

# 他莫昔芬对肝癌 HepG2 细胞脂质代谢的影响

李霞\*, 周望溪, 席美凤(湖南永州市中心医院北院药剂科, 湖南永州 425000)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)29-2715-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.29.11

**摘要** 目的:研究他莫昔芬对肝癌 HepG2 细胞脂质代谢的影响。方法:体外培养 HepG2 细胞, MTT 法检测 0.5、1、5、15、30  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬对 HepG2 细胞增殖的影响;油红 O 染色检测 0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬和 200  $\mu\text{mol/L}$  棕榈酸(阳性对照)对 HepG2 细胞内脂质沉积的影响;荧光定量聚合酶链式反应法检测 5  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬对 HepG2 细胞内脂肪酸(FA)合成酶(FAS)、固醇调节元件结合蛋白 1c (Srebp-1c)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的表达和 FA 氧化相关基因过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPAR- $\alpha$ )、解偶联蛋白 2(UCP-2)表达的影响;蛋白印迹法检测 5  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬对 HepG2 细胞内 ACC 蛋白表达及其磷酸化(P-ACC)水平的影响。以上检测结果均与空白对照组进行比较。结果:与空白对照组比较,0.5、1、5  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬对 HepG2 细胞增殖无明显影响( $P>0.05$ ),15、30  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬能明显抑制 HepG2 细胞的增殖( $P<0.05$ );5  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬能明显增加细胞内脂质沉积,且与阳性对照相似,0.5、1  $\mu\text{mol/L}$  他莫昔芬对细胞内脂质沉积无明显影响( $P>0.05$ );细胞内 FAS mRNA 表达明显增强,P-ACC 水平明显降低( $P<0.05$ ),其余基因和蛋白表达无明显变化( $P>0.05$ )。结论:他莫昔芬能诱导 HepG2 细胞脂质沉积增加,可能与细胞内 P-ACC 水平降低、FAS mRNA 表达上调有关。

**关键词** 他莫昔芬;肝癌 HepG2 细胞;脂质沉积;脂肪酸合成

## Effects of Tamoxifen on Lipid Metabolism of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

LI Xia, ZHOU Wang-xi, XI Mei-feng (Dept. of Pharmacy, North Branch, Yongzhou Central Hospital of Hunan Province, Hunan Yongzhou 425000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of tamoxifen on lipid metabolism of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. METHODS: HepG2 cells were cultured *in vitro*. MTT assay was used to measure the effects of 0.5, 1, 5, 15 and 30  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen on the proliferation of HepG2 cells. The effects of 0.5, 1, 5  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen and 200  $\mu\text{mol/L}$  cetylic acid (positive control) on the lipid accumulation of HepG2 cells were detected by oil red O staining. Fluorescence quantitative PCR was applied to determine the effects of 5  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen on the expression of FAS, Srebp-1c and ACC in HepG2 cells and the expression of fatty acid oxidation related genes such as PPAR- $\alpha$  and UCP-2 were also determined. The effects of 5  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen on protein expression and the phosphorylation of ACC were examined with Western blotting assay. AU results above were compared with blank control group. RESULTS: Compared with blank control group, 0.5, 1 and 5  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen had no significant effects on the proliferation of HepG2 cells ( $P>0.05$ ), while 15 and 30  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen could inhibit the proliferation of HepG2 cells significantly ( $P<0.05$ ); 5  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen could increase lipid accumulation significantly, which was similar to positive control; 0.5 and 1  $\mu\text{mol/L}$  tamoxifen had no significant effect on it ( $P>0.05$ ). The expression of FAS mRNA was increased by tamoxifen treatment while the protein levels of P-ACC were decreased ( $P<0.05$ ). No change was found in other gene and protein expression ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: Tamoxifen can induce the lipid accumulation of HepG2 cells, which may be associated with the decrease of P-ACC level and the increase of FAS mRNA expression.

