

黄卡瓦胡椒素 B 下调雄激素受体对三阴性乳腺癌增殖和迁移的影响

杨忠云, 吴婷, 李雪森*

西南医科大学基础医学院肿瘤医学研究所, 四川泸州 646000

[中图分类号] R737.9 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0527.2023.0823

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 杨忠云, 吴婷, 李雪森. 黄卡瓦胡椒素 B 下调雄激素受体对三阴性乳腺癌增殖和迁移的影响[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(8): 930-938.

[收稿日期] 2023-04-11 [录用日期] 2023-06-27 [上线日期] 2023-08-23

[摘要] **目的** 探讨黄卡瓦胡椒素 B(FKB)下调雄激素受体(AR)对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞增殖和迁移的影响。**方法** 基于 GEPIA2 数据库分析乳腺癌组织及正常乳腺组织中 AR 的表达情况。采用 Western blotting 检测 6 种乳腺癌细胞系 (SUM159PT、MCF-7、T47D、BT474、Hs-578T 和 MDB-MA-231) 中雌激素受体(ER)、人表皮生长因子受体 2(HER2)、孕激素受体(PR)和 AR 蛋白的表达情况。在正常或雄激素剥夺条件下, 使用 CCK-8 法检测不同浓度(0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) FKB 处理不同时间(24、48、72 h)对 SUM159PT 细胞增殖活性的影响。利用 30 $\mu\text{mol/L}$ FKB 处理 SUM159PT 细胞 0、4 和 8 h 后, 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 AR mRNA 及蛋白的表达情况。在雄激素剥夺的条件下, 取 SUM159PT 细胞设置对照组(0.1% DMSO 处理)、二氢睾酮(DHT)组(10 nmol/L DHT 处理)、FKB 组(15 $\mu\text{mol/L}$ FKB 处理)、DHT+FKB 组(10 nmol/L DHT+15 $\mu\text{mol/L}$ FKB 处理)、恩杂鲁胺(ENZA)组(40 $\mu\text{mol/L}$ ENZA 处理)及 DHT+ENZA 组(10 nmol/L DHT+40 $\mu\text{mol/L}$ ENZA 处理)。采用 CCK-8 法、Transwell 实验和克隆形成实验检测各组细胞增殖、迁移和克隆形成能力, Western blotting 检测各组上皮-间质转化(EMT)相关蛋白(N-cadherin、Occludin、Vimentin)及 AR 蛋白的表达水平。**结果** 乳腺癌组织中 AR mRNA 表达水平明显高于正常乳腺组织($P<0.05$)。除 MDB-MA-231 外, AR 在其他 5 种乳腺癌细胞系 (SUM159PT、MCF-7、T47D、BT474 和 Hs-578T) 中均有表达。FKB 可下调 SUM159PT 细胞中 AR mRNA 和蛋白表达水平 ($P<0.001$)。Western blotting 检测结果显示, DHT 可诱导 SUM159PT 细胞中 AR 蛋白表达水平上调, 而 FKB 抑制 DHT 诱导的 AR 蛋白表达水平上调 ($P<0.01$)。FKB 和 ENZA 均抑制 SUM159PT 细胞的增殖和迁移能力, 并逆转 DHT 诱导的细胞增殖和迁移能力增加 ($P<0.05$)。FKB 和 ENZA 均可降低 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平, 并逆转 DHT 诱导的 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平上调 ($P<0.05$)。此外, FKB 还可增加 Occludin 蛋白的表达, 逆转 DHT 导致的 Occludin 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** FKB 可能通过调节 AR 的表达抑制 TNBC 细胞的增殖、迁移以及克隆形成能力, 从而抑制 TNBC 的进展。

[关键词] 雄激素受体; 黄卡瓦胡椒素 B; 三阴性乳腺癌

Effect of flavokawain B downregulates androgen receptor on the proliferation and migration in triple-negative breast cancer

Yang Zhong-Yun, Wu Ting, Li Xue-Sen*

Institute of Medical Oncology, School of Basic Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China

*Corresponding author, E-mail: xuesen_li@163.com

This work was supported by the Sichuan Provincial Science and Technology Program (2022YFS0623)

[Abstract] **Objective** To investigate how flavokawain B (FKB) affects the proliferation and migration of triple-negative breast cancer (TNBC) cells by downregulating the androgen receptor (AR). **Methods** The expression of AR in breast cancer and normal tissues was analyzed using the GEPIA2 database. Expression of estrogen receptor (ER), human epidermal growth factor

[基金项目] 四川省科技计划联合创新专项(2022YFS0623)

[作者简介] 杨忠云, 硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

[通信作者] 李雪森, E-mail: xuesen_li@163.com

receptor 2 (HER2), progesterone receptor (PR), and AR was detected in six breast cancer cell lines (SUM159PT, MCF-7, T47D, BT474, Hs-578T, and MDB-MA-231) by Western blotting. The effect of FKB (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{mol/L}$) treatment of 24, 48, and 72 h on the proliferative activity of SUM159PT breast cancer cells was assessed using the CCK-8 assay under normal or androgen deprivation conditions. The mRNA and protein of AR expression was measured by qRT-PCR and Western blotting after 30 $\mu\text{mol/L}$ FKB treatment of SUM159PT cells for 0, 4 and 8 h. SUM159PT cells were set as control group (treatment with 0.1% DMSO), dihydrotestosterone (DHT) group (treatment with 10 nmol/L DHT), FKB group (treatment with 15 $\mu\text{mol/L}$ FKB), DHT+FKB group (treatment with 10 nmol/L DHT and 15 $\mu\text{mol/L}$ FKB), AR antagonist enzalutamide (ENZA) group (treatment with 40 $\mu\text{mol/L}$ ENZA), and DHT+ENZA group (treatment with 10 nmol/L DHT and 40 $\mu\text{mol/L}$ ENZA) under androgen deprivation conditions. Cell proliferation, migration, and colony formation abilities in the above groups were determined using the CCK-8 method, Transwell assay, and clone formation test. Western blotting was also used to detect the expression levels of EMT-related proteins (N-cadherin, Occludin, Vimentin) and AR protein. **Results** AR mRNA expression level was significantly higher in breast cancer tissue than in normal breast tissue ($P<0.05$). AR was expressed at comparable levels in five different breast cancer cell lines (SUM159PT, MCF-7, T47D, BT474, and Hs-578T) in addition to MDB-MA-231. FKB can downregulate AR mRNA and protein levels ($P<0.05$). Western blotting results showed that DHT could upregulate AR protein levels in SUM159PT cells, but FKB could prevent the DHT-induced upregulation of AR protein levels ($P<0.05$). FKB and ENZA decreased SUM159PT cell proliferation and migration and DHT-mediated cell proliferation and migration ($P<0.05$). FKB and ENZA can reduce N-cadherin and Vimentin protein levels and counteract DHT-induced increases in N-cadherin and Vimentin protein levels ($P<0.05$). In addition, FKB may increase Occludin expression and counteract the DHT-induced decrease in Occludin protein expression ($P<0.05$). **Conclusion** Flavokawain B could inhibit the proliferation, migration, and clonogenic ability of TNBC cells by regulating AR expression.

