

M2-型丙酮酸激酶促进肝癌细胞的侵袭

董天赋,柴浩,陈圣林,熊新魁,孙道一,成峰*

(南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 M2-型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2,PKM2)在肝癌组织中的表达及对肝癌侵袭的影响。方法:荧光定量 PCR (real-time PCR)、免疫组化(IHC)比较 PKM2 在肝癌和癌旁组织中 mRNA 和蛋白的表达水平;构建人肝癌细胞株(HepG2)PKM2 干扰和过表达的细胞株,分析 PKM2 对肝癌细胞侵袭的影响;Real-time PCR、免疫组化、Western blot 分析肝癌组织及转染后的 HepG2 细胞 STAT3 的磷酸化、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α ,HIF-1 α)的表达变化。结果:肝癌标本(106/115)中 PKM2、HIF-1 α 的 mRNA 表达水平在肝癌组织中高于癌旁组织,免疫组化显示肝癌组织中的 PKM2、HIF-1 α 的表达水平高于癌旁组织;在体外实验中,干扰 PKM2 能抑制肝癌细胞 HepG2 的侵袭,过表达 PKM2 促进肝癌细胞 HepG2 的侵袭;PKM2 过表达促进 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)的磷酸化,上调 HIF-1 α 的表达。结论:PKM2 通过促进 STAT3 磷酸化,上调 HIF-1 α 的表达,促进肝癌细胞的侵袭,为肝癌的治疗提供了新思路。

[关键词] M2-型丙酮酸激酶;肝癌;肿瘤侵袭

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-410-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20140402

Promotion of pyruvate kinase M2 on cell invasion in liver cancer cell

Dong Tianfu, Chai Hao, Chen Shenglin, Xiong Xinkui, Sun Daoyi, Cheng Feng*

(Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of pyruvate kinase M2 (PKM2) on the invasion of liver cancer cell *in vitro*. **Methods:** We compared mRNA and protein expressions of PKM2 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and adjacent normal tissues by real-time PCR and immunohistochemistry. Interfered and overexpressed PKM2 cell lines of HepG2 were constructed to analyze the role of PKM2 on invasion of liver cancer cells. Real-time PCR, immunohistochemistry and Western blot were performed to investigate the expression of HIF-1 α and the phosphorylation of STAT3 in HepG2 cells. **Results:** The mRNA expressions of PKM2 and HIF-1 α in the HCC tissues (106/115) were higher than those in adjacent normal tissues. Sample immunohistochemistry showed that the expressions of PKM2 and HIF-1 α in HCC tissues were higher than those in adjacent normal tissues. *In vitro* experiment, interference of PKM2 inhibited the invasion of HepG2 liver cancer cell, and overexpression of PKM2 promoted the invasion of HepG2. The overexpression of PKM2 promoted the phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and upregulated the expression of HIF-1 α . **Conclusion:** PKM2 upregulates the expression of HIF-1 α and promotes liver cancer cell invasion by promoting the phosphorylation of STAT3 and may represent a novel strategy for therapy of HCC.

[Key words] pyruvate kinase M2; hepatocellular carcinoma; tumor invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):410-416]

原发性肝癌是世界上恶性程度最高的肿瘤之一^[1]。中国肝癌发病率逐年增高,是一种严重威胁健

康的疾病^[2-3]。肝癌的主要危险因素包括病毒性肝炎、食物中的黄曲霉毒素污染,以及农村中饮水污染^[4]。目前,肝癌术后的转移和复发使得整体治疗效果仍难以令人满意^[5]。因此,揭示肝癌转移的分子机制对判断预后及寻找特异的治疗靶点,进一步提高肝癌的疗效具有重要意义。Warburg^[6]提出肿瘤细胞无论氧气存在与否都主要依赖糖酵解进行糖代谢,为无

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070324);江苏省卫生厅重点项目(H201102);卫生厅开放课题(ZX05200906);江苏省六大人才高峰项目(2009)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: docchengfeng@njmu.edu.cn

