

Akt 抑制剂哌立福新通过减少乳酸生成抑制胃癌细胞增殖与迁移

林伟仁¹, 庞梦霞², 朱 锋², 应荣彪¹, 杨幼萍¹, 曾玲晖²

(1. 台州市肿瘤医院, 浙江 温岭 317501; 2. 浙江大学城市学院医学院, 浙江 杭州 310015)

摘要: [目的] 探究 Akt 抑制剂哌立福新对胃癌细胞增殖、凋亡及迁移的作用及其可能机制。[方法] 采用不同浓度哌立福新处理胃癌 MGC803 和 SGC7901 细胞。细胞增殖采用磺酰罗丹明 B 法检测, 流式细胞仪 Annexin V-PI 双染法检测细胞凋亡, 细胞迁移和侵袭分别采用细胞划痕实验法和 Transwell 小室实验检测, 乳酸含量的测定采用 ELISA 法, 以蛋白印迹法检测糖酵解通路相关蛋白水平的变化。[结果] 哌立福新在 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度剂量时即能有效抑制胃癌细胞 MGC803 和 SGC7901 细胞增殖。经哌立福新低中高剂量 (2.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, MGC803 细胞凋亡明显增加 ($P < 0.05$)。划痕间距分别为 $407.2 \pm 34.4 \mu\text{m}$, $657.2 \pm 49.2 \mu\text{m}$ 和 $910.8 \pm 51.4 \mu\text{m}$, 与对照组 $240.3 \pm 27.8 \mu\text{m}$ 相比均有显著性差异 ($P < 0.05$), 且呈量效关系。Transwell 小室实验显示每个视野下侵袭的 MGC803 细胞数对照组为 2584 ± 228 个, 而经哌立福新低中高剂量处理后分别为 2052 ± 158 ($P < 0.05$), 1410 ± 105 ($P < 0.01$) 和 887 ± 87 ($P < 0.01$), 与对照组相比均有显著性差异, 并呈剂量依赖性。不同剂量哌立福新均可显著性降低培养基和细胞中乳酸含量, 同时, 蛋白质印迹结果提示哌立福新显著性抑制与糖酵解乳酸生成相关的乳酸脱氢酶-A, 葡萄糖转运蛋白 (Glucose transporter, GLUT) 1, GLUT4 和 IGF-1 的表达 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。[结论] 哌立福新能有效抑制 MGC803 细胞迁移与侵袭, 其机制与降低糖酵解从而减少乳酸生成相关。

关键词: Akt 抑制剂; 哌立福新; 胃癌细胞; 增殖; 迁移; 糖酵解

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)05-0394-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.05.B007

Perifosine, an Akt Inhibitor, Suppress the Proliferation and Migration via Decreasing Lactate Production in Gastric Cancer Cells

LIN Wei-ren¹, PANG Meng-xia², ZHU Feng², et al.

(1. Taizhou Cancer Hospital, Wenling 317501, China; 2. Zhejiang University City College, Hangzhou, 310015, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect and its potential mechanism of perifosine, an Akt inhibitor, on cell proliferation, apoptosis and migration in gastric cancer cells. [Methods] MGC803 and SGC7901 cells were treated with perifosine at different doses. Cell proliferation was detected by sulforhodamine B assay. Cell apoptosis was assayed by Annexin V-PI kit using flow cytometry. Wound healing and transwell chamber assays were conducted to detect cell migration and invasion, respectively. The concentration of lactic acid in culture medium and cell lysate was detected by ELISA, and protein expression was detected by western blot analysis. [Results] Perifosine at the dose of 2 $\mu\text{mol/L}$ had inhibitive effect on cell proliferation in gastric cell line MGC803 and SGC7901. MGC803 cells treated with perifosine at the dose of 2, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ displayed obvious apoptotic rate ($P < 0.05$). Wound healing assay revealed that the scratch space in perifosine-treated groups was significantly increased in a dose-dependent manner in MGC803 cells ($407.2 \pm 34.4 \mu\text{m}$, $P < 0.05$, $657.2 \pm 49.2 \mu\text{m}$, $P < 0.01$, and $910.8 \pm 51.4 \mu\text{m}$, $P < 0.01$, in low, medium and high dose, respectively) as compared to control group ($240.3 \pm 27.8 \mu\text{m}$). Transwell assay exhibited that migrated cells in control group was 2584 ± 228 , while those in perifosine-treated groups were 2052 ± 158 (low, $P < 0.05$), 1410 ± 105 (medium, $P < 0.01$) and 887 ± 87 (high, $P < 0.01$). In addition, perifosine dose-dependently suppressed lactate production detected both in culture medium and in cell lysate. Consistently, the protein level of lactate dehydrogenase A (LDH-A) and other important proteins which regulate glycolysis such as glucose transporter (GLUT) 1, GLUT4 and IGF were also dose-dependently inhibited by perifosine treatment. [Conclusion] Perifosine significantly inhibits cell migration and invasion in gastric cancer MGC803 cells, which may be resulted from its regulative effect on glycolysis and subsequent decrease of lactic acid. As perifosine has been studied in clinical Phase II or III trials in various tumors, it is a potential drug in treating gastric cancer.

