

文章编号:1000-5404(2013)02-0099-06

论著

## 肝癌干细胞样细胞的分离及其耐药性受 PI3K/Akt 通路调节

张小丽<sup>1</sup>, 高建<sup>1</sup>, 贾茜<sup>1</sup>, 邓涛<sup>2</sup> (400010 重庆, 重庆医科大学附属第二医院消化内科<sup>1</sup>; Toronto General Research Institute, University of Toronto, M5G 2M1, Toronto, Ontario, Canada<sup>2</sup>)

**[摘要]** 目的 分离肝癌干细胞样细胞,初步探讨 PI3K/Akt 通路调节其对化疗药物阿霉素的敏感性。方法 将人肝癌细胞株 PLC、HepG2、Hep3B 置于无血清条件培养基中培养,形成细胞球,选用 PLC 细胞株进行后续实验。采用流式细胞仪、克隆形成实验、SCID 小鼠体内成瘤实验鉴定 PLC 细胞球(肝癌干细胞样细胞)的肿瘤干细胞特性。MTT 法、流式细胞仪测定 PLC 细胞球对化疗药物阿霉素的敏感性。流式细胞仪分析加入 PI3K/Akt 通路特异性抑制剂 LY294002、阿霉素共同孵育细胞球后,其凋亡率的变化。Western blot 法比较 PLC 细胞球、PLC 贴壁细胞中 p-Akt1 (Ser473) 蛋白分子表达量及加入抑制剂 LY294002 作用于细胞球后,p-Akt1 (Ser473)、Akt1 蛋白分子表达量的变化。结果 肝癌干细胞标志物 CD90 在细胞球中的表达较贴壁细胞显著升高 ( $P < 0.01$ )。细胞球的克隆形成数目 ( $123.00 \pm 28.48$ ) 为贴壁细胞 ( $56.33 \pm 7.37$ ) 的 2.18 倍 ( $P < 0.05$ )。同样细胞数接种于 SCID 小鼠皮下 7 周后,细胞球的致瘤率明显大于贴壁细胞。以  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  的阿霉素分别处理细胞球和贴壁细胞 48 h 后,细胞球的增殖率明显高于贴壁细胞 [ $(71.83 \pm 12.30)\% \text{ vs } (45.68 \pm 5.95)\%$ ,  $P < 0.05$ ], 凋亡率显著低于贴壁细胞 [ $(11.73 \pm 3.77)\% \text{ vs } (41.22 \pm 6.73)\%$ ,  $P < 0.01$ ], 而以阿霉素  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  和 LY294002 共同孵育细胞球后,其凋亡率 [ $(35.44 \pm 6.65)\%$ ] 显著增加 ( $P < 0.01$ )。Western blot 检测到细胞球的 p-Akt1 (Ser473) 蛋白分子表达量显著高于贴壁细胞 ( $P < 0.01$ ), 加入抑制剂 LY294002 处理细胞球后,p-Akt1 (Ser473) 蛋白表达量明显降低 ( $P < 0.05$ ), Akt1 的表达量无明显变化 ( $P > 0.05$ )。结论 肝癌干细胞样细胞对化疗药物阿霉素具有耐药性,其耐药机制与 Akt 信号通路第 473 位点磷酸化 Akt1 分子有关。

**[关键词]** 肝细胞癌;肿瘤细胞,培养的;肿瘤干细胞;表柔比星;耐药性;PI3K/Akt

**[中图分类号]** R73-351;R730.23;R735.7 **[文献标志码]** A

## Isolation of HCC cancer stem-like cells and chemo-resistance mediated by PI3K/Akt pathway

Zhang Xiaoli<sup>1</sup>, Gao Jian<sup>1</sup>, Jia Qian<sup>1</sup>, Deng Tao<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China; <sup>2</sup>Toronto General Research Institute, University of Toronto, M5G 2M1, Toronto, Ontario, Canada)

