

探讨髓系白血病细胞株糖酵解表型特征

陈莎娜 鲜敬荣 王娟 贺金刚 全静 张帅帅 张伶*

(重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆市重点实验室, 重庆 400016)

摘要 探讨髓系白血病细胞株的糖酵解表型特征及其潜在的调控机制。葡萄糖试剂盒和乳酸试剂盒分别检测5株白血病细胞培养上清液中的葡萄糖消耗(G)和乳酸生成含量(L), 计算L/G比值来评估糖酵解水平; 定量PCR检测糖酵解相关基因*GLUT1*、*MCT1* mRNA表达; CCK8法检测细胞体外增殖能力; Western blot检测AKT蛋白磷酸化水平。结果显示, KG1a和K562细胞体外培养24 h后的L/G比值分别为1.78和1.71, 接近糖酵解表型时L/G为2的比值, 同时这两株细胞高表达糖酵解相关基因*GLUT1*和*MCT1* mRNA。低糖(0.5 mmol/L)、中糖(5 mmol/L)、高糖(10 mmol/L)处理KG1a和K562细胞40 h后, 两株细胞的增殖能力、葡萄糖消耗和乳酸生成随葡萄糖浓度增加而增强, 高糖组增加更为显著($P < 0.05$)。相反, 若糖酵解抑制剂2-DG(0, 5, 10 mmol/L)处理白血病细胞40 h后, 两株细胞的增殖能力及糖酵解代谢水平随2-DG浓度增加而降低, 高浓度2-DG组(10 mmol/L)降低更为显著($P < 0.05$)。此外, AKT抑制剂低浓度(5 μ mol/L)短时间(12 h)处理后能抑制白血病细胞AKT蛋白磷酸化水平, 同时降低细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成($P < 0.05$)。该研究提示髓系白血病细胞具有高糖酵解表型, AKT可能参与调控白血病的糖代谢过程, 这有助于阐明白血病的能量代谢特征以及为白血病的靶向抗代谢治疗奠定基础。

关键词 髓系白血病; 糖代谢; 糖酵解; AKT

Characterization of Glycolytic Phenotype of Myeloid Leukemic Cell Lines

Chen Shana, Xian Jingrong, Wang Juan, He Jingang, Quan Jing, Zhang Shuaishuai, Zhang Ling*

(College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics Designated by the Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To explore the glycolytic phenotype of myeloid leukemic cell lines and its potential mechanisms, the glucose consumption (G) and lactate production (L) in five leukemic cell lines were detected by glucose assay kit and lactate measurement kit, respectively. The glycolytic level was evaluated by the ratio of L/G; The glycolytic metabolism related genes (*GLUT1*, *MCT1*) were determined by quantitative Real-time PCR; Cell proliferation capability was analyzed by CCK-8 (cell counting kit-8) assay. Western blot was used to detect phosphorylation level of AKT protein. The results showed that the ratio of L/G was 1.78 for KG1a and 1.71 for K562, which was closer to 2 (if the glucose was metabolized only through glycolysis, L/G ratio should be 2) comparing to the other three leukemic cell lines. Additionally, the expressions of both *GLUT1* and *MCT1* mRNA were much higher in KG1a and K562 cells. The proliferation capacity, glucose consumption and lactate production in KG1a and K562 cells had enhanced after treated by different concentration of glucose (0.5, 5, 10 mmol/L) for 40 h, significantly higher in the high glu-

收稿日期: 2013-09-22 接受日期: 2013-11-04

重庆市科委自然科学基金计划(批准号: cstc2013jcyjA10035)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

Received: September 22, 2013 Accepted: November 4, 2013

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Science & Technology Commission (Grant No. cstc2013jcyjA10035)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485240, E-mail: lingzhang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-12-11 15:33 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.01.0306.html>

cose group (10 mmol/L) ($P < 0.05$). However, the cell proliferation and the levels of glycolytic metabolism were notably decreased in a dose-dependent manner after treatment with 2-DG (0, 5, 10 mmol/L) for 40 h, significantly lower in high 2-DG group (10 mmol/L) ($P < 0.05$). The low concentration of AKT IV (5 $\mu\text{mol/L}$) and short treatment time (12 h) was used to observe the metabolic change without the reduction of cell number. The results showed that AKT IV significantly reduced glucose consumption and lactate production, and inhibited the phosphorylation level of AKT in leukemic cells ($P < 0.05$). These results demonstrate that myeloid leukemia cells exhibit the highly glycolytic phenotype, and AKT may involve in the regulation of glycolysis, which will contribute to clarify the leukemic cells' characteristics of energy metabolism and facilitate the future leukemia therapy targeting metabolic pathways.

Key words myeloid leukemia; glucose metabolism; glycolysis; AKT

2011年, Weinberg等^[1]在CELL上撰文提出能量代谢重编程(reprogramming of energy metabolism)是肿瘤新增的重要特征之一。即使在氧充足的条件下, 癌细胞的主要供能方式仍是通过高速率糖酵解, 即消耗胞外大量葡萄糖继而在胞液中进行乳酸发酵, 这种糖代谢方式的转变可促进肿瘤细胞的恶性增殖^[2]。白血病是一类造血干细胞异常的克隆性恶性疾病, 无限增殖的白血病细胞需要活跃的糖代谢来产生ATP供能^[3]。最近, Boag等^[4]通过基因表达谱分析, 发现急性淋巴系白血病(acute lymphoid leukemia, ALL)细胞较正常造血细胞高表达葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)和单羧酸转运蛋白(monocarboxylate transporter, MCT)等糖酵解相关基因, 而白血病细胞中三羧酸循环相关基因表达下调。已知糖酵解抑制剂2-DG(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)能与葡萄糖竞争跨膜转运, 导致糖酵解通路近端阻滞, 抑制细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成^[5]。临床上利用2-DG处理ALL细胞, 可逆转白血病细胞对糖皮质激素的耐药性^[6]。深入研究发现, AKT信号通路在淋巴系白血病细胞有氧糖酵解的建立过程起着重要作用, 参与调控白血病细胞抗凋亡和促进细胞存活^[7-8]。然而, 目前对白血病糖酵解代谢的研究多集中在淋巴系白血病, 而临床常见的髓系白血病的糖酵解代谢特征少见报道。因此, 本研究首先观察不同髓系白血病细胞株在体外常氧培养时的糖酵解代谢水平和糖酵解相关基因表达, 筛选出糖酵解表型特征明显的髓系白血病细胞株; 其次用葡萄糖或者2-DG处理观察该细胞的增殖及糖酵解相关指标的改变, 明确白血病细胞的糖酵解表型特征; 最后借助AKT抑制剂处理来初步探讨AKT信号分子是否参与调控髓系白血病细胞的有氧糖酵解, 以期阐明糖酵解在髓系白血病发生发展中的重要作用, 为今后靶

