DOI: 10.16016/j.1000-5404.201912141

己糖激酶 2 在 NSCLC 厄洛替尼耐药中的作用及机制

游启爱,卓文磊,陈正堂 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院全军肿瘤研究所

[摘要] **目的** 观察糖酵解关键酶己糖激酶 2(hexokinase 2,HK2)在人非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织中的表达,探讨 HK2 在 NSCLC 厄洛替尼耐药中的作用及机制。**方法** 在线数据库分析肺癌组织中 HK2 的表达与预后的关系以及厄洛替尼对 NSCLC HK2 基因表达的影响;q-PCR 体外验证 HK2 在正常肺上皮细胞、肺癌细胞中的表达差异;q-PCR、Western blot 检测厄洛替尼敏感细胞(PC9)、耐药细胞(PC9/ER)中 HK2 的基础表达以及厄洛替尼干预后 HK2 的表达情况;进而使用 HK2 抑制剂 3-溴丙酮酸处理 PC9/ER,采用 CCK-8 法检测 PC9/ER 耐药性、流式细胞术分析 PC9/ER 的增殖能力。**结果** HK2 与肺癌患者预后不良相关,HK2 高表达组患者的总体生存期(overall survival, OS)较低表达组明显缩短($P<0.05$);细胞实验证实 HK2 在 PC9/ER 中相对高表达,且厄洛替尼可降低 PC9 细胞中 HK2 的表达,而对 PC9/ER 细胞 HK2 的表达无显著影响;3-溴丙酮酸可有效抑制 PC9/ER 中 HK2 的表达,CCK-8 法结果表明,PC9/ER 3-溴丙酮酸处理组厄洛替尼 IC_{50} 值较 PC9/ER 对照组显著降低[(0.005±0.001) *vs* (1.967±0.436) μmol/L,$P=0.016$],提示 3-溴丙酮酸处理后能让耐药的 PC9/ER 细胞恢复对厄洛替尼的敏感性;3-溴丙酮酸处理组增殖指数为(14.1±0.8)%,较对照组(30.4±2.3)%显著减少($P=0.008$),提示 3-溴丙酮酸能明显抑制耐药细胞增殖。**结论** HK2 是 NSCLC 患者的不良预后指标,可诱导 NSCLC 厄洛替尼耐药。可能和其促进糖酵解的机制有关,抑制其表达有望成为逆转 NSCLC 厄洛替尼耐药的有效策略。

[关键词] 己糖激酶 2;非小细胞肺癌;厄洛替尼;细胞增殖
[中图法分类号] R345; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

Role and mechanism of hexokinase 2 in erlotinib resistance in non-small cell lung cancer

YOU Qi'ai, ZHUO Wenlei, CHEN Zhengtang Cancer Institute of PLA, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the expression of hexokinase 2 (HK2), a key enzyme of glycolysis, in human non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues, and to investigate the role and mechanism of HK2 in the resistance of NSCLC to erlotinib. **Methods** The relationship between the expression of HK2 and prognosis in lung cancer and the effect of erlotinib on NSCLC HK2 gene exlpression were analyzed through online databases (Kaplan-Meier Plotter, GEPIA and GEO DataSets). q-PCR was used to verify the expression differences of HK2 in normal lung epithelial cells and lung cancer cells *in vitro*. The basic expression of HK2 in erlotinib-sensitive cells (PC9) and erlotinib-resistant cells (PC9/ER) and the expression of HK2 after erlotinib intervention were detected by q-PCR and Western blotting. After 3-bromopyruvate, a HK2 inhibitor, was used to treat PC9/ER cells, the erlotinib resistance and cell proliferation in PC9/ER cells were detected by CCK-8 assay and flow cytometry. **Results** HK2 was associated with poor prognosis in NSCLC patients, and overall survival (OS) in the group with high expression of HK2 was significantly shortened when compared with the group with low expression ($P<0.05$). Cell experiments confirmed that HK2 was relatively highly expressed in PC9/ER cells, and erlotinib treatment

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81672290);陆军军医大学人才库重点扶持项目(2019 年)
[通信作者] 陈正堂,E-mail: czt05@163.com

could reduce HK2 expression in PC9 cells, but had no significant effect on PC9/ER cells. 3-bromopyruvate successfully inhibited the expression of HK2 in PC9/ER cells. CCK-8 assay showed that IC_{50} value of erlotinib was significantly lower in the PC9/ER 3-bromopyruvate treated group than the PC9/ER control group (0.005±0.001 *vs* 1.967±0.436 μmol/L, $P=0.016$), suggesting that the inhibitor treatment can restore the sensitivity of PC9/ER cells to erlotinib. In addition, the treatment also resulted in significantly decreased proliferation index in the 3-bromopyruvate treatment group than the control group [(14.1±0.8)% *vs* (30.4±2.3)%, $P=0.008$), indicating that the inhibitor could significantly inhibit the proliferation of drug-resistant cells. **Conclusion** HK2 is an indicator for poor prognosis in NSCLC patients. It can induce erlotinib resistance to NSCLC, which may be associated with its promotion in glycolysis, and inhibiting its expression may be an effective strategy to reverse erlotinib resistance in NSCLC.

