DOI:10.16016/j.1000-5404.201507150

二氯乙酸盐增强盐酸吡柔比星杀伤肝癌细胞的研究

闫小晶[1],倪振洪[1],吴亚冉[1],梁书龙[2],秦利燕[3],何凤田[1],连继勤[1] (400038 重庆,第三军医大学:基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1],学员旅 11 营[2],西南医院血液科[3])

[摘要] **目的** 探讨二氯乙酸盐(Dichloroacetate ,DCA)增强盐酸吡柔比星(Pirarubicin ,THP)杀伤肝癌细胞的效果及可能机制。**方法** 用 40 μmol/L DCA 与不同浓度(0、200、400、600、800 μmol/L)盐酸吡柔比星(THP)联合处理肝癌 HepG2 细胞 24 h,采用 CCK-8 法检测对细胞增殖的影响。然后用 40 μmol/L 二氯乙酸盐与 600 μmol/L 盐酸吡柔比星联合处理肝癌 HepG2 细胞 24 h,用 Western blot 检测细胞中 PARP 的表达变化及 JNK 的磷酸化水平;用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 的水平。**结果** DCA可显著增强不同浓度 THP 对肝癌 HepG2 细胞的杀伤效果,与 PBS 组相比具有统计学差异($P<0.05$);DCA 联合 THP 处理 24 h 可显著升高细胞内的 ROS 水平,与 PBS 联合 THP 组相比具有统计学差异($P<0.05$);此外,DCA 联合 THP 可使 HepG2 细胞中凋亡相关分子 PARP 的剪切明显增加,并增强 JNK 的磷酸化水平。抗氧化剂 NAC 可显著降低 DCA 与 THP 联合处理对 HepG2 细胞中 JNK 的激活作用。**结论** DCA 可显著增强 THP 杀伤肝癌细胞效应,其机制可能与 ROS/JNK 通路的激活有关。

[关键词] 二氯乙酸盐;肝癌;盐酸吡柔比星;活性氧簇;c-Jun 氨基末端激酶

[中图法分类号] R73-361;R735.7;R979.14 [文献标志码] A

Dichloroacetate enhances cytotoxicity of pirarubicin in hepatocellular carcinoma cells *in vitro*

Yan Xiaojing[1], Ni Zhenhong[1], Wu Yaran[1], Liang Shulong[2], Qin Liyan[3], He Fengtian[1], Lian Jiqin[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, [2]Battalion 11, Cadet Brigade, [3]Department of Hematology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the synergistic effect of dichloroacetate (DCA) and pirarubicin (THP) in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the possible mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with DCA (40 μmol/L) combined with THP with different concentrations (0, 200, 400, 600, and 800 μmol/L) for 24 h, and then CCK-8 assay was used to detect the cell viability. Moreover, the cells were treated with or without 600 μmol/L of THP in the presence or absence of 40 μmol/L of DCA. Then Western blotting was utilized to measure the expression of cellular molecules, and DCFH-DA fluorescent probes were used to estimate the level of reactive oxygen species (ROS). **Results** Compared with PBS, DCA significantly enhanced the cytotoxicity of THP in HepG2 cells ($P<0.05$). The combination of DCA and THP induced an obvious increase of ROS compared with the combination of PBS and THP ($P<0.05$). Moreover, the combination of DCA and THP obviously increased the cleavage of PARP and the phosphorylation of JNK. Antioxidant NAC could significantly inhibit JNK phosphorylation in HepG2 cells treated with DCA and THP. **Conclusion** DCA significantly enhances the cytotoxicity of THP in HCC cells, which may be dependent on the activation of ROS/JNK signaling pathway.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81572375);重庆市自然科学基金项目(CSTC2014jcyjA10110)

[通信作者] 连继勤,E-mail: lianjiqin@ sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.010.html(2015-11-27)

[**Key words**] dichloroacetate; hepatocellular carcinoma; pirarubicin; reactive oxygen species; c-Jan N-terminal Kinase

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81572375) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2014jcyjA10110).
Corresponding author: Lian Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是最常见的恶性肿瘤之一。除手术和放疗以外,化疗也是HCC治疗中的一种手段,尤其是一些新的分子靶向药物在HCC的治疗中发挥着重要作用,但治疗效果不佳一直是影响HCC患者化疗的关键因素[1-2]。因此,增强HCC化疗有效性的措施与策略具有重要意义。

