

代谢重编程在化疗耐药乳腺癌中的作用机制

王栋梁¹, 杨浩², 宋少莉³, 刘建军^{1,2}, 黄钢^{1,2}

(1. 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海 200127; 2. 上海健康医学院, 上海市分子影像学重点实验室, 上海 201318; 3. 复旦大学附属肿瘤医院, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032)

摘要: [目的] 探讨葡萄糖代谢在耐药乳腺癌组织中的改变及其在乳腺癌细胞化疗耐药中的作用机制。[方法] 取 10 只裸鼠, 分别采用人乳腺癌细胞株 MCF7 和紫杉醇耐药细胞株 MCF7-Taxol 右侧腋下接种建立乳腺癌裸鼠移植瘤模型和紫杉醇耐药乳腺癌模型各 5 只。给药 4 周后处死, 免疫组织化学染色法、Western blot 法用于检测癌组织和耐药癌组织糖酵解关键酶的表达。采用乳酸测定试剂盒和丙酮酸测定试剂盒分别检测两组癌组织中乳酸和丙酮酸的含量。在耐药细胞 MCF7-Taxol 中用 siRNA 敲低 HK2、PFKFB3、PKM2 表达, Western blot 和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法检测 HK2、PFKFB3、PKM2 的敲低效率, CCK8 法检测 MCF7-Taxol 耐药性改变。[结果] 紫杉醇耐药乳腺癌组织中糖酵解关键酶 HK2、PFKM、PKM2 表达明显高于紫杉醇敏感乳腺癌组织 (P 值均 <0.0001)。相对于癌组织, 耐药癌组织中的乳酸产量和丙酮酸产量相对提高增高约 28% ($P=0.0005$) 和 50% ($P=0.001$)。与 siNC 组 (1.00 ± 0.02) 相比, 敲低组细胞中的 HK2 mRNA (0.56 ± 0.03)、PFKFB3 mRNA (0.37 ± 0.01)、PKM2 mRNA (0.42 ± 0.01) 相对表达水平明显降低, 蛋白水平也明显降低 (P 值均 <0.05)。CCK8 结果显示糖酵解酶敲低后 MCF7-Taxol 紫杉醇耐药性不同程度的减低 (P 值均 <0.05)。[结论] 糖酵解关键酶的高表达介导了化疗耐药乳腺癌的代谢重编程。抑制糖酵解关键酶 HK2、PFKM、PKM2 表达逆转了乳腺癌的紫杉醇耐药性, 有望成为治疗化疗耐药乳腺癌的有效措施。

关键词: 乳腺癌; 抗药性; 糖酵解

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2021)03-0196-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2021.03.B008

Study on Mechanism of Metabolic Reprogramming in Chemotherapy Resistant Breast Cancer

