◆实验研究◆

姜黄素调控Yes相关蛋白1对子宫内膜癌Warburg效应及生物学行为的影响

胡颜霞，宋晓霞，张喜红

郑州人民医院妇科，河南 郑州 450052

［摘要］**目的：**观察姜黄素调控Yes相关蛋白1（YAP1）对子宫内膜癌糖酵解Warburg效应及生物学行为的影响。**方法：**将HEC-1B细胞分为对照组、NC-YAP1组、si-YAP1组及低、中、高剂量组。对照组不做任何处理，NC-YAP1组转染NC-YAP1质粒，si-YAP1组转染si-YAP1质粒，低、中、高剂量组细胞分别用20、40、80 μmol/L的姜黄素处理。试剂盒检测各组细胞葡萄糖消耗量及乳酸含量；CCK-8法检测各组细胞增殖能力；流式细胞术检测各组细胞周期与凋亡；划痕法检测各组细胞迁移能力；Transwell法检测各组细胞侵袭能力。蛋白质印迹（Western blot）法检测YAP1、乳酸脱氢酶-A（LDH-A）、己糖激酶2（HK2）、丙酮酸激酶2（PKM2）蛋白表达。**结果：**与对照组比较，NC-YAP1组YAP1蛋白相对表达水平、乳酸含量及葡萄糖消耗量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、细胞增殖抑制率、G0/G1期比例及S期比例、细胞凋亡率、划痕愈合率、细胞侵袭抑制率差异均无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1组及低、中、高剂量组YAP1蛋白相对表达水平、葡萄糖消耗量及乳酸含量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、S期比例、划痕愈合率均降低（$P<0.05$），细胞增殖抑制率、G0/G1期比例、细胞凋亡率、细胞侵袭抑制率均升高（$P<0.05$）。与NC-YAP1组比较，si-YAP1组及低、中、高剂量组细胞YAP1蛋白相对表达水平、葡萄糖消耗量及乳酸含量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、S期比例、划痕愈合率均降低（$P<0.05$），细胞增殖抑制率、G0/G1期比例、细胞凋亡率细胞侵袭抑制率均升高（$P<0.05$），且低、中、高剂量组上述指标均呈剂量依赖性（$P<0.05$）。与si-YAP1组比较，低、中剂量组细胞中YAP1蛋白相对表达水平均增加（$P<0.05$），而高剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$）；低剂量组葡萄糖消耗量及乳酸分泌量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、S期比例、划痕愈合率均增加（$P<0.05$），细胞增殖抑制率、G0/G1期比例、细胞凋亡率、细胞侵袭抑制率均降低（$P<0.05$），高剂量组葡萄糖消耗量及乳酸分泌量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、S期比例、划痕愈合率均降低（$P<0.05$），细胞增殖抑制率、G0/G1期比例、细胞凋亡率、细胞侵袭抑制率增加（$P<0.05$），而中剂量组乳酸含量及葡萄糖消耗量、LDH-A、HK2、PKM2蛋白水平、细胞增殖抑制率、G0/G1期比例及S期比例、细胞凋亡率、划痕愈合率、细胞侵袭抑制率差异均无统计学意义（$P>0.05$）。**结论：**姜黄素可能通过抑制YAP1表达抑制子宫内膜癌细胞的Warburg效应、增殖、迁移及侵袭等恶性行为。

［关键词］子宫内膜癌；姜黄素；Yes相关蛋白1；Warburg效应

［中图分类号］R285.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2024）05-0207-09

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2024.05.038

［收稿日期］2023-02-27
［修回日期］2023-12-06
［基金项目］河南省重点科技攻关项目（162102310233）
［作者简介］胡颜霞（1975-），女，副主任医师，E-mail：he_wzh@163.com。
［通信作者］张喜红（1966-），女，主任医师，E-mail：xihong_zh@163.com。

Effects of Curcumin Regulating Yes-Associated Protein 1 on Warburg Effect and Biological Behaviors of Patients with Endometrial Carcinoma

HU Yanxia, *SONG Xiaoxia*, *ZHANG Xihong*

Department of Gynecology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou Henan 450052, China

