

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学
附 属 第 一 医 院
博 士 后 研 究 工 作 报 告

双氢青蒿素对肺癌细胞糖代谢的影响及其抗肿瘤机制研究

米彦军

工作完成日期 2015 年 11 月

报告提交日期 2015 年 11 月

厦门大学

2015 年 11 月

双氢青蒿素对肺癌细胞糖代谢的影响及其抗肿瘤机制研究

Research on the effect of DHA on glucose metabolism in human lung cancer cells and its anti-tumor mechanism

博 士 后 姓 名 米彦军

流动站（一级学科）名称 生物学

专 业（二级学科）名称 生物学

研究工作起始时间 2013 年 11 月

研究工作期满时间 2015 年 10 月

厦 门 大 学

2015 年 10 月

摘要

研究背景及目的:

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤之一，尽管近年来治疗取得了很大进展，治疗效果仍然较差。癌细胞具有偏向通过糖酵解方式来进行糖代谢获得能量的代谢特征使得肿瘤细胞能够比正常细胞具有更强的葡萄糖代谢能力，为肿瘤细胞的快速增殖与生长提供了能量来源，也使其具备更强的凋亡抵抗能力。天然产物凭借其来源广泛、类型多样、不良反应小，具有开发为化疗药物增效减毒辅助药物的潜力等特点备受关注。双氢青蒿素是青蒿叶中分离的有效抗疟成分，体内代谢活性产物为双氢青蒿素。药物学研究证实青蒿素类药物具有抗疟、抗血吸虫、调节免疫等功能。近年研究发现青蒿素类药物具有抑制乳腺癌、宫颈癌、肝癌及胰腺癌生长作用。然而双氢青蒿素抗癌作用的具体机制目前尚未完全阐明，是否与抑制糖酵解途径有关，亦未见报道。因此，本研究拟对双氢青蒿素对肺癌细胞糖代谢的影响及其抗肿瘤机制研究进行了探讨。

研究方法:

MTT 法测定药物的细胞毒作用；流式细胞法检测双氢青蒿素对肺癌细胞凋亡的影响；蛋白表达用 Western blotting 检测。细胞划痕和 Transwell 试验检测肺癌细胞转移侵袭能力。过表达 Rheb 和 GLUT1 观察对肺癌细胞生长、凋亡、侵袭转移的影响。

结果:

双氢青蒿素抑制肺癌细胞增殖和克隆形成，并诱导细胞凋亡。双氢青蒿素还可抑制肺癌细胞的葡萄糖摄取及糖代谢相关指标，包括 ATP 和乳酸含量。双氢青蒿素抑制 mTOR 通路的激活和 GLUT1 的表达。上调 Rheb 的表达后激活 mTOR 通路可减轻双氢青蒿素对糖酵解和细胞增殖的抑制作用。过表达 GLUT1 可减少双氢青蒿素诱导的凋亡。双氢青蒿素与 2-脱氧-D-葡萄糖 (2-Deoxy-D-Glucose, 2DG) 联合应用可协同诱导肺癌细胞凋亡。更重要的是

双氢青蒿素与 2DG 合用可激活 caspase-9、caspase-8 和 caspase-3 活性，促进细胞色素 C 和凋亡诱导因子释放到胞浆，诱导细胞凋亡。双氢青蒿素可抑制肺癌细胞的侵袭转移，抑制 NF- κ B 通路，减少 GLUT1 转位。

结论:

双氢青蒿素可以通过抑制 mTOR 通路抑制糖酵解途径影响肺癌细胞的生长，2DG 对双氢青蒿素诱导肺癌细胞凋亡起增敏作用，其作用通过内源性和外源性凋亡途径实现的。双氢青蒿素可通过抑制 GLUT1 转位影响肺癌细胞的侵袭转移。

关键词： 双氢青蒿素 凋亡 侵袭转移 mTOR 通路 葡萄糖转运体 1

Abstract

BACKGROUND AND OBJECTIVE:

Lung cancer is the most common malignant tumor and the leading cause of cancer-related mortality worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer. Resistance of NSCLC cells to apoptosis is a major obstacle in anticancer treatment. A unique characteristic of many tumor cells is increased glucose uptake and elevated aerobic glycolysis. Glycolysis with generation of lactate and reduced mitochondrial oxidative phosphorylation metabolism through the tricarboxylic acid (TCA) cycle is commonly found in cancer cells. This remarkable metabolic reprogramming, known as the Warburg effect, provides cancer cells an advantage to grow even in regions with hypoxia. Accordingly, current researches focus on the development of innovative compounds that promote the apoptosis of therapy-resistant NSCLC cells. Dihydroartemisinin (DHA) is an important derivative of Artemisinin, a natural product isolated from Chinese medicinal herb *Artemisia annua* L. (qinghao). As a very potent anti-malarial drug, DHA has been used as first-line therapeutics against malaria *falciparum* worldwide. Recently, studies have shown that DHA has profound effect against breast cancer, papillomavirus-expressing cervical cancer, liver cancer and pancreatic cancer. Additionally, DHA has been shown to exert anticancer effects by induction of apoptosis without obvious side effects in lung carcinomas. Moreover, ionizing radiation potentiates DHA-induced NSCLC cells apoptosis. Apart from its prominent pro-apoptotic effect, DHA affects cancer cell functions, including tumor cell proliferation, angiogenesis, and immune regulation. However, the exact molecular mechanisms of DHA anticancer effects remain to be fully investigated.

METHODS:

The MTT assay was used to access cytotoxicity. Western blotting was used to determine the protein expression. To upregulate the expression of GLUT1 and Rheb then to observe the change of cell viability. ATP content was determined over time

using the ATP Bioluminescent Somatic Cell Assay kit. Invasion, migration and wound healing assays were used to test cell-matrix adhesion, invasion and migration activities, and cellular motility. 2, 7-Dichlorofluorescein-diacetate (DCHF-DA) assay was for analyzing intracellular ROS.

RESULTS:

Here, we showed that DHA decreased cell viability and colony formation, induced apoptosis in A549 and PC-9 cells. Additionally, we first revealed DHA inhibited glucose uptake in NSCLC cells. Moreover, glycolytic metabolism was attenuated by DHA, including inhibition of ATP and lactate production. Consequently, we demonstrated that the phosphorylated forms of both S6 ribosomal protein and mechanistic target of rapamycin (mTOR), and GLUT1 levels were abrogated by DHA treatment in NSCLC cells. Furthermore, the upregulation of mTOR activation by high expressed Rheb increased the level of glycolytic metabolism and cell viability inhibited by DHA. These results suggested that DHA-suppressed glycolytic metabolism might be associated with mTOR activation and GLUT1 expression. Besides, we showed GLUT1 overexpression significantly attenuated DHA-triggered NSCLC cells apoptosis. Notably, DHA synergized with 2-Deoxy-D-glucose (2DG, a glycolysis inhibitor) to reduce cell viability and increase cell apoptosis in A549 and PC-9 cells. However, the combination of the two compounds displayed minimal toxicity to WI-38 cells, a normal lung fibroblast cell line. More importantly, 2DG synergistically potentiated DHA-induced activation of caspase-9, -8 and -3, as well as the levels of both cytochrome c and AIF of cytoplasm. However, 2DG failed to increase the reactive oxygen species (ROS) levels elicited by DHA. Overall, the data shown above indicated DHA plus 2DG induced apoptosis was involved in both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways in NSCLC cells.

CONCLUSIONS:

DHA plus 2DG induced apoptosis was involved in both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways in NSCLC cells. DHA was able to inhibit the invasion ability of A549 in vitro, and the suppressed invasion activity was related to down-regulating the phosphorylation level of mTOR.

Keywords: dihydroartemisinin; apoptosis; invision; mTOR passway; GLUT1

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 次

第一章 前言	1
第二章 双氢青蒿素对肺癌细胞糖酵解和凋亡的影响及其机制	10
2.1 引言	10
2.2 材料与方法	11
2.2.1 实验材料	11
2.2.2 实验方法	13
2.3 实验结果	18
2.4 讨论	32
第三章 双氢青蒿素对肺癌细胞体外侵袭能力的影响	35
3.1 引言	35
3.2 材料与方法	36
3.2.1 实验材料	36
3.2.2 实验方法	36
3.3 实验结果	37
3.4 讨论	47
3.5 结论	49
参考文献	50
致谢	58
博士生期间发表的学术论文、专著	59
博士后期间发表的学术论文、专著	60
个人简历	61