**[Abstract]** **Objective** To isolate hepatocellular carcinoma (HCC) cancer stem-like cells and investigate the role of PI3K/Akt pathway in the sensitivity of liver cancer stem-like cells to chemotherapeutic drug doxorubicin (DOX). **Methods** Human HCC cell lines PLC, HepG2, and Hep3B were cultured in serum-free condition medium to form tumor spheres, and PLC cell line was finally selected to proceed the subsequent experiments. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) and colony formation assay and SCID mice tumorigenicity experiments *in vivo* were used to identify the traits of CSCs in PLC spheres (liver cancer stem-like cells). The sensitivity of the cancer stem-like cells to DOX was detected with MTT assay and FACS. The apoptotic rate of the cancer stem-like cells was analyzed with FACS after the treatment of DOX and LY294002, an inhibitor specific to PI3K/Akt signaling pathway. Western blotting was used to detect the expression of p-Akt1Ser473 and Akt1 protein in PLC spheres and in PLC monolayer cells in present or absent of the inhibitor LY294002. **Results** The expression of liver CSCs marker CD90 in the obtained spheres was obviously up-regulated as compared to monolayer cells ( $P < 0.01$ ). The cloning number of spheres ( $123.00 \pm 28.48$ ) was 2.18 times higher than that of the monolayer cells ( $56.33 \pm 7.37$ ,  $P < 0.05$ ). The tumorigenicity of spheres was evidently greater than the monolayer cells when same number of cells was subcutaneous injected into SCID mice after

**[基金项目]** 重庆市医学科研计划重点项目(2011-1-055)

**[通信作者]** 高建, E-mail: g6j6@sohu.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121030.1723.002.html>(2012-10-30)

7 weeks. The proliferation rate was greatly elevated after 48 hour-treatment of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX in the spheres than in the monolayer cells [(71.83  $\pm$  12.30)% vs (45.68  $\pm$  5.95)% ,  $P < 0.05$ ], while the apoptosis rate was sharply reduced [(11.73  $\pm$  3.77)% vs (41.22  $\pm$  6.73)% ,  $P < 0.01$ ]. But the apoptotic rate of spheres was sharply increased after the treatment of 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DOX and LY294002. (35.44  $\pm$  6.65)% ,  $P < 0.01$ ). The expression of p-Akt1Ser473 protein significantly exceeded in spheres than monolayer cells ( $P < 0.01$ ) and the p-Akt1Ser473 expression at protein levels was obviously decreased after addition of LY294002 ( $P < 0.05$ ). There was no change in the expression of Akt1 protein ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The liver cancer stem-like cells demonstrate drug resistance to chemotherapeutic drug DOX, and the mechanism is related to Akt signaling pathway molecule Akt1 phosphorylated at Ser473.

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma; tumor cells, cultured; neoplastic stem cells; epirubicin; chemoresistance; PI3K/Akt

Supported by the Key Project of Medical Science of Chongqing (2011-1-055). Corresponding author: Gao Jian, E-mail: g6j6@sohu.com

近年来,肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论的提出为肿瘤的治疗研究提供了新的思路。肿瘤干细胞学说<sup>[1-2]</sup>认为肿瘤组织中绝大多数细胞只具备有限增殖能力,对化疗药物产生抗性的仅是肿瘤中极少一部分细胞,即肿瘤干细胞,治疗如果不能杀死导致肿瘤形成并维持肿瘤生长的肿瘤干细胞,那么肿瘤仍会复发,故对肿瘤的治疗应针对肿瘤干细胞。继1994年Lapidot等<sup>[3]</sup>首次发现了白血病肿瘤干细胞后,研究者陆续在脑肿瘤<sup>[4-5]</sup>、乳腺癌<sup>[6-7]</sup>、结肠癌<sup>[8-9]</sup>、肝癌<sup>[10-11]</sup>等许多实体肿瘤中也成功分离出肿瘤干细胞。本研究采用无血清悬浮球培养方法分离、富集肝癌干细胞并且鉴定细胞球的肿瘤干细胞特性。

磷脂酰肌醇3激酶(PI3Ks)信号参与增殖、分化、凋亡等多种细胞功能的调节,研究<sup>[12-13]</sup>表明,IA型PI3K和其下游分子蛋白激酶B(PKB或Akt)所组成的信号通路与人类肿瘤的发生、发展密切相关,该通路调节肿瘤细胞的增殖和存活。本研究应用球培养法富集肝癌干细胞亚群后,得到肝癌干细胞样细胞对化疗药物阿霉素的耐药性受到PI3K/Akt信号通路的调节。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 PLC8024、HepG2、Hep3B 购自中国科学院上海生命科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、DMEM/F12培养基、人重组表皮生长因子(EGF)、人重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、B27(Invitrogen公司);胎牛血清(FBS,Gibco公司);超低吸附表面6孔板、普通6孔、96孔板(Coming Inc,Coming, NY, USA)。流式分选抗体CD90(德国Miltenyi公司);RIPA裂解液(强)、ECL化学发光显色试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(Beyotime公司);阿霉素、LY294002抑制剂(凯基生物);MTT试剂盒(Beyotime公司);Annexin V-FITC细胞凋亡检测试

