

2',4'-二甲氧基查尔酮抑制 c-Myc 介导的葡萄糖摄取和糖酵解抗胃癌作用研究

李昱彤¹, 李文标¹, 张玉杰¹, 潘巧岭¹, 杜婷婷¹, 吴辉¹, 黄菲¹, 费晓燕²,
吴晓俊^{1*}, 石海莲^{1*}

(1. 上海市复方中药重点实验室, 教育部中药标准化重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与品质评价重点实验室, 上海中药标准化研究中心, 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属龙华医院脾胃病一科, 上海 200032)

摘要: 2',4'-二甲氧基查尔酮 (DMC) 是卡瓦胡椒素 B 的结构修饰物, 本课题以胃癌细胞 MGC-803 和 HGC-27 为研究对象, 探讨 DMC 对胃癌细胞的体内外抗肿瘤作用及机制。采用 CCK-8 法、EdU 染色法和 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测胃癌细胞活力、增殖率和凋亡率, 发现 DMC 抑制胃癌细胞活力和增殖, 促进胃癌细胞凋亡; 构建裸鼠胃癌细胞皮下移植瘤模型观察 DMC 对胃癌移植瘤生长的影响, 发现 DMC 抑制裸鼠胃癌皮下移植瘤的生长, 动物实验获得上海中医药大学动物伦理委员会的批准, 伦理编号为 PZSHUTCM2310110002。转录组学研究 DMC 对 MGC-803 细胞 RNA 表达的影响, 发现生物功能富集于糖酵解; 采用 2-NBDG 探针标记及流式细胞术和乳酸测试盒检测胃癌细胞葡萄糖摄取能力和乳酸生成与外排能力, 发现 DMC 抑制胃癌细胞的葡萄糖摄取能力和乳酸生成与外排; 通过蛋白印迹实验检测胃癌细胞增殖、凋亡及糖酵解相关蛋白的表达, 发现 DMC 能上调胃癌细胞促凋亡蛋白 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、cleaved PARP 的表达, 下调胃癌细胞增殖标志物 Ki-67 的蛋白表达, 并抑制胃癌细胞糖酵解相关蛋白 c-Myc、LDHA、GLUT3、PDHK1 和 MCT1 的表达; 通过 Seahorse 能量代谢分析仪检测实时糖酵解速率, 发现 DMC 能下调胃癌细胞基础糖酵解速率和代偿糖酵解; 通过 c-Myc 过表达稳转株 MGC-803 细胞的翻转实验明确 DMC 通过抑制 c-Myc 介导的葡萄糖摄取和糖酵解发挥胃癌抑制作用。综上所述, DMC 可能通过调控胃癌细胞 c-Myc 及其靶基因糖酵解相关蛋白的表达, 抑制胃癌细胞 c-Myc 介导的葡萄糖摄取功能和糖酵解, 从而抑制胃癌细胞增殖, 促进胃癌细胞凋亡, 最终在体内外抑制胃癌的生长。

关键词: 2',4'-二甲氧基查尔酮; 胃癌; 增殖; 凋亡; 糖酵解

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)05-1421-11

2',4'-Dimethoxychalcone inhibits gastric cancer growth by suppressing c-Myc mediated glucose uptake ability and glycolysis in gastric cancer cells

LI Yu-tong¹, LI Wen-biao¹, ZHANG Yu-jie¹, PAN Qiao-ling¹, DU Ting-ting¹, WU Hui¹,
HUANG Fei¹, FEI Xiao-yan², WU Xiao-jun^{1*}, SHI Hai-lian^{1*}

(1. Shanghai Key Laboratory of Compound Chinese Medicines, Key Laboratory of Chinese Medicine Standardization, Ministry of Education, Key Research Laboratory of New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Research Centre for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;
2. Department I of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: 2',4'-Dimethoxychalcone (DMC) is a structural modifier of carvacrol B. In this study, gastric cancer

收稿日期: 2024-11-15; 修回日期: 2025-01-24.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82474132); 上海市自然科学基金 (23ZR1463100, 21ZR1462800); 上海市复方中药重点实验室开放课题 (21DZ2270500); 研究生创新培养专项 (Y2021088).

*通讯作者 E-mail: xiaojunwu320@126.com; shihailian2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1136

cells MGC-803 and HGC-27 were used as the subjects to investigate the anti-tumor effect and mechanism of DMC on gastric cancer (GC) cells both *in vitro* and *in vivo*. DMC inhibited cell viability and cell proliferation and promoted cell apoptosis in GC cells, detected by CCK-8 assay, EdU staining and Annexin V-FITC/PI double-staining flow cytometry. A nude mouse model of GC cell xenograft was constructed by subcutaneous injection with MGC-803 cells, for measuring the effect of DMC on the growth of GC *in vivo*, and DMC inhibited the growth of subcutaneous transplantation tumor in nude mice. The animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine under the ethical number PZSHUTCM2310110002. The effect of DMC on the RNA expression of MGC-803 cells was detected by RNA-seq assay, and it was found that the biological function of DMC was enriched in glycolysis. DMC inhibited the glucose uptake capacity and lactate production and efflux of gastric cancer cells, detected by using 2-NBDG probe with flow cytometry and lactate (LD) test kit. Western blot assay was performed to detect the protein expression of proliferation, apoptosis, and glycolysis-related proteins in gastric cancer cells, and the results demonstrated that DMC up-regulated the protein expression of cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cleaved PARP, down-regulated Ki-67 protein expression, and inhibited the protein expression of c-Myc, LDHA, GLUT3, PDHK1 and MCT1 in gastric cancer cells. The Seahorse energy metabolism analyser was used to measure the rate of glycolysis, and it was found that DMC could down-regulate the basal glycolysis rate and compensatory glycolysis in gastric cancer cells. The c-Myc overexpressing cell line MGC-803 was used in the reversal experiment to further confirm that DMC suppressed gastric cancer growth through inhibiting c-Myc mediated glucose uptake and glycolysis. In conclusion, DMC may inhibit the protein expression of c-Myc and its target glycolysis-related genes, suppressed c-Myc-mediated glucose uptake and glycolysis in gastric cancer cells, thereby inhibited the cell proliferation and promoted cell apoptosis of gastric cancer cells, and thus finally inhibited the growth of gastric cancer *in vivo* and *in vitro*.

