

## آستروسیت‌های جنینی موش، همانند سلول‌های سرطانی، قادر به تنظیم متابولیسم انرژی از مسیر واربورگ هستند

ندا عبدویس زاده<sup>۱</sup>، اسما محمدی<sup>۲</sup>، پریسا دایتی<sup>۱</sup>، علیرضا خیراله<sup>۳\*</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** اثر واربورگ نوعی گلیکولیز بی هوازی در حضور اکسیژن است که در آن سلولهای توموری تمایل به جذب گلوکز و ترشح لاکتات در حضور اکسیژن دارند تا انرژی لازم برای رشد در شرایط فقر غذایی فراهم گردد. در مطالعات گذشته سلول‌های جنینی می‌توانند مشابه سلول‌های سرطانی رفتار کنند بر اساس این تحقیقات در این مطالعه با القای گرسنگی و ایجاد شرایط محیطی مشابه با شرایط سلول‌های سرطانی به درک اثر واربورگ در سلول‌های آستروسیت جنینی کشت شده از مغز نوزاد موش پرداخته شد. **روش بررسی:** آستروسیت‌ها در ۱۰ DMEM/FBS درصد کشت داده شدند. در کشت ثانویه در زمان‌های ۱۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرسنگی در سلول‌ها القا شد و در انتها مصرف گلوکز، میزان ترشح لاکتات و فعالیت LDH داخل سلولی به روش فتومتریک اندازه‌گیری گردید.

**یافته‌ها:** مصرف گلوکز ۴۸ ساعت بعد از القای گرسنگی سلولی ۴۲٪ در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ( $P < 0/05$ ). همچنین ۱۶ ساعت بعد از القای گرسنگی ترشح لاکتات افزایش و ۷۲ ساعت بعد فعالیت LDH داخل سلولی افزایش معنادار ۷/۶۳ برابری را نشان داد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تولید و ترشح لاکتات در این سلول‌ها به‌عنوان منبع انرژی و همین‌طور ترکیبی شیمیایی برای تبادل پیام با یکدیگر، همانند سلول‌های توموری، عمل می‌کند. با توجه به ایجاد شرایطی مشابه با شرایط سلول‌های توموری برای آستروسیت‌ها، امید است این یافته‌ها منجر به درک بهتر مفاهیم متابولیسم سلول‌های توموری و طراحی استراتژی‌های جدید درمانی بر علیه این سلول‌ها در مغز گردد.

**کلید واژگان:** اثر واربورگ، آستروسیت، فقر غذایی سلول، لاکتات، لاکتات دهیدروژناز، سرطان.

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی.

۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی.

۳-استادیار گروه بیوشیمی بالینی.

۱-گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران.

۳-گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

\*نویسنده مسؤل:

علی رضا خیراله؛ گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۷۵۰۵۰۷۵

Email: akheirohlah@ajums.ac.ir

## مقدمه

سلول‌های آستروسیت از سلول‌های گلیال رادیال در انتهای دوره جنینی پدیدار می‌شوند. این سلول‌ها به نسبت ۱۰ به ۱ بسیار بیشتر از نورون‌ها هستند (۱) و در حدود ۲۵ تا ۵۰ درصد از حجم مغز را اشغال کرده‌اند. از نظر ظاهری، ستاره‌ای شکل بوده و دارای زوایید متعددی هستند و با سطح نورون‌ها اتصال غیر سیناپسی دارند. این سلول‌ها دارای پاهای دور عروقی هستند که حدود ۸۵٪ از سطح مویرگ‌های موجود در CNS را می‌پوشانند (۲).

در دانش پزشکی گذشته آستروسیت‌ها را سلول‌های کم اهمیت، نگهبان و پرکننده فضاهای خالی می‌دانستند. در حالی که امروزه وظایف بی‌شماری را برای آنها برشمرده‌اند. این سلول‌ها در تولید و بازجذب میانجی‌های عصبی (۳)، انتقال سیناپتیک (۴)، کنترل جریان خون CNS (۵)، تنظیم pH (۶)، تأمین انرژی مورد نیاز نورون‌ها دخالت داشته (۷) و قادرند نورون‌ها را از جنبه‌های مختلف حمایت کنند.

