

# 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响

石文静<sup>1,2</sup>, 谭佳妮<sup>1</sup>, 沈卫星<sup>1,3</sup>, 徐长亮<sup>1</sup>, 孙东东<sup>1,3</sup>, 程海波<sup>1,3\*</sup>

(1. 南京中医药大学转化医学研究中心, 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室, 江苏省抗肿瘤验方与产业化工程实验室, 南京 210023; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023; 3. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023)

**[摘要]** 目的:探讨不同浓度消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响及其作用机制。方法:8只新西兰兔随机分为含药血清组(消癌解毒方 40 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)和空白血清组(等体积生理盐水),每组兔子连续灌胃 3 d,制备消癌解毒方含药血清和空白血清。5%,10%,15%消癌解毒方含药血清处理人结肠癌 HT-29 与 HCT-116 细胞后,采用噻唑蓝比色法测定其对 HT-29 与 HCT-116 细胞生长的抑制作用,乳酸试剂盒检测 HT-29 与 HCT-116 细胞的乳酸生成量,葡萄糖试剂盒检测 HT-29 与 HCT-116 细胞的葡萄糖生成量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测己糖激酶(HK2),丙酮酸脱氢酶激酶(PDK1),乳酸脱氢酶(LDHA)和低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )蛋白表达。结果:消癌解毒方含药血清能够抑制 HT-29 与 HCT-116 细胞增殖能力,15%消癌解毒方含药血清对人结肠癌 HT-29 与 HCT-116 细胞的抑制率分别为 42.7%,50.2%。Western blot 结果显示,与空白组比较,消癌解毒方含药血清可降低 HK2, PDK1, LDHA, HIF-1 $\alpha$  蛋白相对表达量( $P < 0.05$ ),且随浓度的增加表达降低。乳酸及葡萄糖试剂盒检测结果显示,与空白组比较,消癌解毒方含药血清可降低 HT-29 与 HCT-116 细胞的乳酸及葡萄糖水平( $P < 0.05$ ),且随浓度的增加乳酸及葡萄糖水平降低。结论:消癌解毒方含药血清可以通过抑制人结肠癌 HT-29 与 HCT-116 细胞糖酵解的过程从而抑制肿瘤细胞的增殖,其抑制糖酵解过程的机制可能与降低 HIF-1 $\alpha$  表达,进而减少糖酵解相关酶 HK2, PDK1, LDHA 表达有关。

**[关键词]** 消癌解毒方; 结肠癌; 增殖; 糖酵解

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0120-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200120

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1411.058.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 14:11

## Effect of Serum Containing Xiaoi Jiedu Decoction on Proliferation and Glycolysis of Human Colon Cancer Cells

SHI Wen-jing<sup>1,2</sup>, TAN Jia-ni<sup>1</sup>, SHEN Wei-xing<sup>1,3</sup>, XU Chang-liang<sup>1</sup>, SUN Dong-dong<sup>1,3</sup>, CHENG Hai-bo<sup>1,3\*</sup>

(1. Translational Medicine Research Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation of State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), Provincial Laboratory of Anticarcinoma Proved Recipe Research and Engineering Industrialization, Nanjing 210023, China; 2. The First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. TCM Treatment on Tumor Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of the containing serum of Xiaoi Jiedu decoction with

**[收稿日期]** 20170209(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81373511,81573910,81673559,81403079);江苏省自然科学基金项目(BK20141467,BK20161045);江苏省高校自然科学基金项目(16KJB360001);江苏高校优势学科建设工程二期项目