序快速增殖的癌细胞提供合成所需氨基酸,称为 Warburg 效应。M2-型丙酮酸激酶(PKM2)在这种转换中发挥决定性的作用,PKM2 升高可明显增加 Warburg 效应,是肿瘤发生、发展、转移等的重要分子^[7]。丙酮酸激酶存在 PKM1、PKM2、PKL 和 PKR 4 种同工酶,随着胚胎形成,PKM2 被不同的同工酶替代,而肿瘤形成过程,其他同工酶消失,PKM2 则高度表达,这给癌症治疗奠定新的生物基础^[8-9]。PKM2 是联系癌细胞微环境糖代谢、细胞生长信号和氧化应激的枢纽蛋白。在癌细胞需氧糖酵解方面,PKM2 以高活性四聚体和低活性二聚体两种形式充当糖酵解双功能作用的传感器和调控器,确定其是代谢成乳酸还是合成生物大分子^[8]。在癌症细胞生长信号方面,癌症细胞 PKM2 的四聚体与二聚体存在动态平衡^[10],受抑癌和致癌蛋白(P53、cMYC 等)^[11]、磷酸化、乙酰化^[12]等信号调控。Dimitrios 等^[13]报道 PKM2 表达的增加可以降低活性氧的产生。肿瘤细胞恶性程度越强,糖酵解水平越高,缺氧诱导因子(HIF)-1 α 表达及活性越强,促使肿瘤恶性进展^[14]。HIF-1 是需氧糖酵解必需因子,能抑制氧化磷酸化而促进有氧糖酵解。雷帕霉素抑制肿瘤的机制在于降低 HIF-1 α 水平、抑制 PKM2 的表达^[15-16]。越来越多的研究表明,HIF-1 α 与新生血管的生成、肿瘤的转移和复发密切相关^[17]。然而 PKM2/HIF-1 α 在肝癌中的作用没有得到深入研究。本研究通过检测肝癌和癌旁组织的 PKM2 和 HIF-1 α 的表达水平,并干扰或过表达肝癌细胞株中的 PKM2 基因,分析 PKM2 对肝癌细胞侵袭的作用,为肝癌的转移机制和治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、青链霉素(Gibco 公司,美国),TRIzol (Invitrogen 公司,美国),DMSO (上海生工生物工程有限公司),Transwell 小室(Millipore 公司,美国),Matrigel(BD 公司,美国),引物合成(上海 Invitrogen 公司),RNA 逆转录试剂盒、SYBR[®] Premix Extaq[™] (TaKaRa 公司,日本),蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒(南京凯基公司),抗 PKM2、抗 HIF-1 α 抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国),抗 STAT3/p-STAT3 抗体(Cell Signal Technology 公司,美国),抗 GAPDH 抗体(上海康成生物工程有限公司)。

293T、HepG2 细胞株由卫生部活体肝移植重点

实验室提供。

组织标本在南京医科大学第一附属医院收集,为 2011 年 1 月~2013 年 7 月肝癌手术切除的 115 对肝癌和癌旁组织标本,所有标本的病理结果均通过 HE 染色病理结果确认,标本均通过液氮保存,实验得到患者本人及南京医科大学第一附属医院的伦理委员会的同意。

1.2 方法

1.2.1 293T 和 HepG2 细胞的培养

293T 和人类肝癌细胞株 HepG2 均由卫生部活体肝移植重点实验室提供,所有细胞都在恒温 37 $^{\circ}$ C,含 5%CO₂ 的细胞培养箱中进行培养,培养基为添加了 10%的 FBS、50 U/ml 的青链霉素双抗的 DMEM。

1.2.2 PKM2 基因干扰及过表达重组质粒的构建

从人类肝脏 cDNA 文库找到 PKM2 的开放读码框 (GenBank:NM_001206796.1),PKM2 基因采用 *Hpa* I 和 *Xho* I 亚克隆至 pLV-GFP (Vector1,南京医科大学第一附属医院孙倍成教授赠),获得 pLV-GFP-PKM2 质粒。利用 Invitrogen 网站获得 PKM2 的 shRNA 序列,序列如下:PKM2-shRNA1:Forward:5'-AACGCTGTGGCTCTAGACACTAACTCGAGTTTA -GTGTCTAGAGCCACAGCTTTTTTC-3',Reverse:5'-T-CGAGAAAAAGCTGTGGCTCTAGACACTAACTC -GAGTTTAGTGTCTAGAGCCACAGCGTT-3';PKM2-shRNA2:Forward:5'-CCG-GGAGGCTTCTTATAAGT-GTTTACTCGAGTAAACACTTATAAGAAGCCTCTTT-TTC-3',Reverse:5'-CAA-AAAGAGGCTTCTTATAA-GTGTTTACTCGAGT-AAACACTTATAAGAAGCCTC-CCGG-3',PKM2-shRNA (由南京金斯瑞生物科技有限公司合成)亚克隆至 pLL3.7(Vector2,南京医科大学陈云教授赠),获得 pLL3.7-PKM2-shRNA 质粒。

