

2-脱氧葡萄糖联合二甲双胍抗人肝癌 HepG2 细胞作用及与 AMPK、mTOR 相关性研究

林 鹤, 于 娜, 常 宁, 杨冬华, 杨金玲, 任利翔*, 邢立国*

沈阳化工研究院有限公司 安评中心, 辽宁 沈阳 110021

摘要: 目的 考察2-脱氧葡萄糖(2-DG)联合二甲双胍(Met)协同抗人肝癌HepG2细胞作用并探索其机制。方法 刃天青法测定2-DG及Met单独及联合应用对HepG2细胞的生长抑制作用,利用金氏公式计算联合用药 Q 值;利用高内涵细胞成像系统考察单独及联合用药对细胞线粒体膜电位及活性氧产生的影响;Western blotting检测Cleave-Caspase 3、p-AMPK及p-mTOR的蛋白变化;考察AMPK及mTOR抑制剂对联合用药后细胞生长抑制作用的影响。结果 2-DG、Met单独应用的 IC_{50} 值分别为2.45及16.35 mmol/L,联合用药对细胞生长抑制具有协同作用, Q 值均大于1.15;联合用药能显著降低细胞内线粒体膜电位及p-mTOR蛋白表达,显著增加细胞内活性氧产生及Cleave-Caspase3、p-AMPK蛋白表达;抑制AMPK或mTOR能显著增加联合用药对细胞的生长抑制作用($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 2-DG联合Met具有协同抑制HepG2细胞增殖作用,其机制与降低细胞线粒体膜电位,促进活性氧产生、细胞凋亡,以及非AMPK依赖性的抑制mTOR活化有关。

关键词: 2-脱氧葡萄糖;二甲双胍;HepG2细胞;AMPK;mTOR

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)12-2195-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.011

Effect of 2-deoxyglucose combined with metformin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its correlation with AMPK and mTOR

LIN He, YU Na, CHANG Ning, YANG Donghua, YANG Jinling, REN Lixiang, XING Ligu

Evaluation Center, Shenyang Chemical Research Institute Co., Ltd., Liaoning 110021, China

Abstract: Objective To investigate whether 2-deoxyglucose (2-DG) combined with metformin (Met) has synergistic antitumor effect on HepG2 cells, and explore the underlying mechanisms. **Methods** The cell growth inhibitory ratio of HepG2 cells treated by 2-DG, Met, and the combination was determined by the resin azure method, and the synergistic antitumor effects of the combined application was also examined by calculating the Q values of Jin's formula; Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species generation were detected by high conformation cell imaging system; The expression level of Cleave-Caspase 3, p-AMPK, and p-mTOR were examined by Western blotting; The cell growth inhibitory ratio was detected by the resin azure method after AMPK and mTOR inhibitors administrating. **Results** The IC_{50} values of 2-DG and Met alone in HepG2 cells were 2.45 mmol/L and 16.35 mmol/L, respectively. Combined application has synergistic antitumor effects, and the Q values of Jin's formula was more than 1.15. Combined application significantly reduced mitochondrial membrane potential and increased intracellular reactive oxygen species production and Cleave-Caspase3 expression. Combined application significantly increased the expression of P-AMPK, decreased the expression of p-mTOR. Moreover, inhibiting AMPK and mTOR by the inhibitors significantly enhanced the cell growth inhibitory effect of combination group ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** 2-DG combined with Met has synergistic antitumor effect on HepG2 cells. The underlying mechanism is related to decreasing mitochondrial membrane potential, promoting reactive oxygen production and apoptosis, and non-AMPK dependent inhibition of mTOR activation.

