文章编号:1000-5404(2010)03-0257-04

论著

丙酮酸脱氢酶激酶-1 在人结肠癌中的表达及意义

童晶涛,梁后杰,陈建芳,江 恒,谢赣丰,刘 平 (400038 重庆,第三军医大学西南医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 检测丙酮酸脱氢酶激酶-I(pyruvate dehydrogenase kinase-I,PDK1)在人结肠癌组织和细胞中的表达。探讨抑制 PDK1 对结肠癌细胞活性的影响。**方法** 应用 RT-PCR、荧光定量 PCR 和免疫荧光法、Western blot 检测结肠癌组织、癌旁组织以及 4 种人结肠癌细胞 PDK1 基因的表达情况。在 PDK1 抑制剂(dichloroacetate ,DCA)的诱导下,通过 MTT 法观察结肠癌细胞活性。**结果** PDK1 基因在结肠癌组织中表达较癌旁组织中高;在 4 种人结肠癌细胞中明显表达。抑制 PDK1 能抑制结肠癌细胞增殖活性,抑制效应随药物浓度而递增,其中 90 mmol/L DCA 的活性细胞率分别为(23.90 ± 2.79)%、(5.90 ± 1.31)%、(32.82 ± 4.50)%和(29.72 ± 3.03)%。**结论** PDK1 基因在结肠癌组织和细胞中高表达,在癌旁组织中低表达,抑制 PDK1 明显抑制结肠癌细胞增殖活性,PDK1 可望成为结肠癌有效治疗靶点。

[关键词] 结肠肿瘤;糖原酵解;丙酮酸脱氢酶激酶-1
[中图法分类号] R735.3; R345.5; R730.23 **[文献标志码]** A

Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-Ⅰ in human colon cancer and its significance

Tong Jingtao, Liang Houjie, Chen Jianfang, Jiang Heng, Xie Ganfeng, Liu Ping (Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To detect the expression of pyruvate dehydrogenase kinase-I (PDK1) in human colon cancer tissue and cells and to study the effect of PDK1 on colon cancer cell activity. **Methods** Expression of PDK1 in human colon cancer tissue and its adjacent tissue and 4 PDK1 genes in human colon cancer cells was detected by RT-PCR, fluorescence quantitative PCR, immunofluorescence and Western blotting, respectively. Colon cancer cell activity induced by dichloroacetate (DCA), a PDK1 specific inhibitor, was measured by MTT. **Results** The expression level of PDK1 gene was higher in colon cancer tissue than in its adjacent tissue. The 4 PDK1 genes were significantly expressed in human colon cancer cells. DCA inhibited the proliferation activity of colon cancer cells by suppressing PDK1 in a concentration-dependent manner. The activity rate of 90 mmol/L DCA for colon cancer cells was (23.90 ± 2.79)%, (5.90 ± 1.31)%, (32.82 ± 4.50)% and (29.72 ± 3.03)%, respectively. **Conclusion** The expression level of PDK1 gene is high in colon cancer tissue and cells, and low in its adjacent tissue. DCA can suppress the proliferation activity of colon cancer cells by inhibiting PDK1, thus PDK1 may become an effective target in therapy for colon cancer.

[Key words] colon tumor; glycolysis; pyruvate dehydrogenase kinase-I

Corresponding author: Liang Houjie, Tel: 86-23-68754128, E-mail: lianghoujie@sina.com

生物能量代谢有别于正常组织细胞是肿瘤细胞的一大生物学特点,长期处于缺氧状态中的肿瘤细胞习惯于主要通过糖酵解获能,即使在有氧情况下也是如此,这就是所谓的 Warburg 效应[1,2]。丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)是糖酵解的关键限速酶,而 PDH 的活性受丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinases, PDKs)调控[3]。抑制 PDK 的表达而增高 PDH 的活性就能进入有氧氧化途径从而切断肿瘤细胞获能的主要方式,增加的氧耗继而促进了细胞的凋亡。PDKs 的 4 个成员中 PDK1 的组织分布相对局限,表达量较低,与缺氧相关因子 HIF-1α 的关系最密切[4];同时有关研究表明 DCA 抑制 PDK1 有肿瘤特异性[5]。为此,我们检测了人结肠癌组织和癌旁组织及细胞中 PDK1 的表达情况,并探讨抑制 PDK1 对结肠癌细胞活性的影响,以期为临床治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 标本

收集本院手术切除获得的结肠组织 20 例(经病理证实其

[通信作者] 梁后杰,电话:(023)68754128,E-mail:lianghoujie@sina.com

中20例均为结肠腺癌)。标本选取包括肿瘤原发病灶和癌旁正常组织(作为对照组)各50~100 mg,加入1 ml Trizol,冻存于-70℃冰箱备用。Dukes分期依据病理报告和外科病史资料。

