

大黄廑虫丸含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞能量代谢的影响

吴 丽^{1,2}, 倪子惠², 赵佳好^{2,3}, 张希琼^{2,3}, 曹可馨²

(1. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 3. 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 研究大黄廑虫丸含药血清对肝癌 SMMC-7721 细胞能量代谢的影响。**方法** SMMC-7721 敏感、耐药(阿霉素)细胞给予不同浓度含药血清, 考察含药血清对 2 种细胞活力和耐药细胞耐药指数的影响。然后, 通过流式细胞术评价含药血清和阿霉素对细胞内阿霉素含有量的影响, 检测 ATP 水平, 分析含药血清对 2 种细胞能量代谢类型的影响。**结果** 含药血清可显著抑制细胞活力; 与阿霉素联用时, 还能逆转耐药指数。**结论** 大黄廑虫丸含药血清的抗肝癌机制可能与抑制线粒体能量代谢、降低细胞内 ATP 水平有关, 与阿霉素联用时效果可更显著。

关键词: 大黄廑虫丸; 含药血清; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 能量代谢; 阿霉素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)07-1473-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.005

Effects of Dahuang Zhechong Pills medicated serum on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

WU Li^{1,2}, NI Zi-hui², ZHAO Jia-yu^{2,3}, ZHANG Xi-qiong^{2,3}, CAO Ke-xin²

(1. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Processing, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of Dahuang Zhechong Pills medicated serum on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. **METHODS** Doxorubicin-sensitive and doxorubicin-resistant SMMC-7721 cells were dosed with different concentrations of medicated serum, after which the effects of medicated serum on cell viabilities of two cells and drug resistance index of drug-resistant cells were investigated. Then flow cytometry was applied to evaluating the effects of medicated serum and doxorubicin on intracellular doxorubicin content, ATP level was detected, and the effects of medicated serum on energy metabolic phenotypes of two cells were analyzed. **RESULTS** The medicated serum could significantly inhibit cell viabilities, which could still reverse drug resistance index when combined with doxorubicin. **CONCLUSION** The anti-hepatoma mechanism of Dahuang Zhechong Pills medicated serum may be related to inhibiting mitochondrial energy metabolism and reducing intracellular ATP level, whose effects can be more significant when combined with doxorubicin.

KEY WORDS: Dahuang Zhechong Pills; medicated serum; hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells; energy metabolism; doxorubicin

细胞能量代谢重编程(包括有氧糖酵解、线粒体能量代谢异常等)有利于肿瘤生长的能量代谢变化,是肿瘤细胞代谢的重要特征,也与肿瘤耐

药密切相关^[1-2]。已有多项研究表明,肝癌细胞线粒体能量代谢抑制呈现显著的可塑性,它只是被部分、可逆性抑制,在缺氧、抗癌药物治疗等应激条

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503308); 江苏省中医药局科技项目(YB2015007); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室资助项目(JKLPE201608); 江苏省普通高校学术学位研究生科研创新计划项目(KYLX16_1160)

作者简介: 吴 丽(1976—),女,副教授,从事中药复方抗肿瘤机制研究。Tel: (025) 85811625, E-mail: wuli@njucm.edu.cn

件下能被重新激活, 主动参与肝癌耐药, 故抑制线粒体能量代谢是逆转肝癌耐药的重要途径。

在我国, 中医药被广泛应用于肝癌治疗, 以减轻化疗药物不良反应、逆转肿瘤耐药, 大黄廬虫丸是最常用的方剂之一。多项研究表明^[3-4], 它可治疗中晚期原发性肝癌, 能改善患者生活质量、延长存活时间, 配合化疗时能显著增强治疗效果, 减少肿瘤耐药。但其基础研究相对薄弱, 仍局限于疗效的简单观察。

基于药性理论研究中药对细胞能量代谢的影响一直是相关领域的热点^[5], 并发现多种具有抗癌活性的寒性中药能抑制肝细胞线粒体能量代谢^[6-8]。课题组前期对大黄廬虫丸进行处方分析时发现, 该方也是以寒性中药为主导, 除君药大黄、土鳖虫外, 臣药地黄、白芍、虻虫, 佐药黄芩也均属寒性。本实验以线粒体能量代谢为切入点, 研究大黄廬虫丸含药血清对肝癌 SMMC-7721 耐药细胞能量代谢的影响。

