

白头翁皂苷调节 Bel-7402 人肝癌异体移植瘤裸鼠能量代谢的研究

罗颖颖^{1,2}, 陈兰英^{2*}, 简 晖², 崔亚茹², 谢欣序², 刘 鹏², 杨世林^{2*}, 郭建生¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 江西中医药大学 国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 考察白头翁 *Pulsatilla chinensis* 皂苷对人肝癌 Bel-7402 荷瘤裸鼠异体移植瘤的抑制作用, 并从能量代谢角度探讨其作用机制。方法 制备人肝癌 Bel-7402 裸鼠异体移植瘤模型, 通过肿瘤体积、抑瘤率观察白头翁皂苷的体内抗肿瘤活性; 生物化学法检测瘤块组织乳酸及 ATP 的量以观察白头翁皂苷对能量代谢的调节作用; ELISA 法检测白头翁皂苷对能量代谢相关酶变化的影响; Western blotting 法检测白头翁皂苷对能量代谢调控蛋白缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的影响。结果 白头翁皂苷能较好地抑制肝癌荷瘤裸鼠异体移植瘤的生长, 可明显减小肿瘤体积, 白头翁皂苷 400、200、100 mg/kg 抑瘤率依次为 42.8%、31.5%、14.9%, 呈剂量依赖关系, 且对血液白细胞 (WBC) 无明显影响; 白头翁皂苷能明显降低瘤块组织中乳酸和 ATP 的量; 白头翁皂苷可降低糖酵解关键酶己糖激酶-II (HK-II)、磷酸果糖激酶 (PFK) 及丙酮酸激酶 (PK) 的量, 提高三羧酸循环关键酶琥珀酸脱氢酶 (SDH) 的量; Western blotting 检测结果显示白头翁皂苷可明显降低瘤块组织 HIF-1 α 蛋白的表达。结论 白头翁皂苷具有较好的体内抗肿瘤作用, 其可能通过 HIF-1 α 通路调节肿瘤细胞能量代谢, 来达到抑制肿瘤生长的作用。

关键词: 白头翁皂苷; Bel-7402 肝癌; 抗肿瘤; 能量代谢; 糖酵解

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)07-0973-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.014

Regulation of saponins from *Pulsatilla chinensis* on energy metabolism of Bel-7402 xenograft in nude mice

LUO Ying-ying^{1,2}, CHEN Lan-ying², JIAN Hui², CUI Ya-ru², XIE Xin-xu², LIU Peng², YANG Shi-lin², GUO Jian-sheng¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The National Pharmaceutical Engineering Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To investigate the antitumor activity of saponins from *Pulsatilla chinensis* against the Bel-7402 human hepatocellular carcinoma xenograft in nude mice, and to explore the mechanism of energy metabolism. **Methods** The antitumor activity *in vivo* was estimated using a Bel-7402 xenograft model. The tumor volume was measured, the tumor inhibitory rate was calculated, the levels of lactic acid and ATP were assessed in Bel-7402 xenograft in nude mice, energy metabolic enzymes in Bel-7402 xenograft in nude mice were detected by ELISA assay, and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) was detected by Western blotting assay. **Results** The saponins from *P. chinensis* could inhibit the growth of Bel-7402 xenograft in a dose-dependent manner. The tumor inhibitory rates at the dose of 400, 200, and 100 mg/kg were 42.8%, 31.5%, and 14.9%. They had no side effects on white blood cell (WBC) in blood; The saponins from *P. chinensis* could decrease the contents of lactic acid and ATP. They also could decrease the levels of glycolytic enzymes phosphofructokinase (PFK), hexokinase-II (HK-II), and pyruvate kinase (PK), while increase the level of succinate dehydrogenase (SDH) that was the key enzyme during tricarboxylic acid cycle. Western blotting indicated that the expression of HIF-1 α protein was significantly decreased in Bel-7402 xenograft in nude mice. **Conclusion** The saponins from *P. chinensis* could inhibit the growth of Bel-7402 xenograft in nude mice *in vivo*, the mechanism is related with regulating energy metabolism through the HIF-1 α pathway.

