

灵芝酸 A 对非小细胞肺癌 PC9 细胞糖酵解及其关键限速酶的影响

任爱华¹, 董彦伯¹, 苗润芝², 吕俞娇¹, 刘岩峰¹

(1. 北华大学基础医学院解剖教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学临床医学院外科教研室, 吉林 吉林 132013)

[摘要] **目的:** 探讨不同剂量灵芝酸 A (GAA) 对非小细胞肺癌 (NSCLC) PC9 细胞的生物活性、糖酵解及其限速酶表达的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 体外培养 NSCLC PC9 细胞, 将 PC9 细胞分为空白对照组、低剂量 ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) GAA 组、中剂量 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) GAA 组和高剂量 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) GAA 组。采用噻唑蓝 (MTT) 法检测各组 PC9 细胞存活率, Transwell 小室实验检测各组 PC9 细胞迁移细胞数, 葡萄糖检测试剂盒检测各组 PC9 细胞葡萄糖摄取量, 三磷酸腺苷 (ATP) 检测试剂盒检测各组 PC9 细胞中 ATP 水平, 乳酸检测试剂盒检测各组 PC9 细胞中乳酸水平, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测各组 PC9 细胞中己糖激酶 2 (HK2) 和 M2 型丙酮酸激酶 (PKM2) mRNA 表达水平, Western blotting 法检测各组 PC9 细胞中 HK2 和 PKM2 蛋白表达水平。**结果:** MTT 法, 培养 24、48 和 72 h 时, 与空白对照组比较, 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 培养 72 h 时, 与低剂量 GAA 组比较, 高剂量 GAA 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。Transwell 小室实验, 与空白对照组比较, 中和高剂量 GAA 组细胞迁移数明显减少 ($P < 0.05$); 与低剂量 GAA 组比较, 高剂量 GAA 组细胞迁移数明显减少 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞中葡萄糖摄取量和乳酸水平均明显降低 ($P < 0.05$), 高剂量 GAA 组 PC9 细胞中 ATP 水平明显降低 ($P < 0.05$)。RT-qPCR 法, 与空白对照组比较, 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞中 HK2 和 PKM2 mRNA 表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 法, 与空白对照组比较, 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞中 HK2 和 PKM2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 中和高剂量 GAA 可抑制 PC9 细胞增殖及迁移的生物活性, 降低糖酵解作用, 其作用机制可能与抑制关键限速酶 HK2 和 PKM2 的表达有关。

[关键词] 灵芝酸 A; 癌, 非小细胞肺; 己糖激酶 2; M2 型丙酮酸激酶; 糖酵解

[中图分类号] R734.2 **[文献标志码]** A

Effect of ganoderic acid A on glycolysis and its key rate-limiting enzymes of non-small cell lung cancer PC9 cells

REN Aihua¹, DONG Yanbo¹, MIAO Runzhi², LYU Yujiao¹, LIU Yanfeng¹

(1. Department of Anatomy, School of Basic Medicinal Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Department of Surgery, School of Clinical Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effects of different doses of ganoderic acid A (GAA) on the

[收稿日期] 2023-06-30

[基金项目] 吉林省教育厅科学技术研究项目 (JJKH20220069KJ, JJKH20180355KJ); 北华大学省级大学生创新创业训练计划项目 (202310201135)

[作者简介] 任爱华 (1976—), 男, 吉林省吉林市人, 讲师, 医学硕士, 主要从事肿瘤解剖病理学方面的研究。

[通信作者] 刘岩峰, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: lyfmmm_2003@126.com)