Key words: 2',4'-dimethoxychalcone; gastric cancer; proliferation; apoptosis; glycolysis

根据全球最新癌症统计报告显示,在不同癌种的恶性肿瘤中,胃癌在男性中发病率和致死率均排第四,在女性中发病率排第七,致死率排第六^[1],虽然已有靶向治疗及免疫治疗等新型治疗手段,化疗药物目前仍是胃癌治疗的基石,贯穿中晚期胃癌治疗的始终。现有化疗药物不可忽视的不良反应和耐药,导致新型低毒高效的抗胃癌药物研发仍然任重道远。代谢重编程是肿瘤细胞代谢的一大重要特征^[2],靶向肿瘤代谢的药物研发是全球抗肿瘤药物研发热点。肿瘤细胞在有氧和无氧条件下均主要通过糖酵解而非氧化磷酸化获能,称为“Warburg 效应”^[3]。中药因其天然且大多毒副作用小等优点,深受研究者的青睐。本课题组研究团队以往研究发现,多个与蜡菊亭化学结构类似的查尔酮化合物均能抑制肿瘤细胞糖酵解,从而发挥抗肿瘤作用^[4-6]。卡瓦胡椒的卡瓦胡椒素 B (FKB) 具有抗癌、抗炎和抗微生物活性等^[7,8],研究也证实其具有抗胃癌作用^[9],但具有潜在的肝毒性风险^[10,11]。2',4'-二甲氧基查尔酮 (DMC) 是 FKB 的结构修饰产物,与蜡菊亭化学结构类似,能够显著抑制非小细胞肺癌的生长^[12,13],但 DMC 是否具有胃癌抑制作用,目前尚不清楚。基于此,本研究旨在探讨 DMC 体内外胃癌抑制作用,并进一步基于葡萄糖摄取和糖酵解阐明其胃癌抑制作用及分子机制。

材料与方法

药物 蜡菊亭由中国科学院上海药物研究所沈敬山教授提供,纯度 > 95%,化学结构式如图 1A; DMC 由上海药明康德新药开发有限公司合成,纯度为 100%,化学结构式如图 1B; FKB (批号: DH0120-0005) 从成都乐美天医药科技有限公司购买; 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU, 批号: M0409A)、顺铂 (cisplatin, DDP, 批号: 01018B) 从大连美仑生物技术有限公司购买。

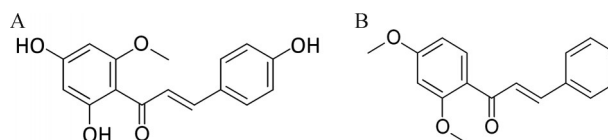


Figure 1 Chemical structure of helichrysetin (A) and DMC (B). DMC: 2',4'-Dimethoxychalcone

细胞 人胃癌细胞 HGC-27 购自亿泽丰生物科技 (上海) 有限公司; 人胃癌细胞 MGC-803、人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1、人正常肝细胞 L-02 购自中国科学院细胞库; c-Myc 原癌基因 (cellular myelocytomatosis, c-Myc) 过表达稳转株 MGC-803 细胞由本课题组构建,所用 c-Myc 过表达慢病毒载体 (LV-c-Myc, 2×10^8 TU·mL⁻¹) 和空 GV358 载体 (LV-CON, 1×10^9 TU·mL⁻¹) 购自吉凯

基因医学科技(上海)有限公司。

动物 24只4周龄,体重为14~16 g的BALB/c, Nu/Nu雄性裸鼠,购于上海斯莱克实验动物有限公司,动物生产合格证号:SCXK(沪)2014-0008。裸鼠分笼饲养于上海中医药大学实验动物中心,饲养环境为昼夜12 h,室温(25±1)℃,湿度(60±10)%,自由饮水摄食。裸鼠分笼适应性饲养1周后开展实验。动物实验获得上海中医药大学动物伦理委员会的批准,伦理编号为PZSHUTCM2310110002。

试剂 兔抗c-Myc抗体(批号:18583S)、兔抗丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDHK) 1抗体(批号:3820T)、兔抗乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDHA)抗体(批号:c28H7)、兔抗β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号:4970)、兔抗切割后的半胱天冬酶(cleaved cysteine-aspartic acid protease, cleaved caspase) 9抗体(批号:7237S)、兔抗切割后的cleaved caspase 3抗体(批号:2772S)、兔抗切割后的聚(ADP-核糖)聚合酶[cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, cleaved PARP]/PARP抗体(批号:7237S)、兔抗B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)抗体(批号:4223S)、兔抗Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)抗体(批号:5023S)均购自美国CST公司;兔抗葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT) 3抗体(批号:ab191071)、兔抗Ki-67抗体(批号:ab16667)均购自英国Abcam公司;兔抗GLUT4抗体(批号:A7637)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔抗单羧酸转运体(monocarboxylate transporter, MCT) 1抗体(批号:GTX-54699)购自美国Genn Tex公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)凋亡检测试剂盒(批号:AD10)购自上海东仁化学科技公司;2-NBDG [2-(N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-氨基)-2-脱氧葡萄糖)]购自美国Thermo Scientific公司(批号:N13195);乳酸(lactate, LD)测试盒(批号:A019-2-1)购自南京建成生物工程研究所;二辛可酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白测定A液(批号:20201ES)购自上海翌圣生物科技有限公司;Seahorse XF糖酵解速率实时分析测定试剂盒(批号:103344-100)购自安捷伦科技有限公司。

仪器 倒置显微镜(CKX41)、扫片机(BX61VS)均购自日本Olympus公司;显影仪(Tanon-5200)购自上海天能科技有限公司;匀浆机(JXFSTPRP-24L)购自上海净信实业发展有限公司;垂直电泳仪(O43BR47575)购自美国Bio-Rad公司;多功能读数仪(VARIOSKAN FLASH)购自美国Thermo Scientific公

司;超声破碎仪(VCX150)购自美国Sonics公司;高速离心机(5415R)购自德国Eppendorf公司;guava easyCyte HT微毛细管细胞分析仪购自美国Millipore公司。

细胞活力检测 用不同浓度DMC或FKB处理MGC-803细胞、HGC-27细胞、L-02和GES-1细胞24 h后,以10% CCK-8溶液处理45 min后,于多功能读数仪检测吸光值并计算细胞存活率。

细胞增殖检测 分别以每孔MGC-803细胞 6×10^3 个、HGC-27细胞 7×10^3 个接种于96孔板内,置于细胞培养箱24 h后弃去培养基,使用10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMC干预24 h,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)培养基处理2 h(每孔100 μL),再以4%多聚甲醛室温固定30 min(每孔50 μL),2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘氨酸溶液孵育5 min(每孔50 μL),0.5% Triton X-100孵育10 min,加入1×Apollo染色液避光孵育30 min(每孔100 μL),最后用1% Hoechst 33342反应液孵育30 min(每孔100 μL),于荧光倒置显微镜下成像分析。

蛋白表达检测 将MGC-803细胞、HGC-27细胞在含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA强裂解液中裂解,BCA蛋白定量后加入上样缓冲液制成20 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的总蛋白样本,在95℃金属浴中煮15 min,每孔上样40 μg ,以十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白并转印至聚偏二氟乙烯膜上,然后将膜置于1×PBST配制的5%脱脂牛奶中室温封闭1 h,加一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,接着用1×PBST洗膜后室温孵育二抗(1:5 000)1 h,再次用1×PBST洗膜后,在避光孵育盒中配制ECL显色试剂,将膜浸泡在ECL显色液中3 min,于Tanon-5200显影仪扫描并拍照,用Image J软件统计定量分析各蛋白条带的灰度值。

