

肝癌干细胞的有氧糖酵解特性及其在 肿瘤微环境中的适应性机制

谭钦文¹, 杜沅沁¹, 徐健¹, 吴颖升¹,
梁向娟¹, 彭嘉敏¹, 黄鸿娜^{2,3}, 黄晶晶^{2,3*}

(¹广西中医药大学研究生院, 南宁 530200; ²广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023;

³广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室, 南宁 530023)

摘要: 肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)是肝癌细胞中少量存在并具有较强的自我更新、增殖和分化能力的细胞, 在肝癌发生、转移、复发、耐药性方面起着根本性的作用。肿瘤细胞的代谢以及生存机制一直是近年来的研究热点。LCSCs相比于非肝癌干细胞具有更强的糖酵解能力和对肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的适应能力。本文介绍了LCSCs的特点、糖酵解特性以及其在TME中的适应性机制, 为后续应用LCSCs实施精准治疗提供新思路。

关键词: 肝癌干细胞; 有氧糖酵解; 乳酸; “瓦伯格”效应; 肿瘤微环境

Aerobic glycolysis of hepatoma stem cells and its adaptive mechanism in tumor microenvironment

TAN Qinwen¹, DU Yuanqin¹, XU Jian¹, WU Yingsheng¹, LIANG Xiangjuan¹,
PENG Jiamin¹, HUANG Hongna^{2,3}, HUANG Jingjing^{2,3*}

(¹Graduate School of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

²The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China;

³Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine Combined with Traditional Chinese and Western Medicine
for High Incidence of Infectious Diseases, Nanning 530023, China)

Abstract: Liver cancer stem cells (LCSCs) are a small number of liver cancer cells with strong self-renewal, proliferation and differentiation ability. They play a fundamental role in the occurrence, metastasis, recurrence and drug resistance of liver cancer, and the metabolism and survival mechanism of tumor cells have become the focus of research in recent years. Compared with non-hepatoma stem cells, LCSCs have stronger glycolytic ability and adaptability to tumor microenvironment (TME). This article introduces the characteristics of LCSCs, glycolytic characteristics and the adaptive mechanism in their TME, in order to provide a new idea for the follow-up precise treatment of LCSCs.

Key Words: liver cancer stem cells; aerobic glycolysis; lactic acid; Warburg effect; tumor microenvironment

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 广西省级自然科学基金项目(2022GXNSFBA035485, 2022GXNSFAA035460)

第一作者: E-mail: 602942121@qq.com

*通信作者: E-mail: 55869563@qq.com

肝癌是目前最常见的恶性肿瘤之一。随着化疗、射频消融、肝移植等治疗手段不断创新,肝癌患者生存率得到一定的提升。这些方法对治疗早期肝癌具有一定效果,但对中晚期肝癌患者效果不佳,易复发及转移。尽管肝癌治疗方面取得了快速进展,但自2000年以来,肝癌患者的死亡率每年仍增长2%。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)预测,2030年肝癌死亡人数将超过100万^[1]。探索新的治疗方式,实施肝癌精准治疗迫在眉睫。近年来,随着分子靶向治疗、免疫治疗等兴起,肿瘤异质性、肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs),调控肿瘤细胞代谢以及肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)等研究为肝癌的预后、诊断和治疗提供了新的思路。

CSCs是肿瘤细胞中部分具有较强的自我更新及分化能力的细胞,对肿瘤的生长、转移、复发和耐药性具有重要作用。CSCs在有氧情况下,依然能通过糖酵解的方式优先摄取微环境中的葡萄糖,产生ATP和乳酸。这也使TME变酸、缺氧和营养缺乏更加严重。同时,CSCs在这种环境下也具有更好的适应性、可塑性和竞争能力,对周围免疫细胞具有抑制作用,易发生免疫逃逸。本文对肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)的糖酵解特性、与相关酶及转运蛋白的关系、在TME中的适应性进行综述。

1 LCSCs的特点

1.1 LCSCs的来源及特征

CSCs假说提出,肿瘤的形成与生长是由肿瘤中少量的CSCs推动的,这些数量少但拥有干细胞特性的细胞具有自我更新、全能或多能分化、致瘤能力强等特征,对肿瘤发生、转移、复发、耐药性起着根本性的作用^[2]。肝脏是一个具有强大再生能力的器官,这种能力与肝脏干细胞密切相关。肝脏干细胞具有独特的分裂方式,它可以根据微环境的变化分裂产生一个干细胞和一个分裂末期的功能细胞,为不对称分裂;或者分裂产生两个相同的干细胞,为对称分裂。这两种分裂方式的平衡是维持肝脏干细胞数量以及产生定向分化细胞的重要条件,当这种平衡机制被打破,则易导致不对称分裂失控而过度增生或产生基因突

变的干细胞,这可能是LCSCs的来源^[3,4]。正常成熟肝细胞和胆管细胞可以在肝损伤后的肝再生或致癌分化过程中,可通过遗传或表观遗传改变,转化为LCSCs。比如在乙型肝炎病毒(hepatitis B, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染以及代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)等的肝脏慢性炎症长期诱导下,肝细胞慢性损伤后致使肝干/祖细胞不断增殖,引起基因突变积累,最终发展为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[5]。