Key words: 2-deoxyglucose; Metformin; HepG2 cells; AMPK; mTOR

肝癌是目前世界范围内第6大常见癌症,近年来发病率呈现上升趋势^[1]。研究发现,在肝癌中同样存在着沃伯格效应(Warburg effect),即有氧条件下,细胞主要通过糖酵解方式产生ATP,而不是通过

收稿日期:2018-06-17

第一作者:林 鹤(1989-),男,集安市人,硕士,主要从事新药活性评价研究。

*通信作者:任利翔,高级工程师,博士。E-mail: renlixiang@sinochem.com

邢立国,教授级高级工程师,博士。E-mail: Xingliguo@sinachem.com

氧化磷酸化。但当糖酵解过程被抑制时,细胞又可重新启动氧化磷酸化产生ATP^[2-3]。因此,同时阻断两种产能方式有望成为新的肿瘤治疗途径。

2-脱氧葡萄糖(2-deoxyglucose, 2-DG)是一种葡萄糖类似物,可通过与葡萄糖竞争性结合己糖激酶(HK)抑制细胞的糖酵解过程^[4]。二甲双胍(metformin, Met)是临床治疗II型糖尿病的药物,近年来研究发现,其抑制细胞内线粒体呼吸链复合体I,使细胞内的ATP合成减少,AMPK活化,抑制mTOR细胞增殖信号通路^[5-6]。因此,基于肿瘤细胞的能量代谢特点及2-DG、Met的作用机制,2-DG联合Met已被用于抗肿瘤研究。然而,2-DG联合Met对人肝癌HepG2细胞是否具有协同抗肿瘤作用、AMPK及mTOR在此过程中发挥怎样的作用需要进一步研究。

1 材料

1.1 细胞系

人肝癌HepG2细胞,购自中科院上海细胞库,接种于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,37℃、含5%二氧化碳的培养箱中培养,实验中使用对数生长期的细胞。

1.2 药物及主要试剂

2-DG(货号C1624064),购自阿拉丁试剂公司;二甲双胍(货号P1201167),购自Adamask-beta公司;RPMI-1640(货号27117002),购自美国corning公司;胎牛血清(货号NR02953),购自上海双迦生物科技有限公司;刃天青(货号H1629141),购自阿拉丁试剂;Mitotracker线粒体深红色荧光探针(货号40743ES50),购自上海翊圣生物科技有限公司;活性氧检测试剂盒(货号S0033)、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(货号P0012A),购自碧云天生物技术;Rapamycin(货号S1039)、Compound C(货号S7840),购自Selleck;Cleave-Caspase 3抗体(货号9661)、P-AMPK抗体(货号2535)、P-mTOR抗体(货号2971)及 β -actin抗体(货号4970),购自Cell Signaling Technology。

1.3 主要仪器

离心机,购自上海安亭科学仪器厂;生物安全柜,购自海尔集团;CO₂培养箱,购自美国纽埃尔;IX71型倒置显微镜,购自日本OLYMPUS;Synergy HT酶标仪,购自美国博腾;Cell Insight CX7细胞高内涵筛选系统,购自美国赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 刃天青法检测细胞活力

细胞以3 000/孔的密度接种于96孔板,CO₂培

养箱常规培养24 h后,弃去上清,分别加入2-DG(0、0.25、0.50、1.00、2.00 mmol/L)、Met(0、2、4、8、16 mmol/L)、2-DG(0.25、0.50、1.00 mmol/L)+Met(0、3 mmol/L),对照组加入等体积溶剂,继续培养72 h。细胞培养结束后,弃上清,每孔加入100 μ L的刃天青染色液(1 mg/mL,完全培养基1:9稀释),37℃反应3 h。反应结束后,震荡混匀,酶标仪535 nm激发,595 nm测定吸光度(A)值,并计算生长抑制率,采用Graphpad 6.02计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。

$$\text{生长抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 联合应用Q值计算

金氏公式是用统计学原理去判断、评价合并用药疗效的工具,可作为定性判断的依据,其计算公式如下:

$$Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$$

E_a 和 E_b 为单独用药时的抑制率, E_{a+b} 为联合用药抑制率。 Q 值小于0.85认为具有拮抗作用,大于0.85小于1.15时认为具有相加作用,大于1.15时认为具有协同作用。

2.3 高内涵检测线粒体膜电位及活性氧

细胞以3 000/孔的密度接种于96孔板,CO₂培养箱常规培养24 h后,弃去上清,分别加入2-DG(1 mmol/L)、Met(3 mmol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L),对照组加入等体积溶剂,继续培养72 h。药物处理结束后,100 μ L PBS洗涤各孔2次。按照试剂盒说明书对荧光探针进行稀释后,各孔加入含有相应染料的染色液100 μ L。37℃培养箱孵育20 min,孵育结束后100 μ L PBS洗涤1次。各孔加入100 μ L PBS,按照试剂盒说明书上的激发波长进行激发后检测。每组检查3个重复孔,每孔检查9个视野,应用仪器自带软件对平均荧光强度进行分析。