剂盒(凯基生物)。无血清条件培养基:以DMEM/F12为基础培养基,不添加血清,添加20 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF、2% B27、100 IU/mL青霉素、100 IU/mL链霉素;标记液:将Annexin V-FITC加入到PBS缓冲液中,使其终浓度为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.2 细胞球培养及传代

以DMEM高糖培养基加10% FBS、100 IU/mL青霉素、100 IU/mL链霉素将PLC、HepG2、Hep3B肝癌细胞培养于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵箱中,待细胞长至80%密度时,用0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,离心,弃上清,以无血清条件培养基重悬。细胞计数,以不超过5 000个/孔的密度接种于超低吸附表面6孔板,加无血清条件培养基于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵箱中培养。培养7~10 d,待细胞球长至约70  $\mu\text{m}$ 大小,收集细胞悬液,将获得的细胞球用0.25%胰酶于37  $^{\circ}\text{C}$ 孵箱消化10 min,吹打分散成单个细胞,加PBS,800 r/min离心5 min,弃上清。再用无血清条件培养基将细胞重悬。计数细胞,5 000个/孔重新接种于超低吸附表面6孔板,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵箱中培养。

### 1.3 流式细胞仪检测各组细胞里肝癌干细胞膜表面分子标记物CD90的表达

待肝癌细胞PLC细胞系长至80%密度时,用0.25%胰酶消化后离心去上清,细胞计数,每 $1 \times 10^7$ 细胞中加入100  $\mu\text{L}$  PBS缓冲液后加入10  $\mu\text{L}$ 抗体,充分混匀,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min,用流式细胞仪测定CD90在各组细胞中的表达量。分别采用此方法检测同型对照组、贴壁细胞组、细胞球组CD90表达量。待细胞长至80%密度时,分别加入不同浓度阿霉素2.5、5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于PLC贴壁细胞48 h后,流式检测膜分子标记物CD90表达量。

### 1.4 体外克隆形成实验

收集PLC细胞球,消化为单细胞,同时收集生长至80%密度的贴壁细胞。计数板计数,将消化为单细胞的细胞球以1 000个/孔接种于6孔板中,接种3孔,贴壁细胞以相同密度接种至另外3孔。用含10% FBS的DMEM培养基于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 孵箱中培养,每4天换1次液。9 d后吸弃培养基,PBS洗3遍,4%多聚甲醛室温固定20 min,PBS冲洗3次。加结晶紫染色10 min,自来水冲洗。显微镜下计数大于60个细胞的克隆个数,拍照记录。

### 1.5 SCID 小鼠体内成瘤实验

4~6周雄性SCID小鼠购自上海中科院实验动物中心,消化、收集PLC细胞球和PLC贴壁细胞,细胞计数,PBS重悬,用100 μL微量注射器在小鼠两侧前腿根部皮下分别注入细胞球、贴壁细胞1、20万个,每只SCID小鼠保证两处接种细胞量相同,每组注射3只。每隔3~4天观察成瘤情况,待小鼠成瘤后,对所形成的瘤块拍照、测量、记录,取瘤块做石蜡包埋、组织切片,行HE染色,显微镜下观察组织切片的病理特征。

### 1.6 MTT 法检测各组细胞增殖率

收集各组细胞并消化为单细胞悬液,按每孔100 μL培养基 $5 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔培养板中,做4个复孔,并设对照孔、调零孔。每组细胞分别培养24 h后,加入阿霉素5 μg/mL,继续培养48、72 h后,每孔加入MTT(5 mg/mL)溶液10 μL,继续孵育4 h,吸去培养基,加入DMSO 100 μL,避光振荡10 min,用全自动酶标仪检测D(570)值。细胞增殖率 = [D(570)实验孔 - D(570)调零孔] / [D(570)对照孔 - D(570)调零孔] × 100%。

### 1.7 Annexin V-FITC 单标法检测各组细胞凋亡率

收集各组细胞3万个,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min,加入100 μL标记液重悬,室温下避光孵育10~15 min,1 000 r/min离心5 min,PBS洗涤1次,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

