论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201408032

低浓度亚砷酸钠抑制 Oct4、Sox2 基因表达诱导肝癌干细胞分化

金世龙,张 鹏,匡远黎,杜 波,唐华明,王 郑,谭智明 (405400 重庆,重庆市开县人民医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 观察 HepG2、Hep3B、HuH7 和 SMCC-7721 细胞对亚砷酸钠的反应,CD133 及 CD13 分子的表达和肿瘤球形成的差异,分析低浓度亚砷酸钠处理前后 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4、Sox2 因子的表达变化,探讨低浓度亚砷酸钠对 HCC 细胞生长的抑制机制。**方法** CCK-8 法检测 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/mL 不同浓度亚砷酸钠处理 48、72、96 h 对 HepG2、Hep3B、HuH7 和 SMCC-7721 细胞生长的抑制作用;分析 HepG2、Hep3B、HuH7、SMCC-7721 和原代 HCC 细胞 CD13、CD133 表达及肿瘤球形成能力,确定是否含肝癌干细胞(LCSCs);观察 0.5 μg/mL 亚砷酸钠处理 HuH7 和原代 HCC 细胞前后 Oct4 和 Sox2 基因和蛋白表达的变化,分析低浓度亚砷酸钠对 LCSCs 有何作用。**结果** 亚砷酸钠处理 HCC 细胞 48、72、96 h,亚砷酸钠明显抑制 HepG2、Hep3B、HuH7 和 SMCC-7721 细胞生长,对 HCC 细胞增殖抑制作用与浓度和作用时间有关。亚砷酸钠处理 HCC 细胞 96 h,0.2、0.4 μg/mL 亚砷酸钠已经明显抑制 SMCC-7721 细胞生长($P<0.05$,$P<0.01$)。0.4 μg/mL 亚砷酸钠明显抑制 HepG2($P<0.01$)和 Hep3B($P<0.01$)细胞增殖。0.1、0.2、0.4、0.6 μg/mL 亚砷酸钠刺激 HuH7 细胞增殖,但差异无统计学意义($P>0.05$),0.8 μg/mL 亚砷酸钠非常明显抑制 HuH7 细胞增殖($P<0.01$)。亚砷酸钠对 HuH7 细胞存在低浓度刺激 HuH7 细胞增殖和较高浓度抑制 HuH7 细胞增殖的双向作用,随着作用时间延长,相同浓度下抑制作用增强。低浓度亚砷酸钠对 SMCC-7721、HepG2 和 Hep3B 细胞几乎无刺激增殖作用。HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 既不表达 CD133,也不形成肿瘤球。HuH7 和原代 HCC 细胞同时表达 CD133、CD13 标志,也具有形成肿瘤球能力,HuH7 和原代 HCC 细胞含有 $CD133^+CD13^+$ LCSCs。HuH7 和原代 HCC 细胞表达 Oct4 和 Sox2 基因和蛋白,0.5 μg/mL 亚砷酸钠可以下调 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 基因和蛋白表达。**结论** 低浓度亚砷酸钠下调或抑制含 $CD133^+CD13^+$ LCSCs 的 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 基因和蛋白表达,推测低浓度亚砷酸钠可能诱导 LCSCs 分化。

[关键词] 肝细胞癌;肝癌干细胞;亚砷酸钠;Oct4;Sox2

[中图法分类号] R73-361;R735.7;R979.12 [文献标志码] A

Low concentration of sodium arsenite induces differentiation of liver cancer stem cells through inhibiting Oct4 and Sox2 expression in hepatocellular carcinoma cells

Jin Shilong, Zhang Peng, Kuang Yuanli, Du Bo, Tang Huaming, Wang Zheng, Tan Zhiming (Department of Hepatobiliary Surgery, Kaicounty People's Hospital, Chongqing, 405400, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the growth inhibition mechanism of hepatocellular carcinoma HCC cells through comparing their responses to sodium arsenite, CD13 and CD133 expressions, and formation of tumor spheres in HepG2, Hep3B, HuH7 and SMCC-7721 cells, and analyze Oct4 and Sox2 gene expression in HuH7 and primary HCC cells treated with low concentration of sodium arsenite. **Methods** CCK-8 assay was used to measure the effect of different concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 μg/mL) of sodium arsenite on growth inhibition of HepG2, Hep3B, HuH7 and SMCC-7721 cells for 48, 72 and 96 h, respectively. The expression of CD13 and CD133 in HepG2, Hep3B, HuH7, SMCC-7721 and primary HCC cells and the formation of tumor spheres were analyzed to determine liver cancer stem cells (LCSCs). The

