

缺乏葡萄糖和谷氨酰胺对黑色素瘤 A375 细胞增殖与凋亡的影响

于田田,张帆,路遥,李红霞,谢敏,刘庆平,卢腾,秦建中,迟彦(大连大学生命科学与技术学院 辽宁省糖脂代谢重点实验室,辽宁大连116622)

[摘要] **目的:**探讨体外培养条件下,缺乏葡萄糖(No-Glu)或谷氨酰胺(No-Gln)对黑色素瘤细胞生长和凋亡的影响。**方法:**分别利用MTT、流式细胞术、化学发光、Western blotting以及免疫荧光染色等方法检测No-Glu和No-Gln对人恶性黑色素瘤A375细胞初级纤毛形成、增殖、ATP含量、细胞周期以及细胞凋亡等多方面的影响。**结果:**在No-Glu或No-Gln培养液中培养,A375细胞的细胞增殖率显著低于对照组(正常培养液)[(21.0±1.9)%或(46.2±9.8)% vs 100%, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$]。No-Gln培养液使A375细胞纤毛形成阳性细胞率显著高于对照组[(16.8±2.3)% vs (6.2±1.0)%, $P < 0.01$],G₁期细胞减少(14.4±6.7)%($P < 0.05$),S期细胞增加(75.0±1.9)%($P < 0.05$)。No-Glu培养液对A375细胞纤毛形成与G₁和S期细胞比例均无显著影响。此外,No-Gln使A375细胞内ATP含量下调了(64.5±4.9)%($P < 0.01$),而No-Glu仅使ATP含量下降了(11.1±2.1)%($P > 0.05$)。No-Glu使A375细胞的凋亡率显著高于对照组[(26.1±1.5)% vs 6.1%, $P < 0.01$],并上调促凋亡蛋白Noxa、降低抗凋亡蛋白Mcl-1的表达水平。No-Gln对细胞凋亡率、Noxa和Mcl-1蛋白表达无明显影响。**结论:**No-Glu或No-Gln均可抑制A375细胞增殖,但No-Gln导致S期细胞周期阻滞、抑制ATP合成的作用更明显,而No-Glu诱导细胞凋亡的作用更强。

[关键词] 黑色素瘤;A375细胞;葡萄糖;谷氨酰胺

[中图分类号] R739.5; R730.51; R967

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)05-0626-07

Depletion of glucose or glutamine affects growth and apoptosis of melanoma cell A375

YU Tiantian, ZHANG Fan, LU Yao, LI Hongxia, XIE Min, LIU Qingping, LU Teng, QIN Jianzhong, CHI Yan (Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism in Liaoning Province, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of deletion of glucose or glutamine on growth and apoptosis of melanoma cells *in vitro*. **Methods:** MTT, flow cytometry, chemiluminescence, Western blotting and immunofluorescence staining assays were respectively used to detect primary cilia formation, proliferation, ATP contents, cell cycles and apoptosis of melanoma A375 cell on which effected by deletions of glucose and glutamine. **Results:** Proliferation rate of the A375 cell in none-glucose (No-Glu) or none-glutamine (No-Gln) culture medium was significantly lower than that in control group (normal culture medium) (No-Glu: [21.0±1.9]% vs 100%, $P < 0.01$; No-Gln: [46.2±9.7]% vs 100%, $P < 0.05$). No-Gln culture significantly increased positive rate of cilia formation of the A375 cell ([16.8±2.3]% vs [6.2±9.8]%, $P < 0.01$), decreased (14.4±6.4)% of the cells at G₁ phase ($P < 0.05$) and increased (75.0±1.9)% of the cells at S phase ($P < 0.05$), compared with control group. No-Glu culture medium had no obvious effect on cilia formation as well as ratios of the cells at G₁ and S phases of the A375 cell. In addition, No-Gln medium reduced ATP content in the A375 cell by 64.5% ($P < 0.01$), and No-Glu medium only reduced ATP content in the A375 cell by (11.1±2.1)% ($P < 0.05$). No-Glu medium increased apoptosis rate of the A375 cell more highly than that in control

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81202536)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No: 81202536)

[作者简介] 于田田(1988-),女,山东济宁人,硕士生,主要从事肿瘤、心血管代谢疾病分子机制研究,E-mail:yixin2008wenxin@163.com

[通信作者] 秦建中(QIN Jianzhong, corresponding author), E-mail:jzqin68@hotmail.com;迟彦(CHI Yan, co-corresponding author), E-mail:chi_yan@126.com

[优先发表]

group ($[26.1 \pm 7.1]\%$ vs $[6.1 \pm 1.5]\%$, $P < 0.01$), and increased expression of pro-apoptotic protein Noxa, decreased expression of anti-apoptotic protein Mcl-1. No-Gln medium had no effect on apoptosis, and expressions of Noxa and Mcl-1 proteins. **Conclusion:** All of No-Glu and No-Gln could inhibit proliferation of the A375 cell, but No-Gln could result in blocking cell cycle of S phase, inhibiting ATP synthesis more obviously, however No-Glu could much more induce apoptosis of the cell.

