

Sự khác biệt về mức độ biểu hiện các enzyme chuyển hóa ceramide giữa hai dòng tế bào ung thư gan Hep3B và Huh6

Vũ Minh Thiết*, Nguyễn Hoàng Danh, Nguyễn Thị Phương, Đỗ Hoàng Đăng Khoa

Viện Kỹ thuật và Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

*vmthiet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Ceramide, một phân tử trung tâm của sphingolipid, đóng vai trò quan trọng trong bệnh ung thư gan và sinh lý bệnh do lipid này điều hòa chuyển hóa axit béo, kháng insulin và cảm ứng mạnh quá trình apoptosis. Sự chuyển hóa của ceramide tác động trực tiếp đến khả năng sống sót của các tế bào ung thư và sự hình thành khối u trong quá trình hóa trị và xạ trị. Do đó, các enzym chuyển hóa ceramide đang là mục tiêu mới trong nghiên cứu phát triển thuốc điều trị ung thư và cơ chế đáp ứng thuốc. Trong nghiên cứu này, phương pháp qPCR được sử dụng để đánh giá toàn diện mức độ biểu hiện của các enzym điều chỉnh trực tiếp quá trình chuyển hóa ceramide trong tế bào có nguồn gốc ung thư gan Hep3B và tế bào có nguồn gốc từ nguyên bào gan Huh6. Kết quả cho thấy hai dòng tế bào này có mức độ khác biệt rõ rệt về mức độ biểu hiện của các enzyme kể trên. So với Huh6, tế bào Hep3B gây giảm thiểu hoạt động của enzyme tạo ceramide chuỗi C16, trong khi lại tăng mức biểu hiện của các enzyme tạo ceramide chuỗi dài C18 - C24; tăng hoạt động của enzyme phân hủy ceramide hydrolase và sphingosine kinase, đặc biệt làm giảm biểu hiện của một sphingomyelinase trung tính. Những điểm khác biệt này giúp Hep3B kích thích tăng sinh tế bào và ức chế quá trình apoptosis so với Huh6. Do đó, chúng tôi đề nghị nên chọn Hep3B (và có thể các dòng tế bào ung thư biểu mô gan khác) thay vì Huh6 trong các nghiên cứu ung thư gan liên quan đến chuyển hóa ceramide.

Nhận 30.11.2020

Được duyệt 27.03.2021

Công bố 09.04.2021

Từ khóa

Chuyển hóa ceramide, dòng tế bào ung thư gan, apoptosis, qPCR

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Trong điều trị ung thư, làm chết tế bào theo chương trình (apoptosis) là một trong những đích tác động chính của các liệu pháp hóa trị và xạ trị. Quá trình apoptosis được điều hòa bởi các enzyme và protein như kinase, phosphatase, p53 và c-myc [1]. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra ceramide và các sphingolipid trực tiếp tác động đến các protein điều hòa apoptosis kể trên. Hầu hết các liệu pháp hóa trị và xạ trị đều nhanh chóng làm thay đổi hàm lượng ceramide trong tế bào [2, 3]. Vì thế, ceramide và các enzyme chuyển hóa liên quan đang được xem là những mục tiêu mới quan trọng trong phát triển các loại thuốc chống ung thư [4, 5].

Về mặt chức năng, ceramide kích ứng mạnh mẽ apoptosis và kiềm hãm tăng sinh tế bào thông qua ức chế các protein phosphatase quan trọng như PP1 và PP2A [5, 6]. Tuy nhiên, các tế bào ung thư sử dụng nhiều cách khác nhau nhằm hạn chế việc sản sinh ceramide hoặc loại bỏ ceramide để tăng tính kháng thuốc và chống lại apoptosis. Sản phẩm từ phân giải ceramide là sphingosine còn được phosphoryl hóa để tạo thành sphingosine 1-phosphate (S1P), một nhân tố kích thích phân bào mạnh giúp tăng sinh tế bào ung thư và phát triển khối u [7]. Vì thế, cân bằng giữa S1P và ceramide được xem là yếu tố quyết định số phận của tế bào.

