

# Aerobic Glycolysis of A549 and MRC-5 and the Intervention of Yangyinfuzheng Decoction on Aerobic Glycolysis of A549

Hong Chen<sup>1</sup>, Xiyuan Sun<sup>1\*</sup>, Dongmei Wei<sup>1</sup>, Mei Jiang<sup>1</sup>, Yuhan Chen<sup>2</sup>, Gang Yin<sup>1</sup>, Rui Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tsitsihar First Hospital, Tsitsihar Heilongjiang

<sup>2</sup>Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang

Email: qszyywdm@163.com, \*sunxiyuan2004@126.com

Received: Dec. 11<sup>th</sup>, 2018; accepted: Jan. 1<sup>st</sup>, 2019; published: Jan. 8<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** To investigate the glycolysis of human lung adenocarcinoma cell A549 and human embryonic lung fibroblasts MRC-5 and the effect of Yangyinfuzheng sugar on the aerobic glycolysis of human lung adenocarcinoma cell A549. **Methods:** Under the condition of normoxia, hypoxia and hypoglycemia, the proliferation activity of cells was detected by CCK8 method, the PH value of cell culture supernatant, and the glucose consumption and lactic acid production were detected by ELISA. **Results:** Under normoxia, hypoxia and hypoglycemia, the OD value of A549 cells increased gradually, while that of MRC-5 cells decreased gradually; the PH value of A549 cell culture medium was slightly lower than that of MRC-5 cell culture medium; the glucose utilization of A549 cells was higher than that of MRC-5 cells, and the lactic acid production of A549 cells was higher than that of MRC-5 cells; the effect of nourishing Yin and nourishing Zheng could inhibit it. The proliferation of A549 cells was reduced, and glucose consumption and lactic acid and ATP production were reduced. **Conclusion:** The aerobic glycolysis of human lung adenocarcinoma A549 cells is carried out by glucose. Yangyinfuzheng decoction can inhibit the aerobic glycolysis of human lung adenocarcinoma A549 cells, and then inhibit the proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells.

## Keywords

Lung Cancer, Yangyinfuzheng Decoction, Aerobic Glycolysis

# A549、MRC-5的有氧糖酵解及养阴扶正汤对A549有氧糖酵解的干预

\*通讯作者。

**文章引用:** 陈宏, 孙玺媛, 魏冬梅, 姜梅, 陈禹含, 尹钢, 刘锐. A549、MRC-5 的有氧糖酵解及养阴扶正汤对 A549 有氧糖酵解的干预[J]. 世界肿瘤研究, 2019, 9(1): 6-12. DOI: 10.12677/wjcr.2019.91002

陈宏<sup>1</sup>, 孙玺媛<sup>1\*</sup>, 魏冬梅<sup>1</sup>, 姜梅<sup>1</sup>, 陈禹含<sup>2</sup>, 尹钢<sup>1</sup>, 刘锐<sup>1</sup>

<sup>1</sup>黑龙江省齐齐哈尔市第一医院, 黑龙江 齐齐哈尔

<sup>2</sup>黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨

Email: qszyywdm@163.com, \*sunxiyuan2004@126.com

收稿日期: 2018年12月11日; 录用日期: 2019年1月1日; 发布日期: 2019年1月8日

## 摘要

**目的:** 探讨人肺腺癌细胞A549、人胚肺成纤维细胞MRC-5的糖酵解方式以及养阴扶正汤对人肺腺癌A549有氧糖酵解的干预。**方法:** 应用3D的培养方式, 在常氧、低氧、低氧缺糖的条件下, CCK8法检测细胞的增殖活性, 细胞培养上清液的PH值、ELISA法检测葡萄糖的消耗、乳酸的生成。**结果:** 在常氧、低氧、低氧缺糖的条件下, A549细胞OD值逐渐升高, MRC-5细胞OD值逐渐下降; A549细胞培养液的PH值略低于MRC-5细胞培养液的PH值; A549对葡萄糖的利用高于MRC-5细胞, A549细胞的乳酸生成量高于MRC-5细胞; 养阴扶正能够抑制A549细胞的增殖, 减少葡萄糖的消耗及乳酸、ATP的生成。**结论:** 人肺腺癌A549细胞利用葡萄糖进行有氧糖酵解, 养阴扶正汤可抑制人肺腺癌细胞A549的有氧糖酵解, 进而抑制了人肺腺癌细胞A549的增殖。