[**Key words**] hexokinase 2; non-small cell lung cancer; erlotinib; cell proliferation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81672290) and the Key Supporting Project of Talent Bank Funded by Army Medical University(2019). Corresponding author: CHEN Zhengtang, E-mail: czt05@163.com

肺癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占80%[1-2]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)异常突变与NSCLC的发生和进展有关,亦是其治疗的重要靶标。目前已开发和研究出了多种抗EGFR抑制剂用于临床,包括单克隆抗体和小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)。第一代EGFR-TKI厄洛替尼用于存在EGFR敏感突变(19号外显子缺失或21号外显子L858R突变)的晚期NSCLC的一线治疗,且其疗效明显优于传统的化疗[3-4]。然而,使用TKI治疗的患者将不可避免出现耐药,已发现的TKI耐药机制包括EGFR二次突变T790M、旁路激活、表型转化等[5-7]。但还有相当部分耐药机制尚未阐明。因此,为改善这一部分患者的生存,进一步探索合适、有效的策略来逆转TKI耐药具有重要的意义。

越来越多的证据表明细胞能量代谢在肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要作用。与正常组织的供能方式不同,无论是有氧或无氧状态,肿瘤细胞均以糖酵解为主要能量来源,即有氧酵解或称为“Warburg效应”[8]。糖酵解不仅为肿瘤细胞增殖提供了能量,其产生的中间产物乳酸、丙酮酸等也是合成肿瘤细胞所需的重要原料[9],抑制糖酵解可以增强NSCLC对EGFR-TKI的敏感性,并防止耐药的产生[10]。己糖激酶(hexokinases, HKs)是催化糖酵解的第一个重要的限速酶,主要有4种不同的亚型在哺乳动物组织中表达,分别为HK1、HK2、HK3和HK4[11]。除己糖激酶家族其他成员外,HK2在人类癌症和胚胎组织中过表达[12],但在正常的成人组织中表达数量较低[13]。鉴于此,HK2有望成为潜在的癌症治疗靶标[14-15],但HK2是否与NSCLC厄洛替尼耐药有关,是否能成为治疗厄洛替尼耐药的靶标,目前尚不清楚。

为了探索HK2在NSCLC厄洛替尼耐药中的作用,本研究首先通过在线网站分析肺癌和肺腺癌组织中HK2的表达与预后的关系;其次通过GEO DataSets数据库研究厄洛替尼对NSCLC细胞中HK2基因差异表达的影响,然后采用q-PCR和Western blot进行体外验证实验,检测在厄洛替尼干预下NSCLC厄洛替尼耐药细胞和敏感细胞中HK2的表达差异,并采用抑制HK2表达的手段,观察HK2对NSCLC细胞厄洛替尼耐药及细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

肺腺癌厄洛替尼敏感细胞PC9购自上海生物化学与细胞生物学研究所(中国上海),耐药细胞PC9/ER由本课题组韩静博士诱导;厄洛替尼敏感细胞HCC827购自ATCC细胞库,人正常肺上皮细胞BEAS-2B由华中科技大学黄珊珊博士赠送;RPMI1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶消化液均购自HyClone公司(美国);CCK-8试剂购自同仁化学研究所(日本);q-PCR反转录试剂盒购自TaKaRa公司(日本);细胞增殖试剂盒购自GeneCopoeia公司(美国);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE电泳液和转膜液均购自碧云天公司(中国上海);厄洛替尼、HK2抑制剂(Bromopyruvic acid,3-溴丙酮酸)购自Selleck-Chem公司(美国);HK2抗体购自Cell Signaling Technology公司(美国);β-actin抗体购自中杉金桥公司(中国北京)。

1.2 方法

1.2.1 肺癌组织中HK2的表达与预后分析 ①登录Kaplan-Meier Plotter网站(http://kmplot.com/ anal-

ysis/index.php),选择肺癌,输入"HK2",获取预后分析数据;②登录 GEPIA 网站(http://gepia.cancer-pku.cn),进入 Survival Plots,输入基因"HK2"并选择肺腺癌,点击"Plot"获取预后分析数据。

1.2.2　厄洛替尼对 NSCLC 细胞中 HK2 基因差异表达的影响　　登录 GEO DataSets 网站,输入"HK2、erlotinib",筛选出数据库(GSE 67051),获取数据并统计分析结果。

