

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.06.008

· 基础研究 ·

HepG2 细胞系 CD133⁺ 细胞对多柔比星的抗性及其机制

王平凡¹, 张东生¹, 徐杨², 马艳红³ (1. 兰州市第二人民医院 病理科, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省医学科学院 医学生物技术研究中心, 甘肃 兰州 730002; 3. 渭源县中医院 检验科, 甘肃 渭源 748200)

[摘要] **目的:** 探讨 HepG2 中 CD133⁺ 细胞对多柔比星 (doxorubicin, DOX) 的抗性及其作用机制。 **方法:** 通过磁珠分选实验对 HepG2 细胞中 CD133⁺ 细胞进行分选, 流式细胞术检测 CD133⁺ 细胞阳性率, MTT 法检测 CD133⁺ 细胞对 DOX 诱导凋亡的抗性, 免疫荧光实验检测 DOX 处理各组细胞后 P65 激活转运情况, qRT-PCR 检测各组细胞乳腺癌耐药蛋白 (breast cancer resistance protein, BCRP) mRNA 表达水平; Western blotting 检测 CD133⁺ 细胞凋亡相关蛋白的表达。 **结果:** 磁珠分选可以高效地富集 HepG2 细胞中 CD133⁺ 细胞。与 CD133⁻ 细胞相比, CD133⁺ 细胞对 DOX 具有更强的抗性 ($P < 0.05$); 与 CD133⁻ 细胞、HepG2 细胞相比, CD133⁺ 细胞中 P65 激活速度与表达水平明显提高 (均 $P < 0.05$); CD133⁺ 细胞中 BCRP mRNA 表达水平明显高于 CD133⁻ 细胞和 HepG2 细胞 (均 $P < 0.05$); 与 HepG2、CD133⁻ 组相比, CD133⁺ 细胞组 Bax 和 p53 蛋白表达水平显著减少、Bcl-2 和 Survivin 蛋白表达量显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** HepG2 细胞中 CD133⁺ 细胞亚群对 DOX 高耐药性的分子机制在于高表达存活相关蛋白 NF- κ B、Bcl-2、Survivin 以及耐药性转运蛋白 BCRP, 而低表达促凋亡相关蛋白 p53、Bax。

[关键词] 肝癌; HepG2 细胞; CD133⁺ 细胞; 多柔比星; 抗性

[中图分类号] R735.7; R967 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)06-0595-06

Resistance of CD133⁺ cells in HepG2 cell line to doxorubicin and its mechanism

WANG Pingfan¹, ZHANG Dongsheng¹, XU Yang², MA Yanhong³ (1. Department of Pathology, the Second People's Hospital of Lanzhou City, Lanzhou 730000, Gansu, China; 2. Medical Biotechnology Research Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730002, Gansu, China; 3. Department of Laboratory examination, Weiyuan County Hospital, Weiyuan 748200, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the resistance of CD133⁺ cells in HepG2 cell line to doxorubicin (DOX) and its mechanism. **Methods:** CD133⁺ cells were sorted by magnetic beads and CD133⁺ positive rate was detected by flow cytometry. MTT assay was used to detect the resistance to DOX-induced apoptosis of CD133⁺ cells. The expression of BCRP transporter mRNA was detected by RT-PCR. The expression of apoptosis-related proteins was detected by Western blotting. Immunofluorescence assay was used to detect the activation and transportation of P65 after DOX treatment. **Results:** Magnetic beads sorting could efficiently sort the CD133⁺ cells from HepG2 cells. MTT proliferation assay showed that CD133⁺ cells had stronger resistance to DOX than CD133⁻ cells ($P < 0.05$). Immunofluorescence showed that the activation rate and content of P65 in CD133⁺ cells were significantly higher than those in CD133⁻ cells and HepG2 cells ($P < 0.05$). The results of RT-PCR showed that the mRNA content of BCRP in CD133⁺ cells was significantly increased compared with CD133⁻ cells and HepG2 cells (all $P < 0.05$). Compared with HepG2 and CD133⁻ groups, the expression of Bax and p53 in CD133⁺ cells was significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of Bcl-2 and Survivin protein in CD133⁺ cells was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The molecular mechanism of high DOX-resistance of the CD133⁺ cell subsets in HepG2 cells is the high expression of the survival-related proteins NF- κ B, Bcl-2, Survivin and the drug-resistance transporter BCRP, and low expression of apoptosis-promoting proteins p53 and Bax.

