

## PKM2 基因对胆管细胞癌迁移、侵袭及增殖的影响

柴浩,熊新魁,孙道一,单文刚,浦立勇,俞悦,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:检测 M2-型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2,PKM2)在胆管癌(cholangiocarcinoma,CCA)组织中的表达情况,探讨 PKM2 下调对胆管癌细胞迁移、侵袭及增殖的影响。方法:实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)染色分别检测胆管癌及对应癌旁组织标本中 PKM2 的 mRNA 和蛋白表达水平。利用慢病毒表达载体系统在胆管癌细胞株 HuCCT-1、HCCC-9810 中下调 PKM2,分别用划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验和 CCK-8 比色法检测细胞迁移、侵袭及增殖能力。结果:胆管癌组织中 PKM2 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于对应癌旁组织。经 qRT-PCR 和 Western blot 方法证实稳定转染 PKM2 shRNA 的胆管癌细胞中 PKM2 的 mRNA 和蛋白水平较对照组均明显下降( $P < 0.05$ ),与空载对照组(PKM2-NC)和正常对照组(PKM2)相比,实验组细胞(PKM2-shRNA)的迁移、侵袭及增殖能力明显减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:胆管癌组织中 PKM2 表达明显高于癌旁组织,PKM2 shRNA 能有效地降低胆管癌细胞中 PKM2 基因的表达,PKM2 基因沉默可以抑制 HuCCT-1、HCCC-9810 细胞的迁移、侵袭及增殖。

**[关键词]** shRNA 干扰;PKM2 基因;生物学功能

**[中图分类号]** R735.8

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-615-07

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150504

## An experimental research on PKM2 gene on migration, invasion and proliferation of cholangiocarcinoma cell line

Chai Hao, Xiong Xinkui, Sun Daoyi, Shan Wengang, Pu Liyong, Yu Yue, Cheng Feng\*

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression level of PKM2 in cholangiocarcinoma(CCA) tissues, then study the effect of PKM2 down-regulation on migration, invasion and proliferation in cholangiocarcinoma cell lines. **Methods:** RNA and protein expressions of PKM2 in CCA tissues and paired adjacent tissues were detected by qRT-PCR and immunohistochemistry. PKM2 was down-regulated by a lentiviral vector expression system in cholangiocarcinoma cell lines HuCCT-1 and HCCC-9810. qRT-PCR and Western blot were performed to analyze the mRNA and protein expression of PKM2 in both cell lines. Cell migration, invasion and proliferation were assessed by wound-healing experiment, matrigel invasion and Cell Counting Kit-8 (CCK-8). **Results:** The expression of PKM2 in CCA tissues had a higher level than that in paired adjacent tissues. The mRNA and protein expressions of PKM2 in the experimental group(PKM2-shRNA) were significantly lower than those in the two control groups, confirmed by qRT-PCR and Western blot ( $P < 0.05$ ). Compared to the empty vector group(PKM2-NC) and the normal control group(PKM2), the cell invasion, migration and proliferation were significantly decreased in the experimental group(PKM2-shRNA) ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Down-regulation of PKM2 by PKM2 shRNA can inhibit migration, invasion and proliferation of HuCCT-1 and HCCC-9810 cells.

**[Key words]** shRNA interference; PKM2 gene; biological function

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):615-621]

**[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

胆管癌是目前病死率最高的恶性肿瘤之一,主要原因是难以早期诊断及治疗方式上的局限。尽管目前治疗方式有所发展,但患者的生存率仍然不理想,主要是因为早期即可出现广泛的局部浸润及远处转移<sup>[1]</sup>。更为深入地研究胆管癌肿瘤的发生发展,