1.2.3 慢病毒的包装及感染

将 pLV-GFP-PKM2 (对照组质粒 pLV-GFP)和 pLL3.7-PKM2-shRNA(对照组质粒 pLL3.7)分别与包装质粒 pCMV-8.91、pCMV-VSV-G 采用磷酸钙共沉淀法瞬时转染病毒包装细胞系 293T 细胞^[18],转染后 48 h 收取病毒上清。取状态良好的 50%~70%融合的 HepG2 细胞,加入制备好的病毒液和 polybrene (8 μ g/ml)^[19],4 h 补加等量培养基,24 h 后换液。48 h 后观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达情况,获得 HepG2-PKM2、HepG2-PKM2-shRNA、HepG2-Vector1、HepG2-Vector2 细胞。

1.2.4 Real-time PCR

TRIzol 法提取组织标本及 HepG2、HepG2-PKM2-shRNA、HepG2-Vector1、HepG2-PKM2、HepG2-Vector2 细胞的总 RNA, 逆转录得 cDNA 文库。PKM2 上游引物: 5'-ATGTCGAAGCCCCATAGTGAA-3'、下游引物: 5'-TGGGTGGTGAATCAATGTCCA-3', HIF-1 α 上游引物: 5'-GAACGTCGAAA-AGAAAAGTCTCG-3'、下游引物: 5'-CCTTATC-AAGATGCGAACTCACA-3', GAPDH 上游引物: 5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAT-3'、下游引物: 5'-GGCTGTTGTCATACTTCT-CATGG-3'(引物由上海 Invitrogen 公司合成)。Real-time PCR 应用 SYBR[®] Premix Extaq[™] 试剂盒, 在 ABI PRISM[®] 7500 型荧光定量仪上进行, 反应体系: SYBR[®] Premix Extaq[™] (2 \times) 10 μ l, 模板 2 μ l, 上下游引物各 0.4 μ l, 灭菌蒸馏水 7.2 μ l。Real-time PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。

1.2.5 免疫组织化学染色

50 对肝癌及癌旁组织经 4% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切成 4 μ m 的石蜡切片, 免疫组化的染色步骤包括: 脱蜡, 水化, 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 柠檬酸抗原修复, 封闭液封闭非特异性结合位点, 一抗 (PKM2、HIF-1 α 抗体) 4 $^{\circ}$ C 封闭孵育过夜, 加生物素二抗, 加辣根酶标记链霉卵白素工作液, DAB 染色, 苏木紫复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片。具体步骤参考免疫组化试剂盒的说明书 (ZSGB-BIO)。

1.2.6 Western blot

用 RIPA 裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 测定蛋白含量, 加入蛋白上样缓冲液后 100 $^{\circ}$ C 煮 5~10 min。SDS-PAGE 进行电泳分离后, 采用湿转膜法转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h, PBST 洗 3 次后, 加入发光反应液, 感光胶片曝光, 实验至少重复 3 次。

1.2.7 稳定转染细胞株迁移侵袭能力检测

采用 DMEM 将 Matrigel 稀释 (1:6), 加入至 Transwell 小室, 100 μ l/孔 (低温条件下), 37 $^{\circ}$ C 放置 1 h, Matrigel 充分聚合后, Transwell 下室加入 1 ml 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 平衡 1 h。收集上述各组细胞, 0.25% 胰酶消化, 用 1% 胎牛血清 DMEM 培养基制备成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液, 取 200 μ l 细胞悬液, 接种至 Transwell 上室铺匀, 在下室内加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基 600 μ l, 常规培养 24 h, 取出 Transwell 小室, 用棉签拭去聚碳酸酯膜

