

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.004

· 基础研究 ·

2-脱氧葡萄糖增强顺铂对人黑色素瘤细胞杀伤作用及其机制

李红霞^a,朱国方^b,谢敏^b,路遥^a,薄俊霞^a,刘庆平^a,王若雨^b,秦建中^{a,b}(大连大学 a. 生命科学与技术学院,辽宁省糖脂代谢重点实验室; b. 附属中山医院肿瘤科,辽宁省肿瘤生物标记筛选和靶向药物转化重点实验室,辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:** 探讨2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-glucose, 2-DG)和顺铂(cisplatin)药物组合对人黑色素瘤细胞凋亡的影响及其作用机制。**方法:** 用MTT法检测细胞活力,Annexin-V/PI染色和流式细胞仪检测细胞凋亡。Western blotting检测相关蛋白表达。细胞内ATP含量用生物发光试剂盒检测。**结果:** 不同浓度顺铂(5~25 μmol/L)单药处理虽然能以剂量和时间依赖方式抑制A375细胞活力,但与2-DG(10 mmol/L)联合使用,顺铂处理浓度除5 μmol/L外都显示增强对细胞活力的抑制作用。2-DG(10 mmol/L)单独处理并不诱导A375细胞出现明显死亡(<10%),顺铂(20 μmol/L)单独作用导致50%左右的细胞死亡,而两者联合则导致大于80%的细胞死亡,与单独用药组比较差异显著($P < 0.01$)。顺铂单药或与2-DG联合均诱导Caspase-3和PARP-1裂解,并抑制抗凋亡蛋白Mcl-1的表达。2-DG联合顺铂(20 μmol/L)能明显抑制II型己糖激酶表达,并且使细胞内ATP含量降低于对照组(6.3 vs 33.0 μmol/mg),与单药组比较差异显著($P < 0.01$)。2-DG联合顺铂不诱导正常人黑色素细胞凋亡。此外该药物联合对另外三种人黑色素瘤细胞(SK-100, C8161和Mum-2C)也有增强杀伤的作用。**结论:** 2-DG能特异地增强顺铂诱导人黑色素瘤细胞凋亡的敏感性,作用机制可能与下调抗凋亡蛋白Mcl-1表达,抑制肿瘤己糖激酶水平和ATP合成有关。

[关键词] 黑色素瘤;2-脱氧葡萄糖;顺铂;细胞凋亡;三磷酸腺苷

[中图分类号] R730.53; R739.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)06-0759-07

Two-deoxy glucose enhances killing efficacy of cisplatin on human melanoma cells and its mechanism

LI Hongxia^a, ZHU Guofang^b, XIE Min^b, LU Yao^a, BO Junxia^a, LIU Qingping^a, WANG Ruoyu^b, QIN Jianzhong^{a,b}(a. Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism of Liaoning Province, School of Life Science and Biotechnology; b. Key Laboratory for Tumor Biomarker Screening and Target Drug Developing of Liaoning Province, Department of Oncology, Affiliated Zhongshan Hospital, Dalian University, Dalian 116600, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of drug combination of 2-deoxy glucose (2-DG) and cisplatin on apoptosis of human melanoma cells and its mechanism. **Methods:** MTT assay was used to detect viability of the cells; Annexin-V/PI staining and flow cytometry assay detected apoptosis of the cells and Western blotting assay detected expressions of related-apoptosis protein. Intracellular ATP content was detected by a bioluminescence kit. **Results:** Although cisplatin with various concentrations (5–25 μmol/L) alone inhibited viability of the A375 cells as concentration and time dependent patterns, cisplatin (except 5 μmol/L) combined with 2-DG (10 μmol/L) all enhanced inhibition effect on viability of the cells. Single 2-DG (10 μmol/L) did not induce apparent death of the A375 cells (<10%), single cisplatin (20 μmol/L) resulted in death of the cells (about 50%) and both of them resulted in death of the cells (>80%), comparing with single drug groups there was a significant difference ($P < 0.01$). Single cisplatin or combination with 2-DG all

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81241148);大连市科技计划项目(No. 2014E14SF147)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81241148), and the Science and Technology Plan of Dalian (No. 2014E14SF147)