远处转移及耐药性等的分子机制可能是目前胆管癌研究的一个方向<sup>[2]</sup>。研究表明肿瘤细胞的代谢是有氧酵解取代氧化磷酸化,即 Warburg 效应,而 M2-型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2,PKM2)就是此效应的关键酶<sup>[3]</sup>,丙酮酸激酶(PK)是糖酵解重要的一种分子,哺乳动物细胞中有 4 个 PK 亚型:PKL 在肝脏和肾脏中表达,PKR 在红血细胞中表达,PKM1 在肌肉和脑中表达,PKM2 (PKM1 的剪接变体)在胚胎和肿瘤细胞中表达。丙酮酸激酶同工酶类型 L、R 和 M1 通常是高活性的四聚体的形式,PKM2 则会有四聚体和几乎无活性二聚体两种形式<sup>[4]</sup>。PKM2 在肿瘤方面的相关功能研究已经有所进展,PKM2 通过调节 Bcl-xL 影响胃癌细胞的增殖,调节组蛋白类 H3 的磷酸化促进神经胶质细胞的增殖<sup>[5-6]</sup>。上皮间质转变(epithelial to mesenchymal transition,EMT)是一种上皮样癌细胞获得间质特性,经过深度细胞骨架重塑从而促进细胞扩散和转移潜能的过程<sup>[5]</sup>,上皮间质转变已经被证明了与胆管癌的恶性行为(淋巴转移、静脉侵袭、晚期肿瘤分期、低分化和预后不良)相关<sup>[6]</sup>。最近有报道称 PKM2 在通过调节上皮生长因子(EGF)影响上皮间质转变,从而影响肝细胞肝癌的侵袭和迁移,但还有待证实<sup>[7]</sup>。既然 PKM2 可促进肿瘤细胞的增殖又可以通过调节 EGF 影响上皮间质转变,而上皮间质转变与胆管癌的恶性行为密切相关,因此 PKM2 是否可影响胆管癌细胞的迁移、侵袭及增殖就成为本课题关注的焦点。本实验在不同的胆管癌及癌旁组织中检测 PKM2 的表达差异,采用慢病毒转染技术降低人胆管癌细胞 HuCCT-1、HCCC-9810 中 PKM2 的表达水平,并采用划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验、CCK-8 法观察下调 PKM2 基因的表达对细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响。

## 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<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>(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),兔抗人 PKM2 多克隆抗体、小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology

公司,美国)。

293T、HuCCT-1、HCCC-9810 细胞株由卫生部活体肝移植重点实验室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PKM2 基因干扰重组质粒的构建

由 Invitrogen 网站获得 PKM2 的干扰质粒短发夹 RNA (PKM2-shRNA) 序列,序列如下:PKM2-shRNA Forward:5' -AACGCTGTGGCTCTAGACAC-TAAACTCGAGTTTACTGTCTAGAGCCACAGCTTT-TTC-3',Reverse:5' -TCGAGAAAAAGCTGTGGCTCTAGACACTAAACTCGAGTTTACTGTCTAGAGCCA-CAGCGTT-3',PKM2-shRNA(由南京斯普金生物科技有限公司合成)亚克隆至 pLL3.7(南京医科大学陈云教授赠),获得 PLL3.7-PKM2-shRNA 质粒。

#### 1.2.2 慢病毒的包装及感染

将空载对照组质粒 pLL3.7、实验组质粒 pLL3.7-PKM2-shRNA 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,转染后 48 h 收取 PKM2-NC(空载对照组)、PKM2-shRNA(实验组)病毒上清。取状态良好的 50%~70%融合的 HuCCT-1、HCCC-9810 细胞,加入制备好的病毒液和 polybrene(8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),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 HuCCT-1-NC、HuCCT-1-PKM2-shRNA、HCCC-9810-NC、HCCC-9810-PKM2-shRNA 细胞。

#### 1.2.3 qRT-PCR

收集南京医科大学第一附属医院胆管癌患者手术切除后,经病理证实为胆管癌的胆管癌组织和对应的癌旁组织标本 40 对 TRIzol 法提取 40 对胆管癌、癌旁组织标本及 HuCCT-1(正常对照组)、HuCCT-1-NC(空载对照组)、HuCCT-1-PKM2-shRNA(实验组)、HCCC-9810(正常对照组)、HCCC-9810-NC(空载对照组)、HCCC-9810-PKM2-shRNA(实验组)细胞的总 RNA,逆转录得 cDNA。PKM2 上游引物:5'-ATGTCGAAGCCCCATAGTGAA-3'、下游引物:5'-TGGGTGGTGAATCAATGTCCA-3',GAPDH 上游引物:5'-GGAGCGAGATCCCTC-CAAAAT-3'、下游引物:5'-GGCTGTTGTCAT-ACTTCTCATGG-3',(引物由上海 Invitrogen 公司合成)。qRT-PCR 应用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>(TaKaRa 公司,日本)试剂盒,在 ABI PRISM<sup>®</sup> 7500 型荧光定量仪上进行,反应体系:SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>(TaKaRa 公司,日本)( $\times 2$ )10  $\mu\text{L}$ ,模板 2  $\mu\text{L}$ ,