1.2.3　CCK-8 法检测细胞增殖　　将处于对数生长期的 PC9、PC9/ER 细胞以 5000 个/孔接种于 96 孔板,每个浓度设置 3 个平行孔,于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 24 h,以含有 50 μmol/L 3-溴丙酮酸的不同浓度厄洛替尼(0、0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L)处理细胞 48 h,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂于细胞培养箱中继续培养 1 h,然后在酶标仪上测定波长 450 nm 处的光密度值[D(450)],计算生存率,并得出 IC_{50} 值。

1.2.4　细胞分组　　体外实验:PC9、PC9/ER 细胞均分为 2 组,用 1 μmol/L 厄洛替尼处理的为厄洛替尼处理组,未用厄洛替尼处理的为对照组。抑制实验:以含有 1 μmol/L 厄洛替尼的不同浓度 3-溴丙酮酸(0、20、50 μmol/L)处理 PC9/ER 细胞,分别为 0、20、50 μmol/L 3-溴丙酮酸组。

1.2.5　实时定量 PCR(q-PCR)检测　　采用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,超微量分光光度计测定总 RNA 浓度,经逆转录反应合成 cDNA,以 β-actin 作为内参,使用 SYBR 试剂盒在 CFX384 荧光定量 PCR 仪上检测基因表达情况。引物序列:β-actin 上游 5′-GCGAGCACAGAGCCTCGCCTT-3′,下游 5′-CATCATCCATGGTGAGCTGGCGG-3′;HK2 上游 5′-GAGCCACCACTCACCCTACT-3′,下游 5′-CCAGGCATTCGGCAATGTG-3′。

1.2.6　Western blot 检测　　含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测定总蛋白浓度;通过 SDS-PAGE 分离等量的蛋白质,然后转移到 PVDF 膜上;用 5%蛋白质粉封闭膜,并在 4 ℃下与特异性一抗一起孵育过夜,使用山羊抗兔 IgG 抗体和化学发光检测系统检测蛋白质。

1.2.7　EdU 法检测细胞增殖　　将 PC9/ER 细胞以 3×10^5 个/孔接种于六孔板,每个浓度设置 3 个平行孔,置于 37 ℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h,以含有 1 μmol/L 厄洛替尼的不同浓度 3-溴丙酮酸(0、50 μmol/L)处理细胞 48 h,然后根据 EdU 检测试剂盒说明书进行检测。

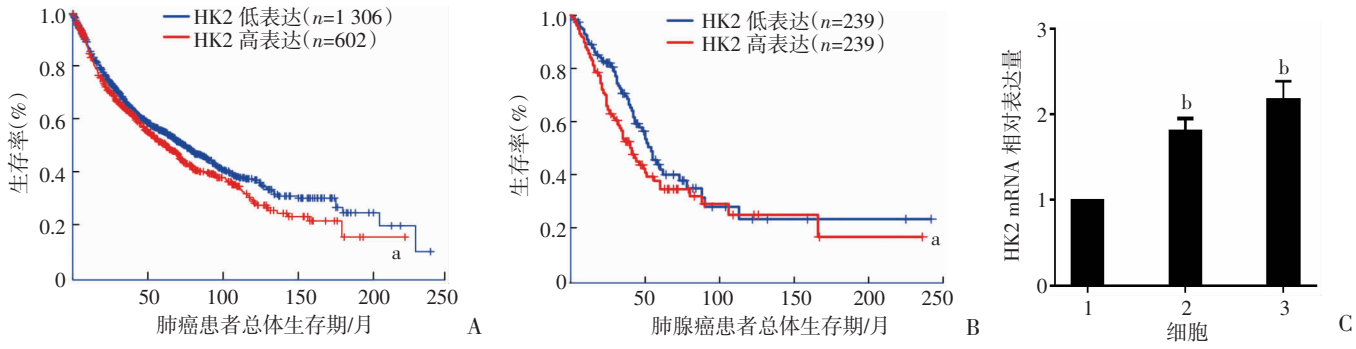
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Graphpad prism 5.01 软件进行分析,两组间变量资料比较采用配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　HK2 高表达与肺癌及肺腺癌患者预后不良相关