یکی از سلول‌های استرومای اطراف تومورهای مغزی، سلول‌های آستروسیت می‌باشند که در پاسخ به انواع جراحات و صدمات مغزی فعال شده و زمینه رشد و تکثیر تومور را فراهم می‌کنند (۸). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نقل و انتقالات متابولیکی بین سلول‌های توموری و سلول‌های استرومای اطراف تومورها، عمدتاً آستروسیت‌ها، نقش مهمی در پیشرفت تومور بازی می‌کند (۹-۱۱). از طرفی ایجاد فقر غذایی (starvation) در سلول‌های اطراف تومورها نیز در پیشرفت تومورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۲-۱۶) و دیده شده است که در شرایط فقر غذایی سلول‌های استرومای اطراف تومور به جای استفاده از فسفریلاسیون اکسیداتیو جهت تولید ATP از گلیکولیز در شرایط هوازی برای تولید انرژی استفاده می‌کنند. این نوع متابولیسم به اثر واربورگ معروف است.

اثر واربورگ یک نوع گلیکولیز هوازی بوده که در آن سلول‌های توموری تمایل فراوانی به جذب گلوکز و ترشح

لاکتات در حضور اکسیژن دارند و متابولیسم غالب در اکثر سرطان‌هاست. واربورگ در سال ۱۹۵۶ نشان داد که سلول‌های سرطانی با وجود اینکه تنفس میتوکندریایی آنها مشابه سلول‌های طبیعی است اما میل فراوانی به برداشت گلوکز و تولید لاکتات دارند. از آنجایی که سطح گلوکز در تومورها بسیار پایین است، به نظر می‌رسد که این مسیر روشی برای استفاده اقتصادی و بهینه از گلوکز جهت بقای سلول‌های سرطانی است (۱۷، ۱۸). لاکتات به عنوان محصول نهایی اثر واربورگ علاوه بر ایجاد فیدبکی از مصرف گلوکز می‌تواند بعد از تبدیل به پیرووات به عنوان سوخت فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری سلول‌های سرطانی مصرف و منجر به تولید ATP شود که لاکتات دهیدروژناز (LDH) آنزیم ضروری برای این تبدیل است (۱۹). به علاوه لاکتات به عنوان یک مولکول سیگنالینگ قوی باعث پایداری فاکتور

**HIF-1 $\alpha$**  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) شده که اثر نهایی آن افزایش در بیان VEGF و به دنبال آن افزایش در رگ‌زایی می‌باشد (۲۰). هدف اولیه مولکول **HIF-1 $\alpha$**  گیرنده‌های گلوکز (GLUT-1) بوده که نه تنها ورود کافی گلوکز به داخل سلول بلکه ترشح لاکتات تجمع یافته به خارج از سلول را در شرایط مستقل از اکسیژن تضمین می‌کند. در متابولیسم واربورگ به دلیل افزایش فعالیت LDH و تولید  $NAD^+$  گلیکولیز ادامه یافته و ATP تولید می‌گردد (۲۱، ۲۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی با ایجاد فقر غذایی در سلول‌های اطراف خود باعث القای اثر واربورگ و تولید لاکتات در آنها شده که برای تولید انرژی، رگ‌زایی و تکثیر بافت سرطانی لازم است. (۲۳، ۲۴) از آنجایی که گزارشی در خصوص بررسی اثر واربورگ در آستروسیت مشاهده نشده است، در این مطالعه بر آن شدیم تا با تأثیر فقر غذایی از طریق حذف سرم و فاکتورهای رشد از محیط کشت سلول-

۸۰-۷۰ درصد به سلولهای گروه کنترل محیط کشت DMEM Low glucose (1gr/L) حاوی FBS 10% اضافه شد و جهت القای شوک گرسنگی سلولها به مدت ۱۶، ۴۸، و ۷۲ ساعت در محیط کشت DMEM Low glucose (1gr/L) حاوی FBS ۱۰٪ قرار گرفتند. در انتهای هر زمان انکوباسیون محیط کشت سلولها جمع‌آوری و جهت انجام آنالیز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز و نگه‌داری شد.