[作者简介] 李红霞(1990–),女,内蒙古乌兰察布人,硕士生,主要从事小分子化合物的抗肿瘤机制研究, E-mail: 15661251922@163.com

[通信作者] 秦建中(QIN Jianzhong, corresponding author), E-mail: jzqin68@hotmail.com;王若雨(WANG Ruoyu, co-corresponding author), E-mail: wangruoyu1963@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20161110.1112.002.html>

induced cleavages of Caspase-3 and PARP-1, and inhibited expression of anti-apoptosis protein Mcl-1. Two-DG combined with cisplatin (20 $\mu\text{mol/L}$) could significantly inhibit expression of hexokinase II and content of intracellular ATP was lower than that in the control group (6.3 $\mu\text{mol/mg protein}$ vs 33 $\mu\text{mol/mg protein}$), that was significantly different from those of single drug groups ($P < 0.01$). Two-DG combined with cisplatin did not introduce apoptosis of normal human melanocytes. In addition, the combination of both drugs also enhanced activity of killing another three human melanoma cells (SK-100, C8161 and Mum-2C). **Conclusion:** Two-DG could specifically enhance susceptibility of cisplatin to induce apoptosis of human melanoma cells, Its mechanism could relate with down-regulating expression of anti-apoptosis protein Mcl-1 as well as inhibiting level of tumor hexokinase and synthesis of ATP.

[**Key words**] melanoma; 2-deoxy glucose (2-DG); cisplatin; cell apoptosis; adenosine triphosphate (ATP)

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(6): 759-765. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.004]

恶性黑色素细胞瘤是一种极度恶性的肿瘤^[1]。化疗曾经是晚期黑色素瘤患者的主要治疗选择,但效果不太理想^[2]。近年来临床应用 B-raf 抑制剂和免疫检查点阻断剂,显著提高了恶性黑色素瘤的治疗效果^[3-4]。但前者只对带有 B-raf 突变基因的肿瘤有效,且易复发,远期疗效不稳定^[5]。抗 CTLA-4 或抗 PD1 抗体只对部分病人(约 20%)有延长存活期的效果^[6]。因此,虽然靶向治疗和免疫治疗取代了化疗作为黑色素瘤的一线治疗方案,但后者对于非适应症或已产生抵抗的患者,仍有重要治疗价值。黑色素瘤细胞葡萄糖消耗量和糖酵解的速率远高于正常黑色素细胞^[7-9],抑制糖代谢是实现特异性肿瘤治疗的新策略^[10]。2-脱氧葡萄糖(2-deoxy glucose, 2-DG)是一种糖酵解抑制剂,它能诱导多种肿瘤细胞凋亡和生长抑制^[11-12],笔者也观察到它能增强 TRAIL 对黑色素瘤细胞的杀伤作用^[13]。顺铂(cisplatin)导致 DNA 损伤,诱导肿瘤细胞死亡,在黑色素瘤化疗中常与其它药物联合使用^[14]。本研究的目的是探讨 2-DG 能否增强顺铂对黑色素瘤细胞的特异性杀伤作用以及相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

A375 人恶性黑色素瘤细胞株购自南京凯基生物有限公司,其它黑色素瘤细胞株(C8161, SK-mel100, Mum-2C)来自芝加哥 Loyola 大学皮肤肿瘤实验室。2-DG 购自 Sigma 公司, Cisplatin 购自江苏豪森药业股份有限公司;细胞培养基、0.25% 胰酶、小牛血清(FBS)均购自 HyClone 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于 Solarbio 公司;复合蛋白酶抑制剂与复合磷酸酶抑制剂购自 Roche 公司;M-Permmalian 蛋白提取缓冲液购自 PIERCE 公司;鼠抗酪氨酸酶抗体购自 Abcam 公司;Biotin 标记的抗鼠二抗购自 Auragene 公司;Caspase-3、PARP-1、Mcl-1、

HK-II、GAPDH 均购自 Santa Cruz 公司;山羊抗兔 HRPIgG、山羊抗小鼠 HRPIgG、驴抗山羊 HRPIgG、增强型 ATP 检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究所。Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Biovision 公司。

1.2 肿瘤细胞培养

A375 和 SK-mel100 细胞使用 DMEM 培养液, C8161 和 Mum-2C 细胞使用 RPMI 1640 培养液,所有培养液均含有 10% 小牛血清、青霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)和硫酸链霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)。细胞培养于 37 $^{\circ}\text{C}$,饱和湿度的 5% CO_2 培养箱中。

1.3 正常人黑色素细胞的分离与培养

取正常儿童包皮环切手术的皮肤标本,去除皮下脂肪组织,分离表皮组织,并经胰蛋白酶消化,分散表皮细胞。用正常人黑色素细胞培养液(Sciencell)培养,第 3~5 代的正常人黑色素细胞用于实验。正常人黑色素细胞用酪氨酸酶免疫组织化学染色技术鉴定。

