

α - 硫辛酸对缺氧应激肝癌细胞线粒体呼吸率 和产能代谢的影响

黄勇超¹, 施冬云², 刘珊林², 刘志昕¹, 俞培忠², 沈新南²

(1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101;

2. 复旦大学上海医学院自由基调控与应用研究中心, 上海 200032)

摘要: 通过实验阐明抗氧化剂 α - 硫辛酸 (alpha-lipoic acid, α -LA) 对肝癌细胞内活性氧具清除作用, 并发现其对肝癌细胞和正常肝细胞增殖有不同作用影响。在缺氧条件下, 研究使用抗氧化剂干预对肝癌细胞和正常肝细胞缺氧耐受性、线粒体活性和产能代谢的影响及差异。以 SMMC-7721 人肝癌细胞和 L02 正常肝细胞作为研究对象, 在 α - 硫辛酸干预条件下检测细胞生长曲线和细胞内 ROS; 分别在单纯缺氧及加 α - 硫辛酸缺氧条件下, 检测细胞存活率、细胞内 ROS、细胞耗氧率、细胞生成 ATP 和癌基因 *c-myc* mRNA 的表达。实验结果说明: 缺氧情况下, 肝癌细胞通过增加糖酵解途径的产能方式诱导 ATP 能量代偿能力提高。使用抗氧化剂 α - 硫辛酸干预清除细胞内过剩 ROS, 能降低肝癌细胞线粒体呼吸率, 并能通过下调 *c-myc* 表达抑制肝癌细胞的增殖及降低其缺氧耐受性。

关键词: α - 硫辛酸; 缺氧; 糖酵解; 肝癌; 活性氧

中图分类号: R364.4

0 引言

癌细胞具有分化程度低、增殖迅速的特点, 故肿瘤组织能在短时间内迅速增大体积。当其生长到一定程度, 会对周围血管产生挤压导致血液循环紊乱, 瘤体周围组织微环境发生一系列改变: 细胞生长必须的氧气、营养物质 (如葡萄糖) 和其它营养素 (如生长因子等) 也将供应不足; 细胞代谢物得不到及时的转运, 酸类代谢物 (如乳酸等) 的堆积, 使组织周围处于较酸性的状态。缺血、缺氧及酸性条件下维持细胞的代谢活动也是肿瘤细胞生长的特点。70 多年前, Warburg 研究了多种人和动物肿瘤, 发现同正常组织相比, 肿瘤组织糖酵解速率明显增高, 由葡萄糖酵解产生的乳酸也明显增多, 这种现象称为 “Warburg effect”^[1]。Warburg 效应的发现, 意味着肿瘤细胞可能具有特有的代谢方式, 但其分子机制尚不清楚。

施冬云等^[2]的研究表明, 肿瘤细胞具有更高的糖酵解水平与缺氧过程释放的过剩活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 有关, 并通过缺氧诱导因子 *hif* 和 *pkb* 等基因, 调节了糖酵解途径中的关键酶 (乳酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶) 的基因表达和酶活水平, 提示这可能是 Warburg 效应和肿瘤细胞能耐受缺氧的机制之一。Valera 等^[3]报道原癌基因 *c-myc* 也参与了细胞糖酵

解的调控, 作用机制与 *c-myc* 的过度表达诱导了葡萄糖激酶和丙酮酸激酶的高表达, 从而提高了酶活性有关。*c-myc* 也参与了乳酸脱氢酶 A 亚基靶序列的表达调控, MYC 在 G1 期的高表达也诱导 LDH-A 表达增加, 使糖酵解更加活跃^[4]。

α - 硫辛酸 (alpha-lipoic acid, α -LA) 不仅是丙酮酸脱氢酶复合物的辅酶之一, 参与三羧酸循环中丙酮酸的氧化脱羧反应, 而且是一种强抗氧化剂。 α -LA 在生物体内可以转化为还原型的二氢硫辛酸 (DHLA), α -LA 和 DHLA 能有效地清除多种自由基^[5]。近几年越来越多的研究涉及抗氧化剂用于肿瘤预防 and 治疗的分子生物学和药理学机制^[6,7], α - 硫辛酸作为强抗氧化剂, 也是潜在的抗癌药物之一^[8]。