Key words: saponins from *Pulsatilla chinensis*; Bel-7402; antitumor; energy metabolism; glycolysis

收稿日期: 2014-01-23

基金项目: 国家“十二五”“重大新药创制”科技重大专项项目 (2011ZX09102-001-19); 江西省优势科技创新团队计划项目 (2010DQB01700); 江西省教育厅产学研合作项目 (GJJ11006)

作者简介: 罗颖颖 (1982—), 女, 在读博士, 从事中药药效评价及作用机制研究。Tel: (0791)87119785 E-mail: luoying0302@163.com

*通信作者 陈兰英 (1966—), 教授, 博士生导师, 从事中药药效评价及作用机制研究。Tel: (0791)87119611 E-mail: clyxy2513@163.com

杨世林 (1953—), 教授, 博士生导师, 从事中药及天然药物活性成分研究及新药开发。Tel: (0791)87119638 E-mail: slyang3636@126.com

细胞的能量主要来自糖代谢,葡萄糖在体内氧化分解的途径包括糖酵解和氧化磷酸化。正常细胞从糖酵解中获取 20%~30%自身代谢所需的能量,从氧化磷酸化中获取约 70%的能量;肿瘤细胞在氧供应充分的条件下,仍以糖酵解获取能量,称为有氧糖酵解,产生大量乳酸和少量 ATP,这即是著名的“Warburg 效应”,“Warburg 效应”的提出具有划时代的意义^[1-2]。肿瘤细胞的能量代谢异常是肿瘤细胞新增的特征之一^[3]。近年来人们的眼光开始聚焦基于肿瘤细胞能量代谢分子靶向药物的研究^[4],以干扰肿瘤细胞能量代谢为基础的合理“饿死”肿瘤治疗策略,将为肿瘤治疗提供一种新的思路和契机^[5],能量代谢的关键酶或载体有望成为对恶性肿瘤进行分子靶向治疗的重要新靶点。

白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 始载于《神农本草经》,其性寒,味苦,主温疟狂易寒热、症瘕积聚、瘕气、逐血止痛、金疮。其中“症瘕积聚”则为现代医学中肿瘤的范畴,研究表明,白头翁可抑制 HeLa 和 SGC-7901 细胞增殖^[6],本课题组前期研究发现,白头翁皂苷为白头翁中抗肿瘤的主要有效部位,可诱导肿瘤细胞凋亡,具有较好的体外抗肿瘤活性^[7],本研究进一步考察白头翁皂苷体内抗肿瘤活性,并从能量代谢角度出发,探讨其抗肿瘤作用机制,为白头翁抗肿瘤新药的开发及其在临床上的应用提供更坚实的理论基础。

1 材料

1.1 细胞株

人肝癌 Bel-7402 细胞株,购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,由本室传代保种。

1.2 动物

SPF 级 Balb/c 裸小鼠,雄性,5~6 周龄,65 只,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(湘)2009-0004。

1.3 药品与试剂

白头翁皂苷,由江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心天然药物研究事业部提供(HPLC 法测定总皂苷质量分数>90%,批号 20121126);卡培他滨片(批号 SH1160),上海罗氏制药有限公司;乳酸检测试剂盒、ATP 检测试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;丙酮酸激酶(PK)、己糖激酶 II(HK-II)、磷酸果糖激酶(PFK)、琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒,购自上海西唐生物科技有限公司;预染蛋白 Marker(Fermentas,

26616);PVDF 膜(millipore,IPVH00010);肌动蛋白(β -actin)抗体(anbo, E0012)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)抗体(Abcam, ab1);山羊抗兔/抗鼠二抗(transgen, HS101-01/HS102-01);EasySee Western Blotting Kit(transgen, DW101-1);RIPA、PMSF、5 $\times$ 上样缓冲液、电泳液、凝胶配制试剂盒、转膜液,购自碧云天生物科技有限公司。

1.4 仪器

MCV-B161S(T)超净工作台(Sanyo);MCO-20 ACI CO₂培养箱(Sanyo);CKX41 倒置显微镜(Olympus);IVC 系统(苏杭科技器材有限公司);游标卡尺;BS124S 型电子天平(Sartorius);353 MK3 酶标仪(Thermo Multiskan);垂直电泳仪(Bio-Rad);凝胶成像系统(Alpha),XT-2000i 血球仪(Sysmex)。

2 方法

2.1 人肝癌裸鼠异体移植瘤模型的制备

取对数生长期的 Bel-7402 人肝癌细胞,用无血清 RPMI 1640 培养基制备成 5×10^7 的单细胞悬液,以 0.2 mL/只接种于裸鼠左前腋部皮下,待裸鼠移植成瘤,再传 2~3 代,取经在体内传代 2 代以上的瘤块,剪成约 2 mm $\times$ 2 mm $\times$ 2 mm,采用套管针接种于裸鼠腋部皮下,建立 Bel-7402 人肝癌裸鼠异体移植瘤模型,以模型组瘤质量均值达 1 g 以上为模型成功标准^[8]。