1.4 MTT 检测细胞活性

取对数生长期的单细胞悬液接种于 96 孔板(6 000 个细胞/孔),培养,加不同浓度的顺铂(0, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$)或各浓度顺铂与 2-DG(10 mmol/L)的混合试剂,每个处理组设 3 个复孔,重复 2 次。终止培养前 4 h,向各处理孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)15 μl ,培养至 24 或 48 h,用多功能酶标仪读取波长 570 nm 处各孔光密度(D)值,按如下公式计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(实验组 D 值 - 空白组 D 值)/(对照组 D 值 - 空白组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.5 FACS 检测细胞凋亡

接种细胞于 6 孔细胞培养板(3×10^5 个细胞/孔),分别设置未处理对照组、顺铂组(20 $\mu\text{mol/L}$)、2-DG 组(10 mmol/L)以及两者联合用药组,按 Annexin-V/PI 检测试剂盒说明书操作,用流式细胞

仪检测细胞凋亡情况,数据用 FlowJO 软件分析,将早期凋亡(Annexin-V 阳性)与晚期凋亡(Annexin-V/PI 双阳性)的细胞数之和计为死亡细胞数。

1.6 Western blotting 法检测蛋白表达

用细胞刮板收获各组药物处理后的细胞,提取细胞总蛋白。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白,行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并将蛋白转移到 PVDF 膜,与靶蛋白 Caspase-3、PARP-1、Mcl-1、HK-II 或 GAPDH 特异抗体及辣根过氧化物酶标记的靶蛋白相应二抗(HRP 山羊抗兔 IgG、HRP 山羊抗小鼠 IgG、HRP 驴抗山羊 IgG)反应。用 ECL 试剂和化学发光凝胶成像系统显影和检测蛋白质表达信号。

1.7 ATP 检测实验

将细胞接种于 12 孔细胞培养板,加入顺铂(10, 20 $\mu\text{mol/L}$)或顺铂与 2-DG(10 mmol/L)的混合试剂,培养 24 或 48 h。收集各孔上清及漂浮细胞,离心后保留沉淀细胞。每孔加入 200 μl ATP 裂解液,充分裂解离心管内的细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心,取上清。按照增强型 ATP 检测试剂盒说明书操作,多功能酶标仪检测各孔的化学发光(RLU)值,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各样品的蛋白浓度。根据标准曲线计算 ATP 浓度,再用各样品蛋白含量对其标准

化,ATP 水平用 $\mu\text{mol/mg}$ 蛋白表示。

1.8 统计学处理

应用 SPSS17.0 软件进行数据统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的单因素方差分析和重复资料的方差分析进行统计与分析,采用双侧概率检验进行统计检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 2-DG 增强顺铂抑制 A375 黑色素瘤细胞活力

MTT 实验显示,不同剂量 2-DG(5 ~ 15 mmol/L)单独处理 A375 细胞 24 ~ 72 h,能抑制细胞活力,各剂量组在 24,48 和 72 h 的细胞活力与未加药组比较均有显著差异($P < 0.05$)。10 mmol/L 的 2-DG 作用 48 h,细胞活力降低为未用药组细胞的 50% 左右(图 1A)。因此在后续实验中选用 10 mmol/L 为 2-DG 与顺铂联合用药的剂量。单独使用顺铂(5 ~ 25 $\mu\text{mol/L}$)对 A375 细胞活力的抑制作用比 2-DG 明显,但抑制作用在 48 h 达到高峰,48 和 72 h 的剂量作用曲线基本重合。除顺铂(5 $\mu\text{mol/L}$)24 h 处理组外,3 个时间点其它各处理组与未加药组比较均有显著差异($P < 0.05$)(图 1)。

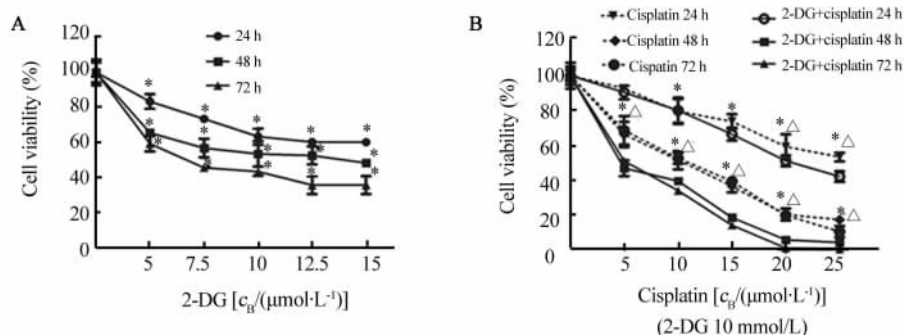


图 1 2-DG 增强顺铂抑制 A375 黑色素瘤细胞活力的作用

Fig. 1 2-DG enhanced inhibitive effect of cisplatin on cyto-viability of melanoma cell A375

