

本文引文格式:张慧慧,程翠,李艳,等. AMPK 抑制剂抑制 FASN 影响宫颈癌细胞胆固醇代谢过程[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(5): 661-666.

【论著与临床报道】

AMPK 抑制剂抑制 FASN 影响宫颈癌细胞胆固醇代谢过程

张慧慧,程翠,李艳,魏丽,王丽华,王亮亮

(蚌埠医科大学第一附属医院妇瘤科,安徽 蚌埠 233000)

摘要:目的 探明 AMPK 抑制剂影响脂肪酸合成酶(FASN)调控宫颈癌细胞胆固醇代谢过程的分子机制。方法 免疫组化检测 FASN 在宫颈癌中的表达, CCK-8、EdU、胆固醇检测沉默 FASN 后对宫颈癌增殖和胆固醇影响, IF 检测各组脂筏和 p-FAK 的表达情况, Western Blot 检测调控 FASN 后 FASN、ERK1/2、p-ERK1/2、p-JUN 和 p-p38 的表达。结果 FASN 在宫颈癌中过表达, 高表达 FASN 与较差的预后直接相关。沉默 FASN 组的增殖、胆固醇和游离胆固醇水平下降, 且脂筏表达下降。相较于 NC 组, si-FASN 组中 p-FAK 的表达下降。相较于 NC 组, si-FASN 组和 MAK8722 组 (AMPK 抑制剂) 中 FASN、p-ERK1/2、p-JUN 和 p-p38 的表达下降。结论 沉默 FASN 调控宫颈癌细胞胆固醇代谢和增殖过程, 而加入 AMPK 抑制剂后抑制了 FASN 和 AMPK 信号轴的关键蛋白表达。

关键词:脂肪酸合成酶; AMPK 信号通路; 胆固醇代谢; 宫颈肿瘤

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2024)05-0661-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2024.05.002

Inhibition of FASN by AMPK inhibitor affects the process of cholesterol metabolism in cervical cancer cells

ZHANG Huihui, CHENG Cui, LI Yan, WEI Li, WANG Lihua, WANG Liangliang

(Department of Gynecologic Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233000, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism through which AMPK inhibitor affects the regulation of fatty acid synthase (FASN) on cholesterol metabolism in cervical cancer cells. **Methods** The expression of FASN in cervical cancer was detected by immunohistochemistry. The effects of silenced FASN on proliferation and cholesterol of cervical cancer were detected by CCK-8, EdU and cholesterol detection. IF was used to detect the expression of lipid rafts and phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK) in various groups. Western Blot analysis was performed to evaluate the expression of FASN, ERK1/2, p-ERK1/2, p-JUN, and p-p38 after modulation of FASN. **Results** FASN was overexpressed in cervical cancer, and high FASN expression was directly associated with poor prognosis. The proliferation, cholesterol, and free cholesterol levels decreased in the FASN-silenced group, accompanied by reduced lipid raft expression. Compared with the negative control (NC) group, the expression of p-FAK was decreased in the si-FASN group. Additionally, the expressions of FASN, p-ERK1/2, p-JUN, and p-p38 were decreased in both the si-FASN group and the MAK8722 group (AMPK inhibitor) compared with the NC group. **Conclusion** Silencing of FASN regulates the cholesterol metabolism and proliferation in cervical cancer cells. Additionally, the addition of AMPK inhibitor further inhibits the expression of key proteins in the FASN and AMPK signaling axis.

Key words: fatty acid synthase; AMPK signaling pathway; cholesterol metabolism; cervical cancer

基金项目:蚌埠医科大学自然科学重点项目(2021byzd146)

