表达,减少了 p62 的表达,从而影响细胞的糖酵解和迁移。

综上所述,本研究证明藤梨根提取物能有效抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移。进一步研究发现藤梨根提取物可能通过阻断细胞糖酵解来抑制细胞的迁移。此外,本实验证明了藤梨根提取物通过 Akt-mTOR 途径介导的自噬诱导在体外对细胞迁移和糖酵解具有抑制作用。因此,本研究加深了对乳腺癌转移机制的认识,为进一步探讨藤梨根提取物抗肿瘤作用机制提供了新的研究

思路。然而,关于藤梨根提取物对体内肿瘤生长,转移和糖酵解的作用及其机制有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG M L, DONG H J. Correlation analysis between genotyping of breast cancer and expression of serum tumor markers[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2017, 34(1): 111-115.
- [2] GHONCHEH M, POURNAMDAR Z, SALEHINIYA H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(S3): 43-46.
- [3] LIM B, HORTOBAGYI G N. Current challenges of metastatic breast cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2016, 35(4): 495-514.
- [4] CHEW H K. Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what?[J]. West J Med, 2001, 174(4): 284-287.
- [5] SPARANO J A, GRAY R J, RAVDIN P M, et al. Clinical and genomic risk to guide the use of adjuvant therapy for breast cancer[J]. N Engl J Med, 2019, 380(25): 2395-2405.
- [6] ZHANG Y, CHEN G H, ZHAO C, et al. Research progress on anti-hepatocellular carcinoma mechanism of active ingredients of traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45(14): 3395-3406.
- [7] WANG L, KANG C, YANG W P, et al. Experimental study on antitumor effects of extracts from *Actinidia arguta*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(16): 2184-2186.
- [8] CHANG J, CASE R. Cytotoxic phenolic constituents from the root of *Actinidia chinensis*[J]. Planta Med, 2005, 71(10): 955-959.
- [9] CHENG Q L, LI H L, HUANG Z Q, et al. 2 β , 3 β , 23-trihydroxy-urs-12-ene-28-olic acid(TUA) isolated from *Actinidia chinensis* Radix inhibits NCI-H460 cell proliferation by decreasing NF- κ B expression[J]. Chem Biol Interact, 2015(240): 1-11.
- [10] XU Y X, XIANG Z B, JIN Y S, et al. Two new triterpenoids from the roots of *Actinidia chinensis*[J]. Fitoterapia, 2010, 81(7): 920-924.
- [11] XU Y X, XIANG Z B, JIN Y S, et al. Constituents from the roots of *Actinidia chinensis* and their cytochrome P450 enzyme inhibitory activities[J]. Chem Biodivers, 2016, 13(11): 1454-1459.
- [12] ZHOU X F, ZHANG P, PI H F, et al. Triterpenoids from the roots of *Actinidia chinensis*[J]. Chem Biodivers, 2009, 6(8): 1202-1207.
- [13] ZHU W J, YU D H, ZHAO M, et al. Antiangiogenic triterpenes isolated from Chinese herbal medicine *Actinidia chinensis* Planch[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(2): 195-198.
- [14] FANG T T, HOU J Y, HE M Y, et al. *Actinidia chinensis* Planch root extract (acRoots) inhibits hepatocellular carcinoma progression by inhibiting EP3 expression[J]. Cell Biol Toxicol, 2016, 32(6): 499-511.
- [15] LOU L J, LU D L, HU Z R, et al. anti-tumor activity of *Actinidia chinensis* Planch against hepatocellular carcinoma

