

Oxyberberín senzibilizuje bunky rakoviny pečene na sorafenib inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7-c-Myc

Abstrakt

Sorafenib je prvolíniovou terapiou pre pacientov s pokročilým štádiom HCC, ale miera jeho klinického vyličenia je neuspokojivá z dôvodu nežiaducich reakcií a liekovej rezistencie. Naliehavo sú potrebné nové alternatívne stratégie na prekonanie rezistencie na sorafenib. Oxyberberín (OBB), hlavný metabolit berberínu in vivo, vykazuje potenciálnu protinádorovú účinnosť pri rôznych ľudských malignitách, vrátane rakoviny pečene. Zostáva však neznáme, či a ako OBB senzibilizuje bunky rakoviny pečene na sorafenib.

Metódy:

Na stanovenie synergického účinku OBB a sorafenibu na zabíjanie buniek HCC sa použili testy bunkovej životaschopnosti, farbenie trypanovou modrou a prietoková cytometria. Na dešifrovanie mechanizmu, ktorým OBB senzibilizuje sorafenib, sa použili testy PCR, western blot, koimunoprecipitácia a RNA interferenčné testy. Na konsolidáciu našich zistení sa použili modely xenoimplantátu HCC a klinické vzorky HCC.

Výsledky:

Prvýkrát sme zistili, že OBB senzibilizoval bunky rakoviny pečene na sorafenib, čím sa zvýšil jeho inhibičný účinok na rast buniek a indukciu apoptózy in vitro. Je zaujímavé, že sme pozorovali, že OBB zvýšil citlivosť buniek HCC na sorafenib znížením expresie ubikvitín-špecifickej peptidázy 7 (*USP7*), dobre známeho génu podporujúceho nádor. Mechanicky OBB inhiboval transkripciu *USP7* sprostredkovanú notch homológom 1, čo viedlo k downregulácii homológu vírusového onkogénu V-Myc vtácej myelocytomatózy (c-Myc), ktorý synergizoval so sorafenibom na potlačenie rakoviny pečene. Okrem toho výsledky na zvieratách ukázali, že spoločná liečba s OBB a sorafenibom významne inhibovala rast nádoru xenoimplantátov rakoviny pečene u myši.

Závery:

Tieto výsledky naznačujú, že OBB zvyšuje citlivosť buniek rakoviny pečene na sorafenib prostredníctvom inhibície signálnej dráhy homológu 1-USP7-c-Myc, ktorá potenciálne poskytuje novú terapeutickú stratégiu pre rakovinu pečene na zlepšenie účinnosti sorafenibu.

ÚVOD

Rakovina pečene je rozšírená a smrteľná malignita, ktorá v roku 2020 spôsobila viac ako 830 000 úmrtí. Je to ôsma najčastejšia rakovina u žien a piata najčastejšia rakovina u mužov. Možnosti liečby včasného štádia rakoviny pečene zahŕňajú resekciu nádoru, abláciu a transplantáciu pečene; včasná diagnostika je však ťažká pre nedostatok typických symptómov. Sorafenib, perorálny multikinázový inhibítor, je od roku 2007 štandardnou terapiou prvej línie pre pokročilý karcinóm pečene. Blokuje signálnu dráhu Raf serín/treonínkinázy/mitogénom aktivovanej proteínkinázy/extracelulárne regulovaných proteínkináz na inhibíciu proliferácie nádorových buniek a cieľi na signalizáciu receptora PDGF a receptora VEGF na inhibíciu nádorovej angiogenézy. Rezistencia na sorafenib je však významným problémom pri liečbe rakoviny pečene. Pochopenie základných molekulárnych mechanizmov rezistencie na sorafenib je nevyhnutné na zlepšenie prežitia pacientov a vývoj účinnejších stratégií protinádorovej liečby rakoviny pečene.

Ubikvitín-špecifická peptidáza 7 (USP7), tiež známa ako ubikvitín-špecifická proteáza spojená s herpesom, je široko študovaný deubikvitínový enzým, ktorý odstraňuje polyubikvitínové reťazce zo svojich downstream cieľových proteínov. USP7 reguluje bunkový cyklus, reakciu na poškodenie DNA, apoptózu, imunitnú reakciu a mnoho ďalších bunkových procesov zacielením na rôzne substráty, ako sú Myc, p53, PTEN, Claspin a Foxp3. Dysregulácia stability a funkcie jeho substrátov závislá od USP7 je rozhodujúca pre iniciáciu, progresiu a recidívu niekoľkých nádorov vrátane rakoviny pľúc, kolorektálneho karcinómu, prsníka, neuroblastómu, meduloblastómu, prostaty a pečene. Napriek vývoju desiatok inhibítorov USP7, ich klinické aplikácie čelia prekážkam, ako je nízka rozpustnosť, vedľajšie účinky a obavy o bezpečnosť. Skrining starých liekov alebo prírodných produktov s obmedzenými vedľajšími účinkami, ktoré inhibujú USP7, je teda vysoko atraktívny pre liečbu rakoviny.

Berberín (BBR) je alkaloid izochinolinového derivátu izolovaný z Huang Lian (Koptis čínsky) a iných čínskych liečivých bylín a je účinný pri liečbe rôznych klinických ochorení, ako je hnačka, metabolický syndróm a cukrovka. BBR má protirakovinovú aktivitu zahŕňajúcu viaceré signálne dráhy a biologické procesy a má inhibičné účinky na rôzne druhy rakoviny, ako je rakovina hrubého čreva, rakovina pečene, glioblastóm a rakovina prsníka. BBR potláča AKT serín/treonínkinázu, mitogénom aktivovanú proteínkinázu a proteínkinázu AMP-aktivovanú katalytickú podjednotku alfa dráhy a priamo inhibuje proliferáciu, pohyb, inváziu a metastázy rakovinových buniek. Ďalšie štúdie však zistili, že prírodný oxoderivát BBR (oxyberberín, OBB) má podľa všetkého vynikajúce biologické aktivity a sľubné medicínske aplikácie. OBB má vyššiu výskumnú a aplikačnú hodnotu vďaka zvýšenej lipofilite a ľahšej absorpcii cez biofilmy, keď sa BBR metabolizuje na jeho oxidovaný derivát OBB.

Skúmali sme, či OBB zvyšuje protirakovinovú účinnosť sorafenibu a dešifruje súvisiace molekulárne mechanizmy. Zistili sme, že OBB dramaticky zvýšil citlivosť buniek rakoviny pečene na sorafenib inhibíciou aktivácie notch homologu 1 (NOTCH1), potlačením transkripcie USP7 a podporou degradácie c-Myc. Naše výsledky naznačujú, že OBB môže byť novým kandidátom na liek zameraný na USP7 a že kombinácia OBB a sorafenibu pri rakovine pečene je nová stratégia, ktorá si zaslúži ďalšie skúmanie.

METÓDY

Bunková kultúra

Bunková línia ľudskej rakoviny pečene Hep3B bola zakúpená od American Type Culture Collection a pasážovaná počas < 6 mesiacov v laboratóriu. Bunková línia Huh7 bola získaná z Fudan Cell Bank (Shanghai, Čína) a bunková línia ľudskej rakoviny pečene LM3 bola zakúpená od BeiNa Culture Collection (Peking, Čína). Všetky bunky boli kultivované v médiu DMEM (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) obsahujúcom 10 % fetálneho hovädzieho séra, streptomycín (100 µg/ml) a penicilín (100 U/ml) pri 37 °C v 5. % CO₂ inkubátor .

Činidlá a protilátky

BBR (kat. č. HY-N0716), OBB (kat. č. HY-N5027) a sorafenib (kat. č. HY-10201) boli zakúpené od MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ). P22077 (kat. č. S7133) a LY2109761 (kat. č. S2704) boli zakúpené od Selleck (Houston, TX). TGF-p (kat. č. P70543) bol zakúpený od MCE (New Jersey). Súprava na počítanie buniek-8 (kat. č. CK04) bola

zakúpená od Dojindo Molecular Technologies Inc. (Kumamoto, Japonsko). Súprava na detekciu apoptózy Annexin V-FITC (kat. č. C1062) bola zakúpená od Beyotime Institute of Biotechnology (Shanghai, Čína). Protilátky proti poly (ADP-ribóza) polymeráze 1 (PARP; kat. č. 9532), c-Myc (kat. č. 18583) a USP7 (kat. č. 4833), členom rodiny SMAD 3 (kat. č. 9523), Notch 1 (kat. č. 4147), kaspáza 3 (kat. č. 9662), ubikvitín (kat. č. 3936) a fosforylovaná c-Jun N-terminálna kináza (kat. č. 9255). od Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA). Protilátky proti FOXO6 (kat. č. 19122-1-AP) boli získané od Proteintech (Chicago, IL). Protilátky proti glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáze (GAPDH) (kat. č. sc-137179) boli získané od Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA).

Kvantitatívna PCR

Bunky hepatokarcinómu boli lyzované činidlom TRIzol (ComWin Biotechnology, Peking, Čína, CW0580S), aby sa extrahovala celková RNA a syntéza prvého vlákna komplementárnej DNA sa uskutočnila pomocou transkriptázy M-MLV (Invitrogen, CA, C28025-011). Na kvantifikáciu hladín mRNA sa uskutočnila kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase pomocou SYBR kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase Green Master Mix (TAKARA, Tokio, Japonsko, RR091A) v objeme 20 μ l podľa pokynov výrobcu pomocou zariadenia LightCycler96. (Roche) zariadenie. Použili sme 2 referenčné gény (*GAPDH* a β -*aktín*) pre všetky kvantitatívne testy polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase.