第一作者:张慧慧, 硕士, 研究方向:恶性肿瘤放射治疗, E-mail: zqa775186846@163.com

通讯作者:王亮亮, 硕士, 副主任医师, 研究方向:妇科恶性肿瘤综合治疗, E-mail: mengbo1980@163.com

宫颈癌是全球妇女死亡的主要原因之一^[1]。我国宫颈癌患者发病率逐年升高^[2-3]。胆固醇代谢已被认为是癌症转移的重要组成部分^[4-5]。通过 TCGA 数据库,本课题组筛选出脂肪酸合成酶(FASN)作为潜在靶点。FASN 可能作为致癌因子,因为它在调节癌细胞脂肪酸合成或驱动癌细胞异常脂肪生成方面发挥作用^[6-7]。研究表明 AMPK 信号通路参与胆固醇代谢过程^[8-9],因此本研究拟探究 AMPK 抑制剂抑制 FASN 从而影响宫颈癌细胞胆固醇代谢过程,为探究宫颈癌恶性进展提供新的分子靶点。

1 方法与材料

1.1 主要试剂 DMEM 高糖培养基(Thermo Fisher Scientific 公司)、胎牛血清(Thermo Fisher Scientific 公司)、1%青-链霉素(上海碧云天生物技术股份有限公司)、Lipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific 公司)、CCK-8 试剂(上海碧云天生物技术股份有限公司)、RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术股份有限公司)、BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司)、Trizol(上海碧云天生物技术股份有限公司)、DAB Kit(Maxim BioTech 公司)、胆固醇/胆固醇酯检测试剂盒(Abcam 公司)。

1.2 实验仪器 细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司)、ProFlex™ PCR 系统(Thermo Fisher Scientific 公司)、EVOS™ M7000 成像系统(Thermo Fisher Scientific 公司)、BX43-LED/BX53-LED 显微镜(奥林巴斯公司)。

1.3 临床样本收集 收集 10 例于本院行宫颈癌根治术的患者癌组织样本及癌旁 2~3 cm 样本,并经病理学检测确诊为宫颈癌。纳入标准:①经组织活检确诊为宫颈癌患者;②ECOG 评分 0~1 分;③经过影像学确诊无淋巴结转移,并经根治性切除者;④临床资料完整者。排除标准:①合并远处转移无法接受根治性切除者;②有严重并发症,如心肺功能不全者;③病历资料不全者;④继发性肿瘤者。收集患者免疫组化蜡块,并用于后续免疫组化染色检测。所有患者均签署知情同意书。本研究经过蚌埠医科大学伦理委员会批准(伦科批字:2022 第 248 号)。

1.4 细胞培养 正常宫颈上皮细胞 HUCEC,宫颈癌细胞系 HeLa、Caski、C33A、MS751 和 HeLa229 均购自中科院细胞研究所。5 株细胞利用 DMEM 高糖培养基(10%胎牛血清和 1%青-链霉素)培养。在 37℃、5%CO₂ 饱和度湿度的恒温培养箱中培养。

1.5 细胞转染操作 取各组细胞种植于 6 孔板中。si-FASN 01 序列:5'-TGCTTTGGTTTGGGTGAT T-3'; si-FASN 02 序列:5'-TACGGTCCTATAAC GTGTGC-3'(购自上海吉凯基因科技有限公司)。取

HeLa 和 Caski 细胞种植于 6 孔板中,随后生长至密度达孔视野 50%~60%左右,更换为无血清培养基,随后 siRNA 于 Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司)混合后,加入到细胞孔中,10 h 左右去除原液,更换为含血清培养基。

1.6 CCK-8 实验 根据需要进行转染操作即处理后,培养 1 d、2 d、3 d 后,取出后避光每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37.5℃恒温培养箱中静置 120 min 左右,酶标仪检测 OD450 波段的变化强度。

1.7 Western Blot 实验检测 用 RIPA 裂解液提取总蛋白裂解物。BCA 法测定蛋白浓度。将等量配置好的蛋白质加载到凝胶上,在 10%凝胶上电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用 5%脱脂乳溶液封闭 PVDF 膜封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜。第 2 天用与二抗在 37℃下孵育 1 h。

1.8 PCR 实验 使用 Trizol 分离细胞中的总 RNA,并将其稀释到不含 DNase/RNase 的水中。定量后,用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA(每个样品 2 个 μg)逆转录为 cDNA。最后,采用 SYBR™ Green PCR Master Mix 进行实时定量 PCR,测定目的基因的表达水平。GAPDH 作为内参对照。本研究的引物序列购自生工生物工程股份有限公司,如表 1 所示。