#### اندازه‌گیری میزان مصرف گلوکز

اندازه‌گیری گلوکز در محیط کشت سلولها بعد از گذشت زمانهای تعیین شده و همچنین سطح گلوکز در محلول DMEM Low glucose به روش کالریمتری و با استفاده از کیت GOD-GLUCOSE PAP(cat,no:1500017) ساخت شرکت پارس آزمون صورت گرفت. اختلاف سطح گلوکز محیط کشت سلولها از سطح گلوکز محلول DMEM Low glucose (1gr/L) به عنوان میزان مصرف گلوکز برای هر دوره زمانی در نظر گرفته شد.

#### اندازه‌گیری میزان تولید لاکتات

میزان لاکتات موجود در محیط کشت سلولها بعد از گذشت زمانهای تعیین شده با استفاده از کیت Lactate (cat,no:1050034) ساخت شرکت پارس آزمون، به روش کالریمتری و به صورت دو محلوله انجام شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد و برای محاسبه غلظت لاکتات بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر از ضریب فاکتور ۱۲۰/۶ استفاده شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت لاکتات دهیدروژناز داخل

##### سلولی

سلولهای کشت شده در پلیت‌های ۶ خانه برای گروه کنترل (n=3) و برای هر بازه زمانی (n=3) برای هر بازه زمانی، با استفاده از بافر لیز سلولی (تریس 20 mM، 1

های آستروسیت جنینی شرایطی مشابه با سرطان ایجاد کرده و به بررسی ارتباط آن با اثر واربورگ پردازیم.

#### روش بررسی

##### جداسازی و کشت اولیه سلولهای آستروسیت

این مطالعه تجربی روی سلولهای آستروسیت جدا شده از نوزاد تازه متولد شده موش نژاد C57BL/6 خریداری شده از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی اهواز انجام شد. سلولهای آستروسیت طبق روش متداول (۲۵) ایزوله و جداسازی شدند. به‌طور خلاصه بعد از جدا کردن مغز نوزاد تازه متولد شده و برداشت پرده مننژ، مغز به قطعات کوچک تقسیم شد و سپس قطعات خرد شده مغز جهت تشکیل سلولهای مجزا با محلول ۰/۱ درصد تریپسین/DPBS) به مدت ۳ دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. رسوب سلولی در ۱۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد در انتها سلولها در محیط کشت DMEM Low glucose (1gr/L) که حاوی FBS ۱۰٪ بود در دمای ۳۷ درجه و CO<sub>2</sub> ۵٪ کشت داده شدند. در این روش متداول و آسان کشت اولیه سلولهای آستروسیت بعد از یک هفته بیش از ۹۷٪ آستروسیت (glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive) و حدود ۳٪ الیگودندروسیت و میکروگلیا خواهند بود (۲۵).

##### کشت ثانویه و القای گرسنگی در آستروسیت‌ها

سلولهای آستروسیت در پاساژ ۴ از فلاسک‌ها جمع‌آوری و به پلیت‌های ۷ cm حاوی ۲ میلی‌لیتر DMEM Low glucose/FBS ۱۰٪ و ۱ درصد Pen/sterp منتقل شدند. در هر پلیت حدود یک میلیون سلول کشت شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. در ادامه سلولها به دو گروه کنترل و گروه starvation تقسیم شدند و پس از ۳ بار شست‌وشوی سلولها در تراکم سلولی (confluency)

میزان ترشح لاکتات در محیط کشت آستروسیت‌هایی که به مدت ۱۶ ساعت در شرایط گرسنگی قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۶/۴۳ برابر افزایش پیدا کرد ( $p < 0.01$ ) و بعد از ۷۲ ساعت به سطح کنترل رسید. (شکل ۲)

فعالیت لاکتات دهیدروژناز داخل سلولی (LDH) در سلول‌های آستروسیت لیز شده گروه کنترل و گروهی که تحت شرایط گرسنگی بودند با روش DGKC اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در آستروسیت‌هایی که مدت ۱۶ و ۷۲ ساعت تحت گرسنگی بودند به ترتیب به میزان ۴/۴۷ و ۷/۶۳ برابر در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت ( $P < 0.01$ ).