[**Key words**] melanoma; A375 cell; glucose; glutamine

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(5): 626-633. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.05.007]

肿瘤细胞对葡萄糖(glucose, Glu)和谷氨酰胺(glutamine, Gln)的需求和依赖远高于正常细胞,这是癌变细胞的共同特征之一^[1-2]。有氧糖酵解是肿瘤细胞能量代谢的主要方式,虽产生的 ATP 能量低于氧化磷酸化,但由于反应过程较简单,ATP 产生速度快,使其能够在短时间内获得能量以满足肿瘤细胞无限增殖的需求^[3-4]。Gln 是快速生长的肿瘤细胞能量供应的主要来源。研究^[5]发现,肿瘤细胞转移 Gln 的速度高出正常细胞 5 ~ 10 倍,肿瘤患者对血中游离 Gln 摄取率是正常人的 2 倍,因此称癌细胞为“Gln 捕捉者”或“氮陷阱(nitrogen trap)”。目前研究^[6-8]表明,将肿瘤细胞过度依赖 Glu 和 Gln 代谢特征作为肿瘤治疗的新靶标,以此为靶点的药物开发正取得新突破。尽管 Glu 和 Gln 均是细胞生长与增殖的重要营养物质,但两者对肿瘤细胞增殖与凋亡的影响有何异同尚缺少一致的结论,不同组织来源的肿瘤细胞也有差异性。本研究以人黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,探讨缺乏 Glu(No-Glu)和 Gln(No-Gln)对黑色素瘤 A375 细胞增殖与凋亡的影响,以期为基于肿瘤细胞营养依赖为靶点建立治疗肿瘤的方法提供新的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

人黑色素瘤 A375 细胞购自南京凯基生物有限公司;胎牛血清、0.25% 的胰蛋白酶和普通 DMEM (含 Glu 25 mmol/L、Gln 2 mmol/L)购自 Hyclone 公司;No-Glu 和 No-Gln 的 DMEM 购自 Gibco 公司。正常胎牛血清 Glu 浓度为 1.7 mmol/L,在含 10% 胎牛血清的 No-Glu 的 DMEM 中,Glu 终浓度是普通培养基的 1/147。MTT 购自 Solarbio 公司;Mcl-1、Noxa、Actin 均购自 Santa Cruz 公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、增强型 ATP 检测试剂盒购自上海碧云天生物工程有限公司。

1.2 黑色素瘤 A375 细胞的培养

人黑色素瘤 A375 细胞培养于普通 DMEM 培养

基中,培养基含 3.7 g/L 的碳酸氢钠、10% 的胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸链霉素, No-Glu 或 No-Gln。隔天换一次液,待细胞达到 80% ~ 90% 汇合时,用 PBS 冲洗,0.25% 的胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 免疫荧光法检测 A375 细胞纤毛形态

将灭菌盖玻片置于 6 孔细胞培养板中,按 5×10^5 个细胞/孔接种 A375 细胞培养过夜,PBS 洗细胞,换 No-Glu 或 No-Gln DMEM 培养基继续培养 48 h。4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 清洗,0.2% Triton X-100 通透细胞后用 2% 的牛血清白蛋白(BAS)封闭细胞 30 min。每张片子加入鼠抗人乙酰微管蛋白抗体及 Alexa Fluor 568 标记的羊抗鼠二抗, PBS 清洗后用 Hoechst 33342 染色,用封片剂 Mountant PermaFluor(美国 Thermo Scientific 公司)封片。Olympus 正置荧光显微镜(BX43, Olympus 公司)下观察并拍照,实验重复 3 次。随机选择 4 ~ 6 个视野,计数 500 个细胞中带有纤毛细胞的百分率。

