

SCD1 对肝癌 SMMC-7721 细胞脂质代谢的影响及可能机制

黄光明¹, 沈 薇²

(1. 重庆市第五人民医院, 重庆 400062; 2. 重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010)

摘要: [目的] 探讨 SCD1 对 SMMC-7721 细胞脂质代谢的影响及可能机制。[方法] 肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞培养, 分为 4 组(对照组、CAY-10566 处理组、CAY-10566 联合 Compound C 共同处理组和 CAY-10566 联合氯喹共同处理组), 通过 MTT 法和流式细胞术分别检测细胞增殖和凋亡情况, 透射电子显微镜观察细胞自噬体情况。胆固醇(CE)和甘油三酯(TAG)检测试剂盒分别检测上述 4 组 SMMC-7721 细胞的 CE 和 TAG 水平。[结果] 抑制 SCD1 后 SMMC-7721 细胞自噬体明显增加, 相应地减少了细胞活力, 增加了细胞凋亡率; 抑制 SCD1 基础上抑制 AMPK 或自噬后上述细胞的自噬体均明显减少, 相应地增加了细胞活力, 减少了细胞凋亡率。CE 和 TAG 检测结果表明: 抑制 SCD1 明显减少 SMMC-7721 细胞 CE 和 TAG 水平, 与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 抑制 SCD1 基础上抑制 AMPK 或自噬后 SMMC-7721 细胞 CE 和 TAG 水平均明显增加, 与 SCD1 抑制剂组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] SCD1 可通过下调 AMPK 途径负性调节自噬, 增加 SMMC-7721 细胞 CE 和 TAG 水平, 抑制细胞凋亡, 促进细胞生存, 可能影响肝癌细胞的形成及进展。

关键词: SCD1; 自噬; AMPK; SMMC-7721 细胞; 脂质代谢

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)08-0653-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.08.B001

Effects of SCD1 on Lipid Metabolism in SMMC-7721 Cells and its Underlying Molecular Mechanism

HUANG Guang-ming¹, SHEN Wei²

(1. The Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: [Objective] To investigate effects of SCD1 on lipid metabolism in SMMC-7721 cells and its underlying molecular mechanism. [Methods] SMMC-7721 cells were cultured and divided into four groups (the control group, the CAY-10566 group, the group of CAY-10566 in combination with Compound C and the group of CAY-10566 concurrently with chloroquine), and the cell viability and cell apoptosis were determined by MTT assay and flow cytometry, respectively, and the cell autophagosomes in the above cells were observed under a transmission electron microscope. The intracellular levels of cholesterol (CE) and triglycerides (TAG) in SMMC-7721 cells in the above four groups were assessed using CE and TAG assay kit. [Results] Inhibition of SCD1 significantly increased autophagosomes of the cytoplasm in SMMC-7721 cells, and accordingly decreased the cell viability and increased cell apoptosis. SCD1 activity was inhibited in combination with inhibition of AMPK signaling, or concurrently with autophagy inhibition, which led to significant reduction of the autophagosomes of the above cells, and accordingly increased the cell viability and decreased cell apoptosis. The data showed that inhibition of SCD1 led to a marked decrease in the levels of CE and TAG in SMMC-7721 cells ($P < 0.05$), and that inhibition of SCD1 in combination with inhibition of AMPK signaling, or concurrently with autophagy inhibition, caused a marked increase in their levels in the above cells ($P < 0.05$). [Conclusion] SCD1 negatively regulated autophagy through inactivation of the AMPK signaling pathway to increase the SMMC-7721 cell levels of CE and TAG, and to suppress cell apoptosis and promote cell growth for the development and progression of hepatoma carcinoma cells.

Subject words: SCD1; autophagy; AMPK; SMMC-7721 cell; lipid metabolism

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最

通讯作者: 沈 薇, 消化内科主任, 主任医师, 教授, 医学硕士; 重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆市渝中区临江路 74 号 (400010); E-mail: shenwei315@126.com

收稿日期: 2017-01-23; **修回日期:** 2017-03-25

常见的肝细胞原发性恶性肿瘤, 占原发性肝癌的 90%, 是目前世界范围内癌症相关死亡的第三大原因^[1]。因此, 进一步理解 HCC 的生长和进展机制对寻找 HCC 的有效治疗方法至关重要。近期研究表明, 脂肪合成

