·肿瘤专栏·

降脂药奥利司他通过靶向脂代谢途径对肝细胞癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的影响

段伟静，吕冬菊，赵兴敏，李　颖

（山东第一医科大学附属人民医院药剂科，山东 济南 271199）

［摘要］ **目的** 探究脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）在肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）进展中的功能，以期为 HCC 治疗提供有利的理论依据。**方法** 生信分析 FASN 在 HCC 肿瘤组织中的表达及富集通路；细胞计数盒 8（cell counting kit-8，CCK-8）、克隆形成、流式细胞术分别检测细胞活力、增殖和凋亡；实时荧光定量 PCR（quantitative real-time polymerase chain reaction，qRT-PCR）检测 FASN 的水平；蛋白质免疫印迹法（Western blot）检测 BCL2 相关 X 蛋白（BCL2-associated X，Bax）和 B 细胞淋巴瘤 2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）的表达；亲脂性荧光染料 BODIPY 493/503 检测中性脂质的积累情况；试剂盒检测游离脂肪酸和甘油的水平。**结果** FASN 在 HCC 肿瘤组织中的表达高于邻近癌旁组织。在体外细胞模型中进行验证，结果显示，与 MIHA 细胞相比，HCC 细胞系（Huh-7、HepG2、Hep3B）中 FASN 的表达显著上调（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组细胞中 FASN 的表达降低，而 oe-FASN 组细胞中 FASN 的表达提高（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组 HepG2 细胞活力和克隆数降低，而 oe-FASN 组 Hep3B 细胞活力和克隆数提高（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组 HepG2 细胞凋亡率提高，而 oe-FASN 组 HepG2 细胞凋亡率降低（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组细胞中 Bax 的表达提高，Bcl-2 的表达降低；oe-FASN 组细胞中 Bax 的表达降低，Bcl-2 的表达提高（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组细胞的中性脂质含量降低，而 oe-FASN 组细胞中的中性脂质含量升高（$P<0.05$）。与对照组相比，si-FASN 组细胞中游离脂肪酸水平和甘油水平降低，而 oe-FASN 组细胞中游离脂肪酸水平和甘油水平提高（$P<0.05$）。与 oe-NC＋DMSO 组相比，oe-NC＋Orlistat 组细胞中 FASN 的表达降低，而与 oe-NC＋Orlistat 组相比，oe-FASN＋Orlistat 组细胞中 FASN 的表达提高（$P<0.05$）。与 oe-NC＋DMSO 组相比，oe-NC＋Orlistat 组细胞的增殖水平降低，并诱导细胞凋亡；而与 oe-NC＋Orlistat 组相比，oe-FASN＋Orlistat 组细胞的增殖水著提高，并抑制细胞凋亡（$P<0.05$）。与 oe-NC＋DMSO 组相比，oe-NC＋Orlistat 组细胞中促凋亡因子 Bax 的表达提高，降低抗凋亡因子 Bcl-2 的表达；而与 oe-NC＋Orlistat 组相比，oe-FASN＋Orlistat 组细胞中促凋亡因子 Bax 的表达显著降低，提高抗凋亡因子 Bcl-2 的表达（$P<0.05$）。与 oe-NC＋DMSO 组相比，oe-NC＋Orlistat 组细胞中的中性脂质含量、游离脂肪酸含量以及甘油水平降低；与 oe-NC＋Orlistat 组相比，oe-FASN＋Orlistat 组细胞中的中性脂质含量、游离脂肪酸含量以及甘油水平提高（$P<0.05$）。**结论** 本研究强调 FASN 在 HCC 进展及脂质代谢中的促进作用。脂肪酸合酶抑制剂奥利司他可以抑制 FASN 的表达，通过调控脂肪酸代谢重编程抑制 HCC 的进展。

［关键词］ 癌，肝细胞；脂代谢障碍；奥利司他　　doi：10.3969/j.issn.1007-3205.2024.03.003

［中图分类号］ R730.261　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-3205(2024)03-0260-11

Effects of lipid-lowering drug Orlistat on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cellline HepG2 through targeted lipid metabolism pathway

DUAN Wei-jing, LYU Dong-ju, ZHAO Xing-min, LI Ying

(*Department of Pharmacy, People's Hospital Affiliated to the First Medical University of Shandong Province, Jinan* 271119, *China*)

［**Abstract**］ **Objective** To explore the function of fatty acid synthase (FASN) in the