Abstract: Objective: To observe the effects of curcumin regulating Yes-associated protein 1 (YAP1) on the Warburg effect of endometrial carcinoma glycolysis and on biological behaviors. **Methods:** The HEC-1B cells were divided into the control group, the NC-YAP1 group, the si-YAP1 group, and the low-dose, medium-dose and high-dose of curcumin groups. The control group was not given any treatment; the NC-YAP1 group was transfected with NC-YAP1 plasmid; the si-YAP1 group was transfected with si-YAP1 plasmid, and the low-dose, medium-dose and high-dose of curcumin groups were respectively treated with 20, 40 and 80 μmol/L curcumin. The consumption of glucose by cells and the lactic acid content in each group were detected by kits; the reproductive capacity of cells in each group was detected by the CCK-8 method; the cell cycle and apoptosis in each group were detected by flow cytometry; the cell migration ability in each group was detected by scratch test, and the cell invasion ability in each group was detected by Transwell method. The protein expressions of YAP1, lactate dehydrogenase-A (LDH-A), hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2) were detected by the Western blot method. **Results:** There was no significance being found in the comparisons of protein expression levels of YAP1, lactic acid content, consumption of glucose, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity and inhibition rates of cell proliferation, ratios of G0/G1 phase and S phase, apoptosis rates, scratch healing rates, and inhibition rates of cell invasion between the NC-YAP1 group and the control group ($P > 0.05$). Compared with those in the control group, the protein expression levels of YAP1, consumption of glucose, lactic acid content, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity of cell proliferation, ratios of S phase and scratch healing rates in the si-YAP1 group and the low-dose, medium-dose and high-dose of curcumin groups were decreased ($P < 0.05$), and the inhibition rates of cell proliferation, ratios of G0/G1 phase, apoptosis rates and inhibition rates of cell invasion were increased ($P < 0.05$). Compared with those in the NC-YAP1 group, the protein expression levels of YAP1, consumption of glucose, lactic acid content, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity of cell proliferation, ratios of S phase and scratch healing rates in the si-YAP1 group and the low-dose, medium-dose and high-dose of curcumin groups were decreased ($P < 0.05$), and the inhibition rates of cell proliferation, ratios of G0/G1 phase, apoptosis rates and inhibition rates of cell invasion were increased ($P < 0.05$); the above indexes in the low-dose, medium-dose and high-dose groups showed dose-dependence ($P < 0.05$). Compared with that in the si-YAP1 group, the protein expression levels of YAP1 in the low-dose and medium-dose of curcumin groups were increased ($P < 0.05$); there was no significance being found in the comparison of protein expression level of YAP1 between the si-YAP1 group and the high-dose of curcumin group ($P > 0.05$). The consumption of glucose, lactic acid content, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity of cell proliferation, ratio of S phase and scratch healing rate in the low-dose of curcumin group were increased ($P < 0.05$), and the inhibition rate of cell proliferation, ratio of G0/G1 phase, apoptosis rate and inhibition rate of cell invasion were decreased ($P < 0.05$). The consumption of glucose, lactic acid content, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity of cell proliferation, ratio of S phase and scratch healing rate in the high-dose of curcumin group were decreased ($P < 0.05$), and the inhibition rate of cell proliferation, ratio of G0/G1 phase, apoptosis rate and inhibition rate of cell invasion

were increased ($P<0.05$). There was no significant difference being found in the comparisons of lactic acid content, consumption of glucose, protein levels of LDH-A, HK2 and PKM2, activity and inhibition rates of cell proliferation, ratios of G0/G1 phase and S phase, apoptosis rates, scratch healing rates, and inhibition rates of cell invasion in the medium-dose of curcumin group ($P>0.05$). **Conclusion**: Curcumin may inhibit such malignant behaviors as Warburg effect, proliferation, migration and invasion of endometrial carcinoma cells by inhibiting the YAP1 expression.

Keywords: Endometrial carcinoma; Curcumin; Yes-associated protein 1; Warburg effect

子宫内膜癌是临床中常见的妇科恶性肿瘤之一，发病率位居妇科恶性肿瘤第二位[1]。子宫内膜癌的发病原因复杂，具体的发病机制目前尚不完全清楚[2]。有氧糖酵解是肿瘤细胞的重要能量代谢特征，又称之为温伯格(Warburg)效应，可以为肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭等生物学行为提供能量进而促进肿瘤的恶性进展[3]。因此，抑制肿瘤细胞的Warburg效应从而抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭也是目前的抗肿瘤治疗研究思路之一。姜黄素是一种从姜科类植物的根颈部提取的多酚类物质，已有大量研究证实姜黄素具有抗肿瘤作用，可抑制包括子宫内膜癌细胞在内的肿瘤细胞增殖，但其在子宫内膜癌中的分子机制目前尚无相关报道[4]。Yes相关蛋白1(YAP1)是启动Hippo信号通路下游信号的转录因子[5]。研究发现，YAP1蛋白参与多种恶性肿瘤的发生进展[6-8]，如胰腺癌、宫颈癌、直肠癌等，且通过调控YAP1蛋白的表达可抑制喉癌细胞的Warburg效应，进而抑制肿瘤细胞的恶性行为[9-10]。研究显示，姜黄素可以通过抑制胰腺癌及肝癌中YAP1蛋白的表达发挥抗癌作用[4]。本研究拟通过实验初步探讨姜黄素是否通过调控YAP1蛋白的表达来抑制子宫内膜癌Warburg效应及增殖、侵袭行为，从而为子宫内膜癌的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器 人子宫内膜癌细胞株HEC-1B(中国科学院上海生物细胞库)。姜黄素(纯度≥98%，美国Sigma公司)；RPMI-1640细胞培养基(美国HyClone公司)；YAP1-siRNA干扰质粒(上海生工生物科技有限公司)；CCK-8试剂盒、乳酸含量检测试剂盒、葡萄糖检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司)；脂质体Lipo2000转染试剂(美国Invitrogen公司)；兔抗人YAP1、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体、兔抗人乳酸脱氢酶-A(LDH-A)、己糖激酶2(HK2)、丙酮酸激酶2(PKM2)单克隆抗体(美国Abcam公司)；山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(上海碧云天公司)。多功能酶标仪(美国Themo公司)；凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)；倒置显微镜(日本OLYMPUS公司)；电泳仪(美国Bio-Rad公司)；流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 细胞培养及分组 将人子宫内膜癌细胞株HEC-1B用含10%FBS、1%双抗(100 U/mL青霉素及100 mg/L链霉素)的RPMI-1640细胞完全培养基置于37 ℃、5%二氧化碳的细胞培养箱中培养。每2～3天换液1次，当细胞生长至90%密度时，0.25%胰酶消化，按照1∶3的比例进行传代培养，取对数生长期的第三代细胞进行后续实验。姜黄素先使用DMSO稀释，再使用完全培养基稀释至成20、40、80 μmoL/L浓度。将培养的HEC-1B细胞分为对照组、NC-YAP1组、si-YAP1组及低、中、高剂量组，其中对照组、NC-YAP1及si-YAP1组转染后给予常规培养基培养，低、中、高剂量组分别给予含20、40、80 μmoL/L姜黄素的培养基进行培养。si-YAP1组转染方法：取对数生长期的细胞经过胰酶消化、洗涤，离心、重悬、铺至6孔板中培养，待细胞生长至70%～80%密度时，取4 μg YAP1-siRNA干扰质粒溶于250 μL无血清培养基中混匀；取10 μL的lipo2000溶于250 μL的无血清培养基中混匀，室温放置5 min，将以上2种混合液混匀室温放置20 min，加入到细胞液中，置于培养箱中继续培养4～6 h，更换为新鲜培养基继续培养。NC-YAP1组仅转染lipo2000空载体。

