

网络出版时间: 2023-05-30 17:22:18 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230529.1632.006.html>

AMD3100 下调 CA9 与 CXCR4 表达逆转索拉菲尼耐药

秦骥伟, 郑浩, 徐治军, 栗雪峰, 孙成

摘要 目的 研究 AMD3100 通过调控碳酸酐酶 IX (CA9) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 逆转人肝癌细胞对索拉菲尼的耐药性机制。方法 以人肝癌细胞 Huh7 和 HepG2 为研究对象, 建立索拉菲尼耐药株 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor; 检测索拉菲尼单独或联合使用 AMD3100 对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、HepG2/Sor 细胞增殖的影响; 观察索拉菲尼耐药细胞与非耐药细胞侵袭能力的区别, AMD3100 对肝癌细胞侵袭能力的影响; 索拉菲尼单独或联合使用 AMD3100 对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达的调控作用。结果 与对照组比较, AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) 可提高索拉菲尼对 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的增殖抑制作用 ($P < 0.05$); 与 Huh7 细胞比较, 索拉菲尼耐药株 Huh7/Sor 细胞的侵袭能力增强 ($P < 0.05$), AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) 可降低 Huh7 和 Huh7/Sor 细胞的侵袭能力 ($P < 0.05$); 与 Huh7 和 HepG2 细胞比较, Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达增加 ($P < 0.05$), AMD3100

(50 $\mu\text{mol/L}$) 可下调 Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的 CA9 和 CXCR4 蛋白表达 ($P < 0.05$)。结论 AMD3100 可能通过下调 CA9、CXCR4 表达降低人肝癌细胞对索拉菲尼耐药性, 增强索拉菲尼对人肝癌细胞的增殖和侵袭抑制。

关键词 肝细胞癌; AMD3100; 碳酸酐酶 IX; 趋化因子受体 4; 索拉菲尼; 耐药

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)06-0919-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.007

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球致死率第 4 的恶性肿瘤, 也是全球第 6 大常见癌症^[1]。手术切除是早期 HCC 的标准治疗方法, 但超过 80% 的 HCC 患者被诊断时已无法进行根治性手术。索拉菲尼作为晚期 HCC 的一线药物作用于多个靶点, 可显著延长晚期 HCC 患者的生存时间^[2-3]。然而, 索拉菲尼的获得性耐药限制了其临床疗效。

碳酸酐酶 IX (carbonic anhydrase IX, CA9) 是一种膜相关锌金属酶, 可使肿瘤细胞在低氧酸性微环

2023-03-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085J35)

作者单位: 中国科学技术大学附属第一医院器官移植中心, 合肥 230001

作者简介: 秦骥伟, 男, 医师, 责任作者, E-mail: jiweiqin1120@hotmail.com

and braking position for 6 weeks to create a KOA model, and electroacupuncture was given to the electroacupuncture group 1 week after completion of the modeling for 4 weeks, five times a week for 20 min each time. The functional score of the left knee joint of rabbits was evaluated by Lequesne's functional algorithm index; serum and joint fluid interleukin (IL)-1 β and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay; serum and joint fluid nitric oxide (NO) levels were measured by Griess; morphological changes in knee cartilage were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the degree of cartilage degeneration was evaluated by Mankin's scale; p-P38MAPK positive cell expression in knee cartilage was observed by immunofluorescence technique. **Results** Compared with the blank control group, the Lequesne score increased in the model control group ($P < 0.05$); the levels of IL-1 β , IL-6, and NO in serum and joint fluid increased ($P < 0.05$); the cartilage surface was less smooth and the Mankin score increased ($P < 0.05$); and the immunofluorescence staining positive cells increased ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the Lequesne score was reduced in the electroacupuncture group ($P < 0.05$); the levels of IL-1 β , IL-6, and NO in serum and joint fluid were reduced ($P < 0.05$); the cartilage surface was smoother, and the Mankin score was reduced ($P < 0.05$); and the immunofluorescence staining positive cells were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture can effectively improve knee joint behavior in rabbit KOA model, and the mechanism may be to delay the onset of KOA by decreasing the expression level of inflammatory factors and affecting the expression of MAPK signaling pathway.

