

视黄酸对大鼠肝癌细胞 γ -丁基甜菜碱双加氧酶的表达及肉碱合成的影响

屈尚蓝^{1,2#},任伟伟^{1,2#},宋流东²,冯维杨^{1*}

¹昆明医科大学基础医学院;²昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室,昆明 650500

摘要:为研究大鼠原发性肝癌 γ -丁基甜菜碱双加氧酶(γ -BBD)的基因表达以及视黄酸对大鼠肝癌细胞 γ -BBD 表达的影响。研究用 50 mg/kg 公斤体重的二乙基亚硝胺(DEN)腹腔每周注射一次的给药方案在体内诱发大鼠原发性肝癌,并通过 western blotting 和 real-time PCR 技术对大鼠原发性肝癌模型肝组织中肉碱合成关键酶 γ -BBD 以及维甲酸 X 受体 γ (RXR γ)的表达水平进行了检测;在体外,本研究通过 western blotting 和 real-time PCR 检测了 1 μ mol/L 13-顺式视黄酸(13-cis-RA)处理的大鼠肝癌细胞(RH-35 细胞) γ -BBD 和 RXR γ 的表达水平,并通过流式细胞术分析了 13-cis-RA 处理的 RH-35 细胞的细胞周期。结果显示,与对照组相比, γ -BBD 和 RXR γ 在大鼠原发性肝癌模型组织中的 mRNA 丰度和蛋白表达水平显著降低;但是,与对照组相比,在用视黄酸处理 48 h、处于明显 G1 期阻滞的大鼠肝癌细胞内, γ -BBD 和 RXR γ 的 mRNA 丰度和蛋白表达水平显著升高。这些结果表明, γ -BBD 和 RXR γ 在 DEN 诱导的原发性肝细胞癌中的表达水平明显下调,而 13-cis-RA 能诱导并上调大鼠肝癌细胞 RXR γ 和 γ -BBD 的表达。提示 13-cis-RA 对 γ -BBD 表达的影响可能对大鼠肝癌细胞肉碱的合成具有促进作用。

关键词:视黄酸; γ -丁基甜菜碱双加氧酶;维甲酸 X 受体;肝癌;肉碱合成

中图分类号:R961

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)10-1791-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.10.018

The effects of retinoic acid on the expression of γ -butyrobetaine dioxygenase and carnitine biosynthesis in rat hepatocellular carcinoma cells

QU Shang-lan^{1,2#},REN Wei-wei^{1,2#},SONG Liu-dong²,FENG Wei-yang^{1*}

¹School of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University;

²School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: To study the gene expression of γ -butyrobetaine dioxygenase (γ -BBD) in primary hepatocellular carcinoma and the effect of retinoic acid on the expression of γ -BBD in rat hepatoma cells. A DEN-induced primary hepatocellular carcinoma model was established in vivo and a rat hepatoma cells (RH-35 cells) was treated with 1 μ mol/L 13-cis-retinoic acid (13-cis-RA) in vitro. In DEN-induced primary hepatocellular carcinoma model, the Sprague Dawley rats received intraperitoneal injections of diethylnitrosamine (DEN) at 50 mg/kg body weight once a week. The expression levels of γ -BBD and retinoid x receptor gamma (RXR γ) were measured by western blotting and real-time PCR in DEN-induced primary hepatocellular carcinoma and RH-35 cells treated with 13-cis-RA, respectively. The cell cycle of RH-35 cells treated with retinoic acid was analyzed by flow cytometry. Compared with those of control group, the mRNA abundance and protein expression levels of γ -BBD and RXR γ were significantly low in DEN-induced primary hepatocellular carcinoma. However, compared with those of control group, the mRNA abundance and protein expression levels of γ -BBD and RXR γ were significantly high in RH-35 cells which were treated with retinoic acid for 48 hours. Furthermore, RH-35 cells treated with retinoic acid for 48 hours were significantly arrested in G1 phase. These results indicated that the expression levels of γ -BBD and RXR γ were significantly down-regulated

投稿日期:2018-10-26

接受日期:2019-04-22

基金项目:云南省应用基础研究计划(2013FZ050)

* 通信作者 Tel:86-871-65922854; E-mail: fengweiyang4@126.com

#共同第一作者

in DEN-induced primary hepatocellular carcinoma, and that the 13-cis-RA could induce and up-regulate the expression of RXR γ and γ -BBD in RH-35 cells. This suggests that the effect of 13-cis-RA on the expression of γ -BBD may promote the synthesis of carnitine in rat hepatocellular carcinoma cells.

