

## 氯苯甲噻联合 2-脱氧-D-葡萄糖抑制宫颈癌细胞生长的研究

陆五香 黄圣淋 段欢欢 吴馨怡 蔡杰 莫清梅 卓铭<sup>通讯作者</sup>

(贵州大学医学院 贵州省贵阳市 550025)

**摘要:** 宫颈癌是严重威胁女性生存安全的恶性肿瘤, 化学药物作为治疗宫颈癌的主要手段之一, 存在疗效不足而毒副作用较强的缺陷, 研发高疗效低毒性化疗药物仍是当前研究热点。本工作使用了代谢抑制药物氯苯甲噻及 2-脱氧-D-葡萄糖联合的策略, 研究了该治疗策略对宫颈癌细胞株 HeLa 的抑制细胞生长、诱导凋亡的作用效果并探索了可能涉及的机制。通过 CCK8 法检测细胞增殖抑制, 以及通过 EdU 标记和检测方法检测细胞 DNA 复制速度的结果均表明, 相比单独用药, 氯苯甲噻联合 2DG 可以有效抑制细胞的增殖、大大降低细胞 DNA 复制速度。同时, 我们检测到联合用药组 HeLa 细胞出现大量死亡, 通过 Annexin-V 凋亡检测方法也检测到联合用药组会导致超过 30% 细胞凋亡, 大大高于单独用药组。在作用机制的研究上, 我们观测到联合用药后细胞的葡萄糖代谢被有效抑制且出现 ATP 耗竭现象, 这可能是导致细胞凋亡的原因。以上结果表明氯苯甲噻联合 2DG 可以有效抑制和杀伤宫颈癌细胞, 可望成为治疗宫颈癌的新药物组合。

**关键词:** 宫颈癌; 氯苯甲噻; 2-脱氧-D-葡萄糖; 糖酵解; 线粒体

根据世界卫生组织国际癌症研究机构 (IARC) 公布的数据, 宫颈癌是女性恶性肿瘤发病率第四位的高发病率肿瘤, 同时也是死亡率第四位的肿瘤, 严重威胁广大妇女的生命安全。当前宫颈癌的治疗手段中, 化疗药物治疗仍是主要治疗手段<sup>[1,2]</sup>, 但常用的治疗药物包括铂类药物、紫杉醇类药物、氟尿嘧啶等在疗效上尚存不足的同时, 均具有显著的神经毒性并可引发多种副作用<sup>[3,4]</sup>。而毒性相对较低的靶向治疗药物多数价格昂贵难以负担。研发高疗效低毒性的化疗药物仍是广大患者的急需。

2-脱氧-D-葡萄糖 (2DG) 是人工合成的葡萄糖类似物, 由于其 2 位碳原子所连接的羟基被氢原子替代, 2DG 无法被糖酵解途径代谢, 但却可以通过与葡萄糖竞争己糖激酶从而从起始步骤便抑制了糖酵解途径的活性, 有效降低细胞代谢葡萄糖的能力。由于多数肿瘤细胞在代谢上表现出 warberg effect, 即对葡萄糖代谢具有极度的偏好, 2DG 对糖酵解的抑制能力也被发现对肿瘤细胞具有针对性, 可以达到一定的治疗效果, 在多种肿瘤的治疗, 包括宫颈癌的治疗中得到应用<sup>[5,6]</sup>。但是迄今为止, 2DG 仍因为作用效果有限, 剂量限制等因素, 未能得到广泛应用, 更多的是作为辅助药物联合其它化疗药物同使用。

氯苯甲噻是常见的抗晕动症药物, 以其毒性和副作用小而成为非处方药, 得到广泛应用。近年来, 氯苯甲噻被发现具有抑制肿瘤细胞生长的功能, 其作用机制之一是阻断了线粒体的底物运输途径, 从而阻断了三羧酸循环过程, 干扰了肿瘤细胞的物质循环与能量产生的过程<sup>[7,8]</sup>, 这一机制与 2DG 对糖酵解途径的抑制作用相结合, 可望达成对肿瘤细胞能量供应的全面阻断, 从而抑制肿瘤细胞生长, 可望得到一个高效价的宫颈癌治疗药物组合。本工作将研究这一组合用药策略对宫颈癌细胞的作用效果。