2.4 蛋白质免疫印迹

细胞以4.8×10⁴/孔的密度接种于6孔板,CO₂培养箱常规培养24 h后,弃去上清,培养结束后,分别加入2-DG(1 mmol/L)、Met(3 mmol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L),对照组加入等体积溶剂,继续培养72 h,进行Cleave-Caspase 3、P-AMPK、P-mTOR蛋白表达检测。收集药物处理的HepG2细胞,加入细胞裂解液裂解细胞。对裂解液进行蛋白浓度测定及变性处理后,制备SDS-PAGE凝胶,每个泳道加入20 μ g蛋白样品后开始电泳,积层胶时电压60 V,分离胶时电压120 V。电泳结束后,100 mA转膜转移2 h。转移结束后,剪下所要检测的蛋白条带,5%脱脂牛奶中封闭处理2 h。封闭完成后,将条带转移至含有1:1 000倍稀释的抗体溶液中4℃封闭过夜。一抗孵育结束后,PBST洗涤条带3次,将

条带转入辣根过氧化物酶标记的第二抗体溶液中, 室温孵育 2 h。孵育结束后, PBST 洗涤 3 次, 凝胶成像系统进行成像并保存图片。采用 Image J 软件对条带进行灰度扫描, 以 β -actin 为内参, 计算相对表达量。

2.5 AMPK 抑制剂 Com C、mTOR 的抑制剂 RAP 对细胞活力的影响

细胞以 3 000/孔的密度接种于 96 孔板, CO_2 培养箱常规培养 24 h 后, 弃去上清, ①分别加入 2-DG(1 mmol/L)、Met(3 mmol/L)、Com C(1 μ mol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L)+Com C(1 μ mol/L), 对照组加入等体积溶剂, 继续培养 72 h。②分别加入 2-DG(1 mmol/L)、Met(3 mmol/L)、Rap(0.2 μ mol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L)、2-DG(1 mmol/L)+Met(3 mmol/L)+Rap(1 μ mol/L), 对照组加入等体积溶剂, 继续培养 72 h。细胞培养结束后, 刃天青

法检测细胞活力, 方法同“2.1”项。

2.6 数据处理

计量结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 单因素方差分析(One-way ANOVA)对组间差异进行比较。

3 结果

3.1 对细胞生长抑制率的影响

如图 1 所示, 作用 72 h 后, 2-DG 及 Met 可浓度相关性的抑制 HepG2 细胞生长, 其中 2-DG 的 IC_{50} 值为 2.45 mmol/L(图 1A), Met 的 IC_{50} 值为 16.35 mmol/L(图 1B)。因联合用药涉及两种药物, 无法计算 IC_{50} 值, 采用金氏公式 Q 值来衡量效果。由图 1C 可知, 联合用药后可显著的增加对细胞生长抑制作用, 与同浓度 2-DG 组比较差异显著($P < 0.05$)。各组 Q 值均大于 1.15, 具有协同抗肿瘤作用(表 1)。为了体现联合应用的效果, 采用较低生长抑制作用下的 2-DG(1 mmol/L)及 Met(3 mmol/L)进行后续研究。