Subject words: Akt inhibitor; perifosine; gastric cancer cells; proliferation; migration; glycolysis

基金项目: 国家自然科学基金 (81371429), 杭州市科技局项目 (20140633B37)

通讯作者: 杨幼萍, 院长, 主任医师, 本科; 台州市肿瘤医院病理科, 浙江省温岭市新河镇新区 (317501), E-mail: YYP0576@163.com; 曾玲晖, 副院长, 教授, 博士; 浙江大学城市学院医学院, 浙江省杭州市拱墅区湖州街 51 号 (310015), E-mail: zenglh@zucc.edu.cn

收稿日期: 2017-01-29; **修回日期:** 2017-03-03

近年来,越来越多的信号通路被发现在肿瘤的发生发展中起重要作用^[1-4]。其中,研究最热门且作用最明确的是 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路。已在很多报道发现实体瘤如肺癌、肝癌、胃癌中 PI3K/Akt/mTOR 通路被激活^[5-7]。哌立福新(perifosine)是 Akt 的靶向抑制剂,为新型烷基磷脂化合物,通过抑制 Akt 的活性,在多种肿瘤中均表现为很好的抗肿瘤活性,单独用药或与其他抗肿瘤药联合应用已经开展临床 II 期或 III 期研究,如在实体瘤直肠癌和神经胶质瘤以及非实体瘤多发性骨髓瘤和慢性淋巴细胞性白血病中的研究^[8-11]。

随着肿瘤研究的深入,肿瘤细胞能量代谢异常作为肿瘤的新特征已越来越成为热点和共识^[12-14]。肿瘤组织不同于正常组织,在氧气充足的环境中亦倾向于利用糖酵解途径作为分解葡萄糖的主要方式,从而导致了糖酵解产物乳酸的积聚。因此,研究胃癌细胞中糖代谢及其中信号传导通路改变的分子机制有助于阐释胃癌发生发展的机理,从而为发现新的胃癌早期诊断、预后和治疗反应评估的肿瘤标志物提供新思路。本研究主要探讨不同剂量哌立福新对体外培养的胃癌细胞系增殖和迁移的作用,并着重通过其对糖酵解通路的调节作用来探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

哌立福新购自上海瀚香生物科技有限公司,实验时用培养基稀释到终浓度。磺酰罗丹明 B(sulforhodamine,SRB)粉末购自美国 Sigma 公司,Annexin V-PI 凋亡试剂盒购自美国 Life Technologies 公司,Transwell 小室购自 Corning 公司,RPMI1640 培养液购自美国 Gibco 公司。GLUT-1、LDH-A 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, GLUT-4、IGF-1 购自英国 Abcam 公司。乳酸试剂盒购自南京建成生物工程研究所。流式细胞仪 FACSCalibur 购自美国 BD 公司,DMI3000B 荧光倒置显微镜购自德国 Leika 公司。

1.2 细胞培养

胃癌细胞系 MGC803 和 SGC7901 购自中国科学院上海生化研究所。细胞用含 10%胎牛血清的

RPMI 1640 培养基培养,并添加 100 U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素,放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,细胞传代处理时用胰酶消化,以含血清培养基终止消化,离心后以新鲜培养液重悬,接种于细胞培养瓶或者培养板中,取生长状态良好的细胞用于实验。