* $P < 0.05$ vs blank group, $\Delta P < 0.05$ vs combined groups of the same dose at the same time point

2-DG 与高剂量顺铂(20、25 $\mu\text{mol/L}$)联合处理细胞 24 h,细胞活力显著低于顺铂单药组,随着时间延长至 48 h,细胞活力减少更明显,各剂量联合药物组与顺铂单药组比较均有显著差异($P < 0.05$)。顺铂(20 $\mu\text{mol/L}$)和 2-DG(10 mmol/L)单药处理 48 h 的细胞活力分别为(20.16 \pm 3.46)% 和(53.48 \pm 7.24)%,两者联合处理的细胞活力为(4.19 \pm 1.56)%。2-DG 加顺铂联合处理组 48 h 和 72 h 的剂量反应曲线基本一致,表明 2-DG 和顺铂联合用

药对肿瘤细胞活力有协同抑制作用,而且 48 h 的协同抑制作用达到高峰。

2.2 2-DG 促进顺铂诱导黑色素瘤细胞凋亡

细胞凋亡检测表明,A375 细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理 48 h 后,50% 左右的细胞死亡,而单独 2-DG 处理几乎没有 A375 细胞死亡,表明 A375 细胞对顺铂比较敏感。但是当 2-DG 与顺铂联合作用时,A375 细胞死亡率大于 80%。与顺铂单药组比较,2-DG 与顺铂联合作用的差异显著($P < 0.01$)(图 2)。

检测细胞凋亡相关蛋白发现, 顺铂(10和20 $\mu\text{mol/L}$)单独处理细胞48 h后, 出现典型的细胞凋亡特征, 表现为 PARP-1 蛋白裂解与可测到的 Caspase-3 裂解, 后者在联合用药条件下变得更加明显(图3)。顺铂单独处理能以剂量依赖的方式下调细胞抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达。2-DG 单独作用对 Mcl-1 也有抑制作用, 当与低剂量顺铂联合时抑制作用更显著, 但与高剂量顺铂合用时 Mcl-1 水平与顺铂单药组基本一致(图3)。

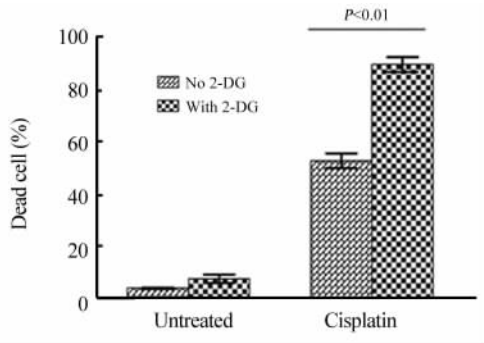


图2 2-DG 促进顺铂诱导 A375 黑色素瘤细胞凋亡的作用
Fig. 2 2-DG promotes apoptosis of melanoma A375 cells induced by cisplatin

于20%和30%), 但两者联合作用, 则可使 HK-II 蛋白的表达降低80%以上(图4A, B)。细胞内 ATP 检测结果表明, 2-DG 和顺铂单独处理细胞24 h, 几乎不影响细胞内 ATP 浓度, 但 2-DG 无论与低剂量(10 $\mu\text{mol/L}$)或高剂量(20 $\mu\text{mol/L}$)顺铂联合都能显著降低细胞内 ATP 的水平, 与顺铂单药组比较差异显著($P < 0.01$, 图4C)。作用48 h后, 2-DG 单药组的 ATP 浓度比未处理组有明显减少($P < 0.05$), 但作用弱于顺铂单药组。2DG 与顺铂(10 $\mu\text{mol/L}$ 或 20 $\mu\text{mol/L}$)联合则使细胞内 ATP 水平分别降低到小于未处理组的20%或检测不到的程度(图4D)。

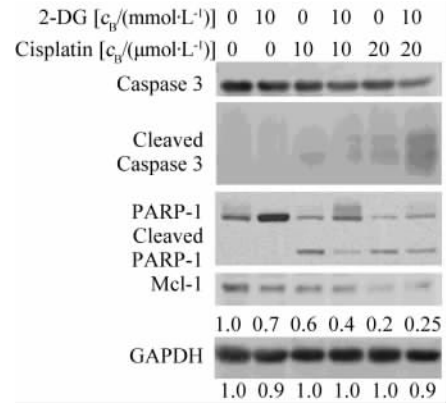


图3 Western blotting 检测 2-DG 与顺铂联合作用对凋亡相关蛋白的影响

Fig. 3 Effect of 2-DG combined with cisplatin on apoptosis-related proteins detected by Western blotting assay

