

人前列腺癌中己糖激酶-2 基因对 TH1/TH2 细胞的影响

李 斌 陶 陶 沈德赞 葛庆宇 夏开国 肖 峻

摘要 目的 探讨在前列腺癌 PC3 细胞系中高表达的己糖激酶-2 基因(HK2 基因)对与 PC3 细胞系共培养体系里的辅助性 T 细胞 1 和辅助性 T 细胞 2(TH1/TH2)的影响。方法 通过 shRNA 构建慢病毒感染 PC3 细胞系产生 HK2 基因敲低的 PC3 细胞系的实验组细胞(sh-HK2),同时使用无义序列构建慢病毒感染 PC3 细胞系获得阴性对照细胞(NC),qPCR 与 Western blot 验证敲低结果。培养前列腺癌细胞(NC 和 sh-HK2)48 h 后分离癌细胞获得上清液,提取健康人外周血单个核细胞(PBMCs)。TH1 空白组:PBMCs 在 TH1 诱导条件下使用 1640 培养基培养 48 h;TH1 实验组(TH1 sh-HK2 组):PBMCs 在 TH1 诱导条件下使用培养过稳转株的上清液共培养 48 h;TH1 阴性对照组(TH1 NC 组):PBMCs 在 TH1 诱导条件下使用培养过阴性对照细胞的上清液共培养 48 h。TH2 空白组、TH2 实验组(TH2 sh-HK2 组)、TH2 阴性对照组(TH2 NC 组)诱导条件变更为 TH2 诱导条件,其他不变。48 h 后分光光度仪检测各共培养体系中乳酸水平。然后提取各组中 PBMCs 使用植物血凝素-M(PHA-M)另外培养 24 h,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 TH1 诱导条件下各组中 PBMCs 的干扰素- γ (IFN- γ)和 TH2 诱导条件下各组 PBMCs 的白介素-4(IL-4)的分泌。结果 qPCR 与 Western blot 显示 HK2 基因敲低结果显著,在 TH1 诱导条件下的实验组中 PBMCs 分泌 IFN- γ 升高,在 TH2 诱导条件下的实验组中 PBMCs 分泌 IL-4 降低。实验组与对照组相比乳酸含量均下降。结论 HK2 基因在前列腺癌 PC3 中的高表达使肿瘤周围环境乳酸浓度升高,并使周围共培养体系中 IFN- γ 水平降低,IL-4 水平升高,由此导致细胞免疫功能下降,而使针对肿瘤无效的体液免疫增强,促进肿瘤进展。

关键词 己糖激酶-2;前列腺癌;人外周血单个核细胞;TH1/TH2 细胞;共培养;干扰素- γ ;白介素-4

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1530-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.010

近年来,针对肿瘤的研究方向偏向于肿瘤代谢

活动,肿瘤细胞倾向于进行活跃的葡萄糖摄取与有氧条件下的糖酵解,即 Warburg 效应。然而有氧糖酵解相比于进行三羧酸循环并不能供给大量的 ATP,但是有氧糖酵解却能提供细胞快速增殖需要的其他物质,如葡萄糖-6 磷酸、果糖-6 磷酸等生物大分子,这些生物大分子是细胞增殖所需的原料,故而为了满足细胞增殖需要,提供相应的能量同时还需要应付肿瘤生长过程中不得不面对的各种不利环境,肿瘤细胞需要进行高度的有氧糖酵解^[1]。己糖激酶 2(hexokinase-2, HK-2)是肿瘤细胞糖酵解中第一步限速酶,集葡萄糖摄取和促进反应过程的功能于一体,因此它能产生更多的乳酸,明显改变肿瘤周围的酸性环境,对肿瘤周围的淋巴细胞功能产生影响^[2]。该实验通过使用人前列腺癌 PC3 细胞系培养后的上清液和人外周血单个核细胞(PBMCs)构建体外共培养体系,在特定诱导分化 TH1/TH2 条件下,观察两种淋巴细胞的细胞因子分泌情况从而评估高表达的 HK2 对肿瘤细胞周围免疫细胞功能的改变。