本研究拟以 SMMC-7721 人肝癌细胞和 L02 正常人肝细胞作为研究对象, 在缺氧应激条件下使用抗氧化剂 α -LA 进行干预, 研究分析两种细胞株生长的应激状态、线粒体活性和产能代谢上的差异。

收稿日期: 2007-04-17

基金项目: 国家自然科学基金重点和面上项目
(30130100, 30470422)

通讯作者: 刘珊林, 电话: (021)54237897,

E-mail: slliu826@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料

SMMC-7721 人肝癌细胞系, 由上海第二军医大学病理解剖教研室建株, 购自中科院生物化学与细胞生物研究所; L02 正常人肝细胞系, 由复旦大学上海中山医院肝病研究所馈赠。 α -硫辛酸 (30 g/L) 由上海现代制药厂提供, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 小牛血清为上海实生生物技术公司产品; N_2 、 CO_2 由上海比欧西气体公司提供; 2',7'-二氯化荧光素二酯 (DCFH-DA) 购自 Calbiochem 公司 (San Diego, CA), ATP 检测试剂盒为上海植物生理研究所提供; 生物化学发光测量仪为上海市检测技术所检测仪器厂产品, 荧光分光光度计为日立公司产品, 氧电极为 Hansateth Oxytherm Electrode Unit, 酶联免疫检测仪为 BIO-TEK 产品。

1.2 细胞培养

培养液为 RPMI-1640 添加 10% 小牛血清, 0.25% 胰蛋白酶消化, 将细胞吹打成单细胞悬液分装至新瓶传代培养。

1.3 细胞缺氧模型

取 RPMI-1640 无血清培养液, 超声波仪超声 30 min, 而后保持 1 l/min 的流速通入 N_2 30 min, 加入 10% 小牛血清, 干预组加入 α -LA (终浓度 5.0 mmol/L), 对照组加入相应体积 ddH₂O, 再保持 1 l/min 的流速通入 N_2 10 min, 即为低氧培养液 (氧电极检测低氧培养液含氧量为饱和氧的 88.0%)。分装接种细胞 5×10^5 于培养瓶中, 待细胞贴壁后 (12 h), 弃上清培养液, 置入特制培养容器中, 按组别分别注入上述低氧培养液, 并在 37°C 和饱和湿度条件下继续培养。

1.4 MTT 法测细胞生长曲线

取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化做成细胞悬液, 以 1×10^4 的浓度接种至 96 孔板, 每孔接种 200 μ l, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度 α -LA 进行干预, 对照组加入相应体积 ddH₂O, 置孵箱 37°C、5% CO_2 、饱和湿度条件下继续培养。培养至一定时间后, 每孔加入 MTT (5 g/L) 20 μ l, 继续孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 DMSO 150 μ l, 振荡 10 min 后, 以酶标仪 490 nm 波长检测吸光度。以时间为横坐标、吸光度 (减去空白对照) 为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.5 细胞存活率

在不同的缺氧培养时间段, 离心收集培养液中细胞和贴壁细胞 (贴壁细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化), 做成细胞悬液, 用 0.2% 台盼蓝染色进行细胞计数, 并计算细胞存活率: 细胞存活率 = 活细胞数 / 细胞总数。

1.6 氧电极检测耗氧量

接种细胞 5×10^5 于培养瓶中, 待细胞贴壁后 (12 h), 按细胞缺氧模型进行缺氧培养, 在不同的培养时间, 分别用针筒抽取培养上清液并封口, 氧电极检测培养液中的含氧量, 以低氧培养液含氧量为空白对照计算不同时间的耗氧率: 耗氧率 = 总耗氧量 / (接种细胞浓度 \times 培养时间)

1.7 生物化学发光法检测 ATP

以 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, PBS 缓冲液吹打均匀收集, 并细胞计数。离心收集细胞, 弃上清后加入 1.0 ml Tris-HCl 缓冲液 (20 mmol/L, pH 7.8), 振荡混匀。沸水浴 15 min, 冷却后离心 (12 000 r/min) 5 min, 取上清液按 ATP 检测试剂盒说明用生物化学发光测量仪检测。用标准 ATP 溶液作标准曲线进行定量。

