

代谢重编程对攻毒治法靶向治疗肺癌干细胞的影响

李慧杰*, 胡熙文, 齐元富, 李秀荣, 刘寨东
(山东中医药大学附属医院, 济南 250014)

[摘要] **目的:** 观察攻毒治法代表药物纳米雄黄靶向肺癌干细胞缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIF)效应分子驱动代谢重编程的作用,探究肺癌干细胞、代谢重编程在肺癌转移过程中的效应机制,验证攻毒治法防治肺癌转移的有效性。**方法:** 体外培养肺癌 A549 细胞,分选肺癌干细胞并鉴定。按空白组,顺铂($5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组,纳米雄黄低、中、高剂量($100, 200, 400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组分别干预,采用葡萄糖氧化酶法检测纳米雄黄对肺癌干细胞糖代谢的影响,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot),酶联免疫吸附测定(ELISA)分别检测纳米雄黄对肺癌干细胞代谢重编程相关基因缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), C-myc, p53 表达的影响,对相关蛋白 HIF-1 α , 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K), 蛋白激酶 B(Akt), 雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达的影响,对相关酶葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1), 丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1), M 型丙酮酸激酶(PKM), 磷酸果糖激酶(PFK), 丙酮酸脱氢酶(PDH), 乳酸脱氢酶(LDH)表达的影响。**结果:** 与空白组比较,纳米雄黄可降低肺癌干细胞葡萄糖消耗,随剂量增加葡萄糖消耗不断降低,呈时间剂量依赖性($P < 0.01$);纳米雄黄可抑制肺癌干细胞代谢重编程关键因子 HIF-1 α mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$),并可下调 C-myc mRNA,上调 p53 mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$),抑制相关蛋白 PI3K, Akt, mTOR 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),抑制相关酶 GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),且纳米雄黄随剂量增加调控能力不断增强。**结论:** 攻毒治法可通过靶向 HIF 效应分子驱动肺癌干细胞代谢重编程,进而抑制肺癌侵袭转移。

[关键词] 肺癌; 干细胞; 代谢重编程; 攻毒治法; 纳米雄黄; 缺氧诱导因子

[中图分类号] R22;R242;R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0075-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200423

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191104.0938.002.html>

[网络出版时间] 2019-11-04 10:52

Effect of Metabolic Reprogramming on Toxin Eliminating Therapeutics in Targeting Lung Cancer Stem Cells

LI Hui-jie*, HU Xi-wen, QI Yuan-fu, LI Xiu-rong, LIU Zhai-dong

(The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of realgar nanoparticles (a representative drug in toxin eliminating therapeutics) targeting hypoxia-inducible factors (HIF), which act as effector molecules on metabolic reprogramming of lung cancer stem cells, and to explore the effect mechanism of lung cancer stem cells and metabolic reprogramming in the process of lung cancer metastasis, so as to verify the effectiveness of toxin eliminating therapeutics in the prevention and treatment of lung cancer metastasis. **Method:** Lung cancer A549 cells were cultured *in vitro*, and lung cancer stem cells were then identified and selected. The stem cells were divided into blank control group, cisplatin group ($5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), realgar nanoparticles low, medium and high dose groups ($100, 200, 400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). After intervention, glucose oxidase method was used to detect the effect of realgar nanoparticles on the glucose metabolism of lung cancer stem cells, real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression levels of hypoxia-inducible factors-1 α (HIF-1 α),

[收稿日期] 20190630(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503542)

