

Titolo: La vitamina C uccide preferenzialmente le cellule staminali tumorali nel carcinoma epatocellulare tramite SVCT-2 - Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2

Codice: ASC007

Autore: Lv et al.

Data: 2018

Rivista: *npj Precision Oncology* 2:1

Argomento: acido ascorbico

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0044-8>

URL: <https://www.nature.com/articles/s41698-017-0044-8>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2024/07/09/asc007-lv-et-al-2018/>

Parole chiave: vitamina c, ascorbato, carcinoma epatocellulare, cellule staminali, staminalità, SVCT-2, risposta differenziale, morte cellulare

Tumore: carcinoma epatocellulare

Traduzione: Sono state tradotte la sezione "Riassunto", "Introduzione", "Risultati" e la sezione "Discussione". La sezione "Metodi" non è stata tradotta. La sezione "Risultati" è stata tradotta con semplificazioni.

**Punti di interesse:** Il cancro al fegato è il sesto tumore più frequente e la seconda causa di morte correlata al cancro in tutto il mondo. Il carcinoma epatocellulare (HCC), che rappresenta oltre l'80% dei casi, ha un elevato tasso di recidiva ed eterogeneità. Le cellule staminali tumorali (CSC), sono capaci di autorinnovarsi e differenziarsi, sono responsabili della progressione del tumore e della resistenza alla chemioterapia. Recentemente, diversi studi hanno mostrato che la vitamina C (acido L-ascorbico, ascorbato, VC) a concentrazioni farmacologiche raggiunte con somministrazione endovenosa (e.v.) uccide selettivamente una varietà di linee cellulari tumorali in vitro, reprimono la crescita di numerosi tumori nei modelli di xenotrapianto. L'acido ascorbico (la forma ridotta della vitamina C) viene specificamente trasportato nelle cellule da trasportatori della vitamina C sodio-dipendenti (SVCT) di cui ne esistono due isoforme: SVCT-1, espressa prevalentemente nei tessuti epiteliali, e SVCT-2 che è ubiquitaria e ha una maggiore affinità per la VC. L'espressione di SVCT-2, il suo ruolo nel cancro e nelle CSC rimangono scarsamente caratterizzati. In questo studio sono state impiegate linee cellulari di HCC umano e modelli di xenotrapianto derivato dal paziente (PDX) per studiare gli effetti antitumorali della VC. L'uso della VC e il rischio di recidiva dell'HCC sono stati esaminati retrospettivamente in 613 pazienti con HCC con resezione epatica curativa come trattamento iniziale. L'ipotesi testata è che l'espressione di SVCT-2 sia collegata alla diversa suscettibilità delle cellule tumorali del fegato, delle CSC e alla citotossicità indotta da VC.

### **Risultati indagini in vitro**

#### **SVCT-2 determina la suscettibilità differenziale alla morte cellulare indotta da VC farmacologica**

Cinque linee cellulari di HCC umano e due linee di cellule epatiche immortalate sono state studiate trattandole con concentrazioni di VC comprese tra 0,3 e 1,5 mM.

I risultati osservati sono:

- 1) drastica diminuzione della vitalità delle cellule HCC in modo dose-dipendente;
- 2) citotossicità delle VC debole per le cellule epatiche immortalate;
- 3) per tutte le linee cellulari HCC, le concentrazioni di VC che determinano a una diminuzione del

50% della sopravvivenza cellulare (valori IC50) sono inferiori a 1 mM, ma con differenze tra le varie linee cellulari. La IC50 era più alta nelle linee cellulari immortalate.

Per indagare se la differenza nella suscettibilità al VC deriva da diversi flussi di VC nelle cellule, le espressioni di SVCT-1 e SVCT-2, sono state esaminate. I risultati osservati sono:

- 1) sia i livelli di mRNA che i livelli proteici di SVCT-2 erano inversamente correlati con i valori IC50 di VC nelle cellule testate. Quindi più alti è la presenza di SVCT-2, più bassa è la IC50, minore vitamina C serve per diminuire del 50% la sopravvivenza cellulare;
- 2) l'espressione di SVCT-1 è irrilevanti per i valori IC50;
- 3) i livelli di espressione di SVCT-2 sono correlati positivamente con le concentrazioni di VC all'interno delle cellule testate dopo il trattamento con VC. Maggiore è l'espressione di SVCT-2 maggiore è la quantità di VC che entra nelle cellule.

Per esplorare ulteriormente il ruolo di SVCT-2, il gene per SVCT-2 è stato silenziato tramite RNA corto a forcina (shRNA) e vettore lentivirale. È stato osservato:

- 1) aumento della vitalità della cellule anche dopo il trattamento con VC, indicando resistenza alla VC;
- 2) il flusso di VC nelle cellule è diminuito drasticamente.

La sensibilità differenziale alla VC deriva da variazioni nel flusso di VC nelle cellule, che dipende dall'espressione di SVCT-2.

### **La VC farmacologica uccide preferenzialmente le CSC epatiche in vitro**

Considerato che le CSC epatiche mostrano un arricchimento di SVCT-2 è stato indagato se le CSC epatiche fossero più sensibili alla morte cellulare indotta da VC. Il trattamento con VC ha:

- 1) marcatamente sottoregolato le espressioni dei geni correlati alla staminalità;
- 2) ridotto la percentuale di cellule positive a marcatori di staminalità sia nelle cellule CSC di HCC che nelle sfere tumorali;
- 3) compromesso significativamente la capacità delle CSC di formare sferoidi tumorali, di accrescerli.

