DOI:10.16016/j.1000-5404.201507152

3-溴丙酮酸联合顺铂抑制肺癌细胞株 A549 的生长

张梦娇[1],张 明[2],胡义德[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肿瘤科[1];646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院呼吸内二科[2])

[摘要] **目的** 探讨3-溴丙酮酸(3-bromopyruvate,3-BrPA)联合顺铂体外抗肺癌 A549 细胞的作用及其可能机制。**方法** 采用 CCK-8 检测不同浓度的 3-BrPA、顺铂单用及联用对 A549 细胞的增殖抑制;选择低于半数抑制浓度(IC_{50})的 40 μmol/L 3-BrPA 与 1 mg/L 顺铂单独和联合作用 A549 细胞 48 h 后,用倒置相差显微镜观察细胞形态变化,流式细胞术检测细胞凋亡;不同浓度的 3-BrPA 作用 A549 细胞 48 h 后,流式细胞术检测细胞周期变化,己糖激酶(hexokinase,HK)活性检测试剂盒检测 3-BrPA 对细胞内 HK 活性的影响。**结果** CCK-8 结果显示,与阴性对照组比较,3-BrPA 浓度大于 20 μmol/L 时对 A549 细胞有明显抑制作用($P<0.01$),与单用顺铂组比较,3-BrPA 联合顺铂组可显著增强顺铂对 A549 细胞的毒性作用($P<0.01$);3-BrPA 作用 A549 细胞 48 h 后,倒置显微镜观察到 3-BrPA 组大多数细胞出现凋亡,而联合用药组细胞凋亡更加明显,部分区域出现细胞碎片等坏死征象;流式细胞术结果显示,3-BrPA 和顺铂单用组及联合用药组细胞凋亡率均明显高于阴性对照组($P<0.01$),且联合用药组细胞凋亡率明显高于单独用药组($P<0.01$);细胞周期检测结果显示 3-BrPA 可将 A549 细胞阻滞于 G_1 期;HK 活性结果显示:与阴性对照组比较,3-BrPA 组 HK 活性明显降低($P<0.01$)。**结论** 3-BrPA 有抑制肺癌 A549 细胞增殖、诱导其凋亡的作用,且与顺铂具有协同抗肺癌 A549 细胞增殖作用,其机制可能为抑制肺癌细胞糖酵解,进而影响肺癌细胞能量代谢。

[关键词] 肺癌;3-溴丙酮酸;顺铂;糖酵解;己糖激酶
[中图法分类号] R73-361;R734.2;R979.1 [文献标志码] A

Effect of 3-bromopyruvate combined with cisplatin on inhibiting growth of lung cancer A549 cells

Zhang Mengjiao[1], Zhang Ming[2], Hu Yide[1] ([1]Department of Oncology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Second Department of Respiratory Medicine, First Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of glycolytic inhibitor 3-bromopyruvate (3-BrPA) combined with cisplatin on inhibiting lung cancer A549 cells and its possible mechanism. **Methods** The cell proliferation of A549 cell streated with different concentrations of 3-BrPA and/or cisplatin was detected by CCK-8 assay. 3-BrPA with concentration of 40 μmol/L, which is lower than the median inhibitory concentration (IC_{50}), was selected to combine with cisplatin (1 mg/L) to treat A549 cells. Then, an inverted microscope was used to observe the morphological changes of A549 cells, and flow cytometry was used to detect apoptosis. The A549 cells were treated with different concentrations of 3-BrPA, and then flow cytometry was adopted to detect the changes of cell cycle. The intracellular hexokinase activity was detected with hexokinase activity assay kit. **Results** Compared with the control group, 3-BrPA with concentration higher than 20 μmol/L showed significantly inhibitory effect on A549 cells ($P<0.01$). Compared with cisplatin alone, 3-BrPA in combination with cisplatin significantly enhanced the toxic effect of cisplatin on A549 cells ($P<0.01$). After A549 cells were treated with 3-BrPA for 48 h, the morphological changes of cell apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372340)
[通信作者] 胡义德,E-mail:huyide_mit@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160106.1539.001.html(2016-01-06)