1.8 荧光分光光度法检测细胞内 ROS

细胞内 ROS 水平按 Jakubowski 等^[9]建立的方法检测。细胞缺氧或干预至特定时间后终止培养, 弃去上清培养液, 加入胰蛋白酶消化、离心收集细胞, 弃去上清液并以 2 ml PBS 缓冲液将细胞制成细胞悬液, 细胞计数后, 加入 DCFH-DA 荧光探针 (终浓度为 10 μ mol/L), 37°C 避光反应 30 min 后, 以 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次, 最后用 2 ml PBS 缓冲液重悬细胞, 移入比色皿, 用荧光检测仪检测荧光强度 (激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。细胞内 ROS 相对水平计算: 细胞内 ROS 水平 = 荧光强度 / 细胞数。

1.9 RT-PCR 测定 *c-myc* 基因表达

细胞总 RNA 的提取: 弃去培养液, 按 TRI-ZOL 试剂说明书, 提取总 RNA, 经紫外分光光度计检测纯度, A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 并根据 A_{260} 值计算样品总 RNA 浓度。RT-PCR: 分别取各组细胞 2 μ g 总 RNA 进行逆转录反应, 然后分别取 2 μ l 逆转录反应产物与各对引物进行 PCR。*c-myc* 基因上游引物为: 5'-TACCCTCTCAACGACAGCAG-3', 下游引物为: 5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTG-3', 扩增产物长度为 477 bp; 内参 β -actin 上游引物为: 5'-ACCTTCAACAACCCAGC-

CATGTACG-3', 下游引物为: 5'-CTGATCCACAT-CTGCTGGAGGGTGG-3', 扩增产物长度为 703 bp。PCR 条件: 94°C 变性 1 min; 退火 1 min (β -actin, 62°C; *c-myc*, 57°C); 72°C 延伸 1 min; 30 个循环, 最后 72°C 10 min 结束反应。

RT-PCR 产物的检测和分析: 取 RT-PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 GDS 凝胶成像系统拍摄实验结果, 电泳条带用 BandScan5.0 软件进行灰度分析。

2 结 果

2.1 α -LA 干预对细胞增殖的影响

从图 1 可以看到, 与对照组相比, 浓度为 1.0 mmol/L 的 α -LA 对 SMMC-7721 肝癌细胞的生长无明显影响; 浓度为 2.5 mmol/L 的 α -LA 对 SMMC-7721 肝癌细胞的生长有抑制作用, 48 h 抑制率为 13.9%, 72 h 抑制率为 29.0%, 96 h 抑制率为 36.3%; 浓度为 5.0 mmol/L 的 α -LA 对 SMMC-7721 细胞的生长表现出很强的抑制作用, 细胞无明显增殖。

与对照组相比, 浓度为 1.0 mmol/L 的 α -LA 对 L02 正常肝细胞略有促进生长作用, 48 h 促进率最高为 25.3%; 2.5 mmol/L 的 α -LA 对 L02 正常肝细胞生长无明显影响; 5.0 mmol/L 的 α -LA 则对 L02 正常肝细胞生长略有抑制作用, 但是并未影响细胞继续增殖。这也说明正常细胞与癌细胞对自由基的敏感程度不同, 5.0 mmol/L 的 α -LA 对 SMMC-7721 肝癌细胞有很强的抑制作用, 也证明肝癌细胞生长对自由基具依赖性的论点^[10], L02 作为体外培养的细胞, 因也是有一定转化倾向的细胞株, 故高浓度的抗氧化剂对其生长也有一些影响, 但相对较小。