[基金项目] 重庆市卫生局中医药科技项目(ZY20132047)

[通信作者] 张 鹏, E-mail: cqkxzhp@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1531.096.html(2014-12-05)

expression of Oct4 and Sox2 detected in HuH7 and primary HCC cells treated with 0.5 μg/mL of sodium arsenite, and the effect of low concentration of sodium arsenite on LCSCs was analyzed. **Results** In 48, 72 and 96 h after treatment with sodium arsenite, the growth of HepG2, Hep3B, HuH7 and SMCC-7721 cells was inhibited, and the inhibitory effect of sodium arsenite on HCC cells was associated with the treating time and concentration. In 96 h, 0.2 and 0.4 μg/mL of sodium arsenite significantly inhibited the growth of SMCC-7721 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and 0.4 μg/mL of sodium arsenite markedly inhibited the proliferation of HepG2 cells ($P < 0.01$) and Hep3B cells ($P < 0.01$). In addition, 0.8 μg/mL of sodium arsenite exhibited highly significant growth inhibitory effect on HuH7 cells ($P < 0.01$), while 0.1 to 0.6 μg/mL of sodium arsenite promoted the proliferation of HuH7 cells, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). However, low concentration of sodium arsenite did not promote the proliferation of HepG2, Hep3B and SMCC-7721 cells. SMCC-7721, HepG2 and Hep3B cells had no CD133 expression and no formation of tumor spheres. In contrast, HuH7 and primary HCC cells expressed CD133 and CD13, and formed typical tumor spheres. HuH7 and primary HCC cells contained $CD133^+CD13^+$ LCSCs and expressed Oct4 and Sox2 gene and protein, and 0.5 μg/mL of sodium arsenite could down-regulate the expression. **Conclusion** Low concentration of sodium arsenite down-regulates or inhibits Oct4 and Sox2 at transcription and protein levels in HuH7 and primary HCC cells containing $CD133^+$ $CD13^+$ LCSCs, which suggests that low concentration of sodium arsenite may induce differentiation of $CD133^+$ $CD13^+$ LCSCs.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; liver cancer stem cells; sodium arsenite; Oct4; Sox2

Supported by the Project of Science and Technology for Traditional Chinese Medicine Chongqing Municipal Health Bureau (ZY20132047). Corresponding author: Zhang Peng, E-mail: cqkxzhp@163.com

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发病率居世界恶性肿瘤第5位,几乎45%的HCC病例出现于中国,且与乙型和丙型肝炎病毒感染有关[1]。HCC诊断时多数已属进展期,手术切除率低于50%,即使手术切除也易复发和转移,5年生存率只有10%~30%[2]。研究发现肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)具有自我更新、多潜能分化和对放化疗抵抗特性,可能是肝癌复发和转移的根源[3]。CD133、CD44、CD90、EpCAM、CD13和SP侧群单独作为LCSCs标志仍存在争议,文献[3-4]发现只有$CD13^+CD133^+$ LCSCs和$CD133^+$ $EpCAM^+$ LCSCs最具有LCSCs生物学特征。研究发现三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)明显抑制HCC细胞增殖、诱导癌细胞凋亡[5],但As_2O_3对HepG2和SMCC-7721的生长抑制机制仍不清楚。为了解HepG2、Hep3B、HuH7和SMCC-7721细胞是否含LCSCs,低浓度砷剂是否抑制LCSCs Oct4、Sox2的表达,明确低浓度砷剂对LCSCs分化有无作用,本研究观察HepG2、Hep3B、HuH7、SMCC-7721和原代HCC细胞CD133、CD13标志表达及其对亚砷酸钠反应的差异,分析低浓度亚砷酸钠对HuH7和原代HCC细胞Oct4、Sox2因子表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌HuH7细胞由第三军医大学西南医院病理研究所提供,HepG2、Hep3B和SMCC-7721由西南医院肝胆外科研究所赠送。CD13荧光抗体购自BD公司,CD133荧光抗体购自美天尼公司,CCK-8、DMEM培养基和胎牛血清为HyClone产品,Oct4抗体购自Abcom公司,Sox2为Cell Signaling Technology公司产品。流式细胞仪为BD FACSAria Ⅱ,使用Thermo Multiskan Spectrum全波长酶标仪。激光共聚焦显微镜为LSM780。总RNA提取试剂盒、cDNA逆转录试剂盒为BioFlux产品。Promega Go*Taq* qPCR Master Mix为Promega公司产品。