biological activities, glycolysis, and the expression of rate-limiting enzymes of non-small cell lung cancer (NSCLC) PC9 cells, and to clarify the mechanism. **Methods:** The NSCLC PC9 cells were cultured *in vitro* and divided into blank control group, low dose ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of GAA group, medium dose ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of GAA group, and high dose ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of GAA group. The methylthiazolyldiphenyltetrazolium (MTT) assay was used to detect the survival rates of the PC9 cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the number of migration cells of the PC9 cells in various groups; the glucose uptakes of the PC9 cells in various groups were detected by glucose assay kit; the levels of ATP in the PC9 cells in various groups were detected by ATP assay kit; the levels of lactic acid in the PC9 cells in various groups were detected by lactate assay kit; the expression levels of hexokinase 2 (HK2) and pyruvate kinase M2 (PKM2) mRNA in the PC9 cells in various groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method; the expression levels of HK2 and PKM2 proteins in the PC9 cells in various groups were detected by Western blotting method. **Results:** The MTT assay results showed that, at 24, 48, and 72 h of culture, compared with blank control group, the survival rates of the cells in medium and high doses of GAA groups were significantly decreased ($P < 0.05$). At 72 h of culture, compared with low dose of GAA group, the survival rate of the cells in high dose of GAA group was significantly decreased ($P < 0.05$). The Transwell chamber assay results showed that compared with blank control group, the numbers of migration cells in medium and high doses of GAA groups were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with low doses of GAA group, the number of migration cells in high dose of GAA group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with blank control group, the glucose uptakes and levels of lactic acid in the cells in medium and high dose of GAA groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and the level of ATP in the cells in high dose of GAA group was significantly decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with blank control group, the expression levels of HK2 and PKM2 mRNA in the cells in medium and high doses of GAA groups were significantly decreased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with blank control group, the expression levels of HK2 and PKM2 proteins in the cells in medium and high doses of GAA groups were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Medium and high doses of GAA can inhibit the biological activities of proliferation and migration of the PC9 cells, reduce the glycolysis, and its mechanism may be related to the inhibition of the expressions of the key rate-limiting enzymes HK2 and PKM2.

KEYWORDS Ganoderic acid A; Cancer, non-small cell lung; Hexokinase 2; Pyruvate kinase M2; Glycolysis

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 约占全部肺癌患者的 85%^[1-2]。研究^[3]显示: 恶性肿瘤细胞通过糖酵解途径较氧化磷酸化途径产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的速度更快, 可为肿瘤细胞快速增殖提供能量。恶性肿瘤细胞为了具有较强的侵袭、增殖、迁移和躲避免疫细胞识别的能力, 即使在有氧条件下也会选择糖酵解获能, 被称为有氧糖酵解 (Warburg 效应)^[4]。糖酵解过程中可产生乳酸, 乳酸使肿瘤局部维持酸性微环境, 便于肿瘤细胞的侵袭和增殖^[5]。郝萌萌等^[6]发现: 灵芝酸 A (ganoderic acid A, GAA) 是由灵芝中分离出来的三萜类活性成分, 有解毒、镇静、止痛、保肝和抗肿瘤等作用。

国内外研究^[7-9]显示: GAA 具有抑制肿瘤细胞增殖、减弱细胞侵袭能力及诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 因此针对 GAA 抗肿瘤方面的研究日趋增多。己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) 和 M2 型丙酮酸激酶 (pyruvate kinase M2, PKM2) 是有氧糖酵解调控过程中的关键限速酶。因此, 可以通过降低糖酵解限速酶活性, 抑制肿瘤细胞糖酵解, 进而减少肿瘤细胞的能量代谢, 以达到抗癌的目的。目前关于 GAA 对 NSCLC 糖酵解的影响及其作用机制的报道较少。本研究探讨不同剂量 GAA 对 NSCLC 细胞增殖和侵袭及糖酵解方面的影响, 并阐明其作用机制, 为 GAA 对 NSCLC 的临床治疗提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、主要试剂和仪器 NSCLC PC9 细胞(北华大学基础医学院解剖教研室冻存)。GAA(纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司)。胰酶和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国BI公司), Transwell小室试剂盒(美国Corning公司), 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyltetrazolium, MTT)(美国Sigma公司), 葡萄糖检测试剂盒(上海荣盛生物药业有限公司), ATP检测试剂盒和乳酸检测试剂盒(上海碧云天公司), 逆转录PCR试剂盒(北京艾德实验室生物技术有限公司)、PKM2、HK2和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceralde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国Santa Cruz Biotechnology公司)。PCR仪(型号: Veriti96, 美国ABI公司), 蛋白质电泳仪和凝胶成像分析系统(美国Syngene公司), 酶标仪(型号: 1681130A, 美国Bio-Rad公司)。

