



· 论 著 ·

肝肿瘤细胞干性与糖代谢特点的相关性研究

李懿晔, 戴 谦, 王蓓丽, 潘柏申, 郭 玮

复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032

[摘要] **背景与目的:** 肝细胞肝癌是致死率第三的恶性肿瘤, 肿瘤干细胞则被认为是肿瘤复发的种子, 而温伯格效应指肿瘤细胞有氧糖酵解的代谢特点。旨在探究肝肿瘤细胞干性与细胞糖代谢特点的相关性。**方法:** 利用流式细胞术分选肝肿瘤细胞系Huh-7、MHCC97H中干性标志物高表达的肿瘤细胞进行无血清悬浮培养, 观察其形态变化并对其干性标志物、糖代谢酶的表达进行检测, 随后对这两种细胞的葡萄糖摄取能力、乳酸生成能力进行对比。**结果:** 肝肿瘤干细胞在无血清悬浮培养的体系中成球, 相比非干性的肿瘤细胞, 成球细胞的糖酵解关键酶和干性标志物的表达有明显的升高 ($P<0.05$), 对葡萄糖的摄取能力及乳酸的生成能力也有明显的增强 ($P<0.05$), 肿瘤细胞的干性与其糖酵解的活跃程度有相关性。**结论:** 无血清悬浮培养技术可用于富集肝肿瘤干细胞; 相比非干性肿瘤细胞, 肝肿瘤干细胞的糖酵解转化程度更高, 肿瘤细胞的干性和肿瘤细胞的糖酵解有相关性。

[关键词] 温伯格效应; 肿瘤干细胞; 无血清悬浮培养

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2019.10.003

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2019)10-0773-07

Correlation between cancer cell stemness and glucose metabolism characteristics in hepatocellular carcinoma

LI Yihao, DAI Qian, WANG Beili, PAN Baishen, GUO Wei (Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: GUO Wei E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma is the third most common malignant tumor worldwide. Cancer stem cells are considered to be the seeds of tumor recurrence, while Warburg effect refers to the aerobic glycolysis characteristic of tumor cells. This study aimed to investigate the relationship between tumor cell stemness and cell glucose metabolism characteristics. **Methods:** Flow cytometry was used to sort the tumor cells with high expression of stem cell markers in liver tumor cell lines Huh-7 and MHCC97H for serum-free suspension culture, and its morphological changes were observed. The expression levels of stem cell markers and glycolysis enzymes, the glucose uptake capacity and lactic acid production ability of the two cell lines were compared. **Results:** Cancer stem cells became spheroid in a serum-free suspension culture system. Compared with non-stem tumor cells, the expression levels of key glycolysis enzymes and stem cell markers in spheroid cells were significantly increased ($P<0.05$). The ability to produce lactic acid was also significantly enhanced ($P<0.05$), and the stemness of tumor cells was related to the activation of glycolysis. **Conclusion:** Serum-free suspension culture can be used to enrich cancer stem cells. Compared with non-stem tumor cells, the transformed degree of glucose metabolism in tumor stem cells is stronger. There is a relationship between the stemness of tumor cells and the activation of glycolytic pathway.

[Key words] Warburg effect; Cancer stem cells; Serum-free suspension culture

近年来, 肿瘤的发病率和死亡率都在不断地增长。有研究报道, 肿瘤相关死亡人数目前已占到了我国全年总死亡人数的25%^[1]。肝癌, 包括肝细胞肝癌和肝内胆管癌, 有着迁延不愈、晚