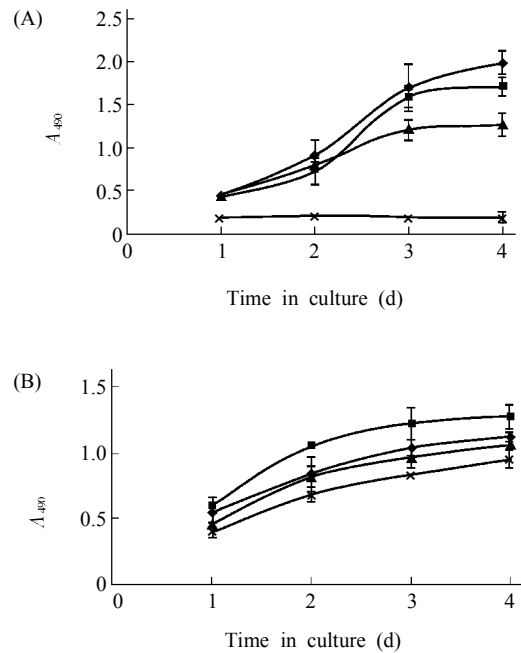


Fig.1 Effect of α -LA on cell proliferation. Cells were treated with 1.0, 2.5 and 5.0 mmol/L α -LA. Data are present as mean \pm SD of three experiments, $P < 0.05$. (A) Growth curves of SMMC-7721 cell; (B) Growth curves of L02 cell. —◆—: control; —■—: α -LA (1.0 mmol/L); —▲—: α -LA (2.5 mmol/L); —×—: α -LA (5.0 mmol/L)

2.2 α -LA 对 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞内 ROS 的清除作用

以浓度为 5.0 mol/L 的 α -LA 对培养的 SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞进行不同时间的干预, 然后以荧光分光光度法对细胞内 ROS 进行检测。结果显示 (表 1), SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞内产生的 ROS 水平随干预时间延长而变化, 0~12 h 时间段减少幅度最大, 18 h 后趋于平缓。

Table 1 Effect of α -LA on scavenging ROS in cells

Time	Intracellular ROS Level (fluorescence intensity/ 10^4 cells)	
	SMMC-7721	L02
Control	2.871 \pm 0.414	1.326 \pm 0.104
6 h	2.073 \pm 0.347 *	1.202 \pm 0.102 *
12 h	1.687 \pm 0.330 *	0.922 \pm 0.020 *
18 h	1.521 \pm 0.290 *	0.917 \pm 0.058 *

Cells were treated with 5.0 mmol/L α -LA. At different times, cells were harvested and detected for ROS. Data are present as mean \pm SD of three experiments. * $P < 0.05$ compared to control cells

2.3 α -LA 干预对缺氧应激细胞内 ROS 的影响

从图 2 可以看到，单纯缺氧条件下，SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞内 ROS 水平不断增加，其中 SMMC-7721 肝癌细胞缺氧 24 h ROS 水平是 0 h 的 2.1 倍，缺氧 36 h ROS 水平是 0 h 的 5.3 倍。

α -LA (5.0 mmol/L) 干预后，SMMC-7721 肝癌细胞缺氧培养条件下细胞内 ROS 水平有不同程度下降 (与未干预组相比)，12 h 细胞内 ROS 水平下降了 37.6% (与未干预组 12 h 相比)，24 h 细胞内 ROS 水平下降了 44.8% (与未干预组 24 h 相比)，36 h 细胞内 ROS 水平下降了 32.8% (与未干预组 36 h 相比)。而 L02 正常肝细胞与未干预组相比，细胞内 ROS 水平都有下降。

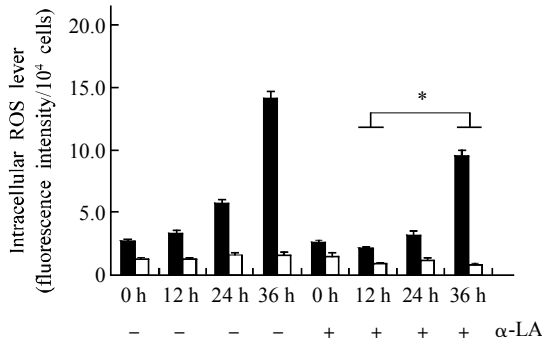


Fig.2 Effect of hypoxia on ROS in SMMC-7721 and L02 cells with or without α -LA. Cells were cultured under hypoxia condition, some cells were treated with 5.0 mmol/L α -LA when hypoxia. At different times after hypoxia, cells were harvested and detected for ROS. Data are present as mean \pm SD of three experiments, * P <0.05. ■: SMMC-7721; □: L02

