

草氨酸钠对胆管癌细胞自噬与凋亡的影响

何大伟¹, 何教林¹, 周明慧¹, 于亚平², 张明华²

(1. 昆山市第一人民医院临床实验研究中心, 昆山 215300;

2. 昆山市第一人民医院肝胆外科, 昆山 215300)

[摘要] 目的 观察乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 抑制剂草氨酸钠对人胆管癌细胞株 Hucct-1 自噬与凋亡的影响, 并初步探讨其相关机制。方法 用不同浓度的草氨酸钠处理 Hucct-1 细胞, 或将 LDHA 小干扰 RNA 转染 Hucct-1 细胞后, CCK8 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 划痕愈合实验检测细胞迁移, 实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法分别检测自噬相关 mRNA 和蛋白的表达水平, 乳酸检测试剂盒检测细胞内乳酸的含量。结果 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞增殖 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 其半数抑制浓度为 50 mmol/L。用 50 mmol/L 草氨酸钠干预 Hucct-1 细胞或 LDHA 小干扰 RNA 转染 Hucct-1 细胞后, LDHA mRNA 和蛋白表达水平均降低 (均 $P < 0.01$), 细胞内乳酸的含量减少 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), 细胞迁移距离缩短 ($P < 0.01$), 细胞中自噬相关基因 7 (autophagy-related gene 7, ATG7)、Beclin-1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC-3 II) 表达水平升高 (均 $P < 0.01$), P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。结论 草氨酸钠通过抑制 Hucct-1 细胞中 LDHA 表达来促进细胞自噬, 诱导细胞凋亡。

[关键词] 草氨酸钠; 胆管癌; 乳酸脱氢酶 A; 细胞自噬; 细胞凋亡

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)05-0403-07

胆管癌是一种预后极差的恶性肿瘤, 在肝胆系统恶性肿瘤中发病率居第 2 位, 且近年来有上升趋势。临床上绝大多数胆管癌是进展期胆管癌, 缺乏有效的治疗方法, 这是因为胆管癌对传统的抗肿瘤药物不敏感, 应答率 $< 30\%$, 患者中位生存时间 < 12 个月, 中位无进展生存期仅为 8 个月^[1-3]。近年来, 肿瘤细胞糖代谢的研究取得了重要进展, 发现肿瘤组织与正常组织细胞的能量代谢截然相反: 肿瘤在正常氧分压的条件下, 糖酵解活性显著增强, 氧化磷酸化供能受到抑制, 产

生大量乳酸。研究表明, 利用这种代谢差异, 扰乱能量代谢过程, 会对肿瘤细胞具有杀伤作用^[4-5]。乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA) 是糖酵解的关键酶之一。目前, LDHA 抑制剂草氨酸钠对胆管癌的作用效果鲜有报道。本研究用草氨酸钠体外干预人胆管癌细胞株 Hucct-1, 观察细胞自噬与凋亡的变化, 为进一步进行动物体内研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌细胞株 Hucct-1 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, LDHA 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 购自广州锐博生物科技有限公司, 草氨酸钠购自美国 Sigma 公司, 兔抗人自噬相关基因 7 (autophagy-related

[收稿日期] 2019-12-06

[基金项目] 昆山市科技计划项目(KS1537)

[作者简介] 何大伟(1987—), 男, 助理研究员, 研究方向: 细胞自噬与肿瘤的发生发展。

E-mail: 824171022@qq.com

[通信作者] 张明华(1977—), 男, 副主任医师, 研究方向: 胆管癌的靶向治疗。E-mail: zhmh1977@163.com

gene 7, ATG7) 单克隆抗体、兔抗人 Beclin-1 单克隆抗体、兔抗人 P62 单克隆抗体、兔抗人微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC-3 II) 单克隆抗体、兔抗人 LDHA 单克隆抗体和兔抗人 β -actin 单克隆抗体均购自英国 Abcam 公司, 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 2 000)、乳酸检测试剂盒、CCK8 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒和 RIPA 裂解液均购自上海碧云天生物科技有限公司, TRIzol 试剂、LipofectAMINE 2000 购自美国 Thermo 公司、RPMI 1640 培养液、Opti-MEM 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清和 PBS 均购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组与转染 人胆管癌细胞 Hucct-1 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的平衡湿度培养箱中培养。当细胞融合度为 70%~80% 时进行消化传代, 按所需密度接种于细胞培养板。