[Key words] androgen receptor; flavokawain B; triple-negative breast cancer

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)占乳腺癌的15%~20%^[1],其主要表现为雌激素受体(estrogen receptor, ER)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)的表达均为阴性^[2-3]。相较其他类型的乳腺癌, TNBC具有高侵袭、易转移和易复发的特点^[4-5]。TNBC患者生存率远低于其他类型乳腺癌,且易产生化疗耐药性,预后较差^[6-7]。然而,目前尚未发现有效的TNBC治疗靶点,因此,寻找新的药物靶点对于TNBC的治疗至关重要^[8]。研究发现,10%~43%的TNBC组织表达雄激素受体(androgen receptor, AR)^[9-10],临床试验证实AR抑制剂恩杂鲁胺(enzalutamide, ENZA)可用于治疗乳腺癌^[11],表明AR可能是一种新型的TNBC治疗靶点^[12-13]。黄卡瓦胡椒素B(flavokawain B, FKB)是一种从卡瓦胡椒中提取的有药用价值的化合物,最初被发现可用于治疗焦虑症^[14-15]。进一步研究发现,FKB可通过下调AR的表达来抑制前列腺肿瘤的生长,并减少肿瘤组织中与AR相关的靶基因的表达^[16]。然而,FKB是否能够下调TNBC中AR的表达并抑制TNBC进展尚未明确。本研究探讨FKB下调AR的表达对TNBC细胞增殖、迁移和克隆形成的影响,旨在为AR作为TNBC的治疗靶点以及FKB的药物转化研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 ENZA、FKB、二氢睾酮(DHT;上

海吉至生化科技有限公司); DMEM高糖培养基(美国Cytiva公司); 胎牛血清(美国Hyclone公司); aB-27无血清添加剂(上海白鲨信息科技有限公司); DMEM无酚红高糖培养基(南京维森特生物技术有限公司); 胰蛋白酶消化液(北京索莱宝科技公司); CCK-8试剂盒(美国APEX BIO公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); HER2抗体、ER抗体、PR抗体、AR抗体、N-cadherin抗体、Vimentin抗体、Occludin抗体、GAPDH抗体(美国Cell Signaling Technology公司); 反转录与实时定量反转录PCR(real-time quantitative reverse transcription PCR, real-time qRT-PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息学分析 基于TCGA和GTEx数据库,使用GEPIA2^[17](<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)检索并分析1085个乳腺癌样本和291个正常乳腺样本中RNA测序表达数据,以明确乳腺癌组织及正常乳腺组织中AR的表达情况。阈值设置为 $|\log_2 FC|>1$, $P<0.01$ 。基于癌细胞系百科全书(CCLE)^[18](<https://sites.broadinstitute.org/ccle>)数据库,检索分析乳腺癌细胞中AR的表达情况。

1.2.2 常规细胞培养 人乳腺癌细胞系SUM159PT、MDB-MA-231、T47D、MCF-7、BT474和Hs-578T由西南医科大学肿瘤研究所保存,用含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基于37℃、5%CO₂环境中培养。

1.2.3 雄激素剥夺条件下的细胞培养 在常规细胞

培养液中培养SUM159PT细胞24 h后,将培养液更换为不含酚红的培养基,并添加aB-27血清替代品使其终浓度为0.5倍;细胞经过8 h饥饿处理以排出雄激素,再次更换培养液为不含酚红的培养基,并添加aB-27血清替代品使其终浓度为1.0倍。细胞在37℃、5% CO₂恒温箱中继续培养。

1.2.4 qRT-PCR检测AR mRNA的表达 常规培养SUM159PT细胞24 h后,使用30 μmol/L FKB分别处理0、4、8 h,然后使用Trizol试剂提取细胞总RNA,并使用紫外分光光度计检测RNA浓度,分析其质量。取1 μg RNA反转录为cDNA,采用qRT-PCR检测AR mRNA的表达水平。反应条件:95℃ 30 s(变性);95℃ 5 s、60℃ 34 s(退火),40个循环。以GAPDH为内参照,使用2^{-ΔΔCt}进行相对定量分析。引物由上海生工有限公司合成。引物序列如下:AR,正向:5'-CTGGCTTCCGCAACTTACAC-3',反向:5'-TGGTAGAAGCGTCTTGAGCA-3';GAPDH,正向:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAT-3',反向:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。对照组(0 h)使用0.1% DMSO处理。

1.2.5 Western blotting检测ER、PR、HER2、AR、Occludin、N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平 (1)常规培养SUM159PT细胞24 h后,使用30 μmol/L FKB分别处理0、4和8 h。(2)常规培养SUM159PT、MCF-7、T47D、BT474、Hs-578T和MDB-MA-231细胞24 h。(3)雄激素剥夺条件下培养SUM159PT细胞后,设置对照组(0.1% DMSO处理)、DHT组(10 nmol/L DHT处理)、FKB组(15 μmol/L FKB处理)、DHT+FKB组(10 nmol/L DHT+15 μmol/L FKB处理)、ENZA组(40 μmol/L ENZA处理)及DHT+ENZA组(10 nmol/L DHT+40 μmol/L ENZA处理),加入相应药物处理16 h。

使用含有蛋白酶抑制剂的裂解液裂解上述细胞,提取细胞总蛋白。利用BCA试剂盒检测蛋白浓度,行SDS-PAGE电泳并转膜;以5%牛血清白蛋白作为封闭缓冲液室温封闭膜1 h;加入一抗ER(1:1000)、PR(1:1000)、HER2(1:1000)、AR(1:1000)、Occludin(1:1000)、N-cadherin(1:1000)、Vimentin(1:1000)和GAPDH(1:1000)4℃孵育过夜;加入抗鼠或抗兔二抗常温孵育2 h,采用Odyssey成像仪扫描成像,ImageJ软件进行灰度值分析。