1.3 Western blot法检测YAP1及Warburg效应相关蛋白表达水平 37 ℃下培养48 h后，收集各组细胞沉淀，RIPA裂解液冰上裂解细胞30 min，4 ℃

12 000 r/min，离心半径 15 cm，离心 15 min，收集各组细胞蛋白，采用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度；取 40 μg 蛋白溶液进行十二烷基苯磺酸钠-聚乙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(80 V 30 min、100 V 90 min)，电泳结束后将蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜，5%脱脂奶粉封闭 2 h，洗膜 3 次，一抗(兔抗 YAP1、GAPDH 多克隆抗体，兔抗 LDH-A、HK2、PKM2 单克隆抗体)4 ℃孵育过夜；二抗(山羊抗兔 IgG 抗体)室温避光孵育 2 h；化学发光(ECL)法进行显色，使用凝胶成像仪拍照观察蛋白的表达情况，采用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行分析，计算各组细胞中蛋白的相对表达量。

1.4 细胞葡萄糖消耗量及乳酸含量检测 分别于培养前和培养 48 h 后，收集各组细胞上清液，参照葡萄糖检测试剂盒说明书检测葡萄糖含量，使用酶标仪在 505 nm 波长处检测吸光度(OD)值，计算各组细胞培养基中葡萄糖消耗量。葡萄糖消耗量=原葡萄糖含量-培养后葡萄糖含量；参照乳酸检测试剂盒说明书进行操作，用酶标仪在 450 nm 处检测各孔的 OD 值后，计算各组细胞培养基中乳酸含量。

1.5 CCK-8 法检测 HEC-1B 细胞增殖活性 各组细胞在 37 ℃下分别培养 24、48、72 h 后，每孔分别加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 2 h，检测各孔细胞在 450 nm 波长的 OD 值，绘制 HEC-1B 细胞的生长曲线并计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率(%)=(对照组 OD 值-观察组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.6 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡率 各组细胞在培养 48 h 后加入胰酶消化，使用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次，留取细胞沉淀，用 PBS 重悬，再加入预冷的 75%乙醇，4 ℃固定 1 h，1 000 r/min 离心 5 min，离心半径 20 cm，收集细胞。再次用 PBS 洗涤及重悬细胞，加入 100 μg/mL 的核糖核酸酶 A(RNaseA) 37 ℃孵育 30 min，再加入 50 μg/mL 碘化丙啶(PI)，4 ℃避光孵育 30 min，过滤后流式细胞术检测各组细胞周期。细胞培养 48 h 后使用胰酶消化处理，PBS 洗涤 2 次后再次重悬细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC(膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素)混匀，4 ℃避光孵育 15 min，再加入 10 μL PI，4 ℃避光孵育 5 min，最后加入 400 μL 缓冲液，上机采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.7 划痕愈合法检测细胞迁移能力 细胞培养过夜，用 10 μL 枪头做划痕愈合实验，PBS 洗去脱落细胞，拍照观察划痕宽度。37 ℃培养 48 h 后，显微镜下拍照确定划痕边缘区域及相对距离，通过 Image J 软件分析各组细胞的迁移距离。计算各组细胞划痕愈合率，划痕愈合率(%)=(0 h 划痕距离-48 h 划痕距离)/0 h 划痕距离×100%。

1.8 Transwell 法检测细胞侵袭能力 用预冷 RPMI1640 培养基按照 1∶8 的比例稀释 Matrigel 基质胶，取稀释液 50 μL 加到 Transwell 小室，置于 37 ℃培养箱 2 h 待凝固。取 400 μL 细胞悬液加入到小室中，各组加入相应剂量的药物处理，下室加入 600 μL 完全培养基，37 ℃培养 48 h。取出小室，擦除未过膜的细胞后用多聚甲醛固定，1%结晶紫染色后，在显微镜下随机取 5 个视野拍照。计算各组细胞侵袭抑制率。细胞侵袭抑制率(%)=(对照组穿膜细胞数-观察组穿膜细胞数)/对照组穿膜细胞数×100%。