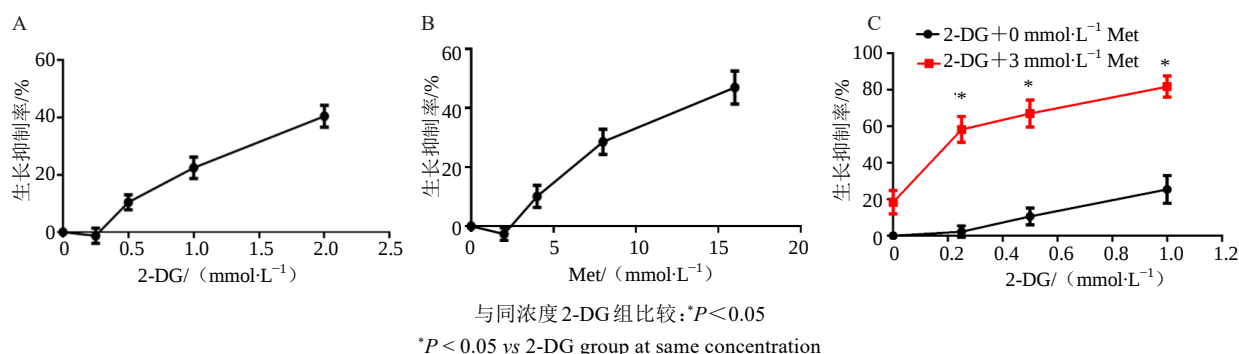


图 1 2-DG(A)、Met(B)、2-DG+Met(C)组细胞生长抑制率曲线($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Cell growth inhibitory ratio curve of 2-DG (A), Met (B) and 2-DG + Met (C) groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 1 联合应用 Q 值统计表($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Q value summary table ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2-DG/ (mmol·L ⁻¹)	E_a	Met/ (mmol·L ⁻¹)	E_b	2-DG+Met/ (mmol·L ⁻¹)	E_{a+b}	Q 值
0.25	0.022 9±0.031 0	3	0.184 1±0.064 3	0.25+3	0.582 9±0.071 0	2.874
0.50	0.106 7±0.046 1	3	0.184 1±0.064 3	0.50+3	0.670 2±0.074 0	2.305
1.00	0.254 5±0.076 1	3	0.184 1±0.064 3	1.00+3	0.817 8±0.058 8	1.865

3.2 对凋亡相关指标的影响

3.2.1 对线粒体膜电位 细胞线粒体膜电位降低可诱导活性氧大量产生, 是诱发细胞发生凋亡的重要因素。Met 可选择性的作用于线粒体呼吸链复合体 I, 对线粒体膜电位、活性氧进行了检测。高内涵检测结果发现, 用药后可以降低细胞内 Mitotraker 的荧光强度, 其中 2-DG+Met 组与对照组比较显著差异($P < 0.01$)。结果见图 2。

3.2.2 对活性氧的影响 与对照组比较, 给药后细胞内 DCF-DA 的荧光强度增加, 其中 Met、2-DG+

Met 组差异显著($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见图 3。结合“3.2.1”项结果说明, 联合用药后可降低细胞内线粒体膜电位, 同时增加活性氧的产生。

3.2.3 对 Cleave-Caspase 3 蛋白表达的影响 通过 Western Blotting 对细胞内活化形式的凋亡执行蛋白 Cleave-Caspase 3 水平进行了考察, 结果显示, 与对照组比较, 给药后细胞内凋亡执行蛋白 Cleave-Caspase 3 的表达增加, 其中 Met、2-DG+Met 组差异显著($P < 0.05$ 、 0.01), 2-DG+Met 组作用更强, 说明联合用药能促进细胞凋亡的发生。结果见图 4。

