肝癌分子机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001208

肝癌细胞 Huh7 与 SMMC-7721 抗 ROS 能力对比与机制初步研究

李高峰[1]，徐　伟[2]，李培培[3]，李清华[4]，吴　东[1]

（1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外一科，上海　200438；2. 苏州市中西医结合医院，苏州　210006）；

3. 福建医科大学第一临床学院，福州　350004；4. 苏州大学研究生院，苏州　210006）

【摘　要】目的：比较 Huh7、SMMC-7721 细胞系抵抗外源性活性氧类（reactive oxygen species，ROS）物质能力的不同，并初步探究肝癌细胞抗 ROS 的机制。**方法**：不同浓度的 H_2O_2 处理 Huh7 和 SMMC-7721 细胞后，比较两者凋亡、坏死的差异，检测细胞内 ROS、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、还原型谷胱甘肽（reduced glutathione，GSH）含量及细胞活性、肿瘤干性分子、ROS 清除酶基因和 DNA 修复酶基因的表达变化。**结果**：同浓度 H_2O_2 处理后，SMMC-7721 细胞凋亡和坏死数目多于 Huh7 细胞，其细胞活性明显低于 Huh7 细胞，在 1 μmol/mL H_2O_2 浓度组，计数 1 500 个细胞内 SMMC-7721 与 Huh7 细胞凋亡与坏死数目分别为（841.7 ± 78.7）个、（169.7 ± 76.1）个（t=10.638，P=0.000）；SMMC-7721 与 Huh7 细胞活性分别为（0.21 ± 0.02）、（0.74 ± 0.14）（t=6.478，P=0.022）。肝癌细胞内 ROS 的水平随 H_2O_2 浓度增加呈升高趋势，但 Huh7 细胞内明显低于 SMMC-7721 细胞，在 1 μmol/mL H_2O_2 浓度组，SMMC-7721 与 Huh7 细胞细胞内 ROS 水平分别为（128 793 ± 1 158）、（103 455 ± 1 665）（t=21.639，P=0.000）；Huh7 细胞比 SMMC-7721 细胞有更高含量的 GSH、SOD，并且在 H_2O_2 处理后 GSH、SOD 下降趋势缓于 SMMC-7721 细胞，在 1 μmol/mL H_2O_2 浓度组，SMMC-7721 与 Huh7 细胞内 GSH 含量分别为（32.85 ± 4.47）mg/g prot、（106.60 ± 6.83）mg/g prot（t=15.655，P=0.000），SMMC-7721 与 Huh7 细胞内 SOD 含量分别为（19.22 ± 2.93）U/mg prot、（23.57 ± 4.85）U/mg prot（t=1.332，P=0.254）；整体上肝癌细胞内 GSH、SOD 的变化早于细胞内 ROS 和细胞活性的变化；Western blot 提示 Huh7 细胞比 SMMC-7721 细胞高表达肿瘤干性分子 CD133、Bmi-1、ROS 清除酶基因 SOD2 和 DNA 修复基因 Rad51。**结论**：Huh7 比 SMMC-7721 有更强的抗 ROS 能力，相对高表达 CD133、Bmi-1、SOD2 及 Rad51，这些分子可能参与了肝癌细胞抗 ROS 的过程，且可能通过细胞内 GSH、SOD 直接发挥作用。

【关键词】肝癌；活性氧类物质；肿瘤干性分子；DNA 修复基因；ROS 清除基因

【中图分类号】R735.7　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-06-03

Comparison of cells' ability to resist ROS and preliminary mechanisms between two hepatoma cell lines Huh7 and SMMC-7721

Li Gaofeng[1]，*Xu Wei*[2]，*Li Peipei*[3]，*Li Qinghua*[4]，*Wu Dong*[1]

（*1. The First Department of Hepatic Surgery，Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital，The Second Military Medical University；2. Soochow Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine；*

3. the First Clinical College of Fujian Medical University；4. Graduate School of Soochow University）

【Abstract】*Objective*：To compare the ability to resist exogenous reactive oxygen species（ROS）between Huh7 and SMMC-7721 cell lines and to explore the ROS resistance mechanisms in hepatocellular carcinoma（HCC）cell lines preliminary. ***Methods***：After hepatoma cell lines Huh7 and SMMC-7721 being treated with different concentrations of H_2O_2，differences in cell apoptosis and necrosis were compared，contents and cell activity of ROS，superoxide dismutase（SOD），reduced glutathione（GSH）were measured，changes in expression of CSCs molecules，ROS scavenger enzyme genes，DNA repair gene between the two cell lines were detected. ***Results***：After being treated with the same concentration of H_2O_2，cell line SMMC-7721 had more apoptosis and necrosis and lower cell activity than cell line Huh7；the dead cells of SMMC-7721 and Huh7 in total of 1，500 cells were（841.7 ± 78.7），（169.7 ± 76.1）（t=10.638，P=0.000）and cell activities were（0.21 ± 0.02），（0.74 ± 0.14）（t=6.478，P=0.022）when H_2O_2 concentration was 1 μmol/mL；the content of ROS in hepatoma cells increased with the