上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 灭菌蒸馏水 7.2  $\mu\text{L}$ 。Real-time PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 40 次。

#### 1.2.4 免疫组织化学染色

40 对胆管癌组和对应的癌旁组织经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切成 4  $\mu\text{m}$  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, 兔抗人 PKM2 多克隆抗体 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭孵育过夜, 加生物素二抗, 加辣根过氧化物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(ZSG-BIO)。

#### 1.2.5 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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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, 凝胶电泳成像系统进行读片分析, 实验重复 3 次。

#### 1.2.6 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  $\mu\text{L}$ /孔 (低温条件下), 37 $^{\circ}\text{C}$  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。取对数生长期的 HuCCT-1 (正常对照组)、HuCCT-1-NC (空载对照组)、HuCCT-1-PKM2-shRNA (实验组) 细胞, 0.25% 胰酶消化, 用 1% 胎牛血清 DMEM 培养基制备成  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液, 取 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ , 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。

#### 1.2.7 细胞迁移实验

取对数生长期的 HCCC-9810 (正常对照组)、HCCC-9810-NC (空载对照组)、HCCC-9810-PKM2-shRNA (实验组) 细胞, 胰酶消化吹打并充分重悬为单细胞悬液后, 细胞计数板计数, 将细胞数稀释至  $5 \times 10^6$  个/mL, 接种至 6 孔板培养板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养, 待细胞长成单层后弃去培养液, 用灭菌枪头在 6 孔培养板底部单层细胞的中央划出一划痕, 洗去死细胞, 分别于 0、48、96 h 拍照, 实验重复 3 次。

#### 1.2.8 CCK-8 实验检测细胞的增殖活性

取对数生长期的 HCCC-9810 (正常对照组)、HCCC-9810-NC (空载对照组)、HCCC-9810-PKM2-shRNA (实验组) 细胞制成单细胞悬液, 分别以  $2 \times 10^4$  个/mL 细胞密度接种于 96 孔培养板 (100  $\mu\text{L}$ /孔) 后继续培养, 培养液为空白对照, 四周的孔用 PBS 填充。每隔 24 h 检测 1 次, 连续培养 8 d, 每次各组随机选择 3 个孔, 每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 培养 2 h 后酶标仪测定波长 450 nm 处各孔的吸光度值, 绘制细胞生长曲线, 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 qRT-PCR 及免疫组化测定 PKM2 在人类胆管癌及癌旁组织中的表达

qRT-PCR 实验结果显示, PKM2 在 40 例胆管癌和相应癌旁组织中都有表达, 胆管癌组织中 PKM2 的表达高于癌旁组织 ( $P < 0.01$ , 图 1)。免疫组

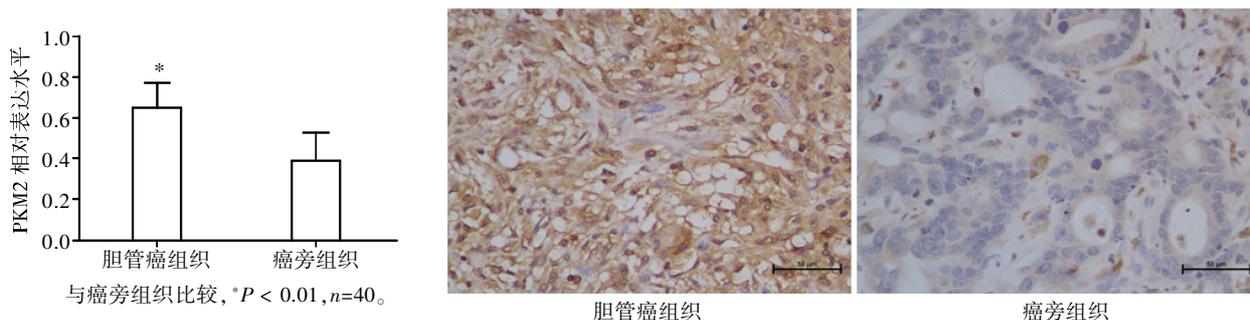


图 1 PKM2 在胆管癌标本中的表达高于癌旁组织 (免疫组化,  $\times 400$ )