［收稿日期］2023－04－20

［基金项目］山东省优秀中青年科学家科研奖励基金（BS2020SW1008）

［作者简介］段伟静（1973－），女，山东济南人，山东省济南市人民医院主管药师，医学学士，从事医院药学研究。

progression of hepatocellular carcinoma (HCC), in order to provide a favorable theoretical basis for the treatment of HCC. **Methods** The expression and enrichment pathway of FASN in HCC tumor tissues were analyzed by bioinformatics. Cell Counting Kit-8 (CCK-8), colony formation and flow cytometry were used to detect cell viability, proliferation and apoptosis, respectively. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the level of FASN. The expression of BCL2-associated X (Bax) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) was detected by Western blot. Lipophilic fluorescent dye BODIPY 493/503 was used to detect the accumulation of neutral lipids, and the levels of free fatty acids and glycerol were detected by reagent kit. **Results** The expression of FASN in HCC tumor tissue was higher than that in paracancerous tissues. Based on verification in an in vitro cell model, the results showed that compared with MIHA cells, the expression of FASN was significantly upregulated in HCC cell lines (Huh-7, HepG2, Hep3B) ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of FASN decreased in cells in the si-FASN group, but increased in the oe-FASN group ($P<0.05$). Compared with the control group, the si-FASN group showed a decrease in HepG2 cell viability and clone count, while the oe-FASN group showed an increase in Hep3B cell viability and clone count ($P<0.05$). Compared with the control group, the apoptosis rate of HepG2 cells increased in the si-FASN group, but decreased in the oe-FASN group ($P<0.05$). Compared with the control group, the si-FASN group showed an increase in Bax expression and a decrease in Bcl-2 expression in cells. The expression of Bax decreased and the expression of Bcl-2 increased in the oe-FASN group cells ($P<0.05$). Compared with the control group, the neutral lipid content decreased in the si-FASN group, but increased in the oe-FASN group ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of free fatty acids and glycerol decreased in the si-FASN group but increased in the oe-FASN group ($P<0.05$). Compared with the oe-NC+DMSO group, the expression of FASN decreased in the oe-NC+Orlistat group cells decreased, while compared with the oe-NC+Orlistat group, the expression of FASN in the oe-FASN+Orlistat group cells increased ($P<0.05$). Compared with the oe-NC+DMSO group, the proliferation level of cells in the oe-NC+Orlistat group decreased and apoptosis was induced. Compared with the oe-NC+Orlistat group, the oe-FASN+Orlistat group showed increased cell proliferation and inhibited cell apoptosis ($P<0.05$). Compared with the oe-NC+DMSO group, the expression of pro-apoptotic factor Bax increased in cells of the oe-NC+Orlistat group, while the expression of anti apoptotic factor Bcl-2 was reduced. Compared with the oe-NC+Orlistat group, the expression of pro-apoptotic factor Bax in the Orlistat+oe FASN group cells significantly reduced, while the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 increased ($P<0.05$). Compared with the oe-NC+DMSO group, the neutral lipid content, free fatty acid level, and glycerol level in the oe-NC+Orlistat group cells reduced. Compared with the oe-NC+Orlistat group, the neutral lipid content, free fatty acid level, and glycerol level in the oe-FASN+Orlistat group cells increased ($P<0.05$). **Conclusion** The results of this study emphasize the role of FASN in the promotion of HCC progression and lipid metabolism. The fatty acid synthase inhibitor Orlistat can inhibit FASN expression, which can inhibit HCC progression by regulating reprogramming in fatty acid metabolism.

[**Key words**] carcinoma, hepatocellular; lipid metabolism disorders; Orlistat

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是一种常见的原发性肝癌[1-2]。目前,HCC的治疗策略包括局部消融、导管为基础的局部治疗、根治性切除、化疗、免疫检查点抑制剂等[3-6]。尽管在这方面已经取得了一定的成就,但由于肝癌的复发和转移、耐药和严重的不良反应,其预后仍然很差[7-8]。能

量代谢的改变被普遍认为是癌症在其发生、发展、治疗抵抗等过程中的标志[9-11]，其中脂质代谢的失调被证明是癌症细胞的一个重要代谢特征[12-20]。脂肪酸合成酶(fatty acid synthase，FASN)是参与脂肪酸合成的主要酶[21]，能催化乙酰辅酶a、丙二酰辅酶a和NADPH前体合成长链脂肪酸[22]，在多种癌症中均发挥着至关重要的作用[23-26]。如FASN的高表达与膀胱癌患者低生存率相关，下调M2-型丙酮酸激酶(Pyruvate kinase M2，PKM2)能够抑制FASN在膀胱癌细胞中转录激活的分子机制[27]。然而，FASN在HCC中的具体功能分子机制尚未完全明晰，FASN作为HCC治疗靶点的潜力尚待评估。因此本研究将进一步探究FASN在HCC进展中的功能，以期为HCC治疗提供有利的理论依据。

1 资料与方法

1.1 生信分析 从TCGA数据库下载HCC的mRNA表达量数据，通过edgeR差异分析(|logFC|>2，padj<0.05)，获得DEmRNA，通过查阅文献确定上调的靶基因mRNA，对靶基因mRNA进行通路富集分析并进行临床数据分析。所有实验重复3次。

1.2 细胞培养 人HCC细胞系(Huh-7、HepG2、Hep3B)和人正常肝上皮细胞MIHA购自雅吉生物(China)，并在添加了10%FBS的DMEM培养基(Corning，New Zealand)中于37 ℃、含5% CO_2 的培养箱中培养。

1.3 细胞转染 si-FASN、oe-FASN、和相应的阴性对照从GenePharma(China)获得。根据制造商的说明，使用Lipofectamine 2000试剂(Invitrogen，USA)进行细胞转染。Orlistat购自Sigma(USA)，使用20 mmol/L该试剂处理HepG2细胞[28]。

1.4 实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction，qRT-PCR) 使用TRIzol试剂提取细胞中的总RNA。根据Prime Script RT试剂盒的说明书反转录成cDNA。利用AceQ qPCR SYBR Green Master Mix(Vazyme，China)在ABI PRISM 7500 real-time PCR System(Roche，Switzerland)上进行qRT-PCR。通过$2^{-\triangle\triangle Ct}$方法分析目的基因的表达，GAPDH作为内参基因。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因	引物序列(5′→3′)
FASN	F:TGCCCTGAGCTGGACTACTT
	R:AAAGCTGCTCAGGACCATGT
GAPDH	F:CAAGGTCATCCATGACAACTTTG
	R:GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

1.5 蛋白质免疫印迹法(Western blot) 转染后，将细胞置于含有完整蛋白酶抑制剂混合物的裂解缓冲液中处理，提取和定量蛋白质。随后，将蛋白质转移到PVDF膜上，使用5%的脱脂牛奶将膜封闭。然后将PVDF膜与与一抗在4 ℃下孵育过夜。将膜洗涤并与二抗山羊抗兔在室温下孵育2 h。最后，使用化学发光检测系统对蛋白质带进行可视化。选择使用以下一抗：anti-FASN、anti-Bax、anti-Bcl-2、anti-β-actin(abcam，UK)。

1.6 细胞计数盒8(cell counting kit-8，CCK-8) 转染24 h后，收集细胞，悬浮并以每孔3 000个细胞的密度接种在96孔板中。将转染细胞在37 ℃的加湿培养箱中分别培养0、1、2、3、4 d，培养箱中提供5%的 CO_2。在每个时间点向每个孔中添加10 μL CCK-8试剂进行分析。孵育2 h后，在多功能酶标仪测量每个孔在450 nm波长下的吸光值。

1.7 克隆形成实验 将细胞接种在6孔板中，每孔接种1×10^3个细胞，并在37 ℃的5% CO_2培养箱中培养14 d。用4%多聚甲醛固定15 min，后用结晶紫对菌落进行染色，将>50个细胞的菌落评分为存活菌落，菌落的图像用数码相机拍摄。