为了探索 HK2 与肺癌和肺腺癌患者的预后关系,使用 Kaplan-Meier Plotter 获取了 1 908 例肺癌患者的生存数据,并在 GEPIA 网站获取了 478 例肺腺癌患者的生存数据。分析显示,HK2 在肺癌、肺腺癌组织中高表达,并与患者的总体生存期(overall survival, OS)差异显著相关,HK2 高表达组患者的 OS 较低表达组明显缩短($P<0.05$,图 1A、B)。进一步在人正常肺上皮细胞株和人肺腺癌细胞株中验证了 HK2 的表达,结果显示与正常人肺上皮细胞相比,HK2 在肺腺癌细胞中的表达更高($P<0.01$,图 1C)。提示 HK2 高表达可能是肺癌尤其肺腺癌患者的不良预后因子。



a:$P<0.05$,与 HK2 低表达比较;b:$P<0.01$,与正常人肺上皮细胞 BEAS-2B 比较;A:肺癌患者总体生存期;B:肺腺癌患者总体生存期;C:q-PCR 检测 HK2 mRNA 的表达　1:正常人肺上皮细胞 BEAS-2B;2:人肺腺癌细胞 PC9;3:人肺腺癌细胞 HCC827

图 1　不同 HK2 表达的肺癌及肺腺癌患者生存情况及不同细胞中 HK2 的表达

2.2 厄洛替尼可下调 NSCLC 敏感细胞中 HK2 的表达

为了探究厄洛替尼对肺腺癌基因表达的影响,利用 GEO DataSets 数据库分析厄洛替尼对 NSCLC 细胞中 HK2 基因差异表达的影响。结果发现,在厄洛替尼(1 μmol/L)的作用下,厄洛替尼敏感 NSCLC 细胞中 HK2 的表达相对下调[PC9 细胞:(1 420.767±85.014) *vs* (618.233±48.183),P = 0.009;HCC827 细胞:(1 388.333±47.579) *vs* (954.733±22.056),P = 0.001]。说明在厄洛替尼干预 TKI 敏感 NSCLC 细胞 PC9 和 HCC827 的过程中,HK2 的表达相应减少,提示厄洛替尼对敏感细胞的抑制作用可能与其诱导的 HK2 下调有关。

2.3 厄洛替尼对 TKI 敏感和耐药 NSCLC 细胞 HK2 表达的不同影响

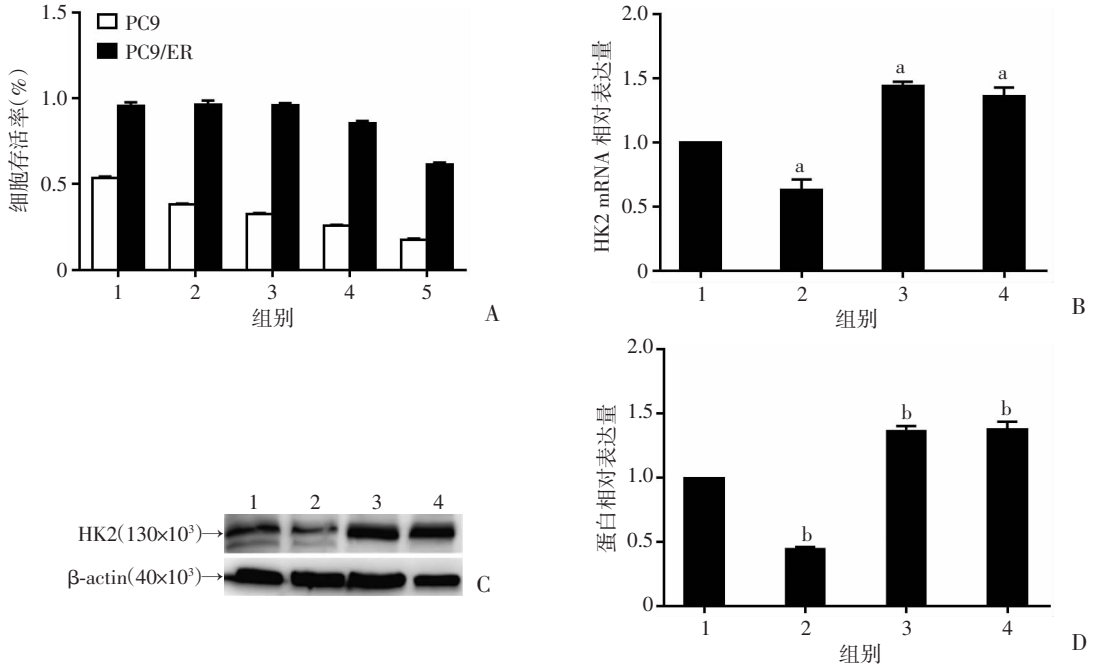
CCK-8 检测结果见图 2A,得到 NSCLC 细胞厄洛替尼的 IC_{50} 值为:PC9 *vs* PC9/ER 为(0.012±0.002) μmol/L *vs* (3.560±0.763) μmol/L(P=0.015),说明两者对厄洛替尼的敏感性差异甚大。q-PCR 和 Western blot 检测结果显示厄洛替尼耐药细胞中 HK2 的表达明显高于敏感细胞(P<0.01,图 2B~D),提示耐药细胞中 HK2 的相对高表达可能与厄洛替尼耐药相关。与 GEO DataSets 数据库分析结果一致,无论在基因水平还是蛋白水平,厄洛替尼可降低敏感细胞 PC9 中 HK2 的表达,但对耐药细胞中 HK2 的表达无显著影响。