1.2 LCSCs的鉴定

目前,LCSCs尚未找到特异性表面标志物,但最常用的表面标志物有CD133、CD44、CD90以及EpCAM等。这些表面标志物高表达意味着CSCs干性较强,也意味着肿瘤具有较强的转移和侵袭能力^[6]。CD133是一种五糖跨膜蛋白,广泛存在于各种干细胞中,如胃癌、肝癌、肺癌干细胞,也是最常用的干细胞表面标志物,以表征具有高致瘤性和形成球体的能力的细胞^[7]。有研究发现,CD133⁺细胞比CD133⁻具有更强的自我更新能力、集落形成能力、血管生成能力、分化及形成肿瘤能力,且对化疗药物也具有更高的耐药性^[8]。CD44是一种存在于细胞表面的,与细胞迁移、黏附特性密切相关的糖蛋白,通常与其他表面标志物组合,用于表达LCSCs干性。有研究表明,CD133⁺CD44⁺肝癌细胞能够显示出更强的干细胞特性,致瘤能力也比CD133⁺CD44⁻细胞更强,耐药性更高,且对一些干细胞相关基因能优先表达^[9]。CD90是一种糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞表面糖蛋白,主要参与细胞间以及细胞与基质间的相互作用。CD90⁺LCSCs在原发肿瘤中被发现,并存在于肝细胞癌患者的血液中循环,作为人类内皮细胞活化的标志,可促进新血管的形成,可能与肝癌血行转移有关^[10]。EpCAM是一种跨膜糖蛋白,EpCAM⁺CSCs具有较强的自我更新、分化及侵袭能力。与CD90⁺CSCs相比,EpCAM⁺CSCs在免疫缺陷小鼠体内致瘤性更强,但侵袭能力相对较弱,其低分化的形态和高血清甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)呈正相关^[11]。在实验研究中,这些表面标志物常联合应用来鉴定LCSCs,也常用于表达LCSCs的干性。在临床研究中也常作为肝癌患

者生存和预后的指标。

2 LCSCs的糖酵解

肝脏是人体代谢的中心,是糖代谢的重要场所。在有氧条件下,细胞主要通过线粒体氧化磷酸化获得能量。糖酵解生成的丙酮酸,进入三羧酸循环,参与氧化磷酸化(*oxidative phosphorylation*, OXPHOS)为细胞供能。而在无氧条件下,细胞主要通过糖酵解生成ATP和乳酸,为细胞提供能量。德国科学家Otto Warburg发现,肿瘤细胞即使在有氧情况下,也主要依靠糖酵解方式代谢葡萄糖以提供能量,这种有氧糖酵解的代谢模式被称为“瓦伯格”效应(Warburg effect),具有高葡萄糖消耗、低ATP合成和高乳酸生成的特点(图1)。CSCs与非肿瘤干细胞相比更加依赖这种代谢方式,葡萄糖含量直接影响着CSCs生存环境与能量代谢^[12]。有研究发现,LCSCs糖酵解关键酶比非干性肿瘤细胞具有更高的表达,且其干性与糖酵解通路激活有着一定的关联性^[13]。与CD133⁺肝癌细胞相比,CD133⁺ LCSCs糖酵解基因(*Glut1*、*HK2*、*PDK4*和*PGAM1*)表达更高,高细胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)和糖生成基因(*G6Pase*和*PEPCK*)表达降低,ATP水平降低,线粒体呼吸减少^[14]。有研究表明,通过调节LCSCs的糖酵解不仅能有效降低LCSCs的干性表达,且对肿瘤细胞的EMT过程产生影响^[15,16]。因此,抑制LCSCs糖酵解对抑制肿瘤发生、发展具有重要意义。

2.1 LCSCs糖酵解过程中的关键酶

CSCs的糖酵解过程中,有四种关键限速酶的参与,包括己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)、磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。这些酶在代谢方面促进了LCSCs的糖酵解,直接或间接地提高了LCSCs的干性表型,也使LCSCs更具异质性。

2.1.1 HK2

HK2属于己糖激酶家族,是糖酵解过程中的第一限速酶,可以催化葡萄糖转化为葡萄糖-6-磷酸(glucose-6-phosphate, G-6-P)。HK2生理条件下在肌肉和脂肪细胞中表达,肝脏中很少有表达。但在肝癌发生时,体内的HK2表达水平上调。有研

究发现, HK2在CSCs中的表达相对较高^[17]。Li等^[18]对体内全基因组CRISPR/Cas9进行筛选,鉴定出67个肝癌致癌代谢相关基因,进行对比发现HK2能进一步促进LCSCs的维持和自我更新。FoxA2是胚胎发育早期的调节因子,能同时与染色体蛋白和DNA结合,参与细胞早期的基因激活,同时也是维持肝脏稳态的重要转录因子。有研究指出,抑制FoxA2的表达可以增强磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)途径相关基因的转录,并触发下游Akt磷酸化,降低HK2的表达,降低LCSCs的有氧糖酵解,抑制LCSCs增殖与肿瘤的生长^[19]。