盐酸吡柔比星(Pirarubicin,THP)作为新一代蒽环类抗肿瘤药物,具有抗肿瘤谱广,抗肿瘤活性强,毒副反应小等优点,是目前临床上治疗恶性血液系统肿瘤的一线用药。近年来研究表明,THP对多种实体性肿瘤也呈现出了较好的抑制作用。研究表明,采用含THP的联合化疗方案,经动脉插管灌注化疗栓塞,对治疗原发性肝癌具有较好的效果[3]。因此,研究THP对HCC细胞的杀伤效果及可能机制,寻找新的药物联用方案,对于HCC患者的临床治疗具有积极的意义。

二氯乙酸盐(Dichloroacetate,DCA)是一种丙酮酸脱氢酶(PDH)激活剂。作为一种经典的治疗代谢药物,近年来实验表明DCA对抑制肿瘤的恶性增殖具有较好的效果并显著增强多种化疗药物的抗瘤效应[4-7]。但目前为止,有关DCA能否增强THP的杀细胞效应还少见报道。本研究证实DCA能显著增强THP的抗HCC效果,其相关机制与ROS/JNK信号通路的增强有关。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株HepG2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。胎牛血清、高糖DMEM培养基和0.25%的胰酶购自美国Hyclone公司;CCK-8试剂盒购自日本Dojindo Laboraories;细胞裂解液RIPA、BCA蛋白定量试剂盒、蛋白酶抑制剂PMSF及GAPDH抗体、SP600125(JNK抑制剂)、活性氧(ROS)检测试剂盒均购自江苏碧云天生物技术公司;N-乙酰半胱氨酸(NAC)购自Sigma公司;PARP、JNK、P-JNK抗体购自美国CST公司;山羊抗兔的二抗购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与加药方法 HepG2细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中,于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养。待其贴壁生长,常规换液和传代后,细胞进入对数生长期,即可于细胞培养板中进行实验。

1.2.2 CCK-8实验 取对数生长期的HepG2细胞,用细胞计数板计数,以每孔5 000个细胞接种于96孔板中,待其完全贴壁后加药处理。分为对照组(PBS)、盐酸吡柔比星处理组(0、200、400、600、800 μmol/L)、二氯乙酸盐处理组(40 μmol/L)及盐酸吡柔比星与二氯乙酸盐联合用药处理组,共10组,每组设3个复孔。加药处理24 h后,待对照孔细胞长满后,将培养基弃去,各加入10 μL CCK-8检测试剂的DMEM溶液100 μL,于37 ℃、5%孵箱内孵育40 min。最后,在450 nm波长下测定密度值[D(450)],计算盐酸吡柔比星、二氯乙酸钠和联合处理组对细胞增殖的存活率。细胞存活率=(加药孔光密度值-空白孔光密度值)/(对照组光密度值-空白孔光密度值)×100%。

1.2.3 细胞总蛋白的提取和Western blot检测 HepG2细胞6孔板加药处理24 h后吸弃培养基,PBS漂洗,吸净PBS,每孔加入100 μL含1 mmol/L PMSF的RIPA裂解液,用细胞刮收集裂解液于1.5 mL EP管中,置于冰上裂解20 min。4 ℃,12 000 g,离心20 min,收集上清于新EP管中,并使用BCA法进行蛋白定量及标准化。将定量后蛋白样品以每孔40 μg上样,在12%丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离,采用半干转方法将凝胶中蛋白转移至PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1 h,用一抗稀释液1∶1 000稀释抗体并4 ℃孵育过夜,次日用含0.1% Tween20的PBST洗膜3次,每次10 min后,用1∶5 000稀释的二抗室温孵育1 h,PBST洗膜3次,每次10 min后将PVDF膜用化学发光底物法置于化学发光仪中显影曝光。

1.2.4 活性氧(ROS)检测 将HepG2细胞接种6孔板,过夜培养后加药处理。处理完毕后,吸去上清,用PBS清洗2遍。每孔加入含DCFH-DA荧光探针的无血清培养液,使终浓度为10 μmol/L。细胞于37 ℃避光孵育20 min后,吸去上清,用PBS清洗3遍,