实验分为正常对照组、草氨酸钠组和 LDHA-siRNA 组。将处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板 (5 × 10⁴ 个 / 孔, 每组 3 个复孔), 培养至细胞密度为 50%~60% 时, 进行 siRNA 转染。将 siRNA (每孔 100 pmol) 和 LipofectAMINE 2000 (每孔 4 μ L) 分别用 Opti-MEM 培养液稀释至 100 μ L, 将两种稀释液混合, 避光孵育 30 min 后, 将混合液加入到含 Hucct-1 细胞的 6 孔板中, 每孔 200 μ L; 每孔再加 1.8 mL Opti-MEM 培养液, 培养 6 h 后更换 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48 h。草氨酸钠组应用 0、25、50、100 和 200 mmol/L 的草氨酸钠作用 48 h 后, 进行后续实验。正常对照组加正常培养液培养 48 h。

1.2.2 荧光定量 PCR 收集上述分组处理过的细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 用酶标仪测定 RNA 的浓度和纯度后, 用 DEPC 水将 RNA 稀释至终质量浓度为 1 μ g/ μ L, 取 1 μ L 进行反转录合成 cDNA, 反应条件为 55 °C 15 min, 85 °C 5 s。然后取 2 μ L cDNA 进行实时荧光定量 PCR, 反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 引物

序列如下: LDHA 基因上游引物序列为 5'-ATGAAGGA-CTTGGCAGAT-3', 下游引物序列为 5'-TGACA-GCTTAATGGGTGA-3'; 内参 β -actin 基因上游引物序列为 5'-ACCACCATGGAGAA-GGCTGG-3', 下游引物序列为 5'-CTCAGTG-TAGCCCAGG-ATGC-3'。以 GAPDH 为内参, 应用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 LDHA 的相对表达量。

1.2.3 蛋白质印迹法检测 LDHA 及细胞自噬相关蛋白表达 细胞接种于 6 孔板, 按上述分组处理结束后, PBS 洗涤, 用 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度。取 20 g 蛋白以 80 V 15 min 后转 110 V 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后以 110 V、1.5 h 电转移至聚偏二氟乙烯膜, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入兔抗人 ATG7、Beclin-1、P62、LC3-II、LDHA 和 GAPDH 抗体 (工作液稀释比例均为 1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1 : 2 000), 常温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后用化学发光法显色, 观察并分析目的蛋白条带与内参 β -actin 条带的灰度值之比。

1.2.4 CCK8 法检测细胞活力 细胞接种于 96 孔板, 按上述分组处理结束后, 设置空白对照孔和不同浓度 (0、25、50、100 和 200 mmol/L) 的草氨酸钠组, 每组 6 个重复孔。各组细胞作用结束前 2 h, 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 孵育 1~3 h, 应用全波长酶标仪检测波长 450 nm 时的各组吸光度, 细胞活力以加药孔吸光度减去空白对照孔吸光度的差值来表示。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 Hucct-1 细胞干预结束后, 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 离心后重悬于 400 μ L 凋亡试剂盒缓冲液中。加入 5 μ L Annexin V-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC), 室温避光孵育 5 min。然后加入 10 μ L 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 4 °C 避光孵育 30 min, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 细胞迁移实验 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度为 80%~90% 时, 尽量垂直于培养板用无菌移液枪尖划出一道痕迹, PBS 洗涤细胞 2 次,

除去漂浮细胞。置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的恒温箱中培养,按 1.2.1 节分组处理细胞,48 h 后在光学显微镜下观察并拍照。通过测量划痕宽度的变化来分析各组细胞的迁移能力。

1.2.7 乳酸检测 细胞接种于 6 孔板,经上述分组处理结束后,收集细胞上清液,按乳酸检测试剂盒说明书依次加入上清液、酶工作液和显色剂,涡旋混匀,37 ℃ 孵育 10 min,加入终止液终止反应。设置空白孔和标准孔,波长 530 nm 时测量各孔吸光度,绘制标准曲线,计算各组细胞中的乳酸含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。各实验均独立重复 3 次,结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,组内两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞增殖