Figure 1 The expression of PKM2 was higher in CCA tissues than that in adjacent normal tissues (IHC,  $\times 400$ )

织化学检测也显示 PKM2 在癌组织中的表达高于癌旁组织(图 1)。

2.2 空载对照组质粒 PLL3.7、实验组质粒 PLL3.7-PKM2-shRNA 在 HuCCT-1、HCCC-9810 细胞中的转染和表达

由于本实验中干扰质粒的表达载体 PLL3.7 携带有绿色荧光蛋白基因,故可以通过观察荧光强度检测转染效率。倒置荧光显微镜观察显示:正常对照组无绿色荧光,空载对照组和实验组细胞中绿色荧光蛋白的表达率高于 95%(图 2)。

2.3 qRT-PCR、Western blot 测定 PKM2 基因在正常对照组、空载对照组、实验组中的表达

慢病毒感染 HuCCT-1、HCCC-9810 细胞的

PKM2 mRNA 及蛋白表达明显低于正常对照组和空载对照组的细胞( $P < 0.01$ ),正常对照组与空载对照组相比,PKM2 mRNA 及蛋白水平无明显变化,与对照组之间没有明显差异( $P > 0.05, n = 3$ , 图 3)。

2.4 PKM2 表达下调抑制 HuCCT-1 细胞侵袭

结晶紫染色风干后,在倒置显微镜下观察各组穿膜细胞数,发现实验组穿膜细胞数为( $130 \pm 7$ )个,正常对照组为( $210 \pm 11$ )个,空载对照组为( $198 \pm 15$ )个。与对照组相比,实验组细胞的侵袭能力显著减弱( $P < 0.01$ ),而两对照组之间无明显差异( $P > 0.05$ ,图 4)。