2.1.2 PFK

PFK是糖酵解的第2个限速酶,参与催化果糖-6-磷酸(fructose-6-phosphate, F-6-P)转化为果糖-1,6-二磷酸。目前,关于PFK在肝癌中的研究较少,在其他癌症如肺癌细胞、前列腺癌细胞、乳腺癌细胞、胶质母细胞瘤细胞中的研究较多,并且仅仅把PFK作为癌细胞糖酵解的一项指标。Xin等^[20]发现,血小板型磷酸果糖激酶(phosphofructokinase-platelet, PFKP)有助于提高肝癌细胞的增殖、集落形成能力以及克隆形成能力,且通过体外实验证明,抑制PFKP有助于降低LCSCs表面标志物(ALDH1、CD44、CD133、Sox-2)的表达。师文楷等^[21]发现,抑制PFKFB3的表达可以降低肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力。这些研究发现,抑制PFK有助于抑制肝癌细胞的生物学行为及干细胞干性,但其相关分子机制尚未明确。

2.1.3 PK

PK能催化磷酸烯醇丙酮酸产生丙酮酸,包括PKR、PKL、PKM1和PKM2 4个亚型,均由*PKM*和*PKL*基因编码。其中,PKM1在正常肝细胞中表达,而PKM2在HCC中高表达,与患者的病理分级、临床分期、肿瘤大小及预后复发等存在一定的联系^[22,23]。临床研究发现,上调丙酮酸脱氢酶激酶4(pyruvate dehydrogenase kinase 4, PDK4)的表达不仅能降低线粒体膜电位以及ATP产量,还能上调葡萄糖转运蛋白以及糖酵解酶的表达,通过代谢重编程改变肝癌细胞的生长微环境,同时也上调LCSCs表面标志物的表达,使肝癌患者对化疗药物

的耐药性增加^[24]。MiR24-2被认为是一种具有致癌功能的微小RNA。在LCSCs中, miR-24-2能促进PKM1与人LCSCs中酪氨酸蛋白激酶肉瘤基因(sarcoma gene, *Src*)启动子区域的结合, 增强了*Src*的表达, 促进了LCSCs的增殖以及致瘤性^[25]。转录因子GATA6在多种癌症组织中均有表达, 并参与HCC的代谢重组。有研究表明, GATA6能与PKM基因启动子区结合并降低PKM2转录, 同时上调GLUT1和HK2的表达, 抑制肝癌细胞的糖酵解水平, 促使HCC细胞进行糖酵解代谢并促进致瘤性、自我更新和转移能力^[26]。

2.1.4 LDH

LDH是糖酵解过程中的最后一个限速酶, 催化丙酮酸生成乳酸, 是肿瘤维持能量代谢的必要条件, 乳酸的堆积造成的酸性微环境能有利于肿瘤细胞生长。LDH有3个亚型(LDHA、LDHB和LDHC), LDHA有利于丙酮酸转化为乳酸, 而LDHB则有利于乳酸转化为丙酮酸, 以维持细胞微环境的平衡。当癌症发生时, 这种平衡的环境被打破。临床研究表明, 肝癌患者的血浆和组织中

LDH水平较高, 与患者的预后显著相关, 血清中LDH水平较高的患者预示着预后不良^[27]。LDH5是由LDHA基因编码的4个亚单位组成, 在缺氧条件下能快速催化丙酮酸转化为乳酸以及生成ATP, 且与CD44⁺ CSCs群有一定相关性。LDH5的高表达可以促进CSCs的增殖^[28]。LDH的表达上调不仅能促进LCSCs的增殖、分化, 还能促使乳酸生成, 改变TME中的pH值, 使微环境更利于LCSCs的生长, 在临床中也与癌症患者的预后息息相关。

2.2 LCSCs糖酵解中的关键转运蛋白

肿瘤细胞糖酵解的关键蛋白包括葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)和单羧酸转运蛋白(monocarboxy late transporter proteins, MCTs)。GLUT位于细胞表面, 是葡萄糖从细胞外进入细胞内的重要转运蛋白, 满足了肿瘤细胞高葡萄糖消耗的特点。乳酸是细胞糖酵解产生能量的必要产物, MCTs能将细胞内的乳酸转移至细胞外, 避免细胞酸中毒, 酸化TME(图1)。