细胞凋亡检测 以每孔MGC-803细胞 2×10^5 个、HGC-27细胞 3×10^5 个接种于6孔板内,置于细胞培养箱24 h后弃去培养基,依据东仁化学科技Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒说明书将细胞染色,使用Guava easyCyte HT微毛细管细胞分析仪进行测定,guava soft 2.5软件分析处理数据。

裸鼠人胃癌细胞皮下移植瘤构建 对裸鼠右上肢后侧皮下注射MGC-803细胞悬液,每只鼠 5×10^6 个细胞,当肿瘤体积达到50 mm^3 时,将小鼠随机分组为模型组、15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DMC组、30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DMC组和25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5-FU组,每组6只并开始给药,药物溶剂为40% 1,2丙二醇、1%聚乙二醇、5%乙醇、54% PBS^[4]。阳性对照组腹腔注射5-FU(25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每隔两天腹腔注射1次),DMC给药组每天腹腔注射15和30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DMC,模型组每天注射溶剂。给药28天后处死裸鼠,快速分离肿瘤组织和各脏器组织并称重。

转录组学检测 于 T25 细胞培养瓶中接种 5×10^5 个 MGC-803 细胞, 待细胞生长密度至 70%~80% 时弃去旧培养基, 并给予 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 分别干预 MGC-803 细胞 12、15 h, 待给药结束后, 用 1 mL 已预冷 PBS 清洗细胞两次, 以 Trizol 试剂裂解细胞, 并及时送至上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组学测序, 使用美吉生物云平台对测序结果进行分析并作图。

葡萄糖摄取能力测定 以每孔 MGC-803 细胞 2×10^5 个、HGC-27 细胞 3×10^5 个接种于 6 孔板内, 置于细胞培养箱 24 h。利用 2-NBDG 产生的荧光与葡萄糖摄取成正比的特点, 使用无葡萄糖、无丙酮酸钠的 RPMI 1640 培养基稀释 2-NBDG, 以每孔 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-NBDG 孵育 1 h。将细胞使用不含有 EDTA 的胰酶消化处理, 分别以 200 μL PBS 重悬细胞并转移至 96 孔板中, 使用 Guava easyCyte HT 微毛细管细胞分析仪检测 2-NBDG 荧光信号强度, 定量测量胃癌细胞对葡萄糖的摄取能力, 使用 guava soft 2.5 软件分析处理数据。

乳酸生成与外排检测 依据乳酸测试盒说明书检测胃癌细胞内外乳酸含量, 依据 Protein Quantification Kit BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书检测细胞内蛋白浓度, 并根据所测蛋白浓度对细胞内乳酸含量进行校准。

糖酵解速率测定 将 5×10^3 个 MGC-803 细胞和 HGC-27 细胞以每孔 80 μL 的体积接种于 XF 96 孔板中, 12 h 后给药处理。提前预热 Seahorse XF 96 分析仪, 并以每孔 200 μL 安捷伦 Seahorse XF 基础培养基水化探针检测板, 封口后于 37°C 、无 CO_2 的培养箱中过夜。细胞给药结束后, 使用 Seahorse XF 基础培养基配置 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸的检测液, 以每孔 180 μL 此检测液置换细胞板中的含药培养基, 放入 37°C 、无 CO_2 培养箱中 1 h。按照安捷伦 Seahorse XF 糖酵解速率实时分析测定试剂盒说明书配制反应化合物鱼藤酮/抗霉素 A (ROT/AA) 和 2-DG, 向探针板每孔 A 端分别各加入 20 μL $10 \times$ ROT/AA, B 端分别加入 22 μL $10 \times$ 2-DG, 上机校准后选择程序 Seahorse XF Glycolytic Rate Assay 对细胞糖酵解速率进行实时分析测定。

统计学方法 用 GraphPad Prism 10.0 统计软件, 两组比较采用 *t* 检验分析数据, 3 组及以上比较采用单因素方差分析方法分析数据, 数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结果

1 DMC 体外抑制胃癌细胞的增殖

分别以不同剂量 DMC (10 、 20 和 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 干

预低分化人胃癌细胞 MGC-803 和未分化人胃癌细胞 HGC-27 细胞 24 h 后, 通过 CCK-8 法检测胃癌细胞活力发现 DMC 均能剂量依赖性地显著下调两株胃癌细胞的细胞活力 (图 2A、B), 其 IC_{50} 分别为 22.31 和 $24.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 作用 24 h 起能够显著抑制胃癌细胞的细胞活力 (图 2C、D)。

为进一步明确 DMC 对胃癌细胞增殖的作用, 本课题首先使用不同剂量 DMC (10 、 20 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用于胃癌细胞 24 h 后进行 EdU 染色, 发现 DMC 能够显著降低两株胃癌细胞 EdU 绿色荧光标记的阳性细胞率, 同步收集细胞并提取总蛋白检测增殖相关蛋白 Ki-67 的表达, 发现 DMC 能下调胃癌细胞 Ki-67 的蛋白表达, 提示 DMC 能够抑制胃癌细胞的增殖 (图 2E~I)。

接着通过 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测发现 DMC (10 、 20 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均能显著促进胃癌细胞的凋亡率, Western blot 检测发现 DMC 下调胃癌细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡蛋白 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、cleaved PARP 的表达, 提示 DMC 能促进胃癌细胞的凋亡 (图 2J、K)。

2 DMC 药效优于 FKB 且毒性更低

在同样条件下使用 FKB 处理 MGC-803 和 HGC-27 细胞, 得到 IC_{50} 值分别为 30.05 和 $48.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3A), 而 DMC 处理胃癌细胞的 IC_{50} 值低于 FKB, 提示 DMC 抑制胃癌作用优于 FKB。再分别以 DMC 和 FKB 干预人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 细胞 24 h, IC_{50} 分别为 42.74 和 $33.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3B), 而干预人正常肝细胞 L-02 细胞 24 h, IC_{50} 值分别为 34.00 和 $22.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 3C), 即 DMC 处理正常细胞的 IC_{50} 高于 FKB, 提示 DMC 毒性低于 FKB。以临床常用的抗代谢类化疗药 5-FU 和含铂广谱抗癌药 DDP 作为阳性对照进一步对比 DMC 的体外药效及毒性, 使用同一剂量 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC、FKB、5-FU 和 DDP 分别处理 MGC-803、GES-1 和 L-02 细胞 24 h, 发现 DMC 药效最高而毒性较低 (图 3D)。

3 DMC 抑制胃癌移植瘤裸鼠皮下瘤的生长

构建 MGC-803 移植瘤裸鼠模型, 与模型对照组比较, $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DMC 和阳性药 $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 5-FU 均能够显著抑制裸鼠胃癌细胞皮下移植瘤重量的增长 (图 4C、D), 5-FU 抑制裸鼠胃癌细胞皮下移植瘤体积的增长的同时, 存在不同程度的腹泻和体重减轻的不良反应 (图 4A、B), 且小鼠脾脏指数下降 (图 4E), 而 DMC 给药组裸鼠状态良好, 无腹泻与体重减轻症状, 肝脏指数亦无异常, 表明肝毒性低。

