

低葡萄糖高乳酸环境对 HeLa 细胞生存的影响*

李 苹¹ 孙蓬明² 李丽娜³ 李明珠¹ 吕育纯^{1**} 林丽蓉⁴

(1.福建医科大学附属泉州市第一医院妇产科,泉州 362000; 2.福建省妇幼保健院,福州 350001; 3.北京中医药大学基础医学院科研中心,北京 100029; 4.厦门大学,厦门 361000)

【摘要】 目的: 探讨低糖高乳酸环境对宫颈癌细胞生存的影响,以及对 EGFR-mTOR 通路的调节作用。方法: 将 HeLa 细胞培养于常糖(葡萄糖 10mmol/L)、低糖(葡萄糖 3mmol/L)、高乳酸(葡萄糖 10mmol/L,乳酸 2.5mmol/L)、低糖高乳酸(葡萄糖 3mmol/L,乳酸 2.5mmol/L) 4 种环境下, CCK-8 法测定 HeLa 细胞的生长抑制率,流式细胞术测定细胞周期。荧光实时定量 PCR 法检测 EGFR 和 mTOR mRNA 水平表达。结果: 与常糖组相比,高乳酸组的细胞抑制率显著升高($P < 0.01$),48h 细胞 G_1/G_0 期比例显著升高($P < 0.01$),细胞凋亡率、EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平均无变化。与常糖组相比,低糖组的细胞抑制率显著升高($P < 0.01$),48h 细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$),细胞各周期比例变化与常糖组无差异,EGFR 表达水平降低($P < 0.05$)。与常糖组相比,低糖高乳酸组的细胞抑制率显著升高($P < 0.01$),但低于低糖组($P < 0.01$)和高乳酸组($P < 0.05$),48h G_1/G_0 期比例显著升高($P < 0.01$),细胞诱导凋亡率显著升高($P < 0.01$),EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.01$)。结论: HeLa 细胞在低糖高乳酸环境中的存活状况好于单纯低糖和单纯高乳酸环境,且伴随着 EGFR 和 mTOR 基因表达水平上升。

【关键词】 宫颈癌; 葡萄糖; 乳酸; 表皮生长因子受体; 雷帕霉素受体

中图分类号: R737.33 文献标志码: A 文章编号: 1004-7379(2017)04-0251-04

DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2017.04.003

The effect of low glucose and high lactic acid on the survival of HeLa. Li Ping¹, Sun Peng-ming², Li Lina³, et al. 1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Hospital of Quanzhou Fujian Medical University, Quanzhou 362000; 2. Fujian Provincial Maternity and Children's Hospital, Fuzhou 350001; 3. Scientific Research Centre in School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029

【Abstract】 Objective: To explore the effect of the low glucose and high lactic acid environment of survival of cervical carcinoma cells, and the regulation of EGFR-mTOR signal way. **Methods:** HeLa cells were cultured in four conditions: normal glucose (glucose 10mmol/L), low glucose (glucose 3mmol/L), high lactic acid (lactic acid 2.5mmol/L) and low glucose add high lactic acid (glucose 3mmol/L, lactic acid 2.5mmol/L). Growth inhibition rate of HeLa cell was determined by CCK-8. Flow cytometry (FCM) were performed to evaluate the cell cycle. The expression levels of EGFR and mTOR mRNA were detected using real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR). **Results:** Compared with those in regular sugar environment, the cell growth inhibition rates were significantly increased in high lactic acid environment ($P < 0.01$). At 48h, the rate of G_1/G_0 was significantly increased ($P < 0.01$), while the apoptosis rate of the cells and the expressions of EGFR and mTOR mRNA had no change. Compared with those in regular sugar environment, the cell growth inhibition rates were significantly increased in high lactic acid environment ($P < 0.01$), while lower than those in low glucose environment ($P < 0.01$) and in high acid environment ($P < 0.05$). The rates of G_1 , G_2 and S phase had no change. The expressions of EGFR mRNA was reduced ($P < 0.05$). The cell growth inhibition

* 泉州市科技计划立项项目 (No: 2015Z41); 国家面上项目 (No: 81672094)

** 通讯作者 Email: Lyuchun1968@163.com

rates were significantly increased in high lactic acid add low glucose environment ($P < 0.01$). At 48h, the apoptosis rate and the rate of G_1/G_0 were significantly increased ($P < 0.01$), while the EGFR and mTOR expression levels were also increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** HeLa in the low glucose add high lactic acid survives better than those in low glucose and in high lactic acid environment, while the expression of EGFR and mTOR is increased.

