DOI:10.16016/j.1000-5404.201509135

二氯乙酸盐通过促进 Mcl-1 降解诱导宫颈癌细胞凋亡

闫晓欢,王 婉,郑英如 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科)

[摘要] **目的** 探讨二氯乙酸盐(dichloroacetate, DCA)对宫颈癌细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测 DCA 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响;流式细胞仪检测 DCA 对 HeLa 细胞凋亡的影响;Western blot 检测 DCA 对 HeLa 细胞凋亡相关蛋白 PARP(poly ADP-ribose polymerase)和 Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1)水平的影响。**结果** 与对照组比较,DCA 处理可显著抑制 HeLa 细胞增殖($P<0.01$)、促进细胞凋亡($P<0.01$)、升高剪切型 PARP(cleaved PARP)蛋白的水平、下调凋亡抑制蛋白 Mcl-1 的表达。DCA 对 HeLa 细胞 Mcl-1 蛋白的下调作用可被蛋白酶体抑制剂 MG132 所抑制,但不能被蛋白翻译抑制剂放线菌酮(cycloheximide,CHX)所抑制。**结论** DCA 促进宫颈癌细胞凋亡的作用可能与其促进蛋白酶体降解 Mcl-1 有关。

[关键词] 二氯乙酸盐;宫颈癌;细胞增殖;细胞凋亡;Mcl-1
[中图法分类号] R737.33; R914.3; R963 [文献标志码] A

Dichloroacetate induces apoptosis in cervical cancer cells by degrading myeloid cell leukemia-1

Yan Xiaohuan, Wang Wan, Zheng Yingru (Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of dichloroacetate (DCA) on the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells, and investigate the possible mechanism. **Methods** CCK-8 assay was used to measure the effect of DCA on the proliferation of cervical cancer HeLa cells, and flow cytometry to detect its effect on cell apoptosis. Expression levels of apoptosis-associated proteins poly ADP-ribose polymerase (PARP) and myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) was measured in HeLa cells after DCA treatment by Western blot analysis. **Results** DCA treatment significantly suppressed the proliferation ($P<0.01$), enhanced the apoptosis ($P<0.01$), increased the level of cleaved PARP, and reduced the level of Mcl-1 protein in HeLa cells. Moreover, the DCA-mediated down-regulation of Mcl-1 protein in HeLa cells could be attenuated by proteasome inhibitor MG132, but not by translation inhibitor cycloheximide (CHX). **Conclusion** DCA promotes the apoptosis of cervical cancer HeLa cells, which may be resulted from the down-regulation of Mcl-1 protein by DCA-induced proteasomal degradation.

[**Key words**] dichloroacetate; cervical cancer cells; cell proliferation; apoptosis; myeloid cell leukemia-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81472436, 81272865). Corresponding author: Zheng Yingru, E-mail: zyrdaping@aliyun.com

宫颈癌是严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤,除手术和放疗外,化疗(主要针对晚期及复发的宫颈癌)也是一种重要的治疗措施。目前,以顺铂为基础的联合化疗方案应用最为广泛,但其副作用较大,效果也尚不理想。因此,亟待探索有效且毒副作用小的治疗措施。近年研究表明:肿瘤也是一种代谢异常疾病,通过调节代谢抗肿瘤已成为肿瘤治疗领域中的新研究热点之一[1-2]。在诸多通过调节代谢而抗肿瘤的药物中,二氯乙酸盐(dichloroacetate,DCA)显示出良好的抗肿瘤前景,其可抑制多种肿瘤细胞的生长,但对正常细胞无影响[2-10]。本研究以 HeLa 细胞为模型,观察了 DCA 对宫颈癌细胞增殖和凋亡的影响,并初步探讨了

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472436, 81272865)
[通信作者] 郑英如,E-mail:zyrdaping@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160128.1703.003.html(2016-01-28)