1.2 细胞培养及分组 PC9细胞分别培养于含10% FBS和1%青-链霉素的DMEM及RIPM 1640培养基中, 置于37℃、5% CO₂的恒温细胞培养箱中培养, 取状态良好的对数生长期细胞进行实验。将PC9细胞分为空白对照组、低剂量GAA(25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA)组、中剂量GAA(50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA)组和高剂量GAA(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA)组, 空白对照组细胞按照常规方法培养, 未添加GAA。

1.3 MTT法检测各组PC9细胞存活率 取对数生长期的PC9细胞, 以 $5\times 10^4\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于96孔细胞培养板, 于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h。分别加入0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA, 于24、48和72 h时取出96孔细胞培养板, 弃上清, 每孔加入20 μL 、0.5% MTT溶液的完全培养液, 继续培养4 h后再次弃上清, 每孔加入150 μL 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 设定波长为490 nm, 酶标仪测定各孔吸光度(A)值, 计算各组细胞存活率。细胞存活率=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

1.4 Transwell小室实验检测各组PC9细胞迁移细胞数 取对数生长期PC9细胞, 细胞密度为 $5\times 10^4\text{mL}^{-1}$, 各组细胞中分别加入0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA, 在各组细胞中取200 μL 接种于Transwell小室上层, 下室均加入FBS培养基, 培养48 h后, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤, 4%多聚甲醛固定

30 min, 再用0.1%结晶紫染色15 min, 显微镜下计数发生迁移的细胞数并拍照。各组每孔随机选取5个视野计数细胞并取其平均值, 每组重复3次。

1.5 葡萄糖含量检测试剂盒检测各组PC9细胞中葡萄糖摄取量 取对数生长期PC9细胞, 细胞密度为 $5\times 10^4\text{mL}^{-1}$, 细胞接种于24孔细胞培养板中, 分别加入0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA, 给药48 h后, PBS缓冲液洗涤2次, 采用不含葡萄糖的培养基孵育细胞2 h, 加入2-NBDG溶液50 μL , 37℃孵育30 min, PBS缓冲液洗涤2次, 参照葡萄糖含量检测试剂盒说明书步骤操作, 采用酶标仪于波长570 nm处检测各孔A值, 实验重复3次。葡萄糖摄取量=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

1.6 ATP检测试剂盒检测各组PC9细胞中ATP水平 取对数生长期PC9细胞, 细胞密度为 $5\times 10^4\text{mL}^{-1}$, 接种于24孔细胞培养板中, 分别加入0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA, 给药48 h后, 每孔加入100 μL 细胞裂解液冰上裂解15 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 取上清液。每个样品中加入100 μL 以1:6稀释的ATP检测试剂, 暗室中静置5 min, 使试剂与ATP充分反应, 立即向每孔添加10 μL 标准品, 采用酶标仪于波长570 nm处检测各孔A值, 实验重复3次。ATP水平=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

1.7 乳酸检测试剂盒检测各组PC9细胞中乳酸水平 取对数生长期PC9细胞, 细胞密度为 $5\times 10^4\text{mL}^{-1}$, 细胞接种于24孔细胞培养板中, 分别加入0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GAA, 给药48 h时, 加入细胞裂解液, 在1.5 mL EP管中, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min, 取上清液, 参照乳酸检测试剂盒说明书操作。于波长570 nm处检测各孔A值, 实验重复3次。乳酸水平=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值) $\times 100\%$ 。

1.8 实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法检测各组PC9细胞中HK2和PKM2 mRNA表达水平 收集各组给药后48 h的PC9细胞, 采用TRIzol试剂提取细胞总RNA, 逆转录合成cDNA。Primer 5.0软件设计引物, 引物序列: HK2上游引物, 5'-AGAACATCCTGTGGCTGGAC-3', 下游引物, 5'-ACCTTTCTGCTTCACCTGGA-3', 扩增产物为466 bp;

PKM2上游引物, 5'-ACAACGTCTFCTGTCCAC-3', 下游引物, 5'-TAACTGGATGTGACACAG-AG-3', 扩增产物为 325 bp; GAPDH上游引物, 5'-CGTGGGGGTCTTAATGACCA-3', 下游引物, 5'-TCCAGAAGGACTCCTCCTTG-3', 扩增产物为 509 bp。PCR 反应条件: 60 °C、2 min, 94 °C、2 min 预变性; 变性 94 °C、2 min; 退火 60 °C、1 min; 循环 40 次, 延伸 72 °C、10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达水平, 每组重复 3 次。