Lượng ceramide trong tế bào được điều hòa qua ba con đường [8]. Đầu tiên là con đường tổng hợp mới ở mạng lưới nội chất khởi đầu bằng phản ứng cô đọng hóa axit amin (chủ yếu là L-serine) với một chuỗi axit béo dài 18 carbon palmitoyl, C18. Quá trình này được điều hòa bởi enzyme SPTLC1 với sản phẩm cuối cùng là sphinganine; tiền chất này được acyl hóa để tạo ceramide bởi các enzyme ceramide synthase (CerS). Con đường thứ hai (tận dụng) xảy ra tại lysosome, được thực hiện bởi các enzyme thủy phân lên các sphingolipid phức tạp. Sản phẩm thủy phân cuối cùng bởi các ceramidase (CDase) là sphingosine được đưa ra ngoài tế bào chất để tổng hợp lại ceramide nhờ các CerS. Con đường thứ ba xảy ra chủ yếu ở màng tế bào nhờ các sphingomyelinase (SMase), enzyme này phân cắt cơ chất sphingomyelin (SM) và giải phóng phosphotidylcholine và ceramide. Những enzyme kể trên thay đổi mạnh mẽ dưới tác động bởi các liệu pháp điều trị nhằm tiêu diệt tế bào ung thư nhưng cũng được chúng điều chỉnh để tăng cường sinh trưởng và khả năng kháng thuốc.

Các dòng tế bào ung thư vẫn là mô hình phổ biến và hiệu quả để tìm hiểu cơ chế phân tử của các quá trình đáp ứng với các liệu pháp ung thư. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có đánh giá toàn diện nào về mức độ hoạt động của các enzyme chuyển hóa ceramide nội sinh ở các dòng tế bào ung thư gan. Ở nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành so sánh hai dòng tế bào Hep3B và Huh6 về mức độ biểu hiện của các enzyme tham gia trực

tiếp chuyển hóa ceramide. Các enzyme này bao gồm CDase, SMase, CerS và SPHK. Dữ liệu về mức độ biểu hiện của các enzyme này sẽ giúp các nhà khoa học có được lựa chọn dòng tế bào phù hợp cho các nghiên cứu *in vitro* về sinh học ung thư trong mối liên hệ với ceramide.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Dòng tế bào và điều kiện nuôi cấy

Dòng tế bào ung thư biểu mô gan Hep3B và ung thư nguyên bào gan Huh6 (ATCC, Mỹ) được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) có bổ sung 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 µg/mL penicillin và streptomycin trong tủ cấy 5 % CO₂ ở 37 °C.

2.2 Tách chiết RNA và tổng hợp cDNA

Các dòng tế bào nuôi cấy sau khi đạt được độ phủ cần thiết được xử lý trực tiếp với Trizol (Invitrogen, , Mỹ) cho việc tách chiết RNA tổng số. Thành phần DNA được loại bỏ khỏi mẫu RNA bằng DNase I (New England Biolabs). Chất lượng và nồng độ RNA được xác định bằng quang phổ hấp thụ và điện di gel agarose. Tổng hợp cDNA được tiến hành bằng cDNA LunaScript™ RT SuperMix Kit (New England Biolabs).

2.3 Thiết kế môi, danh sách môi

Mỗi đặc hiệu cho các gen được đặt tổng hợp từ Công ty IDT với các trình tự sau, Bảng 1

Bảng 1 Danh sách trình tự oligo sử dụng trong nghiên cứu này

Gen	Trình tự (5' – 3')	Gen	Trình tự (5' – 3')
CerS1	GCCTTCCACAACCTCCTG AACTGGGTAACAAGCAGAGTC	Acer1	GCCTAGCATCTTCGCCTATCAG GGAAGTTGCTCTCACACCAGT
CerS2	GCTCTATCCTGCCTTCTTTGG CACTGCGTTCATCTTCTACCA	Acer2	GTTGTAGTGGGAATTGGATCC CCGAAAGATCTTTGGTAGATACC
CerS3	GGCTATATGACTTATGGGAGGTT ACATCAAAGCCAAGTCTAAATAACAG	Acer3	CAATGTTCCGGTGCAGTTCAGAG GGATCCCATTCTTACCCTGCTG
CerS4	CTCTTCCTCATCTTCTCCTTTGTC ACATCAGAAGCCCGTTGAAG	SMPD1	CATTCCCCCAGGGCACTGT CGGCTCAGAGTCTCTTCATCA
CerS5	GCCAATTATGCCAAGTATCAGC CCGATTATCTCCCAACTCTCAA	SMPD2	TTCCCTTTGGTGTCCGCATT GGGCTTCATGATCAGAGAGGG
CerS6	CAATCAGGAGAAGCCAAGCA TGACTCCGTAGGTAATAACATAAAGG	SMPD3	CGGAAGGAGCTGCTGAAGG CCGGACAGCTGGGTGATAAAA
ASAH1	AGTCGAACCATGGTGAAGTC GAGTGTACTGTCCCGTTACT	SMPD4	TCCGGAAGACAGATGAATACCT CCCAAGGCGAGTGTGAAGTC
ASAH2	TCGTGGCAGATAGTGTGTAATG CTGGGCAGTGTCTGGAATATG	GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCAATACGACCAAATCC

2.4 Phản ứng PCR định lượng (qPCR)

Phản ứng qPCR sử dụng bộ kit Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) được thực hiện trên máy luân nhiệt (Prime Pro 48 Real-Time PCR, Techne) với chu trình nhiệt như sau biến tính ban đầu ở 95 °C trong vòng 1 phút, 40 chu trình tiếp theo với 95 °C/ 15 giây và 60 °C/ 30 giây. Sau đó, mức độ đặc hiệu của PCR (số lượng sản phẩm PCR) được xác định bằng đường cong nóng chảy (melting curve) với điều kiện nhiệt độ được tăng từ 60 °C đến 95 °C (tăng 0,2 °C trong 5 giây).

Thiết kế thí nghiệm mỗi phân tích được lặp lại trên 3 mẫu RNA tách chiết khác nhau với 3 lần lặp lại kỹ thuật cho từng mẫu. Giá trị trung bình của 3 lần lặp lại kỹ thuật đại diện cho từng mẫu. Kết quả so sánh và phân tích thống kê dựa trên giá trị thu được từ 3 mẫu.

2.5 Phân tích kết quả

Phương pháp delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) được sử dụng để so sánh tương đối mức độ biểu hiện từng gen đích giữa 2 dòng tế bào với GAPDH là gen nội chuẩn [9]. Số liệu được xử lý bằng phần mềm GraphPad Prism 7.00 phiên bản hệ điều hành Windows. Các thay đổi mức độ biểu hiện gene ở mức tối thiểu 2 lần được xem là có ý nghĩa. Kiểm định t-test không bắt cặp được sử dụng để đánh giá thống kê với mức độ có ý nghĩa khi trị số $p < 0,05$.

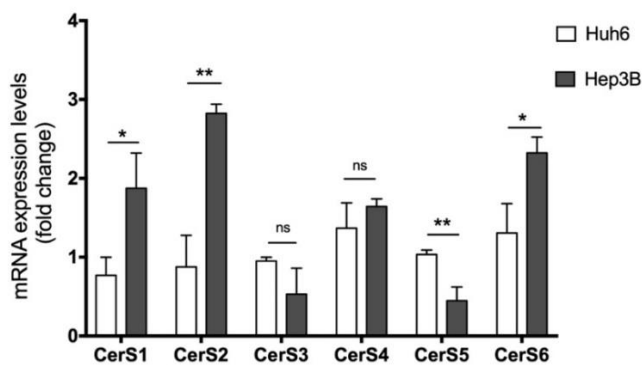
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Mức độ biểu hiện của các ceramide synthases (CerS)

Ở tế bào động vật, ceramide được tổng hợp bởi 6 CerS (CerS1-6). Những enzyme này chuyển nhóm acyl chất béo-coA với chiều dài khác nhau lên nhóm amin của mạch khung sphingosine để hình thành ceramide. Cụ thể, CerS1 và CerS2 chủ yếu tạo ceramide C18 và ceramide C22-C24 tương ứng [10]. CerS3 tạo ceramide C26-C34, trong khi đó CerS4 tạo ceramide C18-C20 [11]. Hai CerS5 và CerS6 cùng tham gia tạo ceramide C16, là loại chiếm lượng nhiều nhất trong tế bào [12], [13]. Về mặt chức năng, các CerS thể hiện vai trò khác nhau một phần do chúng biểu hiện ở các mô khác nhau trong cơ thể sinh vật. Quan trọng hơn, độ dài của chuỗi acyl của các ceramide khác nhau thể hiện chức năng thậm chí trái ngược nhau. Ví dụ, ceramide C16 mang đặc tính kích hoạt apoptosis, trong khi đó ceramide chuỗi rất dài (ceramide C20 đến C24) có đặc tính kháng apoptosis [14].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tế bào Hep3B có mức độ biểu hiện CerS1 và CerS2 tăng cao gấp đôi so với tế bào Huh6 (Hình 1). Đặc biệt là CerS2, enzyme tổng hợp C18 ÷ C20 ceramide, biểu hiện cao hơn 3 lần ở Hep3B so với Huh6 (Bảng 2). Trong khi đó CerS5 giảm biểu hiện 2,3 lần ở Hep3B so với tế bào Huh6 (Hình 1, Bảng 2). Điều này cho thấy Hep3B tăng cường tổng hợp ceramide chuỗi rất dài C18 ÷ C24 và giảm lượng ceramide C16 so với tế bào Huh6. Vì vậy có thể nhận định rằng tế bào Hep3B có thể kháng lại tác động của nhân tố thúc đẩy apoptosis tốt hơn so với tế bào Huh6.