Key words: retinoic acid; γ -butyrobetainedioxygenase; retinoid x receptors; hepatocarcinoma; carnitine biosynthesis

视黄酸 (retinoic acid, RA) 是天然维生素 A 在哺乳动物体内代谢产生的活性衍生物, 包括全反视黄酸 (all-trans-retinoic acid, atRA)、9-顺式视黄酸 (9-cis-retinoic acid, 9-cis-RA) 和 13-顺式视黄酸 (13-cis-retinoic acid, 13-cis-RA) 三种异构体, 三者可相互转变^[1]。RA 不仅防癌、抗癌, 在脂代谢调节中也具有重要作用^[1,4]。研究发现, 维甲酸 X 受体 (retinoid x receptors, RXRs) 与过氧化物酶体增殖激活物受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 所形成的异源二聚体在脂代谢调节中发挥重要作用^[1,4]。在哺乳动物体内, RXRs 包括 RXR α , RXR β 和 RXR γ 三种亚型, 9-cis-RA 是 RXRs 的天然配体^[1]。

L-肉碱在真核细胞的脂肪酸分解代谢中起着不可或缺的作用, 其主要功能是作为载体将活化脂肪酸转运到线粒体中进行 β -氧化。在哺乳动物中, 参与脂肪酸转运的肉碱可以由生物体自身合成^[6]。 γ -丁基甜菜碱双加氧酶 (γ -butyrobetainedioxygenase, γ -BBD, EC 1.14.11.1) 是大鼠和人肉碱生物合成途径中一个重要的关键酶, 主要在肝脏中催化 γ -甜菜碱到 L-肉碱的立体特异性羟化^[6]。研究发现, γ -BBD 抑制剂能抑制 L-肉碱的生物合成并降低脂肪酸的转运和氧化率^[7,8]。这些研究表明, γ -BBD 在大鼠和人肝脏中所催化的反应对肉碱合成及脂肪酸氧化分解具有重要作用。

据报道, 肝癌细胞具有明显的脂代谢重编程现象^[9,10], 而且多项研究已表明 RA 能增强脂肪酸分解代谢^[4,11,12]。但是, γ -BBD 的表达在肝癌细胞内是否随脂代谢调节而被调节、是否受 RA 影响目前尚不清楚。本研究用二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 建立大鼠原发性肝癌模型, 通过 western blotting 等技术研究了肝癌模型组织中 γ -BBD 的基因表达; 探讨了 13-cis-RA 对大鼠肝癌细胞 γ -BBD 基因表达的影响, 为阐明 RA 对肝癌细胞肉碱合成的影响提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验细胞

RH-35 大鼠肝癌细胞 (KCB 92022YJ), 购于中

国科学院昆明动物研究所。

1.2 实验动物

雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 购于昆明医科大学 SPF 实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK (滇) K2015-0002, 动物合格证号: 53004100000036。

1.3 试剂

N-Nitrosodiethylamine (sigma, N0756); 13-cis-RA (sigma, R3255); DMEM, High Glucose, GlutaMAXTM, Pyruvate (Gibco, 10569010); 胎牛血清 (Gibco, 10270106); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (索莱宝, T1300); 1 \times PBS 缓冲液 (PH7.2 ~ 7.4) (索莱宝, P1020); RIPA 组织细胞裂解液 (索莱宝, R0010); BCA 蛋白定量试剂盒 (天根, PA115); Anti-Actin antibody (SAB, 21338); Anti-Gamma-Butyrobetaine Dioxygenase antibody (abcam, ab96348); Anti-Retinoid X Receptor Gamma antibody (abcam, ab53162); Goat Anti-Rabbit IgG-Hrp conjugated (SAB, L3012); Pro-light HRP 化学发光检测试剂 (天根, PA112); 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天, C1052); 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (天根, DP413); TRNzola⁺ 总 RNA 提取试剂 (天根, DP421); Recombinant DNase I (宝生物, 2270A); RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, K1632); LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche, 04707516001)。

1.4 仪器

超高速流式细胞分析分选工作站 (Partec, 德国); 微量核酸蛋白定量仪 (BDT, 美国); 化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI7300, 美国)。

2 实验方法

2.1 DEN 诱发肝癌

40 只雄性 SD 大鼠, 体重 160 ~ 180 g, 适应性饲养 4 天后, 随机分为肝癌模型组 ($n = 20$) 和正常对照组 ($n = 20$)。在常规饮食、饮水基础上, 模型组腹腔注射 50 mg/kg 公斤体重 DEN^[13], 每周一次; 正常对照组腹腔注射 0.9% NaCl 溶液, 每周一次。DEN 诱导肝硬化和肝癌形成期间, 每两周处死一只大鼠, 跟踪观察肝硬化和肝癌形成情况, 至 16 周后将所有