1.2 HCC细胞培养及亚砷酸钠处理HCC细胞

HuH7、HepG2、Hep3B和SMCC-7721细胞在10% FBS的DMEM培养液,37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中孵育,细胞汇合度达到70%~80%时采用0.25%胰酶消化细胞进行实验。将普通培养HCC和原代HCC细胞经0.1~1.0 μg/mL终浓度亚砷酸钠处理。

1.3 肿瘤球培养

以无血清DMEM/F12(1∶1)基础培养基,加入EGF(10 ng/mL)、bFGF(20 μg/mL)、N2、B27等制成标准培养基,于超低粘附6孔板加入3 mL标准培养基和5.0×10^3个HCC细胞,在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中孵育,每日半量换新鲜培养基,观察记录细胞球情况。

1.4 流式细胞术检测HCC细胞CD13、CD133分子表达

将普通培养条件下培养的4种HCC细胞常规消化后制成单细胞悬液,进行细胞计数,PBS洗2遍,分别装入1.5 mL EP管中,设置空白对照管、CD13、CD133、CD13-CD133双抗体4组,每管中加入5 μL抗体,4 ℃避光孵育30 min,700 r/min离心5 min弃上清,PBS洗3遍,300 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测CD13、CD133分子表达。

1.5 CCK-8分析亚砷酸钠对HCC细胞抑制作用

HCC细胞接种于96孔板,每孔加1.0×10^3个细胞,加入100 μL 10% FBS的DMEM培养基(每2天换液)使其贴壁生长。次日细胞贴壁后分别加入不同浓度亚砷酸钠(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/mL),每种浓度设12个孔,设调零孔12个(不加细胞)和细胞对照孔12个(不加药物),在37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中孵育48、72、96 h后吸出培养液。每孔分别加入90 μL DMEM培养基和10 μL CCK-8溶液,继续培养2 h,在酶标仪波长450 nm处测定光密度值[$D(450)$]。

1.6 Western blot检测HCC细胞Oct4和Sox2的表达

①HCC细胞准备:HCC常规胰酶消化制成细胞悬液,细胞数1.0×10^6/mL,1 500 r/min离心5 min,移入1.5 mL EP管,PBS洗2次。②细胞总蛋白提取:细胞悬液离心吸尽上清液,加入200 μL蛋白酶抑制剂的裂解液,冰上裂解30 min,4 ℃ 12 000 r/min离心15 min,上清液移入EP管,蛋白定量后蛋白上样缓冲液稀释,煮3 min,分后置-20 ℃备用。③配胶:配置10%分离胶和4%积层胶。④上样和电泳:上样量为每泳道50 μg,体积25~30 μL。电泳,积层胶电压80 V,分离胶电压100~120 V,电泳2~3 h。⑤电转印:切胶后PADV膜向正极,胶在负极,将滤纸、PVDF膜及凝胶整齐重叠后放在湿转槽、电流150 mA转移90 min。⑥杂交:取下PVDF膜,5%脱脂奶粉PBS封闭,室温振摇1~2 h。将封闭的膜滴加一抗按1∶100(3% BSA)、4 ℃湿盒内过夜,次日PBS漂洗15 min×1次,5 min×4次,二抗按1∶2 500(3% BSA)、25 ℃振摇1 h,PBS漂洗15 min×1次,5 min×4次。⑦化学试剂显色:混合等体积A液和B液(各500 μL,共1 mL),将显色剂滴加到PVDF膜正面,开始显色记录图像。

1.7 免疫荧光检测HuH7细胞Oct4和Sox2因子

0.5 μg/mL亚砷酸钠处理3 d的HuH7细胞和HuH7细胞普通培养在10 mm盖玻片上,长到60%用37 ℃预热PBS漂洗2次,4%多聚甲醛室温固定15 min,PBS洗5 min后用0.5% Triton X-100的PBS室温下脱色摇床振摇15 min,PBS洗3次。取出盖玻片放到载玻片上,10%山羊血清37 ℃封闭30 min,Oct4抗体用PBS按1∶50滴加15~20 μL到盖玻片上,湿盒内4 ℃冰箱过夜。有细胞的盖玻片放进24孔板,PBS脱色摇床洗3次,取出盖玻片滴加20 μL PBS 1∶50稀释的荧光抗体,37 ℃避光孵育60 min。盖玻片放进24孔板内,经PBS洗3次,Hoechst33342染色细胞核,PBS洗盖波片2次,取出盖玻片,封片后激光共聚焦显微镜下观察细胞Oct4和Sox2蛋白的表达。