### 1.8 Western blot 检测各组细胞中 p-Akt1、Akt1 蛋白含量

各组细胞提取蛋白,用BCA法测定样品蛋白浓度,变性后经10% SDS-PAGE凝胶电泳后,转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗兔抗Akt1 pS473 (EPITOMICS, 1:6 000)、山羊抗Akt1/2(中杉金桥, 1:350)、小鼠抗β-actin单抗(中杉金桥, 1:1 000),一抗4℃孵育过夜,TBST洗膜3 × 10 min,二抗山羊抗小鼠IgG(中杉, 1:3 000)、山羊抗兔IgG/辣根酶标记(中杉金桥, 1:25 000)、辣根酶标记马抗山羊IgG(北京鼎国昌盛, 1:400),室温孵育1 h,TBST洗膜3 × 10 min,超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天公司)显色。

### 1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件分析数据,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较采用独立样本的t检验。

## 2 结果

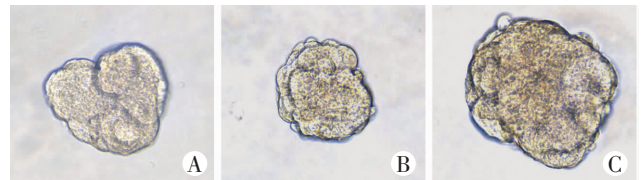
### 2.1 肝癌细胞株培养7 d后所形成的细胞球形态

以无血清条件培养基于超低黏附6孔板中培养细胞,每天显微镜下观察,肿瘤干细胞样细胞随培养时间的延长开始克隆生长,逐渐形成细胞球,而非干细胞样细胞逐渐死亡,从而有效富集肿瘤干细胞。如图1, HepG2、Hep3B、PLC细胞株均可生长成立体、悬浮的细胞球。收集第1代细胞球,消化后可稳定传代、扩增。而HepG2、Hep3B、PLC贴壁细胞在普通培养瓶里、无血清条件培养基中培养至2~3 d时,细胞开始逐渐凋亡。

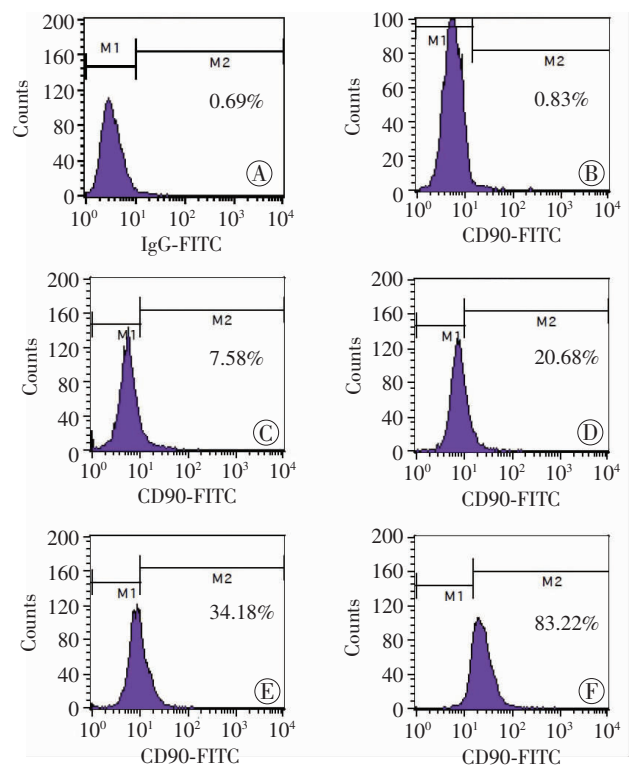
### 2.2 流式细胞仪检测分子标记物 CD90 的表达

图2A为同型对照。PLC贴壁细胞中肝癌干细胞分子标记物CD90呈低表达(图2B)。球培养法富集肝癌干细胞后PLC

细胞球(图2C)中CD90的表达量较贴壁细胞(图2B)显著升高( $P < 0.01$ )。HepG2、Hep3B与PLC细胞系有类似的结果。在PLC贴壁细胞中分别加入不同浓度阿霉素(2.5、5、10 μg/mL)培养48 h后,CD90的表达量(图2D~F)较未加阿霉素的贴壁细胞(图2B)明显升高( $P < 0.01$ ),并且随浓度的增大而增高。



A: HepG2 细胞球; B: Hep3B 细胞球; C: PLC 细胞球  
图1 倒置显微镜观察3种人肝癌细胞株在无血清条件培养基中所形成的细胞球(×200)



A: 同型对照; B: 贴壁细胞; C: 细胞球; D: 贴壁细胞里加入阿霉素2.5 μg/mL; E: 贴壁细胞里加入阿霉素5 μg/mL; F: 贴壁细胞里加入阿霉素10 μg/mL

