

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 19-0023-05

索拉非尼对 MHCC97-H 肝癌细胞增殖、侵袭以及 PRL-3 蛋白表达的影响研究

马盼¹, 贾云宏²

(1. 锦州医科大学研究生学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 锦州医科大学药学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 探讨索拉非尼对体外培养 MHCC97-H 肝癌细胞中肝再生磷酸酶 3 (PRL-3) 表达水平的影响, 以及对肝癌细胞侵袭力的作用。**方法** 在 24、48 及 72 h 测定经不同浓度梯度索拉非尼处理 MHCC97-H 肝癌细胞增殖抑制率以筛选合适的干预浓度和时间。采用 MHCC97-H 肝癌细胞培养传代, 用索拉非尼干预处理, 瑞氏吉姆萨法染色观察形态学变化, MTT 法检测其增殖抑制率, Western blot 法检测 PRL-3 蛋白表达水平, Transwell 实验检测癌细胞侵袭力。**结果** 该实验索拉非尼体外最佳干预实验浓度和时间分别为 16 $\mu\text{mol/L}$ 和 48 h; 索拉非尼能诱导肝癌细胞株 MHCC97-H 的凋亡, 肝癌细胞增殖抑制率与时间和剂量呈正相关。经索拉非尼作用后 PRL-3 蛋白也出现不同程度下降, 肝癌细胞侵袭能力明显下降。**结论** 索拉非尼能降低 MHCC97-H 肝癌细胞株中 PRL-3 蛋白表达水平, 降低肿瘤细胞侵袭力, 从而诱导肝癌细胞凋亡; 索拉非尼降低癌细胞的侵袭可能是通过下调 PRL-3 蛋白进行。

关键词: 索拉非尼; 肝癌; 肝再生磷酸酶-3; 侵袭力

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Sorafenib inhibits proliferation, invasion and PRL-3 protein expression in MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells

Pan Ma¹, Yun-hong Jia²

(1. Graduate School, 2. College of Pharmacy, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Sorafenib on the proliferation and apoptosis of MHCC97-H human hepatocellular carcinoma cells *in vitro*, as well as its effect on expression of PRL-3 protein and cell invasiveness. **Methods** Different concentrations of Sorafenib were applied to MHCC97-H human hepatocellular carcinoma cells, and MTT assay was used to observe the inhibitory effect of Sorafenib on the cell proliferation at 24, 48 and 72 h to screen the optimum concentration of Sorafenib and intervention time. Giemsa staining was used to observe the morphological changes of the cells. Western blot was used to detect the protein expression of PRL-3. Transwell assay was used to detect the invasiveness of the tumor cells. **Results** The optimum concentration and time of Sorafenib intervention were 16 $\mu\text{mol/L}$ and 48 h, respectively. Sorafenib induced apoptosis of MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells. The inhibition rate of MHCC97-H cell proliferation was positively correlated with time and dosage. Sorafenib also decreased PRL-3 protein expression to different extent. After the expression of PRL-3 decreased, the hepatocellular carcinoma cell invasion ability was significantly inhibited. **Conclusions** Sorafenib can reduce the expression level of PRL-3 protein in MHCC97-H hepatocellular carcinoma cell line, and decrease the

收稿日期: 2017-11-12

[通信作者] 贾云宏, E-mail: jiajunhong@tom.com

invasiveness of the cells, so as to induce the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. Its inhibition of cancer cell migration may be mediated by down-regulation of PRL-3 protein.

Keywords: Sorafenib; hepatocellular carcinoma; liver regeneration phosphatase-3; invasive ability

肝细胞癌进展的特点是细胞异常分化快, 快速浸润性生长, 转移早, 恶性程度高, 预后差。尽管肝移植、手术切除或肝动脉化疗栓塞术 (transcatheter arterial chemoembolization, TACE) 治疗可在一定程度上延缓病情的进展, 然而治疗肝细胞癌的最大障碍仍然是侵袭和转移, 近年来研究^[1]证实, 肝再生磷酸酶 3 (phosphatases of regenerating liver 3, PRL-3) 是一种与肿瘤转移相关的磷酸酶, 它的过度表达增加癌细胞的运动和侵袭。索拉非尼作为一种新型的分子靶向药物在临床实践中已显示出显著的疗效。索拉非尼能否下调肝癌细胞中 PRL-3 的表达, 降低肝癌细胞的侵袭力鲜见相关文献报道, 本研究旨在探讨索拉非尼对 MHCC97-H 肝癌细胞增殖抑制情况, 对 PRL-3 蛋白表达水平的影响, 以及对肝癌细胞侵袭力的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