were observed. The combination group showed more obvious morphological changes, and some cells showed signs of necrosis. Flow cytometry indicated that compared with the control group, the apoptotic rates of the 3-BrPA alone group, cisplatin alone group and combination group were significantly higher ($P<0.01$). The apoptotic rates of the 3-BrPA along group and cisplatin alone group were significantly lower than that of the combination group ($P<0.01$). The cell cycle assay results showed that 3-BrPA arrested A549 cells at G_1 phase. Hexokinase activity test showed that compared with the control group, the hexokinase activity of 3-BrPA group was significantly lower ($P<0.01$). **Conclusion** 3-BrPA can inhibit the proliferation of A549 cells and induce apoptosis, and its combination with cisplatin shows better effect than single treatment, indicating that 3-BrPA has chemotherapy sensitizing effect. The mechanism may be related with inhibiting cancer cell glycolysis, and thus affecting the cancer cell energy metabolism.

[**Key words**] lung cancer; 3-bromopyruvate; cisplatine; glycolysis; hexokinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372340). Corresponding author: Hu Yide, E-mail: huyide_mit@yahoo.com.cn

能量代谢异常是肺癌的重要特点之一,Warburg效应在其中起到重要作用。Warburg效应可为恶性肿瘤细胞生长提供充足的能量和原料,对于恶性肿瘤的浸润和转移有着至关重要的作用[1-2]。HK-2糖酵解途径中的第一个关键酶,国内外研究发现其在多种恶性肿瘤细胞中有高表达[3-6]。3-BrPA是强烷化剂,可抑制HK-Ⅱ活性而导致糖酵解不能顺利完成。近来大量研究表明体外3-BrPA可杀死多种肿瘤细胞,体内3-BrPA能抑制恶性肿瘤细胞种植瘤的生长,而对重要脏器功能无明显影响[6-8]。然而目前3-BrPA对肺癌作用的研究较少,其作用机制也不清楚。因此,本研究通过观察3-BrPA及联合顺铂对肺癌细胞A549的影响,探讨3-BrPA对肺癌细胞的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RPMI1640培养基、DMEM培养基、青霉素链霉素溶液-双抗、胰蛋白酶(HyClone公司),胎牛血清(杭州四季青公司),DMSO、3-BrPA(Sigma公司),顺铂(齐鲁医药),CCK8检测试剂盒(日本同仁研究所),己糖激酶试剂盒(南京建成生物工程研究所),BCA蛋白测定试剂盒(碧云天生物研究所),细胞凋亡及周期试剂盒(BD公司)。

1.2 细胞株

人肺腺癌A549细胞株由第三军医大学新桥医院全军肿瘤研究所提供;人胚成纤维细胞MRC-5由泸州医学院中心实验室赠送,分别用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素-链霉素的RPMI1640培养基和DMEM培养基,于饱和湿度、37 ℃、5% CO_2的培养箱中常规培养。

1.3 CCK-8检测细胞增殖抑制作用

按试剂盒的使用指南进行操作。取对数生长期的A549、MRC-5细胞,调整其浓度分别为3×10^4/mL和2.5×10^4/mL并种植到96孔板,加入含不同浓度3-BrPA(10、20、40、80、160 μmol/L)、顺铂(0.25、0.5、1、2、4 mg/L)和40 μmol/L的3-BrPA联合不同浓度的顺铂(0.25、0.5、1、2、4 μmol/L)的培养基200 μL,同时设置阴性对照组、空白对照组;加药24、48、72 h后更换培养基为90 μL无血清培养基和10 μL CCK-8继续培养1 h,用酶标仪测量波长450 nm处的光密度值[D(450)],计算细胞增殖抑制率。细胞生长抑制率=1-[实验组D(450)值-空白组D(450)值]/[对照组D(450)值-空白组D(450)值]×100%。