Použité priméry boli nasledovné: *USP7* forward: TCGTCGCACATTGAGACGG, reverzný: CTTGTCGGCATGGTTGGGAAT; *GAPDH* dopredu:ACGGATTTGGTCGTATTGGG, dozadu:CGCTCCTGGAAGATGGTGAT; β -*aktín* vpred: CATGTACGTTGCTATCCAGGC, reverzný, CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3.

Test životaschopnosti buniek

Test súpravy-8 na počítanie buniek sa uskutočnil tak, ako je opísané. Stručne, po ošetrení uvedenými činidlami sa bunky nasadené na 96-jamkové doštičky odstránili, aby sa zmerali hodnoty absorpcie pri vlnovej dĺžke 450 nm pomocou čítačky mikrodostičiek. Následne sa vypočítala a normalizovala relatívna miera prežitia každej skupiny.

Vylučovací test trypanovej modrej

Ošetrené bunky boli štiepené a zozbierané trypsínom a resuspendované vo vhodnej bunkovej suspenzii. Suspendované bunky (100 μ l) a 100 μ l roztoku trypanovej modrej (2X) sa odsali, jemne premiešali a farbili počas 5 minút. Niektoré zo zafarbených buniek sa spočítali pod svetelným mikroskopom s platňou na počítanie krvných buniek, aby sa spočítali modré bunky a celkový počet buniek. Bunky, ktoré nedokázali vylúčiť farbivo, boli definované ako mŕtve. (Pre presnú kvantifikáciu obsahovala každá vzorka buniek aspoň 500 buniek.) Celková miera bunkovej smrti (%) = počet modrých buniek/celkový počet buniek x 100.

Detekcia apoptózy

Na vyhodnotenie apoptózy sa použila súprava na detekciu apoptózy Annexin V-FITC (kat. č. APOAF-50TST, Sigma-Aldrich). V stručnosti, ošetrené bunky boli zozbierané a inkubované s Annexinom V-FITC a propidium jodidom pri teplote miestnosti počas 10 minút. Následne boli vzorky analyzované pomocou prietokovej cytometrie (CytoFLEX, Beckman Coulter,

Miami, FL). Na pozorovanie jadrovej morfológie sa použil Hoechst 33258 na farbenie ošetrovaných buniek. Bunky boli fixované metanolovou kyselinou octovou počas 10 minút a Hoechst 33258 (10 ug/ml; Shanghai Biotech Research Institute, Čína) počas 10 minút. Následne boli bunky dvakrát premyté PBS, pozorované a zobrazené pomocou fluorescenčného mikroskopu. Apoptotické bunky boli identifikované na základe morfológických zmien v jadre.

Western blot analýza

Bunky sa zozbierali a pripravili sa celobunkové lyzáty. Koncentrácie proteínov sa merali a kalibrovali s použitím proteínovej súpravy na testovanie kyseliny bicinchonínovej (kat. č. P0012; Beyotime Institute of Biotechnology). Proteínové extrakty boli oddelené 10 % alebo 12 % SDS-PAGE a prenesené na polyvinylidéndifluoridové membrány (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA). Membrána sa potom inkubovala s primárnou protilátkou, potom nasledovala inkubácia so sekundárnou protilátkou značenou chrenovou peroxidázou. GAPDH sa použil ako kontrola nanášania proteínu.

Plazmidy a malá interferenčná transfekcia RNA

Plazmidy pcDNA3.1, pcDNA3.1-USP7, pcDNA3.1-c-Myc, pcDNA3.1-FOXO6, pcDNA3.1-notch intracelulárna doména (NICD), USP7 malá interferenčná RNA (siRNA), c-Myc siRNA a kontrolné siRNA boli získané od Guangzhou FuluGen Corporation (Guangzhou, Čína). Plazmid alebo siRNA sa transfekovali použitím Lipofectamine 3000 podľa protokolu výrobcu (Invitrogen). Činidlo siGENOME SMARTpool (Dharmacon) sa zriedilo médiom s redukovaným sérom Opti MEM (Invitrogen). Cieľové sekvencie siRNA boli USP7 (5'-CCCAATTATTCGCGGCAAA-3'), Notch1 (5'-GGAGCATGTGTAACATCAA-3') a c-Myc (5'-GUCAAGAGGCGAACACACA-3').

Pokusy na zvieratách

Na pokusy in vivo sa použili samce nahých myší BALB/c (21–23 g, 5–6 týždňov staré) od spoločnosti Beijing Vital River Experimental Animal Co., Ltd. Zvieratá boli umiestnené v zariadení bez patogénov za stabilných podmienok a kŕmené podľa smerníc Výboru pre starostlivosť o zvieratá a etiku Armádnej lekárskej univerzity. Myši model xenoinplantátu rakoviny pečene bol vytvorený injekciou suspenzie buniek Hep3B do nahých myší. Keď nádor dosiahol 100 mm³, myši boli náhodne rozdelené do 4 skupín (6 myši/skupina) a liečené vehikulom, OBB (10 mg/kg, intraperitoneálne), sorafenibom (30 mg/kg, perorálnou sondou) alebo kombinácia oboch. Veľkosť nádoru a hmotnosť myši sa merali každé 3 dni. Po 31 dňoch boli všetky nahé myši usmrtené a nádory boli vyrezané. Hmotnosť nádoru xenoštetu každej myši sa merala a fixovala v 4% paraformaldehyde na histopatologické vyšetrenie alebo sa zmrazila v tekutom dusíku na testy Western blot a PCR. Všetky pokusy na zvieratách sa uskutočnili v súlade so smernicami pre starostlivosť o zvieratá a boli posúdené a schválené etickou komisiou Armádnej lekárskej univerzity (č. AMUWEC20211346).

Imunohistochemia

Xenoinplantátové nádorové tkanivo bolo fixované v 4% paraformaldehyde, zaliate do parafínu, narezané a zafarbené hematoxylínom a eozínom. Imunohistochemické farbenie sa uskutočnilo podľa štandardného protokolu. Po blokování aktivity endogénnej peroxidázy a získaní antigénu boli rezy inkubované s primárnymi protilátkami proti USP7 (korporácia pre

technológiu bunkovej signalizácie, riedenie 1:100, kat. 4833), NOTCH1 (korporácia pre signalizačnú technológiu buniek, 1:200, kat. 4147), Ki- 67 (Proteintech, riedenie 1:1000) a kaspáza 3 (korporácia pre technológiu bunkovej signalizácie, 1:1000, kat. 9662). Potom sa použila súprava substrátu diaminobenzidínperoxidázy na farbenie jadier buniek. Na kvantifikáciu počtu pozitívnych buniek sa použil softvér Image-Pro Plus (Media cybernetics Inc., Bethesda, MD). Vyhodnoťte aspoň 5 náhodne vybraných polí s vysokým výkonom ($\times 400$) v každom reze tkaniva. Výskumníci, ktorí hodnotili sklíčka a analyzovali údaje, nevedeli o experimentálnych postupoch na zvieratách.

Koimunoprecipitácia

Po dosiahnutí 80 % konfluencie v 10 cm miskách boli bunky podrobené rôznym ošetreniam. Bunky boli lyzované pomocou lyzačného pufru (Beyotime, Shanghai, Čína). Následne boli k lyzátom pridané králičie alebo myšie IgG negatívne kontroly (Beyotime, Shanghai, Čína) alebo zodpovedajúce primárne protilátky v pomere 2 μg na 1 mg celkového proteínu. Po inkubácii pri 4 °C cez noc sa ku každej vzorke oddelene pridalo 40 μl proteín A/G agarózy (Santa Cruz, CA) a inkubovalo sa pri teplote miestnosti 2 hodiny. Zmesi sa potom 5-krát premýli ľadovo studeným PBS a 5-krát sa denaturovali 1 x SDS-PAGE nanášacím pufrom, po čom nasledoval Western blot.

Vzorky pečene od pacientov s HCC

28 pacientov s HCC, ktorí podstúpili resekčnú operáciu HCC v tretej pridruženej nemocnici lekárskej univerzity v Chongqing v roku 2023, bolo zaradených do tejto štúdie so súhlasom etickej komisie tretej pridruženej nemocnice lekárskej univerzity v Chongqing (č. 202386); všetci pacienti poskytli informovaný súhlas. Vzorky zo susedných a rakovinových tkanív sa použili na analýzu Western blot a kvantitatívnu PCR.

Extrakcia jadrového proteínu

Jadrové proteíny z pečenej tkaniv sa získali pomocou súpravy na extrakciu jadrových a cytoplazmatických proteínov (Beyotime, P0028) podľa pokynov výrobcu. Stručne, pečenej tkanivá (40 mg) sa homogenizovali a lyzovali pufriami A a B v pomere 20:1. Po 15 minútach inkubácie na ľade sa zrazeniny zhromaždili centrifugáciou pri 1500 g počas 5 minút. Precipitáty boli lyzované pufrom A a inkubované na ľade počas 20 minút. Po doplnení pufrom B sa cytosolické extrakty zhromaždili centrifugáciou pri 12 000 g počas 5 minút. Jadrové pelety sa resuspendovali v pufri na extrakciu jadrového proteínu. Po 30 minútach inkubácie sa jadrové extrakty zhromaždili centrifugáciou pri 12 000 g počas 10 minút.