[通信作者] *李慧杰,博士,主治医师,从事中西医结合肿瘤防治研究, E-mail:2008lihuijie@163.com

C-myc and p53, while Western blot was used to detect the expression of related proteins HIF-1 α , phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt) and mammalian target of rapamycin (mTOR), and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the glucose transporter 1 (GLUT1), pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), pyruvate kinase M (PKM), phosphofructokinase (PFK), pyruvate dehydrogenase (PDH) and lactic dehydrogenase (LDH) expression. **Result:** As compared with the blank control group, realgar nanoparticles can reduce the glucose consumption of lung cancer stem cells, and the glucose consumption was reduced with the increase of dose in a time-and dose-dependent manner ($P < 0.01$). Realgar nanoparticles can inhibit the mRNA expression of HIF-1 α , a key factor in metabolic reprogramming of lung cancer stem cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), down-regulated C-myc mRNA and up-regulated the p53 mRNA expression ($P < 0.05$, $P < 0.01$), down-regulated protein expressions of PI3K, Akt, mTOR ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and inhibited the expression of related enzymes GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, and LDH levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$). With the increase of dose, the regulation and control ability of realgar nanoparticles gradually increased. **Conclusion:** Toxin eliminating therapeutics can drive the metabolic reprogramming of lung cancer stem cells by targeting HIF effector molecule, and then inhibit the invasion and metastasis of lung cancer.

[**Key words**] lung cancer; stem cells; metabolic reprogramming; toxin eliminating therapeutics; realgar nanoparticles; hypoxia-inducible factors

肺癌的发病率与死亡率在全球恶性肿瘤中均位居首位,防治形式十分严峻。临床中肺癌治疗失败及患者死亡多由肿瘤发生浸润转移、疾病进展导致,因此,如何抑制肿瘤细胞侵袭转移、挖掘其相关机制、筛选有效防治方法是肿瘤医生面临的主要问题之一。肿瘤干细胞(CSCs)是肿瘤发生发展、侵袭转移的根源,肺癌也不例外^[1];当肺内正常干细胞的自我更新能力受损,或恶性突变传递到肺内的前体细胞发生突变、重新获得自我更新能力,都可导致肺干细胞无限增殖,最终促成肺癌的发生发展^[2]。而肿瘤能量代谢重编程亦是肿瘤十大特征之一,其中,葡萄糖代谢异常是肿瘤代谢最突出的特征,与肿瘤侵袭转移密切相^[3];且研究发现缺氧诱导因子(HIF)是肿瘤细胞糖酵解旺盛的驱动因素之一,在整个代谢网络中发挥关键作用^[4]。有多项研究提示,肿瘤干细胞代谢型的重编程可能是造成肿瘤发生的原因,HIF介导的代谢重编程是维持肿瘤干细胞自我更新的关键,可推动肿瘤干细胞获得侵袭转移的能力^[5-6]。

研究证实肿瘤细胞通过缺氧诱导因子-1(HIF-1)介导可调控与糖酵解能量代谢相关的基因、蛋白、酶等,并促进瓦伯格效应(Warburg effects)的发生,进而驱动代谢重编程^[7]。果糖激酶(FRK)通过诱导代谢重编程增强 H1299 细胞的干度,最终促进上皮细胞一间充质转化(EMT)与转移^[8]。报道了基于代谢组学的多西他赛调控肺癌细胞代谢重编程研究^[9];卢建峰等^[10]总结了近年中药治疗肺癌干细胞的研究进展情况;李晓芸等^[11]总结了中药干预

肿瘤 Warburg 效应的研究进展;余功等^[12]实验证实清燥救肺汤可降低肺癌细胞葡萄糖摄取速率抑制癌细胞增殖,药效靶点可能是糖酵解关键酶;但没有查阅到中医药调控 HIF-1 干预肺癌干细胞代谢重编程的相关报道。攻毒治法是肿瘤治疗的有效方法之一,结合前期研究基础,本课题组发现攻毒治法的代表药物纳米雄黄具有抑制肺癌细胞增殖、转移的作用^[13]。为此,本课题组提出了 HIF 效应分子驱动肺癌干细胞代谢重编程是肺癌患者余毒复燃、癌毒走窜的分子生物学微观表现之一的假说,并通过实验观察纳米雄黄靶向调控 HIF 效应分子是否可消减肺癌干细胞 Warburg 效应,进而驱动代谢重编程防治肺癌细胞侵袭转移,以期攻毒治法防治肺癌转移提供实验依据及理论支持。