In contrasto con il cisplatino, al quale le CSC resistono, il trattamento con VC ha marcatamente sottoregolato la staminalità delle CSC.

### **Morte cellulare farmacologica indotta da VC dipendente da SVCT-2**

Vari meccanismi di induzione alla morte cellulare da VC sono stati presi in considerazione.

**Produzione di radicali liberi.** I livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono aumentati in linee cellulari di HCC che esprimono in modo differenziale la proteina SVCT-2 dopo l'esposizione a VC. È stato rilevata una maggiore produzione di ROS nelle cellule con un'espressione SVCT-2 relativamente più elevata. L'antiossidante, N-acetil-L-cisteina (NAC), che previene la produzione di ROS indotta da VC (uno scavenger di ROS), ripristina completamente la vitalità e la formazione di colonie tra le cellule trattate con VC.

**Danno al DNA.** In seguito al trattamento con VC è stato riscontrato un danno al doppio filamento del DNA, dose dipendente. Il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (una forma principale di ROS) da effetti simili al trattamento con VC. Il danno al DNA è stato prevenuto da NAC. La riduzione del danno è stata osservata in cellule con il silenziamento di SVCT-2. Il farmaco Olaparib, un inibitore della riparazione del DNA ha aumentato significativamente la morte cellulare indotta da VC.

**Deplezione di ATP.** Un eccessivo stress ossidativo causa l'esaurimento dell'adenosina trifosfato cellulare (ATP). Diminuzioni di ATP dipendenti dal tempo sono state osservate nelle cellule HCC trattate con VC e la riduzione dei livelli di ATP era maggiore nelle cellule che esprimevano

maggiormente SVCT-2. Questo effetto del trattamento con VC è stato drasticamente invertito da: 1) NAC suggerendo il ruolo dei ROS nel ridurre i livelli di ATP; 2) il silenziamento SVCT-2.

**Blocco del ciclo cellulare.** Il trattamento con VC ha indotto l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M, e una significativa riduzione delle fasi G0/G1, una maggiore espressione dell'inibitore della divisione cellulare, in modo dipendente dalla concentrazione. Inoltre, è stato rilevato un caratteristico picco del contenuto di DNA ipodiploide tipico di cellule apoptotiche, indicando l'induzione di apoptosi dopo l'arresto G2/M. Risultati simili si ottengono trattando le cellule con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al contrario, il trattamento con il NAC invece ha inibito l'arresto del ciclo cellulare innescato da VC.

Complessivamente, questi dati indicano che l'afflusso di VC nelle cellule tramite SVCT-2 aumenta i livelli di ROS intracellulari, che inducono danno al DNA e deplezione di ATP, portando alla morte cellulare parzialmente tramite arresto del ciclo cellulare e apoptosi.

### **Risultati indagini in vivo**

#### **La VC farmacologica compromette la crescita del tumore e sradica le CSC epatiche in vivo**

Per studiare gli effetti della VC farmacologica in vivo, sono stati preparati modelli di xenotrapianti di cellule HCC e modelli di xenotrapianti derivati da pazienti HCC (PDX). Coerentemente con i risultati in vitro, il trattamento con VC ha:

- 1) ridotto le espressioni dei geni correlati alla staminalità. La sola terapia convenzionale con cisplatino ha portato all'aumento delle CSC. La combinazione di VC e cisplatino è stata più efficace nel ridurre la crescita e il peso del tumore.
- 2) Nei modelli di xenotrapianti con tessuti da pazienti (PDX) di HCC con espressione SVCT-2 relativa bassa e alta, il trattamento con VC ha ritardato significativamente la crescita del tumore.
- 3) In modelli di xenotrapianti da pazienti che avevano un'espressione SVCT-2 relativamente più elevata, mostravano una crescita e una massa tumorale inferiori rispetto a quelli con espressione del trasportatore minore, suggerendo un'ipersensibilità verso il trattamento VC.
- 4) i livelli di espressione dei geni associati alle CSC e le percentuali di CSC nei PDX sono diminuiti drasticamente dopo il trattamento con VC, confermando il ruolo inibitorio di VC nelle CSC epatiche.

Il trattamento con VC inibisce la crescita del tumore nei modelli HCC PDX e il livello di espressione di SVCT-2 è associato alla risposta al trattamento con VC.

#### **La VC endovenosa riduce il rischio di progressione dell'HCC post-chirurgico**

Sono stati arruolati seicentotredici pazienti con HCC che hanno ricevuto una resezione epatica curativa e divisi in due gruppi: utenti VC e utenti non VC. Il 55,3% dei pazienti ha ricevuto 2 g di VC per via endovenosa per 4 o più giorni dopo l'epatectomia iniziale. La sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 5 anni per i pazienti che hanno ricevuto VC per via endovenosa è stata del 24%, rispetto al 15% per i pazienti non trattati con VC. Il tempo di sopravvivenza libera da malattia mediano per i pazienti trattati con VC è stato di 25,2 rispetto a 18 mesi per i non trattati con VC. Questi risultati suggeriscono che l'uso di VC per via endovenosa è collegato a un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia.