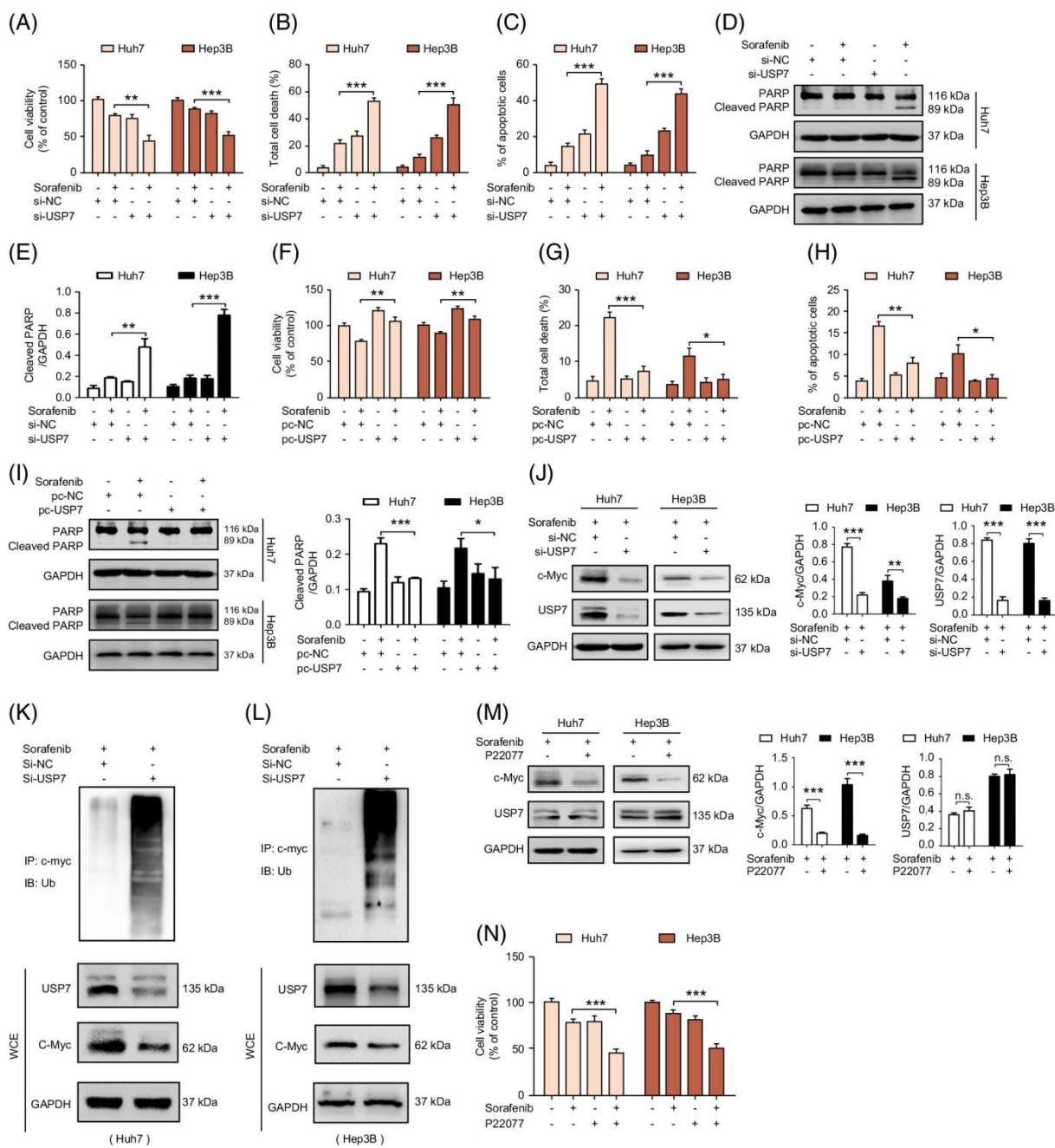
Štatistická analýza

Na vyhodnotenie údajov sa použili softvér GraphPad Prism verzie 6.0 a SPSS 20.0 (oba od GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) (SPSS Inc., Chicago, IL). Údaje sú priemerné výsledky z aspoň 3 samostatných experimentov a sú prezentované ako priemer (\pm SD). Na porovnanie 2 skupín sa použil nepárový alebo párový Studentov *t* test. Jednosmerná ANOVA alebo 2-cestná ANOVA sa použili, keď boli skupiny viac ako 2, a potom sa uskutočnil post hoc Tukeyov test. Keď $p < 0,05$, rozdiel sa považoval za štatisticky významný.

VÝSLEDKY

USP7 výrazne oslabuje účinok sorafenibu proti rakovinovým bunkám pečene

Chemorezistencia často vedie k zlyhaniu liečby nádoru a ubikvitín-špecifická proteáza 7 (USP7) je významným prispievateľom k chemorezistencii. USP7 je prominentne exprimovaný v rôznych malignitách a je spojený so zlou prognózou, čo z neho robí potenciálny terapeutický cieľ pri rakovine. Štúdie ukázali, že USP7 je rozhodujúci pre rezistenciu voči liekom. Pri rakovine pečene potlačenie aktivity USP7 sprostredkované enkurínom významne inhibovalo rezistenciu na sorafenib, čo naznačuje dôležitosť USP7 v rezistencii na sorafenib. Ako je znázornené na obrázku 1A–D, knockdown USP7 pomocou siRNA zacielenej na USP7 významne posilnil cytotoxicitu sorafenibu na bunky rakoviny pečene, vrátane inhibície proliferácie (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$) (obrázok 1A), bunka podpora smrti (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$) (obrázok 1B) a indukcia apoptózy (Huh7, $p < 0,001$; Hep3B, $p < 0,001$) (obrázok 1C). V súlade s týmito výsledkami sa PARP štiepená molekulou súvisiacou s apoptózou významne zvýšila v bunkách rakoviny pečene po liečbe OBB a sorafenibom (Huh7, $p < 0,001$; Hep3B, $p < 0,001$) (obrázok 1D, E). Okrem toho sme zistili, že nadmerná expresia USP7 výrazne znížila zabíjací účinok sorafenibu na bunky rakoviny pečene ($p < 0,05$) (obrázok 1F–I). Tieto výsledky ukázali, že knockdown USP7 významne senzibilizoval sorafenib na potlačenie buniek rakoviny pečene. Ukázalo sa, že c-Myc, dobre známy downstream cieľový proteín USP7, sprostredkováva chemorezistenciu na sorafenib. Preto sme určili, či hladiny proteínu c-Myc môžu byť ovplyvnené liečbou siRNA alebo inhibítorom USP7 v prítomnosti sorafenibu. Výsledky ukázali, že siRNA (si-USP7) alebo inhibítor (P22077) USP7 dramaticky zvýšili ubikvitináciu c-Myc a znížili hladiny proteínu c-Myc (obrázok 1J–M), čo naznačuje, že USP7-c-Myc sa môže podieľať na chemorezistencii bunky rakoviny pečene na sorafenib. Nakoniec test na počítanie buniek kit-8 odhalil, že kombinácia sorafenibu a P22077 významne znížila životaschopnosť buniek rakoviny pečene v porovnaní so samotným sorafenibom alebo P22077 (Huh7, $p < 0,001$; Hep3B, $p < 0,001$) (obrázok 1N). Tieto výsledky naznačujú, že buď inhibícia alebo knockdown USP7 podporuje protinádorový účinok sorafenibu v bunkách rakoviny pečene.