Tăng cường biểu hiện CerS2 gắn liền với tăng mức độ phân bào và có liên hệ với chức năng điều hòa của gen kiểm hãm ung thư p53 [15]. Enzyme CerS1 đáp ứng với phương pháp hóa trị kết hợp Gemcitabine/ doxorubicin từ đó làm tăng lượng C18 ceramide bên trong tế bào và thể hiện khả năng ức chế tác dụng kiểm hãm sinh trưởng của liệu pháp trên. Trong khi đó CerS5 kích ứng apoptosis và quá trình tự thực ở tế bào ung thư dưới tác động của hóa trị và xạ trị. Ceramide C16 có mối liên hệ mật thiết với p53, gen ức chế khối u quan trọng của cơ thể [16]. Ceramide C16 của CerS5 còn được chứng minh là phân tử trực tiếp tương tác và hoạt hóa p53 [17]. Vì vậy, kết quả giảm biểu hiện CerS5 và tăng CerS1/CerS2 ở tế bào Hep3B so với Huh6 cho thấy tế bào Hep3B thể hiện độc lực mạnh hơn so với Huh6. Điều này phù hợp với quan sát thực tế Hep3B là tế bào có đặc tính hình thành khối u, còn Huh6 không có khả năng này.



Hình 1 Mức độ của biểu hiện của các CerS bằng qPCR.

Kết quả được chuẩn hóa với gen GAPDH.

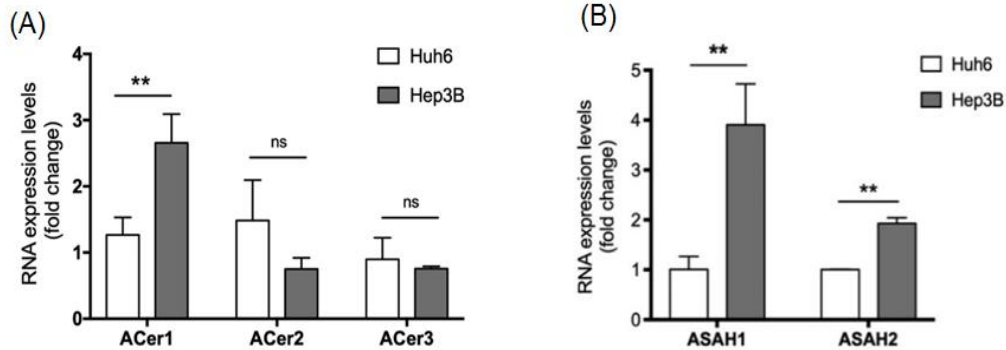
3.1 Mức độ biểu hiện của các ceramidase (CDase)

Với chức năng phân hủy ceramide, các CDase thường được các tế bào ung thư tăng cường hoạt động để làm giảm hàm lượng ceramide và đồng thời tăng cường

cung cấp sphingosine cho SPHK1 và SPHK2 để tạo ra S1P nhằm kích thích quá trình phân bào. Do đó các CDase được xem là gen kích ứng ung thư [18]. Kiểm hãm hoạt động của CDase đang là một hướng đi mới trong phát triển thuốc điều trị ung thư [19].