1.4 倒置相差显微镜观察各组A549细胞形态和流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的A549(1×10^5/mL)接种于6孔板,培养24 h后吸出孔内培养液,加入分别含3-BrPA(40 μmol/L)、顺铂(1 mg/L)和3-BrPA(40 μmol/L)联合顺铂(1 mg/L)的培养基2 mL,同时设置阴性对照组。继续培养48 h后,置于倒置相差显微镜下观察细胞形态。用不含EDTA的胰酶消化收集各组A549细胞,用预冷的PBS离心洗涤(1 000 r/min,10 min)后收集细胞,加入500 μL Binding Buffer重悬细胞,顺次加入5 μL的Annexin V-FITC和PI,混匀后避光室温反应15 min。流式细胞仪检测分析细胞凋亡率。

1.5 流式细胞术检测各组A549细胞周期与增殖指数

取对数生长期的A549(1×10^5/mL),加入含不同浓度3-BrPA(40、80、160 μmol/L)的培养基,培养48 h后终止,胰蛋白酶消化后收集细胞悬液,PBS离心洗涤后加入预冷的70%酒精4 ℃固定过夜。然后PBS离心洗涤并收集细胞,重悬于PBS,加入RNase-A于37 ℃水浴消化30 min后加入PI至终浓度为65 μg/mL,室温避光染色30 min后上机检测细胞周期并计算细

胞增殖指数。增殖指数=(S期百分比+G_2/M期百分比)/(G_0/G_1期百分比)。

1.6 己糖激酶活性测定

细胞分组、培养及收集同1.5。各组细胞中加入PBS后混匀,冰水浴上超声波破碎细胞,破碎好的细胞悬液直接进行测定。按照己糖激酶试剂盒操作说明书进行加样,充分混匀后迅速移至石英比色皿中,于加入样本的同时开始计时,30 s时记录340 nm波长处的光密度(A1),然后迅速将比色皿中的反应液倒入原试管中,放入37 ℃水浴箱中准确水浴2 min,再迅速倒入比色皿中,2 min 30 s时读取光密度(A2)。将样本按照BCA法定量测定匀浆蛋白浓度进行校正。按以下公式计算酶活性(U/g)。HK活性=(A2-A1)/毫摩尔消光系数/(反应时间×比色光径)×反应体系中样本稀释倍数/匀浆蛋白浓度。

1.7 统计学处理

采用SPSS19.0软件统计,计量资料数据以$\bar{x} \pm s$表示,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-t检验,3-BrPA对A549细胞和MRC-5细胞抑制率的比较采用两独立样本t检验。

2 结果

2.1 不同浓度的3-BrPA、顺铂单用及联用对A549、MRC-5细胞的增殖抑制作用

2.1.1 3-BrPA对A549、MRC-5细胞的增殖抑制作用

CCK-8结果显示,3-BrPA在浓度范围20~160 μmol/L内对A549细胞有明显抑制作用,抑制率随浓度的增大而增大,且呈时间依赖性($P<0.01$,表1)。加入3-BrPA作用48 h后IC_{50}为(42.54±3.39)μmol/L,故后续选用低于IC_{50}的3-BrPA(40 μmol/L)用于联合用药实验。3-BrPA在0~80 μmol/L内对MRC-5细胞无明显抑制作用,在80~160 μmol/L内有轻微抑制作用,且其抑制作用明显低于同浓度同时间点对A549细胞的抑制作用($P<0.01$),加入3-BrPA作用48 h后IC_{50}为(738.00±4.05)μmol/L,明显高于同时间点A549 IC_{50}(42.54±3.39)μmol/L($P<0.01$,表1、2)。