第一章 前 言

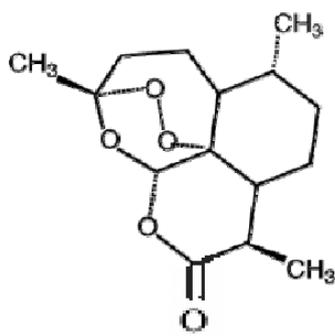
肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤，也是最常见肿瘤相关性死亡原因，占到所有癌症死亡病例的 15-20%，已经成为人类健康的最大杀手¹。与其他肿瘤一样，肺癌亦具有无限生长、浸润性强、抗凋亡等恶性细胞的特征。随着工业的发展，空气污染的增加，肺癌的发病率逐年增高，特别是经济发达地区的肺癌患者成倍地增加，死于癌症的病人中肺癌已居首位，我国每年有近 50 万人死于肺癌，因此预防和治疗肺癌已经成为临床和科研的重要问题。对于早期病人，手术治疗是理想的选择，但 5 年生存率也仅有 18%左右。由于肺癌早期缺乏典型症状，起病隐匿是多数患者就诊时已经为中晚期，失去手术时机，中位生存期为 8-12 个月，5 年生存率 9-13%，因此改善肺癌治疗状况迫在眉睫。

肺癌治疗包括手术、化疗、放疗及靶向治疗等，其中化疗在肺癌治疗中占有重要的地位。随着分子肿瘤学、分子药理学研究的逐步深入，药物开发技术的进步，抗肿瘤药物的研究已进入了一个崭新的阶段。中药是中华民族的瑰宝，几千年来在防病治病上立下了不可磨灭的功绩，至今仍被广泛使用。随着现代科学技术的发展，人们开始深入研究中药对疾病的作用及机制，以寻找新的化学药物。近年来，从中药中筛选抗肿瘤成分是当前抗肿瘤药物研究的重要方向之一。

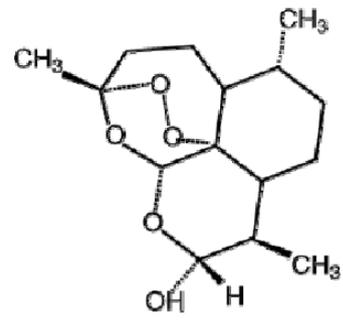
一、双氢青蒿素

青蒿素 (Artemisinin) 是从菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua L* 中提取分离的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物，主要用于治疗对喹啉耐药的顽固性疟疾。在此基础上又开发了包括双氢青蒿素和青蒿琥酯在内的衍生物。青蒿素及其衍生物的人工提纯是中国具有自主知识产权的项目，曾获得 2011 年拉斯克奖，2015 年诺贝尔生理学或医学奖。有趣的是，除了作为特效抗疟疾药物外，近年来越来越多的研究表明它们同时具有抗肿瘤的潜能²。

双氢青蒿素(dihydroartemisinin)是青蒿素的一个重要衍生物，为青蒿素生物合成中的可能前体，由青蒿素经四氢硼钠还原而成的。分子式为 $C_{15}H_{24}O_5$ ，分子量284.35，性状与青蒿素相似。双氢青蒿素是青蒿素类化合物体内主要活性代谢物之一，也是目前所知的该类化合物中疗效较好的抗肿瘤候选化合物²。



青蒿素



二氢青蒿素

双氢青蒿素抗肿瘤作用机制较为复杂。目前研究表明，其抗肿瘤作用机制主要包括抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞周期阻滞和引发肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤新生血管生成以及抑制肿瘤细胞侵袭和转移等多个方面。

1. 抑制肿瘤细胞增殖

双氢青蒿素在体外对胰腺癌、肝癌、白血病、乳腺癌、胃癌、结肠癌、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、骨肉瘤、横纹肌肉瘤和神经母细胞瘤等细胞增殖均具有一定的抑制作用(表1)。双氢青蒿素对不同肿瘤细胞具有不同程度的杀伤作用，对白

