

# 微小 RNA-21 过表达对胰腺癌细胞增殖和凋亡及有氧糖酵解的影响

李建刚, 帕合热迪尼·玉素甫, 王俊, 李亮

新疆医科大学第二附属医院普外科, 新疆 乌鲁木齐 830063

**摘要:** **目的** 探讨微小 RNA(miR)-21 对胰腺癌细胞增殖、凋亡及有氧糖酵解的影响及其可能机制。**方法** 选取人胰腺癌细胞 SW1990、正常胰腺导管上皮细胞 HPDE 为研究对象。对 SW1990 细胞进行转染,分为 miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-21-mimic 组(转染 miR-21-mimic)。MTT、克隆形成实验检测细胞增殖能力;流式细胞术检测细胞凋亡;RT-qPCR 检测细胞中 miR-21、M2 型丙酮酸激酶(PKM2)基因 mRNA 表达水平;western blot 检测 PKM2 蛋白水平;荧光素酶报告实验检测 miR-21 与 PKM2 的靶向关系。**结果** SW1990 细胞 miR-21 表达水平高于 HPDE 细胞( $0.79\pm 0.02$  vs  $0.23\pm 0.02$ ,  $t=34.290$ ,  $P<0.01$ );SW1990 细胞 PKM2 蛋白( $0.41\pm 0.03$ )、mRNA 的表达水平( $0.62\pm 0.02$ )低于 HPDE 细胞( $0.95\pm 0.02$ 、 $1.13\pm 0.03$ ,  $t=25.940$ 、 $24.500$ ,  $P<0.01$ )。miR-21-mimic 组 72 h、96 h 时细胞增殖能力、细胞克隆数明显高于 miR-NC 组,凋亡细胞数低于 miR-NC 组( $P<0.05$ )。miR-21-mimic 组细胞葡萄糖消耗量和乳酸、己糖激酶(HK)及乳酸脱氢酶(LDH)含量均明显高于 miR-NC 组( $t=5.992$ 、 $21.340$ 、 $5.643$ 、 $4.008$ ,  $P<0.05$ )。miR-21-mimic 组细胞 PKM2 蛋白表达水平低于 miR-NC 组( $t=10.070$ ,  $P<0.01$ )。miR-21 与野生型-3'非翻译区(WT-3'UTR)-PKM2 存在一定数量的互补碱基对,miR-21-mimic+WT-PKM2 组的细胞荧光素酶活性低于 miR-NC+WT-PKM2 组( $t=15.680$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 胰腺癌细胞 miR-21 高表达,miR-21 过表达可能促进胰腺癌细胞增殖、有氧糖酵解,抑制细胞凋亡,其机制可能与靶向 PKM2 有关。

**关键词:** 微小 RNA-21; M2 型丙酮酸激酶; 有氧糖酵解; 胰腺癌; 细胞凋亡

中图分类号: R735.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2023)09-1286-05

## Effects of microRNA-21 overexpression on proliferation, apoptosis and aerobic glycolysis of pancreatic cancer cells

LI Jiangang, Paheredini Yusupu, WANG Jun, LI Liang

General Surgery Department, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830063, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of microRNA-21 (miR-21) on proliferation, apoptosis and aerobic glycolysis of pancreatic cancer cells and its possible mechanism. **Methods** Human pancreatic cancer cell SW1990 and normal pancreatic duct epithelial cell HPDE were taken as research objects. SW1990 cells were transfected and divided into miR-NC group (transfected with miR-NC) and miR-21-mimic group (transfected with miR-21-mimic). MTT and clone formation assay were used to detect cell proliferation ability. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. RT-qPCR was used to detect the mRNA expression levels of miR-21 and pyruvate kinase M2 (PKM2) in cells. Western blot was used to detect PKM2 protein level. The luciferase reporter assay was used to detect the targeting relationship between miR-21 and PKM2. **Results** The expression level of miR-21 in SW1990 cells was higher than that in HPDE cells ( $0.79\pm 0.02$  vs  $0.23\pm 0.02$ ,  $t=34.290$ ,  $P<0.01$ ), while the expression levels of PKM2 protein ( $0.41\pm 0.03$ ) and mRNA ( $0.62\pm 0.02$ ) in SW1990 cells were lower than those in HPDE cells ( $0.95\pm 0.02$ ,  $1.13\pm 0.03$ ,  $t=25.940$ ,  $24.500$ ,  $P<0.01$ ). At 72 and 96 hours, the cell proliferation ability and number of clones cell in the miR-21-mimic group were significantly higher than those in the miR-NC group, while the number of apoptotic cells was lower than that in the miR-NC group ( $P<0.05$ ). The glucose consumption, and the content of lactate, hexokinase (HK) and lactate dehydrogenase