动物处死。

2.2 肝组织 HE 染色

肝组织用(10%)甲醛固定、脱水、石蜡包埋切片,按常规操作用苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肝组织的细胞形态学变化。

2.3 细胞培养

用含10%胎牛血清的DMEM于5%CO₂、37℃条件下传代培养RH-35细胞。待细胞在25cm²直角斜颈培养瓶中长满后,弃去培养基,用1×PBS缓冲液(pH7.2~7.4,0.01mmol/L)清洗细胞两次,加入1mL0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液,待大部分细胞变成圆形时轻轻拍打培养瓶使细胞悬浮,然后立即加入2mL完全培养基终止消化。将胰蛋白酶消化细胞转移到50mL离心管中1000rpm离心5min,弃去上清液,加入13mL完全培养基并吹打均匀,再将细胞转移至6孔板或25cm²直角斜颈培养瓶中培养。待细胞长满80%左右时,视黄酸处理组细胞在培养基中加入13-cis-RA使其终浓度为1μmol/L^[14,15],对照组细胞在培养基中按常规继续培养。

2.4 流式细胞术测定细胞周期

视黄酸处理组($n=3$)于13-cis-RA处理大鼠肝癌细胞48h后,与对照组细胞($n=3$)一起以PI单染法流式细胞术分析RH-35细胞的细胞周期进程。所有细胞用胰酶消化收集后,经PBS溶液洗涤并加入1mL冰浴预冷的70%乙醇,4℃固定12~24h,细胞再经PBS洗涤后加入按细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书操作配制好的碘化丙啶染色液0.5mL,37℃避光温浴30min,用流式细胞仪检测并分析DNA含量和细胞周期进程。

2.5 蛋白质印迹技术检测 γ -BBD 和 RXR γ 翻译水平的表达

通过Western blotting技术对DEN诱发的肝癌模型组($n=12$)、正常肝组织对照组($n=13$)的 γ -BBD和RXR γ 的蛋白表达水平进行测定。分别在视黄酸处理12h($n=8$)、24h($n=8$)和48h($n=8$)后提取RA处理组和对照组($n=24$)细胞总蛋白,通过western blotting技术对 γ -BBD和RXR γ 的蛋白表达水平进行测定。肝组织按RIPA说明书每20mg加入150~250μL组织细胞裂解液,6孔板培养肝细胞按每孔细胞加入150~250μL裂解液裂解肝细胞,裂解液经离心后取上清用BCA法测定总蛋白浓度。取含35μg总蛋白的裂解液于12%分离胶,5%

浓缩胶中进行SDS-PAGE电泳,采用半干转移法将总蛋白转移到PVDF膜上。转膜后用5%脱脂奶粉溶液于室温条件下封闭2h,按抗体说明书加入适量I抗4℃孵育过夜,用含1%Tween-20的TBS-T洗膜3次,再加入II抗(1:10000)室温孵育2h。用TBS洗膜2次,每次10min。用化学发光试剂显影,Image-Pro Plus6.0图像分析软件进行灰度分析,以 β -actin作为内参进行相对半定量分析。

2.6 实时荧光定量PCR技术检测 γ -BBD 和 RXR γ 转录水平的表达

通过real-time PCR技术对DEN诱发的肝癌模型组($n=12$)、正常肝组织对照组($n=13$)的 γ -BBD和RXR γ 的mRNA表达水平进行测定。分别在视黄酸处理24h($n=8$)和48h($n=8$)后提取RA处理组和对照组($n=16$)细胞总RNA,通过real-time PCR技术对 γ -BBD和RXR γ 的mRNA表达水平进行测定。肝组织总RNA提取按动物组织总RNA提取试剂盒说明书进行操作,培养肝细胞总RNA提取按TRNzol-A⁺总RNA提取试剂盒说明书进行操作。所有总RNA样品先用琼脂糖凝胶电泳鉴定质量,随后定量、用DNAase I消化基因组DNA。总RNA样品再定量后按RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书操作将肝细胞内的mRNA逆转录成cDNA,20μL逆转录反应体系中加入RNA模板2μg、1μL通用引物Oligo(dT)₁₈。所有cDNA溶液经定量后按LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master说明书计算并配制PCR反应体系,20μLPCR反应体系中引物的终浓度为0.5μmol/L、cDNA模板加70ng。每个样本至少做3个平行反应。PCR反应条件:95℃预变性10min,95℃变性5min,60~62℃退火10s,72℃延伸30s,循环45次。PCR反应结束后,以 β -actin作为内参,用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}定量方法对基因表达产物进行相对定量分析。 β -actin、 γ -BBD和RXR γ 的引物序列见表1。

2.7 统计学处理方法

采用SPSS22.0软件进行统计学分析,实验结果以平均值±标准差表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 DEN 诱发大鼠原发性肝癌