1.8 定量PCR分析HuH7和原代细胞Oct4和Sox2基因表达

①用TRIzol Reagent提取HCC细胞总RNA。②逆转录:按BioKT cDNA first strand cynthesis Kit使用说明设置20 μL反应体系,在室温10 min,42 ℃ 45 min,95 ℃ 5 min,冰浴5 min。逆转录后cDNA在-20 ℃保存。③引物序列:GAPDH上游引物:5′-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3′,下游引物5′-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3′,片段大小108 bp;Oct4上游引物:5′-GGCTCGAGAAGGATGTGGTC-3′,下游引物:5′-GAAGTGAGGGCTCCCATAGC-3′,片段大小188 bp;Sox2上游引物:5′-CAGGAGTTGTCAAGGCAGAGA-3′,下游引物:5′-CGCCGCCGATGATTGTTATT-3′,片段大小171 bp。④荧光定量PCR:按Promega Go*Taq* qPCR Master Mix Kit使用说明,20 μL体系,ABI7500荧光定量PCR仪进行反应。预变性95 ℃4 min,95 ℃ 30 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,反应40个循环。

1.9 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

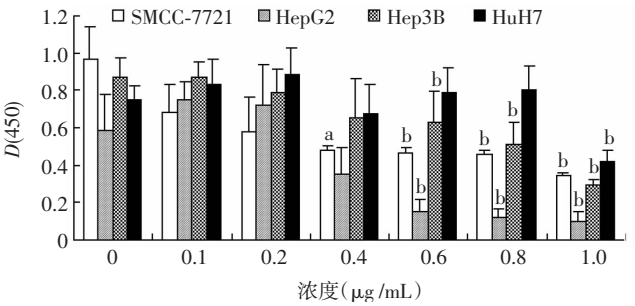
2.1 亚砷酸钠抑制SMCC-7721、HepG2、Hep3B和HuH7细胞生长

亚砷酸钠处理HCC细胞48 h(图1),0.4 μg/mL亚砷酸钠开始抑制SMCC-7721细胞生长($P<0.05$),0.6 μg/mL亚砷酸钠非常明显抑制SMCC-7721($P<0.01$)、HepG2($P<0.01$)和Hep3B($P<0.01$)细胞增殖。0.1~0.8 μg/mL亚砷酸钠刺激HuH7细胞增殖,但差异无统计学意义($P>0.05$),1.0 μg/mL亚砷酸钠非常明显抑制HuH7细胞增殖($P<0.01$)。亚砷酸钠作用HCC细胞72 h(图2),0.4 μg/mL亚砷酸钠非常明显抑制SMCC-7721($P<0.01$)、HepG2($P<0.01$)和Hep3B($P<0.01$)细胞增殖。0.1~0.6 μg/mL亚砷酸钠刺激HuH7细胞增殖,但差异无统计学意义($P>0.05$),而0.8 μg/mL亚砷酸钠非常明显抑制HuH7细胞增殖($P<0.01$)。亚砷酸钠处理HCC细胞96 h(图3),0.2、0.4 μg/mL亚砷酸钠明显抑制SMCC-

7721 细胞生长($P<0.05$,$P<0.01$)。0.4 μg/mL 亚砷酸钠明显抑制 HepG2($P<0.01$)和 Hep3B($P<0.01$)细胞增殖。0.1~0.6 μg/mL 亚砷酸钠刺激 HuH7 细胞增殖,但差异无统计学意义($P>0.05$),0.8 μg/mL 亚砷酸钠非常明显抑制 HuH7 细胞增殖($P<0.01$)。抑制实验结果显示,亚砷酸钠处理 HCC 细胞 48、72、96 h,低浓度亚砷酸钠对 SMCC-7721、HepG2 和 Hep3B 细胞几乎无刺激增殖作用,表明其低浓度就开始抑制其增殖;而亚砷酸钠对 HuH7 细胞存在低浓度刺激 HuH7 细胞增殖和较高浓度抑制 HuH7 细胞增殖的双向作用,随着作用时间延长,相同浓度下抑制作用增强。这证实亚砷酸钠抑制4 种HCC 细胞生长,0.4 μg/mL 亚砷酸钠明显抑制 HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 细胞生长,0.8 μg/mL 亚砷酸钠明显抑制 HuH7 细胞增殖,HuH7 细胞对亚砷酸钠耐受能力最强。