4 DMC 抑制胃癌细胞糖酵解

以 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 分别处理 MGC-803 细胞 12

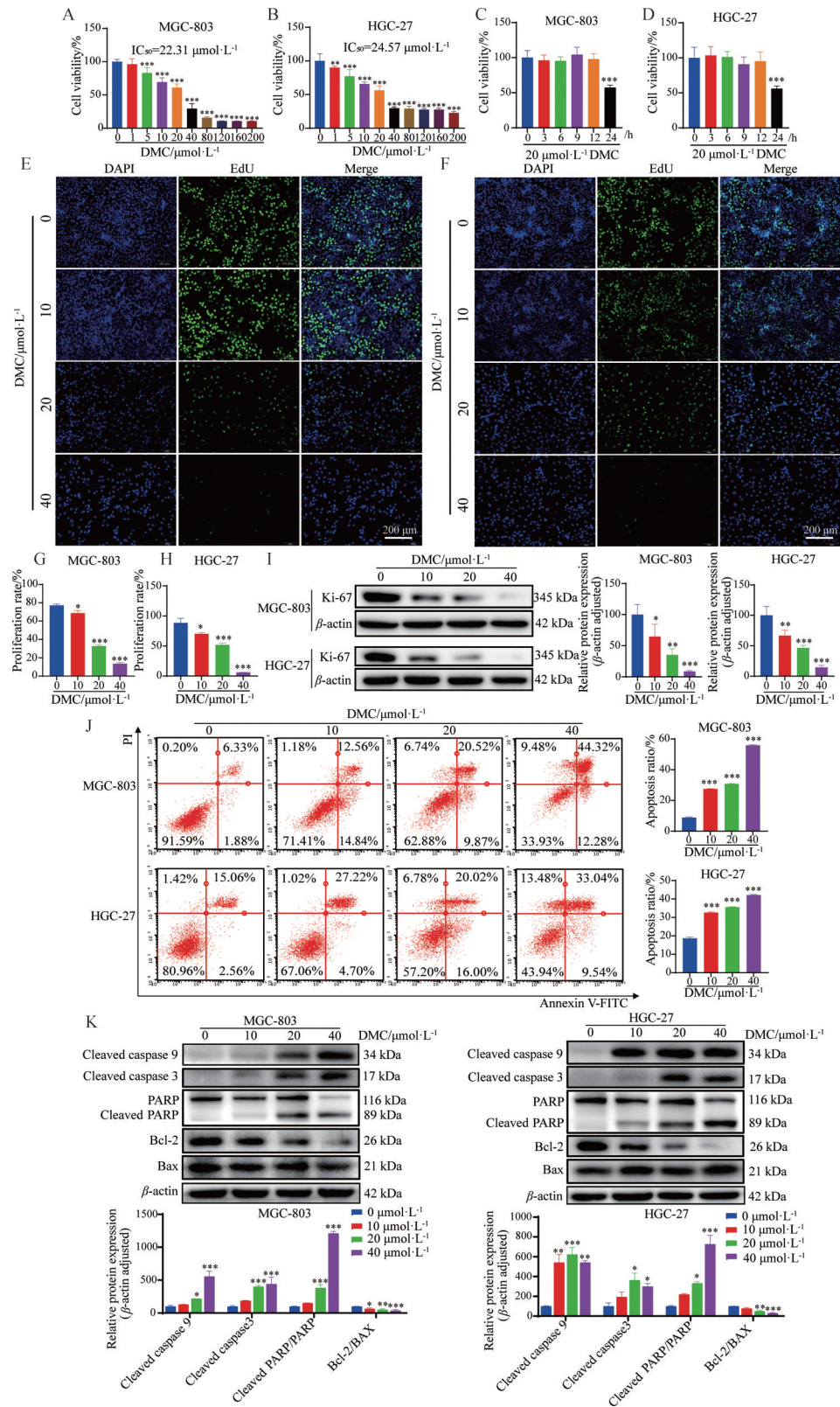


Figure 2 DMC inhibited cell proliferation and enhanced cell apoptosis of gastric cancer cells *in vitro*. A: DMC inhibited the cell viability of MGC-803 cells; B: DMC inhibited the cell viability of HGC-27 cells; C: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC significantly inhibited the cell viability of MGC-803 cells from 24 h of intervention; D: $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC significantly inhibited the cell viability of HGC-27 cells from 24 h of intervention; E, G: DMC inhibited the cell proliferation of MGC-803 cells; F, H: DMC inhibited the cell proliferation of HGC-27 cells; I: DMC inhibited the protein expression of Ki-67 in gastric cells; J: DMC enhanced cell apoptosis in gastric cancer cells; K: DMC enhanced the protein expression of apoptosis-related proteins in gastric cells. $n \geq 3$. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control. Scale bar $200\ \mu\text{m}$

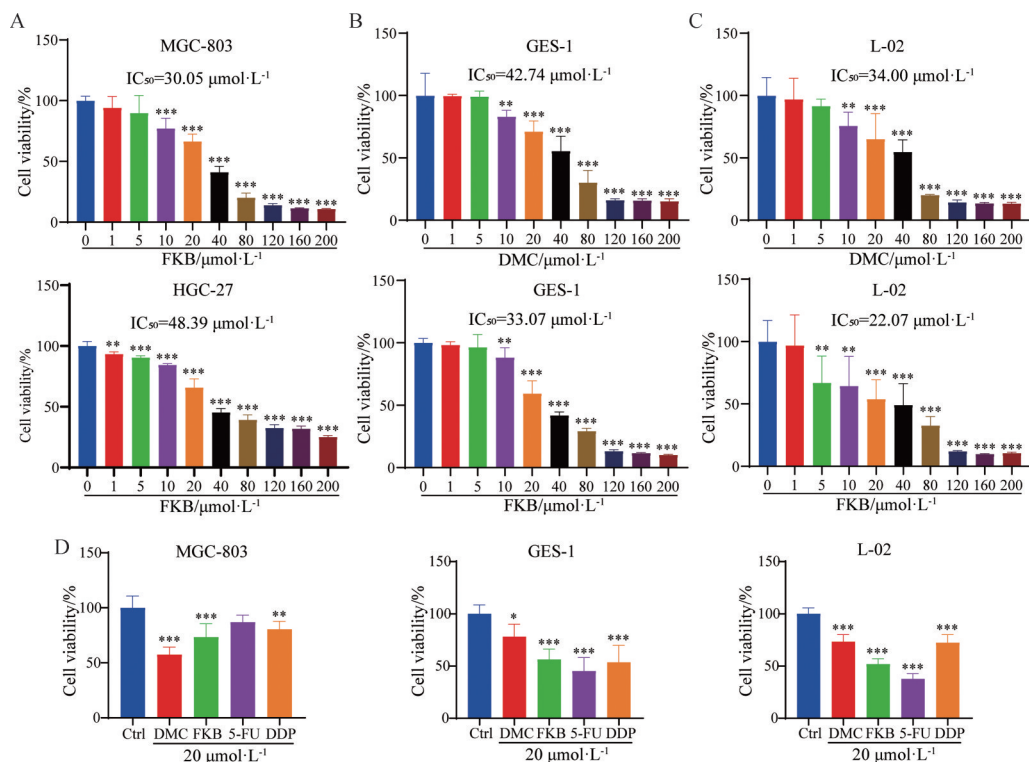


Figure 3 DMC had lower toxicity than FKB on normal cells. A: FKB inhibited cell viability of MGC-803 and HGC-27 cells; B: The effect of DMC and FKB on the cell viability of GES-1 cells; C: The effect of DMC and FKB on the cell viability of L-02 cells; D: The effect of DMC, FKB, 5-FU and DDP at the same concentration on the cell viability of MGC-803, GES-1 and L-02 cells, respectively. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl. FKB: Flavokawain B; 5-FU: 5-Fluorouracil; DDP: Cisplatin