WANG Dong-liang¹, YANG Hao², SONG Shao-li³, LIU Jian-jun^{1,2}, HUANG Gang^{1,2}

(1. Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Molecular Imaging, Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China; 3. Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: [Objective] To investigate the changes and mechanisms of glucose metabolism in paclitaxel-resistant breast cancer. [Methods] The breast cancer xenograft tumor model and paclitaxel-resistant breast cancer model were established by subcutaneous transplant with human breast cancer MCF7 cells and paclitaxel-resistant breast cancer MCF7-taxol cells on the right underarm of 10 nude mice, respectively, with 5 mice in each group. Nude mice were sacrificed 4 weeks after the transplantation, the expression of glycolytic enzymes in breast cancer tissues were detected by immunohistochemistry and Western blot. The contents of lactic acid and pyruvic acid were measured by lactic acid determination kit and the pyruvate determination kit respectively. The siRNA was used to knock down the expression of HK2, PFKFB3 and PKM2 in MCF7-taxol cells, and Western blot and qRT-PCR were used to detect the knockdown efficiency. CCK8 method was used to detect the change of drug resistance of MCF7-taxol. [Results] Compared to the paclitaxel-sensitive breast cancer tissues, the expression of glycolytic enzymes HK2, PFKM, PKM2 in paclitaxel-resistant breast cancer tissues was significantly increased ($P<0.0001$), the production of lactic acid and pyruvate in paclitaxel-resistant breast cancer tissue was increased by 28% ($P=0.0005$) and 50% ($P=0.001$), respectively. Compared with siNC group (1.00 ± 0.02), the relative mRNA levels of HK2 (0.56 ± 0.03), PFKFB3 (0.37 ± 0.01) and PKM2 (0.42 ± 0.01) in knockdown group were significantly decreased ($P<0.05$) and the protein levels were also significantly decreased. CCK8 results showed that the resistance of MCF7-taxol to paclitaxel decreased in varying degrees after knockdown of HK2, PFKFB3 and PKM2 ($P<0.05$). [Conclusion] The key glycolytic enzymes mediated metabolic reprogramming are highly expressed in chemotherapy resistant breast cancer. Knockdown of the expression of key enzymes HK2, PFKFB3 and PKM2 can reverse the resistance of breast cancer to paclitaxel, which is expected to be an effective treatment for chemoresistant breast cancer.

Subject words: breast cancer; drug resistance; glycolysis

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81830052; 81903065); 上海市分子影像学重点实验室 (18dz2260400)

通信作者: 黄钢, 教授, 博士; 上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科, 上海市浦东新区浦建路 160 号 (200127); E-mail: huanggang@sumhs.edu.cn

收稿日期: 2020-11-03; **修回日期:** 2020-12-14

肿瘤耐药是导致乳腺癌治疗失败的重大原因,耐药性与侵袭性等肿瘤恶性临床病理特征密切相关。耐药性降低了乳腺癌患者的治疗效果,并且是癌症相关死亡的重要原因。研究表明侵袭性癌细胞的新兴特征是能量代谢,包括糖酵解激活的增强和乳酸增多^[1-2]。靶向乳酸的生产,被认为是一种有前途的癌症治疗方法^[3-5]。因此对肿瘤组织糖代谢的研究也成为肿瘤诊断和治疗的重要因素。为了进一步探讨体内耐药乳腺癌组织的葡萄糖水平改变,本研究构建了耐药乳腺癌动物模型,通过对糖酵解关键酶表达的检测和糖代谢产物乳酸、丙酮酸生成的测定,探讨体内乳腺癌组织和耐药乳腺癌组织的糖代谢的差异,为耐药乳腺癌的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性无胸腺裸鼠 (BALA/c-nu) 10 只, 21~28 日龄, 体重 12~14g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 乳腺癌细胞株 MCF7 为本实验室保存, 耐药细胞株 MCF7-Taxol 购自和元生物技术(上海)股份有限公司, 胎牛血清、胰蛋白酶、高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; PS(青霉素+链霉素)购自上海爱必信生物科技有限公司, 化疗药物紫杉醇购自美国 Sigma 公司; 转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司, 乳酸测定试剂盒和丙酮酸测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; RNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司; 逆转录试剂盒购自 Takara 公司; CCK8 试剂购自 Bimake 公司; BCA 定量试剂盒购自 Thermo 公司; Western 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司; PKM2 兔单克隆抗体购自美国 Cst 公司; PFKM、HK2、PFKFB3 兔多克隆抗体购自 Proteintech 公司; 酶标仪购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 细胞培养、接种及建模

以含 10% 胎牛血清、青霉素(100U/ml)、链霉素(100μg/ml) DMEM 培养液培养乳腺癌细胞株。细胞培养环境为 37℃, 含有 5% 体积分数 CO₂ 无菌恒温培养箱, 细胞贴壁生长至 70%~80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶消化处理。取对数生长期肿瘤细胞, 细胞密度为 1×10⁸ 细胞/ml, 于裸鼠右侧腋皮下, 每只注射