在接受DEN给药方案的大鼠中,大鼠肝脏的外观于12周时开始出现明显变化,肝表面失去原有光

表 1 PCR 反应中使用的引物和条件

Table 1 Primers and conditions used in the PCR reactions

基因 Gene	引物序列 Prime sequence	退火温度 Annealing temperature	延伸时间 Extension time	循环次数 Number of cycle	扩增长度 Amplicon size (bp)
β -actin	5'GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA3' 5'CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC3'	62	30s	45	540
γ -BBD	5'CACCTGGGGTTAGCTTCTG3' 5'CACATCACCTGGATTTCATCTTG3'	60	30s	45	380
RXR γ	5'GCAAGAAGAAAGGCAGAGGA3' 5'CCACTCAACGAGGGTGAAA3'	60	30s	45	223

泽,颜色变浅、表面粗糙,可见部分结节(图 1A)。至 DEN 给药 14 周时,肝表面更粗糙,且结节数量明显增多、增大(图 1B)。于 DEN 给药 16 周时,肝脏表面结节进一步增多且出现数量较多的大结节(图 1C),但对对照组肝脏外观无任何变化(图 1D)。取肝组织行 HE 染色组织学检查,DEN 处理 14 周时肝组织在光镜下表现为肝脏内弥漫性纤维组织增生,炎性细胞浸润,假小叶形成,小叶内肝细胞排列杂乱,部分细胞出现异型性(图 2A)。尤其是,在 DEN 处理 16 周后肝组织在光镜下明显表现为细胞大小不

一,排列杂乱,细胞核大、深染,形态怪异,异型性细胞明显增多,胞浆嗜碱性,血窦闭塞,部分细胞坏死(图 2B);但 0.9% NaCl 给药 14 周和 16 周的对照组肝细胞则有规律地排列成条索状,细胞及细胞核大小一致,染色均匀(图 2C,2D)。以上实验表明按 50 mg/kg 公斤体重的 DEN 腹腔给药方案在药物作用 14 周时肝脏出现明显肝硬化和组织增生,在药物作用 16 周时大鼠肝组织在进行性肝硬化基础之上出现癌变的形态学变化。

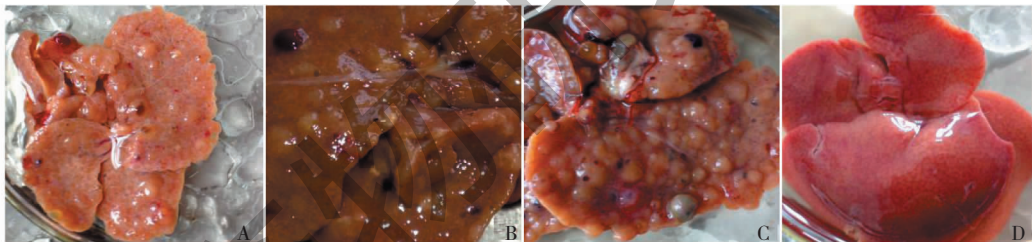


图 1 DEN 处理的大鼠肝组织与对照肝组织

Fig. 1 Rat liver tissue treated with DEN and control liver tissue

注:(A)DEN 处理 12 周的肝组织;(B)DEN 处理 14 周的肝组织;(C)DEN 处理 16 周的肝组织;(D)0.9% NaCl 处理 16 周的肝组织。

Note:(A)Rat liver tissue treated with DEN for 12 weeks;(B)Rat liver tissue treated with DEN for 14 weeks;(C)Rat liver tissue treated with DEN for 16 weeks;(D)Rat liver tissue treated with 0.9% NaCl for 16 weeks.

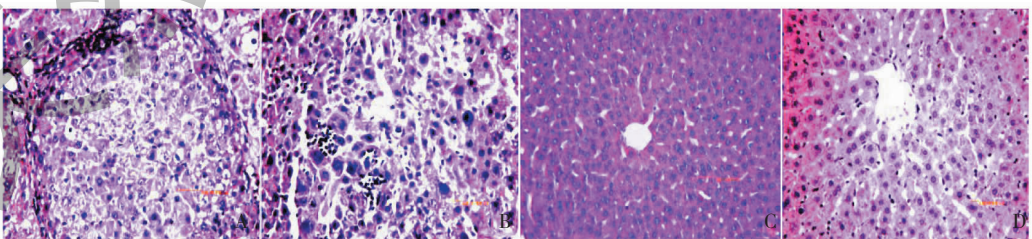


图 2 肝组织 HE 染色(×400)

Fig. 2 Liver tissue HE staining(×400)

注:(A)DEN 处理 14 周的肝组织;(B)DEN 处理 16 周的肝组织;(C)0.9% NaCl 处理 14 周的肝组织;(D)0.9% NaCl 处理 16 周的肝组织。

Note:(A)Rat liver tissue treated with DEN for 14 weeks;(B)Rat liver tissue treated with DEN for 16 weeks(C)Rat liver tissue treated with 0.9% NaCl for 14 weeks;(D)Rat liver tissue treated with 0.9% NaCl for 16 weeks.

