DOI:10.16016/j.2097-0927.202201233

胆红素上调 PPARα/CPT1A 降低 Huh7 细胞对索拉非尼的敏感性

谭 君,张 弛,董 严,梁后杰 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院肿瘤科

[摘要] **目的** 观察胆红素(bilirubin,Bil)对索拉非尼(sorafenib,Sor)治疗肝癌效果的影响,并探讨其可能机制。**方法** 体外实验:用不同浓度的 Sor(0、2、4、8、16、32 μmol/L)、Bil(0、2.5、5、10、20、40 μmol/L)及不同浓度 Sor+Bil(20 μmol/L)培养 Huh7 细胞系不同时间(24、48、72 h)后,通过 CCK-8 法检测细胞活力。采用 Sor(4 μmol/L)、Bil(20 μmol/L)、Sor(4 μmol/L)+Bil(20 μmol/L)处理 Huh7 细胞,48 h 后用流式细胞仪检测细胞周期,14 d 后通过克隆形成实验检测药物对细胞增殖的影响。体内实验:取 16 只裸鼠构建 Huh7 细胞异种移植瘤模型,按 S 型抽样方法将裸鼠分为 Con 组、Bil 组(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})、Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})组、Bil(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})+Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})组,每组各 4 只,并进行相应处理。通过 Western blot 和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测各组过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARα)、肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A(carnitine palmityl transferase 1A, CPT1A)的表达量。加入 CPT1A 抑制剂乙莫克舍(etomoxir,Eto)后,通过 CCK-8、克隆形成实验验证 Bil 削弱 Sor 对肝癌细胞的增殖抑制与 PPARα/CPT1A 的相关性。**结果** CCK-8 结果显示,Sor 对 Huh7 细胞的增殖抑制效应呈现剂量和时间依赖($P<0.05$),Bil 对 Huh7 细胞活力没有明显影响($P>0.05$)。与单独 Sor 处理组相比,Bil+Sor 组细胞增殖活力增加,细胞克隆数目较多($P<0.05$),细胞在 S 期的数目减少($P<0.05$)。体内实验结果显示:Sor 组肿瘤体积和质量小于 Con 组($P<0.05$),Bil+Sor 组肿瘤体积和质量大于 Sor 组($P<0.05$)。Western blot 和 RT-qPCR 结果显示:与 Sor 组相比,Bil+Sor 组 PPARα、CPT1A 的表达增多($P<0.05$)。与 Bil+Sor 组相比,加入 Eto 后,Bil+Sor+Eto 组细胞增殖活力降低($P<0.05$),细胞克隆数目减少($P<0.05$)。**结论** 胆红素通过 PPARα/CPT1A 介导脂肪酸氧化削弱索拉非尼的抗肿瘤效果。

[关键词] 肝癌;索拉非尼;胆红素;脂肪酸氧化;PPARα/CPT1A
[中图法分类号] R735.7; R963; R979.1 [文献标志码] A

Bilirubin impairs the sorafenib sensitivity in Huh7 cells through fatty acid oxidation by up-regulating PPARα/CPT1A

TAN Jun, ZHANG Chi, DONG Yan, LIANG Houjie Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] Objective To observe the effect of bilirubin (Bil) on sorafenib (Sor) in the treatment of liver cancer and explore the involved molecular mechanisms. Methods *In vitro*, Huh7 cells were treated with different concentration of Sor (0, 2, 4, 8, 16, 32 μmol/L), of Bil (0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μmol/L) and of Sor (0, 2, 4, 8, 16, 32 μmol/L) +Bil (20 μmol/L) for 24, 48 and 72 h. Cell viability was detected by CCK-8 assay. Huh7 cells were treated with Sor (4 μmol/L), Bil (20 μmol/L) and Sor (4 μmol/L)+Bil (20 μmol/L), cell cycle was detected by flow cytometry after 48 h, and the effects of drugs on cell

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81803028)
[通信作者] 梁后杰,E-mail: lianghoujie@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

proliferation were detected by clone formation assay after 14 d. *In vivo*, 16 mice bearing xenografts of Huh7 cells were divided into Con group, Bil group (25 mg·kg^{-1}·d^{-1}), Sor group (15 mg·kg^{-1}·d^{-1}) and Bil (25 mg·kg^{-1}·d^{-1})+Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1}) group (n=4), according to the S type sampling method. The expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor (PPARα) and carnitine palmityl transferase 1A (CPT1A) were detected by Western blotting and real time PCR. After etomoxir (Eto), the inhibitor of CPT1A, was added, CCK-8 and clone formation assay were used to verify the mechanisms correlated with PPARα/CPT1A. **Results** CCK-8 results showed that the inhibitory effect of Sor on Huh7 cells was in a dose and time-dependent manner ($P<0.05$), and Bil had no significant effect on Huh7 cells ($P>0.05$). Compared with Sor group, the cell proliferation in Bil+Sor group was increased ($P<0.05$), the relative cell colony formation rate was grown ($P<0.05$), and the number of cells in S phase was decreased ($P<0.05$). *In vivo*, results showed that the tumor volume and weight of Sor group were lower than that of Con group ($P<0.05$), and the tumor volume and weight of Bil+Sor group were higher than those of Sor group ($P<0.05$). Western blotting and RT-qPCR results showed that PPARα and CPT1A expression levels were increased in Bil+Sor group compared with Sor group ($P<0.05$). After Eto was added, the cell proliferation and the relative cell clone formation rate of Bil+Sor+Eto group were decreased compared with Bil+Sor group ($P<0.05$). **Conclusion** Bil impairs the antitumor effects of sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma through fatty oxidation by up-regulating PPARα/CPT1A.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; sorafenib; bilirubin; fatty acid oxidation; PPARα/CPT1A