[Key words] hepatocellular carcinoma; HepG2 cell; CD133⁺ cell; doxorubicin (DOX); resistance

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(6): 595-600. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.008]

全世界每年有数百万人受到肝癌的影响^[1]。对于早期肝癌, 肝脏切除或移植是比较有效的方法, 但由于缺乏有效的诊断方法, 使大多数患者错过了最佳的治疗期, 加之肝癌细胞对传统放化疗的抗性, 使对中晚期肝癌的治疗没有有效的方法。肝癌抗药性的形成机制是寻找有效治疗手段的基础, 肿瘤干细胞理论认为肿瘤的发生发展归咎于肿瘤细胞内一小

部分具有干细胞特性的肿瘤细胞^[2-3]。到目前为止, 许多肿瘤当中都检测到肿瘤干细胞的存在。MA 等^[4]

[作者简介] 王平凡 (1981-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆系统肿瘤诊断的研究, E-mail: 15002659156@163.com

[通信作者] 张东生 (ZHANG Dongsheng, corresponding author), 学士, 主任医师, 主要从事肝胆系统肿瘤诊断的研究, E-mail: bing-li8365202@163.com

检测到肝癌具有等级分化的特点,它起始于一小部分表面具有 CD133⁺细胞标记物的干细胞群,这为肝癌较强的抗放化疗特性提供了一定的基础,但具体肝癌细胞系 CD133⁺细胞抗放化疗的分子机制和通路不甚明了。乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein,BCRP)是 ATP 结合盒转运蛋白超家族 G 亚族成员之一^[5]。实验^[6]表明,BCRP 在消化道肿瘤、生殖道肿瘤、肺癌、黑色素瘤及急性白血病等中有较高表达,BCRP 启动子区存在 κ B 位点,NF- κ B 通过与该位点结合可激活 BCRP 的表达。本实验通过检测 HepG2 细胞、CD133⁻细胞和 CD133⁺细胞中 BCRP 和 NF- κ B 相关分子的表达,为阐明 CD133⁺细胞抗化疗特性的分子机制提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系与主要试剂

人肝癌细胞系 HepG2 由中国科学院上海生物研究所提供。细胞培养基 H-DMEM 和 DMEM/F12(美国 PeproTech 公司),新生牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),PE-CD133 磁性微珠(Miltenyi 公司),0.25% 胰蛋白酶(Solarbio 公司),抗 Bax、Bcl-2、p53、Survivin 抗体均购自 Santa Cruz 公司,磁珠分选装备(Miltenyi 公司),MTT(Solarbio 公司),凋亡检测试剂盒(solarbio 公司),多柔比星(doxorubicin,DOX;阿拉丁生化科技股份有限公司)。FACScan 流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 细胞培养

用含有 10% FBS 的 H-DMEM 培养基将 HepG2 细胞培养于 37 °C 5%CO₂ 培养箱中,待其生长至对数期时,0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.3 免疫磁珠分选 CD133⁺细胞

取处于对数生长期细胞,弃去培养基,用分选缓冲液洗 3 遍,每遍 2 min,0.25% 胰蛋白酶消化,待细胞变圆后,弃去胰蛋白酶,用分选缓冲液吹打成单细胞悬液,以 2 000×g 离心 3 min,弃上清,分选缓冲液重选,锥虫蓝法计数,调整细胞密度为 1×10⁷/80 μ l,加入 10 μ l FCR 阻断剂,4 °C 孵育 15 min,再加入 CD133 磁性微珠 100 μ l,充分混匀,置于 4 °C 暗处避光孵育 30 min。加入 10 ~20 倍细胞体积的缓冲液洗涤,1 500×g 离心 5 min,去上清液,加入 500 μ l 的缓冲液缓冲重悬。将 MS 分选柱安装在磁性分选架上,加 0.5 ml 缓冲液后润洗分选柱将细胞移入 MS 分选柱中,并加入 4 倍体积的缓冲液,细胞悬液流出(此时为 CD133⁻细胞)。当液体停止流出时,将分选柱移出分选架,用配套的塞子快速地将剩余液体压入瓶中,此时得到 CD133⁺细胞。