MHCC97-H 肝癌细胞株购自上海细胞生物研究所, 索拉非尼由德国拜耳公司生产, 鼠抗人 PRL-3 多克隆抗体购自美国 Bio Legend 公司, 胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 等均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度, DMEM 培养液中生长, 含有 10% 胎牛血清、青霉素 100 u/ml 及链霉素 100 mg/L, 消化传代使用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 液。

1.2.2 实验分组 索拉非尼由 100% 二甲基亚砷 (DMSO) 溶解, 实验组分别加入 2、4、8 和 16 μmol/L 的索拉非尼并且分别作用 24、48 和 72 h 以筛选最适合浓度和时间, 对照组不加索拉非尼。

1.2.3 瑞氏-吉姆萨染色观察细胞形态 准备铺有盖玻片的 6 孔培养板以便于对数生长期细胞接种, 同时设阴性对照, 加入 FTY720, 经索拉非尼作用 48 h, 滴加无水乙醇风干后加瑞氏吉姆萨染液染色 30 s, PBS 浸泡 2 min, 洗去染液, 固定、晾干、封片和镜检拍照。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖抑制率 相同浓度 MHCC97-H 细胞悬液, 实验组加 2、4、8 和 16 μmol/L 的索拉非尼。每组设 6 个复孔, 培养 24、48、72 h 后每

孔加入 20 μl 的 MTT 溶液, 再培养 4 h 后终止, 弃其上清后每孔加入 DMSO 溶液 150 μl 震荡溶解 10 min。在 490 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。细胞增殖抑制率 = (1 - 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值) × 100%。

1.2.5 Western blot 检测 PRL-3 蛋白表达的变化 收集经处理 48 h 的对照组, 2、4、8、16 μmol/L 的索拉非尼各组细胞, 经裂解及离心后收集上清进行蛋白定量; 上样缓冲液加入等量蛋白, 煮沸、电泳及转膜后加入 PRL-3 和 β-action 一抗 4℃ 过夜, HRP 标记二抗孵育 2 h, 最后用 ECL 发光, X 射线胶片进行曝光、显影、定影并应用 AlphaEase FC 软件分析图像。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 制备细胞悬液消化并且收集 16 μmol/L 的索拉非尼组细胞及对照组, 调整细胞密度至 5 × 10⁴ 个 /ml 选取 100 μl 加入经 Matrigel 包被的 Transwell 小室。放入细胞培养箱中常规培养 48 h 后取出弃去培养液, 用棉签擦去基质胶和上室内未穿膜的细胞, 经固定漂洗后给予 0.1% 结晶紫染色, PBS 洗 3 遍。400 倍显微镜下随机观察及计数 5 个视野细胞。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用重复测量设计的方差分析和单因素方差分析, 在方差分析有意义的基础上, 采用 LSD-*t* 进行两两比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 索拉非尼对 MHCC97-H 细胞的抑制作用

不同浓度的索拉非尼作用于 MHCC97-H 肝癌细胞 24、48 和 72 h 的细胞增殖抑制率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同浓度索拉非尼的细胞增殖抑制率有差异 ($F = 147.352, P = 0.000$); ②不同作用时间下细胞增殖抑制率有差异 ($F = 214.016, P = 0.000$); ③不同浓度索拉非尼细胞增殖抑制率变化趋势有差异 ($F = 157.263, P = 0.000$) (见表 1 和图 1)。在本实验的几组浓度中筛选出索拉非尼进一步研究作用时间和浓度分别为 48 h 和 16 μmol/L。

3 讨论

3.1 肝癌的研究现状

早期肝癌患者无明显的症状, 缺乏适当的监测和筛选制度, 大多数患者错过了最好的手术或肝移植机会。肝癌对放疗和化疗不敏感, 其预后相对较差, 主要是由于侵袭和转移引起的快速进展。细胞信号转导是一个复杂的多因素蛋白质网络, 其中信息被有效地通过上游因子的激活传递, 并转移到下游效应^[2]。癌基因的异常表达是肿瘤形成、侵袭和转移的关键。如果涉及肿瘤侵袭和转移的基因被确定, 分子生物学技术可纠正它们的表达水平, 肝癌的侵袭和转移可以减少, 从而延缓该疾病的进展。在分子靶向治疗的时代, 确定预测的生物标志物是个性化医学成功实施的关键。随着对肝癌肿瘤异质性意义的进一步了解, 肿瘤标志物的生物学特性可能是肝癌个性化靶向治疗成功发展的一条途径。随着生物信息学技术的发展和完善, 从细胞分子层面阐述肿瘤的作用机制, 为分子靶向治疗奠定了理论基础。

