

生物能量分析仪在肿瘤细胞生物能量代谢中的应用研究

汪春龙^{1#} 郭苗苗^{2#} 吴艺琦^{2#} 陈福红² 蓝林华² 徐翠翠² 楼康诚³ 沈 恺²
徐 浩² 余晓敏² 刘永章² 吕 斌^{2*} 谢红莉^{1*}

(¹温州医科大学第一临床医学院, 温州 325035; ²温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ³温州医科大学第二临床医学院, 温州 325035)

摘要 靶向肿瘤细胞代谢过程中关键调控分子抑制肿瘤细胞生长的研究日益成为热点。目前, 研究肿瘤细胞氧化磷酸化和有氧糖酵解主要是应用Clark氧电极法测定细胞氧耗率以及对相关中间代谢物的测定, 如乳酸和葡萄糖。但是, 这些方法测定的指标相对单一, 而且过程繁琐。该文详细介绍了生物能量分析仪在研究肿瘤细胞糖酵解和线粒体氧耗率中的应用, 并通过研究肿瘤细胞应用阿霉素及相关药物处理后生物能量代谢的变化, 深入探讨了这一方法在研究肿瘤细胞生物能量代谢方面中的优越性。研究表明, 羰基氰-对-三氟甲氧基苯腙(carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, FCCP)的浓度以及细胞数量对于研究肿瘤细胞的氧耗率十分关键, 应用阿霉素能够显著抑制肿瘤细胞的有氧糖酵解和线粒体氧耗率。通过该文的介绍, 期望能为肿瘤细胞生物能量代谢研究提供进一步的参考。

关键词 氧耗率; 有氧糖酵解; 胞外产酸率; 生物能量代谢

Application of Extracellular Flux Analyzer in the Studies of Cancer Cell Metabolism

Wang Chunlong^{1#}, Guo Miaomiao^{2#}, Wu Yiqi^{2#}, Chen Fuhong², Lan Linhua², Xu Cuicui², Lou Kangcheng³,
Shen Kai², Xu Hao², Yu Xiaomin², Liu Yongzhang², Lü Bin^{2*}, Xie Hongli^{1*}

(¹The First Clinical Medical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ³The Second Clinical Medical College, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract In recent years, growing studies are focusing on cancer therapy via targeting key molecules in cancer cell metabolism. The traditional methods for the study of oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis of cancer cells are oxygen consumption rate (OCR) measurement by Clark oxygen electrode method and the determination of crucial inter-mediate substrates, such as L-lactate and glucose. However, the traditional methods used to determine the variation of cell bioenergetics are very complicated and time consuming. Here, we introduced a novel method which works effectively in the study of cellular bioenergetics and investigated the cellular bioenergetics of

收稿日期: 2016-06-01 接受日期: 2016-08-26

国家自然科学基金(批准号: 31570772、31070710、31171345)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn; Tel: 0577-86699981, E-mail: xiehl@wmu.edu.cn

Received: June 1, 2016 Accepted: August 26, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570772, 31070710, 31171345)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86699722, E-mail: lubmito@wmu.edu.cn; Tel: +86-577-86699981, E-mail: xiehl@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-09-14 11:05:21 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160914.1105.002.html>

cancer cells with or without doxorubicin and certain drugs pretreatment to demonstrate the advantage of Extracellular Flux Analyzer. Our data indicated that the concentration of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) and the cell density are crucial for the oxygen consumption detection. Additionally, our results showed that doxorubicin inhibits tumor cell growth may also through disrupting aerobic glycolysis and mitochondrial respiration. Overall, our work may provide reference for the investigation of cellular bioenergetics.

Keywords oxygen consumption rate; aerobic glycolysis; extracellular acidification rate; cellular bioenergetics

真核细胞主要通过氧化磷酸化和糖酵解为细胞提供能量。葡萄糖经一系列酶催化可转变为丙酮酸, 丙酮酸进入线粒体基质后, 经丙酮酸脱氢酶催化转变为乙酰辅酶A, 并作为原料进入三羧酸循环。线粒体是真核生物有氧呼吸的主要场所, 通过氧化磷酸化为细胞的生长及其正常生理功能的维持提供能量。同时, 线粒体还是细胞物质代谢的中心, 涉及三羧酸循环、脂肪酸代谢和谷氨酰胺代谢等。由于肿瘤细胞具有快速生长的特性, 对能量及中间代谢物的需求较正常细胞高, 因此肿瘤细胞的物质代谢与能量代谢通常相对活跃。

关于肿瘤细胞能量代谢的探索, 20世纪20年代, Otto Warburg观察到某些肿瘤细胞在氧充足的状态下产生大量的乳酸, 而其氧化磷酸化的过程减弱。Otto Warburg据此提出假说, 认为肿瘤细胞的呼吸链复合体可能受到了损伤或抑制, 细胞为了存活则发展为以糖酵解为主要能量来源, 也就是我们熟知的Warburg效应^[1]。目前已经有许多糖酵解的抑制剂被发现, 并且在肿瘤的治疗中取得较好的疗效^[2-3], 如2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)(一种葡萄糖的类似物), 长期以来被认为是最有效的糖酵解的抑制剂, 它可以被己糖激酶催化转变为2-脱氧葡萄糖-6-磷酸(2-DG-P), 但2-DG-P并不能像葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)一样参与后续的糖酵解过程, 从而能有效抑制糖酵解^[4-6]; 氯尼达明(lonidamine)作为吡唑-3-羧酸(indazole-3-carboxylic acid)的一种衍生物, 可以通过增强正常细胞的糖酵解速率而抑制肿瘤细胞的糖酵解速率, 这可能与抑制与线粒体结合的己糖激酶有关^[7-8]; 而3-溴丙酮酸(3-bromopyruvate)作为己糖激酶的抑制剂, 能够显著抑制肿瘤细胞的糖酵解过程并降低ATP产生, 同时还能够增加细胞毒性, 使磷酸化的Bax(Bcl-2 associated X protein)(Ser12)去磷酸化, 诱导细胞色素c释放, 引起细胞凋亡^[9-12]。然而, 越来越多的研究表明, 肿瘤细胞的线粒体功能并不像之前所认为的受到了损伤, 相反地, 某些恶性程

度较高的肿瘤细胞表现出了更高的线粒体活性。例如, 某些具有高转移能力的细胞株, 其糖酵解速率和氧化磷酸化速率都较正常细胞高得多^[13-14], 因此也随之出现了一些干扰线粒体相关活性和抑制细胞能量代谢的药物, 其中最为著名的是双胍类物质, 研究表明, 二甲双胍能够抑制线粒体复合物I的活性, 并靶向线粒体氧化磷酸化, 同时还可通过调节AMPK/mTORC1(AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin complex 1)信号通路抑制肿瘤细胞的生长^[15-20]; 另外一种能量干扰剂为5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside, AICAR), 腺苷激酶可将其磷酸化成环腺苷-一磷酸衍生物(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1 β -D-ribofuranosyl-5-monophosphate, ZMP), ZMP与一磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)具有类似的作用, 从而导致细胞ATP产生减少^[21-23]。因此, 靶向肿瘤的生物能量代谢是肿瘤治疗中一个非常有效的策略。而如何高效、完整地研究药物或分子对肿瘤细胞能量代谢的影响显得尤为重要。本文应用生物能量分析仪测定阿霉素及其他药物处理下肿瘤细胞的氧耗率(oxygen consumption rate, OCR)并分析相关指标[如基础呼吸(basal respiration)、最大呼吸(maximal respiration)、储备呼吸(spare respiration)以及ATP产生]以及对其进行详细的介绍; 同时对糖酵解速率(extracellular acidification rate, ECAR)进行测定并检测相关指标[如基础糖酵解速率(basal glycolysis)、最大糖酵解速率(maximal glycolysis)]。本文也应用了AAT Bioquest公司生产的乳酸测定试剂盒测定乳酸水平与生物能量分析仪法进行比较。通过对以上指标进行分析, 为探讨不同药物或分子对细胞的氧化磷酸化和糖酵解途径的影响提供更为全面的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