CDase có 5 thành phần được chia thành 3 nhóm CDase axit (ASAH1), CDase trung tính (ASAH2) và nhóm CDase kiềm (ACER1 ACER2 và ACER3) tùy thuộc vào môi trường pH mà ở đó CDase hoạt động tối ưu [20]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, CDase kiềm

Acer1 và CDase axit ASAH1 tăng cường biểu hiện ở tế bào Hep3B so với Huh6 (Hình 2). CDase axit ASAH1 hoạt động chủ yếu ở lysosome phân giải ceramide thành sphingosine trong bào quan này để cung cấp nguyên liệu cho con đường tận dụng tổng hợp ceramide. Các CDase còn lại không có sự khác biệt về mức độ biểu hiện gen giữa 2 dòng tế bào nghiên cứu (Hình 2). Kết quả trên cho thấy hoạt động phân giải ceramide ở tế bào Hep3B cao hơn so với Huh 6.

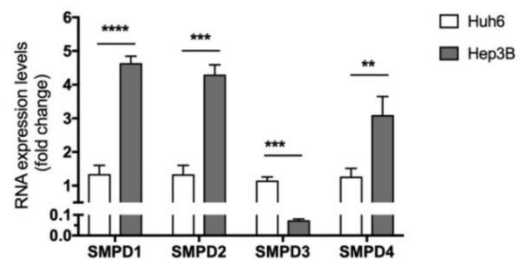


Hình 2 Mức độ biểu hiện của các CDase giữa 2 dòng tế bào Hep3B và Huh6. A) Acer1, 2 và 3 là các thành phần của CDase kiềm, B) Biểu hiện ASAH1 và 2, ASAH1 có mức độ thay đổi lớn hơn 2 lần. Các gen còn lại không có sự thay đổi hoặc thay đổi có ý nghĩa nhưng nhỏ hơn 2 lần (như ASAH2)

3.2 Mức độ biểu hiện của sphingomyelinase (SMase)
 Các SMase ở tế bào động vật cũng được phân chia dựa vào điều kiện pH tối ưu cho hoạt động của từng enzyme. Trong đó, SMase ưa axit (gen mã hóa SMPD1) hoạt động chủ yếu ở lysosome tham gia tạo ceramide trong bào quan này. SMase trung tính (nSMase) có 4 isoform nSMase1 (SMPD2), nSMase 2 (SMPD3), nSMase 3 (SMPD4) với mỗi nSMase có vai trò sinh học và có định vị tại các vị trí bên trong tế bào khác nhau [21]. Các SMase được tăng cường biểu hiện bởi các chất điều trị ung thư như doxorubicin và được xem là một trong những nhân tố chính thúc đẩy tác dụng diệt ung thư của các liệu pháp hóa học trên thông qua việc sản sinh ra ceramide [22, 23]. Trong số đó, nSMase2 (SMPD3) là enzyme được nghiên cứu nhiều nhất. Đột biến chức năng và giảm mức độ hoạt động SMPD3 được phát hiện ở các bệnh nhân ung thư máu [24] và ung thư gan [25, 26].

Kết quả phân tích biểu hiện các SMase cho thấy Hep3B tăng cường biểu hiện SMase axit, SMase trung tính 1 (SMPD2) và 3 (SMPD4) so với Huh6 (Hình 3). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của nSMase lại bị ức chế mạnh

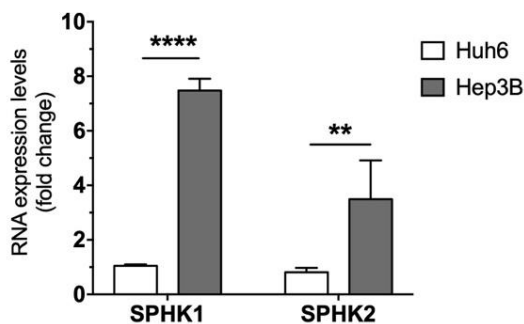
ở dòng tế bào Hep3B so với Huh6 (giảm 16 lần) (Hình 3, Bảng 2).



Hình 3 Mức độ biểu hiện của các sphingomyelinase trong Huh 6 và Hep3B.

Trong Hình 3, dữ liệu thu được từ ít nhất 3 lần lặp lại kỹ thuật và 3 mẫu sinh học khác nhau (n = 3). Kiểm định t-test được sử dụng để đánh giá mức độ ý nghĩa của thống kê. Giá trị p < 0,05 có ý nghĩa thống kê.

