DOI:10.16016/j.1000-5404.201511112

索拉非尼诱导的耐药性肝癌细胞的生物学特征分析

李明远[1],徐艳敏[2], 钱 程[2] (310018 杭州,浙江理工大学生命科学学院[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军临床病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨索拉非尼对肝癌细胞 Huh-7、PLC/PRF/5 以及原代细胞 T1115、T1224 的影响及索拉非尼耐受型细胞的生物学特征。**方法** 通过长时间10 μmol/L 索拉非尼处理建立索拉非尼耐药细胞模型,采用 MTS 法和克隆形成实验测定不同浓度索拉非尼处理对不同细胞的增殖影响。采用 Western blot 检测细胞内 p-AKT、p-STAT3 以及干性相关基因(Nanog、Sox2、Oct4)的表达情况;采用 RT-PCR 检测多药耐药基因 ABCC1 的表达,并通过划痕实验和 Transwell 实验检测索拉非尼耐药细胞和亲本对照细胞的迁移能力的变化情况。**结果** 索拉非尼对肝癌细胞系和原代细胞的增殖抑制作用随着索拉非尼浓度的提高而增强,并且索拉非尼能够有效地下调p-AKT、p-STAT3 的表达。成功建立了 PLC/PRF/5 索拉非尼耐药细胞株模型,并发现耐药细胞相对于亲本细胞的增殖能力显著下降,但迁移能力显著增强。进一步实验结果表明耐药细胞株高表达 ABCC1、Nanog、Sox2 和 Oct4。**结论** 索拉非尼能够有效地抑制肝癌细胞的生长,其耐受型细胞具有更强的迁移能力,并且具有干细胞样特征。

[关键词] 索拉非尼;肝癌;多药耐药;耐药细胞株;干细胞
[中图法分类号] R735.7;R966;R979.19 [文献标志码] A

Effect of sorafenib on inhibiting growth of hepatocellular carcinoma cells and analysis of biological characteristics of sorafenib-resistant cells

Li Mingyuan[1], Xu Yanmin[2], Qian Cheng[2] ([1]College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang Province, 310018; [2]Institute of Clinical Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of sorafenib on inhibiting growth of hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines Huh-7 and PLC/PRF/5, and primary cell lines T1115 and T1224, and further investigate the biological characteristics of sorafenib-resistant cells. **Methods** Sorafenib-resistant cell model PLC/PRF/5 was established through long-term treatment with 10 μmol/L sorafenib. MTS and colony formation assays were used to detect the proliferation of different cell lines under different concentrations of sorafenib. The expression of p-AKT, p-STAT3, and pluripotency related genes (Nanog, Sox2 and Oct4) were detected by Western blotting. The expression of multidrug resistance gene ABCC1 was detected by RT-PCR. The migration ability of sorafenib-resistant cells and their parental counterparts was detected by Transwell assay and wound healing assay. **Results** The data showed that the inhibitory effect of sorafenib on HCC cells and primary cells was enhanced with the sorafenib concentration increase, and the expression of p-STAT3 and p-AKT were down-regulated after sorafenib treatment. Furthermore, sorafenib-resistant cell model was successfully established. The proliferation of sorafenib-resistant cells was significantly decreased compared with the parental counterparts, but the migration ability was significantly strengthened. The results also demonstrated that the expression of ABCC1, Nanog, Sox2 and Oct4 were up-regulated in the sorafenib-resistant cells. **Conclusion** Sorafenib can effectively inhibit the growth of HCC cells, and the sorafenib-resistant cells have strong migration ability and cancer stem cell-like properties.