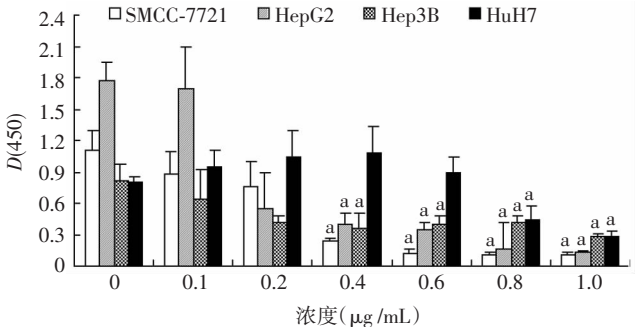
2.2 HuH7 和原代 HCC 细胞含 LCSCs

流式细胞双标技术检测结果显示,HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 不表达 LCSCs 的标志 CD133 分子,Hep3B 和 SMCC-7721 表达 CD13 抗原。HuH7 和原代 HCC 细胞同时表达 CD133、CD13 标志,含有 $CD133^+CD13^+$ HCC 细胞。SMCC-7721、HepG2 和 Hep3B 细胞不能形成肿瘤球,HuH7 和原代 HCC 细胞形成典型肿瘤球(图4、5)。这提示 HuH7 和原代 HCC 细胞含 LCSCs。



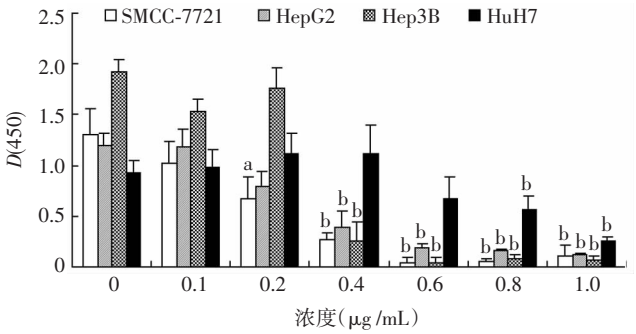
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 1 亚砷酸钠处理 48 h SMCC-7721、HepG2、Hep3B 和 HuH7 细胞生长抑制情况



a:$P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 2 亚砷酸钠处理 72 h SMCC-7721、HepG2、Hep3B 和 HuH7 细胞生长抑制情况