1.4 流式细胞术检测 CD133⁺细胞阳性率

取分选后的 CD133⁺和 CD133⁻细胞,用 PBS 洗涤后,

将细胞收集于试管中,调整细胞密度至 1×10⁵/ml,将待测细胞用 1 500×g 离心 5 min,弃上清,用 4 °C 预冷乙醇固定并保存 30 min,PBS 洗涤 3 次。重悬于 PI 中,孵育后上机检测,用流式细胞仪检测细胞 CD133⁺的阳性率。

1.5 细胞成球实验检测 CD133⁺细胞的成球能力

将分选后所得 CD133⁻和 CD133⁺细胞分别 500/孔培养于无血清 DMEM/F12 培养基中,并添加 20 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF、0.4% BSA 和 2.0% B27,每隔 1 d 拍照采集图片,比较两者成球能力。

1.6 MTT 实验检测 CD133⁺细胞增殖率

将分选后的 CD133⁺和 CD133⁻细胞分别培养于 10%FBS 的 H-DMEM 中,使其贴壁,待其生长至对数期时,消化成单细胞悬液,以 5×10⁴/ml 接种于 96 孔板中,每孔 100 μ l。过夜贴壁后,分别加入 DOX,质量浓度梯度为 25、12.5、6.25、3.12、1.56、0 μ g/ml。加入 DOX 后培养 24 h,每孔加入 20 μ l MTT 培养 4 h,小心吸去培养液,加入 150 μ l DMSO 溶解 10 min,酶标仪 490 nm 处测量光密度(D)值,计算细胞存活率。增殖率(%)=(D_{实验组}/D_{空白组})×100%。

1.7 流式细胞术检测 CD133⁺细胞的凋亡情况

将分选所得 CD133⁺和 CD133⁻细胞分别接种于 6 孔板中,待其生长至对数生长期,加入不同质量浓度的 DOX 处理 24 h,收集细胞,调整待测细胞的密度为 5×10⁵个/ml。取 1 ml 细胞,4 °C 1 000×g 离心 10 min,弃上清。加入 1 ml 预冷的 PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,再次 4 °C 1 000×g 离心 10 min,弃上清。将细胞重悬于 200 μ l 结合缓冲液。加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min。加入 300 μ l 结合缓冲液,在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.8 免疫荧光检测 NF- κ B 定位情况

将经过 3.12 μ g/ml DOX 处理 24 h 的细胞采用固定液固定,洗涤液洗涤后,封闭液室温封闭 1 h,洗涤液洗涤,加入 NF- κ B p65 抗体 4 °C 孵育过夜。洗涤液洗涤,加入抗兔 Cy3,室温孵育 1 h,洗涤液洗涤,滴加适当量抗荧光封片液,封片显微镜下观察拍照。

1.9 qRT-PCR 检测 BCRP mRNA 的表达量

将各组细胞消化后,PBS 离心洗涤 3 次,收集细胞,使用 TRIzol 法,提取总 mRNA。逆转录 mRNA,使用 qRT-PCR 试剂盒以 5 °C、10 s(变性);60 °C、20 s(退火)和 72 °C、20 s(延伸)扩增 cDNA,循环数 40。BCRP mRNA 引物序列:上游为 5'-CTGAGATCCT-GAGCCTTT-3';下游为 5'-TGCCCATCACAACAT-CATCT-3'。采用 2^{- Δ ACT}法计算基因表达量。

1.10 Western blotting 检测 CD133⁺细胞凋亡相关蛋白的表达情况

将处于对数生长期的 CD133⁺和 CD133⁻细胞,加

入 1.5 μg/ml DOX, 37 °C、5% CO₂培养箱中处理 24 h, 弃上清, 加入 PBS 洗 3 次, 于冰上沥干 PBS, 加入 RI-PA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 待细胞大片脱落漂浮, 将细胞与裂解液收集于离心管中, 在冰上继续裂解 1 h 后, 13 000×g 离心 10 min, 收集上清, 加入 4×上样缓冲液, 煮沸 5 min, 上样电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 孵育一抗, 孵育二抗, ECL 试剂显色。