2.1.2 顺铂对A549、MRC-5细胞的增殖抑制作用

CCK-8实验发现,顺铂在0.5~4 mg/L浓度范围内对A549细胞及MRC-5细胞有明显抑制作用,且呈时间和浓度依赖性($P<0.05$,表3、4)。

表1 不同浓度的3-BrPA对肺癌A549细胞的抑制作用($n=3$)

3-BrPA浓度(μmol/L)	24 h		48 h		72 h	
	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
0	1.034±0.059	0	0.930±0.048	0	0.904±0.056	0
10	1.028±0.051	0.64	0.917±0.053	1.49	0.904±0.050	0.04
20	0.862±0.050[b]	18.05	0.760±0.048[a]	19.97	0.848±0.047[b]	6.73
40	0.607±0.065[b]	44.93	0.405±0.040[b]	61.67	0.383±0.057[b]	62.96
80	0.377±0.047[b]	69.14	0.315±0.050[b]	72.20	0.149±0.046[b]	91.24
160	0.113±0.042[b]	96.93	0.111±0.044[b]	96.23	0.119±0.050[b]	91.89
F	151.488	–	157.84	–	164.145	–
P	<0.01	–	<0.01	–	<0.01	–
$MS_{组内}$	0.003	–	0.002	–	0.003	–

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阴性对照组(0 μmol/L)比较

表2 不同浓度的3-BrPA对MRC-5细胞的抑制作用($n=3$)

3-BrPA浓度(μmol/L)	24 h		48 h		72 h	
	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
0	1.298±0.058	0	1.046±0.045	0	1.224±0.062	0
10	1.294±0.049	0.37	1.035±0.047	1.16	1.223±0.060	0.073
20	1.294±0.051	0.33	1.031±0.047	1.56	1.217±0.036	0.569
40	1.291±0.043	0.60	1.043±0.043	0.29	1.194±0.061	2.593
80	1.259±0.052	3.23	0.998±0.041[a]	5.01	1.161±0.052	5.468
160	1.198±0.058[b]	8.14	0.942±0.036[b]	10.74	1.083±0.048[b]	12.257
F	1.684	–	2.576	–	3.113	–
P	0.213	–	0.083	–	0.050	–
$MS_{组内}$	0.003	–	0.002	–	0.003	–

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与阴性对照组(0 μmol/L)比较

2.1.3 3-BrPA 联合不同浓度的顺铂对 A549 细胞的抑制作用 40 μmol/L 的 3-BrPA 联用不同浓度的顺铂,结果显示:单用 3-BrPA(40 μmol/L)组和顺铂(1 mg/L)组 24、48、72 h 细胞抑制率分别为 44.93%、61.67%、62.96% 和 16.07%、45.49%、52.37%,而 40 μmol/L 3-BrPA 联用 1 mg/L 顺铂组 A549 细胞抑制率分别为 67.51%、72.60%、81.62%,均明显高于阴性对照组($P<0.05$),联合用药组细胞抑制率均明显高于单用 3-BrPA 或顺铂组($P<0.05$,表 5、6)。

2.2 倒置相差显微镜观察 A549 细胞形态变化

40 μmol/L 的 3-BrPA 和 1 mg/L 的顺铂单用及联用作用于 A549 细胞 48 h 后,阴性对照组细胞呈多边形,胞体饱满,贴壁良好,折光性强,3-BrPA 组细胞原有多边形形态消失,呈现类圆形改变,细胞体积较对照组减小,胞质浓缩,贴壁较差呈现凋亡改变。顺铂组细胞形态改变与 3-BrPA 组相似,而联合用药组细胞改变较之更为明显,甚至部分细胞呈现空泡化改变,高倍镜下可见大量细胞碎片出现,细胞贴壁差等细胞坏死征象(图 1)。

表 3 不同浓度的顺铂对肺癌 A549 细胞的抑制作用($n=3$)

