

中文摘要

尼日利亚菌素抗肝癌作用及对有氧糖酵解影响的研究

肝细胞癌严重威胁人类健康。中晚期肝癌病人通常需要进行抗肿瘤药物治疗。临床上现有化疗药物及分子靶向药物对肝细胞癌的治疗效果不理想，迫切需要开发有效且稳定的新型药物。尼日利亚菌素（Nigericin sodium salt, NSS）是一种来源于吸水链霉菌的聚醚类抗生素，体内外研究发现其对结肠癌、乳腺癌、肺癌等具有较好的抗肿瘤活性。有关 NSS 抗肿瘤作用的分子机制研究较少，有待深入。

肝癌细胞与其他组织来源的肿瘤细胞一样能量代谢也发生变化。肿瘤细胞的葡萄糖代谢从氧化葡萄糖过程转变为有氧糖酵解，主要依赖有氧糖酵解供能。糖酵解途径中的多种关键酶及调控蛋白在肿瘤发展中起关键作用。有氧糖酵解与肝癌的增殖、免疫逃逸、侵袭、迁移、血管生成等相关。

本研究在探讨 NSS 体内外抗肝癌作用的基础上，以有氧糖酵解为切入点，旨在明确 NSS 对肝癌细胞有氧糖酵解的影响及其分子机制。

在体外实验中分别通过 MTT 法、Annexin V-FITC 与 PI 双染法、划痕实验、Transwell 侵袭实验检测肝癌细胞增殖、细胞凋亡、迁移、侵袭能力；通过生化法测定肝癌细胞培养上清中乳酸（lactic acid, LD）含量及细胞中己糖激酶（hexokinase, HK）、乳酸脱氢酶（lactic dehydrogenase, LDH）和丙酮酸激酶（pyruvate kinase, PK）活性；应用免疫印迹法分析肝癌细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、糖酵解相关调控蛋白 AMPK-P、AMPK、GSK-3 β 、Glut1 的表达。体内实验中建立 Hepa1-6 荷瘤小鼠皮下移植瘤模型，分设模型对照组（生理盐水）、DOX 组（0.05 mg/kg）、NSS 组（0.05 mg/kg、0.1 mg/kg），移植瘤原位注射给药，计算抑瘤率，测定肿瘤组织中乳酸含量、HK、LDH、PK 等糖酵解关键酶活性。

本研究主要研究结果如下：

1. NSS 对肝癌细胞生物学特性的影响

NSS 可显著抑制肝癌细胞增殖，诱导部分肝癌细胞凋亡，上调 Bax 蛋白表达，下调 Bcl-2 蛋白表达，显著降低细胞迁移及侵袭能力。

2. NSS 对肝癌细胞有氧糖酵解影响的研究

NSS 可显著降低肝癌细胞培养上清中 LD 含量和细胞中 HK、LDH、PK 活性；显著降低活化的 AMPK、GSK-3 β 蛋白表达水平，对 Glut1 蛋白表达无显著影响。

3. NSS 对 Hepa1-6 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及有氧糖酵解的影响

与模型组相比，NSS 组肿瘤重量显著降低、抑瘤率显著增加；NSS 显著降低肿瘤组织中乳酸含量，抑制糖酵解关键酶 HK、LDH 和 PK 的活性。

综上所述，NSS 具有较强的抗肝癌活性，诱导细胞凋亡，抑制肝癌细胞迁移和侵袭能力；抑制肝癌细胞有氧糖酵解，并影响其关键酶活性与调节蛋白表达可能是 NSS 抗肝癌作用的重要分子机制。本研究为深入探讨 NSS 靶向代谢途径抗肿瘤作用奠定实验基础。

关键词：

尼日利亚菌素；肝细胞癌；有氧糖酵解；AMPK；GSK-3 β ；

Abstract

Study on the effect of anti-hepatoma of nigericin and aerobic glycolysis

Hepatocellular carcinoma poses a serious threat to human health. Patients with advanced liver cancer usually need to receive anti-tumor drug treatment. The therapeutic effects of existing chemotherapy drugs and molecular targeted drugs on hepatocellular carcinoma in clinical practice are not ideal, and there is an urgent need to develop effective and stable new drugs. Nigericin sodium salt (NSS) is a polyether antibiotic derived from *Streptomyces hygroscopicus*. It has been found that NSS has effective anti-tumor activity against colon cancer, breast cancer, lung cancer in vivo and in vitro studies. There is limited research on the molecular mechanisms underlying the anti-tumor effect of NSS, and further research is needed.