## 关键词

肺癌, 养阴扶正汤, 有氧糖酵解

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

肿瘤细胞与正常细胞在葡萄糖代谢方式上差异很大, 正常细胞主要是通过氧化磷酸化代谢葡萄糖, 为机体提供能量, 只有在缺氧的情况下才会启用糖酵解途径。而肿瘤细胞即使在有氧的条件下也会启用糖酵解途径, 将大量的葡萄糖转化为乳酸, 快速提供 ATP 供肿瘤细胞增殖[1], 同时为核苷酸脂肪、等大分子物质的合成提供原料组建新的肿瘤细胞[2] [3], 最终的宏观效应是促进了肿瘤恶性表型。现已发现, 有氧糖酵解广泛存在于多种类型肿瘤并与其恶性生物学行为密切相关[4]。因此, 本文在前期研究的基础上, 应用 3D 的培养方式, 在常氧、低氧、低氧缺糖的条件下, 研究人肺腺癌 A549、人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞的有氧糖酵解以及养阴扶正汤对人肺腺癌 A549 有氧糖酵解的干预。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

人肺癌 A549 细胞株和人胚肺成纤维细胞 MRC-5 株购置于武汉博士德生物工程有限公司, 3D In Sight™ Tumor Maintenance Medium (Insphero 公司), Gravity TRAP™ ULA 培养板 (Insphero 公司), CCK8 试剂盒 (万类生物), 葡萄糖检测分析试剂盒 (Biovision 公司), 乳酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所), ATP 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。养阴扶正汤 (黄芪、党参、

沙参、麦冬、生白术、白花蛇舌草、拳参、茯苓、文术等药物组成)由齐齐哈尔市第一医院制剂室提供。清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重  $250 \pm 20$  g, 由青岛市实验动物和动物实验中心提供, 合格证号: SCXK (鲁) 2014-000; 动物实验伦理许可证号: 2017051008。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 含养阴扶方汤药物血清的制备

将 SD 大鼠随机分为空白药物血清组(等体积生理盐水灌胃)、养阴扶正方低剂量组、中剂量组、高剂量组, 分别按大鼠 13 g/kg、26 g/kg 和 52 g/kg 浓度分别灌胃给予相应药物 4 ml, 空白药物血清组给予等体积的生理盐水灌胃, 灌胃前禁食 12 小时, 每日早晚 2 次灌胃, 连续给药 3 天。于末次灌药 1 小时后, 氯胺酮麻醉, 无菌条件下腹主动脉采血, 无菌分离血清(离心 2000 rpm, 10 分钟), 同一条件下动物血清混匀,  $56^{\circ}\text{C}$ , 30 分钟灭活抗体,  $0.22 \mu\text{m}$  滤器除菌后分装,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 2.2.2. 细胞培养

1) 3D 培养: 取对数生长期的 A549、MRC-5 细胞, 胰酶消化, 终止消化, 调整细胞密度为  $1.43 \times 10^5$  个/ml, 移液器吸取  $70 \mu\text{l}$  缓慢加入提前预湿的培养板内, 盖上盖子, 250 RCF 离心 2 min, 后置于  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱内, 3 天进行后续实验。2) 常氧培养条件: MRC-5、A549 细胞分别用正常 MEM、DMEM 培养基, 在  $37^{\circ}\text{C}$ , 95%、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中正常条件下培养 72 h。3) 低氧培养: MRC-5、A549 细胞分别用正常 MEM、DMEM 培养基, 在  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、90%  $\text{N}_2$  缺氧培养箱中培养 72 h。4) 低氧缺糖条件: MRC-5、A549 细胞分别用正常 MEM、DMEM 培养基, 在  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、90%  $\text{N}_2$  培养箱中培养 24 h 后, 更换为无糖培养基继续培养 48 h。