作者介绍：李高峰，Email：riophy@163.com，

研究方向：肝癌及胃肠道肿瘤的临床综合治疗。

通信作者：吴　东，Email：dongwu2010@sina.com。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170313.1135.076.html（2017-06-22）

increase of concentration of H_2O_2, but Huh7 had less change than that in SMMC-7721; ROS of SMMC-7721 and Huh7 were (128 793 ± 1 158); (103 455 ± 1 665) (t=21.639, P=0.000) at the level of 1 μmol/mL H_2O_2; Huh7, compared with cell line SMMC-7721, had higher levels of GSH, SOD and more slowly ROS increasing tendency and decreasing tendency of GSH and SOD after being exposed to different concentrations of H_2O_2; GSH of SMMC-7721 and Huh7 were (32.85 ± 4.47) mg/g prot, (106.60 ± 6.83) mg/g prot (t=15.655, P=0.000) and SOD were (19.22 ± 2.93) U/mg prot, (23.57 ± 4.85) U/mg prot (t=1.332, P=0.254); the changes of the intracellular GSH and SOD changed earlier than that of ROS in liver cancer cells as a whole; ROS scavenging enzyme genes and DNA repair genes expressed in Huh7 cells was relatively higher than that in SMMC-7721 cells. Compared with cell line SMMC-7721, cancer stem cells (CSCs) molecules CD133, bmi-1, ROS scavenger enzyme gene SOD2 and DNA repair gene Rad51 were expressed higher in Huh7 than that in SMMC-7721. ***Conclusion***: Cell line Huh7 had stronger ROS resistance ability than cell line SMMC-7721 and higher expression of CD133, Bmi-1, SOD2 and Rad51. Those genes may be involved in the process of liver cancer cells' ROS resistance through regulating intracellular GSH and SOD.

[Key words] hepatocellular carcinoma; reactive oxygen species; CSCs molecular; DNA repair gene; ROS remove gene

化疗是肝癌晚期患者的主要疗法，但肿瘤异质性的存在使预后评判极为困难[1-2]；肝癌化疗药物如5-氟尿嘧啶、顺铂及索拉非尼能使肿瘤细胞形成活性氧类（reactive oxygen species，ROS）物质超载，促进肝脏肿瘤细胞凋亡和坏死[3-5]。因此，肝癌患者化疗的失败与肿瘤耐药性的形成、肿瘤的异质性及化疗过程中建立的ROS抵抗机制有关，同时肿瘤干细胞在该过程中也发挥着重要作用[6]。Ding论述了肿瘤干细胞与肿瘤的发生、复发和转移有重要关系，而且肿瘤干细胞内ROS水平较低[7]；此外，细胞内的还原类物质如超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、还原型谷胱甘肽（reduced glutathione，GSH）以及相关的ROS清除酶基因[8]和DNA修复酶基因Rad51也都参了ROS平衡的维持[9-10]。本文旨在对比2种肝癌细胞系Huh7和SMMC-7721抗ROS能力的差异，测定两者细胞内SOD、GSH的水平变化和相关的ROS代谢酶基因SOD2、DNA修复酶基因Rad51及肿瘤干性分子CD133、Bmi-1的表达情况，探讨分析肝癌细胞抗ROS的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

DMEM培养基、胎牛血清（FBS）（Gibco公司），双抗（青霉素/链霉素）（上海普飞生物），TRIzol® Reagent（Thermo公司），CCK8试剂盒、BSA蛋白浓度测定试剂盒、30%过氧化氢、GSH、SOD酶联免疫试剂盒（上海翊圣生物），Bestar qPCR RT Kit及PCR Master Mix（DBI Bioscience），AO-EB染液（上海克拉玛尔），凝胶图像分析系统（Tanon 5500），荧光显微镜及成像系统（OLYMPUS IX71），酶标仪（Thermo NanoDrop 2000），抗体Bmi-1、CD133（CST公司），抗体Rad51、SOD2、二抗、p16、p21（圣克鲁斯）。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Huh7及SMMC-7721细胞株来自上海第二军医大学附属肝胆外科医院肿瘤免疫实验室。培养基配制为DMEM培养基中加入10%的胎牛血清、1%的双抗；细胞复苏后培养于37 ℃ 5%CO_2孵箱中，定期传代培养。

1.2.2 AO-EB染色观察细胞凋亡与坏死 选择对数期的2种肝癌细胞，消化离心，培养基重悬后，加入到24孔板培养，数量为1.0×10^5个/孔。细胞贴壁后加入不同浓度的H_2O_2，加入不同浓度的H_2O_2，浓度依次为0.5、0.7、1.0、2.0、3.0 μmol/mL；培养12 h后，吸去旧培养基，加入AO-EB染液（A:B=1:1，20 μL AO-EB染液/mL培养基）。避光5 min后，使用荧光显微镜观察细胞的凋亡和坏死情况，计数后统计分析。可见4种细胞形态：活细胞，核染色质着绿色并呈正常结构；早期凋亡细胞，核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状；非凋亡的死亡细胞，核染色质着橘红色并呈正常结构；晚期凋亡细胞，核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。