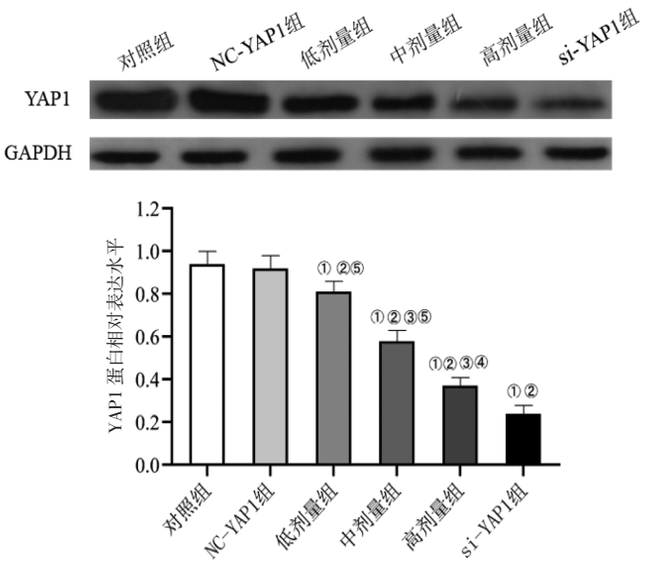
1.9 统计学方法 使用 SPSS22.0 统计学软件分析数据。计量资料且呈正态分布运用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间数据比较使用单因素方差分析，2 组间比较采用独立样本 t 检验，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 YAP1 蛋白相对表达水平比较 见图 1。与对照组比较，NC-YAP1 组 YAP1 蛋白相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)，si-YAP1 组及低、中、高剂量组细胞 YAP1 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$)；与 NC-YAP1 组比较，si-YAP1 组及低、中、高剂量组细胞 YAP1 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$)，且低、中、高剂量组细胞中 YAP1 蛋白表达水平呈梯度降低($P<0.05$)；与 si-YAP1 组比较，低、中剂量组细胞中 YAP1 蛋白相对表达水平均增加($P<0.05$)，而高剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组细胞乳酸含量及葡萄糖消耗量比较 见表 1。与对照组比较，NC-YAP1 组乳酸含量及葡萄糖消耗量差异无统计学意义($P>0.05$)，si-YAP1 组及低、中、高剂量组葡萄糖消耗量及乳酸含量均降低($P<0.05$)；与 NC-YAP1 组比较，si-YAP1 组及低、中、高剂量组葡萄糖消耗量及乳酸含量均降低($P<0.05$)；与 si-YAP1 组比较，低剂量组葡萄糖

消耗量及乳酸分泌量均增加，高剂量组葡萄糖消耗量及乳酸分泌量均降低（$P<0.05$），而中剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$）；且低、中、高剂量组葡萄糖消耗量及乳酸分泌量呈梯度降低（$P<0.05$）。



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与 NC-YAP1 组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与 si-YAP1 组比较，$P<0.05$

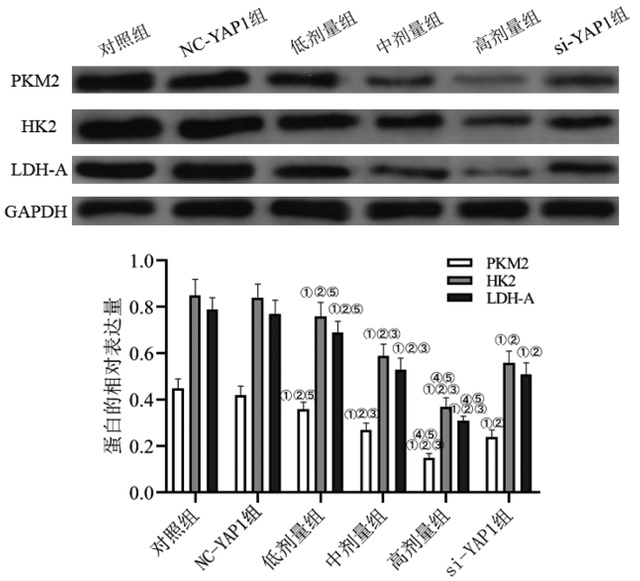
图 1　各组细胞 YAP1 蛋白相对表达水平比较

表 1　各组细胞乳酸含量及葡萄糖消耗量比较　mmol/L

组　别	n	乳酸含量	葡萄糖消耗量
对照组	3	19.10±2.02	9.66±0.98
NC-YAP1 组	3	18.89±1.91	9.46±0.91
低剂量组	3	15.63±1.80①②⑤	8.04±0.72①②⑤
中剂量组	3	12.22±1.79①②③	6.26±0.70①②③
高剂量组	3	8.30±1.33①②③④⑤	3.77±0.58①②③④⑤
si-YAP1 组	3	11.69±1.58①②	5.94±0.64①②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与 NC-YAP1 组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与 si-YAP1 组比较，$P<0.05$

2.3　各组细胞糖酵解相关蛋白比较　见图 2。与对照组比较，NC-YAP1 组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平差异无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1 组及低、中、高剂量组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平均降低（$P<0.05$）；与 NC-YAP1 组比较，si-YAP1 组及低、中、高剂量组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平均降低（$P<0.05$）；与 si-YAP1 组比较，低剂量组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平升高（$P<0.05$），高剂量组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平降低（$P<0.05$），而中剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$），且低、中、高剂量组 LDH-A、HK2、PKM2 蛋白水平呈梯度降低（$P<0.05$）。



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与 NC-YAP1 组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与 si-YAP1 组比较，$P<0.05$

图 2　各组细胞糖酵解相关蛋白比较

2.4　各组细胞增殖抑制率比较　见表 2。与对照组比较，NC-YAP1 组细胞增殖抑制率差异无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1 组及低、中、高剂量组细胞增殖抑制率均增加（$P<0.05$）；与 NC-YAP1 组比较，低、中、高剂量组及 si-YAP1 组细胞增殖抑制率均增加（$P<0.05$）；与 si-YAP1 组比较，低剂量组细胞增殖抑制率降低（$P<0.05$），高剂量组细胞增殖抑制率增加（$P<0.05$），而中剂量组细胞增殖抑制率差异无统计学意义（$P>0.05$）；且低、中、高剂量组细胞增殖抑制率呈梯度增加（$P<0.05$）。

