

基础研究

没药对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞糖酵解及增殖的影响

郑衍芳¹, 谢 萍², 陈金霞¹, 谢 艳¹, 李小波³

(1. 遵义医科大学珠海校区 生理学教研室, 广东 珠海 519000; 2. 遵义医科大学第五附属医院 内镜中心, 广东 珠海 519000; 3. 遵义医科大学珠海校区 诊断学教研室, 广东 珠海 519000)

[摘 要] 目的 探讨没药对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的糖酵解水平和细胞增殖的影响。方法 不同浓度没药处理乳腺癌细胞 24 h 后, 采用细胞计数法 (CCK-8) 检测没药对乳腺癌细胞增殖活性的影响, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞实验检测没药对乳腺癌细胞凋亡的影响, 比色法检测没药对乳腺癌细胞乳酸生成和葡萄糖消耗的影响, 蛋白免疫印迹法 (WB) 检测没药对乳腺癌细胞 6 磷酸果糖 2 激酶/果糖-2,6 二磷酸酶 3 (PFKFB3)、葡萄糖转运体 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 A (LDHA)、丙酮酸脱氢酶激酶 1 (PDHK1) 蛋白表达情况。结果 没药可降低 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达 ($P < 0.05$), 降低葡萄糖消耗和乳酸生成, 从而降低乳腺癌细胞 MDA-MB-231 糖酵解水平, 抑制细胞增殖, 促进乳腺癌细胞凋亡 ($P < 0.05$)。结论 没药通过降低 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达, 降低糖酵解水平, 抑制乳腺癌细胞增殖。

[关键词] 乳腺癌; 没药; 糖酵解; 增殖

[中图分类号] R737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-8159(2026)06-0623-05

Effect of myrrha on glycolysis and proliferation in human breast cancer MDA-MB-231 cells

Zheng Yanfang¹, Xie Ping², Chen Jinxia¹, Xie Yan¹, Li Xiaobo¹

(1. Department of Physiology, Zunyi Medical University Zhuhai Campus, Zhuhai Guangdong 519000, China; 2. Endoscopy Center, The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zhuhai Guangdong 519000, China; 3. Department of Diagnostics, Zunyi Medical University Zhuhai Campus, Zhuhai Guangdong 519000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of myrrha on the proliferation and glycolysis in breast cancer cells MDA-MB-231. **Methods** The effect of the myrrha on proliferation activity of the cells was detected by CCK-8, and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry was used to detect the effect of myrrha on apoptosis of breast cancer cells. Glucose and lactate were detected by colorimetry, and the expression levels of 6-Phospho-fructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3), glucose transporter1 (GLUT1), pyruvate dehydrogenase kinase1 (PDHK), lactate dehydrogenase A (LDHA) proteins were verified by Western blot. **Results** Myrrha effectively reduced the level of PFKFB3, GLUT1, LDHA, and PDHK1 protein ($P < 0.05$), and decreased glucose consumption and lactate production, thus down-regulating glycolysis level, inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis. **Conclusion** Myrrha can reduce the expression of PFKFB3, GLUT1, LDHA, and PDHK1 proteins, thereby lowering glycolytic levels and inhibiting the proliferation of breast cancer cells.

[Key words] breast cancer; myrrha; glycolysis; proliferation

中国女性乳腺癌 (breast cancer, BC) 新发病例高达 35.72 万例, 死亡病例为 7.2 万例, 其发病率和死亡率均位居女性癌症发病率和死亡率的第 2 位^[1]。没药在中国传统医学中为活血化瘀、消肿

止痛的药材, 主要用于治疗疮疡肿毒、症瘕积聚、痹症。近年来, 已从没药中分离鉴定出超过 100 种化学成分, 主要包括萜类、甾体和木脂素等, 发挥抑制肿瘤、减轻炎症反应、缓解疼痛等作用^[2-3]。研究发