RPMI-1640、DMEM培养基和胎牛血清(fetal

bovine serum, FBS)均购自美国Life Technologies公司。青霉素-链霉素双抗溶液、胰蛋白酶和100 mmol/L丙酮酸钠溶液购自上海碧云天生物技术有限公司。生物能量分析仪细胞培养板、生物能量分析仪分析培养基、生物能量分析仪Calibrant和生物能量分析仪Extracellular Flux分析试剂盒均购自美国Seahorse Bioscience公司。葡萄糖、寡霉素(oligomycin)、鱼藤酮、抗霉素A(antimycin A)、FCCP和2-DG均购自美国Sigma公司, 乳酸检测试剂盒购自AAT Bioquest公司。阿霉素购自上海生工生物工程股份有限公司。

CO₂细胞培养箱购自美国Thermo公司, Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer and Prep Station购自美国Seahorse Bioscience公司。

1.2 细胞株培养

人食管鳞癌细胞株TE-1购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源库。TE-1细胞用含10%胎牛血清(FBS)、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100 g/mL)的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。人慢性白血病细胞株K562由中国药科大学张奕华教授馈赠, 用含10% FBS、抗生素(青霉素100 U/mL和链霉素100 g/mL)的RPMI-1640培养基于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 细胞生物能量代谢检测方法

1.3.1 XF Extracellular Flux分析培养基的配制(总体积: 50 mL) (A)氧耗率测定培养基配置: 称取0.225 g葡萄糖, 吸取100 mmol/L的丙酮酸钠1 mL, 加到50 mL生物能量分析仪分析培养基中, 于37 °C恒温水浴锅中温浴, 调节pH至7.4, 经0.22 μm过滤器过滤除菌, 4 °C保存。生物能量分析仪分析培养基最好是现配现用, 配制好的培养基最长在4 °C保存1周; (B)糖酵解速率测定培养基配置: 称取0.016 4 g L-谷氨酰胺(L-glutamine)溶解于50 mL生物能量分析仪分析培养基中, 37 °C恒温水浴锅中温浴, 调pH至7.4, 经0.22 μm过滤器过滤除菌, 4 °C保存。

1.3.2 实验条件的优化 (A)细胞数量的优化: TE-1细胞经胰蛋白酶消化后, 用含血清的培养基终止胰蛋白酶活性, 收集细胞, 1 000 r/min离心5 min, 用温育好的PBS重悬细胞并再次离心, 弃去PBS, 用培养基重悬细胞, 制成单细胞悬液。应用血细胞计数板对单细胞悬液进行计数, 用培养基稀释成5 000、10 000、20 000、40 000/80 μL, 每孔80 μL分别加入

到生物能量分析仪细胞培养板中(做6个复孔), 细胞板4个角中的孔中加入80 μL正常培养基作为背景校正(background)。(B)FCCP浓度的优化: 选定细胞数量之后, 通过配置不同浓度的FCCP, 运行程序进行测定。

1.3.3 氧耗率(OCR)的测定 通过加入药物寡霉素、FCCP、鱼藤酮和抗霉素A处理并测定不同时间点的OCR值, 反映细胞的氧化磷酸化水平。(A)96孔生物能量分析仪细胞培养微型板中单层细胞的铺备: 将配制好的细胞悬液利用血细胞计数板进行细胞计数, 确定细胞密度; 取适量体积细胞悬液至1.5 mL EP管中, 计算所需细胞数总量(每孔所铺的细胞数根据细胞生长的速度及细胞体积的大小而定), 补充培养基(DMEM+10% FBS)至800 μL; 将细胞重新吹匀打散后种于生物能量分析仪细胞培养板中(确保所铺细胞为单层细胞), 每孔80 μL, 同时在背景校正孔中加入80 μL培养基(DMEM+10% FBS); 将细胞放入37 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养过夜。(B)测量探针板的孵化: 向探针板的每个孔加入140 μL pH7.4的生物能量分析仪校正液, 随后将探针板放入Prep Station培养装置中(37 °C, 无CO₂)过夜(将探针用保鲜膜包住, 以免校正液蒸发过多), 然后打开仪器, 启动生物能量分析仪软件, 确保设备稳定在37 °C。(C)96孔生物能量分析仪培养板中单层细胞的换液: 在显微镜下检查96孔板中单层细胞的生长情况, 确保细胞生长状态良好。将96孔板中原有的80 μL培养基(DMEM+10% FBS)吸出, 向每孔中加入120 μL已温浴至37 °C的生物能量分析仪培养基, 轻轻摇动96孔细胞板, 将生物能量分析仪培养基吸出, 再向每孔中加入175 μL的生物能量分析仪分析培养基(上述操作要极为小心谨慎, 以免细胞脱离培养板底部)。随后将96孔生物能量分析仪培养板放入到PS装置中(37 °C, 无CO₂), 约1 h。(D)测量探针板中工作液的加入: 将事先配制好的浓度分别为8、9、10、10 μmol/L的寡霉素、FCCP、鱼藤酮和抗霉素A工作液, 按25 μL/孔加入到相对应的A、B、C孔中, 使这4种药物的最终浓度均为1 μmol/L(药物的最终工作浓度需要根据细胞的不同而进行优化)。(E)程序的运行: 根据公司提供的说明书设置程序(可参考已发表的文献进行预实验, 若无文献报道则需进行摸索条件的细胞或药物可根据说明书给出的建议进行程序的设置), 运行实

验。(F)导出数据, 进行统计分析。

1.3.4 产酸率(ECAR)的测定 细胞产酸率反映细胞的糖酵解速率, 通过检测加入葡萄糖、寡霉素、2-DG后的反应, 测定不同时间点的产酸率, 确定细胞糖酵解速率的变化。检测过程与OCR测定过程相似, 只是检测药物为以上3种。

1.3.5 标准化测定(normalization) 将已完成测定的细胞板取出, 小心吸出测试培养基并按50 μL /孔加入预冷的PBS漂洗细胞, 完成后去除PBS, 每孔加入20 μL 细胞裂解液吹打混匀, 于冰上裂解15 min, 裂解完成后按每孔加入200 μL BCA蛋白测定混合液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 于酶标仪上测定562 nm波长下的吸光度。记录相应 D 值, 将其输入Seahorse软件中进行标准化, 后得到标准化的结果。本文所示结果均为标准化后的数据。