**[第一作者]** 石文静, 硕士, 医师, 从事中医药抗肿瘤的研究, Tel:18068841042, E-mail:415652766@qq.com

**[通讯作者]** \*程海波, 博士, 副教授, 从事中医药抗肿瘤的研究, Tel:025-85811005, E-mail:myyfchb@163.com

different concentrations on proliferation and glycolysis of human colon cancer cells and investigate its action mechanism. **Method:** Eight new zealand rabbits were randomized into the serum containing medicine [40 g·(kg·d)<sup>-1</sup> of Xiaoi Jiedu decoction] group and the blank serum group (equivoluminal normal saline). Both groups received intragastric administration for 3 days to prepare serum containing Xiaoi Jiedu decoction and blank serum. Human colon cancer HT-29 and HCT-116 cells were cultured with pharmacological serum of Xiaoi Jiedu decoction (5%, 10% and 15%), and then their effects on the human colon cancer cells' proliferation was examined by methyl thiazolyl tetrazolium assay. The amount of lactic acid produced by HT-29 and HCT-116 cells was measured by lactic acid test kit, and the amount of glucose produced by HT-29 and HCT-116 cells was measured by glucose test kit. The expression levels of hexokinase 2 (HK2), pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), lactate dehydrogenase (LDHA), and Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) were detected by using Western blot. **Result:** Serum containing Xiaoi Jiedu decoction exhibited suppressive effects on HT-29 and HCT-116 proliferation. The effect of 15% serum containing Xiaoi Jiedu decoction was the best, with inhibition rate of 42.7% and 50.2% respectively for HT-29 and HCT-116 cells. Western blot analysis indicated that as compared with blank control group, the serum containing Xiaoi Jiedu decoction reduced the expression of HK2, PDK1, LDHA and HIF-1 $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), and with the increase of concentration, the expression was decreased. The results of lactic acid and glucose test kit showed that as compared with the blank control group, the serum containing Xiaoi Jiedu decoction can reduce the levels of lactic acid and glucose ( $P < 0.05$ ) and with the increasing of concentration, the levels of lactic acid and glucose were decreased. **Conclusion:** The serum containing Xiaoi Jiedu decoction can inhibit the proliferation of human colon cancer HT-29 and HCT-116 cells by inhibiting the process of the glycolysis. Inhibitory mechanisms of glycolysis might be associated with reducing the expression of HIF-1 $\alpha$ , thereby reducing the expression of glycolytic enzymes HK2, PDK1, and LDHA.

[ **Key words** ] Xiaoi Jiedu decoction; colon cancer; proliferation; glycolysis

结肠癌是最常见的恶性消化道肿瘤,是引起死亡的主要癌症之一<sup>[1]</sup>。在西方国家,结肠癌占恶性肿瘤死亡原因的第 2 位,在我国位居肿瘤死因的第 4 位<sup>[2-3]</sup>。随着经济的迅猛发展,人们生活水平提高,饮食结构发生了变化。近年来我国结肠癌发病率和死亡率增加迅猛,严重威胁人们的健康<sup>[4]</sup>。目前结肠癌的治疗主要为手术切除、化疗及放疗等,但这些方法的治疗效果欠佳,易复发与转移,中医药治疗已成为结肠癌辅助治疗的重要组成部分。中药在调节机体免疫力、减毒增效、预防复发、抑制转移、提高生存质量等方面具有独特的优势。

消癌解毒方是国医大师周仲瑛教授根据 60 余年临床实践经验总结形成的治疗肿瘤的有效验方<sup>[5]</sup>。该方以白花蛇舌草、半枝莲、山慈姑、莪术、太子参、麦冬等组成,方中白花蛇舌草、半枝莲为君药,清热散结、消癌解毒;山慈姑、莪术为臣药,化痰祛瘀、消肿散结;太子参、麦冬为佐使,益气养阴、扶正抗癌,全方攻补兼施,共奏“抗癌祛毒、扶正祛邪”之功。前期临床研究表明,消癌解毒方配合化疗治疗肿瘤,具有较好的增效减毒作用<sup>[6-7]</sup>。同时,前期药效及作用机制研究证实,消癌解毒方抑制小鼠