表面的 Matrigel, PBS 轻轻冲洗, 晾干, 甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 双蒸水冲洗多余结晶紫染液, 晾干, 光学显微镜 (Nikon, ECLIPSE 50i) 下观察并拍照, 实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 所有实验数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间采用单因素方差分析进行比较, 并以 SNK- q 检验进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKM2 在肝癌组织标本中的表达高于癌旁组织

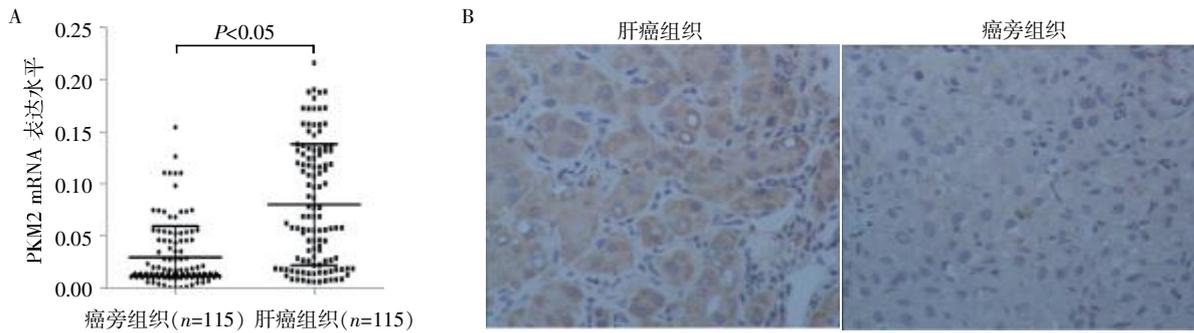
Real-time PCR 检测 115 对肝癌和癌旁标本, 其中 106 对 (106/115) 肝癌组织中 PKM2 的表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1A)。免疫组化结果显示, 在 50 例肝癌组织中, 有 35 例 PKM2 表达强阳性, 6 例阳性, 7 例弱阳性, 2 例阴性; 而在癌旁组织中, 有 6 例 PKM2 表达强阳性, 9 例阳性, 14 例弱阳性, 21 例阴性。典型的免疫组化图片见图 1B。以上结果说明, PKM2 在肝癌组织中的表达高于癌旁组织, PKM2 在肝癌的进展中可能起到重要作用。

2.2 慢病毒感染 HepG2 细胞株获得 PKM2 干扰和过表达的稳定细胞株

将含有 PKM2、PKM2-shRNA1、PKM2-shRNA2、Vector1、Vector2 序列的慢病毒感染 HepG2 细胞, Real-time PCR 和 Western blot 表明, PKM2-shRNA2 的干扰效率明显高于 PKM2-shRNA1 (图 2A), 因此选择 PKM2-shRNA2 作为干扰序列。感染慢病毒 Vector1、Vector2 的 HepG2 细胞与野生型 HepG2 细胞比较, PKM2 mRNA 及蛋白水平无明显变化, 慢病毒 PKM2 感染的 HepG2 细胞的 PKM2 表达明显高于野生型 HepG2 细胞, 而慢病毒 PKM2-shRNA2 感染的 HepG2 细胞的 PKM2 表达明显低于野生型 HepG2 细胞 (图 2B)。慢病毒感染 HepG2 细胞的效率见图 2C。