Hucct-1 细胞中分别加入 0、25、50、100 和 200 mmol/L 草氨酸钠作用 48 h 后,检测各组细胞的活性。结果(图 1)显示,随着药物浓

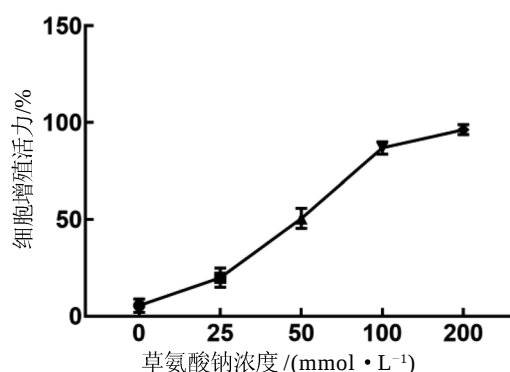


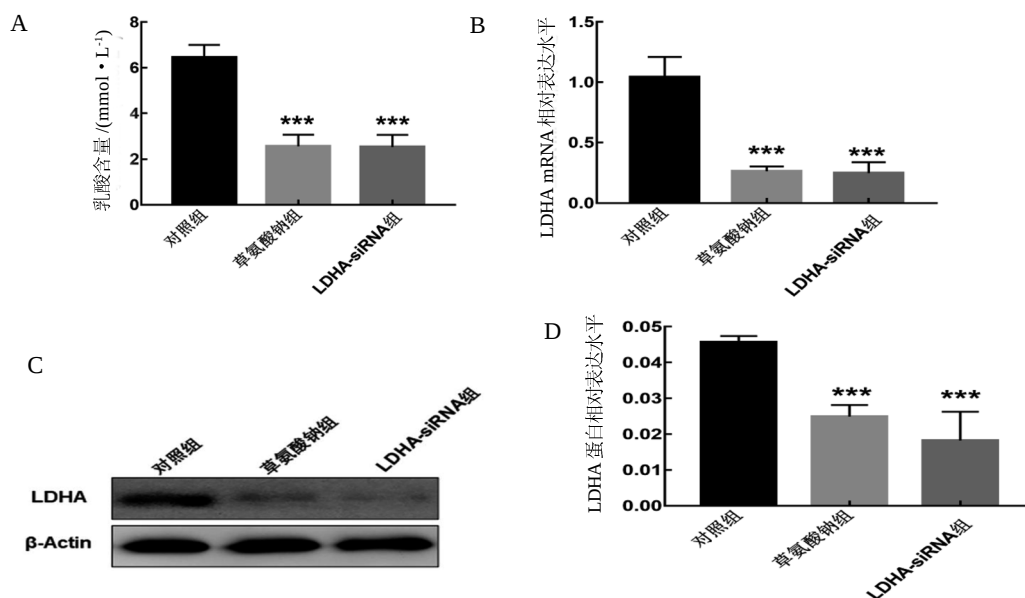
图 1 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞活性影响

Figure 1 Effect of sodium oxalate on Hucct-1 cell activity

度的增加,细胞增殖活力显著降低 ($P < 0.001$),呈明显的剂量依赖性。计算得到草氨酸钠的半数抑制浓度为 50 mmol/L,后续实验中草氨酸钠组即用 50 mmol/L 的草氨酸钠干预细胞。

2.2 草氨酸钠抑制 Hucct-1 细胞中乳酸含量和 LDHA 表达

用 50 mmol/L 的草氨酸钠作用 Hucct-1 细胞 24 h 或转染 LDHA-siRNA 24 h 后,与不经任何处理的正常对照组比较,草氨酸钠组和 LDHA-siRNA 组乳酸含量均明显降低 ($P = 0.0009$, $P = 0.0008$) (图 2A),而 LDHA 的 mRNA



A 为乳酸含量检测; B 为实时荧光定量 PCR 法检测 LDHA mRNA 相对表达水平; C 和 D 分别为蛋白质印迹法检测 LDHA 蛋白表达及其条带灰度分析结果。与对照组比较,*** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 2 草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞中乳酸含量和 LDHA 表达的影响