3.2 γ -BBD 在 DEN 诱发的大鼠原发性肝癌中的表达

与对照组相比,在接受 DEN 给药方案的大鼠中,肝癌模型组 γ -BBD 的蛋白表达水平显著低于对

照组 ($P < 0.05$) (图 3); 荧光定量 PCR 分析也发现肝癌模型组 γ -BBD 的 mRNA 丰度明显低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4A)。这些结果表明, DEN 诱发的大鼠原发性肝癌细胞下调了 γ -BBD 的表达。

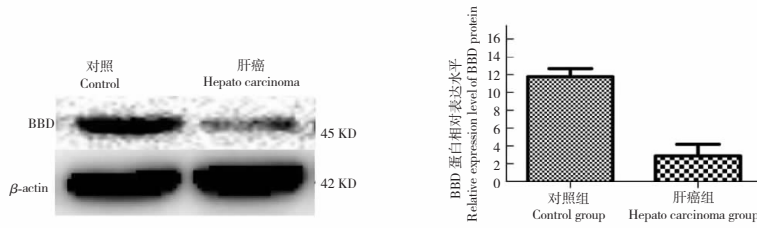


图 3 大鼠肝组织 BBD 的 western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of BBD in rat liver tissue

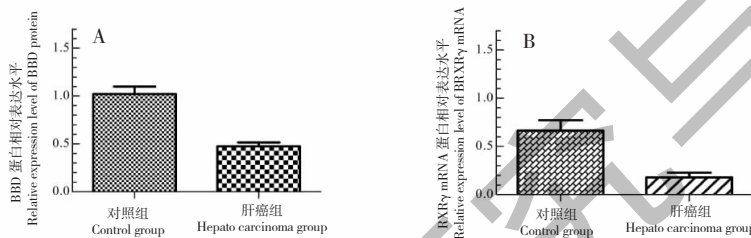


图 4 大鼠肝组织 BBD 和 RXR γ 的 qRT-PCR 分析

Fig. 4 qRT-PCR analysis of BBD and RXR γ in rat liver tissue

3.3 RXR γ 在 DEN 诱发的大鼠原发性肝癌中的表达

与对照组相比,肝癌模型组 RXR γ 的蛋白表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 5), 荧光定量

PCR 分析也发现 RXR γ 的 mRNA 丰度明显低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4B)。这些结果表明, DEN 诱发的大鼠原发性肝癌细胞也下调了 RXR γ 的表达。

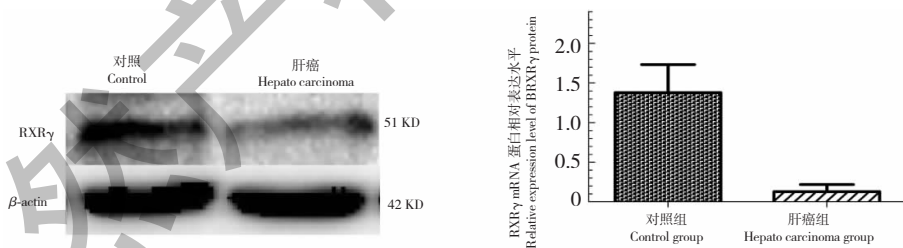


图 5 大鼠肝组织 RXR γ 的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of RXR γ in rat liver tissue

3.4 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 RXR γ 表达的影响

RH-35 细胞经 $1 \mu\text{mol/L}$ 13-cis-RA 处理 12 ~ 48 h 后,与对照组比较, RXR γ 的蛋白表达水平显著增加, 13-cis-RA 处理 48 h 后 RXR γ 蛋白表达水平增加最为显著 ($P < 0.05$, 图 6)。为了进一步确定 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 RXR γ 表达的影响是否发生

在转录水平,实时荧光定量 PCR 技术被用来分析 RXR γ 转录水平的表达,结果显示,在 13-cis-RA 处理 24、48 h 后,与对照组相比, 13-cis-RA 处理组 RXR γ mRNA 的丰度明显升高 ($P < 0.05$, 图 7A)。这些实验结果表明, 13-cis RA 能诱导并上调肝癌细胞 RXR γ 的表达。

