论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201502112

# KRAS促进肺癌细胞糖酵解

李晓静,唐 青,胡义德 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 探讨KRAS对肺癌细胞糖酵解的影响及其初步机制。**方法** 采用Real-time PCR和Western blot检测KRAS、HK2、PKM2在肺癌细胞系H1299、A549、SPC-A1中的表达水平,应用干化学方法检测肺癌细胞培养48 h后培养基上清中乳酸的浓度。采用RNA干扰技术,将KRAS-shRNA感染H1299细胞,实验分为3组:空白对照组(CON组)、阴性对照组(NC组)、慢病毒干扰组(KD组)。采用Real-time PCR和Western blot检测KRAS敲低效率及敲低KRAS基因前后H1299细胞中HK2、PKM2的表达变化。将TNF-α作用于NC组和KD组细胞,检测KRAS、HK2、PKM2的表达水平及乳酸浓度的变化。**结果** 在3株肺癌细胞系中,H1299细胞中KRAS和HK2、PKM2的表达水平最高,乳酸水平也高于A549、SPC-A1细胞。与空白对照组相比,KRAS-shRNA感染H1299细胞后,KRAS基因拷贝以及蛋白表达水平被显著抑制($P<0.05$),HK2、PKM2基因拷贝及蛋白表达水平显著下降,培养基中乳酸浓度明显降低($P<0.05$)。以TNF-α作用NC组、KD组细胞后,KRAS、HK2、PKM2基因和蛋白表达均升高($P<0.05$)。KRAS-shRNA可部分抑制TNF-α升高的乳酸浓度($P<0.05$)。**结论** KRAS能通过调节HK2和PKM2促进肺癌细胞的糖酵解。

[关键词] KRAS;肺癌;糖酵解;shRNA
[中图法分类号] Q591.4; R394.3; R734.2 [文献标志码] A

# Homo sapiensv-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogenes homologue promotes glycolysis in lung cancer cells

Li Xiaojing, Tang Qing, Hu Yide (Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of homo sapiensv-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogenes homologue (KRAS) on the glycolysis in lung cancer cells and investigate the underlying possible mechanism. **Methods** The expression of KRAS, hexokinase 2 (HK2), and pyruvate kinase M2 (PKM2) in 3 lung cancer cell lines H1299, A549 and SPC-A was determined with real-time PCR and Western blotting. Lactate concentration was assessed in 48 hours' culture. After H1299 cells were transfected with negative control and KRAS-shRNA respectively, the expression of the 3 molecules was assessed with real-time PCR and Western blot analysis. After treatment with TNF- alpha in the negative control and H1299-KRAS-shRNA cells, the expression levels of HK2 and PKM2, as well as the lactate concentration were assessed. **Results** The expression of KRAS, HK2 and PKM2 as well as the lactate secretion in H1299 cells were the highest among above 3 lung cancer cell lines. Compared to the negative control group, lentiviral shRNA interference significantly inhibited KRAS expression at mRNA and protein levels ($P<0.05$). Moreover, the mRNA and protein levels of HK2 and PKM2 were also decreased in KRAS-shRNA transfected H1299 cells, compared with negative control ($P<0.05$). TNF-α enhanced KRAS, HK2 and PKM2 in both the negative control and H1299-KRAS-shRNA cells ($P<0.05$). In addition, KRAS-shRNA significantly decreased TNF-α elevated lactate concentrations in the supernatant compared with the negative control ($P<0.05$). **Conclusion** KRAS

[通信作者] 胡义德,E-mail:huyide_mit@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.1021.015.html(2015-04-21)

promotes the glycolysis in lung cancer cells *via* modulating glycolysis related enzymes.

[**Key words**] KRAS; lung cancer; glycolysis; shRNA

Corresponding author: Hu Yide, E-mail: huyide_mit@aliyun.com

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一。其发病率为46.08/10万,死亡率为37/10万[1],居我国恶性肿瘤之首。研究表明,肿瘤细胞具有独特的能量代谢特征,即在有氧条件下肿瘤细胞仍高效摄取葡萄糖并产生大量乳酸进行糖酵解,该现象被称为Warburg效应[2]。己糖激酶(hexokinase,HK)是糖酵解途径的限速酶之一,在人类细胞中共有4种亚型,其中HK2与恶性肿瘤的相关性最强[3]。丙酮酸激酶(pyruvatekinase,PK)是另一种重要的糖酵解限速酶之一,有4种同工酶,其中发现PKM2在恶性肿瘤中高表达[4]。大量研究表明糖酵解与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的增殖和转移密切相关[5]。