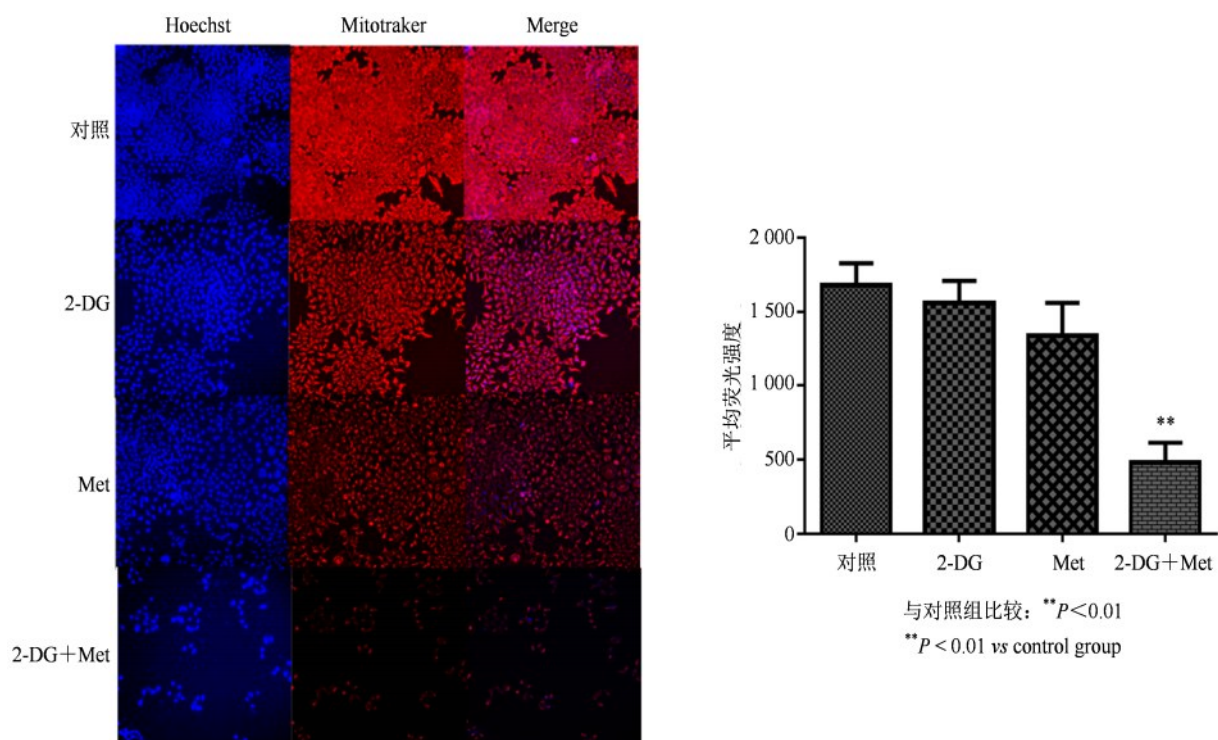


图2 Mitotraker染色检测线粒体膜电位
Fig. 2 Detection of mitochondrial membrane potential by Mitotraker staining

