

- 2015,31(4):675-676.
- [9] TORBA M, GJATA A, BUCI S, et al. The influence of the risk factor on the abdominal complications in colon injury management[J]. G Chir, 2015, 36(2): 57-62.
- [10] 杨立安,冯伟,张震波. 生长抑素治疗急性胰腺炎对患者胰腺血流及功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(7): 54-56.
- [11] WANG W G, TIAN B, BABU S R, et al. Randomized, placebo-controlled study of the efficacy of preoperative somatostatin administration in the prevention of postoperative complications following pancreaticoduodenectomy [J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(123): 400-405.
- [12] PATTI M G. Erythromycin use before induction of general endotracheal anesthesia[J]. JAMA Surg, 2015, 150(8): 738.
- [13] REA E, HUSBANDS E. Erythromycin: prophylaxis against recurrent small bowel obstruction[J]. BMJ Support Palliat Care, 2017, 7(3): 261-263.
- [14] 怀乔,蒋晨霞,孙瑞朋,等. 右美托咪定复合异丙酚对中重度烧伤患者围术期麻醉效果及应激因子水平的影响[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 9(5): 157-160.
- [15] 刘力婕,邹艳玲,薛志芳,等. 快速康复外科在胰腺癌术后对血清 IL-6、IL-10、TNF- α 水平的影响[J]. 重庆医学, 2015, 44(19): 26356-2637.
- [16] 李培武,王先坤,伏旭,等. 生长抑素对急诊腹部损伤患者术后胃肠功能恢复的临床观察[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2016, 5(1): 56-59.
- [本文编辑] 叶婷, 贾泽军

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20160987

· 短篇论著 ·

根皮苷可增强索拉非尼抑制肝癌细胞能量代谢及活力

王德华, 刘云燕*, 李敏然, 苗同国, 任桂芳, 董金红

河北省石家庄市第五医院介入肿瘤科, 石家庄 050017

[摘要] **目的:**探讨根皮苷联合索拉非尼对肝癌细胞能量代谢与凋亡的影响。**方法:**将根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 和(或)索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 HepG2 细胞 48 h 后,检测肝癌细胞活力、肝癌细胞葡萄糖摄取与细胞内 ATP 含量、caspase-3 活力与凋亡细胞计数。**结果:**索拉非尼组肝癌细胞活力降低,与对照组差异有统计学意义($P<0.05$);索拉非尼与根皮苷联合组肝癌细胞活力进一步降低,与其他各组(对照组、索拉非尼组及根皮苷组)差异均有统计学意义($P<0.05$)。根皮苷组葡萄糖摄取及 ATP 生成减少,与对照组差异有统计学意义($P<0.05$);索拉非尼与根皮苷联合组葡萄糖摄取及 ATP 生成进一步减少,与其他组差异均有统计学意义($P<0.05$)。索拉非尼组与根皮苷组 caspase-3 活力与细胞凋亡较对照组增强($P<0.05$);索拉非尼与根皮苷联合组 caspase-3 活力与细胞凋亡进一步增强,与其他组差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**根皮苷可以通过抑制肿瘤细胞 ATP 生成和促进肿瘤细胞凋亡来提高索拉非尼疗效。

[关键词] 肝细胞肝癌;索拉非尼;根皮苷;能量代谢;凋亡

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A

Synergistic effects of phloridzin and sorafenib on energy metabolism and vitality of hepatocellular carcinoma cells

WANG De-hua, LIU Yun-yan*, LI Min-ran, MIAO Tong-guo, REN Gui-fang, DONG Jin-hong

Department of Oncology Intervention, the Fifth Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of combination treatment of phloridzin and sorafenib on the energy metabolism and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** HepG2 cells were treated with sorafenib (5 $\mu\text{mol/L}$) and/or phloridzin (5 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, then the cell viability, glucose uptake, ATP content, caspase-3 activity, and apoptosis were analyzed. **Results:** Cell viability was inhibited in the sorafenib group compared with the control group($P<0.05$); a more obvious inhibitory effect was found in the combined treatment group, and significant differences were found between the

[收稿日期] 2017-09-25 **[接受日期]** 2018-03-26

[基金项目] 石家庄市科技局立项(121461823). Supported by Program of Shijiazhuang Municipal Science and Technology Bureau (121461823).