1 材料

1.1 细胞 人肺腺癌 A549 细胞株,购自山东省医学科学院细胞学实验室,传至第 4~5 代。

1.2 药物和试剂 胎牛血清(上海吉泰依科赛生物科技有限公司,批号 FCS100);RPMI 1640 培养基(美国 HyClone 公司,批号 SH30809.01);葡萄糖氧化酶试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司,批号 GOD-1-Y);总 RNA 抽提试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026C);反转录试剂盒(宝日生物技术有限公司,批号 RR047A);BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0010S);兔抗磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K),兔抗蛋白激酶 B (Akt),兔抗雷帕霉素靶蛋白(mTOR),兔抗缺氧诱导因子-1 α

(HIF-1 α), CD133 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 4249, 4685, 2983, 14179, 64326); 小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 TA-08); ECL 超敏发光液(北京索莱宝科技有限公司, 批号 PE0010-25); 葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1), 丙酮酸脱氢酶激酶 1 (PDK1), M 型丙酮酸激酶(PKM), 磷酸果糖激酶(PFK), 丙酮酸脱氢酶(PDH), 乳酸脱氢酶(LDH) 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(亚太恒信生物科技有限公司, 批号分别为 MM-1186H2, MM-13436H1, MM-14172H2, MM-13234H2, MM-13434H2, MM-0354H2)。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司, 国药准字 H20023461)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计及合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物	序列	长度/bp
C-myc	上游 5'-CAACCGAAAAATGCACCAGCC-3'	97
	下游 5'-TAGCTCGTTCCTCCTCTGGC-3'	
p53	上游 5'-GGAACAGCTTTGAGGTGCGT-3'	125
	下游 5'-CAGTGCTCGCTTAGTGCTCC-3'	
HIF-1 α	上游 5'-GCACAGGCCACATTCACGTA-3'	84
	下游 5'-GCACCAAGCAGGTTCATAGGT-3'	
GAPDH	上游 5'-AGCCACGATCGCTCAGACA-3'	66
	下游 5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'	

1.3 仪器 INCO153 型 CO₂ 培养箱(德国 Memmert 公司); Axiovert 40C 型倒置相差显微镜, Axio Vert. A1 型倒置荧光显微镜(德国 Carl Zeiss 公司); 5424R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 超微量紫外分光光度计, 5020 型 Arktik 多功能 PCR 仪, Multiskan 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司); LightCycler 480 II 型高通量实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(瑞士 Roche 公司); PowerPac Universal 型电泳仪, Trans-Blot Turbo 型全能型蛋白转印系统(美国 Bio-Rad 公司); FluorChem Q 型凝胶成像分析系统(美国 Protein Simple 公司)。

1.4 纳米雄黄及其溶液制备 纳米雄黄制备^[14], 由山东中医药大学附属医院药剂科购买雄黄, 由山东龙脉科技发展有限公司使用 LVM-80WE 型龙脉精研机制备, 由济南微纳颗粒仪器股份有限公司使用光子相关纳米激光粒度分析仪测定, 经检测所制备的雄黄纳米颗粒呈球形、大小均匀, 平均粒径约

72.79 nm, 符合纳米药物制剂要求。纳米雄黄溶液制备, 玻璃吸管吸取浓硝酸 1 mL 滴入玻璃容器中, 加入纳米雄黄 0.4 g, 再迅速加入 KCl 粉末至溶液饱和, 取纳米雄黄 KCl 饱和硝酸溶液 40 μ L 滴入 RPMI 1640 培养基 40 mL, 混合均匀配制成质量浓度为 400 mg·L⁻¹ 的纳米雄黄溶液, NaOH 溶液调整 pH 7.40, 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