细胞悬液 150μl, 6~7d 种植区皮下可触及瘤样结节, 随后每 3d 测量肿瘤体积。肿瘤体积=0.5×长径(a)×短径(b)²。

1.3 细胞转染

取对数生长期的 MCF7-Taxol 细胞, 接种于 6 孔板中, 每个孔加入 2ml 培养基, 培养 24h 后转染。分为 siNC 组、siPKM2 组、siHK2 组和 siPFKFB3 组, 按照 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书转染 48h 后进行实验。序列 siPKM2: 5'-GCUGUGGCUCUAG-ACACUAAA-3', siHK2: 5'-GGGUGAAAGUAACGGA-CAAUG-3', siPFKFB3: 5'-UGUCGCUGAUCAAGGUG-AUU-3'。

1.4 实时荧光定量 PCR

不同转染组的细胞于 6 孔板培养 48h 后收集细胞样品。使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 检测 RNA 浓度后逆转录为 cDNA, 采用相对定量 qPCR 法, 以 Cyclophilin B(CB) 为内参, 检测细胞内 PKM2、HK2、PFKFB3 mRNA 相对表达量。反应条件为 95℃ 5min, 反应一个循环, 95℃ 10s, 60℃ 30s, 反应 40 个循环。引物序列见 Table 1。

1.5 CCK8 法检测细胞增殖

取对数生长期的 siNC 组、siPKM2 组、siHK2 组和 siPFKFB3 组 MCF7-Taxol 细胞以 10⁴/孔接种于 96 孔板中, 培养 24h 后, 加入不同浓度的紫杉醇处理 48h, 每孔加入 CCK8 溶液 10μl, 放入细胞培养箱中继续培养 1h, 于 450nm 处检测各孔的 OD 值。

1.6 动物分组

所有雌性裸鼠饲养环境温度、湿度适宜, 独立通风条件, 以灭菌纯净水、无菌饲料饲养。采用随机分组原则将 10 只裸鼠分为两组, 乳腺癌细胞株接种组为紫杉醇敏感乳腺癌移植瘤模型, 紫杉醇耐药乳腺癌细胞株 MCF7-Taxol 接种组为紫杉醇耐药乳腺癌移植瘤模型, 每组 5 只。

1.7 裸鼠乳腺癌移植瘤模型药物实验

观察肿瘤生长情况, 待肿瘤瘤体长到 500mm³ 时, 尾静脉给药, 10mg/kg, 每周给药 2 次, 连续给药 4 周。给药结束后, 颈椎脱臼法处死裸鼠, 取肿瘤组织, 拍照记录。

1.8 免疫组织化学法检测

分别取典型乳腺癌肿瘤组织及耐药乳腺癌肿瘤组织各两个切片脱蜡, 水化, PBS 冲洗 3 次, 每次

Table 1 Primers used in real-time PCR

Genes	Primers
CB	F: 5'-AGATGTAGCCCGGTGATCT-3' R: 5'-CCGCCCTGGATCATGAAGTC-3'
HK2	F: 5'-GAGCCACCACTCACCCTACT-3' R: 5'-CCAGGCATTCGGCAATGTG-3'
PFKFB3	F: 5'-AGCCCGGATTACAAAGACTGC-3' R: 5'-GGTAGCTGGCTTCATAGCAAC-3'
PKM2	F: 5'-TCGCATGCAGCACCTGATT-3' R: 5'-CCTCGAATAGCTGCAAGTGTA-3'

5min, 放入 0.01M 枸橼酸缓冲液 (pH6.0), 加热 10min, 室温冷却 30min, 3% H_2O_2 滴加到切片上封闭 10min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5min。5% BSA 封闭 20min, 一抗过夜。次日取出, PBS 冲洗 3 次, 孵育二抗, PBS 冲洗 3 次, 滴加 SABC, 室温 20min, PBS 冲洗 4 次, DAB 显色, 蒸馏水终止反应, 自来水冲洗。苏木紫复染, 自来水冲洗, 依次用 50%、70%、95% 酒精浸泡切片 5min, 无水乙醇浸泡 10min, 二甲苯浸泡 10min, 中性树胶封片, 阅片总结结果。将肿瘤细胞内棕黄色颗粒定为阳性, 每张切片随机选取 3 个视野观察, 计算阳性细胞百分比。