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81803028). Corresponding author: LIANG Houjie, E-mail: lianghoujie@sina.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是目前癌症相关死亡的第三大原因,并且持续处于高发生率和高死亡率。目前对于肝癌的治疗手段包括手术、化疗、放疗、生物靶向治疗等;对于晚期肝癌患者,目前缺乏有效的治疗手段[1]。索拉非尼(sorafenib, Sor)是一种小分子药物,可抑制肿瘤细胞增殖和肿瘤血管生成,并在多种肿瘤模型中增加肿瘤细胞的凋亡率[2]。它通过抑制丝氨酸-苏氨酸激酶(Raf-1、B-Raf)以及血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factors receptors, VEGFRs)和血小板衍生生长因子受体β(platelet-derived growth factor receptor β, PDGFR-β)的受体酪氨酸激酶活性发挥作用,是治疗晚期肝癌的一线药物[2]。胆红素(bilirubin, Bil)是血液中衰老红细胞分解代谢的产物,在健康的肝细胞中胆红素可与葡萄糖醛酸结合并排泄到肠道。在肝细胞损伤的情况下,胆红素可以释放到血液中,与血清白蛋白紧密结合,因此,血胆红素水平在临床上也被用作肝功能的重要预测指标[3]。最近的研究发现,胆红素能够结合到过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARα)上,发挥代谢功能[4]。PPARα通过上调在过氧化物酶体和线粒体中的脂肪酸转运蛋白从而促进摄取、利用、代谢脂肪酸。

研究表明,升高的胆红素是索拉非尼治疗肝癌预后的一个不良预测因子[5-6]。但胆红素是否会影响索拉非尼对肝癌的治疗效果目前尚不清楚。本研究以人肝癌细胞株(Huh7细胞株)为研究对象,观察胆红素对索拉非尼诱导肝癌细胞凋亡的影响,并探讨胆红素发挥作用与PPARα/CPT1A信号途径的关系,为肝癌的防治提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

胎牛血清购自ABW公司;结晶紫染色液、RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS PAGE蛋白上样缓冲液均购自碧云天公司;二甲基亚砜、CCK-8试剂盒购自索莱宝公司;兔抗人CPT1A、PPARα、β-actin抗体购自三鹰抗体公司;山羊抗兔二抗及山羊抗鼠抗体购自Affinity公司;PCR引物购自上海生工;逆转录试剂盒、SYBR Green购自Vazyme公司;细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自贝博公司;胆红素、索拉非尼、乙莫克舍(etomoxir, Eto)、PEG400均购自上海陶术生物技术有限公司;DMEM培养基、青链霉素溶液(×100)、0.25%胰蛋白酶均购自HyClone公司;PVDF膜购自赛默飞公司。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞 Huh7 细胞购自 American Type Culture Collection(ATCC)。用含有 10%胎牛血清和 1%青链霉素培养基的 DMEM 培养基放在 37 ℃、含 5%CO_2 的孵箱中培养。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

将 Huh7 细胞以 3 000/孔接种在 96 孔板上。24 h 后,Sor(0、2、4、8、16、32 μmol/L)、Bil(0、2.5、5、10、20、40 μmol/L)分别处理 Huh7 细胞 24、48、72 h;随后将两者一起共同培养 Huh7 细胞(0、2、4、8、16、32 μmol/L 的 Sor 分别加 20 μmol/L Bil)孵育 48 h,用 PBS 洗 2 遍,每孔加入 10 μL CCK-8 染料溶液与 90 μL DMEM 混合液,在 37 ℃下培养 2 h。使用酶标仪读取波长 450 nm 处的光密度值[$D(450)$]。细胞存活率计算公式如下。

细胞存活率=[$D(450)_{药物处理样品}-D(450)_{空白样本}$]/[$D(450)_{对照样品}-D(450)_{空白样本}$]×100%

1.4 克隆形成实验

Huh7 细胞按 1 500/孔接种于 6 孔板中,贴壁培养 24 h。分别设置 Bil(0、10 和 20 μmol/L)和 Bil(0、10 和 20 μmol/L)+4 μmol/L Sor 培养;每隔 3 d 换液 1 次,维持药物浓度,直到出现肉眼可见的细胞集落后,用甲醇固定 15 min,结晶紫染色 5 min 后拍照。