期患者预后大多不良的特点, 其发病率在国内所有的肿瘤性疾病中位列第四, 而其死亡率则位列第三位; 在世界范围内, 肝细胞肝癌的发病率和死亡率也位居前列^[2]。

20世纪20年代, Otto Warburg首次观察到肿瘤细胞即使在有氧条件下, 其糖代谢过程也会更倾向于糖酵解方向。因此, 肿瘤中这种糖代谢重组特点也被称为“温伯格效应”^[3], 该特点在2011年被归纳入肿瘤的10大特征^[4]。近年来的研究在不断解明温伯格效应产生的具体机制的同时, 也发现了肿瘤中这种代谢特点可能与疾病的预后、肿瘤的恶性程度或其大小相关^[5]; 但也有研究者认为, 在肿瘤组织中, 并不是所有的肿瘤细胞都像研究中已报道的那样执行糖酵解模式, 而是分成了温伯格型细胞和氧化磷酸化型细胞两类肿瘤细胞^[6]。有研究发现, 肿瘤的迁延不愈是由于存在具有自我更新和多向分化能力的肿瘤干细胞, 这类细胞被认为是肿瘤术后复发和转移的最主要因素^[7-8]。迄今为止, 很少有研究指明肿瘤干细胞是否存在糖代谢上的改变。本研究旨在通过对比肿瘤干细胞与一般肿瘤细胞的代谢特点, 探究肿瘤细胞的干性与其糖代谢特征的关联。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

1.1.1 研究对象

人肝肿瘤细胞系Huh-7、人肝细胞系LO2均购自中国科学院典藏培养物保藏委员会细胞库/中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 人肝肿瘤细胞系MHCC97H为复旦大学附属中山医院保存细胞系。

1.1.2 实验试剂

实验所用培养体系中DMEM高糖培养基、DMEM/F12混合培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司, DMEM低糖培养基购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 无血清悬浮培养添加细胞因子B27、bFGF、HGF及EGF也均购自美国Gibco公司, 6孔细胞培养板、超低黏附6孔细胞培养板购自美国Corning公司, 流式细胞术分选所用抗体BV421-EpCAM、PE-CD133、APC-CD90均购自美国BD公司。

RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒均购自QIAGEN公司。实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase

chain reaction, RTFQ-PCR) 引物由铂尚生物技术(上海)有限公司合成, 反应体系为宝日医生物技术(北京)有限公司的TB Green™ Premix Ex Taq™, 相关引物序列见表1^[9-17], RTFQ-PCR反应条件见表2。蛋白质印迹法(Western blot)检测抗体兔抗人Hexokinases II抗体、兔抗人GLUT1抗体、兔抗人PKM2抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 兔抗人LDH-A抗体购自美国Abcam公司, 鼠抗人β-actin抗体购自美国Intech公司, 葡萄糖类似物2-NBDG购自美国Life Technology公司。生成的乳酸含量用美国强生VITROS 5600全自动生化免疫分析仪进行检测。

表1 肿瘤干性标志物和糖代谢酶相关基因名称、引物序列

| Tab. 1 Cancer stem cell markers and glycolysis-related enzyme genes' names and primer sequences | |
|---|---------------------------|
| Gene | Primer sequences (5'-3') |
| CD90 | TGAAGGTCCTCTACTTATCCG |
| | CACGAGGTGTTCTGAGCC |
| CD133 | CCGCAGGAGTGAATCTTT |
| | AGGACTCGTTGCTGGTGA |
| EpCAM | GAAGGCTGAGATAAAGGAGATGGG |
| | TTAACGATGGAGTCCAAGTTCTGG |
| CD24 | CTCTACCCACGCAGATTTATTC |
| | AGAGTGAGACCACGAAGAGAC |
| HK-II | GCAGCGCATCAAGGAGAACAAAG |
| | GGAGCGGAGGAAGCGGACAT |
| PKM2 | CTGGGGCTGCTGTGGACTTG |
| | AGATGCCTTGCGGATGAATGAC |
| LDH-A | CAACATGGCAGCCTTTTCCTTAGA |
| | ATCCAGATTGCAACCGCTTCC |
| GLUT-1 | ACCAGCTGGGCATCGTCGTC |
| | TGTCCC CGCAGCTTCTTTAG |
| HIF-1α | AGAAGA ACTTTTAGCCCGCTCAAT |
| | TTTCAACCCAGACATATCCACCTC |
| β-actin | AGCGAGCATCCCCAAAAGTT |
| | GGGCACGAAGGCTCATCATT |

