

胰腺癌组织己糖激酶与丙酮酸激酶活性及乳酸含量检测^{*}

代 洪, 陈芊伊, 杨盛清(湖南师范大学医学院检验系, 长沙 410006)

【摘要】 目的 检测胰腺癌组织中糖酵解关键酶活性及糖酵解产物含量, 分析糖酵解与胰腺癌组织生物学行为的关系。**方法** 收集 21 例胰腺癌组织标本和 12 例胰岛素瘤等良性病变胰腺组织, 制备组织匀浆, 用化学比色法检测糖酵解关键酶己糖激酶(hexokinase, HK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)活性及糖酵解产物乳酸含量。**结果** 与正常胰腺组织相比, 癌组织中 HK、PK 活性和乳酸含量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 胰腺癌有氧化功能降低, 糖酵解水平增强, 特异性抑制糖酵解可能成为胰腺癌新的治疗策略。

【关键词】 己糖激酶; 丙酮酸激酶; 乳酸; 胰腺癌

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.07.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)07-0772-02

Analysis on the activity of HK, PK and the test of lactate content in pancreatic carcinoma tissue DAI Hong, CHEN Qian-yin, YANG Sheng-qing (Department of Clinical Laboratory, The Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

【Abstract】 Objective To test the activity of hexokinase(HK), pyruvate kinase(PK) and the lactate content in pancreatic carcinoma tissue, and to explore the relation between biological behavior of pancreatic cancer and glycolysis. **Methods** We collected the tissue samples from 21 cases of pancreatic adenocarcinoma and 11 cases of benign lesions such as insulinoma. The total activity of HK, PK and the content of lactate were tested by chemical colorimetry respectively. **Results** The activity of HK, PK and the lactate content were significantly higher than that of the non-cancerous tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition the glycolysis may be a new therapeutic method on pancreatic cancer treatment.

【Key words】 hexokinase; pyruvate kinase; lactate; pancreatic cancer

大多数正常组织通过糖的有氧氧化获取能量, 仅在缺氧时才进行糖酵解, 而肿瘤细胞获取能量的主要方式则是糖酵解^[1]。糖酵解的产物是乳酸。

己糖激酶(hexokinase, HK)是催化己糖磷酸化的酶, 是糖酵解途径的第 1 个酶, 也是糖酵解途径 3 个限速酶之一。70 多年前 Warburg 就发现肿瘤高糖代谢特点, 肿瘤细胞中约 60% 的三磷酸腺苷(ATP)来源于糖酵解途径, 在切除的肺、胃肠、乳腺癌的组织中已证实其 HK 含量增高^[2-3]; 在乳腺癌组织中, 当病灶发生转移时, HK 活性更高^[4]; 肾肿瘤组织中 HK 活性增加, 而且有相应亚型的变化^[5]。

丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖酵解途径的第 3 个关键酶, 催化磷酸烯醇式丙酮酸转变成丙酮酸。PK 活性增加, 导致肿瘤细胞新陈代谢的改变, 使得肿瘤细胞能在有限的营养供应下得以增殖^[6]。

目前少见胰腺癌组织中 HK 和 PK 活性变化情况的报道。本研究收集了胰腺癌组织标本, 与良性病变胰腺组织进行比较, 测定糖酵解关键酶活性及糖酵解产物含量, 探讨胰腺癌组织糖酵解有无增强, 为将抑制糖酵解作为胰腺癌新的治疗策略提供实验依据。

1 临床资料

1.1 一般资料 病例组 21 例胰腺癌标本为中南大学湘雅医院和中南大学湘雅二医院普外科 2007 年 1~6 月行胰腺癌根治性手术切除的标本, 经病理证实为胰腺癌, 其中男 13 例, 女 8 例, 年龄 39~76 岁, 平均(54.5±12.1)岁。对照组为 11 例

胰岛素瘤等良性病变的正常胰腺组织, 均经病理鉴定。

1.2 试剂 总蛋白定量采用二辛可宁酸(BCA)蛋白定量试剂盒, 购自北京中杉生物技术有限公司; HK、PK、乳酸测定试剂盒均购自南京建成生物研究所。

1.3 方法

1.3.1 制备组织匀浆 每份标本称取 6 mg, 分别加入 300 μ L PBS 缓冲液于玻璃匀浆器中, 冰浴中匀浆研磨, 制成 2% 的组织匀浆。匀浆上清液吸入 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于离心管中冻存备用。