S180 肉瘤及 H22 肝癌细胞的荷瘤组织的生长<sup>[8-9]</sup>,其机制可能与抑制趋化因子<sup>[10]</sup>,诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>,降低基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 活性<sup>[12]</sup>等有关。鉴于消癌解毒方对人结肠癌细胞的作用及机制研究尚未见报道,本实验以人结肠癌细胞株 HT-29 与 HCT-116 为研究对象,观察消癌解毒方含药血清对结肠癌细胞增殖及糖酵解的影响,探讨其可能的机制,为消癌解毒方防治肿瘤奠定生物学基础。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级雄性新西兰兔,体重(2.0 ~ 2.2)kg,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号 SCXK(苏)2012-0008,本实验经过南京中医药大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 细胞** 人结肠癌细胞 HT-29, HCT-116 购于上海拜力生物公司。

**1.3 药物** 消癌解毒方由白花蛇舌草、半枝莲、山慈姑、麦冬、太子参、莪术等中药按特定剂量比例组成,为周仲瑛教授原创组方,其方中各味药购自亳州国苑中药材饮片有限公司,经南京中医药大学郭立玮博士鉴定为正品,由南京中医药大学药理教研室煎制,浓缩成生药含量为 2 g·mL<sup>-1</sup> 的药液,

保存备用。

**1.4 试剂** 胎牛血清 (Capricorn scientific 公司, 批号 CP14-1299); RPMI-1640 培养基, 胰蛋白酶溶液, 青霉素-链霉素 (上海源培生物科技股份有限公司, 批号分别为 K40411, L40415, E40401); 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 批号 SP1080); 二甲基亚砜 (DMSO, 上海泰坦科技股份有限公司, 批号 P1116833); 细胞裂解液 (合肥 Biosharp 生物科技公司, 批号 6503595); 蛋白预染 Marker, BCA 蛋白定量检测试剂盒, ECL 检测试剂盒 (Thermo 公司, 批号分别为 26616, PB00138, QF218484); 乳酸 (LD) 测试盒 (南京凯基生物科技发展有限公司, 批号 KGT023); 葡萄糖 (Glu) 测试盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 F006); 低氧诱导因子 (HIF)-1 $\alpha$  rabbit antibody (Abcam 公司, 批号 ab179483); 己糖激酶 (hexokinase, HK)2 rabbit antibody, 丙酮酸脱氢酶激酶 (PDK)-1  $\alpha$  rabbit antibody, LD 脱氢酶 (LDHA) rabbit antibody,  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) rabbit antibody (Cell signaling 公司, 批号分别为 #2867, #3062, #3582, #8457)。

**1.5 仪器** SL 16 型低速离心机 (美国 Thermo 公司), HERAcCell 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司), XD 202 型倒置显微镜 (德国 Leica 公司), SW-CJ-2FD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), Multiskan FC 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), PowerPac™ Basic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), BioMate 3S 型紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司), TS-317 型 3D 脱色摇床 (中国其林贝尔仪器制造有限公司), Tanon-5500 型化学发光凝胶成像仪器 (中国天能科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人结肠癌细胞 HT-29 与 HCT-116 用含 10% 胎牛血清, 100 U·mL<sup>-1</sup> 青链霉素混合液的 RPMI 1640 培养液在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养。细胞长满单层铺满培养瓶后, 加入适量胰酶消化传代, 取对数生长期的细胞用于实验。

**2.2 含药血清制备** 将动物随机分为含药血清组和空白血清组。每组 4 只。含药血清组给予消癌解毒方 40 g·(kg·d)<sup>-1</sup> 灌胃 (剂量为人临床等效剂量的 5 倍), 每日分 2 次灌服。空白血清组给予等体积生理盐水灌胃, 连续给药 3 d, 末次给药前 12 h 禁食不禁水, 末次给药 2 h 后利多卡因麻醉, 颈总动脉取血, 血液静置 30 min 后, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 取血清, 合并同组血清。56 °C 水浴灭活 30 min。用