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81301864)
[通信作者] 钱 程,E-mail:cqian8634@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.018.html(2016-01-31)

[**Key words**] sorafenib; hepatocellular carcinoma; multidrug resistance; drug-resistant cells; stem cells

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81301864). Corresponding author: Qian Cheng, E-mail: cqian8634@gmail.com

肝癌具有生长速度快、恶性程度高、血管生成旺盛、复发转移以及药物耐受性等特点,这也是肝癌患者放化疗失败的主要原因[1-2]。索拉非尼是德国拜耳公司和 Onxy 公司共同研制的一种多靶点的分子靶向药物,是目前首个肝癌系统性治疗的多靶点分子药物。它是一种多激酶抑制剂,一方面通过抑制 RAF/MEK/ERK 信号传导通路直接抑制肿瘤生长;另一方面通过抑制 VEGFR 和 PDGFR 而阻断肿瘤新生血管的形成[3-4]。体外研究表明索拉非尼可以有效抑制肝癌细胞的侵袭转移[5]。然而,临床研究结果显示患者通过一段时间的索拉非尼药物治疗后,体内残存的肿瘤细胞常对药物的敏感性降低,表现出明显的药物耐受特征,导致索拉非尼对肝癌的疗效欠佳,且呈现明显的个体差异特征[6-7]。但目前关于索拉非尼耐药的作用机制研究尚不清楚。因此,本研究利用体外培养的肝癌细胞,检测索拉非尼对细胞的增殖抑制效应并初步探讨其分子机制。另外,我们通过索拉非尼长期处理肝癌细胞,建立 PLC/PRF/5 索拉非尼耐药细胞系,进一步探讨索拉非尼耐药细胞的生物学特性,为寻找可逆转索拉非尼耐药的肝癌治疗方式奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 和 Huh7 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。人原代肝癌细胞系 T1115 和 T1224 由本实验室从肝癌患者组织中分离的肝癌原代细胞。PLC/PRF/5-DR 由人肝癌细胞系 PLC/PRF/5 通过长时间的 10 μmol/L 索拉非尼处理建立的耐药细胞株。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(Fetal bovine serum,FBS)购自以色列 BI 公司;胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑盐 MTS 检测试剂购自 Promega 公司;Transwell 细胞小室购自德国 Merck Millipore 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海生物工程有限公司;索拉非尼购自德国拜耳公司。P-STAT3、P-AKT 和 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。Nanog、Oct4、Sox2 抗体购自 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人肝癌细胞系 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115 和 T1224 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中,于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度的孵箱中培养。间歇诱导法获得耐受 PLC/PRF/5 细胞,将 PLC/PRF/5 细胞接种至含 10 μmol/L 索拉非尼的 10% FBS DMEM 培养液中,直至细胞耐受稳定。

1.3.2 MTS 法检测细胞杀伤及增殖 取对数生长的细胞 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115、T1224,流式细胞仪铺设细胞 3×10^3/孔于 96 孔板,培养 24 h 后加入药物。实验分组:索拉非尼不同浓度组(2.5、5.0、7.5、10、12.5、15、20 μmol/L),另设不加药的对照组及空白组。每个剂量设 3 个复孔,加药后培养 48 h 每孔加入 100 μL 10% FBS DMEM 和 10 μL MTT,继续培养 2 h,用酶标仪测定各孔波长 490 nm 处的光密度值[D(490)],细胞存活率 = [实验组 D(490)值 - 空白组 D(490)值]/对照组 D(490)值 × 100%。取对数生长的细胞 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115、T1224,流式细胞仪铺设 1×10^3/孔的细胞于 9 孔板,每隔 24 h 用酶标仪测定各孔 490 nm 处的光密度值[D(490)],细胞增殖倍数 = [实验组 D(490)值 - 空白组 D(490)值]/初始 D(490)值 × 100%。

1.3.3 细胞克隆实验 收集细胞,通过流式细胞仪铺设 100 个细胞于 24 孔板,24 h 后换成索拉非尼(0、2.5、5.0、7.5 μmol/L)的 10% FBS DMEM 培养液,细胞培养,细胞在标准条件下培养 2 ~ 3 周,每 3 天更换新鲜培养基,观察克隆形成情况。当细胞形成肉眼可见的克隆时终止培养,弃去培养基,用 PBS 小心浸洗细胞 2 次后,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,弃去固定液,每孔加入 1 mL 的 10% 结晶紫使用液染色 30 min,以流水缓慢洗去染色液,通风橱中干燥。