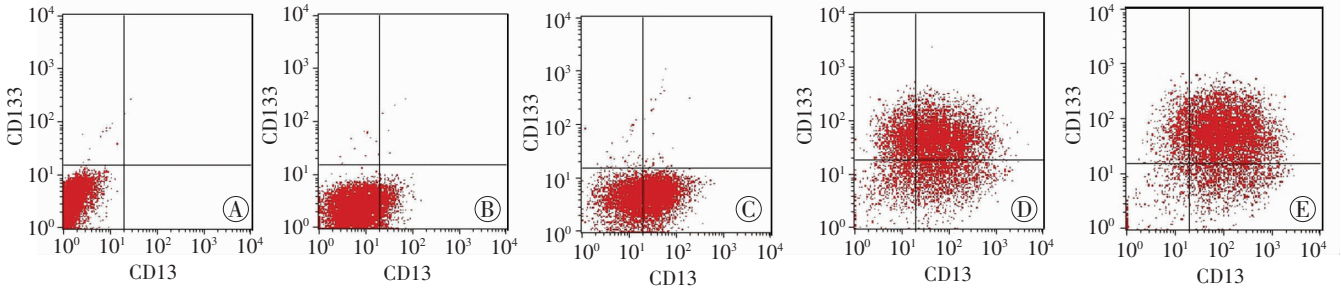


a:$P<0.01$,与 0 μg/mL 比较

图 3 亚砷酸钠处理 96 h SMCC-7721、HepG2、Hep3B 和 HuH7 细胞生长抑制情况

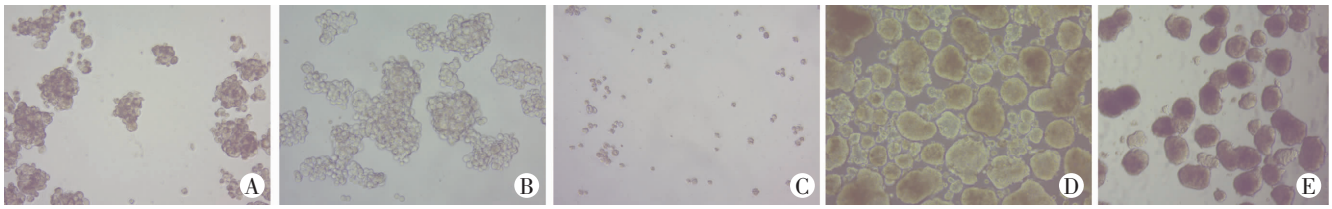
2.3 亚砷酸钠下调 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 蛋白的表达

为了观察亚砷酸钠是否下调 HCC 细胞 Oct4 蛋白的表达,我们用含 0.5 μg/mL 亚砷酸钠处理 HuH7 和原代 HCC 细胞 5 d,分析 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 蛋白表达变化,亚砷酸钠处理后 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 蛋白表达明显下调,HuH7 细胞表达 Oct4 蛋白颗粒明显减少。HuH7 和原代 HCC 细胞表达 Sox2 蛋白,亚砷酸钠处理后 HuH7 和原代 HCC 细胞蛋白表达明显下调(图6、7)。



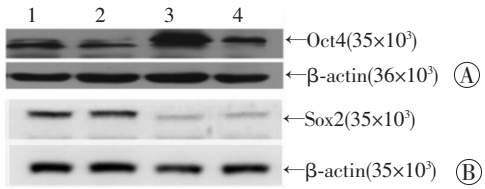
A:HepG2 细胞既不表达 CD13,也不表达 CD33;B:Hep3B 细胞仅表达少量 CD13,不表达 CD133;C:SMCC-7721 细胞表达 CD13 较多,不表达 CD133;D:HuH7 细胞表达 CD13 和 CD133;E:原代 HCC 细胞表达 CD13 和 CD133

图 4 流式细胞双标技术检测 HCC 细胞株和原代 HCC 细胞 CD13 和 CD133 分子表达



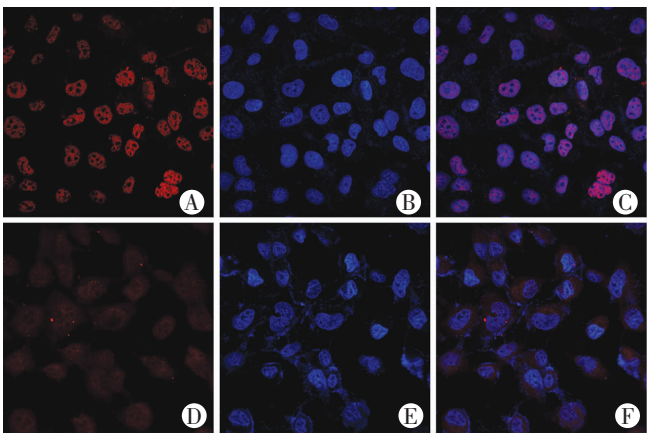
A:HepG2;B:Hep3B;C:SMCC-7721;D:HuH7;E:原代HCC

图5 HCC细胞株和原代HCC细胞肿瘤球形成 (倒置显微镜 ×200)



1:原代HCC细胞处理前;2:原代HCC细胞处理后;3:HuH7细胞处理前;4:HuH7细胞处理后

图6 Western blot检测亚砷酸钠处理前后HuH7和原代HCC细胞Oct4(A)和Sox2(B)蛋白的表达

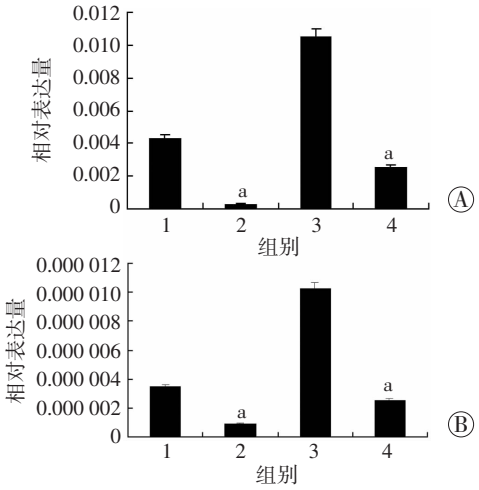


A、D:表达Oct4蛋白的细胞核;B、E:被Hoechst33342染色的细胞核;C、F:Oct4和Hoechst33342图像重合;A~C:HuH7对照细胞,核形态正常,表达Oct4蛋白的细胞核形态清晰;D~F:经亚砷酸钠处理HuH7细胞,细胞核形态多变,核内Oct4蛋白明显减少,仅见浅红色核