2.4 3-溴丙酮酸可明显抑制耐药细胞中 HK2 的表达

由于 HK2 在厄洛替尼耐药细胞中的表达高于敏感细胞,进一步使用不同浓度 3-溴丙酮酸来抑制其在耐药细胞中的表达。结果表明,无论在基因还是蛋白水平,3-溴丙酮酸可成功抑制耐药细胞中 HK2 的表达,且 3-溴丙酮酸浓度越高,其对 HK2 的抑制效果越明显(P<0.01,图 3)。提示 3-溴丙酮酸亦是厄洛替尼耐药细胞 HK2 的抑制剂。

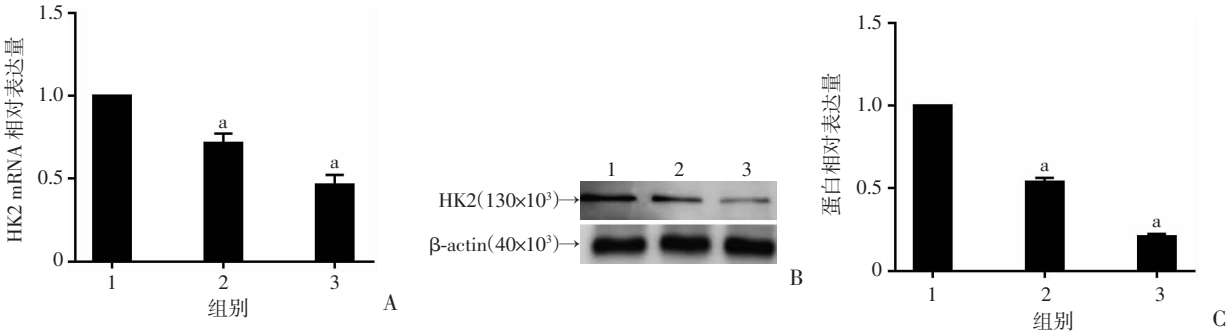
2.5 抑制 HK2 可恢复耐药细胞对厄洛替尼的敏感性

在使用 3-溴丙酮酸成功抑制 HK2 表达的同时,采用 CCK-8 法检测耐药细胞的 IC_{50} 值(图 4)。结果显示,与 0 μmol/L 3-溴丙酮酸组比较,50 μmol/L 3-溴丙酮酸组细胞厄洛替尼 IC_{50} 值明显降低[(0.005±0.001) *vs* (1.967±0.436) μmol/L,P=0.016]。表明 3-溴丙酮酸成功抑制 HK2 的表达后,NSCLC 耐药细胞对厄洛替尼的敏感性得以恢复,提示 HK2 抑制剂能够加强厄洛替尼对耐药 NSCLC 细胞的抑制作用。



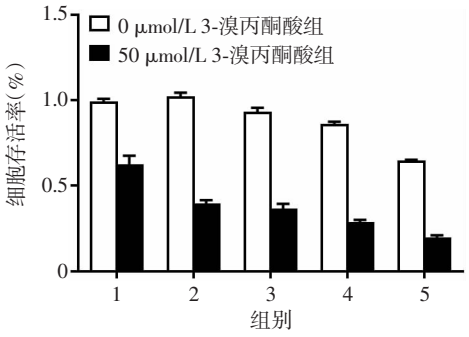
A:CCK-8 检测结果 1~5:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L 厄洛替尼处理组;B:q-PCR 检测结果 1、2:分别为 PC9 细胞对照组和厄洛替尼组;3、4:分别为 PC9/ER 细胞对照组和厄洛替尼组;a:P<0.01,与 PC9 细胞对照组比较;C、D:Western blot 检测结果及半定量分析 1、2:分别为 PC9 细胞对照组和厄洛替尼组;3、4:分别为 PC9/ER 细胞对照组和厄洛替尼组;b:P<0.01,与 PC9 细胞对照组比较

图 2 厄洛替尼干预 PC9、PC9/ER 细胞 HK2 的表达



1~3:分别为 0、20、50 μmol/L 3-溴丙酮酸组;a:$P<0.01$,与 0 μmol/L 3-溴丙酮酸组比较; A:q-PCR 检测结果; B、C:Western blot 检测结果及半定量分析