表2 RTFQ-PCR反应条件

| Tab. 2 Reaction conditions of RTFQ-PCR | | | |
|--|-------|---------------------------|---------------------|
| Program | Cycle | Reaction temperature T/°C | Reaction time t/min |
| 1 | 1 | 95 | 10.0 |
| 2 | 45 | 95 | 0.5 |
| | | 56 | 0.5 |
| | | 72 | 0.5 |
| 3 | 1 | 40 | 0.5 |

1.2 方法

1.2.1 干细胞流式分选和培养

对肝癌细胞系Huh-7、MHCC97H的干细胞标志物(EpCAM、CD90、CD133)进行标记,用BD FACS AriaII流式细胞分选仪分选干性标志物阳性的细胞,对其计数后进行无血清DMEM/F12培养基(含2%生长因子B27、20 ng/mL的bFGF、10 ng/mL的HGF及20 ng/mL的EGF)悬浮培养,干性标志物阴性的细胞作为对照组细胞用同样的方式进行培养,培养条件为37 °C、CO₂体积分数为5%的环境中,每2天根据培养情况更换或补充培养基。

1.2.2 RTFQ-PCR和Western blot检测

培养完成后提取RNA,逆转录后运用RTFQ-PCR以 β -actin为内参,对成球细胞和对照组细胞的干性标志物、糖代谢酶相关基因表达进行相对定量^[9-17]。提取蛋白变性后在10%SDS-PAGE中以 β -actin为内参,对糖代谢酶蛋白表达量进行电泳检测。

1.2.3 细胞葡萄糖摄取实验

细胞分选、计数成球培养后,分别取 5×10^4 个Huh-7、MHCC97H的成球和非成球细胞混合,用低糖型无血清DMEM培养基饥饿处理后加入浓度为150 μ mol/L的2-NBDG温育,用DAPI染色后在荧光显微镜的FITC/DAPI通道下镜检拍照,并用BD FACS AriaII流式细胞分选仪对其细胞内FITC通道的平均荧光强度进行检测和计算^[18-19]。

1.2.4 细胞乳酸生成实验

细胞分选、成球培养后,分别取 4×10^3 个Huh-7、MHCC97H的成球和非成球细胞接种入24孔细胞培养板上1 mL的高糖型DMEM培养基中。培养4 h后,对其培养上清液中乳酸的生成量进行检测。

1.3 统计学处理

采用Microsoft Office Excel 2013、IBM SPSS 24.0软件进行统计学分析,采用GraphPad Prism 6.0软件进行相关图像的绘制。RTFQ-PCR结果采用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法 $[\Delta\Delta Cq = \Delta Cq(\text{target cell}) - \Delta Cq$

(control group cell), $\Delta Cq = Cq(\text{target}) - Cq(\beta\text{-actin})$]进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝肿瘤干细胞具有较强的成球能力

采用流式细胞术分选干性标志物(CD90、CD133、EpCAM)dim区和pos区的细胞(图1A为分选的huh7干性标志物阳性细胞,图1B为分选的MHCC97H干性标志物阳性的细胞)并进行无血清悬浮培养10 d后,在倒置显微镜下观察可见相比干性标志物阴性的细胞,干性标志物阳性细胞已成明显的球状(图1C)。分别对成球细胞和非成球的干性标志物进行RTFQ-PCR验证,结果显示,成球细胞的干性标志物的表达较非成球细胞更显著(图1D, $P < 0.05$)。这一结果表明,相比不表达干性标志物的肝肿瘤细胞,表达干性标志物的肿瘤细胞在无血清悬浮培养环境中能够成球,这一培养模式能作为富集肿瘤干细胞的手段。