2.4 α -LA 干预对缺氧应激细胞存活率的影响

在单纯缺氧条件下，与 0 h 组相比，SMMC-7721 肝癌细胞的存活率 12 h 减少了 23.9%，24 h 减少了 33.1%，36 h 减少了 54.7%。而 L02 正常肝细胞随缺氧时间延长相对下降幅度更大，36 h 减少了 77.5% (与 0 h 相比)。说明 SMMC-7721 肝癌细胞耐缺氧能力要强于 L02 正常肝细胞，缺氧 24~36 h，肝癌细胞存活率也明显高于 L02 正常肝细胞。

α -LA (5.0 mmol/L) 干预后，SMMC-7721 肝癌细胞随缺氧和干预时间延长，存活率也呈下降趋势，但下降幅度增加，与未干预组相同缺氧时段相比，12~36 h 分别下降了 19.3%、52.4%和 81.2%。而 L02 正常肝细胞与未干预组相同缺氧时段相比，

24 h 和 36 h 存活率都有了明显增加，分别增加了 18.9%和 91.3%。说明加入 α -LA 干预清除细胞内过剩 ROS，使 SMMC-7721 肝癌细胞的生长进一步受到抑制，而 L02 正常肝细胞因受 ROS 损伤减少，存活率相反明显增加 (图 3)。

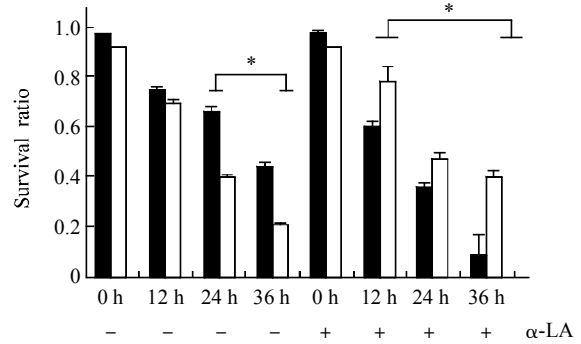


Fig.3 Effect of hypoxia on survival ratio of SMMC-7721 and L02 cells with or without α -LA. Cells were cultured under hypoxia condition, some cells were treated with 5.0 mmol/L α -LA when hypoxia. At different times after hypoxia, cells were harvested and counted for survival ratio. Data are present as mean \pm SD of three experiments, * P <0.05. ■: SMMC-7721; □: L02

2.5 α -LA 干预对缺氧应激细胞耗氧率的影响

耗氧率多少是体现细胞线粒体呼吸率高低的的主要指标之一。在缺氧培养的不同时段，分别收集上清培养液，并取 1.0 ml 以氧电极检测其中含氧量。以低氧培养液含氧量为空白对照并计算 12、24 和 36 h 不同时间段的耗氧率 (图 4)。

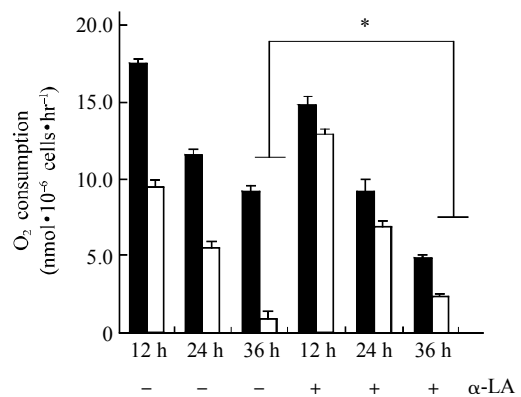


Fig.4 Effect of hypoxia on O₂ consumption of SMMC-7721 cells and L02 cells with or without α -LA. Cells were cultured under hypoxia condition, some cells were treated with 5.0mmol/L α -LA when hypoxia. At different times after hypoxia, medium were harvested and detected for O₂. Data are present as mean \pm SD of three experiments, * P <0.05. ■: SMMC-7721; □: L02