1.2.3 细胞活性检测 选择对数期的2种细胞铺96孔板，每孔细胞数为1×10^4个/孔。待细胞贴壁牢固后，加入不同浓度的H_2O_2，浓度分别为0.5、0.7、1.0、2.0、3.0 μmol/mL；培养12 h后，吸去原有培养基，加入CCK8工作液（10 μLCCK8/100 μL DMEM培养基），37 ℃培养1 h，多功能酶标仪测定。

1.2.4 细胞内ROS检测及荧光显微镜观察 荧光显微镜观察：选择对数期的2种细胞，进行24孔板铺板，数量为1.0×10^5个/孔。稳定贴壁后，加入不同浓度的H_2O_2，处理8 h后，吸去原有培养基，加入含有DCF-HA的培养基（DCF-HA浓度为10 μmol/L），继续培养1 h。使用荧光显微镜观察细胞内ROS变化。酶标仪检测法：96孔板铺板，数量为1.0×10^4个/孔，激发波长488 nm，发射波长525 nm。

1.2.5 细胞内氧化还原类物质检测 冰上消化收集不同浓度H_2O_2处理的2种细胞，PBS洗净，离心加入RIPA细胞裂

解液，-80 ℃冰箱反复冻存 3 次后，4 ℃离心提取上清，酶标仪检测细胞内 SOD（检测波长 550 nm）和 GSH（检测波长 410 nm）。

1.2.6 相关分子表达检测 总蛋白提取：消化收集 Huh7 和 SMMC-7721 两种细胞，加入 RIPA 裂解液，冰上裂解 30 min，4 ℃离心提取上清，使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度，Western blot 检测干性分子及 DNA 修复基因、ROS 清除基因的表达差异。

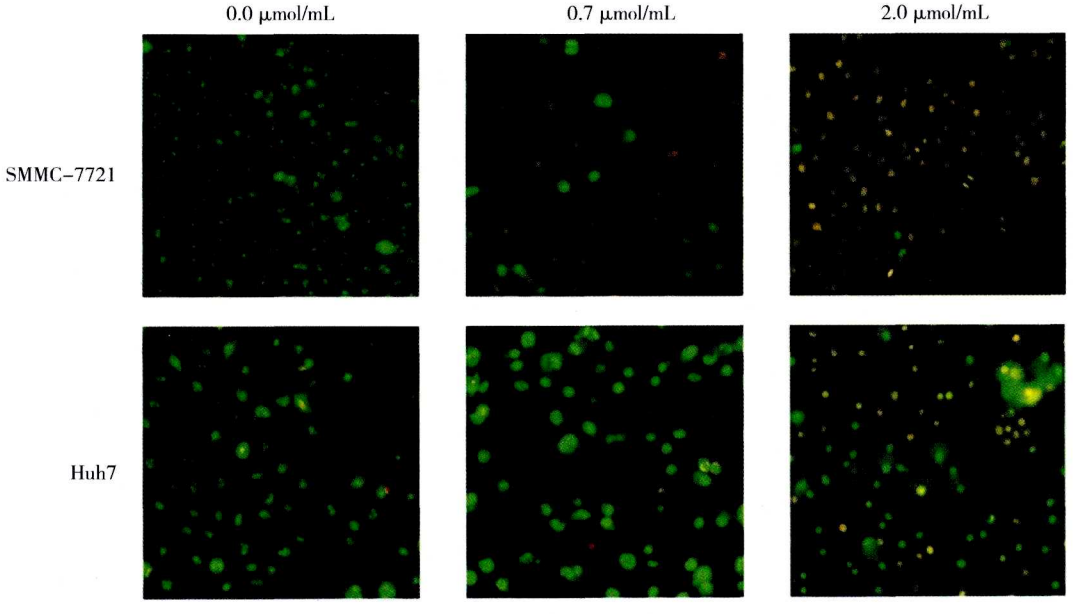
1.3 统计学分析

本次研究数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行处理，所得数值以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，使用两独立样本 t 检验进行数据统计分析，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 不同浓度 H_2O_2 下 Huh7 和 SMMC-7721 细胞凋亡情况

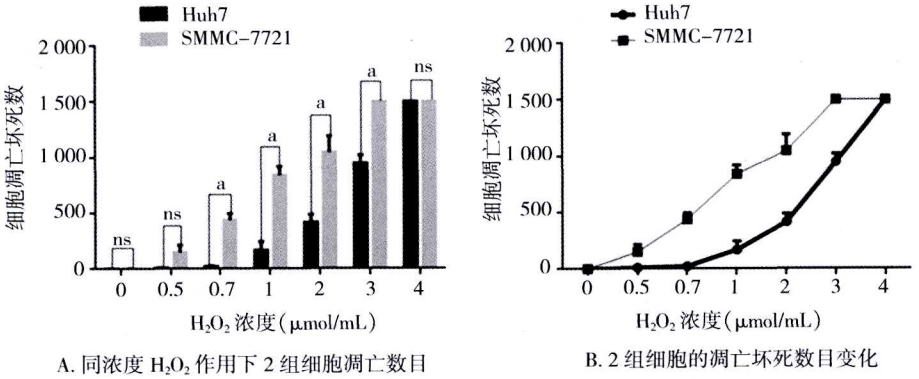
2 种肝癌细胞系经过不同浓度 H_2O_2 处理后会出现不同程度的凋亡或坏死（图 1），且凋亡和坏死比例随着 H_2O_2 浓度的增加而增加，并呈现指数形式变化的趋势（图 2B），在同一 H_2O_2 浓度下，Huh7 细胞发生凋亡和坏死的比例低于 SMMC-7721 细胞，具体数值及分析见表 1。结果表明肝脏肿瘤细胞本身存在一定的抗 ROS 物质，因而有一定的抵抗 ROS 的能力，细胞内的抗 ROS 物质消耗掉之后或在 H_2O_2 浓度超过细胞本身的代偿后，会出现凋亡和坏死的急剧增加；同时也表明 Huh7 细胞比 SMMC-7721 细胞有更强的抵抗 ROS 的能力。



