

• 论 著 •

顺铂作用于人肝癌细胞系 HepG2 后对肿瘤干细胞标志物的影响*

徐颖佳¹, 薛赢俊², 陆婵娟¹

(1. 同仁医院检验科, 上海 200050; 2. 上海中医药大学附属龙华医院检验科, 上海 200333)

摘要:目的 研究顺铂作用于人肝癌细胞系 HepG2 后对肿瘤干细胞标志物的影响。方法 培养 HepG2 人肝癌细胞, 以对数生长期的细胞为研究对象, 分成对照组和实验组, 对照组不予特殊处理, 实验组予以顺铂处理并测定细胞生长抑制率、移行愈合率, 并测定相关肿瘤标记物 P53、caspase-3、caspase-8、CD133、腺苷三磷酸结合盒转运体 G2(ABCG2)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等的表达变化。结果 细胞生长抑制率: 随着药物浓度增加而增强, 与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞移行愈合率: 实验组细胞移行愈合率明显低于对照组($P < 0.05$), 9 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组移行愈合率明显低于 6 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂组($P < 0.05$)。相关肿瘤标记物 P53、caspase-3、caspase-8 随着药物浓度增加而各指标表达增强, 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。细胞免疫荧光方法显示随着顺铂浓度的增加, CD133、ABCG2、ICAM-1 的表达增强。结论 顺铂可能通过上调肿瘤标记物 P53、caspase-3、caspase-8 的表达, 从而抑制人肝癌细胞 HepG2 的生长, 并抑制 HepG2 细胞的迁移愈合, 但会使其耐药性也增加。

关键词: 顺铂; 肝癌; 肿瘤干细胞; 细胞增殖; 细胞周期

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)08-1023-03

The effects of cisplatin on cancer stem cell markers of hepatocellular carcinoma cell line HepG2*

Xu Yingjia¹, Xue Yinjun², Lu Chanjuan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Tongren Hospital, Shanghai 200050, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200333, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of cisplatin on the expression of tumor stem cell markers in human hepatoma cell line HepG2. **Methods** The cultured human hepatoma HepG2 cells in logarithmic growth phase were used for the study, which were divided into control (no special treatment was administrated) and experimental groups (cisplatin was added), then the rates of cell growth inhibition, transitional healing rates and changes in tumor associated markers associated P53, caspase-3, caspase-8, CD133, adenosine triphosphate-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) were measured. **Results** Comparison of cell growth inhibition: with the increase of drug concentration increased, compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Transitional healing rate: with the increase of drug concentration, compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of related tumor markers P53, caspase-3, caspase-8 increased while the drug concentrations increase and were higher in the control group ($P < 0.05$), the difference were statistically significant. In the immunofluorescence for the detection of CD133, ABCG2, ICAM-1, the fluorescence intensity increased with the concentrations of cisplatin. **Conclusion** Cisplatin could inhibit the growth of tumor cells by up-regulating the tumor markers such as P53, caspase-3 and caspase-8. The migration of tumor cells in cell scratch test could also be inhibited by cisplatin while their drug resistance were enhanced.

Key words: cisplatin; liver cancer; cancer stem cells; cell proliferation; cell cycle

原发性肝癌在我国较为常见, 发病率、病死率较高^[1], 大部分患者确诊时已丧失手术机会, 对于这部分的肝癌患者化疗为首选治疗措施^[2]。肿瘤干细胞在肿瘤增殖、转移过程中起重要作用。肿瘤干细胞具有无限增殖、分化的能力, 可能具有抵抗化疗药物损伤的作用, 从而导致肿瘤细胞增殖、转移。P53 基因是一种抑癌基因^[3], caspase-8 在细胞凋亡中起重要作用, 通过激发级联反应, 活化 caspase-3^[4], 三者是在肝癌细胞系 HepG2 细胞凋亡中起关键作用。本实验探讨了顺铂对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞增殖、迁移能力的影响, 在细胞水平上, 通过 MTT 法测定细胞增殖能力, 细胞划痕实验观察细胞迁移愈合能力, 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测 P53、caspase-3、caspase-8 的表达情况, 细胞免疫荧光方法检测 CD133、腺苷三磷酸结合