顺铂浓度	24 h		48 h		72 h	
(mg/L)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
0	1.034±0.059	0	0.930±0.048	0	0.904±0.056	0
0.25	0.988±0.045	4.88	0.715±0.049	25.51	0.892±0.060	1.46
0.5	0.942±0.051[a]	9.67	0.632±0.051[a]	34.99	0.740±0.035[a]	19.79
1	0.881±0.059[a]	16.07	0.543±0.052[a]	45.49	0.471±0.058[a]	52.37
2	0.660±0.055[a]	39.32	0.344±0.044[a]	68.78	0.173±0.060[a]	88.37
4	0.385±0.061[a]	68.24	0.195±0.046[a]	86.36	0.129±0.048[a]	93.66
F	60.406	–	88.097	–	436.577	–
P	<0.01	–	<0.01	–	<0.01	–
$MS_{组内}$	0.003	–	0.002	–	<0.001	–

a:$P<0.01$,与阴性对照组(0 mg/L)比较

表 4 不同浓度的顺铂对 MRC-5 细胞的抑制作用($n=3$)

顺铂浓度	24 h		48 h		72 h	
(mg/L)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
0	1.292±0.057	0	1.046±0.045	0	1.224±0.062	0
0.25	1.029±0.046[a]	21.95	0.803±0.042[a]	25.07	1.032±0.065[a]	16.71
0.5	0.936±0.062[a]	29.51	0.736±0.046[a]	32.03	0.844±0.054[a]	33.04
1	0.760±0.057[a]	43.86	0.604±0.040[a]	45.58	0.795±0.062[a]	37.29
2	0.662±0.052[a]	51.85	0.504±0.056[a]	55.96	0.645±0.054[a]	50.38
4	0.408±0.055[a]	72.61	0.244±0.048[a]	82.69	0.254±0.048[a]	84.40
F	94.605	–	74.573	–	99.809	–
P	<0.01	–	<0.01	–	<0.01	–
$MS_{组内}$	0.003	–	0.004	–	0.003	–

a:$P<0.01$,与阴性对照组(0 mg/L)比较

表 5 3-BrPA(40 μmol/L)联合不同浓度的顺铂对肺癌 A549 细胞的抑制作用($n=3$)

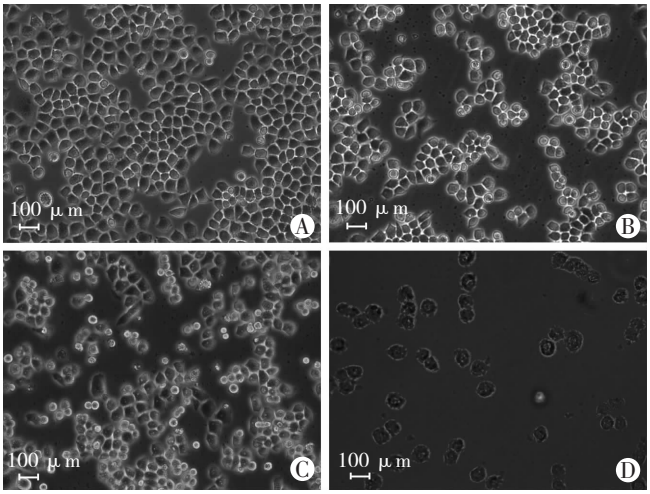
组别	24 h		48 h		72 h	
	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
阴性对照组	1.034±0.059	0	0.930±0.048	0	0.904±0.056	0
顺铂(mg/L)+3-BrPA 组						
0.25	0.600±0.065[a]	45.66	0.382±0.055[a]	64.31	0.314±0.061[a]	71.32
0.5	0.571±0.043[a]	48.73	0.375±0.047[a]	65.17	0.339±0.050[a]	68.23
1	0.392±0.061[a]	67.51	0.312±0.055[a]	72.60	0.229±0.046[a]	81.62
2	0.286±0.049[a]	78.73	0.217±0.050[a]	83.76	0.192±0.047[a]	86.01
4	0.198±0.045[a]	87.91	0.126±0.041[a]	94.42	0.093±0.039[a]	98.04
F	91.585	–	96.421	–	98.628	–
P	<0.01	–	<0.01	–	<0.01	–
$MS_{组内}$	0.003	–	0.002	–	0.003	–