表 1 所有 PCR 序列

Gene	Primer sequence(5'-3')
FASN	5'-CGCGTGGCCGGCTACTCCTAC-3' 5'-CGGCTGCCACACGCTCCTCT-3'
GAPDH	5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3' 5'-TCATACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'

1.9 免疫组化实验 福尔马林固定的石蜡包埋组织脱蜡后,用高压锅在柠檬酸缓冲液中煮沸,在 3%过氧化氢酶拮抗剂缓冲液和 10%胎牛血清中孵育。然后将切片在 4℃下与一抗孵育过夜,然后使用 DAB Kit 对染色蛋白进行可视化。

1.10 EdU 实验 细胞种植于 12 孔板中,随后配制 2X 的 EdU 工作液,固定液固定 15 min,每孔用 0.1~0.2 mL 通透液通透 10 min,用内源性过氧化物酶封闭液室温孵育 20 min,随后配置综合反应液,室温避光孵育 30 min 后,在孵育 DAPI,最后荧光显微镜下检测。

1.11 胆固醇和游离胆固醇检测 根据胆固醇/胆固醇酯检测试剂盒进行总胆固醇和游离胆固醇的测量。细胞消化离心后,在 15 000 r/min 的条件下离心 5 min,液相转移到新的 EP 管中,在 50℃下风干,然后

用 200 μL 的胆固醇测定缓冲液溶解。用胆固醇标准品绘制标准曲线。随后按试剂盒说明书依次加入试剂,样品在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。酶标仪 450 nm 处测量吸光度。检测游离胆固醇,则在反应中减少胆固醇酯酶的加入(方法同上)。

1.12 免疫荧光及脂筏检测 细胞接种在盖玻片上。4%多聚甲醛固定 30 min 左右,用 0.1% Triton X 通透性 30 min。随后 5%牛血清白蛋白封闭 30 min。随后与一抗稀释液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,二抗孵化。细胞核用 DAPI 逆染。随后显微镜观察免疫荧光。购买 Vybrant™ Alexa Fluor™ 555 脂筏标记试剂盒。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用荧光标记的 CT-B 偶联物标记 10 min,然后用抗 CT-B 抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下交联 15 min。随后荧光显微镜检测表达。

1.13 数据统计及生信数据库 使用 GraphPad prism 8.0 进行统计分析。计量资料符合正态分布的

利用($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异用独立 t 检验或单因素方差分析(ANOVA)进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。通过 Timer 2.0 (<http://timer.cistrome.org/>)下载 FASN 在多种癌症中的表达情况。利用 GEPIA 2.0 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)数据库检测 FASN 在宫颈癌中表达情况,同时下载 OS 和 RFS 曲线。

2 结果

2.1 FASN 在宫颈癌中高表达且与较差的预后相关

基于 Timer 2.0 数据库和 TCGA 数据库数据,显示 FASN 在宫颈癌中高表达,且 FASN 随着 Stage 分级的增高而增加(见图 1A、图 1B)。TCGA 数据库中宫颈癌显示低表达 FASN 的 OS 和 RFS 曲线更好(见图 1C)。IHC 结果显示,宫颈癌样本中 FASN 高表达,且随着 G 分级的增高,FASN 表达升高(见图 2)。

