

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research白藜芦醇调控 LKB1/AMPK 通路对乳腺癌
细胞增殖、迁移和糖酵解的研究Research of resveratrol on proliferation, migration and glycolysis of breast cancer
cells by regulating LKB1/AMPK pathway李雪曼, 刘 山, 张 倬,
熊 飞(武汉市第三医院 心胸及血管外科, 湖北 武汉
430000)LI Xue-man, LIU Shan,
ZHANG Zhuo, XIONG Fei(Department of Cardiothoracic and
Vascular Surgery, Wuhan Third Hospital,
Wuhan 430000, Hubei Province, China)基金项目: 武汉市中医药科研基金资助项目
(WZ24Z01)作者简介: 李雪曼(1982-), 女, 副主任医师, 主
要从事乳腺癌研究

通信作者: 刘山, 主治医师

Tel: (027) 65399429

E-mail: uiqgex@163.com

摘要:目的 探索白藜芦醇通过调控肝激酶 B1 (LKB1)/腺苷酸活化激酶 (AMPK) 通路对乳腺癌细胞增殖、迁移和糖酵解的影响及其机制。方法 将人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 分为对照组、低浓度试验组 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇)、高浓度实验组 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇) 和抑制剂组 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 白藜芦醇和 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AMPK 抑制剂 BML-275)。用噻唑蓝 (MTT) 法和 Edu 染色法测定各组细胞增殖情况; 用划痕实验法测定各组细胞迁移情况; 用流式细胞仪测定细胞凋亡情况; 用葡萄糖含量试剂盒、乳酸含量试剂盒测定各组细胞葡萄糖消耗量、乳酸产生量; 用蛋白质印迹法测定各组细胞葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 A (LDHA)、己糖激酶 2 (HK2) 以及 LKB1、AMPK 蛋白表达情况。**结果** 对照组、低、高浓度实验组和抑制剂组的细胞增殖抑制率分别为 $(0 \pm 0)\%$ 、 $(32.27 \pm 3.68)\%$ 、 $(56.75 \pm 5.82)\%$ 和 $(24.41 \pm 3.06)\%$; Edu 阳性率分别为 $(52.64 \pm 6.95)\%$ 、 $(30.72 \pm 4.21)\%$ 、 $(18.86 \pm 2.54)\%$ 和 $(41.37 \pm 4.88)\%$; 划痕愈合率分别为 $(34.24 \pm 3.82)\%$ 、 $(23.67 \pm 2.74)\%$ 、 $(14.85 \pm 2.03)\%$ 和 $(29.74 \pm 3.42)\%$; 细胞凋亡率分别为 $(3.04 \pm 0.32)\%$ 、 $(21.81 \pm 2.64)\%$ 、 $(34.43 \pm 3.86)\%$ 和 $(12.67 \pm 1.93)\%$; 葡萄糖消耗量分别为 (31.74 ± 3.52) 、 (23.18 ± 2.64) 、 (14.33 ± 1.67) 和 $(28.27 \pm 3.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 和乳酸产生量分别为 (48.12 ± 4.43) 、 (31.27 ± 3.75) 、 (18.85 ± 2.14) 和 $(42.36 \pm 4.19) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; GLUT1 相对表达水平分别为 1.14 ± 0.12 、 0.76 ± 0.08 、 0.41 ± 0.04 和 0.94 ± 0.09 ; LDHA 相对表达水平分别为 1.32 ± 0.14 、 0.89 ± 0.09 、 0.47 ± 0.05 和 1.13 ± 0.12 ; HK2 相对表达水平分别为 0.97 ± 0.09 、 0.61 ± 0.06 、 0.34 ± 0.04 和 0.86 ± 0.09 ; LKB1 相对表达水平分别为 0.93 ± 0.10 、 1.38 ± 0.14 、 1.75 ± 0.17 和 1.12 ± 0.11 ; AMPK 相对表达水平分别为 1.02 ± 0.11 、 1.56 ± 0.16 、 2.04 ± 0.23 和 1.18 ± 0.13 。低、高浓度实验组的上述指标与对照组比较, 抑制剂组的上述指标与高浓度实验组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 白藜芦醇可能通过激活 LKB1/AMPK 通路抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和糖酵解。