1.2 主要试剂

DMEM细胞培养液和优级胎牛血清(Gibco公司),PBS粉(北京中杉金桥公司),胰蛋白酶、EDTA和DMSO(Amresco公司),PDK1特异性抑制剂-肝乐(dichloroacetate,DCA)(Sigma公司),二甲基四氮唑蓝(MTT)(上海博鑫公司),免疫组化S-P 9002试剂盒(中杉公司),PDK1单克隆抗体(艾必康公司),羊抗兔FITC标记单克隆抗体(Santa Cruz公司),奥沙利铂(L-OHP)(江苏恒瑞医药股份有限公司),五氟尿嘧啶(5-FU)(江苏同泰药业有限公司),Trizol细胞裂解液(碧云天公司),SYBR Green Realtime PCR Master Mix(东洋纺)RIPA裂解液(碧云天公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人结肠癌细胞株LOVO、HT-29、SW620、LS 174T为本室传代保存。用含10%新生小牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素的高糖DMEM,于37 ℃、5% CO_2饱和湿度的培养箱中培养。2~3 d换液1次,用0.25%胰酶消化传代。实验选用对数生长期细胞。

1.3.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时PCR(Realtime PCR) 按Trizol试剂说明提取组织、细胞总RNA,取2 μg RNA合成cDNA。根据GenBank提供的PDK1序列设计合成引物。上游引物:5′-AAGATGAGTGACCGAGGAGGT-3′,下游引物:5′-CCATAACCAAAACCAGCCAGAG-3′,产物长度131 bp。PCR反应条件:94 ℃预变性5 min;94 ℃ 1 min;62 ℃ 30 s;72 ℃ 1 min,30个循环;72 ℃延伸10 min。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。以β-actin为内参照。实时荧光定量PCR反应:SYBR反应体系共20 μl。反应条件为94 ℃ 2 min,95 ℃ 45 s,62 ℃ 35 s,75 ℃ 45 s,40个循环,设空白对照。PCR反应前3~15个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适宜处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为Ct值。根据ΔCt = PDK1(Mean Ct) - 参照基因GAPDH(Mean Ct),ΔΔCt = $\Delta Ct_{目的基因} - \Delta Ct_{GAPDH}$,利用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算检测基因mRNA相对表达差异,每组重复3次取平均值。

1.3.3 免疫荧光法 取手术中结肠癌标本并制作冰冻组织切片,或将1×10^4个/ml结肠癌细胞接种于放置无菌盖玻片的24孔板中,培养48 h。4%多聚甲醛固定30 min,PBS漂洗5 min×3次后,3% H_2O_2 37 ℃孵育10 min,PBS漂洗5 min×3次,用5%正常羊血清封闭10 min,与一抗(PDK1抗体为1∶500)于4 ℃孵育过夜。PBS漂洗5 min×3次,滴加二抗(FITC标记山羊抗兔IgG为1∶100)室温孵育30 min,Hoechst(1∶1 000)标记细胞核,室温避光孵育20 min,PBS漂洗5 min×3次。在切片上滴加适量的50%甘油,封片,激光共聚焦显微镜下观察照相。

1.3.4 Western blot 用放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay,RIPA)裂解液提取结肠癌组织、癌旁组织、LOVO、HT-29、SW620、LS 174T细胞总蛋白。Bradford法测定蛋白浓度。每孔上样30 μg蛋白,10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜。抗PDK1一抗(1∶2 000)4 ℃孵育过夜。辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1∶2 000)室温孵育1 h。显色拍照。

1.3.5 MTT法检测细胞活性 调整细胞浓度为1×10^4个/ml,加入96孔培养板中,每孔100 μl,培养24 h。加入不同浓度药物各100 μl,每组设5个复孔,继续培养48 h。加20 μl孔MTT液(5 mg/ml),4 h后小心吸去培养基,每孔加150 μl二甲亚枫(DMSO)。Model550酶标仪在490 nm下测得光密度值[D(490)值],计算药物的活性细胞率:活性细胞率(%) = 平均D(490)值$_{实验孔}$/平均D(490)值$_{对照孔}\times100\%$。