1.3 SRB 实验观察细胞增殖抑制率

取对数生长期的细胞消化后计数,以每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,培养 24h 后分别给予不同浓度的哌立福新,观察肿瘤细胞的增殖情况,每个药物浓度设平行 3 孔。继续培养 48h 后收集细胞,弃去培养液后加入 10%三氯乙酸在 4℃下固定 1h,经蒸馏水冲洗后自然晾干。其后经 1%冰醋酸配制的 SRB 溶液染色 15 min,用 1%冰醋酸冲洗后自然晾干后,加 10 mM Tris 溶解经全波长酶标仪测定 OD 值。实验重复至少 3 次,取其平均值。细胞增殖抑制率计算如下:肿瘤细胞抑制率(%)=(1-OD 给药组/OD 对照组)×100%,并求出 IC₅₀。

1.4 Annexin V-PI 双染检测细胞凋亡率

取对数生长期的细胞消化后计数,以每孔 5×10^4 个细胞接种于 12 孔板中,培养 24h 后给药,参照细胞增殖实验的结果,设定哌立福新的低中高浓度分别为 2.0、10.0、20.0μmol/L,每个浓度设平行 3 孔,作用 48h 后收集细胞,经 PBS 洗涤 2 次,调整细胞浓度为 2×10^5 个/L,加入 195 μl 结合液重悬细胞后,然后加入 5μl AnnexinV-FITC 混匀并室温避光孵育 10min,离心弃上清后加入 190μl 结合液轻轻重悬细胞,再加入 10μl PI 混匀,于 1h 内用流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.5 细胞划痕愈合实验检测细胞迁移能力

参照本研究组前期结果^[15],将细胞以每孔 5×10^5 个的密度接种于 24 孔板,培养 24h 后,用 200μl 灭菌移液器枪头对贴壁细胞竖向划一宽度均匀一致的细胞伤口模型,用 PBS 轻轻洗去漂浮的细胞,然后更换含药培养液(500μl/孔),使其终浓度达到设计浓度,每个浓度剂量组设 3 个平行孔。继续培养 48h 后去培养液,PBS 清洗 2 次,用 4%甲醛固定细胞 30 min,用结晶紫法对细胞染色,在光学显微镜下计算各划痕的宽度。细胞迁移能力以迁移率标示,即(原划痕宽度-现划痕宽度)/原划痕宽度×100%。

1.6 Transwell 小室实验检测细胞迁移情况

先将细胞用无血清培养液饥饿处理 12h,然后

将细胞消化,置于无血清培养液中重悬,调整细胞浓度至 4×10^4 /孔,体积为 $200 \mu\text{l}$,接种于上室,下室放入含 10%胎牛血清的完全培养基 $500 \mu\text{l}$ 。实验分 4 组:空白对照组(10%FBS,不给药物)和不同浓度哌立福新给药组(2.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$)。置于培养箱 48h 后,用 PBS 清洗上室和下室 3 次,用预冷的 4%甲醛固定 30min,擦净滤膜内表面细胞,用 0.1%结晶紫进行染色,显微镜下随机选取 3 个视野拍照,采用 Image-Pro plus 6.0 计算侵入下层的细胞数目。

1.7 蛋白质印迹法检测蛋白的表达

收集细胞,加入改良的 RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30min 后 $12000 \times g$ 4°C 离心 20min,采用 BCA 法定量上清液体白浓度。加入等量 2×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混匀煮沸 10min。取 $40 \mu\text{g}$ 总蛋白样品,用 4%~20% SDS-PAGE 电泳 90min 后电转印至硝酸纤维素膜上,5%牛奶封闭 60min 后分别加入 LDH、GLUT1、GLUT4、IGF 抗体(1:1000,anti-rabbit) 4°C 孵育过夜,洗涤 5 次后用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000)室温孵育 2h,ECL 试剂检测发光强弱,结果经扫描后采用 ImageJ 软件对各蛋白条带进行灰度分析,比较各给药组相关蛋白表达量的变化。

1.8 乳酸含量测定

MGC 803 细胞在用终浓度为 2、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 哌立福新处理 48 h 后,分别收集培养基和细胞,按照说明书加入样本、酶工作液、显色剂,漩涡混匀, 37°C 孵育 10min,加入终止剂终止反应,采用全波长酶标仪在 530 nm 的波长处检测样品吸收度,测得乳酸含量。

1.9 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计学软件对各实验结果进行分析。数值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验,两组以上的比较采用 One way ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 哌立福新对胃癌细胞增殖能力的影响

不同浓度下哌立福新对 MGC803 和 SGC7901 的抑制率见 Table 1。哌立福新浓度在低于 1.88 $\mu\text{mol/L}$ 时未见明显抑制作用,当浓度增加到 1.88 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,则表现出明显的抑制效果($P < 0.05$);当剂量

