

维泰醇对小鼠黑色素瘤 B16F0 糖酵解的影响

王朋龙¹, 马晓懿¹, 郑秋生^{1,2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;
2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

[摘要] 目的:研究维泰醇对小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞糖酵解水平的影响并初步探究其机制。方法:以小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞为研究对象,不同浓度维泰醇处理小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞,另设空白组,采用磺酰罗丹明(SRB)法检测维泰醇对细胞增殖的影响,反向高效液相色谱法检测维泰醇对 B16F0 细胞 ATP 含量影响,试剂盒检测 B16F0 细胞培养液中乳酸含量影响,放射同位素法测定维泰醇对 B16F0 细胞葡萄糖摄取影响,试剂盒检测维泰醇对 B16F0 细胞己糖激酶(HK),丙酮酸激酶(PK),乳酸脱氢酶(LDH)活性影响。结果:与空白组比较,维泰醇可浓度依赖性的抑制 B16F0 细胞 ATP 的产生和乳酸的释放,减少 B16F0 细胞对葡萄糖的摄取,浓度依赖性的降低 PK 和 LDH 的活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),但对 HK 的活性无显著性影响。结论:维泰醇可抑制 B16F0 细胞糖酵解水平,其机制可能与抑制葡萄糖摄取,下调糖酵解的关键酶 PK 和 LDH 的活性有关。

[关键词] 维泰醇; B16F0 细胞; 糖酵解; 己糖激酶; 丙酮酸激酶; 乳酸脱氢酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0119-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160119

Effect of Alternol on Glycolysis in Mice Melanoma B16F0 Cells

WANG Peng-long¹, MA Xiao-yi¹, ZHENG Qiu-sheng^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832002, China;
2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of alternol on the level of glycolysis in melanoma B16F0 cells of mice, and to explore its mechanism. **Method:** Mice melanoma B16F0 cells were cultured and treated with different concentrations of alternol *in vitro*. The proliferation of melanoma B16F0 cells was detected by a sulforhodamine B assay. The content of adenosine triphosphate (ATP) was detected by a reverse high performance liquid chromatography method, and the content of lactic acid in the medium was detected by a lactic acid assay kit. Glucose intake of B16F0 cell was determined by radioactive isotopes. The activities of hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK) and lactic dehydrogenase (LDH) were detected by the related assay kits. **Result:** Compared with the control group, alternol could inhibit the release of lactic acid and the production of ATP, reduce glucose uptake and the activities of PK and LDH in B16F0 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** alternol inhibits glycolysis in B16F0 cells, which may be related to reducing the glucose uptake and the activities of PK and LDH.

[Key words] alternol; B16F0 cell; glycolysis; hexokinase; pyruvate kinase; lactic dehydrogenase

皮肤恶性黑色素瘤是一类源于神经嵴的黑色素细胞恶性肿瘤,约占皮肤癌的 80%,患者 5 年生存率 < 5%。小鼠黑色素瘤细胞因其来源及基因背景清楚,已被广泛地用于研究肿瘤发生、转移过程及影

[收稿日期] 20150909(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31471338);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-141);兵团重点领域创新团队建设计划项目;石河子科技计划课题(2014QY16)

[第一作者] 王朋龙,硕士,从事肿瘤及细胞药理研究,Tel: 18040833079,E-mail: mxysz@163.com

[通讯作者] * 郑秋生,博士,教授,从事肿瘤及细胞药理研究,Tel: 13999328286,E-mail: zqsy@sohu.com

响肿瘤发展、转移的相关参数^[1]。1971 年由美国国立癌症研究所从红豆杉植物树皮中提取、分离得到一种名为紫杉醇的物质,现已证实紫杉醇可以抑制多种肿瘤细胞的增殖,在临床上广泛用于卵巢癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤的化疗。紫杉醇除了被证明有广泛的抗肿瘤活性,也有研究表明紫杉醇能通过抑制黑色素瘤细胞糖酵解而抑制其增殖^[2]。维泰醇是红豆杉树皮中一种微生物菌诱变株的产物,经过发酵、纯化等工艺分离出的新型单体化合物,现已获得国家发明专利(CN1880309 A)和国际发明专利(WO2006/036131 AI),具有我国自主知识产权。前期研究表明维泰醇有抗肿瘤生物活性^[3-4]。由于维泰醇与紫杉醇具有相同的来源,因此笔者推测维泰醇有可能同样通过抑制黑色素瘤细胞糖酵解而抑制其增殖。本实验探讨维泰醇对小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞株糖酵解水平的影响。