a:$P<0.01$,与阴性对照组比较

表 6 3-BrPA、顺铂单用及联用对肺癌 A549 细胞的抑制作用（$n=3$）

组别	24 h		48 h		72 h	
	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)	D(450)值	抑制率(%)
阴性对照组	1.034±0.059	0	0.930±0.048	0	0.904±0.056	0
3-BrPA 组	0.607±0.065[a]	44.93	0.405±0.040[a]	61.67	0.383±0.057[a]	62.96
顺铂组	0.881±0.059[a]	16.07	0.543±0.052[a]	45.49	0.471±0.058[a]	52.37
联合用药组	0.392±0.061[ab]	67.51	0.312±0.055[abc]	72.60	0.229±0.046[abc]	81.62
F	65.997	–	91.756	–	91.271	–
P	<0.01	–	<0.01	–	<0.01	–
$MS_{组内}$	0.004	–	0.002	–	0.003	–

a：$P<0.05$，与阴性对照组比较；b：$P<0.05$，与 3-BrPA 组比较；c：$P<0.05$，与顺铂组比较



A：阴性对照组；B：顺铂组；C：3-BrPA 组；D：联合用药组

图 1 相差显微镜观察各组 A549 细胞形态

2.3 3-BrPA 和顺铂对 A549 细胞凋亡影响

流式细胞仪检测结果表明，单用药组及联合用药组细胞凋亡率均明显高于阴性对照组（$P<0.01$），而联合用药组细胞凋亡率明显高于 3-BrPA 组和顺铂组（$P<0.01$，表 7）。

表 7 3-BrPA 顺铂单用及联用对 A549 细胞凋亡的影响
［$n=3$，$(\bar{x}\pm s)$%］

组别	细胞凋亡率
阴性对照组	8.103±2.590
3-BrPA 组	53.417±5.259[ac]
顺铂组	20.700±5.172[ab]
联合用药组	77.953±3.587[abc]

a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 3-BrPA 组比较；c：$P<0.01$，与顺铂组比较

2.4 3-BrPA 对 A549 细胞周期的影响

不同浓度的 3-BrPA 作用于 A549 细胞 48 h 后，与阴性对照组比较，40 μmol/L 组 G_1 期和 S 期细胞比例变化不明显，与阴性对照组及 40 μmol/L 组比较，80、160 μmol/L 组 S 细胞所占比例逐渐下降（$P<0.01$），而 G_1 期细胞所占比例逐渐上升（$P<0.01$，表 8）。提示 3-BrPA 可将 A549 细胞阻滞于 G_1 期，具有明显的增殖抑制作用。

表 8 3-BrPA 对 A549 细胞周期的影响（$n=3$）

组别	凋亡细胞所在周期百分率(%)			增殖指数
	G_0/G_1	S	G_2/M	
阴性对照组	31.823±2.136	56.037±1.568	12.140±1.610	2.142
3-BrPA				
40 μmol/L 组	33.887±2.834[ac]	55.147±2.239[ac]	10.967±1.625[ac]	1.951
80 μmol/L 组	52.400±2.365[ab]	38.080±2.225[ab]	8.517±1.808[ab]	0.889
160 μmol/L 组	71.080±2.042[abc]	22.247±1.851[abc]	6.673±0.681[abc]	0.407

a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 40 μmol/L 组比较；c：$P<0.01$，与 80 μmol/L 组比较

2.5 3-BrPA 对 A549 细胞己糖激酶活性的影响

40、80、160 μmol/L 的 3-BrPA 作用于肺癌 A549 细胞 48 h 后其己糖激酶活性明显低于阴性对照组（$P<0.01$），随着 3-BrPA 浓度的升高己糖激酶活性降低（表 9）。