2.3 PKM2 的水平影响 HepG2 细胞的侵袭

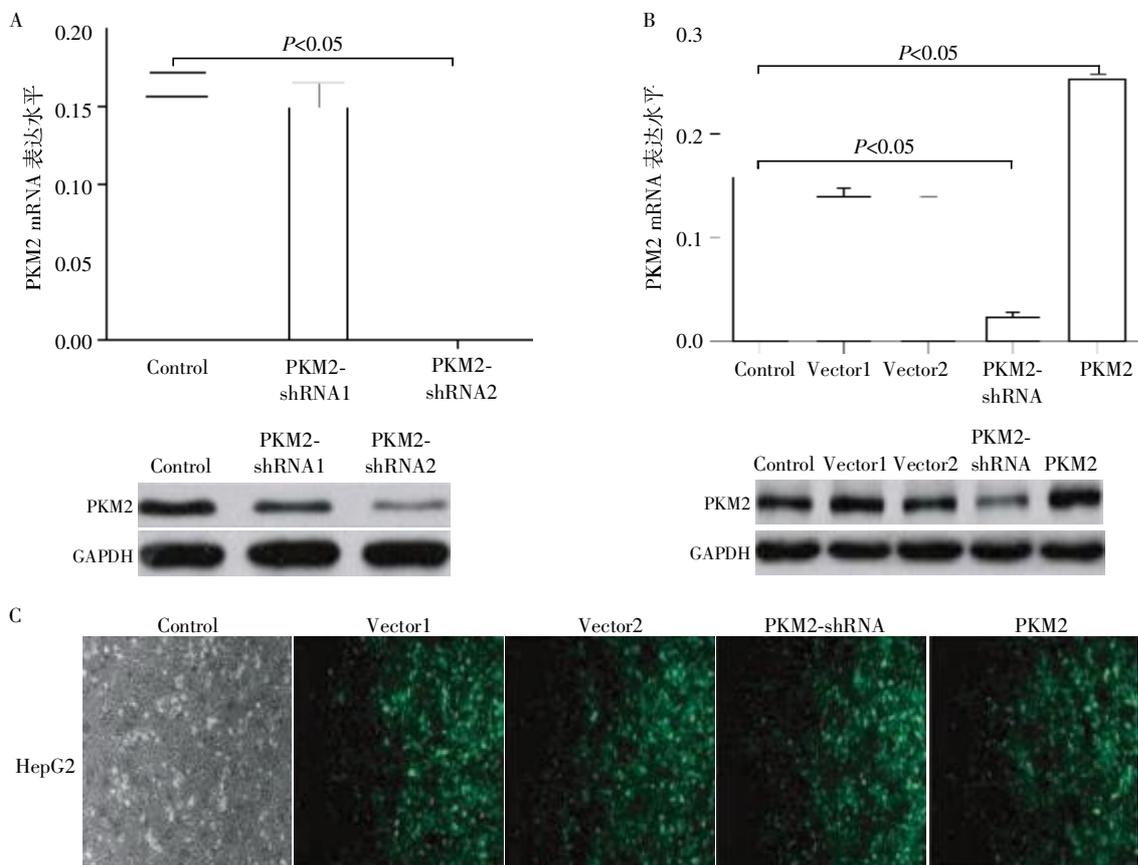
选取稳定的干扰和过表达 PKM2 的 HepG2 细胞株, 采用小室侵袭试验检测转染后 HepG2 细胞株的侵袭情况。感染空病毒 (Vector1、Vector2) 的 PKM2 蛋白及 mRNA 无明显变化, 因此, 野生型 HepG2 细胞株作为对照。小室侵袭实验结果显示, 过表达 PKM2 的 HepG2 细胞侵袭数目明显多于野生型细胞, PKM2 表达被干扰后细胞侵袭数目明显少于野生型 HepG2 细胞 (图 3)。



A: 115 对肝癌及癌旁组织, 有 106 对肝癌组织中的 PKM2 mRNA 水平高于癌旁组织($P < 0.05$); B: 免疫组化中, 肝癌组织中 PKM2 蛋白表达高于癌旁组织($\times 400$)。

图 1 PKM2 在肝癌组织标本中的表达高于癌旁组织

Figure 1 The expression of PKM2 was higher in HCC tissues than that in adjacent normal tissues



A: HepG2 细胞感染慢病毒 PKM2-shRNA1、PKM2-shRNA2, qRT-PCR 分析各组细胞株 PKM2 mRNA 表达水平(上)及 Western blot 检测各组细胞株 PKM2 蛋白表达水平(下); B: qRT-PCR 分析 HepG2 野生型(control)及感染慢病毒(Vector1、Vector2、PKM2-shRNA、PKM2)后 HepG2 细胞 PKM2 mRNA 表达水平(上), Western blot 检测 PKM2 蛋白表达水平(下); C: 慢病毒(Vector1、Vector2、PKM2-shRNA、PKM2)感染 HepG2 细胞的效率($\times 100$)。