1.5 细胞周期与细胞凋亡检测实验

Huh7 细胞按约 5×10^4/孔接种于 96 孔板中,贴壁 24 h 后用无血清的 DMEM 培养 16 h,设置 4 组,分别为:Con 组、Bil 组(20 μmol/L)、Sor 组(4 μmol/L)、Bil(20 μmol/L)+Sor(4 μmol/L)组,培养 48 h。细胞周期实验:用 PBS 洗 2 遍,胰酶消化细胞后离心,用冷 PBS 洗 2 遍后,重新加入 500 μL 冷 PBS 重悬细胞,随后缓慢滴加 1 500 μL 预冷的无水乙醇,达到无水乙醇的终浓度为 75%,4 ℃过夜。离心沉淀细胞后,再用冷 PBS 洗 1 次;500 μL 冷 PBS 重悬细胞后加入 20 μL Rnase A 37 ℃水浴 30 min,400 目网筛过滤。加入 400 μL PI 染液,轻轻混匀后 4 ℃避光孵育 1 h;上机,最大激发波长为 488 nm。

1.6 裸鼠异种移植瘤模型

雄性 BALB/c 裸鼠 16 只(5~6 周龄,体质量 20~22 g),收集培养的 Huh7 细胞并重悬于 PBS 中,然后皮下注射 100 μL(含 2×10^6 个 Huh7 细胞)细胞悬液于裸鼠的右腹股沟。植瘤 10 d 后,按 S 型抽样方法,分为 4 组:Con 组、Bil 组(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})、Sor 组(15 mg·kg^{-1}·d^{-1}),Bil(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})+Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})联用组,每组 4 只,给药方式均采用腹腔注射。监测动物活动及一般状况,每 3 天测量 1 次裸鼠体质量和肿瘤大小,并根据公式计算肿瘤体积。肿瘤体积=($a\times b^2$)/2(a 为长边,b 为短边)。药物干预 24 d 后,处死小鼠,取肿瘤称量。

1.7 Western blot 检测

将药物处理过的细胞用冷 PBS 洗 2 遍,加入适量的 RIPA 裂解液在冰上分别提取 Con 组、Bil 组、Sor 组、Bil+Sor 组的细胞。用碧云天 BCA 浓度试剂盒检测蛋白浓度后,每孔按照 25 μg、10 μL 体系进行上样;用 80 V 电泳 20 min,随后用 120 V 电压电泳,当蛋白上样缓冲液到玻璃板底即停止。随后进行转膜。PVDF 孔径为 0.45 μm,甲醇激发,然后恒流 250 mA、90 min 在冰水混合物中转膜。转膜完毕,用 5%BSA 在摇床上室温封闭 2 h。CPT1A(1∶1 000)、PPARα(1∶1 000)、β-actin(1∶5 000)按比例配置后 4 ℃摇床过夜,PBST 洗 3 次,每次 5 min,第 2 天用 Affinity 二抗(1∶5 000)室温孵育 2 h,PBST 洗 3 次,每次 5 min,用碧云天高敏 ECL 显影液在机器上曝光。

1.8 荧光定量 PCR 检测

将药物处理过的细胞用 PBS 洗 2 遍,6 孔板每孔加入 1 mL TRIzol,随后用 TRIzol 法提取总 RNA,用分光光度计测量 RNA 浓度,随后按照诺维赞反转录说明书进行反转录。反转录完毕进行荧光定量 PCR。CPT1A 上游:5′-GAGTGCCAGGAGGTCATAGATGC-3′,下游:5′-CAGTCTCTGTCCTCCCTTCTCG-3′;ACOX1 上游:5′-CTTGCTTCACCAGGCAACTG -3′,下游:5′-CTGTCTGGGCATAAGTGCCA-3′;PPARα 上游:5′-GATGCGCTGACAGATGGAGA-3′,下游:5′-TAGAGACGGCTCTTCTGCCT-3′;GAPDH 上游:5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′,下游:5′-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad prism 8.3.0 进行统计分析。实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Bil 对 Sor 诱导的肝癌细胞生长活力的影响

首先,以不同浓度 Sor(0、2、4、8、16、32 μmol/L)处理 Huh7 细胞株 24、48、72 h 后,CCK-8 法结果显示:随着 Sor 作用时间和浓度的增加,细胞活力下降,呈明显的时间和剂量依赖关系($P<0.05$,图 1A)。其次,以不同浓度 Bil(0、2.5、5、10、20、40 μmol/L)处理 Huh7 细胞株 24、48、72 h 后,CCK-8 法结果显示:随着 Bil 作用时间和浓度的增加,细胞活力无明显变化(图 1B)。随后,以不同浓度 Sor(0、2、4、8、16、32 μmol/L)与 Bil

(20 μmol/L)共同处理 Huh7 细胞 48 h,CCK-8 法结果显示:与单用 Sor 相比,Bil+Sor 细胞活力增加($P<0.05$,图 1C)。