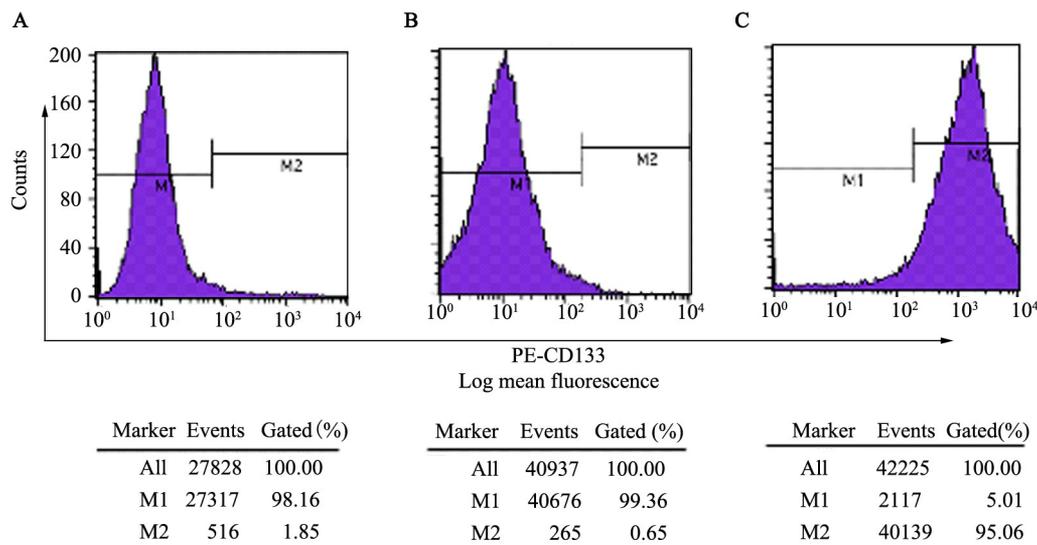
1.11 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 磁珠分选高效富集 HepG2 细胞中 CD133⁺ 细胞

以 CD133 作为干细胞标记物, 利用磁珠分选 HepG2 细胞系中 CD133⁺ 肝癌干细胞。流式细胞术检测结果 (图 1) 显示, 在未分选的 HepG2 细胞中, CD133⁺ 细胞约占 1.85%; 在分选后, 阴性细胞中 CD133⁺ 细胞约占 0.65%, 阳性细胞中 CD133⁺ 细胞约占 95.06%。表明利用磁珠分选可以高效地富集 HepG2 细胞中 CD133⁺ 细胞。



A: HepG2 cell; B: Expression of CD133⁺ cells in negative cells after separation;

C: Expression of CD133⁺ cells in positive cells after separation

图1 流式细胞仪检测磁珠分选后 CD133⁺ 细胞阳性表达率

Fig.1 The positive expression rate of CD133⁺ cells after magnetic beads sorting detected by flow cytometry

2.2 CD133⁺ 细胞成球能力明显提高

细胞成球实验结果 (图 2) 显示, 随着时间的延长, CD133⁻ 细胞并未成球, 而 CD133⁺ 细胞几乎都能成球。

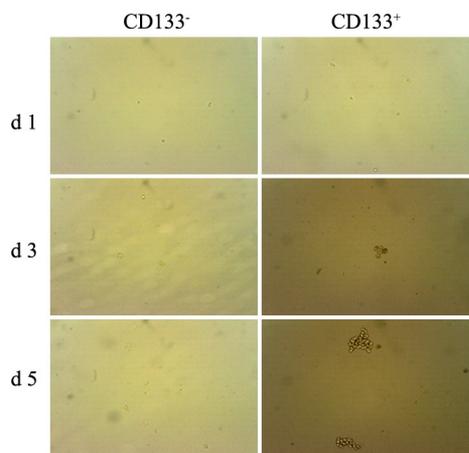


图2 CD133⁻和CD133⁺细胞成球能力比较

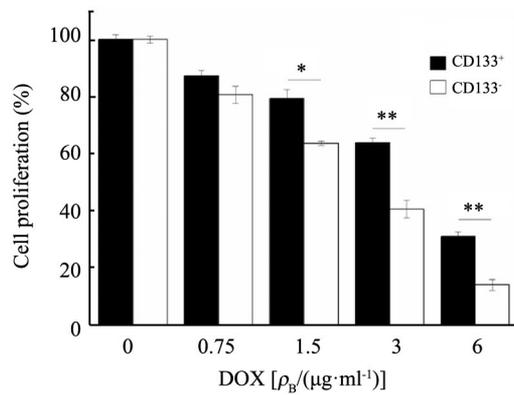
Fig.2 Comparison of the ball-forming ability of CD133⁻ and CD133⁺ cells