图 2 慢病毒感染 HepG2 细胞株, 获得 PKM2 干扰和过表达的稳定细胞株

Figure 2 The efficiency of lentivirus transfection and expression of PKM2 after transfection in HepG2 cell lines

2.4 PKM2 通过影响 STAT3 的磷酸化上调 HIF-1 α 的表达

Real-time PCR 和免疫组化检测肝癌及癌旁组织中 HIF-1 α 的表达, 结果显示, HIF-1 α 在肝癌中的

mRNA 水平(图 4A)和蛋白水平(图 4B)均明显高于癌旁组织。Real-time PCR 进一步分析慢病毒感染的 HepG2 细胞, 发现 HepG2-PKM2 中 HIF-1 α 表达高于野生型 HepG2 细胞, 而 HepG2-PKM2-shRNA 中

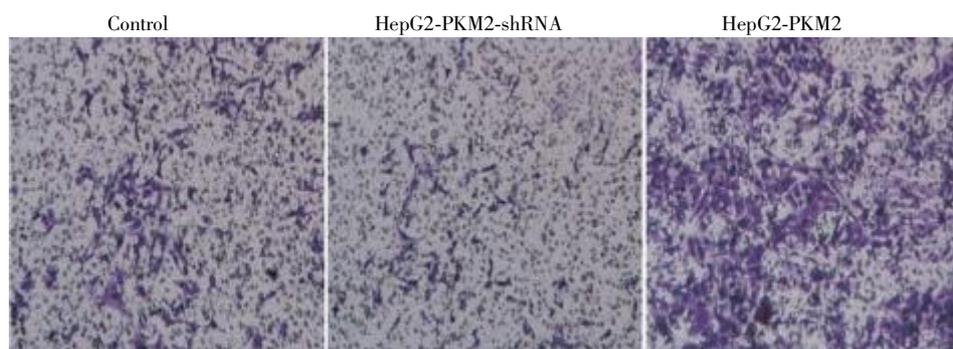
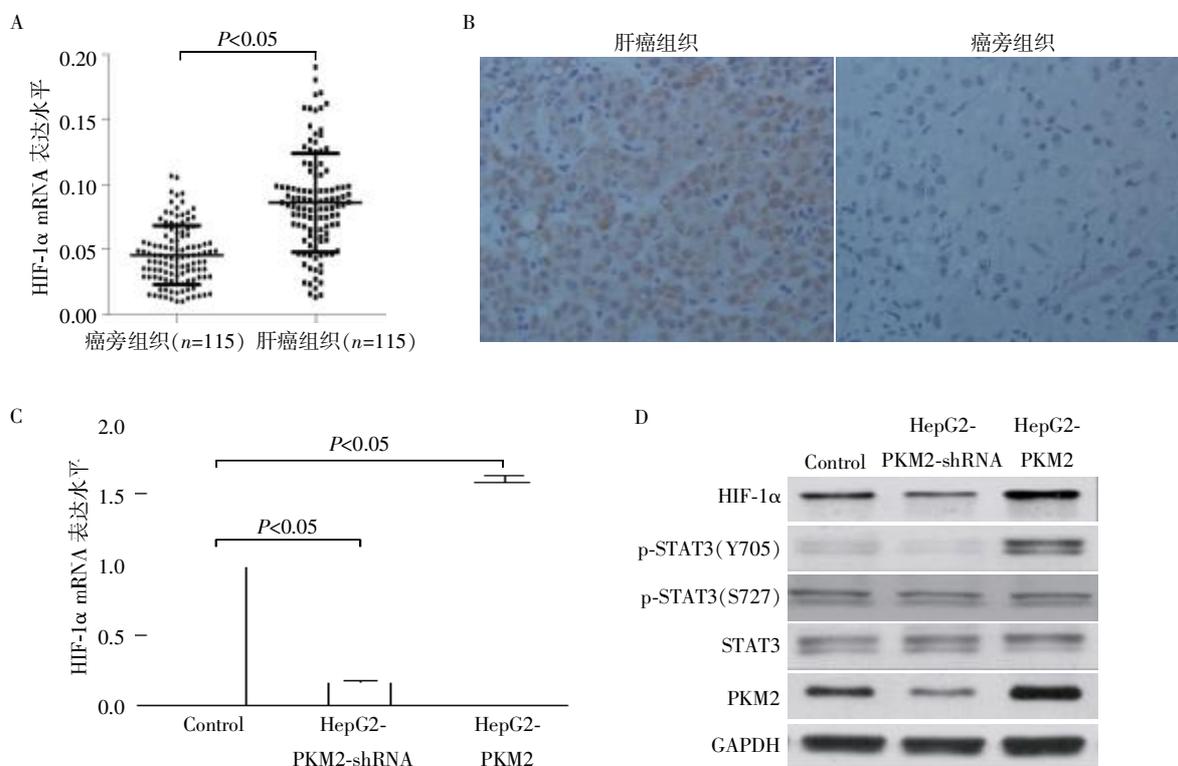