RAS基因最初在Kirsten鼠肉瘤病毒子代基因中发现,1982年在人肺癌细胞中其同系物,命名为KRAS(homo sapiensv-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogenes homologue)[6]。在肺癌中,KRAS是"启动"癌变的关键的基因之一。因此,针对KRAS为分子治疗靶点的研究越来越多,但目前为止,并未发现一个有效的治疗靶点。国外研究表明,KRAS能调控细胞的糖代谢[7],从能量代谢角度设计针对KRAS的干预靶点成为一种新的方式。为研究KRAS对NSCLC能量代谢的影响,本研究检测3株NSCLC系中KRAS、HK2、PKM2的表达水平以及上清液中乳酸浓度;通过RNA干扰技术敲低KRAS,比较敲低前后HK2、PKM2及乳酸浓度的变化;进一步研究TNF-α作用后KRAS、HK2、PKM2的表达水平和乳酸浓度的差异,为初步阐述KRAS影响非小细胞肺癌细胞糖酵解的机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

H1299细胞株(武汉原生原代生物医药科技有限公司)、A549细胞株、SPC-A1细胞株(本实验室前期保存);TRIzol(康为世纪公司);逆转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit、荧光定量PCR反应试剂盒SYBR Premix *Ex Taq*™ Ⅱ(TaKaRa公司);引物合成(上海生工公司);HK2、PKM2、KRAS兔多克隆抗体(武汉三鹰公司),β-actin鼠多克隆抗体(欣博盛公司);山羊抗鼠IgG抗体-HRP(中杉金桥公司),山羊抗兔IgG抗体-HRP(康为世纪公司),BCA试剂盒(碧云天公司),TNF-α(Peprotech公司),Polybrene、空病毒载体CON077、LV-KRAS-RNAi(上海吉凯基因技术有限公司)、RPMI1640(HyClone公司)、胎牛血清(Gibco公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H1299、A549、SPC-A1细胞培养使用含10%胎牛血清、1%青/链霉素的RPMI1640培养基,置于37 ℃,5% $CO_2$恒温孵箱中培养,细胞融合度80% ~90%时传代。

1.2.2 病毒感染 shRNA-KRAS序列:5′-GACTC-TGAAGATGTACCTA-3′,shRNA-control序列:5′-TTCT-CCGAACGTGTCACGT-3′,由上海吉凯基因技术有限公司合成,将对数期生长的H1299细胞胰酶消化后重悬,按$2\times10^4$/孔接种于24孔板过夜培养,待细胞贴壁融合度达到30% ~50%时转染病毒,根据MOI 1∶5,分别加入相应量的阳性病毒以及空载病毒,感染12 h后更换培养基,分别于48、72、96 h荧光显微镜下观察H1299细胞GFP表达。细胞分3组:空白对照组(CON组)、阴性对照组(NC组)和慢病毒干扰组(KD组)。

1.2.3 流式细胞仪分选 取感染病毒后的H1299细胞,胰酶消化离心后,用PBS溶液将细胞重悬为单个细胞,过滤后流式细胞仪分选,收集GFP表达阳性的H1299细胞。

1.2.4 Real-time PCR检测KRAS、HK2、PKM2在肺癌细胞中的表达 取对数生长期的细胞,加入1 mL TRIzol,提取总RNA,并逆转录为cDNA,以此为模板扩增,逆转录及PCR反应均按照试剂盒说明书操作,以β-actin为内参,实验重复3次。引物序列见表1。

**表1 Real-time PCR引物序列**

| 基因 | 引物序列 | 扩增片段大小(bp) |
|---|---|---|
| KRAS | 上游:5′-CCAATTGTGAATGTTGGTGTG-3′ | 119 |
| | 下游:5′-CCAATTAGAAGGTCTCAACTG-3′ | |
| PKM2 | 上游:5′-GAG GCC TCCTCC AAG TGC T-3′ | 63 |
| | 下游:5′-CCA GAC TTG GTG AGG ACG AT-3′ | |
| HK2 | 上游:5′-CTG GAC CCG ACT CAG GAG GAC T-3′ | 130 |
| | 下游:5′-CCT CGC CTT TGT TCT CCT TGA T-3′ | |
| β-actin | 上游:5′-CAT GTA CGT TGC TAT CCA GGC-3′ | 250 |
| | 下游:5′-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT-3′ | |