表 9 3-BrPA 对肺癌 A549 细胞己糖激酶活性的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	己糖激酶活性
阴性对照组	143.999±7.264
3-BrPA	
40 μmol/L 组	96.279±6.672[ac]
80 μmol/L 组	61.082±7.601[ab]
160 μmol/L 组	35.571±5.936[abc]

a：$P<0.01$，与阴性对照组比较；b：$P<0.01$，与 40 μmol/L 组比较；c：$P<0.01$，与 80 μmol/L 组比较

3 讨论

研究证明，肿瘤细胞出现线粒体能量代谢异常是其重要的生物学特征之一。HK 是糖酵解过程中的第一个关键酶，在其催化作用下葡萄糖转化为 6-磷酸葡萄糖（glucose-6-phosphoric acid，G6P），G6P 对细胞利用葡萄糖至关重要。人体有 4 种 HK 同工酶，其中 HK-Ⅱ与线粒体外膜通透性孔道复合物的电压依赖阴离子通道蛋白（voltage-dependant anion channel，VDAC）相互作用对调节能量代谢和细胞凋亡有着关键性作用。HK-Ⅱ与肿瘤相关性最大，在“肝癌、结肠癌”等多种恶性肿瘤细胞中呈高表达，多与线粒体结合的形式存在[9-10]。HK-Ⅱ表达水平与肿瘤细胞生长密切相关，其水平可到达正常组织的 200 倍，这对于肿瘤细胞的代谢与增殖有着重要作用[11]。3-BrPA 可与

HK-Ⅱ活性部位的-XH 基团结合(EHX + BrCH2-CO-COOH→EX-CH2-CO-COOH + HBr),而导致该酶失活,HK-Ⅱ通过 VDAC 和线粒体外膜相互连接,这对线粒体膜通透性孔道复合物结构的稳定性起着至关重要的作用,3-BrAP 通过破坏此连接从而阻止葡萄糖转化为 G6P,最终导致糖酵解不能顺利完成,并使得 ATP 的生成受到抑制。3-BrPA 通过抑制糖酵解而具有抗肿瘤效应。

3-BrPA 可通过诱导细胞凋亡和细胞坏死而抑制肿瘤细胞生长,和常规化疗药物具有协同抗肿瘤,并且对正常组织细胞影响较小,具有较高安全性。Xu 等[12]研究发现,3-BrPA 通过抑制糖酵解过程可有效地杀死肿结肠癌 HCT116 细胞和淋巴瘤 Raji 细胞,浓度较低的 3-BrPA(50 μmol/L)主要导致细胞凋亡,较高浓度的 3-BrPA(>100 μmol/L)主要导致细胞坏死。Cao 等[13]以 RIP1-Tag2 转基因小鼠为研究对象,发现 3-BrPA 联用格尔德霉素可显著抑制原发性胰腺癌生长及转移,联用抗肿瘤作用明显优于单用其中一种。体外实验中 3-BrPA 可杀死人淋巴瘤 Raji 细胞,其半数致死量为 11 μmol/L;体内实验中 3-BrPA 同样可抑制小鼠人淋巴瘤 Raji 细胞移植瘤的生长,而对周围正常组织及其他器官均无影响[14]。本研究发现 3-BrPA 对肺癌 A549 细胞生长有明显的抑制作用,呈一定浓度依赖性,而对正常组织细胞 MRC-5 抑制作用却不明显,仅于 160 μmol/L 时对 MRC-5 有轻微抑制作用,与顺铂联用时对 A549 细胞的抑制作用更加显著,可见 3-BrPA 同样可抑制肺癌 A549 细胞生长,而对正常细胞毒性作用较小,并且可化疗药物协同抗肿瘤细胞生长。进一步研究发现 3-BrPA 和顺铂均可诱导细胞凋亡,而两种联用时更容易出现细胞坏死,3-BrPA 可抑制 A549 细胞 HK 活性,且随浓度的增高抑制作用则增强,并可将 A549 细胞阻滞于 G_1 期,从而抑制增殖,可见 3-BrPA 通过抑制糖酵解、诱导细胞凋亡和坏死和抑制细胞增殖最终起到抑制肺癌 A459 细胞的生长作用。