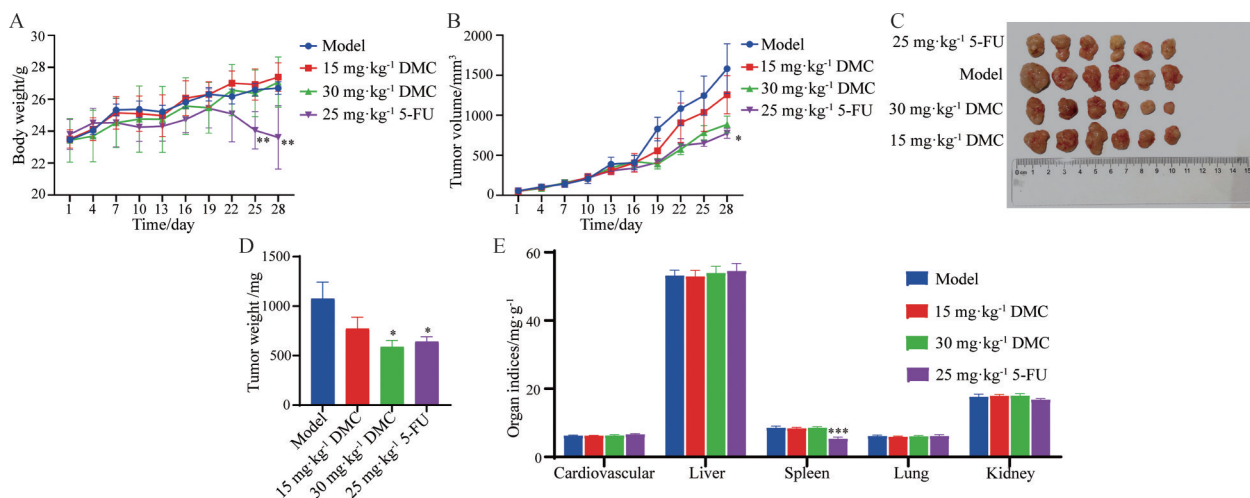


Figure 4 DMC inhibited tumor growth in MGC-803 cells xenografted nude mice. A: Body weight change curve of nude mice; B: Tumor volume growth curve in nude mice; C: Tumor pictures; D: Tumor weight; E: Organ indices. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model

和 15 h 后进行转录组学检测, 得到 2 844 个差异基因, 其中代谢相关基因的有 226 个 (图 5A), 位居第二, 代谢相关的差异基因中糖代谢相关差异基因排名第二 (图 5B), 本研究对所有糖代谢相关差异基因进行 KEGG 富集分析, 发现糖酵解排名第三 (图 5C)。

葡萄糖的摄取是糖代谢发生的第一步, 通过流式细胞术检测 20 μmol·L⁻¹ DMC 处理不同时间 (3、6、9、

12、24 h) 对胃癌细胞葡萄糖摄取能力的影响, 发现处理 12 h 起能够降低 2-NBDG 探针标记的 MGC-803 和 HGC-27 细胞葡萄糖比例 (图 5D)。肿瘤细胞摄取葡萄糖后产生大量乳酸来酸化肿瘤微环境, 乳酸含量的改变从侧面反映肿瘤细胞糖酵解进程的改变。本研究发现, DMC 干预 MGC-803 细胞 12 h 和 HGC-27 细胞 9 h 起均能显著下调细胞乳酸生成和外排 (图 5E)。即

