

清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞糖酵解 关键限速酶 HK2, PFK2, PKM2 的影响

余功, 陈江涛, 胡桥, 饶斌, 谢斌*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞糖酵解关键限速酶己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2), 6-磷酸果糖激酶 2(phosphofructokinase, PFK2), M2 型丙酮酸激酶(pyruvate kinase isoform M2, PKM2)的表达及葡萄糖含量的影响。**方法:**雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, 随机分为模型组, 环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)组, 清燥救肺汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。所有小鼠右腋下注射 Lewis 肺癌细胞建立肺癌荷瘤模型, 清燥救肺汤高、中、低剂量组剂量分别为 11, 5.5, 2.75 g·kg⁻¹·d⁻¹, 造模前 2 周开始灌胃给药, CTX 组以 50 mg·kg⁻¹·(2 d)⁻¹腹腔注射给药, 模型组以等体积生理盐水灌胃给药, 接种后继续给药 2 周, 处死小鼠取瘤组织; 氧化酶法检测葡萄糖含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 HK2 mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 PFK2 蛋白表达; 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 PKM2 活性。**结果:**与模型组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组肺癌细胞 HK2 mRNA 表达及 PKM2 活性显著降低, 葡萄糖含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 清燥救肺汤高、中剂量组肺癌细胞 PFK2 蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**清燥救肺汤可有效抑制荷 Lewis 肺癌细胞增殖, 降低肺癌细胞葡萄糖摄取速率, 糖酵解关键限速酶 HK2, PFK2, PKM2 可能是其药效作用靶点。

[关键词] 清燥救肺汤; 肺癌; 己糖激酶 2(HK2); 6-磷酸果糖激酶 2(PFK2); M2 型丙酮酸激酶(PKM2)

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A 1005-9903(2020)04-0054-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191325

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190318.1644.011.html>

[网络出版时间] 2019-03-20 14:30

Effect of Qingzao Jiufei Tang on Rate-limiting Enzymes HK2, PFK2 and PKM2 in Glycolytic Pathway in Lewis Lung Cancer-bearing Mice Cells

YU Gong, CHEN Jiang-tao, HU Qiao, RAO Bin, XIE Bin*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Qingzao Jiufei Tang on the expression of key limiting enzymes hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase 2 (PFK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2), and the glucose content in Lewis mice colon cancer cells. **Method:** A total of 50 male C57BL/6J mice were randomly divided into model group, chemotherapy group, and high, middle and low-dose Qingzao Jiufei Tang groups, with 10 mice in each group. The lung cancer cell model was established by injecting Lewis lung cancer cells into the right axilla. The high, middle and low dose groups were administered at the doses of 11, 5.5, 2.75 g·kg⁻¹·d⁻¹ for 2 weeks before modeling. The drug was administered through intraperitoneal injection at a dose of 50 mg·kg⁻¹·(2 d)⁻¹ in the chemotherapy group. The model group was intragastrically administered with an equal volume of normal saline. After the inoculation, the drug was administered for two weeks. Two weeks later, all of the mice

[收稿日期] 20190307(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660729);江西省卫生计生委中医药课题项目(2017A232)

[第一作者] 余功, 硕士, 助教, 从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: 172470535@qq.com

[通信作者] * 谢斌, 博士, 副教授, 从事中医药抗肿瘤研究, E-mail: 331080826@qq.com

were put to death, and tumor tissues were collected. The mRNA expression of HK2 was detected by Real-time PCR. the protein expression of PFK2 was detected by Western blot, the PKM2 activity was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with the model group, mRNA expressions and activity of PKM2 in lung cancer cells of treatment groups were significantly declined, and glucose content increased significantly, with significant differences from those of model group ($P < 0.01$). The PFK2 protein expressions in lung cancer cells of treatment groups (high, medium and low-dose groups) were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Qingzao Jiufei Tang could inhibit Lewis proliferation, and decrease the glucose intake in lung cancer cells. The effect targets may be the key rate-limiting enzymes HK2, PFK2, PKM2.