Hepatocellular carcinoma cells, like the tumor cells from other tissues, also undergo changes in energy metabolism. The glucose metabolism of tumor cells is usually converted to aerobic glycolysis from the process of oxidizing glucose. The tumor cells mainly rely on aerobic glycolysis for energy supply. Many key enzymes and regulatory proteins in the glycolytic pathway play a crucial role in tumor development. Aerobic glycolysis is related to the proliferation, immune escape, invasion, migration, and angiogenesis of hepatocellular carcinoma.

On the basis of exploring the anti-hepatoma effects of NSS in vivo and in vitro, this study takes aerobic glycolysis as the breakthrough point to clarify the effect of NSS on aerobic glycolysis of hepatocellular carcinoma and its molecular mechanism.

Experiments in vitro were respectively conducted to detect the proliferation, apoptosis, migration, and invasion ability of liver cancer cells by MTT assay, Annexin V-FITC and PI double staining, scratch test, and Transwell invasion assay. The content of lactic acid (LD) in the supernatant of hepatocellular carcinoma cell culture and the activities of hexokinase (HK), lactate dehydrogenase (LDH), and pyruvate kinase (PK) in the cells were measured by biochemical methods. Western blot was

used to detect the expression level of apoptosis related proteins Bax, Bcl-2, glycolysis related regulatory proteins of AMPK-P, AMPK, GSK-3 and Glut1 in hepatocellular carcinoma cells. In the experiments in vivo, Hepal-6 bearing mice subcutaneous transplanted tumor model were established, and were divided into model control group (physiological saline), DOX group (0.05mg/kg), and NSS group (0.05mg/kg, 0.1mg/kg). NSS and DOX were injected into transplanted tumor. The tumor inhibition rates were calculated. The lactate content, activities of key glycolytic enzyme-HK, LDH, PK in the tumor tissue were measured.

The main research results of this study include:

1. The effect of NSS on the biological characteristics of hepatocellular carcinoma cells

NSS can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, induce apoptosis in some hepatocellular carcinoma cells, upregulate Bax protein expression, and downregulate Bcl-2 protein expression, significantly reducing cell migration and invasion ability.

2. Study on the effect of NSS on aerobic glycolysis of hepatocellular carcinoma cells

NSS can significantly reduce LD content in the culture supernatant of hepatocellular carcinoma cells and the activity of HK, LDH, PK in these cells; and it also significantly downregulate the protein expression level of activated AMPK, GSK-3 β .

3. The anti-tumor activity and the effect on aerobic glycolysis of NSS on Hepal-6 tumor bearing mice

Compared with the model group, the tumor weight significantly decreased and the tumor inhibition rates significantly increased in NSS groups; NSS significantly reduced the lactate content and inhibited the activity of key glycolytic enzymes-HK, LDH, and PK in tumor tissue.

In summary, NSS has strong anti-hepatoma activity, can induce cell apoptosis, and inhibit the migration and invasion ability of hepatocellular carcinoma cells; Inhibiting the aerobic glycolysis and affecting its key enzyme activity as well as the

expression of regulating protein in hepatocellular carcinoma cells may be an important molecular mechanism of anti-hepatoma effect of NSS. This study lays the experimental foundation for further exploring the anti-tumor effects of NSS on metabolic pathways.

Keywords:

Nigericin; Hepatocellular carcinoma; Aerobic glycolysis; AMPK; GSK-3 β ;

目录

第一章 前言	1
1.1 肝细胞癌的研究进展	2
1.2 尼日利亚菌素	3
1.3 癌细胞糖代谢的调节	3
1.3.1 靶向糖代谢	4
1.3.2 代谢相关信号通路	5
1.4 本论文的选题依据	7
第二章 NSS 对肝癌细胞生物学特性的影响	8
2.1 实验材料和方法	8
2.1.1 实验细胞株	8
2.1.2 实验试剂	8
2.1.3 实验仪器	9
2.1.4 溶液配制	9
2.2 实验方法	11
2.2.1 细胞培养	11
2.2.2 MTT 法测细胞增殖	11
2.2.3 Annexin V-FITC/PI 法测细胞凋亡	12
2.2.4 细胞迁移实验-划痕实验	12
2.2.5 肿瘤侵袭实验——Transwell	13
2.2.6 细胞总蛋白提取	13
2.2.7 BCA 法测蛋白浓度	14