#### 一、材料与与方法

##### 1. 材料

宫颈癌细胞株 HeLa 购自普赛诺公司。细胞培养用试剂, 包括 DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶、PBS、青霉素链霉素双抗均购自美国 Gibco 公司。氯苯甲噻、2DG、台盼蓝、4%多聚甲醛等试剂购自索莱宝公司。CCK8 检测试剂盒、EdU 标记和检测试剂盒、ATP 检测试剂盒购自碧云天公司。葡萄糖检测试剂盒购自容盛公司。

##### 2. 方法

(1) 细胞培养: HeLa 细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱培养。培养至细胞密度达到约 80% 时, 以 0.25% 胰蛋白酶室温消化 2 分钟, 1:10 进行传代。

(2) CCK-8 法检测细胞数量: 取对数生长期的 HeLa 细胞稀释成 50 个细胞/ $\mu$ l 培养液的细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔接种 100  $\mu$ l, 于 37°C 培养 24 小时后加入药物进行处理。分组如下: 1. 空

白组; 2. 氯苯甲噻组, 氯苯甲噻终浓度分别为 40  $\mu$ M、80  $\mu$ M; 3. 2DG 组, 2DG 终浓度 (2.5、4、10、20 mmol/L); 每组设 3 个复孔。分别处理 24、48 小时后, 去掉培养液, 加入含 10% CCK-8 试剂的新鲜培养液, 37°C 培养 1 小时, 测量在 450nm 波长处的吸光度, 细胞相对数量的计算公式为: 细胞数量 = (实验组 - 空白组) / (对照组 - 空白组)  $\times$  100%。

(3) 细胞台盼蓝计数法: 细胞铺板和药物处理同 CCK8 法, 接受药物处理后, 将培养液收集在 1.5ml 离心管中, 在培养板每个孔中加入 30  $\mu$ l 胰酶将细胞消化下来并收集到对应培养液的离心管中, 充分混匀后加入 0.1 倍体积的台盼蓝, 然后在显微镜下计数无色和蓝色的细胞数目。无色细胞为活细胞, 蓝色细胞为死细胞。

(4) 凋亡检测方法: 细胞凋亡以 Annexin-V 染色方法进行检测, 细胞以 5X10<sup>5</sup> 数目接种于 6 孔板如前进行处理, 处理结束后收集培养液于 5ml 流式样本管中, 用胰酶将细胞消化下来并收集到对应的样本管中, 用冰预冷 PBS 洗涤细胞 2 次后, 用试剂盒提供的 binding buffer 将细胞重悬, 细胞密度为 1  $\times$  10<sup>6</sup>/ml。然后加入 1:100 的 Annexin-V-FITC 试剂, 于室温避光孵育 15 分钟, 然后以流式细胞仪进行分析。

(5) ATP 检测方法: 细胞以 5  $\times$  10<sup>5</sup> 数目接种于 6 孔板如前进行处理, 处理完成后在培养液中加入 1/10 体积的裂解液, 反复吹打以充分裂解细胞。收集裂解完成的裂解液, 于 4°C 12000g 离心 5 分钟, 收集上清, 取 10  $\mu$ l 以 BCA 法检测蛋白质浓度, 余下的用于 ATP 浓度检测。ATP 浓度检测的标准样品曲线使用 1nM、10nM、100nM、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M ATP 标准品制备, 于 96 孔板中每孔加入 100  $\mu$ l ATP 检测试剂, 室温避光放置 5 分钟后, 加入 20  $\mu$ l ATP 标准品或细胞裂解液, 混匀后于酶标仪上读取荧光强度, 根据标准曲线计算出 ATP 浓度后, 计算各样本 ATP 浓度: 蛋白浓度的比值, 然后设对照组均值为 100%, 计算各组细胞的相对 ATP 浓度。

(6) 葡萄糖检测方法: 细胞以 5  $\times$  10<sup>5</sup> 数目接种于 6 孔板如前进行处理, 处理完成后收集培养液上清, 于 4°C 12000g 离心 5 分钟, 收集上清, 取 10  $\mu$ l 加入 1ml Assay buffer, 于 30 度反应 10 分钟后测量 505nm 处的吸光度。以试剂盒所提供的指控样本和标准样本获得工作曲线, 样本的葡萄糖浓度通过工作曲线计算获得。