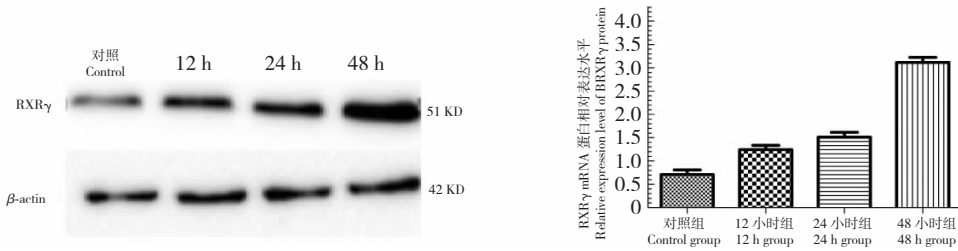


图 6 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 RXR γ 蛋白表达的影响

Fig. 6 The effects of 13-cis-RA on the expression of RXR γ protein in RH-35 cell

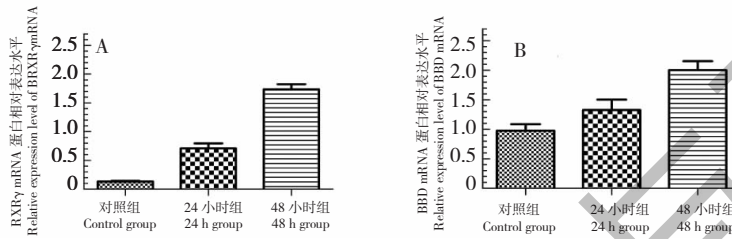


图 7 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 γ -BBD mRNA 和 RXR γ mRNA 表达的影响

Fig. 7 The effects of 13-cis-RA on the expression of γ -BBD mRNA and RXR γ mRNA in RH-35 cell

3.5 13-cis-RA 对大鼠肝癌细胞细胞周期进程的影响

在用 1 μ mol/L 的 13-cis-RA 处理大鼠肝癌细胞 48 h 后,与对照组相比较,13-cis-RA 处理组的细胞 G1 期细胞数量分布明显增加 ($P < 0.05$),S 期细胞

数量分布显著减少 ($P < 0.05$) (图 8),细胞周期分析的定量结果也在表 2 中显示。以上结果表明,1 μ mol/L 的 13-cis-RA 处理 RH-35 细胞 48 h 后,细胞周期明显阻滞于 G1 期,大鼠肝癌细胞处于显著的细胞增殖抑制状态。

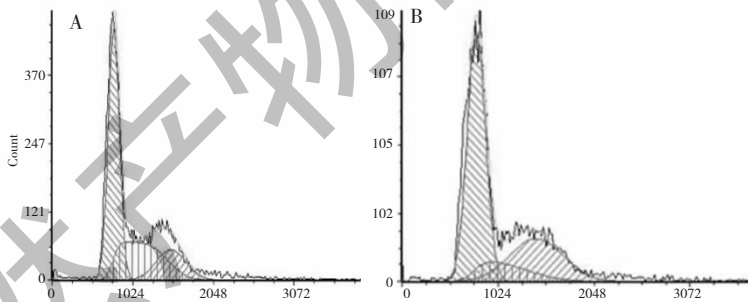


图 8 13-cis-RA 对 RH-35 细胞周期进程的影响

Fig. 8 The effects of 13-cis-RA on RH-35 cell cycle progression

注:(A)对照组;(B)13-cis-RA 处理组。Note:(A) Control group;(B) 13-cis-RA-treated group.

表 2 13-cis-RA 对 RH-35 细胞周期进程的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

Table 2 The effect of 13-cis-RA on RH-35 cell cycle progression ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

细胞周期 Cell cycle	G1 (%)	S (%)	G2 (%)	G2/G1
对照组 Control group	51.36 \pm 0.22	31.74 \pm 0.46	16.90 \pm 0.15	1.92 \pm 0.09
13-cis RA 处理组 13-cis RA-treated group	58.13 \pm 0.26 *	12.37 \pm 0.34 *	29.50 \pm 0.17 *	1.80 \pm 0.05 *

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$.