图 3 PKM2 对肝癌细胞侵袭的影响
Figure 3 Effects of PKM2 on HCC invasion



A: 115 对原发性肝癌及癌旁组织中,肝癌组织中的 HIF-1α mRNA 水平高于癌旁组织($P < 0.05$);B:HepG2 细胞感染慢病毒 PKM2 shRNA 或者 PKM2,对照组(control)为野生型 HepG2,qRT-PCR 分析各组细胞株 HIF-1α mRNA 表达水平;C:免疫组化中,肝癌组织中 HIF-1α 蛋白表达高于癌旁组织($\times 400$);D:PKM2 过表达及干扰,对 STAT3 磷酸化,HIF-1α 表达水平的影响。

图 4 PKM2 通过影响 STAT3 的磷酸化,上调 HIF-1α 的表达

Figure 4 PKM2 upregulates the expression of HIF-1α by affecting the phosphorylation of STAT3

HIF-1α 表达低于野生型 HepG2 细胞(图 4C)。Gao^[20] 报告,PKM2 促进人结肠癌 SW480 和 SW620 细胞 STAT3 的磷酸化,因此,进一步检查 PKM2 在肝癌组织中的表达是否影响磷酸化 STAT3。Western blot 结果显示,HepG2-PKM2 组 STAT3 Y750(tyrosine 705) 磷酸化水平明显高于 HepG2 野生型组,而 HepG2-PKM2-shRNA 组低于 HepG2 野生型组(图 4D)。因此,PKM2 可能通过促进 STAT3 Y705 的磷酸化,上

调 HIF-1α 表达。

3 讨论

PKM2 是癌症组织中特异性酶,在许多癌细胞中高度表达,与恶性肿瘤发生、发展、转移等密切相关,现已成为许多癌症研究者所关注的热点之一。PKM2 在人脑胶质瘤组织中的水平与胶质瘤的恶性程度及患者的预后相关,提示其可能是人脑胶质

瘤恶性程度和预后的生物标志物^[7]。采用反义 RNA 或 iRNA 技术敲低 PKM2, 或用 PKM1 替代 PKM2, 人癌细胞在裸鼠致瘤能力明显减弱^[21]。Luo 等^[22]报道 PKM2 与 HIF-1 形成正反馈圈 (positive feedback loop), 互为补偿, 协同增效。PKM2 在核内发挥蛋白激酶的作用, 促进 STAT3 的活化, 而 STAT3 的活化是癌症进展最重要的分子特征之一^[23]。在癌症细胞生长信号方面, 癌细胞内 PKM2 四聚体与二聚体存在的动态平衡受磷酸化和重要代谢中间体 (果糖 1,6-二磷酸 FBP 等) 等信号调控^[24]。另外, Frederic 等^[25]研究发现 PKM2 与多形性胶质细胞瘤高侵袭性密切相关, 深层次机制表明 PKM2 是 β -连环蛋白的主要激活剂, 凸显 PKM2 在肿瘤形成中的非代谢作用。本研究从 PKM2 的非代谢作用出发, 建立 HepG2 干扰和过表达的细胞株, 研究 PKM2 对 HIF-1 α 及肝癌细胞侵袭的影响。