(7) EdU 标记和检测方法: 细胞以 1  $\times$  10<sup>5</sup> 数目接种于预加有 15mm 盖玻片的 24 孔板中, 如前进行处理, 在处理结束后, 加入 EdU 至终浓度为 10  $\mu$ M, 将细胞在 37°C 继续培养 30 分钟, 然后以 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 分钟, 固定完成后以含 0.3% Triton X100 的 PBS 进行 20 分钟的细胞通透, 以 PBS 清洗玻片两次, 然后加入 150  $\mu$ l 新鲜配置的 Click reaction solution, 室温避光孵育 30 分钟, 以 PBS 清洗玻片两次, 将玻片封装到载玻片上置荧光显微镜上拍摄照片, 照片以 Image J 软件对荧光染色的强度进行分析, 选取一个具有染色的细胞核以 free hand 工具紧贴细胞核的边缘将整个细胞核

选取出来,以 analysis 工具获得该区域的平均荧光强度,每个实验组各随机选取 40 个细胞进行分析。

二、实验结果

1. 氯苯甲嗪和 2DG 联合使用可有效抑制 HeLa 细胞生长。

我们首先检测了氯苯甲嗪和 2DG 对 HeLa 细胞生长的影响,如图 1 A, B 所示,经过 72 小时的培养,氯苯甲嗪可以在 160 μM 浓度下对 HeLa 细胞的生长产生明显抑制,而 2DG 则需要在 10mM 浓度下才具有明显的作用效果。我们进一步选取了对细胞影响较小的低浓度氯苯甲嗪及 2DG 进行了联合测试效果,如图一 C、D 显示,在联合作用 48、72 小时后,氯苯甲嗪和 2DG 的联合作用组均可以显著抑制 HeLa 细胞的生长,使得 CCK8 的读数显著降低。根据周氏中效原理<sup>[10]</sup>计算可得联合用药指数 (Combination Index, CI) 为 0.7,显示氯苯甲嗪和 2DG 具有协同效应。

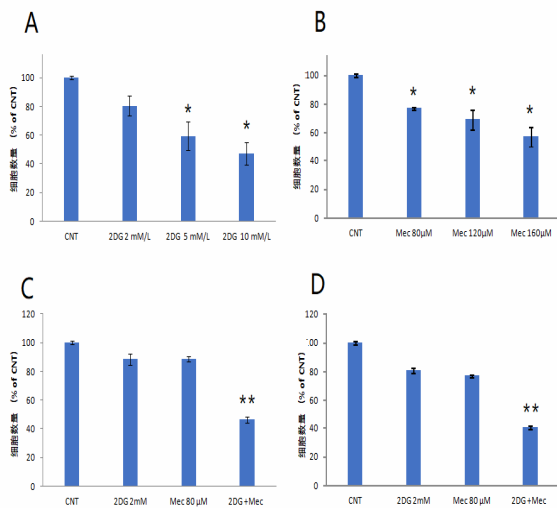


图 1. 氯苯甲嗪和 2DG 对 HeLa 细胞增殖速度的影响。A 不同浓度 2DG 作用于 HeLa 细胞 72 小时, B 不同浓度氯苯甲嗪作用于 HeLa 细胞 72 小时, C 氯苯甲嗪和 2DG 共同作用于 HeLa 细胞 48 小时, D 氯苯甲嗪和 2DG 共同作用于 HeLa 细胞 72 小时。( \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01 对比对照组)

2. 氯苯甲嗪和 2DG 联合使用可以有效降低 HeLa 细胞的 DNA 复制速度。

我们使用了 EdU 标记方法检测了联合用药对 HeLa 细胞 DNA 复制速度的影响。如图 2A 所示,未经处理的 HeLa 细胞保持旺盛生长,细胞可以快速进行 DNA 的复制,只需要进行 30 分钟的标记,就可以在 HeLa 细胞的细胞核中检测到强烈 EdU 染色。氯苯甲嗪在 80 μM 下对 HeLa 细胞影响较小,细胞核的 EdU 整合量较高,而 2mM 的 2DG 已经可以较明显的降低 HeLa 细胞的 EdU 整合量。而在联合用药组,只有少量细胞可以整合 EdU 且染色强度显著低于 2DG 组,说明联合用药可以有效抑制 HeLa 细胞的 DNA 复制速度,抑制细胞的生长。