2.2 分组及给药方法

所有动物随机分为模型组(生理盐水),阳性药卡培他滨组^[9](467 mg/kg),白头翁皂苷高、中、低剂量(400、200、100 mg/kg)组,每组 8 只动物,各组 ig 给药,给药体积均为 10 mL/kg,每天 1 次,连续给药 28 d,其中卡培他滨组每连续给药 7 d 后间隔 7 d 再重复给药。

2.3 肿瘤体积和抑瘤率的观察

各组给药后第 7 天开始每 3 天用游标卡尺测量动物的瘤长(a)和瘤宽(b),计算瘤体积($V=1/2 a \times b^2$)。实验结束时,完整剥取瘤块,称瘤质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量],拍照,液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。

2.4 外周血血液学指标的观察

实验结束时,眼球取血,EDTA-K₂抗凝,血球仪计数白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGb)、血小板(PLT)。

2.5 瘤块组织中乳酸及 ATP 水平检测

取部分瘤块,称质量,用生理盐水制备成 10% 匀浆,按试剂盒说明书操作进行瘤块组织中乳酸及 ATP 水平检测,并采用 BCA 法测定匀浆的蛋白的量。

2.6 瘤块组织中能量代谢相关酶 PFK、HK-II、PK 及 SDH 水平的检测

取部分瘤块,称质量,用生理盐水制备成 10% 匀浆,采用 ELISA 法,按试剂盒说明书进行操作,检测瘤块中 PFK、HK-II、PK 及 SDH 的水平变化。

2.7 瘤块组织中 HIF-1 α 蛋白表达的检测

称取 100 g 肿瘤组织,提取蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件为 80 V、25 min,然后 100 V、80 min,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,转膜条件为 200 mA 转 180 min,在含 5%脱脂奶粉的 TBST 中进行室温封闭 1 h。4 ℃ 孵育一抗 HIF-1 α (1:1 000)、 β -actin (1:5 000) 过夜, TBST 洗 3 次,二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,显色扫描保存结果。

2.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 对组间数据进行方差分析后进行 t 检验。

3 结果

3.1 对荷瘤裸鼠移植瘤生长的影响

白头翁皂苷高剂量组给药第 10 天、中剂量组给药第 13 天、低剂量组给药第 28 天裸鼠肿瘤体积明显下降,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01),结果见图 1。白头翁皂苷各组瘤质量较模型组下降,其中高、中剂量组瘤质量与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$),卡培他滨组与白头翁皂苷高、中、低剂量组抑瘤率分别为 56.26%、42.8%、31.5%、14.9%,白头翁皂苷组抑瘤作用呈明显剂量依赖关系。结果见表 1。

3.2 对荷瘤裸鼠血细胞的影响

结果表明,卡培他滨组可明显降低荷瘤裸鼠 WBC 的数量,与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$),

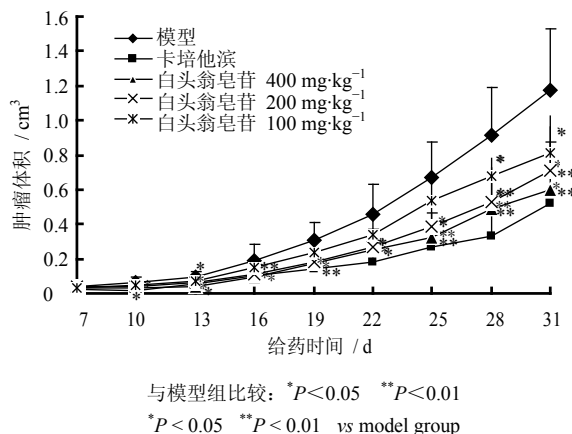


图 1 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠移植瘤肿瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of saponins from *P. chinensis* on volume of Bel-7402 xenograft in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 1 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠异体移植瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	—	1.10 ± 0.27	—
卡培他滨	467	0.48 ± 0.22***	56.2
白头翁皂苷	400	0.63 ± 0.25**	42.8
	200	0.76 ± 0.24*	31.5
	100	0.94 ± 0.25	14.9

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below

白头翁皂苷各剂量给药组对血细胞无明显影响,结果见表 2。

3.3 对荷瘤裸鼠瘤组织中乳酸和 ATP 水平的影响

给药后白头翁皂苷各剂量组荷瘤裸鼠瘤组织中乳酸水平均下降,其中高、中剂量组可明显降低裸鼠异体移植瘤瘤组织中乳酸的分泌,与模型组相比有统计学差异 ($P < 0.05$);白头翁皂苷各剂量组