1.3.2 总蛋白定量 按试剂盒说明书操作, 检测高速离心后上清液中的总蛋白浓度。绘制标准曲线, 依次稀释匀浆上清液浓度为 2%、1%、0.6%、0.5%、0.4% 和 0.2%, 酶标仪在 570 nm 处测定不同浓度上清液的吸光度(A)值。选取 A 值在 BCA 标准曲线可信区间的匀浆浓度, 作为胰腺组织的总蛋白浓度。

1.3.3 酶活性测定 HK 活性测定用 6-磷酸葡萄糖脱氢酶耦联比色法, PK 活性测定用酶耦联速率法。

配制蛋白浓度在 BCA 标准曲线可信区间的匀浆, 按试剂盒说明书操作。酶活性计算公式: 组织酶活力(U/gprot)=(测定管 A 值-测定空白管 A 值)/(标准管 A 值-标准空白管 A 值)×标准管浓度/蛋白浓度。

1.3.4 乳酸含量测定 乳酸测定用化学比色法, 按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据的处理采用 t 检验。检验水准 α

* 基金项目: 湖南省卫生厅课题(B2007119), 湖南省教育厅课题(08C568), 湖南师范大学校级青年自然科学基金课题资助。

=0.05。

2 结 果

2.1 病例组 HK、PK 活性及乳酸含量测定 与良性病变胰腺组织比较,病例组 HK、PK 活性,乳酸含量皆有明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组 HK、PK 活性、乳酸含量测定比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	HK(U/gprot)	PK (U/gprot)	乳酸(umol/gW)
病例组	21	11.25±5.22*	202.31±67.12*	70.89±15.66*
对照组	11	4.32±1.75	97.11±32.19	39.21±9.92

注: * 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 HK、PK 活性与胰腺癌病理学特征的关系 HK、PK 活性与在不同年龄、性别、淋巴结是否转移无关;组间差异无统计学意义,在不同的组织分化及临床分期组间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 HK、PK 活性与胰腺癌病理学关系($\bar{x}\pm s$)

项目	<i>n</i>	HK 活性(U/gprot)	PK 活性(U/gprot)
性别			
男	13	10.18±4.78	198.11±54.33
女	8	11.95±5.23	211.36±60.02
年龄(岁)			
<60	7	10.35±3.77	185.55±45.23
>60	14	11.82±5.49	211.22±68.25
组织分化			
高	5	8.65±4.12	132.25±35.24
中-低	16	13.22±6.13*	254.92±63.14*
淋巴结转移			
有	15	10.56±5.45	234.13±70.25
无	6	11.61±4.90*	198.99±58.32
UICC 分期			
I, II	5	8.05±4.11	145.30±55.23
Ⅲ, Ⅳ	16	13.25±5.54*	289.93±71.28*

注: * 与另一组比较, $P<0.05$ 。

3 讨 论

近几年来,肿瘤化疗取得了相当的进步,但对危害人类生命健康最严重的,占恶性肿瘤 90% 以上的实体瘤的治疗未能达到满意的效果。抗肿瘤药物近年来的新进展,包括细胞毒性抗肿瘤药物、以细胞信号转导分子为靶点的抗肿瘤药物、新生血管生成抑制剂、耐药逆转剂、反义药物、端粒酶抑制剂等^[7-8]。为了发展更多不同抗癌机制的新抗癌药,必须寻找新的抗癌药作用靶。

肿瘤组织即使在供氧充分的条件下也主要是以无氧糖酵解获取能量,这与瘤细胞线粒体功能障碍、瘤细胞酶谱变化,特别是糖酵解关键酶活性增加和同工酶谱改变有关。糖酵解过程有 3 个关键酶:HK、6-磷酸果糖激酶-1(PFK-1)和 PK,如果限速酶活性增加,则糖酵解反应增强。

HK 是糖酵解的第 1 个酶,也是糖酵解的限速酶,它在肿瘤组织中表达的量及活性增加,使得肿瘤组织在乏氧的情况下,仍能获取足够能源,并且糖酵解的中间产物可被瘤细胞利