[作者简介] 王德华,硕士,主治医师. E-mail: wangdhwangdh@sina.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0311-85925618; E-mail: lyyblue6000@163.com

combined treatment group and all other groups (combined treatment group vs control group, sorafenib group, or phloridzin group; all $P < 0.05$). The glucose uptake and ATP content were reduced in the phloridzin group compared with the control group ($P < 0.05$); the decrease was more obvious in the combined treatment group, and significant differences were found between the combined treatment group and all other groups ($P < 0.05$). The caspase-3 activity and apoptosis were increased in the sorafenib group and phloridzin group compared with the control group ($P < 0.05$), which were more obvious in the combined treatment group, and significant differences were found between the combined treatment group and all other groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** There may be a synergistic effect of the phloridzin and sorafenib, which may be mediated by inhibiting the ATP generation and promoting the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

[Key Words] hepatocellular carcinoma; sorafenib; phloridzin; energy metabolism; apoptosis

肝细胞肝癌(简称肝癌)作为一种高危恶性肿瘤,全球发病率占恶性肿瘤发病率的第6位,致死率占恶性肿瘤致死率的第3位^[1]。由于肝癌早期症状不明显,且进展迅速,大多数患者发现时已属晚期,而此时鲜有有效治疗手段。近年来,索拉非尼在晚期肝癌患者的治疗中发挥了重要作用。索拉非尼作为一种多靶向激酶抑制剂,是目前唯一被批准用于经皮肝动脉化疗栓塞(TACE)失败后或极末期肝癌治疗的药物^[2]。然而,研究^[3]显示,索拉非尼对晚期肝癌患者的有效率仅30%,且患者常在用药6个月内产生耐受。因此,寻找有效增强索拉非尼抗肿瘤效应的方法并探索其机制显得急迫而重要。

肿瘤细胞的 Warburg 效应使其呈现不同于正常细胞依赖葡萄糖酵解供能的代谢模式^[4-5],糖酵解产生的能量被用于肿瘤的快速扩增与迁移。肿瘤细胞与正常细胞代谢模式的差异有望成为调控肿瘤生长的靶点。而葡萄糖通过葡萄糖转运体进入正常或肿瘤细胞是糖酵解的第1步。根皮苷是一种葡萄糖转运抑制剂,本研究探讨了其对索拉非尼抗肿瘤效应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 人 HepG2 细胞购自上海细胞生物研究所;血清、培养基购自 Abcam 公司;索拉非尼由德国拜耳公司生产;根皮苷购自上海生命科学学院。用 CCK-8 法确定 50% 细胞生长抑制(IC₅₀) 所须索拉非尼和根皮苷浓度,分别为 5.01 $\mu\text{mol/L}$ 、4.98 $\mu\text{mol/L}$,均采用 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 细胞活力检测 采用 CCK-8 法检测细胞活力。索拉非尼组 HepG2 细胞给予索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h;根皮苷组 HepG2 细胞给予根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h;索拉非尼联合根皮苷组(联合组)给予索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ + 根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h。通过测定 D_{450} 处光密度值,评

估各组细胞活力。

1.3 细胞葡萄糖摄取 通过葡萄糖代谢比色试剂盒(Biovision 公司)检测 HepG2 细胞葡萄糖摄取情况。各组 HepG2 细胞药物处理 48 h 后,按照试剂盒说明书顺次加入 KRPH、葡萄糖摄取缓冲液、2DG,室温避光孵育 30 min 后检测荧光值。