1.8 细胞凋亡实验 细胞凋亡检测采用膜联蛋白-V(Annexin V)—异硫氰酸荧光素酯(fluorescein 5- isothiocyante，FITC)/碘化丙啶(propidium iodide，PI)凋亡检测试剂盒(BestBio，Shanghai)。转染约48 h后，细胞使用胰蛋白酶消化，磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline，PBS)洗涤，重悬于结合缓冲液中，加入等量的Annexin V-FITC和PI。流式细胞仪(BD Biosciences，Franklin Lakes，NJ，USA)观察凋亡细胞水平。

1.9 中性脂质的定量 根据制造商的说明，使用亲脂性荧光染料BODIPY 493/503(Invitrogen，USA)检测HCC细胞中的中性脂质的积累。简言之，将细胞在PBS中洗涤，用4%多聚甲醛固定，并在室温下用BODIPY 493/503(1 mg/L)染色45 min，用Hoechst复染细胞核15 min。使用荧光显微镜(Olympus，Japan)检测免疫染色结果。

1.10 游离脂肪酸和甘油水平的定量 根据试剂盒中提供的说明，分别通过通过脂肪酸含量检测试剂

盒(TW-reagent,China)测定脂肪酸水平,使用Glycerol Cell-Based检测试剂盒(Abcam,UK)测定甘油水平。

1.11　统计学方法　应用SPSS 22.0统计软件和GraphPad Prism软件分析数据。计数资料比较采用t检验、单因素方差分析和SNK-q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　FASN在HCC中上调表达　生信数据库分析结果显示,FASN在HCC肿瘤组织中的表达高于邻近癌旁组织(图1A)。在体外细胞模型中进行验证,结果显示,与MIHA细胞相比,HCC细胞系(Huh-7、HepG2、Hep3B)中FASN的表达显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$)(图1B和表2),其中在HepG2细胞中的表达最高,在Hep3B细胞中的表达最低,后续利用这2个细胞系进行细胞功能实验。

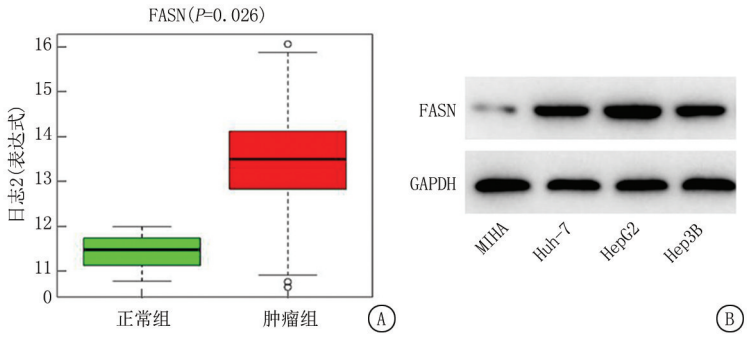


图1　FASN在HCC中上调表达

A.生信分析FASN在HCC肿瘤组织中的表达;B.HCC细胞系中FASN的表达检测

Figure 1　Up-regulation of FASN expression in HCC

表2　FASN在细胞中mRNA和蛋白表达

Table 2　mRNA and protein expression of FASN in cells

($n=3,\bar{x}\pm s$)

细胞系	mRNA水平	蛋白水平
MIHA	1.00±0.09	1.00±0.11
Huh-7	2.41±0.14*	2.30±0.21*
HepG2	3.25±0.23*	3.02±0.31*
Hep3B	2.23±0.21*	2.13±0.24*
F值	82.934	39.961
P值	<0.001	<0.001

*P值<0.05与MIHA比较(SNK-q检验)

2.2　沉默FASN可以抑制HCC细胞增殖,并诱导细胞凋亡　qRT-PCR分析结果显示,与对照组相比,si-FASN组细胞中FASN的表达降低,而oe-FASN组细胞中FASN的表达提高,差异有统计学意义($P<0.05$)(表3～4)。CCK-8和克隆形成实验结果显示,与对照组相比,si-FASN组HepG2细胞活力和克隆数降低,而oe-FASN组Hep3B细胞活力和克隆数提高,差异有统计学意义($P<0.05$)(图2A、表5～8)。细胞凋亡检测结果显示,与对照组相比,si-FASN组HepG2细胞凋亡率提高,而oe-FASN组HepG2细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P<0.05$)(图2B、表9～10)。与对照组相比,si-FASN组细胞中Bax的表达提高,Bcl-2的表达降低;oe-FASN组细胞中Bax的表达降低,Bcl-2的表达提高,差异有统计学意义($P<0.05$)(图2C、表11～12)。

表3　FASN在HepG2细胞中mRNA表达水平

Table 3　mRNA expression level of FASN in HepG2 cells

($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA表达
si-NC	1.00±0.12
si-FASN	0.38±0.04
t值	8.490
P值	0.001

表4　FASN在Hep3B细胞中mRNA表达水平

Table 4　mRNA expression level of FASN in Hep3B cells

($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA表达
oe-NC	1.00±0.11
oe-FASN	3.27±0.28
t值	13.070
P值	<0.001