表 2　各组细胞增殖抑制率比较（$\bar{x}\pm s$）　%

组　别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	0	0	0
NC-YAP1 组	3	2.70±1.06	2.33±1.07	2.83±1.03
低剂量组	3	15.91±2.88①②⑤	17.85±2.18①②⑤	30.26±4.78①②⑤
中剂量组	3	32.33±3.28①②③	36.93±4.42①②③	47.69±3.20①②③
高剂量组	3	46.91±6.33①②③④⑤	56.19±5.58①②③④⑤	65.21±4.15①②③④⑤
si-YAP1 组	3	34.80±3.09①②	40.36±6.49①②	48.75±3.25①②

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与 NC-YAP1 组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与 si-YAP1 组比较，$P<0.05$

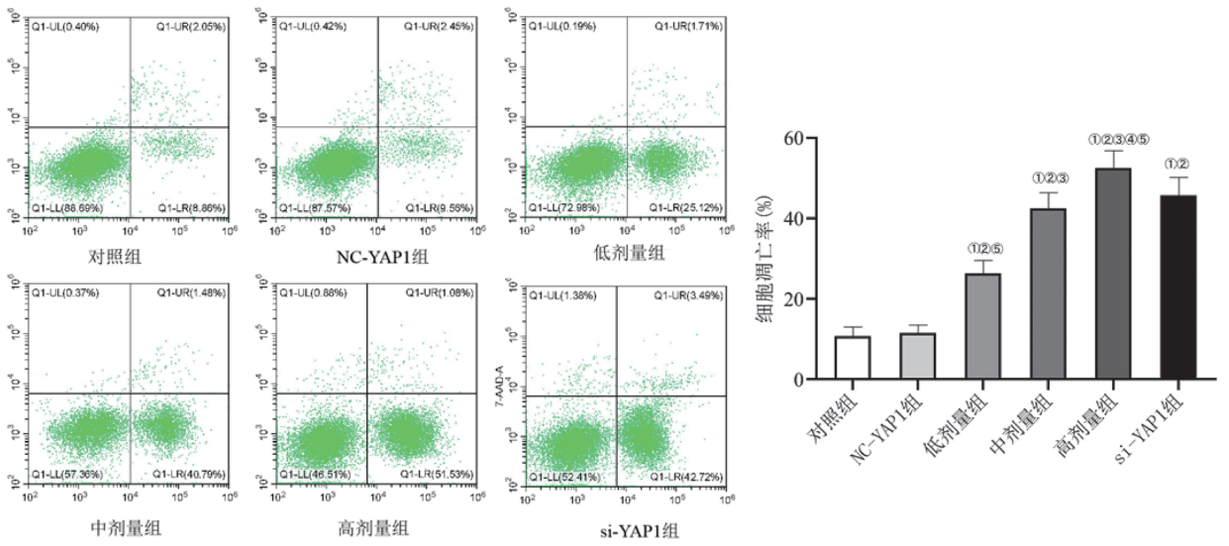
2.5　各组细胞周期比较　见表3。与对照组比较，NC-YAP1组G0/G1期比例及S期比例差异均无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1组及低、中、高剂量组细胞G0/G1期比例升高（$P<0.05$），S期细胞的比例降低（$P<0.05$）；与NC-YAP1组比较，低、中、高剂量组及si-YAP1组细胞G0/G1期比例均升高（$P<0.05$），S期细胞的比例均降低（$P<0.05$）；与si-YAP1组比较，低剂量组G0/G1期比例降低（$P<0.05$），S期比例增加（$P<0.05$），高剂量组G0/G1期比例增加（$P<0.05$），S期比例降低（$P<0.05$）（$P<0.05$），而中剂量组G0/G1期比例与S期比例差异无统计学意义（$P>0.05$），且低、中、高剂量组G0/G1期比例呈梯度增加（$P<0.05$），S期比例呈梯度降低（$P<0.05$）；各组间G2/M比例比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.6　各组细胞凋亡率比较　见图3。与对照组比较，NC-YAP1组细胞凋亡率差异无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1组及低、中、高剂量组细胞凋亡率均升高（$P<0.05$）；与NC-YAP1组比较，低、中、高剂量组及si-YAP1组细胞凋亡率均升高（$P<0.05$）；与si-YAP1组比较，低剂量组细胞凋亡率降低（$P<0.05$），高剂量组增加（$P<0.05$），而中剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$）；且低、中、高剂量组细胞凋亡率呈梯度升高（$P<0.05$）。

表3　各组细胞周期比较（$\bar{x}\pm s$）　%

组　别	n	G0/G1	S	G2/M
对照组	3	35.31±3.12	49.03±3.80	15.07±2.32
NC-YAP1组	3	37.19±2.97	47.24±4.05	14.78±2.39
低剂量组	3	45.34±4.18①②⑤	38.48±4.16①②⑤	16.22±2.80
中剂量组	3	54.35±5.17①②③	28.67±4.19①②⑤	17.60±3.23
高剂量组	3	66.71±6.79①②③④⑤	18.86±4.67①②③④⑤	15.15±3.16
si-YAP1组	3	55.87±5.70①②	28.02±3.21①②	16.20±2.75

注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与NC-YAP1组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与si-YAP1组比较，$P<0.05$



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与NC-YAP1组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与si-YAP1组比较，$P<0.05$