橙色或者橙黄色细胞为凋亡及坏死细胞

图 1 不同浓度 H_2O_2 培养 12 h 时的 Huh7 和 SMMC-7721 细胞凋亡 AO-EB 荧光图

Fig.1 AO-EB fluorescence of Huh7 and SMMC-7721 cells apoptosis under different concentrations of H_2O_2 for 12 hours



A. 同浓度 H_2O_2 作用下 2 组细胞凋亡数目　　B. 2 组细胞的凋亡坏死数目变化

a：P<0.05；ns：统计无差异

图 2 不同浓度 H_2O_2 处理后 Huh7 与 SMMC-7721 细胞的凋亡趋势与计数比较

Fig.2 Comparisons of cell apoptosis trends and counts between Huh7 and SMMC-7721 under different concentrations of H_2O_2

2.2 Huh7 与 SMMC-7721 细胞活性比较

相同数量的细胞未经 H_2O_2 处理时，Huh7 细胞比SMMC-7721 的细胞活性(CCK8)略高，Huh7 与 SMMC-7721 细胞活性分别为(0.93 ± 0.04)、(0.81 ± 0.04)；但无统计学差异(t=3.069，P=0.055)。经不同浓度 H_2O_2 处理后，Huh7 细胞活性的下降趋势明显缓于 SMMC-7721 细胞(图 3B)，且在同浓度 H_2O_2 下，Huh7 细胞的活性明显高于 SMMC-7721 细胞(图 3A)，细胞活性值及统计分析见表 2。细胞活性能力检测说明，Huh7 细胞的抗 ROS 抵抗能力强于 SMMC-7721。较低浓度 H_2O_2 下，Huh7 细胞的活性曲线接近水平，而 SMMC-7721 细胞的活性曲线则呈明显下降趋势，由此说明 Huh7 细胞在正常培养条件下 ROS 抵抗能力储备强于 SMMC-7721。

2.3 不同浓度 H_2O_2 下 Huh7 和 SMMC-7721 细胞内 ROS 变化

胞内 ROS 水平(DCF-HA 荧光)可以直接反映细胞内氧化应激状态。肝癌细胞在未经 H_2O_2 处理时，细胞内无氧化应激超载，细胞荧光显影为暗黑色(图 4A、B)，在 H_2O_2 处理后，细胞内 ROS 激发荧光亮度明显增强(图 4B~H)。Huh7 和 SMMC-7721 两种细胞内 ROS 水平随 H_2O_2 浓度增加而升高，但在 0 μmol/mL 条件下无差异。不同浓度组 Huh7 细胞内 ROS 水平低于 SMMC-7721(图 5A)，且 Huh7 组的 ROS 变化更加缓慢(图 5B)，提示 Huh7 对 ROS 的调控和抵抗能力强于 SMMC-7721，具体数值及分析见表 3。在 H_2O_2 浓度高于 2 μmol/mL 时，Huh7 内 ROS 水平高于 SMMC-7721，原因可能在于 SMMC-7721 细胞死亡过多，导致外源性 H_2O_2 无法在细胞内转化为 ROS，并且在 H_2O_2 浓度为 2 μmol/mL 时 2 组差异无统计学意义，而在 3 μmol/mL 时 2 组差异有统计学意义，说明在此时细胞内 ROS 水平已经趋于最大极限。此外，随着 H_2O_2 浓度的增加，细胞内 ROS 水平趋于极限值，组间差异变小(图 5)。

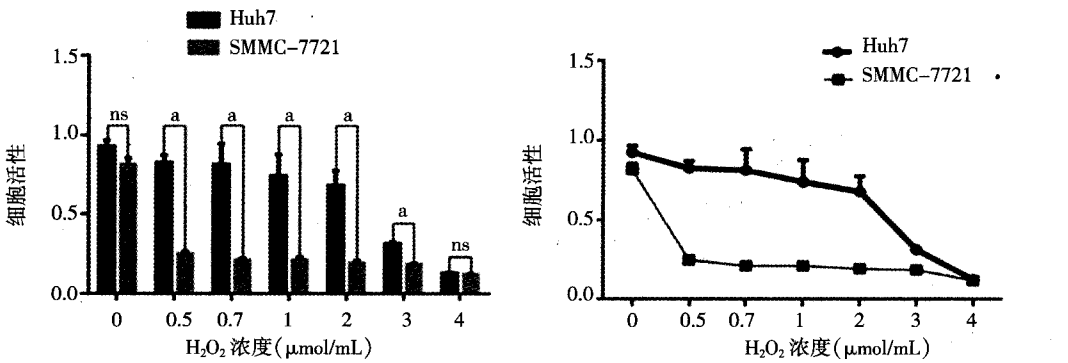
2.4 不同浓度 H_2O_2 下 Huh7 和 SMMC-7721 细胞内 SOD 与 GSH 的变化