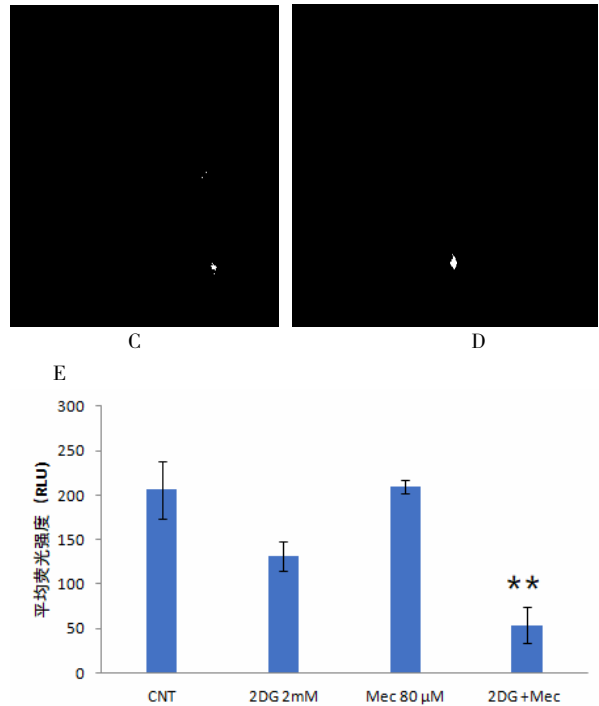
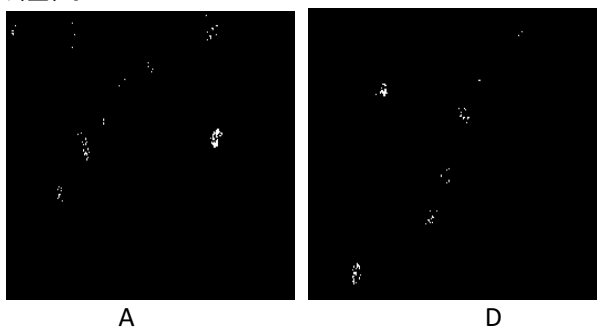
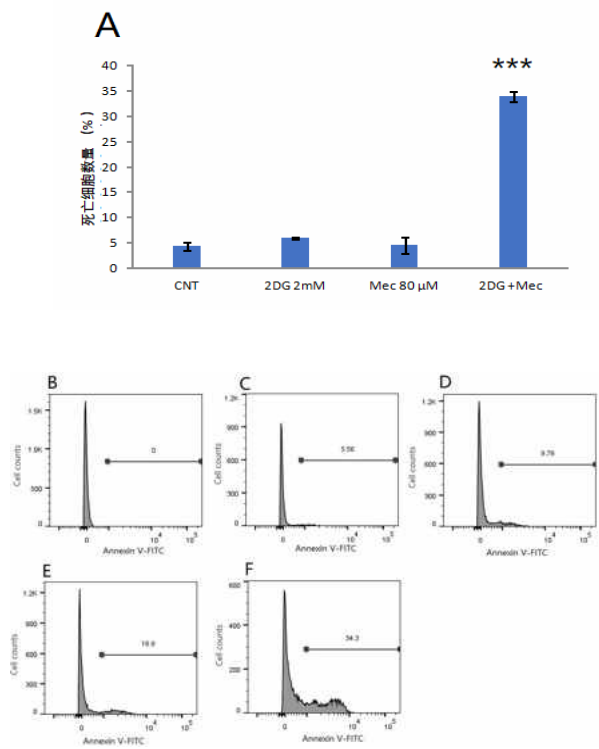


图 2 EdU 检测法检测氯苯甲嗪及 2DG 对 HeLa 细胞 DNA 复制速度的影响。A 对照组, B 氯苯甲嗪组, C 2DG 组, D 氯苯甲嗪+2DG 组。E EdU 染色的荧光强度量化分析。( \*\*: p < 0.01 对比对照组)