关键词: 白藜芦醇; 肝激酶 B1; 腺苷酸活化激酶; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 糖酵解

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.02.008

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)02-0197-07

Abstract: Objective To explore the effects and mechanism of resveratrol on the proliferation, migration and glycolysis of breast cancer cells by regulating the liver kinase B1 (LKB1)/AMP activated protein kinase (AMPK) pathway. **Methods** Human breast cancer MDA-MB-231 cells were divided into four groups: control group, low-concentration experimental group ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol),

high - concentration experimental group ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol) and inhibitor group ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol + $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AMPK inhibitor BML - 275). The cell proliferation of each group was detected by thiazolyl blue (MTT) assay and Edu staining; the cell migration was detected by scratch test; the cell apoptosis was detected by flow cytometry; the glucose consumption and lactic acid production of cells in each group were measured by glucose content kit and lactic acid content kit, respectively; the protein expressions of glucose transporter 1 (GLUT1), lactate dehydrogenase A (LDHA), hexokinase 2 (HK2), LKB1 and AMPK in each group were detected by Western blot.

Results The cell proliferation inhibition rates of control group, low - concentration experimental group, high - concentration experimental group and inhibitor group were $(0 \pm 0)\%$, $(32.27 \pm 3.68)\%$, $(56.75 \pm 5.82)\%$ and $(24.41 \pm 3.06)\%$, respectively; the Edu - positive rates were $(52.64 \pm 6.95)\%$, $(30.72 \pm 4.21)\%$, $(18.86 \pm 2.54)\%$ and $(41.37 \pm 4.88)\%$, respectively; the scratch healing rates were $(34.24 \pm 3.82)\%$, $(23.67 \pm 2.74)\%$, $(14.85 \pm 2.03)\%$ and $(29.74 \pm 3.42)\%$, respectively; the cell apoptosis rates were $(3.04 \pm 0.32)\%$, $(21.81 \pm 2.64)\%$, $(34.43 \pm 3.86)\%$ and $(12.67 \pm 1.93)\%$, respectively; the glucose consumption levels were (31.74 ± 3.52) , (23.18 ± 2.64) , (14.33 ± 1.67) and $(28.27 \pm 3.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the lactic acid production levels were (48.12 ± 4.43) , (31.27 ± 3.75) , (18.85 ± 2.14) and $(42.36 \pm 4.19) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of GLUT1 were 1.14 ± 0.12 , 0.76 ± 0.08 , 0.41 ± 0.04 and 0.94 ± 0.09 , respectively; the relative expression levels of LDHA were 1.32 ± 0.14 , 0.89 ± 0.09 , 0.47 ± 0.05 and 1.13 ± 0.12 , respectively; the relative expression levels of HK2 were 0.97 ± 0.09 , 0.61 ± 0.06 , 0.34 ± 0.04 and 0.86 ± 0.09 , respectively; the relative expression levels of LKB1 were 0.93 ± 0.10 , 1.38 ± 0.14 , 1.75 ± 0.17 and 1.12 ± 0.11 , respectively; the relative expression levels of AMPK were 1.02 ± 0.11 , 1.56 ± 0.16 , 2.04 ± 0.23 and 1.18 ± 0.13 , respectively. Compared with control group, the above indicators in the low - and high - concentration experimental groups were statistically significantly different (all $P < 0.05$); compared with the high - concentration experimental group, the above indicators in the inhibitor group were statistically significantly different (all $P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol may inhibit the proliferation, migration and glycolysis of breast cancer cells by activating the LKB1/AMPK pathway.

Key words: resveratrol; liver kinase B1; AMP activated protein kinase; breast cancer; proliferation; migration; glycolysis

乳腺癌是女性中最常见恶性肿瘤之一^[1-2]。虽临床已积极采取多种措施干预,患者预后得到较大改善,然而复发难治性患者的治疗仍然是临床一大挑战^[3]。因此,探寻乳腺癌进展机制及可靠靶点并制订更加有效的治疗策略至关重要。白藜芦醇是一种天然存在的多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌等多种生物活性^[4]。已有研究表明,白藜芦醇对乳腺癌进展和转移具有抑制作用,但其具体作用机制还有待进一步阐明^[5]。腺苷酸活化激酶(AMP activated protein kinase, AMPK)是肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)最重要的下游激酶,可以抑制肿瘤细胞生长和增殖,从而对肿瘤发挥抑制作用^[6]。研究发现,抑制 LKB1/AMPK 通路激活可以促进肝癌、肾癌和乳腺癌等癌细胞增殖^[7]。而在癌细胞中,糖酵解通常被过度激活,其不仅为肿瘤细胞的恶性增殖提供能量,也为肿瘤细胞的生物合成提供原料^[8]。然而,白藜芦醇是否可以通过调控 LKB1/AMPK 抑制乳腺癌恶性进展