1.2.5 Western blot检测KRAS、HK2、PKM2蛋白在肺癌细胞中的表达 取对数生长期细胞,加预混的RIPA裂解液(RIPA∶PMSF=100∶1),冰上裂解15 min;低温高速离心机12 000 ×$g$、4 ℃离心10 min,将上清移至EP管中,BCA法测定蛋白含量,加入loading buffer,在沸水中处理样品5 min,使其变性,按说明书自配12% SDS-PAGE凝胶后电泳,转膜,封闭(37 ℃,

1 h),孵一抗(KRAS、HK2、β-actin 均 1∶1 000,PKM2 1∶2 000),4 ℃过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min,37 ℃孵二抗(1∶5 000)1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,ECL 显影,实验重复 3 次。

1.2.6 乳酸浓度测定 各组细胞接种至六孔板,每孔接种 $2\times10^5$ 个细胞,每个孔均设立复孔,37 ℃、5% $CO_2$ 培养。取细胞培养基上清,4 ℃ 800 r/min 离心 5 min,在本院检验科应用干化学方法[8]检测乳酸浓度。

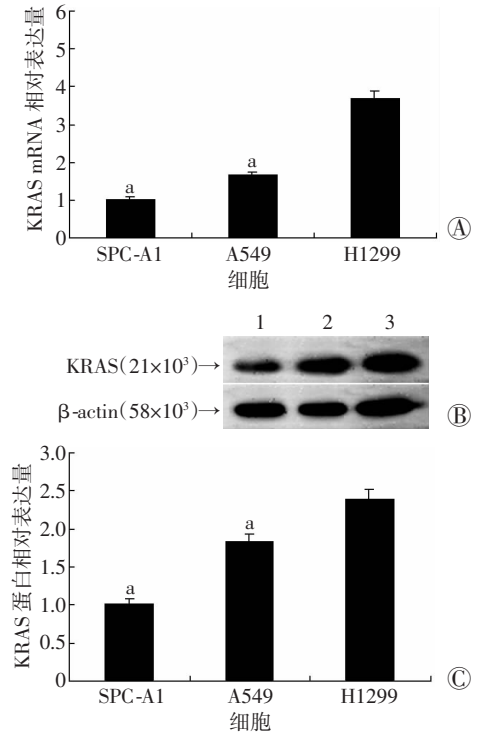
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,两个样本均数比较应用 $t$ 检验,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 KRAS 在 3 种肺癌细胞中的表达水平

Real-time PCR 及 Western blot 检测结果显示,KRAS 在 H1299 细胞中表达显著高于 SPC-A1 和 A549 细胞($P<0.05$,图 1)。



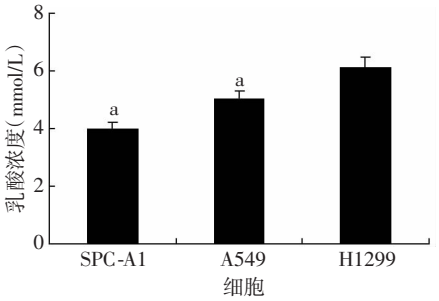

a:$P<0.05$,与 H1299 细胞比较

A:Real-time PCR 检测 3 种肺癌细胞中 KRAS mRNA 的表达;B:Western blot 检测 3 种肺癌细胞中 KRAS 蛋白的表达 1:SPC-A1;2:A549;3:H1299;C:半定量分析 KRAS 蛋白表达

**图 1 KRAS 在肺癌细胞中的表达水平**

2.2 3 种肺癌细胞的乳酸水平

将 3 种肺癌细胞培养 48 h 后收集上清液进行乳酸浓度测定,结果显示 H1299 细胞中乳酸浓度最高,与 SPC-A1 和 A549 细胞相比差异有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