[**Key words**] Qingzao Jiufei Tang; lung cancer; hexokinase2 (HK2); phosphofructokinase 2 (PFK2); pyruvate kinase isoform M2 (PKM2)

肺癌是目前中国以及全球死亡率最高的恶性肿瘤。尽管目前有手术治疗、放疗等多种治疗手段,但肺癌患者的总体 5 年生存率仅为 16.1%^[1]。中医认为燥热伤肺是肺癌的重要病机。肺为娇脏,喜润恶燥,患者感受燥热之邪,耗伤津液,则肺不治节,气机失调、火盛化毒,痰瘀凝聚,日久不解可导致肺癌发生,故清热润燥是肺癌的常用治法^[2]。清燥救肺汤为清代名医喻嘉言《医门法律》滋养肺阴名方,该方由党参片、霜桑叶、生石膏、苦杏仁、阿胶、胡麻仁、麦冬、枇杷叶、炙甘草组成,方中重用霜桑叶质轻性寒,轻宣肺燥而不耗气;生石膏辛甘清泄肺热而不伤中;麦冬甘寒,养阴润肺,党参片益气生津;胡麻仁、阿胶助麦冬养阴润肺,苦杏仁、枇杷叶苦降肺气;加炙甘草以调合诸药。全方宣、清、润、降四法并用,清燥润肺,养阴益气,主治温燥伤肺,气阴两伤证,能较好地缓解燥热伤肺主证,故常用于肺癌中医临床治疗^[3]。有氧糖酵解(Warburg 效应)是恶性肿瘤的显著特征,该过程受己糖激酶 2(HK2),6-磷酸果糖激酶 2(PFK2),M2 型丙酮酸激酶(PKM2)及乳酸脱氢酶-A 等限速酶的调控。肿瘤细胞通过糖酵解途径产生三磷酸腺苷(ATP)的速度比氧化磷酸化更快,可为肿瘤细胞快速增殖提供所需能量与原材料^[4]。同时糖酵解还能大量产生乳酸,维持肿瘤局部酸性微环境,有利于肿瘤细胞对周围组织的浸润与转移^[5]。因此,阻断糖酵解限速酶的活性,就有可能抑制肿瘤糖酵解能量代谢,减少肿瘤细胞的能量生成,从而达到抗癌目的。本课题组在前期研究中发现,清燥救肺汤能明显降低荷 Lewis 小鼠瘤重,抑制其肺癌细胞增殖,具有显著的抗肺癌功效^[6-7],但其具体作用机制尚不明确。本研究在前期证实该方能显著抑制肺癌细胞增殖的研究基础上,拟通过建立荷 Lewis 小鼠肺癌小鼠模型,观察该方对肺癌细胞糖酵解关键限速酶 HK2, PFK2, PKM2 的影响,

从抑制肺癌细胞糖酵解角度探索该方抗肺癌功效的作用机制。

1 材料

1.1 药物 清燥救肺汤组成:生石膏 12 g,霜桑叶 9 g,党参片 12 g,炙甘草 3 g,麦冬 10 g,阿胶 9 g,苦杏仁 9 g,枇杷叶 9 g,购于江西省中医院中药房,由江西中医药大学国家工程中心冯育林教授鉴定为正品。将上述中药首次加 10 倍清水浸泡后煎煮 1 h,药液沸腾后文火煎 40 min,纱布过滤;第 2 次加 8 倍量的清水煎煮,水沸后文火煎 40 min,纱布过滤,合并滤液,置于 60 °C 恒温烘箱内烘干后用打粉机研磨成干粉 27.62 g(1 g 含 0.28 g 杂质),故干粉实际有效成分质量为 $27.62 \times 0.72 = 19.9$ g,得率 $19.9/73\text{ g} = 27.26\%$ 。密封干粉,4 °C 保存备用。药量计算方法参考《中药药理研究方法学》^[8],小鼠用药剂量 = 标准体质量 × 人的剂量,人临床剂量换算成小鼠中剂量。经过前期预实验研究探索,本研究以 $11\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 为高剂量,清燥救肺汤中、低剂量分别为 $5.5, 2.75\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。腹腔注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 16092525, 0.2 g/瓶),给药剂量 $25\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,隔日 1 次。