0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌, 置 -80 °C 冰箱保存备用。

**2.3 MTT 检测细胞增殖** 将 HT-29 与 HCT-116 细胞密度调整为 1  $\times$  10<sup>4</sup> 个/mL, 接种于 96 孔培养板, 每孔 150  $\mu$ L, 第 2 天吸去上清培养液, 设空白组, 每孔加兔空白血清 100  $\mu$ L; 5%, 10%, 15% 消癌解毒方含药血清组每孔加含药血清 100  $\mu$ L, 每组设 3 个复孔。置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 48 h 后检测, 每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 10  $\mu$ L, 继续孵育 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 10 min 使用甲臞完全溶解。于酶标仪上测 562 nm 波长处吸光度 A, 与空白组比较, 计算各组肿瘤细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = (1 - A_{\text{含药血清组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

**2.4 检测 LD 水平** 对数生长期的 HT-29 与 HCT-116 细胞贴壁 24 h 后, 分别加入 5%, 10%, 15% 消癌解毒方含药血清, 孵育 48 h, 收集细胞上清液, 依 LD 检测试剂盒操作。

**2.5 检测 Glu 水平** 对数生长期的 HT-29 与 HCT-116 细胞贴壁 24 h 后, 分别加入 5%, 10%, 15% 消癌解毒方含药血清, 孵育 48 h, 收集细胞, 将上述细胞悬液, 依 Glu 检测试剂盒操作。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 对数生长期 HCT-116 细胞贴壁后培养至细胞溶合 80% ~ 90%, 分别加入 5%, 10%, 15% 消癌解毒方含药血清, 孵育 48 h 后, 收集处理后的细胞和空白组细胞, 提取蛋白质, 按试剂盒说明用 BCA 法定量蛋白, 并变性。进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V 浓缩胶, 120 V 分离胶 2 h。采用湿转膜, 300 mA, 1.5 h 后将转入蛋白的 PVDF 膜用 10% 脱脂牛奶, 37 °C 封闭 1 h。一抗 (1:1 000) 孵育 4 °C 过夜。经 PBST 洗膜后加二抗 (1:2 000), 于室温孵育 1 h, 增强型化学发光试剂 (ECL) 发光试剂盒进行显色, 应用 Gel Analysis 软件进行条带分析。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 19.0 统计软件处理数据, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 根据方差齐性采用单因素方差分析和  $q$  检验比较各组间差异, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 消癌解毒方含药血清对人结肠癌 HT-29, HCT-116 细胞增殖的影响** 与空白组比较, 消癌解毒方含药血清作用于人结肠癌 HT-29, HCT-116 细胞 48 h 后, 能呈浓度依赖性地抑制细胞的增殖, 细胞增殖活力受到了明显的抑制 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 消癌解毒方含药血清处理 HT-29 和 HCT-116 细胞 48 h 后对细胞增殖抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on inhibition rates of HT-29 and HCT-116 cells proliferation after 48 h treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

细胞	组别	含药血清 体积分数 /%	A	抑制率 /%
HT-29	空白	-	0.572 ± 0.083	-
	消癌解毒方	5	0.527 ± 0.062	8.1
		10	0.474 ± 0.048 <sup>1)</sup>	17.0 <sup>1)</sup>
		15	0.328 ± 0.032 <sup>2)</sup>	42.7 <sup>2)</sup>
HCT-116	空白	-	0.735 ± 0.079	-
	消癌解毒方	5	0.623 ± 0.054 <sup>1)</sup>	15.3 <sup>1)</sup>
		10	0.491 ± 0.046 <sup>2)</sup>	33.2 <sup>2)</sup>
		15	0.366 ± 0.025 <sup>2)</sup>	50.2 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~4 同)。

**3.2 消癌解毒方含药血清对人结肠癌 HT-29, HCT-116 细胞 LD 与 Glu 水平的影响** 与空白组比较,给药组 HT-29, HCT-116 细胞呈现明显 LD, Glu 水平下降,且随给药浓度的增加 LD, Glu 水平下降越明显 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结果提示消癌解毒方含药血清能影响人结肠癌细胞的糖酵解水平,从而调控肿瘤细胞的能量代谢。见表 2。