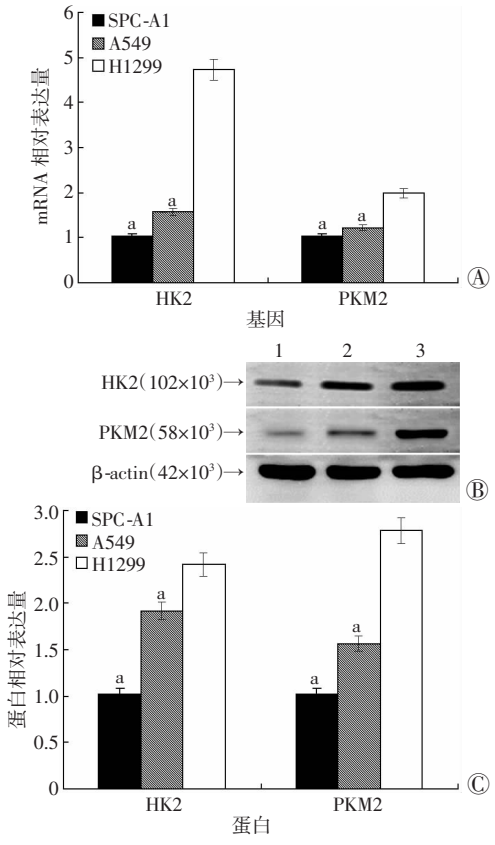



a:$P<0.05$,与 H1299 细胞比较

**图 2 肺癌细胞上清液中的乳酸水平**

2.3 3 种肺癌细胞中 HK2、PKM2 的表达水平

Real-time PCR 及 Western blot 结果显示,HK2、PKM2 mRNA 在 H1299 细胞中表达最高,与 SPC-A1 和 A549 细胞相比差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



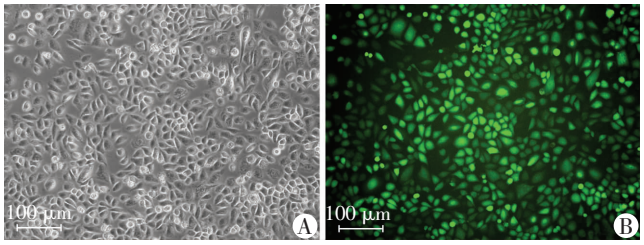

a:$P<0.05$,与 H1299 细胞比较

A:Real-time PCR 检测 HK2、PKM2 mRNA 的表达;B:Western blot 检测 HK2、PKM2 蛋白的表达 1:SPC-A1;2:A549;3:H1299;C:半定量分析 HK2、PKM2 蛋白表达水平

**图 3 3 种肺癌细胞株中 HK2、PKM2 表达水平**

2.4 KRAS-shRNA 感染 H1299 细胞的效果

用干扰序列以及阴性对照序列同时感染 H1299 细胞,经流式分选提高感染效率,根据细胞的 GFP 表达情况来初步判断感染效率,可见 H1299 细胞中 GFP 表达阳性(图 4)。

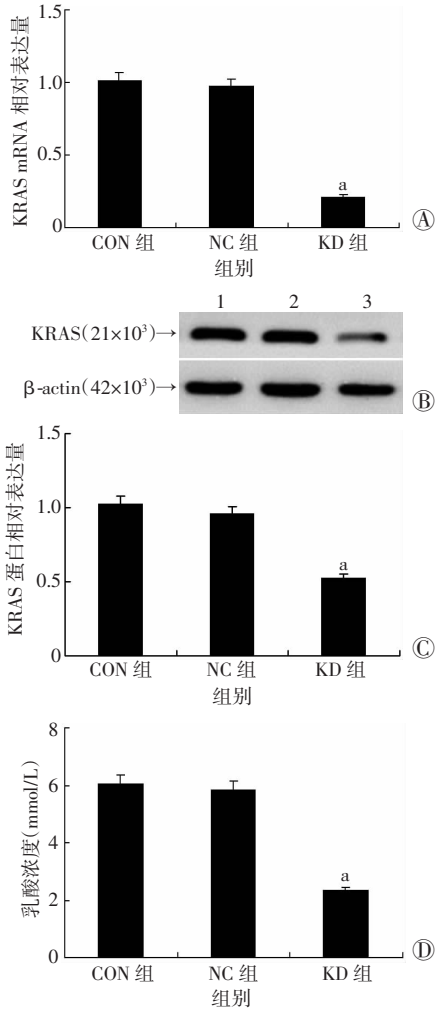



A:光镜观察;B:荧光显微镜观察

**图 4　慢病毒感染 H1299 细胞绿色荧光蛋白的表达**

### 2.5　Real-time PCR 及 Western blot 检测 shRNA 敲低效果以及对乳酸分泌的影响

将 KRAS-shRNA 慢病毒感染 H1299 细胞后,有效抑制了 KRAS mRNA 的表达量。敲低 KRAS 后,乳酸分泌明显减少。与 CON 组、NC 组相比差异有统计学意义($P<0.05$,图 5)。