**KEY WORDS** Tamoxifen; Hepatocellular carcinoma HepG2 cells; Lipid accumulation; Fatty acid synthesis

作简便易行,各步原料价格低廉。

### 参考文献

- [1] 杨臻峰,孙大柠.抗精神病药 Lurasidone Hydrochloride[J]. 药学进展,2009,33(2):91.
- [2] 封宇飞.抗精神病新药鲁拉西酮的药理与临床研究进展[J].中国新药杂志,2011,20(10):853.
- [3] 曹运莉,朱珠.新型抗精神分裂症药物鲁拉西酮[J].药物流行病学杂志,2011,20(5):257.
- [4] 严寒,刘津爱,王明新,等.一种制备鲁拉西酮的方法:中国,102827157A[P].2012-12-19.
- [5] Goodridge RJ, Hambley TW, Ridley DD. Preparations and crystal structures of the 2-oxides of some octahydro-3,2,1-benzoxathiazines and octahydro-2h-3,1,2-benzoxaza-

phosphorines[J]. *Aust J Chem*, 1986,39(4):591.

- [6] William JB, Harold RG. Cyclic dienes I 1,2-dimethylencyclohexane[J]. *J Am Chem Soc*, 1953,75(19):4780.
- [7] Berkessel A, Glaubitz K, Lex J. Enantiomerically pure  $\beta$ -amino acids: a convenient access to both enantiomers of trans-2-aminocyclohexanecarboxylic acid[J]. *Eur J Org Chem*, 2002(17):2948.
- [8] 姜玲珠,张海军,郑淑亚.1R,2R-1,2-环己二甲酸合成工艺改进[J].大科技,2012(9):349.
- [9] Longeau A, Durand S, Spiegel A, et al. Synthesis of new  $C_2$ -symmetrical diphosphines using chiral zinc organometallics[J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997,8(7):987.
- [10] Muto M, Ikutaro S, Tanno N, et al. Imide derivatives, and their production and use: US, 5532372[P].1996-07-02.

(收稿日期:2013-02-26 修回日期:2013-05-12)

\* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0746-8334381。E-mail:leexial1976@163.com

他莫昔芬(Tamoxifen)是一种选择性雌激素受体调节剂,被广泛应用于治疗乳腺癌和妇科恶性肿瘤<sup>[1-3]</sup>。根据国内外研究<sup>[4-9]</sup>表明,43%的患者在使用他莫昔芬后两年内都会产生非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD),导致肝脏脂质沉积,并可能进一步发展为脂肪型肝炎和肝硬化。近年来关于他莫昔芬导致脂肪肝的体外分子机制研究报道较少。本研究拟通过建立他莫昔芬诱导肝细胞产生脂质沉积模型,探讨他莫昔芬对肝细胞脂质合成与代谢途径的影响,并进一步明确其导致肝细胞脂质沉积可能的分子机制,为选择和开发治疗乳腺癌和妇科肿瘤更加安全和有效的药物提供理论基础。

## 1 材料

CFX96TM 聚合酶链式反应(PCR)仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad公司);BX51 显微镜(日本 Olympus公司)。

他莫昔芬原料药(批号:T5648,纯度:≥99%)和棕榈酸原料药(批号:57-10-3,纯度:≥99%)均购自美国 Sigma-Aldrich公司;Trizol 试剂(美国 Invitrogen 生命技术公司,批号:15596026);乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)一抗及其磷酸化(P-ACC)一抗(美国 Abcam公司,批号:ab63531、ab31931);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗、MTT 试剂(中国碧云天生物技术研究所,批号:A0208、ST316);1640 培养基和胎牛血清(美国 Hyclone公司,批号:SH30809.01B、SV300087.02)。

人肝癌 HepG2 细胞,由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

将 HepG2 细胞复苏后接种于 50 ml 细胞培养瓶,用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养,置于 37 °C、CO<sub>2</sub> 孵育箱中,2 d 换液 1 次,传代至第 3 代时进行试验。