盒转运体 G2 (ABCG2)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 等的表达, 以期对肝癌的药物治疗提供借鉴。现报道如下。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 细胞培养基购于 GIBCO 公司; 胎牛血清购自 PAA 公司, MTT 购自 Sigma 公司; 顺铂购自山东齐鲁制药有限公司; Trizol 购自海生生物工程技术有限公司; 逆转录试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司; CD133、ABCG2、ICAM-1 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 HepG2 肝癌细胞株在 37 °C、50 mL/L CO₂ 的环境下, 在含 1% 青霉素和链霉素、100 mL/L 的胎牛血清的培养基中培养。

* 基金项目: 上海市药学会医院药学科科研基金(2012-YY-01-02)。

作者简介: 徐颖佳, 女, 检验师, 主要从事免疫分子生物学方面的研究。

1.2.2 细胞增殖实验 实验分为对照组和实验组,对照组不加入顺铂(空白),实验组培养基中加入顺铂(分为 3、6、9、12、15、18、24、30 μmol/L 8 个浓度梯度),每个孔中为 100 μL 的 7×10^4 /mL 的人 HepG2 肝癌细胞悬浊液,培养 48 h 后,应用 MTT 法检测细胞增殖的情况,记录吸光度 A_{490} 值,计算细胞增殖抑制率,重复 3 次,求平均值。

1.2.3 细胞划痕实验 实验分为对照组和实验组,对照组不加入顺铂(空白),实验组培养基中加入顺铂(分为 6、9 μmol/L 2 个浓度梯度),每个孔中为 600 μL 的 7×10^4 /mL 的人 HepG2 肝癌细胞悬浊液。待细胞铺满板底,用无菌 20 nL 枪头在 24 孔板底部划出一条直线,每孔只划一次,加入培养基及药物后培养 24 h 后,测定移行愈合率:移行愈合率=(初始边缘距离-24 h 后边缘距离)/初始边缘距离 $\times 100\%$,重复 3 次,求平均值。

1.2.4 顺铂对 HepG2 细胞增殖抑制作用机制的研究 细胞分为对照组和实验组,对照组为空白,实验组培养基中加入顺铂(分为 5.4、10.76 μmol/L 2 个浓度),10.76 μmol/L 和 5.4 μmol/L 分别为顺铂作用于人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞 48 h 的细胞半数抑制浓度(IC50)的 1/2 和 1/4,每个孔中为 600 μL 的 7×10^4 /mL 的人 HepG2 肝癌细胞悬浊液,待细胞铺满板底,加入药物,培养 48 h,提取细胞总 RNA,鉴定 P53、caspase-3、caspase-8 等相关 RNA 的纯度和分析浓度,合成 cDNA,电泳分析 PCR 产物。

1.2.5 HepG2 肿瘤干细胞标记物的检测 实验分组分为对照组和实验组,对照组为空白,实验组加入顺铂(分为 5.4、10.76 μmol/L 2 个浓度),随后的操作和 1.2.4 相同,培养 48 h 后用细胞免疫荧光方法检测 CD133、ABC2、ICAM-1 的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞增殖能力的测定 单独运用 3、6、9、12、15、18、24、30 μmol/L 8 个浓度梯度的顺铂作用于人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞 48 h 后,测定 A_{490} 值,计算细胞增殖抑制率。各处理组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。顺铂对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞有抑制增殖的作用,IC50 时的顺铂浓度为 21.52 μmol/L,药物抑制作用随着顺铂浓度的增加而增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 顺铂作用于 HepG2 细胞 48 h 后对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

顺铂浓度(μmol/L)	A_{490} 值	抑制率(%)
0	0.700±0.015	—
3	0.587±0.020	17.11±0.83
6	0.518±0.343	27.54±1.02
9	0.476±0.013	33.84±0.92
12	0.438±0.023	37.43±1.13
15	0.427±0.035	41.29±1.87
18	0.391±0.014	46.68±1.36
24	0.346±0.035	53.42±2.03
30	0.298±0.026	70.44±2.58

—:该项无数据。

2.2 顺铂对 HepG2 细胞迁移的影响 测定移行愈合率的比

较,实验组(2 个浓度)与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),实验组移行愈合率明显低于对照组。6 和 9 μmol/L 两个浓度组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),9 μmol/L 顺铂组移行愈合率明显低于 6 μmol/L 顺铂组。见表 2。