代谢,特别是增加的脂肪从头合成代谢,在癌症发生发展中起重要作用,认为脂肪生成代谢通路可作为癌症治疗的理想靶点^[2,3]。硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)也称脂肪酰辅酶A Δ -9去饱和酶,是脂肪酸从头合成的关键酶,其催化饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA)转化生成单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA)^[4]。研究表明,SCD1在人类和啮齿动物肿瘤细胞生长和恶性转化过程中扮演重要角色^[5]。我们的研究发现,抑制SCD1诱导了HepG2细胞凋亡和自噬,促进了细胞死亡,是通过激活AMPK信号途径来实现的^[6],在另一个肝癌细胞株SMMC-7721是否会得到类似的结果,是否SCD1的抑制通过影响脂肪代谢来抑制肿瘤细胞的生长?本研究在SMMC-7721细胞中探讨SCD1对细胞脂质代谢的影响及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞

人类HCC细胞株(SMMC-7721)细胞由重庆医科大学生命科学研究院实验中心馈赠。RPMI1640/DMEM(高糖)培养基购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司;甘油三酯(TG)和胆固醇(CE)测定试剂盒购自北京普利莱(APPLYGEN)基因技术有限公司;全蛋白提取试剂盒、MTT细胞增殖试剂盒和Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒购自南京凯基生物有限公司;CAY-10566(SCD1抑制剂)购自美国Cayman公司;Compound C(AMPK抑制剂)购自德国Merck公司;氯喹(自噬抑制剂)购自美国Sigma公司。

1.2 细胞培养与分组

用含10%胎牛血清DMEM高糖培养基培养SMMC-7721细胞,并置于37℃含5% CO₂细胞培养箱中进行孵育。倒置显微镜下观察细胞生长情况,每隔1~2d更换培养液。待细胞生长状态达85%~90%左右,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,根据实验要求进行传代、冻存或处理细胞。细胞分为4组(对照组、CAY-10566 10 μmol/L处理组、CAY-10566 10 μmol/L联合Compound C 10 μmol/L共同处理组和CAY-10566 10 μmol/L联合氯喹 10 μmol/L共同处理组)。

1.3 MTT法检测细胞活力

以 5×10^3 /ml的细胞浓度分别将SMMC-7721细胞接种到96孔板上;细胞贴壁后,每孔更换200 μl培养基,根据实验需要处理4组细胞;每孔加入MTT(5mg/ml)20 μl,继续培养4h;小心吸去培养基,每孔加入DMSO 150 μl,置于摇床上低速震荡10min,充分溶解结晶物;在设定为490nm波长的酶标仪上检测每孔的OD值,重复3次实验;计算各组的OD平均值以及细胞生长抑制率。

1.4 Annexin V-FITC/PI流式细胞术检测细胞凋亡率

用适量不含EDTA 0.25%胰酶消化 $1 \sim 5 \times 10^5$ /ml的各組细胞,分别装入离心管,以800rpm离心5min,然后收集细胞,PBS洗2次;分别加入500 μl的Binding Buffer到各离心管中悬浮细胞;在悬浮细胞中加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI,室温下避光染色15min;将获取至少 1×10^5 个以上细胞放置在488nm波长激发光的流式细胞仪上检测,实验重复3次;用累积曲线分割方法计算各期细胞所占比例。

1.5 透射电子显微镜观察自噬小体

细胞培养量需达到 10^6 以上;培养的细胞用0.1%胰酶消化细胞;收集细胞沉淀,用PBS悬浮细胞,当细胞液体量大于1.5ml时,先将细胞液装入10ml离心管,以800rpm离心5min,吸去上清液,保留1.5ml细胞液体,再将细胞团块吹散;将1.5ml细胞液装入1.5ml EP管中,1200 rpm,离心10min,弃上清液;固定:沿管壁加入2.5%戊二醛固定液,切勿破坏细胞团块,预固定2h,PBS洗3次,每次15min;1%锇酸后固定2h,PBS洗3次,每次15min;脱水:分别浸入到50%、70%和90%乙醇中各15min,再浸泡到1:1 90%乙醇与90%丙酮及90%丙酮各15min,以上均在4℃条件下操作,最后在室温条件下浸泡到100%丙酮共3次,每次15min;包埋:分别以纯丙酮与包埋液按2:1比例,室温3~4h;纯丙酮与包埋液按1:2比例,室温过夜;纯包埋液37℃ 2~3h三步包埋;固化:分别放入37℃、45℃和60℃烘箱内过夜、12h和24h;切片:超薄切片机制备50nm超薄切片;染色:3%醋酸铀-枸橼酸铅电子双染色;观察:透射电子显微镜观察自噬小体,照相。