Figure 2 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on the lactate content and LDHA expression in Hucct-1 cells

($P = 0.0019$, $P = 0.0014$) 和蛋白 ($P = 0.0215$, $P = 0.0043$) 表达水平明显降低 (图 2B ~ D)。

2.3 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞凋亡的影响

Annexin V /PI 双染法检测细胞凋亡结果显示, 草氨酸钠作用或 LDHA-siRNA 转染 24 h 后, 草氨酸钠组 ($P = 0.0002$) 和 LDHA-siRNA 组 ($P < 0.0001$) 细胞凋亡率明显高于正常对照组 (图 3), 说明通过抑制 LDHA 的表达可以诱导胆管癌细胞凋亡。

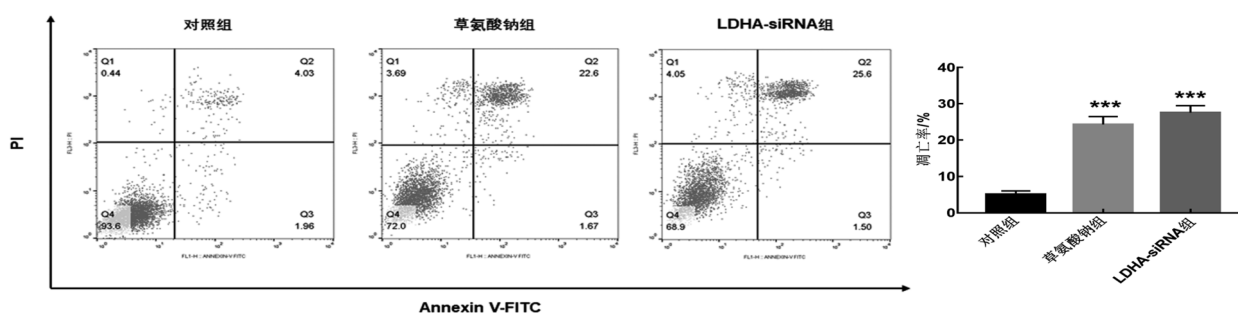
2.4 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞迁移能力的影响

草氨酸钠作用或 LDHA-siRNA 转染 48 h 后, 与正常对照组比较, 草氨酸钠组 ($P = 0.0013$)、LDHA-siRNA 组 ($P = 0.0003$) 的 Hucct-1 细胞

迁移距离均显著缩短 (图 4), 表明草氨酸钠可以通过下调 LDHA 的表达抑制细胞迁移。

2.5 草氨酸钠对 Hucct-1 细胞自噬相关蛋白表达的影响

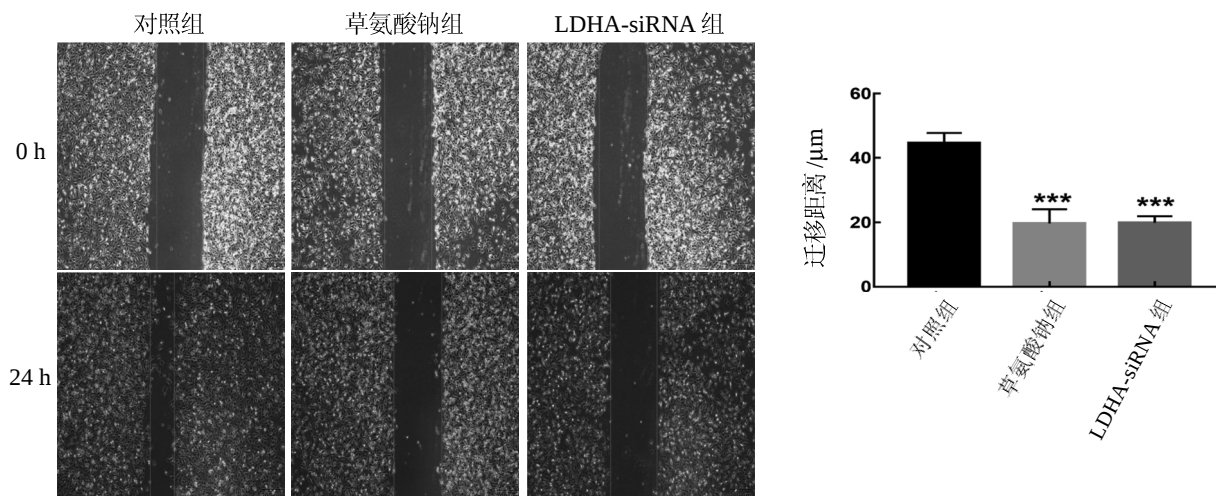
草氨酸钠干预或 LDHA-siRNA 转染 48 h 后, 提取 Hucct-1 细胞总蛋白, 蛋白质印迹法检测结果 (图 5A) 表明, 草氨酸钠组、LDHA-siRNA 组细胞自噬相关蛋白 ATG7 ($P = 0.0006$, $P = 0.0001$)、Beclin-1 ($P = 0.0004$, $P = 0.0033$) 和 LC3-II ($P = 0.0003$, $P = 0.0003$) 表达水平明显升高 (图 5B、C、D), 自噬底物蛋白 P62 ($P = 0.0009$, $P = 0.0008$) 的表达水平明显降低, 差异均有统计学意义 (图 5E)。