仍需进一步研究。本研究旨在探索白藜芦醇在乳腺癌恶性进展中的作用及机制,为进一步丰富乳腺癌机制及其临床治疗提供实验参考。

材料与方法

1 材料

细胞 人乳腺癌细胞株 MDA - MB - 231,上海泽叶生物科技有限公司生产。

试剂 白藜芦醇,规格:每支 20 mg,纯度:98%,批号:DST20230518,成都德思特生物技术有限公司生产;AMPK 抑制剂,美国 MCE 公司生产;噻唑蓝(thiazolyl blue, MTT)和 Edu 细胞增殖试剂盒、膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素(Annexin V - FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)试剂盒,均由上海尚宝生物科技有限公司生产;葡萄糖消耗检测试剂盒和乳酸检测试剂盒,均由上海贝博生物科技有限公司生产;乳酸

脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抗体, 美国 CST 公司生产; 葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1)、己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)、LKB1、AMPK、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体及山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 抗体, 均由英国 Abcam 公司生产。

仪器 CytoFLEX 流式细胞仪, 江苏捷诺生物科技有限公司产品; Multiskan FC 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司产品; 5810R 高速低温冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司产品; IX73 显微镜, 日本 Olympus 公司产品; Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪及 Mini Trans-Blot 转膜仪, 均为美国 Bio-Rad 公司产品。

2 方法

2.1 细胞培养^[9]

将 MDA-MB-231 细胞接种至含 10% FBS 的杜氏改良培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基, 放入培养箱内培养 (环境设置如下: 37 °C, 5% CO₂), 每 24~48 h 更换 1 次新鲜培养基。当细胞融合度达 80%~90% 时进行消化传代, 具体操作如下: 弃去孔内旧培养基, 用磷酸盐缓冲盐水 (phosphate-buffered saline, PBS) 缓冲液洗涤细胞 2 次, 吸尽残留 PBS; 每孔加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 1 mL, 37 °C 培养箱内孵育 2~3 min; 加入含 10% FBS 完全培养基 2 mL 终止消化, 用移液器轻轻吹打细胞培养瓶壁, 使细胞充分脱壁并分散为单细胞悬液; 将单细胞悬液转移至无菌 EP 管中, 以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清液; 加入新鲜培养基 3~5 mL 重悬细胞, 轻轻吹打混匀后, 按 1:3 比例接种至新的细胞培养瓶中, 放入培养箱继续培养。后续所有相关实验均选用生长状态良好的对数期细胞。

2.2 细胞分组及处理方法

将 MDA-MB-231 细胞进行分组, 分别为对照组、低浓度试验组、高浓度试验组和抑制剂组, 其中低浓度试验组和高浓度试验组细胞分别加入 25 和 50 μmol·L⁻¹ 白藜芦醇进行干预^[10], 抑制剂组细胞在加入 50 μmol·L⁻¹ 白藜芦醇干预的同时加入 4 μmol·L⁻¹ 的 BML-275^[11], 对照组不进行任何处理, 正常培养。

2.3 MTT 法及 Edu 染色法检测细胞增殖情况^[12]

MTT 实验 收集各组细胞于 96 孔板中接种, 其中细胞密度为 1 × 10⁵ cells·mL⁻¹, 然后加入 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液, 每孔 20 μL 进行培养, 4 h 后

将每孔中的上清液除去, 并每孔加入二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μL 进行培养, 5 min 后对每个孔的光密度 (optical density, OD) 值进行测定 (490 nm 处), 计算细胞增殖抑制率, 计算公式: $(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

Edu 染色法 收集各组细胞接种于 24 孔板中, 细胞密度调整为每孔 1 × 10⁵ 个, 培养 24 h 后加入 10 μmol·L⁻¹ Edu 溶液进行孵育, 2 h 后加入 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 进行染色, 最后置于荧光显微镜下观察, 计算 Edu 阳性细胞率, 公式为 Edu 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