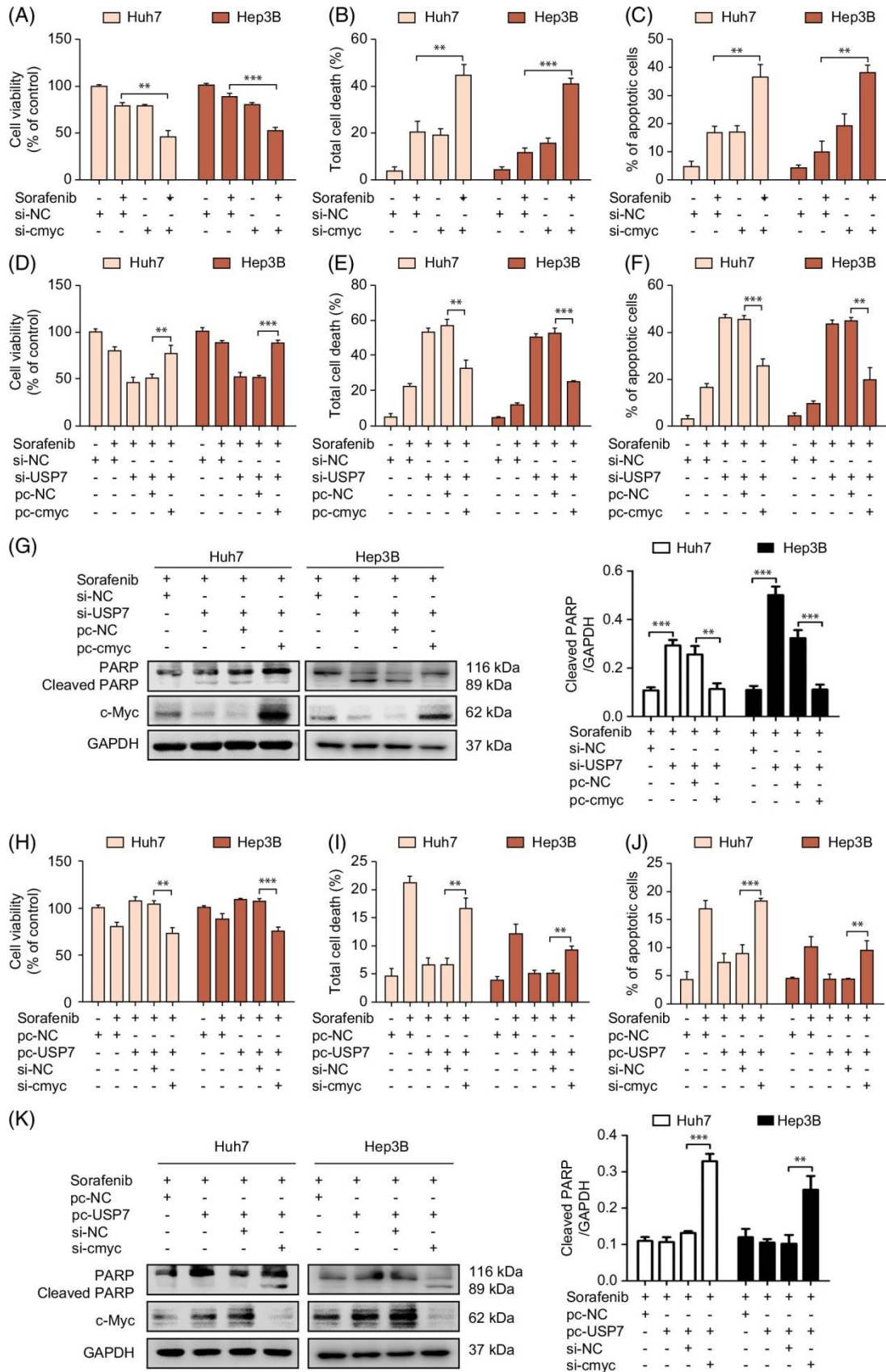


USP7 výrazne oslabuje účinok sorafenibu proti rakovine pečene. (A–E) Huh7 a Hep3B bunky boli transfekované negatívnou kontrolnou siRNA (si-NC) alebo USP7 siRNA (si-USP7) počas 24 hodín, po liečbe sorafenibom (5 μ M) alebo kontrolou vehikula počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8 (A), celková bunková smrť sa vypočítala pomocou farbenia trypanovou modrou (B) a apoptotické bunky sa analyzovali pomocou prietokovej cytometrie (C). Štiepená PARP sa vyhodnotila pomocou Western blotu s GAPDH ako kontrolou nanášania a kvantifikovala sa pomerom štiepenej PARP ku GAPDH (D a E). (F–I) Huh7 a Hep3B bunky boli transfekované negatívnym kontrolným vektorom alebo eukaryotickým expresným plazmidom USP7 (pc-USP7) počas 24 hodín, po liečbe sorafenibom (5 μ M) alebo kontrolou vehikula počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8 (F), celková bunková smrť sa vypočítala pomocou farbenia trypanovou modrou (G) a apoptotické bunky sa analyzovali

pomocou prietokovej cytometrie (H). Odštiepená PARP sa vyhodnotila pomocou Western blotu s GAPDH ako kontrolou nanášania a kvantifikovala sa pomerom odštiepenej PARP ku GAPDH(I). (J) Bunky Huh7 a Hep3B boli transfekované kontrolnou siRNA alebo USP7 siRNA počas 24 hodín, po ošetrení sorafenibom (5 μ M) alebo kontrolou s vehikulom počas 48 hodín. Potom sa hladiny uvedených proteínov vyhodnotili pomocou Western blotu a kvantifikovali sa pomerom c-Myc k GAPDH a USP7 k GAPDH. (K a L) Po ošetrení ako v (J) boli bunky ošetrené 10 μ M MG132 počas 6 hodín pred extrakciou celkového proteínu, potom boli bunky Huh7 (K) a Hep3B (L) lyzované na ko-imunoprecipitačný test s protilátkou USP7 a potom sa použil Western blot na meranie uvedených proteínov. (M) Bunky rakoviny pečene boli ošetrené sorafenibom (5 μ M), inhibítorom USP7 P22077 (10 μ M) alebo kombinovaným sorafenibom P22077 počas 48 hodín; hladiny uvedených proteínov boli hodnotené pomocou Western blotu a kvantifikované pomerom c-Myc ku GAPDH a USP7 ku GAPDH. (N) Po ošetrení ako v (M) sa životaschopnosť buniek merala testom CCK8. Údaje sú uvedené ako priemer \pm SD (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Skratky: c-Myc, V-Myc homológ vírusového onkogénu vtáčej myelocytomatózy; GAPDH, glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenáza; IB, imunoblotovanie; IP, imunoprecipitácia; ns, žiadny význam; PARP, poly (ADP-ribóza) polymeráza; si-NC, negatívna kontrola s malou interferenčnou RNA; si-USP7, USP7 malá interferenčná RNA; WCE, celobunkový extrakt.

USP7 zmierňuje citlivosť buniek rakoviny pečene na sorafenib prostredníctvom upregulácie c-Myc

Vyššie uvedené výsledky ukazujú, že USP7 hrá dôležitú úlohu v terapeutickú rezistenciu na sorafenib. C-Myc je dobre známy downstream cieľový proteín USP7 a považuje sa za jeden z najdôležitejších dôvodov terapeutickú rezistencie sorafenibu, ako je znázornené na obrázku 2A–C, umlčanie c-Myc výrazne zvýšilo toxicitu sorafenibu ($p < 0,01$). Na ďalšie overenie úlohy c-Myc v rezistencii na sorafenib sprostredkovanú USP7 sa eukaryotické expresné plazmidy si-USP7 a USP7 kotransfekovali do buniek rakoviny pečene v prítomnosti alebo neprítomnosti sorafenibu. Ako je znázornené na obrázku 2D–F, ticho USP7 významne zvýšilo potlačenie proliferácie sprostredkované sorafenibom (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$), apoptózu (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$) a indukcia bunkovej smrti (Huh7, $p < 0,001$; Hep3B, $p < 0,01$), ktorá bola dramaticky znížená nadmernou expresiou c-myc. Okrem toho nadmerná expresia c-Myc pozoruhodne zoslabila umlčanie USP7 v kombinácii so sorafenibom indukovanou upreguláciou štiepenej PARP ($p < 0,001$) (obrázok 2G). Tieto výsledky naznačujú, že nadmerná expresia c-Myc významne oslabila účinok sorafenibu na zabíjanie nádorov v kombinácii s umlčaním USP7, čo naznačuje, že os USP7-c-Myc hrá zásadnú úlohu pri regulácii citlivosti buniek rakoviny pečene na sorafenib. Aby sme ďalej overili dôležitosť dráhy USP7-c-Myc v rezistencii na sorafenib, kotransfekovali sme c-Myc siRNA s eukaryotickými expresnými plazmidmi USP7 v prítomnosti sorafenibu. Výsledky ukázali, že nadmerná expresia USP7 významne inhibovala sorafenibom sprostredkovanú inhibíciu proliferácie, bunkovú smrť a indukciu apoptózy, čo bolo zvrátené umlčaním c-Myc ($p < 0,01$) (obrázok 2H–J). V súlade s týmito výsledkami sa expresia molekuly štiepenej PARP súvisiacej s apoptózou v skupine s kombináciou zvýšila po umlčaní c-Myc ($p < 0,01$) (obrázok 2K). Tieto výsledky naznačujú, že os USP7-c-Myc je dôležitou signálnou dráhou vedúcou k rezistencii na sorafenib a zacielenie na signálnu dráhu USP7-c-Myc je uskutočniteľnou stratégiou na zvýšenie terapeutického účinku sorafenibu. Celkovo tieto zistenia naznačujú, že dráha USP7-c-Myc významne zmierňuje účinky sorafenibu proti rakovine pečene.