1.4 MTT 检测 A375 细胞增殖率

取对数期生长的 A375 单细胞悬液接种于 96 孔板中,接种密度为 6 000 个/孔,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养过夜。次日,将 A375 细胞分组培养,每组设 6 个复孔,分别设置正常对照组(DMEM 完全培养基培养)、No-Glu 组(缺乏 Glu 的 DMEM 完全培养基培养)、No-Gln 组(缺乏 Gln 的 DMEM 完全培养基培养),并继续培养 24 h。在终止培养前 4 h,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 15 μl ,继续置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养 4 h 后,终止培养。取出 96 孔板,去除原培养基,每孔加入 DMSO 100 μl ,摇床缓慢震荡 10 min 至溶质完全溶解。细胞增殖通过多功能酶标仪检测每孔样品在 570 nm 波长的光密度(D 值),计算细胞增殖率[公式:细胞增殖率(%) = $D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$]。

1.5 流式细胞术检测 A375 细胞凋亡情况

将 A375 接种于 6 孔板中,按 1.3 分组。各组 A375 细胞培养 24 h 后收集细胞,用 PBS 洗一次。在 500 μl Annexin-V 结合缓冲液中加入 1 μl Annex-

in V-FITC 和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PI, 重悬细胞, 冰上避光孵育细胞 10 min, 用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 结果用 FlowJo 软件分析, 早期、晚期凋亡与死亡细胞数之和计为细胞的总死亡数。

1.6 Western blotting 检测 A375 细胞凋亡相关蛋白表达情况

取对数生长期的 A375 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度按 5×10^5 个细胞/孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h。按 1.3 分组, 各组在 DMEM 完全培养基继续分别培养 6 和 24 h 后, 收集细胞、分别提取细胞总蛋白质, 用 10% 的胶进行 SDS-PAGE, 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, McI-1 (1:1 000)、Noxa (1:1 000)、Actin (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢孵育过夜, 含 2.5% 脱脂奶粉的 TBST 洗膜 2 次, 5 min/次。HRP 标记山羊抗兔的二抗室温孵育 1 h, 清洗同上。膜洗后在其表面加上适量化学发光试剂 (ECL), 用化学发光扫描仪检测蛋白表达信号, 并用 Image J 软件测定蛋白灰度, 计算靶蛋白的相对水平。

1.7 流式细胞术检测 A375 细胞细胞周期

接种 A375 细胞于 6 孔板中, 5×10^5 个细胞/孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后, 将原培养液收到 15 ml 离心管中, 每孔加入 200 μl 0.25% 的胰蛋白酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化后, 用原培养液终止消化并转入对应离心管中。离心弃上清, 将细胞沉淀振荡成单细胞悬液, 然后用 1 ml 预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min 后, 离心, 弃上清, 加入 250 μl RNase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min。加入 250 μl PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 冰上继续孵育 30 min, 然后用流式细胞术检测细胞 DNA 含量, 进行细胞周期分析。

1.8 ATP 检测法检测 A375 细胞 ATP 水平

将 12 孔板中的原培养液收集到 15 ml 的离心管中, 离心并弃上清, 每孔加入 200 μl ATP 裂解液, 并置于冰上反复吹打裂解均匀, 将裂解液收集置于 EP 管中, 离心收集上清。用 ATP 检测试剂稀释液按 1:5 稀释 ATP 检测试剂配制成适量的 ATP 检测工作液, 每孔加入 100 μl ATP 检测工作液, 室温静置 3~5 min, 每孔再加入 50 μl 样品, 混合均匀, 多功能酶标仪检测每孔的化学发光 RLU 值, 并使用 BCA 试剂盒测定每空样品的蛋白浓度, 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 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白表示。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件对数据进行统计分

析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 人黑色素瘤 A375 细胞纤毛的形态学特征

免疫荧光染色检测结果 (图 1) 显示, A375 细胞有一种突出于细胞表面呈毛发状物质, 即细胞纤毛 (箭头所示)。

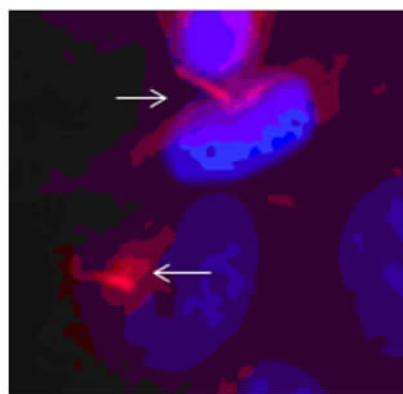


图 1 A375 细胞纤毛的形态 (Hoechst 33342 染色, $\times 600$)
Fig. 1 Typical morphological feature of cilia of A375 cells (Hoechst 33342 staining, $\times 600$)

Red: Man acetylated tubulin positive reaction, showing the cell cilia; Blue: Nuclei