1 材料

1.1 细胞 小鼠黑色素瘤细胞 B16F0 购于中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物及试剂 维泰醇(汕头市双骏生物科技有限公司提供,批号 041108,纯度 98%);二甲基亚砜(DMSO),磺基罗丹明 B(SRB)及三磷酸腺苷(ATP)(美国 Sigma 公司,批号分别为 51596BPV,3520421,C10H16N5O13P3);1640 细胞培养基(美国 Gibco 公司,批号 1181347),³H-G(安玛西亚中国有限公司,批号 3256754),己糖激酶(HK)试剂盒以及丙酮酸激酶(PK)试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司,批号分别为 20150128,20150128),乳酸脱氢酶(LDH)测试盒以及乳酸含量测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150114,20140820)。

1.3 仪器 Thermo3131 型 CO₂ 培养箱与 3001 型多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),20A 型高效液相色谱(日本岛津公司)。

2 方法

2.1 测定维泰醇对 B16F0 细胞活力的影响

B16F0 细胞以 5×10^4 个/孔的细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL 过夜;每组设 4 个平行孔,用添加完全培养设置本底对照(只加培养液,不加细胞),置于 CO₂ 培养箱中,再培养 48 h 后,加入 16% 三氯乙酸固定细胞,静置 5 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h,倒掉固定液,用去离子水反复冲洗 5 遍,室温下干燥。每孔内加入 0.4% SRB 50 μL ,室温放置 20 min,用 1% 冰乙酸反复冲洗 5 遍,室温下干燥。每孔加 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

的 Tris-HCl (pH 10.5) 150 μL 以溶解,酶标仪在 515 nm 处测定每孔的吸光度 A 。细胞增殖抑制率的计算公式。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}}{A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

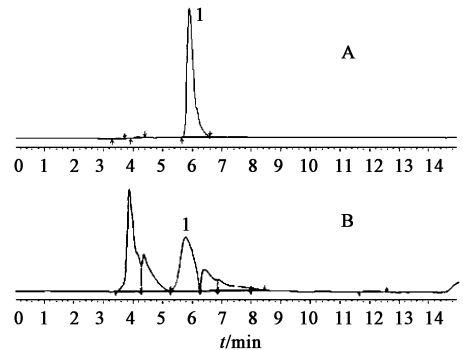
2.2 反相高效液相色谱法测定离体培养细胞内 ATP 含量

2.2.1 ATP 对照溶液 用超纯水将 ATP 对照品溶至 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用。

2.2.2 样品溶液 用 0.25% 胰蛋白酶消化 B16F0 细胞,收集细胞悬液,1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 弃上清,向加入 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸 500 mL 至细胞沉淀,轻轻吹打混匀, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。待测时,置冰上解冻,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清,用 4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K₂CO₃ 调 pH 至中性。4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,小心弃去上清,用 0.45 μm 滤膜过滤,即得。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为日本岛津公司 ODS-SP (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 紫外检测波长 254 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相甲醇-50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液 (5:95), 进样量 20 μL , 流速 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别精密量取 2.2.1 项下对照品溶液 0.5, 1, 2, 4, 8 mL 至 10 mL 容量瓶中,超纯水定容,按 2.2.3 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 5\,418.5X + 22\,672$ ($r = 0.998\,4$)。见图 1。



A. 对照品; B. 细胞样品溶液; 1. ATP

图 1 维泰醇的 HPLC

Fig. 1 HPLC of alternol

2.3 培养液中乳酸含量测定 用乳酸测定试剂盒检测细胞乳酸的分泌情况。B16F0 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中 (1 mL/孔), 用不同浓度的 (0, 4, 8, 12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 48 h, 根据前期研究方法, 离心收集上清液, 用冰浴的 20% 高氯酸脱脂, 冰上放置 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min, 按照试

剂盒说明书对乳酸含量进行测定。

2.4 放射性同位素标记测定 B16F0 细胞葡萄糖摄入 取对数生长期的 B16F0 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,生长至 70% 融合,弃培养液,加入培养液不同浓度的维泰醇 ($4, 8, 12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),另设培养液为空白组继续培养 48 h 后,分别加入 $^3\text{H-G}$ ($1.0 \text{ uCi} \cdot \text{mL}^{-1}$) 孵育 30 min 之后,取检测样品 0.2 mL 加无水乙醇 1.0 mL 充分混匀并移入闪烁瓶内,加入闪烁液 2 mL,4 °C 过夜及常规处理后用 LKB 液体闪烁计数器计算各组 CPM/Flask 值。