2.2.1 GLUT

GLUT由SLC2基因编码, 主要底物包括葡萄

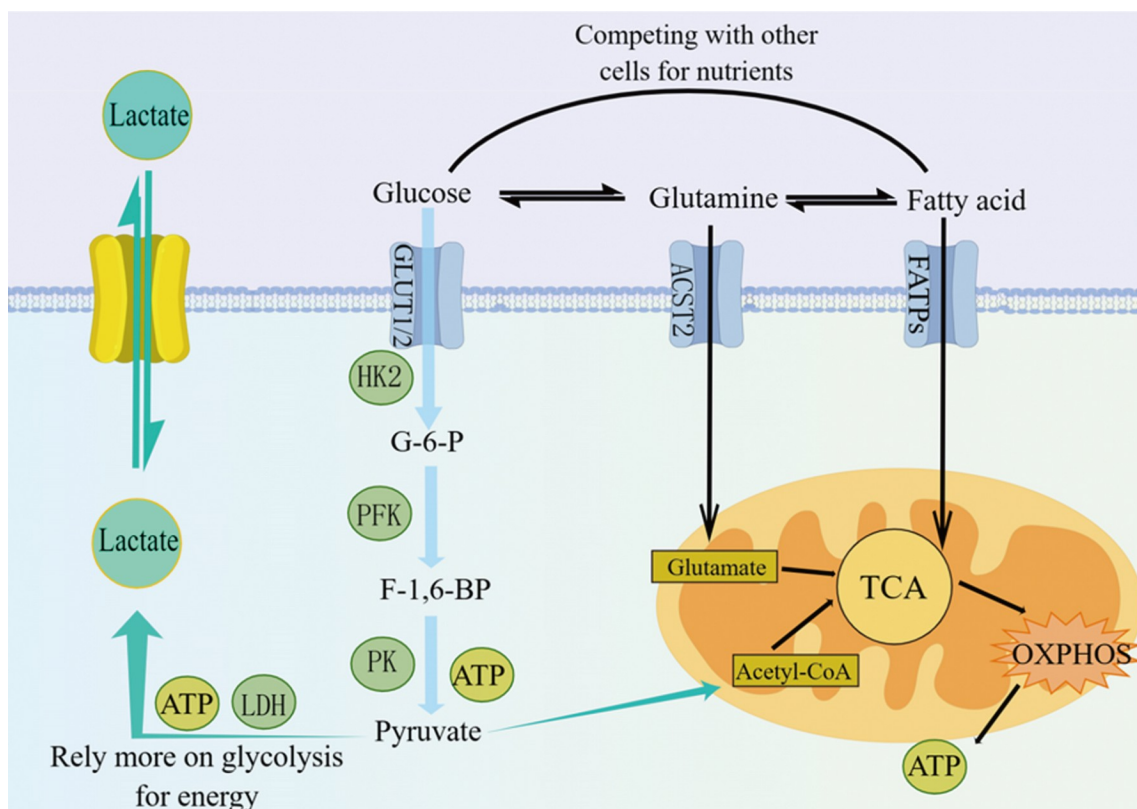


图1 LCSCs与“瓦伯格”效应的关系

糖、果糖和木糖等。目前, 人类已发现的GLUT家族共有14个成员(GLUT1~14), 其分布具有组织特异性。其中, GLUT1、GLUT2与肝的关系最密切^[29]。在肝癌组织中, GLUT1的表达相对较高, 且其mRNA和蛋白表达水平与肝癌的肿瘤大小、病理分级、临床分期以及淋巴结转移相关, 有助于预测肝癌的恶性程度、侵袭和转移能力。有研究表明, 胰腺癌、卵巢癌、胶质母细胞瘤的CSCs通常需要超生理葡萄糖浓度来维持其干细胞状态^[30]。抑制GLUT1的表达可降低CSCs的葡萄糖摄取, 同时抑制CSCs的成球能力、CD133的表达以及其在裸鼠体内的成球能力。GLUT1对CSCs的葡萄糖摄取发挥巨大作用, 以满足CSCs高葡萄糖消耗的状态。

GLUT2主要存在于干细胞和胰岛 β 细胞中, 与体内葡萄糖浓度、胰岛素的分泌密切相关。Kim等^[31]在从癌症基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA)获得的数据分析中发现, GLUT2在无饮酒和丙型肝炎相关性肝癌患者中表达更高, 可用于预测肝癌患者5年的生存率。2-18F-脱氧葡萄糖(2-[18F]fluoro-2-deoxyglucose, 18FDG)是一种被氟18标记的葡萄糖类似物, 主要依赖GLUT1和GLUT3转运至细胞内, 可用于肝癌的影像学诊断。Kim等^[31]还发现, 肝癌细胞中GLUT2 mRNA的表达与18FDG摄取呈正相关, 且高于GLUT1和GLUT3, 其分子机制有待进一步探索。STAT3是一种存在于多种肿瘤组织中的转录活化因子, 参与癌细胞的生长、代谢、转移和浸润。体外实验表明, 肝卵圆细胞中的STAT3活化可以促进GLUT2的表达上调, 增加了葡萄糖消耗和乳酸的生成, 促使肝卵圆细胞的恶性转化^[32]。除了参与葡萄糖转运之外, GLUT2还可作为抑制肝前体细胞/卵圆细胞转化成为癌性干细胞的一个重要靶点, 但其分子机制仍不明确。目前对于GLUT家族在LCSCs中的相关研究较少, 其作用和机制在未来有待进一步探索, 具有较好的研究前景。

2.2.2 MCT

MCT广泛存在细胞质膜, 在正常生理pH状态下, 乳酸不能自由进出细胞, 需要MCT参与转运。与GLUT家族类似, MCT家族同样有14个成员(MCT1~14), 哺乳动物编码丙酮酸和乳酸代谢需要

两种LDH同工酶(LDHA和LDHB), 以及4种单羧酸转运体(MCT1~MCT4), 在肿瘤细胞能量代谢及TME方面发挥重要作用。MCT1和MCT4主要负责将细胞内乳酸转运至细胞外, 避免细胞酸中毒, 同时酸化TME, 抑制和杀死了周围的正常细胞, 包括基质细胞和免疫细胞等, 促使HCC发生免疫逃逸和转移^[33]。韩晟等^[34]发现, 癌旁组织中MCT1的高表达有利于提高肿瘤对微环境中乳酸的摄取, 诱导Treg分化, 促使肿瘤发生免疫逃逸。研究表明, 聚己亚甲基盐酸可与CD147结合, 从而抑制MCT1和MCT4的表达, 降低胶质母细胞瘤干细胞的增殖, 且在非CSCs向CSCs转化过程中, MCT1的呈高表达状态^[35]。乳酸循环是乳酸异生为葡萄糖被组织利用的重要途径。葡萄糖也可通过循环乳酸参与线粒体TCA循环, 而乳酸则可作为TCA循环的中间体^[36]。有研究表明, 抑制MCT1的表达可抑制CSCs线粒体的功能, 从而抑制CSCs的增殖性克隆扩增^[37]。以上研究指出, MCT转运蛋白对CSCs的增殖、转运和TME变化具有重要作用, 但目前对LCSCs中的MCT转运蛋白的研究较少, 仍需进一步探讨其在LCSCs中的作用机制。