1.2 动物和瘤株 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 50 只,雄性,体质量(20 ± 2) g,购自常州卡文斯实验动物有限公司,合格证号 SCXK(苏)2016-0003。小鼠 Lewis 肺癌原代细胞,购于 ATCC 细胞库,编号 36470TM。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准,批号 JZLLSC:2017-0030。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基(北京 Solarbio 公司,批号 20170605);胎牛血清(中国医学科学院生物医学工程研究所,批号 TBD15HT);葡萄糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 F006);trizol 总 RNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW0581S);反转录试剂盒(北京诺博莱

德科技有限公司,批号 205311);PCR mix(美国 MCE 公司,批号 HY-K0501);PFK2 一抗,二抗 HRP 标记山羊抗兔, β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国 Proteintech 公司,批号分别为 13763-1-AP,SA00001-2,20536-1-AP);PKM2 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 JL45585)。

1.4 仪器 CO₂-IR 型 CO₂ 细胞培养箱(上海丙林电子科技有限公司),DMI3000B 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),SCIENTZ-192 型高通量组织研磨机(宁波新芝生物科技股份有限公司),Mini Trans-blot 型 PowerPac™ 电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),92-14860-00 型凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司),HBS-1096A 型全波长酶标仪(南京德铁实验设备有限公司),AFD9600 型实时荧光定量 PCR 仪(杭州安杰思有限公司)。

2 方法

2.1 Lewis 细胞培养及造模方法 将 Lewis 细胞于 37 °C 5% CO₂ 培养箱,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基贴壁培养。取生长良好 Lewis 细胞用生理盐水将密度调至 5 × 10⁶ 个/mL。以 0.2 mL/只接种于小鼠右腋下^[9]。

2.2 分组及给药 将小鼠随机分为模型组,CTX 组,清燥救肺汤高、中、低剂量组,每组 10 只。模型组接种 24 h 后,以生理盐水灌胃,0.2 mL/只,每 12 h 给药 1 次;CTX 组接种 24 h 后,按 50 mg·kg⁻¹ 剂量隔日腹腔注射;清燥救肺汤组造模前 2 周即开始按设计剂量灌胃给药,每 12 h 给药 1 次,接种 24 h 后继续给药 2 周。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 HK2 mRNA 表达水平 取冰冻肿瘤组织 50 mg 用剪刀剪碎,用生理盐水洗净后加入 trizol 1 mL,研磨至充分匀浆后以 4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,静置 5 min 后,加入三氯甲烷 0.2 mL,剧烈震荡 30 s,静置 3 min 后以 4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min;在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇,颠倒混匀后以 4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,留沉淀;75% 乙醇对沉淀进行洗涤;再以 4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃上清,留 RNA 沉淀;放置 2 ~ 3 min,晾干后加入无核酶水 30 ~ 100 μ L 溶解,充分溶解提取总 RNA,逆转录为 cDNA。再以 cDNA 为模板,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参,采用两步法 PCR 反应程序,扩增条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,61 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 1 min,共

40 个循环。反应结束后记录相应 C_t 和溶解曲线,所有样品均重复检 3 次。以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对目的基因进行相对定量分析。引物通过引物设计软件 oligo6 自行设计,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence primer

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452
	下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	
HK2	上游 5'-CAGAGCGCCTCAAGACAAGG-3'	130
	下游 5'-CTGTCGTACACGTGCTCTC-3'	