### 2.2.3. CCK8 法检测细胞的增殖活性及 PH 值的检测

1) CCK8 法检测细胞的增殖活性: 按试剂盒说明书严格进行操作; 2) 将保留的上清液用 PH 计进行测定, 并进行记录。

### 2.2.4. 葡萄糖消耗量的检测

按试剂盒说明书进行操作。以标准孔的标准品含量为横坐标, OD 值为纵坐标, 根据标准曲线计算各样本葡萄糖吸收情况。

### 2.2.5. 乳酸生成量的检测

按试剂盒说明书进行操作, 细胞乳酸含量( $\text{mmol/gprot}$ ) = ((测定 OD 值 - 空白 OD 值)/(标准 OD 值 - 空白 OD 值))  $\times$  标准品浓度(3 mmol/L)/待测样本蛋白浓度( $\text{gprot/L}$ )。

### 2.2.6. ATP 生成的检测

按试剂盒说明书进行操作, ATP 浓度( $\mu\text{mol/gprot}$ ) = (测定 OD 值 - 对照 OD 值)/(标准 OD 值 - 空白 OD 值)  $\times$  标准品浓度(1000  $\mu\text{mol/L}$ )  $\times$  样本测试前稀释倍数/待测样本蛋白浓度( $\text{gprot/L}$ )。

## 3. 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 两组之间的比较采用 Mann-Whitney 检验, 多组之间比较采用单因素方差分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 4. 结果

1) 常氧、低氧、低氧缺糖条件下人肺腺癌 A549、人胚肺成纤维细胞 MRC-5 的增殖活性(图 1)

在常氧培养条件下, A549 细胞增殖能力低于 MRC-5 细胞( $P < 0.05$ ); 在低氧培养条件下, A549 细胞与 MRC-5 细胞增殖能力相当( $P > 0.05$ ); 在低氧缺糖培养条件下, A549 细胞与 MRC-5 细胞增殖能力相当( $P > 0.05$ )。A549 细胞在常氧、低氧、低氧缺糖条件下培养, OD 值呈升高趋势, 表明 A549 细胞增殖活力逐渐增强, MRC-5 细胞常氧、低氧、低氧缺糖条件下培养, OD 值呈下降趋势, 表明 MRC-5 细胞增殖活力逐渐减弱。

2) 常氧、低氧、低氧缺糖条件下人肺腺癌 A549、人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞培养上清液 PH 值(图 2)

在常氧、低氧、低氧缺糖条件下培养, A549、MRC-5 细胞培养上清液 PH 值中比较分别  $P > 0.05$ , 无统计学差异, 表明 A549、MRC-5 细胞培养上清液 PH 值无差异, 但在常氧、低氧缺糖条件下培养, A549 细胞培养液的 PH 值略低于 MRC-5 细胞培养液的 PH 值。

3) 常氧、低氧、低氧缺糖条件下人肺腺癌 A549、人胚肺成纤维细胞 MRC-5 细胞的葡萄糖消耗量以及乳酸的生成量(图 3、图 4)

在常氧、低氧、低氧缺糖条件下培养, A549 细胞对葡萄糖的消耗大于 MRC-5 细胞  $P < 0.01$ , A549 细胞的乳酸生成量于 MRC-5 细胞的乳酸生成量  $P < 0.05$ , 提示在无论常氧、低氧、低氧缺糖条件下, A549 对葡萄糖的利用高于 MRC-5 细胞, 进行有氧糖酵解, A549 细胞的乳酸生成量高于 MRC-5 细胞。

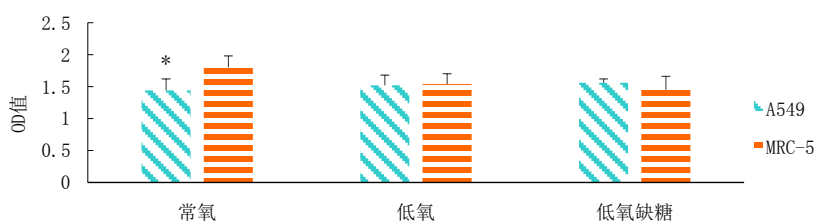
4) 常氧条件下养阴扶正汤对人肺腺癌 A549 的增殖抑制作用(图 5)

在常氧培养条件下, 空白血清对 A549 的增殖无影响, 随着养阴扶正方汤药物浓度的增加, 对 A549 的增殖抑制作用亦逐渐增强, 高剂量养阴扶正方汤药物血清疗效最显著( $P < 0.01$ )。

5) 常氧条件下养阴扶正汤对人肺腺癌 A549 细胞培养上清液 PH 值的影响(图 6)