图7 免疫荧光观察亚砷酸钠处理前后HuH7细胞核内Oct4蛋白的表达 (激光共聚焦显微镜 ×400)

2.4 亚砷酸钠下调HuH7和原代HCC细胞Oct4和Sox2基因的表达

定量PCR分析结果显示,HuH7和原代HCC细胞表达Oct4、Sox2基因,0.5 μg/mL亚砷酸钠处理HuH7和原代HCC细胞5 d后HuH7和原代HCC细胞Oct4和Sox2基因表达明显下调($P<0.05$,图8)。



1:HuH7细胞处理前;2:HuH7细胞处理后;3:原代HCC细胞处理前;4:原代HCC细胞处理后 a:$P<0.05$,与处理前比较

图8 定量PCR检测亚砷酸钠处理前后HuH7和原代HCC细胞Oct4(A)和Sox2(B)基因的表达

3 讨论

HCC恶性程度高,切除后易复发转移,临床疗效差的根源是缺乏有效清除针对放化疗抵抗、处于休眠状态的LCSCs的方法。本研究发现0.6 μg/mL低浓度亚砷酸钠作用48 h就能非常显著抑制HepG2、Hep3B和SMCC-7721增殖($P<0.01$),而0.1~0.8 μg/mL刺激HuH7细胞增殖,1.0 μg/mL亚砷酸钠明显抑制HuH7细胞增殖($P<0.01$);亚砷酸钠处理HCC细胞72、96 h,0.4 μg/mL低浓度亚砷酸钠就能非常显著抑制HepG2、Hep3B和SMCC-7721增殖($P<0.01$),而亚砷酸钠浓度达到0.8 μg/mL时才能非常明显抑制HuH7细胞增殖($P<0.01$),0.1~0.6 μg/mL反而刺激HuH7细胞增殖($P>0.05$)。以上提示:①亚砷酸钠对HepG2、Hep3B、HuH7和SMCC-7721细胞都有明显的抑制作用,但HCC细胞抑制增殖作用存在浓度的差异;②亚砷酸钠对HCC细胞抑制作用随时间延长,相同浓度下抑制作用增强;③亚砷酸钠对HuH7细胞存在抑制和刺激增殖的双向作用,低浓度短期刺激增殖可能与早幼粒细胞白血病蛋白(PML)表达下调后,PML蛋白对肿瘤抑制作用减弱有关;对

HuH7 抑制是 PML 缺失后 Oct4、Sox2 等基因表达抑制的结果。既然亚砷酸钠对 HepG2 和 SMCC-7721 增殖具有明显抑制作用,为何Ⅱ期临床试验结果显示单独使用亚砷酸钠抗癌效果很不理想[6]? 我们比较 HepG2、Hep3B、SMCC-7721、HuH7 和原代 HCC 细胞 CD133、CD13 标志的表达、肿瘤球形成和对亚砷酸钠的反应,发现 3 个差异:①HepG2、Hep3B、SMCC-7721 细胞几乎不表达 CD133 分子,HuH7 及原代 HCC 细胞同时表达 CD133、CD13 标志。研究已证实 $CD133^+$ $CD13^+$ HCC 细胞具有 LCSCs 的生物学特征[3,7]。②HepG2、Hep3B、SMCC-7721 细胞不能形成肿瘤球,HuH7 和原代 HCC 细胞具有成瘤能力,后者具备自我更新能力。③0.2、0.4 μg/mL 低浓度亚砷酸钠非常显著抑制 HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 增殖($P<0.01$),0.8 μg/mL 亚砷酸钠才明显抑制 HuH7 细胞增殖($P<0.01$)。这些差异的关键是因为 HuH7 细胞含有 $CD13^+$ $CD133^+$ HCC,原代 HCC 与 HuH7 细胞具有 $CD13^+$ $CD133^+$ HCC 和成球能力,因此,用抑制 Hep3B、HuH7 和 SMCC-7721 的低浓度亚砷酸钠治疗 HCC,不仅不会抑制 HCC 细胞生长,反而会刺激 HCC 细胞生长。