图3　姜黄素调控Yes相关蛋白1对HEC-1B细胞凋亡的影响

2.7　各组细胞迁移能力比较　见图4。与对照组比较，NC-YAP1组划痕愈合率差异无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1组及低、中、高剂量组划痕愈合率降低（$P<0.05$）；与NC-YAP1组比较，低、中、高剂量组及si-YAP1组划痕愈合率均降低（$P<0.05$）；与si-YAP1组比较，低剂量组划痕愈合率增加（$P<0.05$），高剂量组降低（$P<0.05$），而中剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$），且低、中、高剂量组细胞划痕愈合率呈梯度降低（$P<0.05$）。

2.8　各组细胞侵袭能力比较　见图5。与对照组比较，NC-YAP1组细胞侵袭抑制率差异无统计学意义（$P>0.05$），si-YAP1组及低、中、高剂量组细胞

侵袭抑制率均升高（$P<0.05$）；与 NC-YAP1 组比较，低、中、高剂量组及 si-YAP1 组细胞侵袭抑制率均升高（$P<0.05$）；与 si-YAP1 组比较，低剂量组细胞侵袭抑制率降低（$P<0.05$），高剂量组增加（$P<0.05$），而中剂量组差异无统计学意义（$P>0.05$），且低、中、高剂量组细胞侵袭抑制率呈梯度升高（$P<0.05$）。

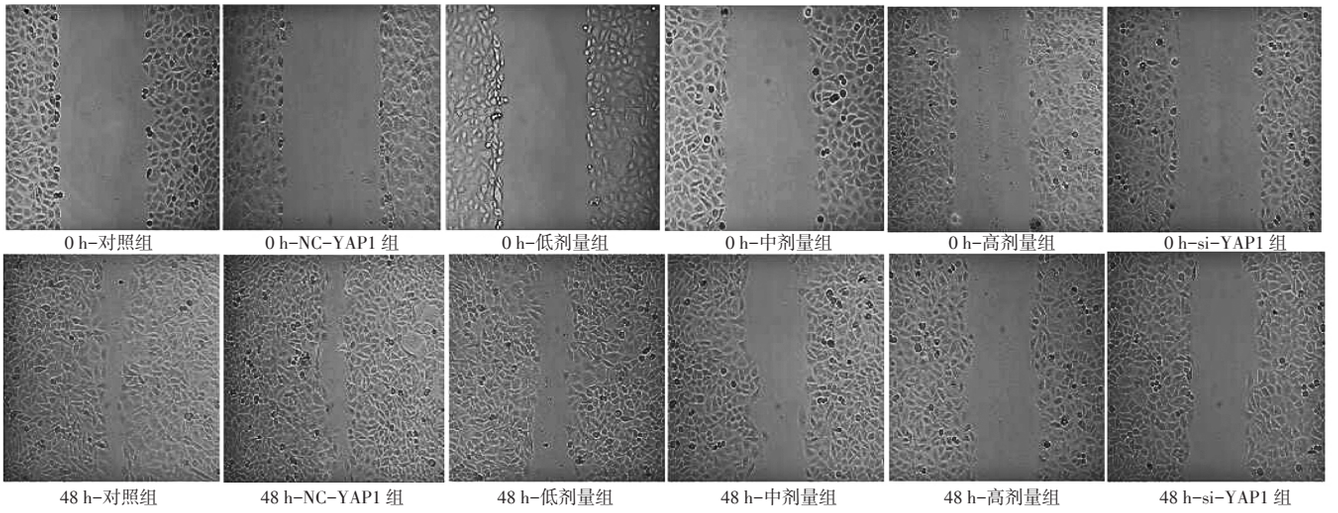
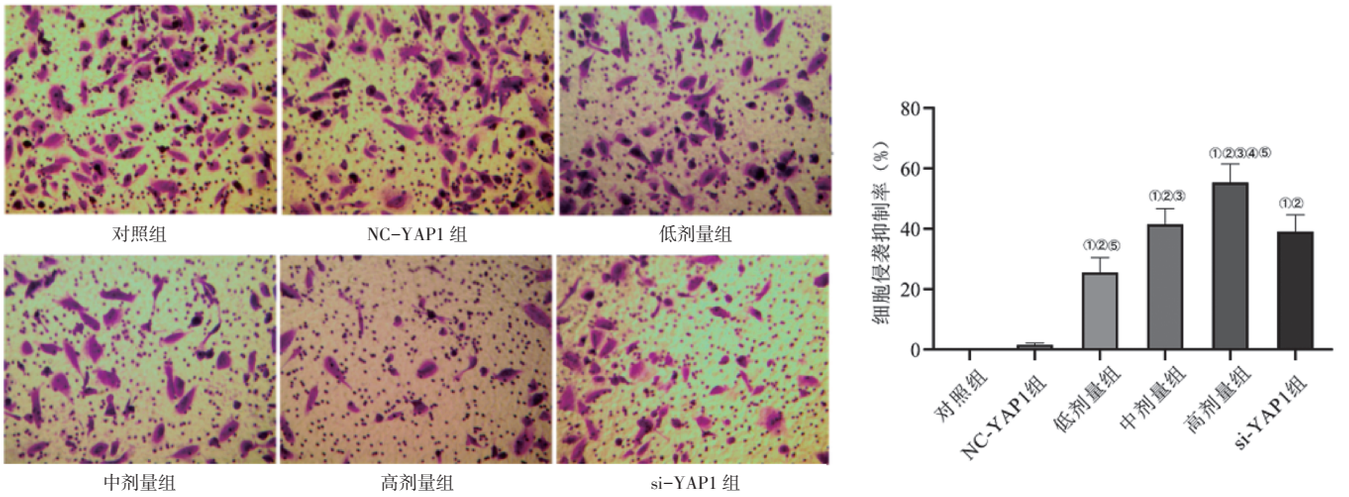