在常氧培养条件下, 空白血清、低剂量养阴扶正方药物血清、中剂量养阴扶正方药物血清、高剂量养阴扶正方药物血清对人肺腺癌 A549 细胞培养上清液 PH 值的无影响( $P > 0.05$ )。

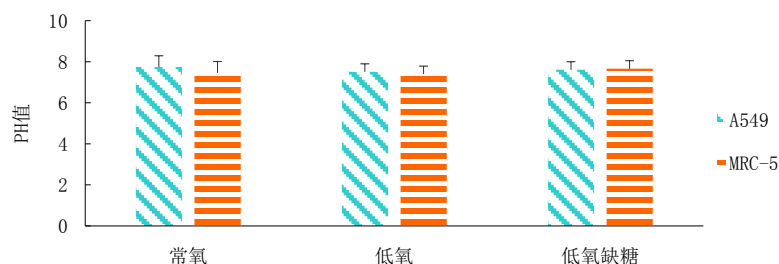
6) 常氧条件下养阴扶正汤对 A549 细胞的葡萄糖消耗、乳酸生成、ATP 生成的影响(图 7、图 8、图 9)



注: \* $P < 0.05$

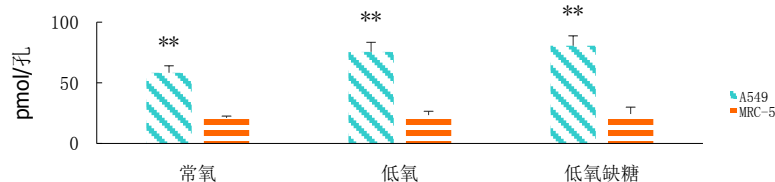
**Figure 1.** Proliferative activity of A549 and MRC-5 cells under normoxia, hypoxia and hypoxia conditions

**图 1.** 常氧、低氧、低氧缺糖条件下 A549、MRC-5 细胞的增殖活性



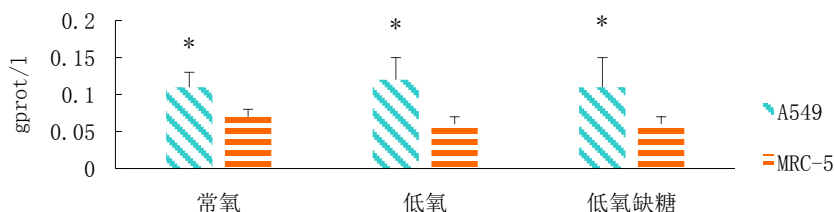
**Figure 2.** PH values of supernatants of A549 and MRC-5 cell cultures under normoxia, hypoxia and hypoxia conditions

**图 2.** 常氧、低氧、低氧缺糖条件下 A549、MRC-5 细胞培养上清液 PH 值



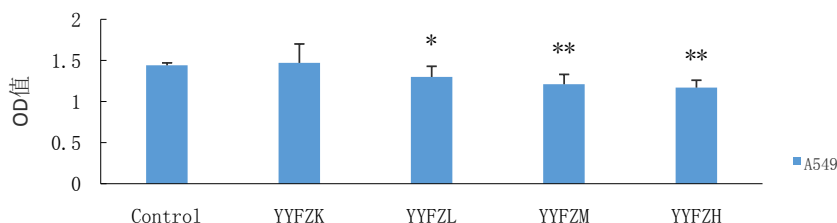
注: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

**Figure 3.** Glucose consumption of A549 and MRC-5 cells under normoxia, hypoxia and hypoxia conditions  
**图 3.** 常氧、低氧、低氧缺糖条件下 A549、MRC-5 细胞的葡萄糖消耗量



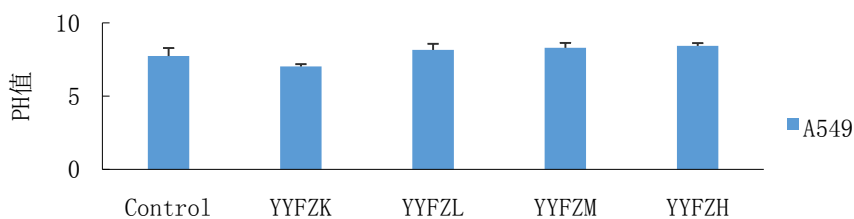
注: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