检测结果显示,在单纯缺氧条件下,相同缺氧培养时间段,SMMC-7721 肝癌细胞呼吸率明显高于 L02 正常肝细胞,说明 SMMC-7721 肝癌细胞在低氧分压情况下仍能保持较高的线粒体呼吸率。

加入 α -LA (5.0 mmol/L) 干预后,与未干预组相同缺氧时段相比,SMMC-7721 肝癌细胞耗氧率有不同程度减少,12 h 减少了 15.5%,24 h 减少了 19.6%,36 h 减少了 47.7%。而 L02 正常肝细胞干预组与未干预组相同缺氧时段相比,耗氧率有不同程度增加,其中 36 h 耗氧率增加了 1.3 倍(与未干预组 36 h 相比)。说明 α -LA 干预降低了低氧分压状态下 SMMC-7721 肝癌细胞的 ROS 水平,抑制细胞增殖,从而使线粒体的呼吸率也下降,而 L02 正常肝细胞相反。表明 α -LA 对正常肝细胞线粒体缺氧损伤有一定保护作用。

2.6 α -LA 干预对缺氧应激细胞产生 ATP 的影响

ATP 产生量能直接反映细胞产能代谢水平,在缺氧培养不同时间段,分别收集贴壁细胞,并提取 ATP,用生物化学发光法进行检测。结果见图 5。

检测结果显示,SMMC-7721 肝癌细胞在缺氧应激时,24 h 产生 ATP 大幅增加,是 0 h 的 2 倍;36 h ATP 含量迅速减少。而 L02 正常肝细胞随缺氧时间延长,ATP 呈逐渐减少。

加入 α -LA (5.0 mmol/L) 干预,SMMC-7721 肝癌细胞在 12 h ATP 含量最高,是 0 h 的 2 倍,24 h ATP 含量下降至接近 0 h 水平。L02 正常肝细

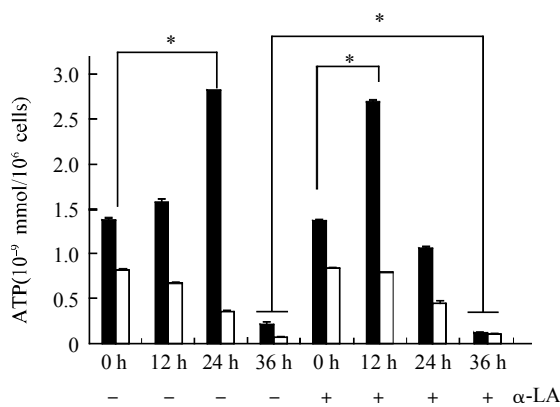


Fig.5 Effect of hypoxia on ATP product in SMMC-7721 and L02 cells with or without α -LA. Cells were cultured under hypoxia condition, some cells were treated with 5.0 mmol/L α -LA when hypoxia. At different times after hypoxia, cells were harvested and detected for ATP. Data are present as mean \pm SD of three experiments, * P <0.05. ■: SMMC-7721; □: L02

胞在 α -LA 干预后,与未干预组相同培养时间段比较,ATP 产生量有所增加,36 h 是未干预组 36 h 的 1.8 倍,与存活率有较好的对应性。

2.7 α -LA 干预对缺氧应激 SMMC-7721 和 L02 细胞 *c-myc* mRNA 基因表达的影响

如图 6 所示,在没有缺氧条件下,SMMC-7721 肝癌细胞癌基因 *c-myc* mRNA 表达明显高于 L02 正常肝细胞。缺氧 12 h,SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞 *c-myc* mRNA 表达都明显增加(与各自对照组相比)。而在缺氧并加入 5.0 mmol/L α -LA 干预下,SMMC-7721 肝癌细胞和 L02 正常肝细胞 *c-myc* mRNA 表达都降低至接近对照组相同水平。说明缺氧应激产生的过剩 ROS 可以通过抗氧化剂干预对 *c-myc* 的表达进行调节。