2.4 划痕实验检测细胞迁移情况^[13]

收集各组细胞进行接种培养, 细胞融合至 100% 后, 用 100 μL 枪头垂直于平板划一条线, 并用 PBS 将悬浮的细胞清洗干净, 接着置于培养箱内 (37 °C, CO₂ 5%) 培养, 分别在 0 和 24 h 时进行拍照, 用 Image J 软件分析, 根据 0 和 24 h 的划痕面积来对划痕愈合率进行计算。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况^[14]

收集各组培养 48 h 后的细胞于结合缓冲液中重悬, 分别加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL 在避光条件下进行培养, 15 min 后用流式细胞仪对各组细胞进行检测。

2.6 试剂盒法检测细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量^[15]

收集各组细胞进行培养, 48 h 后将各组细胞收集至 EP 管中, 用超声波破碎细胞, 按照葡萄糖含量试剂盒、乳酸含量试剂盒说明书进行操作, 检测各组细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量。

2.7 蛋白质印迹法检测细胞中相关蛋白表达^[16]

取各组细胞进行 24 h 培养后, 加入放射免疫沉淀测定 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液进行裂解以提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 并将蛋白热变性后。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 加入 Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 上样后电泳, 至溴酚蓝迁移至凝胶底部。用湿转法转膜, 转膜后, 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次。加入 GLUT1、LDHA、HK2、LKB1、AMPK 及 GAPDH 一抗稀释液 (1:1 000) 于 4 °C 孵育过夜, 洗膜后, 加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h。行曝光检测, 用 Image J 软件分析各组蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。数值以 $\bar{x} \pm s$

表示,多组比较用单因素方差分析,两两组间比较用 $SNK-q$ 分析。

结 果

1 白藜芦醇对乳腺癌细胞增殖的影响

低、高浓度实验组细胞增殖抑制率较对照组均显著升高, Edu 阳性细胞率较对照组均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);相较于高浓度试验组,抑制剂组细胞增殖抑制率显著降低, Edu 阳性细胞率显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

2 白藜芦醇对乳腺癌细胞迁移和凋亡的影响

低、高浓度实验组细胞划痕愈合率较对照组均显著降低,细胞凋亡率较对照组均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);抑制剂组细胞相较于高浓度试验组,划痕愈合率显著增加,但细胞凋亡率显著降低,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2 和表 2。

表 1 各组细胞增殖抑制率和 Edu 阳性细胞率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell proliferation inhibition rate and number of Edu-positive cells among different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Cell proliferation inhibition rate(%)	Edu-positive cell rate(%)
Control	6	0 ± 0	52.64 ± 6.95
Experimental-L	6	32.27 ± 3.68 *	30.72 ± 4.21 *
Experimental-H	6	56.75 ± 5.82 *#	18.86 ± 2.54 *#
Inhibitor	6	24.41 ± 3.06 [△]	41.37 ± 4.88 [△]

Control group: Normal cultured; Experimental-L group: 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol; Experimental-H group: 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol; Inhibitor group: 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ resveratrol + 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AMPK inhibitor BML-275; Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental-L group, # $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, $\Delta P < 0.05$.

3 白藜芦醇对乳腺癌细胞糖酵解的影响

与对照组比较,低、高浓度实验组的细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);抑制剂组的细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量较高浓度实验组均显著增加,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 3。

4 白藜芦醇对乳腺癌细胞糖酵解关键酶表达的影响

低、高浓度实验组细胞的 GLUT1、LDHA 和 HK2

表 2 各组细胞划痕愈合率和细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of cell scratch healing rate and cell apoptosis rate among different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Scratch healing rate(%)	Cell apoptosis rate(%)
Control	6	34.24 ± 3.82	3.04 ± 0.32
Experimental-L	6	23.67 ± 2.74 *	21.81 ± 2.64 *
Experimental-H	6	14.85 ± 2.03 *#	34.43 ± 3.86 *#
Inhibitor	6	29.74 ± 3.42 [△]	12.67 ± 1.93 [△]

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental-L group, # $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, $\Delta P < 0.05$.