1 材料与方法

1.1 细胞来源及培养 前列腺癌细胞系 PC3 来源于安徽医科大学基础医学实验室。PC3 细胞系用含有 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)培养,细胞常规置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱 2~3 d 换液 1 次。人 PBMCs 使用淋巴细胞提取液(天津灏洋华科生物科技有限公司)从健康成人外周血中提取,1 300 r/min 离心 30 min,取白膜层富含淋巴细胞层,连续 1 000 r/min,用 PBS 洗涤 2 次,后置于上述相同培养条件下培养。

1.2 PC3 培养上清液与 TH1/TH2 的共培养体系建立 12 孔板每孔种 PC3 细胞 1×10^5 个(实验组细胞与阴性对照细胞,即 sh-HK2 与 NC),同时设置空白组,不加入 PC3 细胞。3 组均放置于培养箱中培养 48 h,分离 PC3 细胞计数细胞且同时获得 3 种培养上清液:空白培养上清液,NC 培养上清液,sh-HK2 培养上清液。后在培养上清液中加入 10^6 个

2020-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81702540);安徽省自然科学基金(编号:1708085QH202)

作者单位:安徽医科大学附属医院泌尿外科,合肥 230001

作者简介:李 斌,男,硕士研究生;

肖 峻,男,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: xjdoctor@126.com

PBMCs,使共培养体系体积为 1 ml。TH1 培养条件下加入 5 μ l/ml CD3 抗体、1 μ l/ml CD28 抗体、1 μ l/ml IL-2、20 μ l/ml IL-12、2 μ l/ml 抗 IL-4 抗体(美国 RD 公司)。TH2 培养条件下加入 5 μ l/ml CD3 抗体、1 μ l/ml CD28 抗体、1 μ l/ml IL-2、10 μ l/ml IL-4、2 μ l/ml 抗 IFN- γ 抗体(美国 RD 公司)。体系命名 TH1 空白组:空白培养上清液 + PBMCs 在 TH1 培养条件下继续培养,TH1 NC 组:NC 培养上清液 + PBMCs 在 TH1 培养条件下继续培养,TH1 sh-HK2 组:sh-HK2 培养上清液 + PBMCs 在 TH1 培养条件下继续培养。同理 TH2 空白组、TH2 NC 组、TH2 sh-HK2 组培养条件改为 TH2 培养条件,余下不变。

体系建立后常规置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱 48 h 后,分离上清液与 PBMCs,上清液用于乳酸浓度测定,PBMCs 用 PBS 洗涤,重新放置于 12 孔板,更换新鲜 1640 培养液,加入 5 μ g/ml 植物血凝素 PHA-M (Absin) 培养 24 h 后,TH1 培养条件下 PBMCs 上清液用于检测 IFN- γ ,TH2 培养条件下 PBMCs 上清液用于检测 IL-4^[3]。

1.3 PC3 细胞 shRNA 慢病毒载体 HK2 基因敲低稳转株 使用针对 HK2 基因的 shRNA 构建慢病毒载体,后包装慢病毒载体,得到含有慢病毒颗粒的病毒液,使用慢病毒颗粒病毒液感染目的细胞,筛选出活细胞,即实验组细胞(sh-HK2),相同方法运用于构建阴性对照细胞(NC),针对 HK2 的基因 shRNA 序列换为无义序列。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 将 HK2 基因敲低后的实验组细胞(shRNA)和阴性对照细胞(NC)分别提取总 RNA 在 0.2 ml PCR 管(无 RNase 酶)中,加入总 RNA,PCR 仪上 65 $^{\circ}$ C 加热 5 min,立即冰浴 3 min,逆转录为 cDNA 后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。以 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,共 40 个循环。 β -actin 上游引物(5' \rightarrow 3'): CCCTG-GAGAAGAGCTACGAG,下游引物(5' \rightarrow 3'): GGAAG-GAAGGCTGGAAGAGT; HK2 上游引物(5' \rightarrow 3'): GACGAGAGCATCCTCCTCAA, HK2 下游引物(5' \rightarrow 3'): GTTACCACAGCAACCACAT。