可能机制,为探索宫颈癌治疗新策略提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人宫颈癌 HeLa 细胞由第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室保存。DCA 购自美国 Santa 公司,CCK-8 试剂盒购自 DojinDo 公司,兔抗人 PARP 抗体和兔抗人 Mcl-1 抗体均购自 Cell Signaling Technology,Tublin 抗体、MG132、放线菌酮(cycloheximide,CHX)、青霉素-链霉素均购自碧云天生物科技公司,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自美国 BD Biosciences 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG 均购自中杉金桥公司,DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 细胞培养及实验分组

采用 DMEM 培养基 +10% 胎牛血清 +1% 双抗在 37 ℃、5% CO_2 孵箱中进行细胞培养。当细胞密度达培养瓶底面积 90% 左右时进行传代培养。实验分 2 组:对照组,DCA 组(40 mmol/L DCA)。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

将对数生长期的 HeLa 细胞消化成单细胞悬液,按 5 000/孔接种于 96 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜后处理细胞,实验组加入 40 mmol/L 的 DCA,对照组加入等体积 PBS,每组设 3 个复孔,24 h 后加入 CCK-8 检测试剂,每孔 10 μL,37 ℃避光孵育 30 min 后使用全波长酶标仪于 450 nm 处测量每孔的光密度值,计算细胞存活率。

1.4 细胞凋亡检测

1.4.1 流式细胞仪检测细胞凋亡 对数生长期 HeLa 细胞消化成单细胞悬液后接种于 6 孔板中,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养,待细胞贴壁后,用 40 mmol/L 的 DCA 进行处理,对照组加入等体积的 PBS 溶液,20 h 后收集 2 组细胞,离心,用预冷 PBS 清洗 2 ~ 3 次,重悬,采用 Annexin V-FITC、PI 进行染色,室温避光染色 15 min 后,流式细胞仪进行检测,计算机处理分析。

1.4.2 Western blot 检测凋亡相关蛋白 PARP 表达

对数生长期 HeLa 细胞铺于 6 孔板中,细胞贴壁后,用 40 mmol/L 的 DCA 进行处理,对照组加入等体积的 PBS 溶液,20 h 后收取细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量后,10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,兔抗人 PARP 抗体(1∶1 000 稀释)、鼠抗人 Tublin 抗体(1∶5 000 稀释)4 ℃孵育过夜,次日用 PBST 洗膜 3 次、每次 15 min 后,分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1∶10 000 稀释)、山羊抗鼠 IgG 二抗(1∶10 000 稀释)室温孵育 1 h,PBST 洗膜后用 ECL 发光试剂盒进行显影成像。

1.5 Western blot 检测 Mcl-1 蛋白表达

Mcl-1 是重要的抗凋亡分子,为探讨 DCA 促进 HeLa 细胞凋亡是否与调节 Mcl-1 的蛋白表达有关,我们采用 Western blot 方法分析 DCA 对细胞中 Mcl-1 蛋白的表达。设置对照组、DCA 组,按 1.4.2 方式处理。为探讨 DCA 下调 Mcl-1 蛋白表达的机制,分别加入蛋白翻译抑制剂 CHX 或蛋白酶体抑制剂 MG132,检测 DCA 对 Mcl-1 蛋白表达的影响。其中为明确 DCA 对 Mcl-1 蛋白表达是否受 CHX 的影响,设置对照组、DCA 组、CHX 组、DCA + CHX 组,DCA + CHX 组先用 40 mmol/L DCA 进行处理 18 h 后,加入 10 μmol/L CHX 处理 2 h;为研究 DCA 对 Mcl-1 蛋白表达是否受 Mg132 的影响,设置对照组、DCA 组、Mg132 组(10 μmol/L)、DCA + Mg132 组(40 mmol/L + 10 μmol/L),DCA + Mg132 组用 10 μmol/L Mg132 预处理 2 h 后加入 40 mmol/L DCA 处理 20 h。收集细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,检测 Mcl-1 蛋白的表达,12% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,其中兔抗人 Mcl-1 抗体按 1∶1 000 稀释后使用,按 1.4.2 步骤进行 Western blot 检测。ECL 发光试剂盒进行显影成像。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据录入及统计分析均采用 SPSS 18.0 统计软件,2 组数据以 *t*-test 进行组间比较,多组数据间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DCA 可抑制 HeLa 细胞增殖