Key words osteoarthritis of the knee; electroacupuncture; articular cartilage

境中存活^[4-6],并在多种恶性肿瘤中表达上升。低氧微环境使肿瘤细胞生存能力和侵袭性增强,更易远处转移及产生耐药性^[5,7]。趋化因子受体 4(CXC chemokine receptor Type 4, CXCR4)是一种参与血管生成和肿瘤侵袭的趋化因子受体,研究表明其在 HCC、乳腺癌等多种肿瘤类型中表达,并在其转移扩散中发挥重要作用^[8-12]。AMD3100 是 CXCR4 的特异性拮抗剂,既往研究^[10,13]表明 AMD3100 可抑制多种肿瘤的转移和增殖,增加肿瘤对化疗和放疗的敏感性。因此,该研究通过分析 CA9 和 CXCR4 在 HCC 中的表达,以 AMD3100 作为研究对象,研究其对索拉菲尼耐药 HCC 细胞的增殖、侵袭和耐药性影响,对探讨 HCC 恶性倾向以及 HCC 的索拉菲尼耐药机制具有重要的科研和临床价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人源 HCC Huh7、HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药物与试剂 AMD3100 购自美国 Selleck Chemicals 公司;索拉菲尼购自美国 Selleck Chemicals 公司;CCK-8 购自日本 Dojindo 公司; β -actin 购自德国 Sigma 公司;胎牛血清、青-链霉素双抗、2.5% 胰酶购自美国 Gibco 公司;PBS 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;SDS-PAGE 上样缓冲液购自上海碧云天生物技术有限公司;CXCR4 购自美国 Santa Cruz 公司;CA9 购自美国 Gene Tex 公司;transwell 小室购自美国 Corning 公司;MitroGel 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Huh7 和 HepG2 细胞培养在含有 10% 胎牛血清以及 1% 青-链霉素双抗的培养液中,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 HCC 索拉菲尼耐药细胞的建立 采用浓度梯度递增法构建 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 耐药细胞株,以浓度为 5 μ mol/L 的索拉菲尼作为起始浓度进行诱导,逐步进行浓度爬坡,每次爬坡浓度约提高 1.5 倍,每 14 d 爬坡 1 次,最终得到稳定耐受浓度为 15 μ mol/L 的索拉菲尼的 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 耐药细胞株。Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞株培养在含有 10 μ mol/L 索拉菲尼的培养液以维持其耐药性。实验前 5~6 d 将 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞恢复至正常培养液中培养。

1.2.3 CCK-8 法检测 AMD3100 和索拉菲尼对

HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞增殖毒性作用的影响 课题组预实验表明不同浓度 AMD3100 处理后降低 Huh7/Sor 细胞对索拉菲尼的耐药性,50 μ mol/L 组和 100 μ mol/L 组效果最明显且两组间差异无统计学意义,本研究后续实验均采用 50 μ mol/L AMD3100,见表 1。取对数生长期 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、HepG2/Sor 细胞以及以 50 μ mol/L 的 AMD3100 预处理 90 min 的 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞接种于 96 孔板内,每孔加 100 μ l 培养基,细胞密度为 5×10^4 个/ml。待细胞融合到 80%,以梯度稀释的方法分别加入由完全培养基配制的 2.5、5.0、10.0、20.0、30.0 μ mol/L 的索拉菲尼。Control 组加等量培养液,各组均设 3 个复孔,另设调零孔(培养液)。将 96 孔板置入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 48 h,弃去各孔内液体,每孔加入 100 μ l 含 10% CCK-8 的培养液,置于培养箱内孵育 4 h。用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长下的吸光值(A),细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{平均Control组}}) / (A_{\text{平均对照组}} - A_{\text{平均Control组}}) \times 100\%$,计算出索拉菲尼对 4 种细胞生存率的影响及相应的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

1.2.4 Transwell 小室法检测 AMD3100 对 HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞的侵袭能力的影响 Matrigel 基质胶冰面上液体化后,与 DMEM 培养基按 1:3 稀释后在膜下室侧涂抹。将铺基质胶的小室置于 37 °C 孵育箱 30 min 使基质胶凝固。胰酶消化下处理过的 Huh7、Huh7/Sor 细胞制成单细胞悬液,细胞密度用无血清 DMEM 培养基调至约 2.5×10^4 个/ml,下室加 600 μ l 无血清 DMEM 培养基,吸取 200 μ l 细胞悬液均匀加入上室。分为 Huh7、Huh7/Sor 和上室含有 50 μ mol/L 的 AMD3100 的 Huh7、Huh7/Sor 共 4 组。12 h 后,取出小室 PBS 洗涤,4% 多聚甲醛溶液固定 30 min。将小室置于 0.1% 结晶紫甲醇溶液中染色 10 min,光学显微镜下计数每孔 5 个高倍视野下穿过基底膜的细胞数目并拍照。