表 2 不同浓度顺铂的作用下 HepG2 细胞移行愈合率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度(μmol/L)	移行愈合率
0	84.6±6.88
6	45.5±4.30
9	37.5±3.43

2.3 顺铂对 HepG2 细胞增殖的抑制作用机制 计算实验组条带的光密度值与相应的内参光密度值的比值然后与对照组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),顺铂组 caspase-3、caspase-8、P53 表达水平上调。见表 3。

表 3 顺铂对 HepG2 细胞 P53、caspase-3、caspase-8 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	实验组	
		6 μmol/L 顺铂	9 μmol/L 顺铂
P53	100.00	147.69±9.67	112.31±6.53
caspase-3	100.00	306.89±20.15	137.93±10.01
caspase-8	100.00	139.09±8.82	104.63±3.89

2.4 顺铂对人肝癌细胞株 HepG2 肿瘤干细胞标志物的影响 细胞免疫荧光方法示,随着顺铂浓度的增加,CD133、ABC2、ICAM-1 的表达增强,因此可知,顺铂刺激了肿瘤干细胞耐药性的增加。

3 讨 论

顺铂具有广谱的抗肿瘤作用,影响肿瘤细胞代谢周期,促进其凋亡,有抑制肿瘤细胞增殖的作用。原发性肝癌在我国较为常见,发病率、病死率较高,首选的治疗措施是手术切除,但本病发病隐匿,发现时已属晚期,出现肿瘤细胞播散和远处转移,已丧失手术机会,对于这部分的肝癌患者化疗为首选措施,所以顺铂被常用于肝癌的化疗。肿瘤干细胞在肿瘤增殖、转移过程中起重要作用,肿瘤干细胞具有无限增殖、分化的能力,可能具有抵抗化疗药物损伤的作用,从而导致肿瘤细胞增殖转移,在肿瘤增殖、分化中 P53、caspase-3、caspase-8 的表达起到重要作用^[5-7]。本实验探讨了顺铂对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞增殖、迁移能力的影响。在细胞水平上,通过 MTT 法测定细胞增殖能力,细胞划痕实验观察细胞迁移愈合能力,RT-PCR 检测 P53、caspase-3、caspase-8 的表达情况。实验中用 3、6、9、12、15、18、24、30 μmol/L 8 个浓度的顺铂分别作用于人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞 48 h 后,测定 A_{490} 值、细胞增殖抑制率,发现顺铂对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞有抑制增殖的作用,药物抑制作用随着顺铂浓度的增加而增强。顺铂的 IC50 为 21.52 μmol/L。6 和 9 μmol/L 浓度的实验组与对照组比较,实验组的移行愈合率明显低于对照组;6 和 9 μmol/L 浓度下的实验组比较,高浓度顺铂组移行愈合率明显低于低浓度的顺铂组。顺铂作用于 HepG2 细胞 48 h 使 caspase-3、caspase-8、

P53 表达水平上调可能是其抑制细胞增殖的机制。CD133 是肿瘤干细胞的广谱标志物之一, ABCG2 是肿瘤细胞逃避药物作用的标志物之一, ICAM-1 是一细胞黏附分子, 在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用, 细胞免疫荧光方法显示: 随着顺铂浓度的增加, CD133、ABCG2、ICAM-1 的表达增强, 因此可知, 顺铂刺激了肿瘤干细胞耐药机制的加强。

综上所述, 顺铂作用于肝癌 HepG2 肿瘤干细胞后, 可能通过上调肿瘤标记物 P53、caspase-3、caspase-8 表达, 从而抑制人 HepG2 肝癌细胞的生长, 并抑制人 HepG2 肿瘤细胞的迁移愈合, 且随着药物浓度增加而抑制作用增强。但是顺铂在应用于肝癌患者后普遍出现耐药现象, 对于其耐药机制的研究还有待于进一步完善^[8-10]。

参考文献

[1] Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette(ABC)B5 regulate liver Cancer cell chemoresistance[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(1):344-355.

[2] Williamson JM, Thairu N, Katsoulas N, et al. Impact of portal vein embolization on expression of Cancer stem cell markers in regenerated liver and colorectal liver metastases[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(12):1472-1479.