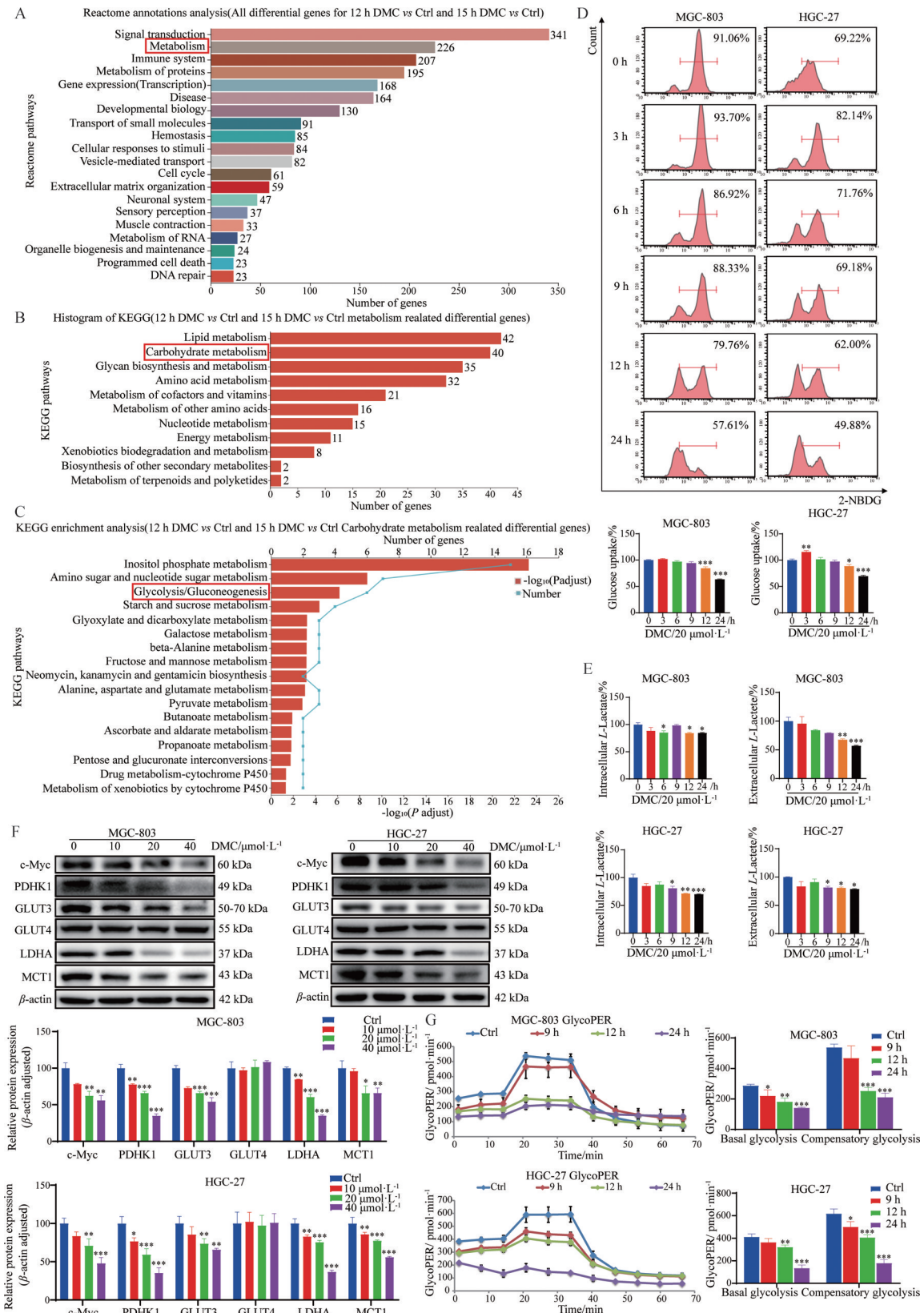


Figure 5 DMC significantly suppressed the glycolysis in gastric cancer cells. A: Reactome functional annotation analysis histogram; B: KEGG analysis for functional annotation analysis of differential expressed genes; C: KEGG enrichment analysis of differential expressed genes; D: DMC inhibited glucose uptake of gastric cancer cells; E: DMC inhibited lactate production and efflux in gastric cancer cells; F: DMC modulated the protein expression of glycolysis related proteins in gastric cells; G: Glycolytic rates of gastric cancer cells after DMC treatment for 0, 9, 12, and 24 h, respectively. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl

20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 在尚未抑制胃癌细胞活力时就能显著抑制胃癌细胞葡萄糖摄取、乳酸生成和外排。

进一步检测 DMC 对胃癌细胞糖酵解相关蛋白表达的影响,发现 DMC 能显著下调 MGC-803 细胞和 HGC-27 细胞 c-Myc 的蛋白表达,对 GLUT4 的蛋白表达无明显影响,但其能抑制 LDHA、GLUT3、PDHK1 和 MCT1 的蛋白表达(图 5F)。进一步通过 Seahorse XF 糖酵解速率测定试剂盒实时分析胃癌细胞糖酵解速率,发现 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 处理 9 h 起能够显著抑制 MGC-803 细胞的基础糖酵解和 HGC-27 细胞的代偿糖酵解,12 h 起能够抑制 HGC-27 细胞的基础糖酵解和 MGC-803 细胞的代偿糖酵解,即 DMC 在尚未抑制胃癌细胞活力时就能显著抑制胃癌细胞糖酵解水平(图 5G)。

5 DMC 通过抑制 c-Myc 介导的葡萄糖摄取和糖酵解抑制胃癌细胞活力

c-Myc 是一种原癌基因,在癌细胞中被过度激活并通过调控与能量代谢相关的基因来调节能量代谢^[5]。课题组前期研究发现,与 DMC 具有相似结构的蜡菊亭能够通过靶向癌细胞中 c-Myc 介导的能量代谢重编程来抑制胃癌生长,本研究发现 DMC 同样能够抑制 c-Myc 的蛋白表达。通过构建 c-Myc 过表达稳转株 MGC-803 细胞进行回复验证实验,发现过表达 c-Myc 抵消了 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 处理 24 h 对 MGC-803 细胞活力的抑制作用(图 6A),拮抗了对增殖相关蛋白 Ki-67 蛋白和抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的下调作用,以及对促凋亡相关蛋白 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、cleaved PARP 的上调作用(图 6B、C),回调了糖酵解相关蛋白 LDHA、PDHK1 和 MCT1 的表达,拮抗了 DMC 对葡萄糖转运蛋白 GLUT3 表达的下调作用(图 6D),也恢复了 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMC 处理 12 h 对于 MGC-803 细胞糖酵解速率的抑制作用(图 6E),提示 DMC 抑制胃癌细胞活力作用是通过其对 c-Myc 介导的葡萄糖摄取和糖酵解途径的调控。

讨论

胃癌是临床最常见消化道肿瘤之一,目前胃癌治疗方法仍以外科手术、放疗为主^[14],对胃癌患者常用的化疗药物主要有氟尿嘧啶类、铂类、紫杉醇类等^[15],大多具有骨髓抑制、消化道反应等毒副作用^[16],低毒有效小分子抗胃癌药物亟待研发。

源自卡瓦胡椒的 FKB 显示出广谱的生物活性,包括抗癌、抗炎和抗微生物活性^[7-9],但不可忽视其有潜在的肝毒性风险^[10,11],其结构修饰产物 DMC 能够抑制非小细胞肺癌的生长^[12,13],但其是否抑制胃癌生长目

前尚不清楚。本研究通过体外细胞研究发现,DMC 能够显著抑制人胃癌细胞 MGC-803 和 HGC-27 细胞的细胞活力,且效果优于 FKB,在正常胃黏膜上皮细胞和正常肝细胞上的细胞毒性也均低于 FKB。体内实验也表明,DMC 能够抑制裸鼠胃癌细胞皮下移植瘤重量的增长,且不同于阳性对照药 5-FU 组中小鼠存在腹泻、体重减轻、肝脏指数与脾脏指数下降的不良反应,DMC 给药组小鼠状态良好,无腹泻与体重减轻症状,肝脏指数亦无异常。

肿瘤的生长和进展由肿瘤细胞的增殖和凋亡之间的不平衡驱动,增殖过度和凋亡不足促进肿瘤的生长和扩散^[17]。细胞增殖是指细胞通过分裂增加数量的过程。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,可以用于评估细胞增殖的水平^[18],而 Ki-67 蛋白是肿瘤增殖的标志物^[19]。本研究发现,DMC 不仅可以降低胃癌细胞 EdU 绿色荧光标记的增殖细胞率,还能够抑制胃癌细胞增殖相关蛋白 Ki-67 的表达,即 DMC 能够抑制胃癌细胞增殖。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,抗凋亡蛋白 Bcl-2 能够抑制促凋亡蛋白 Bax 的活性,阻止线粒体外膜通透性增加,从而抑制细胞凋亡^[20]。当细胞受到凋亡刺激时, Bax 被激活并转移到线粒体外膜,形成孔道,导致线粒体外膜通透性增加,释放细胞色素 c^[21];细胞色素 c 在形成凋亡小体后激活 caspase-9 (活化形式为 cleaved caspase-9), cleaved caspase-9 激活下游的 caspase-3 (活化形式为 cleaved caspase-3)^[22],而 cleaved caspase-3 又能够进一步激活 PARP (活化形式为 cleaved PARP),从而诱导细胞发生凋亡^[23]。本研究发现,DMC 可以显著促进胃癌细胞的凋亡,下调胃癌细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,上调促凋亡蛋白 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3、cleaved PARP 的表达,提示 DMC 可能通过线粒体途径介导促进胃癌细胞凋亡。