未经处理时，与 SMMC-7721 相比，Huh7 细胞内 SOD、

表 1 H_2O_2 各浓度组两细胞系细胞凋亡($\bar{x} \pm s$，个)

Tab.1 Average necrosis of cell in each group($\bar{x} \pm s$，cell)

细胞系	不同 H_2O_2 浓度(μmol/mL)组细胞死亡数目					
	0.0	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
Huh7	3.3 ± 1.5	10.3 ± 2.5	23.0 ± 6.6	169.7 ± 76.1	417.7 ± 73.4	951.3 ± 75.1
SMMC-7721	3.7 ± 1.5	150.0 ± 65.8	441.3 ± 57.2	841.7 ± 78.7	1 050.3 ± 145.7	1 500.0 ± 0.0
t 值	0.267	3.673	12.590	10.638	6.718	12.647
P 值	0.802	0.066	0.000	0.000	0.003	0.000



A. Huh7 与 SMMC-7721 在同浓度 H_2O_2 时的对比　　B. 2 组细胞的活性在不同 H_2O_2 浓度下的变化趋势

a：P<0.05；ns：统计无差异

图 3 Huh7 与 SMMC-7721 细胞经不同浓度 H_2O_2 作用后的细胞活性对比

Fig.3 Comparison of cell ativity between Huh7 and SMMC-7721 under different concentrations of H_2O_2

表 2 H_2O_2 各浓度组两细胞系细胞活性($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Average cell activity in each group($\bar{x} \pm s$)

细胞系	不同 H_2O_2 浓度(μmol/mL)组细胞活性					
	0.0	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
Huh7	0.93 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.81 ± 0.13	0.74 ± 0.14	0.68 ± 0.10	0.31 ± 0.01
SMMC-7721	0.81 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03
t 值	3.069	20.314	7.826	6.478	8.594	20.362
P 值	0.055	0.000	0.001	0.022	0.001	0.000

GSH略高。Huh7 细胞在受到 H_2O_2 刺激后，细胞内 SOD、GSH 变化相对缓慢。同一 H_2O_2 浓度下，SOD、GSH 含量在 Huh7 组高于 SMMC-7721 组（图 6）。随着细胞内 ROS 水平的升高、细胞活性的下降及凋亡比例的增加，肝癌细胞内 SOD、GSH 呈相应递减趋势，且细胞活性降低速率及细胞内 ROS 的增加速率均低于 SOD、GSH 的降低速率，即细胞内 ROS 的增加和细胞活性的降低发生于还原类物质 SOD、GSH 消耗之后。同时，不同浓度 H_2O_2 条件下，Huh7 细胞内 SOD、GSH 高于 SMMC-7721，表明 Huh7 细胞抗 ROS 能力强于 SMMC-7721，细胞内 GSH、SOD 含量均值及统计分析见表 4、表 5。

2.5　Huh7 与 SMMC-7721 细胞内相关分子表达情况

肿瘤细胞干性分子 Bmi-1 具有调控 ROS 抵抗的功能，而 CD133 高表达的细胞则意味着细胞干性特征强、细胞分化程度低、恶性程度高。Huh7 细胞表达 CD133、Bmi-1 高于 SMMC-7721，提示干性分子可能是抗 ROS 作用的主要原因，因为 CD133 与 Bmi-1 参与肿瘤细胞生长、分化信号通路的调控。p16、p21 作为凋亡促进因子，在 Huh7 与 SMMC-7721 内表现明显差异，Huh7 细胞高表达 p21，低表达受 Bmi-1 调控的 p16，提示肝癌内存在其他的抗凋亡机制。DNA 修复基因 Rad51 在 Huh7 内表达高于 SMMC-7721，Rad51 的高表达有助于 Huh7 细胞对损伤 DNA 的修复（图 7）。