1.3.4 Western blot 分析耐药的分子机制 收集细胞,PBS 小心浸洗细胞 2 次后,加入细胞裂解液于冰上裂解 45 min,每隔 15 min 震荡 1 次,12 000 r/min 离心 15 min 吸取细胞上清液,进行 BCA 定量后加入一定量的 loading buffer。加入一定量的蛋白样品于 SDS-PAGE 电泳,进而湿转法转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温孵育封闭 2 h,孵育一抗,4 ℃过夜,PBST 洗涤 3 次,每次 15 min;然后加入对应的二抗孵育 2 h,PBST 洗涤 3 次,每次 15 min;加入化学显影液曝光。

1.3.5 Real-time PCR 检测耐药相关基因的表达 Trizol 法提取细胞总 RNA,通过紫外分光光度计检测 RNA 浓度及质量。为避免基因组影响,首先通过去基因组操作。然后 20 μL 反应体积逆转录为 cDNA。荧

光定量 PCR 检测基因表达:5 μL 5×SYBR Green buffer、0.5 μL cDNA 模板、1 μL prime mix,用 ddH_2O 补足反应体系至 10 μL,然后上机扩增处理数据。

1.3.6 肿瘤细胞迁移侵袭实验 采用 0.8 μm 的 Transwell 小室,消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 2 遍,用无血清培养基重悬。调整细胞数至 5×10^4/100 μL,加入 100 μL 细胞到上室,下室采用 20% FBS 的 DMEM 培养基。24 h 后进行观察,10%结晶紫使用液染色 30 min 后,用浸水后的棉签擦去基质胶和没有迁移的上室细胞,把 Transwell 小室反过来底面朝上,显微镜(200 倍)进行观察并且拍照。细胞划痕迁移实验,在 24 孔板中铺设约 1×10^5 个细胞,第 2 天用枪头垂直划线,并用 PBS 清洗洗细胞 3 次,以洗去划下的漂浮细胞,加入 2% FBS 的 DMEM 培养液。放入 37 ℃ 5% CO_2 培养箱,培养。按 0、24 h 时间点取样,拍照。最后使用 Image Pro Plus 软件进行划痕面积像素统计。

1.4 统计学处理

实验均重复 3 次以上。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用 Excel 统计软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 索拉非尼对人肝癌细胞增殖抑制效应

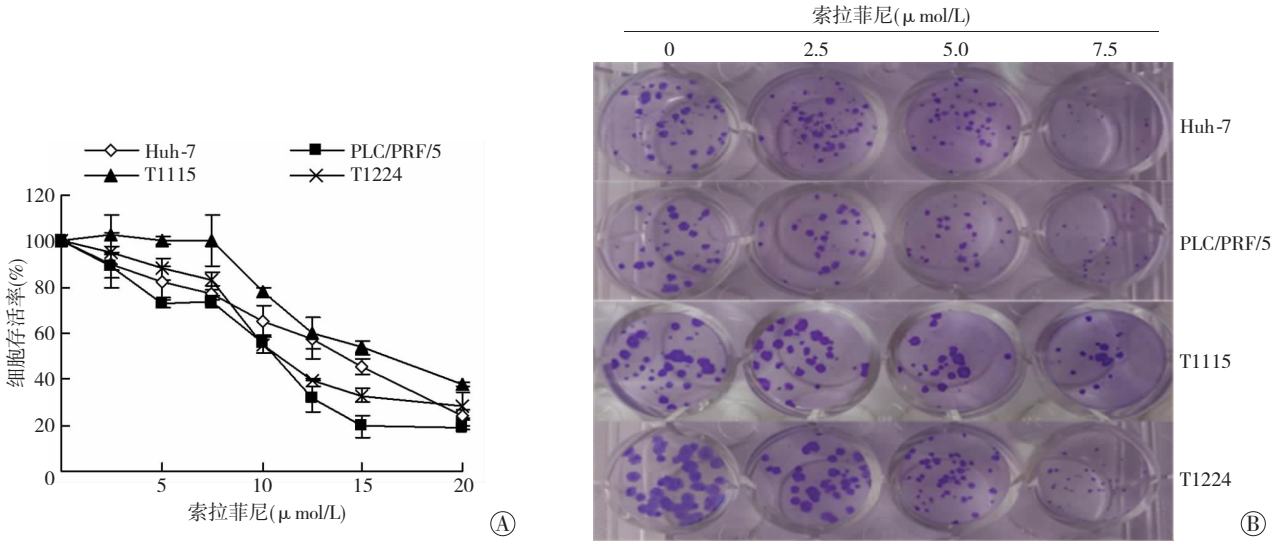
MTS 法检测索拉非尼对肝癌细胞的增殖抑制效应,结果显示索拉非尼能明显抑制人肝癌细胞 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115、T1224 的增殖,且呈现明显的剂量依赖效应。随着药物浓度的提高,细胞的存活率显著降低(图 1A)。计算索拉非尼处理 48 h 对肝癌细胞 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115、T1224 的 IC_{50} 值分别为(13.92±0.70)、(10.416±0.70)、(16.25±1.23)、T1224(12.205±0.935) μmol/L。同时,克隆形成实验也得出相似结果,随着药物浓度的升高,细胞克隆形成率降低,克隆形态也变小(图 1B)。说明索拉非尼能有效抑制肝癌细胞的增殖。