**Figure 4.** Lactate production of A549 and MRC-5 cells under normoxia, hypoxia and hypoxia conditions  
**图 4.** 常氧、低氧、低氧缺糖条件下 A549、MRC-5 细胞的乳酸生成量



注: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Control: 对照组, YYFZK: 空白血清组, YYFZL: 低剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZM: 中剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZH: 高剂量养阴扶正汤药物血清组。

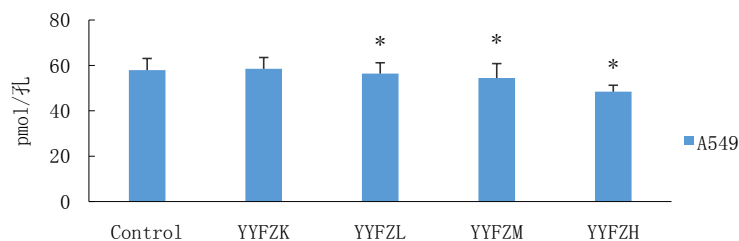
**Figure 5.** Inhibitory effect of Yangyinfuzheng Decoction on proliferation of human lung adenocarcinoma A549 under normal oxygen condition  
**图 5.** 常氧条件下养阴扶正汤对人肺腺癌 A549 的增殖抑制作用



注: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Control: 对照组, YYFZK: 空白血清组, YYFZL: 低剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZM: 中剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZH: 高剂量养阴扶正汤药物血清组。

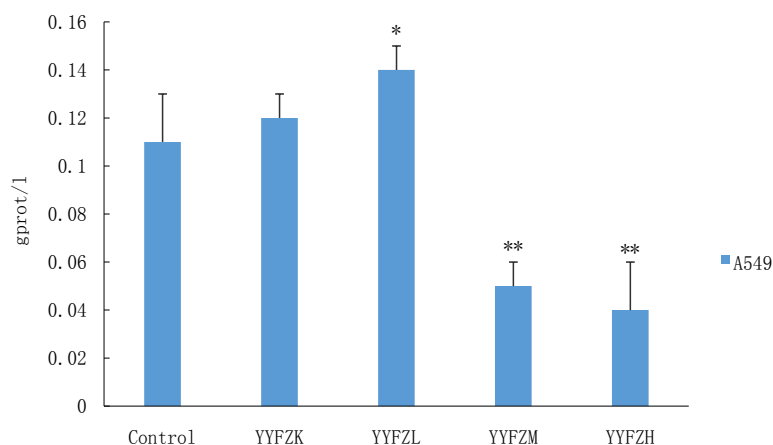
**Figure 6.** Effect of Yangyinfuzheng Decoction on pH value of supernatant of human lung adenocarcinoma A549 cells under normal oxygen condition  
**图 6.** 常氧条件下养阴扶正汤对人肺腺癌 A549 细胞培养上清液 PH 值的影响

常氧培养条件下, 空白血清对 A549 的葡萄糖消耗、乳酸的生成、ATP 的生成无影响(P > 0.05), 随着养阴扶正方药物血清剂量的增高, 葡萄糖的消耗、乳酸的生成、ATP 的生成亦减少, 高剂量养阴扶正方药物血清疗效最显著(P < 0.05, P < 0.05), 表明养阴扶正方能够抑制 A549 进行有氧糖酵解。



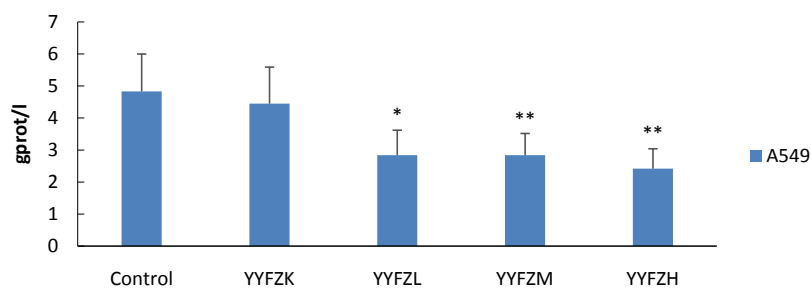
注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Control: 对照组, YYFZK: 空白血清组, YYFZL: 低剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZM: 中剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZH: 高剂量养阴扶正汤药物血清组。