3.3 Biểu hiện sphingosine kinase (SPHK1 và SPHK2) và SPHK2 tham gia vào quá trình tạo S1P từ cơ chất sphingosine tạo ra bởi quá trình phân hủy ceramide. Vì thế cả hai kinase đều là nhân tố kích thích sinh trưởng và phát triển trong nhiều loại ung thư khác nhau bao gồm cả ung thư gan. Nhiều thuốc điều trị



Hình 4 So sánh mức độ biểu hiện sphingosine kinase SPHK1 và SPHK2 bằng qPCR ở Hep3B và Huh6. SPHK1 ung thư hiện nay đang được tập trung phát triển dựa trên hoạt tính ngăn chặn hoạt tính phosphoryl hóa của hai kinase này. Đặc biệt SPHK2 đang nổi lên như một đích tác động có giá trị lâm sàng cao trong điều trị ung thư gan. Hiện tại, ABC294640 (Opaganib), một chất

bất hoạt SPHK2 đang được thử nghiệm lâm sàng và cho hiệu quả tốt trên các bệnh nhân ung thư gan [27]. So với Huh6, cả hai kinase này đều biểu hiện tăng cao ở dòng Hep3B (Hình 4). Vì thế, có thể suy luận rằng, tế bào Hep3B tạo ra nhiều S1P hơn so với tế bào Huh6. Kết quả trên có thể góp phần giải thích cho khả năng tăng sinh nhanh của tế bào Hep3B so với tế bào Huh6 cũng như khả năng tạo khối u chỉ xảy ra ở tế bào Hep3B trong mô hình *in vivo*.

Bảng 2 Tổng hợp kết quả so sánh khác biệt mức độ biểu hiện gen giữa dòng tế bào ung thư biểu mô gan Hep3B và ung thư nguyên bào Huh6. Trong đó $p < 0,05$ xác định khác biệt có ý nghĩa thống kê. Các gen có mức độ biểu hiện giảm ở Hep3B so với Huh6 (chữ **đậm**). Các gen có mức độ biểu hiện dưới 2 lần (chữ *nghiêng*) được xem là thay đổi không đáng kể.

Bảng 2 Tổng hợp kết quả so sánh khác biệt mức độ biểu hiện gen giữa dòng tế bào ung thư biểu mô gan Hep3B và ung thư nguyên bào Huh6

Gene	Thay đổi biểu hiện gen (Hep3B/Huh6)	<i>p-value</i>	Gene	Thay đổi biểu hiện gen (Hep3B/Huh6)	<i>p-value</i>		
CerS1	Tăng	2.46	0.0188	ASAH1	Tăng	3.88	0.0043
CerS2	Tăng	3.22	0.0013	ASAH2	<i>ns</i>	1.92	0.0074
CerS3	<i>ns</i>	1.79	0.0948	SPHK1	Tăng	7.12	< 0.0001
CerS4	<i>ns</i>	1.20	0.2261	SPHK2	Tăng	4.72	0.0055
CerS5	Giảm	2.31	0.0050	SMPD1	Tăng	4.50	< 0.0001
CerS6	<i>ns</i>	1.78	0.0140	SMPD2	Tăng	4.25	0.0003
Acer1	Tăng	2.10	0.0091	SMPD3	Giảm	16.19	0.0001
Acer2	<i>ns</i>	1.97	0.1157	SMPD4	Tăng	2.47	0.0073
ACer3	<i>ns</i>	1.18	0.5024				

4 Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu cho thấy tế bào Hep3B và Huh6 có sự khác biệt lớn về mức độ biểu hiện gen của các enzyme chuyển hóa ceramide. Cụ thể, tế bào Hep3B tăng mức độ biểu hiện hầu hết các enzyme theo hướng có lợi cho sự tăng sinh tế bào và chống lại apoptosis như CerS1, CerS2, Acer1, ASHA1, SPHK1 và SPHK2. Thêm vào đó, tế bào Hep3B giảm mức độ hoạt động của CerS5 và nSMase2 để hạn chế việc sản sinh ra các loại ceramide có tác dụng kích ứng apoptosis.