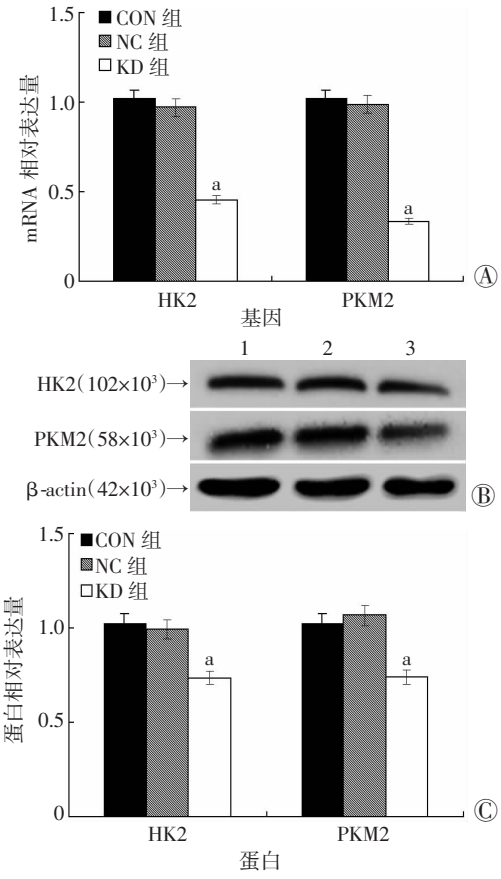

a:$P<0.05$,与 CON 组、NC 组比较

A:Real-time PCR 检测 KRAS mRNA 的表达;B:Western blot 检测 KRAS 蛋白表达　1:CON;2:NC;3:KD;C:半定量分析 KRAS 蛋白表达水平;D:干化学法检测敲低前后乳酸分泌水平

**图 5　KRAS 敲低前后 KRAS 表达水平及乳酸分泌水平改变**

### 2.6　KRAS 敲低对 HK2、PKM2 表达水平的影响

Real-time PCR、Western blot 结果显示,KRAS 敲低后,HK2、PKM2 表达水平明显降低,且差异有统计学意义($P<0.05$,图 6)。



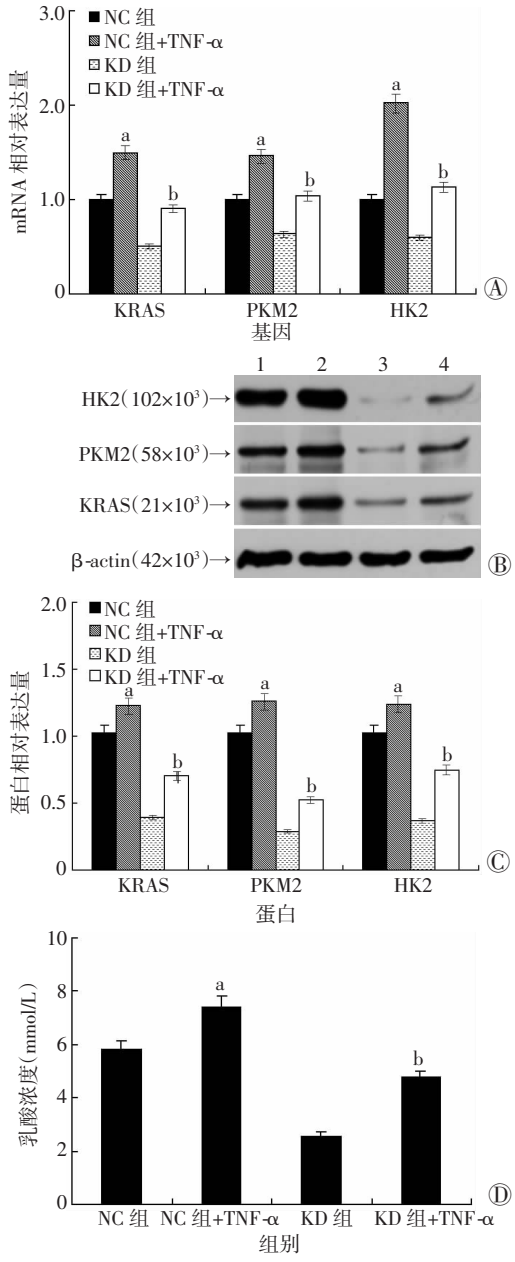

a:$P<0.05$,与 CON 组、NC 组比较

A:Real-time PCR 检测 HK2、PKM2 mRNA 的表达;B:Western blot 检测 HK2、PKM2 蛋白的表达　1:CON 组;2:NC 组;3:KD 组;C:半定量分析 HK2、PKM2 蛋白表达水平