1.6 细胞胆固醇(CE)和甘油三酯(TAG)测定

CE和TAG按照试剂盒操作说明测定。计算CE浓度:CE浓度(μmol/μg)=[(样品OD值-空白OD值)/

(标准品 OD 值-空白 OD 值) $\times 5.17$]/样品蛋白浓度; 计算 TAG 浓度: TAG 浓度($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$)=[(样品 OD 值-空白 OD 值)/(标准品 OD 值-空白 OD 值) $\times 2.26$]/样品蛋白浓度; 计算得到的实验组 CE 和 TAG 绝对浓度与对照组绝对浓度相比获得相对浓度比值。

1.7 统计学处理

统计学分析采用 SPSS 17.0 统计软件。采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量资料, t 检验用于两个样本均数的比较。采用率表示分类变量资料, χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法用于两个样本率的比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCD1 通过 AMPK 通路对 SMMC-7721 细胞自噬的影响

通过电子显微镜观察发现, CAY 处理的 SMMC-7721 细胞其自噬体明显增加, 相反地, CAY 和 Compound C 或自噬抑制剂氯喹共同处理的上述细胞其自噬体明显减少 (Figure 1)。

2.2 SCD1 通过 AMPK 依赖的自噬途径对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

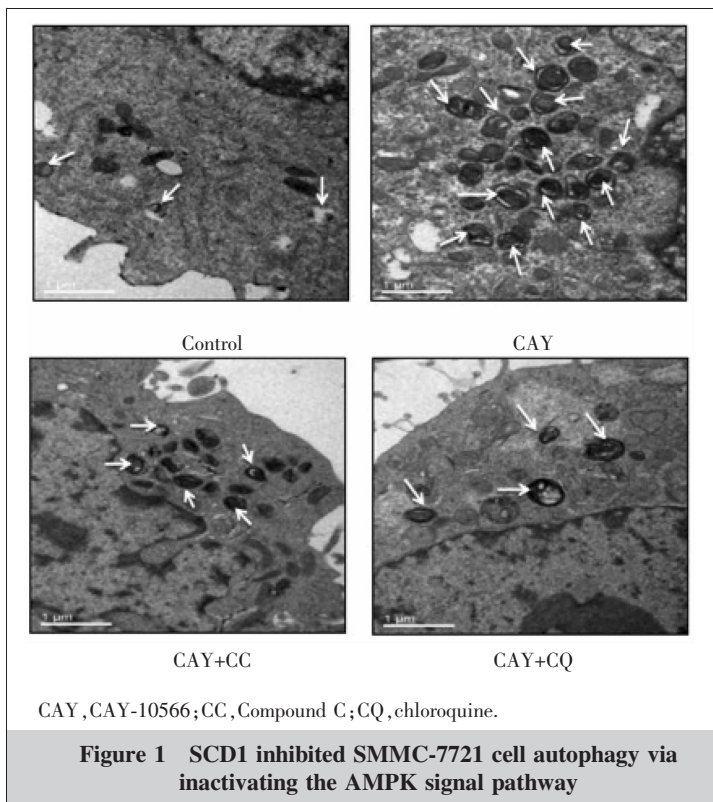
MTT 分析结果提示: CAY 处理的 SMMC-7721 细胞其细胞增殖能力明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 CAY 和 Compound C 共同处理的上述细胞其细胞增殖能力均得到明显的恢复, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), CAY 和氯喹共同处理上述细胞也得到相似的结果, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 2)。

2.3 SCD1 通过 AMPK 依赖的自噬途径对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测表明, 对照组、CAY 处理组、CAY 和 Compound C 共同处理组、CAY 和氯喹共同处理组的细胞凋亡率分别为: $7.49\%\pm 0.48\%$ 、 $2.89\%\pm 0.63\%$ 、 $12.99\%\pm 0.57\%$ 和 $16.05\%\pm 0.41\%$; 与对照组相比, CAY 处理组的 SMMC-7721 细胞其细胞凋亡明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 相反地, 与 CAY 处理组相比, CAY 和 Compound C 或氯喹共同处理的上述细胞其细胞凋亡被明显抑制, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 3)。

2.4 SCD1 通过 AMPK 依赖的自噬途径对 SMMC-7721 细胞 CE 和 TAG 代谢的影响

实验发现: CAY 处理的 SMMC-7721 细胞其 CE 和 TAG 水平明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 而 CAY 和 Compound C 共同处理的上述细胞其 CE 和 TAG 水平均明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), CAY 和氯喹共同处理后也得到相似的结果, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (见 Table 1, Figure 4)。



CAY, CAY-10566; CC, Compound C; CQ, chloroquine.