组织来源	细胞	IC ₅₀ umol. L ⁻¹	方法	文献	组织来源	细胞	IC ₅₀ umol. L ⁻¹	方法	文献
白血病	U937	0.92	MTT	3	肺癌	NCI-H23	5.54	SRB	4
	K562	3.76	MTT	3		SPC-A-1	29.9	MTT	5
	Jurkat	0.65	MTT	6	卵巢癌	OVCA-420	5.64	MTT	7
	HL-60	1.74	MTT	6		OVCA-439	3.83	MTT	7
结肠癌	HT29	0.82	SRB	3	乳腺癌	MCF-7	5.27	SRB	3
	HCT116	1.34	SRB	3		MDA-MB-231	>20	SRB	3
肝癌	SMMC7721	5.97	SRB	3		MDA-MB-435	0.49	SRB	3
	BEL-7402	4.65	SRB	3	前列腺癌	DU145	>20	SRB	3
	HepG2	13.35	MTT	8		宫颈癌	HeLa	2.51	SRB
	Hep3B	10.3	MTT	8	黑色素瘤	A375	1.04	SRB	3
胃癌	MKN-28	1.81	SRB	3	口腔鳞癌	KB	1.87	SRB	3
	MKN-45	13.61	SRB	3	骨肉瘤	U2OS	7.89	SRB	3
	SCG-7901	1.08	SRB	3	横纹肌肉瘤	RH30	4.95	SRB	3
胰腺癌	BxPC-3	33.6	MTT	9	神经母细胞瘤	UKF-NB-3	4.50	MTT	10
	AsPC-1	49.9	MTT	9	细胞瘤	IMR-32rDOX20	3.69	MTT	10

血病、胰腺癌、骨肉瘤及肺癌细胞的抗癌作用甚佳。其抑制肿瘤细胞增殖的IC₅₀

大小可相差几个数量级，这可能与肿瘤细胞内基因表达谱不同有关，Lu等发现，c-MYC的表达水平与结肠癌、白血病细胞对双氢青蒿素的敏感性呈正相关¹¹。双氢青蒿素对正常细胞，包括外周血单核细胞和卵巢上皮细胞的杀伤作用远低于肿瘤细胞，预示其应用的安全性^{6,7}。由于多药耐药的产生在肿瘤化疗中是难以克服的问题，双氢青蒿素对多种耐药细胞株具有明显作用¹⁰。如在神经母细胞瘤耐药细胞株具有与敏感细胞株类似的杀伤作用。此外，双氢青蒿素还能增强淋巴瘤、胶质瘤对放疗的敏感性^{12,13}。

2. 抑制肿瘤新生血管生成

血管生成参与了许多生理病理反应，如胚胎发生、女性生殖周期伤口愈合等以及肿瘤、风湿性关节炎、糖尿病等炎症反应。肿瘤的侵袭与转移都依赖于新生血管的生成。因此，抑制血管生成是抗肿瘤药物研究的热点之一。许多实验证明，双氢青蒿素具有抗肿瘤新生血管生成的作用。双氢青蒿素能浓度依赖性和时间依赖性地抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增殖及血管内皮生长因子诱导的细胞增殖，同时双氢青蒿素还可抑制HUVEC的迁移和管腔形成^{14,15}。Chen等发现，双氢青蒿素能有效抑制HUVEC上血管内皮生长因子受体Flt-1和KDR/Flk-1的表达¹⁵。双氢青蒿素能浓度依赖性地下调白血病细胞K562血管内皮生长因子的表达和分泌，当其作用于K562细胞后收集培养液用于鸡胚尿囊膜实验，与正常培养液组比，双氢青蒿素处理得到的培养液能显著抑制新生血管的生成¹⁶。

3. 延迟细胞周期，诱导细胞凋亡

诱导细胞周期阻滞是化合物抑制肿瘤细胞增殖的重要机制之一。研究表明，双氢青蒿素可引发肿瘤细胞G1或G2/M期阻滞，但以前者居多。双氢青蒿素处理胰腺癌细胞72小时后能浓度依赖性地诱导G1期阻滞，S期的细胞数量明显减少，但对G2/M期无明显影响。同时双氢青蒿素处理后均能促使胰腺癌细胞中细胞CyclinE、CDK2、CDK4和CDK6表达下降以及周期阻滞蛋白P27^{kip}升高，这一现象可能与其抑制NF- κ B的激活有关¹⁷。Wang等也发现，双氢青蒿素处理胰腺癌细胞72小时后可诱导G1期阻滞。其主要机制可能是NF- κ B失活导致的下游蛋白如细胞CyclinD1和c-MYC的减少有关¹⁸。双氢青蒿素还能诱导结肠癌和肝癌等不同组织来源的肿瘤细胞G1期阻滞，影响相关蛋白表达^{8,19}。细胞内重要转录因子