表 3 各组细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of glucose consumption and lactic acid production of cells among different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Glucose consumption ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Lactic acid production ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	6	31.74 ± 3.52	48.12 ± 4.43
Experimental-L	6	23.18 ± 2.64 *	31.27 ± 3.75 *
Experimental-H	6	14.33 ± 1.67 *#	18.85 ± 2.14 *#
Inhibitor	6	28.27 ± 3.12 [△]	42.36 ± 4.19 [△]

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with experimental-L group, # $P < 0.05$; Compared with experimental-H group, $\Delta P < 0.05$.

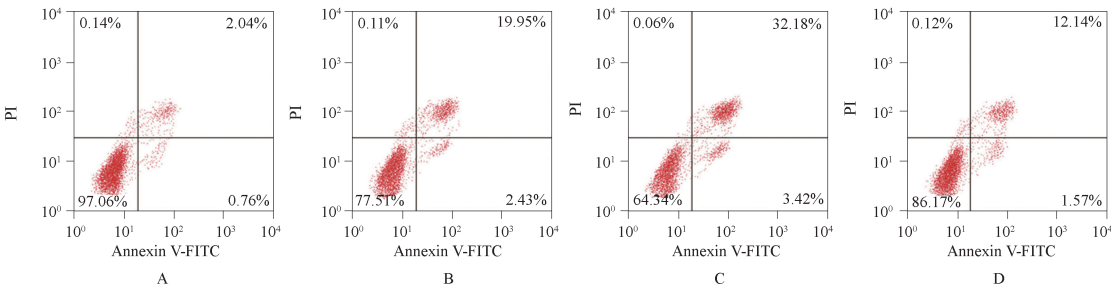


图 1 各组细胞凋亡情况的流式细胞仪检测结果

Figure 1 Flow cytometry detection results of cell apoptosis in different groups

A:Control group; B:Experimental-L group; C:Experimental-H group; D:Inhibitor group.

蛋白相对表达水平较对照组均显著下降(均 $P<0.05$);对比高浓度试验组,抑制剂组细胞的 GLUT1、LDHA 和 HK2 蛋白相对表达水平均显著增加,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图 4 和表 4。

表 4 各组细胞中 GLUT1、LDHA、HK2 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)
Table 4 Comparison of GLUT1, LDHA, and HK2 protein expressions in cells of different groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	GLUT1	LDHA	HK2
Control	6	1.14±0.12	1.32±0.14	0.97±0.09
Experimental-L	6	0.76±0.08*	0.89±0.09*	0.61±0.06*
Experimental-H	6	0.41±0.04*#	0.47±0.05*#	0.34±0.04*#
Inhibitor	6	0.94±0.09 Δ	1.13±0.12 Δ	0.86±0.09 Δ

Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with experimental-L group, # $P<0.05$; Compared with experimental-H group, $\Delta P<0.05$.

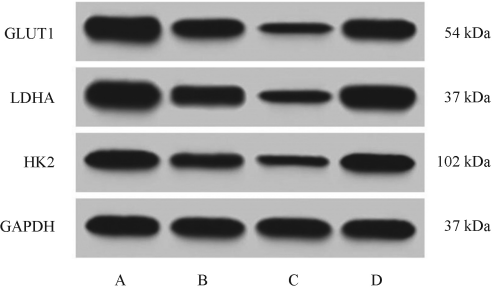


图 2 蛋白质印迹法检测各组细胞葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 A (LDHA) 和己糖激酶 2 (HK2) 蛋白相对表达水平

Figure 2 Protein relative expression levels of glucose transporter 1 (GLUT1), lactate dehydrogenase A (LDHA) and hexokinase 2 (HK2) in cells of different groups detected by Western blot
A: Control group; B: Experimental-L group; C: Experimental-H group; D: Inhibitor group.