图2 流式细胞仪检测CD90在各组细胞中的表达

### 2.3 克隆形成能力分析

细胞培养9 d后,倒置显微镜下计数细胞数>60个的集落个数,细胞球形成的集落个数为(123.00 ± 28.48),贴壁细胞形成的集落个数为(56.33 ± 7.37),两者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。表明细胞球的自我增殖能力明显大于贴壁细胞。

### 2.4 SCID 小鼠体内成瘤实验

2.4.1 成瘤情况 分别接种1、20万个PLC细胞球细胞的SCID小鼠在4周时可摸及米粒大小的瘤体,7周时瘤块明显突出,其中接种1万个细胞球细胞的小鼠在7周后有2/3形成肿瘤,接种20万个细胞球细胞的小鼠全部形成肿瘤,检查小鼠其他部位有无肿瘤转移,拍照记录。剥离下肿瘤后,测量其大小

为1.2 cm × 1.1 cm。接种1万个PLC贴壁细胞的SCID小鼠在7周甚至12周时仍未见肿瘤形成,接种数量至20万个时,仅有1/3只小鼠形成肿瘤,且瘤体体积小于细胞球所形成的肿瘤。以上结果表明细胞球的成瘤能力明显强于贴壁细胞。SCID小鼠成瘤情况见图3,成瘤比例见表1。

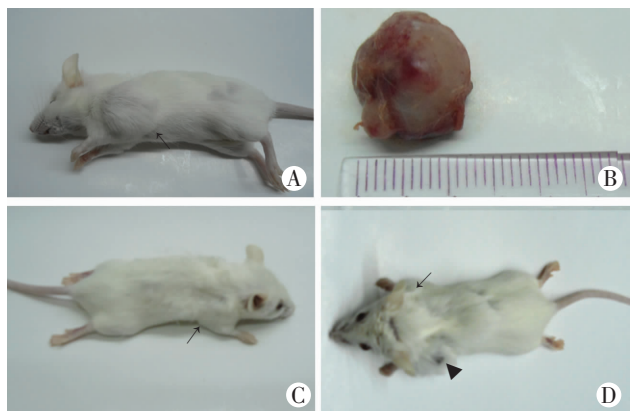
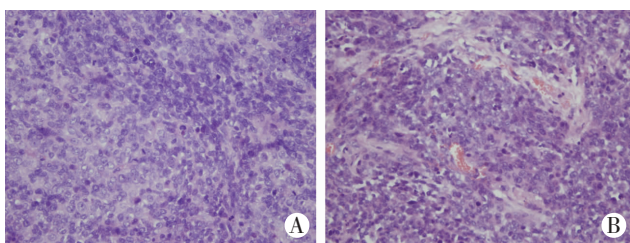


图3 SCID小鼠接种细胞7周后所形成的肿瘤大体观察  
A:接种细胞球后的成瘤小鼠 ↑:接种细胞球所形成的肿瘤部位;B:细胞球所形成的肿瘤大小为1.2 cm × 1.1 cm;C:接种贴壁细胞后未形成肿瘤的小鼠 ↑:接种贴壁细胞的部位,未形成肿瘤;D:细胞球所形成的瘤块体积大于贴壁细胞形成的肿瘤体积 ↑:接种贴壁细胞部位;▲:接种细胞球部位

表1 SCID小鼠接种细胞后体内成瘤情况

接种细胞	成瘤时间	成瘤比例
PLC细胞球细胞		
1 × 10 <sup>4</sup>	7周	2/3
2 × 10 <sup>5</sup>	7周	3/3
PLC贴壁细胞		
1 × 10 <sup>4</sup>	12周	0/3
2 × 10 <sup>5</sup>	7周	1/3

2.4.2 病理学观察 细胞球与贴壁细胞所形成的肿瘤在形态学上无明显区别(图4)。



A:贴壁细胞;B:细胞球

图4 细胞接种于SCID小鼠形成的移植瘤组织的病理学观察(HE × 200)