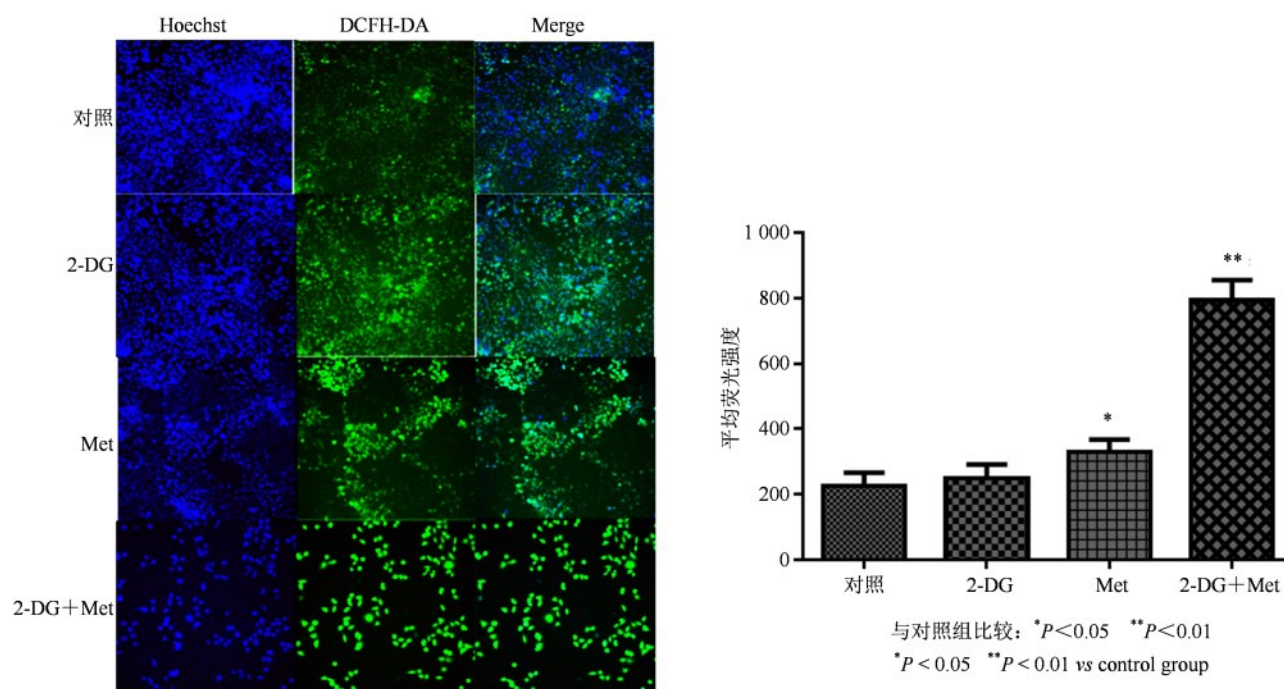


图3 DCFH-DA染色检测活性氧
Fig. 3 Detection of reactive oxygen species by DCFH-DA staining

3.3 对P-AMPK及P-mTOR的影响

3.3.1 Western Blotting 检测细胞内 P-AMPK、P-mTOR 蛋白表达 细胞内 AMPK 及 mTOR 通过磷

酸化后可转化为活性形式的 p-AMPK 及 p-mTOR。通过 Western Blotting 对细胞内 p-AMPK 及 p-mTOR 的表达情况进行考察, 结果发现, 用药后增加细胞

内 p-AMPK 的表达水平,同时降低 p-mTOR 的表达水平,与对照组比较, Met、2-DG+Met 组差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01),其中 2-DG+Met 组作用更强。结果表明,2-DG 与 Met 联合应用后能使细胞内能量感受器 AMPK 活化,同时抑制调控细胞生长与增殖的关键性蛋白激酶 mTOR 的活化。结果见图 5。

3.3.2 AMPK 抑制剂 Com C、mTOR 的抑制剂 RAP 对细胞生长的影响 加入 AMPK 抑制剂 Com C 及 mTOR 的抑制剂 RAP 后,考察 AMPK 及 mTOR 在此过程中发挥怎样的作用。结果发现,在加入无毒剂量的 Com C 抑制 AMPK 活化后,与 2-DG+Met 组比较能显著增加对细胞的生长抑制率 ($P<0.05$)。同时在加入无毒剂量的 mTOR 抑制剂 RAP 进一步抑制 mTOR 后,与 2-DG+Met 组比较也能明显的增加对细胞的生长抑制作用 ($P<0.05$)。结果表明,联合用药后造成 AMPK 活化在该过程中可能起到细胞保护作用,而联合用药后抑制 mTOR 的活化对细胞生长具有抑制作用。结果见图 6。

4 讨论

本研究通过 2-DG 联合 Met 作用于人肝癌

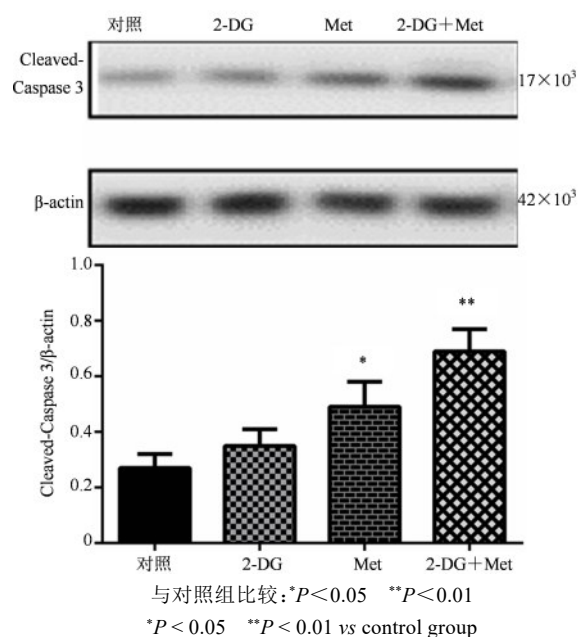


图4 Western Blotting检测凋亡执行蛋白 Cleave-Caspase3 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Western Blotting was used to detect expression of apoptotic protein Cleave-Caspase 3 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