1.3.6 统计方法 本研究所用统计均采用统计软件SPSS 16.0完成; 作图均应用GraphPad 5.0作图软件完成; 统计方法采用student's t 检验。 $P < 0.05$ 表示两样本之间差异有统计学意义。

2 结果

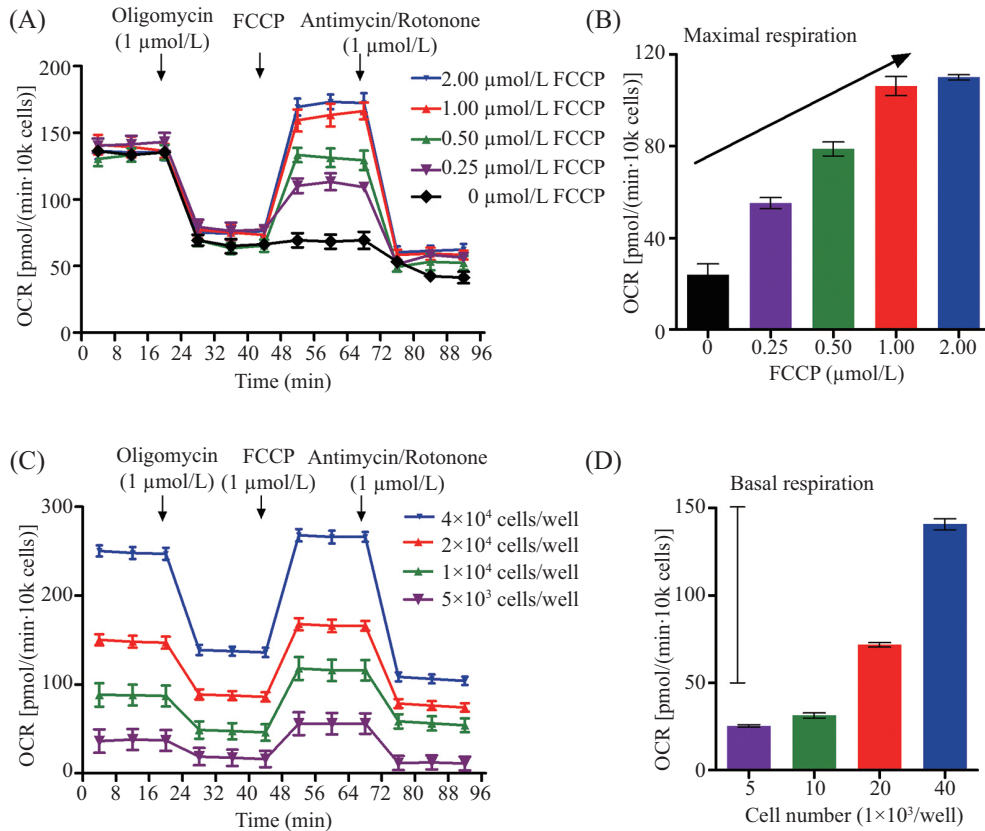
2.1 应用生物能量分析仪测定细胞生物能量代谢实验条件的优化

生物能量分析仪通过设定程序加入4种呼吸链酶复合物调节药物(寡霉素、FCCP、鱼藤酮和抗霉素A)对细胞OCR及相关参数进行测定。然而, 在这一过程中, FCCP工作浓度对于细胞OCR的测定较其他几种药物更为关键。FCCP是一种解偶联剂, 加入此化合物后细胞耗氧与ATP合酶偶联大大减弱, 耗氧增加, 而事实上FCCP同时也作为一种质子载体, 使大量质子回流, 并导致细胞氧耗率增加(通过消耗细胞内的ATP而成为线粒体呼吸链的解偶联剂)^[24]。利用寡霉素抑制线粒体氧化磷酸化后, 再加入FCCP研究细胞最大的氧耗率水平。由于FCCP具有将电子传递和氧化磷酸化解偶联的作用, 而过高浓度的FCCP将对细胞产生毒性引发细胞死亡, 因此选择一个合适的工作浓度至关重要。本文通过加入一定浓度梯度的FCCP测定细胞在寡霉素处理OCR增加的水平, 探究不同浓度FCCP对细胞最大氧耗率的影响。如图1A所示, 细胞在氧化磷酸化抑制剂寡霉素处理后, 细胞的氧耗率显著降低, 在连续测定3次后加入不同药物浓度的FCCP, 然而随着FCCP浓度

的增加, 细胞OCR也呈现显著增加, 并且在FCCP浓度为1.00 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值, 而增加FCCP浓度至2.00 $\mu\text{mol/L}$ 时并不会使细胞的OCR出现显著的增加, 这表明FCCP的最佳浓度为1.00 $\mu\text{mol/L}$ 。在应用生物能量分析仪分析细胞OCR时, 细胞密度对于细胞OCR的测定也具有较大的影响, 因此有必要对细胞数量进行一定的优化。本文通过加入不同的细胞数量, 测定相应的OCR, 发现OCR随细胞数量增加而逐渐上升。为保证测定信号的准确性及灵敏性, 根据Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer仪器产品说明, 在应用96孔生物能量分析仪测定细胞OCR时, 细胞的基础OCR应在50~150 pmol/min。如图1B所示, 选用TE-1细胞作为实验材料, 测定不同处理下的OCR时, 应保证细胞数量在 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ /孔的范围内比较合适。

2.2 阿霉素降低细胞氧耗率及各相关指标

阿霉素(doxorubicin, Dox)是一种抗肿瘤抗生素, 可抑制RNA合成和DNA的复制, 对RNA的抑制作用最强, 抗癌谱较广, 对多种肿瘤均有效, 属周期非特异性药物, 对各种生长周期的肿瘤细胞都具有诱导细胞死亡的作用, 是临床化疗方案中常用的药物, 但其作用机制仍不清楚。之前的研究表明, 阿霉素与DNA的相互作用主要是通过稳定拓扑异构酶II实现的。在DNA复制过程中, 拓扑异构酶II将DNA解链后, 阿霉素会稳定拓扑异构酶II, 防止DNA两股螺旋再结合在一起, 从而终止复制过程。阿霉素也可以与某些蛋白质相互作用诱导线粒体介导的细胞凋亡通路, 因此我们推测阿霉素可能对线粒体电子传递链具有一定的影响^[25-27]。为了研究阿霉素对于细胞氧化磷酸化过程的影响, 首先我们确定了实验所用阿霉素具有抑制食管鳞癌细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。如图2A所示, 阿霉素处理后细胞增殖受到显著的抑制, 一定浓度梯度阿霉素(0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 $\mu\text{g/mL}$)处理, 细胞的活性随阿霉素浓度增加而显著降低。在阿霉素(0.50 $\mu\text{g/mL}$)处理细胞24 h后, 应用流式细胞术检测发现, 细胞发生显著的凋亡(图2B和图2C), 应用Western blot方法分析凋亡相关蛋白质变化, 结果显示, 细胞凋亡关键分子PARP(poly ADP-ribose polymerase), 半胱天冬酶-3(caspase-3)和半胱天冬酶-7出现明显的切割, 并且p53蛋白质水平显著增加, 这表明阿霉素在诱导食管鳞癌细胞凋亡过程中发挥着关键的作用(图2D)。



A: 食管鳞癌细胞TE-1在不同浓度(0、0.25、0.50、1.00、2.00 $\mu\text{mol/L}$)FCCP处理后, 细胞氧耗率的变化; B: TE-1细胞在不同浓度FCCP处理后, 细胞的最大呼吸变化; C: 不同细胞数量下, TE-1细胞的氧耗量; D: 不同细胞数量下, 细胞的基础氧耗率变化。

A: OCR of TE-1 cells which were treated with a gradient concentration of FCCP (0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00 $\mu\text{mol/L}$); B: maximal respiration rate of the cells which were treated with gradient concentration of FCCP; C: OCR of TE-1 cells in diverse cell density; D: basal respiration rate in diverse cell density.