1.2.5 Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞 CA9 及 CXCR4 蛋白表达水平的影响 将 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、HepG2/Sor 细胞分为 0 μ mol/L 组和 5 μ mol/L 索拉菲尼处理组,以 5×10^4 个/ml 密度接种至 6 孔板,每孔 2 ml。细胞融合至 70% 时,分别换成无血清培养基和含 5 μ mol/L 索拉菲尼的无血清培养基,实验组加入 AMD3100 (终质量浓度为 50 μ mol/L) 处理 90 min。用 RIPA 缓冲液分别溶解各组细胞,BCA 法检测蛋

白质浓度。每孔加样 25 g 相应总蛋白质进行蛋白 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上。50 g/L 脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗 CXCR4 (1 : 1 000)、CA9 (1 : 1 000) 置于 4 ℃ 冰箱过夜。TPBS 清洗膜后加入二抗 37 ℃ 摇床放置 2 h。用 DNR 生物成像系统进行发光、测试、照相,使用 Image J 软件图像分析,计算出各组细胞中 CA9 和 CXCR4 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计图绘制。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMD3100 和索拉菲尼对 HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞的增殖毒性作用的影响 结果显示, Huh7/Sor 组在 2.5、5.0、10.0、20.0 和 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉菲尼浓度下的增殖效率高于 Huh7/Sor + AMD3100 组和 Huh7 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HepG2/Sor 组在 2.5、5.0、10.0、20.0 和 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉菲尼浓度下的增殖效率高于 HepG2/Sor + AMD3100 组和 HepG2 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。应用 Probit 回归分析估算出索拉菲尼对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、HepG2/Sor 的 IC_{50} 值。索拉菲尼对 Huh7、HepG2、Huh7/Sor、

HepG2/Sor 的 IC_{50} 值分别为 6.40、6.95、11.51、11.70 $\mu\text{mol/L}$ 。根据耐药指数 (resistance index, RI) = $\text{IC}_{50}(\text{耐药细胞}) / \text{IC}_{50}(\text{亲本细胞})$ 计算得出 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞对索拉菲尼的 RI 分别为 1.80 和 1.68。AMD3100 可以增加 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞对索拉菲尼的敏感性,提高索拉菲尼对 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的抑制作用,降低 IC_{50} 值。AMD3100 处理后, Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞对索拉菲尼的 IC_{50} 值分别从 11.51 和 11.70 $\mu\text{mol/L}$ 降至 9.01 和 10.36 $\mu\text{mol/L}$, RI 也分别从 1.80 和 1.68 降至 1.41 和 1.49。见表 2。

2.2 Transwell 小室法检测 HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞的侵袭能力 结果显示, 12 h 后 Huh7/Sor + AMD3100 组迁移细胞数 (196.45 ± 29.94) 较 Huh7/Sor 组 (292.15 ± 60.80) 减少,差异有统计学意义 ($t = -5.003, P < 0.05$)。Huh7 + AMD3100 组迁移细胞数 [183.24 ± 65.81 个]较 Huh7 组 [238.83 ± 50.36 个]减少,差异有统计学意义 ($t = -2.458, P < 0.05$)。Huh7 组迁移细胞数 [238.83 ± 50.36 个]少于 Huh7/Sor 组 [292.15 ± 60.80 个],差异有统计学意义 ($t = -2.376, P < 0.05$)。这表明 Huh7/Sor 细胞拥有比 Huh7 细胞更强的侵袭能力,而 AMD3100 处理后可以降低 Huh7 细胞和 Huh7/Sor 细胞的侵袭能力。见图 1。

2.3 Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞

表 1 不同浓度 AMD3100 对 HCC 索拉菲尼耐药细胞的增殖毒性作用的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