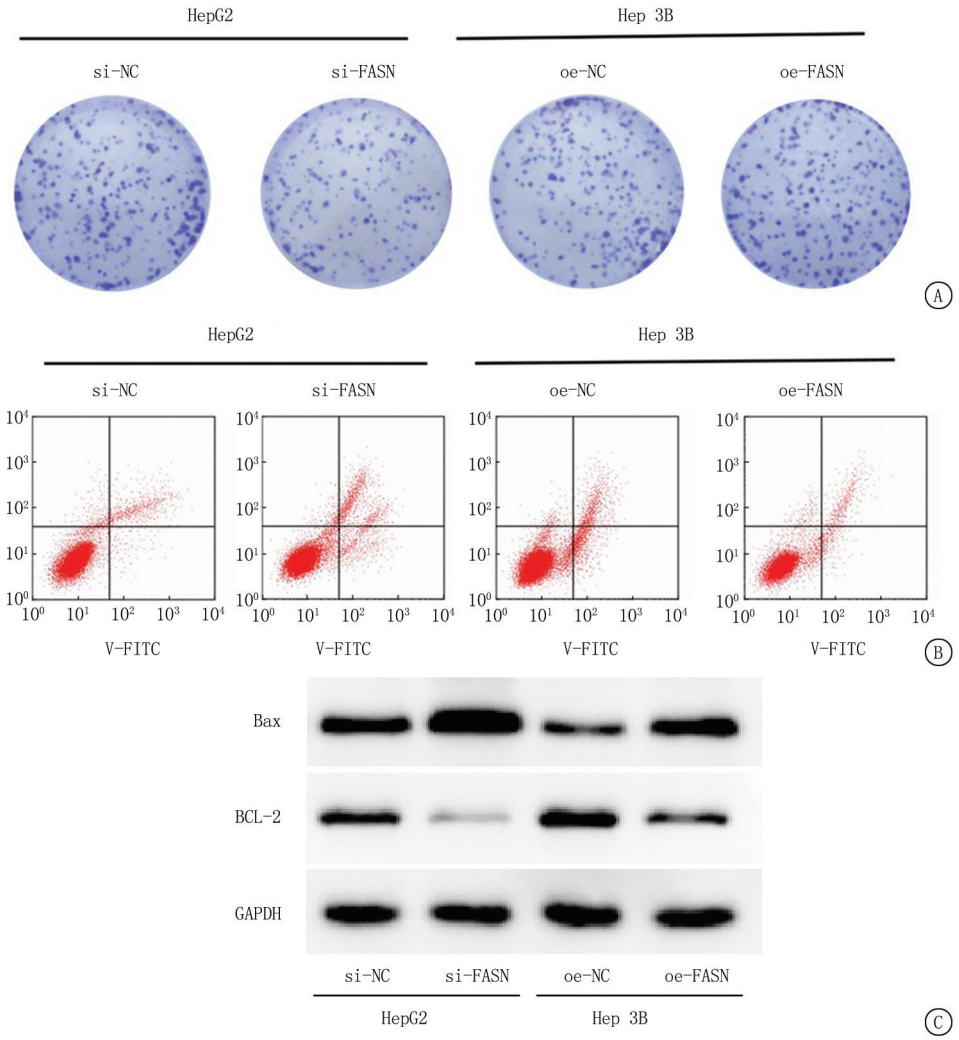


图 2　沉默 FASN 可以抑制 HCC 细胞增殖，并诱导细胞凋亡

A.检测细胞克隆数；B.检测细胞凋亡；C.检测 Bax 和 Bcl-2 的表达

Figure 2　Silencing FASN to inhibit the proliferation of HCC cells and induce cell apoptosis

表 5　敲低 FASN 对 HepG2 细胞活力的影响

Table 5　Effect of FASN knockdown on the viability of HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
si-NC	0.26±0.02	0.47±0.07	0.89±0.09	1.17±0.10	1.57±0.18
si-FASN	0.25±0.03	0.36±0.06	0.67±0.07	0.91±0.08	1.09±0.12
t 值	0.480	2.067	3.342	3.517	3.843
P 值	0.656	0.108	0.029	0.025	0.018

表 6　过表达 FASN 对 Hep3B 细胞活力的影响

Table 6　Effect of FASN overexpression on the viability of Hep3B cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
oe-NC	0.28±0.02	0.49±0.08	0.83±0.08	1.22±0.09	1.55±0.14
oe-FASN	0.27±0.05	0.61±0.06	1.08±0.11	1.49±0.11	1.98±0.15
t 值	0.322	2.067	3.184	3.290	3.630
P 值	0.764	0.106	0.033	0.030	0.022

表 7　敲低 FASN 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Table 7　Effect of FASN knockdown on the proliferation of HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$，个）

组别	细胞克隆数
si-NC	245.12±25.07
si-FASN	113.14±11.03
t 值	8.346
P 值	<0.001

表 8　过表达 FASN 对 Hep3B 细胞增殖能力的影响

Table 8　Effect of FASN overexpression on the proliferation of Hep3B cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$，个）

组别	细胞克隆数
oe-NC	225.21±20.05
oe-FASN	383.29±31.22
t 值	7.379
P 值	<0.001

表 9　敲低 FASN 对 HepG2 细胞凋亡率的影响

Table 9　Effect of FASN knockdown on apoptosis rate of HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$，%）

组别	细胞凋亡率
si-NC	10.12±1.08
si-FASN	18.19±1.51
t 值	7.529
P 值	<0.001

表 10　过表达 FASN 对 Hep3B 细胞凋亡率的影响

Table 10　Effect of FASN overexpression on apoptosis rate of Hep3B cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$，%）

组别	细胞凋亡率
oe-NC	9.52±1.07
oe-FASN	3.14±0.21
t 值	10.134
P 值	<0.001

表 11　敲低 FASN 对 HepG2 细胞中 Bax 和 Bcl-2 的影响

Table 11　Effects of FASN knockdown on Bax and Bcl-2 in HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	Bax	Bcl-2
si-NC	1.00±0.08	1.00±0.09
si-FASN	2.24±0.20	0.32±0.02
t 值	9.971	12.775
P 值	<0.001	<0.001

表 12　过表达 FASN 对 Hep3B 细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Table 12　Effects of FASN overexpression on the expression of Bax and Bcl2 in Hep3B cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	Bax	Bcl-2
oe-NC	1.00±0.11	1.00±0.12
oe-FASN	0.24±0.04	2.32±0.20
t 值	11.246	9.803
P 值	<0.001	<0.001

2.3　FASN 参与调控 HCC 细胞中脂质代谢　生信数据库分析显示 FASN 显著富集在脂肪酸代谢通路上（图 3A）。通过 BODIPY 493/503 染色测定 HCC 细胞中的中性脂质含量，结果显示，与对照组相比，si-FASN 组细胞的中性脂质含量降低，而 oe-FASN组细胞中的中性脂质含量升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）（图 3B，表 13～14）。与对照组相比，si-FASN 组细胞中游离脂肪酸水平和甘油水平降低，而 oe-FASN 组细胞中游离脂肪酸水平和甘油水平提高，差异有统计学意义（$P<0.05$）（表13～14）。