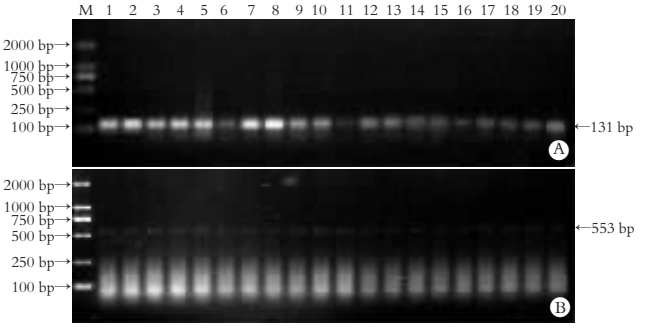
1.4 统计学处理

应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,数据用$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用独立样本t检验,3组以上检验进行单因素方差分析。

2 结果

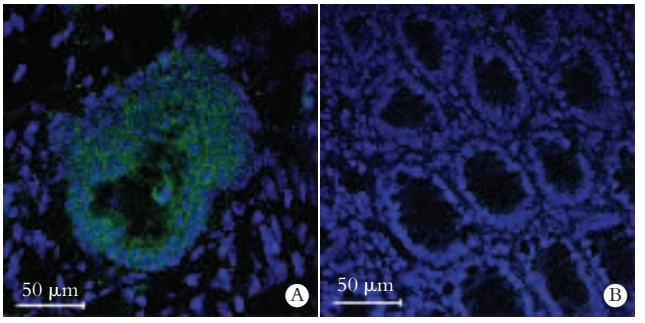
2.1 结肠癌组织与癌旁组织PDK1 mRNA与蛋白的表达

RT-PCR检测显示,PDK1 mRNA在20例结肠癌组织中明显表达,而在20例癌旁组织中表达较弱(图1);免疫荧光法、Western blot显示PDK1蛋白在结肠癌组织中表达也很明显,而在癌旁组织中表达不明显(图2、3);荧光定量PCR的结果显示:结肠癌组织PDK1 mRNA ΔCt = 6.726,癌旁组织PDK1 mRNA ΔCt = 8.353,$\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct} = 3.089$,说明结肠癌组织PDK1 mRNA表达水平比癌旁组织PDK1mRNA表达水平高3.089倍。



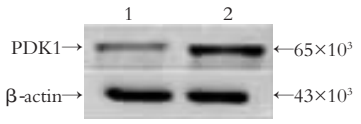
M:标准;1~10:癌旁组织;11~20:结肠癌组织
A:PDK1基因;B:β-actin