与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 流式细胞术检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞凋亡的影响

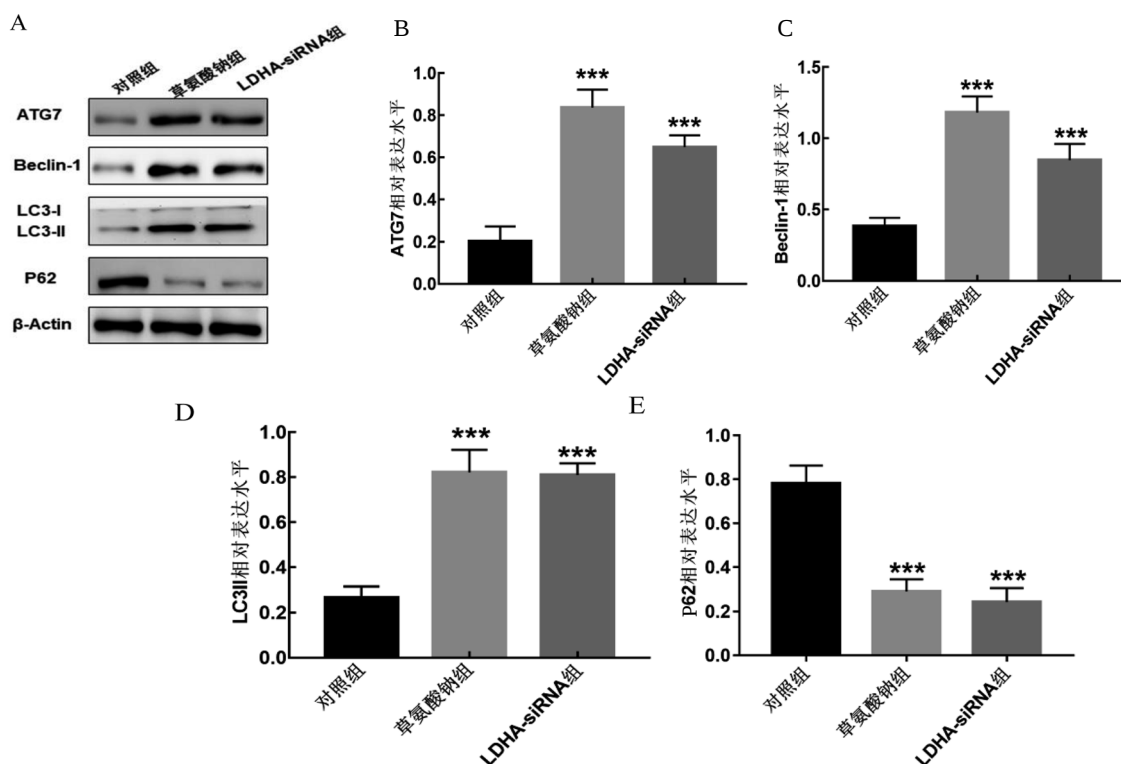
Figure 3 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on apoptosis of Hucct-1 cells were detected by flow cytometry