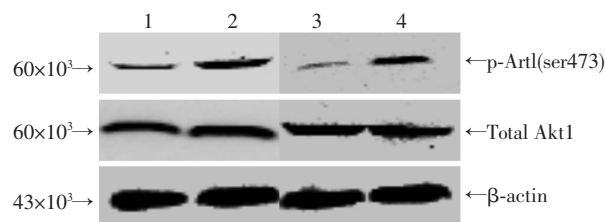
## 2.5 PLC细胞球对化疗药物阿霉素的耐药性及其机制

以5 μg/mL的阿霉素分别处理2组细胞48 h后,细胞球的增殖率为(71.83 ± 12.30)%,贴壁细胞的增殖率为(45.68 ± 5.95)%,处理72 h后,2组细胞的增殖率分别是(48.89 ± 10.74)%(19.88 ± 4.21)%,结果显示化疗药物阿霉素在48、72 h对细胞球的增殖抑制作用都弱于PLC细胞( $P < 0.05$ )。以阿霉素5 μg/mL分别处理细胞球和贴壁细胞48 h后,流式检测其凋亡率,细胞球为(11.73 ± 3.77)%,贴壁细胞为

(41.22 ± 6.73)%,两组细胞的凋亡率差异有显著性( $P < 0.01$ ),表明细胞球对阿霉素具有耐药性。再加入PI3K/Akt通路特异性抑制剂LY294002 25 μmol/L与阿霉素5 μg/mL共同孵育细胞球48 h后,凋亡率变为(35.44 ± 6.65)%,较细胞球中只加入阿霉素时显著升高( $P < 0.01$ ),说明细胞球的耐药性可能与PI3K/Akt信号通路有关。

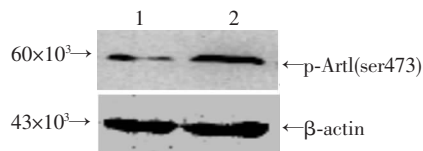
## 2.6 PLC细胞球的耐药性受PI3K/Akt通路调节

Western blot检测结果显示PLC细胞球、PLC贴壁细胞中p-Akt1(Ser473)蛋白的相对表达量分别为(0.013 ± 0.003)、(0.004 ± 0.001),细胞球中表达显著高于贴壁细胞( $P < 0.01$ ),见图5。在细胞球和贴壁细胞中分别加入阿霉素5 μg/mL后,p-Akt1(Ser473)蛋白的相对表达量分别为(0.036 ± 0.006)、(0.007 ± 0.003),细胞球中表达明显高于贴壁细胞( $P < 0.01$ ),见图6。在细胞球中加入抑制剂LY294002 10 μmol/L处理48 h后,p-Akt1(Ser473)相对表达量为(0.006 ± 0.001),较细胞球中未加入抑制剂时(0.013 ± 0.003)明显降低( $P < 0.05$ ),而Akt1在2组细胞中的相对表达量分别为(0.044 ± 0.006)、(0.045 ± 0.006),无明显变化( $P > 0.05$ ),见图5。以上结果表明细胞球的耐药与Akt信号通路第473位点磷酸化Akt1分子有关。



1:PLC贴壁细胞;2:PLC细胞球;3:加入抑制剂LY294002处理的细胞球;4:未加入抑制剂LY294002处理的细胞球

图5 Western blot检测2组细胞p-Akt1(Ser473)、Akt1蛋白表达



1:PLC贴壁细胞;2:PLC细胞球

图6 Western blot检测加入阿霉素5 μg/mL后2组细胞p-Akt1(Ser473)蛋白表达

## 3 讨论

随着对肝癌干细胞研究的深入,肝癌干细胞分选工作得到了长足的进步,主要有膜表面标志物(CD90、CD133、EpCAM等)流式或磁珠分选法<sup>[10,14-15]</sup>、侧群细胞(SP)筛选法<sup>[16]</sup>、悬浮球培养法<sup>[11]</sup>。CD133是常用的肿瘤干细胞标记物之一,但缺乏特异性和敏感性。例如,Suetsug等<sup>[10]</sup>研究结果显示CD133在肝癌细胞系HepG2、Huh7中的表达量分别为0.7%和46.79%,而另一些研究<sup>[15]</sup>报道CD133在这两种细胞系中的表达量分别为0.0%和2.7%。Yang等<sup>[14,17]</sup>以膜表面分子CD90为标记在肝癌细胞中分选得到的极少一部分