### 2.2 HepG2 细胞增殖检测

将 HepG2 细胞接种于 96 孔板,接种密度为每孔 6 000 个,分为 6 组,每组设 3 个复孔。空白对照组为不作处理的细胞,另外 5 组分别为用 0.5、1、5、15、30 μmol/L 他莫昔芬处理后的细胞。培养 48 h 后每孔加入 20 μl 的 MTT 试剂(5 mg/ml),继续培养 4 h 后吸弃培养基,每孔加入 150 μl 的二甲基亚砜,充分混匀后用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值。OD 值越大,则表明细胞增殖越明显。

### 2.3 HepG2 细胞脂质沉积检测

将 HepG2 细胞接种于爬片,分为空白对照组、阳性对照组(200 μmol/L 棕榈酸溶液<sup>[6]</sup>)和 0.5、1、5 μmol/L 他莫昔芬组,每组设 3 个复孔,分别加入相应药物处理细胞诱导脂质沉积。各组细胞培养 48 h 后吸弃培养基,4% 多聚甲醛固定 10 min,油红 O 染色 20 min,以质量比为 60% 的异丙醇分化,苏木素复染细胞核。400 倍显微镜下观察各组细胞脂质沉积情况,以细胞内红色脂滴明显增多表示脂质沉积明显。

### 2.4 HepG2 细胞内脂肪酸(FA)合成、氧化相关基因的表达检测

将 HepG2 细胞接种于 6 孔板,分为空白对照组和他莫昔芬(5 μmol/L)组,每组设 3 个复孔,加入相应药物处理细胞,培养 12 h 后,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 法检测细胞内 FA 合成酶(FAS)、固醇调节元件结合蛋白 1c(Srebp-1c)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的表达和 FA

氧化相关基因过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPAR-α)和解偶联蛋白 2(UCP-2)的表达。引物采用 Primer 5 软件设计, FAS 上游序列:5'-CGCTCGGCATGGCTACTCT-3',下游序列:5'-CTCGTTGAAGAACGCATCCA-3'; ACC 上游序列:5'-ATCCGCGGCTATATGAAAACA-3',下游序列:5'-TCGTAGTGGGCTTGCTGAAA-3'; Srebp-1c 上游序列:5'-CGGAACCATCTTGGAACA-3',下游序列:5'-GCCGGTTGATAGGCAGCTT-3'; PPAR-α 上游序列:5'-GGGCACCTGGAGG-TATCGT-3',下游序列 5'-GGGACCCTTATCAATCCTAAT-CATT-3'; UCP-2 上游序列:5'-CCATCTCCTGGGACGTAG-CA-3',下游序列:5'-GGCACATCTGTGGCCTTGA-3'。以他莫昔芬组各基因表达与空白对照组各基因表达的比值为指标。

### 2.5 HepG2 细胞内 ACC 和 P-ACC 蛋白表达检测

将 HepG2 细胞接种于 6 孔板,分为空白对照组和他莫昔芬(5 μmol/L)组,每组设 3 个复孔,加入相应药物处理细胞,培养 12 h 后,分别加入适量的蛋白裂解液于冰上裂解细胞提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。依次进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,加入 ACC 和 P-ACC 一抗 4 °C 孵育过夜,加入 HRP 标记山羊抗兔二抗孵育 1 h,化学发光、显影、定影,凝胶成像仪采集图像,结果采用 Quantity One 软件进行条带灰度值分析。

### 2.6 统计学分析

各组数据采用 GraphPad Prism 5 软件分析。各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,结果采用方差分析, $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 3 结果

### 3.1 HepG2 细胞增殖情况

与空白对照组比较,0.5、1、5 μmol/L 他莫昔芬对 HepG2 细胞增殖无明显影响( $P > 0.05$ ),15、30 μmol/L 他莫昔芬能明显抑制 HepG2 细胞的增殖( $P < 0.05$ )。各组 HepG2 细胞增殖情况比较见表 1。