2 方法

2.1 分组^[13-14] 空白组不加任何药物; 顺铂组给予顺铂(5 mg·L⁻¹); 纳米雄黄低、中、高剂量组给予纳米雄黄(100, 200, 400 mg·L⁻¹)。

2.2 干细胞分选及鉴定^[15] 收集生长状态良好的 A549 细胞, 细胞计数, 调整细胞密度, 加入 CD133 抗体、封闭液, 避光孵育 30 min; 洗涤; 用分离柱收集阴性结合细胞和阳性结合细胞, 培养。所培养细胞通过自我更新能力测定实验、软琼脂克隆形成试验鉴定其干性, 结果表明二代细胞球随着时间的增加更新能力逐渐增大、细胞集落形成率 80.12%, 符合实验需要。

2.3 葡萄糖氧化酶法 收集肺癌干细胞, 制备细胞悬液, 调整密度, 接种培养 3 d, 换液, 按实验分组干预, 分别培养 24, 48 h, 采用葡萄糖氧化酶法测定各时段各组细胞培养液的葡萄糖浓度, 酶标仪 505 nm 波长处测定吸光度 A, 计算各组细胞的葡萄糖消耗情况。

2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关 mRNA 表达 收集肺癌干细胞, 制备细胞悬液, 调整密度, 接种培养 3 d, 换液, 按实验分组干预, 培养 48 h, 使用 trizol 抽提各组总 RNA, 使用 NanoDrop 2000 型超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度判定其质量, 进行反转录反应, 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。采用相对定量分析, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 表示 mRNA 相对表达量。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 细胞分组及培养同 2.4 项, 细胞提取蛋白, BCA 试剂盒蛋白定量。制胶, 加样, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 加入二抗(1:5 000), 恒温摇床 1 h, 发光鉴定, 观察条带显影情况, 读取条带灰度值, 分析结果。

2.6 ELISA 检测 GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 表达水平 细胞分组及培养同 2.4 项, 按试剂盒说明书逐步进行细胞处理收集、包被、封闭、抗体反应、显色、终止反应等操作, 后于酶标仪波长

492 nm 处测定 A, 计算各组细胞 GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 的表达水平。

2.7 统计学方法 运用 SPSS 22.0 软件, 数据采用单因素方差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 则有统计学意义。

3 结果

3.1 纳米雄黄对肺癌干细胞糖代谢的影响 与空白组比较, 各给药组 24, 48 h 肺癌干细胞葡萄糖消耗均显著降低 ($P < 0.01$)。与顺铂组比较, 纳米雄黄低剂量组 24, 48 h 葡萄糖消耗显著升高 ($P < 0.01$); 纳米雄黄中剂量组 48 h 显著降低 ($P < 0.01$); 纳米雄黄高剂量组 24, 48 h 葡萄糖消耗显著降低 ($P < 0.01$)。可见, 纳米雄黄随剂量增加, 细胞葡萄糖消耗不断降低; 提示纳米雄黄可降低肺癌干细胞葡萄糖消耗, 且呈时间剂量依赖性。见表 2。

3.2 纳米雄黄对代谢重编程相关 C-myc, p53, HIF-1 α mRNA 表达的影响 与空白组比较, 各给药

表 2 纳米雄黄对肺癌干细胞葡萄糖消耗的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of realgar nanoparticles on glucose consumption of lung cancer stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h 葡萄糖消耗	48 h 葡萄糖消耗
空白	-	1.873 \pm 0.062	6.191 \pm 0.053
顺铂	5	1.372 \pm 0.054 ¹⁾	4.936 \pm 0.048 ¹⁾
纳米雄黄	100	1.705 \pm 0.044 ^{1,2)}	5.317 \pm 0.048 ^{1,2)}
	200	1.346 \pm 0.045 ¹⁾	4.649 \pm 0.050 ^{1,2)}
	400	1.026 \pm 0.039 ^{1,2)}	3.641 \pm 0.042 ^{1,2)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与顺铂组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