增加到 3.75 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,抑制作用更加明显($P < 0.01$)。在 MGC803 和 GC7901 的 IC_{50} 分别为 $7.4 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ 和 $8.1 \pm 0.2 \mu\text{mol/L}$,两组间并无统计学差异。因此,在后续实验选择在 MGC803 细胞中进行,设定哌立福新的低中高剂量分别为 2、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 。

Table 1 Suppression rate of perifosine against MGC803 cells($\bar{x} \pm s$, %)

Perifosine ($\mu\text{mol/L}$)	Suppression rate	
	MGC803	SGC7901
Control group	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3
Perifosine 0.47	1.9 ± 0.5	2.1 ± 0.4
Perifosine 0.94	5.3 ± 1.1	4.5 ± 0.8
Perifosine 1.88	$9.7 \pm 1.5^*$	$8.6 \pm 1.2^*$
Perifosine 3.75	$32.9 \pm 2.8^{**}$	$28.6 \pm 2.3^{**}$
Perifosine 7.5	$58.6 \pm 3.7^{**}$	$49.5 \pm 3.4^{**}$
Perifosine 15.0	$72.4 \pm 5.8^{**}$	$66.9 \pm 6.1^{**}$
Perifosine 30.0	$88.9 \pm 8.4^{**}$	$85.8 \pm 7.5^{**}$

Compared to control group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

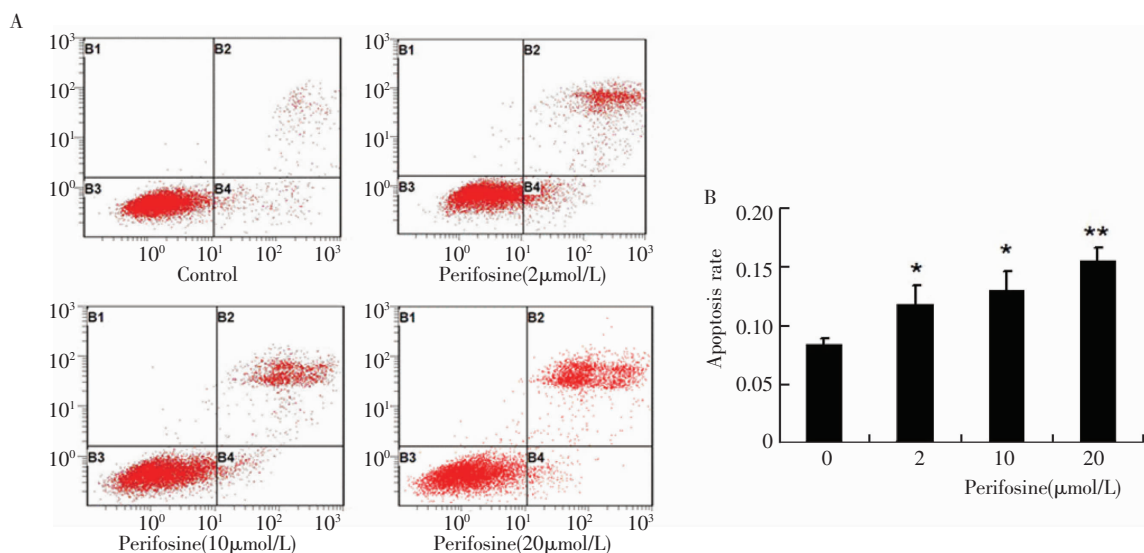
2.2 哌立福新促进胃癌细胞 MGC803 细胞凋亡

流式细胞仪检测不同浓度哌立福新给药后对胃癌 MGC803 细胞凋亡的影响,低剂量 2 $\mu\text{mol/L}$ 即可见明显促进凋亡作用($P < 0.05$),高剂量(20 $\mu\text{mol/L}$)给药后诱发细胞凋亡的作用更加明显($P < 0.01$) (Figure 1)。