(LDH) in miR-21-mimic group were significantly higher than those in miR-NC group ( $t = 5.992, 21.340, 5.643, 4.008, P < 0.05$ ). The level of PKM2 protein in the miR-21 mic group was lower than that in the miR-NC group ( $t = 10.070, P < 0.01$ ). There were a certain number of complementary base pairs between miR-21 and WT-3' UTR-PKM2, and the cell luciferase activity of miR-21-mimic+WT-PKM2 group was lower than that of the transfected miR-NC+WT-PKM2 group ( $t = 15.680, P < 0.01$ ). **Conclusion** The overexpression of miR-21 in pancreatic cancer cells may promote the proliferation, aerobic glycolysis, and inhibit apoptosis of pancreatic cancer cells. The mechanism may be related to targeting PKM2.

**Keywords:** MicroRNA-21; Pyruvate kinase M2; Aerobic glycolysis; Pancreatic cancer; Apoptosis

**Fund program:** Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region(2021D01C375)

胰腺癌是恶性程度高、预后较差的肿瘤之一,寻找到肿瘤发生、进展的分子机制对于胰腺癌的诊断、治疗至关重要。有氧糖酵解在肿瘤细胞增殖、侵袭等恶性生物学行为中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。M2型丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)是调控肿瘤细胞有氧糖酵解过程的关键酶<sup>[2]</sup>。PKM2在肿瘤组织中表达失调,参与细胞的增殖、侵袭等恶性生物学行为<sup>[3-4]</sup>。微小RNA(microRNA, miR)-21是发现较早的miR,在肿瘤组织中表达失调,如结肠癌细胞低表达miR-21,上调miR-21可抑制细胞的恶性表型<sup>[5]</sup>。但也有研究发现,miR-21在肝癌、肺癌组织中高表达<sup>[6-7]</sup>。有研究发现,miR-21可通过靶向快速发育生长因子同源蛋白2抗体(sprouty homolog 2, Spry2)抑制胰腺癌细胞的生长、侵袭等<sup>[8]</sup>。然而miR-21与PKM2对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响文献报道鲜见。因此,本研究观察了miR-21在胰腺癌中的作用,以为胰腺癌的防治提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料 人胰腺癌细胞SW1990、正常胰腺导管上皮细胞HPDE(美国Gerim教授惠赠)。

1.1.2 主要试剂、细胞株及仪器 改良Eagle DMEM培养液(天津惠普生物技术,中国);miR-NC空载质粒、miR-21 mimic、突变型(mutant, MUT)-PKM2、野生型(wild type, WT)-PKM2、pGL3载体(天津通用生物科技,中国);Lip3000脂质体(BioVision公司,美国);兔抗人PKM2、 $\beta$ -actin、二抗(沈阳Abiol公司,中国);碘化丙啶(propidium iodide, PI)(山东拓普生物工程,中国);噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT)、TRIzol(山东拓普生物工程,中国);PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(郑州万田生物科技,中国);蛋白印记试剂盒(Kapa Biosystems,美国)。酶标仪、ABIQ5PCR扩增仪(江苏电子仪器厂,中国);FACS流式细胞仪(BD公

司,美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染及分组 细胞使用含有胎牛血清及抗生素的DMEM培养基进行培养,常规培养环境(37℃,5%CO<sub>2</sub>)。细胞传代3次处于对数生长期时利用Lip3000把miR-NC、miR-21-mimic质粒转染细胞后孵育48h,分为miR-NC组和miR-21-mimic组。