2.2 肿瘤干细胞具有较强的糖酵解代谢酶表达

以人肝细胞系LO2为对照、 β -actin为内参,对成球、非成球肿瘤细胞丙酮酸激酶同工酶M2(pyruvate kinase isozyme M2, PKM2)、葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1, GLUT-1)、乳酸脱氢酶A(lactate dehydrogenase A, LDH-A)、己糖激酶2(hexokinase II, HK-II)等糖酵解关键酶的表达情况分别通过RTFQ-PCR和Western blot进行了验证(图2)。GLUT-1、PKM2和LDH-A等糖酵解关键酶在肝肿瘤细胞系中的表达较正常肝细胞均有显著的升高(图2A, $P < 0.05$),而其在成球细胞中的表达较非成球细胞则有更进一步地升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。在蛋白水平上,相比非成球细胞,成球细胞LDH-A、PKM2、HK2及GLUT-1的表达也有显著的提升。该结果表明,肿瘤干细胞的糖酵解相关酶的表达量相比非成球的肿瘤细胞更高,提示肿瘤干细胞所含有的糖酵解酶含量更丰富,肿瘤干细胞的代谢向糖酵解转变的程度更高(图2B)。

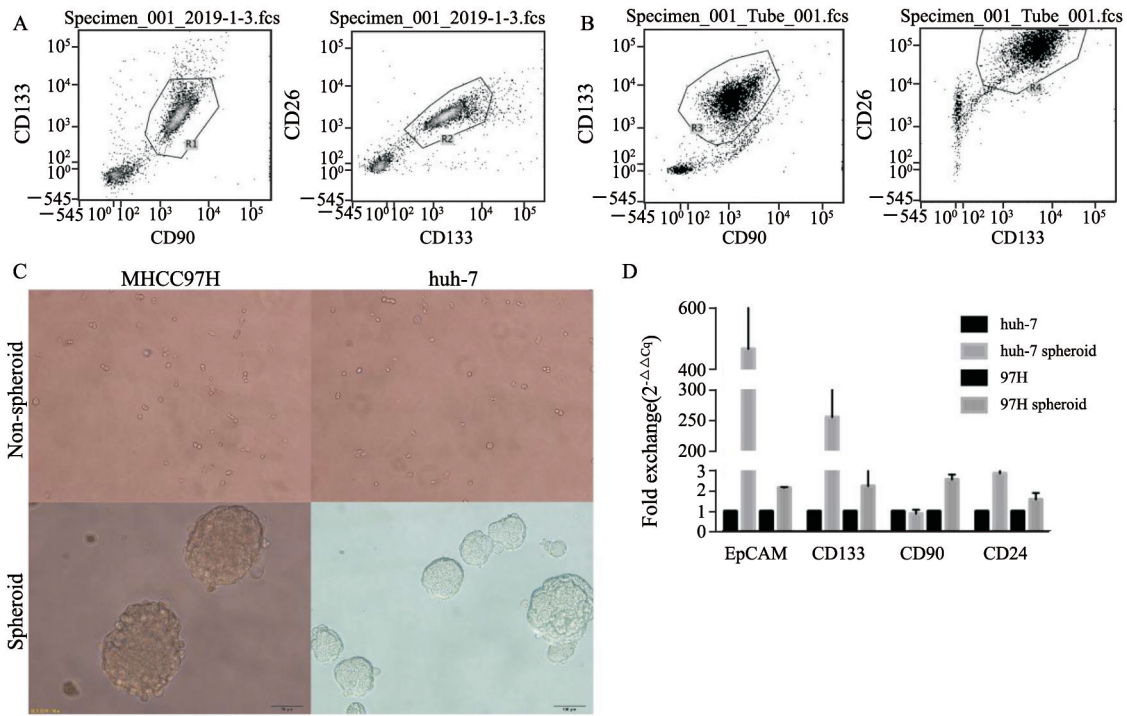


图 1 干性标志物阳性的肝肿瘤细胞具有成球能力

Fig. 1 HCC cells with positive cancer stem cell markers could shape spheroids

A: Screening of the cancer stem cell marker-positive Huh-7 cells, and sorting the cells expressing CD133, CD90 and EpCAM (CD326) into dim or pos; B: Screening of cancer stem cell marker-positive MHCC97H cells, and sorting cells expressing CD133, CD90, and EpCAM (CD326) into dim or pos; C: Serum-free suspension culture results of MHCC97H cells and