【Key words】 Cervical Carcinoma; Glucose; Lactic Acid; EGFR; mTOR

宫颈癌是严重危害女性健康的常见恶性肿瘤之一,其手术及放疗治疗虽日趋成熟,但对晚期或转移性宫颈癌尚无满意的治疗手段。研究发现,宫颈癌患者的血乳酸积聚与生存率呈负相关^[1]。乳酸通过调节细胞周期、代谢等细胞过程减弱因葡萄糖缺乏导致的死亡信号,从而使肿瘤细胞适应葡萄糖缺乏的环境^[2]。EGFR-mTOR 通路对肿瘤的代谢调节具有十分重要的意义^[3]。宫颈癌中 EGFR 表达水平显著高于癌旁组织和正常组织^[4]。这提示 EGFR-mTOR 通路可能对宫颈癌细胞在低糖高乳酸环境中的生存发挥作用。本文通过研究低糖和高乳酸对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞生存、细胞周期等方面的影响,以及相关基因表达水平的变化,初步探讨 EGFR-mTOR 通路在宫颈癌适应不良环境中的变化。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞购自北京协和细胞资源中心。胎牛血清、RPMI 1640 培养基和 RPMI 1640 无糖培养基均购自美国 Gibco 公司。RT-PCR 引物由 Invitrogen 公司化学合成。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司。M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司。qPCR mix 购自北京康为世纪公司,CCK-8 试剂盒购自碧云天研究所,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒均购自江苏凯基公司,兔抗人 EGFR 抗体,兔抗人 mTOR 抗体,兔抗人 skp2 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与分组 HeLa 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、100kU/L 青霉素、100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液中。取对数生长期贴壁细胞,分为常糖组(培养基中葡萄糖含量为 10mmol/L),低糖组(葡萄糖含量为 3mmol/L,低于正常人空腹血糖低值),高乳酸组(葡萄糖含量为 10mmol/L,乳酸含量为 2.5mmol/L),和低糖高乳酸组(葡萄糖含量为 3mmol/L,乳酸含量为 2.5mmol/L)进行后续实验。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞生长状况 参照 Tominaga 方法^[5]检测细胞存活状况:将对数生长期细胞按 1×10^4 细胞/孔接种于 96 孔板,每组细胞接种 6 个孔,继续培养。于 24h、48h、72h 三个时点加 CCK-8 液 5 μ l/孔,孵育 4h,450nm 下测定各孔吸光值,以常糖组为对照,计算抑制率。抑制率 = (1 - 实验组/对照组) \times 100%。绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞周期检测 胰酶消化,收集经 1.2.1 处理 48h 的细胞,PBS 洗涤细胞 1 次,70% 冰乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定 30min。离心去乙醇,洗涤、离心、染色。流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS-

Canto II 型)检测 DNA 含量。

1.2.4 细胞凋亡的检测 经 1.2.1 处理 46h 的细胞,弃血清,继续培养 2h。以不含 EDTA 的胰酶消化,收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加 5 μ l Annexin V-FITC 混匀,加 5 μ l Propidium Iodide 混匀,室温避光 15min。流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS Canto II 型)检测。

1.2.5 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平的检测 收集经 1.2.1 处理 48h 的细胞,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。引物: EGFR F: 5'-GCTTGATTCCAGTGGTTCT-3', R: 5'-GACAGAGTGGCTTATCCTAC-3'; mTOR F: 5'-GAATGGCTGAGACGGCTGAG-3', R: 5'-GCGATGTCTTGTGAGGTGAGG-3'; 内参 β -actin F: 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAAGG-3', R: 5'-AGTGGACACGAGGCCAGGAT-3'。ABI7500 型荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5min。PCR 结束后,PCR 仪自动分析给出每个标本的 Ct (cycle threshold) 值。参照文献^[6]采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对于管家基因的定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件,细胞生长抑制率、细胞周期和细胞凋亡采用单因素方差分析,组间比较采用 Dunnett T3 检验。qRT-PCR 结果采用非参数检验中的 Kruskal-Wallis 单因素 ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长状况的变化 与常糖组比较,高乳酸组在 48h 内细胞生长抑制率显著上升 ($P < 0.01$), 72h 细胞抑制率虽有所下降,但仍显著高于常糖组 ($P < 0.01$); 低糖组 72h 细胞抑制率持续上升 ($P < 0.01$)。提示低糖和高乳酸均不利于 HeLa 细胞的增殖。低糖高乳酸组的细胞抑制率呈先降低再升高的趋势,但均低于低糖组和高乳酸组,特别是在 48h,其细胞抑制率接近常糖组,提示低糖和高乳酸并存的微环境有利于 HeLa 细胞的存活和生长。见图 1。