向代谢的抗血液肿瘤药物的研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 胎牛血清、RPMI 1640普通培养液、RPMI 1640无糖培养液购买于美国Gibco公司。D-(+)-葡萄糖溶剂、2-脱氧葡萄糖(2-DG)购于美国Sigma公司, 2-DG用无菌水配制成不同浓度备用。AKT抑制剂(AKT INHIBITOR IV, AKT IV)购于德国Calbiochem公司, AKT IV用DMSO配制成不同浓度备用。RNA提取试剂RNAiso Plus、RT-PCR试剂盒、定量PCR试剂SYBR Premix Ex Taq™ II均购买于日本TaKaRa公司。CCK8试剂盒(Cell Counting Kit-8)购于上海碧云天生物技术有限公司。葡萄糖测定试剂盒购于上海荣盛生物技术有限公司。乳酸试剂盒购于南京建成生物工程研究所。兔抗人pAKT473单克隆抗体及兔抗人T-AKT单克隆抗体购于美国Cell Signal Technology公司, 鼠抗人 β -actin单抗、山羊抗鼠IgG二抗、山羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.2 细胞 人急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)细胞系KG1a(AML M0)、HL60(AML M2)、THP-1(AML M5), 人慢性粒细胞性白血病细胞系K562均购于中国科学院上海生命科学研究院, OCI/AML3(AML M4)获赠于美国休斯敦德克萨斯大学MD Anderson癌症中心。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞常氧培养 细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640普通培养液置于37 °C、5% CO₂温箱中培养。平均1~2 d传代, 以保持细胞对数生长。

1.2.2 检测葡萄糖消耗含量(G)和乳酸生成含量(L) 收集对数生长期的细胞, 细胞经PBS洗涤2次后重悬于

RPMI 1640普通培养液,以每孔 2×10^5 /mL接种于24孔板,孵育24 h后收集细胞悬液,2 500 r/min离心10 min,分别收集5株白血病细胞的培养上清液备用。

葡萄糖消耗含量(G)的检测:根据葡萄糖测定试剂盒说明书,在酶联免疫检测仪(BioTek EON)波长505 nm处测量光密度值(D_{505}),葡萄糖含量(mmol/L)=[$(D_{测定}-D_{空白})/(D_{标准}-D_{空白})$] $\times 5.55$ 。分别检测未加细胞时培养液和培养细胞24 h时上清液的葡萄糖含量,二者之差为葡萄糖消耗含量。

乳酸生成含量(L)的检测:根据乳酸试剂盒说明书,在酶联免疫检测仪530 nm处测量光密度值(D_{530}),乳酸生成含量(mmol/L)=[$(D_{测定}-D_{空白})/(D_{标准}-D_{空白})$] $\times 3 \times$ 稀释倍数。

L/G比值的计算: $L/G = \text{乳酸生成含量(mmol/L)} / \text{葡萄糖消耗含量(mmol/L)}$

1.2.3 定量PCR 细胞重悬于RPMI 1640普通培养液,以每孔 1×10^6 /mL接种于6孔板孵育48 h,用RNAiso Plus试剂抽提细胞总RNA,反转录合成cDNA备用。*GLUT1*上游引物序列:5'-ACT GTG CTC CTG GTT CTG-3';下游引物序列:5'-TCC TCG GGT GTC TTG TC-3'。*MCT1*上游引物序列:5'-ATT GTT GGT GGC TGC TTG T-3';下游引物序列:5'-ACT GTG CTC CTG GTT CTG-3'; β -actin上游引物序列:5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3';下游引物序列:5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TG-3'。定量PCR总体系包括2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II、高压去离子水、PCR引物、模板cDNA。反应程序如下:预变性95 $^{\circ}$ C 30 s;变性95 $^{\circ}$ C 30 s,退火(*GLUT1*:54.2 $^{\circ}$ C;*MCT1*:64.2 $^{\circ}$ C)20 s,延伸72 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C采集荧光,共39个循环。融解曲线条件:(65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C)每上升0.5 $^{\circ}$ C采集1次荧光。反应体系在Bio-Rad T100TM Thermal Cycler上进行。

1.2.4 葡萄糖处理后检测细胞增殖能力和糖代谢指标的改变 CCK-8法检测细胞增殖:细胞经PBS洗涤2次后重悬于含10%胎牛血清的RPMI 1640无糖培养液,以 1×10^4 /孔密度接种于96孔板,随之加入终浓度为0.5, 5, 10 mmol/L的D-(+)-葡萄糖溶液处理,每种浓度设5个复孔。细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂温箱中孵育,每种浓度处理组分别于0, 10, 20, 30, 40 h等时间点前1 h加入CCK-8溶液继续孵育1 h。同时设置加了无糖培养液和CCK-8培养液的孔作为空白对照。在酶联免疫检测仪450 nm处测量光密度值(D_{450}),以反映细胞体外增殖情况。

细胞经PBS洗涤2次后重悬于10%胎牛血清RPMI 1640无糖培养液,以 2×10^5 /mL细胞密度接种于24孔板,加入终浓度为0.5, 5, 10 mmol/L的D-(+)-葡萄糖溶剂,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂温箱中。每种浓度处理组分别孵育0, 10, 20, 30, 40 h,收集上清分别检测细胞上清葡萄糖消耗和乳酸生成。