本课题组以往的研究发现,蜡菊亭及其结构类似物具有抑制肿瘤糖酵解的作用^[4-6],因此猜测 DMC 可能也通过调控胃癌细胞的糖酵解,发挥胃癌抑制作用,而本研究通过转录组学研究也证明了代谢在 DMC 抑制胃癌作用中可能有着关键作用,DMC 调控胃癌细胞的代谢相关差异表达基因富集到糖酵解功能。肿瘤细胞的代谢依赖性与正常细胞有很大不同,肿瘤细胞能够通过改变代谢途径(如 Warburg 效应),获得更多的能量和合成代谢前体^[24],支持肿瘤细胞的疯狂增殖^[25]。无论在有氧或无氧条件下,肿瘤细胞都更倾向于通过糖酵解获能^[26]。胃癌细胞对葡萄糖的需求远远大于正常细胞,通过 GLUT 如 GLUT3 和 GLUT4 摄取胞外的葡萄糖^[4],再通过糖酵解途径于细胞质中将葡萄糖分

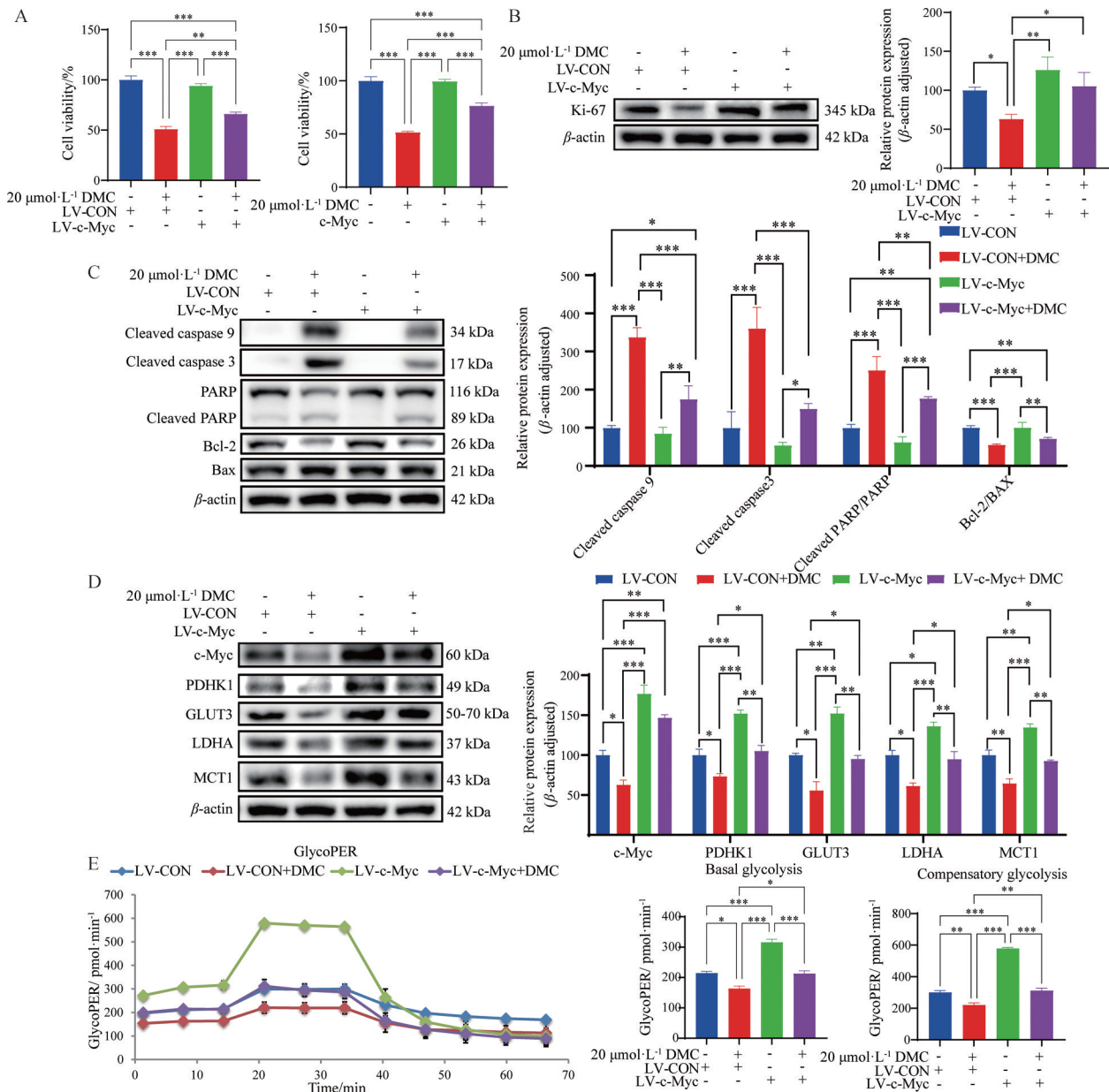


Figure 6 DMC suppresses gastric cancer cell viability by inhibiting c-Myc-mediated glucose uptake and glycolysis. A: Overexpression of c-Myc counteracted the inhibitory effect of DMC on the cell viability of MGC-803 cells; B: Overexpression of c-Myc antagonized the effect of DMC on the protein expression of Ki-67 in MGC-803 cells; C: Overexpression of c-Myc antagonized the effect of DMC on the protein expression of apoptosis-related proteins in MGC-803 cells; D: Overexpression of c-Myc antagonized the effect of DMC on the protein expression of glycolysis-related proteins in MGC-803 cells; E: Overexpression of c-Myc counteracted the effect of DMC on the glycolytic rates of MGC-803 cells. $n \geq 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

解为两分子丙酮酸,生成少量ATP和NADH^[27],然后丙酮酸被LDHA还原为乳酸^[28],同时再生NAD⁺,维持糖酵解的持续进行。PDHK1的激活促使丙酮酸更多地被转化为乳酸,抑制丙酮酸进入线粒体进行氧化磷酸化,从而促进糖酵解^[29]。MCT1由494个氨基酸构成,贯通12次膜,并有两个末端,即N末端和C末端,C末端的氨基酸排列更具特异性,没有ATP结合部,因此其对于乳酸的转运依赖于乳酸浓度梯度而非能量。胃癌

细胞糖酵解产生的乳酸通过MCT1和MCT4排出细胞,酸化肿瘤微环境并防止细胞内酸中毒^[30]。c-Myc是目前已知的调控胃癌细胞糖酵解的关键转录因子^[6,31],通过直接结合其靶基因如PDHK1、LDHA、GLUT3、GLUT4、MCT1、MCT4的启动因子,从而调控其糖酵解相关靶基因的表达,调控胃癌细胞的糖酵解^[32,33]。本研究发现,DMC能够显著下调胃癌细胞葡萄糖摄取能力和乳酸生成、外排,下调糖酵解相关蛋白

c-Myc、GLUT3、LDHA、PDHK1、MCT1 的表达, 抑制葡萄糖摄取和糖酵解速率, 通过翻转实验也进一步证明DMC抑制胃癌细胞增殖, 促进细胞凋亡作用是通过其对c-Myc介导的葡萄糖摄取和糖酵解途径的调控, 提示DMC可能通过抑制c-Myc介导的葡萄糖摄取和糖酵解, 从而发挥抑制胃癌生长作用。