与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 划痕愈合实验检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对胆管癌 Hucct-1 细胞迁移的影响

Figure 4 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on migration of Hucct-1 cells were detected by wound healing assay



ATG7 为自噬相关蛋白 7, LC3- I /II 为自噬相关蛋白轻链 3- I /II, P62 为功能蛋白 P62, Beclin-1 为一种自噬效应蛋白。与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 5 蛋白质印迹法检测草氨酸钠和 LDHA-siRNA 对 Hucct-1 细胞自噬相关蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of sodium oxalate and LDHA-siRNA on Hucct-1 cell autophagy-related protein expressions were detected by Western blotting

3 讨论

细胞生长过程都是以能量代谢为基础。正常的组织细胞在缺氧环境下,可激活糖酵解代谢途径,LDHA 表达增高,应用糖酵解提供能量,产生大量的乳酸。在正常氧分压或缺氧条件下,肿瘤细胞过量摄取葡萄糖后,糖酵解途径激活,有氧供能受到抑制,产生大量乳酸,这种现象称为“Warburg 效应”^[6-7]。肿瘤的生长速度、恶性程度与能量代谢密切相关。研究表明,利用肿瘤细胞与正常细胞的代谢差异,扰乱其能量代谢过程,会对肿瘤细胞具有杀伤作用,而不会影响正常细胞的代谢^[8-9],这为肿瘤治疗提供了新的策略。LDHA 是能量代谢的关键酶之一。研究表明,LDHA 在胆管癌组织和胆管癌细胞中的表达水平升高^[10],说明 LDHA 与胆管癌的发生与发展相关。

胆管癌的发病机制复杂,与多种抑癌基因的失活、原癌基因的激活以及其他特殊的微环境相关,胆管癌组织中的 2- 氟 -2- 脱氧 -D- 葡萄糖显著增加,提示胆管癌细胞代谢具备 Warburg 效应^[11]。胆管癌的生长可能更加依赖肿瘤细胞的 Warburg 效应,因此可以推断,干扰胆管癌特有的能量代谢途径会抑制胆管癌的各种生物学行为,从而改善胆管癌患者的预后。LDHA 主要催化糖酵解途径的丙酮酸转化为乳酸,产生 ATP^[12];抑制 LDHA 必然会抑制胆管癌细胞的各种生物学行为;研究证实,阻断胰腺癌及乳腺癌等恶性肿瘤细胞的 LDHA 表达,可明显抑制这些肿瘤细胞的增殖,并诱导细胞凋亡的发生^[13]。本研究发现,LDHA 表达下调后,明显抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,由此推测,LDHA 有可能成为胆管癌治疗的新靶点。

草氨酸钠的化学成分为丙酮酸类似物,与丙

酮酸竞争性地结合 LDHA 而抑制其催化活性。作为一种新型的抗肿瘤药物,草氨酸钠具有广泛的应用前景。鉴于 LDHA 在肿瘤细胞 Warburg 效应中的关键作用,本研究发现草氨酸钠可通过阻断 LDHA 的酶活性,抑制胆管癌细胞增殖,促进其凋亡发生。细胞自噬在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用,自噬与凋亡是影响肿瘤的重要因素,调节自噬影响肿瘤细胞的生存与凋亡。目前,部分科学家认为,肿瘤细胞可以依赖细胞自噬维持细胞稳态,以抵抗放疗和化疗药物的压力,同时维持肿瘤细胞内蛋白质和细胞器的更新,防止 DNA 损伤^[14]。本研究在细胞水平证实,应用草氨酸钠干预胆管癌细胞后,细胞凋亡率升高,细胞自噬相关蛋白 ATG7、Beclin-1 和 LC3- II 表达水平明显升高,自噬底物蛋白 P62 表达水平下降。本研究发现草氨酸钠可以激活细胞自噬,促进细胞凋亡。草氨酸钠作为新型的抗肿瘤药物,其确切机制尚未明确。本研究组将继续通过动物体内实验探究草氨酸钠诱导胆管癌细胞凋亡的分子病理机制。