### **Discussione**

La VC farmacologica ha suscitato un crescente interesse nel campo della terapia del cancro. Pochi studi hanno valutato l'effetto della VC sulle cellule staminali del cancro (CSC). In questo studio, su CSC epatiche che hanno un'elevata espressione di SVCT-2, concentrazioni clinicamente ottenibili di VC hanno preferenzialmente sradicato le CSC epatiche in vitro e in vivo. Inoltre, con uno studio di

coorte retrospettivo è stato evidenziato che la VC per via endovenosa ha ridotto il rischio di progressione dell'HCC post-chirurgica.

Essendo la proteina chiave responsabile dell'assorbimento di VC, SVCT-2 svolge un ruolo cruciale nel regolare la sensibilità alla citotossicità indotta dall'ascorbato.

a) Maggiori espressioni di SVCT-2 sono correlate negativamente alla quantità di VC necessaria per ridurre del 50% la crescita cellulare, e positivamente con la quantità di VC nelle cellule HCC dopo il trattamento con VC.

b) Il silenziamento di SVCT-2 in cellule altamente sensibili, ha ridotto drasticamente la loro sensibilità alla VC.

c) SVCT-2 è altamente espresso nei campioni di HCC umano e particolarmente elevato nelle CSC epatiche. L'abbattimento dell'espressione di SVCT-2 ha influenzato significativamente l'autorinnovamento, la chemioresistenza e la tumorigenicità delle CSC epatiche.

La VC si distingue da altri farmaci chemioterapici ben definiti (ad esempio, cisplatino, doxorubicina) in quanto non determina l'arricchimento delle CSC, non determinando resistenza. Al contrario, è stato rivelato che il trattamento con VC riduce drasticamente la capacità di autorinnovamento di queste cellule, i livelli di espressione dei geni legati alla staminalità e le percentuali di CSC nell'HCC, indicando che le CSC erano più suscettibili alla morte cellulare indotta da VC. Pertanto, come farmaco per l'eradicazione delle CSC, la VC può rappresentare una strategia promettente per il trattamento dell'HCC, da solo o in combinazione con farmaci chemioterapici. Per quanto riguarda i meccanismi d'azione, questo studio nell'HCC, ha evidenziato che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generati da VC causavano stress genotossico (danno al DNA) e stress metabolico (deplezione di ATP), che portando all'arresto del ciclo cellulare e all'apoptosi.

Nel loro insieme, i risultati di questo studio svelano la potenziale applicazione della VC per la terapia dell'HCC.

Traduzione articolo

### **Riassunto**

**La vitamina C (acido L-ascorbico, ascorbato, VC) è un potenziale agente chemioterapico per i pazienti affetti da cancro. Tuttavia, gli effetti antitumorali della VC farmacologica sul carcinoma epatocellulare (HCC) e sulle cellule staminali del cancro al fegato (CSC) devono ancora essere completamente chiariti. Sono state impiegate linee cellulari di HCC umano e modelli di xenotrapianto derivato dal paziente (PDX) per studiare gli effetti antitumorali della VC farmacologica. L'uso della VC e il rischio di recidiva dell'HCC sono stati esaminati retrospettivamente in 613 pazienti con HCC che avevano ricevuto resezione epatica curativa come trattamento iniziale. Esperimenti in vitro e in vivo hanno inoltre dimostrato che le concentrazioni clinicamente ottenibili di VC inducono la morte cellulare nelle cellule di cancro al fegato e la risposta alla VC era correlata alle espressioni del trasportatore della vitamina C sodio-dipendente 2 (SVCT-2). L'assorbimento di VC tramite SVCT-2 ha aumentato i ROS intracellulari e successivamente ha causato danni al DNA e deplezione di ATP, portando all'arresto del ciclo cellulare e all'apoptosi. Ancora più importante, SVCT-2 era altamente espresso nelle CSC epatiche, che promuovevano il loro autorinnovamento e le rendevano più sensibili alla VC. Nei modelli di xenotrapianto di linee cellulari HCC, così come nei modelli PDX, VC ha ridotto drasticamente la crescita del tumore e ha sradicato le CSC epatiche. Infine, uno studio di coorte retrospettivo ha mostrato che l'uso di VC per via endovenosa era collegato a un miglioramento della sopravvivenza libera da malattia (DFS) nei pazienti con HCC (HR aggiustato = 0,622, IC al 95% da 0,487 a 0,795,  $p < 0,001$ ). I nostri dati evidenziano**

## **che la VC farmacologica può uccidere efficacemente le cellule tumorali del fegato e preferenzialmente sradicare le CSC epatiche, il che fornisce ulteriori prove a sostegno della VC come nuova strategia terapeutica per il trattamento dell'HCC.**

### **Introduzione**

Il cancro al fegato è il sesto tumore più frequente e la seconda causa di morte correlata al cancro in tutto il mondo (1). Il carcinoma epatocellulare (HCC) rappresenta oltre l'80% dei casi di cancro al fegato primario ed è caratterizzato da un elevato tasso di recidiva ed eterogeneità (2). Queste proprietà patologiche possono derivare da cellule staminali tumorali (CSC), che sono capaci di autorinnovarsi e differenziarsi, responsabili della progressione del tumore, delle metastasi e della resistenza alla chemioterapia (3, 4). Pertanto, l'eradicazione delle CSC sta emergendo come una nuova strategia di trattamento per il fegato cancro.