组可下调 C-myc, HIF-1 α mRNA 的表达, 上调 p53 mRNA 的表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 其中纳米雄黄组随剂量增加, 其下调或上调能力增加, 呈剂量依赖性。除纳米雄黄中剂量组 C-myc, 低剂量组 HIF-1 α 外, 余纳米雄黄组与顺铂组相比差异明显 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 纳米雄黄对肺癌干细胞代谢重编程相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of realgar nanoparticles on metabolic reprogramming-related mRNA expression in lung cancer stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	C-myc	p53	HIF-1 α
空白	-	1.170 \pm 0.085	1.047 \pm 0.089	1.157 \pm 0.085
顺铂	5	0.994 \pm 0.076 ²⁾	4.026 \pm 0.133 ²⁾	0.752 \pm 0.060 ²⁾
纳米雄黄	100	1.058 \pm 0.083 ^{1,4)}	3.867 \pm 0.110 ^{2,3)}	0.824 \pm 0.059 ²⁾
	200	0.807 \pm 0.059 ²⁾	4.305 \pm 0.102 ^{2,4)}	0.612 \pm 0.067 ^{2,4)}
	400	0.643 \pm 0.052 ^{2,4)}	4.923 \pm 0.129 ^{2,4)}	0.517 \pm 0.053 ^{2,4)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4, 5 同)。

3.3 纳米雄黄对代谢重编程相关蛋白 PI3K, Akt, mTOR, HIF-1 α 蛋白表达的影响 与空白组比较, 各给药组可显著抑制 PI3K, Akt, mTOR, HIF-1 α 蛋白表达 ($P < 0.01$); 除纳米雄黄中剂量组 mTOR, 纳

米雄黄低剂量组 HIF-1 α 外, 余纳米雄黄组与顺铂组比较差异明显 ($P < 0.05, P < 0.01$); 纳米雄黄随剂量的增加其抑制程度增加, 呈剂量依赖性。见表 4, 图 1。

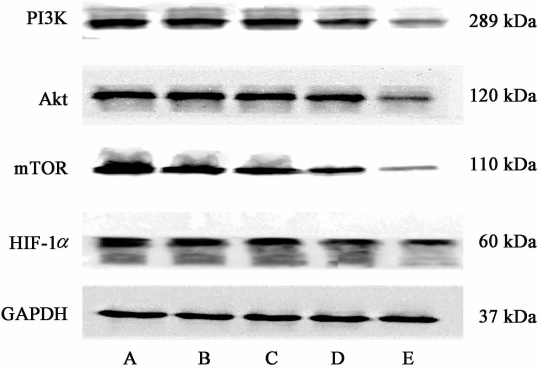
表 4 纳米雄黄对肺癌干细胞代谢重编程相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of realgar nanoparticles on metabolic reprogramming-related protein expression in lung cancer stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH	HIF-1 α /GAPDH
空白	-	1.309 \pm 0.088	1.382 \pm 0.091	0.896 \pm 0.075	0.936 \pm 0.068
顺铂	5	0.940 \pm 0.085 ²⁾	1.066 \pm 0.082 ²⁾	0.669 \pm 0.078 ²⁾	0.661 \pm 0.057 ²⁾
纳米雄黄	100	1.162 \pm 0.077 ^{2,4)}	1.197 \pm 0.091 ^{2,3)}	0.748 \pm 0.057 ^{2,3)}	0.702 \pm 0.054 ²⁾
	200	0.818 \pm 0.078 ^{2,3)}	0.934 \pm 0.086 ^{2,3)}	0.605 \pm 0.053 ²⁾	0.577 \pm 0.058 ^{2,3)}
	400	0.671 \pm 0.072 ^{2,4)}	0.785 \pm 0.063 ^{2,4)}	0.512 \pm 0.047 ^{2,4)}	0.493 \pm 0.045 ^{2,4)}