1.9 Western blot 法

分别提取两组典型紫杉醇耐药乳腺癌组织和敏感乳腺癌组织的蛋白质, BCA 法对蛋白浓度定量, SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 80V (浓缩胶)-120V (分离胶) 电泳, 湿转法将蛋白转至 PVDF 膜, 质量分数为 5% 脱脂奶粉室温封闭膜 1h, TBST 洗 3 次, 每次 5min, 加入 PKM2 兔单抗 (1:1000)、PFKM 兔多抗 (1:1000)、PFKFB3 兔多抗 (1:1000)、HK2 兔多抗 (1:1000)、 β -actin 兔单抗 (1:1000), 4℃ 过夜, 去一抗, TBST 洗 3 次, 每次 5min, 室温孵育二抗 1h, TBST 洗 3 次, 每次 5min, 加 ECL 在 Azure Biosystems c300 化学发光检测系统中采集图像。

1.10 乳酸、丙酮酸生成测定

取两组肿瘤组织, 按重量(g): 体积(ml)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500r/min, 离心 10min, 取上清液作为样本, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。根据丙酮酸试剂盒说明书, 样本、标准液和空白对照生理盐水先后加入澄清剂, 工作液, 37℃ 反应 10min 后加入终止液, 铺在 96 孔板中, 每个分组设置 3 个副孔, 用酶标仪于 505nm 处检测各孔的丙酮酸浓度。根据乳酸试剂盒说明书,

样本、标准液和空白对照生理盐水先后加入工作液、显色剂, 37℃ 反应 10min 后加入终止液, 铺在 96 孔板中, 每个分组设置 3 个副孔, 于 530nm 处检测各孔的乳酸浓度。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行实验数据分析, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 两样本组间比较采用 *t* 检验。采用 GraphPad Prism 7.0 作图。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠一般情况

共接种 10 只裸鼠, 成瘤率 100%, 6~7d 种植区皮下可触及瘤样结节, 13~14d 肿瘤体积达到 500mm³, 成瘤后裸鼠活动情况及体重无明显变化, 随肿瘤体积增大, 裸鼠体重减轻, 活动减弱。

2.2 紫杉醇治疗后裸鼠情况

给药期间, 9 只裸鼠一般情况良好, 有 1 只耐药乳腺癌组裸鼠死亡, 系肿瘤体积过大, 心肺衰竭而死。给药 4 周后, 相对于紫杉醇耐药乳腺癌组, 紫杉醇敏感乳腺癌组裸鼠肿瘤体积明显减小 ($t=2.053$, $P<0.05$), 肿瘤重量明显减轻 ($t=2.349$, $P<0.05$) (Table 2), 说明紫杉醇耐药乳腺癌模型构建成功。

2.3 紫杉醇耐药乳腺癌组织中的糖酵解酶高表达

与紫杉醇敏感乳腺癌组相比, 紫杉醇耐药乳腺癌组的 HK2、PFKM、PKM2 染色阳性率分别提高约 55%、42%、53% (Figure 1A, P 值均 <0.0001)。蛋白印迹实验检测 HK2、PFKM、PKM2 在紫杉醇耐药乳腺癌组织和敏感乳腺癌组织中的表达, 紫杉醇耐药乳腺癌组织中 HK2、PFKM、PKM2 蛋白表达水平分别增高约 65%、54%、52% (Figure 1B)。由此可见, 对紫杉醇药物产生耐药性促进了乳腺癌组织糖酵解酶的表达。

2.4 紫杉醇耐药乳腺癌组织有较强的乳酸和丙酮酸生成能力

在等重量肿瘤组织条件下, 相对于紫杉醇敏感乳腺癌组织, 紫杉醇耐药乳腺癌组织中乳酸产量增高约 28% ($P=0.0005$), 丙酮酸产量增高约 50% ($P=0.001$) (Figure 2)。由此说明, 耐药乳腺癌组织中糖酵解酶的高表达促进了耐药乳腺癌组织中糖酵解能力