图 3　3-溴丙酮酸可抑制耐药细胞 PC9/ER 中 HK2 的表达



1~5:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L 厄洛替尼处理组

图 4　CCK-8 检测 3-溴丙酮酸影响厄洛替尼对 PC9/ER 细胞的抑制

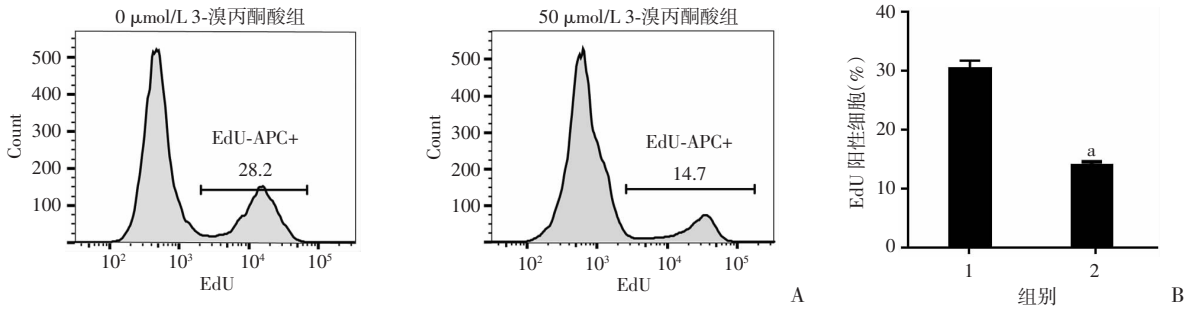
2.6　HK2 可促进细胞增殖

在证实抑制 HK2 可增强耐药细胞对厄洛替尼的敏感性后,进一步分析 HK2 对 NSCLC 细胞耐药表型的影响。结果发现厄洛替尼(1 μmol/L)联合 3-溴丙酮酸组(50 μmol/L)的 EdU 阳性细胞的比例低于单用厄洛替尼组[(14.1±0.8)% *vs* (30.4±2.3)%,$P=0.008$,图 5],说明 3-溴丙酮酸可以加强厄洛替尼抑制细胞增殖的作用。在厄洛替尼无法有效抑制耐药细胞增殖的情况下,联合 HK2 抑制剂可以增强抗细胞增殖的作用,进而提示 HK2 可促进细胞增殖。

3　讨论

EGFR-TKI 靶向治疗一直是存在 EGFR 敏感突变的晚期 NSCLC 患者的首选治疗方式,与使用传统放、化疗的患者相比,使用 EGFR-TKI 治疗的患者临床获益更佳,但患者终会因耐药而使临床获益受限。因此,寻找逆转 TKI 耐药的策略对改善患者的生存至关重要。本研究首先通过在线数据库发现 HK2 与肺癌患者的预后相关,HK2 高表达的肺癌、肺腺癌患者总体生存期更短;体外实验也证实肺腺癌细胞中 HK2 较人正常肺上皮细胞高表达,提示 HK2 在肺癌尤其是肺腺癌中发挥着促癌作用,是肺腺癌的不良预后因子。但 HK2 是否与 NSCLC 厄洛替尼耐药相关有待进一步研究。

本课题组前期研究发现,在同样的生存环境下 NSCLC 厄洛替尼耐药细胞较敏感细胞产酸、产 ATP 的能力更强,意味着耐药细胞更倾向于依赖糖酵解供能。糖酵解是肿瘤细胞的核心表型之一,可通过多种机制参与耐药。己糖激酶是一种组织特异性同工酶,是催化糖酵解途径的第一个重要的限速酶,而 HK2 则是催化过程中必不可少的一个己糖激酶亚型[16-17],并且 HK2 在肿瘤中过表达对糖酵解至关重要[18]。本研



A:EdU 检测结果;B:EdU 阳性细胞比例　1:0 μmol/L 3-溴丙酮酸组;2:50 μmol/L 3-溴丙酮酸组;a:$P<0.01$,与 0 μmol/L 3-溴丙酮酸组比较

图 5　抑制 HK2 可降低 PC9/ER 细胞的增殖

究发现厄洛替尼可抑制 NSCLC 敏感细胞中 HK2 的表达,q-PCR 和 Western blot 也证实 HK2 在耐药细胞中相对高表达,且厄洛替尼不能抑制耐药细胞中 HK2 的上调。提示我们耐药细胞对厄洛替尼的抵抗作用可能与 HK2 的过表达有关,HK2 过表达促进耐药细胞糖酵解,继而诱导 NSCLC 厄洛替尼耐药。