3.6 13-cis RA 对 RH-35 细胞 γ -BBD 表达的影响

RH-35 细胞经 $1 \mu\text{mol/L}$ 13-cis-RA 作用 12 ~ 48 h 后, 与对照组比较, γ -BBD 的蛋白表达水平显著增加, 13-cis-RA 处理 48 h 后 γ -BBD 蛋白表达水平增加最为显著 ($P < 0.05$, 图 9)。但是, γ -BBD 的蛋白表达水平在 13-cis-RA 处理 12 h 组与 13-cis-RA 处理 24 h 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 9)。为

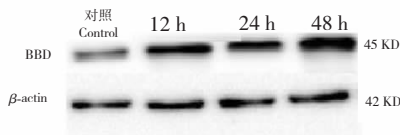
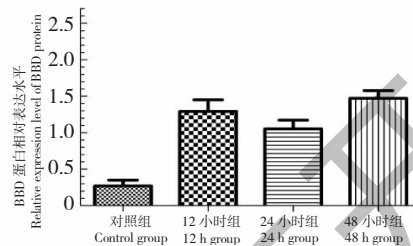


图 9 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 γ -BBD 蛋白表达的影响

Fig. 9 The effects of 13-cis-RA on the of γ -BBD protein in RH-35 cell

了进一步确定 13-cis-RA 对 RH-35 细胞 γ -BBD 表达的影响是否发生在转录水平, 实时荧光定量 PCR 技术被用来分析 γ -BBD 转录水平的表达, 结果显示, 与对照组相比, 在 13-cis-RA 处理 24、48 h 后, γ -BBD mRNA 的丰度明显升高 ($P < 0.05$, 图 7B)。这些结果表明 13-cis-RA 在转录和翻译水平上调了 γ -BBD 的表达。



4 结论

DEN 诱发大鼠肝癌模型因其诱癌成功率高, 诱发癌变的病理变化过程与各种原因引起的大鼠和人肝细胞癌变过程相似而被广泛应用^[13,16]。不管是什么原因引起的肝癌, 其发展过程一般都要经历肝硬化—再生性结节—腺瘤性增生—早期肝癌—进展期肝癌的病理变化过程^[13,16]。临床上或肝癌模型制备过程中常以肝脏宏观的形态学变化、HE 染色镜下肝硬化形态学变化以及组织、细胞异型性增生的形态学特点作为判断典型癌变肝组织的重要指标。本研究采用 Seong Tae Park 等^[13]的研究方法制备大鼠原发性肝癌模型, 肝脏于 12 周时开始出现肝硬化结节, 至 DEN 给药 14 周时, 肝表面结节数增多、增大, HE 染色可见弥漫性纤维组织增生、假小叶形成等典型的肝硬化表现。于 DEN 给药 16 周时, 肝脏表面出现明显且数量较多的大结节, HE 染色组织学检查发现细胞大小不一, 排列杂乱, 细胞核大、深染, 形态怪异, 异型性明显。因此, 至诱癌 16 周结束时, 大鼠肝组织已表现出典型的肝硬化基础上癌变的病理学特征。而且, 这些进行性变化的形态学特征与多项 DEN 诱发原发性肝癌的报道相似^[13,16]。这说明 50 mg/kg 公斤体重的 DEN 腹腔给药方案能成功诱发大鼠原发性肝癌。

L-肉碱作为脂肪酸分解代谢必不可少的载体, 其合成有可能随脂代谢重编程而被协调调节。本研究用 DEN 诱发大鼠原发性肝癌, 通过 western blotting 等技术分析了大鼠原发性肝癌模型 γ -BBD 的表

达, 结果证实了 γ -BBD 在进展期肝癌模型组织中转录水平和翻译水平的表达是下调的, 提示, DEN 诱发的大鼠原发性肝癌模型中的肉碱合成可能下调。研究发现, γ -BBD 是 PPAR α 调控的靶基因^[17]; 另有研究还发现 RXR γ 活化和过表达能上调 PPAR α 的表达^[18]。因此, DEN 诱导的原发性肝癌模型细胞中 γ -BBD 表达的调控模式可能与 RXR γ 的基因表达调控模式有关。本研究通过 western blotting 等技术证实了 DEN 诱发的大鼠原发性肝癌模型中 RXR γ 的表达是下调的, 与 γ -BBD 的调控趋势一致。提示, DEN 诱发的原发性肝癌模型中 γ -BBD 的低表达调控模式可能与与 RXR γ 的低表达有关。

据报道, RA 能上调 RXR γ 的表达^[14,19,20], 因此 RA 干预有可能通过影响肝癌细胞 RXR γ 的表达进而影响 γ -BBD 的表达。本研究证实了 13-cis-RA 在药物诱导 48 h 这一时间点能显著上调大鼠肝癌细胞 RXR γ 的表达。一些研究还发现 RXR γ 在癌细胞中低表达与癌发生、增殖以及低分化有关^[15,19], 因此本研究用流式细胞术观察 RA 对大鼠肝癌细胞细胞周期的影响, 结果也表明在 13-cis-RA 作用 48 h 这一时间点, RH-35 细胞表现出显著的 G1 期阻滞。提示, RA 上调肝癌细胞 RXR γ 的表达可能与癌细胞重分化有关。在此基础之上, 本研究通过 western blotting 等技术检测了 13-cis-RA 对大鼠肝癌细胞 γ -BBD 表达的影响, 结果也发现在 RA 作用 48 h 这一时间点, γ -BBD 在转录水平和翻译水平的表达均显著上调。提示, 13-cis-RA 可能在诱导细胞重分化时