2.2.8 Western blot	14
2.3 统计学分析	16
2.4 实验结果	16
2.4.1 NSS 对 Hepa1-6、HepG2、SMMC 7721 细胞增殖的影 响	16
2.4.2 NSS 对 Hepa1-6、HepG2 和 SMMC 7721 细胞凋亡的影 响	18
2.4.3 NSS 对 Hepa1-6、HepG2、SMMC 7721 细胞凋亡相关蛋 白表达的影响	20
2.4.4 NSS 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响	21
2.5 小结	23
第三章 NSS 对肝癌细胞有氧糖酵解影响的研究	24
3.1 实验材料与方法	24
3.1.1 实验细胞株	24
3.1.2 实验试剂	24
3.1.3 主要实验仪器	24
3.1.4 乳酸含量及糖酵解酶活性测定	24
3.1.5 免疫印迹	28
3.2 实验结果	28
3.2.1 NSS 对培养上清中 LD 含量及细胞中 HK、LDH、PK 活 性的影响	29
3.2.2 NSS 对肝癌细胞有氧糖酵解调控蛋白表达的影响	30

3.3 小结:	32
第四章 NSS 对 Hepa1-6 荷瘤小鼠的抗肿瘤作用及有氧糖酵解的影响	33
4.1 实验材料	33
4.1.1 实验动物	33
4.1.2 药物	33
4.2 实验方法	33
4.2.1 动物模型建立	33
4.2.2 分组及给药	33
4.2.3 肿瘤的采集及处理	33
4.2.4 乳酸含量及糖酵解酶活性测定	34
4.3 统计学分析	34
4.4 实验结果	34
4.4.1 NSS 对 Hepa1-6 荷瘤小鼠一般状态及肿瘤生长的影响	34
4.4.2 NSS 对肿瘤组织中乳酸和糖酵解关键酶活性的影响	35
4.5 小结	35
讨论	36
结论	39
参考文献	40
致谢	48

第一章 前言

肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）是最常见的原发性肝癌类型^[1, 2]，其发病率在全球范围内呈上升趋势。最新的全球癌症统计数据表明，肝癌是癌症相关死亡的主要原因^[3]。目前，肝细胞癌的首选治疗方法是手术，是患者获得长期生存的唯一途径^[4]。中国对肝癌治疗现状的调查显示，早期肝癌患者易被漏诊^[5]，大多数患者确诊时已经是中晚期，失去了手术治疗的机会^[6]。由于传统化疗药物的治疗效果不理想，因此，迫切需要开发新型有效药物，以延长肝癌患者的生存期，提高患者的生存质量。

尼日利亚菌素（Nigericin sodium salt, NSS）是一种来源于吸水链霉菌代谢产物的聚醚类抗生素^[7]，具有抗菌、抗真菌、抗疟疾^[8]和抗癌活性^[9]，对多种耐药革兰氏阳性细菌具有有效的杀菌活性^[10]。NSS 具有选择性跨细胞膜传递离子的能力，被广泛用作干扰细胞内 H^+ 和 K^+ 浓度的研究工具^[11]。NSS 在多种恶性肿瘤中也发挥了一定的抗肿瘤作用^[12]，如胰腺癌^[13]、膀胱癌^[14]、结直肠癌^[15]、乳腺癌^[16]和鼻咽癌^[17]等。有研究表明 NSS 可选择性靶向鼻咽癌干细胞，抑制鼻咽癌细胞的增殖和侵袭能力，并可增强传统化疗药物疗效^[18]。NSS 抑制肿瘤生长的作用机制与 Wnt/ β -catenin 信号通路及应激激活蛋白激酶/c-jun 氨基末端激酶信号通路有关^[19]，有望成为临床应用的抗癌候选药物。

异常的癌症代谢，如细胞糖酵解和合成代谢增加，对肿瘤的发生、转移、产生耐药性具有重要作用。癌细胞转移是导致癌症患者死亡的主要原因。癌症转移包括侵袭、扩散、循环肿瘤细胞、定植和继发性肿瘤形成五个步骤。每一步骤都需要癌细胞内发生特定的代谢变化以适应周围环境。从代谢方面研究抗肿瘤作用机制十分必要，因为：（1）代谢变化是癌症的主要特点；（2）癌基因突变导致癌症代谢的改变；（3）代谢产物参与调节癌细胞中多种基因和蛋白质表达；（4）某些代谢产物可作为诊断和预后评价的生物标志物。