1.2.5 2-DG处理后检测细胞增殖能力和糖代谢指标的改变 细胞重悬于RPMI 1640普通培养液,随之加入终浓度为0, 5, 10 mmol/L的2-DG处理。每种浓度设5个复孔,同时设置加了普通培养液的孔作为空白对照。同样地,在0, 10, 20, 30, 40 h 5个时间点用CCK-8法检测2-DG处理后细胞增殖能力,以及检测细胞上清葡萄糖消耗和乳酸生成。

1.2.6 Western blot 白血病细胞重悬RPMI 1640普通培养液,以每孔 1×10^6 /mL接种于6孔板,收集细胞提取总蛋白,考马斯亮蓝法测蛋白质浓度。取50 μ g细胞蛋白提取液,经12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,通过半干转膜仪将蛋白转移到PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭液室温封闭3 h,加入一抗(pAKT473 1:1 000; T-AKT 1:1 000; β -actin 1:1 000)4 $^{\circ}$ C过夜。TBST洗2次,TBS洗1次。加入TBST稀释的二抗(anti-rabbit 1:1 000; anti-mouse 1:1 000)室温孵育1.5 h,洗膜。最后用化学发光显色试剂进行显色。

1.2.7 AKT IV处理后检测pAKT473和糖代谢指标的改变 AKT IV在低浓度(5 μ mol/L)、不同时间(6 h、12 h和24 h)处理白血病细胞,CCK-8法检测细胞的体外增殖能力。选择AKT IV处理前后细胞增殖无显著性差异的时间点(12 h)作为后续实验条件。细胞经PBS洗涤2次后重悬于RPMI 1640普通培养液,加入终浓度为5 μ mol/L的AKT IV处理12 h后,检测AKT磷酸化蛋白水平,同时收集上清检测细胞葡萄糖消耗和乳酸生成。

1.2.8 统计学处理 应用SPSS 13.0统计学软件进行结果分析。实验结果的计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据之间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白血病细胞株的糖酵解水平

5种髓系白血病细胞株(KG1a、HL60、THP-1、OCI/AML3和K562)常氧培养24 h后收集其培养上清液,检测葡萄糖消耗和乳酸生成并计算L/G比值,结

果发现, KG1a细胞的L/G值为1.78、K562细胞的L/G比值为1.71, 接近糖酵解为主要糖代谢途径时L/G为2的比值(一分子葡萄糖全部糖酵解生成两分子乳酸)。HL60、THP-1、OCI/AML3细胞的L/G值分别为2.56、1.47、1.30(图1A)。此外, 定量PCR结果显示, KG1a细胞和K562细胞高表达糖酵解相关基因*GLUT1*、*MCT1* mRNA(图1B和图1C)。因此选择KG1a和K562这两株细胞作为具有高糖酵解表型的细胞模型进行后续实验研究。

2.2 葡萄糖处理对白血病细胞增殖和糖酵解代谢的影响

不同浓度葡萄糖处理KG1a和K562细胞40 h后, 观察细胞体外增殖能力的改变。结果表明, 低糖(0.5 mmol/L)处理不能促进细胞的体外增殖, 而中糖(5 mmol/L)和高糖(10 mmol/L)处理则显著刺激细胞生长; 高糖处理组细胞增殖能力显著增强($P<0.05$)(图2)。同样, 低糖处理对两株细胞培养液上清中葡萄糖的消耗和乳酸生成影响并不显著, 而中糖、高糖处理则显著促进葡萄糖消耗和乳酸生成($P<0.05$), 高糖处理组细胞的葡萄糖消耗和乳酸生

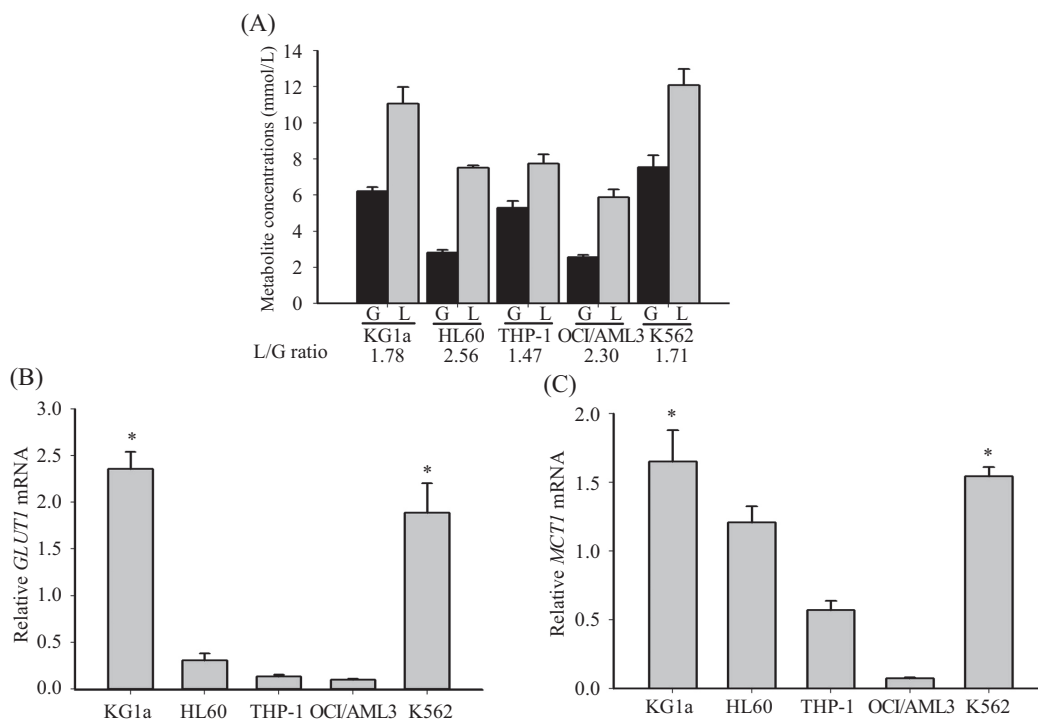
成的增加更为显著(图3)。

2.3 2-DG对白血病细胞增殖和糖酵解代谢的影响

不同浓度2-DG处理KG1a细胞和K562细胞40 h后, 观察细胞体外增殖能力的改变。结果表明, 与未处理组比较, 加入不同浓度2-DG后细胞生长减缓, 其中高浓度2-DG(10 mmol/L)处理组细胞增殖能力显著下降(图4)($P<0.05$)。此外, 与未处理组比较, 不同浓度2-DG处理白血病细胞可导致培养上清液中的葡萄糖消耗和乳酸生成减少, 高浓度2-DG(10 mmol/L)处理组的葡萄糖消耗和乳酸生成下降更为显著(图5)($P<0.05$)。