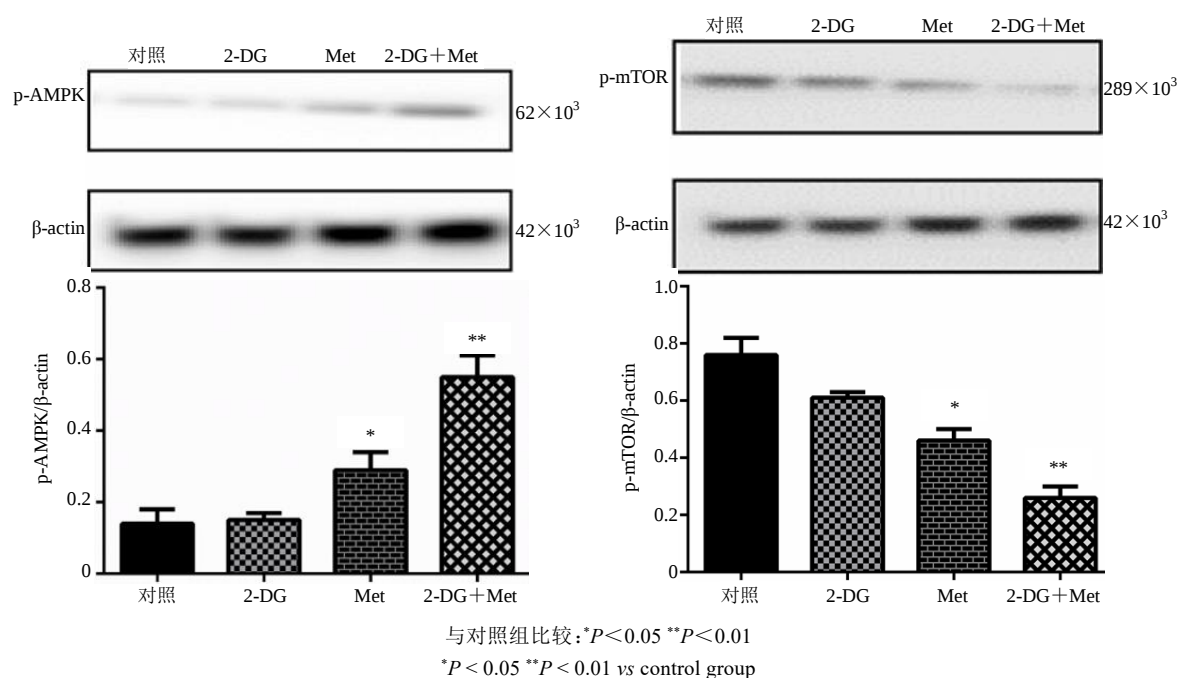


图5 Western blotting检测p-AMPK、p-mTOR的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Western blotting detection of protein expression of p-AMPK and p-mTOR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

HepG2 细胞,考察二者的协同抗肿瘤作用,同时对 AMPK 及 mTOR 进行了考察。结果发现,2-DG 联合 Met 可以降低细胞线粒体膜电位,增加细胞内活性氧的产生,诱导细胞发生凋亡,发挥协同抗肿瘤作用。说明在 HepG2 细胞中,针对肿瘤细胞的能量代

谢特点,利用糖酵解过程中己糖激酶的竞争性抑制剂 2-DG 抑制肿瘤细胞过度依赖的糖酵解的产能方式,同时联合氧化磷酸化过程中复合体 I 的抑制剂 Met 防止氧化磷酸化的产能方式重启,具有可行性。