期通过上调 RXR γ 的表达促进 PPAR α 表达,进而影响了 γ -BBD 的表达。研究发现单独的 PPARs 不能直接调控靶基因,需与 RXRs 结合形成异二聚体才能发挥作用^[1,2],因此本研究中 13-cis-RA 还可能在细胞内通过异构成 9-cis-RA 后,与 PPARs:RXRs 中的 RXRs 连接直接活化该异二聚体^[1,2,5,20,21],进而增强 γ -BBD 的转录。

综上所述, DEN 诱发的原发性大鼠肝癌模型有可能因 γ -BBD 下调而下调肉碱合成代谢;但是, 13-cis-RA 能上调 γ -BBD 的表达,因此 13-cis-RA 可能影响 RH-35 大鼠肝癌细胞的肉碱合成。13-cis-RA 对 γ -BBD 表达的影响可能通过上调肝癌细胞 RXR γ 的表达,活化并增强 PPARs:RXRs 的转录活性而发挥作用。

参考文献

- 1 Uray IP, Dmitrovsky E, Brown PH. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic [J]. *Semin Oncol*, 2016, 43: 49-64.
- 2 Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Retinoic acid actions through mammalian nuclear receptors [J]. *Chem Rev*, 2014, 114: 233-254.
- 3 Bonet ML, Ribot J, Palou A. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821: 177-189.
- 4 Amengual J, Petrov P, Bonet ML et al. Induction of carnitine-palmitoyltransferase 1 and fatty acid oxidation by retinoic acid in HepG2 cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44: 2019-2027.
- 5 Lefebvre P, Benomar Y, Staels B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21: 676-683.
- 6 Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals [J]. *Biochem J*, 2002, 361: 417-429.
- 7 Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, et al. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48: 314-319.
- 8 Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Kuka J, et al. Inhibition of L-carnitine biosynthesis and transport by methyl- γ -butyrobetaine decreases fatty acid oxidation and protects against myocardial infarction [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172: 1319-1332.
- 9 DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation [J]. *Cell Metab*, 2008, 7: 11-20.
- 10 Gu JJ, Yao M, Yang J, et al. Mitochondrial carnitinepalmitoyltransferase-II inactivity aggravates lipid accumulation in rat hepatocarcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23: 256-264.
- 11 Amengual J, Ribot J, Bonet ML, et al. Retinoic acid treatment enhances lipid oxidation and inhibits lipid biosynthesis capacities in the liver of mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 25: 657-666.
- 12 Amengual J, Ribot J, Bonet L, et al. Retinoic acid treatment increases lipid oxidation capacity in skeletal muscle of mice [J]. *Obesity*, 2008, 16: 585-591.
- 13 Seong Tae Park, Jeong Won Jang, GiDae Kim, et al. Beneficial of metronomic chemotherapy on tumor suppression and survival in a rat model of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65: 1029-1037.
- 14 Wang H, Yu XY, Zhang SG, et al. Effects of 9-cis-retinoic acid on transcripton of retinoic acid receptors RXR in lung cancer cells [J]. *Molecul Cardiol China* (中国分子心脏病学杂志), 2004, 4: 16-20.
- 15 Nelson AM, Gilliland KL, Cong Z, et al. 13-cis Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126: 2178-2189.
- 16 Zhang ZM, Wang G, Chen C. Pathologic and morphologic study on modified DEN-induced hepatocarcinoma model in rats [J]. *J Third Mil Med Univ* (第三军医大学学报), 2007, 29: 1164-1167.
- 17 Van Vlies N, Ferdinandusse S, Turkenburg M, et al. PPAR α -activation results in enhanced carnitine biosynthesis and OCTN2-mediated hepatic carnitine accumulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1767: 1134-1142.
- 18 Nie B, Nie T, Hui X, et al. Brown adipogenic reprogramming induced by a small molecule [J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 624-635.
- 19 Liu Y, Zhu ZA, Cui T, et al. Inhibitory effect of RXR γ and RAR β on growth of human gastric carcinoma cell line SGC7901 treated by 9-cis-RA [J]. *Tianjin Med J* (天津医药), 2009, 37: 1000-1003.
- 20 Papi A, Rocchi P, Ferreri AM, et al. RXR γ and PPAR γ ligands in combination to inhibit proliferation and invasiveness in colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297: 65-74.
- 21 He LL, Chen XQ, Zhang Y. Research progress of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose and lipid metabolism [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1655-1661.