**Figure 7.** Effect of Yangyinfuzheng Decoction on glucose consumption of A549 cells under normal oxygen condition  
**图 7.** 常氧条件下养阴扶正汤对 A549 细胞的葡萄糖消耗量



Control: 对照组, YYFZK: 空白血清组, YYFZL: 低剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZM: 中剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZH: 高剂量养阴扶正汤药物血清组。

**Figure 8.** Effect of Yangyinfuzheng Decoction on lactic acid production of A549 cells under normal oxygen condition  
**图 8.** 常氧条件下养阴扶正汤对 A549 细胞的乳酸生成量的影响



Control: 对照组, YYFZK: 空白血清组, YYFZL: 低剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZM: 中剂量养阴扶正汤药物血清组, YYFZH: 高剂量养阴扶正汤药物血清组。

**Figure 9.** Effect of Yangyinfuzheng Decoction on ATP production in A549 cells under normal oxygen condition  
**图 9.** 常氧条件下养阴扶正汤对 A549 细胞的 ATP 生成的影响

## 5. 讨论

有氧糖酵解为恶性肿瘤细胞的生长提供了能量及有利的场所,赋予了肿瘤细胞旺盛的生命力,也就是说有氧糖酵解推动了恶性肿瘤的生长。养阴扶正方由黄芪、党参、沙参、天冬、麦冬、生白术、山药、



白花蛇舌草、绞股蓝、茯苓、文术等药物组成，具有益气养阴，解毒化痰散结之功。本课题组前期研究发现养阴扶正方具有明确的抗肺癌的作用，能够改善肺癌患者的临床症状，总有效率 76.3%，稳定瘤灶，提高患者的生存质量，减轻化疗毒副反应；抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖和迁移，促进肺癌细胞凋亡，抑制瘤灶中 PI3K、p-AKT 的表达、bcl-2 蛋白的表达，降低瘤灶 N-cadherin、Vimentin、MMP-9、MMP-2 的表达，促进 bax、野生型 p53 蛋白增加 E-cadherin 的作用[5] [6] [7] 本研究表明，人肺腺癌 A549 细胞利用葡萄糖进行有氧糖酵解，为肺癌细胞的生长提供能量和有利的酸性微环境，养阴扶正汤可抑制人肺腺癌细胞 A549 的有氧糖酵解，进而抑制了人肺腺癌细胞 A549 的增殖，其分子机制有待于进一步研究。

## 基金项目

黑龙江自然科学基金资助项目编号：H2016095。

## 参考文献

- [1] Hsu, P.P. and Sabatini, D.M. (2008) Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*, **134**, 703-707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- [2] Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., et al. (2012) Reductive Glutamine Metabolism by IDH1 Mediates Lipogenesis under Hypoxia. *Nature*, **481**, 380-384. <https://doi.org/10.1038/nature10602>
- [3] Jung, S.Y., Jeon, H.K., Choi, J.S., et al. (2012) Reduced Expression of FASN through SREBP-1 Down-Regulation Is Responsible for Hypoxic Cell Death in HepG2 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **113**, 3730-3739. <https://doi.org/10.1002/jcb.24247>
- [4] Zhou, W.D., Capello, M., Fredolini, C., et al. (2012) Proteomic Analysis Reveals Warburg Effect and Anomalous Metabolism of Glutamine in Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Proteome Research*, **11**, 554-563.
- [5] 魏冬梅, 尹钢, 陈禹含, 田林晓, 费洪新, 陈宏. 养阴扶正汤调控肿瘤细胞黏附蛋白因子抗肺癌的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 378-380.
- [6] 陈宏. 肺癌平膏调控 PI3K-AKT 信号通路防止肺癌转移的分子机制研究[D]: [博士后出站论文]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔市第一医院, 2014.
- [7] Wei, D.M., Wang, L., Chen, Y.H., et al. (2018) Yangyin Fuzheng Decoction Enhance Anti-Tumor Efficacy of Cisplatin on Lung Cancer. *Journal of Cancer*, **9**, 1568-1574. <https://doi.org/10.7150/jca.24525>

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-9049, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [wjcr@hanspub.org](mailto:wjcr@hanspub.org)