随后使用荧光酶标仪检测 488 nm(激发波长)/525 nm(发射波长)处的吸光值。

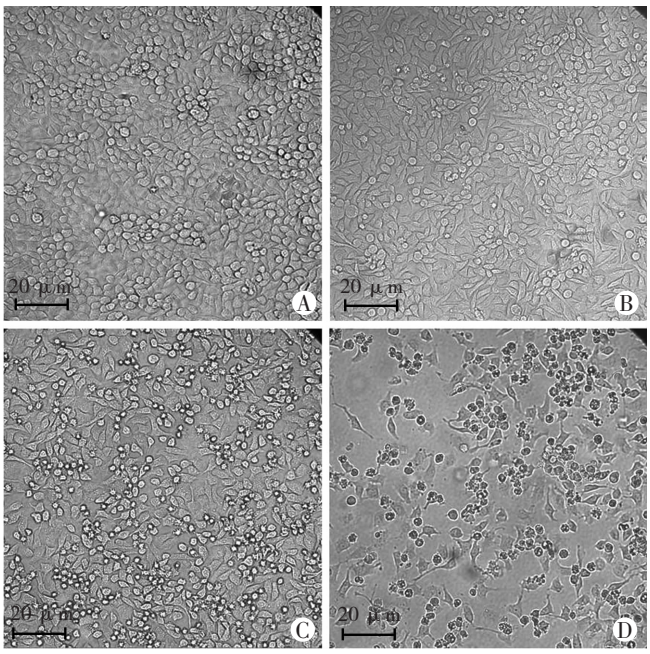
1.3 统计学方法

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。检验水准 =0.05。

2 结果

2.1 DCA 显著增强 THP 对 HCC 细胞的杀伤效果

显微镜观察可见(图 1),THP(200 μmol/L)单独处理 24 h 可明显影响 HepG2 细胞的生长状态,表现为细胞贴壁能力下降,细胞形态改变, DCA(40 μmol/L)单独处理 24 h 对细胞形态改变不大,而 THP(200 μmol/L)与 DCA(40 μmol/L)联合处理 24 h 则导致细胞数量显著降低,细胞贴壁能力进一步下降,细胞形态受损。CCK-8 实验结果也进一步表明 THP 可剂量依赖性地抑制 HepG2 细胞的增殖,DCA(40 μmol/L)单独处理 24 h 对细胞增殖影响不大,但 DCA(40 μmol/L)与不同浓度的 THP(200、400、600、800 μmol/L)联合处理 24 h 后均显著增强了 THP 对细胞的杀伤效应($P < 0.05$)(图 2)。

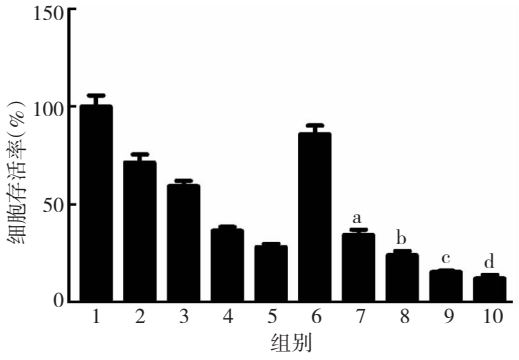


A:对照组;B:DCA(40 μmol/L)处理组;C:THP(200 μmol/L)处理组;D:DCA(40 μmol/L)、THP(200 μmol/L)联合处理组

图 1 倒置相差显微镜下观察不同处理对细胞形态的影响

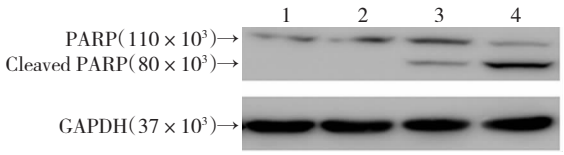
2.2 DCA 促进 THP 诱导的肝癌细胞凋亡

有研究表明 THP 主要通过诱导凋亡来杀伤肿瘤细胞,那么 DCA 是否是通过增加细胞凋亡从而增强了 HepG2 细胞对 THP 的敏感性[8-9]。本研究进一步分析了 THP 及 DCA 处理对凋亡相关蛋白 PARP 的影响。如图 3 所示,THP 单独处理细胞 24 h 可使凋亡标志蛋白 PARP 的切除有所增加,而 DCA 和 THP 联合作用 24 h 后进一步增强了此效应,提示两药联用可显著增加细胞的凋亡。



1:对照组;2:THP(200 μmol/L)处理组;3:THP(400 μmol/L)处理组;4:THP(600 μmol/L)处理组;5:THP(800 μmol/L)处理组;6:DCA(40 μmol/L)处理组;7:DCA(40 μmol/L)、THP(200 μmol/L)联合处理组;8:DCA(40 μmol/L)、THP(400 μmol/L)联合处理组;9:DCA(40 μmol/L)、THP(600 μmol/L)联合处理组;10:DCA(40 μmol/L)、THP(800 μmol/L)联合处理组;a:$P < 0.05$,与第 2 组比较;b:$P < 0.01$,与第 3 组比较;c:$P < 0.01$,与第 4 组比较;d:$P < 0.05$,与第 5 组比较