3 CSCs在TME中具有更好的适应性

缺氧、缺营养、酸化是肿瘤所处环境的特征, 在这种环境下, 肿瘤细胞为了得到生存, 通常需要依赖自身代谢方式的调整, 与周围基质细胞或免疫细胞竞争营养物质, 来维持自身的发展。在这些肿瘤细胞中, CSCs对微环境的调节和适应能力更强, 是癌症发生转移、复发、耐药性、免疫逃逸的关键。“瓦伯格”效应促使形成的TME能满足CSCs快速增殖对生物能量和生物合成需求。在有氧糖酵解过程中, 丙酮酸通过LDHA转化为乳酸, 一方面减少了对酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase complex, OGDC)的抑制, 稳定了缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达, 增强肿瘤细胞对缺氧的适应性, 同时细胞内乳酸浓度的增加, 能激活希佩尔-林道蛋白(von Hippel-Lindau, VHL), 减少HIF-1 α 的降解, 又能诱导肿瘤细胞有氧糖酵解的发生^[38]。另一方面, 乳酸通过MCT转移至细胞外, 即避免了肿瘤细胞酸中毒, 同时降低微环境

的pH值,使周围的基质细胞和免疫细胞生长得到抑制,肿瘤细胞通过有氧糖酵解优先利用葡萄糖,同时诱导肿瘤发生免疫逃逸^[39]。

3.1 缺氧微环境下的LCSCs

缺氧是肿瘤所处环境的最主要特征,肿瘤细胞在缺氧环境下可以通过PI3K/Akt、c-MYC、ERK/MAPK等信号通路,诱导HIF的表达,激活更多下游通路,适应缺氧微环境^[40]。同时,缺氧微环境也有利于促进CSCs表型的表达。缺氧相关因子(hypoxia-associated factor, HAF)是一种E3泛素连接酶,在缺氧环境中HAF高表达并与HIF-1 α 结合并泛素化,使HIF-1 α 降解,同时HAF也会与HIF-2 α 结合,激活HIF-2 α ,将癌细胞的缺氧反应从HIF-1 α 转换为依赖于HIF-2 α 的转录,使干细胞相关基因如(MMP-9和Oct-3/4)的表达增加^[41]。Oct-3/4的增加也可以促使成体细胞去分化,向多能干细胞转变^[42]。有研究表明,HIF-1 α 、HIF-2 α 能调节SDF-1、VEGF的表达,促进乳腺以及肾肿瘤血管的生成,同时能促使CSCs表型的表达^[43]。在缺氧微环境中,HIF-1 α 和HIF-2 α 已被证实多种CSCs中表达,在缺氧微环境下维持CSCs的表型和促使肿瘤血管生成起重要作用。

在LCSCs方面,早期的研究发现,缺氧可以通过AKT/HIF-1 α /PDGF-BB自分泌环境增强对肝癌细胞和成瘤性肝祖细胞的耐药性^[44]。Jung等^[45]用人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)与Huh7球体共培养,建立体外HCC模型,模拟缺氧和营养缺乏的TME,不仅在球体中检测到HIF-1 α 高表达,还检测到了CD133、CD24、EpCAM和 β -连环蛋白等干性标志物的表达以及VEGF的高表达。ELK3可以促进肿瘤发生和血管生成。研究表明,ELK3通过调节HIF-1 α 表达促进CD133⁺/CD44⁺ LCSCs中的MMP-2和VEGF的活性,促进细胞的转移和侵袭。在缺氧微环境中,CSCs以HIF-1 α 和HIF-2 α 依赖的方式维持着干性^[46]。

3.2 缺营养微环境下的LCSCs

营养缺乏是肿瘤在微环境中面临的另一困境,具体表现在一方面肿瘤快速长大,部分肿瘤远离血管,对血管中的营养物质获取不足;另一方面,血管缺乏除了导致氧气缺乏外,肿瘤细胞