2.2　Bil 对 Sor 诱导的细胞增殖抑制的影响

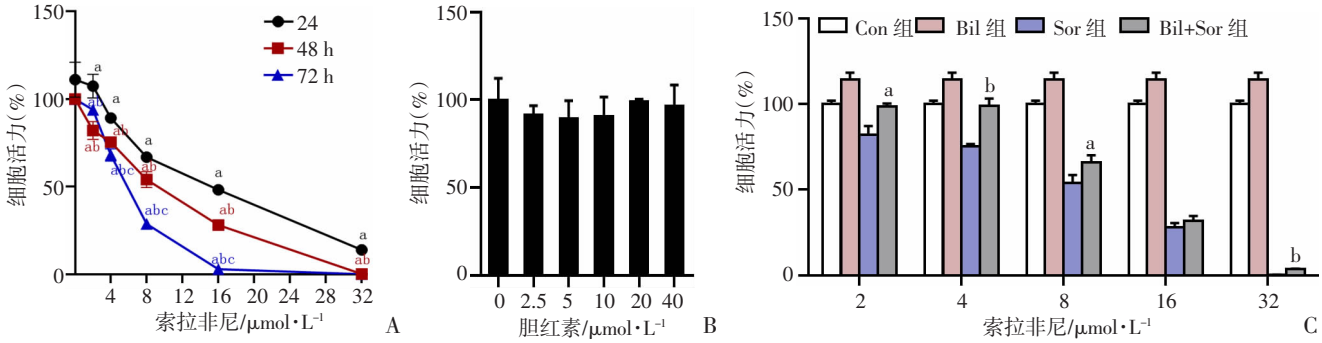
以不同浓度 Bil(0、10、20 μmol/L)、Bil(0、10、20 μmol/L)联合 4 μmol/L Sor 处理 Huh7 细胞 14 d,克隆形成实验结果显示:与 Con 组相比,单用 Sor 组的细胞克隆数减少($P<0.01$,图 2)。与单用 Sor 组相比,Bil+Sor 组细胞克隆数增多($P<0.05$,图 2)。

2.3　Bil 对 Sor 诱导的肝癌细胞周期的影响

为了探究 Bil 减弱 Sor 诱导的肝癌细胞生长抑制作用与细胞周期调控的相关性,采用流式细胞仪进行检测分析。结果显示,各组细胞处理 48 h 后,与 Sor 组相比,Bil+Sor 组 S 期细胞数目减少($P<0.05$,图 3)。

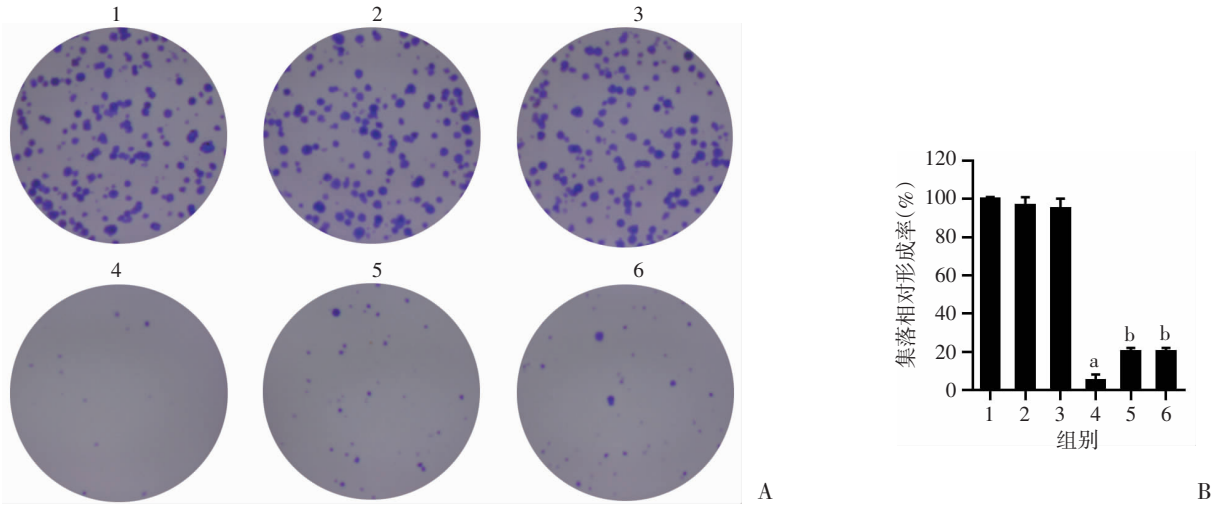
2.4　Bil 对 Sor 诱导的肝癌细胞体内生长抑制作用的影响

为了进一步研究 Bil 是否能在体内消除 Sor 的抗癌作用,以 Huh7 细胞(2×10^6)皮下注射到 5~6 周无胸腺裸鼠体内,Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})、Bil(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})或 Bil(25 mg·kg^{-1}·d^{-1})联合 Sor(15 mg·kg^{-1}·d^{-1})处理。结果显示,Sor 组的肿瘤体积和质量、肿瘤生长速率均低于 Con 组($P<0.01$,图 4),并且这种抗肿瘤作用在体内被 Bil 治疗逆转($P<0.05$,图 4)。



A:不同 Sor 浓度对 Huh7 细胞活力的影响　a:$P<0.05$,与同时间点前一浓度比较;b:$P<0.05$,与同浓度 24 h 比较;c:$P<0.05$,与同浓度 48 h 比较;B:不同 Bil 浓度对 Huh7 细胞活力的影响;C:不同浓度 Sor 浓度联合 20 μmol/L Bil 对 Huh7 细胞活力的影响　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Sor 组比较