Oct4 基因特异表达于胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESCs)及癌干细胞(cancer stem cells,CSCs)、早期胚胎、生殖细胞,Oct4 不表达于已分化的细胞,是维持 CSCs、ESCs 自我更新、多能性和分化命运的关键因子[8-10]。Sox2 表达于畸胎瘤细胞、胚胎内细胞团、外胚层和生殖细胞中,在维持 ESCs 和 CSCs 多能性和决定其是否走向分化方面具有关键作用,常作为一种多能性细胞谱系的分子标记,Oct4、Sox2 协同调控干细胞增殖和分化关键基因的表达[11-12]。本研究发现 HuH7 和原代 HCC 细胞表达 Oct4 和 Sox2 基因和蛋白,0.5 μg/mL亚砷酸钠短时间(96 h)虽不能明显抑制 HuH7 细胞增殖,但可使 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 蛋白及基因表达明显下调,提示低浓度亚砷酸钠可以抑制 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 基因表达。这些结果提示 0.5 μg/mL 浓度亚砷酸钠不能明显抑制 HuH7 细胞增殖,却可抑制含 $CD133^+$ $CD13^+$ HCC 细胞的 HuH7 和原代 HCC 细胞 Oct4 和 Sox2 基因及蛋白的表达,表明 Oct4 和 Sox2 蛋白下调后 $CD133^+$ $CD13^+$ LCSCs 多能性难以维持,诱导分化为 HCC 细胞[13]。目前在临床 HCC 常规治疗不能针对性清除 LCSCs,基础研究未找到防治 HCC 手术切除后复发和转移方法的情况下,本实验为临床 HCC 治疗过程中用低浓度砷剂抑制 LCSCs 关键基因表达,诱导 LCSCs 分化、清除 LCSCs 提供了新思路。我们尚需进一步研究亚砷酸钠通过何种途径抑制 LCSCs 关键基因 Oct4 和 Sox2 表达,如何影响 LCSCs 功能特征和 LCSCs 关键基因 Oct4、Sox2 表达。

参考文献:

[1] Llovet J M, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1907-1917.

[2] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.

[3] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, *et al*. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells[J]. J Clin Invest, 2010, 120(9): 3326-3339.

[4] Chen Y, Yu D, Zhang H, *et al*. $CD133^+$ $EpCAM^+$ phenotype possesses more characteristics of tumor initiating cells in hepatocellular carcinoma Huh7 cells [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(7): 992-1004.

[5] Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, *et al*. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML[J]. Science, 2010, 328(5975): 240-243.

[6] 屈凤莲, 郝学志, 秦叔逵, 等. 亚砷酸注射液治疗原发性肝癌的Ⅱ期多中心临床研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(9): 697-701.

[7] 金世龙, 黄中荣, 陈华, 等. HuH7 细胞系 $CD13^+$ $CD133^+$ HCC 细胞分选及 CSCs 特性分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(16): 1658-1662.

[8] Ito K, Bernardi R, Morotti A, *et al*. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells[J]. Nature, 2008, 453 (7198): 1072-1078.

[9] Chang F T, McGhie J D, Chan F L, *et al*. PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric chromatin integrity in embryonic stem cells [J]. Nucleic Acids Res, 2013 , 41(8): 4447-4458.

[10] Karwacki-Neisius V, Goke J, Osomo R, *et al*. Reduced Oct4 expression directs a robust pluripotent state with distinct signaling activity and increased enhancer occupancy by Oct4 and Nanog [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12 (5): 531-545.

[11] Koo B S, Lee S H, Kim J M, *et al*. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells [J]. Oncogene, 2014, doi: 10. 1038/onc. 2014. 174. [Epub ahead of print].

[12] Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, *et al*. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma [J]. Nature, 2014, 511 (7508): 246-250.

[13] 金世龙, 余天雾, 黄中荣, 等. As_2O_3 在 HuH7 及 $CD13^+$ $CD133^+$ LCSCs 增殖和分化中作用的初步观察[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1857-1861.

(**收稿**:2014-08-06;**修回**:2014-09-26)

(编辑 龙 亮)