2.2 细胞诱导凋亡的变化 与常糖组相比,高乳酸组的细胞凋亡率降低,但差异无统计学意义,低糖组的细胞凋亡率显著下降 ($P < 0.01$)。提示低糖和高乳酸环境均能抑制血清剥夺诱导的 HeLa 细胞凋亡。低糖高乳酸组的细胞凋亡率显著上升 ($P < 0.01$),均高于其余 3 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),提示低糖和高乳酸并存的微环境下的 HeLa 细胞更易诱发凋亡。见图 2。

2.3 细胞周期的变化 与常糖组比较,高乳酸组、低糖组和低糖高乳酸组 G₁/G₀ 期细胞比例均上升,差异均有统计学意义(P<0.01 P<0.05 P<0.01);高乳酸组和低糖高乳酸组的 G₂/M 期和 S 期细胞比例均下降,低糖组 G₂/M 期细胞略有上升,S 期细胞略有下降,但差异均无统计学意义,提示高乳酸和低糖高乳酸环境使 HeLa 细胞阻滞于 G₁/G₀ 期。见图 3。

2.4 EGFR 和 mTOR mRNA 表达的变化 与常糖组比较,低糖组的 EGFR mRNA 表达水平下调(P<0.05);低糖高乳酸组的 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平上调(P<0.05),且与低糖组比较,差异有统计学意义(P<0.01),提示微环境中低糖和高乳酸同时存在对 EGFR 和 mTOR 基因转录有正向调控作用。见图 4。

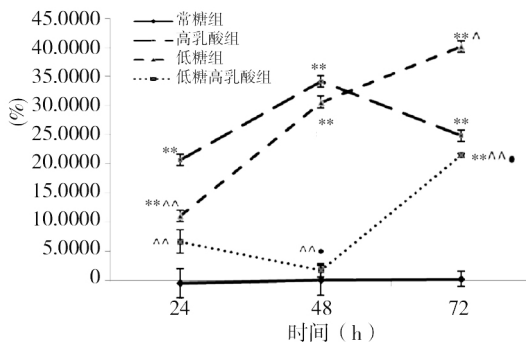


图 1 低糖和高乳酸对 HeLa 细胞抑制率的影响

* P<0.05, ** P<0.01 vs 常糖组; ^ P<0.05, ^ P<0.01 vs 高乳酸组; ● P<0.05, ●● P<0.01 vs 低糖组

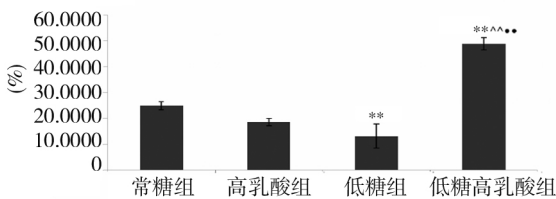


图 2 低糖和高乳酸对 HeLa 细胞诱导凋亡的影响

* P<0.05, ** P<0.01 vs 常糖组; ^ P<0.05, ^ P<0.01 vs 高乳酸组; ● P<0.05, ●● P<0.01 vs 低糖组

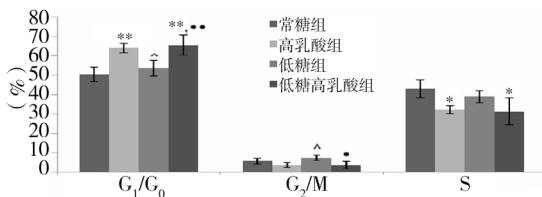


图 3 低糖和高乳酸对 HeLa 细胞细胞周期的影响

* P<0.05, ** P<0.01 vs 常糖组; ^ P<0.05, ^ P<0.01 vs 高乳酸组; ● P<0.05, ●● P<0.01 vs 低糖组

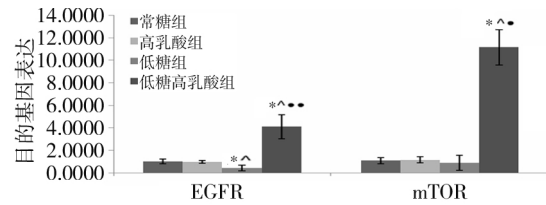


图 4 低糖和高乳酸对 HeLa 细胞 EGFR 和 mTOR mRNA 表达水平的影响

* P<0.05, ** P<0.01 vs 常糖组; ^ P<0.05, ^ P<0.01 vs 高乳酸组; ● P<0.05, ●● P<0.01 vs 低糖组