1.2.6 细胞迁移实验 雄激素剥夺条件下培养SUM159PT细胞后,设置对照组(0.1% DMSO处理)、DHT组(10 nmol/L DHT处理)、FKB组(15 μmol/L FKB处理)、DHT+FKB组(10 nmol/L DHT+15 μmol/L FKB处理)、ENZA组(40 μmol/L ENZA处理)及DHT+ENZA组(10 nmol/L DHT+40 μmol/L ENZA处理)。收

集SUM159PT细胞重悬于无血清无酚红培养基中,进行细胞计数并稀释细胞;在Transwell上室中加入100 μl含6×10⁴个细胞的混悬液,并加入100 μl对应实验分组的药物培养基混合溶液;在下室中加入600 μl含20% FBS的细胞培养液,并将Transwell置于37℃、5% CO₂孵箱中孵育16 h。孵育结束后,取出小室,倒掉上室的培养基,PBS洗2次,轻轻用棉签擦去上室的细胞。然后使用70%甲醇固定、晾干、1%结晶紫染色,随机选取3个视野拍照和采集数据,对细胞进行计数并取平均值。

1.2.7 克隆形成实验 雄激素剥夺条件下培养SUM159PT细胞后,设置对照组(0.1% DMSO处理)、DHT组(10 nmol/L DHT处理)、FKB组(5 μmol/L FKB处理)、DHT+FKB组(10 nmol/L DHT+5 μmol/L FKB处理)、ENZA组(40 μmol/L ENZA处理)及DHT+ENZA组(10 nmol/L DHT+40 μmol/L ENZA处理)。为减少细胞活性抑制对细胞克隆能力的影响,该实验选取抑制细胞活性较小的5 μmol/L FKB进行处理。接种SUM159PT细胞于6孔板(8×10³个/孔)中,按照分组处理细胞并每隔2~3 d换液1次。培养10~14 d后,肉眼可见克隆团时终止培养。PBS洗涤细胞后,用70%甲醛溶液固定、1%结晶紫染色(上海碧云天生物技术有限公司),拍照保存。随后使用33%冰乙酸洗脱结晶紫,采用酶标仪检测590 nm波长处的吸光度(OD)值,计算克隆细胞数。实验均独立重复3次。

1.2.8 CCK-8法检测细胞增殖活性 (1)在正常培养条件下,采用CCK-8法检测FKB对SUM159PT细胞增殖活性的影响。接种SUM159PT细胞于96孔板中(1×10⁵个/孔)并培养24 h后,使用不同浓度的FKB(0、10、20、30、40、50、60 μmol/L)处理。每个处理设置5个复孔,于常规培养箱中培养。分别培养24、48、72 h后,采用CCK-8法检测细胞增殖活性。(2)在雄激素剥夺的条件下,采用CCK-8法检测不同浓度(0、2.5、5、10、15、20 μmol/L)FKB处理不同时间(24、48、72 h)对SUM159PT细胞增殖活性的影响,不同浓度(0、10、20、30、40、60 μmol/L)ENZA处理不同时间(24、48、72 h)对SUM159PT细胞增殖活性的影响;取SUM159PT细胞,设置对照组(0.1% DMSO处理)、DHT组(10 nmol/L DHT处理)、FKB组(10 μmol/L FKB处理)、DHT+FKB组(10 nmol/L DHT+10 μmol/L FKB处理)、ENZA组(40 μmol/L ENZA处理)及DHT+ENZA组(10 nmol/L DHT+40 μmol/L ENZA处理),加入相应药物处理24、48、72 h,采用CCK-8法检测细胞增殖活性。

配制含CCK-8试剂的培养液(CCK-8:培养基=1:10)备用。弃去培养基,PBS洗2次;每孔加入100 μl CCK-8溶液,并设置含CCK-8溶液但无细胞的

孔作为空白对照孔；继续培养2h后，采用酶标仪检测450 nm处的OD值，并计算细胞增殖活性。实验独立重复3次。细胞增殖活性(%)=(实验组-空白组)/(对照组-空白组)×100%。对照组使用0.1% DMSO处理。

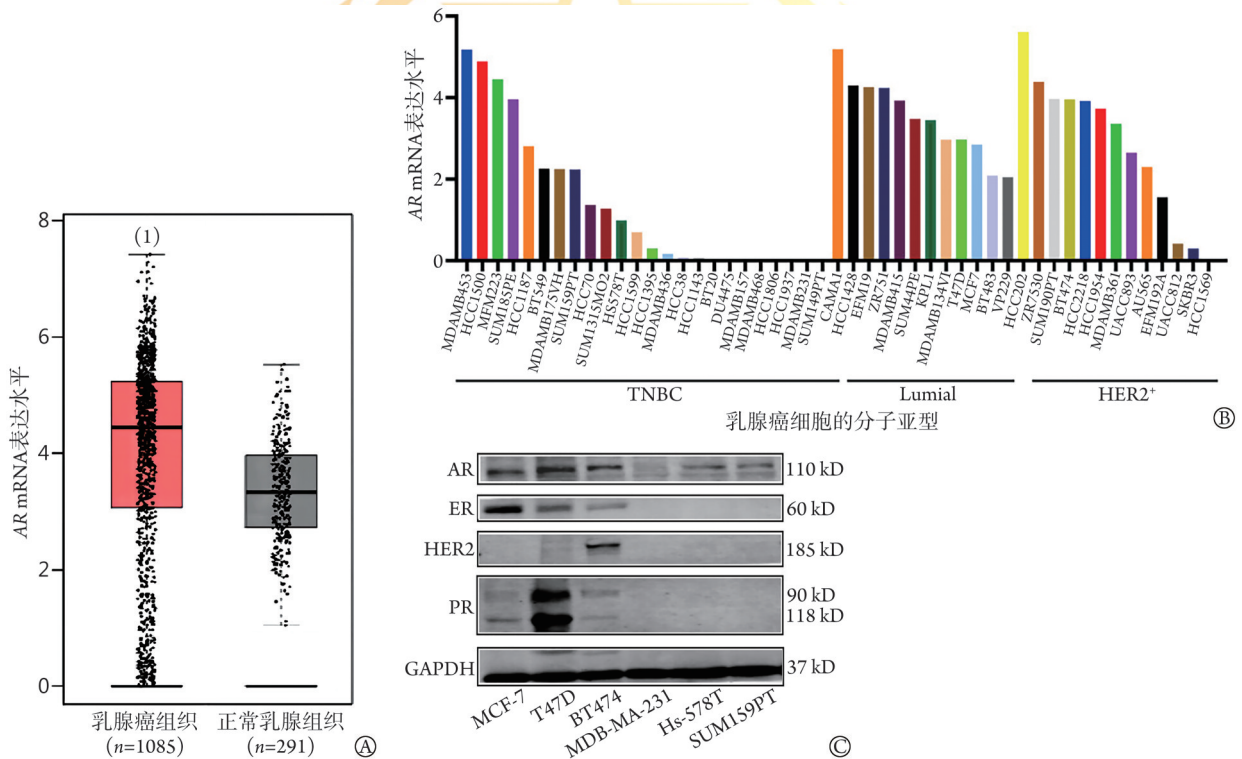
1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism 9软件进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Dunnett's检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AR在乳腺癌中的表达情况 GEPIA2检索分析