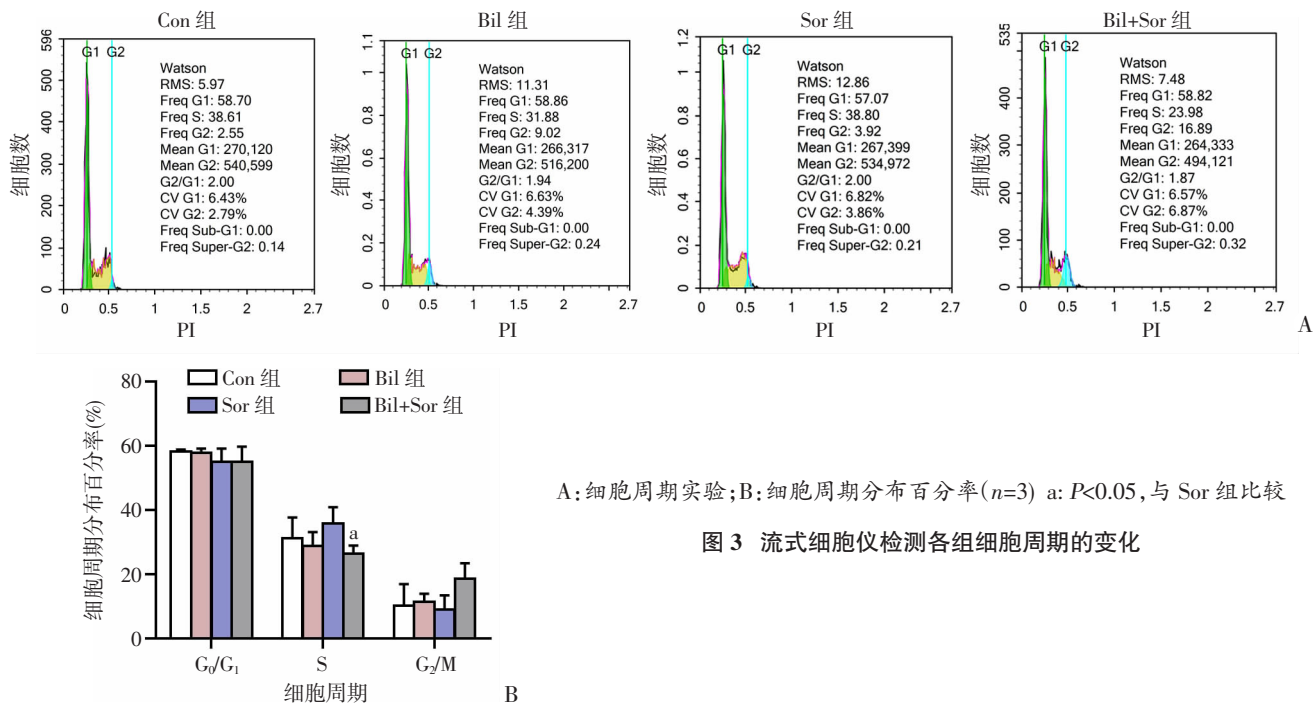
图 1　CCK-8 法检测不同浓度 Sor、Bil 及 Bil+Sor 对人肝癌细胞系 Huh7 活力的影响　($n=4$)



1:Con 组;2:10 μmol/L Bil 组;3:20 μmol/L Bil 组;4:4 μmol/L Sor 组;5:10 μmol/L Bil+Sor 4 μmol/L 组;6:20 μmol/LBil+Sor 4 μmol/L 组　a:$P<0.01$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 Sor 组比较

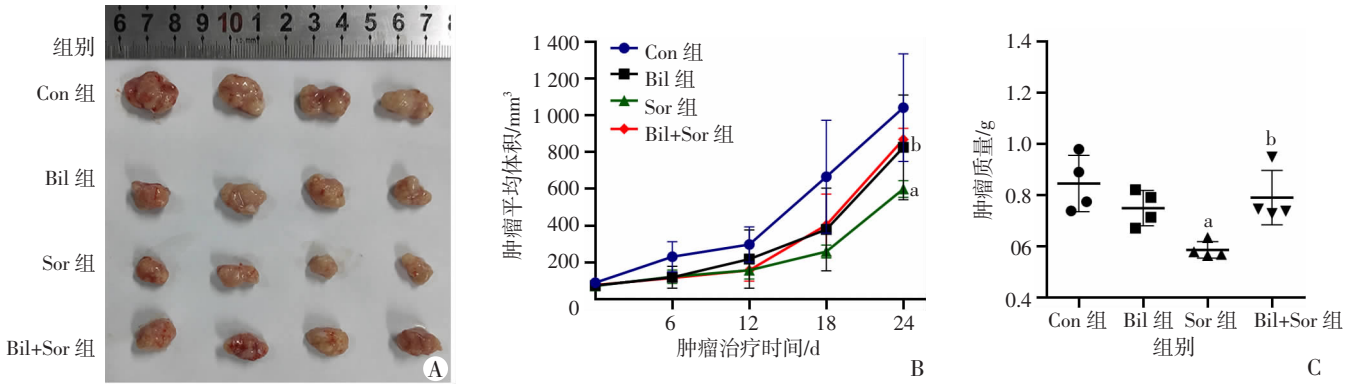
A:克隆形成实验;B:细胞克隆相对形成率($n=3$)