1.2.2 RT-qPCR分析miR-21、PKM2水平 两组细胞使用TRIzol提取RNA,测定浓度、纯度后进行合成cDNA。随后完成PCR扩增,体系如下:cDNA 2  $\mu$ L、PCR正向引物(10  $\mu$ mol/L)、PCR反向引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L、TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2 $\times$ )12.5  $\mu$ L,灭菌水加8.5  $\mu$ L,95℃30s,然后95℃5s、60℃31s共40个循环,70℃30s。2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法表示相对表达水平。内参为U6。

miR-21引物上下游分别为:5'-GGACCCAGG-GAGAGACGTAA-3', 5'-GUACCUAAAAACCUCGUCC-3';PKM2引物上下游分别为:5'-AACGCTGGCTC-CGAAAACCTT-3', 5'-CCTAAGGCGGTAAAATGCC-3';U6引物上下游分别为:5'-UAGCGAAGCCGUCGUGU-3',5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖能力 分别消化、收集两组细胞,将5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞铺到96孔板中,置于培养箱中0、24、48、72及96h后加入20mL MTT孵育4h,然后加入150  $\mu$ L二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),检测450nm波长处的吸光度(optical density, OD值)。

1.2.4 克隆实验 制备两组单细胞悬液,将5000个细胞铺到每个6孔板,继续培养2周后清除培养液,4%多聚甲醛固定,结晶紫染色,拍照,计算克隆细胞数量。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 胰酶消化,800g离心3min,制备单细胞悬液,将5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞铺到6孔板,孵育48h后加入10  $\mu$ L PI后在冰箱中培养1h,

上机检测凋亡率。

1.2.6 有氧糖酵解作用测定 取两组细胞培养 24 h 后的培养液,离心后留取上清液,采用酶联反应法检测测定葡萄糖消耗量、乳酸、己糖激酶(hexokinase, HK)及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)含量。步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.7 Western blot 法检测细胞 PKM2 蛋白的表达 两细胞培养 96 h 后,使用蛋白裂解液(RIPA)提取总蛋白。分别配制 5%浓缩胶水及 10%分离胶,每孔加入 30 μg 蛋白,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%奶粉室温封闭 1 h,加入 PKM2 一抗(1 : 1 000)、β-actin(1 : 1 100)冰箱过夜,然后加入对应到二抗室温孵育 1 h,曝光,Image J 分析灰度值,计算目的条带的相对表达水平。

1.2.8 荧光素酶报告实验 将 miR-NC、miR-21-mimic 与 MUT-PKM2、WT-PKM2 分别两两结合共同转染于细胞中,常规培养条件下孵育 48 h 使用细胞裂解液裂解后,600 g 离心 5 min,保留上清液,按照试剂盒说明书依次加入试剂,最后上机检测荧光素酶活性。

1.3 统计学方法 数据导入 SPSS 11.0 进行处理。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 SW1990、HPDE 细胞 miR-21、PKM2 表达 SW1990 细胞 miR-21 表达水平高于 HPDE 细胞

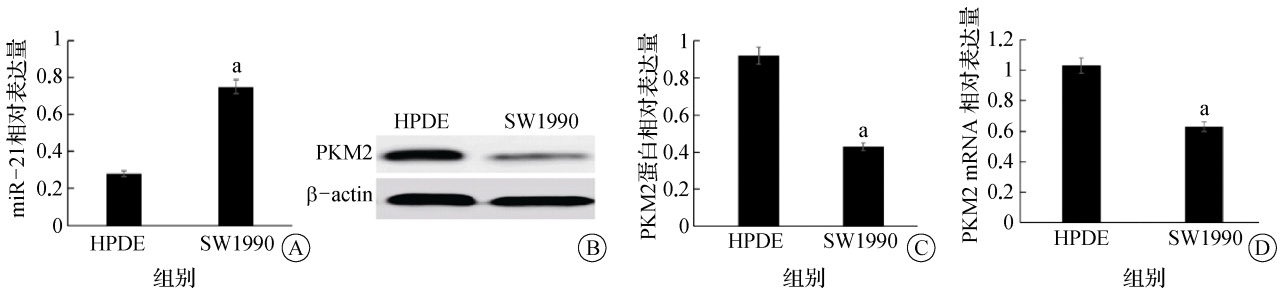
( $0.79 \pm 0.02$  vs  $0.23 \pm 0.02$ ,  $t = 34.290$ ,  $P < 0.01$ )。SW1990 细胞 PKM2 蛋白( $0.41 \pm 0.03$ )、基因 mRNA 表达水平( $0.62 \pm 0.02$ )分别低于 HPDE 细胞( $0.95 \pm 0.02$ 、 $1.13 \pm 0.03$ ,  $t = 25.940$ 、 $24.500$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。