2.5 HK,PK,LDH 活性测定 先收集 B16F0 细胞到离心管内,弃上清,按照每 100 万细胞加入细胞裂解液 200 μL 的比例充分匀浆以破碎并裂解细胞。8 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,置冰上待测。分别按照 HK,PK,LDH 测定细胞中 3 种酶的活性。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 t 检验进行组间统计学差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 B16F0 细胞增殖的影响 B16F0 经维泰醇处理 48 h 后,与空白组比较,维泰醇可浓度依赖性的抑制 B16F0 细胞的增殖。最终得半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 8.58。见表 1。

表 1 维泰醇对 B16F0 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of alternol on proliferation ATP contents of B16F0 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

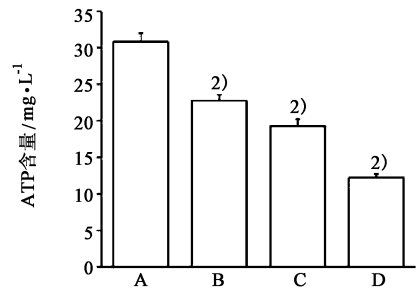
组别	浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	抑制率 $/\%$
空白	-	$0.639 \pm 0.029^{1)}$	0
维泰醇	4	$0.438 \pm 0.031^{2)}$	$31.49 \pm 4.77^{2)}$
	8	$0.351 \pm 0.022^{2)}$	$45.13 \pm 3.31^{2)}$
	12	$0.050 \pm 0.014^{2)}$	$92.12 \pm 3.48^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 B16F0 细胞 ATP 生成的影响 维泰醇处理 B16F0 细胞 48 h,可显著降低细胞 ATP 含量且具有浓度依赖性 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.3 对 B16F0 细胞培养液中乳酸水平的影响 不同浓度的维泰醇作用于 B16F0 细胞 48 h 后,维泰醇可明显降低培养液中乳酸含量,且具有浓度依赖性 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

3.4 维泰醇对 B16F0 细胞葡萄糖摄入的影响 与空白组比较,8,12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维泰醇可明显显著 B16F0 细胞对葡萄糖的摄取,且呈浓度依赖性 ($P < 0.01$)。见图 4。



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。A. 空白组;B. 维泰醇 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. 维泰醇 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. 维泰醇 12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 3~5 同)

图 2 维泰醇对 B16F0 细胞 ATP 生成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 2 Effects of alternol on intracellular ATP contents of B16F0 cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

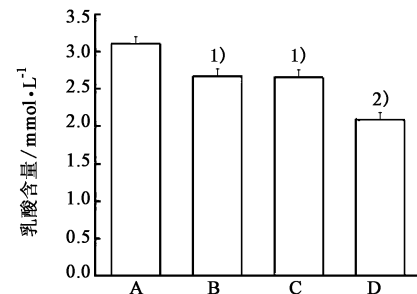


图 3 维泰醇对 B16F0 细胞培养液中乳酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of alternol on lactate levels in B16F0 cell culture fluid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

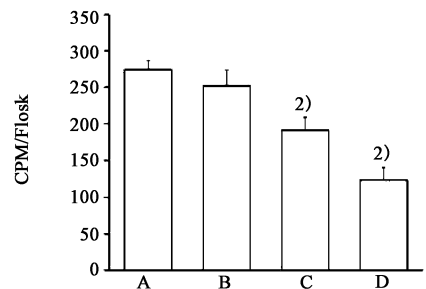


图 4 维泰醇对 B16F0 细胞葡萄糖摄入的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of alternol on glucose uptake of B16F0 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 对 B16F0 细胞 HK,PK,LDH 活性的影响 维泰醇处理 B16F0 细胞 48 h 后,与空白组比较,4,8,12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维泰醇明显降低 PK 相对酶活性 ($P < 0.05$),12 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 维泰醇显著降低 LDH 相对酶活性 ($P < 0.01$),但对 HK 活性无明显影响。见图 5。

4 讨论

大多数正常组织细胞在有氧环境中的能量代谢以有氧氧化为主,在供氧不足时,糖酵解途径启动以提供能量,而肿瘤细胞的能量代谢构成发生了较大变化即肿瘤细胞在有氧的条件下也是主要通过糖酵解产能,这一现象称为 Warburg 效应^[4]。糖酵解抑制剂可以减少肿瘤细胞能量供应,正在成为对抗这种疾病的潜在药物^[5]。前期研究发现紫杉醇可以