图 2 CCK-8 检测 DCA 可显著增强不同浓度 THP 对细胞的杀伤效应



1:对照组;2:DCA(40 μmol/L)处理组;3:THP(600 μmol/L)处理组;4:DCA(40 μmol/L)、THP(600 μmol/L)联合处理组

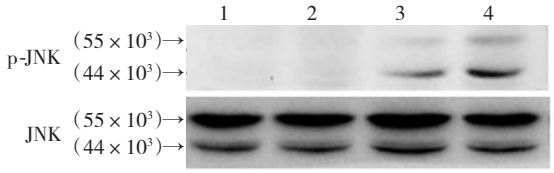
图 3 Western-blot 检测 DCA 促进 THP 诱导的肝癌细胞凋亡

2.3 DCA 增加了 THP 介导的 ROS 升高

为进一步探讨 THP 及 DCA 联合处理诱导 HepG2 细胞发生凋亡的机制,本研究分析了细胞中 ROS 水平的变化。结果表明,用 THP 单独处理可引起细胞内 ROS 含量增加,而 THP 与 DCA 联合处理则进一步显著增强了 HepG2 细胞内的 ROS 水平,且与 THP 单独处理组相比具有统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 DCA 联合 THP 显著增强了 JNK 的活化水平

由于 JNK 激酶是 ROS 升高后诱导细胞凋亡发生的一个重要分子,本研究继续检测了 THP 及 DCA 联合处理对 JNK 激酶的活化情况。结果表明(图 4),THP 单独及与 DCA 联合处理对总的 JNK 蛋白表达量无明显影响,而 THP 单独处理可使 JNK 的磷酸化水平(p-JNK)增加,而联合 DCA 以后,p-JNK 的活化水平进一步增强。

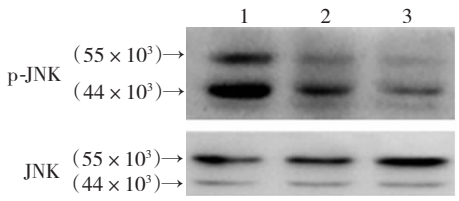


1:对照组;2:DCA(40 μmol/L)处理组;3:THP(600 μmol/L)处理组;4:DCA (40μmol/L)、THP(600 μmol/L)联合处理组

图 4 Westernblot 检测 DCA 联合 THP 显著增强了 JNK 的活化水平

2.5 DCA 联合 THP 所介导的 JNK 活化增强依赖于 ROS 的升高

为进一步明确 ROS 水平升高与 JNK 激活之间的关系,本研究用抗氧化剂 NAC(5 mmol/L)联合处理 HepG2 细胞,同时以 JNK 激酶抑制剂 SP600125(10 μmol/L)作为阳性对照。结果表明(图 5),NAC 或 SP600125 联合处理均可明显降低 P-JNK 水平,从而证实 DCA 联合 THP 所引进的 JNK 活化依赖于细胞内 ROS 的升高。



1:THP 与 DCA 联合处理组;2:NAC 与 THP、DCA 联合处理组;3:SP600125 与 THP、DCA 联合处理组

图 5 Westernblot 检测 DCA 联合 THP 所引起的 JNK 活化增强依赖于 ROS 的升高

3 讨论

盐酸吡柔比星(THP)是阿霉素的一种衍生物,通过产生过量的活性氧(ROS)破坏肿瘤的生长,目前是临床上治疗恶性血液系统肿瘤的一线用药。研究表明,THP 对乳腺癌、卵巢癌等实体肿瘤也有很好的治疗效果。但目前 THP 用于肝癌治疗的报道还很少。根据 He[10]等的报道,THP 与 5-氟尿嘧啶联合可以有效杀伤肝癌细胞,这与本研究结果类似。二氯乙酸盐(DCA)也是近年来对肿瘤治疗效果良好的一种化疗药物。但有关二者联合应用对于肿瘤的杀伤效果还未见报道。本实验首次发现了 THP 联合 DCA 呈现了显著地抗 HCC 效应,相关的机制与 ROS/JNK 通路的活化密切相关。