2.2 过表达 miR-21 对细胞增殖、凋亡的影响 miR-21-mimic 组细胞 miR-21 表达高于 miR-NC 组( $2.58 \pm 0.22$  vs  $0.35 \pm 0.04$ ,  $t = 17.270$ ,  $P < 0.01$ ), 72 h、96 h 细胞 OD 值( $2.47 \pm 0.03$ 、 $3.75 \pm 0.12$ )分别高于 miR-NC 组( $1.22 \pm 0.03$ 、 $1.67 \pm 0.11$ ,  $t = 51.030$ 、 $22.130$ ,  $P < 0.01$ ), 细胞克隆数大于 miR-NC 组( $389.45 \pm 25.53$  vs  $104.55 \pm 14.92$ ,  $t = 16.691$ ,  $P < 0.01$ ), 凋亡率低于 miR-NC 组[( $5.43 \pm 0.25$ )% vs ( $10.44 \pm 0.42$ )%,  $t = 17.750$ ,  $P < 0.01$ ]。见图 2。

2.3 过表达 miR-21 对细胞有氧糖酵解代谢的影响 与 miR-NC 组相比,miR-21-mimic 组细胞葡萄糖消耗量、乳酸含量、HK 含量及 LDH 含量均明显升高( $P < 0.05$ )。见表 1。

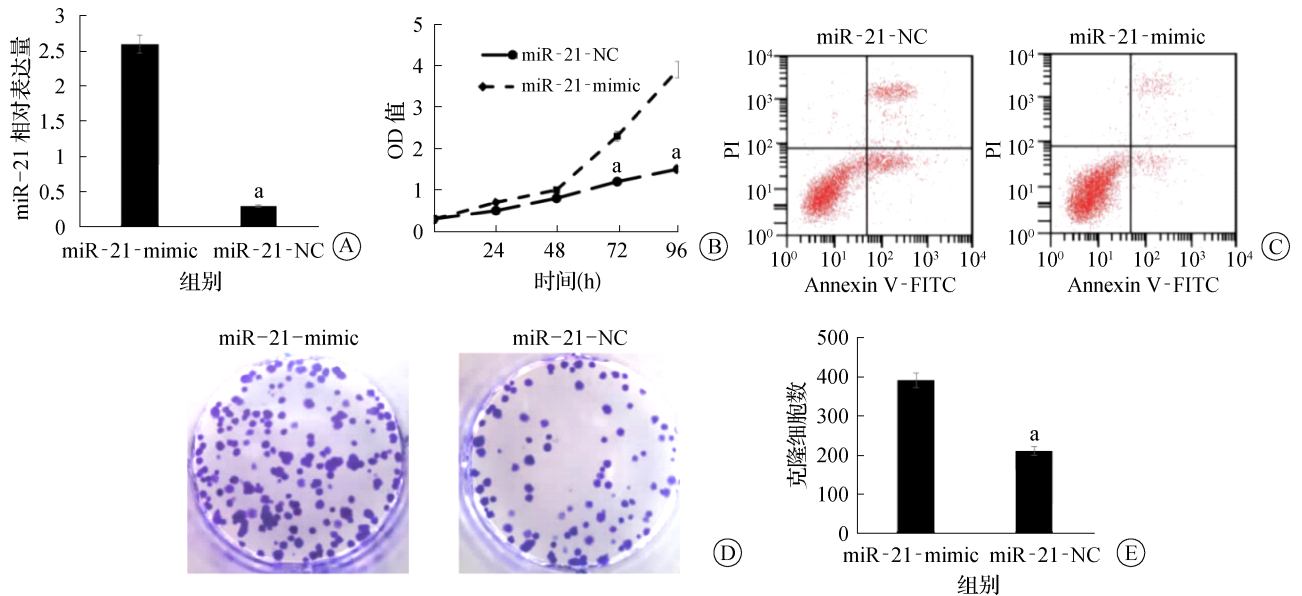
2.4 各组细胞 PKM2 蛋白表达水平比较 与 miR-NC 组( $0.47 \pm 0.04$ )相比,miR-21-mimic 组( $0.21 \pm 0.02$ )细胞 PKM2 蛋白表达水平降低( $t = 10.070$ ,  $P < 0.01$ )。见图 3。