之间以及肿瘤与其他细胞之间争夺营养物质,也会导致葡萄糖、氨基酸等的含量缺乏。在这种竞争下,CSCs的竞争性相对较强。有研究表明,CD133⁺ LCSCs可通过IL-6-STAT3信号通路促进细胞中的GLUT1和GLUT3表达,优先从微环境中摄取葡萄糖^[47]。在这种微环境下,HCC可驱动岩藻糖基转移酶1(fucosyltransferase 1, FUT1)转录,靶向作用于CD147、ICAM-1、EGFR和EPHA2等膜蛋白,激活Akt/mTOR/4EBP1信号传导以驱动癌症干性^[48]。除此之外,氨基酸、脂质和铁等也是LCSCs与周围细胞竞争的重要营养物质(图1)。在氨基酸代谢方面,有研究指出,部分CSCs没有利用糖酵解的能力,更多依赖氨基酸代谢产生能量,当微环境中的氨基酸减少,则这部分细胞会出现不同程度的损伤和死亡^[49]。在LCSCs中,谷氨酰胺代谢有助于维持其干性^[50]。在脂质代谢方面,CSCs在微环境中能通过增加对脂肪酸摄取以维持自身的干性^[51]。NANOG是干细胞自我更新和多能性维持的重要因子。在LCSCs中,上调NANOG的表达可抑制线粒体氧化磷酸化,降低氧耗的同时增加细胞的脂肪酸代谢,以维持自身干性以及耐药性^[52]。在铁代谢方面,研究发现,CSCs中的铁含量比非CSCs多,且与细胞干性的强弱有关^[53]。目前临床上已有多种治疗通过改变CSCs的铁稳态来作为癌症的辅助治疗^[54]。在缺氧、缺营养微环境下,LCSCs表现出较好的可塑性,迅速适应微环境的变化并增强自身干性,对肿瘤的生长、转移及耐药性起重要作用,研究LCSCs的可塑性机制有助于进一步了解其在TME中的异质性。

3.3 酸性微环境下的LCSCs

近年来,人们对CSCs与肿瘤缺氧微环境的关系研究较多,而对酸性微环境与CSCs的关系研究较少。人体正常组织的pH值在7.35~7.45之间,而相关报道指出,恶性肿瘤的周围环境的pH值为6.7~7.1^[55]。酸性微环境主要与糖酵解产生的乳酸和氧化代谢产生的CO₂有关,缺氧条件下,CO₂通过TCA循环或戊糖磷酸产生,在碳酸酐酶的作用下合成H₂CO₃,然后解离形成HCO₃⁻和H⁺,并在H⁺-ATP酶、Na⁺/H⁺交换体1和MCT4等转运体的参与下,H⁺被转运至细胞外,使TME酸化^[56]。在体

外模拟的酸性微环境下可激活了HIF-1 α 和HIF-2 α , 并与miR-21和miR-10b启动子区域的结合, 刺激了外泌体miR-21和miR-10b的表达, 在体内和体外都显著促进了肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[57]。酸性微环境下, 肿瘤细胞的成球能力以及CSCs的干性表型、迁移能力等也得到增强^[58,59]。有研究发现, 乳酸可以通过组蛋白乳酸化来调节糖酵解和TCA循环中的相关基因表达, 来促进肿瘤细胞的生长^[60]。Pan等^[61]发现, 乳酸能提高H3组蛋白乳酸化水平, 有效地促进了LSCs的增殖, 使用特定剂量的去甲基拉木醛(demethylzeylasteral, DML)能降低细胞外乳酸水平, 抑制组蛋白乳酸化, 使LCSCs的糖酵解酶、干性标志物、增殖标志物等明显降低, 并在体内实验中抑制了裸鼠皮下瘤体的生长, 有效抑制了HCC的生长。从上述研究可以看出, 酸性微环境可以诱导HIF的表达, 加重微环境的缺氧状态, 而缺氧又可刺激肿瘤细胞糖酵解产生乳酸, 酸化TME, 而LCSCs在肿瘤酸性微环境中表现出较强的可塑性, 迅速适应和利用微环境的变化提高自身的干性以及迁移能力。另外, 组蛋白乳酸化是近年来的研究热点, 可调控糖酵解相关酶和转运蛋白的基因表达, 对抑制CSCs细胞糖酵解具有重要意义, 但目前这方面研究较少, 具有广阔的研究前景。

4 小结与展望

CSCs在肿瘤发生、转移、复发、耐药性起着根本性作用, 目前针对CSCs的治疗方式甚少, 探索CSCs的代谢方式, 为靶向CSCs代谢提供新思路势在必行。“瓦伯格”效应提出的肿瘤有氧糖酵解的代谢模式一直是近年来肿瘤代谢研究的热点, 而随着研究的深入, 发现CSCs也同样存在这种代谢模式, 甚至对其依赖程度比非肿瘤干细胞更高。LCSCs的有氧糖酵解过程中的关键酶和转运蛋白不仅对LCSCs的增殖、侵袭以及TME的形成具有重要作用, 而且对非癌干细胞的恶性转化具有重要意义。这些关键酶和和转运蛋白可作为抑制LCSCs增殖的重要靶点, 探索抑制这些靶点的药物对抑制HCC的发生、发展具有重要意义。此外, 在缺氧、营养缺乏和酸性的TME中, LCSCs展示出自身强大的可塑性优势, 更能适应这种微

环境的变化, 并利用微环境发展自身, 提高与周围细胞的竞争能力。

虽然抑制LCSCs是治疗HCC的可行方式, 但目前也存在相关难度和挑战。首先, 目前对LCSCs的鉴别困难, 目前研究多基于肝癌细胞成球能力, 相关干性表面标志物等进行鉴别, 但仍没有明确的特异性表面标志物。其次, 近年来“瓦伯格”效应受到不同程度的质疑和挑战, 单一的有氧糖酵解已不足以完全诠释CSCs的代谢方式, 线粒体代谢、磷酸戊糖途径等多种方式也是近年来探索CSCs代谢的研究热点, 且CSCs在TME中具有强大的适应性, 很难判断CSCs是否会根据微环境的变化改变自身代谢方式, 所以, 未来治疗需考虑从LCSCs多条代谢途径联合, 来共同抑制LCSCs的发生、发展。