Figure 1 SCD1 inhibited SMMC-7721 cell autophagy via inactivating the AMPK signal pathway

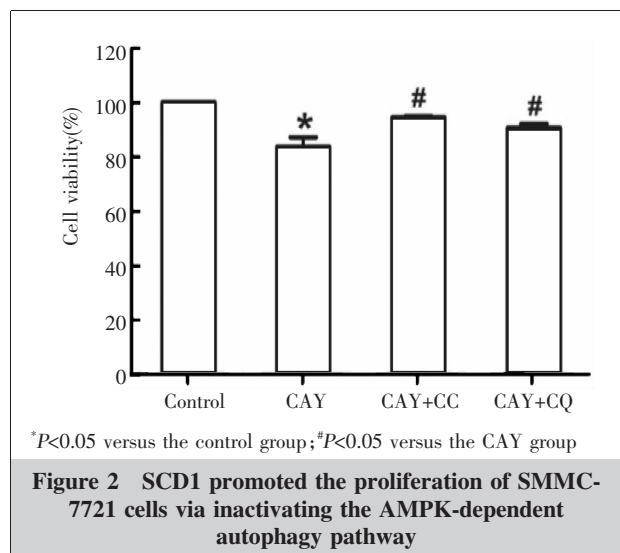


Figure 2 SCD1 promoted the proliferation of SMMC-7721 cells via inactivating the AMPK-dependent autophagy pathway

3 讨论

肿瘤细胞为了增殖和生存，通常激活多种脂质生物合成反应而抑制分解代谢通路如 β -氧化^[2]。功

能上相对的 Akt/mTOR 和 AMPK 通路共同控制脂类代谢,细胞增殖、生存和致癌性转化^[7-11]。已经证明脂肪酸从头合成的关键修饰酶 SCD1 正向调节 Akt/mTOR 通路和负向调节 AMPK 通路^[5]。研究表明，

Akt/mTOR 和 AMPK 信号通路是调节细胞自噬的经典途径,两条信号通路对自噬的作用相反: Akt/mTOR 抑制或负性调节细胞自噬,而 AMPK 诱导或正性调节细胞自噬^[12-16]。这两条信号通路介导的自噬与一些肿瘤的发生及进展相关,调节相关信号通路抑制或诱导细胞自噬可在抗肿瘤治疗中发挥重要作用。有关上述两条信号通路调节的自噬在 HCC 中的作用不一: Akt/mTOR 途径抑制自噬促进 HCC 细胞增殖和生存,下调 Akt/mTOR 通路诱导细胞自噬^[17-19]; AMPK 途径诱导自噬抑制 HCC 细胞增殖与生存,上调 AMPK 通路诱导细胞自噬^[18,20,21]。然而,有研究发现,自噬有利于 HCC 细胞的生存,并不依赖 Akt/mTOR 途径,抑制自噬减少了细胞活力,诱导了细胞凋亡^[22]。自噬在 HCC 中的作用可能具有两面性。自噬到底是促进 HCC 的生存还是抑制 HCC 的生存,可能受多种因素的影响,比如引起 HCC 的原因, HCC 生长的环境、状态、肿瘤大小,自噬发生的阶段,抑制或诱导自噬的因素以及外在的其他干预因素等,在 HCC 生长的不同阶段自噬的作用可能也不尽相同。这些问题有必要深入探讨。

在我们研究中,发现 SCD1 与自噬在 HCC 中可能存在负相关性,细胞实验证实了 SCD1 的确参与了 HCC 细胞自噬的负性调节,抑制 SCD1 可诱导 HCC 细胞 AMPK 途径的激活,同时可诱导细胞自噬,抑制细胞生长,药物性抑制 AMPK 途径相应地细胞自噬活性下降,减少细胞凋亡。提示 SCD1 负性调节 HCC 细胞自噬诱导细胞部分凋亡是通过失活 AMPK 信号途径来实现的^[6]。

抑制 SCD1 可通过 AMPK 诱导的自噬途径导致细胞死亡的原因仍不清楚。已有研究表明,抑制 SCD1 通过磷酸化激活 AMPK 通路减少脂肪合成和/或增加脂肪酸氧化^[23]。