La vitamina C (acido L-ascorbico, ascorbato, VC), un importante antiossidante naturale, ha una storia controversa nel trattamento del cancro. Negli anni '70, Pauling e Cameron eseguirono studi clinici che mostravano l'efficacia dell'ascorbato per via endovenosa nel prolungare la sopravvivenza dei pazienti con cancro terminale (5,6,7). Tuttavia, queste ricerche furono pesantemente criticate dopo successivi studi in doppio cieco e placebo utilizzando VC orale, presso la Mayo Clinic che non mostrarono alcun beneficio (8, 9). Successivamente è stato riconosciuto che la via di somministrazione di VC era la ragione principale della discrepanza. Gli studi originariamente riportati utilizzando VC per via endovenosa producono concentrazioni plasmatiche molto più elevate rispetto agli studi successivi che utilizzano VC orale (10). Più recentemente, Chen et al. hanno rivelato che l'ascorbato a concentrazioni farmacologiche (0,3–20 mM) raggiunte solo mediante somministrazione endovenosa (e.v.) uccide selettivamente una varietà di linee cellulari tumorali in vitro, ma ha scarso effetto citotossico sulle cellule normali (11,12,13). Inoltre alte dosi parenterali di VC reprimono la crescita di numerosi tumori nei modelli di xenotrapianto, tra cui il cancro del pancreas, il cancro dell'ovaio, il cancro della prostata, il cancro del colon, il mesotelioma, il cancro al seno e il neuroblastoma (13,14,15,16). Queste osservazioni hanno riattivato l'interesse per gli effetti antitumorali della VC farmacologica a livello globale. Tuttavia, i meccanismi dettagliati alla base della citotossicità indotta da VC e i potenziali meccanismi che modulano le differenze nella sensibilità delle cellule tumorali al VC sono scarsamente compresi. Inoltre, se il VC abbia effetti tossici sulle CSC rimane una questione aperta.

L'acido ascorbico (la forma ridotta della vitamina C) viene specificamente trasportato nelle cellule dai trasportatori della vitamina C sodio-dipendenti (SVCT) (17). Due diverse isoforme di SVCT, SVCT-1 (codificato dal gene SLC23A1) e SVCT-2 (SLC23A2), sono stati clonati (18). SVCT-1 è espresso prevalentemente nei tessuti epiteliali, mentre l'espressione di SVCT-2 è ubiquitaria (19). Per quanto riguarda il fegato, SVCT-2 è la proteina chiave responsabile dell'assorbimento di VC (20). SVCT-2 ha una maggiore affinità per VC rispetto a SVCT-1 (21). Inoltre, le variazioni genetiche in SVCT-2 sono strettamente associate al rischio di vari tumori tra cui cancro gastrico, linfoma e carcinomi a cellule squamose della testa e del collo (22,23,24). Tuttavia, l'espressione di SVCT-2 e la funzione nel cancro e nelle CSC rimane scarsamente caratterizzata. Ipotizziamo che l'espressione di SVCT-2, principalmente responsabile dell'assorbimento di VC, sia collegata alla diversa suscettibilità delle cellule tumorali del fegato e delle CSC alla citotossicità indotta da VC. Inoltre, indaghiamo i meccanismi alla base della morte cellulare indotta da VC e i livelli di espressione di SVCT-2 nell'HCC e nelle CSC.

### **Risultati**

#### **SVCT-2 è altamente espresso nelle CSC epatiche ed è necessario per il mantenimento delle CSC epatiche**

Il trasportatore SVCT-2 è altamente espresso nei campioni di HCC rispetto ai tessuti peri-tumorali.

L'elevata espressione (grado 2+/3+) di SVCT-2 è in accordo con una sopravvivenza globale (OS) più scarsa dei pazienti con HCC e un comportamento del tumore più aggressivo rispetto ad un'espressione di SVCT-2 bassa. L'espressione di SVCT-2 è correlata positivamente con i geni legati alla staminalità (geni Sox-2, Oct-4, Lin28) o con il marcatore CD133 delle CSC. La formazione di sfere è una metodologia ben consolidata per aumentare il numero di CSC, che sfrutta la loro capacità di autorinnovamento (3). **In vitro**, abbiamo scoperto che l'espressione di SVCT-2 era notevolmente aumentata nelle sfere derivate dalle cellule HCC rispetto alle corrispondenti cellule aderenti (Fig. 1f, G; Fig. 1h, i). Per determinare ulteriormente il ruolo patologico di SVCT-2 nelle CSC epatiche, è stato silenziato il gene che codifica per SVCT-2 e questo ha ridotto 1) l'espressione dei marcatori correlati allo staminalità sia a livello di mRNA che di proteine; 2) la formazione di sfere; 3) i marcatori delle cellule staminali del cancro come CD133 e la EpCAM (molecole di adesione cellulare); 4) la resistenza ai farmaci chemioterapici. **Nei modelli in vivo**, la carenza di SVCT-2 ha ridotto notevolmente la crescita e il peso del tumore dello xenotrapianto. Coerentemente con i risultati in vitro, le espressioni dei marcatori di staminalità (CD133 e Oct-4) sono state ridotte nei tessuti tumorali derivati dalle cellule con il trasportatore SVCT-2 silenziato (shSVCT-2). Inoltre, il deficit di SVCT-2 ha promosso marcatori apoptotici. Complessivamente, questi dati suggeriscono che SVCT-2 è espresso preferenzialmente nelle CSC epatiche ed è necessario per il mantenimento delle CSC epatiche.