2.5 miR-21 与 PKM2 的靶向关系 miR-21 与野生型-3'非翻译区(WT-3'UTR)-PKM2 存在核苷酸结合位点。miR-21-mimic+MUT-PKM2 的细胞荧光素酶活性与 miR-NC + MUT-PKM2 组比较无差异,miR-21-mimic+WT-PKM2 组的细胞荧光素酶活性低于 miR-NC+WT-PKM2 组( $0.36 \pm 0.04$  vs  $1.17 \pm 0.08$ ,  $t = 15.680$ ,  $P < 0.01$ )。见图 4。



注:A 为 miR-21 相对表达量;B、C 为 PKM2 蛋白检测结果;D 为 PKM2 mRNA 检测结果;与 HPDE 细胞比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01。

图 1 SW1990、HPDE 细胞 miR-21、PKM2 表达  
Fig. 1 Expression of miR-21 and PKM2 in SW1990 and HPDE cells

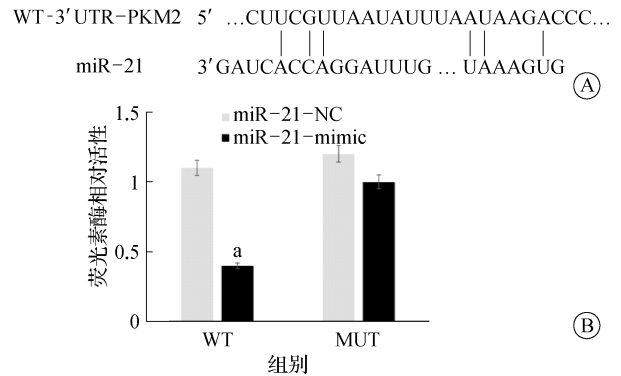


注:A为miR-21相对表达量;B为MTT结果;C为细胞凋亡率;D为克隆实验(结晶紫染色);E为两组克隆细胞数比较;与miR-21-mimic组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01。

图2 过表达miR-21对细胞增殖、凋亡的影响  
Fig. 2 Effect of overexpression of miR-21 on cell proliferation and apoptosis

表1 过表达miR-21对细胞有氧糖酵解代谢的影响 (x̄±s)  
Tab. 1 Effects of overexpression of miR-21 on cellular aerobic glycolysis metabolism (x̄±s)

组别	葡萄糖消耗量 (mmol/L)	乳酸含量 (mmol/L)	HK 含量 (u/g)	LDH 含量 (u/g)
miR-21-mimic 组	3.12±0.23	7.03±0.14	196.64±20.01	76.26±9.01
miR-NC 组	2.17±0.15	4.41±0.16	105.73±19.45	48.35±8.02
<i>t</i> 值	5.992	21.340	5.643	4.008
<i>P</i> 值	0.004	<0.001	0.005	0.016



注:A为互补碱基对;B为荧光素酶报告实验;与miR-NC+WT-PKM2组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01。