3.4 纳米雄黄对代谢重编程相关酶 GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 水平的影响 与空白组比较, 各给药组可明显抑制 GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 水平表达 ($P < 0.05, P < 0.01$); 除中剂量

组 GLUT1, PKM, PDH 及低剂量组 PFK, PKM, LDH 外, 余纳米雄黄各组与顺铂组比较差异明显 ($P < 0.05, P < 0.01$); 其中, 纳米雄黄各组呈剂量依赖性, 剂量越高组抑制程度越高。见表 5。



A. 空白组; B. 顺铂组; C. 纳米雄黄低剂量组; D. 纳米雄黄中剂量组; E. 纳米雄黄高剂量组

图 1 纳米雄黄对肺癌干细胞 PI3K, Akt, mTOR, HIF-1 α 表达的影响

Fig. 1 Effect of Realgar nanoparticles on expression of PI3K, Akt, mTOR and HIF-1 α in lung cancer stem cells

4 讨论

肿瘤细胞偏好糖酵解早在 20 世纪 20 年代就被德国 Otto Warburg 教授发现, 该现象被称之为“Warburg 效应”, 且陆续被发现广泛存在各种实体瘤中, 证实其与肿瘤发生发展密切相关^[16]。近年来研究发现, 肿瘤细胞的代谢异常情况远较 Warburg 教授最初的设想复杂, 其并不是单一代谢通路的简单调整, 而是整个代谢网络的全面改变, 即代谢重编程^[17]。经典的代谢重编程即 HIF 的累积, PI3K/Akt 通路的活化, p53, C-myc 基因的表达变化, 以及代谢关键酶的表达与活性失常^[18]。代谢网络中的 HIF-1 激活在肿瘤细胞糖酵解过程中扮演重要角色, 糖酵解活动增强与 HIF-1 水平升高相关^[19]。可见, 代谢是肿瘤发生发展过程中的一个核心问题, 代谢重编程与肿瘤侵袭转移密切相关, 是介导细胞恶性转化

表 5 纳米雄黄对肺癌干细胞代谢重编程相关酶表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of realgar nanoparticles on metabolic reprogramming-related enzymes expression in lung cancer stem cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	GLUT1/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PDK1/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	PFK/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	30.787 \pm 2.918	33.782 \pm 3.230	16.134 \pm 1.907
顺铂	5	21.324 \pm 1.856 ²⁾	23.515 \pm 2.079 ²⁾	10.778 \pm 1.782 ²⁾
纳米雄黄	100	24.158 \pm 2.115 ^{2,3)}	27.298 \pm 2.053 ^{2,3)}	12.432 \pm 1.574 ²⁾
	200	19.989 \pm 1.943 ²⁾	19.143 \pm 2.338 ^{2,4)}	8.577 \pm 1.546 ^{2,3)}
	400	15.746 \pm 1.576 ^{2,4)}	13.803 \pm 2.265 ^{2,4)}	6.598 \pm 1.135 ^{2,4)}
组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	PKM/ng·L ⁻¹	PDH/ng·L ⁻¹	LDH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	42.460 \pm 3.992	10.439 \pm 1.233	50.518 \pm 4.582
顺铂	5	31.372 \pm 3.371 ²⁾	7.180 \pm 1.083 ²⁾	41.872 \pm 3.089 ³⁾
纳米雄黄	100	34.383 \pm 3.790 ²⁾	8.598 \pm 1.022 ^{2,3)}	45.185 \pm 4.167 ²⁾
	200	28.078 \pm 3.301 ²⁾	6.106 \pm 1.000 ²⁾	36.703 \pm 3.412 ^{2,3)}
	400	20.344 \pm 2.543 ^{2,4)}	4.247 \pm 0.788 ^{2,4)}	30.020 \pm 2.602 ^{2,4)}