[基金项目] 贵州省科技计划项目 [NO: 黔科合基础 - ZK (2023) 一般 511]; 遵义医科大学博士科研启动基金资助项目 (NO: F-ZH-008); 遵义医科大学珠海校区大创项目 (NO: ZHCX2022064)。

[通信作者] 李小波, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药防治乳腺肿瘤, E-mail: lixiaobo@zmuzh.edu.cn。

现没药通过调控信号通路抑制癌细胞增殖和诱导凋亡,但对没药抑制肿瘤能量代谢的实验研究较少,缺乏对肿瘤细胞糖酵解机制的深入研究。

能量代谢重编程是肿瘤细胞重要特征之一,即使在有氧条件下,肿瘤细胞仍优先进行糖酵解,大量摄取葡萄糖产生能量和乳酸,这个现象被称为 Warberg 效应。导致 Warberg 效应的产生有很多因素,涉及到很多酶的活性提高、表达增多,其中 6 磷酸果糖 2 激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kiase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3), 葡萄糖转运体 (glucose transporter, GLUT), 丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase, PDHK), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 在糖酵解过程中有很重要的作用^[4-7]。依据肿瘤细胞的代谢特性,以调整肿瘤的代谢途径或者一些关键的代谢酶的表达为出发点,将是对乳腺癌进行治疗的有效方法。本研究利用乳腺癌细胞,观察没药是否通过抑制 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 表达干扰糖酵解,探讨没药是否多靶点阻断乳腺癌病变的进展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株来源与培养 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 (货号: SCSP-5043) 购自中国科学院上海生命科学研究所细胞库。培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养基,置于 5% CO₂, 37 °C 恒温恒湿培养箱中。实验时取对数生长期细胞。

1.1.2 药物和试剂 一抗: PFKFB3 (批号: 13123S); GLUT1 (批号: 12939S); LDHA (批号: 2012S); PDHK1 (批号: 3820S)、 β -actin (批号: 4970) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。羊抗兔 IgG (HRP) 二抗 (批号: as006) 购自 ASBIO 公司。没药 (拉丁名: Myrrha) 购自湖北金贵中药饮片有限公司 (批号: A250701)。按《中国药典》2020 年版一部方法进行薄层色谱鉴别,符合规定。CCK-8 试剂盒 (货号: K0301) 购自 MedChemExpress 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: P0010) 购自中国上海碧云天生物技术有限公司; 乳酸浓度测定试剂盒 (货号: A01921) 购自南京建成生物工程有限公司; 葡萄糖浓度测定试剂盒 (货号: E1011) 购自北京普利莱基因技术有限公司。ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (货号: CA1020) 购自索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 没药制备 先用研钵将药物磨细,采用密闭容器,以预冷至 4 °C 的培养液浸泡没药 72 h (生药含量为 100 g/L), 超声振荡溶解 2 h, 4 °C 下继续浸泡 24 h 后取上清液,用 0.22 μ m 微孔滤器过滤后,得到药物浸提液。实验时用培养液稀释至所需浓度。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞的增殖活性 取对数生长期乳腺癌细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 后添加不同剂量没药 (0、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100 g/L) 进行处理,处理 24 h 后加入含 10 μ L CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h,于 450 nm 处检测其吸光值。

1.2.3 细胞培养液中葡萄糖和乳酸含量检测 取对数生长期细胞接种于 6 孔板孵育 24 h 后,添加 3.13、6.25 g/L 没药处理,分别记为低浓度没药组,高浓度没药组,并设置 0 g/L 没药组为对照组,24 h 后收集培养液于 EP 管中,3 000 r/min,离心 5 min,小心移取上清液至新 EP 管中,分别在 550、530 nm 处检测吸光度 (OD) 值测量葡萄糖、乳酸含量。葡萄糖消耗量 = 原葡萄糖含量 - 培养后葡萄糖含量。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 不同浓度没药孵育 24 h 后收集细胞,加入 500 μ L 的结合缓冲液悬浮细胞,再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 混匀,避光室温孵育 15 min,流式细胞仪进行检测。细胞接种密度为 1×10^6 个/mL,每组设 3 个复孔。使用 FlowJo 软件进行分析,以完整细胞群体设门 (P1),排除细胞碎片和黏连体。在 Annexin V-FITC/PI 双参数散点图上, Q2-1 (Annexin V - /PI +) 为坏死细胞, Q2-2 (Annexin V + /PI +) 为晚期凋亡细胞, Q2-3 (Annexin V - /PI -) 为活细胞, Q2-4 (Annexin V + /PI -) 为早期凋亡细胞。