Hạn chế của nghiên cứu là chỉ đánh giá mức độ biểu hiện của các enzyme này qua mRNA mà chưa trực tiếp định lượng các protein bằng các phương pháp như Western Blot... Thêm vào đó, hàm lượng của ceramide cũng chưa được đo bằng các phương pháp định lượng như sắc ký khối phổ,... để có thể phản ánh

chính xác hệ quả trực tiếp của những thay đổi ở mức độ biểu hiện gen mã hóa lên sự thay đổi của các ceramide khác nhau trong tế bào. Dù vậy, kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin cần thiết để có thể xem xét lựa chọn dòng tế bào thích hợp cho các nghiên cứu hướng đến chuyển hóa ceramide trong điều trị ung thư gan.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.019. Học viên cao học Nguyễn Hoàng Danh được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup – Công ty CP và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới Sáng tạo Vingroup, Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn.

Tài liệu tham khảo

1. S. Nagata, "Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 36, no. 1, pp. 489–517, Apr. 2018, doi 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
2. J.-P. Truman, M. García-Barros, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, "Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1841, no. 8, pp. 1174–1188, 2014, doi <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.12.013>.
3. D. Canals et al., "Ceramide launches an acute anti-adhesion pro-migration cell signaling program in response to chemotherapy," *FASEB J.*, vol. 34, no. 6, pp. 7610–7630, Jun. 2020, doi <https://doi.org/10.1096/fj.202000205R>.
4. S. Pyne, D. R. Adams, and N. J. Pyne, "Sphingosine 1-phosphate and sphingosine kinases in health and disease Recent advances," *Prog. Lipid Res.*, vol. 62, pp. 93–106, 2016, doi 10.1016/j.plipres.2016.03.001.
5. B. J. Pettus, C. E. Chalfant, and Y. A. Hannun, "Ceramide in apoptosis an overview and current perspectives," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1585, no. 2, pp. 114–125, 2002, doi [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00331-1](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00331-1).
6. R. Nganga, N. Oleinik, and B. Ogretmen, *Mechanisms of Ceramide- Dependent Cancer Cell Death*, vol. 140. Elsevier Ltd, 2018.
7. S. Narayanan, W. Wang, L. Fah, D. R. Herr, and I. C. Paterson, "Mechanisms of sphingosine 1-phosphate receptor signalling in cancer," *Cell. Signal.*, vol. 34, pp. 66–75, 2017, doi 10.1016/j.cellsig.2017.03.002.
8. T. Yamaji and K. Hanada, "Sphingolipid Metabolism and Interorganellar Transport Localization of Sphingolipid Enzymes and Lipid Transfer Proteins," *Traffic*, vol. 16, no. 2, pp. 101–122, 2015, doi 10.1111/tra.12239.
9. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method," *Nat. Protoc.*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008, doi 10.1038/nprot.2008.73.
10. E. L. Laviad et al., "Characterization of ceramide synthase 2 Tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 9, pp. 5677–5684, 2008, doi 10.1074/jbc.M707386200.
11. C. Riebeling, J. C. Allegood, E. Wang, A. H. Merrill, and A. H. Futerman, "Two Mammalian Longevity Assurance Gene (LAG1) Family Members, trh1 and trh4, Regulate Dihydroceramide Synthesis Using Different Fatty Acyl-CoA Donors," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 44, pp. 43452–43459, 2003, doi 10.1074/jbc.M307104200.
12. S. Lahiri and A. H. Futerman, "LASS5 Is a Bona Fide Dihydroceramide Synthase That Selectively Utilizes Palmitoyl-CoA as Acyl Donor," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 40, pp. 33735–33738, Oct. 2005, doi 10.1074/jbc.M506485200.
13. Y. Mizutani, A. Kihara, and Y. Igarashi, "Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides," *Biochem. J.*, vol. 390, no. 1, pp. 263–271, 2005, doi 10.1042/BJ20050291.
14. J. Mesicek et al., "Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells," *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 9, pp. 1300–1307, 2010, doi <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.04.006>.
15. Y. Pewzner-Jung et al., "A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis II. Insights into molecular changes leading to hepatopathy," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 14, pp. 10911–10923, 2010, doi 10.1074/jbc.M109.077610.
16. B. Fekry, K. A. Jeffries, A. Esmailniakooshkghazi, B. Ogretmen, S. A. Krupenko, and N. I. Krupenko, "CerS6 Is a Novel Transcriptional Target of p53 Protein Activated by Non-genotoxic Stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 32, pp. 16586–16596, Aug. 2016, doi 10.1074/jbc.M116.716902.
17. B. Fekry et al., "C16-ceramide is a natural regulatory ligand of p53 in cellular stress response," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 4149, 2018, doi 10.1038/s41467-018-06650-y.
18. J. C. Cheng et al., "Radiation-induced acid ceramidase confers prostate cancer resistance and tumor relapse," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 10, pp. 4344–4358, Oct. 2013, doi 10.1172/JCI64791.