2.4 AKT抑制剂对白血病细胞AKT磷酸化和糖酵解代谢的影响

Western blot检测发现, 5株白血病细胞株均不同程度地表达AKT蛋白磷酸化水平(pAKT473)(图6A和图6B)。为观察AKT对白血病细胞糖酵解代谢的影响, 首先在低浓度AKT IV(5 $\mu\text{mol/L}$)不同时间(0, 6, 12, 24 h)处理两株细胞以观察细胞增殖情况, 结果发现AKT IV处理12 h对细胞的体外增殖能力影响较小(图略), 因此后续实验皆以12 h作为处理时间

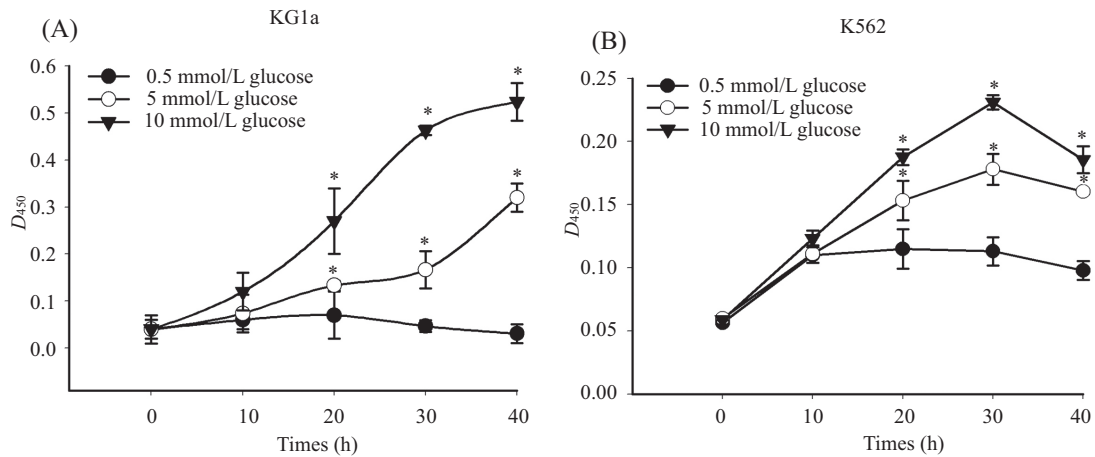


A: 检测葡萄糖消耗(G)和乳酸生成(L)并计算L/G比值; B: 定量PCR检测*GLUT1* mRNA表达; C: 定量PCR检测*MCT1* mRNA表达。* $P<0.05$, 与其他3株细胞(HL60、THP-1和OCI/AML3)比较。

A: detected consumed glucose (G), produced lactate (L) and the ratio of L/G; B: quantitative PCR detected *GLUT1* mRNA; C: quantitative PCR detected *MCT1* mRNA. * $P<0.05$ vs other three leukemic cell lines (HL60, THP-1 and OCI/AML3).