1.4 细胞 ATP 检测 采用 ATP Detection Assay Kit(Abcam 公司)检测细胞 ATP。各组 HepG2 细胞药物处理 48 h 后,按照说明书制作标准曲线,顺次加入 ATP 工作液。用分光光度计通过检测光信号强弱,以此反映细胞内 ATP 水平。

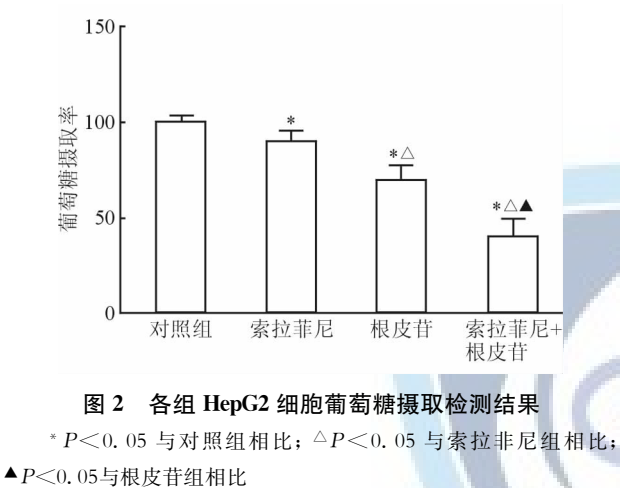
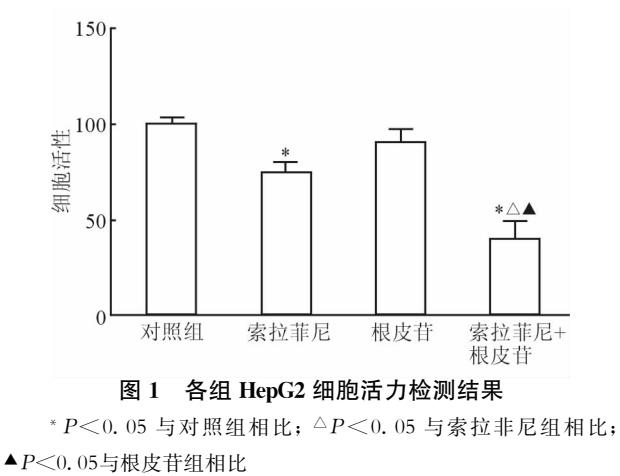
1.5 细胞 caspase-3 活力与凋亡细胞计数检测 采用 caspase-3 assay kit 试剂盒(Abcam 公司),通过比色法测定细胞 caspase-3 活力。凋亡细胞计数通过 Annexin V/PI 双染色后,应用流式细胞仪进行定量计数。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准(α)为 0.05。

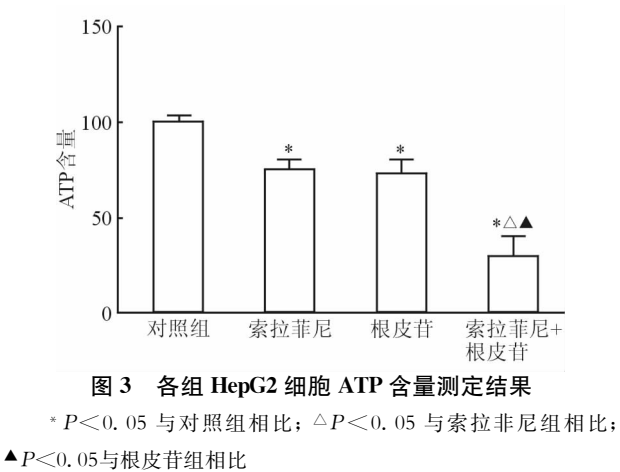
2 结果

2.1 索拉非尼和根皮苷对细胞活力的影响 CCK-8 检测结果(图 1)显示:索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后, HepG2 细胞活力降低($P < 0.05$);根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后, HepG2 细胞活力降低,但差异无统计学意义;联合组细胞活力进一步降低,与其他组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 索拉非尼和根皮苷对葡萄糖摄取的影响 细胞葡萄糖摄取实验结果(图 2)显示:索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后, HepG2 细胞葡萄糖摄取减少,但差异无统计学意义;根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后, HepG2 细胞葡萄糖摄取较对照组与较索拉非尼组均减少($P < 0.05$);联合组细胞葡萄糖摄取进一步减少,与其他组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