结果显示，与正常乳腺组织相比，乳腺癌组织中AR mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$, 图1A)。CCLE数据库分析结果显示，AR在大多数乳腺癌细胞中均有表达，在TNBC中呈偏态分布，且不同细胞之间表达量差异较大；在其余两种亚型(Lumial和HER2⁺)乳腺癌细胞中的表达较均衡，不同细胞之间表达量差异较小(图1B)。

Western blotting检测结果显示，除MDB-MA-231细胞外，AR在其余ER阳性MCF-7、T47D，HER2阳性BT474，以及三阴性Hs-578T、SUM159PT等5种乳腺癌细胞中均有表达(图1C)，在两种三阴性细胞中，AR mRNA在SUM59PT细胞中表达较高，因此选取SUM159PT细胞进行后续实验。



AR, 雄激素受体; ER, 雌激素受体; HER2, 人表皮生长因子受体2; PR, 孕激素受体; TNBC, 三阴性乳腺癌; A, GEPIA2数据库分析乳腺癌组织和正常乳腺组织中AR mRNA表达情况; B, CCLE数据库分析乳腺癌细胞中AR mRNA表达情况; C, Western blotting检测不同乳腺癌细胞中AR蛋白的表达情况($n=3$); 与正常乳腺组织比较, (1) $P < 0.05$

图1 AR在乳腺癌中的表达情况

Fig.1 Expression of AR in breast cancer

2.2 FKB对AR的表达及SUM159PT细胞增殖活性的影响 CCK-8法检测结果显示，FKB以浓度和时间依赖性抑制SUM159PT细胞的增殖活性。FKB处理24、48、72 h的IC₅₀值分别为44.36、13.92、10.06 μmol/L(图2A)。30 μmol/L FKB处理对细胞增殖活性有一定抑制作用，但对细胞状态没有明显影响，因此选择30 μmol/L FKB进行后续实验。

qRT-PCR检测结果显示，与处理0 h相比，30 μmol/L FKB处理4 h后，SUM159PT细胞中AR

mRNA表达水平降低60%；处理8 h后，SUM159PT细胞中AR mRNA表达水平降低84%($P < 0.001$, 图2B)。

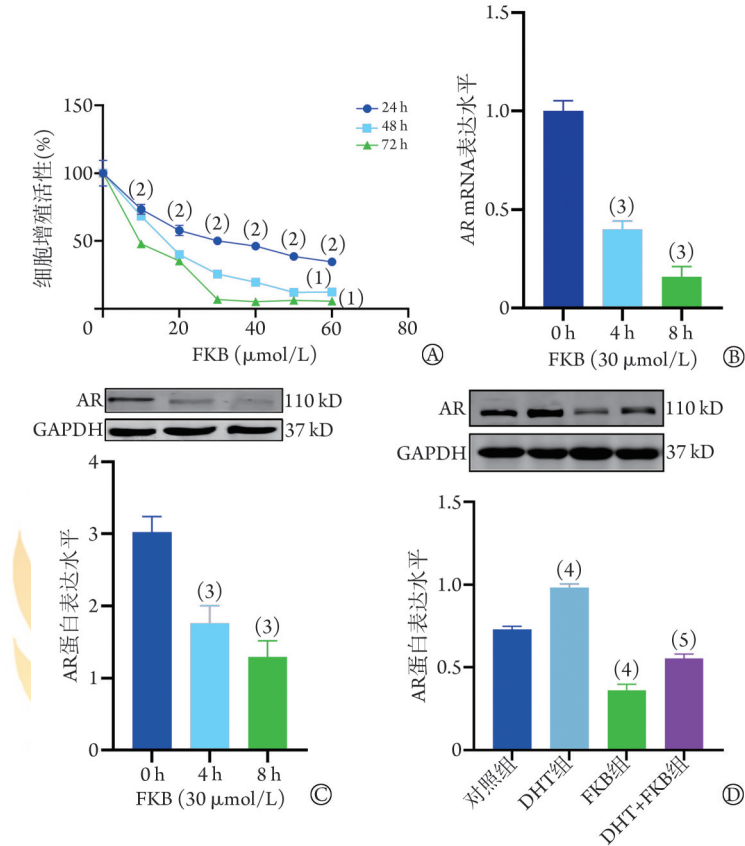
Western blotting检测结果显示，与处理0 h相比，30 μmol/L FKB处理4 h后，SUM159PT细胞中AR蛋白表达水平降低41%；处理8 h后，SUM159PT细胞中AR蛋白表达水平降低57%($P < 0.001$, 图2C)。

在雄激素剥夺的条件下，与对照组相比，DHT组SUM159PT细胞中AR蛋白表达水平增高($P < 0.01$)；与DHT组相比，DHT+FKB组SUM159PT细胞中AR

蛋白表达水平降低($P<0.01$, 图2D)。

2.3 FKB抑制AR的表达对SUM159PT细胞增殖活性和克隆形成能力的影响 CCK-8法检测结果显示,在雄激素剥夺的条件下,不同浓度(0、2.5、5、10、

15、20 $\mu\text{mol/L}$)FKB处理24、48、72 h后, SUM159PT细胞增殖活性均受到明显抑制,且呈浓度和时间依赖性($P<0.05$, 图3A)。FKB处理24、48、72 h的 IC_{50} 值分别为24.8、16.1和13.6 $\mu\text{mol/L}$ 。