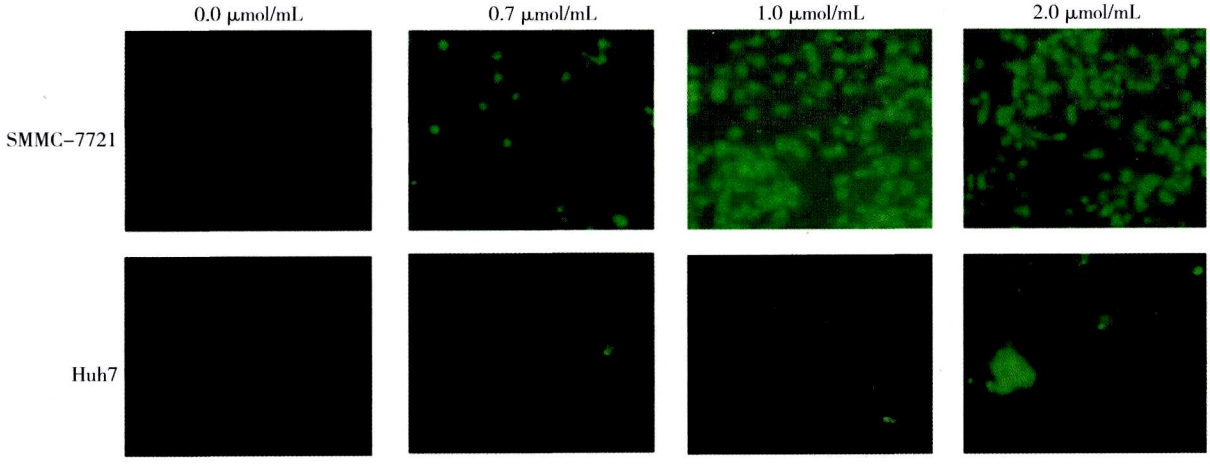
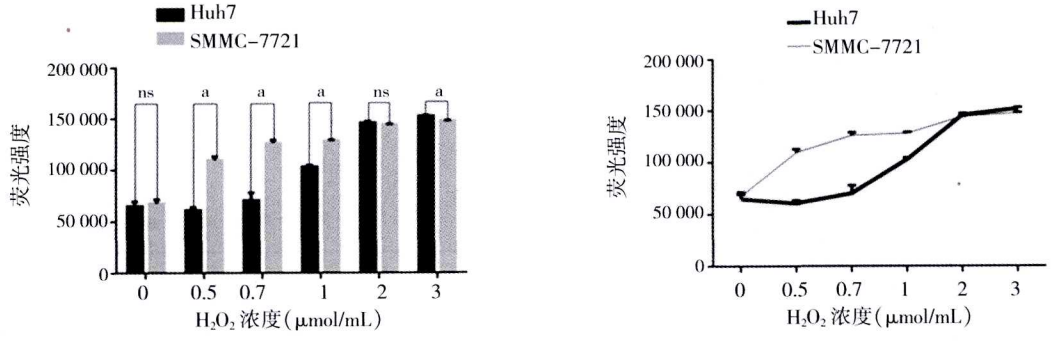


图 4　Huh7 与 SMMC-7721 细胞在不同浓度 H_2O_2 作用后细胞内 DCF-HA 荧光图

Fig.4　DCF-HA fluorescence intensity of Huh7 and SMMC-7721 cells under different concentrations of H_2O_2



A. H_2O_2 同浓度下 Huh7 与 SMMC-7721 细胞内 ROS 水平比较　　B. 2 组细胞内 ROS 水平在不同 H_2O_2 浓度下的变化趋势

a：$P<0.05$；ns：统计无差异

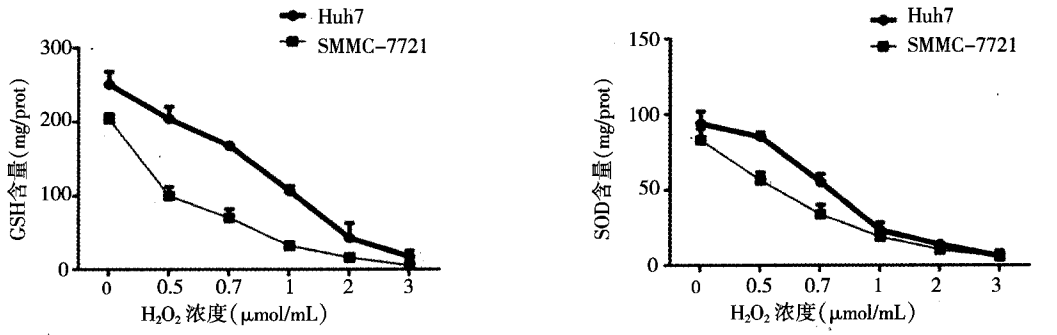
图 5　SMMC-7721 与 Huh7 细胞在不同浓度 H_2O_2 作用后细胞内 ROS 变化

Fig.5　Changes of ROS in Huh7 and SMMC-7721 cells under different concentrations of H_2O_2

表 3　H_2O_2 各浓度组两细胞系 ROS 水平（$\bar{x} \pm s$）

Tab.3　Average content of ROS in each group（$\bar{x} \pm s$）

细胞系	不同 H_2O_2 浓度（μmol/mL）组细胞内 ROS（荧光值）					
	0.0	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
Huh7	62 531 ± 4 691	61 260 ± 3 024	70 747 ± 7 716	103 455 ± 1 665	146 360 ± 1 537	152 832 ± 895 000
SMMC-7721	68 005 ± 3 739	110 076 ± 3 470	126 527 ± 3 099	128 793 ± 1 158	144 950 ± 491 000	148 306 ± 451 000
t 值	0.081	18.370	11.619	21.639	1.513	7.816
P 值	0.468	0.000	0.000	0.000	0.205	0.001



A. 2 组细胞内 GSH 水平在不同 H_2O_2 浓度下的变化趋势　　B. 2 组细胞内 SOD 水平在不同 H_2O_2 浓度下的变化趋势

图 6　不同浓度 H_2O_2 处理 Huh7 与 SMMC-7721 细胞内 SOD、GSH 的变化

Fig.6　Changes of SOD GSH in Huh7 and SMMC-7721 cells under different concentrations of H_2O_2