2.3 2-DG 联合顺铂抑制己糖激酶的表达并降低细胞内 ATP 水平

用 Western blotting 方法检测 II 型己糖激酶(HK-II)的表达发现: 2-DG(10 mmol/L)和顺铂(20 $\mu\text{mol/L}$)单独作用对 HK-II 的抑制作用较弱(分别小

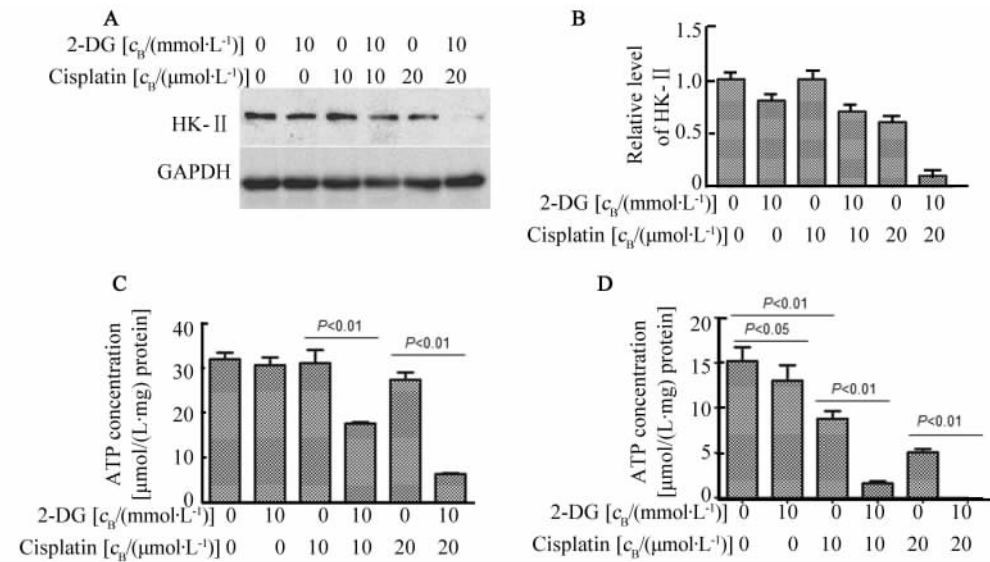


图4 2-DG 联合顺铂对黑色素瘤细胞能量代谢的影响

Fig. 4 Effect of 2-DG combined with cisplatin on energetic metabolism of melanoma cells

A: Expression of HK II protein detected by Western blotting; B: Expression level of HK II protein in various treatment groups;

C: ATP levels treated for 24 h in various treatment groups; D: ATP levels treated for 48 h in various treatment groups (图 5A)。用 2-DG(10 mmol)与顺铂(20 $\mu\text{mol/L}$)分别或联合处理正常人黑色素细胞 48 h, 然后进行细胞凋亡检测。结果显示单药组或联合用药组黑色素细胞均未出现明显的细胞凋亡(图 5B,C)。

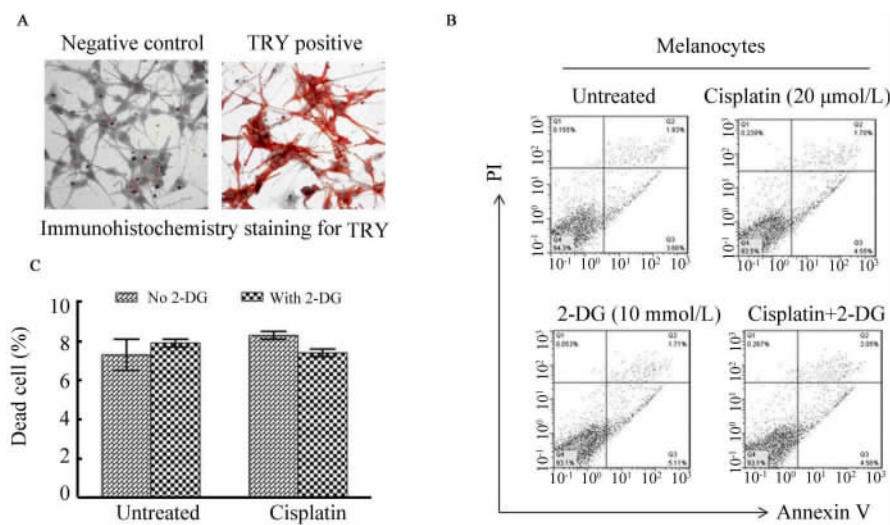


图 5 2-DG 联合顺铂对正常人黑色素细胞凋亡的作用

Fig. 5 Effect of 2-DG combined with cisplatin on apoptosis of normal human melanocytes