2.2 Western blot 检测索拉非尼对细胞内相关蛋白表达的影响

通过 Western blot 法检测不同浓度索拉非尼对肝癌细胞中 AKT、p-AKT、STAT3、p-STAT3 的表达影响,结果显示,随着索拉非尼浓度的提高,细胞内 p-AKT、p-STAT3 表达呈逐渐下调,而 AKT、STAT3 总蛋白表达不受影响(图 2)。表明抑制 p-AKT、p-STAT3 的激活可能是索拉非尼抑制细胞增殖的重要途径之一。

2.3 PLC/PRF/5 耐药细胞的建立

PLC/PRF/5 亲本细胞通过长时间的 10 μmol/L 索拉非尼诱导,直至细胞耐受比较稳定,显微镜(200 倍)观察细胞形态发生了显著的变化,且耐药细胞形态呈现明显的梭型(图 3A),通过 MTS 法检测不同浓度(0、2.5、5、7.5、10、12.5 μmol/L)索拉非尼作用下细胞的存活率变化情况,结果显示建立的耐药细胞(耐药组)比亲本细胞(亲本组)具有更强的耐受性,具有统计学意义($P<0.05$,图 3B),同时通过连续 7 d MTS 检测细胞的增殖情况,结果显示建立的耐药细胞比亲本细胞的增殖能力相对较慢,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3C),并通过 RT-PCR 检测发现耐药细胞株中耐药相关基因 ABCC1 基因表达上调,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3D)。结果表明,建立的耐药细胞耐受性强、稳定性高的特征。