2.5 PKM2 表达下调抑制 HCCC-9810 细胞迁移

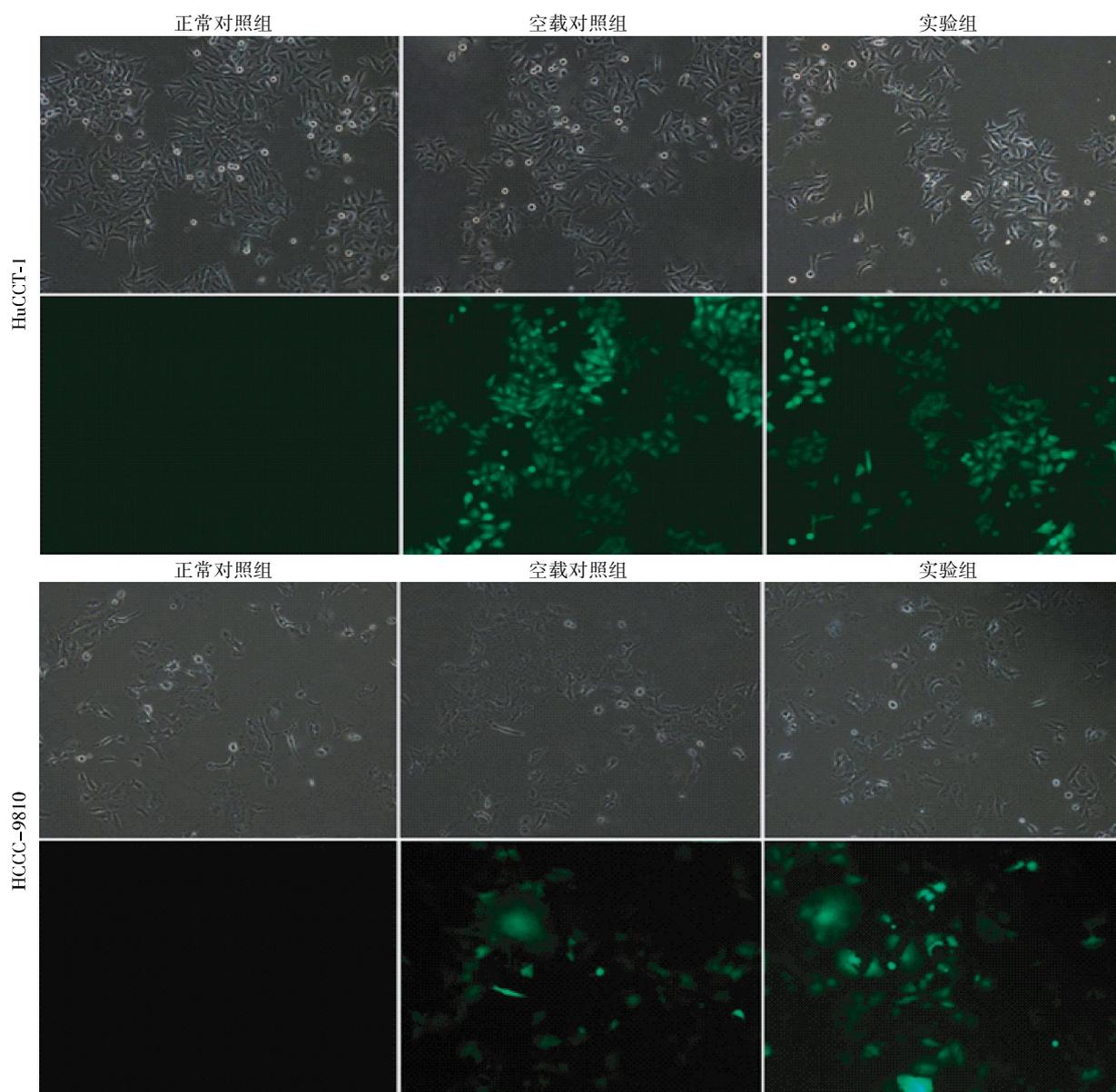
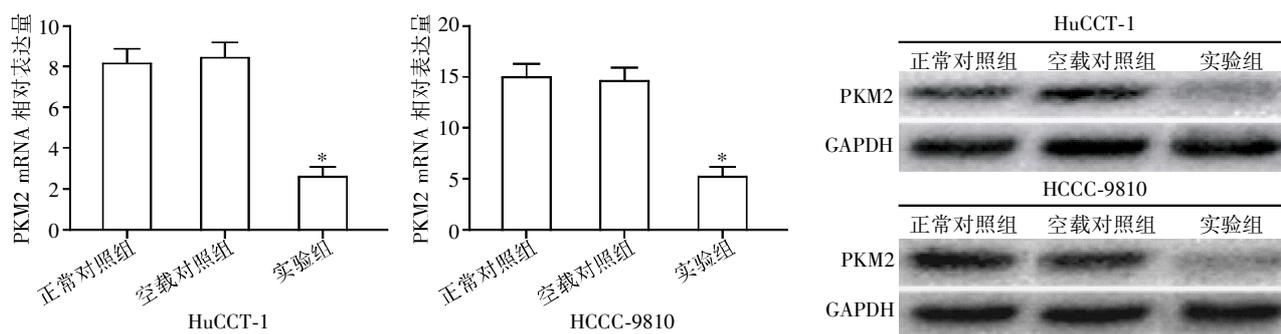


图 2 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达(×200)