1 材料

1.1 仪器 Synergy2 酶标分光光度读板仪 (美国 BioTek 公司); INCO108 CO₂ 细胞培养箱 (德国美墨尔特上海贸易有限公司); SX-500 高压蒸汽灭菌锅 (日本 Tomy 公司); A1301026 低温高速离心机 (上海艾测电子科技有限公司); CKX-31 生物显微镜 (日本 Olympus 公司); SW-CJ-1G 双人无菌操作台 (苏州市苏杭科技器材有限公司); 振荡器; XF96 细胞能量代谢实时测定仪; BD Accuri™ C6 流式细胞仪。

1.2 试剂 大黄廬虫丸 (批号 15013005) 购自北京同仁堂股份有限公司。阿霉素 (批号 CDXB21217) 购自日本明治制果药业株式会社; 胎牛血清 (批号 1809582)、胰蛋白酶 (批号 1828698)、DMEM 高糖培养基 (批号 8117037)、PBS (批号 8116437) 购自美国 Gibco 公司。青霉素-链霉素溶液 (批号 053116160705)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型) (批号 102815160401)、增强型 ATP 检测试剂盒 (批号 093016161116) 购自碧云天生物技术有限公司; 线粒体、糖酵解压力测试盒购自美国 Seahorse Bioscience 公司。DMSO (批号 BCBR6 170 V) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 细胞及动物 SMMC-7721 (中国科学院上海细胞库)、SMMC-7721/阿霉素 (由 SMMC-7721 采用浓度递增结合低剂量持续诱导而成), 接种于含 20% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM

高糖培养基中, 置于恒温细胞培养箱 (37 ℃、5% CO₂) 中继续培养, 次日换液, 隔日传代, 按 1:3 比例进行, 取对数生长期的细胞用于实验。清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量 180 ~ 220 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001, 饲养于南京中医药大学实验动物中心, SPF 环境下饲养, 处死前 12 ~ 16 h 禁食不禁水。

2 方法

2.1 含药血清制备 参考临床常用剂量 [0.1 ~ 0.45 g/(kg · d)] 结合《药理实验方法学》, 计算出大鼠等效剂量为 2.40 g/kg。取丸剂 (24 粒, 3 g/丸) 72 g, 加超纯水至 300 mL, 超声 10 min 混匀, 制备混悬液。再取健康大鼠 20 只, 随机分为空白对照组 (蒸馏水), 大黄廬虫丸组 [2.40 g/(kg · d)], 每组 10 只, 灌胃给予蒸馏水或混悬液, 每天早、晚分 2 次给药, 连续 7 d。第 7 天晚上 8 点开始禁食不禁水, 第 8 天早上灌胃 2 h 后, 颈总动脉取血, 分离血清, 4 ℃下离心 5 min (3 000 r/min), 取上层血清, 于 56 ℃温育 30 min 灭活, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装, 置于 -20 ℃冰箱中保存备用。在进行实验时, 大黄廬虫丸最大质量分数为 10% 含药血清, 并用空白血清稀释, 制备 1.25%、2.5%、5% 含药血清。

2.2 含药血清对肝癌 SMMC-7721 敏感、耐药细胞活力的影响 取对数生长期的 SMMC-7721、SMMC-7721/阿霉素细胞, 以 8×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 贴壁后, 给予空白血清 (终含有量 10%) 或含药血清 (1.25%、2.5%、5%、10%), 每组设 6 个复孔, 分别培养 24 h, CCK-8 法检测细胞活力。

2.3 含药血清对肝癌细胞耐药指数的影响 取对数生长期的 SMMC-7721、SMMC-7721/阿霉素细胞, 以 8×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板, 37 ℃、5% CO₂ 下取空白、含药血清, 每组设 6 个复孔, 培养 24 h, 弃去原培养液, 换无血清培养液, 饥饿细胞 24 h 后弃去培养液, 每孔加入不同浓度阿霉素 (0.1 ~ 40 μmol/L), 于 37 ℃下孵育 24 h 后弃去药液, CCK-8 法检测细胞活力, 计算阿霉素对 2 种细胞的抑制率, 计算公式为抑制率 = $[(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{样品}}) - 1] \times 100\%$, 再计算耐药指数 (耐药细胞 IC₅₀/亲本细胞 IC₅₀)。