2.2 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞纤毛形成的影响

免疫荧光法检测结果 (图 2) 显示, No-Gln 培养液能促进 A375 细胞纤毛的形成 [$(16.8 \pm 2.3)\%$ vs $(6.2 \pm 1.0)\%$, $t = 0.026$, $P < 0.05$], 而 No-Glu 对 A375 细胞纤毛的形成影响不明显 [$(6.1 \pm 0.4)\%$ vs $(6.2 \pm 1.0)\%$, $t = 0.918$, $P > 0.05$]。

2.3 No-Glu 或 No-Gln 抑制 A375 细胞的增殖

MTT 法检测结果 (图 3) 所示, 在 No-Glu 和 No-Gln 的条件下, A375 细胞的增殖率均有不同程度的下降 [$(21.0 \pm 1.9)\%$ 和 $(46.2 \pm 9.7)\%$ vs 100%, $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$]。结果表明, No-Glu 组对 A375 细胞的增殖率影响更大。

2.4 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞 ATP 水平的影响

ATP 检测法检测结果 (图 4) 显示, No-Glu 组 A375 细胞内 ATP 水平仅比正常组降低了 $(11.1 \pm 2.1)\%$, 但差异无统计学意义。No-Gln 则使 A375 细胞 ATP 水平下调 $(64.5 \pm 4.9)\%$, 与正常组的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 表明 Gln 缺乏对 A375 细胞能量的合成有更重要作用。

2.5 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞细胞周期的影响
流式细胞术检测结果(图 5)显示, No-Glu 仅使 A375 细胞 G₂-M 期细胞数量增加(4.6 ± 6.7)%, 对 G₁ 和 S 期细胞数量没有明显影响。但 No-Gln 使

A375 细胞 G₁ 期细胞数量减少(14.4 ± 6.7)%, S 期细胞数量增加(75.0 ± 1.9)%, 同时 G₂-M 期细胞数量增(15.3 ± 4.9)%, 表明 No-Gln 对细胞周期的影响较 No-Glu 作用更显著。

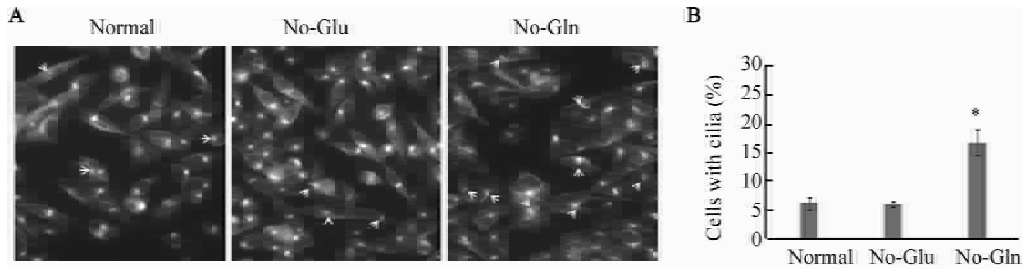


图 2 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞纤毛形成的影响
Fig. 2 Effects of depletion of glucose or glutamine on cilia formation of A375 cells

A: Representative images of cilia formation of A375 cells in three mediums; B: Quantization of cells with cilia. Each bar represents the average percent of cells with cilia based on three independent experiments

* $P < 0.05$ vs Normal or No-Glu group

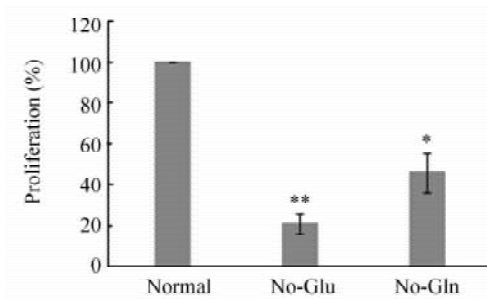


图 3 No-Glu 或 No-Gln 抑制 A375 细胞的增殖
Fig. 3 Depletion of glucose or glutamine inhibits A375 cell proliferation

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal group

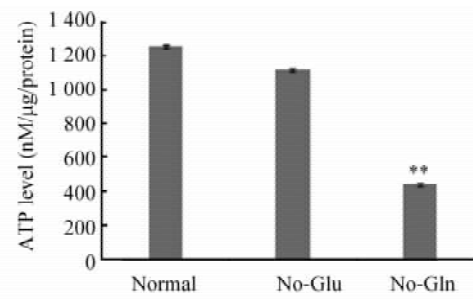


图 4 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞 ATP 水平的影响
Fig. 4 Effects of depletion of glucose or glutamine on cell ATP level of A375 cells