通过识别异种肿瘤相关分子的驱动程序, 分子靶向为肿瘤细胞的治疗提供可观的效果。识别肿瘤血管生成的作用改变以往对肿瘤的局限认识, 新的分子靶向治疗药物的出现使得癌症的治疗取得革命性的进步^[3]。目前有各种特定的和有效的单目标/单基因药物, 但他们的成本是相当昂贵的。此外, 使用多个有针对性的靶向药物, 将不可避免地增加患者的身体负荷和经济负担。因此, 寻找高效能的多靶向药物已成为治疗癌症患者的首要目标^[4]。随着医疗技术的进步, 针对基因、受体和激酶的药物已在临床上应用, 并在一定程度上为许多肿瘤的治疗提供巨大的前景。采用分子标记或者肿瘤生物标志物来理解这种高度侵袭性的作用机制, 可以预测肿瘤的预后, 为开发新的治疗方法提供重要的基础研究。近年来开发的药物靶向基因和激酶受体应用于临床, 推进癌症的治疗到一个前所未有的新阶段^[5]。

3.2 索拉非尼在治疗肝癌方面的应用

肝癌靶向治疗的关键是干扰肿瘤血管生成, 目前所有新的药物用于治疗晚期肝细胞癌的疗效以索拉非尼最为显著^[6]。索拉非尼能抑制 PI3K/Akt、Ras/MAPK 等通路, 这将防止多药耐药途径, 有更高的疗效和较低的不良反^[7-9]。一些研究还测试 TACE 联合索拉非尼在肝癌伴门静脉癌栓治疗的安全性和有效性^[10], 联合治疗肝癌可进一步提高疗效^[11]。索拉非尼在 Raf/

丝裂原活化蛋白转导中起关键作用^[12], 调节 ERK 激酶信号通路, 从而降低 Cyclin D1 的表达和细胞周期阻滞。索拉非尼还可通过抑制酪氨酸激酶受体^[13]抑制肿瘤血管生成, 导致肿瘤组织缺血坏死。此外, 索拉非尼也能通过 MAPK 依赖的机制抑制其活性, 增加肿瘤细胞凋亡的内在途径^[14]。索拉非尼是多激酶的血管生成抑制剂, 它已成为晚期肝细胞癌的标准治疗^[15]。尽管索拉非尼可以抑制肿瘤细胞通过多种信号转导途径, 但没有相关研究验证是否能有针对性地抑制 PRL-3 通路。

3.3 PRL-3 与肿瘤转移的相关性

PRL-3 是蛋白酪氨酸磷酸酶 PRL 亚组的一员, 积极参与蛋白酪氨酸激酶信号通路的许多基本生理过程, 调节多种酶的作用过程。越来越多的证据表明, PRL-3 参与卵巢癌、胃癌、乳腺等^[16-17]多种肿瘤细胞的增殖、生长调节、转移和侵袭。PRL-3 被证明是肿瘤复发与多种人类癌症患者预后的有用指标。PRL-3 在肿瘤血管生成及肿瘤侵袭性肝癌中起着关键的作用^[18], 调节 MMP-2、MMP-9 和 E-cadherin 在肝癌中的功能。抑制 PRL-3 也降低 IL-6 诱导 STAT3 的磷酸化, 从而调节机体自身的免疫状态。最近一些研究^[19]表明, PRL-3 能够控制多个信号通路, 包括 PI3K/Akt、Ras/MAPK 和 CSK/Src 途径, 是细胞周期和细胞迁移的关键。PRL-3 的高表达加速肝癌细胞侵袭、转移, 导致更差的预后。PRL-3 也被证明在 PI3K/Akt 活性主要负责调节蛋白表达水平增加, 同时下调 Akt 的活化, 降低磷酸酶和张力蛋白同源物。PRL-3 能通过自分泌分泌肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素 6, 激活 NF- κ B 信号通路, 引起机体免疫系统的破坏和激发炎症反应^[20]。PRL-3 已成为肿瘤转移的重要标志物之一^[21]。探索 PRL-3 作为药物分子靶标抑制肝癌细胞侵袭与转移已成为一种目前热门课题。虽然大多数的肿瘤可以从单一的肿瘤细胞进化克隆, 但所有的恶性肿瘤是遗传不稳定, 导致显著的生化异质性。虽然 PRL-3 是 1 个理想的分子靶点, 其效用仍然不能令人满意, 主要由于肿瘤治疗的特异性和敏感性鉴定缺乏。

3.4 本研究的意义和局限性

本研究发现本次实验最佳干预索拉非尼浓度为 16 μ mol/L, 最佳干预时间为 48 h。索拉非尼作用后肝癌细胞出现典型的核碎裂及细胞凋亡形态; MHCC97-H 细胞经索拉非尼作用后 PRL-3 蛋白量下调, 侵袭力受到明显抑制, 索拉非尼对肝癌细胞的抑