综上所述,3-BrAP 作为 HK-Ⅱ抑制剂,对肺癌细胞同样有较强的抗肿瘤效应,与化疗药物联用时可产生协同抗肺癌细胞作用,而对正常细胞影响较小。本研究对 3-BrPA 作为抗肺癌药物在临床的应用提供了一定理论依据,但仅涉及其体外抗肺癌细胞的作用,对于 3-BrPA 体内抗肺癌作用及其稳定性和安全性仍需进一步深入研究。

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 - 1033. DOI: 10.1126/science.1160809

[2] El-Sayed S M, Mahmoud A A, El-Sawy S A, *et al*. Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect)[J]. Med Hypotheses, 2013, 81(5): 866 - 870. DOI:10.1016/j.mehy.2013.08.024

[3] Mazurek S, Grimm H, Boschek C B, *et al*. Pyruvatekinase-type M2: acrossroad in the tumor metabolome[J]. Br J Nutr, 2002, 87(Suppl 1): S23 - S29.

[4] Buchakjian M R, Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(10): 715 - 727. DOI: 10.1038/nrm2972

[5] 杨芳, 柳俊, 韩玉翠, 等. 肺癌细胞 HK-Ⅱ、CRABP1 基因的表达及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(1): 37 - 38.

[6] Icard P, Zhang X D, Lemoisson E, *et al*. Experimental results using 3-bromopyruvate in mesothelioma: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. J BioenergBiomembr, 2012, 44(1): 81 - 90. DOI: 10.1007/s10863-012-9415-6. Epub 2012 Feb 10

[7] Chapiro J, Sur S, Savic L J, *et al*. Systemic delivery of microencapsulated 3-bromopyruvate for the therapy of pancreatic cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(24): 6406 - 6417. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1271. Epub 2014 Oct 17

[8] Xian S L, Cao W, Zhang X D, *et al*. 3-Bromopyruvate inhibits its human gastric cancer tumor growth in nude mice *via* the inhibition of glycolysis[J]. OncolLett, 2015, 9(2): 739 - 744. DOI:10.3892/ol.2014.2779

[9] 蒋晓忠, 严律南, 孙广运, 等. 原发性肝细胞癌组织 HIF-1α 和 HK-Ⅱ及 LDH-Ⅴ表达生物学意义分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(1): 41 - 44, 48.

[10] 冯青青, 刘红梅, 彭秋平, 等. HK-Ⅱ、TS 和 Ki-67 在青年人结肠癌组织中的表达及其意义[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(6): 663 - 665. DOI: 10.3971/j.issn.10008578.2011.06.014

[11] Robey R B, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt[J]. Oncogene, 2006, 25(34): 4683 - 4696. DOI: 10.1038/sj.onc.1209595

[12] Xu R H, PelicanoH, Zhou Y, *et al*. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia[J]. Cancer Res, 2005, 65(2): 613 - 621.

[13] Cao X, Jia G, Zhang T, *et al*. Non-invasive MRI tumor imaging and synergistic anticancer effect of HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor in RIP1-Tag2 transgenic pancreatic tumor model[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 62(6): 985 - 994. DOI: 10.1007/s00280-008-0688-8

[14] Schaefer N G, Geschwind J F, Engles J, *et al*. Systemic administration of 3-bromopyruvate in treating disseminated aggressive lymphoma[J]. Transl Res, 2012, 159(1): 51 - 57. DOI:10.1016/j.trsl.2011.08.008

(**收稿**:2015-07-26;**修回**:2015-09-28)

(编辑 汪勤俭)