Huh-7 cells sorted by flow cytometry; D: Comparison of cancer stem cell marker expressions between spheroid Huh-7, MHCC97H cells and non-spheroid Huh-7, MHCC97H cells after serum-free suspension culture

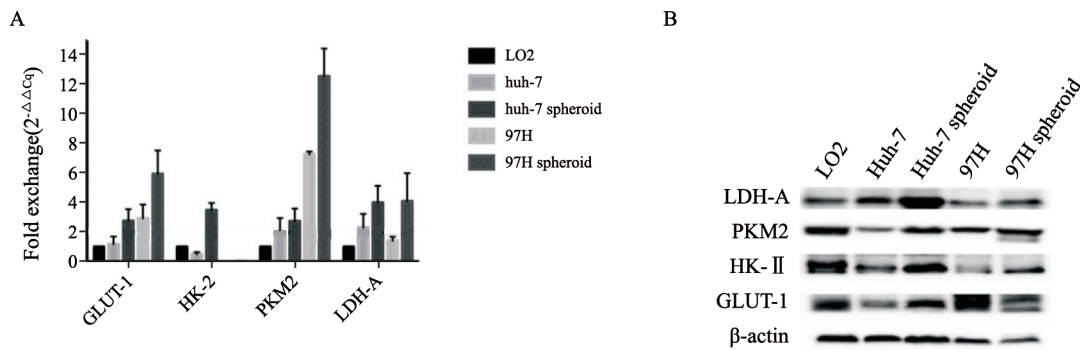


图 2 成球与非成球细胞糖酵解酶/蛋白表达情况图

Fig. 2 Comparison of glycolysis enzymes and proteins between spheroid and non-spheroid cells

A: mRNA expression of glycolytic key enzymes in liver cell line LO2, spheroid and non-spheres Huh-7, MHCC97H cells; B: Expression of glycolytic key enzyme protein in liver cell line LO2, spheroid and non-spheres Huh-7 and MHCC97H cells

2.3 肿瘤干细胞具有较强的葡萄糖摄取能力

本实验中采用了2-NBDG对成球及非成球细胞在同一葡萄糖供应体系下对葡萄糖的摄取能力进行了对比。图3A为MHCC97H细胞组、Huh-7细胞组的2-NBDG摄取结果图, 图中绿色荧光为被细胞摄取后的2-NBDG; 蓝色荧光为DAPI染色后的细胞核成分。在荧光显微镜下可见, 在同一葡萄糖供应体系下成球细胞有着对葡萄糖明显更

多的摄取, 表明肿瘤干细胞的葡萄糖摄取能力显著强于非干性肿瘤细胞。

将摄取了2-NBDG的成球与非成球Huh-7细胞, 采用流式细胞术检测其荧光强度, 结果显示, 其平均荧光强度也存在着显著的差异。灰色为未摄取2-NBDG的背景荧光, 紫色为摄取2-NBDG后的非成球细胞, 蓝色为摄取2-NBDG后的成球细胞, 成球肿瘤细胞的平均荧光强度明

显高于非成球的肿瘤细胞的平均荧光强度（成球组平均荧光强度为17 637，非成球组平均荧光强度为12 567， $P<0.05$ ），这也说明成球细胞对葡萄糖的摄取能力明显高于非成球细胞（图3B）。