1.9 Western blotting 法检测各组 PC9 细胞中 HK2 和 PKM2 蛋白表达水平 取对数生长期 PC9 细胞, 细胞密度为 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 接种于 24 孔细胞培养板中培养, 细胞贴壁后, 分别加入 0、25、50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ GAA 处理 48 h。收集各组细胞, 采用细胞蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度。取 25 μg 总蛋白, 经 10% SDS-PAGE 胶电泳, 转至 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉室温封闭。加入一抗, HK2 和 PKM2 以 1:200 稀释, GAPDH 以 1:1 000 稀释, 4 °C 孵育过夜。TBST 溶液清洗, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000), 室温孵育 1 h, TBST 溶液清洗。采用 ECL 显色曝光成像, 成像分析系统摄取图像, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值, 每组实验重复 3 次。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞存活率、乳酸水平、葡萄糖摄取量、ATP 水平、HK2 和 PKM2 mRNA 及蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 PC9 细胞存活率 培养 24、48 和 72 h 时, 与空白对照组比较, 低剂量 GAA 组 PC9 细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。培养 24 和 48 h 时, 与低剂量 GAA 组比较, 中和高剂量 GAA 组 PC9 细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 培养 72 h 时, 与低剂量 GAA 组比较, 高剂量 GAA 组 PC9 细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

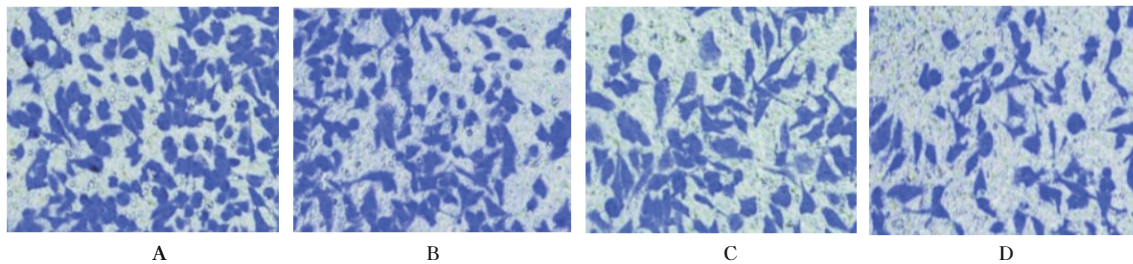
表 1 MTT 法检测各组不同作用时间 PC9 细胞存活率
Tab. 1 Survival rates of PC9 cells in various groups detected by MTT method after treated for different time

($n=8, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Survival rate of PC9 cells		
	(t/h) 24	48	72
Blank control	100.00 ± 1.58	100.00 ± 3.14	100.00 ± 2.69
GAA			
Low dose	95.28 ± 3.65	93.77 ± 2.88	92.52 ± 3.24
Medium dose	90.34 ± 2.92*	86.24 ± 3.58*	83.18 ± 4.11*
High dose	87.76 ± 3.21*	84.39 ± 4.01*	79.99 ± 3.82 [△]

* $P < 0.05$ compared with blank control group; [△] $P < 0.05$ compared with low dose of GAA group.

2.2 各组 PC9 细胞迁移细胞数 与空白对照组 (108.69 个 ± 4.66 个) 比较, 低剂量 GAA 组 PC9 细胞迁移细胞数 (97.29 个 ± 5.20 个) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 中剂量 GAA 组 (84.34 个 ± 4.98 个) 和高剂量 GAA 组 (77.76 个 ± 4.35 个) PC9 细胞迁移细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。与低剂量 GAA 组比较, 高剂量 GAA 组 PC9 细胞迁移细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。见图 1。



A: Blank control group; B: Low dose of GAA group; C: Medium dose of GAA group; D: High dose of GAA group.