19. S. M. Cho and H. J. Kwon, “Acid ceramidase, an emerging target for anti-cancer and anti-angiogenesis,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 232–243, 2019, doi 10.1007/s12272-019-01114-3.
20. N. Coant, W. Sakamoto, C. Mao, and Y. A. Hannun, “Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease,” *Adv. Biol. Regul.*, vol. 63, pp. 122–131, Jan. 2017, doi 10.1016/J.JBIOR.2016.10.002.
21. M. V Airola and Y. A. Hannun, “Sphingolipid Metabolism and Neutral Sphingomyelinases,” E. Gulbins and I. Petrache, Eds. Vienna Springer Vienna, 2013, pp. 57–76.
22. H. Ito et al., “Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 gene expression of a human breast cancer cell line, MCF-7, induced by the anti-cancer drug, daunorubicin,” *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1789, no. 11, pp. 681–690, 2009, doi <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.08.006>.
23. A. A. Shamseddine et al., “P53-dependent upregulation of neutral sphingomyelinase-2 role in doxorubicin-induced growth arrest,” *Cell Death Dis.*, vol. 6, no. 10, pp. e1947–e1947, 2015, doi 10.1038/cddis.2015.268.
24. W. J. Kim et al., “Mutations in the neutral sphingomyelinase gene SMPD3 implicate the ceramide pathway in human leukemias,” *Blood*, vol. 111, no. 9, pp. 4716–4722, May 2008, doi 10.1182/blood-2007-10-113068.
25. K. Revill et al., “Genome-Wide Methylation Analysis and Epigenetic Unmasking Identify Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma,” *Gastroenterology*, vol. 145, no. 6, pp. 1424–1435.e25, Dec. 2013, doi 10.1053/j.gastro.2013.08.055.
26. L. Zhong et al., “Increased liver tumor formation in neutral sphingomyelinase-2-deficient mice,” *J. Lipid Res.*, vol. 59, no. 5, pp. 795–804, May 2018, doi 10.1194/jlr.M080879.
27. C. D. Britten et al., “A Phase I Study of ABC294640, a First-in-Class Sphingosine Kinase-2 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 23, no. 16, pp. 4642 LP – 4650, Aug. 2017, doi 10.1158/1078-0432.CCR-16-2363.

Differences in the expression levels of ceramide-metabolizing enzymes between two liver cancer cell lines Hep3B and Huh6

Vu Minh Thiet*, Nguyen Hoang Danh, Nguyen Thi Phuong, Do Hoang Dang Khoa
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
*vmthiet@ntt.edu.vn

Abstract Ceramide, a central molecule of sphingolipids, plays an important role in liver cancer and pathophysiology because this lipid regulates fatty acid metabolism, insulin resistance, and potently induces apoptosis. The metabolism of ceramide directly affects the viability of cancer cells and tumor formation during chemotherapy and radiation therapy. Therefore, ceramide-metabolizing enzymes are a new target in the research and development of cancer drugs and drug response mechanisms. In this study, qPCR method was used to comprehensively evaluate the expression level of enzymes that directly regulate ceramide metabolism in Hep3B hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cells. hepatocytes Huh6. The results showed that these two cell lines had markedly different expression levels of these enzymes. Compared with Huh6, Hep3B cells reduced the activity of C16-chain ceramide-producing enzymes, while increasing the expression levels of long-chain ceramide-producing enzymes C18 - C24; increased activity of the degrading enzymes ceramide hydrolase and sphingosine kinase, especially decreased expression of a neutral sphingomyelinase. These differences provide Hep3B stimulate cell proliferation and inhibit apoptosis compared to Huh6. Therefore, we suggest that Hep3B (and possibly other hepatocarcinoma cell lines) should be chosen over Huh6 in liver cancer studies involving ceramide metabolism.

Keywords Ceramide metabolism, apoptosis, liver cancer cells, qPCR.