[3] Zhu AX, Duda DG, Ancukiewicz M, et al. Exploratory analysis of early toxicity of sunitinib in advanced hepatocellular carcinoma pa-

tients; kinetics and potential biomarker value[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(4):918-927.

[4] Na DC, Lee JE, Yoo JE, et al. Invasion and EMT-associated genes are up-regulated in B viral hepatocellular carcinoma with high expression of CD133-human and cell culture study[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 90(1):66-73.

[5] 万元泰, 刘小敏, 虞金宝, 等. 肝复康胶囊对人肝癌细胞系 HepG2 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21):165-168.

[6] 钟扬, 李靖, 黄小兵, 等. 慢病毒载体介导的人肝癌 HepG2 细胞 BC047440 基因沉默[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(8):744-748.

[7] 刘礼, 谢纪文, 王熙, 等. EGCG 联合不同剂量放疗对人肝癌细胞系 HepG2 中 hTERT 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(18):1873-1878.

[8] 张方宇, 何松. 乳糖脂修饰苦参碱脂质体的肝靶向性和体外抑瘤作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(6):747-751.

[9] 葛金华, 朱月永, 刘豫瑞, 等. siRNA 降低 COX-2 基因表达对肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(22):2244-2250.

[10] 特日格乐, 郁大鹏, 刘刚, 等. 人肝癌细胞系 HepG2 的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶缺陷型的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2011(12):92-95.

(收稿日期:2015-12-25)

(上接第 1022 页)

培养方便、杆状病毒使用相对安全, 应用广泛, 可以在一个细胞中表达多种蛋白^[12]。除此之外, 本研究结合 SIV Gag 蛋白和 Trop2 rBV 共感染制备嵌合 VLPs, 多种 MOI 比例共感染昆虫细胞制备嵌合 VLPs, 进行体外生物学活性鉴定, 筛选最有效的比例可以优化 VLPs 组装效率, 从而为后续的体内实验及有效的新型肺癌疫苗研究提供依据, 也为高表达 Trop2 的其他恶性肿瘤如宫颈癌、胃癌及胰腺癌的疫苗研制提供新思路 and 借鉴依据^[13]。

参考文献

[1] Win SJ, Ward VK, Dunbar PR, et al. Cross-presentation of epitopes on virus-like particles via the MHC I receptor recycling pathway[J]. *Immunol Cell Biol*, 2011, 89(6):681-688.

[2] Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, et al. Virus-like particles in vaccine development[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(10):1149-1176.

[3] Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, et al. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2009, 62(2):152-158.

[4] 江爱桂, 黄建安. Trop2 在晚期非小细胞肺癌组织中的表达及其对预后的影响[J]. *江苏医药*, 2013, 39(22):2702-2705.

[5] Gridelli C, Maione P, Comunale D, et al. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer*

Control, 2007, 14(1):57-62.

[6] Owonikoko TK, Ragin CC, Belani CP, et al. Lung cancer in elderly patients; an analysis of the surveillance, epidemiology, and end results database[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(35):5570-5577.

[7] Immunosenescence PT. Current status and molecular mechanisms[J]. *Hautarzt*, 2011, 62(8):598-606.

[8] Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing[J]. *Pathol*, 2007, 211(2):144-156.

[9] Frasca D, Blomberg BB. Aging affects human B cell responses[J]. *J Clin Immunol*, 2011, 31(3):430-435.

[10] 舒放, 王晓岩, 雷迎峰, 等. HCV 中和抗原表位与 HBV S 抗原嵌合病毒样颗粒的制备及纯化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(3):257-260, 265.

[11] 李谨革, 龙敏, 王希, 等. Her2/ECD-sf162/TM 融合杆状病毒表达及鉴定[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(13):1798-1802.

[12] 彭建明, 李金明. 病毒样颗粒在免疫测定中的应用研究进展[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(2):214-216.

[13] Hesketh PJ, Lilenbaum RC, Chansky K, et al. Chemotherapy in patients ≥ 80 with advanced non-small cell lung cancer; combined results from SWOG 0027 and LUN 6[J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2007, 2(6):494-498.

(收稿日期:2015-12-20)