3 讨论

与正常细胞一样,肿瘤的生长依赖于微环境中的能量物质,葡萄糖是肿瘤的重要能量来源。实体瘤生长迅速,瘤体内部新生的血管系统内有大量的血管盲端、动静脉间短路及血管的局部膨出,因此实体肿瘤与血管之间的物质交换极其不完善^[7],瘤体内部的细胞处于低氧低葡萄糖高乳酸环境中。宫颈癌患者的阴道 pH 值降低,乳酸杆菌减少与人乳头瘤病毒感染和宫颈癌相关^[8-9],而正常阴道处于高乳酸环境。故推测高乳酸和低糖均不利于宫颈癌的存活,两者的叠加更加不利于宫颈癌细胞的存活。本实验结果显示,单一的高乳酸环境或低糖环境下,宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的抑制率显著升高,而高乳酸低糖环境下的细胞抑制率先降后升,但均好于单纯低糖环境和单纯高乳酸环境,提示存活于高乳酸低糖环境下的 HeLa 细胞能更好地抵抗不良环境而存活。

本研究结果显示,单一的高乳酸环境或低糖环境下,HeLa 细胞的凋亡率较常糖组低,而高乳酸低糖环境下的细胞诱导凋亡率升高,似乎与前面的实验结果相矛盾。PI 染色检测细胞周期不能区分 G₁ 期和 G₀ 期细胞,也不能区分 M 期和 G₂ 期细胞。细胞在 G₁ 期体积增大,G₂ 期需要进入有丝分裂提供物质条件,均要合成大量 RNA 和蛋白质,所需能量多,而 G₀ 期细胞处于阻抑状态,M 期虽形态变化最为显著的时期,但其呼吸作用反而降低,使得处于这两个阶段的细胞所需能量较少。结合细胞周期结果来看,与常糖组相比,高乳酸环境下的 HeLa 细胞处于 G₁/G₀ 期的细胞比例显著升高,S 期的细胞比例显著降低;低葡萄糖环境下,HeLa 细胞处于 G₁/G₀ 期和 G₂/M 期的细胞比例均轻微高于常糖组,而 S 期的细胞比例轻微低于常糖组;高乳酸低糖的环境下,G₁/G₀ 期细胞比例上升,而细胞存活比例提高(抑制率降低)。该现象产生的原因本课题组将进一步研究。

宫颈癌 EGFR 突变的报道不多,但临床标本中宫颈癌组织 EGFR 高表达^[10-12],提示可能存在某些 EGFR 上调机制。mTOR 基因和蛋白在宫颈癌组织中也呈高表达,且宫颈癌伴有淋巴结转移、高 FIGO 分期及放化疗无反应者的 mTOR 表达更高^[13-14]。EGFR 促进肿瘤生长,其核内化还可促进肿瘤分泌乳酸^[15]。EGFR 通过 PI3K/AKT 信号影响 mTOR 的活性,mTOR 活化不仅能影响细胞的存活和增殖,而且对于肿瘤代谢的调节具有十分重要的作用^[16-17]。mTOR 是细胞自噬启动阶段的关键调节因子,活化后可抑制自噬发生^[18-19],当自噬被抑制时,细胞转向凋亡。本实验结果显示,低糖高乳酸可显著促进 EGFR 和 mTOR 基因转录。这可能是高乳酸低糖环境下细胞诱导凋亡率升高的原因。低糖抑制 EGFR 和 mTOR 基因转录,高乳酸对 EGFR 和 mTOR 基因转录水平无明显影响,而两者的叠加可大幅度提高 EGFR 和 mTOR 基因转录水平。已知的可能与 EGFR 启动子结合的转录因子有: Sp1、TCF 和 YY1^[20-21],而这些因子与高乳酸和低葡萄糖环境之间的关系尚不清楚,推测低葡萄糖和高乳酸这两种环境信号在向细胞内部传递的过程中,在某些特定的信号通路中发生了串话(cross-talk)或某些特定的节点上发生了叠加。其具体环节和作用机制还有待于深入研究。