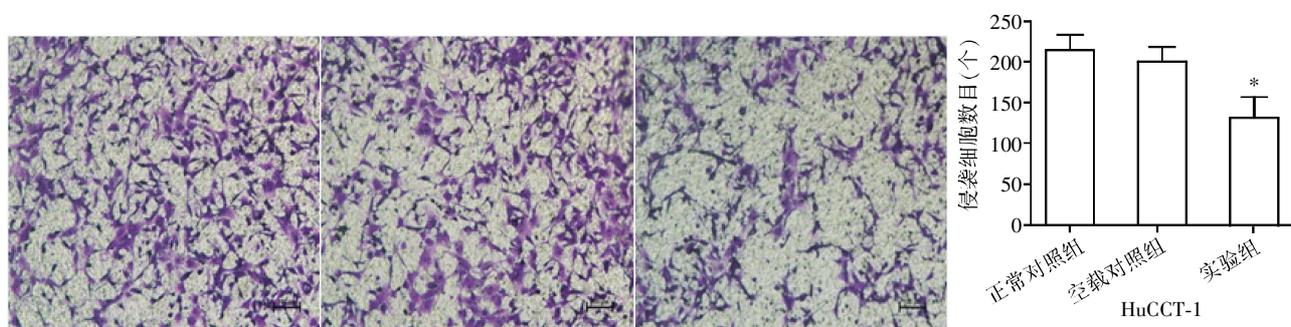
Figure 2 Expressions of green fluorescent proteins were observed by fluorescence microscopy(×200)



与两对照组比较, \* $P < 0.01, n=3$ 。

图 3 qRT-PCR, Western blot 检测稳定转染细胞中 PKM2 的表达

Figure 3 qRT-PCR, Western blot analysis of PKM2 expression in stably transfected cells



与 2 个对照组比较, \* $P < 0.01, n=3$ 。

图 4 PKM2-shRNA 显著降低 HuCCT-1 人胆管细胞型肝癌细胞侵袭( $\times 100$ )

Figure 4 HuCCT-1 human liver cancer cells invasion significantly inhibited by PKM2-shRNA( $\times 100$ )

观察划痕后 48 h 和 96 h 的修复情况, 发现正常对照组和空载对照组的愈合明显快于实验组。48 h 时正常对照组愈合程度已达到 34%, 空载对照组愈合近 30%, 而实验组愈合程度约 18%, 实验组与对照组间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而两对照组之间无明显差异( $P > 0.05$ , 图 5), 但划痕实验的观察时间远大于细胞的增殖周期, 所以划痕愈合的差异不能排除有细胞增殖差异带来的影响。

### 2.6 PKM2 表达下调抑制 HCCC-9810 细胞增殖

利用 CCK-8 实验检测 PKM2 对 HCCC-9810 增殖活性的影响。与对照组相比较, 实验组细胞增殖活力较低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 正常对照组与空载对照组之间差异没有统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 6), 提示下调 PKM2 的表达能抑制 HCCC-9810 细胞的增殖活性。

## 3 讨论

原发性肝癌分为肝细胞型肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、胆管细胞型肝癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 和混合型肝癌 (combined hepatocellular

and cholangiocarcinoma, cHCC)。CCA 是仅次于 HCC 的第二大原发性肝癌, 临床上出现症状较晚, 早期诊断困难, 且因胆管癌所处的解剖位置特殊及其向周围组织、血管、神经浸润的特点, 外科手术切除率低, 目前对高侵袭性胆管癌的治疗并不满意, 预后取决于切缘的完整性和是否有远处转移, 因此阐明胆管癌转移过程中分子机制有明显的临床意义, 而侵袭和迁移是有利于恶性肿瘤细胞转移的一个关键表型<sup>[8]</sup>。正常的 EMT 发生于胚胎的发育和器官生成阶段, 但异常的 EMT 与肿瘤的发生和发展有关, 肿瘤细胞 EMT 的发生包括诸多因素, 主要有转录因子表达上调以及信号通路开启等, 从而促使细胞间黏附力下降, 失去了上皮细胞的顶底极性, 并伴随细胞形态的改变。在结肠癌、肝癌和乳腺癌等多种肿瘤中发现 EMT 与肿瘤细胞的原发性浸润和继发性转移有着非常密切的关系<sup>[9]</sup>。PKM2 是新近发现的肿瘤相关基因, 到目前为止, 关于 PKM2 基因的具体作用机制及功能尚未达成一致意见。已有研究表明在神经胶质瘤细胞中的 miRNA-326 作用于 PKM2 抑制细胞增殖并可以促进凋亡, 核 PKM2 在人类胶质细胞瘤、前列腺癌、乳腺癌细