HK2 过表达可通过促进糖酵解来诱导肿瘤进展[19],抑制 HK2 可在癌细胞中诱导凋亡、辅助抗癌药物渗透肿瘤细胞,提高肿瘤细胞对抗癌药物的敏感性[20-22]。HK2 敲低后,癌细胞中的葡萄糖消耗和乳酸产量显著降低,而厄洛替尼耐药 NSCLC 细胞中 HK2 上调加强了细胞糖酵解,继而产生大量乳酸造成肿瘤微环境的酸化,微环境酸中毒是癌症进化和恶性进展的关键因素,酸化的微环境还提供了强大的进化选择压力,从而促进了侵略性和抗治疗性克隆的出现[23]。我们前期的研究发现厄洛替尼耐药细胞产生的乳酸含量高于敏感细胞,表明在酸性环境中耐药细胞具有更强的生存优势,耐酸的厄洛替尼抗性细胞逐渐被选择出来。同时,糖酵解增强造成的酸中毒会引起基因组不稳定,肿瘤细胞将出现更多突变以适应不断变化的肿瘤微环境,进而导致新生的癌细胞对治疗产生抵抗[24]。增强的糖酵解会产生大量的 ATP,从而为耐药细胞合成生物大分子提供丰富的能量,糖酵解途径的中间代谢产物也用以合成耐药细胞进而驱动肿瘤生长,此外,糖酵解还可通过促进表型转化赋予癌细胞转移优势导致细胞耐药[25]。P 糖蛋白是一种外排转运蛋白,可将抗肿瘤药物排出胞外,增多的乳酸使细胞外环境酸化加强了 P 糖蛋白作为外排泵的功能,同时细胞膜两侧形成的 pH 梯度也会减少弱碱性抗癌药物向细胞内的扩散[26]。HK2 的许多抑制剂,如 3-溴丙酮酸、2-脱氧葡萄糖等可成功抑制多个瘤种的糖酵解并初步显示出抗癌功效[27]。本研究表明 HK2 在厄洛替尼耐药细胞中的表达更高,使用 3-溴丙酮酸可成功抑制厄洛替尼耐药细胞 HK2 的表达。当 HK2 被成功抑制后,厄洛替尼耐药细胞对厄洛替尼的敏感性得以恢复。研究表明 HK2 在癌症中过表达可通过调节糖酵解促进肿瘤增殖[28],本研究也证实经 3-溴丙酮酸干预后,耐药细胞 EdU-APC+细胞的比例显著下降,表明抑制 HK2 可降低细胞的增殖能力,HK2 可通过调节糖酵解促进耐药细胞增殖。

本研究表明 HK2 与肺腺癌患者的生存预后呈显著负相关,HK2 高表达组患者的 OS 明显降低,并证实 HK2 在肺腺癌细胞中明显高表达,表明 HK2 可能是肺腺癌的标志物并与不良预后密切相关,提示 HK2 在肺腺癌的发生进展中发挥了重要作用。体外联合 HK2 抑制剂能够显著提高厄洛替尼对耐药细胞的抑制作用,提高耐药细胞对厄洛替尼的敏感性,抑制耐药细胞的增殖。因此,HK2 可作为治疗 NSCLC 患者 EGFR-TKI 耐药后的一个有效新靶点,HK2 抑制剂单用或与 EGFR-TKI 组合应用可能是应对 EGFR-TKI 治疗后出现耐药的一种新策略。

综上所述,HK2 上调促进糖酵解在 NSCLC 厄洛替尼耐药机制中发挥重要作用,其具体作用机制还需进一步探讨,但抑制其表达降低糖酵解水平有望成为逆转 NSCLC 厄洛替尼耐药的有效策略。

参考文献:

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI:10.3322/caac.21262.

[2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.

[3] ROSELL R, CARCERENY E, GERVAIS R, *et al*. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2012, 13(3): 239-246. DOI:10.1016/S1470-2045(11)70393-X.

[4] WU Y L, ZHOU C, LIAM C K, *et al*. First-line erlotinib versus gemcitabine/cisplatin in patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: analyses from the phase Ⅲ, randomized, open-label, ENSURE study[J]. Ann Oncol, 2015, 26(9): 1883-1889. DOI:10.1093/annonc/mdv270.

[5] NEEL D S, BIVONA T G. Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma[J]. NPJ Precis Oncol, 2017, 1: 3. DOI:10.1038/s41698-017-0007-0.

[6] CHABON J J, SIMMONS A D, LOVEJOY A F, *et al*. Corrigendum: Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13513. DOI:10.1038/ncomms13513.

[7] YU H A, ARCILA M E, REKHTMAN N, *et al*. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 2240-2247. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.

[8] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(3): 211-218. DOI:10.1016/j.tibs.2015.12.001.

[9] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 27-47. DOI:10.1016/j.cmet.2015.12.006.