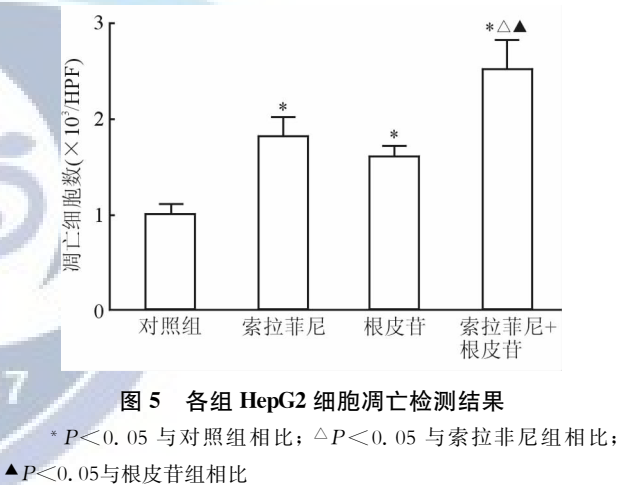
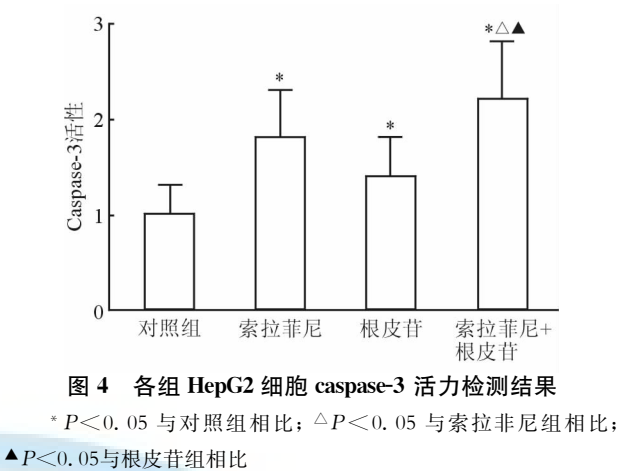


2.3 索拉非尼和根皮苷对细胞内 ATP 含量的影响 细胞 ATP 检测结果(图 3)显示:与对照组相比,索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 与根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后,HepG2 细胞内 ATP 生成均减少($P < 0.05$);联合组细胞内 ATP 进一步减少,与其他组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



2.4 索拉非尼和根皮苷对细胞凋亡的影响 Caspase-3 活力检测结果(图 4)显示:与对照组相

比,索拉非尼 5 $\mu\text{mol/L}$ 与根皮苷 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h 后,HepG2 细胞内 caspase-3 活力均提高($P < 0.05$);联合组 caspase-3 活力进一步提高,与其他组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组 HepG2 细胞凋亡与 caspase-3 变化情况一致(图 5)。



3 讨论

索拉非尼主要通过抑制 Raf 激酶活性和血管内皮生长因子受体、血小板衍生生长因子受体、c-kit 活性等,进而抑制肿瘤细胞增殖及新生血管生成^[6]。通过该作用,索拉非尼可以延长晚期肝癌患者生存时间,但有效率较低。因此,迫切须要探索可能的调控靶分子,并与索拉非尼联合应用,进而提高索拉非尼的疗效。

根皮苷可抑制多种葡萄糖转运体或通道^[7],从而减少细胞内葡萄糖含量,抑制糖酵解,进而降低肿瘤细胞能量供给。本研究中,索拉非尼组与根皮苷组肿瘤细胞内 ATP 含量均减少,与研究^[8]结论一致;根皮苷组细胞葡萄糖摄取减少,根皮苷引起肝癌细胞内 ATP 含量降低可能与其抑制葡萄糖摄