不可或缺的途径, 而 HIF 是肿瘤细胞糖酵解旺盛的驱动因素之一, 干预 HIF 活动可延缓肿瘤进程。

肺癌干细胞是肺癌发生发展的“根源”, 肺癌的复发转移、耐药变异等恶性特征均与肺癌干细胞有关^[20]。正常干细胞与缺氧关系密切, 在不同阶段呈现不同的代谢特点, 主要以糖酵解为主, 在分化过程中逐渐向氧化磷酸化转变, 既可快速产生三磷酸腺苷, 又可减少活性氧类物质产生, 以保证干细胞的稳态^[21]。与正常干细胞及肿瘤细胞的糖代谢相比, 肿瘤干细胞存在特殊的代谢状态, 肿瘤干细胞在分化过程中出现的 Warburg 效应可促进其增殖能力加快, 但具体机制需进一步探索。近年来, 研究发现肿瘤干细胞糖代谢存在糖酵解和氧化磷酸化两条途径, 并受到微环境中氧分压及葡萄糖浓度等的影响^[22]。可见, 肺癌干细胞存在特殊的代谢状态, Warburg 效应的发生与肺癌干细胞侵袭转移密切

相关, HIF 同样发挥着关键作用。癌毒贯穿肿瘤发生发展过程始终, 攻毒治法是肿瘤治疗常用法则之一, 临床中可根据患者具体病情全程辨证应用攻毒治法, 并注重扶正与祛邪力度的平衡^[23]。攻毒治法代表药物雄黄具有解毒、杀虫之效, 研究表明该药具有明显的抗肿瘤作用, 而采用纳米技术解决其难溶问题, 不仅能提高生物利用度和药效, 还能增强对瘤细胞的靶向性及降低毒副作用^[24]。前期研究发现, 纳米雄黄可有效抑制肺癌 A549 细胞迁移、侵袭, 可通过降低 β -连环蛋白 (β -catenin) 及 C-myc 表达, 且能下调血管内皮生长因子 (VEGF), HIF-1 的表达, 有效抑制肺癌 A549 细胞增殖, 侵袭^[13, 25]。研究证实, 攻毒中药纳米雄黄可通过靶向调控 HIF-1, C-myc 等表达有效抑制肿瘤细胞增殖侵袭, 但攻毒治法抗肿瘤转移的具体机制有待进一步挖掘。

本研究结果表明, 纳米雄黄可降低肺癌干细胞

葡萄糖消耗,且呈时间剂量依赖;可抑制肺癌干细胞代谢重编程关键因子 HIF-1 α 的表达,并可下调 C-myc 基因,上调 p53 基因的表达,抑制 PI3K, Akt, mTOR, GLUT1, PDK1, PFK, PKM, PDH, LDH 等相关蛋白及相关酶的表达。结果提示,攻毒治法可通过靶向 HIF 效应分子驱动肺癌干细胞代谢重编程,进而抑制肺癌侵袭转移。此外,本研究还进行了体内相关实验,纳米雄黄同样可消减肺癌干细胞小鼠糖代谢,调控其代谢重编程,抑制肺癌转移。临床观察亦发现未合并糖尿病及相关代谢疾病的肺癌患者中,复发转移者糖代谢高于非复发转移者,且有统计学差异,但相关药物干预的疗效观察尚未进行。

综上,研究验证了 HIF 效应分子驱动肺癌干细胞代谢重编程是肺癌患者余毒复燃、癌毒走窜的分子生物学微观表现之一的假说,证实了纳米雄黄可靶向肺癌干细胞驱动代谢重编程,进而抑制肺癌侵袭转移,提示攻毒治法防治肺癌转移的可行性与有效性,为防治肺癌转移提供了新的治疗策略。

[参考文献]

[1] JAGUST P, LUXÁN-DELAGDO B, PAREJO-ALOSO B, et al. Metabolism-based therapeutic strategies targeting cancer stem cells [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10(1):203-212.

[2] CORTES-DERICKS L, GALETTA D. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells in lung cancer: benefits, risks and challenges [J]. *Cell Oncol*, 2019, 28(7): 13402-13415.