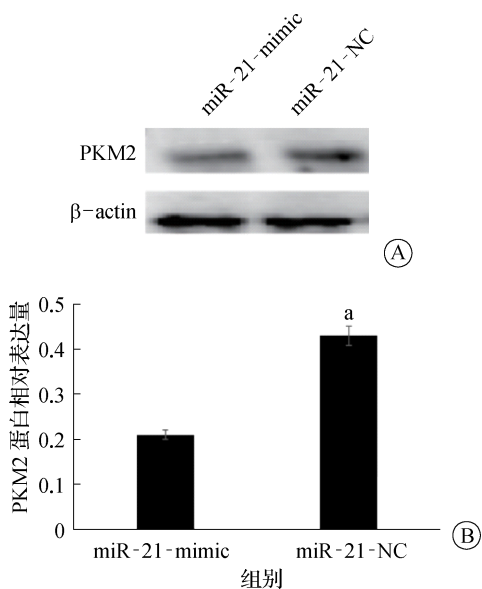
图4 miR-21与PKM2的靶向关系  
Fig. 4 Targeting relationship between miR-21 and PKM2

### 3 讨论

肿瘤细胞的侵袭、转移与肿瘤进展等密切相关<sup>[2]</sup>。因此,与细胞侵袭及转移有关的分子可能是治疗胰腺癌的靶点。

研究表明,miRNAs在胰腺癌组织与正常组织中表达不同<sup>[9]</sup>。miR-21是一种与细胞恶性行为有关的分子,在多种肿瘤组织中表达失调<sup>[10]</sup>。本研究表明,miR-21在胰腺癌细胞中高表达,与前人研究结果一致<sup>[11]</sup>;同时也表明,上调miR-21的胰腺癌细胞增殖能力提高,凋亡受到抑制。

糖酵解与肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移密切相关,此过程中细胞会分解葡萄糖、产生乳酸<sup>[12]</sup>。糖酵



注:A为western blot结果;B为两组PKM2蛋白表达对比;与miR-21-mimic组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01。

图3 各组细胞PKM2蛋白表达  
Fig. 3 PKM2 protein expression of cells in each group

解产生的乳酸不但可以加速细胞运动,同时还与肿瘤细胞的侵袭、转移有关,因此葡萄糖消耗量及乳酸生成量是肿瘤细胞有氧糖酵解的重要指标<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,miR-21 过表达细胞有氧糖酵解各项指标(葡萄糖消耗量和乳酸、HK、LDH 含量)明显升高,提示 miR-21 可能通过糖酵解促进胰腺癌细胞的恶性生物学行为。

PKM2 是肿瘤细胞糖酵解过程中的限速酶,在多种恶性肿瘤中高表达<sup>[14]</sup>。PKM2 可通过多种途径参与肿瘤细胞的增殖、凋亡,如 PKM2 与 Bub3 基因 Y207 位点磷酸化位点结合后调控肿瘤细胞周期<sup>[15]</sup>。此外,温媛媛等<sup>[16]</sup>研究发现,PKM2 可通过 Bim 调控肺鳞状细胞癌凋亡。在胰腺导管腺癌,PKM2 可通过募集热休克蛋白(heat shock protein, HSP) 90,促进 P21 激活激酶 2 (p21-activated protein kinase 2, PAK2)S192/197 位点磷酸化,从而稳定 PAK2,促进细胞侵袭、转移<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,胰腺癌细胞 PKM2 表达水平低于正常胰腺上皮细胞,提示 PKM2 与胰腺癌的发生有关。文献报道,多种 miR 可通过靶向 PKM2 影响肿瘤细胞的恶性生物学行为<sup>[18]</sup>。然而 miR-21 与 PKM2 的关系尚不清楚。本研究结果显示,miR-21 与 PKM2 存在一定的碱基互补配对序列,miR-21-mimcs 组 PKM2 野生型荧光素酶活性降低,提示 miR-21 与其具有一定靶向关系。

但本研究存在一定的局限性,首先 miR-21 对胰腺癌细胞增殖、凋亡影响的具体分子机制未进行探讨;其次,PKM2 对胰腺癌细胞增殖、凋亡的影响有待进一步分析;最后,此次研究结果需要动物体内实验验证。