### **SVCT-2 determina la suscettibilità differenziale alla morte cellulare indotta da VC farmacologica**

Come evidenziato dalle analisi di farmacocinetica clinica (10) concentrazioni farmacologiche di VC plasmatico superiori a 0,3 mM sono ottenibili solo dalla somministrazione intravenosa (i.v.). Per imitare il potenziale clinico della somministrazione intravenosa (i.v.) abbiamo trattato cinque linee cellulari di HCC umano e due linee di cellule epatiche immortalate (HL-7702 e QSG-7701) con concentrazioni di VC comprese tra 0,3 e 1,5 mM. La vitalità delle cellule HCC è stata drasticamente ridotta dopo l'esposizione a VC in modo dose-dipendente, mentre la citotossicità delle VC sulle cellule epatiche immortalate era molto più debole. Per tutte le linee cellulari HCC, le concentrazioni di VC che portavano a una diminuzione del 50% della sopravvivenza cellulare (valori IC50) erano inferiori a 1 mM, mentre i valori IC50 di VC nelle linee cellulari epatiche immortalate erano ovviamente superiori a 1 mM (Fig. 3a). Queste cellule testate possono essere divise in tre gruppi in base al valore IC50 di VC, le cellule epatiche immortalizzate (HL-7702 e QSG-7701) con IC50 > 1 mM, le cellule HCC resistenti a VC (SMMC-7721 e HCC-LM3) con 0,7 mM < IC50 < 1 mM e celle sensibili a VC (Huh7, CSQT-2 e PLC/PRF/5) con IC50 < 0,7 mM (Fig. 3a). L'effetto inibitorio del VC è stato ulteriormente confermato nei modelli di xenotrapianto di cellule HCC-LM3 e Huh7 in vivo. Il tumore derivato da cellule Huh7 sensibili a VC mostrava un peso tumorale relativo inferiore rispetto alle cellule HCC-LM3 resistenti a VC dopo il trattamento con VC, in linea con i risultati in vitro.

Per indagare se la differenza nella suscettibilità al VC deriva da distinte concentrazioni di flusso di VC nelle cellule, abbiamo inizialmente esaminato le espressioni di SVCT-1 e SVCT-2, entrambi responsabili dell'assorbimento di VC nelle cellule, nelle cellule testate. È interessante notare che sia i livelli di mRNA che quelli proteici di SVCT-2 erano inversamente correlati con i valori IC50 di VC nelle cellule testate, mentre le espressioni di SVCT-1, che ha un'affinità inferiore per VC rispetto a SVCT-2 (21) erano irrilevanti per i valori IC50. Inoltre, i livelli di espressione di SVCT-2 erano correlati positivamente con le concentrazioni di VC intracellulari nelle cellule testate dopo il trattamento con VC. Per esplorare ulteriormente il ruolo di SVCT-2 nella sensibilità VC, abbiamo abbattuto l'espressione di SVCT-2 tramite RNA corto a forcina (shRNA) sulla linea cellulare Huh7 che esprime alti livelli di SVCT-2. Rispetto alle cellule di controllo, la vitalità delle cellule shSVCT-2 (cellule con gene del trasportatore silenziato) è aumentata significativamente dopo il trattamento

con VC, implicando resistenza a VC. Nel frattempo, il flusso di VC nelle cellule shSVCT-2 è diminuito drasticamente. Questi risultati indicano che la sensibilità differenziale al VC può derivare da variazioni nel flusso di VC nelle cellule, che dipende dall'espressione di SVCT-2.

### **La VC farmacologica uccide preferenzialmente le CSC epatiche in vitro**

Alla luce dei risultati di cui sopra che mostrano un arricchimento di SVCT-2 nelle CSC epatiche, abbiamo successivamente valutato se le CSC epatiche fossero più sensibili alla morte cellulare indotta da VC. Curiosamente, in contrasto con l'effetto dell'agente chemioterapico convenzionale cisplatino, al quale è noto che le CSC resistono (28) il trattamento con VC ha marcatamente sottoregolato le espressioni dei geni correlati alla staminalità e ha ridotto la percentuale di cellule CD133+ (25) EpCAM+ (29) o OV6+ (26,27) sia nelle cellule CSC di HCC che nelle sfere tumorali. Abbiamo ulteriormente determinato l'effetto della VC farmacologica sull'auto-rinnovamento delle CSC epatiche, come evidenziato dalla capacità delle CSC di formare sferoidi in vitro. Di conseguenza, VC ad alte dosi ha compromesso significativamente sia l'inizio della formazione delle sfere tumorali sia la crescita delle sfere tumorali derivate dalle cellule HCC in modo dipendente dal tempo e dalla dose.