2.4 含药血清与阿霉素对细胞内阿霉素含有量的影响 取对数生长期的 SMMC-7721、SMMC-7721/

阿霉素细胞，以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板，分为阿霉素组、联合用药组，待细胞贴壁后，加入阿霉素 ($2 \mu\text{mol/L}$) 或/和 10% 含药血清干预 24 h。实验结束时，取各组细胞消化吹匀， $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min，弃上清，收集细胞，PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ 个细胞， $1\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min，弃上清，流式细胞仪进行检测。

2.5 含药血清对肝癌细胞 ATP 水平的影响 取对数生长期的 SMMC-7721、SMMC-7721/阿霉素细胞，以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板，分为空白对照组、阿霉素组、大黄廬虫丸组、联合用药组，待细胞贴壁后，加入阿霉素 ($2 \mu\text{mol/L}$) 或/和 10% 含药血清干预 24 h。实验结束时，各组细胞加入 $200 \mu\text{L}$ ATP 裂解液， $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心 5 min ($12\,000\text{ r/min}$)，取上清，按 BCA 蛋白水平测定试剂盒操作，酶标仪测定 A_{562} ，根据标准曲线计算样品蛋白浓度；按增强型 ATP 检测试剂盒操作，微孔板发光检测仪测定相对光单位 (RLU) 值，根据标准曲线计算样品 ATP 浓度。然后，将 ATP 浓度单位处理成 nmoL/mg 蛋白的形式，以消除制备样品时由于蛋白量差异而造成的误差。

2.6 含药血清与阿霉素对细胞能量代谢表型的影响 取对数生长期的 SMMC-7721、SMMC-7721/阿霉素细胞，以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于能量代谢表型特制 96 孔板中，分为空白对照组、阿霉素组、大黄廬虫丸组、联合用药组，待细胞贴壁后，加入阿霉素 ($2 \mu\text{mol/L}$) 或/和 10% 含药血清干预 24 h。实验结束后，在各组细胞中依次加入 ATP 合成酶抑制剂寡霉素、氧化磷酸化解偶联剂碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腈、线粒体酶复合物 I 抑制剂鱼藤酮用于线粒体压力测试，葡萄糖、寡霉素、糖酵解抑制剂 *D*-2-脱氧葡萄糖用于糖酵解压力测试，Seahorse XF96 分析仪检测线粒体功能，Seahorse XF Prep Station 软件进行分析。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 15.0 软件进行处理，计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 含药血清对肝癌 SMMC-7721 敏感、耐药细胞活力的影响 图 1 显示，10% 含药血清作用于 SMMC-7721 敏感细胞 24 h 后，能显著降低细胞活力 ($P < 0.05$)，持续 48 h；对于耐药细胞而言，大黄廬虫丸干预 12 h 后即可产生显著的抑制效应 ($P < 0.05$)，24 h 时进一步增强 ($P < 0.01$)。由