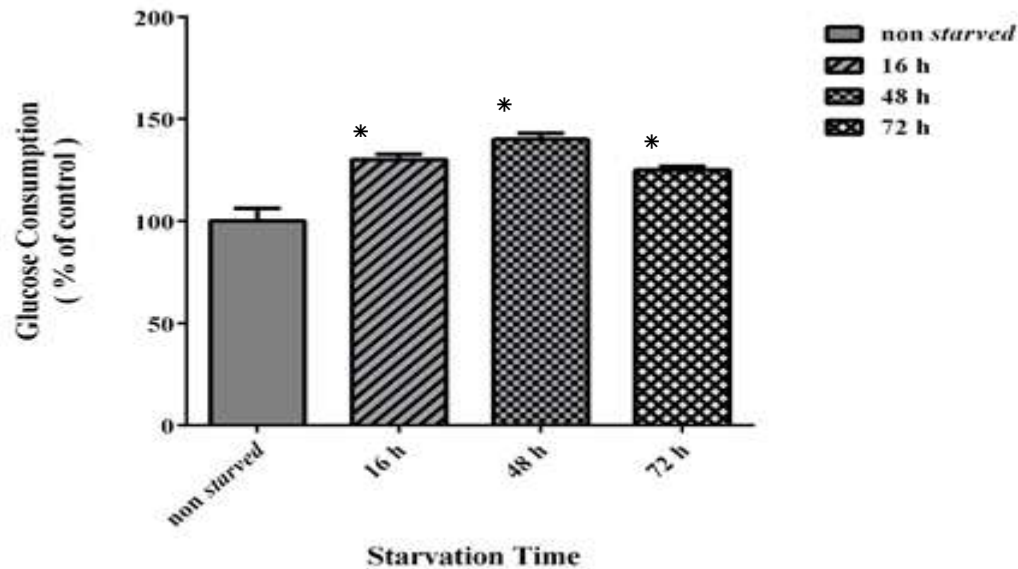
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل با کمک نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و همچنین آزمون TUKEY مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار آماری Graphpad Prism 6 رسم گردیدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح ( $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.01$ ) معنادار در نظر گرفته شد.

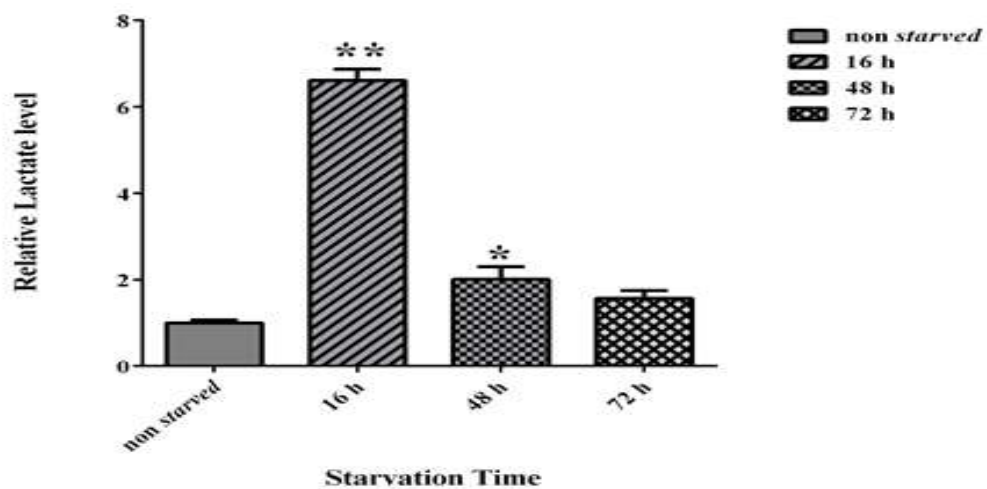
100 mM NaCl، mM EDTA، تریتون 0.5% و X100 (Protease Inhibitor Cocktail) جمع‌آوری شدند. سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در سلول‌های لیز شده به روش DGKC و با استفاده از کیت LDH(cat,no:1050022) ساخت شرکت پارس‌آزمون صورت گرفت. بر اساس این روش جذب نمونه‌ها دقیقاً ۱ و ۲ و ۳ دقیقه پس از انکوباسیون در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز طبق پروتکل کیت میانگین مقدار اختلافات جذب نوری دقیق ۱، ۲ و ۳ در ضریب ۳۲۲۷ ضرب شد.