### **Meccanismi dipendenti da SVCT-2 della morte cellulare farmacologica indotta da VC**

I livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono aumentati in due linee cellulari di HCC che esprimono in modo differenziale la proteina SVCT-2 dopo l'esposizione a VC. È stato rilevato più ROS nelle cellule Huh7 con un'espressione SVCT-2 relativamente più elevata rispetto alle cellule HCC-LM3. L'antiossidante, N-acetil-L-cisteina (NAC), che previene la produzione di ROS indotta da VC (uno scavenger di ROS), ripristina completamente la vitalità e la formazione di colonie tra le cellule trattate con VC. Inoltre, è stato riscontrato un danno al doppio filamento del DNA in seguito al trattamento con VC dose dipendente. Il danno al DNA è stato prevenuto da NAC, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (una forma principale di ROS) da effetti simili. Il silenziamento di SVCT-2 ha ridotto notevolmente il danno al DNA indotto da VC. Il farmaco Olaparib, un inibitore della riparazione del DNA ha aumentato significativamente la morte cellulare indotta da VC. L'aggiunta di cisplatino ha mostrato un effetto sinergico sulla morte cellulare rispetto a entrambi i farmaci da soli.

È risaputo che un eccessivo stress ossidativo causa l'esaurimento dell'adenosina trifosfato cellulare (ATP) (31) Diminuzioni di ATP dipendenti dal tempo sono state osservate nelle cellule HCC trattate con VC e la riduzione dei livelli di ATP era maggiore nelle cellule Huh7 che esprimevano SVCT-2 più elevate rispetto ad altre cellule. Il NAC ha invertito drasticamente la deplezione di ATP indotta da VC nelle cellule HCC, suggerendo il ruolo dei ROS nel ridurre i livelli di ATP. Allo stesso modo, il silenziamento SVCT-2 ha anche soppresso la deplezione di ATP nelle cellule Huh7 dopo il trattamento con VC. Il trattamento con VC ha indotto l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M, accompagnato da una significativa riduzione delle fasi G0/G1 e una maggiore espressione dell'inibitore della divisione cellulare, l'inibitore di chinasi p21 in modo dipendente dalla concentrazione, coerente con i risultati ottenuti con trattamenti con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e quelli con NAC che invece ha inibito l'arresto del ciclo cellulare innescato da VC. Inoltre, è stato rilevato un caratteristico picco del contenuto di DNA ipodiploide (sub-G1) che rappresenta le cellule apoptotiche, indicando l'apoptosi indotta da VC dopo l'arresto G2/M. In effetti, le proporzioni delle cellule apoptotiche precoci e tardive erano significativamente aumentate in modo dipendente dalla concentrazione di VC.

Abbiamo anche testato se la morte delle cellule HCC indotta da VC dipendesse dall'autofagia (32,33,34) o necrosi (35, 36).

Complessivamente, i nostri dati indicano che l'afflusso di VC nelle cellule tramite SVCT-2 aumenta i livelli di ROS intracellulari, che successivamente inducono danno al DNA e deplezione di ATP,

portando alla morte cellulare parzialmente tramite arresto del ciclo cellulare e apoptosi dipendente dalla caspasi, ma non autofagia o necroptosi.

### **La VC farmacologica compromette la crescita del tumore e sradica le CSC epatiche in vivo**

Per confermare ulteriormente i risultati di cui sopra in vivo, abbiamo preparato sia modelli di xenotrapianti di cellule HCC che modelli di xenotrapianti derivati da pazienti HCC (PDX). Coerentemente con i risultati in vitro, le espressioni dei geni correlati alla staminalità nello xenotrapianto tumorale sono state notevolmente ridotte dopo il trattamento con VC o VC e cisplatino, mentre la sola terapia convenzionale con cisplatino ha portato all'aumento delle CSC. È interessante notare che la combinazione di VC e cisplatino è stata ancora più efficace nel ridurre la crescita e il peso del tumore. Inoltre, VC o cisplatino da soli hanno comportato un aumento dell'espressione dei marcatori apoptotici, mentre la combinazione VC e cisplatino ha causato ulteriormente l'apoptosi cellulare nello xenotrapianto tumorale (Fig. 6b, c). Nei modelli di xenotrapianti con tessuti da pazienti (PDX) di HCC con espressione SVCT-2 relativa bassa e alta, il trattamento con VC ha ritardato significativamente la crescita del tumore (Fig. 6d, e). Curiosamente, PDX#2 e PDX#3, che avevano un'espressione SVCT-2 relativamente più elevata, mostravano una crescita e una massa tumorale relative inferiori rispetto a PDX#1, suggerendo un'ipersensibilità verso il trattamento VC (Fig. 6d, e). Questi risultati verificano che VC inibisce la crescita del tumore nei modelli HCC PDX e che il livello di espressione di SVCT-2 è associato alla risposta al trattamento con VC. Inoltre i livelli di espressione dei geni associati alle CSC e le percentuali di CSC nei PDX sono diminuiti drasticamente dopo il trattamento con VC, confermando il ruolo inibitorio di VC nelle CSC epatiche (Fig. 6f, g).

### **La VC endovenosa riduce il rischio di progressione dell'HCC post-chirurgico**

Il trattamento di protezione epatica viene regolarmente somministrato ai pazienti con carcinoma epatico dopo epatectomia. La VC è uno dei numerosi epatoprotettori comuni (37). Nel nostro Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai, Cina, alcuni pazienti con HCC hanno ricevuto VC per via endovenosa dopo epatectomia. Studi di farmacocinetica sull'uomo mostrano che 2 g di VC per via endovenosa raggiungono una concentrazione plasmatica di quasi 1,5 mM (10). È interessante notare che, a concentrazioni extracellulari superiori a 1 mM, VC induce una forte citotossicità per le cellule tumorali, comprese le cellule tumorali del fegato, come dimostrato negli studi di cui sopra (38). Pertanto, abbiamo ipotizzato che la VC endovenosa potrebbe ridurre il rischio di recidiva nei pazienti con HCC dopo resezione epatica curativa.