活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)是生物有氧代谢过程中产生的一类活性含氧化合物的总称,作为细胞内的一种信号分子,ROS 广泛地参与了细胞内信号通路的调节[11-12]。适度的 ROS 在促进肿瘤细胞恶性表型的转化以及快速增殖的过程中均发挥了积极的作用,而过度累积的 ROS 也可导致细胞的死亡[13-14]。随着肝癌的进展,ROS 生产过剩或长期的氧化应激反应会诱导细胞凋亡或预防癌症发展肝细胞癌。因此,调节体内平衡的活性氧或氧化应激反应已成为一个重要的治疗肝细胞癌的策略。之前研究表明 ROS 可通过多种途径激活 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun NH2-terminal kinase,JNK),而 ROS 介导的 JNK 持续激活会引起线粒体途径介导的细胞凋亡[15]。JNK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族成员,能有效地磷酸化 c-Jun 的氨基末端并激活 c-Jun,是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。JNK 激活后可以通过转录因子 AP-1 促进一些促凋亡蛋白的表达。高表达的促凋亡蛋白又会作用于线粒体,促使细胞色素 C 释放入胞浆,细胞色素 C 和 Caspase-9 结合,最终使 Caspase-3 活化,从而诱发细胞凋亡[16-17]。

近年来,DCA 在抗肿瘤方面的应用日渐广泛,DCA 可以激活丙酮酸脱氢酶从而促使丙酮酸进入线粒体,增加了糖有氧代谢,将线粒体膜电位水平恢复接近至非肿瘤细胞,这个过程并不影响正常的非肿瘤细胞。依靠这个过程,ROS 生成增多,凋亡诱导因子等从线粒体中释放,从而介导细胞凋亡[18-19]。

参考文献:

[1] Liao Y J, Bai H Y, Li Z H, *et al*. Longikaurin A, a natural ent-kaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1137. DOI:10.1038/cddis.2014.66

[2] Chai Z T, Zhu X D, Ao J Y, *et al*. microRNA-26a suppresses recruitment of macrophages by down-regulating macro-

phage colony-stimulating factor expression through the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8: 56. DOI:10.1186/s13045-015-0150-4

[3] Daruwalla J, Greish K, Malcontenti-Wilson C, *et al*. Styrene maleic acid copolymer-pirarubicin induces tumor-selective oxidative stress and decreases tumor hypoxia as possible treatment of colorectal cancer liver metastases[J]. Surgery, 2015, 158(1): 236-247. DOI:10.1016/j.surg.2015.03.019

[4] Choi Y W, Lim I K. Sensitization of metformin-cytotoxicity by dichloroacetate via reprogramming glucose metabolism in cancer cells[J]. Cancer Lett, 2014, 346(2): 300-308. DOI:10.1016/j.canlet.2014.01.015

[5] 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

[6] 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.

[7] 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

[8] Liu S Y, Song S X, Lin L, *et al*. Molecular mechanism of cell apoptosis by paclitaxel and pirarubicin in a human osteosarcoma cell line[J]. Chemotherapy, 2010, 56(2): 101-107.

[9] 钱正子, 王华庆, 付凯, 等. 硼替佐米与吡喃阿霉素联合对T细胞淋巴瘤细胞系Hut78细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(1): 47-51.

[10] He X, Li J, Guo W, *et al*. Targeting the microRNA-21/AP1 axis by 5-fluorouracil and pirarubicin in human hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(4): 2302-2314.

[11] Rodrigo-Moreno A, Poschenrieder C, Shabala S. Transition metals: a double edge sward in ROS generation and signaling[J]. Plant Signal Behav, 2013, 8(3): e23425.

[12] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Curr Biol, 2014, 24(10): R453-R462. DOI:10.1016/j.cub.2014.03.034

[13] Bauer G. Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells[J]. Anticancer Res, 2014, 34(4): 1467-1482.

[14] Monks T J, Xie R, Tikoo K, *et al*. Ros-induced histone modifications and their role in cell survival and cell death[J]. Drug Metab Rev, 2006, 38(4): 755-767.

[15] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology[J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(1): 30-38.

[16] Zhang Y, Liao H, Zhong S, *et al*. Effect of N-n-butyl haloperidol iodide on ROS/JNK/Egr-1 signaling in H9c2 cells after hypoxia/reoxygenation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 11809. DOI:10.1038/srep11809

[17] 王宏婷, 王存琴. 27-O-(E)-香豆酰基-乌索酸通过调控JNK/SAPK通路诱导人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞凋亡[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 722-726.

[18] Haugrud A B, Zhuang Y, Coppock J D, *et al*. Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 147(3): 539-550. DOI:10.1007/s10549-014-3128-y

[19] Kumar K, Wigfield S, Gee H E, *et al*. Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts[J]. J Mol Med (Berl), 2013, 91(6): 749-758. DOI:10.1007/s00109-013-0996-2

(**收稿**:2015-07-30;**修回**:2015-09-30)

(编辑 栾 嘉)