图1 不同浓度的FCCP及不同细胞数量条件下TE-1细胞的氧耗率

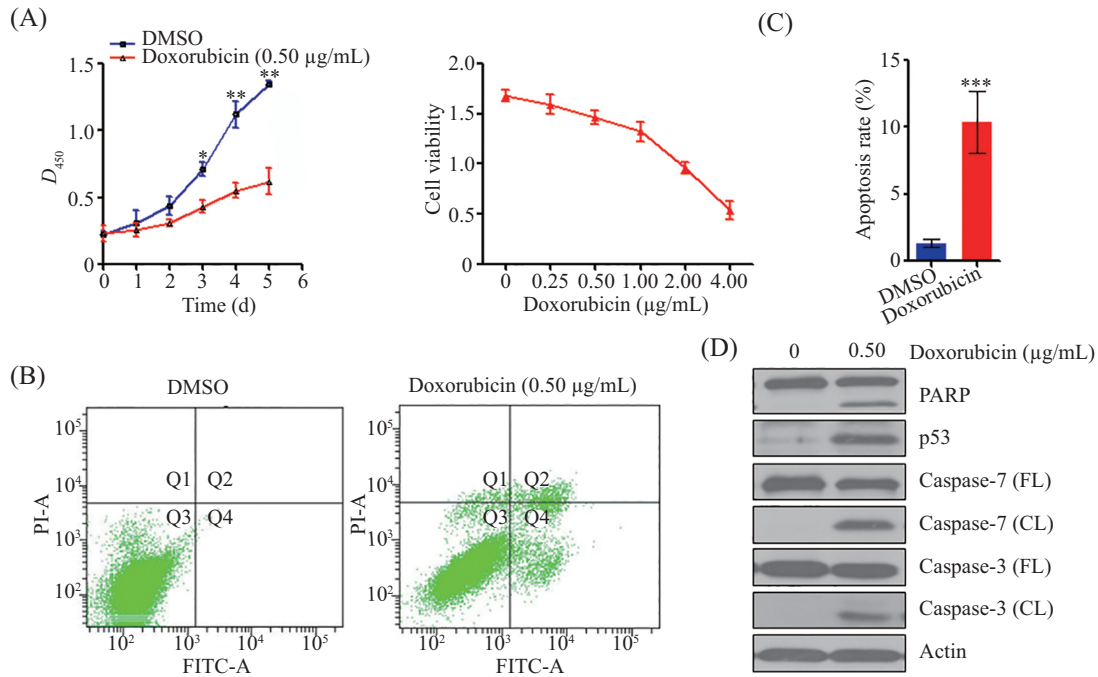
Fig.1 OCR of TE-1 cells within gradient concentration of FCCP and divers cell number

然而, 关于阿霉素对细胞氧化磷酸化过程的影响尚未见报道, 因此本研究将应用生物能量分析仪对阿霉素处理后的细胞OCR进行测定, 并分析相关指标, 确定阿霉素对细胞氧化磷酸化过程的影响。如图3A所示, 细胞经阿霉素(0.50 $\mu\text{g/mL}$)处理后, 细胞整体OCR曲线较对照组有显著的降低。结果显示, 寡霉素处理后细胞OCR有显著的下降, 而在解偶联剂FCCP处理后细胞OCR显著上升, 但是阿霉素处理后细胞的OCR上升幅度较对照组要小, 最后加入电子传递链抑制剂鱼藤酮和抗霉素A后, 细胞OCR又出现显著的降低。通过对细胞进行以上4种氧化磷酸化和电子传递链调节剂处理, 测定相应的OCR, 经过统计分析探讨外界因素对细胞线粒体呼吸的影响。如图3B所示, 细胞测定的初始OCR(rate 3)与鱼藤酮/抗霉素A处理后细胞的OCR(rate 11)的差值作为细胞的基础OCR(basal respiration); 初始OCR(rate 3)与寡霉素处理后的OCR(rate 5)的差值作为细胞

的ATP产生(ATP production); 细胞经FCCP处理后增加的OCR(rate 8)与鱼藤酮/抗霉素A处理后细胞的OCR(rate 11)的差值为细胞的最大OCR(maximal respiration); 细胞经FCCP处理后增加的OCR(rate 8)与细胞测定的初始OCR(rate 3)的差值为细胞的储备呼吸(spare respiration); 细胞经鱼藤酮/抗霉素A处理后细胞的OCR曲线以下部分为非线粒体呼吸(non-mitochondrial respiration)^[28]。应用上述方法, 本文对阿霉素处理后的线粒体生物能量代谢的4个指标进行了分析, 发现阿霉素处理后细胞的基础呼吸、ATP产生、最大呼吸和储备呼吸均有显著的降低(图3C~图3F), 这表明阿霉素在很大程度上抑制了细胞线粒体能量代谢过程。

2.3 阿霉素显著抑制细胞的糖酵解过程

早在20世纪20年代, Otto Warburg^[2]通过实验观察并提出正常细胞在发生恶性转化及肿瘤细胞生长过程中, 一些肿瘤细胞将通过转换代谢方式从而



A: 应用CCK-8试剂盒测定在0.50 µg/mL阿霉素处理后的细胞增殖率变化(左), 应用MTT细胞毒性检测试剂盒检测在浓度梯度阿霉素(0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 µg/mL)处理后细胞活性的变化(右); B: 流式细胞术检测TE-1细胞在0.5 µg/mL阿霉素处理后细胞凋亡状态; C: 阿霉素处理后细胞凋亡的统计数据; D: TE-1细胞在0.5 µg/mL阿霉素处理24 h后, 收集细胞应用Western blot检测凋亡相关蛋白质变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与DMSO组比较。

A: cell proliferation rates were detected by CCK-8 kit after treated with 0.50 µg/mL doxorubicin (left) and cell viability by MTT detection kit after a gradient concentration of doxorubicin (0, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 µg/mL) treatment (right); B: TE-1 cells were pre-treated with 0.5 µg/mL doxorubicin and followed by flow cytometry analysis; C: quantitative cell apoptotic rate determined by flow cytometry; D: TE-1 cells were pre-treated with 0.5 µg/mL doxorubicin for 24 h and the cell samples were subjected to Western blot analysis. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with DMSO group.