讨论

乳腺癌占癌症病例总数 24.2%,也是导致癌症相关死亡主要原因,其中,转移性乳腺癌占乳腺癌相关死亡的比例最高,达 90% 以上^[17]。转移性乳腺癌患者 5 年生存率相对较低^[18]。目前虽临床已积极采取多种措施干预,患者治疗效果仍有待进一步提高^[19]。因此,寻找可有效治疗乳腺癌的药物及其作用机制意义重大。

白藜芦醇可以参与调控癌细胞生长和凋亡,抑制

5 白藜芦醇对乳腺癌细胞 LKB1/AMPK 通路蛋白表达的影响

低、高浓度实验组细胞的 LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平较对照组均显著增加,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);抑制剂组细胞的 LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平较高浓度试验组均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见图 5 和表 5。

表 5 各组细胞中 LKB1 和 AMPK 蛋白相对表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)
Table 5 Comparison of LKB1 and AMPK protein relative expressions levels in cells of different groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	LKB1	AMPK
Control	6	0.93±0.10	1.02±0.11
Experimental-L	6	1.38±0.14*	1.56±0.16*
Experimental-H	6	1.75±0.17*#	2.04±0.23*#
Inhibitor	6	1.12±0.11 Δ	1.18±0.13 Δ

Compared with control group, * $P<0.05$; Compared with experimental-L group, # $P<0.05$; Compared with experimental-H group, $\Delta P<0.05$.

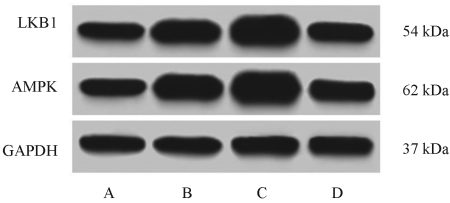


图 3 蛋白质印迹法检测各组肝激酶 B1 (LKB1) 和腺苷酸活化激酶 (AMPK) 细胞蛋白相对表达水平

Figure 3 Protein relative expression levels of liver kinase B1 (LKB1) and AMP activated protein kinase (AMPK) in cells of different groups detected by Western blot
A: Control group; B: Experimental-L group; C: Experimental-H group; D: Inhibitor group.

代谢活性细胞糖酵解,发挥抗癌作用^[20-21]。近年来,研究发现,白藜芦醇可以抑制乳腺癌细胞恶性生物学行为^[22]。本研究结果与上述研究结果一致,白藜芦醇处理 MDA-MB-231 后,细胞增殖抑制率和细胞凋亡率均显著上升,Edu 阳性细胞率及划痕愈合率均显著降低,细胞葡萄糖消耗量和乳酸产生量减少,且糖酵解关键蛋白 (GLUT1、LDHA、HK2) 相对表达水平均显著下降,提示白藜芦醇对乳腺癌细胞增殖、迁移以及糖酵解均具有抑制作用,同时诱导乳腺癌细胞加快凋亡。LKB1 可以参与调节细胞能量平衡和代谢,并在多种癌症中参与调控癌细胞侵袭和转移^[23]。AMPK 失调与肥胖、糖尿病、炎症以及癌症等代谢性

疾病有关^[24]。相关文献报道称,LKB1与肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤发生发展有一定联系^[25]。以往在乳腺癌的研究中发现,抑制LKB1/AMPK通路可以对乳腺癌细胞增殖发挥抑制作用^[26]。本研究发现,使用不同浓度的白藜芦醇干预乳腺癌细胞后,LKB1、AMPK蛋白相对表达水平均显著上调,且在高浓度白藜芦醇干预乳腺癌细胞基础上,进一步使用AMPK抑制剂,发现,AMPK抑制剂可以逆转白藜芦醇对乳腺癌细胞增殖、凋亡、糖酵解等的调控作用。以上结果进一步证实,白藜芦醇对乳腺癌细胞的作用可能是通过激活LKB1/AMPK通路实现的。