图 2　克隆形成实验检测各组细胞增殖的情况



A:细胞周期实验;B:细胞周期分布百分率(n=3) a: P<0.05,与 Sor 组比较

图 3 流式细胞仪检测各组细胞周期的变化



A:裸鼠成瘤实验;B:肿瘤生长曲线;C:肿瘤质量 a: P<0.01,与 Con 组比较;b: P<0.05,与 Sor 组比较

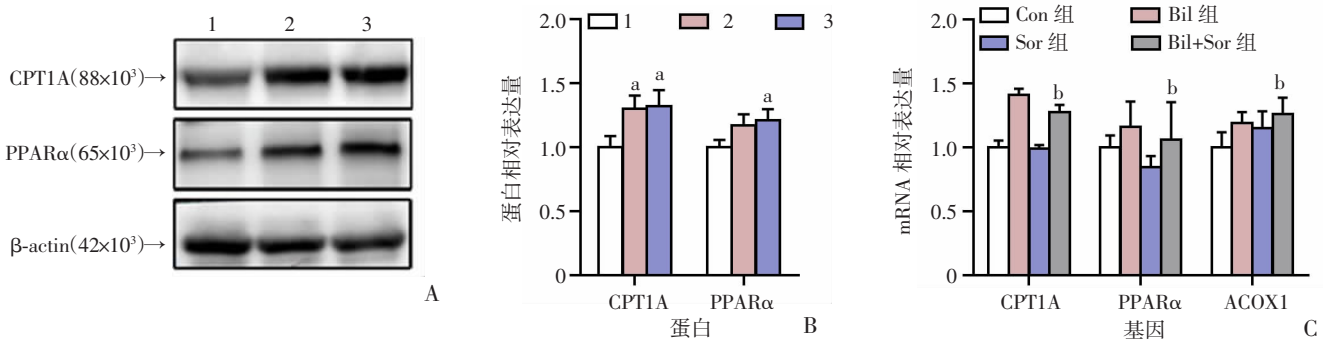
图 4 裸鼠成瘤实验观测各组体内肝癌生长情况

2.5 Bil 损害 Sor 诱导的肝癌细胞的生长抑制作用与激活 PPARα/CPT1A 有关

为了验证 Bil 削弱 Sor 诱导的肝癌细胞的生长抑制作用与脂肪酸氧化的相关性。通过检测是否共处理 Bil 情况下,Sor 处理的 Huh7 细胞中脂肪酸氧化关键酶 PPARα、CPT1A 表达情况。Western blot 检测结果显示,与单用 Sor 组相比,Bil+Sor 组 PPARα、CPT1A 的表达量增加(P<0.05,图 5A、B)。荧光定量 PCR 结果也显示,与 Sor 组相比,Bil+Sor 组 Huh7 细胞的 PPARα、CPT1A、ACOX1 的 mRNA 相对表达量明显升高(P<0.01,图 5C)。

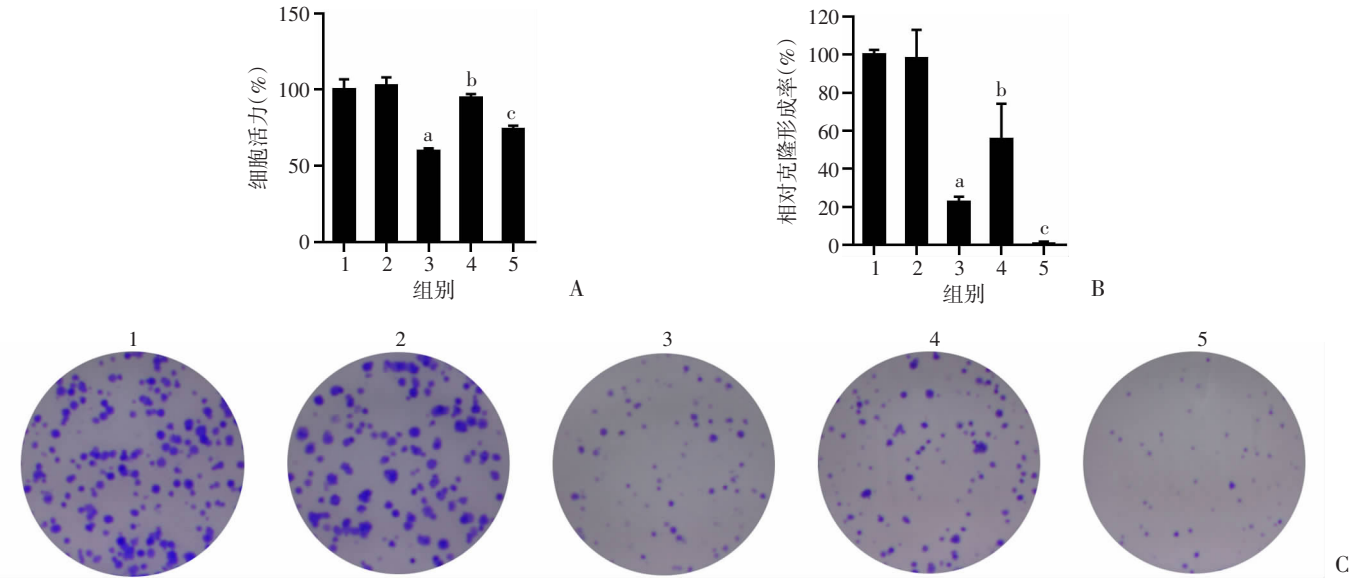
2.6 PPARα/CPT1A 参与胆红素减弱索拉非尼诱导的肝癌细胞的生长抑制作用