取有关;索拉非尼联合根皮苷组肿瘤细胞葡萄糖摄取和细胞内 ATP 含量较单药组进一步减少,这种肿瘤细胞能量代谢抑制效应可能体现为细胞活力降低、凋亡增加。

本研究中,根皮苷组细胞活力与对照组差异无统计学意义。陈娟等^[9]研究发现,低血糖能改善氧化损伤细胞的活力,维持细胞形态。根皮苷减少葡萄糖转运而可能不抑制细胞的活力的具体机制仍有待进一步研究。本研究中,索拉非尼可以促进肿瘤细胞凋亡,与文献^[10]报道相似;索拉非尼联合应用葡萄糖转运抑制剂时,这种促凋亡效应进一步加强。这是因为索拉非尼可以降低肿瘤细胞内 ATP 含量,从而影响肿瘤细胞的能量代谢,而与葡萄糖转运抑制剂联合应用时,葡萄糖转运被抑制。此外,葡萄糖转运体在肝癌细胞中高表达,并与肝癌分期晚、分化差等因素相关^[11-12],而索拉非尼可通过降低缺氧诱导因子-1(HIF-1)来下调葡萄糖转运体的表达^[13-14]。因此,联合应用葡萄糖转运抑制剂时,索拉非尼疗效增强,肿瘤细胞内能量进一步减少、细胞凋亡增加。

综上所述,代谢抑制剂可以通过协同索拉非尼抑制肿瘤细胞葡萄糖摄取来减少细胞内能量,进而降低细胞活力、促进细胞凋亡,提高索拉非尼的疗效。本研究为晚期肝细胞癌患者索拉非尼的优化治疗,以及提高晚期肝癌患者生存率提供了新思路。

参考文献

- [1] FORNER A, LLOVET J M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2012, 379(9822):1245-1255.
- [2] BRUIX J, SHERMAN M, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma: an update [J]. *Hepatology*, 2011, 53(3): 1020-1022.
- [3] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4):378-390.
- [4] DEBERARDINIS R J, LUM J J, HATZIVASSILIOU G, et al. The biology of cancer; metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1):11-20.
- [5] TRAN Q, LEE H, PARK J, et al. Targeting cancer metabolism - revisiting the warburg effects[J]. *Toxicol Res*, 2016, 32(3):177-1793.
- [6] Tesori V, Piscaglia A. C, Samengo D, et al. The multikinase inhibitor Sorafenib enhances glycolysis and synergizes with glycolysis blockade for cancer cell killing [J]. *Sci Rep*, 2015, 5, 9149.
- [7] WILHELM S M, CARTER C, TANG L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19), 7099-7109.
- [8] ORONSKY B T, ORONSKY N, FANGER G R, et al. Follow the ATP: tumor energy production; a perspective[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14(9):1187-1198.
- [9] 陈娟,张景燕,王蓉,等. 热量限制对 SH-SY5Y 细胞氧化损伤的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10):33-36.
- [10] ISHIJIMA N, KANKI K, SHIMIZU H, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by retinoic acid sensitizes hepatocellular carcinoma cells to apoptosis induced by sorafenib [J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(5):567-575.
- [11] AMANN T, HELLERBRAND C. GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(12):1411-1427.
- [12] AMANN T, MAEGDEFRAU U, HARTMANN A, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(4): 1544-1522.
- [13] MA L, LI G, ZHU H, et al. 2-Methoxyestradiol synergizes with sorafenib to suppress hepatocellular carcinoma by simultaneously dysregulating hypoxia-inducible factor-1 and -2 [J]. *Cancer Lett*, 2015, 355(1):96-105.
- [14] FAN R, HOU W J, ZHAO Y J, et al. Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1 α upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4655-4663.

[本文编辑] 姬静芳