AR. 雄激素受体; FKB. 黄卡瓦胡椒素B; DHT. 二氢睾酮; A. 不同时间(24、48、72 h)不同浓度(0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) FKB处理对SUM159PT细胞增殖活性的影响; B. FKB对SUM159PT细胞中AR mRNA表达的影响; C. FKB对SUM159PT细胞中AR蛋白表达的影响; D. 在雄激素剥夺的条件下, FKB(15 $\mu\text{mol/L}$)和DHT(10 nmol/L)单独或共同处理SUM159PT细胞16 h后, Western blotting检测AR蛋白的表达。与处理24 h比较, (1) $P<0.001$; 与0 $\mu\text{mol/L}$ FKB比较, (2) $P<0.001$; 与处理0 h比较, (3) $P<0.001$; 与对照组比较, (4) $P<0.01$; 与DHT组比较, (5) $P<0.01$

图2 FKB对SUM159PT细胞增殖活性及AR表达的影响($n=3$)

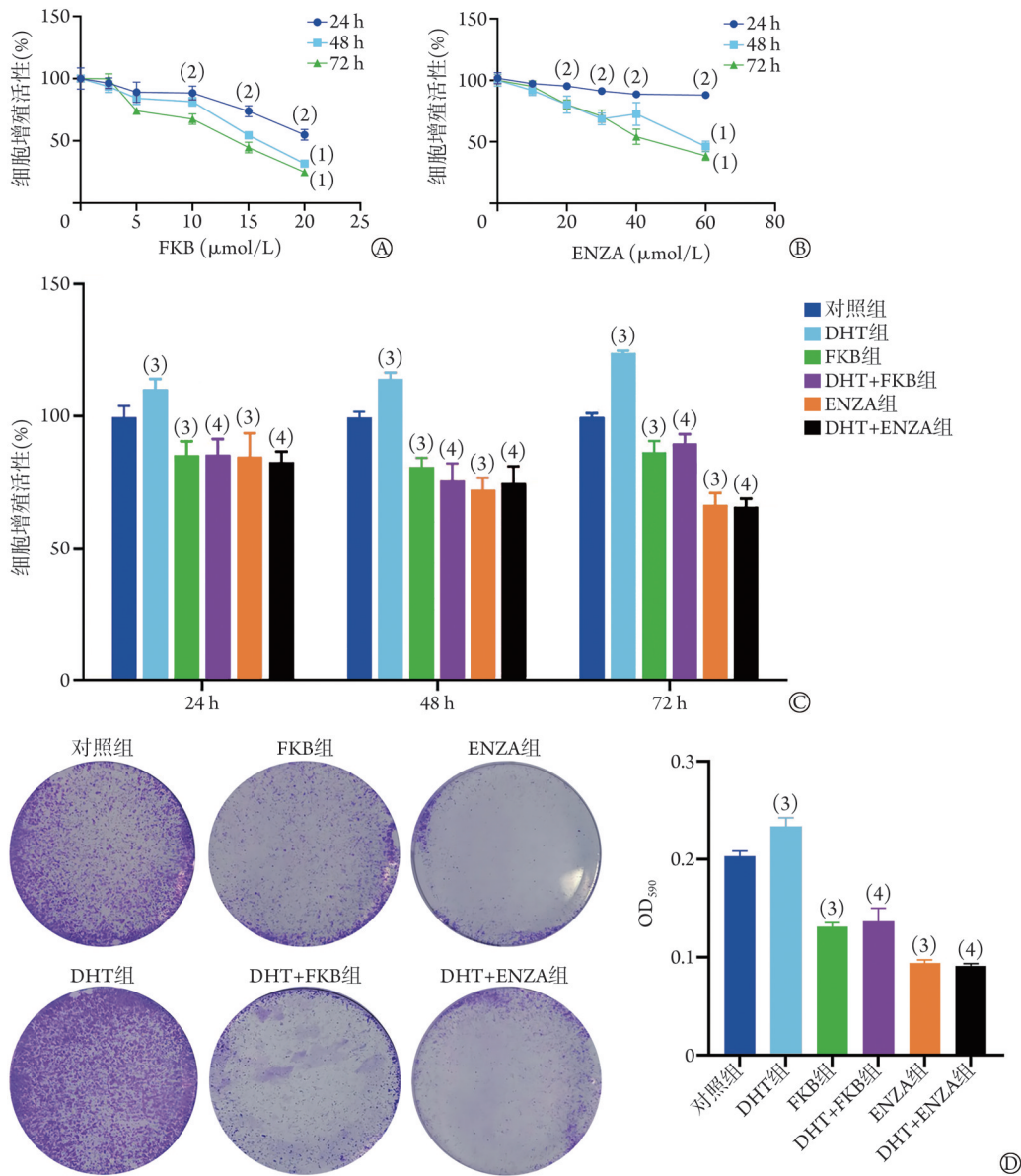
Fig.2 Effect of FKB on proliferative activity and the expression of AR in SUM159PT cells ($n=3$)

在雄激素剥夺的条件下,不同浓度(0、10、20、30、40、60 $\mu\text{mol/L}$)ENZA处理SUM159PT细胞,处理24 h时 IC_{50} 值超出其线性范围,处理48、72 h的 IC_{50} 值分别为58.07、47.86 $\mu\text{mol/L}$ (图3B)。

CCK-8法检测结果显示,处理24 h、48 h和72 h, DHT组SUM159PT细胞增殖活性明显高于对照组,FKB组与ENZA组SUM159PT细胞增殖活性明显低于对照组($P<0.05$); DHT+FKB组和DHT+ENZA组SUM159PT细胞增殖活性明显低于DHT组($P<0.05$, 图3C)。克隆形成实验结果显示, DHT组SUM159PT细胞克隆数明显多于对照组,FKB组和ENZA组SUM159PT细胞克隆数明显少于对照组($P<0.05$); DHT+FKB组和DHT+ENZA组SUM159PT细胞克隆数明显少于DHT组($P<0.05$, 图3D)。

2.4 FKB抑制AR的表达对SUM159PT细胞迁移的影响 Transwell实验结果显示, DHT组迁移细胞数明显多于对照组,FKB组和ENZA组迁移细胞数明显少于对照组($P<0.05$); DHT+FKB组和DHT+ENZA组迁移细胞数明显少于DHT组($P<0.05$, 图4A)。

Western blotting检测结果显示, DHT激活AR可使N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), Occludin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与对照组比较, FKB组和ENZA组N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), FKB组Occludin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),而ENZA组Occludin蛋白表达水平无明显变化($P>0.05$);与DHT组比较, DHT+FKB组及DHT+ENZA组N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), DHT+FKB