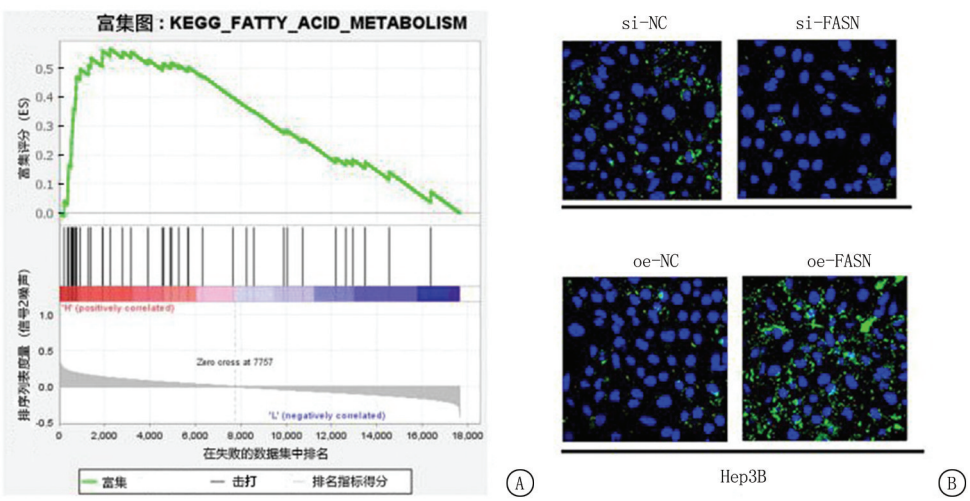


图 3　FASN 参与调控 HCC 细胞中脂质代谢

A.GSEA 富集分析；B.检测中性脂质的含量

Figure 3　FASN involved in the regulation of lipid metabolism in HCC cells

表 13 敲低 FASN 对 HepG2 细胞中中性脂质含量、甘油水平和游离脂肪酸水平的影响

Table 13 Effects of FASN knockdown on neutral lipid content, glycerol level and free fatty acid level in HepG2 cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	中性脂质含量 (mg/L)	甘油水平 (mg/L)	游离脂肪酸水平
si-NC	48.92±3.34	7.29±0.79	1.00±0.09
si-FASN	30.29±2.02	3.71±0.38	0.36±0.04
t 值	8.267	7.073	11.255
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

表 14 过表达 FASN 对 Hep3B 细胞中中性脂质含量、甘油水平和游离脂肪酸水平的影响

Table 14 Effects of FASN overexpression on neutral lipid content, glycerol level and free fatty acid level in Hep3B cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	中性脂质含量 (mg/L)	甘油水平 (mg/L)	游离脂肪酸水平
oe-NC	49.17±5.02	6.01±0.60	1.00±0.12
oe-FASN	77.67±6.34	10.76±0.99	1.97±0.12
t 值	6.104	7.107	9.900
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

2.4 奥利司他介导 FASN 的表达抑制 使用 FASN 抑制剂(Orlistat,奥利司他)或过表达 FASN 处理 HepG2 细胞。首先通过 qRT-PCR 检测转染效率,结果显示,与 oe-NC+DMSO 组相比,oe-NC+Orlistat 组细胞中 FASN 的表达降低,而与 oe-NC+Orlistat 组相比,oe-FASN+Orlistat 组细胞中 FASN 的表达提高,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 15)。细胞增殖和凋亡检测结果显示,与 oe-NC+DMSO 组相比,oe-NC+Orlistat 组细胞的增殖水平降低,并诱导细胞凋亡;而与 oe-NC+Orlistat 组相比,oe-FASN+Orlistat 组细胞的增殖水著提高,并抑制细胞凋亡,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4A-B,表 16~18)。与 oe-NC+DMSO 组相比,oe-NC+Orlistat 组细胞中促凋亡因子 Bax 的表达提高,降低抗凋亡因子 Bcl-2 的表达;而与 oe-NC+Orlistat 组相比,oe-FASN+Orlistat 组细胞中促凋亡因子 Bax 的表达显著降低,提高抗凋亡因子 Bcl-2 的表达,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4D 和表 19)。与 oe-NC+DMSO 组相比,oe-NC+Orlistat 组细胞中的中性脂质含量、游离脂肪酸含量以及甘油水平降低;与 oe-NC+Orlistat 组相比,oe-FASN+Orlistat 组细胞中的中性脂质含量、游离脂肪酸含量以及甘油水平提高,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4C 和表 20)。

表 15 FASN 在 HepG2 细胞中的表达

Table 15 Expression of FASN in HepG2 cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	mRNA 水平
oe-NC+DMSO 组	1.00±0.10
oe-NC+Orlistat 组	0.24±0.02*
oe-FASN+DMSO 组	2.45±0.20*
oe-FASN+Orlistat 组	1.09±0.10#
F 值	168.037
P 值	<0.001

* P 值<0.05 与 oe-NC+DMSO 组比较 # P 值<0.05 与 oe-FASN+DMSO 组比较(SNK-q 检验)

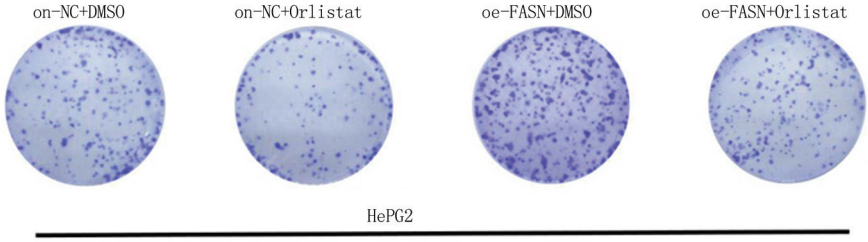
表 16 奥利司他介导 FASN 的表达对 HepG2 细胞活力的影响

Table 16 Effects of Orlistat-mediated FASN expression on the viability of HepG2 cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
oe-NC+DMSO 组	0.26±0.02	0.49±0.07	0.82±0.09	1.16±0.14	1.57±0.15
oe-NC+Orlistat 组	0.25±0.03	0.41±0.06	0.64±0.07*	0.87±0.08*	1.06±0.12*
oe-FASN+DMSO 组	0.27±0.05	0.55±0.06	1.07±0.10*	1.41±0.11*	1.95±0.13*
oe-FASN+Orlistat 组	0.27±0.03	0.51±0.06	0.87±0.08#	1.23±0.13#	1.54±0.17#
F 值	0.234	2.650	12.763	11.002	19.304
P 值	0.870	0.120	0.002	0.003	<0.001