图1 RT-PCR法扩增20例人结肠癌组织及癌旁组织PDK1基因的琼脂糖凝胶电泳结果



A:PDK1蛋白在结肠癌组织中的表达;B:PDK1蛋白在癌旁组织中的表达

图2 激光共聚焦显微镜观察人结肠癌组织及癌旁组织PDK1蛋白表达

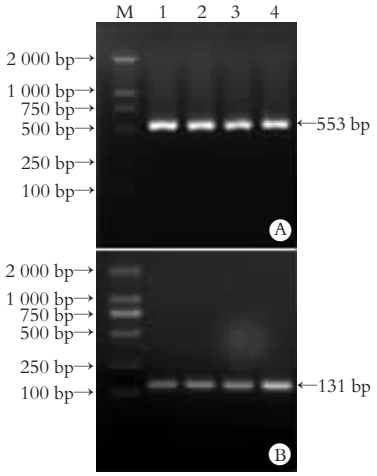


1:结肠癌癌旁组织;2:结肠癌组织

图 3 Western blot 检测人结肠癌组织及癌旁组织 PDK1 蛋白表达

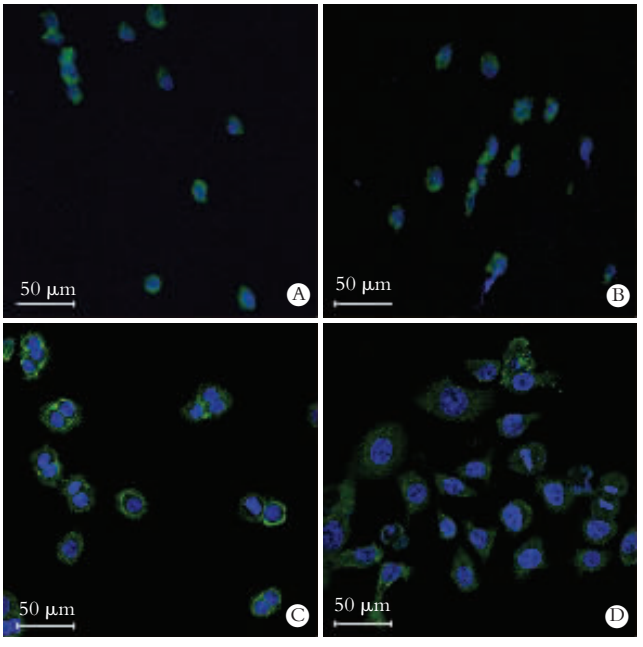
2.2 结肠癌细胞 PDK1 mRNA 与蛋白的表达

RT-PCR 显示 PDK1 mRNA 在结肠癌细胞株 LOVO、HT-29、SW620、LS 174T 中高表达(图 4);免疫荧光法显示 PDK1 蛋白在结肠癌细胞株 LOVO、HT-29、SW620、LS 174T 中明显表达(图 5);Western blot 显示 PDK1 蛋白在结肠癌细胞株 LOVO、HT-29、SW620、LS 174T 中表达明显(图 6)。



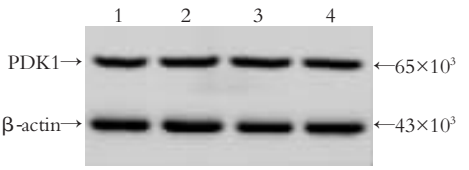
M:标准;1:HT-29 细胞;2:SW620 细胞;3:LS 174T 细胞;4:LOVO 细胞
A:PDK1 基因;B:β-actin

图 4 RT-PCR 法扩增 4 种结肠癌细胞 PDK1 基因的琼脂糖凝胶电泳结果



A:PDK1 蛋白在 LS 174T 细胞中的表达;B: PDK1 蛋白在 SW620 细胞中的表达;C: PDK1 蛋白在 HT-29 细胞中的表达;D: PDK1 蛋白在 LOVO 细胞中的表达

图 5 观察 4 种人结肠癌细胞 PDK1 蛋白表达

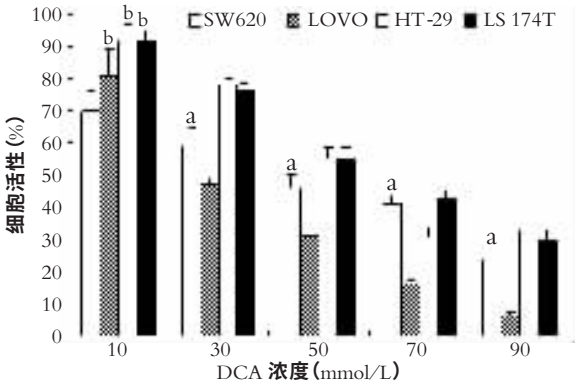


1:LOVO 细胞;2:SW620 细胞;3:HT-29 细胞;4:LS 174T 细胞

图 6 Western blot 检测 4 种人结肠癌细胞 PDK1 蛋白表达

2.3 抑制 PDK1 对结肠癌细胞增殖活力的影响

不同浓度的 DCA 分别作用细胞 48 h,细胞增殖活性受到明显抑制,抑制效应随药物浓度而递增,其中 90 mmol/L DCA 的活性细胞率分别为(23.90 ± 2.79)%、(5.90 ± 1.31)%、(32.82 ±4.50)%和(29.72 ±3.03)%。见图 7。



a:$P<0.05$,与 10 mmol/L 时 SW620 细胞活性比较;b:$P<0.05$,与 SW620 10 mmol/L 时比较

图 7 MTT 法检测不同浓度 DCA 对 4 种结肠癌细胞活性的抑制

3 讨论

结肠癌是一种常见的消化道肿瘤,除早期可手术切除外,化疗是结肠癌最重要的治疗手段。但目前结肠癌化疗敏感性低,治疗效果较差[6]。如何提高结肠癌的治疗效果是目前一项重要的任务。研究已经证实肿瘤细胞主要是靠糖酵解来获取能量的,这一现象也被称为 Warburg 效应[1,2]。Warburg 效应产生的机制可能有以下几个方面:线粒体 DNA 突变和丢失;核 DNA 突变或非正常基因的表达;癌基因的转化;肿瘤微环境的影响[2]。针对 Warburg 效应,一旦抑制糖酵解的进行,则切断了肿瘤获能的主要方式,可能导致肿瘤细胞的死亡。因此,利用糖酵解的相关因子治疗肿瘤越来越被人们所重视[7,8]。

目前已知人类和哺乳动物中 PDKs 有 4 种同工酶,即 PDK-1、PDK-2、PDK-3 和 PDK-4。其中 PDK1 在体内分布相对较局限,主要分布在心脏中,表达量较低[9]。且研究表明 PDK1 是受缺氧诱导因子 HIF1α 调控的靶点蛋白之一,与肿瘤细胞的缺氧密切相关[10,11]。我们比较了癌旁组织和结肠癌组织中 PDK1