P53似乎没有参与双氢青蒿素诱导的周期阻滞，如p53野生型的HepG2细胞和p53缺失的Hep3B细胞经双氢青蒿素处理后均能产生G1期阻滞，CyclinD，CyclinE和CDK4的表达均被抑制，而周期阻滞蛋白P21的表达均升高⁸。双氢青蒿素可通过诱导卵巢癌OVCA-420细胞G2/M期阻滞抑制其增殖⁷。双氢青蒿素诱导肿瘤细胞周期阻滞在其发挥抗肿瘤过程中发挥重要作用。

细胞凋亡是正常生理及包括肿瘤在内的各种疾病中的一个重要现象，已成为多年来生物学、医学研究的一个热点。1972年Kerr等首次提出了细胞凋亡的概念，认为它是细胞的一种基本生物学现象，在多细胞生物的正常发育及去除异常细胞中起着重要的功能；对生物体的进化、内环境的稳定以及多系统的发育有着重要的意义。正常细胞凋亡的机制失调或破坏将会造成细胞的转变，可以看作是肿瘤发生发展的一个重要原因。细胞凋亡的特征包括细胞皱缩，染色质凝聚、断裂等。目前公认的两条经典的凋亡途径包括以Caspase-8激活为代表的死亡受体途径(外源性途径)和以Caspase-9激活为代表的线粒体途径(内源性)²⁰⁻²²。当死亡受体Fas或TNFR与相应的配体CD95L或TNF结合后，诱导受体三聚体化，吸引了胞浆中的Fas相关死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)，然后在细胞膜上形成死亡受体复合物(death-inducing signaling complex, DISC)²³。FADD能将procaspase-8募集到死亡受体上，聚集后的procaspase-8发生自我剪切产生成熟的Caspase-8，激活的Caspase-8又可激活下游的效应Caspase-3，-6和-7并最终导致细胞凋亡。

线粒体是细胞生命活动的控制中心，也是细胞凋亡的调控中心。当细胞在应激状态或受到化疗药物作用时，细胞色素C(cytochrome c, Cyto-c)从线粒体释放到胞浆是细胞凋亡的关键步骤。释放出的Cyto-c和ATP作为复合因子与胞浆中凋亡相关因子(apoptotic protease activation factor, Apaf-1)结合，通过ATP分解提供能量诱导Apaf-1自身多聚化并暴露Apaf-1的N端Caspase募集域，使procaspase-9募集到多聚物上，形成Cyto-c、Apaf-1及Procaspase-9的复合物，促使procaspase-9被激活，激活的Caspase-9进一步激活Caspase-3、-7、多聚ADP核糖聚合酶等，从而诱导细胞凋亡^{24,25}。此外，线粒体还释放凋亡诱导因子如AIF参与激活Caspases。细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)通常与线粒体凋亡途径有关，肿瘤坏死因子、抗癌药物及化学保护剂等能刺激细胞内ROS过度产生，导致细胞内钙平衡失调、能量生成障碍等一系列病理学变化，释放出包括Cyto-c在内的一系列促凋亡

因子，从而介导凋亡通路下游的分子事件^{26,27}。

肿瘤的发生与发展是一个多因素作用、多基因参与、经过多个阶段才能最终形成的复杂生物学现象。在肿瘤发生发展的过程中，细胞凋亡的减少无疑是肿瘤发生的关键，因此，调控细胞凋亡途径相关蛋白的表达，诱导肿瘤细胞凋亡，为肿瘤的治疗提供了靶点，也为抗癌药物的研究提供了新的窗口。