图 1 Transwell 小室实验检测各组 PC9 细胞迁移情况 (×200)

Fig. 1 Migration of PC9 cells in various groups detected by Transwell chamber assay (×200)

2.3 各组PC9细胞中葡萄糖摄取量、ATP水平及乳酸水平 与空白对照组比较,低剂量GAA组PC9细胞中葡萄糖摄取量、ATP水平和乳酸水平差异均无统计学意义 ($P>0.05$),中和高剂量GAA组PC9细胞中葡萄糖摄取量及乳酸水平均明显降低 ($P<0.05$);中剂量GAA组PC9细胞中ATP水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),高剂量GAA组PC9细胞中ATP水平明显降低 ($P<0.05$)。见表2。

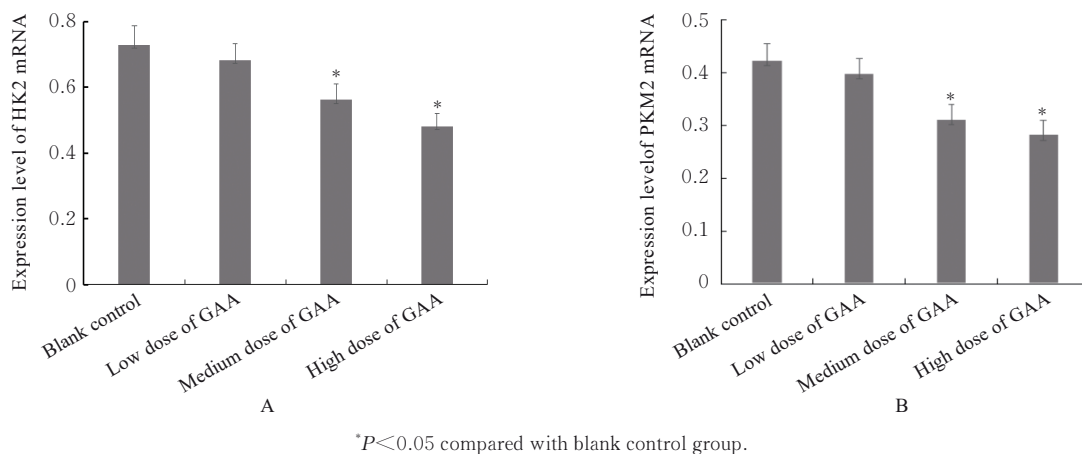
2.4 各组PC9细胞中HK2和PKM2 mRNA表达水平 与空白对照组比较,低剂量GAA组PC9细胞中HK2和PKM2 mRNA表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),中和高剂量GAA组PC9细胞中

表2 各组PC9细胞葡萄糖摄取量、ATP水平和乳酸水平
Tab. 2 Glucose uptakes, ATP levels, and lactic acid levels of PC9 cells in various groups ($n=8, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Glucose uptake	ATP level	Lactic acid level
Blank control	100.00±0.00	45.28±1.89	100.00±0.00
GAA			
Low dose	93.84±3.83	41.84±2.63	95.23±3.12
Medium dose	89.31±4.29*	37.31±2.34	90.57±4.03*
High dose	85.16±3.91*	34.16±2.58*	86.28±3.72*

* $P<0.05$ compared with blank control group.

HK2及PKM2 mRNA表达水平均明显降低 ($P<0.05$)。见图2。



* $P<0.05$ compared with blank control group.

图2 各组PC9细胞中HK2和PKM2 mRNA表达水平

Fig. 2 Expression levels of HK2 and PKM2 mRNA in PC9 cells in various groups

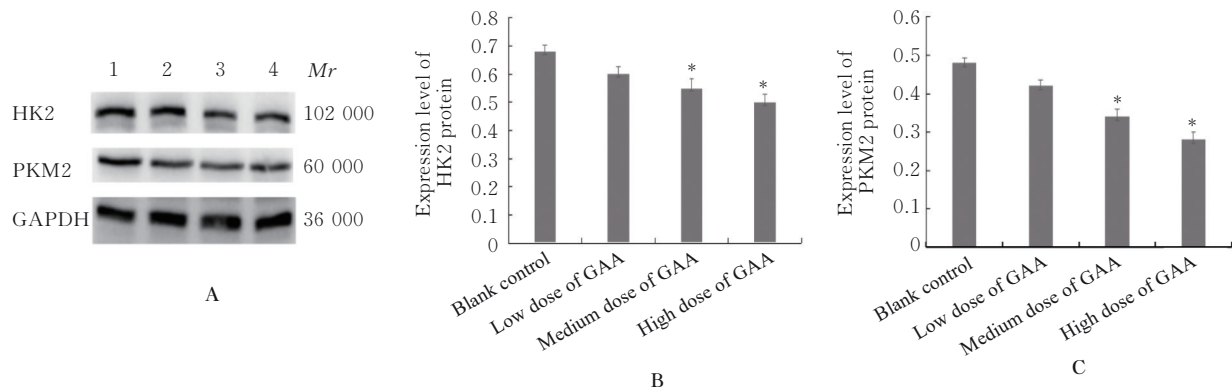
2.5 各组PC9细胞中HK2和PKM2蛋白表达水平 与空白对照组比较,低剂量GAA组PC9细胞中HK2和PKM2蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$),中和高剂量GAA组PC9细胞中HK2及PKM2蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$)。见图3。