的表达,发现结肠癌组织中 PDK1 的表达十分明显;同时我们还检测了分化程度不同的 4 种结肠癌细胞,同样为阳性表达。有关临床研究发现结肠癌中糖酵解十分活跃[12]。PDK1 的高表达可能是引起结肠癌糖酵解活跃的原因之一。

DCA(肝乐)是 PDK 特异性阻断剂,它能与 ADP 协同作用于 PDK,从而对 PDK 产生抑制作用,目前作用机制尚不明确[13]。DCA 抑制 PDK 后影响 PDH 使糖代谢朝着有氧氧化的方向进行,减少了体内乳酸的形成,因此 DCA 以往主要是用来治疗乳酸堆积症等疾病[14]。目前的研究证实 DCA 在肺癌、乳腺癌子宫内膜癌等中能抑制肿瘤细胞的增殖,对正常组织没有副作用,具有肿瘤特异性[9,15]。我们在实验中也发现 DCA 能抑制不同分化程度的结肠癌细胞的增殖活性,而且这一作用是随着药物浓度的增加而增大的。

PDK1 在癌旁组织中表达很少,抑制 PDK1 能明显控制结肠癌细胞的活性,这可能是 DCA 抑制结肠癌细胞的增殖引起的,这为目前疗效较差的结肠癌治疗提供了一个新的靶点,也提供了一个值得探索的方向。

参考文献:

[1] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. Science, 1956, 123(3191): 309-314.

[2] Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, *et al*. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(3): 267-274.

[3] Kim J W, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect[J]. Cancer Res , 2006, 66(18): 8927-8930.

[4] 营记涌, 张勇, 朱大海. 丙酮酸脱氢酶激酶的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2008, 28(11): 1212-1215.

[5] Michelakis E D, Webster L, Mackey J R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 99(7): 989-994.

[6] Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, *et al*. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 350(23): 2343-2351.

[7] Pelicano H, Martin D S, Xu R H, *et al*. Glycolysis inhibition for anticancer treatment[J]. Oncogene, 2006, 25(34): 4633-4646.

[8] Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, *et al*. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications[J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(3): 267-274.

[9] Bonnet S, Archer S L, Allalunis-Turner J, *et al*. A mitochondria-K^+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth[J]. Cancer Cell, 2007, 11(1): 37-51.

[10] Lu C W, Lin S C, Chen K F, *et al*. Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance[J]. J Biol Chem, 2008, 283(42): 28106-28114.

[11] Kim J W, Tchernyshyov I, Semenza G L, *et al*. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia[J]. Cell Metab, 2006, 3(3): 177-185.

[12] Altenberg B, Greulich K O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes[J]. Genomics, 2004, 84(6): 1014-1020.

[13] Kato M, Li J, Chuang J L, *et al*. Distinct structural mechanisms for inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms by AZD7545, dichloroacetate, and radicicol[J]. Structure, 2007, 15(8): 992-1004.

[14] Stacpoole P W, Nagaraja N V, Hutson A D. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug[J]. J Clin Pharmacol, 2003, 43(7): 683-691.

[15] Wong J Y, Huggins G S, Debidda M, *et al*. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(3): 394-402.

(**收稿**:2009-07-10;**修回**:2009-10-28)

(编辑 吴培红)

欢迎订阅《局解手术学杂志》

由重庆市科学技术协会主管,重庆市解剖学会和第三军医大学主办,第三军医大学局部解剖手术学教研室承办的《局解手术学杂志》是全国唯一的局部解剖学与临床外科手术学相结合的杂志,1992 年 10 月创刊,ISSN 1672-5042、CN 50-1162/R,双月刊。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《万方数据-数字化期刊群》收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国期刊全文数据库全文收录期刊,中国学术期刊(光盘版)入编期刊。

主要刊登人体解剖学、局部解剖学、应用解剖学、断层解剖学、外科手术学、外科基础理论、外科实验研究及临床研究的科研论著、文献综述、高教研究、新科技进展等。主要栏目:专家述评、科研论著、教学研究、经验交流、综述与讲座、短篇与个案等。本刊稿件刊出周期短,大 16 开,72 页,彩色铜版纸印刷,每逢双月的 25 日出版,每册定价 12.00 元,全年 72.00 元(含邮资费)。

地 址:重庆市沙坪坝区高滩岩正街 30 号第三军医大学《局解手术学杂志》编辑部 **邮 编**:400038

联系人:左艳芳 **电 话**:(023)68752649,68752251

网 址:www.JRAOS.com.cn **电子邮件**:jjssxzz@yahoo.com.cn;guogjin@yahoo.com.cn