** $P < 0.01$ vs Normal group

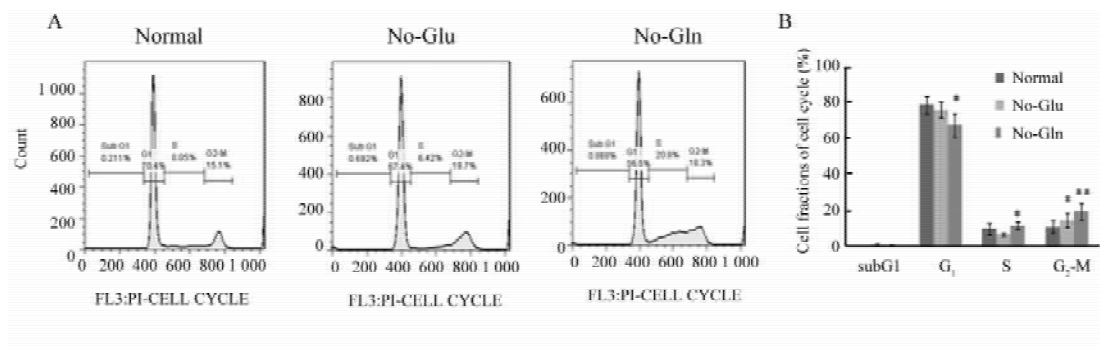


图 5 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞细胞周期的影响

Fig. 5 Effects of depletion of glucose or glutamine on cell cycle of A375 cells

A: Representative profile of cell cycle distribution; B: Quantitative and statistic analysis of cell cycle. Each bar represents the average fractions of cell cycle based on three independent experiments

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal group

2.6 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞凋亡的影响
 用流式细胞术检测结果(图6)显示,与正常组比较, No-Gln 组 A375 细胞凋亡率差异无统计学意义

[(10.9 ± 2.5)% vs (6.1 ± 1.5)% , $P > 0.05$], 而 No-Glu 组细胞凋亡率明显升高[(26.1 ± 7.1)% vs (6.1 ± 1.5)% , $P < 0.01$]。

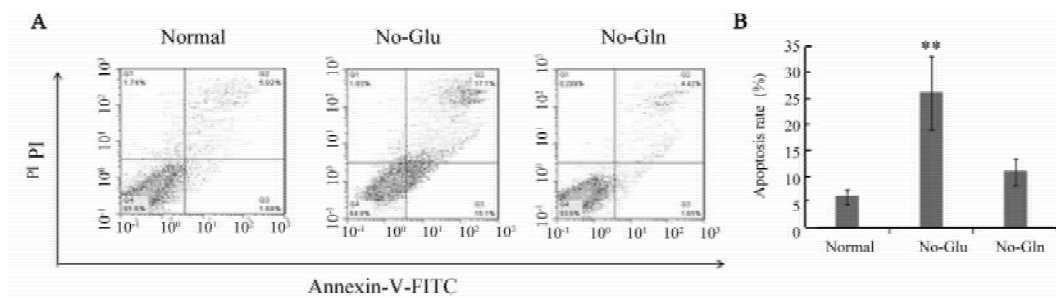


图6 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effects of depletion of glucose or glutamine on cell apoptosis of A375 cells

A: Representative profiles of apoptosis assessed by FACS; B: Quantitative analysis of apoptosis cells.

Each bar represents the average dead cells based on three independent experiments

** $P < 0.01$ vs Normal group

2.7 No-Glu 或 No-Gln 对 A375 细胞凋亡与抗凋亡平衡的影响

Western blotting 检测结果(图7)显示,与正常组比较, No-Glu 或 No-Gln 均使促凋亡因子 Noxa 的表达水平增高(24 h 时与正常组相比, No-Glu 组 Noxa 的表达水平增高到 5.01 倍, $P < 0.01$; No-Gln 组 Noxa 的表达水平增高到 3.01 倍, $P < 0.05$), 但前者的作用更

明显(501.0 ± 2.60)% vs (301.0 ± 9.1)% , $P < 0.05$]。 No-Glu 使抗凋亡因子 Mcl-1 的表达水平下降(24 h 时与正常组相比, No-Glu 组 Mcl-1 的表达水平下降到 77.0% , $P < 0.01$), 而 No-Gln 对 Mcl-1 表达的影响不明显[(148.0 ± 17.0)% vs 100% , $P < 0.05$], 提示 No-Glu 对 Mcl-1/Noxa 这一重要的抗凋亡与促凋亡平衡的影响比 No-Gln 更明显。