图1 白血病细胞株糖酵解水平分析

Fig.1 The glycolytic levels of leukemic cell lines

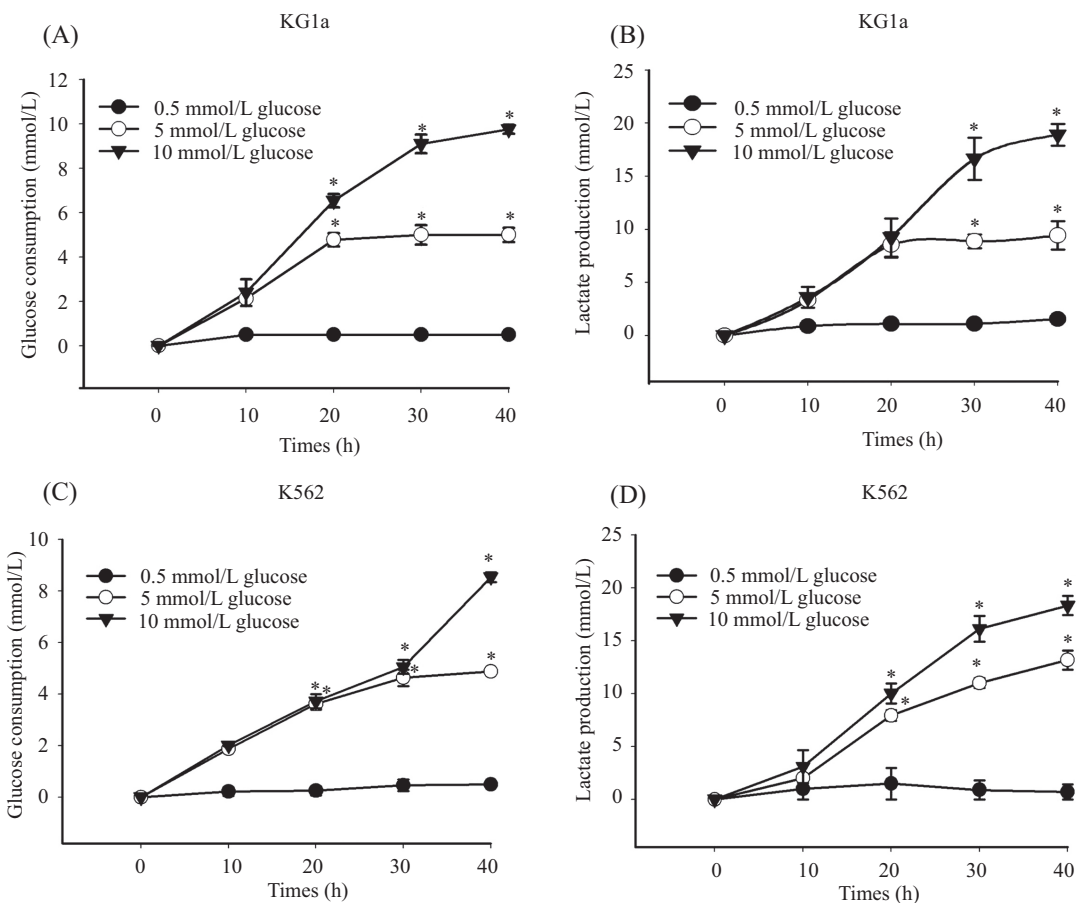


A: 不同浓度葡萄糖(0.5, 5, 10 mmol/L)处理40 h后KG1a细胞的生存曲线; B: 不同浓度葡萄糖(0.5, 5, 10 mmol/L)处理40 h后K562细胞的生存曲线; * $P < 0.05$, 与低糖组(0.5 mmol/L glucose)比较。

A: the survival curve of KG1a cells treated with glucose at concentrations of 0.5, 5, 10 mmol/L after 40 h; B: the survival curve of K562 cells treated with glucose at concentrations of 0.5, 5, 10 mmol/L after 40 h. * $P < 0.05$ vs low glucose treated (0.5 mmol/L glucose) group.

图2 葡萄糖处理对白血病细胞增殖能力的影响

Fig.2 Effect of glucose on the proliferation capability in the leukemic cells

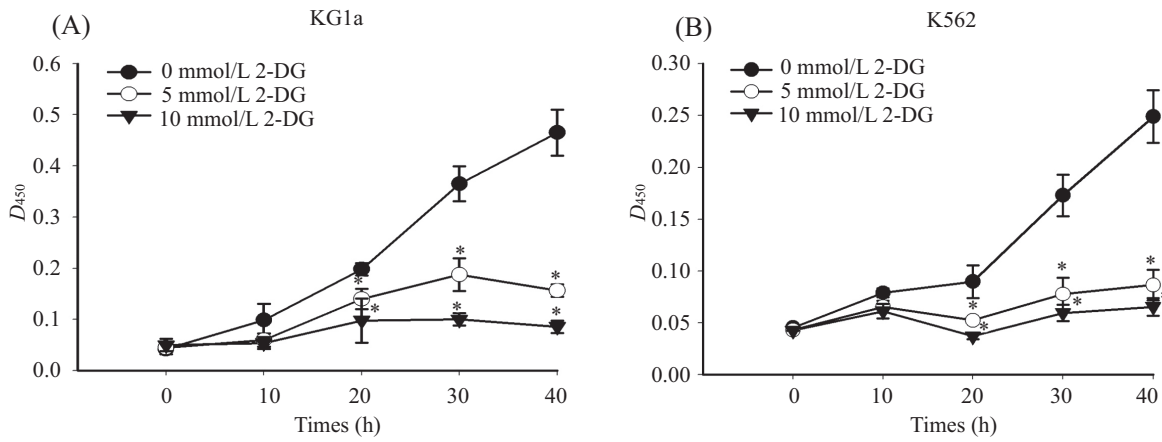


A和B: 不同浓度葡萄糖(0.5, 5, 10 mmol/L)处理40 h后KG1a细胞葡萄糖消耗和乳酸生成情况; C和D: 不同浓度葡萄糖(0.5, 5, 10 mmol/L)处理40 h后K562细胞葡萄糖消耗和乳酸生成情况。* $P < 0.05$, 与低糖组(0.5 mmol/L)比较。

A and B: glucose consumption and lactate production were measured after treating KG1a cells with various concentrations of glucose (0.5, 5, 10 mmol/L) for 40 h; C and D: glucose consumption and lactate production were measured after treating K562 cells with various concentrations of glucose (0.5, 5, 10 mmol/L) for 40 h. * $P < 0.05$ vs low glucose (0.5 mmol/L) treated group.