**图 6　KRAS 敲低对 HK2、PKM2 表达水平的影响**

### 2.7　TNF-α 对阴性对照及 KRAS 敲低细胞的 KRAS、HK2、PKM2 及乳酸分泌的影响

以 20 ng/mL 的 TNF-α 浓度作用于阴性对照组细胞(NC/TNF-α 组)以及慢病毒干扰细胞(KD/TNF-α 组)后,Real-time PCR、Western blot 检测结果显示,NC 组与 NC/TNF-α 组比较,KD 组与 KD/TNF-α 组比较,TNF-α 作用后,KRAS、HK2、PKM2 表达以及乳酸分泌均较前升高,差异有统计学意义($P<0.05$,图 7)。NC/TNF-α 组与 KD/TNF-α 组比较,说明 shRNA 敲低 KRAS 可显著抑制因 TNF-α 升高的 KRAS、HK2 和 PKM2 的表达以及乳酸分泌水平。




a:$P<0.05$,与 NC 组比较;b:$P<0.05$,与 KD 组比较
A:Real-time PCR 检测 TNF-α 作用后各组 KRAS、HK2、PKM2 mRNA 的表达;B:Western blot 检测 TNF-α 作用后各组 KRAS、HK2、PKM2 蛋白的表达 1:NC 组;2:NC 组 + TNF-α;3:KD 组;4:KD 组 + TNF-α;C:半定量分析蛋白表达水平;D:干化学方法检测 TNF-α 作用于 NC 组、KD 组细胞乳酸分泌变化

**图 7 TNF-α 对 KRAS 敲低细胞 KRAS、HK2、PKM2 及乳酸分泌的影响**

## 3 讨论

20 世纪 20 年代,Otto Warburg 发现在肿瘤细胞中,即使在供氧充足的情况下葡萄糖仍向乳酸转换,这种代谢现象称之为 Warburg 效应。乳酸的增加为肿瘤细胞提供酸性环境,利于肿瘤细胞的生长、增殖。因此,在肿瘤细胞中研究糖代谢的调节有着重要的意义[6]。肿瘤细胞选择糖酵解作为其主要产能方式与其发生过程中癌基因密切相关[9]。在过去的十年中,大量证据表明,致癌基因参与调节糖酵解以及其他相关代谢途径,如 KRAS、PI3K、mTOR 等[10]。肺癌中,KRAS 癌基因与肿瘤细胞的生存、增殖、转移等均有关,且与 NSCLC 不良预后有关,所以 KRAS 是肺癌能量代谢的研究热点,KRAS 也成为肺癌基因治疗的靶点之一,但是特异性抑制 KRAS 基因的治疗却鲜有成效。有研究报道表明 KRAS 能通过提高葡萄糖的摄取、增加葡萄糖中间产物、重编谷氨酰胺代谢、增加自噬等方式来增加糖酵解[11-12]。

在肿瘤的发生、发展过程中,肿瘤生长的异质性导致肿瘤病理生理结构异常,从而引起肿瘤细胞基因及相关蛋白质的表达发生改变,同时会诱导肿瘤细胞发生新生血管或增强糖酵解过程来获取能量,以此造成肿瘤细胞恶性转化、侵袭转移以及对放化疗等治疗的抵抗,给临床上肿瘤的治疗带来困扰。换个角度考虑,正是这些问题的发现,也为肿瘤的治疗带来新的切入点。我们知道,有氧糖酵解是肿瘤最明显的能量代谢特征,而己糖激酶和丙酮酸激酶是糖酵解过程中的关键酶,既然 KRAS 能通过一系列途径增加肿瘤细胞的糖酵解,那么 KRAS 能否通过影响糖酵解关键酶(HK2、PKM2)来影响糖酵解呢? 如果能证明 KRAS 通过 HK2、PKM2 等直接影响肿瘤细胞的糖酵解过程,那么有可能在干预肿瘤细胞的能量代谢方面寻找到新的治疗靶点。因此,本研究在 3 种非小细胞肺癌细胞系中检测 KRAS、HK2、PKM2 表达水平以及乳酸浓度;通过 RNA 干扰技术敲低 KRAS,再次检测糖酵解酶 HK2、PKM2 的变化及乳酸浓度的改变。实验结果表明有 3 株 NSCLC 细胞系中,H1299 细胞中 KRAS、HK2、PKM2 表达以及乳酸浓度显著高于 SPC-A1 和 A549。通过敲低 KRAS 水平,再次检测 HK2、PKM2 的表达水平,发现 2 种关键酶均降低,细胞乳酸浓度也明显降低,表明 HK2、PKM2 的表达水平与 KRAS 的表达水平正相关,同时调控细胞乳酸的分泌。