研究表明，双氢青蒿素可显著诱导不同来源的肿瘤细胞凋亡。白血病HL-60细胞经双氢青蒿素处理后出现明显细胞凋亡，其机制可能是通过激活caspase 3, caspase 7, caspase 8, caspase 9和DNA修复酶聚ADP核糖聚合酶，促发细胞凋亡诱导因子释放入细胞质等。双氢青蒿素可激活死亡受体或线粒体介导的细胞凋亡通路诱导结肠癌、卵巢癌、肝癌、肺癌、前列腺癌等肿瘤细胞凋亡²⁸⁻³³。Handrick等¹²最新研究表明，双氢青蒿素可诱导淋巴瘤细胞促凋亡蛋白NOXA表达并激活Bak。而干扰NOXA或Bak的表达均能有效抑制双氢青蒿素诱导的细胞凋亡，特别是在Bak和Bax双缺失的细胞中，双氢青蒿素几乎不引发细胞凋亡，提示Bcl-2家族在双氢青蒿素诱导凋亡中起重要作用。丝裂原激活蛋白激酶通路在调节细胞周期、凋亡和分化等方面具有重要作用，ERK、P38MAPK和JNK通路得到广泛研究。双氢青蒿素能激活白血病HL-60细胞和肺癌PC-14细胞的P38MAPK蛋白诱导细胞凋亡，其作用可被P38MAPK的抑制剂SB203580或SB202190所逆转³⁴，提示P38MAPK参与了双氢青蒿素诱导的凋亡。Lu等³⁵发现，JNK抑制剂SP600125能够增敏双氢青蒿素对肺癌细胞的抑制，其作用是通过增强促凋亡蛋白Bax的线粒体移位而引发的细胞凋亡。双氢青蒿素促发的细胞凋亡可能也不依赖于P53³⁶。Hou等⁸发现，双氢青蒿素无论在p53野生的HepG2细胞还是p53缺失的Hep3B细胞中均能有效升高Bax，降低Bcl-2，激活胱天蛋白酶3并诱导细胞凋亡。最新研究表明，双氢青蒿素可显著诱导高表达c-MYC的肿瘤细胞凋亡。此外，双氢青蒿素还可增加细胞内GADD153蛋白表达，并使其核定位增多，从而导致细胞凋亡¹⁹。

4、抑制肿瘤细胞侵袭和转移

侵袭和转移是恶性肿瘤的基本特征之一，也是造成肿瘤治疗失败和患者死亡的重要原因。因此，有效控制侵袭和转移是治疗肿瘤的有效途径之一。肿瘤细胞间去黏附、基底膜降解、血管或淋巴转移等是肿瘤转移的基本过程。在体外，双氢青蒿素具有较强的抑制肿瘤转移的作用。划痕实验结果表明，无显著细胞毒性

浓度的双氢青蒿素可显著抑制纤维瘤HT-1080细胞划痕的愈合³⁷；Transwell迁移实验结果表明，双氢青蒿素可显著抑制佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯 (phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)诱导的HT-1080细胞迁移。基质金属蛋白酶家族蛋白在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用，进一步研究了双氢青蒿素对MMP2和MMP9的影响，结果发现双氢青蒿素通过抑制PKC α /Raf/MAPK途径及转录因子NF- κ B和AP-1的激活减少PMA所诱导的MMP2和MMP9表达和活性。Wang等³⁸研究表明，双氢青蒿素也能诱导小鼠淋巴内皮细胞凋亡及管腔形成，这也可能是其抑制肿瘤细胞淋巴转移的原因之一。

二、糖酵解与肿瘤发生发展

代谢是机体生命活动的基本特征。细胞生长、分裂、运动等多项生命活动都需要消耗大量能量，其绝大部分由三磷酸腺苷（ATP）供应，而细胞糖代谢是最主要的ATP生成途径。正常生理状态下，胞外葡萄糖可经葡萄糖转运体（GLUT）进入胞浆，通过己糖激酶（HK）等糖酵解酶进行分解代谢，生成丙酮酸。丙酮酸再进入线粒体转化为乙酰辅酶A，通过三羧酸循环（TCA）后彻底氧化生成38分子的ATP实现高效供能；而在缺氧条件下，细胞则主要仅通过胞质中效率较低糖酵解为其供能。