的增强。

2.5 瞬时敲低 PKM2、HK2、PFKFB3 的效率

将 siPKM2、siHK2、siPFKFB3 分别转染至乳腺癌耐药细胞系 MCF7-Taxol, 蛋白印迹实验和实时荧光定量 PCR 结果 (Figure 3) 显示, 相对于 NC 组, siPKM2 mRNA 和蛋白水平分别下降约 58% 和 40% ($P < 0.0001$), siHK2 mRNA 和蛋白水平分别下降约 44% 和 32% ($P = 0.0391$), siPFKFB3 的 mRNA 水平和蛋白水平分别下降 63% 和 37% ($P = 0.0002$)。

2.6 敲低 PKM2、HK2、PFKFB3 逆转耐药乳腺癌细胞紫杉醇耐药性

相对于空白组, 200nmol/L 和 400nmol/L 紫杉醇浓度作用下, siPKM2 组的 MCF7-Taxol 细胞存活率分别降低 32% ($P < 0.0001$)、38% ($P = 0.0003$); siHK2 组分别降低 22% ($P = 0.004$)、28% ($P = 0.0003$); siPFKFB3 组分别降低 20% ($P = 0.0206$)、23% ($P = 0.007$) (Figure 4)。由此可见, 敲低 PKM2、HK2、PFKFB3 三个糖酵解关键酶增强了紫杉醇药物对耐药乳腺癌的抑制作用。

3 讨论

正常细胞在正常环境中主要通过线粒体中的氧化磷酸化产生 ATP。在肿瘤细胞中, 即使在氧气存在的情况下, 肿瘤细胞也会增强糖酵解作用产生 ATP 和乳酸。这种现象被称为 Warburg 效应。这种肿瘤代谢的重编程被认为是肿瘤的标志^[1,6]。乳腺癌在产生化疗耐药后葡萄糖代谢的变化情况尚未得到深入研究。本研究构建了体内乳腺癌耐药模型, 通过一定周期的治疗后检测癌组织中葡萄糖代谢物的水平, 旨在研究乳腺癌产生耐药后葡萄糖代谢的变

Table 2 Comparison of tumor growth in two groups

Groups	Tumor volume (cm ³)	Tumor weight (g)
Resistant group	1.401±0.155	2.052±0.217
Sensitive group	0.536±0.789	0.665±0.119