FKB. 黄卡瓦胡椒素 B; DHT. 二氢睾酮; AR. 雄激素受体; ENZA. 恩杂鲁胺; A. 在雄激素剥夺的条件下, 不同浓度(0、2.5、5、10、15、20 μmol/L)FKB 处理不同时间(24、48、72 h)对 SUM159PT 细胞增殖活性的影响; B. 在雄激素剥夺的条件下, 不同浓度(0、10、20、30、40、60 μmol/L)ENZA 处理不同时间(24、48、72 h)对 SUM159PT 细胞增殖活性的影响; C. CCK-8 法检测雄激素剥夺的条件下各组 SUM159PT 细胞的增殖活性; D. 克隆形成实验检测在雄激素剥夺的条件下各组 SUM159PT 细胞的克隆形成能力; 与处理 24 h 比较, (1) $P < 0.001$; 与 0 μmol/L FKB 或 ENZA 比较, (2) $P < 0.05$; 与对照组比较, (3) $P < 0.05$; 与 DHT 组比较, (4) $P < 0.05$

图 3 FKB 对 SUM159PT 细胞增殖活性的影响($n=3$)

Fig.3 Effect of FKB on SUM159PT cell proliferative activity ($n=3$)

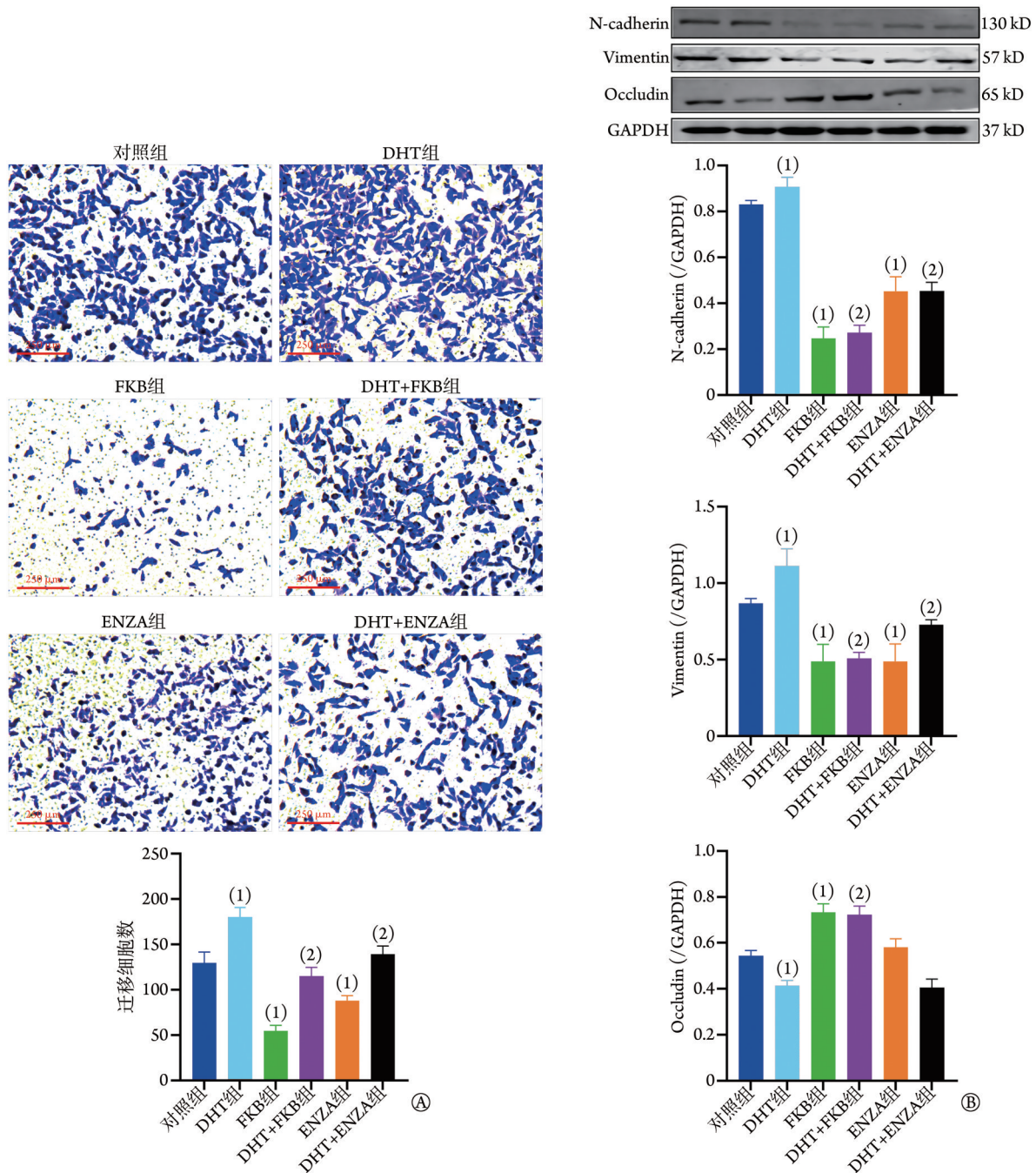
组 Occludin 蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), DHT+FKB 组 Occludin 蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$, 图 4B)。

3 讨论

目前, 乳腺癌已成为威胁全球女性健康的第一大杀手, 其中 TNBC 恶性程度远高于其他类型乳腺癌^[19-23]。AR 在包括乳房在内的多种组织中均有表达^[24], 参与多种生物学过程, 如骨骼和生殖功能的发育和维持, 在女性生育能力和乳房发育中必不可

缺^[25-26]。AR 可直接与 DNA 结合并调节多种基因的转录^[27-28]。

除在前列腺癌中起重要作用外, AR 高表达也与肾癌的低肿瘤分级和早期肾细胞癌相关^[28], 食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)患者中 AR 呈高表达, 且与较短的总生存期(overall survival, OS)和无病生存期密切相关^[29]。利用阻止雄激素产生和(或)阻断 AR 的药物进行雄激素阻断可抑制前列腺癌的生长^[27]。AR 在乳腺癌中广泛表达, 且与 TNBC 预后相关, 因此其是潜在的乳腺癌治疗靶



FKB. 黄卡瓦胡椒素 B; DHT. 二氢睾酮; AR. 雄激素受体; ENZA. 恩杂鲁胺; EMT. 上皮-间质转化; A. 在雄激素剥夺的条件下, Transwell 实验检测各组 SUM159PT 细胞的迁移能力; B. 在雄激素剥夺的条件下, Western blotting 检测各组 SUM159PT 细胞中 EMT 相关标志物蛋白的表达情况($n=3$); 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 DHT 组比较, (2) $P<0.05$