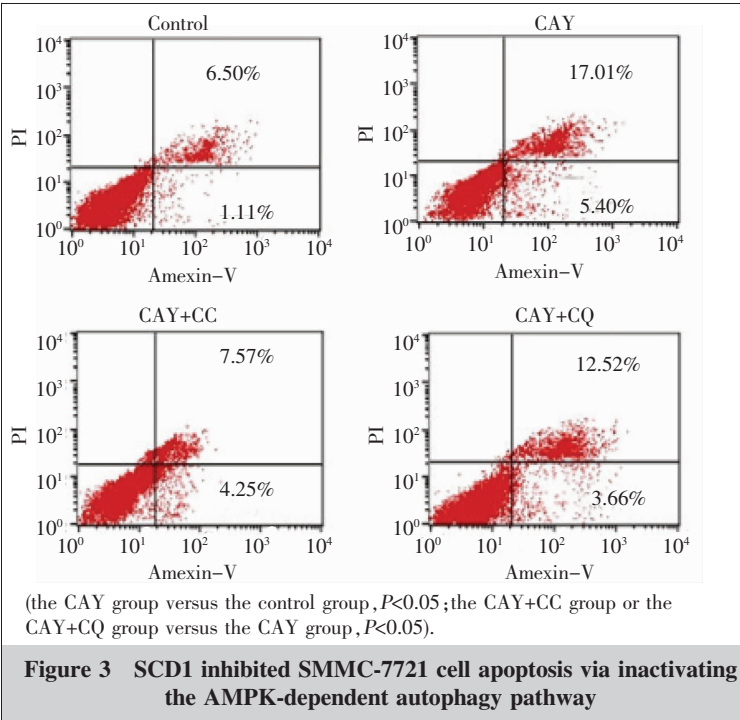
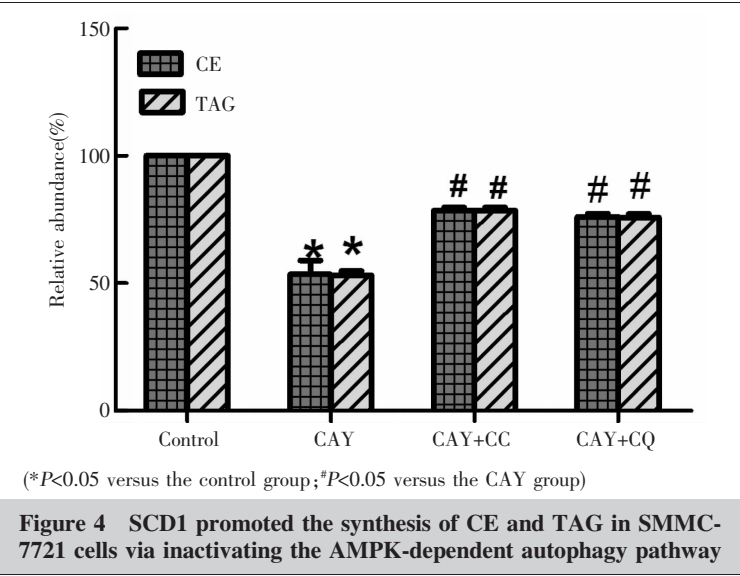


Table 1 The levels of cholesterol and triglyceride in different treatment group in SMMC-7721 cells

Index	Control	CAY	CAY+CC	CAY+CQ
CE($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$)	54.33 $\pm$ 6.66	28.67 $\pm$ 2.89 [*]	42.67 $\pm$ 5.69 [#]	41.33 $\pm$ 5.13 [#]
TAG($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$)	39.00 $\pm$ 5.57	20.67 $\pm$ 2.89 [*]	30.67 $\pm$ 4.73 [#]	30.00 $\pm$ 4.58 [#]

Note: ^{*} $P<0.05$ versus the control group; [#] $P<0.05$ versus the CAY group



是否抑制 SCD1 可通过 AMPK 诱导的自噬途径影响脂质代谢导致细胞死亡?本实验证实了这一问题。本研究发现 HCC 细胞株(SMMC-7721)中 TAG 和 CE 水平明显增加。抑制脂肪酸从头合成的关键酶 SCD1, 导致 SMMC-7721 细胞中 TAG 和 CE 水平明显减少。进一步实验发现, AMPK 信号通路介导的自噬参与了抑制 SCD1 导致 TAG 和 CE 的代谢异常。由此推测, SCD1 促进 HCC 的形成和进展是通过下调 AMPK 信号通路抑制细胞自噬来影响脂肪代谢, 从而促进细胞生长和抑制细胞凋亡。