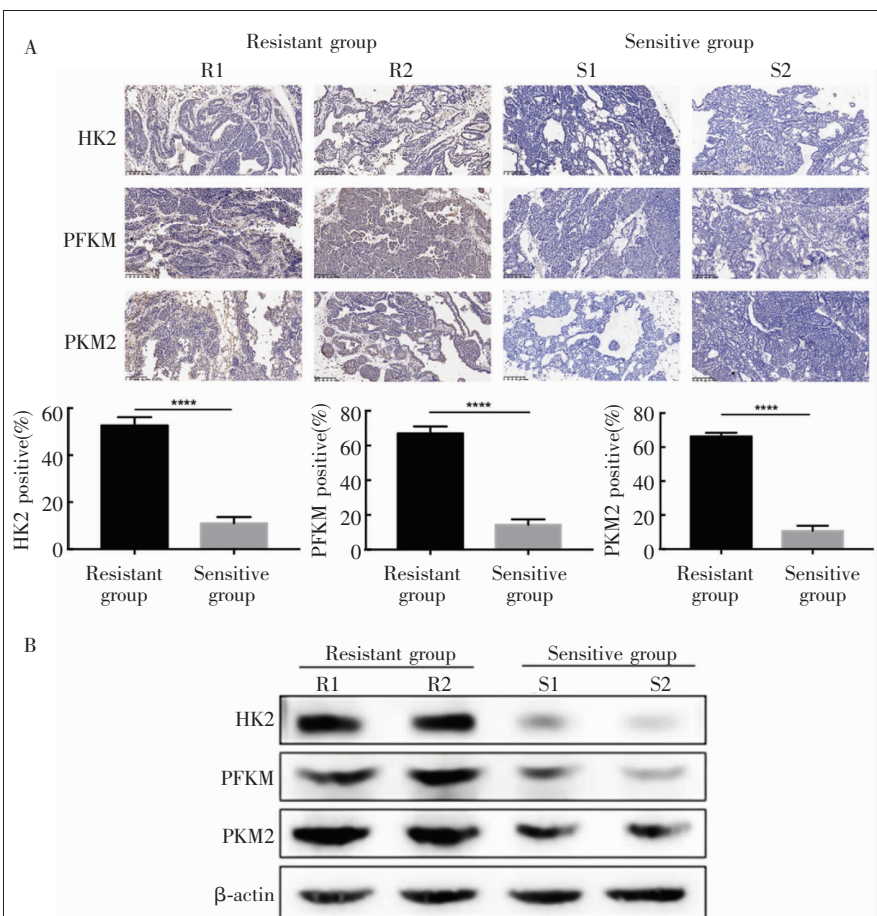


Figure 1 Expression of glycolytic enzyme in tumor tissues in two groups

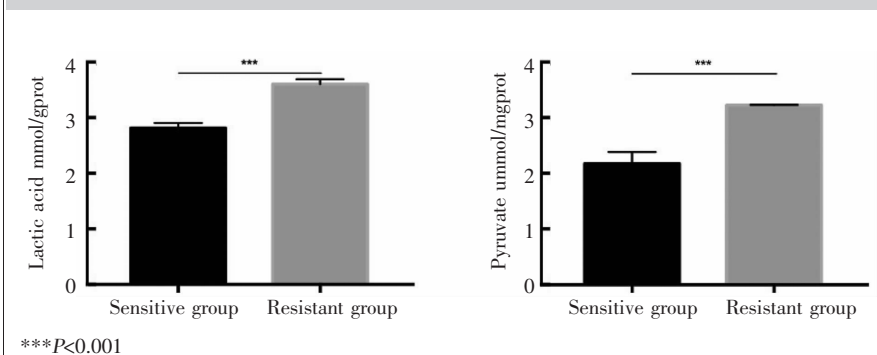
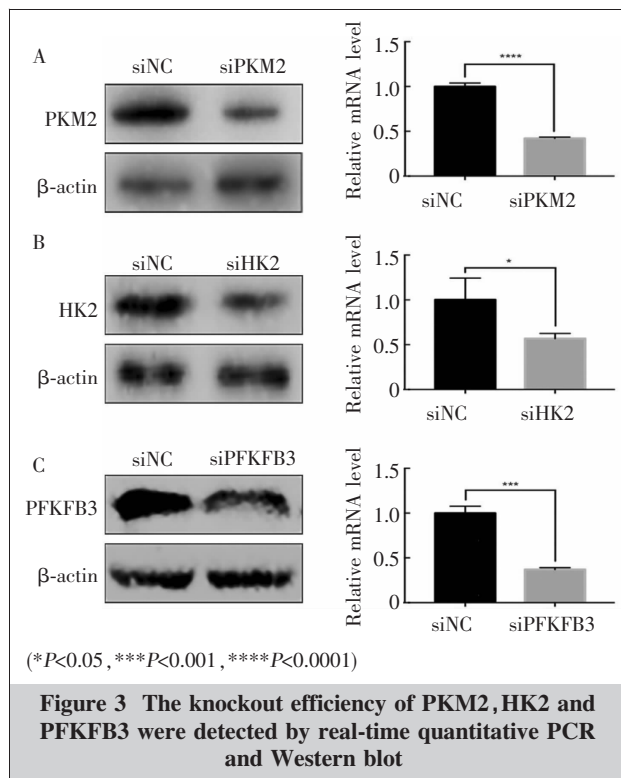