为了进一步验证 Bil 降低 Huh7 细胞对 Sor 的敏感性是否与 PPARα/CPT1A 有关。CPT1A 抑制剂 Eto(75 μmol/L)与 Sor(4 μmol/L)和 Bil(10 μmol/L)共处理后,再次检测细胞增殖及克隆形成情况。结果显示:与 Con 组相比,Sor 组细胞活力和克隆形成率均明显降低(P<0.01,图 6);而 Bil+Sor 组细胞活力和克隆形成率较 Sor 组明显升高(P<0.01,图 6);而 Bil+Sor+Eto 组细胞活力和克隆形成率较 Bil+Sor 组明显降低(P<0.05,图 6)。



A、B:Western blot 检测蛋白表达及半定量分析 1:Sor(4 μmol/L)组;2:Bil(10 μmol/L)+Sor(4 μmol/L)组;3:Bil(20 μmol/L)+Sor(4 μmol/L)组 a:$P<0.05$,与 Sor 组(4 μmol/L)比较;C:荧光定量 PCR 检测脂肪酸氧化相关关键基因 CPT1A、PPARα、ACOX1 的 mRNA 表达 b:$P<0.01$,与 Sor 组比较

图 5 各组脂肪酸氧化相关基因在蛋白及 mRNA 水平表达情况



A:CCK-8 检测加入 CPT1A 抑制剂后细胞活力;B:相对集落形成率 1:Con 组;2:Eto 组;3:Sor 组;4:Bil+Sor 组;5:Bil+Sor+Eto 组 a:$P<0.01$,与 Con 组比较;b:$P<0.01$,与 Sor 组比较;c:$P<0.05$,与 Bil+Sor 组比较;C:加入 CPT1A 抑制剂后细胞克隆形成能力检测

图 6 加入 CPT1A 抑制剂后细胞活力、克隆形成能力的变化

3 讨论

本研究通过体内外实验探讨胆红素在索拉非尼诱导的肝癌细胞增殖抑制中的作用。结果表明,胆红素减弱 Huh7 细胞在体内外对索拉非尼的敏感性。此外,实验结果进一步表明 PPARα/CPT1A 信号通路可能参与了胆红素减弱索拉非尼诱导的生长抑制作用;并且在胆红素存在下,使用 CPT1A 抑制剂增强索拉非尼诱导的 HCC 细胞凋亡。这些发现提示在胆红素升高的患者中,联合使用 CPT1A 抑制剂和索拉非尼对 HCC 患者可能具有一定的治疗价值。

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,已被临床批准用于治疗晚期 HCC 患者。然而,与索拉非尼治疗相关的生存益处约 3 个月[1-2]。而进展期肝癌在一般情况下都会有肝功能障碍,伴随胆红素升高[7]。本研究发现,使用不同浓度索拉非尼作用肝癌细胞时,加用胆红素处理,细胞活力增加 10%~35%。这表明在胆红素存在条件下,HCC 细胞对索拉非尼的敏感性减弱。

能量代谢的重新编程已经被认为是癌症的一个重要标志[8-9]。癌细胞将有氧糖酵解作为主要的能量来源,也可以利用其他物质如谷氨酰胺、脂肪酸等提供三磷酸腺苷(ATP)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)和癌细胞中其他重要大分子合成代谢物质[10-12]。在 β-连环蛋白突变的肝癌、膀胱癌以及白血病的发生过程中观察到脂肪酸吸收和脂肪酸氧化(FAO)增强,并且在膀胱癌和急性白血病中使用 CPT1A 抑制剂能

够抑制其增殖[13-15]。胆红素由体内衰老红细胞产生,很长一段时间被认为是肝脏疾病的潜在危险信号[3]。最近的研究显示胆红素也可以作为过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARα)的激动剂[16]。PPARα是一种核受体,通过配体激活与数千个基因的启动子结合,以增加脂肪燃烧,减少脂肪储存[17]。PPARα通过调控转运脂肪酸进入线粒体进行β氧化对关键靶基因CPT1A发挥作用。乙莫克舍是CPT1A的抑制剂,已经用于心脏病和糖尿病的治疗,可以不可逆的抑制CPT1A的表达[18]。本研究通过Western blot和RT-qPCR探讨了胆红素减弱索拉非尼对HCC生长抑制的分子机制,胆红素可以增加索拉非尼治疗下PPARα、CPT1A的表达,相反,加入CPT1A抑制剂后,CCK-8实验和集落形成实验显示:乙莫克舍阻断了胆红素与索拉非尼潜在的分子机制方面的联系,使HCC细胞对索拉非尼敏感性增加。