于 2.5%、5% 含药血清对 2 种细胞的作用相对较弱，故后续实验将采用 10% 含药血清。

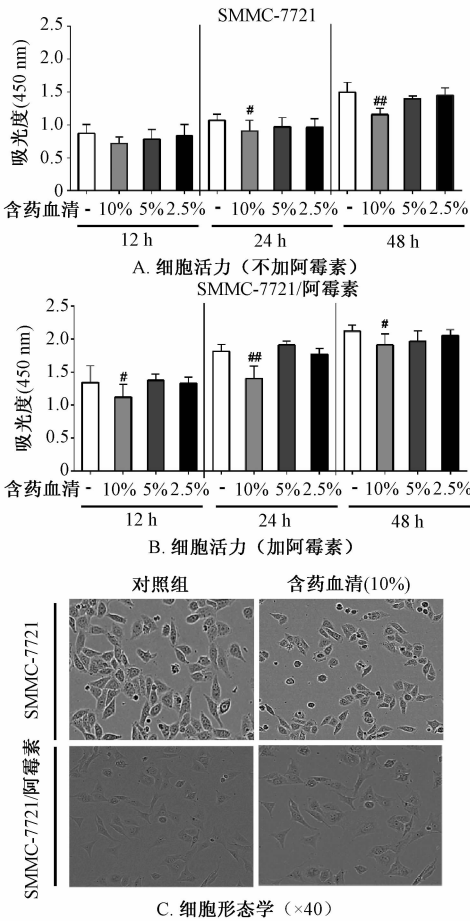


图 1 含药血清对细胞活力的影响
Fig. 1 Effect of medicated serum on cell viability

3.2 含药血清对肝癌细胞耐药指数的影响 图 2、表 1 显示，肝癌 SMMC-7721 细胞在持续低剂量阿霉素诱导下，对其敏感性显著降低，产生耐药现象，耐药指数达到 7.95；提前给予含药血清干预 24 h 后，在 $0.1 \sim 40 \mu\text{mol/L}$ 范围内阿霉素对耐药细胞的抑制率显著增加，耐药指数下降为 1.40。

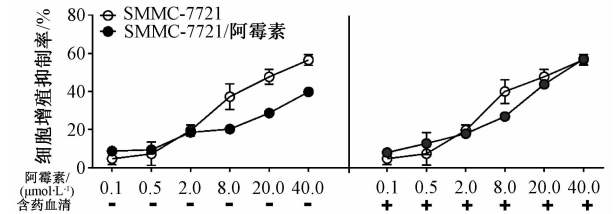
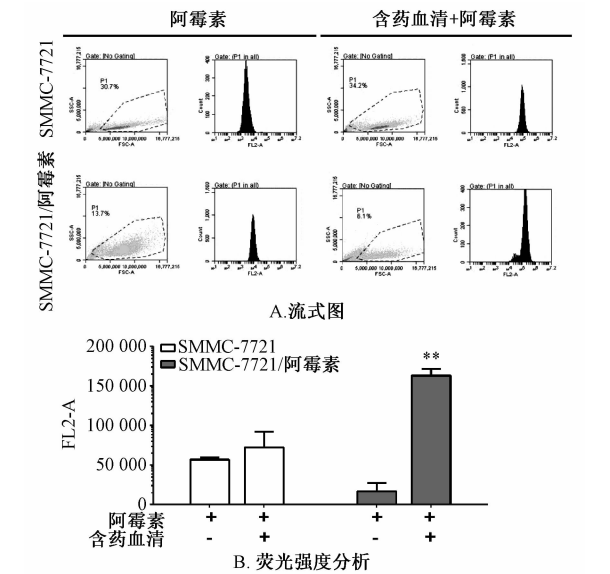


图 2 含药血清对细胞抑制率的影响
Fig. 2 Effect of medicated serum on cell inhibition rate

表 1 含药血清对耐药指数的影响
Tab. 1 Effect of medicated serum on drug resistance index

组别	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		耐药指数
	SMMC-7721	SMMC-7721/阿霉素	
对照组	23.27	185.0	7.95
含药血清组	22.13	30.89	1.40

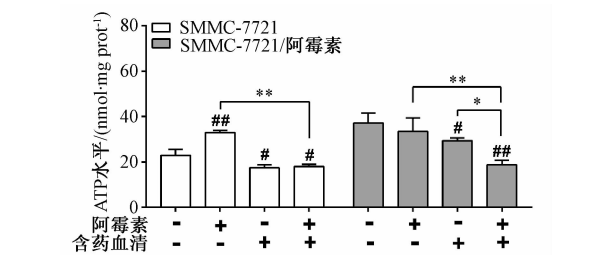
3.3 含药血清与阿霉素对细胞内阿霉素含有量的影响 图 3 显示,与敏感细胞比较,耐药细胞中的阿霉素含有量显著降低;含药血清提前干预 24 h 时,能增加细胞内阿霉素含有量,与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。



注:与阿霉素组比较,** $P < 0.01$
图 3 含药血清对阿霉素含有量的影响
Fig. 3 Effect of medicated serum on doxorubicin content