A:索拉非尼处理 48 h 后 4 种细胞存活率变化;B:细胞克隆形成情况

图 1 不同浓度索拉非尼对 4 种肝癌细胞生长和克隆形成的影响

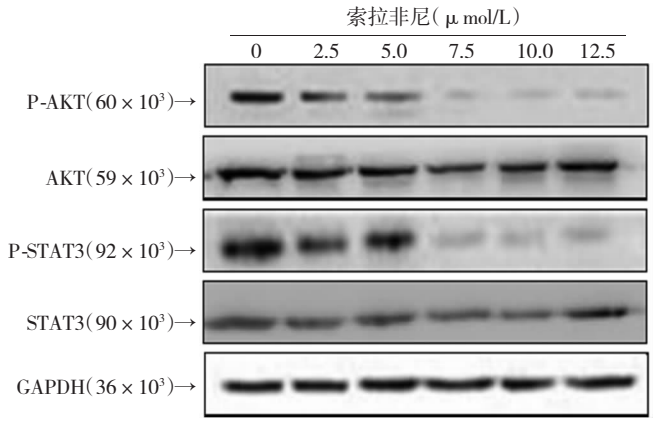
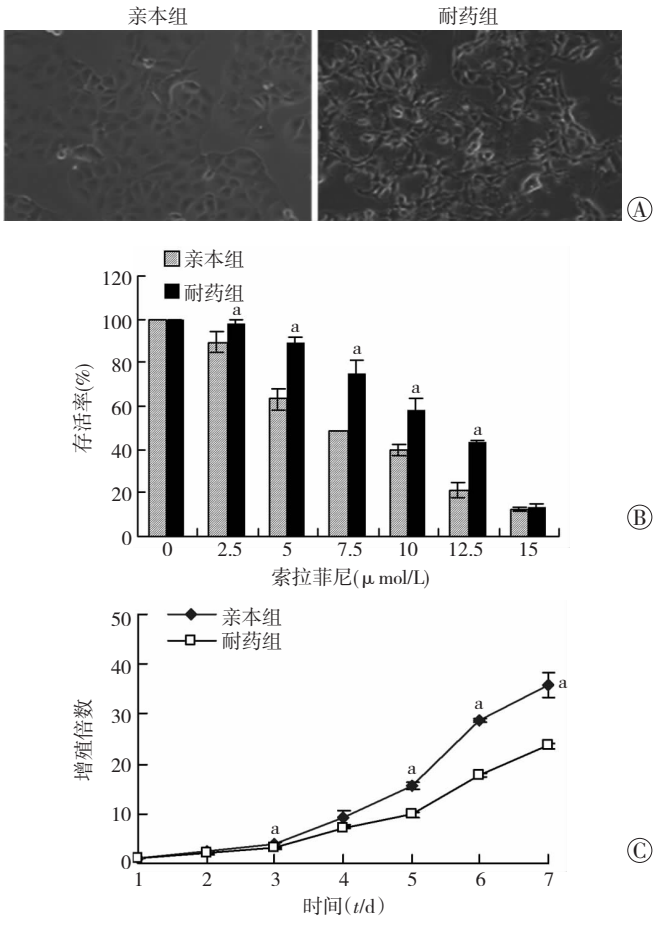


图2　Western blot 检测不同浓度索拉非尼处理 48 h 后对细胞内 p-AKT、p-STAT3 蛋白的影响

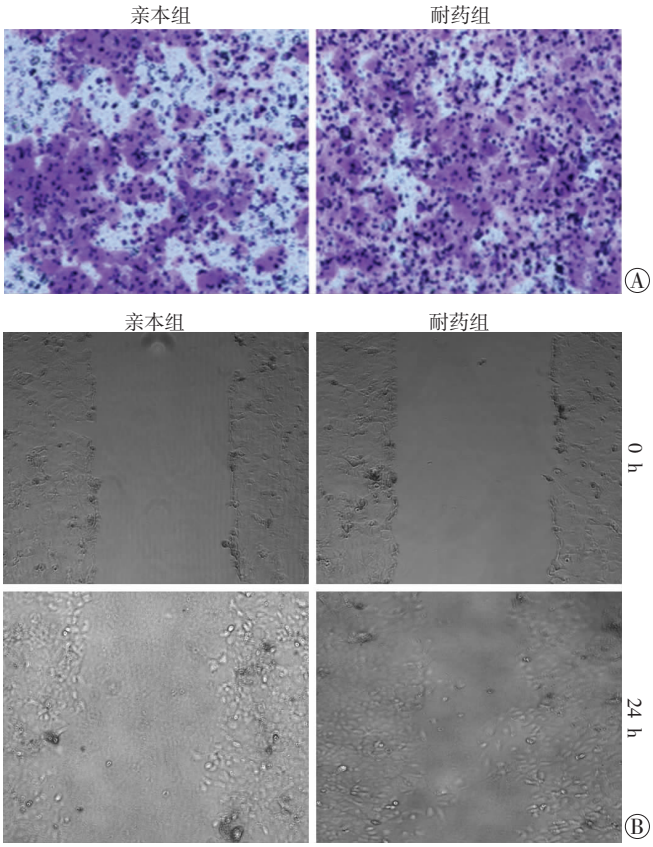


A:两种细胞的形态学变化(相差显微镜 ×200);B:不同浓度处理下两种细胞的存活率变化　a:$P<0.05$,与亲本组比较;C:两种细胞的增殖能力　a:$P<0.05$,与亲本组比较