图2 阿霉素抑制食管鳞癌细胞增殖并引发半胱天冬酶依赖的细胞凋亡途径

Fig.2 Doxorubicin inhibits esophageal squamous cell carcinoma cell TE-1 proliferation and promotes cell apoptosis

适应低氧的生存环境, 表现为肿瘤细胞糖酵解速率的增加, 即使是重新回到常氧条件下, 肿瘤细胞仍然继续依赖糖酵解途径产能, 这一代谢方式被称为有氧糖酵解。目前已经发现了多种化合物或分子能够靶向糖酵解途径中的不同过程, 从而达到抑制肿瘤细胞生长的效果, 如2-DG、3-溴丙酮酸和氯尼达明等。常用的研究糖酵解率的方法主要是测定糖酵解过程中关键酶的活性及相关中间产物含量的变化, 特别是通过测定乳酸含量来间接反映细胞的糖酵解速率, 但是此方法具有一定的局限性, 因为它只检测了细胞的乳酸含量, 而外界诱导因素对糖酵解过程整体的影响并不能反映出来。因此高效而简便的测定糖酵解过程的实验技术对分析外界因素对于糖酵解过程的影响显得尤为重要。生物能量分析仪不仅能够用于研究细胞的氧耗率, 还可以应用于细胞糖酵解过程的研究。本研究利用生物能量分析仪测定阿霉素处理后细胞糖酵解过程的变化, 进而探

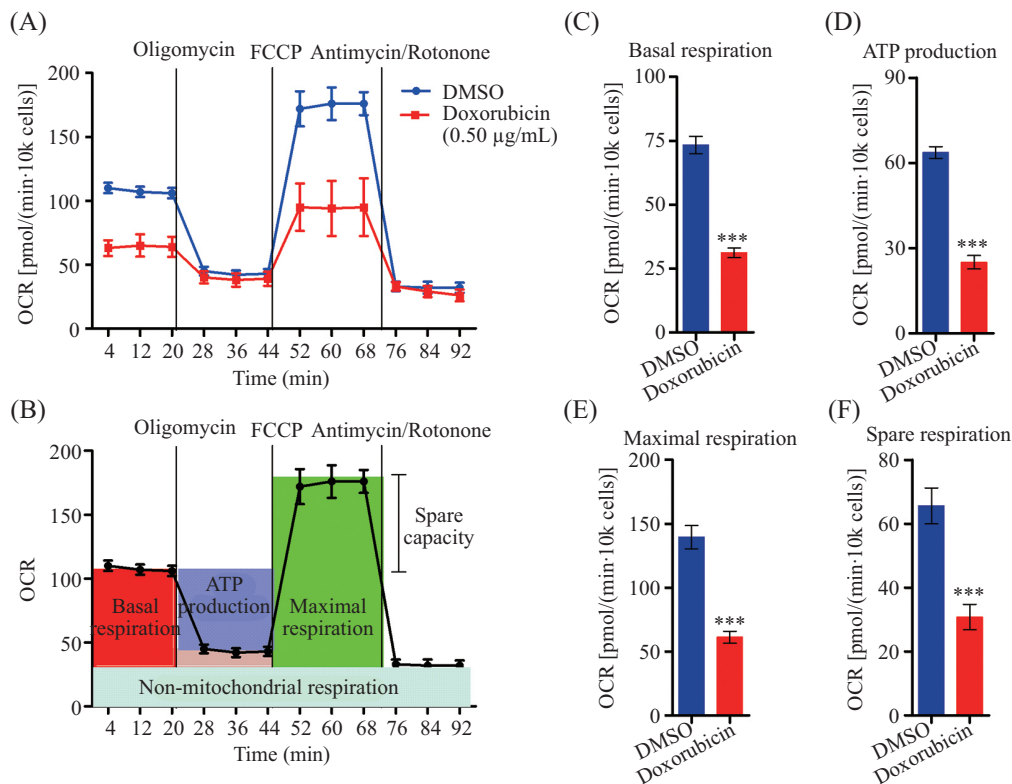
讨化疗药物阿霉素对于细胞糖酵解过程的影响。研究表明, 肿瘤细胞经阿霉素处理后, 细胞的糖酵解过程受到显著的抑制(图4A)。如图4B所示, 通过依次加入葡萄糖、寡霉素和2-DG, 测定相应的酸化率(ECAR)来反映细胞糖酵解过程的变化: 细胞初始ECAR(rate 3)与2-DG处理后细胞的ECAR(rate 11)的差值为细胞基础糖酵解率(basal glycolytic rate); 加入外源葡萄糖后测定的ECAR(rate 5)与2-DG处理后的ECAR(rate 11)的差值为细胞的葡萄糖代谢率(cellular glucose metabolism rate); 加入寡霉素处理后的ECAR(rate 7)与2-DG处理后的ECAR(rate 11)差值为细胞的最大糖酵解率(maximal glycolytic rate); 加入寡霉素处理后的ECAR(rate 7)与外源葡萄糖刺激后细胞的ECAR(rate 5)的差值为细胞的储备糖酵解率(spare glycolytic capacity); 2-DG处理后的ECAR(rate 11)以下的部分为非糖酵解产酸过程(non-glycolytic capacity)。因此, 通过对上述指标进行统计分析发

现,阿霉素处理后细胞糖酵解过程受到显著抑制,表现为细胞基础糖酵解率、最大糖酵解率及储备糖酵解率的显著降低(图4C~图4E)。为明确应用生物能量分析仪测定细胞在阿霉素处理后糖酵解水平的变化,我们应用乳酸检测试剂盒测定了糖酵解产物中乳酸的含量,如图4F所示,在阿霉素(0.5 $\mu\text{g/mL}$)处理后,细胞的乳酸产量确实有显著的降低,这也间接反映了细胞糖酵解速率的降低,也进一步验证了生物能量分析仪所测定的实验结果。

2.4 应用生物能量分析仪测定悬浮细胞(K562)的生物能量代谢

在体外肿瘤细胞中,有一类悬浮型细胞,如较为常用的白血病细胞K562细胞株。应用生物能量分析仪在对体外培养细胞的生物能量代谢水平检测过程中需要使细胞贴壁于96孔培养板底部才能准确测定细胞的氧化磷酸化和糖酵解速率。那么如何对悬浮细胞进行生物能量代谢的检测呢?通过预先

在96孔板中按1~5 $\mu\text{g/cm}^2$ 的量加入细胞黏附剂(Cell TAK)室温过夜,制备细胞悬液(注意包被好Cell TAK的细胞板应置于室温下,若置于37 $^{\circ}\text{C}$ 下则会影响细胞的黏附)。将铺好的细胞板置于离心机的离心板上,650 r/min离心4 min。培养20 min后,观察细胞是否均匀贴于底部及细胞是否受到破坏,待确认完毕后,将细胞培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、无 CO_2 培养箱中培养20 min,后续的生物能量测定与贴壁细胞测定方法一致。如图5所示,经Cell TAK预包被后,悬浮细胞的生物能量代谢情况同样可以应用生物能量分析仪进行检测。如图5A所示,经Drug A(与中国药科大学合作者合成的新化合物,为NO供体,在另文报道)预处理后细胞的基础氧耗率并没有显著的变化,而在FCCP刺激后并不能够达到与DMSO组一样的OCR,这表明Drug A对细胞的最大呼吸、ATP产生和储备呼吸均具有显著的抑制作用。而图5B的结果表明,在Drug B(与中国药科大学合作者合成的另一个新化合