与前人相关研究相比,本研究具有明确创新性和优势,也是对现有研究的补充。首先,以往研究多单独探讨中医药对乳腺癌细胞恶性表型单一调控作用,或仅初步关联LKB1/AMPK通路^[27],未对肿瘤细胞糖酵解相关内容展开探讨,而本研究同步检测白藜芦醇对MDA-MB-231细胞恶性表型及糖酵解综合影响,同时系统验证LKB1/AMPK通路在其中的介导作用,通过干预-检测-抑制剂逆转的实验设计,明确白藜芦醇调控乳腺癌细胞生物行为机制,使研究结论更具严谨性和说服力。其次,已有研究聚焦于抑制LKB1/AMPK通路对乳腺癌的影响^[28-29],而本研究明确证实,白藜芦醇可以通过激活LKB1/AMPK通路发挥抗乳腺癌作用,与以往研究形成互补,丰富LKB1/AMPK通路在乳腺癌调控中的作用模式,也为白藜芦醇抗癌机制研究提供新视角。HUANG等^[30]的研究证实,洛伐他汀可以通过激活LKB1-AMPK-p38MAPK-p53-survivin信号通路诱导MCF-7乳腺癌细胞凋亡,而本研究聚焦于白藜芦醇,针对侵袭性更强的三阴性乳腺癌细胞模型MDA-MB-231细胞株展开研究,推进临床转化,可以为难治性乳腺癌天然药物治疗提供新实验依据和思路。此外,研究显示,PI3K/AKT/mTOR通路及下游信号p53均可以通过调控细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤微环境进而参与乳腺癌恶性进展^[31-32]。然而,白藜芦醇能否通过联合调控LKB1/AMPK通路下游靶点PI3K/AKT/mTOR、p53共同发挥抑制乳腺癌恶性进展作用,还有待后续展开相关实验做进一步探讨。

本研究提示:白藜芦醇对乳腺癌细胞的增殖、迁移和糖酵解具有抑制作用,并能够加速癌细胞凋亡,其作用机制可能与其激活LKB1/AMPK通路有关。然而,本研究仅通过体外实验进行相关研究探索,后续需要结合体内实验做进一步验证。本研究补充了

天然多酚类物质激活LKB1/AMPK通路抗乳腺癌的研究空白,为乳腺癌天然药物干预提供新的靶点和实验支撑。

参考文献:

- [1] 姜俊杰,张维,常春佳,等. 千金藤素调控乳腺癌细胞进展的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2025, 41(11):1562—1568.
- [2] XIONG X, ZHENG L W, DING Y, et al. Breast cancer: Pathogenesis and treatments [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1):49—82.
- [3] ZANNETTI A. Breast cancer: From pathophysiology to novel therapeutic approaches 2.0 [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3):2542—2545.
- [4] REN B, KWAH MX, LIU C, et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2021, 515(1):63—72.
- [5] SELVAKUMAR P, BADGELEY A, MURPHY P, et al. Flavonoids and other polyphenols act as epigenetic modifiers in breast cancer [J]. *Nutrients*, 2020, 12(3):761—779.
- [6] YANG L, ZHANG Q, XIONG Y, et al. A subset of VEGFR-TKIs activates AMPK in LKB1-mutant lung cancer [J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(4):1651—1662.
- [7] XIA T, CHEN D, LIU X, et al. Midkine noncanonically suppresses AMPK activation through disrupting the LKB1-STRAD-Mo25 complex [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4):414—447.
- [8] ZHEN X, ZHANG M, HAO S, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and transketolase: Key factors in breast cancer progression and therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176(1):1—12.
- [9] 张杨,刘文文,苗欢欢,等. 瑞芬太尼对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、凋亡及Wnt/ β -catenin通路的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2025, 60(9):1606—1613.
- [10] 崔如霞. 白藜芦醇通过ILP-2抑制三阴性乳腺癌细胞增殖和迁移的机制研究[D]. 湖南省吉首市:吉首大学, 2023.
- [11] 王国芳,王玉娟,郎华. miR-7-5p靶向丝氨酸/苏氨酸激酶11调控非小细胞肺癌细胞A549的凋亡[J]. 解剖学研究, 2019, 41(6):487—492.
- [12] 宋梦琪,刘美杉,李春震,等. 糖基转移酶B4GALT2对人乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响及其可能的机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2024, 31(12):1178—1185.
- [13] 于轶睿,温馨,张甲蓉,等. 薯蓣皂苷元对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞周期与迁移的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2026, 51(2):515—523.
- [14] 姚博文,李亚昭,李静宇,等. 白花蛇舌草总黄酮对乳腺癌MDA-MB-231细胞系增殖、凋亡及干性的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2023, 44(6):880—885.
- [15] 樊倩,杨程,刘云霓. 醉茄素A通过circOSBPL10/miR-128-3p通路调控乳腺癌MDA-MB-231细胞糖酵解、增殖、迁移及侵袭的机制研究[J]. 天津中医药, 2022, 39(6):801—808.
- [16] 梁睿,翟溯澜,吕梦雨,等. 刺五加皂苷B/E对乳腺癌MDA-MB-231细胞迁移能力的影响及作用机制研究[J]. 药学与临床研究, 2020, 28(1):15—19.