#### یافته‌ها

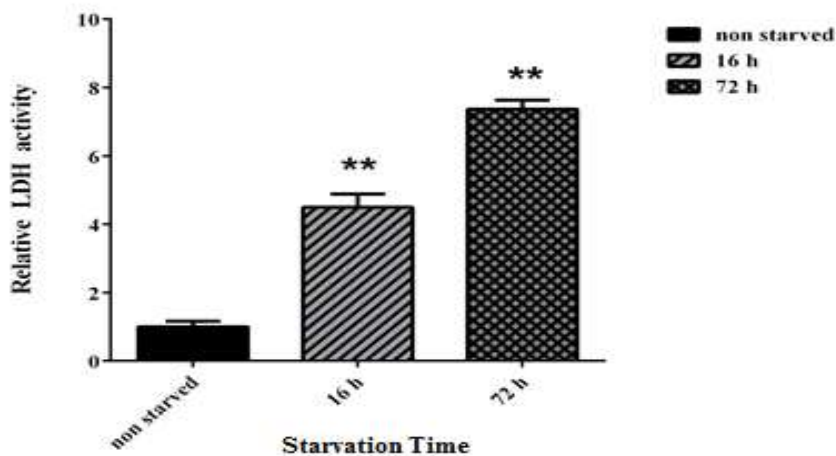
سطح گلوکز در محیط کشت سلول‌های گروه کنترل و نیز سلول‌هایی که در زمانهای ۱۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت شرایط گرسنگی قرار گرفته بودند با استفاده از روش کالریمتری مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، بعد از ۱۶ ساعت گرسنگی میزان مصرف گلوکز در سلول‌های آستروسیت شروع به افزایش و بعد از ۴۸ ساعت گرسنگی به میزان ۴۲ درصد در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۱: نتایج مصرف گلوکز بعد از ۷۲ و ۴۸، ۱۶ ساعت القای گرسنگی در سلول‌های آستروسیت نوزاد موش. هر آزمایش سه بار تکرار و میزان مصرف گلوکز در هر زمان در مقایسه با گروه کنترل (non starved) ارزیابی شد. نتایج به درصدی از کنترل بیان شده است و \* تفاوت معناداری ( $P < 0.05$ ) می‌باشد.



شکل ۲: نتایج تولید لاکتات بعد از ۷۲ و ۴۸، ۱۶ ساعت القای گرسنگی به سلول‌های آستروسیت نوزاد موش. هر آزمایش سه بار تکرار و میزان تولید لاکتات در هر زمان در مقایسه با گروه کنترل (non starved) ارزیابی گردید. \* تفاوت معناداری ( $P < 0.05$ ) و \*\* تفاوت معناداری ( $P < 0.01$ ) در نظر گرفته شد.



شکل ۳: نتایج فعالیت LDH بعد از ۷۲، ۴۸، ۱۶ و ۰ ساعت القای گرسنگی به سلول‌های آستروسیت نوزاد موش. هر آزمایش سه بار تکرار و میزان فعالیت LDH در هر زمان در مقایسه با گروه کنترل (non starved) ارزیابی شد. \* تفاوت معناداری ( $P < 0.05$ ) و \*\* تفاوت معناداری ( $P < 0.01$ ) در نظر گرفته شد.