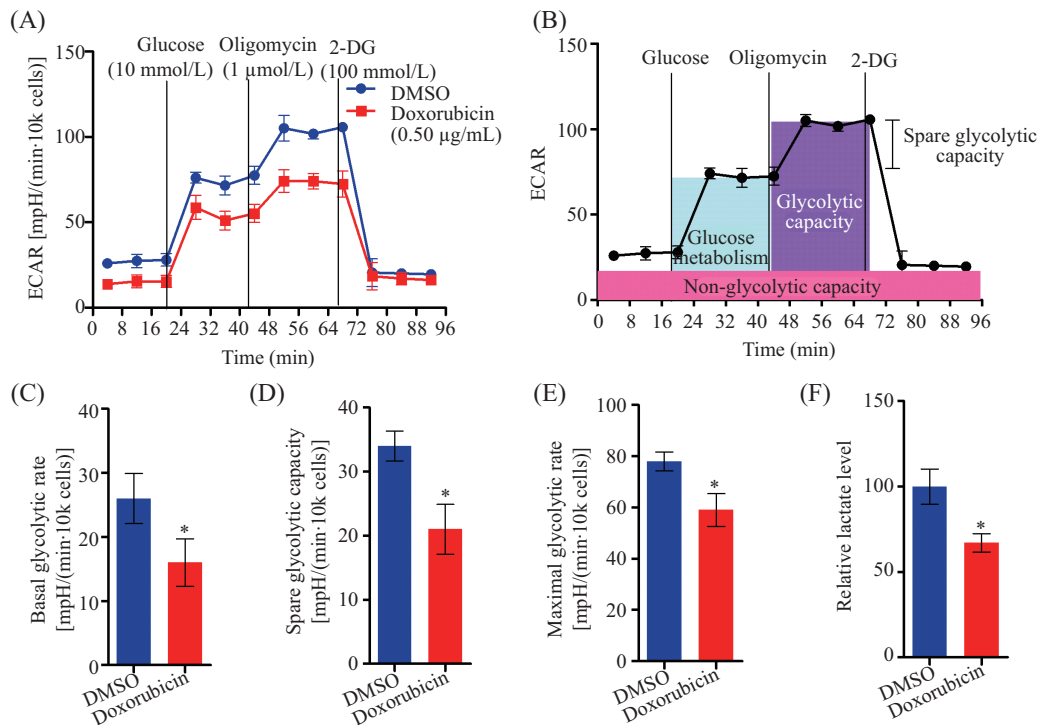


A: TE-1细胞在阿霉素(0.5 $\mu\text{g/mL}$)处理后总体的细胞氧耗率变化曲线; B: 细胞氧化磷酸化相关参数示意图^[27]; C: TE-1细胞经阿霉素(0.5 $\mu\text{g/mL}$)处理12 h后细胞的基础呼吸; D: 阿霉素处理后细胞的ATP产生水平; E: 最大呼吸; F: 储备呼吸。*** $P < 0.001$,与DMSO组比较。

A: overall curve of cellular OCR in response to doxorubicin (0.5 $\mu\text{g/mL}$) treatment; B: schematic diagram of indexes in overall OCR curve (down)^[27]; C: cellular basal respiration of cells subjected to doxorubicin treatment; D: alteration of cellular ATP production in response to doxorubicin treatment; E: maximal respiration of the control and doxorubicin pre-treated cells; F: cellular spare respiration variation of the control and doxorubicin pre-treated cells. *** $P < 0.001$ compared with DMSO group.

图3 阿霉素对细胞线粒体呼吸的影响

Fig.3 The effect of doxorubicin on mitochondrial respiration of cells



A: 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素预处理后细胞的总产酸率曲线; B: 糖酵解相关参数示意图^[26]; C: TE-1细胞经阿霉素(0.5 $\mu\text{g/mL}$)处理后细胞基础糖酵解率变化; D: 细胞储备糖酵解率; E: 细胞最大糖酵解能力; F: 细胞相对乳酸水平。* $P < 0.05$, 与DMSO组比较。

A: overall ECAR curve of doxorubicin pre-treated cells; B: certain indexes of aerobic glycolysis^[26]; C: basal glycolytic rate of control and doxorubicin pre-treated cells; D: spare glycolytic rate alteration of TE-1 cells due to doxorubicin treatment; E: cellular glycolytic capacity of convert in TE-1 cells with or without doxorubicin treatment; F: cellular relative lactate level of control and doxorubicin pre-treated TE-1 cells. * $P < 0.05$ compared with DMSO group.

图4 阿霉素对细胞糖酵解途径的影响

Fig.4 The effect of doxorubicin in regulating aerobic glycolysis of cells

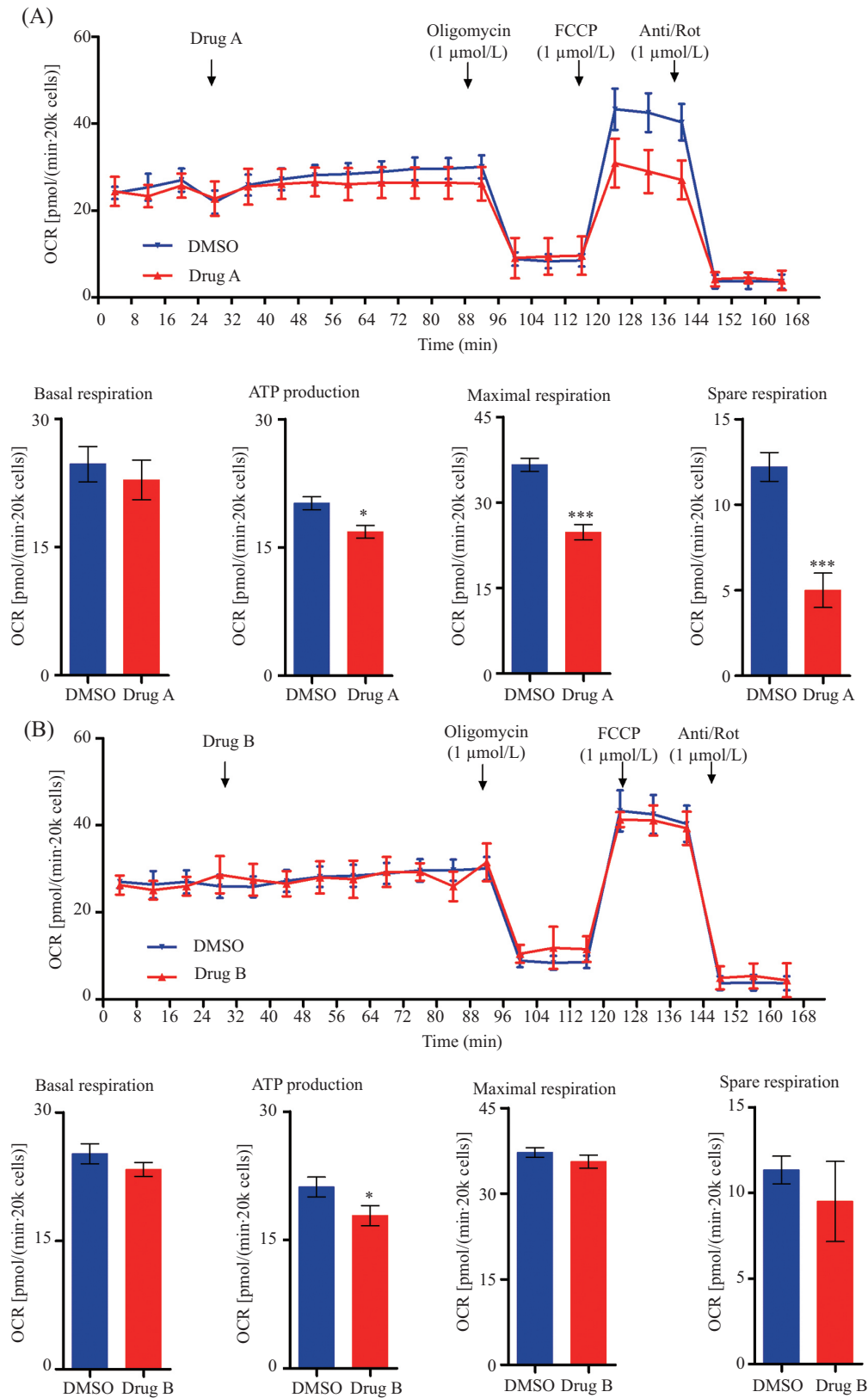
物, 为NO供体, 在另文报道)预处理后细胞的基础氧耗率、最大呼吸和储备呼吸均无显著差异, 但ATP产生量显著降低。