- [17] XU X, ZHANG M, XU F, *et al.* Wnt signaling in breast cancer: Biological mechanisms, challenges and opportunities [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):165—174.
- [18] KASHYAP D, PAL D, SHARMA R, *et al.* Global increase in breast cancer incidence: Risk factors and preventive measures [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 18(1):1—12.
- [19] AYDIN M, KOSE E, ODABAS I, *et al.* The effect of exercise on life quality and depression levels of breast cancer patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2021, 22(3):725—732.
- [20] BEHROOZAGHDAM M, DEHGHANI M, ZABOLIAN A, *et al.* Resveratrol in breast cancer treatment: From cellular effects to molecular mechanisms of action [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11):539—546.
- [21] BERRETTA M, BIGNUCOLO A, DI FRANCIA R, *et al.* Resveratrol in cancer patients: From bench to bedside [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2945—2967.
- [22] 高庆东, 段旭昉, 李妍, 等. 白藜芦醇抗乳腺癌的研究进展 [J]. *中国药房*, 2024, 35(11):1408—1412.
- [23] KING C T, MATOSSIAN M D, SAVOIE J J, *et al.* Liver kinase B1 regulates remodeling of the tumor microenvironment in triple - negative breast cancer [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9(1):1—11.
- [24] XU X, FANG Y, NOWSHEEN S, *et al.* Regulation of AMPK activation by extracellular matrix stiffness in pancreatic cancer [J]. *Genes Dis*, 2023, 11(3):1—9.
- [25] BOUROUH M, MARIGNANI P A. The tumor suppressor kinase LKB1: Metabolic nexus [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10(1):1—15.
- [26] 谭艳芳, 张艳冰, 万红霞, 等. 黄芪总皂苷调控 LKB1/AMPK 信号通路对人乳腺癌细胞增殖, 凋亡, 周期的影响及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(2):388—391.
- [27] 郭檬檬, 应语, 陈海东, 等. 山茱萸多糖对乳腺癌 MCF - 7 细胞的影响及其通过调控 AMPK/SIRT1 通路的作用机制研究 [J]. *江苏中医药*, 2024, 56(7):68—72.
- [28] CAO J, MA X, YAN X, *et al.* Kaempferol induces mitochondrial dysfunction and mitophagy by activating the LKB1/AMPK/MFF pathway in breast precancerous lesions [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(8):3602—3616.
- [29] MAHARJAN S, LEE M G, LEE K S, *et al.* Morin overcomes doxorubicin resistance in human breast cancer by inducing DNA damage and modulating the LKB1/AMPK/mTORC1 signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2025, 51(1):1—16.
- [30] HUANG S W, CHYUAN I T, SHIUE C, *et al.* Lovastatin - mediated MCF - 7 cancer cell death involves LKB1 - AMPK - p38 MAPK - p53 - survivin signalling cascade [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(2):1822—1836.
- [31] ZHANG H P, JIANG R Y, ZHU J Y, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: An important driver and therapeutic target in triple - negative breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2024, 31(4):539—551.
- [32] MARVALIM C, DATTA A, LEE S C. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy [J]. *Theranostics*, 2023, 13(4):1421—1442.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025 - 05 - 12)

· 信息动态 ·

国家药监局药审中心关于发布《艾滋病免疫功能重建 不全治疗药物临床试验技术指导原则》的 通告(2025 年第 52 号)

为进一步推动艾滋病免疫功能重建不全治疗药物的研发,指导临床试验设计,提供可参考的技术规范,在国家药品监督管理局的部署下,药审中心组织制定了《艾滋病免疫功能重建不全治疗药物临床试验技术指导原则》。根据《国家药监局综合司关于印发药品技术指导原则发布程序的通知》(药监综药管〔2020〕9 号)要求,经国家药品监督管理局审查同意,现予发布,自 2025 - 12 - 29 起施行。

指导原则从艾滋病免疫功能重建不全治疗药物的临床药理学研究、探索性临床试验、确证性临床试验等几个方面进行了建议。

国家药品监督管理局药品审评中心
2025 - 12 - 29