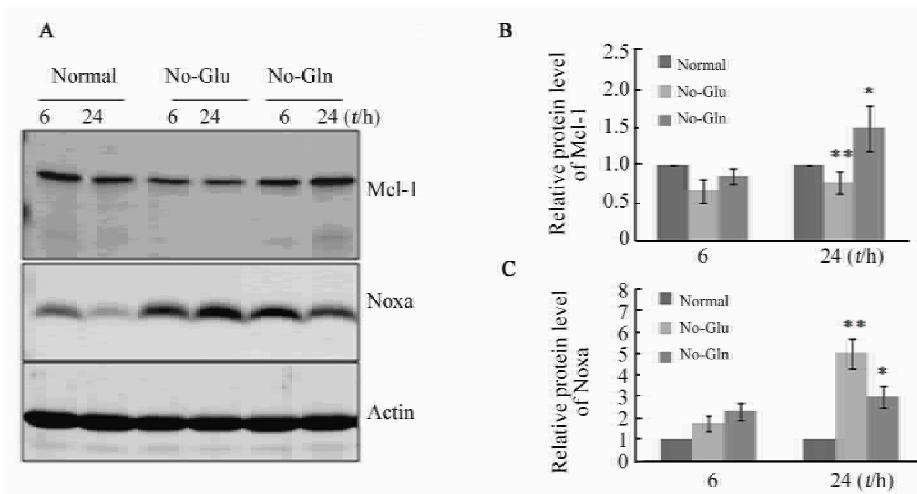


图7 No-Glu 或 No-Gln 对凋亡和抗凋亡平衡的影响

Fig. 7 Effects of depletion of glucose or glutamine on Mcl-1-Noxa balance

A: Expression of apoptosis-related proteins; B: Quantitative analysis of Mcl-1; C: Quantitative analysis of Noxa

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normal group

3 讨论

细胞能量代谢异常是肿瘤细胞的主要特征之

一,表现为对营养物质葡萄糖和谷氨酰胺的过分依赖。研究肿瘤细胞异常的糖代谢和氨基酸代谢,有利于找到代谢途径中的关键酶,并以此为靶点,建立

抑制肿瘤细胞增殖的治疗策略。本研究以人恶性黑色素瘤 A375 细胞为研究对象,首次比较了 No-Glu 或 No-Gln 对细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡、细胞纤毛形成及凋亡和抗凋亡因子比例等方面的不同影响,为今后建立基于肿瘤细胞营养依赖特征为靶点的治疗方法提供参考^[9-10]。

本研究首先利用 MTT 法研究 No-Glu 或 No-Gln 对细胞增殖的影响,结果显示, No-Glu 或 No-Gln 使 A375 细胞增殖率有不同程度的下降,表明 Glu 相较于 Gln 对 A375 细胞的增殖率影响较大。肿瘤细胞利用 Glu,不仅通过有氧糖酵解为自身迅速提供部分能量,更多的是通过磷酸戊糖旁途径合成大量的还原剂、戊糖以及核酸等生物大分子以满足肿瘤细胞快速增殖的需求^[7]。因此, No-Glu 相较于 No-Gln 对肿瘤细胞增殖的影响更大。MTT 实验是通过检测细胞线粒体活性间接反应细胞增殖状态, No-Glu 或 No-Gln 抑制 A375 细胞增殖可能主要是导致细胞数量减少。检测细胞内 ATP 水平发现, No-Glu 并不明显降低细胞内 ATP 含量,提示 A375 肿瘤细胞线粒体功能基本正常,并可以代谢 Glu 之外的营养物质补充能量。值得注意的是, No-Gln 导致 ATP 水平显著降低。分析其原因,笔者认为肿瘤细胞已经适应产能低但速度快的有氧糖酵解代谢方式,因此对 ATP 的需求不再主要依靠葡萄糖。由于 Gln 进入细胞后在谷氨酰胺酶的作用下水解成谷氨酸和氨,谷氨酸转变成 α -酮戊二酸进入三羧酸循环,彻底氧化,为细胞提供能量,因此肿瘤细胞更依赖于 Gln 为其提供能量^[11]。因此,本研究表明尽管 No-Glu 或 No-Gln 都能抑制肿瘤细胞增殖,但前者主要影响细胞合成生物大分子,后者对细胞能量合成更重要。