图3 葡萄糖处理对白血病细胞糖酵解代谢的影响

Fig.3 Effect of glucose on the glycolytic metabolism in leukemic cells

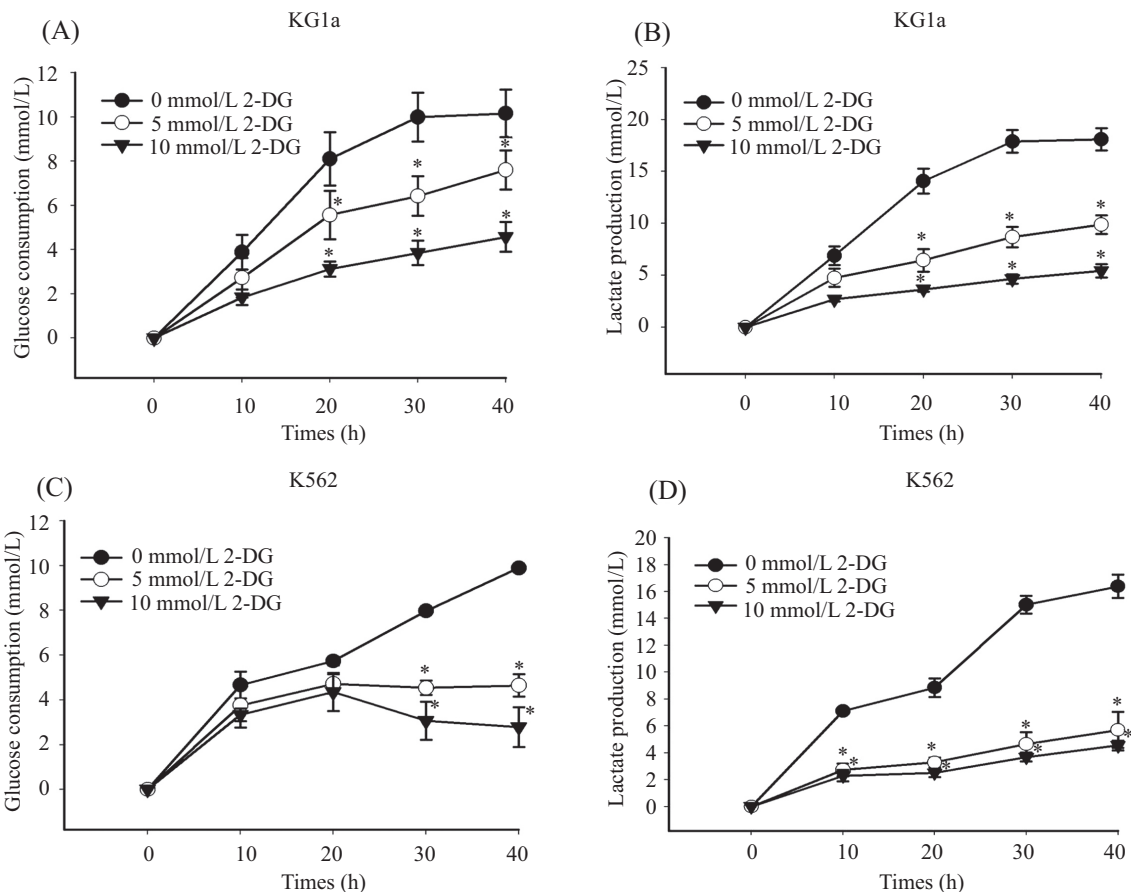


A: 不同浓度2-DG(0, 5, 10 mmol/L)处理40 h后KG1a细胞的生存曲线; B: 不同浓度2-DG(0, 5, 10 mmol/L)处理40 h后K562细胞的生存曲线。
* $P < 0.05$, 与未处理组(0 mmol/L 2-DG)比较。

A: the survival curve of KG1a cells treated with 2-DG at concentrations of 0, 5, 10 mmol/L after 40 h; B: the survival curve of K562 cells treated with 2-DG at concentrations of 0, 5, 10 mmol/L after 40 h. * $P < 0.05$ vs untreated (0 mmol/L 2-DG) group.

图4 2-DG处理对白血病细胞增殖的影响

Fig.4 Effect of 2-DG on the proliferation capability in the leukemic cells

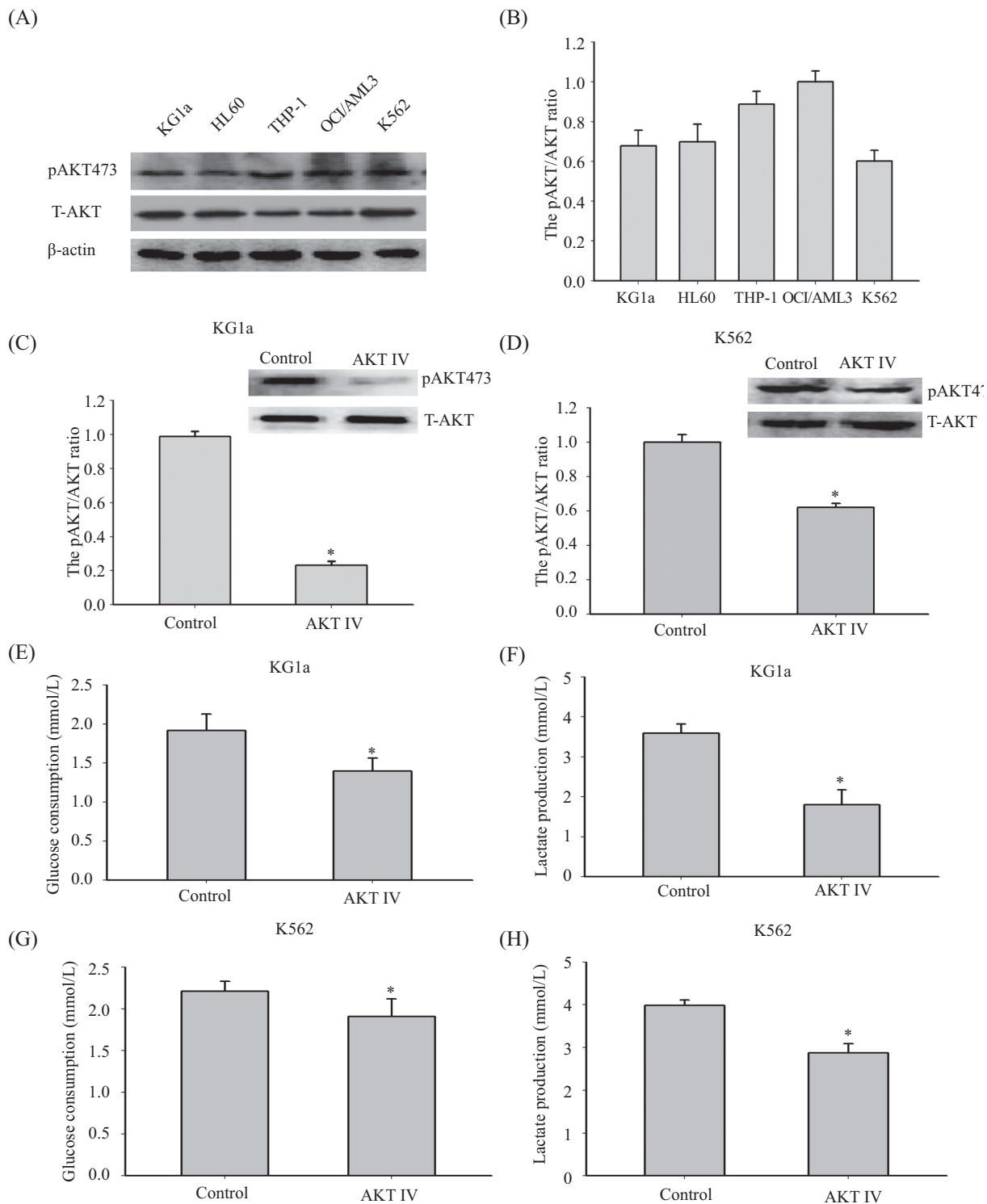


A和B: 不同浓度2-DG(0, 5, 10 mmol/L)处理40 h后KG1a细胞葡萄糖消耗和乳酸生成情况; C和D: 不同浓度2-DG(0, 5, 10 mmol/L)处理40 h后K562细胞葡萄糖消耗和乳酸生成情况。* $P < 0.05$, 与未处理组(0 mmol/L 2-DG)比较。