3 讨论

晚期NSCLC的生存率较低,肿瘤有氧糖酵解产生的乳酸与肿瘤的扩散和复发具有一定的相关性^[10-11]。研究^[12-14]显示:乳酸产生可以促进肿瘤血管生成、诱使肿瘤局部产生炎症反应、减少机体对肿瘤细胞的免疫反应和增强肿瘤细胞侵袭迁移性。因此,通过测定肿瘤细胞消耗葡萄糖量、ATP水平和乳酸水平,可以判断肿瘤细胞糖酵解情况。本研究以NSCLC PC9细胞为研究对象,观

察不同剂量GAA对PC9细胞的生物活性、糖酵解产物和糖酵解关键限速酶的影响。本研究结果显示:采用不同剂量GAA处理PC9细胞24、48和72 h后,中和高剂量GAA组PC9细胞存活率明显降低,细胞增殖受到抑制。在细胞迁移实验中,随着GAA剂量升高,PC9细胞迁徙细胞逐渐减少;与空白对照组比较,中和高剂量GAA组PC9细胞对葡萄糖摄取量及乳酸水平明显降低,高剂量GAA组PC9细胞ATP水平明显降低。提示GAA浓度升高可以抑制PC9细胞的生物学活性,抑制有氧糖酵解,阻断肿瘤细胞能量供应,并可以作为重要的抗癌治疗手段。

PKM2是糖酵解的关键限速酶,对肿瘤的生长和增殖具有重要作用。研究^[15-18]发现:在肝癌、胃癌和胶质母细胞瘤中存在PKM2蛋白过表达。降低PKM2蛋白表达水平,减弱肿瘤细胞的有氧糖酵



Lane 1: Blank control group; Lane 2: Low dose of GAA group; Lane 3: Medium dose of GAA group; Lane 4: High dose of GAA group. * $P < 0.05$ compared with blank control group.

图3 各组PC9细胞中HK2和PKM2蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 3 Electrophoregram (A) and histograms (B, C) of expressions of HK2 and PKM2 proteins in PC9 cells in various groups

解, 可以促进肿瘤细胞凋亡^[19-20]。HK2是有氧糖酵解的第一个关键限速酶, 与肿瘤相关性较高。研究^[21-22]显示: 抑制HK2活性可降低有氧糖酵解水平。GAA抑制肿瘤细胞增殖的作用已被证实^[23], 但是GAA抗肿瘤的作用机制尚不明确。本研究结果显示: 中和高剂量GAA组PC9细胞中PKM2和HK2 mRNA及蛋白表达水平明显降低, 提示可以通过限制糖酵解及其关键限速酶的活性, 抑制糖酵解关键限速酶PKM2和HK2蛋白表达, 进而实现抗肿瘤的作用。

综上所述, GAA剂量升高可以抑制PC9细胞的存活率、迁移细胞数、葡萄糖摄取量、ATP水平、乳酸水平、HK2和PKM2 mRNA及蛋白表达水平, 其主要作用机制可能与HK2和PKM2蛋白表达有关。GAA在抑制PC9细胞糖酵解方面发挥重要作用, 本研究结果为探讨抗NSCLC的辅助用药提供了理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

任爱华和董彦伯参与文献检索、实验设计及论文撰写, 苗润芝参与数据收集和分析, 吕俞娇参与论文结果分析和讨论, 刘岩峰参与论文写作指导和审校。

[参考文献]