1.5 Western blot 法检测 NC 和 sh-HK2 中 HK2 蛋白的表达 6 孔板中每个孔种 NC 及 sh-HK2 各 1 \times 10⁶ 个,48 h 后胰酶消化细胞,收集细胞。具体步骤为:提取蛋白标本;BCA 测定各蛋白样本浓度;上样;上层浓缩胶电压 80 V、60 min,Marker 分离后分离胶 120 V、90 min;按 Marker 指示切下需要部分;

转膜:条件为 200 mA、120 min;5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h;HK2 蛋白一抗(美国 Abcom 公司,1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温 1 h;曝光。

1.6 乳酸浓度测定 共培养体系建立后 48 h,各培养体系中最终的上清液用于乳酸浓度测定。

获得 PC3 细胞培养上清液时,同时计数贴壁的 PC3 细胞数用于后续乳酸检测实验结果的比对,计数结果用于各培养体系最终乳酸浓度结果比较,运用 TH1 空白组、TH2 空白组乳酸值为基数,TH1 NC 组、TH1 sh-HK2 组、TH2 NC 组、TH2 sh-HK2 组中最终乳酸含量减去对应的空白组基数值再除以计数的 PC3 细胞数,显示每 10⁵ 个 PC3 细胞对 TH1 NC 组、TH1 sh-HK2 组、TH2 NC 组、TH2 sh-HK2 组中乳酸含量的改变,消除因细胞增殖能力不同导致乳酸含量改变的影响。上清液按照乳酸浓度试剂盒(北京 solarbio 公司)说明书用可见分光光度仪测 OD 值,根据 OD 值,使用乳酸浓度试剂盒标样绘制的标准曲线检测出乳酸浓度。

1.7 ELISA 法测定 IFN- γ 与 IL-4 水平 根据 ELISA 试剂盒(美国 RD 公司)说明书操作检测。① 使用试剂盒中的标样配置 IFN- γ 与 IL-4 的标样,形成浓度梯度,作为样品参照;② 待测样品用去离子水稀释 10 倍,避免超过测量范围;③ 按说明书操作加样,清洗,显色;④ 使用酶标仪在 450 nm 处读出结果数值。

1.8 统计学处理 数据通过 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,每组实验重复 3 次。组间比较采用 *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Graph-pad prism 8 进行统计定量图绘制。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测 HK2 转录水平 与阴性对照细胞(NC)相比,使用针对 HK2 基因的 shRNA 作用于 PC3 细胞后产生的实验组细胞(sh-HK2)转录的 HK2 基因 mRNA 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 Western blot 法检测 HK2 蛋白表达水平 与阴性对照细胞(NC)相比,使用针对 HK2 基因的 shRNA 作用于 PC3 细胞后产生的实验组细胞(sh-HK2)表达的 HK2 蛋白显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 糖酵解乳酸检测 使用共培养体系建立 48 h 后培养上清液检测乳酸浓度,在 TH1 共培养体系中,与 TH1 NC 组相比,TH1 sh-HK2 组中乳酸含量

显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 16.17$), 见图 3A。在 TH2 共培养体系中, 与 TH2 NC 组相比, TH2 sh-HK2 组中乳酸含量显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 15.95$), 见图 3B。