参考文献

- [1] Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, et al. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(7): 411-428
- [2] Chen J, Chen L, Zern MA, et al. The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver Int*, 2017, 37(9): 1260-1271
- [3] Zhang RR, Zheng YW, Li B, et al. Hepatic stem cells with self-renewal and liver repopulation potential are harbored in CDCP1-positive subpopulations of human fetal liver cells. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 29
- [4] Yovchev MI, Lee EJ, Rodriguez-Silva W, et al. Biliary obstruction promotes multilineage differentiation of hepatic stem cells. *Hepatol Commun*, 2019, 3(8): 1137-1150
- [5] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 6
- [6] Wei Y, Wang Y, Gong J, et al. High expression of MAGE-A9 contributes to stemness and malignancy of human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*, 2018, 52(1): 219-230
- [7] Soleimani A, Dadjoo P, Avan A, et al. Emerging roles of CD133 in the treatment of gastric cancer, a novel stem cell biomarker and beyond. *Life Sci*, 2022, 293: 120050
- [8] Sun J, Luo Q, Liu L, et al. Biomechanical profile of cancer stem-like cells derived from MHCC97H cell lines. *J BioMech*, 2016, 49(1): 45-52
- [9] Wang J, Wu Y, Gao W, et al. Identification and characterization of CD133⁺ CD44⁺ cancer stem cells from human laryngeal squamous cell carcinoma cell lines. *J*

- Cancer*, 2017, 8(3): 497-506
- [10] Saalbach A, Hildebrandt G, Haustein UF, et al. The Thy-1/Thy-1 ligand interaction is involved in binding of melanoma cells to activated Thy-1- positive microvascular endothelial cells. *Microvas Res*, 2002, 64(1): 86-93
- [11] Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, et al. Discrete nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013, 57(4): 1484-1497
- [12] Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, et al. Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32843-32853
- [13] 李懿峰, 戴谦, 王蓓丽. 等. 肝肿瘤细胞干性与糖代谢特点的相关性研究. *中国癌症杂志*, 2019, 29(10): 773-779
- [14] Song K, Kwon H, Han C, et al. Active glycolytic metabolism in CD133(+) hepatocellular cancer stem cells: regulation by miR-122. *Oncotarget*, 2015, 6(38): 40822-40835
- [15] Bi L, Ren Y, Feng M, et al. HDAC11 regulates glycolysis through the LKB1/AMPK signaling pathway to maintain hepatocellular carcinoma stemness. *Cancer Res*, 2021, 81(8): 2015-2028
- [16] Prasad CP, Gogia A, Batra A. Essential role of aerobic glycolysis in epithelial-to-mesenchymal transition during carcinogenesis. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(10): 1844-1855
- [17] Park HK, Hong JH, Oh YT, et al. Interplay between TRAP1 and sirtuin-3 modulates mitochondrial respiration and oxidative stress to maintain stemness of glioma stem cells. *Cancer Res*, 2019, 79(7): 1369-1382
- [18] Li H, Song J, He Y, et al. CRISPR/Cas9 screens reveal that hexokinase 2 enhances cancer stemness and tumorigenicity by activating the ACSL4-fatty acid β -oxidation pathway. *Adv Sci*, 2022, 9(21): 2105126
- [19] Wang P, Cong M, Liu T, et al. FoxA2 inhibits the proliferation of hepatic progenitor cells by reducing PI3K/Akt/HK2-mediated glycolysis. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9524-9537
- [20] Sha X, Wang K, Wang F, et al. Silencing PFKF restrains the stemness of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2021, 407(1): 112789
- [21] 师文楷, 张予川, 赵永福, 等. 磷酸果糖激酶-2/果糖-2,6-二磷酸酶3对肝细胞癌细胞生物学行为的影响. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2022, 36(8): 769-773
- [22] Wong N, Ojo D, Yan J, et al. PKM2 contributes to cancer metabolism. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 184-191
- [23] Chen Z, Lu X, Wang Z, et al. Co-expression of PKM2 and TRIM35 predicts survival and recurrence in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2015, 6(4): 2539-2548
- [24] Fekir K, Dubois-Pot-Schneider H, Désert R, et al. Retro differentiation of human tumor hepatocytes to stem cells leads to metabolic reprogramming and chemoresistance. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 1869-1883
- [25] Wang L, Li X, Zhang W, et al. miR24-2 promotes malignant progression of human liver cancer stem cells by enhancing tyrosine kinase Src epigenetically. *Mol Ther*, 2020, 28(2): 572-586
- [26] Tan H, Leung CO, Chan KK, et al. Deregulated GATA6 modulates stem cell-like properties and metabolic phenotype in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2019, 145(7): 1860-1873
- [27] Faloppi L, Bianconi M, Memeo R, et al. Lactate dehydrogenase in hepatocellular carcinoma: something old, something new. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7196280
- [28] Koukourakis MI, Kakouratos C, Kalamida D, et al. Hypoxia-inducible proteins HIF1 α and lactate dehydrogenase LDH5, key markers of anaerobic metabolism, relate with stem cell markers and poor post-radiotherapy outcome in bladder cancer. *Int J Radiat Biol*, 2016, 92(7): 353-363
- [29] Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 121-138
- [30] Shibuya K, Okada M, Suzuki S, et al. Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 651-661
- [31] Kim YH, Jeong DC, Pak K, et al. SLC2A2 (GLUT2) as a novel prognostic factor for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 68381-68392
- [32] 韩文祺, 毕杨辉, 王芸姣, 等. STAT3通过上调GLUT2的表达促进转化的肝卵圆细胞WB-F344的Warburg效应. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 193-199
- [33] Cell-intrinsic programs partition nutrients in tumor microenvironment. *Cancer Discov*, 2021, 11(6): 1316
- [34] 韩晟, 周锦仁, 邵青, 等. MCT1在预测肝细胞癌患者预后中的作用研究. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(2): 184-188,210
- [35] Takada T, Takata K, Ashihara E. Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *J Physiol Sci*, 2016, 66(5): 387-396
- [36] Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, et al. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 2017, 551(7678): 115-118
- [37] Lamb R, Harrison H, Hulit J, et al. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11029-11037