2.4 氧化酶法检测肺癌细胞葡萄糖含量 取冰冻肿瘤组织 0.1 g,剪碎后置于 1.5 mL 离心管中,充分研磨后加入 RIPA 裂解液 1 mL,4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min 后取上清液,按照试剂盒说明书要求操作。以 505 nm 波长测各孔吸光度 A,葡萄糖浓度 = A_{样品}/A_{标准} × 标准浓度。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测移植瘤组织中 PFK2 蛋白表达 取肿瘤组织 0.1 g,充分研磨后加入 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min;4 °C,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,提取总蛋白上清液,BCA 法测定蛋白浓度。根据蛋白定量结果,将蛋白样品 -Loading buffer 4:1 混匀,加上样缓冲液,105 °C 变性 5 min,配胶进行 SDS-PAGE 电泳,转膜。50 g·L⁻¹ 脱脂奶粉封闭,加入一抗(1:6 000),4 °C 过夜,洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗,室温摇床孵育 1 h,TBST 法洗膜,ECL 法显影。蛋白半定量图像分析,采用 Alpha view SA 图像分析软件分析蛋白条带灰度值,以 β -actin 作为内参分析灰度值。

2.6 ELISA 检测糖酵解关键限速酶 PKM2 活性 取 2.4 项下肿瘤组织上清液,按试剂盒说明书进行操作。最后在酶标仪中以 450 nm 波长测定各孔的 A,然后根据标准孔 A 绘制标准曲线,按曲线方程计算各样品浓度值。

2.7 统计学分析 所有数据均用 SPSS 20.0 软件分析整理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞 HK2 mRNA 表达及葡萄糖含量的影响 与模型组比较,清燥救肺汤高、中、低剂量组及 CTX 组中肺癌细胞 HK2 mRNA 表达降低(*P* < 0.01);与 CTX 组比较,

清燥救肺汤高、中、低剂量组中 HK2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组中 HK2 mRNA 表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与清燥救肺汤中剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组中 HK2 mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组及 CTX 组葡萄糖含量升高 ($P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组葡萄糖含量降低 ($P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组葡萄糖含量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与清燥救肺汤中剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组葡萄糖含量降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞 HK2 mRNA 表达及葡萄糖含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Qingzao Jiufei Tang on HK2 mRNA expression and glucose content in Lewis lung cancer-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

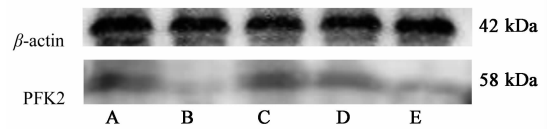
组别	剂量/g·kg ⁻¹	HK2 mRNA	葡萄糖/mmol·L ⁻¹
模型	-	1.046 ± 0.035	0.214 ± 0.020
CTX	0.05	0.299 ± 0.042 ¹⁾	0.725 ± 0.035 ¹⁾
清燥救肺汤	11	0.349 ± 0.028 ^{1,3)}	0.428 ± 0.013 ^{1,3)}
	5.5	0.440 ± 0.041 ^{1,2,5)}	0.406 ± 0.011 ^{1,3,4)}
	2.75	0.790 ± 0.040 ^{1,2,4,7)}	0.387 ± 0.012 ^{1,3,5,6)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 CTX 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与清燥救肺汤高剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$; 与清燥救肺汤中剂量组比较⁶⁾ $P < 0.05$, ⁷⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞 PFK2 蛋白表达及 PKM2 活性的影响 与模型组比较, 清燥救肺汤高、中剂量组及 CTX 组中肺癌细胞 PFK2 蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组中 PFK2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组中 PFK2 蛋白表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, CTX 组及清燥救肺汤高、中、低剂量组 PKM2 活性降低 ($P < 0.01$); 与 CTX 组比较, 清燥救肺汤高、中、低剂量组 PKM2 活性升高 ($P < 0.01$); 与清燥救肺汤高剂量组比较, 清燥救肺汤中、低剂量组 PKM2 活性升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与清燥救肺汤中剂量组比较, 清燥救肺汤低剂量组 PKM2 活性升高 ($P < 0.05$), 见图 1, 表 3。

4 讨论

肺癌常见干咳少痰, 甚则痰中带血或咯血, 声音嘶哑等表现。中医学认为, 肺为娇脏, 喜润恶燥, 且



A. 模型组; B. CTX 组; C ~ E. 清燥救肺汤低、中、高剂量组

图 1 荷 Lewis 小鼠肺癌组织 PFK2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PFK2 in Lewis lung cancer-bearing mice