图3　亲本细胞与耐药细胞的生物学特性分析

2.4　耐药细胞迁移能力的变化

PLC/PRF/5 耐药细胞形态呈现梭型,推测耐药细胞可能获得更强的迁移能力。Transwell 小室实验检测细胞的迁移能力结果显示,经过 24 h 后耐药细胞比亲本细胞穿过小室细胞更多,说明耐药细胞的迁移能力增强,具有统计学差异($P<0.05$,图 4A)。通过细胞划痕实验,以 0 h 为对照,24 h 后观察发现耐药细胞的迁移能力比亲本细胞显著增强(图 4B)。结果显示索拉非尼诱导的耐药细胞株具有更强的迁移能力。

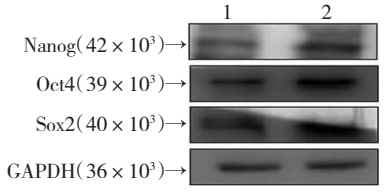


A:Transwell 小室检测 24 h 后两种细胞的迁移(200 倍)及平均迁移细胞数;B:细胞划痕实验观察两种细胞的迁移能力

图4　亲本细胞与耐药细胞的迁移能力变化

2.5　耐药细胞干性蛋白的变化

肿瘤干细胞具有慢增殖,以及更强的迁移能力特征,并且对化疗药物不敏感。化疗药物所诱导的耐受性细胞具有更强的干性,同时相关干性指标也出现上调。基于索拉非尼耐药细胞株的这些特征,通过 Western blot 检测了细胞内干性相关蛋白,结果显示干性蛋白 Nanog、Sox2、Oct4 在耐药细胞中上调,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5),揭示耐药细胞具有更强的干性。



1:亲本组;2:耐药组

图5　Western blot 检测两种细胞相关干性蛋白 Nanog、Sox2、Oct4 的表达

3 讨论

原发性肝癌指肝细胞或肝内胆管细胞发生的癌,为我国常见恶性肿瘤之一,索拉非尼是目前首个标准化治疗肝癌的有效药物,能够抑制 MAPK 信号传导系统及血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)受体而阻断肿瘤生长及新生血管的形成。本实验亦证实了索拉非尼能够抑制肝癌细胞 Huh-7、PLC/PRF/5、T1115、T1224 的生长,同时能够阻断 p-AKT、p-STAT3 的激活通路。PI3K/AKT 与 STAT3 信号通路通常在肿瘤细胞异常激活,并参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、血管生成、耐药、侵袭转移等生理功能的调控,体外抑制 PI3K/AKT 信号与 STAT3 信号通路可以有效地抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡[8-10]。本实验通过不同浓度索拉非尼处理肝癌细胞系,发现细胞内 p-AKT、p-STAT3 的表达显著下调,说明索拉非尼可以有效地抑制 PI3K/AKT 与 STAT3 信号通路的激活发挥抑制作用。同时,我们曾检测过耐药细胞株的 p-STAT3 表达呈显著上调趋势,且 JAK-STAT3 信号通路异常激活。更重要的有文献报道肿瘤细胞经药物处理后残存的肿瘤细胞通常对药物不敏感,且细胞具有更强的侵袭转移特征,而且干细胞相关蛋白表达升高[11]。因此,肿瘤耐药细胞和肿瘤干细胞的关系引起了我们的关注。已有研究报道,检测索拉非尼耐药株中发现 CD44 + 和 CD44 + CD133 + 细胞比例显著上升,同时有研究显示高表达的干性基因 CD44 和 CD133 也能够显著的发挥抵抗索拉非尼诱导的坏死[11-12]。我们通过长时间的索拉非尼处理 PLC/PRF/5 细胞,建立了一批耐受性好、稳定性高的耐药细胞株,同时在我们的耐药细胞株中,发现了耐药细胞具有更强的侵袭转移能力,并且干性蛋白 Nanog、Sox2、Oct4 在耐药细胞中的表达显著上调,而耐药细胞株的细胞增殖相对变慢,而干细胞通常增殖也比较慢,我们有理由相信索拉非尼长时间处理可能诱发或富集一定比例的干细胞样特征的细胞,进而促进细胞的迁移。肿瘤干细胞始被认为是肿瘤复发与转移的根源,并介导肿瘤耐药,目前许多临床治疗手段都无法有效的靶向所有的细胞,患者前期治疗效果甚佳,体内大部分肿瘤细胞被杀死,但是体内未被杀伤的残存肿瘤细胞通常对药物产生耐受,并且干细胞比例较高,当这些细胞重新“苏醒”的时候,就会引起肿瘤复发和转移,最终导致治疗失败[13]。因此研究分析肿瘤干细胞的特异和差异分子,并有效的靶向肿瘤干细胞将是未来肿瘤转化研究中最热的方向之一。