Figure 2 Production of lactic acid and pyruvate in two groups of tumor tissues

化及其机制。本文结果发现耐药癌组织中产生更多的乳酸和丙酮酸, 这表明在乳腺癌在产生耐药后其糖酵解水平增高, 耐药加剧了肿瘤细胞由氧化磷酸化转向糖酵解途径。葡萄糖代谢与肿瘤生理学和药理

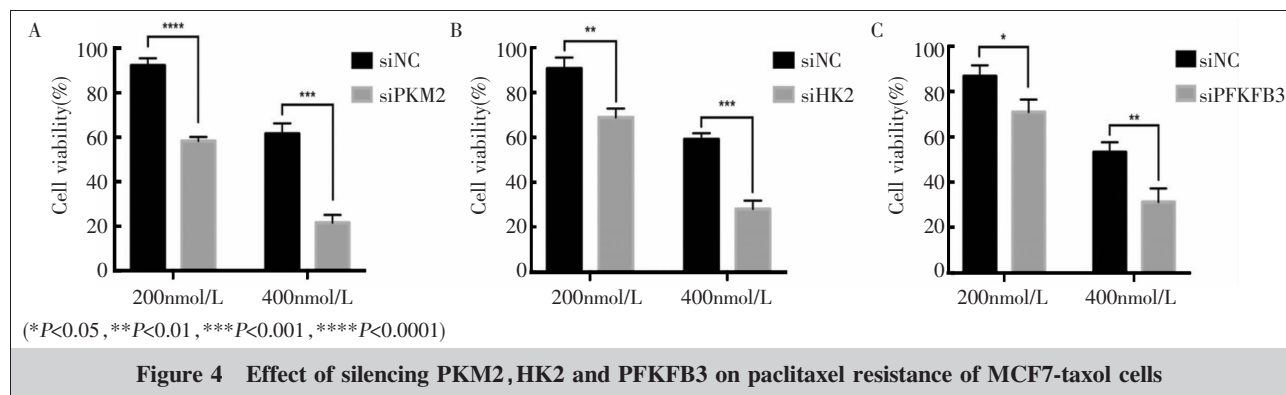


学相关,研究表明糖酵解的增强还可以赋予癌细胞其他的优势,通过其他途径产生的中间物质,从而适应低氧环境^[7]。糖酵解的增强减少了活性氧(ROS)、二氧化碳(CO_2)在线粒体中的产生,这些活动导致了有利于肿瘤增殖的细胞内碱性和细胞外酸性的 pH 环境^[8-9]。除了促进肿瘤生长外,癌组织的代谢差异,ROS 产生的减少为肿瘤细胞提供了一个耐药的环境和可能靶向治疗的机会^[10-11]。本研究表明在体内耐药肿瘤组织与肿瘤组织的代谢特征不同,耐药肿瘤组织比肿瘤组织糖酵解水平更高,说明肿瘤细胞代谢失调与耐药性表型的发展有关。

代谢重编程促进了肿瘤恶性表征,从而影响肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡以及治疗反应^[12]。最近研