DCA 组[(55.82 ± 3.62)%]的细胞存活率明显低于对照组[(100.00 ± 4.31)%]($P < 0.01$)。

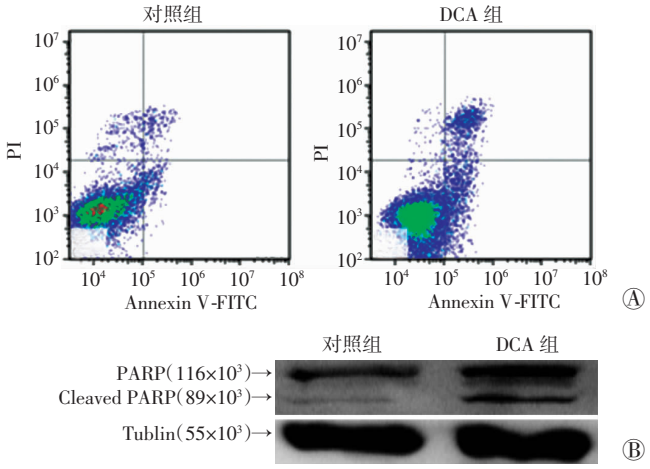
2.2 DCA 可促进 HeLa 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示:DCA 组[(18.74 ± 2.65)%]的细胞凋亡率明显高于对照组[(6.74 ± 2.74)%]($P < 0.01$,图 1A);Western blot 检测结果显示:与对照组比较,DCA 处理可明显增加剪切型 PARP(cleaved PARP)蛋白的表达(图 1B)。上述两个结果均表明 DCA 可以促进宫颈癌 HeLa 细胞凋亡。

2.3 DCA 可下调 HeLa 细胞中 Mcl-1 蛋白的表达

与对照组比较,DCA 处理可显著下调 HeLa 细胞

中 Mcl-1 蛋白的表达(1.00 ± 0.34 *vs* 0.36 ± 0.06,$P<0.05$,图 2)。



A:流式细胞仪检测;B:Western blot 检测

图 1　DCA 对 HeLa 细胞凋亡的影响

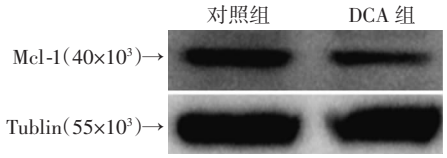
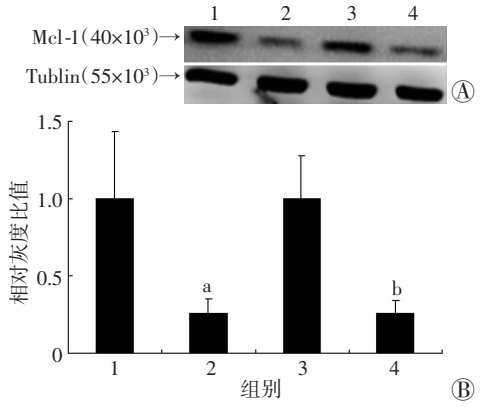


图 2　Western blot 检测 DCA 对 HeLa 细胞中 Mcl-1 蛋白表达的影响

2.4　DCA 对 Mcl-1 蛋白的下调作用可被蛋白酶体抑制剂所缓解

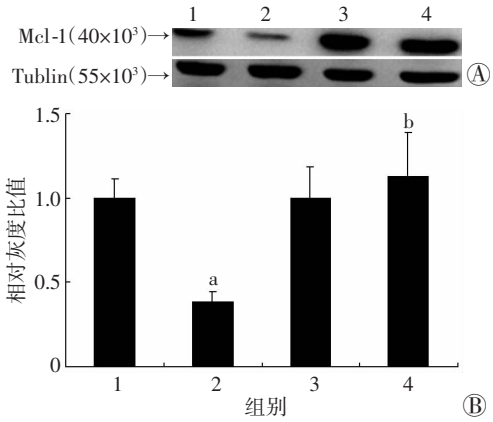
DCA 对 Mcl-1 蛋白的下调作用不能被 CHX 所抑制(图 3),但可被 MG132 所抑制(图 4)。这些结果提示:DCA 下调 Mcl-1 蛋白的水平可能是由于其促进了蛋白酶体活性,进而加速了 Mcl-1 蛋白降解所致。