图 4　各组细胞迁移能力比较



注：①与对照组比较，$P<0.05$；②与 NC-YAP1 组比较，$P<0.05$；③与低剂量组比较，$P<0.05$；④与中剂量组比较，$P<0.05$；⑤与 si-YAP1 组比较，$P<0.05$

图 5　各组细胞侵袭能力比较

3　讨论

子宫内膜癌约占女性生殖系统恶性肿瘤的 20%～30%，目前其发病率呈逐渐上升趋势，仅次于宫颈癌，死亡率仅次于卵巢癌，且发病年龄趋于年轻化[11-13]。近年来，子宫内膜癌治疗方式主要以手术和放化疗为主，但晚期患者临床效果欠佳。姜黄素是提取自姜科类植物根茎部的一种多酚类天然物质，具有抗炎、抗肿瘤等作用，且兼具低毒、不良反应小等优点，是目前肿瘤防治候选辅助药物之一。研究证实其在各类妇科肿瘤（如卵巢癌、宫颈癌及子宫内膜癌）中具有抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭及促凋亡作用[14-16]。分子实验相关研究表明姜黄素主要抗肿瘤机制为增加肿瘤细胞对药物的作用靶点、调节增殖及凋亡信号通路的转导及相关酶、蛋白质、基因的表达；此外，还可逆转肿瘤细胞的耐药性，增强自然杀伤细胞的细胞毒性以及抑制癌血

管生成等[17-19]。目前已有许多关于姜黄素在子宫内膜癌中的研究[20-21]，但关于其对肿瘤细胞 Warburg 效应的抑制是否是其抑癌机制之一尚不够明确。Warburg 效应是肿瘤细胞的独特代谢方式，正常细胞一般在缺氧状态下转为无氧糖酵解方式以保证供能，而肿瘤细胞即使在氧气充足的情况下，也依然以糖酵解的方式进行供能，消耗葡萄糖而产生乳酸。其中，HK2、PKM2、LDH-A 是该过程中重要的限速酶，三者的表达水平可直接反映细胞的糖酵解水平[22-23]。陈妍等[24]研究显示，通过降低 HK2、PKM2、LDH-A 蛋白的表达，可显著抑制肿瘤细胞的有氧糖酵解水平。金纬纬等[25]研究发现，姜黄素可通过下调丙酮酸脱氢酶激酶 2(PDK2)的表达抑制子宫内膜癌细胞的糖酵解水平。本研究结果显示，与对照组比较，低、中、高剂量组细胞的乳酸含量和葡萄糖消耗量均降低，LDH-A、HK2、PKM2 蛋白表达水平也降低，且呈梯度下降，提示姜黄素可显著抑制子宫内膜癌细胞的糖酵解水平。

近年来研究发现，Hippo/YAP 信号通路是维持细胞增殖和凋亡平衡的关键信号通路，是参与肿瘤发生发展的机制之一[26]。正常状态下，该通路中的各因子相互作用后可维持细胞增殖和凋亡的平衡，但当通路中某一信号分子表达异常时可能导致细胞生命周期失衡和恶性肿瘤的发生。YAP1 是一种原癌基因，是 Hippo 信号通路下游的效应分子，Hippo 通路激活时可促进 YAP1 高表达和过度磷酸化，而后与胞质中的相关蛋白结合从而无法进入细胞核发挥正常转录作用，导致细胞增殖凋亡失衡[27]。细胞实验已证实，YAP1 在甲状腺肿瘤细胞中高表达，并促进肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭[28]。而下调其表达水平，可显著抑制肺癌细胞的增殖、分化、侵袭等恶性生物学行为，促进细胞凋亡[29-30]。唐晓敏等[31]研究显示，靶向下调 YAP 蛋白可抑制喉癌细胞的 Warburg 效应。有研究显示，YAP1 蛋白在肝癌及胰腺癌中是姜黄素的关键抑制靶点[32]，但姜黄素能否通过调控 YAP1 表达抑制子宫内膜癌的进展目前未有相关研究。本研究结果显示，使用低、中、高剂量姜黄素干预后，HEC-1B 细胞的 YAP1 蛋白表达水平降低，且呈浓度依赖性。在细胞生物学行为的影响上，低、中、高剂量组及 si-YAP1 组均可以抑制细胞增殖、促进细胞周期 G0/G1 阻滞和细胞凋亡、抑制细胞迁移和侵袭能力，提示姜黄素有可能通过下调 YAP1 蛋白表达发挥抑制子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的 Warburg 效应，抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭，促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述，姜黄素可以显著下调子宫内膜癌 HEC-1B 细胞中 YAP1 蛋白的表达，抑制细胞的糖酵解过程、增殖、迁移和侵袭并促进其凋亡，提示姜黄素对 HEC-1B 细胞的抗癌机制可能与下调 YAP1 蛋白的表达有关。

[参考文献]

[1] NJOKU K, ABIOLA J, RUSSELL J, et al. Endometrial cancer prevention in high- risk women[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2020, 65(8): 66-78.

[2] MOORE L, LEONGAMORNLERT D, COORENS T H H, et al. The mutational landscape of normal human endometrial epithelium[J]. Nature, 2020, 80(5): 640-646.

[3] VAUPEL P, SCHMIDBERGER H, MAYER A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression[J]. Int J Radiat Biol, 2019, 95(7): 912-919.