究表明糖酵解中的几种调节酶与促进耐药性癌症表型有关。己糖激酶(HK)是催化糖酵解途径第一个代谢步骤的关键酶。研究表明其两种同工酶在许多癌症中都表达上调,并具有抑制线粒体凋亡的能力^[13]。同时 Yang 等^[14]发现 PIM2 介导的 HK2 磷酸化通过增强糖酵解和葡萄糖饥饿诱导的自噬促进了乳腺癌的肿瘤生长和对紫杉醇的耐药性。磷酸果糖激酶最重要的变构激活剂是 2,6-二磷酸果糖,合成 2,6-二磷酸果糖最重要的酶磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶同工酶 3(PFKFB3)已被发现在肿瘤的发生发展,癌细胞的存活增殖中起着重要作用^[15]。Ge 等^[16]发现通过 miR-206 靶向抑制 PFKFB3 的表达,可以抑制乳腺癌的增殖和迁移。丙酮酸激酶(PKM)是糖酵解作用的另一个关键酶,它可将磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和 ADP 转化为丙酮酸和 ATP。PKM2 在癌症中高表达,对 PEP 的高底物亲和力和驱动了更高的糖酵解通量,并保持了高乳酸水平^[17],而高乳酸促进了肿瘤细胞的存活,减少了 ROS 产生,抑制了化疗药物介导的肿瘤细胞的凋亡^[18]。Hsu 等^[19]发现 PKM2 通过激活 EGFR 信号传导途径诱导乳腺癌细胞扩散。本实验通过 Western blot 实验和免疫组织化学法检测癌组织中糖酵解酶的表达,结果显示耐药组织中其 HK2、PFKM、PKM2 三个糖酵解关键酶均明显提高,说明耐药组织是通过提高糖酵解酶表达水平来实现葡萄糖代谢向糖酵解途径的转变。本研究在耐药乳腺癌细胞中敲低三个糖酵解关键酶 PKM2、HK2、PFKFB3 的表达,结果发现乳腺癌细胞对紫杉醇药物的耐药性不同程度的降低,说明抑制糖酵解酶的表达能够逆转耐药乳腺癌对紫杉醇的耐药性。因此,PKM2、HK2、PFKFB3 可作为治疗乳腺癌紫杉醇耐药患者的有效靶点。

综上所述,紫杉醇耐药乳腺癌代谢重编程程度



加重,糖酵解关键酶的高表达在其中发挥重要作用,抑制 PKM2、HK2、PFKFB3 表达以此降低糖酵解水平有望成为逆转乳腺癌紫杉醇耐药的有效措施。

参考文献:

- [1] Bose S, Le A. Glucose metabolism in cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1063: 3–12.
- [2] Mirzaei H, Hamblin MR. Regulation of glycolysis by non-coding RNAs in cancer; switching on the Warburg effect [J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2020, 19: 218–239.
- [3] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, et al. Cancer metabolism; a therapeutic perspective [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(1): 11–31.
- [4] Weyandt JD, Thompson CB, Giaccia AJ, et al. Metabolic alterations in cancer and their potential as therapeutic targets[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017, 37: 825–832.
- [5] Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3685–3692.
- [6] Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27–47.
- [7] Belisario DC, Kopecka J, Pasino M, et al. Hypoxia dictates metabolic rewiring of tumors; implications for chemoresistance[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2598.
- [8] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression; mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt A): 156–164.
- [9] Schwartz L, Supuran CT, Alfaro KO. The Warburg effect and the hallmarks of cancer[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(2): 164–170.
- [10] Sun L, Suo C, Li ST, et al. Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment; beyond the Warburg Effect[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2018, 1870(1): 51–66.
- [11] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism; Warburg and beyond[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 703–707.
- [12] Kinnaird A, Zhao S, Wellen KE, et al. Metabolic control of epigenetics in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 694–707.
- [13] Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism; implications for therapeutic targets[J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45(10): e45.
- [14] Yang T, Ren C, Qiao P, et al. PIM2-mediated phosphorylation of hexokinase 2 is critical for tumor growth and paclitaxel resistance in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2018, 37(45): 5997–6009.
- [15] Shi L, Pan H, Liu Z, et al. Roles of PFKFB3 in cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2017, 2: 17044.
- [16] Ge X, Lyu P, Cao Z, et al. Overexpression of miR-206 suppresses glycolysis, proliferation and migration in breast cancer cells via PFKFB3 targeting[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 1115–1121.
- [17] Dayton TL, Jacks T, Vander Heiden MG. PKM2, cancer metabolism, and the road ahead[J]. *EMBO Rep*, 2016, 17(12): 1721–1730.
- [18] Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer; can it be exploited for cancer therapy? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(10): 635–649.
- [19] Hsu MC, Hung WC, Yamaguchi H, et al. Extracellular PKM2 induces cancer proliferation by activating the EGFR signaling pathway[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(3): 628–638.