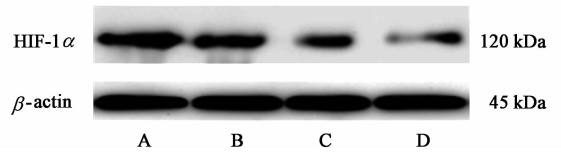
表 2 消癌解毒方含药血清处理人结肠癌 HT-29 和 HCT-116 细胞 48 h 后对 LD, Glu 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on lactate level and glucose level of HT-29 and HCT-116 cells after 48 h treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

细胞	组别	含药血清 体积分数 /%	LD	Glu
HT-29	空白	-	12.0 ± 0.635	3.247 ± 0.217
	消癌解毒方	5	6.0 ± 0.562 <sup>1)</sup>	1.842 ± 0.006 <sup>1)</sup>
		10	4.5 ± 0.231 <sup>2)</sup>	1.360 ± 0.008 <sup>1)</sup>
		15	3.0 ± 0.245 <sup>2)</sup>	0.533 ± 0.002 <sup>2)</sup>
HCT-116	空白	-	12.0 ± 0.523	4.513 ± 0.487
	消癌解毒方	5	7.5 ± 0.421 <sup>1)</sup>	1.853 ± 0.091 <sup>1)</sup>
		10	6.0 ± 0.156 <sup>1)</sup>	1.312 ± 0.066 <sup>2)</sup>
		15	4.5 ± 0.152 <sup>2)</sup>	0.073 ± 0.001 <sup>2)</sup>

**3.3 消癌解毒方含药血清对 HCT-116 细胞能量代谢相关蛋白水平调控的影响** 与空白组比较,人结肠癌 HCT-116 细胞经 10%, 15% 含药血清处理后, HIF-1 $\alpha$ , HK2, PDK1, LDHA 蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1, 表 3, 图 2, 表 4。说明消癌解毒方可以通过抑制 HK2, PDK1, LDHA 与低氧诱

导因子 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达来参与抑制人结肠癌细胞的糖酵解过程。



A. 空白组; B ~ D. 5%, 10%, 15% 消癌解毒方含药血清组 (图 2 同)

图 1 结肠癌 HCT-116 细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expression of HIF-1 $\alpha$  protein detected in HCT-116 cells

表 3 消癌解毒方含药血清对人结肠癌 HCT-116 细胞 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effects of Xiaoi Jiedu decoction on expression of HIF-1 $\alpha$  protein in HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	含药血清 体积分数 /%	HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin
空白	-	0.511 ± 0.044
消癌解毒方	5	0.422 ± 0.015
	10	0.346 ± 0.027 <sup>1)</sup>
	15	0.120 ± 0.004 <sup>2)</sup>

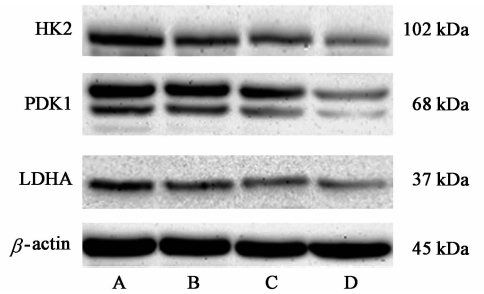


图 2 人结肠癌 HCT-116 细胞糖酵解相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of aerobic glycolysis-related proteins in HCT-116 cells

表 4 消癌解毒方含药血清对人结肠癌 HCT-116 细胞糖酵解相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Xiaoi Jiedu decoction on expression of aerobic glycolysis-related proteins in HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	含药血清 体积分数 /%	HK2 / $\beta$ -actin	PDK1 / $\beta$ -actin	LDHA / $\beta$ -actin
空白	-	0.253 ± 0.041	0.510 ± 0.037	0.350 ± 0.061
消癌解毒方	5	0.227 ± 0.037	0.441 ± 0.032	0.295 ± 0.010
	10	0.112 ± 0.015 <sup>1)</sup>	0.350 ± 0.047 <sup>1)</sup>	0.217 ± 0.036 <sup>1)</sup>
	15	0.144 ± 0.030 <sup>1)</sup>	0.131 ± 0.031 <sup>2)</sup>	0.163 ± 0.027 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