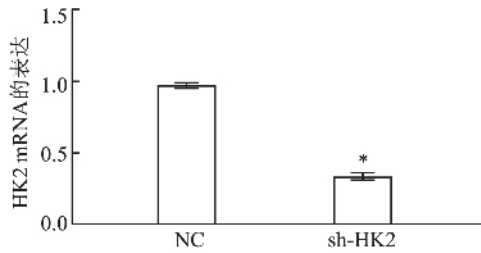


图1 RT-qPCR 测定 HK2 基因 mRNA 表达
与 NC 比较: * $P < 0.05$

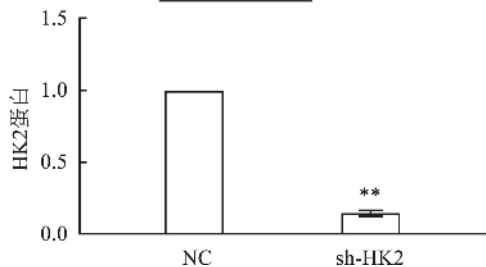
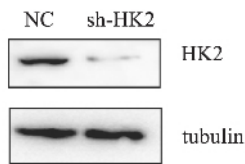


图2 Western blot 法测定 HK2 蛋白表达
与 NC 比较: ** $P < 0.01$

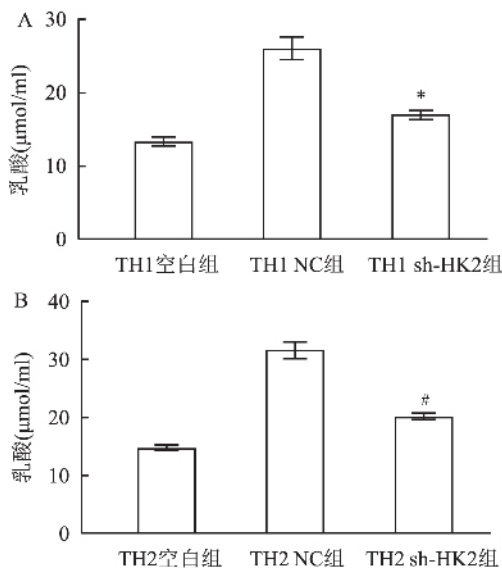


图3 TH1、TH2 共培养体系中各组乳酸含量

A: TH1 共培养体系中各组乳酸含量; 与 TH1 NC 组比较: * $P < 0.05$; B: TH2 共培养体系中各组乳酸含量; 与 TH2 NC 组比较: # $P < 0.05$

在 TH1 共培养体系中, 与 TH1 NC 组相比, TH1 sh-HK2 组中每 10^5 个 PC3 细胞产生的乳酸改变显著降低, 说明共培养体系中乳酸改变是由于 PC3 细胞产酸能力差别导致的, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 21.54$), 见图 4A。在 TH2 共培养体系中, 与 TH2 NC 组相比, TH2 sh-HK2 组中每 10^5 个 PC3 细胞产生的乳酸改变显著降低, 说明共培养体系中乳酸改变是由于 PC3 细胞产酸能力差别导致的, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 31.20$), 见图 4B。

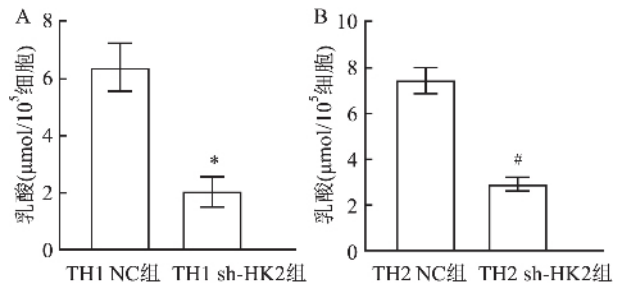


图4 TH1、TH2 共培养体系中每 10^5 个 PC3 细胞数导致的乳酸改变

A: TH1 共培养体系中每 10^5 个 PC3 细胞导致的乳酸改变; 与 TH1 NC 组比较: * $P < 0.05$; B: TH2 共培养体系中每 10^5 个 PC3 细胞导致的乳酸改变; 与 TH2 NC 组比较: # $P < 0.05$