* P 值<0.05 与 oe-NC+DMSO 组比较 # P 值<0.05 与 oe-FASN+DMSO 组比较(SNK-q 检验)



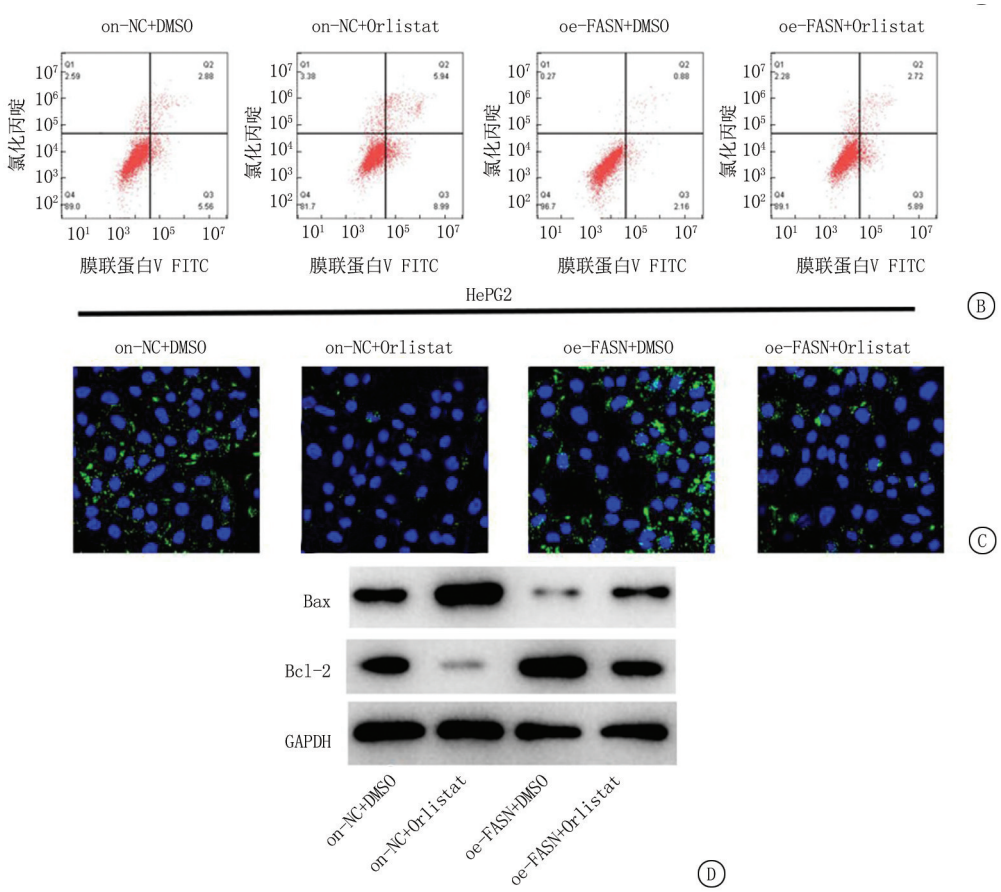


图 4　奥利司他介导 FASN 的表达抑制，通过抑制脂质代谢途径诱导 HCC 细胞凋亡

A.检测细胞克隆数；B.检测细胞凋亡；C.检测细胞中中性脂质的含量；D.检测 Bax 和 Bcl-2 的表达

Figure 4　Orlistat mediating the inhibition of FASN expression and inducing HCC cell apoptosis by inhibiting lipid metabolism pathway

表 17　奥利司他介导 FASN 的表达对 HepG2 细胞增殖能力的影响

Table 17　Effect of Orlistat-mediated FASN expression on the proliferation of HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$）

组别	HepG2
oe-NC＋DMSO 组	292.13±23.73
oe-NC＋Orlistat 组	134.67±15.39*
oe-FASN＋DMSO 组	409.23±39.56*
oe-FASN＋Orlistat 组	314.54±26.46#
F 值	50.802
P 值	＜0.001

* *P* 值＜0.05 与 oe-NC＋DMSO 组比较　# *P* 值＜0.05 与 oe-FASN＋DMSO 组比较（SNK-*q* 检验）

表 18　奥利司他介导 FASN 的表达对 HepG2 细胞凋亡率的影响

Table 18　Effect of Orlistat-mediated FASN expression on apoptosis rate of HepG2 cells

（$n=3, \bar{x}\pm s$，%）

组别	HepG2
oe-NC＋DMSO 组	8.44±0.39
oe-NC＋Orlistat 组	15.93±1.39*
oe-FASN＋DMSO 组	3.01±0.25*
oe-FASN＋Orlistat 组	8.61±0.54#
F 值	138.422
P 值	＜0.001

* *P* 值＜0.05 与 oe-NC＋DMSO 组比较　# *P* 值＜0.05 与 oe-FASN＋DMSO 组比较（SNK-*q* 检验）

表 19 奥利司他介导 FASN 的表达对 HepG2 细胞中性中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Table 19 Effect of Orlistat-mediated FASN expression on the expression of Bax and Bcl-2 in HepG2 cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	Bax	Bcl-2
oe-NC+DMSO 组	1.00±0.10	1.00±0.09
oe-NC+Orlistat 组	2.42±0.20*	0.32±0.03*
oe-FASN+DMSO 组	0.34±0.03*	2.24±0.21*
oe-FASN+Orlistat 组	0.87±0.09#	0.96±0.09#
F 值	160.726	126.433
P 值	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 oe-NC+DMSO 组比较 # P 值<0.05 与 oe-FASN+DMSO 组比较(SNK-q 检验)

表 20 奥利司他介导 FASN 的表达对 HepG2 细胞中中性脂质含量、甘油水平和游离脂肪酸水平的影响

Table 20 Effect of Orlistat-mediated FASN expression on neutral lipid content, glycerol level and free fatty acid level in HepG2 cells