图 4 DHT、FKB 和 ENZA 单独或与 DHT 联用对 SUM159PT 细胞迁移能力的影响

Fig. 4 Effect of DHT, FKB and ENZA alone or in combination with DHT on the migratory activity of SUM159PT cells

点^[29]。AR 抑制剂 ENZA 可使 TNBC 患者的临床获益率 (clinical benefit rate, CBR) 提高至 33%, 并改善 AR 阳性 TNBC 患者的中位无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 和 OS^[11]。

FKB 提取自卡瓦胡椒的根部, 是一种天然的查耳酮类化合物^[14,30]。FKB 可下调 AR 及其靶基因 (PSA 和 *TMPRSS2*) 的表达, 同时降低 Sp1 蛋白的表达, 导致 AR 转录水平下调^[16]。既往临床前研究发现, 雄激

素可导致表达 AR 的乳腺癌细胞增殖, 并促进动物模型中的肿瘤形成[该动物模型不添加致癌物质, 使用睾酮 (T) 联合 17 β -雌二醇 (E₂) 在几个月内即可诱发乳腺癌]^[31]; 而 FKB 可抑制乳腺癌细胞的增殖活性^[32]。有动物研究发现, 降解 AR 蛋白可抑制小鼠体内异种移植物的生长^[33]。Anestis 等^[34]发现, ENZA 可抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的生长, 也可抑制 DHT 介导的乳腺癌细胞生长; AR 抑制剂比卡鲁胺可降低

TNBC中AR的表达,并具有抗增殖作用^[35]。本研究结果显示,FKB和ENZA可抑制DHT促进的SUM159PT细胞增殖活性和克隆形成能力。FKB和ENZA在功能上具有相似的作用,均通过作用于AR抑制SUM159PT细胞的增殖活性和克隆形成能力。值得注意的是,DHT具有激活AR的作用,与FKB和ENZA的作用方式可能不同。

由于AR的表达与OS有关,因此AR有利于乳腺癌的发展和侵袭^[36]。AR可促进TNBC细胞的存活以及侵袭相关基因的表达,从而促进转移^[35]。本研究发现,FKB与AR抑制剂ENZA类似^[37-38],均可抑制SUM159PT细胞的迁移。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤细胞迁移及侵袭密切相关^[39-40],其中上皮型标志物紧密连接蛋白(Occludin)表达下调可促进EMT的发生,从而促进肿瘤细胞转移^[41];间质型标志物N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)表达下调可抑制EMT的发生,从而抑制肿瘤细胞转移^[42-43]。DHT激活的AR可与去甲基酶LSD1相互作用,抑制AR阳性MCF7乳腺癌细胞中E-cadherin转录,并激活Vimentin转录,导致EMT发生,最终促进癌症转移^[29]。研究发现,AR抑制剂ENZA可通过抑制细胞迁移和增殖,影响细胞迁移相关蛋白的表达,从而影响细胞生长^[34]。本研究发现,FKB通过影响Occludin、N-cadherin和Vimentin蛋白的表达从而影响细胞迁移,提示DHT可诱导细胞迁移,而FKB和ENZA可抑制细胞迁移,同时可抑制DHT诱导的细胞迁移。

ENZA可与AR结合,竞争性抑制AR的活性,因此容易受到AR突变的影响,ENZA对AR剪接变异体7(androgen receptor splice variant-7, AR-V7)具有明显的耐药性^[44]。FKB可下调全长AR和AR-V7的表达^[16],从而下调AR mRNA和蛋白水平,进而避免AR突变产生的耐药性。本研究发现,SUM159PT细胞中,FKB IC₅₀值及抑制AR活性的浓度均低于ENZA。研究发现,FKB可在体内抑制前列腺癌、骨肉瘤和胆管癌等多种癌细胞的生长^[16,45-46]。因此,FKB具有治疗AR⁺TNBC的潜力,有望成为一种治疗AR⁺TNBC的化疗药物。此外,FKB也被用于治疗焦虑症,并被列入《美国药典》中^[15]。FKB应用于乳腺癌的治疗中,还需对其剂量、给药方案以及治疗持续时间等参数进行优化。因此,将FKB引入临床试验以治疗TNBC仍任重道远。多项研究发现,FKB可与其他药物联合治疗癌症,从而起到协同作用^[46-47],因此,未来研究应深入探索FKB在TNBC发生发展中的确切作用,并研究FKB与其他治疗手段的联合应用,以期提高治疗效果。

综上所述,本研究结果表明,FKB可抑制高表达AR的TNBC细胞的增殖、克隆形成和迁移,其机制可能与FKB抑制AR的表达有关,为高表达AR的TNBC的治疗提供了一种新的策略和方向。但本研究仍存在不足之处:(1)仅基于细胞层面,缺乏对乳腺癌实体瘤和动物模型的实验验证;(2)仅初步证实FKB通过调节AR的表达来抑制TNBC细胞的恶性进展,仍需要进一步深入探讨FKB抑制乳腺癌细胞生物学活性与AR表达之间的关系。

【参考文献】

- [1] Denkert C, Liedtke C, Tutt A, *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies[J]. *Lancet*, 2017, 389(10087): 2430-2442.
- [2] Bartsch R, Ziebermayr R, Zielinski CC, *et al.* Triple-negative breast cancer[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2010, 160(7-8): 174-181.
- [3] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- [4] Hwang SY, Park S, Kwon Y. Recent therapeutic trends and promising targets in triple negative breast cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 199: 30-57.
- [5] 路延芹,蔡海峰,黄豆霖,等.三阴性乳腺癌患者雌激素相关受体 α 表达情况及其临床意义分析[J]. *临床军医杂志*, 2022, 50(10): 1094-1096.
- [6] Loibl S, Poortmans P, Morrow M, *et al.* Breast cancer[J]. *Lancet*, 2021, 397(10286): 1750-1769.
- [7] Abdelhakiem MK, Johnstone C, Bergom C, *et al.* The influence of breast cancer subtype on survival after palliative radiation for osseous metastases[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(23): 8979-8988.
- [8] Zhou DD, WQ Bai, XT Zhai, *et al.* Excellent effects and possible mechanisms of action of a new antibody-drug conjugate against EGFR⁺ triple⁻negative breast cancer[J]. *Military Med. Res.*, 2022, 9(4): 419-431.
- [9] Coussy F, Lavigne M, de Koning L, *et al.* Response to mTOR and PI3K inhibitors in enzalutamide-resistant luminal androgen receptor triple-negative breast cancer patient-derived xenografts[J]. *Theranostics*, 2020, 10(4): 1531-1543.
- [10] 陈俊青,陈占红,王晓稼.三阴性乳腺癌雌激素受体靶向治疗的研究进展[J]. *肿瘤学杂志*, 2018, 24(5): 499-503.
- [11] Traina TA, Miller K, Yardley DA, *et al.* Enzalutamide for the treatment of androgen receptor-expressing triple-negative breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(9): 884-890.
- [12] Li D, Zhou W, Pang J, *et al.* A magic drug target: androgen receptor[J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(5): 1485-1514.
- [13] Venema CM, Bense RD, Steenbruggen TG, *et al.* Consideration of breast cancer subtype in targeting the androgen receptor[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 200: 135-147.
- [14] Phang CW, Karsani SA, Sethi G, *et al.* Flavokawain C inhibits cell cycle and promotes apoptosis, associated with endoplasmic reticulum stress and regulation of MAPKs and Akt signaling pathways in HCT 116 human colon carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148775.
- [15] 王济滩. Flavokawain B通过ATF4/DDIT3/TRIB3/AKT/MTOR/RPS6KB1信号通路调控胶质母细胞瘤自噬、衰老与