用,用来合成蛋白质、核酸和脂类等,为瘤细胞本身的生长和增生提供了必需的物质基础。

PK 是糖酵解途径的第 3 个关键酶,催化磷酸烯醇式丙酮酸转变成丙酮酸。PK 有 4 种不同的同工酶,分别为 L 型、R 型、M1 型和 M2 型,在肿瘤细胞中优先表达 M2-PK,随着 M2-PK 表达上调,酶结构从传统的三聚体型转变为二聚体型,后者对磷酸烯醇式丙酮酸的亲和力较弱,导致肿瘤细胞新陈代谢的改变,使得肿瘤细胞能在有限的营养供应下得以增殖。近年研究发现,血清中 M2PK 的检测对肺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤、肾癌等肿瘤的早期诊断、预后判断和疗效评价方面非常有价值^[6]。

本研究发现,胰腺癌组织 HK、PK 活性增强,糖酵解产物乳酸含量也明显增加,与良性胰腺组织比较差异有统计学意义。结果说明,胰腺癌糖酵解增强。乳酸既是糖酵解的产物,同时又可成为肿瘤细胞的能源物质。

对胰腺癌患者临床资料进行研究发现,不同性别、年龄的酶活性差异不大,但组织分化程度与酶活性有关,组织分化程度越低,酶活性越高。高度组织分化的组织 HK、PK 酶活性分别为(8.65±4.12)U/gprot 和(234.13±70.25)U/gprot,中低度分化的组织 HK、PK 酶活性分别为(13.22±6.13)U/gprot 和(254.92±63.14)U/gprot,有明显差异。此外,按国际抗癌联盟(UICC)分期,Ⅲ、Ⅳ期胰腺癌 HK、PK 活性较 I、Ⅱ期活性高些。实验说明,胰腺组织分化越差,恶性程度越高,糖酵解关键酶活性越高。

随着诊断技术和治疗手段的进步,胰腺癌患者的生存时间却没有延长,寻找新的、有效的治疗方法是基础研究者和临床医生共同努力的方向。由于手术治疗不能从根本上延长生存时间,化疗又存在耐药和毒副作用,越来越多的研究开始关注胰腺癌的生物治疗。

胰腺癌细胞与正常细胞糖代谢有明显的差异,糖酵解显著增强。如能有效抑制肿瘤细胞的糖酵解,则可抑制肿瘤细胞生长^[7-10]。因此可以考虑选择肿瘤细胞的糖代谢作为胰腺癌抗癌药物的作用靶。

参考文献

[1] Garber K. Energy boost: The Warburg effect returns in a new theory of cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(24):1805-1806.

[2] Altenberg B, Greulich KO. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes[J]. Genomics, 2004, 84(6):1014-1020.

[3] Neary CL, Pastorino JG. Nucleocytoplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4):1075-1081.

[4] Palmieri D, Fitzgerald D, Shreeve SM, et al. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(9):1438-1445.

[5] Adams V, Kempf W, Hassam S, et al. Determination of hexokinase isoenzyme I and II composition by RT-PCR: increased hexokinase isoenzyme II in human renal cell carcinoma[J]. Biochem Mol Med, 1995, 54(1):53-58.

[6] Benesch C, Schneider C, Voelker HU, et al(下转第 776 页)

代 HBsAg EIA 试剂灵敏度可达 0.05~0.5 ng/mL,采用 EIA 对献血者进行 HBsAg 筛查后,输血传播 HBV 得到明显控制,但输注 HBsAg 阴性血液后,仍有输血后乙型肝炎(PTHB)的发生^[4]。据报道,输注 HBsAg 阴性血液或成分血液后,PTHB 的发生率为 0.3%~1.7%,占输血后肝炎病例总数的 7%~17%。目前认为造成 HBsAg 阴性血液传播 HBV 感染的主要原因包括:(1)HBV“窗口期”血液感染;(2)隐匿性 HBV 感染;(3)S 基因突变 HBsAg 检测呈阴性反应等。本研究采用国产及进口两种 EIA 试剂的筛查模式对本地区献血者血液进行检测,在一定程度上保证了血液的安全,但该模式下本地区输血感染 HBV 的风险仍然存在,主要表现为 HBV 低水平复制的隐匿性感染情况。本研究共筛查出 13 例 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的献血者血液,从定量结果分析均为 HBV 隐匿性感染,表明 HBV 隐匿性感染可能是输血传播 HBV 风险的主要原因。