在肿瘤的发生发展过程中伴随着代谢途径的重塑,即使是氧气供应充足的条件下肿瘤细胞也主要

以糖酵解而非线粒体的氧化磷酸化提供能量,这种异常代谢现象被称为有氧糖酵解即 Warburg 效应。近年来随着人们对 Warburg 效应的重新关注,肿瘤细胞能量代谢异常引起众多学者的重视。肿瘤细胞通过糖酵解途径获得更多代谢所需物质,具体表现为 Glu 摄取及 LD 生成增加<sup>[13]</sup>。本实验中消癌解毒方含药血清干预人结肠癌 HT-29 与 HCT-116 细胞 48 h 后,发现与空白组比较,其可以下调 LD 的生成水平,减少细胞对 Glu 的消耗,且含药血清浓度越高,Glu 摄取与 LD 生成越少。提示消癌解毒方含药血清可以通过抑制有氧糖酵解的进程,从而调控肿瘤细胞的能量代谢。

为了进一步阐明消癌解毒方抑制结肠癌细胞有氧糖酵解的作用机制,本研究对肿瘤细胞糖酵解过程中的关键酶进行了检测。HK 作为糖酵解途径的第一个关键酶,有 4 种同工酶(HK1, HK2, HK3, HK4)。其中 HK2 和肿瘤的相关性最大,在恶性肿瘤细胞中表达较高<sup>[14]</sup>。Patra 等<sup>[15]</sup>发现抑制 HK2 活性可降低有氧糖酵解水平,并可使癌细胞的代谢方式发生转变,即由有氧酵解转化为氧化磷酸化。在本课题组研究中发现消癌解毒方可以抑制己糖激酶 HK2 的表达。PDK 是细胞糖酵解关键限速酶 PDH 的调节酶。丙酮酸脱氢酶激酶的 4 种同工酶中 PDK1 在 PDH 磷酸化过程中发挥重要的功能,尤其在 PDH 长期调节中尤为重要。Warburg 效应研究中,PDK1 作用被重视,抑制 PDK1 能扭转肿瘤细胞糖酵解的活跃状态,促进有氧氧化的进行,继而促进肿瘤化疗和放疗的效果。LDH 是催化 LD 生成的关键酶,是有氧糖酵解过程中的重要调控蛋白。LDH 是由两个亚基(LDHA 和 LDHB)组成的四聚体<sup>[16]</sup>。LDHA 涉及糖酵解的最后步骤,且在多种肿瘤中高表达。LDHA 的高活性可以维持线粒体膜的高电位,抑制线粒体的氧化呼吸进而减少氧气的消耗,促进 LD 的产生<sup>[17]</sup>。酸性微环境的形成与肿瘤的生成、转移及患者预后相关显著<sup>[18]</sup>。本实验结果显示,消癌解毒方含药血清可显著降低 PDK1 与 LDHA 的表达,且随含药血清浓度的增加,抑制作用增强。

HIF 是细胞为适应缺氧的微环境而诱发的转录因子,是糖酵解的基本调节因子。HIF-1 作为 HIF 的 3 种亚型之一,在消化道相关肿瘤中,胃癌、结肠癌、肝癌等组织标本中高表达<sup>[19-21]</sup>,并且能够上调糖酵解酶的相关基因的表达及大部分糖酵解酶的活性。HIF-1 $\alpha$  与 HK2 密切相关,缺氧条件下,HK2 的

活性可增加到 3 倍<sup>[22]</sup>。Kim 等<sup>[23]</sup>通过实验显示 PDK1 的表达可被 HIF-1 $\alpha$  调控,可能与肿瘤缺氧的环境有关。张伟锋等<sup>[24]</sup>发现 RNA 干扰抑制了 HIF-1 $\alpha$  基因表达,从而减少了 LDHA 基因的表达。消癌解毒方含药血清干预人结肠癌 HCT-116 细胞 48 h 后,可降低 HIF-1 $\alpha$  的表达,药物浓度越高对 HIF-1 $\alpha$  表达的抑制作用越强。初步验证了消癌解毒方含药血清对糖酵解过程的调控可能是通过降低 HIF-1 $\alpha$  的表达来实现的。