3.4 含药血清对肝癌 SMMC-7721 敏感、耐药细胞中 ATP 水平的影响 图 4 显示, SMMC-7721/阿霉素细胞内 ATP 水平显著高于敏感细胞;小剂量阿霉素能显著升高敏感细胞中 ATP 水平,但对耐药细胞无显著影响。含药血清单独用药时,即能显著降低 2 种细胞内 ATP 水平 ($P < 0.05$);与阿霉素联合用药后,能逆转敏感细胞中阿霉素增高的 ATP 水平 ($P < 0.01$),在耐药细胞中进一步降低,与单独用药比较具有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.5 含药血清与阿霉素对肝癌 SMMC-7721 敏感、耐药细胞能量代谢表型的影响 图 5A ~ 5D 显示,耐药细胞的基础耗氧量显著高于敏感细胞,给予 ATP 合成酶抑制剂寡霉素后,均能降低 2 种细胞的耗氧量,但前者降低程度更大。使用碳酰氰 4-三氟甲氧基苯胺解偶联氧化磷酸化时,虽然能增加敏



注:与空白血清组(最左边白色或黑色柱状)比较,# $P < 0.05$,
$P < 0.01$;与阿霉素组、含药血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$
图 4 含药血清对 ATP 水平的影响
Fig. 4 Effect of medicated serum on ATP level

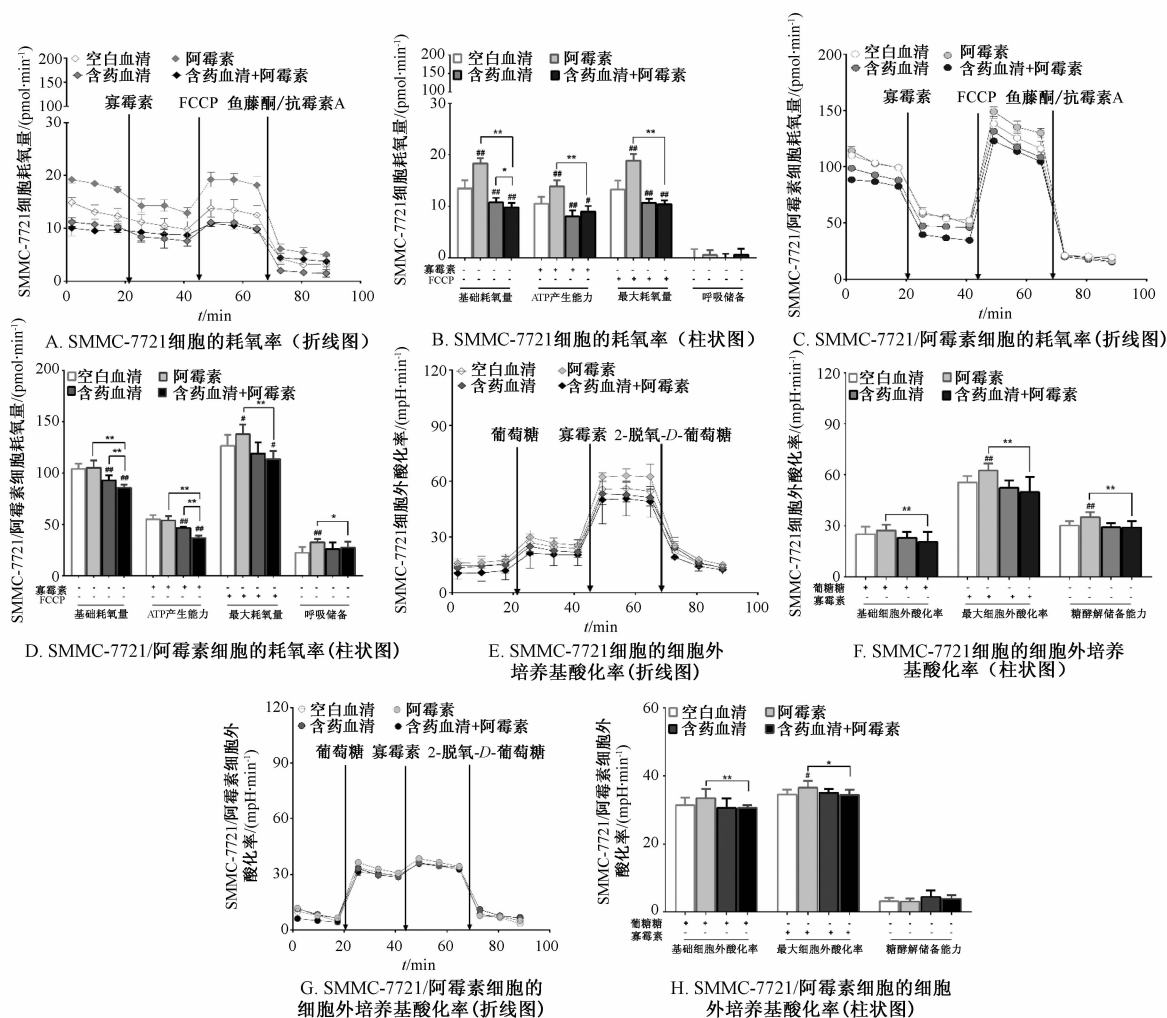
感细胞的耗氧量,但并未超过基础耗氧量,即呼吸储备功能不足;在耐药细胞中,其最大耗氧量显著增加,超过基础耗氧量,有很强的氧化磷酸化储备功能。阿霉素能显著增加敏感细胞的基础耗氧量及最大耗氧量,对耐药细胞基础耗氧量影响较小,但可提高最大耗氧量;含药血清能显著抑制 2 种细胞的基础耗氧量及最大耗氧量,与阿霉素联合用药后能逆转阿霉素升高的两者、ATP 产量及呼吸储备。