本文从肝细胞癌研究进展、尼日利亚菌素、癌症代谢研究进展等方面进行综述。

1.1 肝细胞癌的研究进展

恶性肿瘤已被公认为严重威胁人类健康的重大问题之一，是癌症死亡发生的主要原因^[20]，在中国其发病率呈上升趋势^[21]。肝癌患者死亡率在所有癌症中排名第二^[22]。HCC 的发病具有显著的性别差异和区域差异。在全球范围内，男性患肝癌的风险更高，男女比例为 2.4:1^[23]。HCC 80% 以上病例发生在发展中国家，从地理上看，发病率最高的地区是东亚和撒哈拉以南非洲^[24]，约占全球所有 HCC 的 80%，作为世界上 HCC 发病率最高的国家之一，中国肝癌患者人数约占全球病例的 45%。

HCC 是最常见的肝脏恶性肿瘤^[26]，占原发性肝癌病例的 80% 以上^[27]。HCC 起源于肝细胞，主要转移至肺、淋巴结、肾上腺和骨骼。转移性肝细胞癌通常预后不良^[28]。

在肝细胞癌中，慢性炎症引起的肝硬化是致癌的主要原因^[29]。肝硬化是肝细胞癌的重要危险因素，可以由慢性病毒性肝炎、酒精、遗传性代谢性疾病如非酒精性脂肪肝引起。研究发现乙型肝炎病毒（HBV）相关因素是慢性乙型肝炎患者发生 HCC 的关键因素，肥胖、糖尿病和脂肪肝等与肝细胞癌发生相关^[30]。

肝细胞癌的最佳治疗方法是手术切除。早期肝细胞癌需要在术后进行辅助治疗，包括：经导管肝动脉化疗栓塞术、射频消融术、放化疗和生物治疗^[31-33]。晚期肝细胞癌全身治疗的主要手段包括免疫治疗、化疗和靶向治疗^[34]。肝癌的早期诊断生物标志物较少，通常确诊时已无法手术切除。肝癌也缺少明确的治疗靶点^[35]，很多治疗手段无效。选择合适的药物来抑制肝癌的发展仍然是一个挑战^[36]。缺乏有效的药物治疗是肝癌患者死亡率高的主要原因之一。因此，迫切需要开发更有效的肝癌治疗药物。

近年来，靶向治疗药物在晚期肝细胞癌的 III 期试验中获得成功，包括索拉非尼、仑伐替尼和瑞戈非尼等^[37]。索拉非尼于 2008 年获得批准，是第一个 FDA 批准的晚期 HCC 药物^[38]。研究与肿瘤发生发展相关的细胞信号传导通路可为开发新型抗肿瘤药物提供新的靶点。HCC 发生与受体酪氨酸激酶信号传导相关，包括：表皮生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、肝细胞生长因子、血小板衍生生长因子受体和血管内皮生长因子受体。这些生长因子的激活启动细胞外信号，促进 HCC 细胞的存活和增殖^[39]。

近年来 HCC 的发病率持续增加，早期诊断、早期治疗对改善患者的预后至关重要。尽管肝癌的治疗方法很多，但大多数 HCC 患者确诊时已为中晚期，失去了手术切除和肝移植机会^[40]，药物治疗仍是其主要治疗手段。基于 HCC 发生发展的分子机制和潜在治疗靶点研发新型抗肿瘤药物具有重要意义。

1.2 尼日利亚菌素

尼日利亚菌素是一种聚醚类离子载体^[41]，在 1950 年代首次从吸水链霉菌中分离出来，并使用 X 射线晶体学揭示了其复杂的结构。其对单价阳离子如 Na^+ 和 K^+ 具有高亲和力，并且会破坏离子平衡，从而有选择性的转运阳离子来影响跨膜电位，还发现它可以抑制脂肪细胞中的葡萄糖转运。以往的研究证明 NSS 具有广泛的生物学活性，包括抗菌、抗真菌、抗病毒、抗疟疾和抗肿瘤^[42]。NSS 通过破坏离子稳态以最低有效浓度杀死疟原虫。可以有效抑制牛痘病毒和脊髓灰质炎病毒、人类免疫缺陷病毒（HIV）等病毒。NSS 以抗生素^[43]、抗疟药^[44]、抗弓形虫^[45]和抗病毒效力^[46]而发挥作用。NSS 在哺乳动物模型中可以诱导细胞凋亡和焦亡^[47]。