A and B: glucose consumption and lactate production were measured after treated KG1a cells with various concentrations of 2-DG (0, 5, 10 mmol/L) for 40 h; C and D: glucose consumption and lactate production were measured after treated K562 cells with various concentrations of 2-DG (0, 5, 10 mmol/L) for 40 h. * $P < 0.05$ vs untreated (0 mmol/L 2-DG) group.

图5 2-DG处理对白血病细胞糖酵解代谢的影响

Fig.5 Effect of 2-DG on the glycolytic metabolism in leukemic cells



A和B: Western blot检测白血病细胞磷酸化AKT蛋白表达, B为A图的量化图; C和D: 5 μ mol/L AKT IV处理KG1a和K562细胞12 h后, Western blot检测细胞AKT的蛋白表达; E和F: 5 μ mol/L AKT IV处理12 h后KG1a细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成情况; G和H: 5 μ mol/L AKT IV处理12 h后K562细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成情况。* P <0.05, 与对照组比较。

A and B: Western blot detected phosphorylation AKT in leukemic cells, and B was the quantitative graphs for A; C and D: Western blot detected phosphorylation AKT protein after 5 μ mol/L AKT IV treated KG1a and K562 cells for 12 h; E and F: glucose consumption and lactate production were measured after 5 μ mol/L AKT IV treated KG1a cells for 12 h; G and H: glucose consumption and lactate production were measured after 5 μ mol/L AKT IV treated K562 cells for 12 h. * P <0.05 vs control group.

图6 AKT抑制剂对白血病细胞AKT磷酸化水平和糖酵解代谢的影响

Fig.6 Effect of AKT inhibitor on the phosphorylation AKT and the glycolytic metabolism in the leukemic cells

点。结果显示, 5 $\mu\text{mol/L}$ AKT IV处理12 h能够降低KG1a和K562细胞的pAKT473水平(图6C和图6D)。同时, 检测AKT IV处理前后两株细胞培养上清液中的糖酵解代谢指标的改变, 结果显示, 与未处理组比较, AKT IV处理组细胞的葡萄糖消耗和乳酸生成显著下降(图6E、图6F、图6G和图6H)($P < 0.05$)。

3 讨论

德国生物化学家Otto Warburg早在1930年就发现即使在氧供应充分的情况下, 恶性肿瘤细胞仍表现出异常活跃的糖酵解^[9]。对于肿瘤细胞糖酵解的研究过去多集中在实体肿瘤。近年来研究发现, 血液系统恶性肿瘤也存在异常的糖代谢, 但髓系白血病的糖酵解表型特征尚未完全阐明。

为了观察髓系白血病细胞的糖酵解水平, 本研究通过比较5株髓系白血病细胞株(KG1a、HL60、THP-1、OCI/AML3、K562)的糖酵解代谢水平, 发现KG1a细胞和K562细胞的L/G比值较接近葡萄糖全部通过糖酵解代谢时L/G为2的比值^[10]。同时, 这两株细胞高表达糖酵解相关基因*GLUT1*和*MCT1*, 提示KG1a和K562细胞具有高糖酵解表型特征。Suganuma等^[10]在对白血病细胞的糖酵解与氧化磷酸化代谢的对比研究中发现, 急性早幼粒细胞白血病NB4细胞系的L/G值为1.8, 加上该细胞体外生长培养时对2-DG敏感, 因此NB4细胞被认为是一株具有高糖酵解表型的白血病细胞。已知细胞外的葡萄糖需借助细胞膜上的GLUT蛋白才能转运入细胞内, 随着胞内的葡萄糖增多, 肿瘤细胞糖酵解终产物乳酸也随之增加。而2-DG与葡萄糖竞争跨膜转运, 导致糖酵解通路近端阻滞, 降低细胞葡萄糖消耗和乳酸生成。为此, 本课题用葡萄糖或者2-DG处理观察细胞的增殖和糖酵解代谢改变, 以进一步明确髓系白血病细胞的糖酵解表型特征。研究结果表明, 随着培养体系中加入葡萄糖浓度的增加, KG1a和K562细胞的体外增殖能力增强, 且培养上清液中的葡萄糖消耗和乳酸生成量也逐渐增加, 细胞表现出对葡萄糖依赖性存活的特点, 这与Blouin等^[11]利用葡萄糖处理可促进神经胶质瘤细胞增殖和糖酵解代谢水平的研究发现是一致的。同时, 本研究观察到这两株细胞的体外存活对2-DG敏感, 加入2-DG能够使细胞生长受抑、葡萄糖消耗减少和乳酸生成下降。Tsunekawa-Imai等^[12]研究发现, 高糖酵解表型的NB4

细胞, 其葡萄糖消耗和乳酸生成随着2-DG处理浓度的增加呈剂量依赖性减低; 相反, 依赖氧化磷酸化途径供能的THP-1白血病细胞, 其葡萄糖消耗和乳酸生成则不受加入2-DG多少的影响。这些结果进一步证实有氧糖酵解可能是KG1a和K562细胞的一种主要糖代谢途径。KG1a是从KG1细胞分离出的亚株, KG1细胞来源于急性髓系白血病未分化M0型, 高表达白血病干细胞相关的表面分子, 可从体外培养的KG1a中富集具有肿瘤干细胞样生物学特性的亚群^[13]。文献报道肺癌干细胞过表达甘氨酸脱羧酶(GLDC)等代谢相关酶, 可以通过影响糖酵解途径参与细胞的恶性转化和肿瘤形成^[14]。目前认为, 肿瘤干细胞是导致肿瘤耐药产生的重要机制。Herst等^[15]发现髓系白血病的糖代谢水平与临床预后有关, 无论来自初诊或者复发患者的白血病细胞糖酵解水平皆升高, 且高糖酵解表型的白血病细胞对化疗明显耐受。因此, 白血病细胞的糖酵解表型特征在白血病的恶性转化以及临床化疗耐药中的重要作用值得深入探讨。