[4] BROOKS R A, FLEMING G F, LASTRA R R, et al. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 258-279.

[5] MAEHAMA T, NISHIO M, OTANI J, et al. The role of Hippo-YAP signaling in squamous cell carcinomas[J]. Cancer Sci, 2021, 112(1): 51-60.

[6] 洪斌，张莹. YAP1蛋白表达在胰腺癌肿瘤异质性及病理诊断中的应用[J]. 实用肿瘤杂志，2020，35(6)：58-61.

[7] 王文慧，邵志叶，陈豪. 宫颈癌组织中Hippo-Yes相关蛋白1的表达及临床意义[J]. 中国现代医学杂志，2020，30(12)：27-32.

[8] 黄哲，蔡朋株，许庆文，等. Yes相关蛋白1和内质网蛋白29在结直肠癌组织的表达及临床意义[J]. 中华实验外科杂志，2019，36(2)：215-217.

[9] 唐晓敏，孙宇轩，李万举，等. 靶向下调Yes相关蛋白抑制喉癌细胞Warburg效应和侵袭能力的研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2019，54(11)：857-862.

[10] 周雅青，杨蓉，马刚. 沉默YAP1可抑制鼻咽癌细胞的增殖、迁移及侵袭能力[J]. 南方医科大学学报，2019，39(3)：286-291.

[11] CIVIDINI S, GUNTER M J, NAUTIYAL J, et al. Risk factors for endometrial cancer: An umbrella review of the literature[J]. Int J Cancer, 2019, 145(7): 1719-1730.

[12] CROSBIE E J, KITSON S J, MCALPINE J N, et al. Endometrial cancer[J]. Lancet, 2022, 399(10333): 1412-1428.

[13] 谢玲玲，林荣春，林仲秋. 国际权威子宫内膜癌诊治指南解读[J]. 实用妇产科杂志，2020，36(6)：428-432.

[14] 余瑛，张群贵，崔华子，等. 姜黄素联合顺铂调控PI3K/Akt信号通路对卵巢癌耐药细胞增殖、迁移和凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志，2023，39(7)：1415-1419.
[15] 陈红梅，冯强，黎娟，等. 姜黄素对宫颈癌大鼠肿瘤细胞凋亡，免疫功能的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志，2023，43(13)：3271-3274.
[16] 李若乔，马咸梅，岳琦. 姜黄素在子宫内膜癌中抗肿瘤作用的新进展[J]. 中国妇产科临床杂志，2022，23(3)：334-336.
[17] 亓小改，韩翔，郝娟芝，等. 姜黄素抑制乳腺癌细胞增殖与侵袭机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志，2018，25(17)：1211-1216.
[18] 葛佳威，程正健. 不同剂量姜黄素对宫颈癌裸鼠移植瘤生长及瘤组织MIF、VEGF表达的影响[J]. 中国老年学杂志，2018，38(7)：1738-1740.
[19] 陈茜，陈丽娟，党媛媛，等. 姜黄素对人子宫内膜癌细胞HEC-1-B侵袭转移的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版)，2016，37(1)：134-138.
[20] ZHANG Z，YI P，TU C，et al. Curcumin inhibits erk/c-jun expressions and phosphorylation against endometrial carcinoma[J]. Biomed Res Int，2019，2019：8912961.
[21] SUN M X，YU F，GONG M L，et al. Effects of curcumin on the role of MMP-2 in endometrial cancer cell proliferation and invasion[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22(15)：5033-5041.
[22] 贺帅，刘欣媛，马俊兵，等. 乳腺癌中SIRT5，PKM2及HK2的表达及其意义[J]. 临床与实验病理学杂志，2020，36(5)：20-23.
[23] 李响，冯丽丽，闻浩. 乳酸脱氢酶A促进恶性肿瘤发生发展机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2020，28(14)：2532-2535.
[24] 陈妍，陈加华，李小琴. 胃癌细胞中乳酸脱氢酶A表达变化及其对EMT的影响[J]. 山东医药，2019，59(17)：20-23.
[25] 金纬纬，林一禾，赵小迎，等. 姜黄素调控子宫内膜癌细胞糖酵解过程的机制[J]. 温州医科大学学报，2019，49(12)：878-884.
[26] MAUGERI-SACCÀ M，DE MARIA R. The Hippo pathway in normal development and cancer[J]. Pharmacol Ther，2018，186(12)：60-72.
[27] RAJ N，BAM R. Reciprocal crosstalk between yap1/hippo pathway and the p53 family proteins：mechanisms and outcomes in cancer[J]. Front Cell Dev Biol，2019，7：159.
[28] HUANG C Y，HAN Z，LI X，et al. Inhibition of thyroid carcinoma cells with YAP1 protein interference and its mechanism[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22(8)：2351-2355.
[29] 李翠芝，姚海英. 下调YAP1蛋白对子宫内膜癌细胞增殖的影响及其机制[J]. 解剖学研究，2019，41(1)：16-19.
[30] 蒋玉林，刘一锋，张志乾，等. 维替泊芬通过下调Yes相关蛋白表达抑制MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖及侵袭和迁移[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2017，33(9)：1223-1227.
[31] 唐晓敏，孙宇轩，李万举，等. 靶向下调Yes相关蛋白抑制喉癌细胞Warburg效应和侵袭能力的研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志，2019，54(11)：857-862.
[32] 于洪丹，张舒文，谷学静. YAP信号通路在姜黄素诱导HepG2肝癌细胞系凋亡中的作用[J]. 锦州医科大学学报，2020，41(3)：13-18.

(责任编辑：钟志敏)