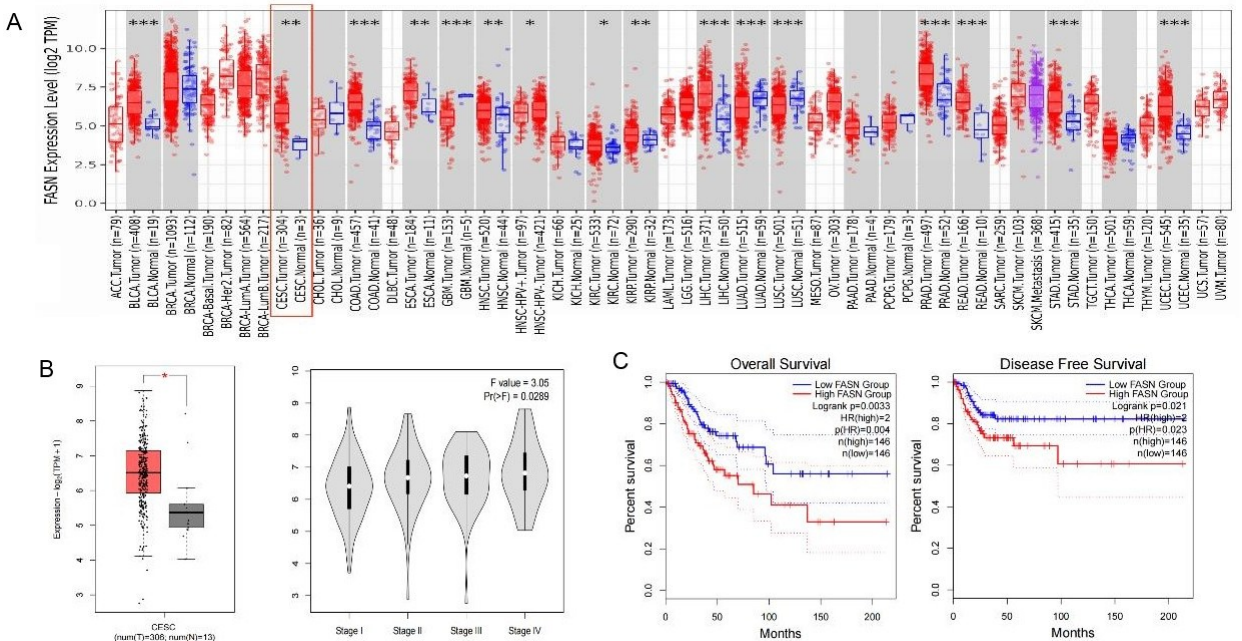


图 1 FASN 在宫颈癌中高表达且与较差的预后相关

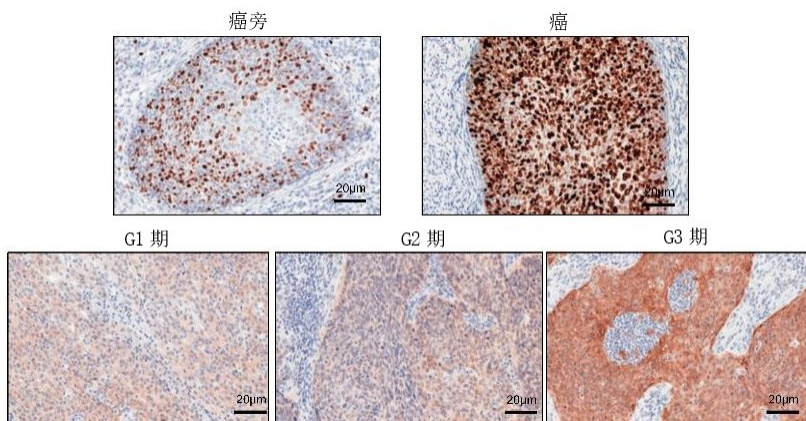
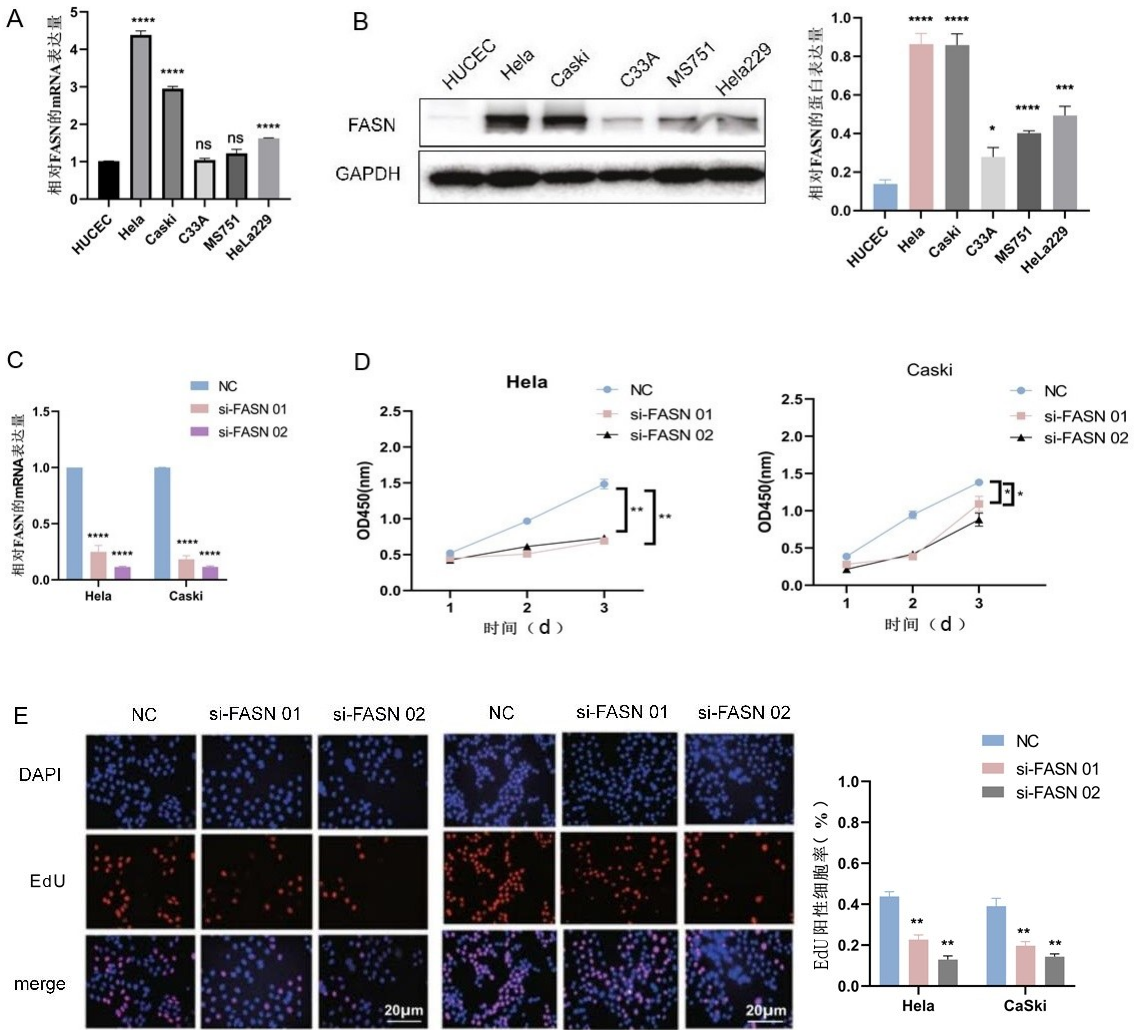


图 2 IHC 检测 FASN 在宫颈癌患者样本中的表达情况($\times 20$)

2.2 沉默 FASN 抑制宫颈癌细胞增殖 RT-PCR 和 Western Blot 结果提示, HeLa 和 Caski 细胞中 FASN 的表达最高(见图 3A、图 3B), RT-PCR 结果显示沉默

载体构建成功(见图 3C)。CCK-8 和 EdU 提示, 相较于 NC 组, si-FASN 01 组和 si-FASN 02 组 ($P < 0.001$) 中宫颈癌细胞增殖效率下降(见图 3D、图 3E)。