3. 氯苯甲嗪和 2DG 联合使用可以有效杀死 HeLa 细胞。

我们首先使用台盼蓝计数的方法检测了氯苯甲嗪和 2DG 联合使用对 HeLa 细胞的杀伤效果,结果如图 3A 所示,在氯苯甲嗪和 2DG 联合使用时, HeLa 细胞不仅生长速度受到极大抑制,细胞的死亡率也大幅度上升。我们又进一步用 Annexin-V 染色方法检测细胞凋亡的比例,结果如图 3B-C 显示,氯苯甲嗪和 2DG 联合使用可以诱导 HeLa 细胞大量凋亡,凋亡数量大大高于单独用药组。



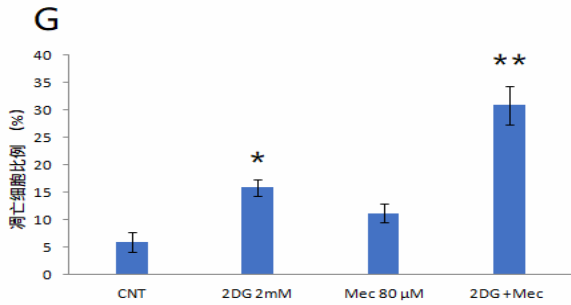


图3 氯苯甲嗪和2DG联合作用引发Hela细胞死亡和凋亡的检测。A.台盼蓝法检测Hela细胞死亡数。B-G Annexin-V染色流式细胞法检测Hela细胞凋亡。B未染色组 C对照组 D氯苯甲嗪组 E 2DG组 F联合用药组 G细胞凋亡数据的量化分析。(\*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$  对比对照组)

#### 4. 氯苯甲嗪和2DG联合使用导致Hela细胞代谢异常。

Hela细胞是具有Warberg effect的细胞，代谢偏好上偏向于葡萄糖，当我们检测Hela细胞培养液中葡萄糖浓度时，结果如图4A所示，经96小时培养后，培养液中的葡萄糖被大量消耗。但在2DG组中，培养液中的葡萄糖浓度依然较高，表明此浓度的2DG已经足以抑制葡萄糖代谢，而氯苯甲嗪对葡萄糖代谢速度影响不大，但在联合用药组葡萄糖代谢依然被显著抑制。我们又进一步检测Hela细胞中ATP的含量，结果如图4B所示，虽然2DG单独使用时已经可以显著抑制Hela细胞的葡萄糖代谢，但细胞内ATP含量并没有显著下降，单独使用氯苯甲嗪对ATP浓度也只有轻微影响。但当两者联合使用时，细胞内ATP含量出现了显著下降，表明氯苯甲嗪和2DG在联合使用时可以有效抑制Hela细胞的能量代谢，使细胞处于严重缺乏ATP的状态。

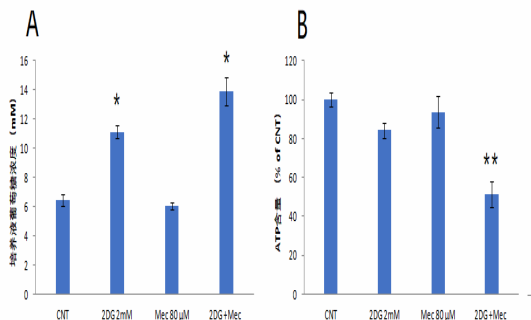


图4 氯苯甲嗪和2DG对Hela细胞的葡萄糖代谢及ATP水平的影响。A 氯苯甲嗪和2DG对Hela细胞葡萄糖代谢的影响。B 氯苯甲嗪和2DG对Hela细胞细胞内ATP含量的影响。(\*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$  对比对照组)

#### 讨论

在本工作中，我们发现，在使用较低剂量的2DG或氯苯甲嗪单独作用于Hela细胞时，虽然细胞生长速度和DNA复制速度会受到一定影响，但总体而言并不能有效抑制肿瘤细胞生长。但当2DG和氯苯甲嗪联合作用于Hela细胞时，细胞生长速度受到显著抑制，DNA复制速度也大大减慢。进一步的研究发现，联合用药可以导致Hela细胞大量死亡并显著诱导细胞的凋亡。造成Hela细胞死亡的原因可能是因为联合用药严重干扰了细胞的能量代谢，造成细胞内ATP的耗竭，从而引发细胞凋亡。