索拉菲尼浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞存活率 (%)			
	Control 组	1 $\mu\text{mol/L}$ AMD3100 组	50 $\mu\text{mol/L}$ AMD3100 组	100 $\mu\text{mol/L}$ AMD3100 组
2.5	95.31 $\pm$ 0.65	92.83 $\pm$ 1.00 ^{**}	89.31 $\pm$ 0.63 ^{##}	88.47 $\pm$ 0.54 ^{##}
5.0	84.99 $\pm$ 1.63	80.23 $\pm$ 0.98 ^{**}	72.50 $\pm$ 1.61 ^{##}	72.10 $\pm$ 1.00 ^{##}
10.0	61.49 $\pm$ 1.06	52.77 $\pm$ 1.62 ^{**}	44.65 $\pm$ 1.62 ^{##}	43.54 $\pm$ 1.53 ^{##}
20.0	23.66 $\pm$ 0.99	20.59 $\pm$ 0.82 ^{**}	19.68 $\pm$ 0.29 [#]	18.84 $\pm$ 0.35 ^{##}
30.0	15.71 $\pm$ 0.71	13.57 $\pm$ 1.11 [*]	12.38 $\pm$ 0.44	12.20 $\pm$ 1.59 [#]

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 1 $\mu\text{mol/L}$ AMD3100 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 2 AMD3100 和索拉菲尼对 HCC 细胞及 HCC 索拉菲尼耐药细胞的增殖毒性作用的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率 (%)					IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	RI
	索拉菲尼 2.5 $\mu\text{mol/L}$	索拉菲尼 5.0 $\mu\text{mol/L}$	索拉菲尼 10.0 $\mu\text{mol/L}$	索拉菲尼 20.0 $\mu\text{mol/L}$	索拉菲尼 30.0 $\mu\text{mol/L}$		
Huh7	85.44 $\pm$ 0.98	56.28 $\pm$ 1.85	23.21 $\pm$ 0.47	16.06 $\pm$ 0.33	9.63 $\pm$ 1.29	6.40	
Huh7/Sor + AMD3100	89.93 $\pm$ 1.05 ^{**}	74.33 $\pm$ 1.08 ^{**}	44.09 $\pm$ 1.00 ^{**}	19.83 $\pm$ 0.39 ^{**}	12.19 $\pm$ 0.29 ^{**}	9.01	1.41
Huh7/Sor	96.21 $\pm$ 0.75 ^{##}	83.67 $\pm$ 1.57 ^{##}	60.12 $\pm$ 1.54 ^{##}	22.33 $\pm$ 0.53 ^{##}	13.78 $\pm$ 0.74 [#]	11.51	1.80
HepG2	83.42 $\pm$ 1.53	66.24 $\pm$ 1.56	27.71 $\pm$ 1.70	17.01 $\pm$ 0.53	10.35 $\pm$ 0.72	6.95	
HepG2/Sor + AMD3100	92.92 $\pm$ 1.17 ^{**}	84.93 $\pm$ 1.09 ^{**}	54.03 $\pm$ 1.21 ^{**}	19.08 $\pm$ 0.68 ^{**}	11.52 $\pm$ 0.49 [*]	10.36	1.49
HepG2/Sor	96.51 $\pm$ 0.38 ^{##}	89.15 $\pm$ 0.52 ^{##}	58.31 $\pm$ 1.50 ^{##}	21.84 $\pm$ 0.89 ^{##}	12.68 $\pm$ 0.79 [#]	11.70	1.68

与对应非耐药细胞组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对应耐药细胞 + AMD3100 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

及 HCC 索拉菲尼耐药细胞 CA9 及 CXCR4 蛋白表达水平的影响 ① 在各细胞组中,AMD3100 处理组细胞的 CA9 蛋白表达水平均低于 Control 组 ($P < 0.05$); 0 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼处理条件下,Huh7 组和 HepG2 组细胞的 CA9 蛋白表达水平均低于 Huh7/Sor 组细胞和 HepG2/Sor 组细胞 ($t = -8.086$ $P < 0.01$; $t = -8.086$ $P < 0.01$); 5 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼处理条件下,Huh7 组细胞和 HepG2 组细胞的 CA9 蛋白表达水平均低于 Huh7/Sor 组细胞和 HepG2/Sor 组细胞 ($t = -2.570$ $P < 0.05$; $t =$