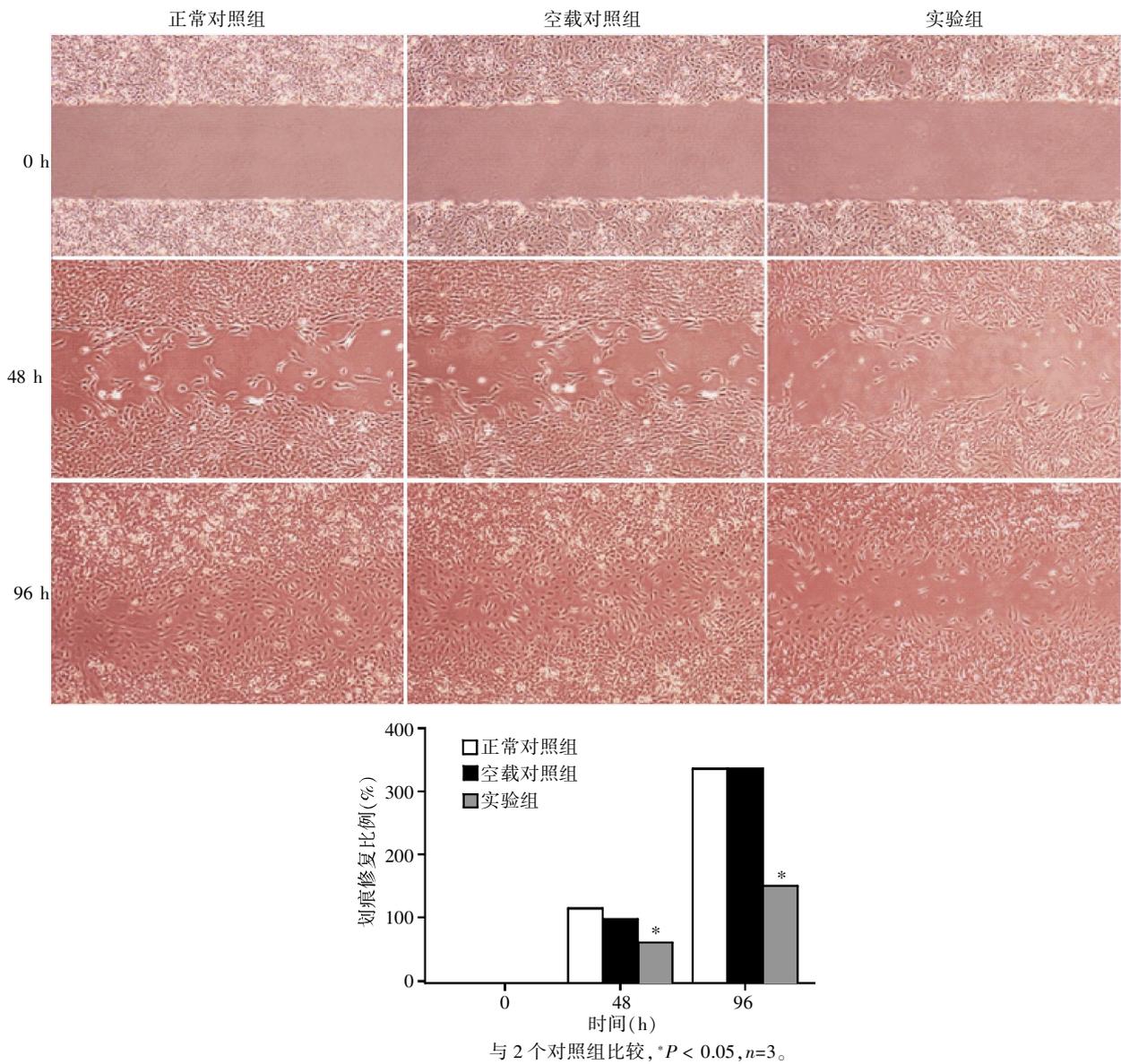


图 5 PKM2-shRNA 显著降低 HCCC-9810 人胆管细胞型肝癌细胞迁移( $\times 100$ )

Figure 5 HCCC-9810 human liver cancer cells migration significantly inhibited by PKM2-shRNA( $\times 100$ )