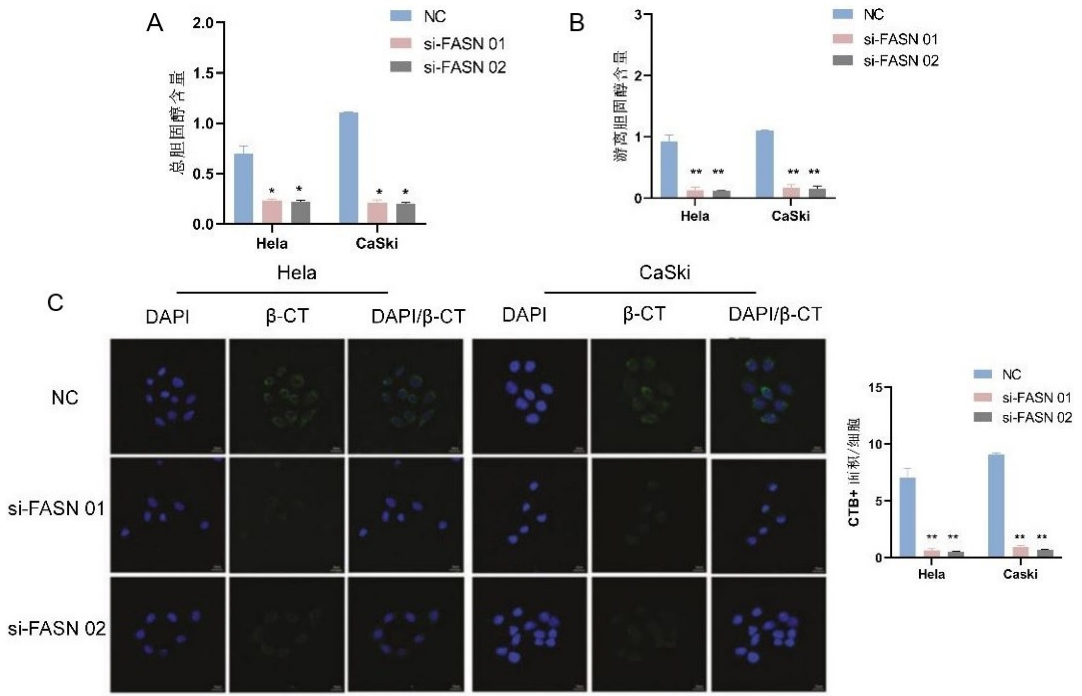
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: $P > 0.05$ 。

图 3 沉默 FASN 抑制宫颈癌细胞增殖($\times 20$)

2.3 沉默 FASN 后抑制了宫颈癌细胞胆固醇代谢过程 多项研究显示 FASN 参与胆固醇代谢过程^[10-12]。相较于 NC 组, si-FANS 组中总胆固醇(见图 4A, $P = 0.0405$)和游离胆固醇表达下降(见图 4B, $P = 0.0021$)。而胆固醇代谢重编辑主要由脂筏和肌动蛋白重塑来影响细胞转移过程, FASN 被敲除后, 在 HeLa 和 CaSki 细胞中观察到的脂筏较少(见图 4C, $P = 0.0051$)。随后在肌动蛋白重塑实验中, 免疫荧光结果显示, 磷酸化 FAK(p-FAK) 共定位于 CC 细胞的丝状足部, 用 siRNA 敲除 FASN 后, p-FAK 阳性面积和丝