参考文献:

- [1] Sempoux C, Jibara G, Ward SC, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: new insights in pathology[J]. *Semin Liver Dis*, 2011, 31(1):49-60.
- [2] Wei CX, Wong H, Xu F, et al. IRF4-induced upregulation of lncRNA SOX2-OT promotes cell proliferation and metastasis in cholangiocarcinoma by regulating SOX2 and PI3K/AKT signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(23):8169-8178.
- [3] Cadamuro M, Brivio S, Mertens J, et al. Platelet-derived growth factor-D enables liver myofibroblasts to promote tumor lymphangiogenesis in cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4):700-709.
- [4] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5):325-337.
- [5] Garcia-Heredia JM, Carnero A. Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39):41582-41599.
- [6] Li L, Liang Y, Kang L, et al. Transcriptional regulation of the Warburg effect in cancer by SIX1[J]. *Cancer Cell*, 2018, 33(3):368-385.
- [7] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. *Cell*, 2011, 147(2):275-292.
- [8] Zhu Y, Dean AE, Horikoshi N, et al. Emerging evidence for targeting mitochondrial metabolic dysfunction in cancer therapy[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(9):3682-3691.
- [9] Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(4):267-277.
- [10] 廖敏琪, 傅 赞, 于亚平, 等. 乳酸脱氢酶A在人胆管癌组织及胆管癌细胞中的表达及意义[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(5):682-685.
- [11] Thonsri U, Seubwai W, Waraasawapati S, et al. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(5):503-510.
- [12] Tang D, Xu L, Zhang M, et al. Metformin facilitates BG45 induced apoptosis via an antiWarburg effect in cholangiocarcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4):1957-1965.
- [13] Cui XG, Han ZT, He SH, et al. HIF1/2 α mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(15):24840-24852.
- [14] 阚月一, 王娅杰, 李 琦, 等. 肿瘤发展过程中自噬与凋亡的相互作用[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(2):106-112.

Effects of Sodium Oxalate on Autophagy and Apoptosis of Cholangiocarcinoma Cells

HE Dawei¹, HE Aolin¹, ZHOU Minghui¹, YU Yaping², ZHANG Minghua²

(1. Clinical Experimental Research Center, 2. Department of Hepatobiliary surgery First People's Hospital of Kunshan, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China)

Correspondence to: ZHANG Minghua, zhmh1977@163.com

[Abstract] **Objective** To observe the effects of sodium oxalate, an inhibitor of lactate dehydrogenase A (LDHA), on autophagy and apoptosis of cholangiocarcinoma cell line Hucct-1, and to explore the related mechanisms. **Methods** Hucct-1 cells were treated with different concentrations of sodium oxalate. And LDHA siRNA was transfected into Hucct-1 cells by LipofectAMINE 2000 and Opti-MEM medium. Then the cell proliferation was detected by CCK8 assay, the apoptosis was detected by flow cytometry, and the cell migration was detected by scratch healing test. Meanwhile, the expressions of autophagy-related mRNAs and proteins were detected respectively by RT-PCR and Western blotting. And the lactic acid detection kit was used to detect lactate content in cells. **Results** Sodium oxalate inhibited the proliferation of Hucct-1 cells in a dose-dependent manner, its half-inhibitory concentration increased was 50 mmol/L. After Hucct-1 cells were treated with 50 mmol/L sodium oxalate or transfected with LDHA siRNA, the mRNA and protein expression levels of LDHA were decreased (both $P<0.01$), and the intracellular lactic acid content was decreased ($P<0.01$). In the meantime, the apoptosis rate was increased ($P<0.01$), and the cell migration distance was decreased ($P<0.01$). And the expression levels of autophagy-related gene 7 (ATG7), Beclin-1 and microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC-3 II) were increased (all $P<0.01$). In addition, the expression of P62 protein was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Sodium oxalate can promote autophagy and induce apoptosis by inhibiting the expression of LDHA in Hucct-1 cells. **[Key words]** Sodium oxalate; Cholangiocarcinoma; Lactate dehydrogenase A; Autophagy; Apoptosis