CD90<sup>+</sup>细胞具有干细胞特征,并且小鼠体内致瘤能力明显大于CD90<sup>-</sup>阴性细胞,因此,他们认为CD90是肝癌干细胞的特异性标记物。在本研究中,我们发现在贴壁细胞中加入化疗药物阿霉素后,肝癌干细胞标记物CD90在贴壁细胞中的表达较未加入阿霉素时显著升高,并且随着阿霉素浓度的增大而增高,这表明加入阿霉素后,CD90<sup>-</sup>阴性细胞会被阿霉素杀死,而CD90<sup>+</sup>阳性细胞不会被杀死,CD90<sup>+</sup>阳性细胞的表达量便相对增加,表明CD90<sup>+</sup>阳性细胞具有抗药性,符合肿瘤干细胞的特征,进一步验证了CD90作为肝癌干细胞标记物的可靠性。虽然Yang等认为肝癌干细胞标记物CD90的特异性较CD133高,但肝癌组织中至今仍未发现公认的癌干细胞特异性标记物,所以采用膜标记物分选肝癌干细胞仍存在较大争议<sup>[18]</sup>。而且肝癌干细胞在肝癌细胞中含量极少,采用标志物分选肝癌干细胞后,细胞在体外难以培养、扩增,不利于后续研究。SP细胞是一群能排出Hoechst33342染料的细胞,Chiba等<sup>[16]</sup>在肝癌细胞系中已分选出SP细胞,并证明这群细胞具有自我更新、多向分化能力及高致瘤性的肿瘤干细胞特性。但SP细胞的肿瘤干细胞特性是来自于细胞本身还是Hoechst染料的毒性作用导致SP细胞和非SP细胞生物学行为的不同仍存在疑问。球培养法现已广泛应用于肿瘤干细胞的富集研究,我们课题组在以往的乳腺癌干细胞研究<sup>[6]</sup>中,也曾采用此方法筛选、富集得到乳腺癌干细胞亚群。综合以上考虑,本研究选用球培养法分选肝癌干细胞样细胞。根据肿瘤干细胞特点,我们对形成的PLC细胞球(肝癌干细胞样细胞)进行了一系列研究:①本课题组在前期研究<sup>[19]</sup>中已经发现膜表面标志物CD90高表达于HepG2、Hep3B细胞球中,本研究得到CD90在PLC细胞球中的表达较贴壁细胞显著升高,说明细胞球可有效富集癌干细胞。②细胞球的集落形成能力明显高于贴壁细胞,表明细胞球具有较强的自我增殖能力。③化疗药物阿霉素处理细胞后,细胞球的增殖率明显高于贴壁细胞,凋亡率明显低于贴壁细胞,表明细胞球具有抗药性。④相同细胞数接种于SCID小鼠皮下7周后,细胞球的致瘤率明显大于贴壁细胞,证明细胞球具有较强的致瘤能力。由以上研究结果可知,球培养法所形成的细胞球具有肝癌干细胞的多种特性。细胞球在形成过程中只有干细胞样细胞可以克隆生长,而非干细胞逐渐死亡并且细胞球在体外可连续传代、扩增,故本研究采用球培养法能在体外有效富集、扩增肝癌干细胞亚群,方便应用于肝癌干细胞样细胞的后续研究。

Akt通过磷酸化多种作用底物,促进肿瘤细胞的生长、增殖,抑制凋亡,促进肿瘤细胞的侵袭和转移。

Ma等<sup>[20]</sup>在CD133阳性肝癌干细胞中发现,Akt通路的活化是该群细胞对化疗药物产生抗性的重要原因,然而肝癌干细胞标记物CD133在Ma等所使用的肝癌细胞系PLC中的表达量较高,高达60%,不符合肿瘤干细胞理论,即肿瘤细胞中仅存在一小部分肿瘤干细胞。Yang等<sup>[14,17]</sup>认为CD133是肝癌患者的循环内皮祖细胞的分子标志,CD133<sup>-</sup>细胞也能在免疫缺陷小鼠体内产生肿瘤,CD133并不能作为肝癌干细胞的特异性标记物。因此,Ma等<sup>[20]</sup>采用CD133阳性标志物分选所得肝癌干细胞来进行后续耐药机制的研究仍存在争议,他们之所以选取高表达CD133的PLC细胞株进行研究,是因为从低表达CD133的细胞株中分选出肝癌干细胞后不易继续培养下去并扩增,同时不易获得相同数量的CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞群,从而不便于后续研究。然而本研究采用悬浮球培养法能够有效富集、扩增肝癌干细胞亚群,正好弥补了Ma等<sup>[20]</sup>研究的缺陷和不足,所以,我们认为有必要继续探讨肝癌干细胞的耐药机制是否与PI3K/Akt通路有关。通过研究我们发现,经MTT法、FACS测定,PLC细胞球对化疗药物阿霉素的毒性敏感度较PLC贴壁细胞明显降低,具有耐药能力,而以阿霉素和PI3K/Akt通路抑制剂LY294002共同孵育细胞球后,其凋亡率较细胞球中只加入阿霉素时显著增加,说明细胞球的耐药性可能与PI3K/Akt信号通路有关,为此,我们下一步采用了Western blot实验验证。Western blot检测到PLC细胞球中的p-Akt1(Ser473)蛋白分子表达量显著高于PLC贴壁细胞,加入阿霉素后,p-Akt1(Ser473)蛋白在细胞球中的表达量仍明显高于贴壁细胞,进一步在细胞球中加入PI3K/Akt通路特异性抑制剂后,p-Akt1(Ser473)蛋白表达量明显下降,Akt1表达量却无明显变化,此结果进一步验证细胞球的耐药性受到PI3K/Akt通路的调节。上述结果表明富集肝癌干细胞的细胞球对化疗药物阿霉素具有耐药性,其耐药机制与Akt信号通路活化状态的第473位点磷酸化Akt1分子有关,而非活化状态的Akt1分子无关。综上所述,Akt作为PI3K/Akt生存通路的关键分子,其活化状态能对化疗药物产生抵抗,深入研究抑制该分子的靶向药物,可望有效治疗临床上难以攻破的肝细胞性肝癌。