TNF-α 是由巨噬细胞分泌的一种具有复杂生物活性的细胞因子,能促进肿瘤细胞的增殖。最近国外研究表明 TNF-α 能介导 RAS 的表达[13-14]。我们试图将 TNF-α 作为 KRAS 的激动剂,根据文献[15]报道,选择最适 TNF-α 浓度(20 ng/mL)作用于阴性对照组和慢病毒干扰组细胞,观察作用前后 2 种细胞中 KRAS、

HK2、PKM2的差别,发现作用后KRAS基因表达量升高,同时糖酵解关键酶HK2、PKM2表达也升高,作用后的细胞乳酸分泌量明显增多。表明TNF-α能促进KRAS的表达。我们通过敲低KRAS后,糖酵解关键酶HK2、PKM2的表达也随之降低,糖酵解终产物乳酸也降低;使用shRNA敲低KRAS表达水平后,可部分扭转TNF-α升高的HK2、PKM2和乳酸分泌水平,表明KRAS通过影响糖酵解的关键酶HK2、PKM2而促进NSCLC的糖酵解过程。

本研究不足之处在于,缺少体内实验,后续可进行动物实验,研究敲低KRAS基因后对裸鼠成瘤情况的影响。总的来说,KRAS参与NSCLC细胞的能量代谢过程,通过调控糖酵解过程中的关键酶HK2、PKM2而促进糖酵解过程。

**参考文献:**

[1] 陈万青, 郑荣寿, 张思维. 中国恶性肿瘤的动态变化[J]. 科技导报, 2014, 32(26): 65-71.

[2] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. Science, 1956, 123(3191): 309-314.

[3] Shinohara Y, Yamamoto K, Kogure K, *et al*. Steady state transcript levels of the type Ⅱ hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cell lines[J]. Cancer Lett, 1994, 82(1): 27-32.

[4] Meng M B, Wang H H, Guo W H, *et al*. Targeting pyruvate kinase M2 contributes to radiosensitivity of non-small cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 985-993.

[5] 刘博宁, 罗猛, 周清华, 等. 糖酵解与肺癌相关研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2012, 15(4): 228-233.

[6] Parada L F, Weinberg R A. Presence of a Kirsten murine sarcoma virus ras oncogene in cells transformed by 3-methylcholanthrene[J]. Mol Cell Biol, 1983, 3(12): 2298-2301.

[7] Kinnaird A, Michelakis E D. Metabolic modulation of cancer: a new frontier with great translational potential[J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(2): 127-142.

[8] 梁丽峰, 李佩佩, 常蕊静, 等. 人小细胞肺癌细胞H446及其MDR细胞H446/DDP受顺铂冲击后乳酸代谢与活性氧产生情况[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2013, 6(2): 134-138.

[9] 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.

[10] Bryant K L, Mancias J D, Kimmelman A C, *et al*. KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation[J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(2): 91-100.

[11] Sasaki H, Shitara M, Yokota K, *et al*. Overexpression of GLUT1 correlates with Kras mutations in lung carcinomas[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(3): 599-602.

[12] Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(11): 761-774.

[13] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al*. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444.

[14] Leibovich-Rivkin T, Liubomirski Y, Meshel T, *et al*. The inflammatory cytokine TNFα cooperates with Ras in elevating metastasis and turns WT-Ras to a tumor-promoting entity in MCF-7 cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 158.

[15] 徐采云, 李理, 袁伟锋, 等. 不同浓度肿瘤坏死因子-α对肺腺癌A549细胞的影响[J]. 山东医药, 2013, 53(21): 4-6.

(**收稿**:2015-02-26;**修回**:2015-03-15)

(编辑 汪勤俭)