表 4　H_2O_2 各浓度组两细胞系 GSH 含量（$\bar{x} \pm s$，mg/g prot）

Tab.4　Average content of GSH in each group（$\bar{x} \pm s$，mg/g prot）

细胞系	不同 H_2O_2 浓度(μmol/mL)组细胞内 GSH					
	0.0	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
Huh7	251.47 ± 17.20	204.28 ± 16.80	167.86 ± 5.21	106.60 ± 6.83	43.00 ± 20.00	18.16 ± 7.76
SMMC-7721	204.24 ± 7.17	99.80 ± 12.58	70.43 ± 11.90	32.85 ± 4.47	17.11 ± 4.93	6.06 ± 2.51
t 值	4.390	8.623	12.998	15.655	2.177	2.571
P 值	0.012	0.001	0.000	0.000	0.095	0.062

表 5　H_2O_2 各浓度组两细胞系 SOD 含量（$\bar{x} \pm s$，U/mg prot）

Tab.5　Average content of SOD in each group（$\bar{x} \pm s$，U/mg prot）

细胞系	不同 H_2O_2 浓度(μmol/mL)组细胞内 SOD					
	0.0	0.5	0.7	1.0	2.0	3.0
Huh7	93.92 ± 8.15	85.20 ± 3.03	55.18 ± 5.22	23.57 ± 4.85	14.00 ± 1.61	6.38 ± 3.72
SMMC-7721	82.88 ± 7.71	56.48 ± 5.13	33.97 ± 6.23	19.22 ± 2.93	10.64 ± 2.43	6.30 ± 2.11
t 值	1.510	8.348	4.522	1.332	1.995	0.031
P 值	0.228	0.001	0.011	0.254	0.117	0.977

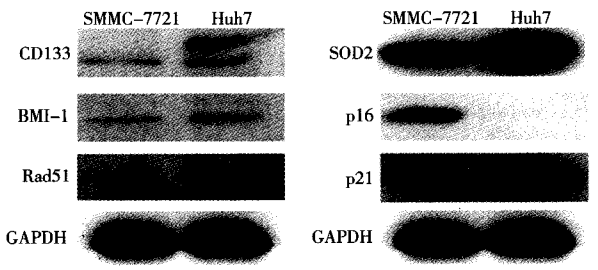


图 7　Huh7 和 SMMC-7721 细胞内相关分子的表达

Fig.7　Expressions of related moleculars in Huh7 and SMMC-7721

3　讨　论

许多化疗药物如氟尿嘧啶、顺铂、索拉非尼可通过增加癌细胞内的 ROS 来诱导肿瘤细胞的凋亡和坏死[3-5]。ROS 的超载使细胞 DNA 受损，质膜和细胞内重要的酶蛋白氧化，从而导致细胞发生坏死或凋亡，如果受损的 DNA 不能得到及时修复，会诱发突变导致正常细胞癌变[11]。正常细胞和肿瘤细胞在新陈代谢过程中可产生内源性 ROS，且能维持相对平衡。细胞内存在的还原类物质 GSH 和 SOD 可主动清除累积的 ROS[8]。肿瘤细胞普遍存在耐药现象，表明肿瘤细胞普遍存在抗 ROS 能力。同时，肿瘤细胞的 DNA 修复能力是细胞抗凋亡和坏死的重要因素。临床样本中发现 DNA 修复酶基因 Rad51 高表达，患者预后较差[9-10]，因此 DNA 修复酶基因高表达意味着肿瘤细胞较强的抵抗 ROS 能力和耐药能力。

不同遗传背景的肿瘤患者，尤其是肿瘤干性分子 CD133、Bmi-1 高表达的患者，预后更差，转移和复发率更高[12]。体外实验证明，分离出的高表达干性分子 CD133、CD90、EpCAM 和 Bmi-1 的细胞亚群相比于普通肿瘤细胞有更强的侵袭、转移能力；小鼠皮下成瘤实验也说明干性分子高表达的细胞亚群更容易引起肿瘤的发生[13-14]。在肿瘤分离出来的干细胞中发现，肿瘤干细胞内的 ROS 水平低于普通肿

瘤细胞，说明肿瘤患者化疗抵抗的一个主要因素在于肿瘤干细胞的存在。化疗过程中出现的短期敏感、长期耐药现象，可能是化疗药物诱导了普通肿瘤细胞的凋亡和坏死，使得肿瘤干细胞富集，形成耐药肿瘤组织。由于肿瘤干细胞有更强的迁移和侵袭能力，因而耐药现象往往伴随肿瘤的复发和转移。肿瘤干性分子 Bmi-1 具备调控 ROS 抵抗的能力，Jin 等[15]的研究表明，敲除 Bmi-1 的小鼠，肾间质出现明显的氧化应激性损伤，同时不同的肿瘤干性分子在不同肿瘤组织中普遍表达，表明肿瘤干细胞普遍存在，这解释了耐药性普遍存在的原因。