1:对照组;2:DCA 组;3:CHX 组;4:DCA + CHX 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 CHX 组比较

图 3　Western blot 检测 CHX 对 DCA 下调 HeLa 细胞中 Mcl-1 蛋白表达的影响



1:对照组;2:;DCA 组;3:MG132 组;4:DCA + MG132 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 DCA 组比较

图 4　Western blot 检测 MG132 对 DCA 下调 HeLa 细胞中 Mcl-1 蛋白表达的影响

3　讨论

据全世界范围内统计,每年约有 529 000 例宫颈癌新发病例,其中 85% 的新发病例出现在发展中国家[11]。我国约占全世界的 1/4,严重危害着女性的生命健康安全。尽管宫颈癌的诊断和治疗方法都已得到了极大地提高,但其治疗效果仍不满意。DCA 作为一种通过调节代谢而发挥抗肿瘤效应的小分子化合物,其在抗肿瘤方面的作用正在不断地被发掘。在本研究中发现 DCA 可抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖、促进其凋亡,这种抗癌作用可能与 DCA 促进宫颈癌细胞蛋白酶体降解 Mcl-1 蛋白,进而使 Mcl-1 蛋白水平下降有关。本研究的发现丰富了宫颈癌的治疗方法,同时也可抵消某些其他抗肿瘤药物在抗肿瘤时,因诱导 Mcl-1 上调而削弱其自身的抗瘤效应[12],使得 DCA 可以增敏此类药物的抗癌效应,为肿瘤的临床治疗提供新的策略。

近年研究显示:DCA 可以抑制多种肿瘤细胞的生长,包括前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢上皮癌、胶质母细胞瘤、口腔鳞癌等多种肿瘤细胞[2-10];此外还发现 DCA 可以逆转肿瘤细胞对索拉非尼、5-氟尿嘧啶、顺铂等化疗药物产生的抗药性[13-15],从而增敏化疗药物的疗效。关于 DCA 抗肿瘤机制有多个,其中主要的包括:①DCA 作为线粒体丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase,PDK)的抑制剂,导致丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase,PDH)激活,从而促使更多的丙酮酸进入线粒体,抑制糖酵解,减少乳酸堆积,使微环境不利于肿瘤生存;②DCA 通过提高肿瘤细胞 H_2O_2 水平及 pH 值而使线粒体膜电位降低,从而增加凋亡蛋白的表达,促进

细胞凋亡;③DCA 通过调节葡萄糖代谢方式逆转肿瘤细胞对化疗药物产生的耐药性,从而增敏化疗药物的疗效。本研究中,我们发现 DCA 可通过下调 Mcl-1 蛋白的水平而促进宫颈癌细胞凋亡,从而丰富了 DCA 的抗肿瘤机制。

Mcl-1(myeloid cell leukemia-1)是 Bcl-2 家族的成员之一,其具有重要的抗凋亡功能。近年研究发现,Mcl-1 与肿瘤的发生、发展密切相关,而且在包括宫颈癌在内的多种恶性肿瘤中广泛高表达,其已成为肿瘤治疗的一个重要靶标。因此,设法下调肿瘤细胞中 Mcl-1 的表达水平,无疑有助于提高肿瘤的治疗效果。目前已有关于通过靶向降低 Mcl-1 的表达水平而增加肿瘤化疗敏感性的报道[16]。