在 HCC 细胞中, SCD1 受上游两个转录因子的调节, 即 LXR α 和 SREBP-1。激活 LXR α 上调 SREBP-1 的表达, 增加 SCD1 蛋白表达水平; 相反, 抑制 LXR α 减少 SREBP-1 和 SCD1 蛋白表达水平^[24]。是否该转录因子是 SCD1 途径通过 AMPK 依赖的自噬来控制肿瘤细胞脂肪代谢的分子连接, 有待继续探讨。

参考文献:

- [1] Fares N, P  ron JM. Epidemiology, natural history, and risk factors of hepatocellular carcinoma [J]. *Rev Prat*, 2013, 63(2):216-217, 220-222.
- [2] Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(10):763-777.
- [3] Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy [J]. *Br J cancer*, 2009, 100(9):1369-1372.
- [4] Ntambi JM, Miyazaki M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1 [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14(3):255-261.
- [5] Igal RA. Stearoyl-CoA desaturase-1: a novel key player in the mechanisms of cell proliferation, programmed cell death and transformation to cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(9):1509-1515.
- [6] Huang GM, Jiang QH, Cai C, et al. SCD1 negatively regulates autophagy-induced cell death in human hepatocellular carcinoma through inactivation of the AMPK signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(2):180-190.
- [7] Palian BM, Rohira AD, Johnson SA, et al. Maf1 is a novel target of PTEN and PI3K signaling that negatively regulates oncogenesis and lipid metabolism [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12):e1004789.
- [8] Ray S, Murmu N, Adhikari J, et al. Inhibition of Hep G2 hepatic cancer cell growth and CCl₄ (4) induced liver cytotoxicity in Swiss albino mice by Mahua extract [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2014, 33(4):295-314.
- [9] Yellen P, Foster DA. Inhibition of fatty acid synthase induces pro-survival Akt and ERK signaling in K-Ras-driven cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 353(2):258-263.
- [10] Nambiar DK, Deep G, Singh RP, et al. Silibinin inhibits aberrant lipid metabolism, proliferation and emergence of androgen-independence in prostate cancer cells via primarily targeting the sterol response element binding protein 1 [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(20):10017-10033.
- [11] Zadra G, Photopoulos C, Tyekucheva S, et al. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(4):519-538.
- [12] Din FV, Valanciute A, Houde VP, et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7):1504-15. e3.
- [13] Shi WY, Xiao D, Wang L, et al. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3:e275.
- [14] Huang H, Kang R, Wang J, et al. Hepatitis C virus inhibits AKT-tuberous sclerosis complex (TSC), the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway, through endoplasmic reticulum stress to induce autophagy [J]. *Autophagy*, 2013, 9(2):175-195.
- [15] Kumar D, Shankar S, Srivastava RK. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(2):179-189.
- [16] Xie CM, Liu XY, Sham KW, et al. Silencing of EEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) reveals AMPK-ULK1-dependent autophagy in colon cancer cells [J]. *Autophagy*, 2014, 10(9):1495-1508.
- [17] Liu YL, Yang PM, Shun CT, et al. Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma [J]. *Autophagy*, 2010, 6(8):1057-1065.
- [18] Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, et al. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(7):1099-1111.
- [19] Zhang DM, Liu JS, Deng LJ, et al. Arenobufagin, a natural bufadienolide from toad venom, induces apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6):1331-1342.
- [20] Zhang H, Li N, Wu J, et al. Galangin inhibits proliferation of HepG2 cells by activating AMPK via increasing the AMP/TAN ratio in a LKB1-independent manner [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718(1-3):235-244.
- [21] Zhang H, Chen GG, Zhang Z, et al. Induction of autophagy in hepatocellular carcinoma cells by SB203580 requires activation of AMPK and DAPK but not p38 MAPK [J]. *Apoptosis*, 2012, 17(4):325-334.
- [22] Chang Y, Yan W, He X, et al. miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(1):177-87. e8.
- [23] Kim E, Lee JH, Ntambi JM, et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase1 activates AMPK and exhibits beneficial lipid metabolic effects in vitro [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(1-3):38-44.
- [24] Caputo M, De Rosa MC, Rescigno T, et al. Binding of polyunsaturated fatty acids to LXR α and modulation of SREBP-1 interaction with a specific SCD1 promoter element [J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(8):637-646.