## بحث

سلول‌های توموری عمل کرده و یافته‌های ما نیز هم راستا با این مطالعات می‌باشد (۲۴).

در این مطالعه مشاهده شد که ایجاد گرسنگی موجب القای اثر واربورگ در آستروسیت‌ها می‌شود و ترشح لاکتات به عنوان محصول نهایی اثر واربورگ و مهمترین یافته در این مطالعه، ۱۶ ساعت بعد از القای گرسنگی در بیشترین سطح خود بوده و به میزان ۶/۴۳ برابر نسبت به شرایط کنترل افزایش داشته است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که لاکتات تولید شده در اثر واربورگ قادر است با ایجاد محیط اسیدی منجر به افزایش در بیان کلاژن و فاکتور لازم برای رگ‌زایی (VEGF)، شده و بنابراین توموزایی را تشدید کند (۲۶). به‌علاوه لاکتات به عنوان یک مولکول سیگنالینگ قوی منجر به القای فاکتور HIF-1 $\alpha$  می‌شود که این فاکتور به نوبه خود در شرایط هوایی فعال شده و موجب افزایش بیان LDH و افزایش مصرف گلوکز می-

علاوه بر هیپوکسی، فقر غذایی نیز از ویژگی دیگر تومورهاست، بنابراین انرژی تولیدی در سلول‌های توموری نه تنها فعالیت سلول‌های توموری را امکان‌پذیر می‌کند بلکه باید تقسیم سلولی سریع تومورها را تضمین نماید. سلول‌های توموری مسیرهای متابولیکی خود را هم راستا با نیاز خود در طی رشد و تکثیر تنظیم می‌کنند. بهترین فنوتیپ متابولیکی که در سلول‌های سرطانی تشخیص داده شده به اثر واربورگ معروف بوده و آن تغییر تولید ATP از فسفریلاسیون اکسیداتیو به گلیکولیز بی‌هوازی در حضور اکسیژن است (۱۷).

در این مطالعه با حذف سرم و کاهش فاکتورهای رشد از محیط کشت سلولها و در نتیجه القای گرسنگی تغییرات متابولیکی ایجاد شده در سلول‌های آستروسیت جنینی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات گذشته ثابت کرده‌اند که سلول‌های استرومای جنینی در شرایط *in vitro* مشابه

جنینی در شرایط گرسنگی گلیکولیز بی‌هوازی را علی‌رغم وجود اکسیژن انتخاب می‌کند و ۱۶ ساعت بعد از القای گرسنگی، سلول‌ها جهت تأمین انرژی از لاکتات تولیدی خود استفاده می‌نمایند.

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که سلول‌های فیبروبلاست اطراف تومور (CDFS) با تولید لاکتات از طریق اثر واربورگ رشد و بقای خود را علی‌رغم نبود فاکتورهای آنژیوژنز تضمین می‌کنند (۲۷).

نتایج دو مطالعه مجزا بر روی سلول‌های *Hela* و فیبروبلاست‌های انسانی نشان داده است که پس از گذشت ۴۸ ساعت از القای گرسنگی میزان لاکتات در محیط کشت هر دو نوع سلول افزایش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۸ و ۲۹). یافته‌های ما نشان می‌دهند که با القای گرسنگی، آستروسیت‌ها همانند سلول‌های توموری عمل کرده و با تغییر مسیر متابولیسمی خود به اثر واربورگ به رشد و بقای خود ادامه می‌دهند. از آنجایی که تا کنون گزارشی از بررسی اثر واربورگ در آستروسیت‌ها موجود نیست، امید است این یافته‌ها منجر به درک بهتر مفاهیم متابولیسم سلول‌های توموری و طراحی استراتژی‌های جدید درمانی بر علیه این سلول‌ها در مغز گردد.

#### فقدانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی (CRMC-89) استخراج گردید که با مجوز و حمایت مالی معاونت توسعه پژوهش و فناوری تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز و در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شد.