- 凋亡的机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [16] Li X, Liu Z, Xu X, *et al.* Kava components down-regulate expression of AR and AR splice variants and reduce growth in patient-derived prostate cancer xenografts in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31213.
- [17] Tang Z, Kang B, Li C, *et al.* GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W556-W560.
- [18] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, *et al.* The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity[J]. *Nature*, 2012, 483(7391): 603-637.
- [19] Polyak K. Breast cancer: origins and evolution[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(11): 3155-3163.
- [20] Abu Bakar A, Akhtar MN, Mohd Ali N, *et al.* Design, synthesis and docking studies of Flavokawain B type chalcones and their cytotoxic effects on MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines[J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 616.
- [21] Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406(6797): 747-752.
- [22] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10869-10874.
- [23] 宫文晔, 洪陈彦, 钟钰婷, 等. 非哺乳期乳腺炎临床特征及诊疗研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(12): 1478-1485.
- [24] Jinna N, Jovanovic-Talisman T, Labarge M, *et al.* Racial disparity in quadruple negative breast cancer: aggressive biology and potential therapeutic targeting and prevention[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(18): 4484.
- [25] Chen JF, Lin PW, Tsai YR, *et al.* Androgens and androgen receptor actions on bone health and disease: from androgen deficiency to androgen therapy[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1318.
- [26] Walters KA, Simanainen U, Handelsman DJ. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models[J]. *Hum Reprod Update*, 2010, 16(5): 543-558.
- [27] Tan MH, Li J, Xu HE, *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(1): 3-23.
- [28] Gucalp A, Traina TA. Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor[J]. *Cancer J*, 2010, 16(1): 62-65.
- [29] Feng J, Li L, Zhang N, *et al.* Androgen and AR contribute to breast cancer development and metastasis: an insight of mechanisms[J]. *Oncogene*, 2017, 36(20): 2775-2790.
- [30] Wang J, Qi Q, Zhou W, *et al.* Inhibition of glioma growth by flavokawain B is mediated through endoplasmic reticulum stress induced autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 2007-2022.
- [31] Wong YC, Xie B. The role of androgens in mammary carcinogenesis[J]. *Ital J Anat Embryol*, 2001, 106(2 Suppl 1): 111-125.
- [32] 唐颖, 李雪森. 黄卡瓦胡椒素 B 抑制 HER2 阳性乳腺癌细胞增殖的作用机制[J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(9): 919-924.
- [33] Zhao L, Han X, Lu J, *et al.* A highly potent PROTAC androgen receptor (AR) degrader ARD-61 effectively inhibits AR-positive breast cancer cell growth *in vitro* and tumor growth *in vivo*[J]. *Neoplasia*, 2020, 22(10): S22-S32.
- [34] Anestis A, Sarantis P, Theocharis S, *et al.* Estrogen receptor beta increases sensitivity to enzalutamide in androgen receptor-positive triple-negative breast cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2019, 145(5): 1221-1233.
- [35] Cuenca-López MD, Montero JC, Morales JC, *et al.* Phospho-kinase profile of triple negative breast cancer and androgen receptor signaling[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 302.
- [36] You CP, Leung MH, Tsang WC, *et al.* Androgen receptor as an emerging feasible biomarker for breast cancer[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(1): 72.
- [37] Caiazza F, Murray A, Madden SF, *et al.* Preclinical evaluation of the AR inhibitor enzalutamide in triple-negative breast cancer cells[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2016, 23(4): 323-334.
- [38] Wu X, Feng W, Yang M, *et al.* HC-1119, a deuterated enzalutamide, inhibits migration, invasion and metastasis of the AR-positive triple-negative breast cancer cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(10): 9231-9240.
- [39] Liao S, Yu C, Liu H, *et al.* Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of lung cancer cells and regulates the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin[J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 4099-4107.
- [40] Padmanaban V, Krol I, Suhail Y, *et al.* E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer[J]. *Nature*, 2019, 573(7774): 439-444.
- [41] Jung YY, Mohan CD, Eng H, *et al.* 2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine targets epithelial-mesenchymal transition by abrogating manganese superoxide dismutase expression and TGFβ-driven signaling cascades in colon cancer cells[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 891.
- [42] Tang Y, Zhao Y, Ran J, *et al.* MicroRNA-21 promotes cell metastasis in cervical cancer through modulating epithelial-mesenchymal transition[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(4): 3289-3295.
- [43] Corso G, Figueiredo J, de Angelis SP, *et al.* E-cadherin deregulation in breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 5930-5936.
- [44] Antonarakis ES, Lu C, Wang H, *et al.* AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(11): 1028-1038.
- [45] Ji T, Lin C, Krill LS, *et al.* Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 55.
- [46] Son JH, Choi YH, Lee SH, *et al.* Flavokawain B inhibits growth of cholangiocarcinoma cells by suppressing the Akt pathway[J]. *In Vivo*, 2023, 37(3): 1077-1084.
- [47] Hseu YC, Lin RW, Shen YC, *et al.* Flavokawain B and Doxorubicin Work Synergistically to Impede the Propagation of Gastric Cancer Cells via ROS-Mediated Apoptosis and Autophagy Pathways[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(9): 2475.

(责任编辑: 纪方方)