2.4 肿瘤干细胞具有较强的乳酸生成能力

本实验通过对定量的成球和非成球细胞在含

有等量葡萄糖的等量培养基中产生的乳酸情况进行对比。在相同条件下，成球肿瘤细胞培养后产生并排至细胞上清液中的糖酵解终产物——乳酸的量较非成球细胞更多。本研究中成球肿瘤细胞不仅葡萄糖摄取能力高，成球肿瘤细胞的糖酵解能力也明显强于非成球细胞（表3）。

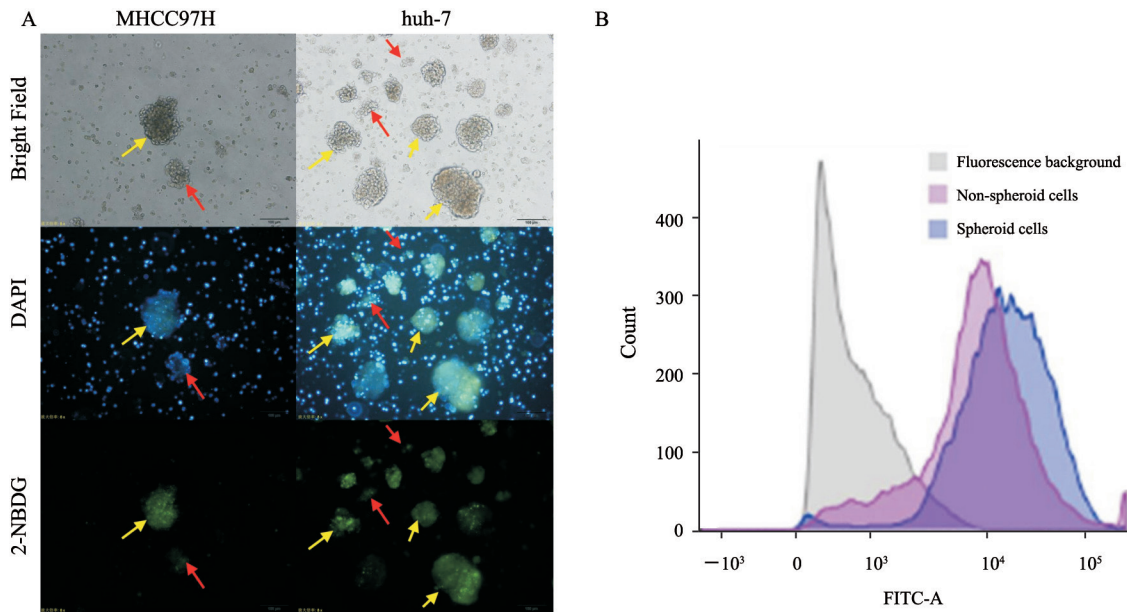


图3 成球与非成球细胞葡萄糖摄取能力结果图

Fig. 3 Comparison of glucose uptake ability between spheroid and non-spheroid cells

A: Fluorescence microscopy of glucose uptake by spheroid cells and non-spheroid cells in the same glucose supplement system (yellow arrows showed the spheroid cells, red arrows showed the non-spheroid cells); B: Fluorescence intensity of glucose uptake in spheroid and non-spheroid Huh-7 cells in the same glucose supplement system

表3 成球与非成球细胞乳酸生成能力对比

Tab. 3 Comparison of lactic acid production ability between spheroid and non-spheroid cells

| Item | Blank control | Huh-7 | Huh-7 spheroid | MHCC97H | MHCC97H spheroid |
|---------------------------------------|---------------|----------|-----------------|----------|------------------|
| Lactic acid $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$ | $<0.5^*$ | $<0.5^*$ | 0.60 ± 0.07 | $<0.5^*$ | 1.40 ± 0.04 |

*: The detection limit of the lactic acid detection kit was 0.5 mmol/L, and <0.5 indicated that the amount of lactic acid produced was below detection limit