2.4 TH1 共培养体系中 PBMCs 产生 IFN- γ 的能力 在 TH1 空白组、TH1 NC 组、TH1 sh-HK2 组中, 共培养完毕后分离提取 PBMCs, 使用 PHA-M 另外培养 24 h 后分离上清液测 IFN- γ 的浓度, 结果显示相比于 TH1 NC 组, TH1 sh-HK2 组中 PBMCs 产生 IFN- γ 能力显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 10.13$), 见图 5。

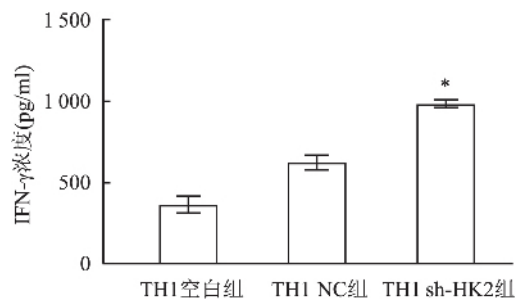


图5 TH1 共培养体系中 PBMCs 产生 IFN- γ 的能力
与 TH1 NC 组比较: * $P < 0.05$

2.5 TH2 共培养体系中 PBMCs 产生 IL-4 的能力 在 TH2 空白组、TH2 NC 组、TH2 sh-HK2 组中, 共培养完毕后分离提取 PBMCs, 使用 PHA-M 另外培养 24 h 后分离上清液测 IL-4 的浓度, 结果显示相比

于 TH2 NC 组, TH2 sh-HK2 组中 PBMCs 产生 IL-4 能力显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $t = 6.511$), 见图 6。

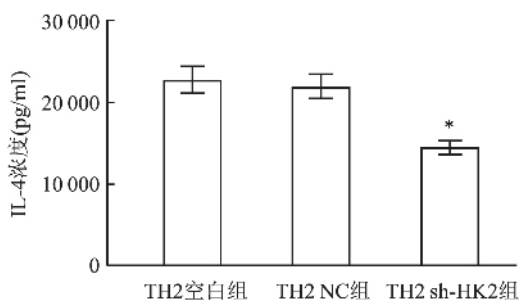


图 6 TH2 共培养体系中 PBMCs 产生 IL-4 的能力与 TH2 NC 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

恶性肿瘤细胞基因改变的一个表现即代谢程序的重新编程。在正常细胞中, 常氧状态下, 葡萄糖经过糖酵解途径和三羧酸循环 (TCA) 彻底氧化分解成水和二氧化碳, 并大量生成 ATP 为细胞供能。而在肿瘤细胞中, 为了满足肿瘤大量增殖的需求同时又要面对肿瘤生长过程中遇见的各种不利因素, 肿瘤更倾向于进行有氧糖酵解过程, 即葡萄糖最终生成乳酸过程中同时生成少量 ATP。糖酵解过程中有三个关键酶: 己糖激酶 (HK)、6-磷酸果糖激酶 1 (PF1) 和丙酮酸激酶 (PK), HK2 又因为其极低的米氏常数, 兼备更加强大的葡萄糖摄取能力, 增加了进入有氧糖酵解过程的葡萄糖量, 使有氧糖酵解过程中生成的生物大分子物质用于肿瘤细胞增殖生长, 这就是 Warburg 效应^[4]。同时多项研究^[5-7]显示: 恶性肿瘤细胞中 (包括前列腺癌) HK2 基因高表达并且其与肿瘤恶性度高度相关。相应的肿瘤细胞的代谢改变也将导致肿瘤周围免疫细胞代谢及表型改变^[8]。研究发现即使肿瘤细胞抗原性强度足够的情况下, 若周围 T 淋巴细胞葡萄糖摄取不足依然将导致 T 淋巴细胞激活抑制, 肿瘤细胞对肿瘤微环境中葡萄糖的大量摄取可以抑制周围 T 淋巴细胞的糖酵解能力, mTOR 活性和 IFN- γ 的产生^[9-10], 同时产生的高乳酸水平也将使肿瘤周围 T 细胞分泌 IFN- γ 下降及凋亡诱导^[2, 11]。可见乳酸是可以作为一个肿瘤增殖的提示因子, 特别是在肿瘤对周围免疫细胞影响的方面上。