制作用表现出一定的时间和剂量效应关系。索拉非尼可作用于多靶点, 可能通过下调 PRL-3 蛋白从而减少肝癌细胞的侵袭, 并诱导其凋亡。PI3K/Akt、Ras/MAPK 等是索拉非尼和 PRL-3 调控的共同通路, 此通路的抑制以及肝癌细胞侵袭力的下降可能是下调 PRL-3 蛋白, 其作用机制需要进一步的探索。

综上所述, PRL-3 是肝转移的重要调节因子, 索拉非尼可下调 PRL-3 蛋白的表达从而减少肝癌细胞的侵袭, 本研究为实现索拉非尼的工艺改进和集多靶点为一体奠定理论基础。

参 考 文 献:

- [1] ZHAO W B, LI Y, LIU X, et al. Evaluation of PRL-3 expression, and its correlation with angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(2): 187-192.
- [2] YANG F, LV L Z, CAI Q C, et al. Potential roles of EZH2, Bmi-1 and miR-203 in cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cell line Hep3B[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(47): 13268-13276.
- [3] MA Z G, MA R, XIAO X L, et al. Azo polymeric micelles designed for colon-targeted dimethyl fumarate delivery for colon cancer therapy[J]. *Acta Biomater*, 2016, S1742-7061(16): 30417-30422.
- [4] HE Q, YAO C L, LI L, et al. Targeted gene therapy and in vivo bioluminescent imaging for monitoring postsurgical recurrence and metastasis in mouse models of liver cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 12: 15(3): DOI: 10.4238/gmr.15037878.
- [5] MOONEY M A, SIMON E D, LITTLE A S. Advancing treatment of pituitary adenomas through targeted molecular therapies: the acromegaly and cushing disease paradigms[J]. *Front Surg*, 2016, 28(3): 45.
- [6] LU L C, HSU C H, HSU C, et al. Tumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma: facing the challenges[J]. *Liver Cancer*, 2016, 5(2): 128-138.
- [7] LIN H H, FENG W C, LU L C, et al. Inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway improves the anti-tumor effects of sorafenib against hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(1): 58-66.
- [8] KIROPLASTIS K, FOUZAS I, KATSIKI E, et al. The effect of sorafenib on liver regeneration and angiogenesis after partial hepatectomy in rats[J]. *Hippokratia*, 2015, 19(3): 249-255.
- [9] HOUSSINON A, FRANÇOIS C, SAUZAY C, et al. Metallothionein-1 as a biomarker of altered redox metabolism in hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 38.
- [10] ZHAO Y, LI H, BAI W, et al. Early sorafenib-related adverse events predict therapy response of TACE plus sorafenib: a multicenter clinical study of 606 HCC patients[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(4): 928-937.
- [11] TACYILDIZ N, TANYILDIZ H G, DINCASLAN H U, et al. Can fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography be used as a useful method to evaluate the treatment response to neoadjuvant therapy combined with sorafenib and anti-vegfr in children diagnosed with metastatical bone sarcoma[J]. *Iran J Pediatr*, 2016, 26(2): e4008.
- [12] XU Y, HUANG J, MA L, et al. MicroRNA-122 confers sorafenib resistance to hepatocellular carcinoma cells by targeting IGF-1R to regulate RAS/RAF/ERK signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(2): 171-181.
- [13] NISHIDA N, KITANO M, SAKURAI T, et al. Molecular mechanism and prediction of sorafenib chemoresistance in human hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis*, 2015, 33(6): 771-779.
- [14] LECONTE M, SANTULLI P, CHOUZENOUX S, et al. Inhibition of MAPK and VEGFR by sorafenib controls the progression of endometriosis[J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(9): 1171-1180.
- [15] ISHIJIMA N, KANKI K, SHIMIZU H, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by retinoic acid sensitizes hepatocellular carcinoma cells to apoptosis induced by sorafenib[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(5): 567-575.
- [16] MAYINUER A, YASEN M, MOGUSHI K, et al. Upregulation of protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) is associated with tumor differentiation and a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Surg Oncol*, 2013, 20(1): 305-317.
- [17] GARI H H, DEGALA G D, LUCIA M S, et al. Loss of the oncogenic phosphatase PRL-3 promotes a TNF-R1 feedback loop that mediates triple-negative breast cancer growth[J]. *Oncogenesis*, 2016, 5(8): e255.
- [18] YE Z, AL-AIDAROOS A Q, PARK J E, et al. PRL-3 activates mTORC1 in cancer progression[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17046.
- [19] XING C, LU X X, GUO P D, et al. Ubiquitin-specific protease 4-mediated deubiquitination and stabilization of PRL-3 is required for potentiating colorectal oncogenesis[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(1): 83-95.
- [20] XU H, LAI W, ZHANG Y, et al. Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 330.
- [21] ZIMMERMAN M W, MCQUEENEY K E, ISENBERG J S, et al. Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth factor signaling and enables endothelial cell motility[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(9): 5904-5913.

(张蕾 编辑)