$$\text{总凋亡率} = \frac{\text{凋亡细胞}}{\text{全部细胞}} \times 100\%$$

1.2.5 免疫印迹法检测相关蛋白的表达 提取不同浓度没药处理后细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。上样后在 10% SDS-PAGE 中电泳,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭 2 h 后加入一抗,4 °C 过夜; PBST 洗膜后转入二抗中,室温孵育 2 h; 用化学发光法 (ECL) 显影。

1.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件分析,结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 与对照组比较采用 Dunnett 检

验,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验或 Tamhane's *T*₂ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 没药对 MDA-MB-231 细胞活性的影响 不同浓度梯度的没药作用 24 h 后采用 CCK-8 实验检测乳腺癌细胞活性和增殖情况。如图 1 所示,高浓度没药产生抑制细胞生长的作用。计算 IC_{50} 为 5.94 g/L,因此后续实验选择 3.13、6.25 g/L 为给药浓度,给药时间为 24 h(图 1)。

2.2 没药抑制 MDA-MB-231 细胞摄取葡萄糖和生成乳酸 与对照组比较,不同浓度没药作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 后,葡萄糖消耗量降低,说明没药处理的 MDA-MB-231 细胞对葡萄糖的摄取减少,同时 MDA-MB-231 细胞培养液中乳酸含量明显降低($P < 0.05$),说明没药抑制细胞生成乳酸(图 2)。

2.3 没药对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 用不同浓度的没药处理 MDA-MB-231 细胞,检测细胞的凋亡水平。对照组 0 g/L 没药处理细胞的凋亡率为 $(3.39 \pm 0.17)\%$;低浓度、高浓度没药组细胞凋亡率分别为 $(4.94 \pm 1.07)\%$ 、 $(10.08 \pm 1.89)\%$;与对照组相比,高浓度没药组细胞总凋亡率升高至对照组的约 3.0 倍($10.08\% \pm 1.89\%$ vs $3.39\% \pm 0.17\%$, $t = -6.347$, $P < 0.05$),见图 3。