综上,Hela 细胞在低糖和高乳酸两种不良环境中的存活状况好于单纯低糖和单纯高乳酸环境,且伴随着 EGFR 和 mTOR 基因表达水平上升。这一现象产生的机制还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Walenta S ,Wetterling M ,Lehrke M ,et al. High lactate levels predict likelihood of metastases ,tumor recurrence , and restricted patient survival in human cervical cancers [J].Cancer Res 2000 ,60(4) : 916-921
- [2] 赵宇 ,刘志刚 ,王晖.乳酸异常代谢与肿瘤的研究进展 [J].中华肿瘤防治杂志 2015 2(3) : 239-242
- [3] Makinoshima H ,Takita M ,Saruwatari K ,et al. Signaling through the phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) /Mammalian target of rapamycin (mTOR) axis is responsible for aerobic glycolysis mediated by glucose transporter in epidermal growth factor receptor (EGFR) -mutated lung adenocarcinoma [J].J Biol Chem 2015 290(28) : 17495-17504
- [4] 周素英 ,张品南 ,潘丹 ,等.组织芯片宫颈癌中 EGFR 的表达及意义 [J].中华中医药学刊 2013 26(9) : 2010-2012
- [5] Tominaga H ,Ishiyama M ,Ohseto F ,et al. A water-soluble tetraaolium salt useful for colorimetric cell viability assay [J].Anal Commun ,1999 36(2) : 47-50
- [6] 聂丹 ,刘玲 ,夏纪毅 ,等.血管生成素样蛋白 4 (ANGPTL4) 敲低抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖并促进其凋亡 [J].细胞与分子免疫学杂志 2016 ,32(4) : 488-492
- [7] Livak KJ ,Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(⁻DeltaDelta C(T)) method [J]. Methods 2001 ,25(4) : 402-408
- [8] 刘晓霞 ,何茵芳.宫颈癌对阴道内环境及常见菌群的影响 [J].实用癌症杂志 2015 28(30) : 1135-1138
- [9] 朴金兰 ,张睿怡 ,耿力.阴道炎与 HPV 感染及宫颈上皮内瘤样变的关系及其机制 [J].国际生殖健康/计划生育杂志 2015 34(8) : 488-490
- [10] 郑凤霞 ,傅芬 ,蔡勇 ,等. EGFR、蛋白激酶 B 在宫颈癌中表达及 EGFR 胞外区基因突变的研究 [J].现代妇产科进展 2015 24(7) : 516-520
- [11] 周素英 ,张品南 ,潘丹 ,等.组织芯片宫颈癌中 EGFR 的表达及意义 [J].中华中医药学刊 2013 31(9) : 2010-2013
- [12] 薛琴琴 ,张菊 ,俞青苗 ,等.宫颈癌组织表皮生长因子受体对 TKI 敏感性相关的基因突变研究 [J].西安交通大学学报(医学版) 2012 3(5) : 583-587
- [13] 李慧 ,吴素慧 ,闫中华 ,等. mTOR 蛋白表达与宫颈癌风险相关性的 Meta 分析 [J].中国循证医学杂志 ,2015 ,15(8) : 907-913
- [14] 张卫 ,印永祥 ,张晔 ,等. EGFR、IGF-1R、mTOR 在子宫颈上皮内瘤变及宫颈癌中的表达及意义 [J].中国妇幼保健 2015 30(31) : 5466-5469
- [15] Dittmann K ,Mayer C ,Paasch A ,et al. Nuclear EGFR renders cells radio-resistant by binding mRNA species and triggering a metabolic switch to increase lactate production [J].Radiother Oncol 2015 ,116(3) : 431-437
- [16] Choi KJ ,Baik IH ,Ye SK ,et al. Molecular Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Present Status and Future Directions [J]. Biol Pharm Bull 2015 ,38(7) : 986-991
- [17] Hao W ,Zonghui D ,Danqing H ,et al. Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death [J].J Pathol 2007 227(2) : 189-199
- [18] Brech A ,Ahlquist T ,Lothe RA ,et al. Autophagy in tumour suppression and promotion [J]. Mol Oncol ,2009 3(4) : 366-375
- [19] Mizushima N. Autophagy: process and function [J]. Genes Dev 2007 21(22) : 2861-2873
- [20] Brandt B ,Meyer-Staeckling S ,Schmidt H ,et al. Mechanisms of EGFR gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response [J]. Clin Cancer Res 2006 12(24) : 7252-7260
- [21] Bheda A ,Creek KE ,Pirisi L ,et al. Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promote ractivity in normal human keratinocytes [J]. Oncogene 2008 27(31) : 4315-4323

(收稿日期 2016-12-01)

第一作者简介:李苹(1975-),女,福建医科大学附属泉州市第一医院妇产科主治医师。主要研究方向:子宫恶性肿瘤。