($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	中性脂质含量 (mg/L)	甘油水平 (mg/L)	游离脂肪酸水平
oe-NC+DMSO 组	6.83±0.79	7.38±0.38	1.00±0.10
oe-NC+Orlistat 组	3.37±0.38*	3.83±0.12*	0.28±0.02*
oe-FASN+DMSO 组	11.76±0.99*	11.83±0.32*	2.01±0.21*
oe-FASN+Orlistat 组	7.76±0.80#	8.83±0.37#	1.71±0.11#
F 值	59.793	332.821	107.735
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

* P 值<0.05 与 oe-NC+DMSO 组比较 # P 值<0.05 与 oe-FASN+DMSO 组比较(SNK-q 检验)

3 讨 论

目前,HCC 仍然是最具侵袭性和致命的肿瘤类型之一[2]。虽然治疗 HCC 的方法取得了较大的改善,但由于 HCC 是一种具有复杂分子机制的高度异质性肿瘤[29],治疗效果仍不尽如意[30]。因此,亟需深入了解 HCC 发生发展的分子机制,寻找 HCC 治疗靶点,这对于 HCC 治疗进展有重要的意义。

基于 TCGA 数据和生物信息分析基础,本研究显示 FASN 在 HCC 肿瘤样本中表达上调。研究[30]认为 FASN 在乳腺癌组织和细胞中高表达,FASN 通过介导糖酵解过程,进而促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭。研究[30]显示 FASN 在骨肿瘤细胞中高表达,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/转化相关蛋白 53(transformation-related protein 53,P53)信号通路通过上调 FASN 表达促进骨癌细胞增殖。研究[31]显示,与对照组相比,胃腺癌患者血清中 FASN 水平显著升高,FASN 基因的表达与弥漫性肿瘤患者和较差的生存率相关。本研究通过一系列的功能实验显示敲低 FASN 能显著抑制 HCC 细胞的增殖,并诱导细胞凋亡,这与 Gong 等[32]研究结果相吻合。以上结果表明 FASN 在肿瘤的发生和发展起到关键作用,提示抑制 FASN 可能是 HCC 治疗的有效策略。

细胞能量代谢的重编程被广泛认为是癌症的新标志[33]。脂肪酸代谢重编程是恶性肿瘤的新特征。脂肪酸代谢由维持能量稳态的合成代谢和分解代谢组成。脂肪酸合成和分解之间失去平衡可能导致脂肪酸水平不足或脂质积累[34]。目前,脂肪酸代谢重编程在肿瘤进展中的作用受到诸多研究者的关注,如 Garcia 等[35]显示脂肪酸结合蛋白 5(fatty acid-binding protein 5, FABP5)参与脂肪酸合成,FABP5 的表达促进 FASN 和 SCD1 等脂肪酸合成相关酶的表达,并且 FABP5 的表达是肺腺癌细胞周期进展、迁移和体内肿瘤生长所必需的。固醇辅酶 A 去饱和酶 1(Stearoyl-CoA desaturase-1, SCD1)作为不饱和脂肪酸合成酶的限速酶,在肺腺癌中高表达,并且是细胞增殖、迁移和侵袭所必须的,并且晚期肺腺癌患者中 SCD1 高表达,预后较差[36]。在 HCC 中,酰基辅酶 A 硫酯酶 9(Acyl-CoA thioesterase, ACOT9)通过调节 HCC 细胞中脂肪酸代谢的重编程促进肿瘤生长和转移[19];长链非编码 RNA NEAT1 通过靶向 miR-124-3p/甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)轴,调节异常脂解,驱动 HCC 细胞增殖[36]。在本研究中,证实 FASN 可以通过调节脂肪酸代谢促进 HCC 细胞中的中性脂质累积,进而促进肿瘤细胞增殖。以上结果提示靶向脂质代谢途径可能是肿瘤治疗的有效靶标。此外,本研究结果表明 FASN9 是 HCC 细胞代谢中重要调控分子,提示 FASN 可能是抑制 HCC 脂质代谢途径重要靶点,也为基于代谢重编程途径治疗 HCC 提供了新的策略。

近年来,许多代谢酶已经被作为研究肿瘤靶向治疗的目标。奥利司他(Orlistat)是一种不可逆的胰腺和胃脂肪酶抑制剂,也是一种 FASN 抑制剂[37]。据报道[38]抗肥胖药奥利司他通过抑制信号转导子和转录激活子 3(signal transducers and activators of transduction-3, STAT3)和核因子 κB(nuclear factor kappa-B, NF-κB)介导的信号转导减轻西方饮食驱动的结肠炎相关性结肠癌的肿瘤进展;奥利司他通过下调细胞周期蛋白 B1 来增强口腔鳞状细胞癌细胞对顺铂和紫杉醇的化学敏感性[39]。在 HCC 中,奥利司他通过调节细胞代谢使

HCC细胞对索拉非尼耐药性再敏感。本研究结果也同样证实奥利司他通过抑制FASN的表达，抑制HCC细胞的增殖并诱导细胞凋亡。

综上所述，本研究证实在HCC中，奥利司他介导FASN的表达抑制调控脂肪酸代谢途径促进肿瘤细胞增殖的分子机制，显示为HCC患者提供了有价值的治疗靶点，并为HCC机制的研究开辟了新的前景。然而本研究也有不足之处，未探索FASN上游调控分子以及下调调控通路。本团队拟在将来继续探索HCC中影响脂质代谢的调控分子及FSAN促肿瘤增殖的分子调控机制。本研究将为通过靶向脂质代谢途径指导HCC的治疗提供新的方向。

[参考文献]

[1] Lee TK, Guan XY, Ma S. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma-from origin to clinical implications[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(1): 26－44.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209－249.

[3] Serper M, Taddei TH, Mehta R, et al. Association of provider specialty and multidisciplinary care with hepatocellular carcinoma treatment and mortality[J]. Gastroenterology, 2017, 152(8): 1954－1964.

[4] Kudo M, Ueshima K, Ikeda M, et al. Randomised, multicentre prospective trial of transarterial chemoembolisation (TACE) plus sorafenib as compared with TACE alone in patients with hepatocellular carcinoma: TACTICS trial[J]. Gut, 2020, 69(8): 1492－1501.