图 5E ~ 5H 显示,给予葡萄糖后,2 种细胞中的细胞外酸化率均有所增高;给予寡霉素抑制线粒体能量代谢后亦然,但敏感细胞增加程度显著高于耐药细胞。含药血清联合阿霉素与单用阿霉素比较,对基础糖酵解、糖酵解最大水平、糖酵解储备功能均具有显著的抑制作用,但对耐药细胞的糖酵解功能无显著影响。

4 讨论

化疗药物耐药是影响肝癌化疗效果的关键因素,常导致治疗失败^[9]。由 P-糖蛋白介导的药物外排增强曾被认为是肿瘤耐药的主要机制^[10],但无论是以维拉帕米为代表的第一代抑制剂,还是特异性更强、选择性更高的第二、第三代抑制剂伐司朴达、Tariquidar、Zosuquidar,其临床疗效均不理想^[11-12]。因此,寻找新的肝癌耐药机制,开发更有效的逆转耐药剂,对提高肝癌治疗效果具有重要的临床意义。

近年来,线粒体能量重新激活在肝癌领域中的研究较为活跃,并认为与肿瘤耐药关系密切。如在 HepG2 细胞中,线粒体氧化磷酸化功能只是被可逆性抑制,而给予氯乙基亚硝基脲治疗后,其能量代谢可被迅速激活,并呈现出显著的抗凋亡作用^[13];剥夺肝癌 HepG2 细胞培养液中的葡萄糖能激活线粒体呼吸链,ATP 合酶 β 亚基表达水平增加^[14];



注:与空白血清组(白色柱状)比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与阿霉素组、含药血清组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。FCCP 为 羧基-氧-对-三氟甲基苯肼(一种线粒体解偶联剂)

图5 含药血清对细胞能量代谢表型的影响

Fig. 5 Effect of medicated serum on cell energy metabolism phenotype

在 AS-30D 肝癌细胞线粒体中, 丙酮酸、苹果酸、柠檬酸、乙酰乙酸、乙酸的脱羧速率与正常细胞基本一致, 与线粒体能量代谢密切相关的三羧酸循环没有被削弱^[15-17]。最近, 墨西哥国立大学研发的抗癌新药 Casiopeina 能同时抑制肝癌细胞氧化磷酸化及糖酵解过程, 其抗癌效果明显优于糖酵解抑制药 3-溴噻吩^[18]。本实验发现, 肝癌 SMMC-7721 敏感细胞线粒体能量代谢被相对抑制, 但给予低剂量阿霉素刺激后, 其线粒体耗氧及总 ATP 水平均明显提高; 在耐药细胞中, 线粒体耗氧及细胞内总 ATP 水平均较敏感细胞显著增高, 由此可知, 肝癌 SMMC-7721 细胞线粒体能量代谢只是被部分、可逆性抑制, 在抗癌药物治疗等应激条件下能被迅速激活; 持续低剂量阿霉素诱导的耐药细胞线粒体能量代谢被显著激活, 主动参与肝癌耐药, 以线粒体