早在 1972 年，NSS 对艾氏腹水肿瘤细胞的胞内 pH、糖酵解和 K^+ 浓度的影响就被研究过^[48]。NSS 通过 H^+ 和 K^+ 跨细胞膜交换，在体内外作为单一药物或与其他抗癌药物联合使用，通过降低细胞内 pH 显示出良好的抗癌活性。也有研究发现，用 NSS 处理人 HeLa、A549 和 Huh7 细胞几乎可以完全消除牛痘病毒的复制^[49]。NSS 在体内外研究中对前列腺癌、膀胱癌、结直肠癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤也发挥了良好的抗癌作用。NSS 可特异性靶向鼻咽癌干细胞并抑制结直肠癌的转移^[50]。另有研究报道了 NSS 可抑制骨肉瘤 SRC/STAT3 信号传递途径^[51]；靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制结直肠癌细胞增殖^[52]。到目前为止尚未见有关 NSS 抗肝癌作用机制的报道。

1.3 癌细胞糖代谢的调节

葡萄糖代谢是生命最基本特征之一^[53]。在常氧条件下，大多数分化的细胞通过氧化磷酸化将葡萄糖转化为乙酰辅酶 A 和二氧化碳，以维持机体正常的能量代谢。然而在缺氧条件下，葡萄糖通过糖酵解直接还原为乳酸。20 世纪 20 年代科学家提出 Warburg 效应^[54]：即使在氧气供应足够的情况下，癌细胞仍然可以通过糖酵解产生能量，不依赖于线粒体的氧化磷酸化，癌细胞摄取葡萄糖、

产生 ATP、乳酸均增加，即有氧糖酵解。与线粒体氧化磷酸化相比，糖酵解产生较少活性氧，并可诱导肿瘤细胞凋亡。调控葡萄糖代谢最直接的方式包括影响其代谢酶或激酶，或操纵葡萄糖代谢中起重要作用的信号通路。

癌细胞的葡萄糖摄取和糖酵解增加。随着肿瘤的快速生长，血管处于缺氧状态，主要进行缺氧糖酵解以提供能量。癌细胞通过转录因子即缺氧诱导转录因子适应缺氧糖酵解^[55]。已有研究表明，PFK 等糖酵解关键酶在形成癌症 Warburg 效应中起着关键作用^[56]。癌细胞上调糖酵解酶的表达及其酶活性以促进有氧糖酵解，糖酵解增加导致酸性肿瘤微环境，使其有利于选择存活能力更强的癌细胞^[57]。葡萄糖代谢途径中的代谢酶及调节蛋白是研制新型药物是潜在靶点。

1.3.1 靶向糖代谢

糖酵解是细胞必不可少的能量来源。多种关键酶及调节因子参与癌细胞葡萄糖代谢的调节，见图 1.1。研究表明，糖酵解活性与结直肠癌、前列腺癌、胃癌、胰腺癌、肝癌等的恶性增殖、转移和化学耐药性有关^[58, 59]。

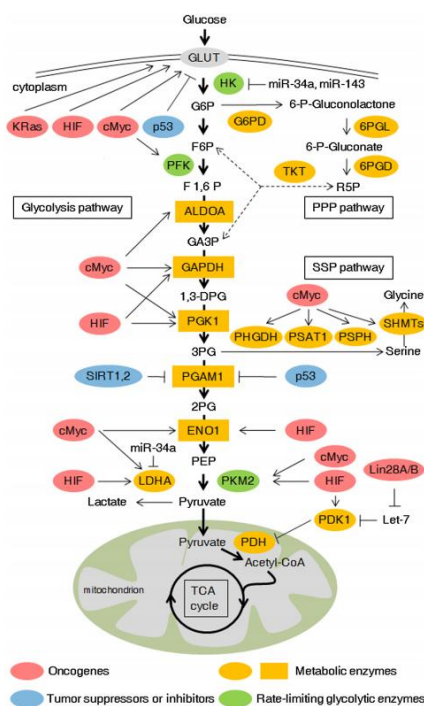


图 1.1 癌细胞中葡萄糖代谢的调节

(引自 Cell. Mol. Life Sci. 2016; 73:377–392)

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/307042125156006046>