3 讨论

肿瘤细胞为满足其快速增殖的需要, 对能量的需求也相应的增加, 因此靶向肿瘤细胞的生物能量代谢过程对于抑制肿瘤细胞的生长是一个新的治疗策略。常用测定糖酵解及氧化磷酸化的方法主要有: 培养基中乳酸含量测定、氧电极测定氧耗率以及各种试剂盒测定相关代谢中间产物。但这几种方法比较繁琐, 因此迫切需要一种更为高效、准确及快速的研究药物和分子(蛋白质、microRNA和lncRNA等)对细胞生物能量代谢影响的方法。生物能量分析仪为研究细胞的生物能量代谢提供了一种新型的测定方法。本文通过对不同处理因素下肿瘤细胞的生物能量代谢进行测定, 深入探讨了生物能量分析仪用于测定生物能量代谢水平的技术方法, 并对相关条

件进行了优化, 为更好地研究细胞的氧化磷酸化和糖酵解过程提供了实验依据。

首先, 我们对实验条件进行了优化, 主要是FCCP的工作液浓度和细胞的数量。前面已经提到, FCCP作为电子传递链和氧化磷酸化的解耦联剂, 实际上也是一种质子载体, 通过消耗ATP使细胞ATP水平降低。但是, 如果FCCP的浓度过高, 不仅会导致细胞ATP产生降低, 还会消耗细胞本身的ATP, 从而诱导细胞死亡或生存状态发生变化, 这既不利于后续的研究, 也使得实验结果缺乏有效性。因而, 在使用生物能量分析仪测定细胞生物能量代谢变化时, 合适的FCCP浓度是十分关键的。由于不同细胞对于FCCP敏感性不同, 因此应用不同细胞株进行实验时, 需要对FCCP的浓度进行摸索。如图2A所示, 应用1 $\mu\text{mol/L}$ FCCP处理TE-1细胞时, 其OCR值可达到最大, 而继续增加FCCP的浓度时, 细胞的OCR并没有呈现上升的趋势, 因此选择工作浓度为1 $\mu\text{mol/L}$ 的FCCP对于研究食管鳞癌细胞株TE-1细胞的线粒体



A: K562细胞在药物A预处理后的总氧化磷酸化变化; B: K562细胞在药物B处理后的总氧化磷酸化水平变化。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与DMSO组比较。

A: overall OCR curve of drug A pretreated K562 cells; B: OCR alteration of K562 cells in response to drug B pre-treatment. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with DMSO group.

图5 悬浮细胞K562在药物A和药物B处理后的氧化磷酸化变化

Fig.5 The alteration of OXPHOS in suspension cell K562 upon Drug A and Drug B treatment

呼吸状态改变较为合适。此外, 细胞密度对于测定结果的准确性也有很大的影响, 若细胞密度太低, 则会导致测定结果不稳定; 若细胞密度过高, 细胞会处于重叠或挤压的状态也会使测定结果不准确。考虑到不同类型细胞的大小不同, 因而我们原则上是保证细胞能够自由生长为宜。此外, 基于生物能量分析仪本身的设计, 为得到较为准确的信号, 建议测定的初始氧耗率(basal OCR)在以下范围: (A)24孔生物能量分析仪: 100~400 pmol/min; (B)96孔生物能量分析仪: 50~150 pmol/min。因此需要对不同数量细胞的OCR值进行检测, 确保初始OCR值在指定的范围。

本文详细介绍了在不同处理条件下细胞的OCR和ECAR的变化。阿霉素作为一种常用的抗肿瘤药物, 可通过多种作用方式诱导肿瘤细胞凋亡从而达到治疗肿瘤的效果。然而, 之前的研究主要集中于阿霉素对肿瘤细胞DNA复制及生长相关信号通路的影响, 关于阿霉素对细胞生物能量代谢的研究相对较少。本文应用生物能量分析仪对阿霉素处理后细胞的生物能量代谢进行了测定, 发现阿霉素预处理24 h后, 细胞的氧化磷酸化和糖酵解过程均受到了显著的抑制, 统计分析发现, 4个主要指标(基础呼吸、最大呼吸、储备呼吸和ATP产生)均有不同程度的下降。原因可能是, 细胞经阿霉素预处理后, 处于凋亡状态, 而诱导增加的p53可能通过促进TIGAR(TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)的表达, 来降低果糖2,6-二磷酸的表达水平, 从而抑制糖酵解^[29]。然而, Matoba等^[30]报道正常p53能够优化细胞线粒体功能, 通过调控细胞色素c氧化合成酶2(cytochrome c synthetase 2, SCO2)的表达, 促进细胞色素c氧化酶2(cytochrome c oxidase 2, COX2)的合成, 从而抑制糖酵解。p53失活可降低SCO2活性, 导致线粒体OXPHOS功能受损, 使代谢从线粒体氧化磷酸化方式转变为有氧糖酵解^[31-32]。同时我们的结果表明, 阿霉素处理后, 细胞活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)水平显著上升, 这可能会导致细胞的氧化损伤增加, 线粒体呼吸链复合物的活性降低, 从而抑制细胞的氧化磷酸化产能过程, 至于更深入的机制研究有待后续的探索。此外, 本文也通过利用乳酸测定试剂盒对阿霉素处理后细胞的乳酸含量进行测定, 发现细胞的乳酸水平显著降低, 这也更进一步确认了生物能量分析仪测定糖酵解能力变化的优越性及可靠性。