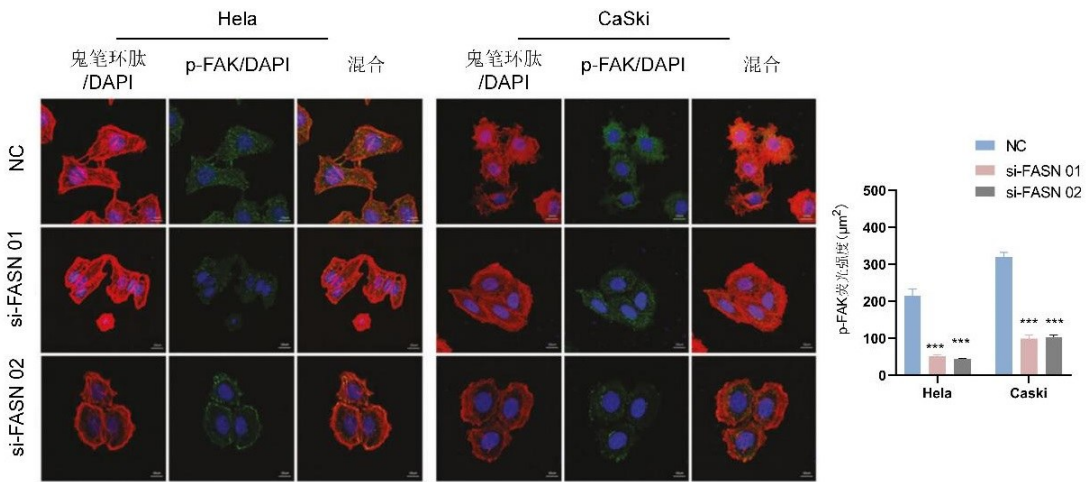
足数目均减少(见图 5)。

2.4 MAPK 抑制剂(MAK8722)抑制 FASN/ERK/JUN 轴的表达 研究发现 MAPK 信号通路与胆固醇代谢密切相关^[8], 在加入 $50 \mu\text{mol/L}$ 浓度剂量的 MAPK 抑制剂(MAK8722)后, Western Blot 实验检测各组 MAPK 信号轴通路关键蛋白的表达情况。结果显示, 相较于 NC 组, si-FASN 组和 MAK8722 组中 FASN、p-ERK1/2、p-JUN 和 p-p38 的表达均下降, 且 MAK8722 组抑制更强(见图 6)。



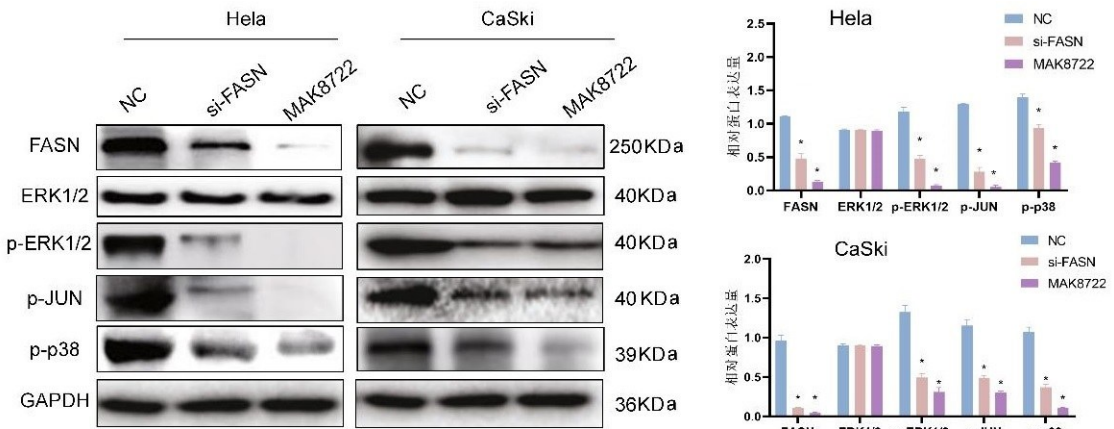
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

图 4 沉默 FASN 抑制宫颈癌细胞胆固醇代谢过程($\times 40$)



注: 红色为鬼笔环肽染色, 绿色为 p-FAK 染色, 蓝色为细胞核染 DAPI; *** $P < 0.0001$ 。

图 5 免疫荧光染色检测各组 p-FAK 表达情况($\times 40$)



注: * $P < 0.05$ 。

图 6 Western Blot 检测 FASN、ERK1/2、p-ERK1/2、p-JUN 和 p-p38 的表达

3 讨论

FASN 基因在胆固醇代谢中起着至关重要的作用^[13-14], FASN 在多种癌症中过表达且促进癌细胞进展^[15]。本次研究显示, FASN 在宫颈癌中过表达且与较差的预后相关。作为脂类代谢的关键酶, FASN 调节多种脂类的合成代谢和分解代谢过程, 其中胆固醇是脂筏的主要成分^[16]。本次研究显示抑制 FASN 降低细胞总胆固醇和游离胆固醇, 这与之前的报道一致^[17]。脂筏被认为是癌细胞入侵的信号中枢^[18], 而 FAK 介导的肌动蛋白重塑在癌症转移中的重要性已经被证明^[19]。在本次研究中, 沉默 FASN 后, FAK 磷酸化表达下降, 这提示 FASN 影响 FAK 的磷酸化激活从而激活脂筏形成, 影响宫颈癌细胞肌动蛋白重塑过程, 促进其增殖和转移。