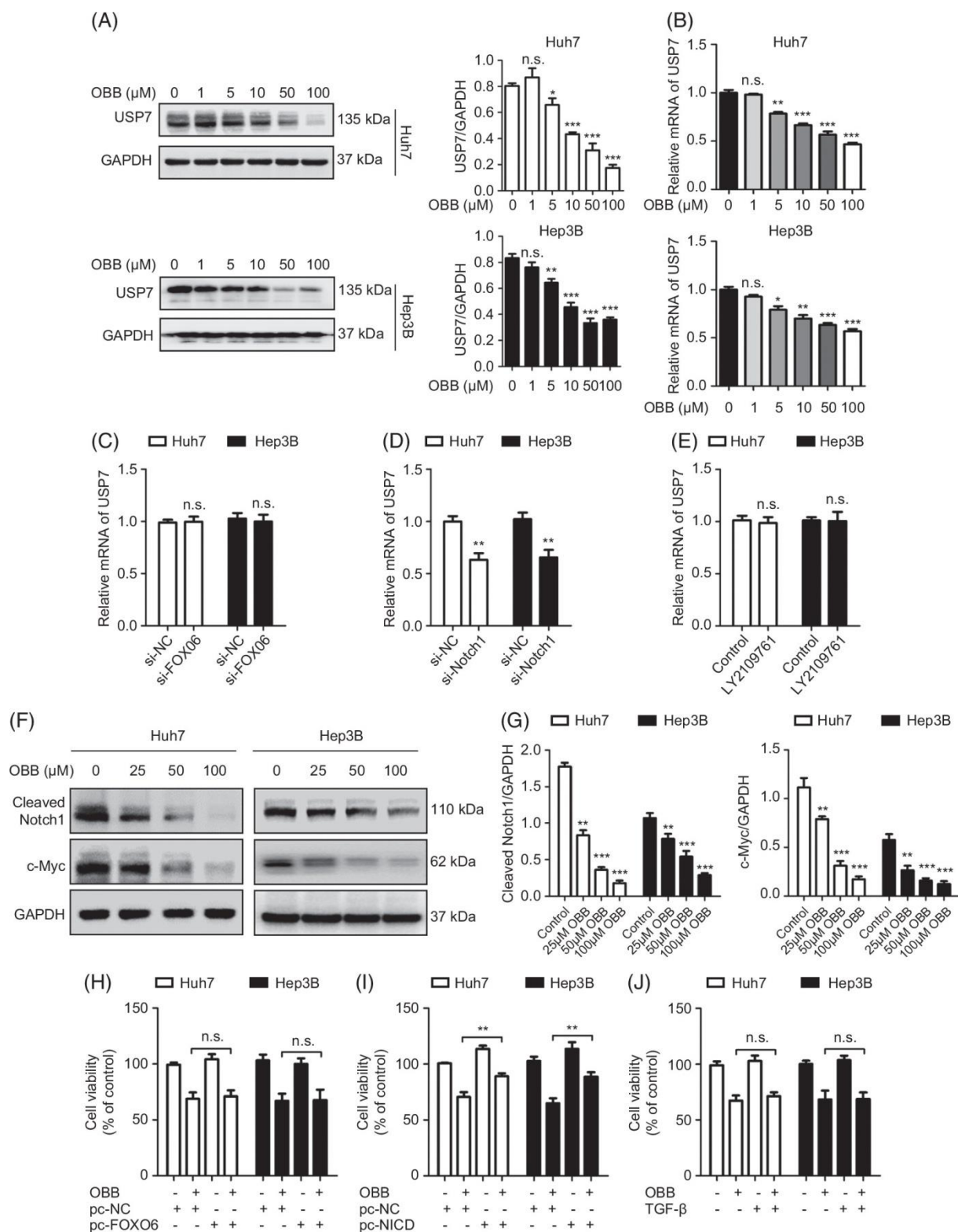


USP7 znižuje citlivosť buniek rakoviny pečene na sorafenib prostredníctvom upregulácie c-Myc. (A-C) Huh7 a Hep3B bunky boli transfekované si-NC alebo c-Myc siRNA (si-cmyc) počas 24 hodín, po ošetrení sorafenibom (5 μ M) alebo kontrolou vehikula počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8 (A), celková smrť buniek sa vypočítala pomocou farbenia trypanovou modrou (B) a

apoptotické bunky sa analyzovali pomocou prietokovej cytometrie (C). (D–K) Bunky Huh7 a Hep3B boli kotransfekované s uvedenými plazmidmi a siRNA počas 24 hodín, po liečbe sorafenibom (5 μ M) alebo po kontrole vehikula počas 48 hodín. Potom sa skúmala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8 (D a H), celková bunková smrť sa vypočítala pomocou farbenia trypanovou modrou (E a I) a apoptotické bunky sa analyzovali pomocou prietokovej cytometrie (F a J) a štiepili sa PARP a c-Myc sa vyhodnotili pomocou Western blotu s GAPDH ako kontrolou zaťaženia a kvantifikovali sa pomerom štiepenej PARP ku GAPDH (G a K). Údaje sú uvedené ako priemer \pm SD (n=3). ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Skratky: c-Myc, V-Myc homológ vírusového onkogénu vtácej myelocytomatózy; GAPDH, glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenáza; PARP, poly (ADP-ribóza) polymeráza; si-NC, negatívna kontrola s malou interferenčnou RNA; si-USP7, USP7 malá interferenčná RNA.

OBB potláča expresiu USP7 inhibíciou NOTCH1

BBR, prírodný alkaloid získaný z čínskych bylín, sa používa na liečbu úplavice a kolitídy. Preukázal rôzne farmakologické účinky, vrátane zlepšenia cukrovky, zápalu, NAFLD a rakoviny. Jeho koncentrácia v krvi je však nízka a pre jeho bioaktivitu sú rozhodujúce metabolity sprostredkované črevnou mikroflórou. OBB, hlavný metabolit BBR, má vyššiu biologickú dostupnosť a je vnímaný ako prostriedok na zlepšenie cukrovky, zápalu a NAFLD. Naším cieľom bolo zistiť, či má OBB protinádorové vlastnosti podobné vlastnostiam BBR. Skrínovali sme OBB z niekoľkých prírodných zlúčenín zameraných na inhibíciu USP7 v bunkách HCC (údaje nie sú uvedené). Je zaujímavé, že sme zistili, že OBB v závislosti od dávky znížil hladinu proteínu USP7 (keď bol OBB $\geq 5 \mu$ M, 48 hodín, $p < 0,01$) (obrázok 3A), dobre charakterizovaného onkogénu pri rakovine pečene. Okrem toho BBR významne znižuje hladinu proteínu USP7 spôsobom závislým od koncentrácie. Ďalej sme skúmali mechanizmus, ktorým OBB downreguloval expresiu USP7. mRNA USP7 v bunkách rakoviny pečene bola stanovená po liečbe rôznymi koncentraciami OBB. Tieto výsledky boli konzistentné s výsledkami Western blotu; OBB znížil hladinu mRNA USP7 spôsobom závislým od dávky (keď OBB $\geq 5 \mu$ M, 48 hodín, Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,05$) (obrázok 3B), čo naznačuje, že OBB potlačil expresiu USP7 na transkripčnej úrovni. Predchádzajúce štúdie ukázali, že transkripcia USP7 je regulovaná proteínom forkhead box O6 (FOXO6), NOTCH1 a TGF- β . Preto sme určili, či sa FOXO6, NOTCH1 a TGF- β podieľali na regulácii USP7 sprostredkovanej OBB. Je zaujímavé, že sme zistili, že knockdown NOTCH1 pri liečbe OBB významne inhiboval transkripciu USP7 ($p < 0,01$), zatiaľ čo umlčanie FOXO6 pomocou si-FOXO6 (Huh7, $p = 0,556$; Hep3B, $p = 0,598$) a člena rodiny TGF- β -SMAD 3 inhibícia receptorom TGF- β (Huh7, $p = 0,552$; Hep3B, $p = 0,908$) inhibítorom LY2109761 jasne neovplyvnila transkripciu USP7 pri liečbe OBB (obrázok 3C–E). Okrem toho Western blot odhalil, že NOTCH1 bol inhibovaný OBB spôsobom závislým od dávky ($p < 0,01$) (obrázok 3F, G). Tieto výsledky naznačujú, že NOTCH1 sa podieľa na inhibícii expresie USP7 v bunkách rakoviny pečene sprostredkovanej OBB. Okrem toho sme zistili, že iba bunky nadmerne exprimujúce NICD (NICD, napodobňujúce zosilnenie signálnej dráhy Notch1) by mohli významne inhibovať zabíjajúci účinok toxicity OBB ($p < 0,01$), zatiaľ čo FOXO6 (Huh7, $p = 0,997$; Hep3B, $p = 0,923$) a člen rodiny TGF- β -SMAD 3 (Huh7, $p = 0,888$; Hep3B, $p = 0,957$) môžu byť neúčinné (obrázok 3H–J). Súhrnne tieto výsledky ukázali, že OBB inhiboval expresiu USP7 inhibíciou NOTCH1.