2DG虽然是已经得到长期应用的化疗药物，并且具有毒性小、副作用少等显著优点，但其最大的短板就是对肿瘤细胞的生长抑制能力和杀伤能力低下，需要大剂量使用，不仅在给药方式上受到限制。也增加了各种副作用，最终导致2DG的使用效果受到质疑。导致2DG使用受限的原因在于，虽然Warberg effect是普遍存在于肿瘤细胞的代谢异常现象，但肿瘤细胞内的线粒体依然具有代谢活力，当肿瘤细胞的糖酵解途径受到阻碍时，细胞仍然具有重新启用线粒体提供能量的能力。在我们的实验结果中，我们也发现，2mM的2DG虽然可以大幅度减少Hela细胞消耗葡萄糖的能力，但细胞内的ATP含量仍然能够维持在正常水平的90%左右，这使得细胞仍然可以具有足够能量维持细胞的正常生理功能。因此，使用其它代谢抑制药物辅助2DG，是提升2DG的效果，更有效抑制肿瘤细胞生长并杀伤肿瘤细胞的重要方法。

氯苯甲嗪是线粒体抑制剂，其作用机制是氯苯甲嗪通过抑制线粒体的重要底物丙酮酸转运通路。由于氯苯甲嗪并不直接干扰线粒体的主要代谢通路氧化磷酸化过程，因此氯苯甲嗪也并不表现出如其它线粒体抑制剂，如抗霉素、罗藤酮等所表现出的严重的细胞毒性。在高度依赖线粒体功能的神经细胞上，氯苯甲嗪甚至可以作为神经细胞的保护剂，保护神经细胞免于线粒体损伤<sup>[11,12]</sup>。在本工作中，我们的数据也表明低浓度下氯苯甲嗪对Hela细胞并不表现出明显毒性，但是这并不表明氯苯甲嗪对Hela细胞没有作用，只是Hela细胞可以通过糖酵解途径获得大量能量，用以补偿线粒体功能所受抑制，因此氯苯甲嗪的作用并不显著。但当使用氯苯甲嗪与2DG联合作用于Hela细胞时，同时阻断了糖酵解途径和线粒体功能，Hela细胞就失去了代偿能力，无法再维持能量供应，细胞内的ATP含量出现显著下降。由于DNA的复制过程是一个高度耗能的过程，无论是碱基的合成还是DNA链的延伸均需消耗ATP，当ATP供应不足时，DNA复制就被有效抑制，肿瘤细胞的生长速度也就大幅度下降。细胞持续处于缺乏能量的状态也是诱发细胞凋亡的主要机制。在我们的结果中，联合用药组中出现了显著的细胞凋亡现象，并且凋亡细胞的比例接近总死亡细胞比例，显示凋亡可能是导致Hela细胞死亡的主要机制，但还需要进一步的工作来加以验证。

本工作的结果表明，凭借协同抑制代谢作用的机制，氯苯甲嗪和2DG联合使用可以有效抑制宫颈癌细胞的生长，并诱导细胞凋亡，其作用效果显著高于单独用药，展示出了非常优秀的治疗肿瘤潜力，我们将在未来的工作中在动物模型上进一步研究该联合用药方案的治疗效果。由于在低剂量使用时，氯苯甲嗪和2DG都是在临床得到过长期应用的口服药，如果其效果可以得到证实，那么该方案将具有易于推广、易于使用的显著优势，具有较大临床应用价值。

#### 参考文献:

- [1]赵爽, 陈号, 赵方辉 全球子宫颈癌前病变及宫颈癌治疗指南制订现状的系统综述 中华医学杂志, 2022,102(22): 1666-1676.
- [2]祝彩霞 紫杉醇联合顺铂新辅助化疗在早中期宫颈癌治疗中的临床应用价值分析 《哈尔滨医药》 2022年第6期 86-88.
- [3]程遥, 刁冬梅, 宋永春, 党诚学. 2-脱氧葡萄糖在抗肿瘤领域的研究进展 《中国肿瘤临床》 2012年第17期 1325-1328
- [4]邵霞, 王婷. 2-脱氧-D-葡萄糖抗肿瘤作用机制及联合应用治疗肿瘤的研究进展 医学综述 2016年第22卷第17期 3394-3397

基金项目: 贵州省科技计划项目, 项目编号: 黔科合基础-ZK[2022]-一般 161; 贵州大学大学生创新创业计划训练项目, 项目编号: 贵大(省)创字 2021 (079)