TH1 作为辅助性 CD4 + T 细胞, 其分泌的 IFN- γ 是肿瘤细胞免疫的关键细胞因子, 最终参与促进

效应 CD8 + T 细胞活化与功能完全^[12], 甚至能直接抑制肿瘤细胞增殖^[13]。TH2 同样作为辅助性 CD4 + T 细胞, 其主要功能是促进体液免疫及炎症, 其分泌的 IL-4 更是有抑制 TH0 细胞向 TH1 方向分化的作用^[14], 同时在肿瘤周围酸性环境中, 因为 TH2 细胞功能增强, 将导致 TH1 细胞功能相对下降, 最终导致针对肿瘤的细胞免疫功能下降, 进而导致肿瘤进展。

本实验乳酸检测结果显示 HK2 基因受到抑制后, 其产酸能力下降, 同时 TH1 共培养体系中, IFN- γ 浓度升高, TH2 共培养体系中 IL-4 浓度降低, 表示 HK2 抑制后, TH1 由于低酸环境与葡萄糖摄取相对增多导致分泌 IFN- γ 增多, 可以推断针对肿瘤细胞免疫功能将增强, 后期 CD8 + T 效应细胞、NK 细胞活化增多, 同时 CD8 + T 效应细胞、NK 细胞也分泌 IFN- γ , 将参与针对肿瘤的细胞免疫的维持与扩大化。IL-4 浓度降低说明肿瘤细胞周围针对肿瘤无用的体液免疫与促炎反应减少, 同时也减弱了 IL-4 抑制 TH1 活化的功能, 使更多的参与细胞免疫的效应细胞活化。从侧面说明 HK2 抑制后针对肿瘤细胞免疫将增强。实验结果支持前列腺恶性肿瘤中高表达的 HK2 基因导致 TH1 细胞分泌 IFN- γ 下降和 TH2 细胞分泌 IL-4 上升, 进而抑制抗肿瘤细胞免疫功能。说明在前列腺癌的免疫治疗方面, HK2 基因是可以作为一个潜在的治疗靶点, 它可以改善肿瘤周围免疫微环境中免疫细胞的供能, 减轻肿瘤酸性环境对免疫细胞的抑制作用, 增强肿瘤免疫疗法的疗效。

参考文献

- [1] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. Science 2009, 324(5930): 1029-33.
- [2] Brand A, Singer K, Koehl G E, et al. LDHA-associated lactic acid production blunts tumor immunosurveillance by T and NK cells [J]. Cell Metab 2016, 24(5): 657-71.
- [3] Bačić A, Prgomc D, Janjanin S. Tonsil-derived mesenchymal stem cells exert immunosuppressive effects on T cells [J]. Croat Med J, 2019, 60(1): 12-9.
- [4] Hsu P P, Sabatini D M. Cancer cell metabolism: warburg and beyond [J]. Cell 2008, 134(5): 703-7.
- [5] Pedersen P L, Mathupala S, Rempel A, et al. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention [J]. Biochim Biophys Acta 2002, 1555(1-3): 14-20.
- [6] Mathupala S P, Ko Y H, Pedersen P L. Hexokinase II: cancer's