能量代谢为干预机制的药物可能成为逆转肝癌细胞耐药的**有效药物**。

大黄廑虫丸是东汉名医张仲景创制的抗癌名方，其作用在《金匱要略》中已有详细表述：“五劳极虚羸瘦，腹满不能饮食，食伤、忧伤、房事伤、饥伤、劳伤、经络荣卫气伤，内有干血，肌肤甲错，两目暗黑。缓中补虚，大黄廑虫丸主之”，临床以胁下癖块、触之鞭痛、推之不移、舌黯无华、脉弦细为证治要点，在肝癌、胃癌等腹腔肿瘤的综合治疗中被广泛应用。本实验基于中药药性理论及耐药肝癌细胞中线粒体能量代谢被激活的机制，探讨了大黄廑虫丸对肝癌 SMMC-7721 敏感、耐药细胞的作用，从线粒体能量代谢角度揭示其临床发挥抗肿瘤、减少肿瘤耐药的原理，发现大黄廑虫丸通过抑制线粒体能量

代谢、降低细胞 ATP 水平来直接发挥抗癌作用；与阿霉素联用后，能逆转敏感细胞中的线粒体能量代谢激活，抑制耐药细胞的线粒体能量代谢，增加细胞内阿霉素含有量，进而达到提高肝癌细胞对阿霉素敏感性、逆转肿瘤耐药的作用，即两者联用具有显著的协同抗癌效果。

参考文献：

[1] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.

[2] Liu W, Li L, Li W. Gene co-expression analysis identifies common modules related to prognosis and drug resistance in cancer cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135 (12): 2795-2803.

[3] 谢美清, 赵晓芳, 刘旭东. 大黄廬虫丸对肝癌介入治疗致肝纤维化相关指标的影响[J]. *广西中医药*, 2014, 37 (2): 46-47.

[4] 吴 洁, 申弘道. 大黄廬虫丸联合化疗治疗中晚期原发性肝癌的临床观察[J]. *西部中医药*, 2011, 24(10): 54-55.

[5] 王艳艳, 孙 雪, 裴晓蕾, 等. 中药寒热药性与线粒体能量代谢关系研究[J]. *中医药信息*, 2013, 30(4): 48-50.

[6] 黄丽萍, 彭淑红, 蒙晓芳, 等. 6 种寒性中药对大鼠肝脏能量代谢的影响[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (24): 3255-3258.

[7] 马清翠, 于华芸, 赵 俭, 等. 附子、干姜、黄连、大黄对正常大鼠能量代谢的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2010, 34(5): 379-380, 390.

[8] 李 毅, 卢德赵, 唐利华, 等. 寒凉药对热证大鼠肝线粒体蛋白质组的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(23): 4144-4147.

[9] Ranieri G, Marech I, Lorusso V, *et al.* Molecular targeting agents associated with transarterial chemoembolization or radio-

frequency ablation in hepatocarcinoma treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(2): 486-497.

[10] Park S Y, Han J, Kim J B, *et al.* Interleukin-8 is related to poor chemotherapeutic response and tumourigenicity in hepatocellular carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50 (2): 341-350.

[11] Saraswathy M, Gong S. Different strategies to overcome multi-drug resistance in cancer[J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1397-1407.

[12] Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 149: 121-123.

[13] Loiseau D, Morvan D, Chevrollier A, *et al.* Mitochondrial bioenergetic background confers a survival advantage to HepG2 cells in response to chemotherapy[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(8): 733-741.

[14] Domenis R, Bisetto E, Rossi D, *et al.* Glucose-modulated mitochondria adaptation in tumor cells: a focus on ATP synthase and inhibitor Factor 1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13 (2): 1933-1950.

[15] Dietzen D J, Davis E J. Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 305 (1): 91-102.

[16] Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, *et al.* Energy metabolism in tumor cells [J]. *FEBS J*, 2007, 274(6): 1393-1418.

[17] Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E, *et al.* The bioenergetics of cancer: is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? [J]. *Biofactors*, 2009, 35(2): 209-225.

[18] Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez J C, López-Ramírez S Y, *et al.* Casiopaina II-gly and bromo-pyruvate inhibition of tumor hexokinase, glycolysis, and oxidative phosphorylation[J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(5): 753-766.