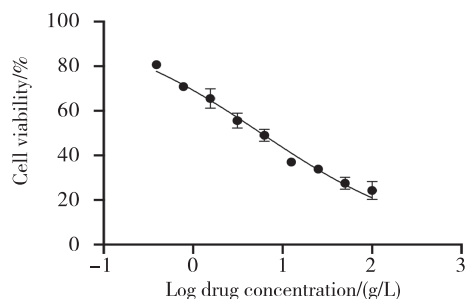
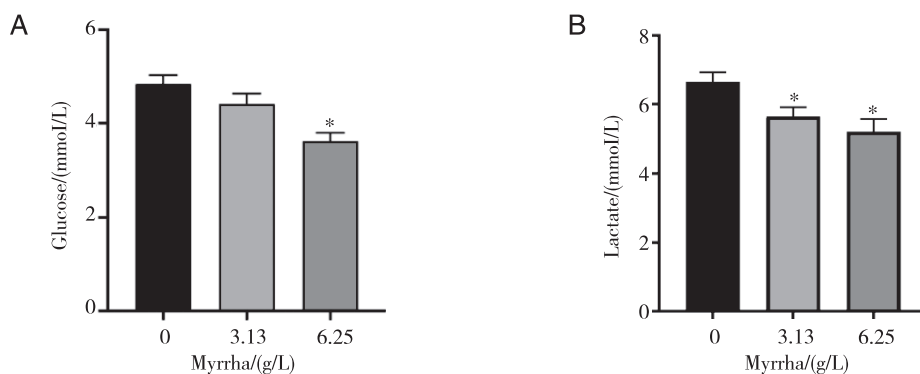
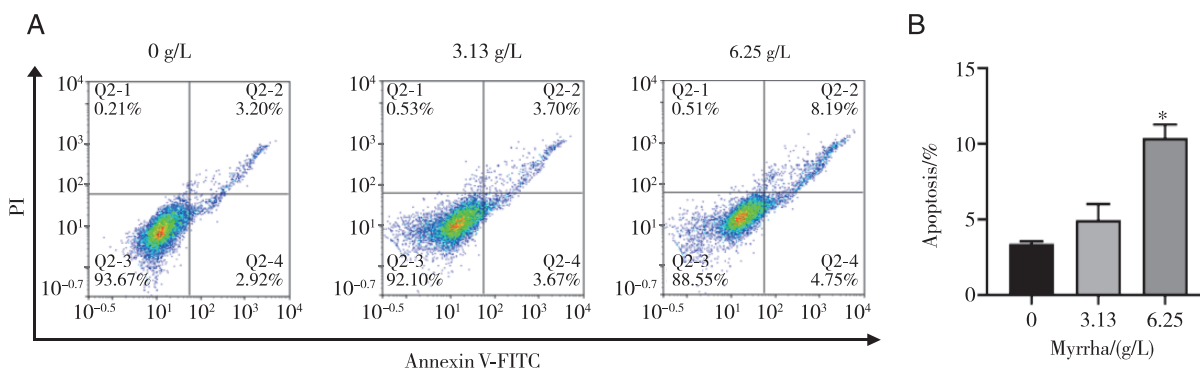


图 1 没药对 MDA-MB-231 细胞活力的影响



A: 没药抑制 MDA-MB-231 细胞摄取葡萄糖; B: 没药抑制 MDA-MB-231 细胞生成乳酸; *: 与 0 g/L 没药组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 没药抑制 MDA-MB-231 细胞摄取葡萄糖和生成乳酸

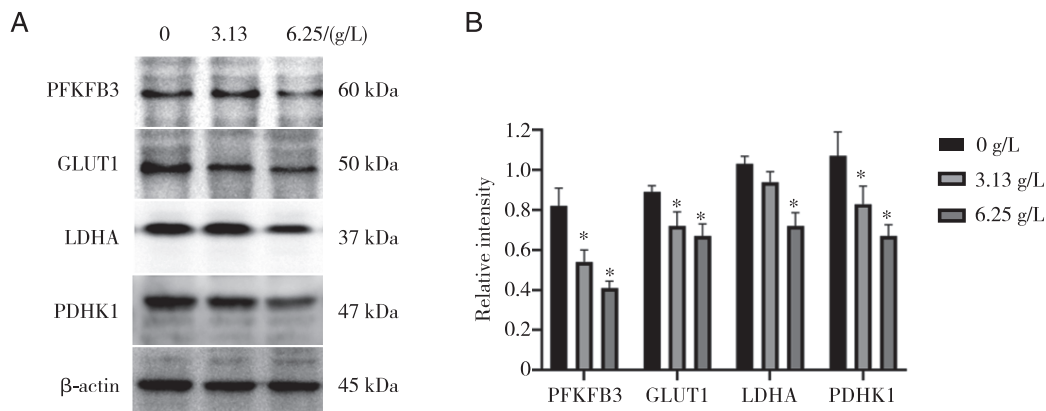


A: 流式细胞术散点图; B: 不同剂量组细胞凋亡率比较; *: 与 0 g/L 没药组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 没药对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

2.4 没药对 MDA-MB-231 细胞 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达的影响 免疫蛋白印迹法 (westernblot, WB) 结果 (图 4) 显示, 没药作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, 与空白组比较, 没药低浓