表 3 清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞 PFK2 蛋白表达及 PKM2 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Qingzao Jiufei Tang on PFK2 and PKM2 expression in Lewis lung cancer-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PFK2/β-actin	PKM2/μg·L ⁻¹
模型	-	0.549 ± 0.084	4.310 ± 0.549
CTX	0.05	0.145 ± 0.015 ²⁾	1.391 ± 0.431 ²⁾
清燥救肺汤	11	0.248 ± 0.044 ²⁾	2.029 ± 0.223 ^{2,3)}
	5.5	0.404 ± 0.058 ^{1,4,5)}	2.681 ± 0.304 ^{2,4,5)}
	2.75	0.461 ± 0.102 ^{4,6)}	3.061 ± 0.291 ^{2,4,6,7)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 CTX 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与清燥救肺汤高剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$; 与清燥救肺汤中剂量组比较⁷⁾ $P < 0.01$ 。

肺与外界直接相通, 易受邪侵, 导致热毒灼津, 炼液为痰, 日久耗伤正气, 气滞血瘀, 形成积块。亦有医家认为, 肺癌多因汗出伤津, 或燥热伤肺, 或食辛辣燥热之品, 或素嗜烟酒, 致虚火灼津, 炼液为痰, 终致痰浊瘀血胶结于肺, 形成积块^[10]。因此, 诸多医家提出燥热伤肺是肺癌的重要病机。清燥救肺汤主治温燥伤肺, 气阴两伤证, 与肺癌燥热病机相符, 故用于肺癌各分期的中医治疗中, 疗效较为显著^[11]。前人研究表明, 热证与能量代谢密切相关。如徐志伟等^[12]发现, 实热证、虚热证模型大鼠机体能量代谢都比较旺盛, 机体产能和耗能增加。司惠丽^[13]证实寒性中药大黄三氯甲烷提取物、大黄水煎液对实热证大鼠的能量代谢有抑制作用。

有氧糖酵解 (Warburg 效应) 是恶性肿瘤能量代谢的明显特征, 并在肿瘤的增殖与转移过程中发挥了重要作用, 肿瘤组织代谢的葡萄糖是正常组的十多倍。且与氧化磷酸化相比, 葡萄糖通过有氧糖酵解方式产生 ATP 速度更快, 更能满足肿瘤细胞快速生长和分裂所需。HK2 是肿瘤糖酵解过程中的第一个限速酶。HK2 在快速生长的肿瘤中对启动和维持高葡萄糖代谢水平具有至关重要的作用, 大部分恶性肿瘤细胞都有 HK2 的高表达, 其活性在肿瘤细胞比正常细胞高 5 ~ 7 倍^[14], 在肿瘤细胞 Warburg 效应中起到关键作用。在转录水平, 缺氧条件等都

可以增强该基因的启动子的活性,从而增加其转录速率^[15]。在本实验中,PCR 结果显示清燥救肺汤高、中、低剂量组 HK2 mRNA 表达均低于模型组,且清燥救肺汤高、中、低剂量组中肺癌细胞内葡萄糖含量高于模型组,提示清燥救肺汤可能通过降低 HK2 mRNA 表达,减少 HK2 生成,进而减少肺癌细胞葡萄糖摄取。

PFK2 是合成 2,6 二磷酸果糖(2,6-diphosphate fructose, F-2,6-P₂)的限速酶,广泛存在于生物细胞中。2,6 二磷酸果糖是糖酵解的重要刺激剂,PFK2 可通过影响 2,6-二磷酸果糖水平实现对糖酵解通路调节,其表达增多可促进细胞糖酵解,生成大量乳酸和 ATP,以满足肿瘤细胞增殖对能量的快速需求^[16]。本实验中 Western blot 结果显示,清燥救肺汤高、中剂量组中肺癌细胞 PFK2 蛋白表达量低于模型组,提示清燥救肺汤抑制肺癌增殖,PFK2 可能是其效应靶点之一。