[5] Mazzaferro V, Citterio D, Bhoori S, et al. Liver transplantation in hepatocellular carcinoma after tumour downstaging (XXL): a randomised, controlled, phase 2b/3 trial[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(7): 947－956.

[6] Xu J, Shen J, Gu S, et al. Camrelizumab in combination with apatinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma (RESCUE): a nonrandomized, open-label, phase Ⅱ trial[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(4): 1003－1011.

[7] Berzigotti A, Reig M, Abraldes JG, et al. Portal hypertension and the outcome of surgery for hepatocellular carcinoma in compensated cirrhosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Hepatology, 2015, 61(2): 526－536.

[8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7－34.

[9] Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: still emerging[J]. Cell Metab, 2022, 34(3): 355－377.

[10] Martinez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(10): 669－680.

[11] Stine ZE, Schug ZT, Salvino JM, et al. Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology[J]. Nat Rev Drug Discov, 2022, 21(2): 141－162.

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

[13] Cao Y. Adipocyte and lipid metabolism in cancer drug resistance[J]. J Clin Invest, 2019, 129(8): 3006－3017.

[14] Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31－46.

[15] Fu Y, Zou T, Shen X, et al. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies[J]. Med Comm (2020), 2021, 2(1): 27－59.

[16] Bacci M, Lorito N, Smiriglia A, et al. Fat and furious: lipid metabolism in antitumoral therapy response and resistance[J]. Trends Cancer, 2021, 7(3): 198－213.

[17] Snaebjornsson MT, Janaki-Raman S, Schulze A. Greasing the wheels of the cancer machine: the role of lipid metabolism in cancer[J]. Cell Metab, 2020, 31(1): 62－76.

[18] Munir R, Lisec J, Swinnen JV, et al. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress[J]. Br J Cancer, 2019, 120(12): 1090－1098.

[19] Wang B, Zhang H, Chen YF, et al. Acyl-CoA thioesterase 9 promotes tumour growth and metastasis through reprogramming of fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2022, 42(11): 2548－2561.

[20] Chen J, Ding C, Chen Y, et al. ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway[J]. Cancer Lett, 2021, 502: 154－165.

[21] Maier T, Jenni S, Ban N. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 A resolution[J]. Science, 2006, 311(5765): 1258－1262.

[22] Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme[J]. Biochemistry, 1989, 28(11): 4523－4530.

[23] Zaytseva YY, Rychahou PG, Gulhati P, et al. Inhibition of fatty acid synthase attenuates CD44-associated signaling and reduces metastasis in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 2012, 72(6): 1504－1517.

[24] Uddin S, Hussain AR, Ahmed M, et al. High prevalence of fatty acid synthase expression in colorectal cancers in Middle Eastern patients and its potential role as a therapeutic target[J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104(7): 1790－1801.

[25] Jiang L, Wang H, Li J, et al. Up-regulated FASN expression promotes transcoelomic metastasis of ovarian cancer cell through epithelial-mesenchymal transition[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(7): 11539－11554.

[26] Lei T, Zhu Y, Jiang C, et al. MicroRNA-320 was downregulated in non-small cell lung cancer and inhibited cell proliferation, migration and invasion by targeting fatty acid synthase[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(2): 1255－1262.

[27] Tao T, Su Q, Xu S, et al. Down-regulation of PKM2 decreases FASN expression in bladder cancer cells through AKT/mTOR/SREBP-1c axis[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 3088－3104.

[28] Tirado-Velez JM, Joumady I, Saez-Benito A, et al. Inhibition of fatty acid metabolism reduces human myeloma cells proliferation[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46484.

[29] Liang J, Chen W, Ye J, et al. Single-cell transcriptomics analysis reveals intratumoral heterogeneity and identifies a gene signature associated with prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2022, 42(2): BSR20212560.

[30] Celsa C, Giuffrida P, Stornello C, et al. Systemic therapies for hepatocellular carcinoma: the present and the future[J]. Recenti Prog Med, 2021, 112(2): 110－116.

[31] Ezzeddini R, Taghikhani M, Somi MH, et al. Clinical importance of FASN in relation to HIF-1alpha and SREBP-1c in gastric adenocarcinoma[J]. Life Sci, 2019, 224: 169－176.

[32] Gong J, Shen S, Yang Y, et al. Inhibition of FASN suppresses migration, invasion and growth in hepatoma carcinoma cells by deregulating the HIF-1alpha/IGFBP1 pathway[J]. Int J Oncol, 2017, 50(3): 883－892.

[33] Zhang C, Liao Y, Liu P, et al. FABP5 promotes lymph node metastasis in cervical cancer by reprogramming fatty acid metabolism[J]. Theranostics, 2020, 10(15): 6561－6580.

[34] Kuo CY, Ann DK. When fats commit crimes: fatty acid metabolism, cancer stemness and therapeutic resistance[J]. Cancer Commun (Lond), 2018, 38(1): 47.

[35] Garcia KA, Costa ML, Lacunza E, et al. Fatty acid binding protein 5 regulates lipogenesis and tumor growth in lung adenocarcinoma[J]. Life Sci, 2022, 301: 120621.

[36] Liu X, Liang Y, Song R, et al. Long non-coding RNA NEAT1-modulated abnormal lipolysis via ATGL drives hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 90.

[37] Schcolnik-Cabrera A, Chavez-Blanco A, Dominguez-Gomez G, et al. Orlistat as a FASN inhibitor and multitargeted agent for cancer therapy[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2018, 27(5): 475－489.

[38] Jin BR, Kim HJ, Sim SA, et al. Anti-obesity drug orlistat alleviates western-diet-driven colitis-associated colon cancer via inhibition of STAT3 and NF-kappaB-mediated signaling[J]. Cells, 2021, 10(8): 2060.

[39] Almeida LY, Moreira FDS, Santos G, et al. FASN inhibition sensitizes metastatic OSCC cells to cisplatin and paclitaxel by downregulating cyclin B1[J]. Oral Dis, 2023, 29(2): 649－660.

（本文编辑：何祯）