在检测 No-Glu 或 No-Gln 对于 A375 肿瘤细胞细胞周期的影响实验发现,在 No-Glu 的情况下,细胞周期进展没有明显改变,但 No-Gln 使 G₁ 期细胞数量减少, S 期或者 G₂-M 期细胞数量增多,说明细胞被阻滞在 S 期或 G₂-M 期,细胞分裂受到影响。近年研究^[12]证明,细胞初级纤毛的形成与细胞周期进展有密切关系,它是细胞表面的单一突出结构,主要由乙酰化微管蛋白为核心,外被细胞质膜组成。初级纤毛的胞质端根植于中心粒,后者在细胞分裂时消失,纤毛结构随之解聚。因此一般认为,初级纤毛在快速增殖的细胞减少或消失,而在静止细胞重新聚合^[13]。有研究^[14-15]发现,在乳腺癌、胰腺癌等肿瘤标本中初级纤毛减少,用无血清培养基培养细胞也可增加纤毛形成^[16],但 No-Glu 或 No-Gln 对肿瘤细胞纤毛形成的影

响尚未见报道。本研究发现,在正常培养基中,只有 5% 左右的 A375 细胞有纤毛形成, No-Glu 对纤毛形成影响不显著,但 No-Gln 则导致纤毛形成的细胞明显增加(接近 20%),此现象与 No-Gln 导致细胞 S 期和 G₂-M 期阻滞相一致,进一步提示 No-Gln 抑制细胞有丝分裂。除了与细胞周期有关外,初级纤毛还参与多种细胞信号转导,如 Sonic Hedgehog、Wnt 和 RTK 有关^[17-19]。No-Gln 是否对这些细胞信号的功能产生影响,值得进一步研究。

本研究比较 No-Glu 或 No-Gln 对于诱发肿瘤细胞发生凋亡的影响时,观察到 No-Glu 诱导细胞凋亡的作用远大于 No-Gln[(26.1 ± 7.1)% vs (10.9 ± 2.5)%]。为了深入探讨细胞凋亡的潜在机制,检测了 Bcl-2 家族中的一对抗凋亡和促凋亡蛋白质(Mcl-1 和 Noxa)的表达水平。结果发现, No-Glu 能显著抑制 Mcl-1 的表达,同时上调 Noxa 的水平, No-Gln 也诱导 Noxa 表达,但弱于 No-Glu,此外对 Mcl-1 的表达没有明显影响。Mcl-1 是细胞在多种应激刺激下主要的抗凋亡蛋白之一, BH-3 only 促凋亡蛋白 Noxa 可以拮抗 Mcl-1 的细胞保护作用^[20]。因此,笔者认为 No-Glu 或 Gln 对这一对蛋白质表达的影响,至少部分地解释了 No-Glu 诱导更多肿瘤细胞凋亡的原因。

本研究结果表明, Glu 或 Gln 对肿瘤细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡以及初级纤毛形成等诸多方面有不同影响。因此有理由推测,如果联合限制这两种重要的营养物质会同时以不同途径干扰肿瘤细胞代谢,对肿瘤细胞的抑制作用会更明显。最近有研究^[21]表明,同时在培养液中去掉 Glu 或 Gln,培养 Hela 细胞 4 h,就可使细胞存活率下降约 50%。目前联合限制多种细胞营养成分的体内实验资料尚无报道,机体对这一方案的耐受性和可能存在的副作用需要进一步研究。

Glu 或 Gln 对细胞的不同影响,不是肿瘤细胞特异的。最近 Machado 等^[22]报道,正常人牙髓细胞在 No-Glu 或 Gln 条件下的细胞活力和形态改变,在有血清条件下, No-Gln 对细胞活力没有影响,但 No-Glu 明显抑制细胞活力,提示这两种营养物质正常细胞代谢也有不同影响。病理情况下,肿瘤细胞对于这些营养物质的依赖性大于正常细胞,为靶向营养物质利用以达到选择性抑制肿瘤生长的目的提供了窗口。例如,如 No-Gln 增加 TRAIL 对黑色素瘤细胞的杀伤作用,但对正常细胞无影响^[23]。笔者同时观察到,虽然 No-Gln 促进黑色素瘤细胞纤毛形成,但对正常皮肤成纤维细胞无明显影响。

综上,本研究首次系统地比较了 No-Glu 或 No-Gln 对黑色素瘤 A375 细胞增殖、凋亡以及细胞周期的影响,证明前者抑制细胞增殖和诱导凋亡的作用更强,后者对细胞能量合成和细胞周期影响更显著。这些结果为设计干扰 Glu 或 Gln 代谢的肿瘤治疗方案提供了新的证据。

[参考文献]