表 2 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠血细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of saponins from *P. chinensis* on blood cells of Bel-7402 xenograft in nude mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	WBC / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)	RBC / (×10 ¹² ·L ⁻¹)	HGb / (g·L ⁻¹)	PLT / (×10 ⁹ ·L ⁻¹)
模型	—	5.08 ± 0.89	10.1 ± 0.5	150.75 ± 7.67	1 596 ± 313
卡培他滨	467	4.23 ± 1.05*	10.0 ± 0.4	151.25 ± 6.90	1 692 ± 284
白头翁皂苷	400	5.09 ± 1.51	9.8 ± 0.2	143.75 ± 4.53	1 669 ± 192
	200	5.27 ± 2.06	10.0 ± 0.6	148.85 ± 6.57	1 696 ± 240
	100	7.39 ± 1.39	10.1 ± 0.2	146.00 ± 1.41	1 673 ± 478

ATP 水平均下降, 其中高剂量组 ATP 水平与模型组相比有统计学差异 ($P<0.05$), 结果见表 3。

表 3 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠瘤组织中乳酸和 ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of saponins from *P. chinensis* on contents of lactic acid and ATP in Bel-7402 xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	乳酸 / (mmol·g ⁻¹)	ATP / (μmol·g ⁻¹)
模型	—	0.261±0.045	36.4±14.4
卡培他滨	467	0.209±0.065*	19.2±11.4*
白头翁皂苷	400	0.215±0.037*	20.1±14.1*
	200	0.222±0.026*	31.3±26.4
	100	0.219±0.075	34.8±19.6

表 4 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠瘤组织中能量代谢相关酶的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effects of saponins from *P. chinensis* on relative enzymes of energy metabolism in Bel-7402 xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	HK-II / (ng·mL ⁻¹)	PFK / (pg·mL ⁻¹)	PK / (ng·mL ⁻¹)	SDH / (mmol·L ⁻¹)
模型	—	0.400±0.063	97.3±32.8	36.1±5.3	0.259±0.033
卡培他滨	467	0.352±0.105	65.7±26.1	31.3±10.6	0.302±0.061*
白头翁皂苷	400	0.359±0.066*	61.9±14.1*	34.6±7.1	0.299±0.039*
	200	0.442±0.058	70.3±10.7*	42.1±5.1	0.281±0.079
	100	0.446±0.201	78.9±25.8	41.2±16.1	0.281±0.121

表 5 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠瘤组织中 HIF-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effects of saponins from *P. chinensis* on expression of HIF-1α protein in Bel-7402 xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	HIF-1α / β-actin
模型	—	1.73±0.33
卡培他滨	467	1.53±0.25
白头翁皂苷	400	0.90±0.22*

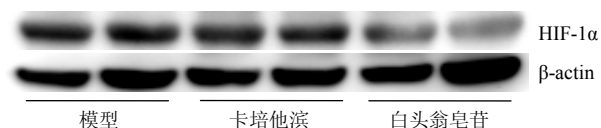


图 2 白头翁皂苷对 Bel-7402 荷瘤裸鼠瘤组织中 HIF-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effects of saponins from *P. chinensis* on expression of HIF-1α protein in Bel-7402 xenograft tissue of nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

本实验结果表明, 白头翁皂苷能明显抑制人肝

3.4 对荷瘤裸鼠瘤组织中能量代谢相关酶的影响

白头翁皂苷高剂量可明显降低荷瘤裸鼠瘤组织中 HK-II、PFK 的水平, 升高 SDH 的水平, 与模型组比较有统计学差异 ($P<0.05$), 白头翁皂苷高、中剂量可明显降低瘤组织中 PFK 的水平, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$), 中、低剂量组瘤组织中 SDH 水平有所升高, 对 PK、HK-II 无明显影响, 结果见表 4。

3.5 对荷瘤裸鼠瘤组织 HIF-1α 蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测各组瘤块组织 HIF-1α 蛋白表达的变化, 结果表明, 白头翁皂苷高剂量组瘤块组织 HIF-1α 蛋白表达明显下降, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$), 结果见表 5 和图 2。

癌 Bel-7402 裸鼠异体移植瘤的生长, 其高剂量抑瘤率可达 42.6%, 具有较好的体内抗肿瘤作用。众所周知, WBC 减少是化疗药物的最常见的, 也是较严重的毒副作用之一, 白头翁皂苷对血细胞, 尤其是对 WBC 无明显影响, 因此, 作为一种新型抗肿瘤中药, 白头翁皂苷具有较好的开发前景。