表 1 各组 HepG2 细胞增殖情况比较( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Comparison of the proliferation of HepG2 cells of each group( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	OD 值
空白对照组	1.03 ± 0.04
0.5 μmol/L 他莫昔芬组	1.01 ± 0.05
1 μmol/L 他莫昔芬组	0.99 ± 0.08
5 μmol/L 他莫昔芬组	0.96 ± 0.09
15 μmol/L 他莫昔芬组	0.81 ± 0.02*
30 μmol/L 他莫昔芬组	0.67 ± 0.05*

与空白对照组比较:\* $P < 0.05$

vs. blank control group:\* $P < 0.05$

### 3.2 HepG2 细胞脂质沉积情况

空白对照组 HepG2 细胞未作任何处理,故细胞内无明显脂质沉积。与空白对照组比较,5 μmol/L 他莫昔芬组细胞内红色脂滴明显增多,表明出现脂质沉积,且与阳性对照组相似;而 0.5、1 μmol/L 他莫昔芬组细胞内脂质沉积不明显。各组 HepG2 细胞内脂质沉积显微镜图见图 1。

### 3.3 HepG2 细胞内 FA 合成、氧化相关基因的表达情况

与空白对照组(1.00 ± 0)比较,他莫昔芬组细胞内 FAS(1.37 ± 0.08) mRNA 表达明显增强( $P < 0.05$ ),ACC(1.02 ±

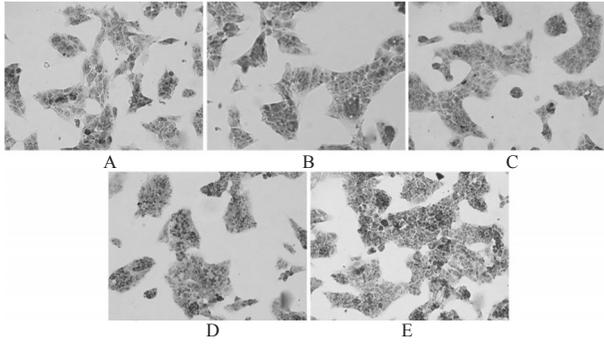


图1 各组HepG2细胞内脂质沉积显微镜图(×400)

A. 空白对照组; B. 0.5 μmol/L 他莫昔芬组; C. 1 μmol/L 他莫昔芬组; D. 5 μmol/L 他莫昔芬组; E. 阳性对照组

Fig 1 Microscopic images of lipid accumulation of HepG2 cells of each group(×400)

A. blank control group; B. 0.5 μmol/L tamoxifen group; C. 1 μmol/L tamoxifen group; D. 5 μmol/L tamoxifen group; E. positive control group

0.18)、Srebp-1c ( $0.94 \pm 0.07$ )、PPAR- $\alpha$  ( $0.93 \pm 0.06$ ) 和 UCP-2 ( $0.93 \pm 0.06$ ) mRNA 表达无明显变化。提示他莫昔芬可通过增加FA的合成来增加HepG2细胞内的脂质沉积,FA的氧化对减少HepG2细胞内的脂质沉积起着重要作用。

### 3.4 HepG2细胞内ACC和P-ACC蛋白表达情况

与空白对照组比较,他莫昔芬组细胞内ACC蛋白表达无明显变化( $P > 0.05$ ),P-ACC蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。两组HepG2细胞内ACC、P-ACC蛋白电泳图见图2,表达量比值比较见图3。

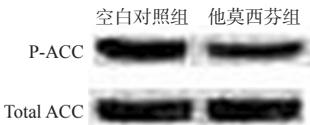


图2 两组HepG2细胞内ACC、P-ACC蛋白电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of ACC and P-ACC in HepG2 cells of 2 groups

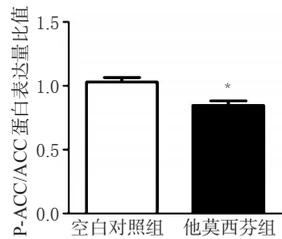


图3 两组HepG2细胞内ACC/P-ACC蛋白表达量比值比较与空白对照组比较: \* $P < 0.05$

Fig 3 Comparison of protein expression ratio of ACC to P-ACC in HepG2 cells of 2 groups vs. blank control group: \* $P < 0.05$