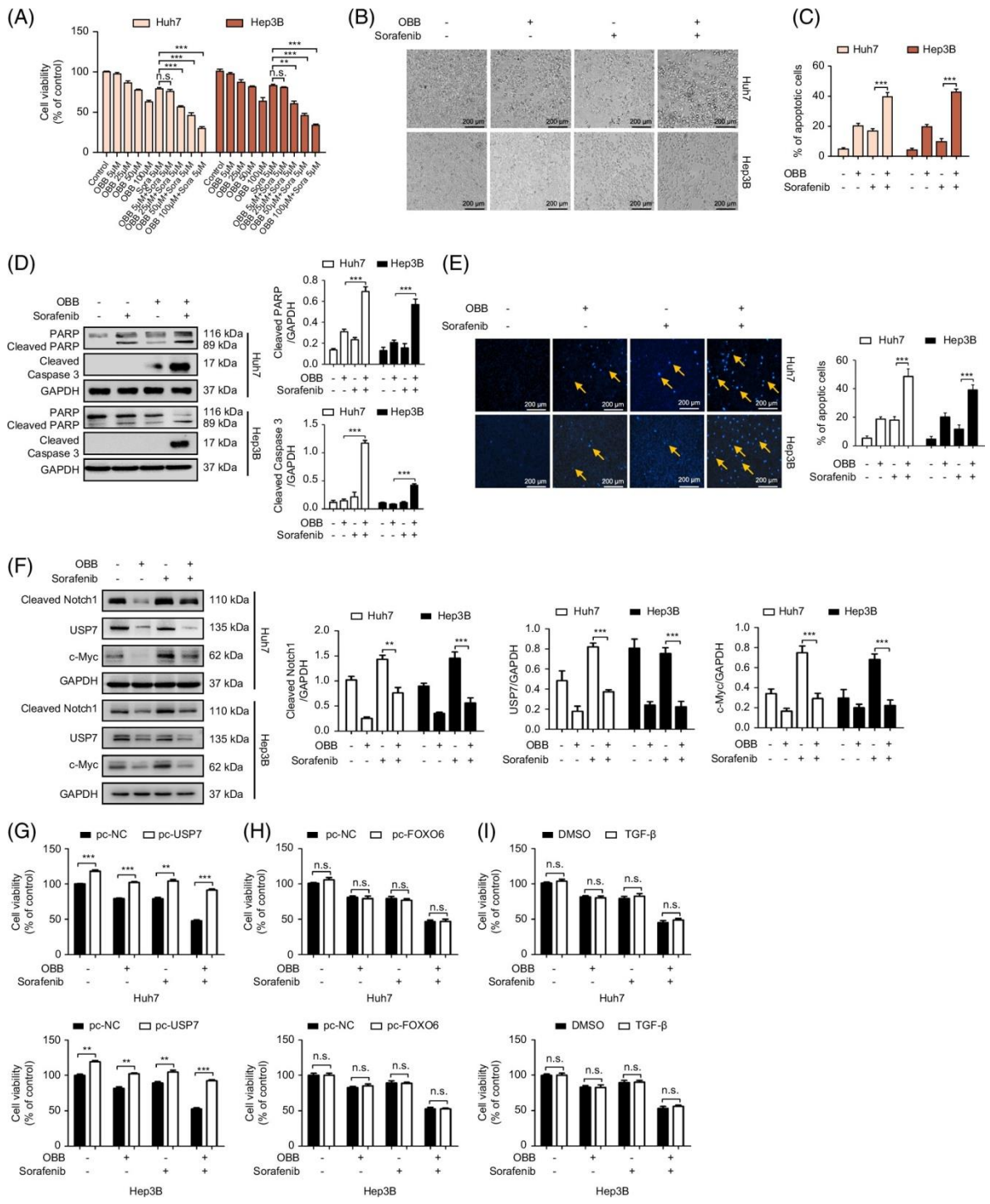


OBB potláča expresiu USP7 inhibíciou NOTCH1. (A a B) Bunky Huh7 a Hep3B boli ošetrené OBB (1, 5, 10, 50 alebo 100 μ M) alebo kontrolou vehikula počas 48 hodín. Potom sa použil western blot na detekciu hladiny proteínu USP7 s GAPDH ako kontrolou zaťaženia. Kvantitatívna PCR sa použila na detekciu hladiny mRNA USP7 s GAPDH ako referenčným génom. (C a D) Súčasne s pridaním OBB bola malá interferenčná RNA zameraná na FOXO6 (si-FOXO6) alebo NOTCH1 (si-NOTCH1) alebo negatívna kontrolná malá interferenčná RNA transfekovaná do buniek Huh7 a Hep3B počas 48 hodín a potom qRT-PCR sa použila na meranie hladiny mRNA USP7 s použitím GAPDH ako referenčného génu. (E) Po ošetrení LY2109761 (inhibítory TGF- β receptora) a OBB počas 24 hodín boli bunky Huh7 a Hep3B lyzované na detekciu mRNA USP7 pomocou qRT-

PCR a GAPDH sa amplifikoval ako referenčný gén. (F a G) Bunky Huh7 a Hep3B boli ošetrené OBB (25, 50 alebo 100 μM) alebo kontrolou s vehikulom počas 48 hodín. Potom boli bunky zozbierané a bola detekovaná a kvantifikovaná hladina proteínu štiepeného NOTCH1 a c-Myc. (H–J) Bunky Huh7 a Hep3B boli transfekované eukaryotickým expresným plazmidom (pc-FOXO6 alebo pc-NICD) alebo aktivátorom signálnej dráhy člena 3 rodiny TGF- β /SMAD (TGF- β) počas 24 hodín po liečbe OBB (50 μM) alebo kontrola vehikula počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8. Údaje sú uvedené ako priemer \pm SD ($n=3$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Skratky: c-Myc, V-Myc homológ vírusového onkogénu vtáčej myelocytomatózy; GAPDH, glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenáza; FOXO6, forkhead box proteín O6; NICD, intracelulárna doména zárezu; NOTCH1, homológ zárezu 1; ns, žiadny význam; OBB, oxyberberín; si-NC, negatívna kontrola s malou interferenčnou RNA; USP7, ubikvitín-špecifická peptidáza 7.

OBB senzibilizuje sorafenib inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7

Sorafenib, inhibítor s malou molekulou, sa od roku 2007 považuje za štandard starostlivosti o pacientov s pokročilým neresekovateľným karcinómom pečene. Predtým sme zistili, že aktivácia USP7 sa významne podieľa na rezistencii na sorafenib a ďalej sme zistili, že OBB môže významne inhibovať vyjadrenie USP7. Na základe týchto zistení sme špekulovali, že OBB pravdepodobne senzibilizuje bunky rakoviny pečene na sorafenib. Na testovanie tejto hypotézy sme skúmali cytotoxický účinok OBB v kombinácii so sorafenibom v 2 bunkových líniiach rakoviny pečene, Huh7 a Hep3B. Ako je znázornené na [obrázku 4A](#). OBB významne senzibilizoval bunky na sorafenib pri 25 μM (keď $\text{OBB} \geq 25 \mu\text{M}$, 48 hodín, $p < 0,05$). Zároveň sme ukázali zmeny prežitia buniek ovplyvnené rôznymi koncentraciami sorafenibu, OBB a BBR počas 48 hodín. Na posúdenie, či bol kombinovaný účinok synergický alebo aditívny, sme vypočítali kombinačný index (CI) a vytvorili izobologramy. A $\text{CI} < 1$ indikuje synergický efekt kombinovanej terapie. Kombinované liečby s 5/5 μM sorafenib/OBB viedli len k aditívnym účinkom ($\text{CI} = 0,945$ pre bunky Huh7 a 0,981 pre bunky Hep3B). Kombinácie 5 μM sorafenibu a 25 μM OBB alebo 5 μM sorafenibu a 50 μM OBB viedli k synergickému účinku ($\text{CI} = 0,249$ alebo 0,556 v bunkách Huh7 a $\text{CI} = 0,205$ alebo 0,662 v bunkách Hep3B). Tieto výsledky naznačujú synergický účinok medzi sorafenibom a OBB v bunkách HCC. Okrem toho sme zistili, že kombinovaná liečba s 5/25 μM sorafenib/OBB priniesla dobré synergické účinky. Vzhľadom na to, že koncentrácie 5 μM sorafenibu a 25 μM OBB sú klinicky relevantné a možno ich farmakologicky dosiahnuť, sme vybrali tieto koncentrácie sorafenibu a OBB pre nasledujúce experimenty. Okrem toho OBB v kombinácii so sorafenibom vyvolal významnú zmenu v morfológii buniek, vrátane zmršťovania buniek a vymiznutia bunkového spojenia ([obrázok 4B](#)). Okrem toho percentá buniek rakoviny pečene pozitívnych na annexin V/propidium jodid (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$) ([obrázok 4C](#)) a apoptotické telieska ([obrázok 4E](#)) (Huh7, $p < 0,01$; Hep3B, $p < 0,001$) v skupine s OBB a sorafenibom boli významne vyššie ako v skupinách s OBB a sorafenibom samotným. V súlade s týmito výsledkami sa hladina molekuly c-PARP súvisiacej s apoptózou významne zvýšila v skupinách s kombináciou OBB a sorafenib ($p < 0,001$) ([obrázok 4D](#)). Western blot overil, že OBB významne inhiboval dráhu NOTCH1-USP7 aktivovanú sorafenibom ($p < 0,01$) ([obrázok 4F](#)). Tieto výsledky naznačujú, že OBB môže podporovať sorafenibom indukovanú apoptózu buniek rakoviny pečene downreguláciou USP7. Na upevnenie toho, že OBB synergizuje so sorafenibom na potlačenie rakoviny pečene prostredníctvom inhibície USP7, sa použil eukaryotický expresný plazmid USP7. Ako je znázornené na [obrázku 4G](#), nadmerná expresia USP7 významne inhibovala OBB a sorafenibom indukovaný zabíjací účinok buniek rakoviny pečene ($p < 0,01$). Vyššie uvedený experiment ukazuje, že OBB synergizoval so sorafenibom na zabíjanie buniek rakoviny pečene znížením USP7. Na rozdiel od toho, nadmerná expresia FOXO6 alebo liečba TGF- β nemala žiadny významný vplyv na bunkovú letalitu indukovanú kombináciou OBB a sorafenibu ($p > 0,05$, bez významnosti) ([obrázok 4H, I](#)). Tieto výsledky naznačujú, že dráha NOTCH1-USP7 hrá dôležitú úlohu v synergickom účinku OBB a sorafenibu na bunky rakoviny pečene.