2.3 DOX 处理可提高 CD133⁺ 细胞增殖率

DOX 对 CD133⁺ 细胞和 CD133⁻ 具有细胞毒性作用, MTT 实验检测结果 (图 3) 显示, CD133⁺ 细胞和 CD133⁻ 细胞的增殖率随着 DOX 质量浓度的升高而升高, 其 IC₅₀ 分别为 3.83 μg/ml 和 2.05 μg/ml。在相同质量浓度的 DOX 下, CD133⁺ 细胞的增殖率高于 CD133⁻, 尤其是 DOX 高于 1.5 μg/ml 时, CD133⁺ 细胞增殖率明显高于 CD133⁻ 细胞 (*P* < 0.05)。

2.4 DOX 处理显著增高 CD133⁻ 细胞凋亡率

用 DOX 分别处理 CD133⁻ 和 CD133⁺ 细胞后, 流式细胞仪检测结果 (图 4) 显示, 随着质量浓度的增加, DOX 引起 CD133⁻ 细胞凋亡率显著增高 (*P* < 0.01), 而 CD133⁺ 细胞凋亡率升高较缓慢。DOX 为 0.75 μg/ml 和 1.5 μg/ml, CD133⁻ 和 CD133⁺ 细胞所对应的凋亡率分别为 (17.8 ± 1.4)%、(9.7 ± 0.8)% 和 (22.9 ± 1.5)%、(12.3 ± 1.1)%。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CD133⁻ group

图3 DOX对CD133⁺和CD133⁻细胞增殖的影响

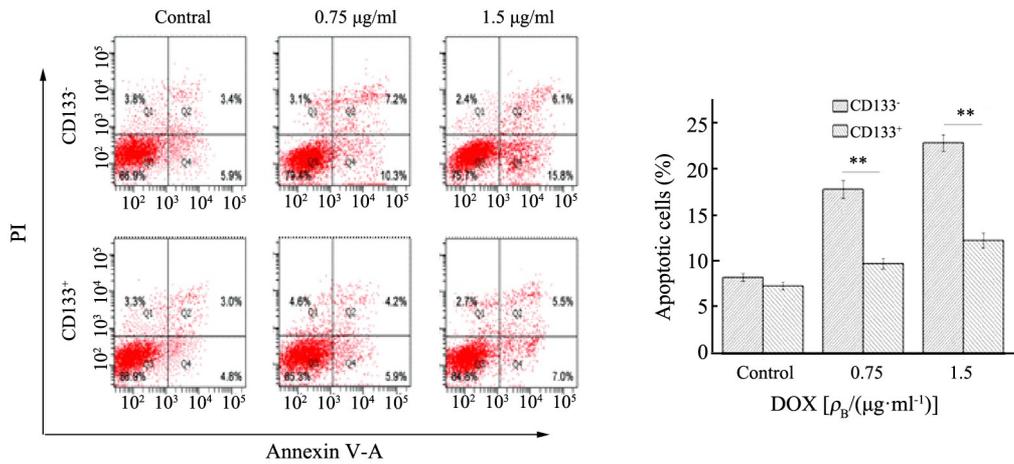
Fig. 3 Effect of DOX on proliferation of CD133⁺ and CD133⁻ cells

2.5 DOX处理可激活P65在CD133⁺细胞核中的转运

用DOX分别处理HepG2、CD133⁻和CD133⁺细胞后,P65核转运免疫荧光实验结果(图5)显示,随着处理时间的增长,DOX引起3组细胞P65从细胞质进入细胞核,但是所需时间与进入量不同。其中CD133⁺细胞中P65进入细胞核所需时间最短,进入量最多,在30 min时,大量P65进入细胞核,而HepG2和CD133⁻细胞在30 min时,只有少量进入细胞核;DOX处理60 min时3组细胞P65进入量几乎达到一致。

2.6 DOX处理可提高CD133⁺细胞BCRP mRNA表达水平

RT-PCR检测结果(图4)显示,与HepG2比较,CD133⁻细胞BCRP mRNA显著降低,CD133⁺细胞BCRP mRNA含量显著升高($P < 0.01$);与CD133⁻细胞比较,CD133⁺细胞BCRP mRNA含量显著升高($P < 0.01$)。