Sono stati arruolati nelle analisi seicentotredici pazienti con HCC che hanno ricevuto una resezione epatica curativa come trattamento iniziale tra il 2008 e il 2009 e che soddisfacevano i criteri di inclusione. I pazienti con HCC sono stati divisi in due gruppi: utenti VC e utenti non VC.

Trecentotrentanove partecipanti (55,3%) hanno ricevuto 2 g di VC per via endovenosa per 4 o più giorni dopo l'epatectomia iniziale. Come mostrato nella Tabella supplementare 2, la distribuzione dei fattori clinicopatologici tra utenti e non utenti di VC non presentava differenze significative. La sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 5 anni per i pazienti che hanno ricevuto VC per via endovenosa è stata del 24%, rispetto al 15% per i pazienti non trattati con VC per via endovenosa ( $p < 0,001$ ) (Fig. 6h). Il tempo DFS mediano per gli utilizzatori di VC è stato di 25,2 rispetto a 18 mesi per i non utilizzatori di VC ( $p < 0,001$ ). L'analisi univariata ha rivelato che dimensioni del tumore  $\geq 5$  cm, numero di tumori multipli, AFP  $\geq 20$   $\mu\text{g/L}$ , AFP  $\geq 400$   $\mu\text{g/L}$ , trombo tumorale e nessuna somministrazione di VC endovenosa post-chirurgica erano significativamente associati a una DFS più breve (Tabella 1). L'analisi multivariata ha inoltre dimostrato che la somministrazione di VC per via endovenosa era un fattore indipendente per il miglioramento della DFS (HR aggiustato = 0,622, IC al 95% da 0,487 a 0,795,  $p < 0,001$ ) (Tabella 1). Questi risultati suggeriscono che l'uso di VC per via endovenosa è collegato a un miglioramento della DFS nei pazienti con HCC.

## Discussione

Nonostante i recenti progressi nella terapia, il cancro al fegato rimane una delle neoplasie più letali. La VC ha una storia controversa nel trattamento del cancro. Negli anni '70, Pauling e Cameron riferirono che la VC per via endovenosa (10 g/die) era efficace nel prolungare la sopravvivenza dei pazienti affetti da cancro (5,6,7). Tuttavia, studi clinici condotti dalla Mayo Clinic hanno riscontrato che la stessa dose di VC era inefficace nel trattamento del cancro utilizzandolo per via orale (8, 9). Successivamente è stato riconosciuto che la via di somministrazione di VC era la ragione principale della discrepanza. Concentrazioni farmacologiche di VC plasmatiche, ottenibili con somministrazione endovenosa, possono uccidere le cellule tumorali (10). Attualmente, la VC farmacologica ha suscitato un crescente interesse nel campo della terapia del cancro. Tuttavia, pochi studi hanno studiato l'effetto della VC sulle cellule staminali del cancro (CSC), la sottopopolazione responsabile dell'iniziazione del tumore, delle metastasi, della recidiva e della resistenza alla chemioterapia (3, 4). In questo studio, sulla base dell'elevata espressione di SVCT-2, che è responsabile dell'assorbimento di VC, nelle CSC epatiche, abbiamo rivelato che le concentrazioni clinicamente ottenibili di VC hanno preferenzialmente sradicato le CSC epatiche in vitro e in vivo. Inoltre, in uno studio di coorte retrospettivo abbiamo scoperto che la VC per via endovenosa ha ridotto il rischio di progressione dell'HCC post-chirurgica.

Essendo la proteina chiave responsabile dell'assorbimento di VC nel fegato, SVCT-2 ha svolto un ruolo cruciale nel regolare la sensibilità alla citotossicità indotta dall'ascorbato (34). In questo studio, abbiamo anche rivelato che le espressioni di SVCT-2 erano inversamente associate ai valori IC50 di VC e correlato positivamente con le concentrazioni di VC intracellulare nelle cellule HCC dopo il trattamento con VC. Al contrario, il silenziamento di SVCT-2 nelle cellule Huh7 ha ridotto drasticamente la sensibilità al VC. Sorprendentemente, abbiamo anche osservato che SVCT-2 era altamente espresso nei campioni di HCC umano e preferenzialmente elevato nelle CSC epatiche. L'abbattimento dell'espressione di SVCT-2 ha influenzato significativamente l'autorinnovamento, la chemioresistenza e la tumorigenicità delle CSC epatiche. A questo proposito, SVCT-2 potrebbe fungere da potenziale marcatore CSC e bersaglio terapeutico nell'HCC. Inaspettatamente, la concentrazione fisiologica di VC non promuove marcatamente l'HCC in vitro. Abbiamo scoperto che una bassa dose (0,1 mM) di VC non ha avuto un'influenza significativa sulla crescita delle cellule HCC e sulle espressioni dei geni correlati allo staminalità (Figura 4a, b supplementare). Tuttavia, le nostre condizioni in vitro non sono in grado di imitare sufficientemente l'ambiente in vivo con ipossia, ipoglicemia e altri cambiamenti metabolici. Pertanto, sono necessari ulteriori studi per valutare l'effetto del VC fisiologico sull'HCC in vitro e in vivo.