综上所述,消癌解毒方含药血清可以抑制肿瘤细胞的糖酵解过程,从而抑制肿瘤细胞的增殖,其抑制糖酵解过程的机制可能与降低 HIF-1 $\alpha$  的表达,进而减少糖酵解相关酶 HK2, PDK1, LDHA 的表达有关。此实验为研究消癌解毒方发挥抗肿瘤作用做出了新的探索,本课题组还将进一步通过体内外实验,进行多层次深入研究,以阐明消癌解毒方防治肿瘤的作用机制。

#### [参考文献]

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.
- [2] Rebecca S, Deepa N, Ahmedin J. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [3] Bosetti C, Levi F, Rosato V, et al. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe [J]. Int J Cancer, 2011, 129(1): 180-191.
- [4] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] 陈海彬,周红光,程海波,等. 消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响 [J]. 南京医科大学学报, 2009, 29(9): 1257-1259.
- [6] 周红光,陈海彬,吴勉华,等. 消癌解毒方配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(7): 1140-1143.
- [7] 陈海彬,周红光,吴勉华,等. 消癌解毒方对中晚期恶性肿瘤患者免疫功能的影响 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2009, 29(9): 1257-1259.
- [8] 周红光,吴勉华. 消癌解毒方抗肿瘤作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 815-816.
- [9] 陈海彬,沈波,李黎,等. 消癌解毒方抑制肝癌 H22 移植瘤的生长及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 28-32.
- [10] 李文婷,赵凤鸣,周红光,等. 消癌解毒方对人肝癌 SMMC-7721 细胞相关趋化因子蛋白表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 464-467.
- [11] 李黎,王明艳,陈海彬,等. 消癌解毒方含药血清对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用 [J]. 中药新药

- 与临床药理, 2011, 22(6):587-589.
- [12] 张玉, 吴勉华, 陈海彬, 等. 消癌解毒方体内抑瘤作用机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):234-237.
- [13] Beyoğlu D, Imbeaud S, Maurhofer O, et al. Tissue metabolomics of hepatocellular carcinoma; tumor energy metabolism and the role of transcriptomic classification [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1):229-238.
- [14] Wilson J E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function [J]. *J Exp Biol*, 2003, 206(12):2049-2057.
- [15] Patra K C, WANG Q, Bhaskar P T, et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(2):213-228.
- [16] GAO X, WANG H, YANG J J, et al. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase [J]. *Mol Cell*, 2012, 45(5):598-609.
- [17] Gupta V, Bamezai R N. Human pyruvate kinase M2; a multifunctional protein [J]. *Protein Sci*, 2010, 19(11):2031-2044.
- [18] Chiche J, Brahimi-Horn M C, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis; a common feature in cancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4):771-794.
- [19] WU Y L, HU L N, ZHENG C D, et al. Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Natl Med J China*, 2016, 96(18):1418-1423.
- [20] Lee S Y, Park M J, Lee H K, et al. Increased expression of thymosin  $\beta_4$  is independently correlated with hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and worse clinical outcome in human colorectal cancer [J]. *J Pathol Transl Med*, 2016, 51(1):9-16.
- [21] JIA Z, JIANG G, FENG Y. Serum HIF-1 $\alpha$  and VEGF levels pre-and post-TACE in patients with primary liver cancer [J]. *Chin Med Sci J*, 2011, 26(3):158-162.
- [22] Robey R B, Hay N. Mitochondrial hexokinases: guardians of the mitochondria [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(5):654-658.
- [23] Kim J, DANG C V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(18):8927-8930.
- [24] 张伟锋, 朱宏, 曾楷峰, 等. RNA 干扰 HIF-1 $\alpha$  对食管癌细胞糖酵解相关基因表达的影响 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(7):905-909.

[责任编辑 张丰丰]