-3.679 $P < 0.05$)。见图 2。② 在各细胞组中,AMD3100 处理组细胞的 CXCR4 蛋白表达水平均低于 Control 组 ($P < 0.05$); 0 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼处理条件下,Huh7 组细胞的 CXCR4 蛋白表达水平低于 Huh7/Sor 组细胞 ($t = -8.855$ $P < 0.01$); 5 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼处理条件下,Huh7 组细胞和 HepG2 组细胞的 CXCR4 蛋白表达水平均低于 Huh7/Sor 组细胞和 HepG2/Sor 组细胞 ($t = -2.570$ $P < 0.05$; $t = -3.724$ $P < 0.05$)。见图 3。结果提示:与 Huh7 和 HepG2 细胞比较,Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的

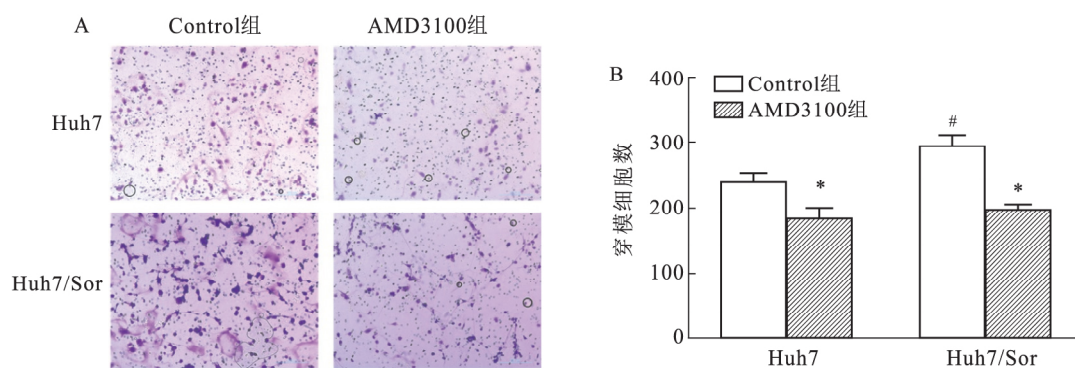


图1 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力

A: Transwell 侵袭实验不同组别穿透小室的结晶紫染色结果 $\times 200$; B: Transwell 侵袭实验不同组别穿透小室细胞数量;与 Control 组比较:

* $P < 0.05$; 与非耐药株对照组比较: # $P < 0.05$

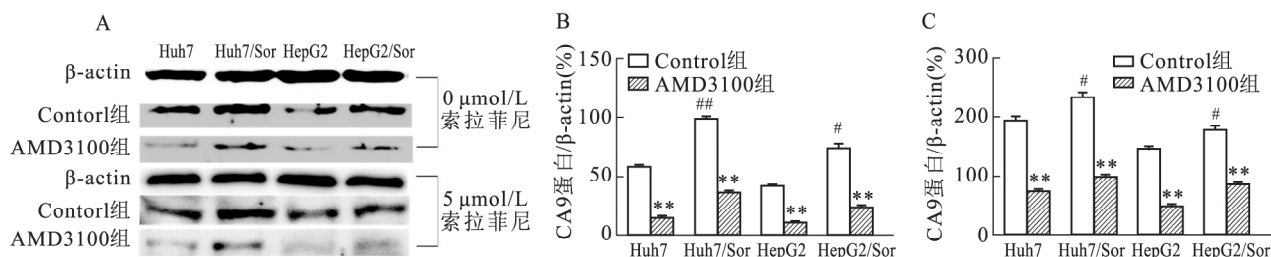


图2 Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞中 CA9 相对蛋白表达水平的影响

A: Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞中 CA9 蛋白相对表达水平的影响; B: 0 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼下 AMD3100 对 HCC 细胞中 CA9 蛋白相对表达量的影响; C: 5 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼下 AMD3100 对 HCC 细胞中 CA9 蛋白相对表达量的影响;与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与非耐药细胞组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