** $P < 0.01$ vs CD133⁺ group

图4 DOX对CD133⁺和CD133⁻细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of DOX on apoptosis of CD133⁺ and CD133⁻ cells

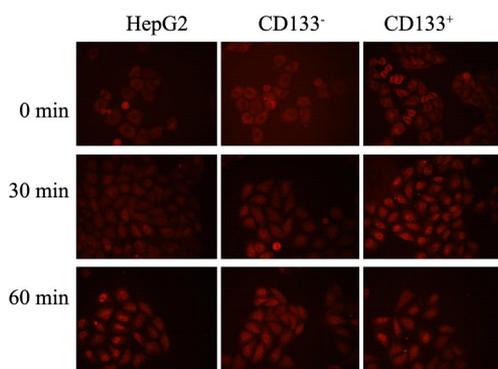
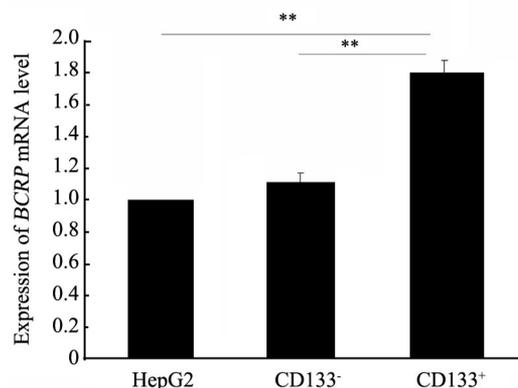


图5 DOX对各组细胞中P65激活转运的影响($\times 400$)

Fig. 5 Effect of DOX on P65 activation and transportation in each group($\times 400$)



** $P < 0.01$ vs CD133⁻ or HepG2 group

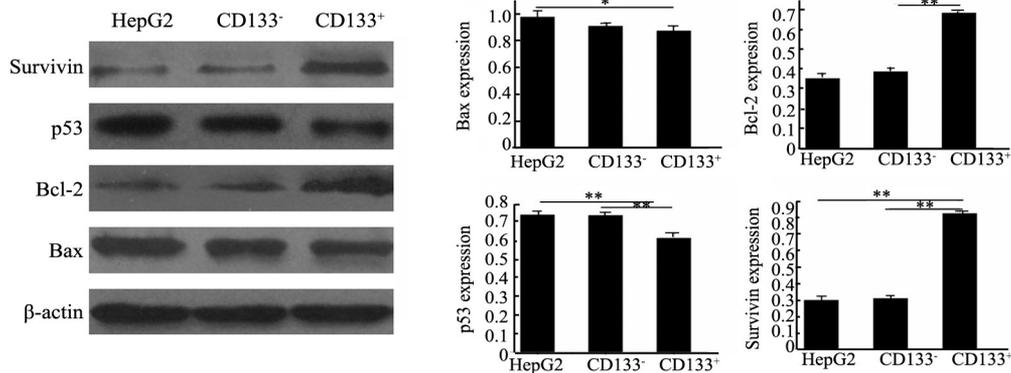
图6 各组细胞中BCRP mRNA表达水平

Fig. 6 Expression of BCRP mRNA in the cells of each group

2.7 DOX处理明显影响CD133⁺细胞相关蛋白的表达

Western blotting结果(图7)显示,与HepG2组相比,CD133⁺细胞组Bax和p53蛋白表达水平显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与CD133⁻细胞和HepG2细胞相

比,Bcl-2和Survivin蛋白在CD133⁺细胞中的表达量都明显增加($P<0.01$);但上述4种蛋白在CD133⁻细胞和HepG2细胞的表达量无明显变化。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CD133⁺ group

图7 DOX处理对CD133⁺细胞相关蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of DOX treatment on relevant protein expressions in CD133⁺ cells

3 讨论

传统的放化疗手段是诱导肿瘤细胞凋亡,但无法根除肿瘤,容易复发。肿瘤干细胞具有无限增殖、低分化、低代谢和不对称分裂的能力^[7]。它是肿瘤发生发展的实际推动者,赋予肿瘤复发转移和抗药性能力^[6]。CD133是肿瘤干细胞的一个分子标记物。在肝癌细胞中,CD133是研究最多的肿瘤干细胞标记物之一。在人白血病、脑肿瘤、前列腺癌和喉部肿瘤中,也鉴定出具有CD133标记物的肿瘤干细胞。在肝脏中,与CD133⁻细胞相比,CD133⁺细胞具有较高的增殖能力、克隆形成能力、体内诱导肿瘤形成的能力和对放化疗的抵抗能力^[9-11]。目前放化疗的目的主要集中于诱导癌细胞凋亡,抗凋亡是癌细胞抵抗放化疗的主要手段。