- [1] VANDER HEIDEN M G, CANTLEY L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation [J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033. DOI: 10.1126/science.1160809.
- [2] MOHAMED A, DENG X, KHURI F R, et al. Altered glutamine metabolism and therapeutic opportunities for lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2014, 15(1): 7-15. DOI: 10.1016/j.clc.2013.09.001.
- [3] SUN Q, CHEN X, MA J, et al. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(10): 4129-4134. DOI: 10.1073/pnas.1014769108.
- [4] 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.
- [5] WANG J B, ERICKSON J W, FUJI R, et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation [J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(3): 207-219. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.08.009.
- [6] MURNIN M, KUMAR A, LI G D, et al. Effects of glutamine isomers on human (Caco-2) intestinal epithelial proliferation, strain-responsiveness, and differentiation [J]. *J Gastrointest Surg*, 2000, 4(4): 435-442. DOI: 10.1016/S1091-255X(00)80025-6.
- [7] PRADELLI L A, BENETEAU M, CHAUVIN C, et al. Glycolysis inhibition sensitizes tumor cells to death receptors-induced apoptosis by AMP kinase activation leading to Mcl-1 block in translation [J]. *Oncogene*, 2010, 29(11): 1641-1652. DOI: 10.1038/onc.2009.448.
- [8] BAENKE F, CHANETON B, SMITH M, et al. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(1): 73-84. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.08.003.
- [9] 林碧云, 黎旭, 张海涛. 肿瘤细胞能量代谢中潜在的治疗靶点 [J]. *生命的化学*, 2015, 35(1): 45-50. DOI: 10.13488/j.smhx.20150109.
- [10] BOST F, DECOUX-POULLOT A G, TANTI J F, et al. Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy? [J/OL]. *Oncogenesis*, 2016, 5(1): e188[2016-06-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728676/>. DOI: 10.1038/onc.2015.46.
- [11] JELLUMA N, YANG X, STOKOE D, et al. Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(5): 319-330. DOI: 10.1158/1541-7786.
- [12] WHEATLEY D N, WANG A M, STRUGNELL G E. Expression of primary cilia in mammalian cells [J]. *Cell Biol Int*, 1996, 20(1): 73-81. DOI: 10.1006/cbir.1996.0011.
- [13] GOTO H, INOKO A, INAGAKI M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(20): 3893-3905. DOI: 10.1007/s00018-013-1302-8.
- [14] SEELEY E S, CARRIERE C, GOETZE T, et al. Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 422-430. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [15] YUAN K, FROLOVA N, XIE Y, et al. Primary cilia are decreased in breast cancer: analysis of a collection of human breast cancer cell lines and tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(10): 857-870. DOI: 10.1369/jhc.2010.955856.
- [16] KIM J H, KI S M, JOUNG J G, et al. Genome-wide screen identifies novel machineries required for both ciliogenesis and cell cycle arrest upon serum starvation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(6 Pt A): 1307-1318. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.021.
- [17] SATIR P, PEDERSEN L B. Christensen ST (2010) The primary cilium at a glance [J]. *J Cell Sci*, 123(Pt 4): 499-503. DOI: 10.1242/jcs.050377.
- [18] MUKHOPADHYAY S, ROHATGI R. G-protein-coupled receptors, Hedgehog signaling and primary cilia [J/OL]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 33: 63-72[2016-06-10]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952114001293>. DOI: 10.1016/j.semdb.2014.05.002.
- [19] OH E C, KATSANIS N. Context-dependent regulation of Wnt signaling through the primary cilium [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(1): 10-18. DOI: 10.1681/ASN.2012050526.
- [20] HUSSEIN M R, HAEMEL A K, WOOD G S. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2003, 199(3): 275-288. DOI: 10.1002/path.1300.
- [21] MATHEWS E H, STANDER B A, JOUBERT A M, et al. Tumor cell culture survival following glucose and glutamine deprivation at typical physiological concentrations [J]. *Nutrition*, 2014, 30(2): 218-227. DOI: 10.1016/j.nut.2013.07.024.
- [22] MACHADO N, DUAİLÍBÍ S E, SANTOS J A, et al. Effects of glucose and glutamine concentrations in human dental pulp stem cells viability: an approach for cell transplantation [J]. *Acta Cir Bras*, 2014, 29(10): 658-666. DOI: 10.1059/S0102-8650201400160006.
- [23] QIN J Z, XIN H, NICKOLOFF B J. Targeting glutamine metabolism sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced death [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(1): 146-152. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.057.

[收稿日期] 2016-05-26

[修回日期] 2016-07-30

[本文编辑] 党瑞山