研究证实与癌旁组织相比, 肝癌组织中 PKM2 的表达增高, 提示 PKM2 在肝癌的发展中可能起促进作用。体外实验表明过表达 PKM2 增加 HepG2 细胞的侵袭能力, 干扰 PKM2 则降低 HepG2 细胞的侵袭能力, 表明 PKM2 能促进肝癌细胞的侵袭。进一步研究表明, PKM2 可通过影响 STAT3 的磷酸化, 上调 HIF-1 α 的表达, 促进肝癌细胞的侵袭。

综上所述, 已有许多研究表明 PKM2 参与肿瘤形成的信号通路, 发挥基因调控等作用, 同时促进肿瘤微环境的优势形成, 上调 HIF-1 α 的表达, 促进肿瘤细胞的侵袭。PKM2 是否存在促进肿瘤细胞侵袭的其他机制, 这还有待进一步研究。PKM2 可能成为肝癌的治疗提供新思路。

[参考文献]

- [1] Bosch FX, Ribes J. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127 (5): S5-S16
- [2] Wu Y, Jiang W, Yingming Wang, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 regulates hepatocellular carcinoma cell apoptosis via suppressing osteopontin expression [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e42976
- [3] Hou J, Xu J, Jiang R, et al. Estrogen-sensitive PTPRO expression represses hepatocellular carcinoma progression by control of STAT3 [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2): 678-688
- [4] William BC. Mechanisms of human hepatocarcinogenesis [J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(6): 573-588
- [5] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(12): 1118-1127
- [6] Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body [J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8(6): 519-530
- [7] Matthew G. Vander Heiden, Lewis C. Cantley, et al. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033
- [8] Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(7): 969-980
- [9] Imamura K, Taniuchi K, Tanaka T. Multimolecular forms of pyruvate kinase. II. Purification of M2-type pyruvate kinase from Yoshida ascites hepatoma 130 cells and comparative studies on the enzymological and immunological properties of the three types of pyruvate kinases, L, M1, and M2 [J]. *J Biochem*, 1972, 72(4): 1001-1015
- [10] Mazurek S, Eigenbrodt E. The tumor metabolome [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2A): 1149-1154
- [11] Guido K, Jacques P. Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(7): 472-482
- [12] Yeung SJ, Pand J, Lee MH. Roles of p53, Myc and HIF-1 in regulating glycolysis—the seventh hallmark of cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 3981-3999
- [13] Dimitrios A, George P, John MA, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses [J]. *Science*, 2011, 334(6060): 1278-1283
- [14] Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (12): 3930-3942
- [15] Qian S, Chen XX, Ma JH, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (10): 4129-4134
- [16] Luo WB, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2011, 2(7): 551-556
- [17] Miyoshi A, Kitajima YT, Ohtaka IK, et al. Hypoxia accelerates cancer invasion of hepatoma cells by upregulating MMP expression in an HIF-1 α -independent manner [J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(6): 1533-1539
- [18] Gao Y, Yao A, Zhang W, et al. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *Oncogene*, 2010, 29(19): 2784-2794
- [19] Jiang R, Xia Y, Li J, et al. High expression levels of IKK α and IKK β are necessary for the malignant properties of liver cancer [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1263-1274

- [20] Gao X, Wang H, Yang JJ, et al. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase[J]. Mol Cell, 2012, 45(5): 598-609
- [21] Andrew NM, Jeffery B. PKM2 and the tricky balance of growth and energy in cancer [J]. Mol Cell, 2011, 42(6): 713-714
- [22] Luo W, Hu H, Chang R, et al. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1[J]. Cell, 2011, 145: 732-744
- [23] Frank DA. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation[J]. Cancer Lett, 2007, 251(2): 199-210
- [24] Levine AJ, Puzio Kam. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes[J]. Science, 2010, 330(6009): 1340-1344
- [25] Frederic C, Christine P. PKM2: a new play in the β -catenin game[J]. Future Oncol, 2012, 8(4): 395-398

[收稿日期] 2013-12-18

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》在第三届中国学术期刊评价中被评为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”! 本次共有 6448 种中文学术期刊参与评价, 经过综合评价后得到期刊相应的等级, 共计 1939 种学术期刊进入核心期刊区。