- double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria [J]. *Oncogene* ,2006 ,25 (34) : 4777 -86.
- [7] 陶陶,沈洲,项平等. HK2 基因在前列腺癌中的表达及其对前列腺癌细胞恶性表型的影响[J]. *临床与实验病理学杂志* 2017 ,33(2) : 149 -52.
- [8] Pavlova N N ,Thompson C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. *Cell Metab* 2016 ,23(1) : 27 -47.
- [9] Chang C H ,Qiu J ,O'sullivan D , et al. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression [J]. *Cell* ,2015 ,162(6) : 1229 -41.
- [10] Palmer C S ,Ostrowski M ,Balderson B , et al. Glucose metabolism regulates T cell activation , differentiation , and functions [J]. *Front Immunol* 2015 ,6(1) : 1 -6.
- [11] Ho P C ,Bihuniak J D ,Macintyre A N , et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses [J]. *Cell* 2015 ,162(6) : 1217 -28.
- [12] Curtsinger J M ,Agarwal P ,Lins D C , et al. Autocrine IFN- γ promotes naive CD8 T cell differentiation and synergizes with IFN- α to stimulate strong function [J]. *J Immunol* 2012 ,189 (2) : 659 -68.
- [13] Kakuta S ,Tagawa Y ,Shibata S , et al. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- γ through direct inhibition of cell proliferation and activation of antitumor host mechanisms [J]. *Immunology* 2002 ,105(1) : 92 -100.
- [14] Nishio M ,Urakawa N ,Shigeoka M , et al. Software-assisted morphometric and phenotype analyses of human peripheral blood monocyte-derived macrophages induced by a microenvironment model of human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Pathol Int* , 2016 ,66(2) : 83 -93.

The impact of hexokinase-2 gene of human prostate cancer on T help 1/T help 2 cell

Li Bin ,Tao Tao ,Shen Deyun ,et al

(Dept of Urology ,The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230001)

Abstract Objective To study the impact of high expression level of HK2 gene in human prostate cancer on T help 1/T help 2 ,which are co-cultured with human prostate cancer (PC3 cell line) . **Methods** shRNA was used to construct a stable transgenic cells (sh-HK2) of PC3 cell line with shRNA-infected PC3 cell line induced by lentivirus infection ,nonsense sequences was used to construct lentivirus ,PC3 cell line was infected to obtain negative control cells (NC) ,then the result of knocking down was inspected through qPCR and Western blot. Isolated cancer cells to obtain supernatant after culturing PC3 cells(NC and sh-HK2) for 48 hours. Human peripheral blood mononuclear cells(PBMCs) were extracted from healthy persons. TH1 blank group: PBMCs were cultured in 1640 medium for 48 h under TH1 induction conditions ,and TH1 experimental group (TH1 sh-HK2 group) : PBMCs were co-cultured for 48 h in TH1 induction conditions using the supernatant of the cultured stable transgenic cells. (TH1 NC group) : PBMCs were co-cultured for 48 h under the condition of TH1 induction using the supernatant of the cultured negative control cells. The induction conditions of the TH2 blank group ,the TH2 experimental group (TH2 sh-HK2 group) ,and the TH2 negative control group (TH2 NC group) were changed to TH2 induction conditions ,and the others were unchanged. After 48 hours ,the lactate level in each co-culture system was detected by a spectrophotometer. PBMCs were then extracted and cultured with phytohemagglutinin-M(PHA-M) for another 24 h ,then the secretion of IFN- γ of PBMCs in TH1 induction conditions and IL-4 of PBMCs in TH2 induction conditions were inspected through ELISA. **Results** qPCR and Western blot showed that HK2 gene knockdown was significant. In TH1 experimental group of TH1-inducing conditions ,the secretion of IFN- γ of PBMCs raised. In TH2 experimental group of TH2-inducing conditions ,the secretion of IL-4 of PBMCs decreased. The level of lactic acid in sh-HK2 group declined compared with NC group . **Conclusion** The high expression level of HK2 gene in PC3 cell line enhances lactic acid in tumor environment. At the same time ,it decreases the secretion of IFN- γ and enhances the secretion of IL-4 ,which leads to weak cellular immune function ,therefore humoral immunity that invalid for tumor immunity is enhanced ,resulting in the progress of tumor.

Key words hexokinase-2; prostate cancer; human peripheral blood mononuclear cells; TH1/TH2 cell; co-culture; IFN- γ ; IL-4