恶性肿瘤不仅是一种基因病，也被认为是一种代谢性疾病。为了适应快速生长、分裂等特点，肿瘤细胞常通过抑制线粒体氧化磷酸化功能，促进内源性蛋白、脂肪酸、磷脂以及核酸等大分子的物质合成，满足大量细胞结构的组装。早在90多年前，德国生物化学家Warburg就观察到肿瘤细胞比正常细胞需要较少的氧和较多的葡萄糖，且即使在氧供充足条件下，恶性肿瘤细胞的糖酵解依然明显活跃³⁹⁻⁴¹。

Warburg这项重大发现不但使其获得了诺贝尔生理学与医学奖，并由此开拓了肿瘤细胞糖代谢重编程的新研究领域。而该领域的最新研究成果也被成功地应用于临床：PET技术利用Warburg效应开展恶性肿瘤诊断,已在临床上得到成功应用和广泛推广⁴²。目前,已有多种正电子核素显像剂，临床常采用18氟标记的脱氧葡萄糖(18F-FDG)。18F-FDG是葡萄糖的类似物，能被葡萄糖转运蛋白转运进入细胞内，并被己糖激酶（HK）催化为6-磷酸氟化葡萄糖，但6-磷酸氟化葡萄糖不能进入三羧酸循环参与分解代谢或用于合成糖原，而是滞留于细胞内使沉积组

织细胞显影。正是由于肿瘤细胞膜上葡萄糖转运蛋白数量增多和细胞内HK活性增加,其摄取并浓集¹⁸F-FDG能力明显增强⁴³。因此,基于良、恶性病变之间的这种葡萄糖代谢水平差异,¹⁸F-FDG可被用于区别显示良、恶性病变。PET对肿瘤分期、分型、复发、转移的诊断,肿瘤生物学特征的预测以及对治疗反应的监测等方面的作用得到了较为广泛的认可。

尽管糖酵解途径较线粒体氧化磷酸化产能效率低,但恶性肿瘤细胞可从活跃的糖酵解代谢中受益⁴⁴。首先,肿瘤细胞受内外因素影响,线粒体氧化磷酸化过程受到不同程度的抑制,糖酵解代谢可补充能量ATP。其次,肿瘤细胞还可通过糖酵解获取中间代谢产物,用于直接合成脂肪和蛋白质。再者,糖酵解产生大量乳酸,导致微环境酸化。酸化的细胞外液对细胞基质有分解破坏作用,有利于肿瘤细胞的浸润与转移。近期研究还显示⁴⁵,糖酵解还具有拮抗细胞凋亡的功效,可导致恶性肿瘤对化、放疗等促凋亡作用耐受。

尽管肿瘤细胞Warburg效应机制尚未完全阐明,Warburg效应与恶性肿瘤细胞发生和发展的关系存在不同认识,但是,正如肿瘤血管生成一样,Warburg效应为恶性肿瘤细胞生存提供了重要的生物能量基础。因此,抑制恶性肿瘤细胞特异的糖酵解代谢可能与阻断肿瘤血管一样,在恶性肿瘤治疗中占有一席之地。

GLUT1是一种组织细胞进行跨膜转运葡萄糖的重要载体,是第一个被描述的调节葡萄糖转运的因子⁴⁶。它对葡萄糖分子有很高的亲合力,在相对低浓度葡萄糖的状态下也能转运葡萄糖分子。人的GLUT1是由492个氨基酸组成的,其结构模型含有12个跨膜区段。机体中葡萄糖转运是在GLUT1的调控下通过细胞膜表面的疏水层,从而达到降低细胞内外葡萄糖浓度梯度的目的。

肿瘤加强葡萄糖摄取导致细胞GLUT1的过度表达,也已在肿瘤组织中被广泛地观察到。在人类正常和良性肿瘤组织中,免疫组织化学法检测到GLUT1低表达,而在恶性肿瘤组织中则普遍高表达,阳性表达率均达到或超过50%。因此,普遍认为GLUT1是细胞恶性病变的早期标志。Younes等研究了118例乳腺癌患者GLUT1表达,其中42%有GLUT1高表达,这些高表达组织都伴随着增殖能力的增强⁴⁷。最新的研究证实,GLUT1高表达与肺癌和卵巢癌分化程度及转移存在着一定的关系⁴⁸。通过对67例骨、软组织恶性肿瘤患者的随访研究发现,GLUT1在肿瘤中高表达,其程度与肿瘤的转移、患者生存期密切相关⁴⁹。Stewart等将分别从

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.