综上所述,本研究结果表明,胆红素作为一个代谢调控物,通过促进脂肪酸氧化,从而减弱索拉非尼对肝癌的疗效,同时发现靶向脂肪酸氧化通路PPARα/CPT1A可以提高索拉非尼对肝癌细胞的抑制作用。但还需要更多的应用及毒理学研究来阐明联用效果、机制及毒副作用,将有助于在胆红素升高情况下增加晚期肝癌患者对索拉非尼的敏感性提供新的证据。

参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GlOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA A Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] ZIOGAS I A, TSOULFAS G. Evolving role of sorafenib in the management of hepatocellular carcinoma[J]. World J Clin Oncol, 2017, 8(3): 203-213. DOI: 10.5306/wjco.v8.i3.203.

[3] HAMOUD A R, WEAVER L, STEC D E, *et al*. Bilirubin in the liver-gut signaling axis[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(3): 140-150. DOI: 10.1016/j.tem.2018.01.002.

[4] STEC D E, JOHN K, TRABBIC C J, *et al*. Bilirubin binding to PPARα inhibits lipid accumulation[J]. PloS ONE, 2016, 11(4): e0153427. DOI: 10.1371/journal.pone.0153427.

[5] KUO Y H, WANG J H, HUNG C H, *et al*. Albumin-bilirubin grade predicts prognosis of HCC patients with sorafenib use[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2017, 32(12): 1975-1981. DOI: 10.1111/jgh.13783.

[6] NGUYEN T T H, NGUYEN V H, NGUYEN V H, *et al*. Role of baseline albumin-bilirubin grade on predict overall survival among sorafenib-treated patients with hepatocellular carcinoma in Vietnam[J]. Cancer Control, 2019, 26(1): 1073274819865269. DOI: 10.1177/1073274819865269.

[7] TADA T, KUMADA T, TOYODA H, *et al*. Impact of albumin-bilirubin grade on survival in patients with hepatocellular carcinoma who received sorafenib: an analysis using time-dependent receiver operating characteristic[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2019, 34(6): 1066-1073. DOI: 10.1111/jgh.14564.

[8] FAUBERT B, SOLMONSON A, DEBERARDINIS R J. Metabolic reprogramming and cancer progression[J]. Science, 2020, 368(6487): eaaw5473. DOI: 10.1126/science.aaw5473.

[9] WANG Y G, XIA Y, LU Z M. Metabolic features of cancer cells[J]. Cancer Commun, 2018, 38(1): 65. DOI: 10.1186/s40880-018-0335-7.

[10] BENSINGER S J, CHRISTOFK H R. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(4): 352-361. DOI: 10.1016/j.semcdb.2012.02.003.

[11] KOPPENOL W H, BOUNDS P L, DANG C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(5): 325-337. DOI: 10.1038/nrc3038.

[12] CAIRNS R A, HARRIS I S, MAK T W. Regulation of cancer cell metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2): 85-95. DOI: 10.1038/nrc2981.

[13] CHENG S T, WANG G, WANG Y, *et al*. Fatty acid oxidation inhibitor etomoxir suppresses tumor progression and induces cell cycle arrest *via* PPARγ-mediated pathway in bladder cancer[J]. Clin Sci (lond), 2019, 133(15): 1745-1758. DOI: 10.1042/CS20190587.

[14] SENNI N, SAVALL M, CABRERIZO GRANADOS D, *et al*. B-catenin-activated hepatocellular carcinomas are addicted to fatty acids[J]. Gut, 2019, 68(2): 322-334. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-315448.

[15] RICCIARDI M R,MIRABILII S, ALLEGRETTI M, *et al*. Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: functional preclinical effects in leukemias[J]. Blood, 2015, 126(16): 1925-1929. DOI: 10.1182/blood-2014-12-617498.

[16] MONTAGNER A, POLIZZI A, FOUCHÉ E, *et al*. liver PPARα is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFlD[J]. Gut, 2016, 65(7): 1202-1214. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310798.

[17] GORDON D M, BLOMQUIST T M, MIRUZZI S A, *et al*. RNA sequencing in human HepG2 hepatocytes reveals PPAR-α mediates transcriptome responsiveness of bilirubin[J]. Physiol Genomics, 2019, 51(6): 234-240. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00028.2019.

[18] LOPASCHUK G D, WALL S R, OLLEY P M, *et al*. Etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase Ⅰ inhibitor, protects hearts from fatty acid-induced ischemic injury independent of changes in long chain acylcarnitine[J]. Circ Res, 1988, 63(6): 1036-1043. DOI: 10.1161/01.res.63.6.1036.

(**收稿**:2022-01-24;**修回**:2022-04-09)

(编辑 汪勤俭)