#### 参考文献:

- [1] Visvader J E, Lindeman G J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(10): 755-768.
- [2] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284.
- [3] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. Nature,

- 1994, 367(6464): 645-648.
- [4] Singh S K, Hawkins C, Clarke I D, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [5] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828.
- [6] Liu J C, Deng T, Lehal R S, *et al.* Identification of tumorsphere- and tumor-initiating cells in HER2/Neu-induced mammary tumors [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8671-8681.
- [7] Velasco-Velazquez M A, Homsí N, De-La-Fuente M, *et al.* Breast cancer stem cells[J]. *Int J Biochem cell Biol*, 2012, 44(4): 573-577.
- [8] Kemper K, Grandela C, Medema J P. Molecular identification and targeting of colorectal cancer stem cells[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(6): 387-395.
- [9] Li Y F, Xiao B, Tu S F, *et al.* Cultivation and identification of colon cancer stem cell-derived spheres from the Colo205 cell line[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45(3): 197-204.
- [10] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al.* Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824.
- [11] Cao L, Zhou Y, Zhai B, *et al.* Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines[J]. *BMC Gastroenterol*, 2011(11): 71.
- [12] Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501.
- [13] Liu P, Cheng H, Roberts T M, *et al.* Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 627-644.
- [14] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, *et al.* Significance of CD90<sup>+</sup> cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [15] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, *et al.* Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)<sup>+</sup> cell population in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(10): 2145-2155.
- [16] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251.
- [17] Yang Z F, Ngai P, Ho D W, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928.
- [18] Salnikov A V, Kusumawidjaja G, Rausch V, *et al.* Cancer stem cell marker expression in hepatocellular carcinoma and liver metastases is not sufficient as single prognostic parameter[J]. *Cancer Lett*, 2009, 275(2): 185-193.
- [19] 贾茜, 高建, 张小丽, 等. HepG2、Hep3B 细胞中肿瘤干细胞相关标志分子的表达[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 852-856.
- [20] Ma S, Lee T K, Zheng B J, *et al.* CD133<sup>+</sup> HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway[J]. *Oncogene*, 2008, 27(12): 1749-1758.

(收稿:2012-09-10;修回:2012-10-23)

(编辑 王红)

## 2011年医科大学学报类期刊主要指标(按综合评价总分排名)

刊名	综合评价总分	综合排名	总被引频次	排名	影响因子	排名
第三军医大学学报	73.0	1	3 181	1	0.604	8
中山大学学报医学版	70.0	2	920	17	0.747	1
北京大学学报医学版	67.3	3	1 233	5	0.675	2
中国医学科学院学报	66.2	4	1 235	4	0.632	6
中南大学学报医学版	65.8	5	994	14	0.582	9
南方医科大学学报	65.1	6	2 181	2	0.381	19
首都医科大学学报	64.1	7	801	22	0.634	5
上海交通大学学报医学版	56.8	8	1 231	6	0.443	17
复旦学报医学版	56.5	9	856	19	0.471	15
四川大学学报医学版	56.1	10	1 178	7	0.487	12

——摘自《2012年版中国科技期刊引证报告(核心版)》