## 4 讨论

在NAFLD病理过程中,一般伴有肝细胞脂质代谢紊乱,富余脂质尤其是甘油三酯(TG)的沉积是NAFLD形成发展的先决条件<sup>[7]</sup>。在本试验中,空白对照组与他莫昔芬组均未给予外部FA刺激,5 μmol/L他莫昔芬组HepG2细胞内出现明显的脂质沉积,提示给予他莫昔芬刺激HepG2细胞后,细胞自身合成FA可能是增加的。因此本研究检测了ACC、FAS、Srebp-1c mRNA的表达水平,结果5 μmol/L他莫昔芬组细胞内FAS mRNA表达明显增强。FAS是合成FA的关键酶,位于细胞浆内,普遍表达于肝、肾、脑、肺等组织中,特别是肝脏组织<sup>[8]</sup>。

FAS在催化内源性长链FA合成过程中起着重要作用。ACC是FA重头合成的限速酶,其79位的丝氨酸去磷酸化能使ACC激活,导致FA合成增加<sup>[9-10]</sup>。因此本研究检测了ACC及P-ACC蛋白表达,根据结果表明5 μmol/L他莫昔芬组细胞内P-ACC蛋白表达明显降低。由此导致的肝脏自身合成FA增加可能是FA蓄积的原因之一。

此外,正常有效的FA氧化对减少HepG2细胞中的脂质沉积是必要的。FA代谢关键调控因子及其控制的关键酶,在FA氧化中都起重要作用,其表达和功能发生异常,也是造成FA代谢紊乱主要原因之一<sup>[11]</sup>。因此本研究检测了FA氧化相关基因PPAR- $\alpha$ 、UCP-2,结果空白对照组与5 μmol/L他莫昔芬组无统计学差异。

综上所述,本次研究首次通过体外细胞模型观察到他莫昔芬能够通过增加FA合成来导致HepG2细胞脂质沉积,抑制P-ACC水平是其可能的作用机制之一,为进一步明确其副作用机制和开发新药提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] Singh MN, Martin-Hirsch PL, Martin FL. The multiple applications of tamoxifen: an example pointing to SERM modulation being the aspirin of the 21st century[J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(9): RA144.
- [2] 陈燕妮,王俐,陆澄,等.某院2007—2009年乳腺癌内分泌治疗药利用评估[J]. *中国药房*, 2011, 22(18): 1659.
- [3] McGonigle KF, Smith DD, Marx HF, et al. Uterine effects of tamoxifen: a prospective study[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2): 814.
- [4] 闫永红,党欢,宋光辉,等.乳腺癌术后他莫昔芬治疗致脂肪肝[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(21): 2016.
- [5] Akhondi-Meybodi M, Mortazavy-Zadah MR, Hashemian Z, et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis in females treated with tamoxifen for breast cancer[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2011, 12(1): 34.
- [6] Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2007, 46(3): 823.
- [7] 汪春燕,郭传勇.非酒精性脂肪肝的研究新进展[J]. *保健医学研究与实践*, 2011, 8(1): 68.
- [8] 赵励彦,王莉莉,李松.脂肪酸合成酶抑制剂减肥作用机制的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(7): 780.
- [9] Viollet B, Guigas B, Leclerc J, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009, 196(1): 81.
- [10] 王光丽,周小辉,傅玉才.非酒精性脂肪性肝病和固醇调节元件结合蛋白1c[J]. *肝脏*, 2008, 13(3): 257.
- [11] 秦艳,张晾,潘杰.高脂饮食对非酒精性脂肪肝病影响机制研究进展[J]. *实用肝病杂志*, 2010, 13(1): 72.

(收稿日期:2012-09-27 修回日期:2012-11-20)