本研究选用肝癌细胞系HepG2细胞作为研究对象,以CD133作为肝癌干细胞分子标记物分选CD133⁺细胞。磁珠分选后流式检测结果显示,在HepG2细胞系中有一小部分细胞表达CD133分子标记物,标记为CD133⁺细胞,其余标记为CD133⁻细胞;细胞成球实验结果显示相较于CD133⁻细胞,富集的CD133⁺细胞具有更强的成球能力,因此CD133⁺细胞具有干细胞特性。接着用DOX分别处理CD133⁻和CD133⁺细胞,结果显示,在相同质量浓度下,CD133⁺细胞比CD133⁻细胞具有更高的存活率,说明与CD133⁻细胞相比,CD133⁺细胞对DOX的毒性作用具有更高的抗性。为进一步说明CD133⁺细胞比CD133⁻细胞对DOX引起的细胞凋亡具有更强的抗

性,流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,CD133⁺细胞比CD133⁻细胞对DOX引起的细胞凋亡具有更高的抗性。

为探索CD133⁺细胞抗凋亡分子机制,本研究通过免疫荧光技术检测经过DOX处理的各组细胞中P65的激活转运情况;利用Western blotting实验检测各组细胞中Bax、Bcl-2、p53和Survivin的表达。研究发现,NF- κ B高表达肿瘤细胞对抗肿瘤药物及电离射线有较高的耐受性,而抑制NF- κ B活性可明显增加肿瘤细胞的治疗敏感性,诱导细胞凋亡^[12]。本实验免疫荧光结果显示,在HepG2细胞系中,并非所有细胞亚群都高表达NF- κ B,与HepG2细胞、CD133⁻细胞相比,CD133⁺细胞中NF- κ B表达量显著升高,并且经过DOX处理后,CD133⁺细胞P65较其他两组细胞可更快的激活并进入细胞核参与细胞的抗凋亡作用。在肿瘤细胞中由于NF- κ B的活化可以激活含有 κ B位点的Bcl-2及Bcl-XL编码基因的转录表达,而对无 κ B位点的Bax和Bad基因则无此作用,使得Bax/Bcl-2的比值失衡,从而增强肿瘤细胞的抗凋亡性。有证据^[13]表明,NF- κ B和p53存在转录对抗性,抑癌基因p53表达产物可介导一些存在致肿瘤性染色体重组或其他DNA损伤的细胞在通过凋亡检测点时被诱导凋亡,而当NF- κ B蛋白高表达拮抗p53介导的凋亡通路时,存在基因变异的细胞逃避凋亡而在机体内扩增转代,导致肿瘤的发生。此外,Bax的启动子中含有p53的结合位点,所以p53能够促进Bax的表达,从而导致Bax/Bcl-2比值升高而使细胞凋亡^[14]。Western blotting实验结果显示,与CD133⁻细胞、HepG2细胞相

比, CD133⁺细胞中 Bax、p53 表达明显降低, Bcl-2 表达明显升高。综上所述, 由于 CD133⁺细胞中 NF- κ B 的高表达, 一方面可能直接诱导 Bcl-2 表达量升高, 增加细胞存活率; 另一方面可能通过拮抗 p53 作用, 降低 Bax 含量, 使 CD133⁺细胞逃避凋亡, 具体机制需要进一步研究。Survivin 是细胞凋亡抑制蛋白家族中的一员, 研究^[15]发现, 在大部分人肿瘤组织中却过表达, 提示 Survivin 在肿瘤发生发展过程中起调控作用。在肿瘤的发展过程中, Survivin 的过表达和野生型 p53 表达沉默是常见的两类突变, 提示 Survivin 和 p53 具有功能上的联系^[16]。研究^[17]发现, 野生型 p53 可以介导 Survivin 表达的抑制。在某种程度上, Survivin 的缺失介导 p53 依赖的凋亡途径^[18]。WANG 等^[19]发现, Survivin 通过 caspase-3/Mdm2 通路调控 p53 的表达和降解。Western blotting 实验结果显示与 CD133⁺细胞、HepG2 细胞相比, CD133⁺细胞中 p53 表达明显降低, 而 Survivin 表达明显升高, 从而导致 CD133⁺细胞较其他 2 组细胞有更高的存活率。在本实验中, qRT-PCR 检测结果显示, 与 HepG2、CD133⁻细胞比较, CD133⁺细胞 BCRP mRNA 显著升高, 提示 CD133⁺中 NF- κ B 表达升高导致 BCRP 的表达升高, 赋予 CD133⁺具有更高的耐药性和增值率。