关于 Mcl-1 的表达调控机制复杂多样,特别是有关其降解调控的研究近年来倍受关注。本研究发现 DCA 处理后可显著下调 Mcl-1 蛋白的水平,而且这种下调作用可被蛋白酶体抑制剂 MG132 所抑制,但不能被翻译抑制剂 CHX 所抑制,提示 DCA 对 Mcl-1 蛋白的下调作用可能是通过促进蛋白酶体活性而加速 Mcl-1 蛋白降解来实现的。在结肠癌细胞的研究中发现 DCA 通过促进蛋白酶体的降解降低 Mcl-1 的蛋白表达水平,暗示其可能与蛋白酶体的稳定性有关[7]。

本研究丰富了 DCA 的抗肿瘤机制,为以 DCA 为基础的抗宫颈癌新策略的研究提供了新的科学依据。但 DCA 对宫颈癌 HeLa 细胞中 Mcl-1 的表达调控的详细机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Robertson D S. The development of tumor cell characteristics [J]. J Cell Physiol, 2014, 229(6): 705 – 710. DOI: 10.1002/jcp.24498

[2] Feng W, Gentles A, Nair R V, *et al*. Targeting unique metabolic properties of breast tumor initiating cells[J]. Stem Cells, 2014, 32(7): 1734 – 1745. DOI: 10.1002/stem.1662

[3] Garon E B, Christofk H R, Hosmer W, *et al*. Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(3): 443 – 452. DOI: 10.1007/s00432-014-1583-9

[4] Liu D, Wang F, Yue J, *et al*. Metabolism targeting therapy of dichloroacetate-loaded electrospun mats on colorectal cancer [J]. Drug Deliv, 2015, 22(1): 136 – 143. DOI: 10.3109/10717544.2013.870258

[5] Dunbar E M, Coats B S, Shroads A L, *et al*. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors[J]. Invest New Drugs, 2014, 32(3): 452 – 464. DOI: 10.1007/s10637-013-0047-4

[6] Kailavasan M, Rehman I, Reynolds S, *et al*. NMR-based evaluation of the metabolic profile and response to dichloroacetate of human prostate cancer cells [J]. NMR Biomed, 2014, 27(5): 610 – 616. DOI: 10.1002/nbm.3101

[7] Delaney L M, Ho N, Morrison J, *et al*. Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells[J]. Apoptosis, 2015, 20(1): 63 – 74. DOI: 10.1007/s10495-014-1046-4

[8] Saed G M, Fletcher N M, Jiang Z L, *et al*. Dichloroacetate induces apoptosis of epithelial ovarian cancer cells through a mechanism involving modulation of oxidative stress [J]. Reprod Sci, 2011, 18(12): 1253 – 1261. DOI: 10.1177/1933719111411731

[9] Michelakis E D, Sutendra G, Dromparis P, *et al*. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate [J]. Sci Transl Med, 2010, 2(31): 31ra34. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000677

[10] Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, *et al*. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment[J]. Oncotarget, 2015, 6(2): 1217 – 1230.

[11] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893 – 2917. DOI: 10.1002/ijc.25516

[12] Faber A C, Coffee E M, Costa C, *et al*. mTOR inhibition specifically sensitizes colorectal cancers with KRAS or BRAF mutations to BCL-2/BCL-XL inhibition by suppressing MCL-1[J]. Cancer Discov, 2014, 4(1): 42 – 52. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0315

[13] Shen Y C, Ou D L, Hsu C, *et al*. Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma [J]. Br J Cancer, 2013, 108(1): 72 – 81. DOI: 10.1038/bjc.2012.559

[14] Xie J, Wang B S, Yu D H, *et al*. Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells[J]. Int J Oncol, 2011, 38(2): 409 – 417. DOI: 10.3892/ijo.2010.851

[15] Xuan Y, Hur H, Ham I H, *et al*. Dichloroacetate attenuates hypoxia-induced resistance to 5-fluorouracil in gastric cancer through the regulation of glucose metabolism[J]. Exp Cell Res, 2014, 321(2): 219 – 230. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.12.009

[16] Ding Q, Huo L, Yang J Y, *et al*. Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6109 – 6117. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0579

(**收稿**:2015-09-24;**修回**:2015-12-08)

(编辑 吴培红)