گردد. (۲۱، ۲۲) که در این راستا افزایش مصرف گلوکز (شکل ۱) و افزایش شدید و معنادار فعالیت LDH (شکل ۳) در آستروسیت‌هایی که به مدت ۷۲ و ۴۸،۱۶ ساعت در شرایط گرسنگی قرار داشتند، قابل تفسیر است.

نکته قابل توجه دیگر این است که میزان لاکتات ترشح شده توسط آستروسیت‌ها در محیط کشت سلول‌ها پس از ۱۶ ساعت گرسنگی به اوج خود رسیده و به میزان ۶/۴۳ برابر نسبت به کنترل افزایش داشته و پس از ۷۲ ساعت تقریباً به سطح کنترل بازگشته است (شکل ۲) و هم زمان مصرف گلوکز در ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ ساعت کاهش نشان داد (شکل ۱) این پدیده نشان می‌دهد که آستروسیت‌ها در شرایط گرسنگی طی یک چرخه، لاکتات ترشح شده به محیط کشت را برداشت کرده تا استفاده بهینه و اقتصادی از لاکتات داشته باشند که افزایش شدید و معنادار فعالیت LDH (شکل ۳) تأییدکننده این ایده می‌باشد، زیرا که وجود LDH برای واکنش دو طرفه تولید یا مصرف لاکتات ضروری است.

علاوه بر استفاده بهینه و اقتصادی، برداشت لاکتات شاید به خاطر جلوگیری از تغییرات pH محیط کشت صورت می‌گیرد، کما اینکه اندازه‌گیری pH محیط کشت در بازه‌های زمانی مشخص شده نشان داد که پس از ۱۶ ساعت به میزان کم و غیر معناداری کاهش و سپس به سطح کنترل برگشت. این یافته‌ها تأکید می‌کنند که بین میزان فعالیت LDH و میزان ترشح و یا باز جذب لاکتات یک ارتباط مستقیم وجود دارد و القای گرسنگی به سلول‌های آستروسیت جنینی منجر به تحریک اثر واربورگ شده و بقای سلول‌ها را علی‌رغم وجود استرس و تنش گرسنگی تضمین می‌کند. به عبارت دیگر سلول‌های آستروسیت

#### منابع

- 1-Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35.
- 2-Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(8):626-40.
- 3-Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*. 1984;42(1):1-11.

- 4-Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*. 2003;26(10):523-30.
- 5-Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in neurosciences*. 2009;32(3):160-9.
- 6-Wolf F, Kirchhoff F. Imaging Astrocyte Activity. *Science*. 2008;320(5883):1597-9 .
- 7-Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 2007;55(12):1251-62.
- 8-Lorger M. Tumor microenvironment in the brain. *Cancers*. 2012;4(1):218-43.
- 9-Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Lisanti MP. Understanding the Warburg effect and the prognostic value of stromal caveolin-1 as a marker of a lethal tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2011;13(4):1-13.
- 10-Tripathi M, Billet S, Bhowmick NA. Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell adhesion & migration*. 2012;6(3):231-5.
- 11-Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiological reviews*. 1996;76(1):69-125.
- 12-Mueller-Klieser W, Walenta S, Paschen W, Kallinowski F, Vaupel P. Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting. *Journal of the National Cancer Institute*. 1988;80(11):842-8.
- 13-Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*. 1989;49(23):6449-65.
- 14-Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene*. 2000;19(40):4621-31.
- 15-Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences*. 1999;24(2):68-72.
- 16-Bae SK, Baek JH, Lee YM, Lee OH, Kim KW. Hypoxia-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells: a possible involvement of the 6-TG-sensitive protein kinase(s)-dependent signaling pathway. *Cancer letters*. 1998;126(1):97-104.
- 17-Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
- 18-Dang CV. PKM2 tyrosine phosphorylation and glutamine metabolism signal a different view of the Warburg effect. *Science signaling*. 2009;2(97):pe75.
- 19-Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Chiavarina B, Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Tsiganos A, et al. Understanding the "lethal" drivers of tumor-stroma co-evolution: emerging role(s) for hypoxia, oxidative stress and autophagy/mitophagy in the tumor micro-environment. *Cancer biology & therapy*. 2010;10(6):537-42.
- 20-Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(26):23111-5.
- 21-Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(2):85-95.
- 22-Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):54-61.
- 23-Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
- 24-Rattigan YI, Patel BB, Ackerstaff E, Sukenick G, Koutcher JA, Glod JW, et al. Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Experimental cell research*. 2012;318(4):326-35.
- 25-Ito J-i, Nagayasu Y, Lu R, Kheirollah A, Hayashi M, Yokoyama S. Astrocytes produce and secrete FGF-1, which promotes the production of apoE-HDL in a manner of autocrine action. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(4):679-86.
- 26-Philp A, Macdonald AL, Watt PW. Lactate--a signal coordinating cell and systemic function. *The Journal of experimental biology*. 2005;208(Pt 24):4561-75.
- 27-Lemons JM, Feng X-J, Bennett BD, Legesse-Miller A, Johnson EL, Raitman I, et al. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity. *PLoS Biol*. 2010;8(10):e1000514.
- 28-Golpour M, Akhavan Niaki H, Khorasani HR, Hajian A, Mehrasa R, Mostafazadeh A. Human fibroblast switches to anaerobic metabolic pathway in response to serum starvation: a mimic of Warburg effect. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2014;3(2):74-80.
- 29-Wu CA, Chao Y, Shiah SG, Lin WW. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833(5):1147-56.