2.3 哌立福新抑制 MGC803 细胞迁移与侵袭

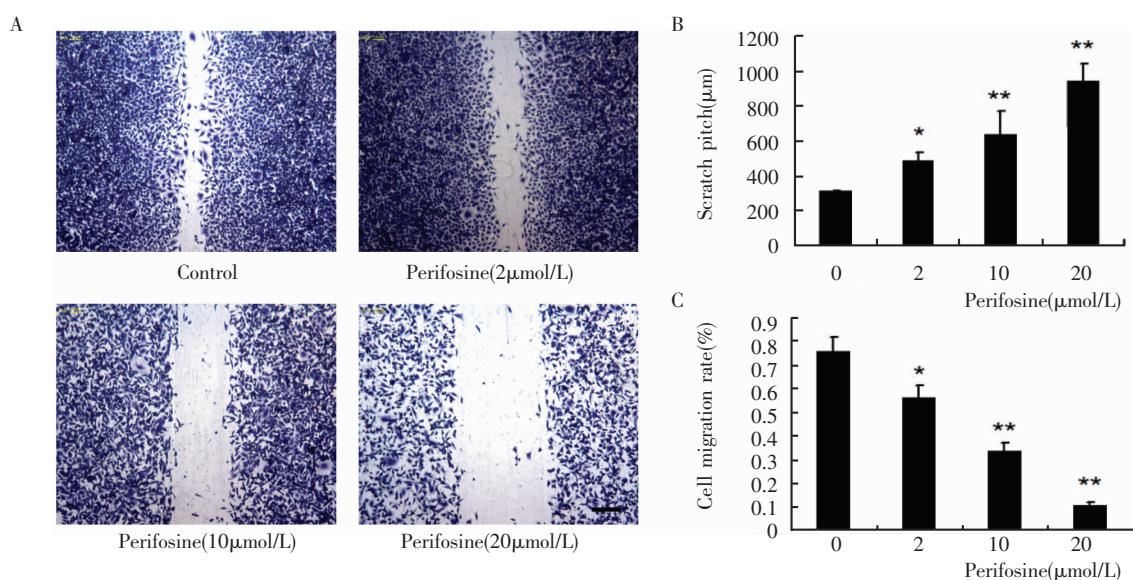
MGC803 细胞给药前各组间划痕间距无显著性差异。划痕 48h 后,对照组划痕间距为 $240.3 \pm 27.8 \mu\text{m}$,低中高剂量组间距分别为 $407.2 \pm 34.4 \mu\text{m}$, $657.2 \pm 49.2 \mu\text{m}$ 和 $910.8 \pm 51.4 \mu\text{m}$,与对照组相比均具有显著性差异($P < 0.05$),在中高剂量组尤为明显($P < 0.01$)。细胞迁移率在对照组为 $75.8\% \pm 6.2\%$,哌立福新低中高剂量组分别为 $61.4\% \pm 5.2\%$, $33.9\% \pm 3.1\%$ 和 $10.5\% \pm 1.6\%$,划痕间距和迁移率随药物浓度变化呈现一定的量效关系,表明哌立福新在体外能够有效抑制 MGC-803 细胞迁移(Figure 2)。

Transwell 小室实验检测了哌立福新对 MGC803 细胞侵袭的作用。48h 培养后,对照组 MGC803 细胞从微孔滤膜上层侵入到下层每视野下细胞数为 2584 ± 228 个,低中高给药剂量的侵入细胞数分别为 2012 ± 158 ($P < 0.05$), 1410 ± 105 ($P < 0.01$) 和 887 ± 87 ($P < 0.01$)。各剂量组哌立福新均能明显抑制细胞从微孔滤膜上层侵入到下层,且抑制程度随药物浓度的变化呈现剂量依赖性,在高浓度作用下抑制效果尤为



A: Representative flow cytometry analysis of apoptotic cells after perifosine treatment at the dose of 2, 10 and 20 μmol/L in MGC803 cells. B: Quantitative analysis of apoptotic rates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

Figure 1 Effect of perifosine on cell apoptosis in MGC803 cells



A: Representative images of wound healing assay in MGC803 cells cultured with perifosine at 2, 10 and 20 μmol/L. B, C: Quantitative analysis of scratch pitch and cell migration rates. Scale bar=200 μm. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