- [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2009, 27(7): 1509-1511.
- [16] HE M Y, HOU J Y, WANG L Y, et al. *Actinidia chinensis* Planch root extract inhibits cholesterol metabolism in hepatocellular carcinoma through upregulation of PCSK9[J]. Oncotarget, 2017, 8(26): 42136-42148.
- [17] HOU J Y, WANG L Y, WU D J. The root of *Actinidia chinensis* inhibits hepatocellular carcinomas cells through LAMB3[J]. Cell Biol Toxicol, 2018, 34(4): 321-332.
- [18] FANG T T, FANG Y, XU X J, et al. *Actinidia chinensis* Planch root extract attenuates proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. J Ethnopharmacol, 2019(231): 474-485.
- [19] SONG W Y, XU G H, ZHANG G J. Effect of *Actinidia chinensis* Planch polysaccharide on the growth and apoptosis, and p-p38 expression in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2014, 34(3): 329-333.
- [20] WANG L, HOU J, SHI L. Inhibitory effects of *Actinidia chinensis* Planch root extracts(acRoots) on human lung cancer cells through retinoic acid receptor beta[J]. Molecular and Cellular Therapies, 2017: 1-11. Doi: 10.13052/2052-8426-2017-022.
- [21] WANG D D, CHEN X S. Cell autophagy and its progress in breast cancer[J]. J Mod Oncol(现代肿瘤医学), 2017, 25(22): 3704-3707.
- [22] MCAULIFFE P F, MERIC-BERNSTAM F, MILLS G B, et al. Deciphering the role of PI3K/Akt/mTOR pathway in breast cancer biology and pathogenesis[J]. Clin Breast Cancer, 2010, 10(Suppl 3): S59-S65.
- [23] FANG T T, FANG Y, XU X J, et al. *Actinidia chinensis* Planch root extract attenuates proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. J Ethnopharmacol, 2019(231): 474-485.
- [24] WANG Q, XU Y F, GAO Y, et al. *Actinidia chinensis* Planch polysaccharide protects against hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(1): 193-201.
- [25] PORPORATO P E, PAYEN V L, PÉREZ-ESCUREDO J, et al. A mitochondrial switch promotes tumor metastasis[J]. Cell Rep, 2014, 8(3): 754-766.
- [26] LI L, KANG L, ZHAO W, et al. miR-30a-5p suppresses breast tumor growth and metastasis through inhibition of LDHA-mediated Warburg effect[J]. Cancer Lett, 2017(400): 89-98.
- [27] LIU X M, ZHU Z W, WANG G, et al. Resveratrol promotes cisplatin-induced cell death by inhibiting the glucose metabolism in bladder cancer[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(10): 1262-1267.
- [28] LI S M, LI Y J, BAI Y X. Research progress on anticancer effects of pyruvate kinase M2[J]. China Cancer(中国肿瘤), 2019, 28(3): 202-207.
- [29] WONG N, OJO D, YAN J, et al. PKM2 contributes to cancer metabolism[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt A): 184-191.
- [30] SUN Q. Role of pyruvate kinase M2 in tumor metabolism and development[J]. Basic Clin Med(基础医学与临床), 2012, 32(5): 462-467.
- [31] PENG Y, XING S N, TANG H Y, et al. Inhibiting the expression of glucose transporter 1 reduces the proliferation, invasion and migration of neuroblastoma cells[J]. Chin J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2018, 34(11): 994-999.
- [32] XIAO H J, WANG J, YAN W X, et al. GLUT1 regulates cell glycolysis and proliferation in prostate cancer[J]. Prostate, 2018, 78(2): 86-94.
- [33] 李影, 刘红宁, 邓晓霞, 等. 恶性肿瘤有氧糖酵解关键酶研究进展[J]. 江西中医药, 2019(50): 73-77.
- [34] XIAN Z Y, LIU J M, CHEN Q K, et al. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer[J]. Tumor Biol, 2015, 36(10): 8093-8100.
- [35] LI S R, LI Y, HU R L, et al. The mTOR inhibitor AZD8055 inhibits proliferation and glycolysis in cervical cancer cells[J]. Oncol Letters, 2013, 5(2): 717-721.
- [36] ZHAO G M, HAN X D, ZHENG S W, et al. Curcumin induces autophagy, inhibits proliferation and invasion by downregulating AKT/mTOR signaling pathway in human melanoma cells[J]. Oncol Rep, 2016, 35(2): 1065-1074.
- [37] GARCÍA-PRAT L, MARTÍNEZ-VICENTE M, PERDIGUERO E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence[J]. Nature, 2016, 529(7584): 37-42.
- [38] ZHANG Y J, FAN Y Z, HUANG S K, et al. Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Sci, 2018, 109(12): 3865-3873.
- [39] ZHANG M, LIU S H, CHUA M S, et al. SOCS5 inhibition induces autophagy to impair metastasis in hepatocellular carcinoma cells via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 612.
- [40] QIN W J, LI C, ZHENG W, et al. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(37): 39839-39854.
- [41] JIAO L, ZHANG H L, LI D D, et al. Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2)[J]. Autophagy, 2018, 14(4): 671-684.

收稿日期: 2020-06-25
(本文责编: 曹粤锋)