3 讨 论

近年来，肿瘤的发病率和死亡率都呈逐年上升的趋势，在我国，肝癌一直以来都是威胁人们健康的一个重大问题，2015年因肝癌死亡的患者就达到了422 100例。虽然目前针对肝细胞肝癌的治疗手段有外科手术、介入手术等，但这类患者很多仍难以逃过术后疾病复发、肿瘤迁延不愈的问题。

肿瘤干细胞有着和正常干细胞一样的自我更新、多能分化的特点。肿瘤干细胞的这一特点也被认为与肿瘤的发生、发展、转移以及抗癌药物耐药性的产生有着千丝万缕的联系。为了能发现肿瘤干细胞的存在，近年来建立了许多富集肿瘤干细胞的方法，包括阳选法、阴选法、无血清悬浮培养等。其中，阳选法的思路也被用于循环肿瘤细胞的富集中。另外，研究也发现了许多肿瘤的干性标志物，包括CD90、EpCAM、CD133和CD24^[9-12]等。而由于肿瘤细胞存在异质性，仅

运用单一的肿瘤细胞表面标志物可能产生漏检的情况。无血清悬浮培养技术是一种较为经济实用的富集手段^[20], 本研究也将阳选法和无血清悬浮培养法用于肝癌干细胞的富集中。

另一方面, 肿瘤细胞的代谢也是近年来学者们关注的焦点之一。肿瘤细胞的温伯格效应, 或称“有氧糖酵解”现象就是肿瘤代谢重组的一个重要的特点。众所周知, 肿瘤细胞的生长需要大量的ATP, 而有氧糖酵解相比氧化磷酸化, 其产能水平和效率都远为低下。目前的研究也发现, 为了弥补这种产能效率的不足, 肿瘤细胞往往都倾向于提升其对葡萄糖的摄取、提升其糖酵解酶的作用以及增加代谢副产物的排泌等, 最典型的改变就表现在肿瘤细胞糖酵解相关酶/蛋白的表达量、功能的提升上, 如GLUT-1、HK- II、PKM2和LDH-A等。目前的研究中也有学者证实, 肿瘤细胞“有氧糖酵解”的代谢重组现象也与某些癌基因(如*ras*、*myc*等)及相关信号通路的激活和(或)抑癌基因^[21-22](如*p53*等)的失活以及肿瘤相关信号转导蛋白的表达增加(如HIF-1 α 等)^[23]有关, 而这些基因的改变也能影响肿瘤细胞的增殖能力。

本研究首先根据先前的研究^[9-12,24], 根据CD133、CD90和EpCAM等干性标志物的表达情况对Huh-7和MHCC97H细胞进行分选后培养, 结果发现, 干性标志物高表达的肿瘤细胞能在无血清悬浮培养的环境中成球; 对这两种细胞的干性标志物进行转录本水平的分析表明, 成球细胞的干性标志物较非成球细胞的表达有着显著的提升。由此可见, 肿瘤干细胞有着能在无血清悬浮培养的环境中成球的特点, 这一培养条件能作为富集肿瘤干细胞的手段。

本研究以永生的人肝细胞系LO2为对照, 对成球细胞和非成球细胞糖酵解酶的mRNA和蛋白表达进行了检测。结果显示, 除了HK- II, 相比正常肝细胞系LO2, 肝癌细胞系Huh-7和MHCC97H的糖酵解酶mRNA表达更高, 而成球细胞的糖酵解酶mRNA表达显著高于非成球细胞。在蛋白水平上, 成球Huh-7细胞的LDH-A、PKM2、HK- II和GLUT-1的表达均显著高于非