## Mouse Astrocytes are Able to Regulate Energy Metabolism Through the Warburg Effect Similar to Cancer Cells

Neda Abdeveiszadeh<sup>1</sup>, Asma Mohammadi<sup>2</sup>, Parisa Dayti<sup>1</sup>, Alireza kheiroollah<sup>3\*</sup>

1-MSC Student of Clinical Biochemistry.

2-MSc of Clinical Biochemistry.

3-Assistant Professor of Clinical Biochemistry.

1-Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2-Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran

3-Department of Clinical Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

\*Corresponding author:

AliReza kheiroollah; Department of Clinical Biochemistry, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Tel: +989167505075

Email: akheiroollah@ajums.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** In Warburg effect, an aerobic glycolysis, tumor cells tend to absorb glucose and secrete lactate in the presence of oxygen to provide the energy needed for the growth in nutrient-poor conditions. Previous studies have shown that fetal cells behave like cancer cells. Based on those researches, we examined the Warburg effect in cultured fetal astrocytes isolated from the newborn mouse brain of C57BL/6 by creating a condition similar to cancer cells to induce cell starvation.

**Subjects and Methods:** Astrocytes were cultured in DMEM/ FBS 10% and starvation was induced during the subculture for the period of 16, 48 and 72 hr. At the end glucose, lactate secretion and intracellular LDH activity were measured by a colorimetric method.

**Results:** Glucose consumption was increased to 42% after 48 hr of starvation ( $P < 0.05$ ). Starvation-mediated events indicate an increase of lactate release after 16 hr and a significant increase in intracellular LDH activity by 7.63 fold after 72 hr compared to the control ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Lactate production and secretion acts as a necessary source of energy and also a chemical component for signaling to other cells similar to what happen in the tumor cells. Since we provided a condition like tumor cells environment for astrocytes, it is concluded that astrocytes, like other cells, can mimic Warburg effect and this lead to a better understanding of tumor cell metabolism concepts to design of novel therapeutic strategies to target these cells in the brain.

**Key words:** Warburg effect, Astrocytes, Cell starvation, Lactate, Lactate Dehydrogenate, Cancer.

►Please cite this paper as :

Abdeveiszadeh N, Mohammadi A, Dayti P, kheiroollah A. Mouse Astrocytes are Able to Regulate Energy Metabolism Through Warburg Effect Similar to Cancer Cells. *Jundishapur Sci Med J* 2016;15(4):423-431.

Received: Jan 25, 2015

Revised: May 5, 2016

Accepted: July 2, 2016