综上所述, 在 HepG2 细胞中, 并非所有细胞都有高耐药性和存活率。本实验研究显示, 在 HepG2 细胞中存在一小群 CD133⁺细胞亚群, 具有干细胞特性, 其具有较高的耐药性和存活率。其原因在于与 HepG2 细胞、CD133⁻细胞相比, CD133⁺细胞中 NF- κ B、Bcl-2 和 Survivin 表达量显著升高, p53、Bax 含量显著降低, 最终导致 CD133⁺细胞抗凋亡能力增加、增殖率升高。此外, CD133⁺中 BCRP 的表达升高, 赋予 CD133⁺具有更高的耐药性和存活率。

[参考文献]

- [1] THORGEIRSSON S S, GRISHAM J W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2002, 31(4): 339-346. DOI:10.1038/ng0802-339.
- [2] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111. DOI: 10.1038/35102167.
- [3] PARDAL R, CLARKE M F, MORRISON S J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(12): 895-902. DOI:10.1038/nrc1232.
- [4] MA S, LEE T K, ZHENG B J, 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. DOI:10.1038/sj.onc.1210811.
- [5] KRISHNAMURTHY P, SCHUETZ J D. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine[J]. Annu Rev Pharmacol, 2006, 46(46): 381-386. DOI:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141238
- [6] NATARAJAN K, XIE Y, BAER M R, et al. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(8):1084-1103. DOI:10.1016/j.bcp. 2012. 01.002.
- [7] MACKILLOP W J, CIAMPI A, TILL J E, et al. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays [J]. J Natl Cancer Inst, 1983, 70(1): 9-16. DOI:10.1016/s0022-5347 (17)51493-7.
- [8] SCHULENBURG A, BLATT K, CERNY-REITERER S, et al. Cancer stem cells in basic science and in translational oncology: can we translate into clinical application[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8(1): 16-24. DOI:10.1186/s13045-015-0113-9.
- [9] MA S, CHAN K W, HU L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2542-2556. DOI:10.1053/j.gastro.2007.04.025.
- [10] SUETSUGU A, NAGAKI M, AOKI H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.10.128.
- [11] YIN S, LI J, HU C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity[J]. Int J Cancer, 2007, 120(7): 1444-1450. DOI:10.1002/ijc.22476.
- [12] WANG C Y, CUSACKJC J R, LIU R, et al. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 412-417. DOI:10.1038/7410.
- [13] WEBSTER G A, PERKINS N D. Transcriptional cross talk between NF-kappa B and p53 [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(5): 3485-3495.
- [14] HAUPT S, BERGER M, GOLDBERG Z, et al. Apoptosis the p53 network[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 20): 4077-4085. DOI: 10. 1038/nrc4077.
- [15] GARG H, SURI P, GUPTA J C, et al. Survivin: a unique target for tumor therapy[J]. Cancer Cell Int, 2016, 16(49):326-331. DOI: 10. 1186/s12935-016-0326-1.
- [16] TRÖGER A, SIEPERMANN M, MAHOTKA C, et al. Role of survivin splice variants in pediatric acute precursor B lymphoblastic leukemia[J]. Klin Padiatr, 2007, 219(3): 127-133. DOI:10.1055/s-2007-973850.
- [17] HOFFMAN W H, BIADÉ S, ZILFOU J T, et al. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3247-3257. DOI:10.1074/jbc.M106643200.
- [18] MIRZA A, MCGUIRK M, HOCKENBERRY T N, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622. DOI:10.1038/sj.onc.1205353.
- [19] WANG Z, FUKUDA S, PELUS L M. Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family[J]. Oncogene, 2004, 23(49): 8146-8153. DOI:10.1038/sj.onc.1207992.

[收稿日期] 2018-02-26

[修回日期] 2018-04-19

[本文编辑] 王映红