[3] GANDHI N, GOKUL M D. Metabolic reprogramming in breast cancer and its therapeutic implications [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 89-103.

[4] 李慧杰,齐元富,李秀荣. 缺氧诱导因子 1 在肿瘤进程中的作用机制研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(18): 2979-2981.

[5] QIN J, LIU Y, LU Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10592-10599.

[6] MATHEWS J, DAVY P M, GARDNER L H, et al. Stem cells, telomerase regulation and the hypoxic state [J]. *Front Biosci*, 2016, 21(1): 303-315.

[7] NAGAO A, KOBAYASHI M, KOYASU S, et al. HIF-1-dependent reprogramming of glucose metabolic pathway of cancer cells and its therapeutic significance [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(2): 238-252.

[8] ZHANG L, YANG Y, CHAI L, et al. FRK plays an oncogenic role in nonsmall cell lung cancer by enhancing the stemness phenotype via induction of metabolic reprogramming [J]. *Intern J Can*, 2019, 145(5): 1169-1182.

[9] 孙海超,朴海龙,齐欢,等. 基于代谢组学的多西他赛

调控肺癌细胞代谢重编程研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2019, 22(4):208-215.

[10] 卢建峰,黄静,肖桦,等. 中药治疗肺癌干细胞研究进展 [J]. *中药与临床*, 2018, 9(4): 63-66.

[11] 李晓芸,卞卡. 中药干预肿瘤 Warburg 效应的研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 31(1): 87-99.

[12] 余功,陈江涛,胡桥,等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20191325.

[13] 齐元富,李慧杰,刘寨东. 纳米雄黄对肺癌 A549 细胞增殖影响及其机制的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(1): 27-30.

[14] 齐元富,李慧杰,聂奔. 纳米雄黄对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株增殖抑制及诱导凋亡作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(4): 187-191.

[15] 李慧杰,齐元富,李秀荣,等. 芪连扶正胶囊干预肺癌干细胞白介素-10、转化生长因子- β 1 表达对免疫重塑的影响 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(18): 1968-1971.

[16] SHAN M, DAI D, VUDEM A, et al. Multi-scale computational study of the Warburg effect, reverse warburg effect and glutamine addiction in solid tumors [J]. *PLoS Comput Biol*, 2018, 14(12): 1371-1384.

[17] RED E, MURRAY J T, TEE A R. Oncogenic signalling through mechanistic target of rapamycin (mTOR): a driver of metabolic transformation and cancer progression [J]. *Cancers:Basel*, 2018, 10(1):3390-3398.

[18] SCHITO L, REY S. Cell-autonomous metabolic reprogramming in hypoxia [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(17): 30197-30206.

[19] CHEN C, TANG Q, ZHANG Y, et al. Metabolic reprogramming by HIF-1 activation enhances survivability of human adipose-derived stem cells in ischaemic microenvironments [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(5): 12363-12371.

[20] SHIBATA M, HOQUE M O. Targeting cancer stem cells: a strategy for effective eradication of cancer [J]. *Cancers:Basel*, 2019, 11(5):732-745.

[21] 李慧杰,齐元富,李秀荣. 肺癌干细胞与肺癌转移相关机制的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(10): 798-801.

[22] MENENDEZ J A, JOVEN J, CUFÍ S, et al. The warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(8): 1166-1179.

[23] 李慧杰,齐元富,李秀荣. 基于癌毒理论探讨攻毒治法抗肿瘤转移 [J]. *中医药信息*, 2018, 35(4): 81-83.

[24] 裴可,冯慧超,郑文利,等. 纳米雄黄抗肿瘤的药理毒理研究及临床应用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5): 214-219.

[25] 齐元富,李慧杰,于连洋. 纳米雄黄干预肺癌 A549 细胞对血管内皮生长因子及缺氧诱导因子-1 表达的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(3): 27-30.

[责任编辑 张丰丰]