在肿瘤生长的过程中, 由于大量细胞拥挤在相对狭小的空间内, 导致其中相当一部分细胞不能从血管中获得充足的氧来合成细胞的能量物质 ATP, 而有氧糖酵解使得肿瘤细胞能在缺氧环境下获得能量, 存活和生长具有明显优势。因此, 恶性肿瘤由于其生长迅速, 常常出现葡萄糖摄取量增高, 糖酵解增加和乳酸堆积现象^[10]。乳酸是糖酵解途径的最终代谢产物。本实验结果表明, 给药后白头翁皂苷组瘤块组织乳酸和 ATP 水平明显降低, 说明白头翁皂苷可以抑制肿瘤细胞糖酵解, 调节肿瘤细胞能量代谢。

HK-II、PFK、PK 是影响糖酵解水平的直接作用因素, 在调控糖酵解代谢中起着重要作用。因它们催化的反应基本上是不可逆的, 因此被称为糖酵

解过程中的关键酶,其中HK是糖酵解的第一个限速酶,它可催化葡萄糖磷酸化生成6-磷酸葡萄糖。HK家族有I、II、III、IV 4种亚型,其中大多数恶性肿瘤以HK-II亚型高表达为主, HK-II在正常组织中活性很低,但在肿瘤细胞中表达量和活性明显增高,其量和活性越高,则肿瘤糖酵解速度越快^[11]。PFK是糖酵解最重要的限速酶,它催化6-磷酸果糖转化为1,6-二磷酸果糖,是糖酵解过程中最重要的限速步骤^[12]。PK亦是糖酵解过程中的重要限速酶,它催化糖酵解倒数第二步反应,将底物磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸,是控制肿瘤生长的关键酶之一。SDH存在于所有有氧呼吸细胞,和线粒体膜牢固结合,是三羧酸循环中惟一与内膜结合的酶,是脱氢酶中最重要的酶,它的活性降低,可造成三羧酸循环功能紊乱,触发糖酵解增强并成为ATP产生的主要来源。本实验结果表明,白头翁皂苷高剂量给药组能明显降低瘤块组织中HK-II、PFK的量,升高SDH的量,说明白头翁皂苷可以通过影响糖酵解关键限速酶来抑制肿瘤细胞糖酵解,并通过提高SDH的量,使肿瘤细胞能量代谢向氧化磷酸化方式转变,从而干扰肿瘤细胞在缺氧环境下产生和获得能量,抑制肿瘤细胞的生长。

HIF-1 α 是调节糖酵解的重要蛋白,在低氧条件下, HIF堆积,和其家族成员发生二聚化,并移位入核,可转录活化GLUT1、糖酵解酶类、乳酸脱氢酶A(LDHA)、丙酮酸脱氢酶激酶1(PDK1)等多个与糖酵解相关的基因,通过诱导激活糖酵解途径基因的转录和翻译来增加糖酵解^[13]。本研究结果表明,白头翁皂苷可明显降低瘤块组织HIF-1 α 蛋白的表达,说明白头翁皂苷可能通过HIF-1 α 通路来降低糖酵解关键酶的数量和活性,提高三羧酸循环的关键酶的数量和活性,调节肿瘤细胞能量代谢,来达到抑制肿瘤生长的作用。

参考文献

[1] Mayevsky A. Mitochondrial function and energy metabolism in cancer cells: past overview and future

perspectives [J]. *Mitochondrion*, 2009, 9(3): 165-179.

- [2] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles heel [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [3] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [4] Sakharkar M K, Shashni B, Sharma K, et al. Therapeutic implications of targeting energy metabolism in breast cancer [J]. *PPAR Res*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/109285>.
- [5] Nijsten M W, vanDam G M. Hypothesis: using the Warburg effect against cancer by reducing glucose and providing lactate [J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(1): 48-51.
- [6] 王征, 张宁, 孙艳妮, 等. 白头翁寒热药性的细胞评价 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(5): 359-362.
- [7] 罗颖颖, 陈兰英, 崔亚茹, 等. 白头翁皂苷抑制人HT29结肠癌细胞增殖及诱导凋亡作用研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5): 52-56.
- [8] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [9] Kenneth K, Zhang Y E, Ute D, et al. Novel regimens of capecitabine alone and combined with irinotecan and bevacizumab in colorectal cancer xenografts [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 91-98.
- [10] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [11] MathuPala S P, RemPel A, Pedersen P L. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the tyPe II hexokinase gene to hypoxic conditions [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43407-43412.
- [12] Mor I, Cheung E C, Vousden K H. control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011, 76: 211-216.
- [13] Dalgard C L, Lu H, Mohyeldin A, et al. Endogenous 2-oxoacids differentially regulate expression of oxygen sensors [J]. *Biochem J*, 2004, 380(2): 419-424.