Figure 2 Effect of perifosine on scratch space in MGC803 cells

明显 (Figure 3)。

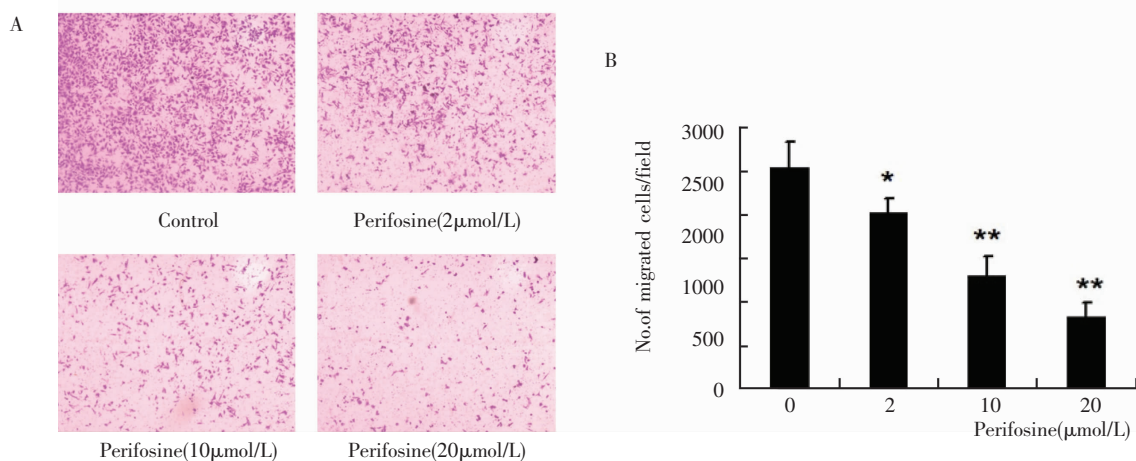
2.4 哌立福新可降低乳酸生成

哌立福新给药后分别检测培养基和细胞裂解液中乳酸含量的测定, 哌立福新在 2 μmol/L 和 10 μmol/L 即显著性降低分泌至培养基的乳酸含量及细胞内的乳酸生成 ($P < 0.05$), 在 20 μmol/L 浓度

下抑制作用更为明显 ($P < 0.01$) (Figure 4)。

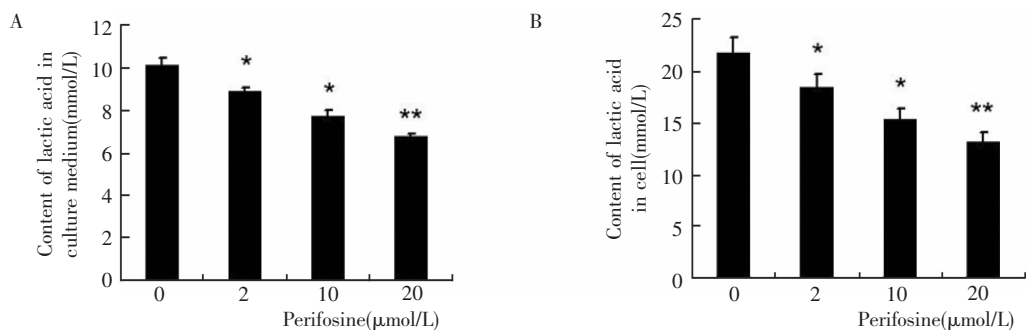
2.5 哌立福新对糖酵解通路中相关蛋白表达的作用

蛋白质印迹实验, 哌立福新处理后 MGC803 (Figure 5A, B) 细胞中与糖酵解相关的蛋白 LDH-A、GLUT1、GLUT4 和 IGF-1 的表达在低浓度下即显示抑制作用 ($P < 0.05$), 中高剂量组与对照组差异显著



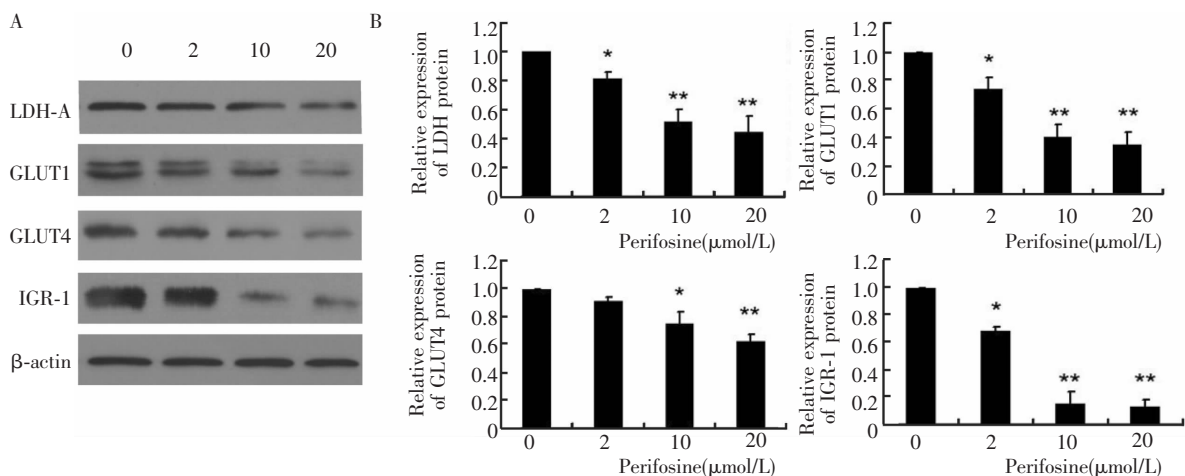
A; Representative images of transwell assay in MGC803 cells cultured with perifosine at 2, 10 and 20 μmol/L. B; Quantitative analysis of number of migrated cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