成球Huh-7细胞, 也均高于LO2细胞; 而成球的MHCC97H细胞也有类似的表现(GLUT-1除外)。这提示我们, 相比非成球肿瘤细胞及正常肝细胞, 成球肿瘤细胞的糖酵解酶的转录和表达更丰富。在荧光显微镜下对比成球细胞与非成球细胞在同一葡萄糖供应体系中对葡萄糖类似物2-NBDG的摄取可见, 成球细胞摄取的2-NBDG的荧光相比非成球细胞中更为明亮和丰富, 提示成球细胞对葡萄糖的摄取能力远高于非成球细胞, 流式细胞术的检测结果也证实了这一点; 同时, 在相同培养条件下, 成球细胞的乳酸生成量远高于非成球细胞, 表明干性表达的成球细胞的糖代谢重构程度远高于非干性的非成球细胞, 肿瘤干细胞对葡萄糖的摄取和利用能力更强, 糖酵解通路更活跃, 结果提示肿瘤糖代谢重构的程度和肿瘤细胞的干性表达存在相关性。

综上所述, 本研究结果表明, 无血清悬浮培养是一种可用来富集肝肿瘤干细胞的体外培养方式; 此外我们也观察到肝肿瘤干细胞的糖酵解活跃程度高于非干性的肿瘤细胞。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] KROEMER G, POUYSSEUR J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel [J]. Cancer Cell, 2008, 13(6): 472-482.
- [4] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [5] 魏慧君, 郭丽丽, 李 林, 等. Warburg效应及其对肿瘤转移的影响 [J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(3): 179-183.
- [6] KENNEDY K M, DEWHIRST M W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation [J]. Future Oncol, 2010, 6(1): 127-148.
- [7] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [8] YAMASHITA T, JI J, BUDHU A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features [J]. Gastroenterology, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [9] CLEVERS H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges [J]. Nat Med, 2011, 17(3): 313-319.
- [10] SHI G M, XU Y, FAN J, et al. Identification of side population

- cells in human hepatocellular carcinoma cell lines with stepwise metastatic potentials [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(11): 1155–1163.
- [11] ZHU L, GIBSON P, CURRLE D S, et al. Prolamin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation [J]. *Nature*, 2009, 457(7229): 603–607.
- [12] YANG Z F, HO D W, NG M N, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153–166.
- [13] LIU W R, TIAN M X, YANG L X, et al. PKM2 promotes metastasis by recruiting myeloid-derived suppressor cells and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 846–861.
- [14] RONG Y, WU W, NI X, et al. Lactate dehydrogenase A is overexpressed in pancreatic cancer and promotes the growth of pancreatic cancer cells [J]. *Tumor Biol*, 2013, 34(3): 1523–1530.
- [15] AMANN T, MAEGDEFRAU U, HARTMANN A, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1544–1552.
- [16] 李澎瀛, 张东阳, 吴美玲, 等. 缺氧条件下肝癌细胞和正常肝细胞能量代谢通路的差异 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2016, 43(2): 127–134.
- [17] 蒋晓忠, 严律南, 孙广运, 等. 原发性肝细胞癌组织HIF-1 α 和HK-II及LDH-V表达生物学意义分析 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(1): 41–44.
- [18] TESLAA T, TEITELL M A. Techniques to monitor glycolysis [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 542: 91–114.
- [19] O'NEIL R G, WU L, MULLANI N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells [J]. *Mol Imaging Biol*, 2005, 7(6): 388–392.
- [20] GEDYE C, AILLES L. Isolation and characterization of cancer stem cells *in vitro* [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 181–204.
- [21] LEVINE A J, PUZIO-KUTER A M. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1340–1344.
- [22] DEBERARDINIS R J, LUM J J, HATZIVASSILIOU G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation [J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1): 11–20.
- [23] WANG H J, HSIEH Y J, CHENG W C, et al. JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1 α -mediated glucose metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(1): 279–284.
- [24] GUO W, SUN Y F, SHEN M N, et al. Circulating tumor cells with stem-like phenotypes for diagnosis, prognosis, and therapeutic response evaluation in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(9): 2203–2213.

(收稿日期: 2019-03-05 修回日期: 2019-06-20)