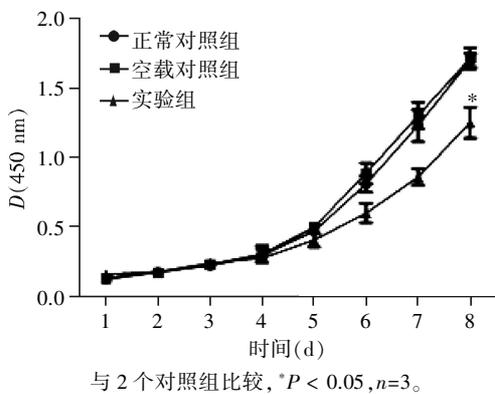


图 6 PKM2-shRNA 显著降低 HCCC-9810 人胆管细胞型肝癌细胞增殖

Figure 6 HCCC-9810 human liver cancer cells proliferation significantly inhibited by PKM2-shRNA

胞中能够激活基因转录和细胞增殖,PKM2 的高表达与结直肠癌转移有密切关系,但是具体机制尚不清楚<sup>[10-12]</sup>。PKM2 在肝脏恶性肿瘤中的作用研究较少,但最近有学者研究表明,肝细胞癌中下调 PKM2 的表达可以明显抑制 EMT,沉默 PKM2 能够抑制细胞的运动能力<sup>[7]</sup>。但 PKM2 在胆管癌中的作用尚无报道,为了进一步探索 PKM2 在胆管癌中的作用,本研究通过 qRT-PCR 及 IHC 比较不同胆管癌患者的手术标本,发现在肿瘤组织中 PKM2 的 mRNA 及蛋白水平明显高于对应的癌旁组织(33/40,  $P < 0.01$ ),因此本文认为 PKM2 可能在胆管癌中有重要作用,推测 PKM2 在胆管癌细胞侵袭转移有重要作用。为此本研究通过 shRNA 干扰 HuCCT-1、

HCCC-9810 细胞中 PKM2 的表达,获得 PKM2 含量降低的胆管癌细胞,初步用于研究 PKM2 在胆管癌细胞中的作用。用划痕实验和细胞侵袭实验检测细胞迁移及侵袭情况,结果显示与对照组相比,PKM2 的表达下调能显著抑制胆管癌细胞的迁移和侵袭 ( $P < 0.05$ )。由于划痕实验周期较长,划痕愈合的差异不能排除细胞增殖差异带来的影响,因此本研究用 CCK-8 实验检测细胞增殖,结果显示 PKM2 表达的下调能显著抑制胆管癌细胞的增殖,提示划痕实验的结果可能存在迁移和增殖两方面共同的作用。但 PKM2 是通过哪些靶基因参与到编码基因的调控网络中,尚待后续研究确认。

综上所述,本研究结果表明 PKM2 可调节胆管癌细胞体外的迁移、侵袭和增殖,具有广泛的生物学效应,但 PKM2 能否成为胆管癌靶向治疗的靶点,及其在胆管癌中的重要作用及相应分子机制还需要更深入的研究。

[参考文献]

[1] Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. *HPB(Oxford)*, 2008, 10(2): 77-82

[2] Timmer MR, Beuers U, Fockens P, et al. Genetic and epigenetic abnormalities in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(8): 1789-1797

[3] 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

[4] Mazurek S, Eigenbrodt E. The tumor metabolome [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2A): 1149-1154

[5] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-890

[6] Yao X, Wang X, Wang Z, et al. Clinicopathological and prognostic significance of epithelial mesenchymal transition-related protein expression in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2012, 5: 255-261

[7] Fan FT, Shen CS, Tao L, et al. PKM2 regulates hepatocellular carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and migration upon EGFR activation [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(5): 1961-1970

[8] Baek S, Lee YW, Yoon S, et al. CDH3/P-Cadherin regulates migration of HuCCCT1 cholangiocarcinoma cells [J]. *Anat Cell Biol*, 2010, 43(2): 110-117

[9] Yap AS, Crampton MS, Hardin J. Making and breaking contacts; the cellular biology of cadherin regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(5): 508-514

[10] Kefas B, Comeau L, Erdle N, et al. Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells [J]. *Neuro Oncol*, 2010, 12(11): 1102-1112

[11] 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

[12] Zhou CF, Li XB, Sun H, et al. Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(9): 775-782

[收稿日期] 2015-01-13

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆  
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。