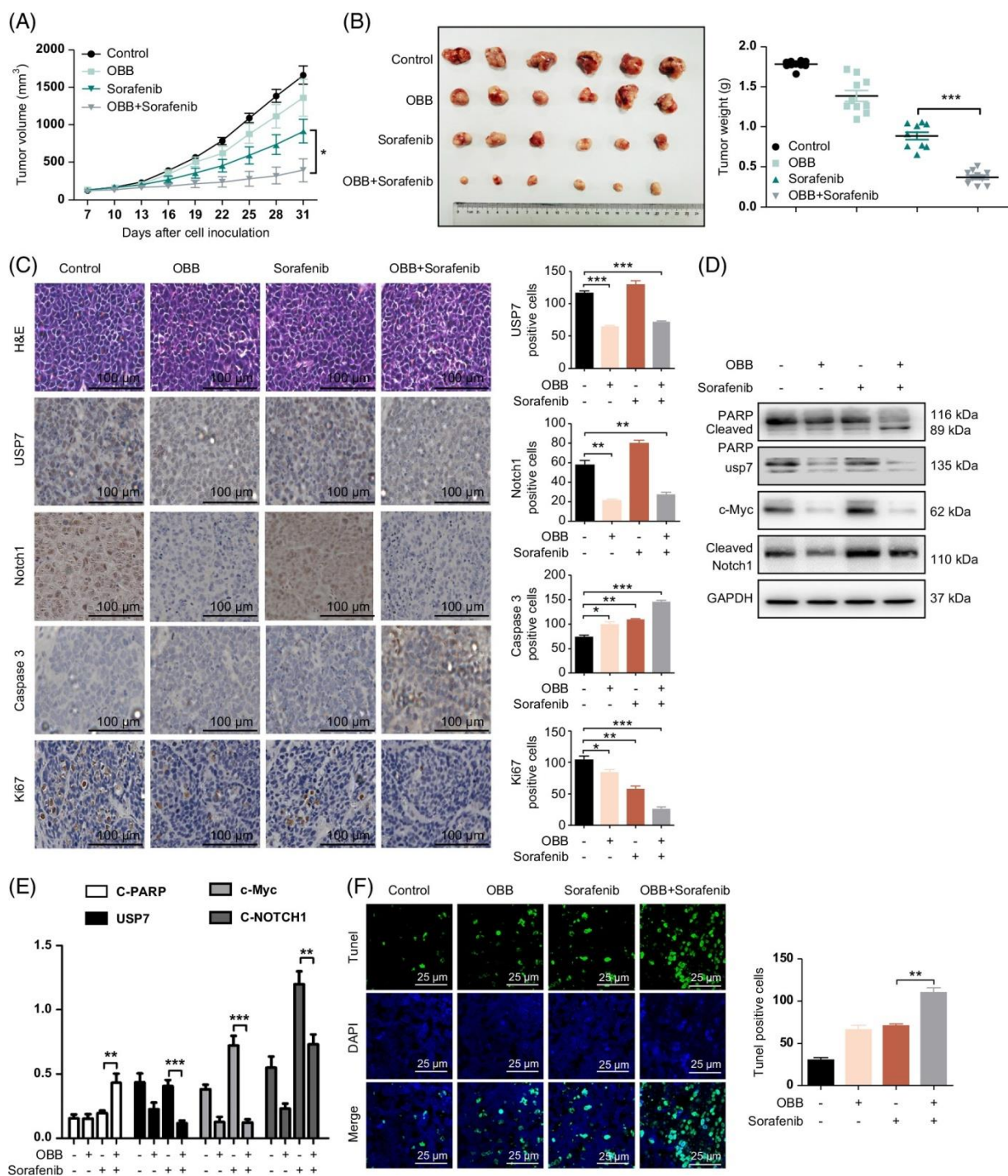


OBB senzibilizuje sorafenib inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7. (A) Bunky Huh7 a Hep3B boli ošetrené rôznymi koncentraciami (5, 25, 50 alebo 100 μ M) OBB v prítomnosti sorafinibu (5 μ M) alebo nie počas 48 hodín a potom bola bunkou meraná životaschopnosť buniek. test počítacej súpravy-8 (CCK8). (B–E) Bunky Huh7 a Hep3B boli ošetrené OBB (25 μ M), sorafinibom (5 μ M) alebo OBB kombinovaným sorafinibom počas 48 hodín a potom zobrazené pod mikroskopom s fázovým kontrastom, Mierka: 200 μ m (B) a apoptotické bunky sa analyzovali pomocou prietokovej cytometrie (C), štiepená PARP sa vyhodnotila pomocou Western blotu a kvantifikovala sa (D). Bunky boli zafarbené s Hoechst 33258 a pozorované pod fluorescenčným mikroskopom; bolo spočítané a vypočítané percento apoptotických buniek. Mierka: 200 μ m (E). (F) Bunky Huh7 a Hep3B boli ošetrené ako v (B), potom boli hladiny proteínov NOTCH1, USP7 a c-Myc detegované pomocou Western blotu a kvantifikované pomerom štiepeného NOTCH1 k GAPDH, USP7 k GAPDH a c-Myc na GAPDH. (G) Bunky Huh7 a Hep3B boli transfekované negatívnym kontrolným vektorom alebo pc-USP7 počas 24 hodín, po ošetrení OBB (25 μ M), sorafinibom (5 μ M) alebo OBB kombinovaným sorafinibom počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8. (H) Bunky Huh7 a Hep3B boli transfekované negatívnym

kontrolným vektorom alebo pc-FOXO6 počas 24 hodín, po ošetrovaní OBB (25 uM), sorafenibom (5 uM) alebo OBB kombinovaným sorafenibom počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8. (I) Bunky Huh7 a Hep3B boli transfekované OBB (25 uM), sorafenibom (5 uM) alebo OBB kombinovaným sorafenibom v prítomnosti alebo neprítomnosti TGB-p počas 48 hodín. Potom sa testovala životaschopnosť buniek pomocou súpravy CCK8. Údaje sú priemery \pm SD (n=3). ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Skratky: c-Myc, V-Myc homológ vírusového onkogénu vtáčej myelocytomatózy; GAPDH, glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenáza; ns, žiadny význam; OBB, oxyberberín; PARP, poly (ADP-ribóza) polymeráza; USP7, ubikvitín-špecifická peptidáza 7.

OBB synergizuje so sorafenibom na potlačenie rastu xenoimplantátu rakoviny pečene in vivo

Skonstruovali sme model xenoimplantátu rakoviny pečene u myši, aby sme určili, či kombinácia OBB a sorafenibu potlačila rast nádorových buniek in vivo. Potom sme ošetrili nahé myši nesúce xenoštepové nádory samotným OBB a sorafenibom alebo OBB plus sorafenib a monitorovali rast nádoru počas 31 dní. Ako je znázornené na obrázku 5A, B, priemerné objemy nádorov ($p < 0,05$) a hmotnosti nádorov ($p < 0,001$) v skupine s kombináciou OBB a sorafenibu boli významne znížené v porovnaní s objemami v skupine s jedným liekom alebo v kontrolnej skupine. Zatiaľ čo telesná hmotnosť myši sa medzi skupinami v priebehu liečby nelíšila. Boli prezentované reprezentatívne obrázky pre hematoxylinové a eozínové farbenie xenoštepových nádorov (obrázok 5C). Medzitým imunohistochemická analýza ukázala, že hladiny kaspázy 3 v kombinovanej skupine boli vyššie ako hladiny v skupinách s OBB alebo samotným sorafenibom ($p < 0,05$) a hladiny NOTCH1 a USP7 v kombinovanej skupine boli významne nižšie ako hladiny v skupine skupina sorafenib samotný ($p < 0,01$). V súlade s týmito výsledkami výsledky Western blotu ukázali, že expresia NOTCH1 a c-Myc bola významne znížená v skupine s kombináciou v porovnaní so samotnou skupinou sorafenibu ($p < 0,01$) (obrázok 5D, E). Okrem toho tunelový test odhalil, že počet pozitívnych buniek v skupine s kombináciou bol jasne vyšší ako počet v skupine s OBB alebo sorafenibom samotným ($p < 0,01$) (obrázok 5F). Tieto údaje ďalej ukazujú, že OBB zvyšuje účinok sorafenibu proti rakovine pečene in vivo. Okrem toho sme určili vzťah medzi hladinou proteínu jadrového NICD a hladinou mRNA USP7 v pečevných tkanivách pacientov s HCC. Hladina proteínu jadrovej NICD a hladina mRNA USP7 bola dramaticky zvýšená v tkanivách HCC v porovnaní so susednými nádorovými tkanivami, čo je v súlade s predchádzajúce štúdie. Korelačná analýza navyše odhalila, že hladina mRNA USP7 pozitívne korelovala s hladinou proteínu jadrového NICD, čo naznačuje, že USP7 je transkripčne regulovaný nukleárnym Notch1 u pacientov s HCC. Celkovo naše výsledky ukázali, že OBB senzibilizuje bunky rakoviny pečene na sorafenib inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7-c-Myc, čo môže pripraviť cestu pre vývoj nových stratégií na liečbu pokročilej rakoviny pečene založenej na kombinovanom použití OBB a sorafenib.