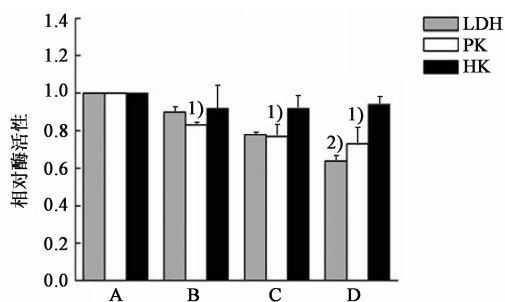


图 5 维泰醇对 B16F0 细胞 HK, PK, LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effects of alternol on activity of HK, PK and LDH of B16F0 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

通过抑制糖酵解来抑制黑色素细胞增殖^[6]。因此,笔者假设与紫杉醇来源相同的维泰醇也可能抑制黑色素瘤细胞糖酵解,并探讨其可能的作用机制。

肿瘤细胞即使在常氧条件下仍依赖糖酵解产生 ATP 来进行增值,因此抑制糖酵解主要是要降低细胞内 ATP 水平。研究显示,糖酵解的终极产物乳酸盐是生物合成的媒介,用于构建细胞的生命控制中心,对肿瘤发生发展影响巨大,包括免疫逃离、细胞迁移等。这两者的改变决定着糖酵解途径的改变^[7]。本文发现维泰醇能降低细胞内 ATP 水平和培养液中乳酸含量,这表明维泰醇确实可以抑制 B16F0 细胞糖酵解途径。

肿瘤细胞的快速增殖需要大量的能量,而糖酵解提供的能量又很少,所以肿瘤细胞需要大量摄取葡萄糖,本实验研究发现维泰醇可以显著降低 B16F0 细胞对葡萄糖摄取。肿瘤过度生长导致其对葡萄糖利用和摄取增加,从而使葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 表达上调,转运更多葡萄糖至细胞内以获得营养供应^[8]。葡萄糖转运蛋白 1 是葡萄糖跨细胞膜进入细胞的载体,其表达异常升高可能为癌细胞摄取葡萄糖增多的机制之一。但维泰醇抑制 B16F0 细胞对葡萄糖的摄取与抑制葡萄糖转运蛋白 1 表达是否有关,尚需进一步研究证实。

糖酵解是通过变构调节剂和糖酵解酶对细胞骨架的可逆结合来控制的^[9]。糖酵解过程中有 3 个主要的关键酶,分别为 HK, PK, LDH, 许多研究表明肿瘤细胞糖酵解代谢增强与糖酵解过程中如果 3 个关键酶活性增强紧密相关。HK 是肿瘤细胞糖酵解的限速酶,肿瘤细胞中 HK 活性显著增加,从而保证肿瘤细胞增殖过程中所必需的能量和物质,但本研究中并未观察到 HK 活性出现明显变化。PK 作为糖酵解的第 2 个关键酶,它与 ATP 的净增加相关,PK 激酶活性越高,ATP 净生成越多,这样即使细胞周围

氧环境很低,肿瘤细胞也能生存^[10]。LDH 也是糖酵解的关键酶,糖酵解产物丙酮酸可经过 LDH 催化生成乳酸,从而酸化微环境,有利于肿瘤在低氧环境中生存和生长,抑制 LDH 活性可阻止肿瘤进展^[11]。本研究结果显示,维泰醇可明显抑制 B16F0 细胞的 PK 和 LDH 活性,从而导致乳酸和 ATP 的生成减少,最终抑制 B16F0 细胞增殖。

[参考文献]

[1] Pan T, Li X, Jankovic J. The association between Parkinson's disease and melanoma [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(10): 2251-2260.

[2] Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 608(1): 119-129.

[3] Tang Y, Chen R, Huang Y, et al. Natural compound Alternol induces oxidative stress-dependent apoptotic cell death preferentially in prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(6): 1526-1536.

[4] Akram M. Mini-review on glycolysis and cancer [J]. *J Cancer Educ*, 2013, 28(3): 454-457.

[5] Furtado C M, Marcondes M C, Sola-Penna M, et al. Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30462.

[6] Quennet V, Yaromina A, Zips D, et al. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice [J]. *Radiother Oncol*, 2006, 81(2): 130-135.

[7] Nishikawa T, Bellance N, Damm A, et al. A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease [J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1203-1211.

[8] Sottnik J L, Lori J C, Rose B J, et al. Glycolysis inhibition by 2-deoxy-D-glucose reverts the metastatic phenotype *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(28): 865-875.

[9] Pedersen P L. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i. e., elevated glycolysis in the presence of oxygen [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2007, 39(3): 211-222.

[10] Gao J L, Chen Y G. Natural compounds regulate glycolysis in hypoxic tumor microenvironment [J]. *Biomed Res Int*, 2015, doi: 10.1155/2015/354143.

[11] Shuch B, Linehan W M, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, 13(6): 711-719.

[责任编辑 周冰冰]