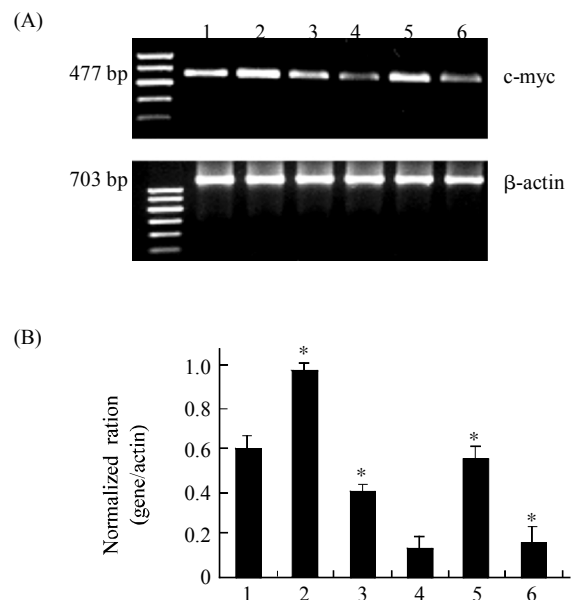


Fig.6 Effect of hypoxia on *c-myc* gene expression in SMMC-7721 and L02 cells with or without α -LA. Cells were cultured under hypoxia condition for 12 h, some cells were treated with 5.0mmol/L α -LA when hypoxia. (A) RT-PCR was performed for quantification of *c-myc* expression; (B) The ratio of *c-myc* to β -actin. Data are present as mean \pm SD of three experiments, * P <0.05 compared to control cells. 1: SMMC-7721 control; 2: SMMC-7721 hypoxia 12h; 3: SMMC-7721 hypoxia+ α -LA (5.0 mmol/L) 12 h; 4: L02 control; 5: L02 hypoxia 12 h; 6: L02 hypoxia+ α -LA (5.0 mmol/L) 12 h

3 讨 论

越来越多的研究发现,肿瘤细胞的生长、增殖和转移等生物学行为与 ROS 有关^[11,12]。ROS 作为肿瘤细胞生长信号通路的第二信使,也参与肝癌细胞缺氧信号通路的调控^[13]。

本实验结果表明, SMMC-7721 肝癌细胞比 L02 正常肝细胞确具有更强的缺氧耐受性,体现在: 1) 低氧分压条件下, SMMC-7721 肝癌细胞仍能保持较高线粒体呼吸率,可有效利用 O₂; 2) 在缺氧应激条件下 ATP 生成可代偿性增加,使细胞存活率维持在较高水平。加入抗氧化剂 α -LA 干预后, SMMC-7721 肝癌细胞线粒体活性明显受到影响,耗氧率减少,ATP 能量代谢也受影响,单纯缺氧 24 h 时产生 ATP 最多,为对照组的 2 倍;加入抗氧化剂 α -LA 干预后 12 h 产生 ATP 也达到对照组的 2 倍。说明因 α -LA 对 ROS 的清除,使 SMMC-7721 细胞缺氧应激状态提前。表明缺氧应激产生的 ROS 也可诱导癌细胞 ATP 能量代偿能力提高,具体机制可能就是通过增加糖酵解途径的产能方式^[2];维持肝癌细胞内一定的 ROS 水平可以保证癌细胞的增殖。这也表明缺氧情况下肝癌细胞存活和生长仍对 ROS 有依赖。

c-myc 是癌基因,其表达与细胞的转化及增殖密切相关。本实验结果说明缺氧会诱导 *c-myc* 表达上调,从而促进癌细胞增殖。如果采用抗氧化剂 α -LA 可明显下调 *c-myc* 表达,并使癌细胞生长受到抑制。这也进一步揭示,缺氧应激可以通过 ROS 调节癌基因 *c-myc* 表达,从而参与调控肝癌细胞的生长。

本实验结果进一步提示,糖酵解的无氧化产能方式促进了 ROS 的产生,ROS 作为第二信使参与了肿瘤细胞生长信号通路的调控。这种协同效应说明缺氧既是肿瘤细胞快速增殖的结果,也是肿瘤细胞快速生长增殖的原因之一。