PKM2 是糖酵解途径最后一个限速酶。PKM 有两种异构体:PKM1 和 PKM2,其中 PKM2 与肿瘤能量代谢密切相关,其在多种肿瘤和高度增殖的细胞中具有较高表达^[17]。PKM2 还能够为肿瘤细胞提供充足的中间代谢产物,以满足肿瘤细胞快速分裂所需,并避免氧化应激损伤。同时,PKM2 能够进入细胞核内,作为共转录因子和蛋白激酶调节转录^[18-19]。本实验中 ELISA 结果显示,清燥救肺汤高、中、低剂量组中 PKM2 活性低于模型组,提示清燥救肺汤抑制肺癌增殖,PKM2 可能是其效应靶点之一。

综上所述,清燥救肺汤能抑制荷 Lewis 肺癌细胞增殖,并降低肺癌细胞葡萄糖摄取速率,糖酵解关键限速酶 HK2, PFK2, PKM2 可能是其效应靶点。本次研究结果提示清燥救肺汤抗肺癌可能与其抑制肺癌细胞糖酵解关键酶有关,但该方对上述糖酵解关键酶的调控机制仍需进一步的研究。

[参考文献]

[1] 叶火林,高淑平,刘汉起,等.肺癌相关肿瘤标记物及 miRNAs 在肺癌患者血清中的表达及意义[J]. 检验医学与临床,2018,15(18):2701-2704.
[2] 徐杉智,余功,谢斌.肺癌的病机分析及方剂应用探索[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(2):270-272.
[3] 陈江涛,徐彬智,余功,等.清燥救肺汤对荷 Lewis 小鼠肺癌细胞增殖相关糖酵解乳酸生成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):120-124.

[4] Ganapathy K S, Geschwind J F. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects [J]. Mol Cancer, 2013, 12(49):5551-5562.
[5] Potter M, Newport E, Morten K J. The warburg effect: 80 years on [J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(5): 1499-1505.
[6] 谢雄,谢斌,饶斌,等.肺癌阴虚证型特点及补肺阴选方参考[J]. 江西中医药大学学报,2015,27(6):8-10.
[7] 谢雄,谢斌,饶斌,等.清燥救肺汤对 Lewis 肺癌小鼠 EGFR, NF- κ B, ICAM-1 表达及 JAK1, STAT1 蛋白磷酸化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(24): 140-144.
[8] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:445.
[9] 谢斌,谢雄,余功,等.清燥救肺汤对结肠癌侵袭转移相关蛋白 NF- κ B, VEGF, VEGFR-1, MMP-9 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(17):110-114.
[10] 张星星,李泽庚.肺癌中医病因病机探讨[J]. 中华中医药杂志,2015,30(10):3447-3449.
[11] 武鹏鹏. 张培宇主任中医治疗肺癌的经验总结及思路探讨[D]. 北京:北京中医药大学,2015.
[12] 徐志伟,陈群,孙琪,等.中医热证实质研究[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(3):53-56.
[13] 司惠丽. 大黄对实热证大鼠能量代谢影响的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2012.
[14] Pedersen P L, Mathupala S, Rempel A, et al. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for the therapeutic intervention [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1555(1/3):14-20.
[15] Pirinen E, Heikkinen S, Malkki M, et al. Analysis of the human hexokinase II promoter *in vivo*: lack of insulin response within 4.0 kb [J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1676(2):149-154.
[16] 刘佳,孔庆鹏.能量代谢途径相关基因变异与肿瘤细胞适应性进化[J]. 动物学研究,2012,33(6): 557-565.
[17] Dayton T L, Jacks T, Vander H M. PKM2, cancer metabolism, and the road ahead [J]. EMBO Rep, 2016, 17(12):1721-1730.
[18] JIANG Y, LI X, YANG W, et al. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells [J]. Mol Cell, 2014, 53(1):75-87.
[19] GAO X, WANG H, YANG J, et al. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase [J]. Mol Cell, 2012, 45(5):598-609.

[责任编辑 张丰丰]