Figure 3 Effect of perifosine on cell migration in MGC803 and DU-145 cells



A; Content of lactic acid in culture medium in MGC803 cells cultured with perifosine at 2, 10 and 20 μmol/L. B; Content of lactic acid in cell lysate in MGC803 cells cultured with perifosine at 2, 10 and 20 μmol/L. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

Figure 4 Effect of perifosine on lactate production in MGC803 cells



A. Representative blots of LDH-A, GLUT1, GLUT4 and IGR-1 in MGC803 cells cultured with perifosine at 2, 10 and 20 μmol/L. B. Quantitative analysis of each protein expression after normalized to β-actin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ when compared with control group.

Figure 5 Effect of perifosine on glycolysis-related protein expression in MGC803 cells

($P < 0.01$)。上述结果进一步印证了乳酸含量检测的结果,提示哌立福新参与乳酸生成的调节。

3 讨论

哌立福新作为 Akt 的靶向抑制剂在肿瘤中的作用已研究较多^[16,17]。本研究中我们发现哌立福新可显著性抑制胃癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭,且能显著性降低乳酸生成,其作用可能与降低 GLUT 信号通路相关。

肿瘤组织利用糖酵解途径分解葡萄糖,通过乳酸脱氢酶将葡萄糖转变为乳酸排出细胞,从而导致了糖酵解产物乳酸的积聚,该现象被称为“Warburg”效应^[18]。肿瘤细胞利用乳酸,通过氧化磷酸化产生 ATP,从而为肿瘤细胞供能,且乳酸等有机酸的产生可改变肿瘤细胞微环境,同时乳酸还可作为信号分子,在促进肿瘤细胞迁移、刺激血管生成以及协助肿瘤细胞免疫逃逸中起作用,从而加剧肿瘤的发展和转移^[19-21]。本研究中发现哌立福新给药可显著性降低培养基中和胃癌细胞中乳酸的生成以及乳酸脱氢酶的表达,虽然本研究并未对其与抑制肿瘤细胞的增殖和迁移进行相关性分析,综合以往的报道,我们认为哌立福新对胃癌的抑制作用至少与抑制乳酸生成部分相关。

本研究中也进一步明确了抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肿瘤能量代谢中的作用。已有研究表明激活该信号通路可通过对下游信号的基因转录提高糖酵解的水平^[22]。Akt 的激活一方面引起 GLUT1 向细胞膜转移并激活 GLUT1,增加葡萄糖的摄取,另一方面激活糖酵解途径的一些关键酶如 HKII,同时通过己糖胺合成途径(HBP)增加 UDP-GlcNAc 量,使蛋白 O-GlcNAc 糖基化增加影响关键酶的活性,如 PKM2、PDK,细胞糖酵解活动增强^[23,24]。糖酵解产生酸性微环境和大量中间代谢产物也可以维持细胞增殖、分化、浸润和迁移等^[25]。本研究中发现采用哌立福新抑制 Akt 的活性后,Glut1、Glut4 和 IGF-1 的表达水平显著性下降,证实了 PI3K/Akt/mTOR 在能量代谢中的作用,在后续的研究中我们将以此为基础对其具体机制进一步研究和完善。