通过抗氧化剂 α -LA 的干预能有效清除 SMMC-7721 肝癌细胞内的 ROS,使 SMMC-7721 肝癌细胞生长增殖受到抑制,同时降低了其缺氧耐

受能力。这为抗氧化剂可研发为抗癌药物提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci*, 1999,24(2):68~72
- [2] 施冬云, 刘珊林, 李浩然, 沈新南, 俞培忠, 程建, 龚兴国. 缺氧应激对肝癌细胞代谢信号通路的调节作用. *生物化学与生物物理进展*, 2006,33(9):869~876
- [3] Valera A, Pujol A, Gregori X, Riu E, Visa J, Bosch F. Evidence from transgenic mice that myc regulates hepatic glycolysis. *FASEB J*, 1995,9:1067~1078
- [4] Lewis BC, Shim H, Li Q, Wu CS, Lee LA, Maity A, Dang CV. Identification of putative c-Myc-responsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene. *Molecular and Cellular Biology*, 1997,17:4967~4978
- [5] Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995,19(2):227~250
- [6] 刘珊林, 施冬云, 潘喜华, 申宗侯. 抗氧化干预对肝癌细胞增殖及 N-ras 基因表达的作用. *生物化学与生物物理学报*, 2001,33(4):463~466
- [7] Rao MS, Subbarao V. Inhibition of ciprofibrate-induced hepatocarcinoma genesis in the rat by dimethylthiourea, a scavenger of hydroxyl radical. *Oncol Rep*, 1999,6(6):1285~1288
- [8] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 2006,160:1~40
- [9] Jakubowski W, Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int*, 2000,24(10):757~760
- [10] Shi DY, Deng YR, Liu SL, Zhang YD, Wei L. Redox stress regulates cell proliferation and apoptosis of human hepatoma through Akt protein phosphorylation. *FEBS Letters*, 2003,542(1~3):60~64
- [11] Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. Oxidative stress and tumor cell proliferation. *Free Rad Res Commun*, 1990,11:65~76
- [12] Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT, Adamis AP. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest*, 1996,98(7):1667~1675
- [13] 黄耿文, 杨连粤. 肿瘤细胞的缺氧信号传导通路. *世界华人消化杂志*, 2002,10(12):1441~1444

THE EFFECT OF ALPHA-LIPOIC ACID ON MITOCHONDRIAL RESPIRATORY RATE AND ENERGY METABOLISM IN HEPATOMA CELLS IN RESPONSE TO HYPOXIC STRESS

HUANG Yong-chao¹, SHI Dong-yun², LIU Shan-lin², LIU Zhi-xin¹, YU Pei-zhong², SHEN Xin-nan²

(1. National key Biology Laboratory for Tropical Crops, Haikou 571101, China

2. Free Radical Regulation and Application Centre of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: This study investigated the ability of the antioxidant, alpha-lipoic acid, to scavenge the reactive oxygen species (ROS) in hepatoma cells, and assessed how the effects of alpha-lipoic acid on cell proliferation differed between SMMC-7721 human hepatoma cells and L02 immortalized normal liver cells. The effect of the antioxidant on cell survival ratio, mitochondrial activity and energy metabolism was explored further under the condition of hypoxia. Effects of the antioxidant for cancer cells and normal cells were compared to see if they differed. Cell growth and the level of ROS in cells were analysed in response to different concentrations of alpha-lipoic acid treatment. The survival ratio, ROS level in cells, consumption of O₂, generation of ATP and mRNA levels of c-myc oncogene were each detected under hypoxic condition, respectively in response to 5 mmol/L alpha-lipoic acid. The results suggest that hepatoma cells compensatively increase ATP generation through increasing the glycolysis pathway in response to hypoxia, the antioxidant, alpha-lipoic acid, scavenges the excess ROS in cells and decreases the mitochondria respiratory rate in hepatoma cells, and alpha-lipoic acid inhibits the proliferation of hepatoma cells and decreases their ability to endure hypoxia by downregulating the expression of c-myc.

Key Words: Alpha-lipoic acid; Hypoxia; Glycolysis; Hepatoma; Reactive oxygen species

This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30130100, 30470422)

Received: Apr 17, 2007

Corresponding author: LIU Shan-lin, Tel: +86(21)54237897, E-mail: sliu826@yahoo.com.cn