度组 PFKFB3、GLUT1、PDHK1 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 没药高浓度组 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$, 图 4)。



A: Western blot 检测没药对 MDA-MB-231 细胞 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达的代
表性条带; B: 蛋白表达灰度值的定量分析统计结果; *: 与 0 g/L 没药组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 没药对 MDA-MB-231 细胞中 PFKFB3、GLUT1、LDHA、PDHK1 蛋白表达的影响

3 讨论

没药为橄榄科植物地丁树或哈地丁树干燥树脂, 传统医学认为其有散瘀定痛、消肿生肌的功效, 多用于气滞血瘀引起的痛症、癥瘕积聚、痈肿疮疡等病症的治疗。其组方西黄丸在临床多用于乳腺癌等多种恶性肿瘤的辅助治疗, 西黄丸联合化疗药物能够提高晚期乳腺癌患者的临床疗效及生存质量, 降低血清肿瘤标志物水平和不良反应发生率^[8-9]。该方通过 Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt/mTOR、MAPK/ERK、TGF- β 等信号通路、多靶点作用, 对肺癌、乳腺癌、前列腺癌和结直肠癌等多种恶性肿瘤疗效显著^[10-11]。其药对乳香-没药可降低雌二醇诱导人乳腺细胞的细胞周期相关因子 *cyclinD1*、*CDK4*、*CDK6* mRNA 的表达, 阻滞细胞在 G_2/M 期, 抑制乳腺细胞增殖^[12]。进一步研究没药及其化学成分, 发现没药倍半萜化合物 M36 激活 MAPK 信号通路, 促进其凋亡和自噬^[13]。没药甾酮可调控孕烷 X 受体/P-糖蛋白通路增强化疗药物顺铂、5-氟尿嘧啶抑制肝癌细胞增殖和促进肝癌细胞凋亡^[14], 通过调控 mTOR/自噬信号通路没药甾酮增强替莫唑胺抗脑胶质瘤作用^[15]。目前研究主要集中在没药通过信号通路影响癌细胞的增殖。

肿瘤细胞舍弃高效的氧化磷酸化途径, 采取低效的糖酵解途径 (Warburg 效应), 以获得更快的

ATP 合成速率和生物大分子合成原料^[16]。本研究从代谢角度出发, 证实没药能多环节协同抑制乳腺癌细胞的糖酵解。本研究发现没药可降低 GLUT1 表达, 减少葡萄糖摄取; 同时降低 PFKFB3 表达, 抑制糖酵解关键限速步骤; 降低 LDHA 表达, 抑制丙酮酸向乳酸的转化; 并降低 PDHK1 表达, 解除对 PDH 的抑制, 从而可能促使代谢流向线粒体氧化磷酸化。这种“减少摄取-抑制通量-阻断转化-促进有氧代谢”的多靶点特征, 为“多靶点阻断肿瘤代谢”的治疗策略提供了新的实验支持, 这区别于许多单一靶点抑制, 如仅靶向 LDHA 或 GLUT1 的药物。同时没药可降低乳酸生成, 乳酸不仅是糖酵解的代谢产物, 近期研究发现, 乳酸可直接驱动蛋白质的“乳酸化修饰”, 进而调控基因表达, 影响肿瘤的生长、转移和免疫逃逸^[17]。

本研究发现没药可同时下调多个不直接受同一经典通路调控的糖酵解关键蛋白 GLUT1、PFKFB3、LDHA 和 PDHK1, 提示其可能通过一种更广泛的转录或翻译后调控机制发挥作用。尽管本研究证实了没药处理与这些蛋白下调的相关性, 但是否为没药中的某个特定成分直接结合并抑制了 PFKFB3 的活性, 还是通过上游信号通路 HIF-1 α 或 c-Myc 等间接下调了所有蛋白的表达, 这需要进行进一步的实验验证。此外, 本研究使用的没药为粗提物, 其发挥上述作用的明确化学成分尚不清楚。文献报道没药中的倍半萜类^[10]、甾酮类^[11-12] 化合物