进一步研究发现,2-DG 联合 Met 应用可使细胞

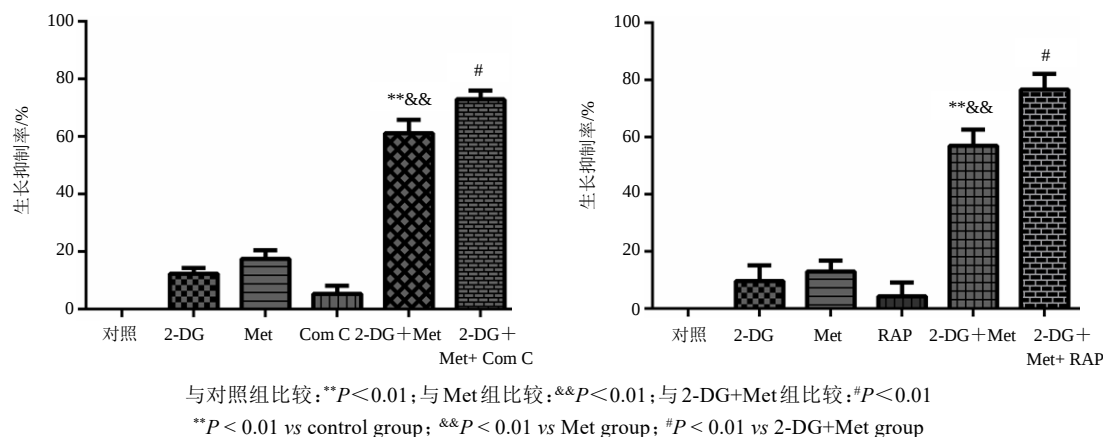


图6 抑制 AMPK(A)、mTOR(B) 考察对联合应用生长抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of inhibition of AMPK (A) or mTOR (B) on growth inhibition rate of combined application ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

内 AMPK 活化成 p-AMPK, 同时抑制细胞内 mTOR 的活化。而加入 AMPK 及 mTOR 抑制剂后, 均能增强联合用药对细胞的生长抑制作用。大量文献报道, p-AMPK 可以抑制 mTOR 的活化, 进而抑制 mTOR 信号通路调节的细胞增殖^[7]。然而在本研究中, 在加入抑制剂抑制 AMPK 的活化后, 并未降低 2-DG 联合 Met 引起的细胞生长抑制作用, 而抑制 mTOR 活化后, 能进一步增加联合应用对细胞的生长抑制作用。Adem^[8] 及 Isaam^[9] 等研究发现, 在 KC67 细胞及 LNCap 细胞中, 可通过 AMPK 非依赖性的方式抑制 mTOR 的活化。因此, 我们推测联合应用引起的 mTOR 活化抑制为 AMPK 非依赖性的。

而 AMPK 的活化可能是由于联合用药后细胞内 AMP/ATP 比值升高引起的, 活化的 AMPK 可通过促进细胞内能量代谢相关酶的表达来对抗这种不利条件^[10], 从而发挥细胞保护作用。加入 AMPK 抑制剂后会增强联合用药对肿瘤细胞的抑制作用。

糖酵解抑制剂 2-DG 联合氧化磷酸化抑制剂 Met 具有协同抗人肝癌 HepG2 细胞的作用, 其机制与降低细胞线粒体膜电位, 促进活性氧产生、细胞凋亡, 以及非 AMPK 依赖性的抑制 mTOR 活化有关。

参考文献

- [1] Ozakyol A. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma (HCC Epidemiology) [J]. J Gastrointest Canc, 2017, 48(3): 238-240.
- [2] 李君, 孙淑军, 王洋, 等. 29 例肝细胞肝癌患者的肿瘤组织代谢组学研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017(4): 578-586.
- [3] Cassim S, Raymond V A, Bilodeau M. Targeting the

warburg effect in hepatocellular carcinoma: an efficient way to potentiate cisplatin-induced anti-tumor effects [A]. Canadian Digestive Diseases Week (CDDW). HEPATOLOGY [C]. Banff - Canada: 2018, 68: 1253A-1253A.

- [4] 邵霞, 王婷. 2-脱氧-D-葡萄糖抗肿瘤作用机制及联合应用治疗肿瘤的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22(17): 3374-3378.
- [5] Ota S, Horigome K T. Metformin suppresses glucose-6-phosphatase expression by a complex I inhibition and AMPK activation-independent mechanism [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 388(2): 311-316.
- [6] Sinnott-Smith J, Kisfalvi K, Kui R, et al. Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: Dependence on glucose concentration and role of AMPK [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(1): 352-357.
- [7] Xu Y, Liu C, Chen S, et al. Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death *in vitro*, models of Parkinson's disease [J]. Cell Signal, 2014, 26(8): 1680-1689.
- [8] Kalender A, Selvaraj A, Kim S Y, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner [J]. Cell Metab, 2010, 11(5): 390-401.
- [9] Ben S I, Regazzetti C, Robert G, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1 [J]. Cancer Res, 2011, 71(13): 4366-4372.
- [10] Ke R, Xu Q, Li C, et al. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism [J]. Cell Biol Int, 2018, 42(4): 384-392.