NAT 自 20 世纪 90 年代末开始,逐步应用于献血者血液病毒感染筛查,研究显示可使 HBV 检测的窗口期缩短为 34 d,能够降低输血传播病毒的残余危险度 50%以上^[5]。目前,欧美等一些发达国家和地区已经将 NAT 常规用于血液的筛查,在降低输血传播病毒风险方面取得良好的效果^[6]。澳大利亚报道 EIA 筛查后 HBV 残余风险为 1/483 000^[7],德国 1/60 000^[8];本次的 HBV DNA NAT 筛查结果显示,HBV 的残余风险高达 1.1/10 000,明显高于这些欧美等 HBV 非流行国家的研究报道。我国台湾地区报道采用 6 份混合标本 HBV DNA NAT 筛查残余风险为 0.11%^[9],明显高于本次采用 48 份混合样本 HBV DNA NAT 筛查结果。本研究结果显示 HBsAg 阴性、HBV DNA 阳性的 HBV 感染献血者 HBV 处于低水平复制状态,HBV DNA 载量多在 10³ 以下,采用 48 例混合 NAT 检测,可能造成部分漏检。目前罗氏 TagMan 血筛技术已经采用 6 份混合标本检测,以减少 NAT 检测假阴性的发生^[9]。

本地区输血传播 HBV 风险比较高,控制输血传播 HBV 任重而道远。NAT 检测目前正在我国 15 个省份推广使用,考虑到本地区献血者的特点和 HBV 流行情况,增加 NAT 筛查血液对减少输血传播病毒感染的风险意义重大。

参考文献

[1] 庄辉. 加强对新生儿以外人群乙型肝炎疫苗免疫[J]. 中

(上接第 773 页)

al. The clinicopathological and prognostic relevance of pyruvate kinase M2 and pAkt expression in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(5):1689-1694.

[7] Blay JY, Le Cesne A, Alberti L, et al. Targeted cancer therapies[J]. *Bull Cancer*, 2005, 92(2):8-13.

[8] Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, et al. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3):999-1006.

华流行病学杂志, 2004, 25(5):376.

[2] 黄呈辉, 黄建国, 欧阳玲. 应用核酸扩增技术对血液中 HBV、HCV 和 HIV-1 检测[J]. *中国输血杂志*, 2005, 18(3):202-204.

[3] 欧阳玲, 黄呈辉. 乙型肝炎核心抗体阳性献血者乙肝病毒 DNA 检测及基因变异分析[J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(20):3103-3106.

[4] 庞启迪, 张明良, 樊少勇. 抗-HBc 阳性 HBsAg 阴性献血者乙型肝炎病毒感染性分析[J]. *中国输血杂志*, 2001, 14(3):164-165.

[5] Muller-Breitkreutz K. Results of viral marker screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997. EPFA Working Group on Quality Assurance[J]. *Vox Sang*, 2000, 78(3):149-157.

[6] Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody negative blood donors by nucleic acids amplification testing[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(8):760-768.

[7] Seed CR, Cheng A, Ismay AL, et al. Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV and HCV RNA donor screening in Australia and the implications for future HBV NAT[J]. *Transfusion*, 2002, 42(10):1365-1372.

[8] Ofergeld R, Faensen D, Ritter S, et al. Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing [J]. *Euro Surveill*, 2005, 10(2):8-11.

[9] Li L, Chen PJ, Chen MH, et al. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus [J]. *Transfusion*, 2008, 48(6):1198-1206.

(收稿日期:2010-12-17)

[9] Lee WN, Guo P, Lim S, et al. Metabolic sensitivity of pancreatic tumour cell apoptosis to glycogen phosphorylase inhibitor treatment[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(12):2094-2100.

[10] Macpherson GR, Figg WD. Small molecule-mediated anti-cancer therapy via hypoxia-inducible factor-1 blockade [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(6):503-504.

(收稿日期:2010-12-20)