综上所述,哌立福新可通过抑制乳酸转运体和乳酸脱氢酶的活性降低乳酸生成,从而减少胃癌生

长增殖所需的能量来源,最终抑制其转移和侵袭。基于哌立福新已经用于多种肿瘤的临床试验,其作为一种新型的抗肿瘤药物在胃癌的发生发展中亦发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Bahrami A,Hasanzadeh M,ShahidSales S,et al. Clinical significance and prognosis value of wnt signaling pathway in cervical cancer [J]. J Cell Biochem,2017,Mar 16, [Epub ahead of print]
- [2] Xu L,Zhou R,Yuan L,et al. Igf1/igf1r/stat3 signaling-inducible ifitm2 promotes gastric cancer growth and metastasis[J]. Cancer Lett,2017,393:76-85.
- [3] Liu P,Cheng H,Roberts TM,et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. Nature reviews Drug discovery,2009,8(8):627-644.
- [4] Chang L,Graham PH,Ni J,et al. Targeting pi3k/akt/mtor signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance [J]. Crit Rev Oncol Hematol,2015,96 (3): 507-517.
- [5] Ying J,Xu Q,Liu B,et al. The expression of the pi3k/akt/mtor pathway in gastric cancer and its role in gastric cancer prognosis[J]. Onco Targets Ther,2015,8:2427-2433.
- [6] Lim WT,Zhang WH,Miller CR,et al. Pten and phosphorylated akt expression and prognosis in early- and late-stage non-small cell lung cancer [J]. Oncol Rep,2007,17 (4):853-857.
- [7] Li W,Tan D,Zhang Z,et al. Activation of akt-mtor-p70s6k pathway in angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Rep,2008,20(4):713-719.
- [8] Friedman DR,Lanasa MC,Davis PH,et al. Perifosine treatment in chronic lymphocytic leukemia:Results of a phase ii clinical trial and in vitro studies[J]. Leuk & Lymphoma,2014,55(5):1067-1075.
- [9] Bendell JC,Nemunaitis J,Vukelja SJ,et al. Randomized placebo-controlled phase ii trial of perifosine plus capecitabine as second- or third-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2011,29(33):4394-4400.
- [10] Kushner BH,Cheung NV,Modak S,et al. A phase I / I b trial targeting the pi3k/akt pathway using perifosine:long-term progression-free survival of patients with resistant neuroblastoma[J]. Int J Cancer,2017,140(2):480-484.
- [11] Guidetti A,Carlo-Stella C,Locatelli SL,et al. Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative

- diseases[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(22): 5641-5651.
- [12] Ngo DC, Ververis K, Tortorella SM, et al. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the warburg effect[J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(4): 819-823.
- [13] Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2): 85-95.
- [14] Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics [J]. J Clinical Invest, 2013, 123(9): 3685-3692.
- [15] Chen YT, Zhu F, Lin WR, et al. The novel ezh2 inhibitor, gsk126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-a [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 77(4): 757-765.
- [16] Chen HB, Jiang KH, Hu xh, et al. Effects of perifosine on proliferation and migration of human prostate cancer cells [J]. J Prac Oncol, 2015, 30(1): 22-25. [陈洪发, 江克华, 胡晓辉, 等. 哌立福新对前列腺癌 DU145 细胞的作用及其机制[J]. 实用肿瘤杂志, 2015, 30(1): 22-25.]
- [17] Luo HS, Jin LL, Tong Q, et al. Effects of Akt inhibitor perifosine on proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cells[J]. J Clin Intern Med, 2011, 28(11): 778-780. [罗和生, 金灵莉, 童强, 等. 哌立福新对食管癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 临床内科杂志, 2011, 28(11): 778-780.]
- [18] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. Science, 1956, 123(3191): 309-314.
- [19] Semenza GL. Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate[J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 3835-3837.
- [20] Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, et al. Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism[J]. Cell Cycle, 2010, 9(17): 3506-3514.
- [21] Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells[J]. Blood, 2007, 109(9): 3812-3819.
- [22] Duvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mtor complex 1[J]. Molecular Cell, 2010, 39(2): 171-183.
- [23] Liang S, Guo R, Zhang Z, et al. Upregulation of the eif4e signaling pathway contributes to the progression of gastric cancer, and targeting eif4e by perifosine inhibits cell growth[J]. Oncol Rep, 2013, 29(6): 2422-2430.
- [24] Guha M, Fang JK, Monks R, et al. Activation of Akt is essential for the propagation of mitochondrial respiratory stress signaling and activation of the transcriptional coactivator heterogeneous ribonucleoprotein A2 [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(20): 3578-3589.
- [25] Hudson CD, Hagemann T, Mather SJ, et al. Resistance to the tyrosine kinase inhibitor axitinib is associated with increased glucose metabolism in pancreatic adenocarcinoma [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1160.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。

2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。

3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。

4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。

5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。

6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。

7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。

《肿瘤学杂志》编辑部