A: Images of tyrosinase in normal human melanocyte detected by immunohistochemistry staining ($\times 400$);

B: Apoptosis profiles of normal human melanocyte in various treatment groups assessed by FACS;

C: Quantitatively analyzed apoptosis cells of normal human melanocyte in various treatment groups

2.5 2-DG 增强顺铂对多种黑色素瘤细胞的杀伤作用

为了验证 2-DG 与顺铂联合用药的抗肿瘤作用是否具有细胞特异性, 进一步检测了 C8161、Mum-2C 和 SK-mel 100 三株黑色素瘤细胞对这种药物组合的敏感性。结果显示不同细胞对 2-DG 或顺铂单独处理的敏感性有所不同。2-DG 在 SK-mel100 和 C8161 细胞诱导少于 20% 的细胞死亡, 诱导 Mum-2C 细胞死亡率和未处理组没有明显差别。顺铂单药组 C8161、Mum-2C 和 SK-mel 100 三株细胞的细胞死亡率分别为 $(13.7 \pm 3.7)\%$ 、 $(23.1 \pm 1.9)\%$ 和 $(30.5 \pm 6.2)\%$, 对顺铂的敏感性为 C8161 < Mum-2C < SK-mel 100。当两种药物联合使用时, 三株细胞的死亡率都显著高于单药组, 分别为 $(37.8 \pm 6.7)\%$ 、 $(79.1 \pm 1.8)\%$ 和 $(89.1 \pm 1.8)\%$, 与顺铂单药组比较, 差异均有统计学意义(图 6) ($P < 0.05$)。值得注意的是, 2-DG 与顺铂联合诱导细胞死亡的程度与细胞对顺铂的敏感性有关。

3 讨论

肿瘤细胞有不同于正常细胞的代谢方式, 主要特征之一是对葡萄糖的依赖性增加, 并且即使在有

氧条件下也主要依赖增强糖酵解反应提供的能量和合成生物大分子的中间产物^[14]。有研究^[15-16]报道,

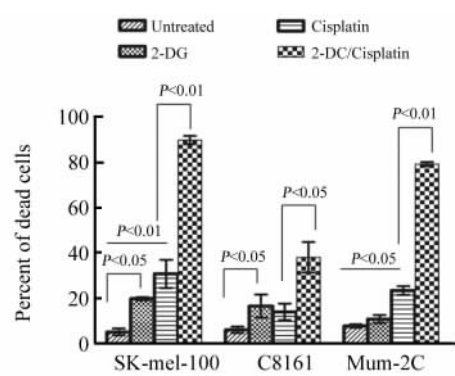


图 6 2-DG 增强顺铂对多种黑色素瘤细胞的杀伤作用

Fig. 6 2-DG enhanced killing effect of cisplatin on multimelanoma cells

为了满足能量和细胞增生的需求, 肿瘤细胞葡萄糖的消耗量和糖酵解速率分别是正常细胞的 10 倍和 30 倍。因此, 抑制肿瘤细胞的糖代谢功能无疑对肿瘤特异治疗有重要意义。2-DG 是一种葡萄糖类似

物,它能够与葡萄糖竞争结合己糖激酶而被磷酸化,但磷酸化的 2-DG 却不能被细胞代谢所利用,因此起到糖酵解抑制剂的作用^[17]。尽管许多研究^[18]报道,2-DG 可以抑制肿瘤细胞增生,能量合成和诱导细胞凋亡,但在本研究中,发现单独使用 2-DG 对黑色素瘤细胞没有显著的杀伤作用,在 24 h 内也没有明显干扰细胞能量合成,提示 2-DG 单药对黑色素瘤治疗的意义不大。因此,研究 2-DG 能否影响其它抗肿瘤药物的治疗效果可能更有价值。