OBB synergizuje so sorafenibom na potlačenie rastu xenoimplantátu rakoviny pečene in vivo. Hep3B bunky (2×10^6) boli naočkované subkutánne do nahých myší na oboch zadných stranách, aby sa vytvorili subkutánne nádory. Keď nádory dosiahli priemerný objem 100 mm^3 nahé myši sa náhodne rozdelili do 4 skupín (6 myši/skupina) a myšiam sa podávala buď kontrola s vehikulom, sorafenib (perorálna sonda, 30 mg/kg) alebo len OBB. (ip, 10 mg/kg) a OBB a sorafenib v kombinácii, v danom poradí. Myši dostali celkovo 31 dní liečby, sondou každý deň počas 5 dní v rade, po ktorých nasledovali 2 dni odpočinku. (A) Objemy nádorov sa zaznamenávali každé 3 dni. (B) Nádory xenoštetpu sa extrahovali 31 dní po subkutánnej injekcii a stanovila sa hmotnosť nádorov. (C) Nádorové rezy z xenoimplantátov sa pripravili na H&E a imunohistochemické analýzy. Sú znázornené reprezentatívne obrázky imunofarbenia kaspázy 3, USP7 a NOTCH1. Pozitívne bunky sa spočítali v priemere medzi celkovo 1000 buniek. Mierka, $100 \mu\text{m}$. (D a E) Hladiny proteínov USP7, NOTCH1, c-MYC a štiepenej PARP v tkanivách xenoimplantátových nádorov sa detegovali pomocou western blotu a kvantifikovali sa pomerom štiepenej PARP k GAPDH, USP7 k GAPDH, c-Myc k GAPDH a štiepil NOTCH1

na GAPDH. (F) Nádorové rezy z xenoimplantátov sa použili na test TUNEL. Boli zobrazené reprezentatívne obrázky TUNEL. Kvantifikoval sa počet TUNEL-pozitívnych buniek. Mierka, 25 μ m. Údaje sú uvedené ako priemer \pm SD (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$. Skratky: c-Myc, V-Myc homológ vírusového onkogénu vtácej myelocytomatózy; GAPDH, glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenáza; H&E, hematoxylín a eoziín; NOTCH1, homológ zárezu 1; OBB, oxyberberín; PARP, poly (ADP-ribóza) polymeráza; TUNEL, koncové značenie dUTP-biotínovým nick endom sprostredkované deoxynukleotidyltransferázou; USP7, ubikvitín-špecifická peptidáza 7.

DISKUSIA

V klinickej praxi stále existuje veľký počet pokročilých pacientov s HCC, ktorí používajú sorafenib na liečbu so slabou účinnosťou. Hoci sa preukázalo, že na chemorezistencii voči liečbe sorafenibom sa podieľa niekoľko mechanizmov, ako je autofágia, ACSL4-sprostredkovaná ferroptóza a apoptóza, zodpovedajúci mechanizmus chemorezistencie sorafenibu nie je pri liečbe rakoviny pečene stále ani zďaleka dobre objasnený. Pribúdajúce dôkazy ukázali, že účinnosť sorafenibu možno významne zlepšiť kombinovanou liečbou. V tejto štúdií sme zistili, že OBB zosilnil účinok sorafenibu na rakovinu pečene inhibíciou osi USP7-c-Myc, čo je v súlade s tým, že c-Myc je kľúčovým cieľom rezistencie na sorafenib. OBB významne zabil bunky rakoviny pečene a indukoval apoptózu v kombinácii so sorafenibom inhibíciou transkripcie USP7 prostredníctvom inhibície NOTCH1. Okrem toho má OBB, derivát BBR, výhody dobrej bezpečnosti, nízkych vedľajších účinkov lieku a toxicity, čo ho robí vhodným pre klinické kombinácie liekov. Preto kombinácia sorafenibu a OBB môže zvýšiť účinnosť sorafenibu v prvej línii liečby. Súhrnne náš výskum ukazuje, že OBB zvyšuje citlivosť buniek rakoviny pečene na sorafenib inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7-c-Myc, čo ponúka nové poznatky o zvyšovaní terapeutického účinku sorafenibu na rakovinu pečene.

USP7, známy karcinogénny faktor, je čoraz viac uznávaný pre svoju úlohu pri rôznych druhoch rakoviny a chorôb. Nadmerná expresia USP7 v ľudských rakovinách a jej interakcia s proteínmi spojenými s rakovinou, ako sú MDM2, FDX1 a c-Myc, z nej urobili hlavný cieľ liečby rakoviny. Predchádzajúci výskum ukázal, že zacielenie na USP7 môže zvýšiť citlivosť na rádiochemoterapiu hematologických aj solídnych malignít. Inhibícia USP7 môže prekonať chemorezistenciu DOX, čo naznačuje jej úlohu pri sprostredkovaní chemorezistencie. Okrem toho vysoká aktivita USP7, indukovaná downreguláciou enkurínu, proteínu supresujúceho nádory, prispieva k rezistencii na sorafenib pri rakovine pečene. Zacielenie USP7 môže zvýšiť odpoveď nádoru na rôzne terapeutické stratégie vrátane tradičnej chemoterapie, molekulárne cielej terapie, imunoterapie a rádioterapie. Preto zacielenie na USP7 má potenciál poskytnúť univerzálne výhody v klinickej praxi. V dôsledku toho existuje značný záujem o vývoj inhibítorov USP7 alebo degradačných činidiel na liečbu nádorov. Neexistujú však žiadne správy o prírodných produktoch, ktoré by mohli znížiť USP7. Zistili sme, že hladina mRNA USP7 bola významne znížená v bunkách rakoviny pečene ošetrovaných OBB v porovnaní s kontrolnou skupinou a ďalej potvrdili, že USP7 je downstream cieľový gén OBB v bunkách rakoviny pečene.

Na záver po prvýkrát uvádzame, že prírodná zlúčenina OBB môže významne inhibovať expresiu USP7, čo poskytuje sľubnú terapeutickú stratégiu pre terapiu nádorov zameranú na USP7.

BBR, izochinolínový alkaloid s rôznymi biologickými účinkami, sa v medicíne používa už roky. Je to fytochemická zlúčenina získaná z liečivých rastlín. BBR má protinádorové účinky pri malignitách. Okrem toho má BBR synergické účinky s protirakovinovými liekmi alebo prírodnými zlúčeninami, čím zvyšuje jeho účinnosť proti niekoľkým rakovinám. BBR si

získal pozornosť vďaka svojim farmakologickým účinkom a nízkej toxicite. BBR sa používa v tradičnej orientálnej medicíne na liečbu zápalových ochorení. OBB, prírodný peroxidový derivát BBR, sa uvádza, že má protinádorové a hypoglykemické účinky, chráni tkanivá pred poškodením stresom a môže liečiť metabolicky spojené stukovatenie pečene. OBB má výraznejší protizápalový účinok a je bezpečnejší ako BBR. OBB je v mnohých aspektoch lepší ako BBR a má potenciál ako protinádorové terapeutické činidlo. Potenciálne biologické aktivity a terapeutické prínosy OBB sa však skúmali len zriedka. Skrínovali sme OBB z niekoľkých prírodných zlúčenín zameraných na inhibíciu USP7 v bunkách HCC (údaje nie sú uvedené). Výskum tiež ukázal, že OBB môže slúžiť ako potenciálny senzibilizátor chemoterapeutických liekov. Dôležitejšie je, že OBB má výhody dobrej bezpečnosti, nízkych vedľajších účinkov a toxicity, vďaka čomu je vhodný pre klinické kombinácie liekov. Preto kombinácia sorafenibu a OBB môže zvýšiť účinnosť sorafenibu v klinickom prostredí. Naš experiment dokázal, že OBB downreguloval expresiu USP7 hlavne inhibíciou dráhy NOTCH1.

Táto štúdia uvádza úlohu OBB pri inhibícii nádorov, čo naznačuje, že sa môže použiť ako senzibilizátor sorafenibu pri rakovine pečene. Okrem toho OBB aj BBR významne potlačili expresiu USP7. Blokovanie funkcie USP7, inhibícia jeho aktivity alebo downregulácia jeho proteínovej expresie môže účinne prekonať terapeutickú rezistenciu voči mnohým liekom, vrátane sorafenibu. To môže vysvetliť, prečo OBB môže účinne senzibilizovať refraktérne rakoviny na liečbu sorafenibom. Preto tieto výsledky naznačujú, že OBB alebo BBR sa môžu použiť ako účinné senzibilizátory klinickej chemoterapie na zlepšenie rezistencie na liečbu. Okrem toho OBB alebo BBR môžu chrániť srdce, pečeň, pľúca a obličky pred vážnym poškodením spôsobeným týmito terapiami. OBB je teda sľubným adjuvantným liekom na liečbu rakoviny.

ZÁVERY

Stručne povedané, naša štúdia je prvá, ktorá naznačuje, že OBB slúži ako nový prírodný inhibítor USP7 a zvyšuje citlivosť sorafenibu na inhibíciu rastu nádoru a podporu apoptózy v bunkách rakoviny pečene inhibíciou dráhy NOTCH1-USP7-c-Myc. To môže pripraviť cestu pre vývoj nových stratégií na liečbu rakoviny pečene na základe kombinovaného použitia OBB a sorafenibu.

Zdroj: *Oxyberberine sensitizes liver cancer cells to sorafenib via inhibiting NOTCH1-USP7-c-Myc pathway*, Sun, Liangbo, He, Meng, Li, Feng, Wu, Di, Zheng, Ping, Zhang, Cong, Liu, Yang, Liu, Dong, Shan, Meihua, Yang, Mingzhen, Ma, Yuanhang, Lian, Jiqin, Xiong, Haojun

Key Laboratory of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

Department of Clinical Biochemistry, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, China

Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

Department of General Surgery of Xinqiao Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China