综上所述, 本研究首先通过体外实验明确了DMC抑制胃癌细胞活力与增殖并促进凋亡, 通过胃癌细胞皮下移植瘤裸鼠模型明确了DMC体内的胃癌抑制作用; 进一步从糖酵解切入研究其胃癌抑制作用分子机制, 发现DMC可能通过抑制胃癌细胞c-Myc蛋白的表达, 抑制其靶基因如GLUT3、LDHA、PDHK1、MCT1的蛋白表达, 下调c-Myc介导的葡萄糖摄取能力和糖酵解, 从而抑制胃癌细胞增殖, 促进胃癌细胞凋亡, 最终发挥抗胃癌作用。本研究提示, DMC在临床治疗胃癌的潜在作用, 且DMC的毒副作用可能小于临床常用化疗药5-FU。

作者贡献: 李昱彤负责文献查阅, 具体实验设计与实施和数据分析, 论文初稿和论文修改稿的撰写; 李文标参与动物实验及预实验; 张玉杰参与动物实验及部分蛋白免疫印迹实验; 潘巧岭参与预实验及动物实验取材; 杜婷婷参与动物实验取材和部分实验; 吴辉负责实验技术指导; 黄菲和费晓燕参与理论指导和数据分析指导; 吴晓俊和石海莲负责科学假说及整体研究方案的设计指导, 论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74: 229-263.
- [2] Wei Y, Jiang XS, Xia SL, et al. Glucose metabolism reprogramming and its role of targeted therapeutic agents in inflammation-related diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 511-519.
- [3] Chen H, Li Y, Li H, et al. NBS1 lactylation is required for efficient DNA repair and chemotherapy resistance [J]. Nature, 2024, 631: 663-669.
- [4] Yu MY, Pan QL, Li WB, et al. Isoliquiritigenin inhibits gastric cancer growth through suppressing GLUT4 mediated glucose uptake and inducing PDHK1/PGC-1 α mediated energy metabolic collapse [J]. Phytomedicine, 2023, 121: 155045-155056.
- [5] Wang P, Jin JM, Liang XH, et al. Helichrysetin inhibits gastric cancer growth by targeting c-Myc/PDHK1 axis-mediated energy metabolism reprogramming [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43: 1581-1593.
- [6] Jin JM, Qiu SP, Wang P, et al. Cardamonin inhibits breast cancer growth by repressing HIF-1 α -dependent metabolic reprogramming [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38: 377-393.
- [7] Warmka JK, Solberg EL, Zeliadt NA, et al. Inhibition of mitogen activated protein kinases increases the sensitivity of A549 lung cancer cells to the cytotoxicity induced by a kava chalcone analog [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424: 488-492.
- [8] Batovska DI, Todorova IT. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones [J]. Curr Clin Pharmacol, 2010, 5: 1-29.
- [9] Chang CT, Hseu YC, Thiyagarajan V, et al. Chalcone flavokawain B induces autophagic-cell death *via* reactive oxygen species-mediated signaling pathways in human gastric carcinoma and suppresses tumor growth in nude mice [J]. Arch Toxicol, 2017, 91: 3341-3364.
- [10] Teschke R. Kava hepatotoxicity-a clinical review [J]. Ann Hepatol, 2010, 9: 251-265.
- [11] Zhou P, Gross S, Liu JH, et al. Flavokawain B, the hepatotoxic constituent from kava root, induces GSH-sensitive oxidative stress through modulation of IKK/NF-kappaB and MAPK signaling pathways [J]. FASEB J, 2010, 24: 4722-4732.
- [12] Seo YH. Discovery of 2', 4'-dimethoxychalcone as a Hsp90 inhibitor and its effect on iressa-resistant non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Arch Pharm Res, 2015, 38: 1783-1788.
- [13] Ouyang Y, Yang H, Zhang P, et al. Synthesis of 2, 4-diaminopyrimidine core-based derivatives and biological evaluation of their anti-tubercular activities [J]. Molecules, 2017, 22: 1592-1619.
- [14] Li CH, Zhang M, Lin J, et al. Computer-aided drug design analysis of the *in vitro* activity of Dunhuang medical formula Dazhuanshuantang against gastric cancer and its dispensing pattern [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2087-2100.
- [15] Liu B, Jin J, Zhang Z, et al. Shikonin exerts antitumor activity by causing mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma through PKM2-AMPK-PGC1 α signaling pathway [J]. Biochem Cell Biol, 2019, 97: 397-405.
- [16] Wang H, Fang YF, Zhang XW. Research progress of new antitumor drugs targeting Hedgehog signalling pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 848-858.
- [17] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144: 646-674.
- [18] Yang R, Gao W, Wang Z, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction *via* Nrf2/HO-1/GPX4 axis [J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155135.
- [19] Menon SS, Guruvayoorappan C, Sakthivel KM, et al. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker [J]. Clin Chim Acta, 2019, 491: 39-45.
- [20] Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285: 416-431.

- [21] Wang YJ, Deng W, Zhang PF. Progress in the study of cytochrome C and apoptosis [J]. *Prog Vet Med (动物医学进展)*, 2012, 33: 4.
- [22] Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 1577-1590.
- [23] Yu F, Luo Z, Li L, et al. Amphotericin chloride induces apoptosis in small cell lung cancer cells H1688 and H446 *via* PI3K/Akt/Bcl-2/caspase-3/PARP pathway [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2022, 38: 1023-1031.
- [24] Li YJ, Huang SN, Wang ZA, et al. Progress of nanomedicine delivery system based on aerobic glycolysis regulation for tumour therapy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2024, 59: 2509-2518.
- [25] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324: 1029-1033.
- [26] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 325-337.
- [27] Yang H, Yang S, He J, et al. Glucose transporter 3 (GLUT3) promotes lactylation modifications by regulating lactate dehydrogenase A (LDHA) in gastric cancer [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23: 303.
- [28] Hu J, Huang L, Ding Q, et al. Long noncoding RNA HAGLR sponges miR-338-3p to promote 5-Fu resistance in gastric cancer through targeting the LDHA-glycolysis pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46: 173-184.
- [29] Liu J, Bai X, Zhang M, et al. Energy metabolism: a new target for gastric cancer treatment [J]. *Transl Oncol*, 2024, 26: 338-351.
- [30] Faubert B, Li KY, Cai L, et al. Lactate metabolism in human lung tumors [J]. *Cell*, 2017, 171: 358-371.
- [31] Li J, Liao T, Liu H, et al. Hypoxic glioma stem cell-derived exosomes containing linc01060 promote progression of glioma by regulating the MZF1/c-Myc/HIF1 α axis [J]. *Cancer Res*, 2021, 81: 114-128.
- [32] Jing Z, Liu Q, He X, et al. NCAPD3 enhances Warburg effect through c-Myc and E2F1 and promotes the occurrence and progression of colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 198.
- [33] David CJ, Chen M, Assanah M, et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer [J]. *Nature*, 2010, 463: 364-368.