通常顺铂在黑色素瘤化疗中与其它药物(如 dacarbazine、vinblastine)联合使用^[19],但顺铂与 2-DG 联合应用对黑色素瘤细胞的影响尚未见报道。本研究发现顺铂在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时有明显的抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖,诱导凋亡的作用,但与 2-DG 联合使用时,超过 80% 的细胞死亡,细胞活力也小于 10%,表明 2-DG 能增加顺铂对黑色素瘤细胞的杀伤作用。本研究观察到 2-DG 和顺铂联合处理的细胞显示细胞凋亡的生化特征,表现为 Caspase-3 裂解增加和 PARP-1 蛋白裂解。为了排除 2-DG 与顺铂协同抗肿瘤作用的细胞特异性,又选择了三种对顺铂敏感性不同的黑色素瘤细胞作为研究对象,结果证明该药物组合对其它黑色素瘤细胞也有增加抗肿瘤作用,例如顺铂单独作用诱导 SK-mel 100 和 Mum-2C 细胞的死亡率均低于 A375 细胞,但与 2-DG 合用的细胞死亡率几乎与 A375 细胞相同。值得注意的是,C8161 细胞对顺铂抵抗最强,相应地对顺铂与 2-DG 组合的敏感性也相对较低,这提示 2-DG 与顺铂联合使用应选择对顺铂有一定敏感性的肿瘤细胞。许多体外实验研究在探讨药物抗肿瘤作用时,忽略了观察对正常细胞的影响。本研究比较了 2-DG 和顺铂对黑色素瘤细胞和正常人黑色素细胞的作用,发现本研究所用的药物组合能够明显诱导黑色素瘤细胞死亡,但对正常人黑色素细胞几乎没有任何影响,提示 2-DG 和顺铂的细胞杀伤作用具有相对的肿瘤细胞特异性,为该药物组合对黑色素瘤的临床应用提供了新的支持证据。但是,2-DG 与顺铂联合对其它正常组织细胞,尤其是肾脏细胞(顺铂具有肾毒性的副作用)的影响还需要进一步观察。

本研究对 2-DG 增强顺铂抗黑色素瘤细胞的作用机制也提供了有价值的线索。观察到 2-DG 和顺铂单独都能下调 Mcl-1 蛋白表达,但 2-DG 与浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂合用则导致 Mcl-1 较单药组降低更明显。Mcl-1 是 Bcl-2 蛋白家族中重要的抗凋亡成员之一。许多研究表明,Mcl-1 的水平直接影响

肿瘤细胞对治疗药物的抵抗性^[20],下调 Mcl-1 可能促使细胞对该药物组合变得更敏感。在本实验条件下,2-DG 似乎对高浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)顺铂抑制 Mcl-1 表达没有促进作用,尚无实验证据解释该现象,推测可能由于高浓度顺铂已导致 Mcl-1 降低到可检测的最低程度,或诱导了某种反馈机制阻止 Mcl-1 继续下调。本研究没有对其它细胞凋亡调节蛋白进行系统检测,因此不排除 2-DG 联合顺铂也会对其它促细胞生长和存活因子产生影响的可能性。

其次,多年来人们认为顺铂诱导细胞死亡的主要机制是导致 DNA 损伤。后来发现,顺铂可以进入线粒体,与线粒体 DNA 结合,影响线粒体酶的表达与功能,从而抑制细胞能量代谢并增加细胞内氧自由基水平。有研究^[21-22]报道,2-DG 与顺铂联合能改变细胞内氧化还原平衡状态。本研究发现 2-DG 或顺铂单独处理细胞 24 h,并不明显降低细胞内 ATP 水平,但两者联合作用时,ATP 浓度显著降低。这可能是由于肿瘤细胞能够通过糖酵解和线粒体三羧酸循环两种途径合成 ATP,2-DG 抑制糖酵解造成的能量合成减少可以通过增加线粒体代谢获得补偿,反之亦然。但当 2-DG 抑制糖酵解和顺铂抑制线粒体功能同时发生,细胞内 ATP 合成就会显著降低。处理 48 h 后,糖酵解和线粒体各自代偿能力降低,因此导致单药组即出现 ATP 降低。顺铂处理的细胞 ATP 降低更明显,这提示顺铂可能主要作用于具有高效合成 ATP 功能的线粒体。推测 2-DG 加顺铂在 48 h 抑制大部分 ATP 合成,是导致大量细胞死亡的原因之一。本研究还发现,2-DG 联合顺铂能显著降低 II 型己糖激酶的表达。由于己糖激酶是葡萄糖代谢的关键限速酶,提示该药物组合的协同作用主要依赖于二者对葡萄糖代谢和线粒体功能的抑制作用。有报道^[23]表明,用 SiRNA 沉默己糖激酶可以增强肿瘤细胞对顺铂的敏感性。

总之,本研究证明 2-DG 能增强顺铂对黑色素瘤细胞的杀伤作用,但不影响正常人黑色素细胞的存活。两者联合可导致肿瘤细胞内 ATP 水平明显降低,并显著抑制己糖激酶和 Mcl-1 蛋白的表达。本文结果为探索提高顺铂对黑色素瘤的化疗效果提供了新的实验证据。

致谢:本文作者诚挚感谢 Brian J Nickoloff 教授与 Hong Xin 博士对本研究工作提供的支持与帮助!