肿瘤细胞的能量代谢过程中常常受多种信号通路的调控, PI3K/AKT是其中重要的一条信号通路。组成性激活的AKT信号分子除了刺激肿瘤细胞增殖外, 还可通过促进GLUT1和己糖激酶等糖酵解关键酶的表达来参与调控糖代谢过程^[16-17]。本研究采用AKT抑制剂(AKT IV)处理来观察AKT在白血病细胞糖酵解水平的调控作用。首先确定AKT IV在低浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)、短时间(12 h)处理对KG1a和K562细胞的体外增殖影响较小, 在此条件下观察白血病细胞AKT磷酸化和糖酵解水平的改变。结果发现, AKT IV处理能够抑制白血病细胞的AKT磷酸化水平, 同时细胞上清液中葡萄糖消耗和乳酸生成显著下降, 提示AKT可能参与调控髓系白血病细胞的糖酵解途径。最近Kim等^[18]在研究慢性粒细胞白血病时发现, AKT可增加细胞内活性氧水平进而促进白血病细胞的葡萄糖代谢。除了白血病细胞本身组成性激活的信号通路外, 最近有文献报道骨髓微环境也参与调控白血病细胞的糖酵解过程, 骨髓间充质干细胞与OCI/AML3细胞株共培养后能够上调白血病细胞线粒体膜上解偶联蛋白UCP2的活性, 阻止丙酮酸盐进入线粒体的氧化磷酸化, 增强白血病细胞的糖酵解, 导致胞外乳酸大量累积^[19]。

本研究结果证明, 髓系白血病细胞株(KG1a和

K562)具有高糖酵解表型,初步探讨了AKT信号通路可能参与调控髓系白血病细胞的有氧糖酵解途径。这些研究还局限在体外培养的白血病细胞株,下一步将扩展到临床样本以明确白血病的糖酵解表型特征。此外,由于白血病具有高度异质性,不同型别的白血病细胞在代谢方式上也可能存在差异。除了有氧糖酵解是白血病细胞的主要代谢方式外,最近有文献报道脂肪酸氧化作为一种重要的供能方式,在维持造血干细胞的增殖、促进白血病细胞抗凋亡等方面发挥重要作用^[20-22]。因此,明确髓系白血病能量代谢特点及其调控机制对阐明白白血病的发病机制和开拓临床抗代谢治疗新策略有重要意义。

参考文献 (References)

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 2008; 134(5): 703-7.
- Gautier EL, Westerterp M, Bhagwat N, Cremers S, Shih A, Abdel-Wahab O. HDL and Glut1 inhibition reverse a hyper metabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *J Exp Med* 2013; 210(2): 339-53.
- Boag JM, Beesley AH, Firth MJ, Freitas JR, Ford J, Hoffmann K, *et al.* Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukaemia* 2006; 20(10): 1731-7.
- Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. Differential mechanisms of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in the monolayers and multicellular spheroids of a human glioma cell line. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(9): 1142-51.
- Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJ, *et al.* Inhibition of glycolysis modulate prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2009; 113(9): 2014-21.
- Coloff JL, Mason EF, Altman BJ, Gerriets VA, Liu T, Nichols AN, Zhao Y, *et al.* Akt requires glucose metabolism to suppress puma expression and prevent apoptosis of leukemic T cells. *J Biol Chem* 2011; 286(7): 5921-33.
- Coloff JL, Macintyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, *et al.* Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res* 2011; 71(15): 5204-13.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(2): 85-95.
- Suganuma K, Miwa H, Imai N, Shikami M, Gotou M, Goto M, *et al.* Energy metabolism of leukemia cells: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma* 2010; 51(11): 2112-9.
- Blouin MJ, Zhao Y, Zakikhani M, Algire C, Piura E, Pollak M. Loss of function of PTEN alters the relationship between glucose concentration and cell proliferation, increases glycolysis, and sensitizes cells to 2-deoxyglucose. *Cancer Lett* 2010; 289(2): 246-53.
- Tsunekawa-Imai N, Miwa H, Shikami M, Suganuma K, Goto M, Mizuno S, *et al.* Growth of xenotransplanted leukemia cells is influenced by diet nutrients and is attenuated with 2-deoxyglucose. *Leuk Res* 2013; 37(9): 1132-6.
- Zhang L, Yang S, He YJ, Shao HY, Wang L, Chen H, *et al.* Fluorouracil selectively enriches stem-like leukemic cells in a leukemic cell line. *Int J Biol Sci* 2010; 6(5): 419-27.
- Zhang WC, Shyh-Chang N, Yang H, Rai A, Umashankar S, Ma S, *et al.* Glycine decarboxylase activity drives non-small cell lung cancer tumor-initiating cells and tumorigenesis. *Cell* 2012; 148(1/2): 259-72.
- Herst PM, Howman RA, Neeson PJ, Berridge MV, Ritchie DS. The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome. *J Leukoc Biol* 2011; 89(1): 51-5.
- Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, Gillot L, Bardet V, Willems L, *et al.* Autocrine IGF/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/AKT activation in acute myeloid leukemia: Therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody. *Haematologica* 2010; 95(3): 415-23.
- Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(1): 25-31.
- Kim JH, Chu SC, Gramlich JL, Pride YB, Babendreier E, Chauhan D, *et al.* Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 2005; 105(4): 1717-23.
- Samudio I, Fiegl M, McQueen T, Clise-Dwyer K, Andreeff M. The Warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res* 2008; 68(13): 5198-205.
- Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, *et al.* A PML-PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med* 2012; 18(9): 1350-8.
- Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* 2010; 120(1): 142-56.
- Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: Fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(4): 227-32.