[10] WANG H, SHEEHAN R P, PALMER A C, *et al*. Adaptation of human iPSC-derived cardiomyocytes to tyrosine kinase inhibitors reduces acute cardiotoxicity via metabolic reprogramming[J]. Cell Syst, 2019, 8(5): 412-426.e7. DOI: 10.1016/j.cels.2019.03.009.

[11] ROBERTS D J, MIYAMOTO S. Hexokinase Ⅱ integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy[J]. Cell Death Differ, 2015, 22(2): 364. DOI:10.1038/cdd.2014.208

[12] DEWAAL D, NOGUEIRA V, TERRY A R, *et al*. Hexokinase-2 depletion inhibits glycolysis and induces oxidative phosphorylation in hepatocellular carcinoma and sensitizes to metformin[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 446. DOI:10.1038/s41467-017-02733-4.

[13] LEE H J, LI C F, RUAN D, *et al*. Non-proteolytic ubiquitination of hexokinase 2 by HectH9 controls tumor metabolism and cancer stem cell expansion[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2625. DOI:10.1038/s41467-019-10374-y.

[14] WANG L, WANG J, XIONG H, *et al*. Co-targeting hexokinase 2-mediated Warburg effect and ULK1-dependent autophagy suppresses tumor growth of PTEN- and TP53-deficiency-driven castration-resistant prostate cancer[J]. EBio Medicine, 2016, 7: 50-61. DOI:10.1016/j.ebiom.2016.03.022.

[15] ZHOU L, LI M, YU X Y, *et al*. Repression of hexokinases Ⅱ-mediated glycolysis contributes to piperlongumine-induced tumor suppression in non-small cell lung cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(4): 826-837. DOI: 10.7150/ijbs.31749.

[16] LIS P, DYLAG M, NIEDZWIECKA K, *et al*. The HK2 dependent "Warburg effect" and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: targets for effective therapy with 3-bromopyruvate[J]. Molecules, 2016, 21(12): E1730. DOI:10.3390/molecules21121730.

[17] JIAO L, ZHANG H L, LI D D, *et al*. Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2)[J]. Autophagy, 2018, 14(4): 671-684. DOI: 10.1080/15548627.2017.1381804.

[18] WOLF A, AGNIHOTRI S, MICALLEF J, *et al*. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme[J]. J Exp Med, 2011, 208(2):313-326. DOI:10.1084/jem.20101470.

[19] GUO W, QIU Z, WANG Z, *et al*. MiR-199a-5p is negatively associated with malignancies and regulates glycolysis and lactate production by targeting hexokinase 2 in liver cancer[J]. Hepatology, 2015, 62(4):1132-1144. DOI: 10.1002/hep.27929.

[20] KWIATKOWSKA E, WOJTALA M, GAJEWSKA A, *et al*. Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. J Bioenerg Biomembr, 2016, 48(1): 23-32. DOI:10.1007/s10863-015-9637-5.

[21] SUN Y M, LIU Z, ZOU X, *et al*. Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer[J]. J Bioenerg Biomembr, 2015, 47(4): 319-329. DOI: 10.1007/s10863-015-9612-1.

[22] AKINS N S, NIELSON T C, LE H V. Inhibition of glycolysis and glutaminolysis: an emerging drug discovery approach to combat cancer[J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(6): 494-504. DOI:10.2174/1568026618666180523111351.

[23] PILLAI S R, DAMAGHI M, MARUNAKA Y, *et al*. Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2019, 38(1/2): 205-222. DOI: 10.1007/s10555-019-09792-7.

[24] GILLIES R J, VERDUZCO D, GATENBY R A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(7): 487-493. DOI:10.1038/nrc3298.

[25] ZHANG M, CONG Q, ZHANG X Y, *et al*. Pyruvate dehydrogenase kinase 1 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer through EGFR activation[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 6361-6370. DOI:10.1002/jcp.27369.

[26] ICARD P, SHULMAN S, FARHAT D, *et al*. How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? [J]. Drug Resist Updat, 2018, 38: 1-11. DOI:10.1016/j.drup.2018.03.001.

[27] ZHANG Q W, ZHANG Y Y, ZHANG P, *et al*. Hexokinase Ⅱ inhibitor, 3-BrPA induced autophagy by stimulating ROS formation in human breast cancer cells[J]. Genes Cancer, 2014, 5(3/4): 100-112. DOI:10.18632/genesandcancer.9.

[28] ZHOU P, CHEN W G, LI X W. MicroRNA-143 acts as a tumor suppressor by targeting hexokinase 2 in human prostate cancer[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(6): 2056-2063.

(收稿:2019-12-16;修回:2020-01-25)

(编辑 汪勤俭)