参考文献:

[1] Shirakami Y, Sakai H, Shimizu M. Retinoid roles in blocking hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2015, 4(4): 222-228. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2015.05.01

[2] Berasain C. Hepatocellular carcinoma and sorafenib: too many resistance mechanisms? [J]. Gut, 2013, 62(12): 1674-1675. DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304564

[3] Gadaleta-Caldarola G, Divella R, Mazzocca A, *et al*. Sorafenib: the gold standard therapy in advanced hepatocellular carcinoma and beyond[J]. Future Oncol, 2015, 11(16): 2263-2266. DOI: 10.2217/fon.15.161

[4] Gadaleta-Caldarola G, Infusino S, Divella R, *et al*. Sorafenib: 10 years after the fist pivotal trial[J]. Future Oncol, 2015, 11(13): 1863-1880. DOI: 10.2217/fon.15.85

[5] Ha T Y, Hwang S, Moon K M, *et al*. Sorafenib inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells through suppression of matrix metalloproteinase expression[J]. Anticancer Res, 2015, 35(4): 1967-1976.

[6] Palmer D H, Johnson P J. Evaluating the role of treatment-related toxicities in the challenges facing targeted therapies for advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Metastasis Rev, 2015, 34(3): 497-509. DOI: 10.1007/s10555-015-9580-2

[7] Maida, M, Iavarone M, Raineri M, *et al*. Second line systemic therapies for hepatocellular carcinoma: Reasons for the failure[J]. World J Hepatol, 2015, 7(17): 2053-2057. DOI: 10.4254/wjh.v7.i17.2053

[8] Gedaly R, Angulo P, Hundley J, *et al*. PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Anticancer Res, 2010, 30(12): 4951-4958.

[9] Chen K F, Tai W T, Liu T H, *et al*. Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3[J]. Clin Cancer Res,2010, 16(21): 5189-5199. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3389

[10] Chai H, Luo A Z, Weerasinghe P, *et al*. Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2010, 3(4): 408-415.

[11] Chow A K, Ng L, Lam C S, *et al*. The Enhanced metastatic potential of hepatocellular carcinoma (HCC) cells with sorafenib resistance[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78675. DOI: 10.1371/journal.pone.0078675. eCollection 2013

[12] Fernando J, Malfettone A, Cepeda E B, *et al*. A mesenchymal-like phenotype and expression of CD44 predict lack of apoptotic response to sorafenib in liver tumor cells[J]. Int J Cancer, 2015,136(4): 161-172.

[13] DI C, Zhao Y. Multiple drug resistance due to resistance to stem cells and stem cell treatment progress in cancer (Review)[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(2): 289-293.

(收稿:2015-11-17;修回:2015-12-30)

(编辑 汪勤俭)