本文还应用生物能量分析仪对悬浮细胞的生物能量代谢水平的检测也做了简单的介绍。除实体瘤以外, 包括白血病在内的血液病也是威胁人类健康一种十分重要的疾病类型。近年来的研究表明, 在多发性髓性白血病中通过抑制线粒体蛋白酶ClpP降低细胞的生物能量代谢可显著抑制白血病肿瘤细胞的生长^[33]。因此, 通过对血液病细胞的生物能量代谢进行研究, 对探讨血液相关疾病的发生及治疗同样具有非常重要的意义。生物能量分析仪也能够对悬浮细胞的生物能量代谢进行测定, 但需要对其做一定的预处理。需预先对细胞培养板的培养小室进行Cell TAK的包被, 使悬浮细胞能够黏附于培养小室底部, 从而方便后续的测定。一旦黏附完成后, 后续的测定则与贴壁细胞一致。

本文通过利用生物能量分析仪对不同处理下的肿瘤细胞生物能量代谢变化进行了测定, 分析研究了不同处理条件下细胞的氧化磷酸化和糖酵解速率的变化, 并通过相关实验进行了一定的验证, 同时对悬浮细胞生物能量代谢测定的操作方法也做了一定的介绍。此外, 应用生物能量分析仪还对提纯的线粒体氧耗率进行测定, 基本方法则与悬浮细胞类似(未发表资料)。虽然本文着重于肿瘤细胞生物能量代谢的测定, 但是对其他细胞生物能量的测定同样适用。值得一提的是, 生物能量分析仪在测定脂质氧化水平上同样有所应用, 传统脂质氧化水平的测定方法主要是通过对放射性标记底物的摄入和累积进行测定或通过MDA脂质氧化检测试剂盒进行测定, 而生物能量分析仪可通过Palmitate-BSA FAO试剂对氧化的棕榈酸盐的累积进行测定, 从而反映细胞的脂质氧化水平, 对于这一方面的应用我们会在后续的技术方法中做详细的介绍。

综上所述, 生物能量分析仪对于研究细胞的生物能量代谢具有很好的应用价值, 通过相关实验方法的具体介绍, 希望能够为细胞生物能量代谢的研究提供可靠的方法和手段。

参考文献 (References)

- 1 Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Phys* 1927; 8(6): 519-30.
- 2 Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891-9.
- 3 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123(3191): 309-14.

- 4 Brown J. Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: Review of the literature and studies in the rat. *Metabolism* 1962; 11: 1098-112.
- 5 Weindruch R, Keenan KP, Carney JM, Fernandes G, Feuers RJ, Floyd RA, *et al.* Caloric restriction mimetics: Metabolic interventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56(1): 20-33.
- 6 Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53(2): 116-22.
- 7 Floridi A, Paggi MG, Marcante ML, Silvestrini B, Caputo A, De Martino C. Lonidamine, a selective inhibitor of aerobic glycolysis of murine tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66(3): 497-9.
- 8 Floridi A, Bruno T, Miccadei S, Fanciulli M, Federico A, Paggi MG. Enhancement of doxorubicin content by the antitumor drug lonidamine in resistant Ehrlich ascites tumor cells through modulation of energy metabolism. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(7): 841-9.
- 9 Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: Characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* 2001; 173(1): 83-91.
- 10 Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL. Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004; 4(3): 449-57.
- 11 Xu RH, Pelicano H, Zhang H, Giles FJ, Keating MJ, Huang P. Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells. *Leukemia* 2005; 19(12): 2153-8.
- 12 Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, *et al.* Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005; 65(2): 613-21.
- 13 Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, *et al.* Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2012; 22(4): 547-60.
- 14 Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21(3): 297-308.
- 15 Martin DS, Leonard S, Devine R, Redondo C, Kinsella GK, Breen CJ, *et al.* Novel mitochondrial complex I inhibitors restore glucose-handling abilities of high-fat fed mice. *J Mol Endocrinol* 2016; 56(3): 261-71.
- 16 Marini C, Bianchi G, Buschiazzo A, Ravera S, Martella R, Bottoni G, *et al.* Divergent targets of glycolysis and oxidative phosphorylation result in additive effects of metformin and starvation in colon and breast cancer. *Sci Rep* 2016; 6: 19569.
- 17 Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Lamb R, Hult J, Howell A, Gandara R, *et al.* Mitochondrial dysfunction in breast cancer cells prevents tumor growth: Understanding chemoprevention with metformin. *Cell Cycle* 2013; 12(1): 172-82.
- 18 Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Flomenberg N, Birbe RC, Witkiewicz AK, Howell A, *et al.* Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells *in situ*: Visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. *Cell Cycle* 2011; 10(23): 4047-64.
- 19 Cheong JH, Park ES, Liang J, Dennison JB, Tsavachidou D, Nguyen-Charles C, *et al.* Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(12): 2350-62.
- 20 Gwak H, Kim Y, An H, Dhanasekaran DN, Song YS. Metformin induces degradation of cyclin D1 via AMPK/GSK3 β axis in ovarian cancer. *Mol Carcinog* 2016; doi: 10.1002/mc.22498.
- 21 Shen C, Ka SO, Kim SJ, Kim JH, Park BH, Park JH. Metformin and AICAR regulate NANOG expression via the JNK pathway in HepG2 cells independently of AMPK. *Tumour Biol* 2016; doi: 10.1007/s13277-016-5007-0.
- 22 Fodor T, Szántó M, Abdul-Rahman O, Nagy L, Dér Á, Kiss B, *et al.* Combined treatment of MCF-7 cells with AICAR and methotrexate, arrests cell cycle and reverses Warburg metabolism through AMP-activated protein kinase (AMPK) and FOXO1. *PLoS One* 2016; 11(2): e0150232.
- 23 Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: Spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem* 2009; 109(4): 1179-91.
- 24 Asghar U, Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *J Hepatol* 2012; 56(3): 686-95.
- 25 Xu F, Wang F, Yang T, Sheng Y, Zhong T, Chen Y. Differential drug resistance acquisition to doxorubicin and paclitaxel in breast cancer cells. *Cancer Cell Int* 2014; 14(1): 538.
- 26 Lei H, Wang X, Wu C. Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations. *J Mol Graph Model* 2012; 38: 279-89.
- 27 Min Wu, Andy Neilson, Amy L. Swift, Rebecca Moran, James Tamagnine, Diane Parslow, *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C125-36.
- 28 Brahimi-Horn MC and Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3582-91.
- 29 Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, *et al.* TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006; 126(1): 107-20.
- 30 Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, *et al.* p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006; 312(5780): 1650-3.
- 31 Kruse JP and Gu W. p53 aerobics: the major tumor suppressor fuels your workout. *Cell Metab* 2006; 4(1): 1-3.
- 32 Assaily W and Benchimol S. Differential utilization of two ATP-generating pathways is regulated by p53. *Cancer Cell* 2006; 10(1): 4-6.
- 33 Cole A, Wang Z, Coyaud E, Voisin V, Gronda M, Jitkova Y, *et al.* Inhibition of the mitochondrial protease ClpP as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2015; 27(6): 864-76.