- [1] UNG M H, MACKENZIE T A, ONEGA T L, et al. Statins associate with improved mortality among patients with certain histological subtypes of lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2018, 126: 89-96.
- [2] OSMANI L, ASKIN F, GABRIELSON E, et al. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): moving from targeted therapy to immunotherapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 52(Pt 1): 103-109.
- [3] 张斯琦, 刘丹丹, 孙美琪, 等. 肿瘤细胞能量代谢特点的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2023, 44(1): 49-52.
- [4] 王凤丽, 胡晶. 恶性肿瘤中泛素化修饰对Warburg效应调控机制的研究进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2022, 49(6): 616-622.
- [5] SUN H Y, CHEN L, CAO S, et al. Warburg effects in cancer and normal proliferating cells: two tales of the same Name[J]. *GPB*, 2019, 17(3): 273-286.
- [6] 郝萌萌, 王金艳, 冯娜, 等. 灵芝子实体中不同极性的三萜体外抗肿瘤及抗炎活性比较[J]. *菌物学报*, 2019, 38(6): 917-925.
- [7] GILL B S, KUMAR S, NAVGEET. Evaluating antioxidant potential of ganoderic acid A in STAT 3 pathway in prostate cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(12): 1411-1422.
- [8] SUN Z W, SUN L B, LI W W. Effect of ganoderic acid on diethylnitrosamine-induced liver cancer in mice [J]. *Trop J Pharm Res*, 2021, 19(12): 2639-2644.
- [9] LAN X T, XIAO H. Cyclodextrins facilitate the efficient secretion of an anti-tumor triterpenoid ganoderic acid HLDOA by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2020, 130(2): 142-148.
- [10] 周倩, 谭榜宪. 晚期非小细胞肺癌维持治疗的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2021, 48(12): 631-635.
- [11] GU H L, WANG Y Z, HUANG D S, et al. Clinical features and imaging manifestations of retinoblastoma

- with hepatic metastasis[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2021, 68(10): e28959.
- [12] 白日兰, 白玲, 李薇, 等. 乳酸及其转运蛋白对肿瘤和免疫的影响及相关治疗进展[J]. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2021, 8(3): 245-250.
- [13] NIU D, WU Y W, LEI Z Y, et al. Lactic acid, a driver of tumor-stroma interactions[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 106: 108597.
- [14] 闫焱, 焦碧航, 周昆, 等. 基线 BMI 与免疫检查点抑制剂治疗晚期非小细胞肺癌疗效的关系[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2023, 58(3): 373-377.
- [15] GUO J S, XUE Q Q, LIU K H, et al. Dimethylaminomicheliolide (DMAMCL) suppresses the proliferation of glioblastoma cells via targeting pyruvate kinase 2 (PKM2) and rewiring aerobic glycolysis [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 993.
- [16] 曲颜丽, 王海峰, 唐勇. 胃癌BGC-823细胞中缺氧诱导因子对葡萄糖转运蛋白1、M2型丙酮酸激酶及血管内皮生长因子的调控作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(4): 627-630.
- [17] 韩家鑫, 宓余强, 徐亮. 肝细胞癌早期筛查和诊断的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(6): 1468-1475.
- [18] YUAN Q, ZHANG J, LIU Y, et al. MyD88 in myofibroblasts regulates aerobic glycolysis-driven hepatocarcinogenesis via ERK-dependent PKM2 nuclear relocalization and activation [J]. *J Pathol*, 2022, 256(4): 414-426.
- [19] 黄哲, 蔡朋株, 林琳, 等. M2型丙酮酸激酶和张力蛋白同源物基因在胃癌及癌旁组织的表达及临床意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(4): 631-633.
- [20] WANG C, JIANG J L, JI J, et al. PKM2 promotes cell migration and inhibits autophagy by mediating PI3K/AKT activation and contributes to the malignant development of gastric cancer[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2886.
- [21] 任晖, 章联, 林晓燕. 小檗碱调节己糖激酶II抑制乳腺癌细胞糖酵解的作用研究[J]. *中国药师*, 2017, 20(11): 1945-1949.
- [22] 王军华, 陶明华, 王滕, 等. 敲低己糖激酶2(HK2)抑制乳腺癌细胞增殖并降低其对氟尿嘧啶的耐药[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(8): 722-727.
- [23] 范炳芝, 王一鑫, 廉霄甜, 等. 三萜类化合物抗病毒的构效关系及其作用机制研究进展[J]. *化工学报*, 2020, 71(9): 4071-4101.