- [38] Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 2010, 330(6009): 1340-1344
- [39] Cassim S, Pouyssegur J. Tumor microenvironment: a metabolic player that shapes the immune response. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 157
- [40] Cao CJ, Su Y, Sun J, et al. Anti-tumor effect of ginkgo biloba exocarp extracts on B16 melanoma bearing mice involving PI3K/Akt/HIF-1 α /VEGF signaling pathways. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18(2): 803-811
- [41] Koh MY, Lemos Jr R, Liu X, et al. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 4015-4027
- [42] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(10): 1177-1181
- [43] He M, Yang H, Shi H, et al. Sunitinib increases the cancer stem cells and vasculogenic mimicry formation via modulating the lncRNA-ECVSR/ER β /Hif2- α signaling. *Cancer Lett*, 2022, 524: 15-28
- [44] Won C, Kim B, Yi EH, et al. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2015, 62(4): 1160-1173
- [45] Jung HR, Kang HM, Ryu JW, et al. Cell spheroids with enhanced aggressiveness to mimic human liver cancer *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10499
- [46] Lee JH, Hur W, Hong SW, et al. ELK3 promotes the migration and invasion of liver cancer stem cells by targeting HIF-1 α . *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 813-822
- [47] Zhang HL, Wang MD, Zhou X, et al. Blocking preferential glucose uptake sensitizes liver tumor-initiating cells to glucose restriction and sorafenib treatment. *Cancer Lett*, 2017. doi: 10. 1016/j.canlet.2016.11.023
- [48] Loong JHC, Wong TL, Tong M, et al. Glucose deprivation-induced aberrant FUT1-mediated fucosylation drives cancer stemness in hepatocellular carcinoma. *J Clin Investigation*, 2021, 131(11): 12
- [49] Jones CL, Stevens BM, D'Alessandro A, et al. Inhibition of amino acid metabolism selectively targets human leukemia stem cells. *Cancer Cell*, 2018, 34(5): 724-740
- [50] Chisari A, Golán I, Campisano S, et al. Glucose and amino acid metabolic dependencies linked to stemness and metastasis in different aggressive cancer types. *Front Pharmacol*, 2021. doi: 10. 3389/fphar. 2021. 723798
- [51] Yi M, Li J, Chen S, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 118
- [52] Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, et al. NANOG metabolically reprograms tumor-initiating stem-like cells through tumorigenic changes in oxidative phosphorylation and fatty acid metabolism. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 206-219
- [53] Recalcati S, Gammella E, Cairo G. Dysregulation of iron metabolism in cancer stem cells. *Free Radical Biol Med*, 2019, 133: 216-220
- [54] Recalcati S, Correnti M, Gammella E, et al. Iron metabolism in liver cancer stem cells. *Front Oncol*, 2019, 9: 149
- [55] Peppicelli S, Andreucci E, Ruzzolini J, et al. The acidic microenvironment as a possible niche of dormant tumor cells. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(15): 2761-2771
- [56] Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(10): 577-593
- [57] Tian XP, Wang CY, Jin XH, et al. Acidic microenvironment up-regulates exosomal miR-21 and miR-10b in early-stage hepatocellular carcinoma to promote cancer cell proliferation and metastasis. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1965-1979
- [58] Chen C, Bai L, Cao F, et al. Targeting LIN28B reprograms tumor glucose metabolism and acidic microenvironment to suppress cancer stemness and metastasis. *Oncogene*, 2019, 38(23): 4527-4539
- [59] Hu PS, Li T, Lin JF, et al. VDR-SOX2 signaling promotes colorectal cancer stemness and malignancy in an acidic microenvironment. *Sig Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 183
- [60] Jiang J, Huang DL, Jiang Y, et al. Lactate modulates cellular metabolism through histone lactylation-mediated gene expression in non-small cell lung cancer. *Front Oncol*, 2021, 11: 647559
- [61] Pan L, Feng F, Wu J, et al. Demethylzeylasteral targets lactate by inhibiting histone lactylation to suppress the tumorigenicity of liver cancer stem cells. *Pharmacol Res*, 2022, 181: 106270