总之,本研究表明 miR-21 与胰腺癌细胞的增殖、凋亡及有氧糖酵解有关,其机制可能与靶向 PKM2 有关。

利益冲突 无

## 参考文献

- [1] Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer metabolism: phenotype, signaling and therapeutic targets[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2308.
- [2] Ren RY, Guo JC, Shi J, et al. PKM2 regulates angiogenesis of VR-EPCs through modulating glycolysis, mitochondrial fission, and fusion[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(9): 6204-6217.
- [3] Zhou YY, Huang ZN, Su J, et al. Benserazide is a novel inhibitor targeting PKM2 for melanoma treatment[J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(1): 139-151.
- [4] Wang DL, Zhao CS, Xu F, et al. Cisplatin-resistant NSCLC cells induced by hypoxia transmit resistance to sensitive cells through exosomal PKM2[J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2860-2875.

- [5] Wang CX, Peng R, Zeng M, et al. An autoregulatory feedback loop of miR-21/VMP1 is responsible for the abnormal expression of miR-21 in colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1067.
- [6] Zheng XY, Dong LL, Zhao S, et al. Propofol affects non-small-cell lung cancer cell biology by regulating the miR-21/PTEN/AKT pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Anesth Analg*, 2020, 131(4): 1270-1280.
- [7] Li J, Ren HZ, Wang JL, et al. Extracellular HMGB1 promotes CD44 expression in hepatocellular carcinoma via regulating miR-21 [J]. *Aging*, 2021, 13(6): 8380-8395.
- [8] Zhao QY, Chen SM, Zhu ZL, et al. miR-21 promotes EGF-induced pancreatic cancer cell proliferation by targeting Spry2 [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9: 1157.
- [9] Zhou CF, Yi CH, Yi YX, et al. LncRNA PVT1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer via activating Wnt/ $\beta$ -catenin and autophagy pathway through modulating the miR-619-5p/Pygo2 and miR-619-5p/ATG14 axes [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 118.
- [10] Gong RN, Jiang YP. Non-coding RNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 309.
- [11] Chu NJ, Anders RA, Fertig EJ, et al. Inhibition of miR-21 regulates mutant KRAS effector pathways and intercepts pancreatic ductal adenocarcinoma development[J]. *Cancer Prev Res(Phila)*, 2020, 13(7): 569-582.
- [12] Wang CQ, Li YM, Yan S, et al. Interactome analysis reveals that lncRNA HULC promotes aerobic glycolysis through LDHA and PKM2[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3162.
- [13] Wang F, Qi XM, Wertz R, et al. p38 $\gamma$  MAPK is essential for aerobic glycolysis and pancreatic tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(16): 3251-3264.
- [14] 孟雨,李燕京,白玉贤.M2型丙酮酸激酶非代谢功能在肿瘤治疗中的研究进展[J].*现代肿瘤医学*,2022,30(17):3230-3234.
- [14] Meng Y, Li YJ, Bai YX. Research progress of nonmetabolic function of M2-pyruvate kinase in tumor therapy[J]. *J Mod Oncol*, 2022, 30(17): 3230-3234.
- [15] Jiang YH, Li XJ, Yang WW, et al. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(1): 75-87.
- [16] 温媛媛,杨志强,金丹雯,等.沉默PKM2表达可通过Bim来影响肺鳞状细胞癌凋亡[J].*医学研究杂志*,2020,49(11):60-65.
- [16] Wen YY, Yang ZQ, Jin DW, et al. Silencing the expression of PKM2 can affect the apoptosis of lung squamous cell carcinoma by Bim[J]. *J Med Res*, 2020, 49(11): 60-65.
- [17] Cheng TY, Yang YC, Wang HP, et al. Pyruvate kinase M2 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis through phosphorylation and stabilization of PAK2 protein[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13): 1730-1742.
- [18] Zhang HL, Feng C, Zhang MZ, et al. miR-625-5p/PKM2 negatively regulates melanoma glycolysis state[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2964-2972.