AMPK 的磷酸化激活可以调节多种脂肪生成因子, 其中包括 FASN^[20-21]。AMPK 的激活抑制可以抑制其转录共激活因子 p300 的活性, 而 p300 是 FASN 表达的关键因子, 因此, 改变 AMPK 的激活状态, 亦有可能改变 FASN 的表达。在本研究中, 通过抑制 AMPK 的激活, 可明显抑制宫颈癌中的 AMPK 信号通路的关键分子 p-ERK1/2、p-JUN 和 p-p38 的磷酸化激活。同时, 在抑制 AMPK 激活的同时, 宫颈癌中 FASN 的表达明显被抑制, 表明抑制 AMPK 的激活, 可以抑制 FASN 的表达, 进而影响宫颈癌的脂质代谢和肿瘤进程。

参考文献:

[1] TSIKOURAS P, ZERVOUDIS S, MANAV B, et al. Cervical cancer: screening, diagnosis and staging [J]. J BUON, 2016, 21(2): 320-325.

[2] 程红. 阜阳市女大学生宫颈癌筛查健康信念路径研究[J]. 右江民族医学院学报, 2022, 44(1): 86-89.

[3] 余慧, 余亮, 胡向青. 安徽省黄山市女性居民宫颈癌健康素养现状及影响因素研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(1): 89-93.

[4] CHENG C M, GENG F, CHENG X, et al. Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer [J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 27.

[5] BIAN X L, LIU R, MENG Y, et al. Lipid metabolism and cancer [J]. J Exp Med, 2021, 218(1): e20201606.

[6] LI C L, ZHANG L L, QIU Z D, et al. Key molecules of fatty acid metabolism in gastric cancer [J]. Biomolecules, 2022, 12(5): 706.

[7] FHU C W, ALI A. Fatty acid synthase: an emerging target in cancer [J]. Molecules, 2020, 25(17): 3935.

[8] WANG Q, LIU S D, ZHAI A H, et al. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(7): 985-993.

[9] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.

[10] STOYKOVA G E, SCHLAEPFER I R. Lipid metabolism and endocrine resistance in prostate cancer, and new opportunities for therapy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2626.

[11] ZHANG J Y, SONG Y W, SHI Q Q, et al. Research progress on FASN and MGLL in the regulation of abnormal lipid metabolism and the relationship between tumor invasion and metastasis [J]. Front Med, 2021, 15(5): 649-656.

[12] SONG Z Y, XIAOLI A M, YANG F J. Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues [J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1383.

[13] WEI W X, QIN B F, WEN W J, et al. FBXW7 β loss-of-function enhances FASN-mediated lipogenesis and promotes colorectal cancer growth [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 187.

[14] LIU M S, ZHANG Z, CHEN Y T, et al. Circadian clock and lipid metabolism disorders: a potential therapeutic strategy for cancer [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1292011.

[15] GU L, ZHU Y H, LIN X, et al. Stabilization of FASN by ACAT1-mediated GNPAT acetylation promotes lipid metabolism and hepatocarcinogenesis [J]. Oncogene, 2020, 39(11): 2437-2449.

[16] CODINI M, GARCIA-GIL M, ALBI E. Cholesterol and sphingolipid enriched lipid rafts as therapeutic targets in cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 726.

[17] LIU Q, DONG X F. Targeting *de novo* lipogenesis and cholesterol biosynthesis simultaneously is a novel therapeutic option for hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatocell Carcinoma, 2021, 8: 19-21.

[18] PAUL B, LEWINSKA M, ANDERSEN J B. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer [J]. JHEP Rep, 2022, 4(6): 100479.

[19] YU S L, WANG L, CHE D N, et al. Targeting CRABP-II overcomes pancreatic cancer drug resistance by reversing lipid raft cholesterol accumulation and AKT survival signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 88.

[20] SULZMAIER F J, JEAN C, SCHLAEPFER D D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications [J]. Nat Rev Cancer, 2014, 14(9): 598-610.

[21] LU Y Z, ZHANG C, SONG Y Y, et al. Gallic acid impairs fructose-driven *de novo* lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis via AMPK-dependent suppression of SREBP-1/ACC/FASN cascade [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 940: 175457.

收稿日期: 2024-05-05; 修回日期: 2024-06-07