本研究发现，Huh7 细胞比 SMMC-7721 细胞有更强的抗 ROS 能力，同时 Huh7 细胞高表达 Bmi-1、CD133、SOD2 和 Rad51，并且 Huh7 细胞内 GSH、SOD 水平相对较高，说明 Huh7 细胞抵抗 ROS 的能力依赖以上因素。肿瘤干细胞作为肿瘤组织中维持细胞自我更新的主要细胞，在肿瘤患者术后复发和转移中发挥重要作用，而且肿瘤耐药往往伴随复发与转移，表明肿瘤干细胞是肿瘤组织中发挥药物抵抗的主要亚群。此外，在高浓度 H_2O_2 下，肝癌细胞仍有小部分存活，说明肝癌细胞中存在抗 ROS 亚群，这一亚群可能是高表达 CD133 或 Bmi-1 的干细胞亚群。调控细胞 ROS 代谢的 SOD2 和 DNA 修复基因 Rad51，可能是抗 ROS 信号通路下游起直接作用的分子，但不在基因层面影响细胞的调控。而重要膜蛋白分子 CD133 可以参与信号通路的调控，核转录因子的 Bmi-1 更直接参与基因选择性表达的调控和细胞的分化、发育[16]。

综上所述，肝癌细胞 Huh7 比 SMMC-7721 有更强的调控 ROS 抵抗的能力，有可能是通过高表达干性分子 CD133、Bmi-1 及相关的 ROS 清除酶、DNA 修复酶基因，决定了肝癌细胞抗 ROS 能力，进而决定其耐药性。其中，肿瘤干细胞的存在或肿瘤干性分子 CD133、Bmi-1 的表达可能是肿瘤细胞耐药及 ROS 抵抗的根本因素。本研究初步探讨分析了肝癌细胞抗 ROS 能力的机制，能更好地指导临床用药和研发抑制 ROS 抵抗的化疗药物，为临床肿瘤治疗提供新的策略。临床上“少次大剂量脉冲式”的化疗方案有可能更大限度发挥化疗药物的作用，减少肿瘤细胞耐药性的产生。新药的研究可以更加关注肿瘤干性分子的靶向药，尤其是能同时诱导肿瘤细胞凋亡和抑制 ROS 抵抗能力的双重作用药物。此外，肿瘤药物研发策略的重点也应当从普通的肿瘤细胞向肿瘤干细胞亚群方面转移，从肿瘤细胞的杀伤效果向抑制肿瘤细胞 ROS 抵抗能力转移。

参 考 文 献

[1] Dragani TA. Risk of HCC: genetic heterogeneity and complex genetics[J]. Journal of Hepatology, 2010, 52(2): 252-257.

[2] Gao Q, Wang XY, Zhou J, et al. Heterogeneity of intermediate-stage HCC necessitates personalized management including surgery[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2015, 12(1): 10.

[3] Coriat R, Nicco C, Chereau C, et al. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2012, 11(10): 2284-2293.

[4] Hu XY, Liang JY, Guo XJ, et al. 5-fluorouracil combined with apigenin enhances anticancer activity through mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi m$)-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2015, 42(2): 146-153.

[5] Nor C, Zhang Z, Warner KA, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer[J]. Neoplasia, 2014, 16(2): 137-146.

[6] Ma S, Lee TK, Zheng, BJ et al. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway[J]. Oncogene, 2008, 27(12): 1749-1758.

[7] Ding SJ, Li CB, Cheng NH, et al. Redox regulation in cancer stem cells[J]. Oxidative Medicine & Cellular Longevity, 2014, 2015(3): 750-798.

[8] Bułdak RJ, Bułdak Ł, Kukla M, et al. Significance of selected antioxidant enzymes in cancer cell progression[J]. Pol J Pathol, 2014, 65(3): 167-175.

[9] Lee Y, Kim K, Kang KT, et al. Atmospheric-pressure plasma jet induces DNA double-strand breaks that require a Rad51-mediated homologous recombination for repair in Saccharomyces cerevisiae [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014, 560(20): 1-9.

[10] Shao JJ, Xu Z, Peng XM, et al. Gefitinib synergizes with irinotecan to suppress hepatocellular carcinoma via antagonizing rad51-mediated DNA-repair[J]. PLos One, 2016, 11(1): e0146968.

[11] Kobayashi CI, Suda T. Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells[J]. Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(2): 421-430.

[12] Guo Z, Li LQ, Jiang JH, et al. Cancer stem cell markers correlate with early recurrence and survival in hepatocellular carcinoma[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(8): 2098-2106.

[13] Jin L, Gao D, Feng T, et al. Cells with surface expression of CD133 (high)CD71(low) are enriched for tripotent colony-forming progenitor cells in the adult murine pancreas[J]. Stem Cell Research, 2015, 16(1): 40-53.

[14] Yang F, Lü LZ, Cai QC, et al. Potential roles of EZH2 Bmi-1 and miR-203 in cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cell line Hep3B[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(47): 13268-13276.

[15] Jin J, Lü X, Chen L, et al. Bmi-1 plays a critical role in protection from renal tubulointerstitial injury by maintaining redox balance [J]. Aging Cell, 2014, 13(5): 797-809.

[16] Wiederschain D, Chen L, Johnson B, et al. Contribution of polycomb homologues Bmi-1 and Mel-18 to medulloblastoma pathogenesis [J]. Molecular and cellular biology, 2007, 27(13): 4968-4979.

（责任编辑：张辉洁）