[参考文献]

- [1] TSAO H, ATKINS M B, SOBER A J. Management of cutaneous melanoma [J]. N Engl J Med, 2004, 351(10):998-1012. DOI:

- 10.1056/nejmra041245.
- [2] MEGAHED A I, KOON H B. What is the role of chemotherapy in the treatment of melanoma? [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2014, 15(2): 321-335. DOI: 10.1007/s11864-014-0277-5.
- [3] MARTIN-LIBERAL J, LARKIN J. Vemurafenib for the treatment of BRAF mutant metastatic melanoma [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(4): 579-589. DOI: 10.2217/fon.14.252.
- [4] CALLAHAN M K, FLAHERTY C R, POSTOW M A. Checkpoint blockade for the treatment of advanced melanoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2016, 167: 231-250. DOI: 10.1007/978-3-319-22539-5.
- [5] BUCHEIT A D, DAVIES M A. Emerging insights into resistance to BRAFinhibitors in melanoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(3):381-389. DOI: 10.1016/j.bep.2013.11.013.
- [6] HODI F S, O'DAY S J, MCDERMOTT D F, et al. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363: 711-723. DOI: 10.1056/nejmoa1003466.
- [7] WARD P S, THOMPSON C R. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 297-308. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
- [8] SCOTT D A, RICHARDSON A D, FILIPP F V, et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(49): 42626-42634. DOI: 10.1074/jbc.m111.282046.
- [9] HALL A, MEYLE K D, LANGE M K, et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(4): 584-599. DOI: 10.18632/oncotarget.965.
- [10] ELF S E, CHEN J. Targeting glucose metabolism in patients with cancer [J]. *Cancer*, 2014, 120(6):774-780. DOI: 10.1002/encr.28501.
- [11] ZHANG D, LI J, WANG F, et al. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2):176-183. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.003.
- [12] DWARAKANATH B S. Cytotoxicity, radiosensitization and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro [J]. *J Cancer Res Ther*, 2009, 5(Suppl 1):S27-31. DOI: 10.4103/0973-1482.55137.
- [13] QIN J Z, XIN H, NICKOLOFF B J. 2-deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL- induced apoptosis which is reduced by mannose [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 401(2):293-299. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.054.
- [14] 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.
- [15] ICARD P, LINCET H. A global view of the biochemical pathways involved in the regulation of the metabolism of cancer cells [J]. *Biochim Biophys*, 2012, 1826(2):423-433. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.07.001.
- [16] PRIEBE A, TAN L, WAHL H, et al. Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 122(2): 389-395. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.04.024.
- [17] ZHU Z, JIANG W, MCGINLEY J N, et al. 2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(15): 7023-7030. DOI: 10.1158/0008-5472.can-05-0453.
- [18] RAMIREZ-PEINADO S, ALCAZAR-LIMONES F, LAGARES-TEJANA L, et al. 2-deoxyglucose induces Noxa-dependent apoptosis in alveolar Rhabdomyosarcoma [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21): 6796-6806. DOI: 10.1158/0008-5472.can-11-0759.
- [19] ATALLAH E, FLAHERTY L. Treatment of metastatic malignant melanoma [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2005, 6(3):185-193. DOI: 10.1007/s11864-005-0002-5.
- [20] YANG Z, SCHUMAKER L M, EGORIN M J, et al. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis [J]. *Clinic Cancer Res*, 2006, 12(19):5817-5825. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1037.
- [21] CHOI Y M, KIM H K, SHIM W, et al. Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135083 [2015-12-03]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0135083>. DOI: 10.1371/journal.pone.0135083.
- [22] QUINN B A, DASH R, AZAB B, et al. Targeting Mcl-1 for the therapy of cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20(10): 1397-1411. DOI: 10.1517/13543784.2011.609167.
- [23] MARULLO R, WERNER E, DEGTYAREVA N, et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81162 [2015-12-03]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081162>. DOI:10.1371/journal.pone.0081162.

[收稿日期] 2016 - 06 - 26 [修回日期] 2016 - 10 - 24

[本文编辑] 宋关鸿

本刊从 2017 年 24 卷开始改为月刊出版