Le CSC svolgono un ruolo critico nella regolazione dell'iniziazione del tumore, della recidiva e della chemioresistenza (3, 4). Nell'HCC, abbiamo precedentemente dimostrato che le CSC epatiche OV6+ mostrano resistenza alla chemioterapia e contribuiscono alla progressione e all'invasione dell'HCC (26, 27). Contrariamente alle aspettative, VC si distingue da altri farmaci chemioterapici ben definiti (ad esempio, cisplatino, doxorubicina) e il trattamento con VC non porta all'arricchimento delle CSC. Invece, studiando le caratteristiche chiave delle CSC in vitro e in vivo, abbiamo rivelato che il trattamento con VC riduceva drasticamente la capacità di autorinnovamento, i livelli di espressione dei geni associati alle CSC e le percentuali di CSC nell'HCC, indicando che le CSC erano più suscettibili alla morte cellulare indotta da VC. Pertanto, come farmaco per l'eradicazione delle CSC, il VC può rappresentare una strategia promettente per il trattamento dell'HCC, da solo o soprattutto in combinazione con farmaci chemioterapici.

È accettato che la citotossicità del VC farmacologica sia mediata dalla generazione di radicale ascorbato sostenibile e  $H_2O_2$  (11). Tuttavia, non esiste un meccanismo molecolare generale adatto per cellule tumorali eterogenee perché l' $H_2O_2$  potrebbe produrre ROS a valle e influenzare vari bersagli cellulari e molecolari. Studi precedenti hanno segnalato molteplici meccanismi in diversi tumori, tra cui l'apoptosi caspasi-dipendente e caspasi-indipendente (39), morte cellulare non apoptotica (11,40), autofagia (16), autoschizis (41), deplezione di ATP (25), danno al DNA (25,42) e arresto del ciclo cellulare (42). Nell'HCC, abbiamo scoperto che i ROS generati da VC causavano stress genotossico (danno al DNA) e stress metabolico (deplezione di ATP), che attivavano ulteriormente l'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21, portando all'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M e all'apoptosi dipendente dalla caspasi nelle cellule HCC (Fig. 6i). Inoltre, abbiamo dimostrato un effetto sinergico del VC e del farmaco chemioterapico cisplatino sull'uccisione dell'HCC sia in vitro che in vivo. È noto che anche il trattamento con cisplatino provoca danni al DNA, nonostante attraverso un meccanismo distinto da quello del VC (43). Il cisplatino induce danni al DNA attraverso la reazione della molecola di platino con siti nucleofili anziché ROS (43). Di conseguenza, la combinazione VC e cisplatino ha portato a un danno al DNA maggiore nelle cellule HCC rispetto all'uso singolo. È stato anche riportato che la VC per via endovenosa riduce la tossicità associata alla chemioterapia del carboplatino e del paclitaxel nei pazienti (38) ma il meccanismo specifico necessita di ulteriori indagini.

Studi di farmacocinetica mostrano che 2 g di VC per via endovenosa raggiungono una concentrazione plasmatica di quasi 1,5 mM (10), una concentrazione sufficiente a indurre la morte nelle cellule HCC, come evidenziato dai nostri studi in vitro. Il nostro studio di coorte retrospettivo ha inoltre dimostrato che l'uso di VC per via endovenosa (2 g) era correlato al miglioramento della sopravvivenza in assenza di malattia (DFS) nei pazienti con HCC dopo epatectomia iniziale. Infatti, diversi studi clinici con VC per via endovenosa ad alte dosi sono stati condotti in pazienti con cancro avanzato e hanno rivelato una migliore qualità della vita e un sopravvivenza totale (OS) prolungata (44). Considerando la dose molto più elevata ( $\geq 50$  g) impiegata in questi studi clinici, ulteriori studi clinici saranno necessari per dimostrare la sicurezza, l'efficacia e le dosi di VC nel trattamento dell'HCC. Tutti gli xenotrapianti sono stati eseguiti in topi nudi con sistema immunitario compromesso per testare l'effetto antitumorale del VC negli studi di cui sopra. Poiché la VC può aiutare a rafforzare il sistema immunitario del corpo per combattere il cancro, abbiamo esaminato ulteriormente l'effetto del VC ad alte dosi sulla progressione dell'HCC e sulle cellule immunitarie utilizzando topi normali. Allo stesso modo, il trattamento con VC ha inibito significativamente la crescita di tumori derivati da cellule di cancro al fegato di topo. Inoltre, la VC ad alte dosi non era tossica per le cellule immunitarie e per le principali sottopopolazioni di cellule immunitarie in vivo. Pertanto, l'effetto inibitorio della VC farmacologica sul cancro al fegato potrebbe non essere principalmente attraverso la promozione del sistema immunitario. Nel loro insieme, i nostri risultati svelano la potenziale applicazione della VC per la terapia dell'HCC. I meccanismi su come la VC farmacologica uccide le cellule tumorali e uccide preferenzialmente le CSC tramite SVCT-2 sono riassunti in Fig. 6i. In particolare, proponiamo anche che SVCT-2 sia un nuovo marcatore CSC e bersaglio terapeutico nell'HCC e che il suo livello di espressione possa fungere da biomarcatore per la risposta VC.