具有抗肿瘤活性,但这些成分对糖酵解途径的影响有待筛选和验证。后续研究应结合液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术分析粗提物成分,并通过活性导向分离手段,鉴定出其中负责调控糖酵解的关键单体化合物,以提升研究的特异性和转化价值。

综上所述,本研究初步揭示了没药通过多靶点降低糖酵解通量、诱导乳腺癌细胞凋亡的机制,为传统中药没药的抗肿瘤作用提供了基于现代肿瘤代谢生物学的解释,具有较好的理论创新性和基础研究价值。

[参考文献]

- [1] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1):47-53.
- [2] 杨宝, 徐莲莲, 陈芳有, 等. 没药化学成分及抗炎活性研究[J]. 中草药, 2023, 54(9):2716-2721.
- [3] 周海燕, 杜杰, 白杨, 等. 经典名方中没药的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(10):123-129.
- [4] Galindo C M, Oliveira Ganzella F A, Klassen G, et al. Nuances of PFKFB3 signaling in breast cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2022, 22(4):604-614.
- [5] Zhang S, Wang X, Zhang R, et al. A GLUT1 inhibitor-based fluorogenic probe for Warburg effect-targeted drug screening and diagnostic imaging of hyperglycolytic cancers[J]. Anal Chim Acta, 2021, 1167(6):338593.
- [6] Pan B S, Hsu C C, Wu H E, et al. Glucose metabolism and its direct action in cancer and immune regulation: opportunities and challenges for metabolic targeting[J]. J Biomed Sci, 2025, 32(1):71.
- [7] Varma G, Seth P, Coutinho De Souza P, et al. Visualizing the effects of lactate dehydrogenase (LDH) inhibition and LDH-A genetic ablation in breast and lung cancer with hyperpolarized pyruvate NMR[J]. NMR Biomed, 2021, 34(8):4560-4571.
- [8] 杨雨婷, 曾瑾, 陈平, 等. 西黄丸抗肿瘤临床应用及药理作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3):250-258.
- [9] 李梦宜, 张磊, 王立军, 等. 西黄丸/胶囊辅助放疗和(或)化疗治疗消化道恶性肿瘤有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 中医杂志, 2025, 66(9):912-919.
- [10] 申国园, 张春泽. 西黄丸调控肿瘤相关信号通路的分子机制研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2026, 32(2):290-294.
- [11] 郑明瑜, 王洋, 彭友飞, 等. 经典名方西黄丸抑制小鼠乳腺癌细胞肺转移的转录组学分析[J/OL]. 中华中医药学刊, 2026, 1-9. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20260325.1617.012>.
- [12] 龚婕, 周瑶, 邓显光, 等. “乳香-没药”药对对乳腺增生大鼠乳腺组织 Cyclin D1、Cyclin D2、ER α 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(6):1352-1356.
- [13] 刘东晓, 刘亚鑫, 黄惠铭, 等. 没药倍半萜化合物 M36 抑制人肝癌细胞生长的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5):80-87.
- [14] 夏黄帅, 余卓伦, 张其海, 等. 没药甾酮下调 PXR/P-gp 通路逆转肝癌化疗耐药机制[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(5):684-691.
- [15] 余卓伦, 张其海, 樊昊雯, 等. 没药甾酮通过调控 mTOR/自噬通路增强替莫唑胺抗脑胶质瘤的作用研究[J]. 中药材, 2023, 46(2):462-468.
- [16] 姜继军, 高宁. CircRNA 调控肿瘤代谢重编程的研究进展[J]. 遵义医科大学学报, 2026, 49(4):444-455.
- [17] Dai C Y, Wang L H. Glycolysis enzymes and cellular lactylation in tumour[J]. Clin Transl Med, 2026, 16(2):e70549.

[收稿 2025-07-01;修回 2026-05-18]

(编辑:王福军)