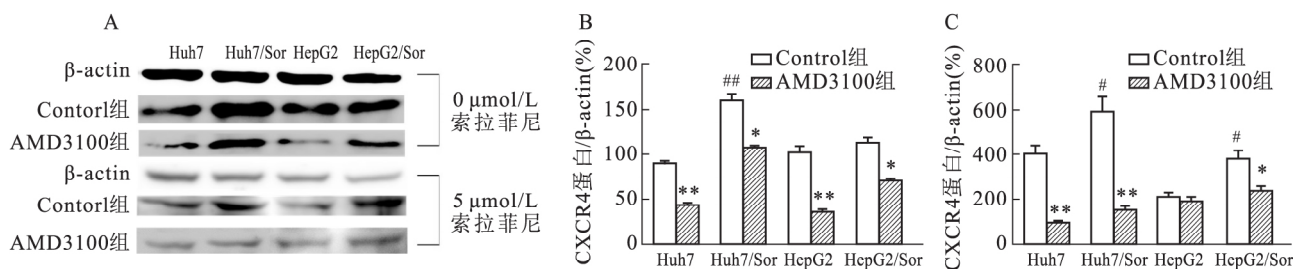


图3 Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞中 CXCR4 相对蛋白表达水平的影响

A: Western blot 法检测 AMD3100 对 HCC 细胞中 CXCR4 蛋白相对表达量的影响; B: 0 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼下 AMD3100 对 HCC 细胞中 CXCR4 蛋白相对表达量的影响; C: 5 $\mu\text{mol/L}$ 索拉菲尼下 AMD3100 对索拉菲尼对 HCC 细胞中 CXCR4 蛋白相对表达量的影响;与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与非耐药细胞组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

CA9 和 CXCR4 蛋白表达增加; AMD3100 处理 Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞后,可降低其 CA9 及 CXCR4 的蛋白表达水平。

3 讨论

HCC 是目前世界范围内发病率和病死率均居前列的人类恶性肿瘤之一,尤其是在以中国为代表的东亚地区^[1]。由于早期 HCC 无明显临床症状,超过 80% 的 HCC 患者被诊断时已经处于晚期状态,无法进行根治性手术或肝移植。同时晚期 HCC 患者还面临化疗有效率低、放疗及肝动脉介入栓塞化疗不能解决肝外转移等问题。

索拉菲尼是晚期 HCC 的标准临床治疗药物之一。然而,由于索拉菲尼通常在 6 个月内发生原发性或获得性耐药,故仅有约 30% 的 HCC 患者因索拉菲尼的治疗而受益^[14]。目前,索拉菲尼耐药的具体机制尚不明确。近年有研究^[7,14]表明,索拉菲尼耐药性的产生可能与 HCC 的肿瘤低氧微环境的发生发展有关。目前已在多个实体恶性肿瘤的研究中发现肿瘤低氧微环境的形成,低氧是由不良的血管形成和旺盛的代谢活动引起的,并与化疗药物耐药性的产生、恶性肿瘤的侵袭性增加和预后不良有关^[7,14-15]。因此,抑制低氧被认为是克服耐药性的可行方法。一般情况下,低氧可以通过转录因子低氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的 α 亚基的过度表达来检测。然而, HIF-1 α 的稳定性非常有限, CA9 作为一个更稳定的分子参数通常作为低氧的替代标志物。CA9 是 HIF-1 的特异性转录靶基因,但比 HIF-1 α 更稳定,并且可通过与 CO₂ 的水合作用稳定细胞外 pH 值,从而影响实体肿瘤的进展。在低氧条件下, CA9 启动子区的低氧反应元件与 HIF-1 α 结合,从而导致 CA9 表达上调^[4]。因此, CA9 在本研究中被用作低氧标志来进行检测。

CXCR4 是基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) α 的趋化因子受体。最近的研究^[10-12]表明, CXCR4 参与血管生成和细胞迁移,在低氧微环境和 HIF-1 α 调节下表达上调。索拉菲尼可以通过增加肿瘤组织中的低氧、炎症和纤维化来触发 HCC 中的促癌微环境。SDF1 α /CXCR4 轴在索拉菲尼治疗后表达上调,并在增强癌细胞存活、募集肿瘤相关骨髓衍生细胞、增加结缔组织增生和促进 HCC 转移表型中发挥关键作用。鉴于 CXCR4 信号传导的致癌作用,因此,对于晚期 HCC 患者,阻断 CXCR4 轴可能与目前的标准治疗——索拉菲尼和

免疫检查点抑制剂(如抗 PD-1)具有协同作用,同时具有对抗索拉菲尼的耐药作用^[11]。AMD3100 是第 1 个被 FDA 批准的可用于外周血干细胞移植的 CXCR4 拮抗剂^[10],与 CXCR4 特异性结合并抑制 CXCR4 与趋化因子 CXC 配体 12 之间的相互作用,且与其他趋化因子受体无交叉反应。

基于目前索拉菲尼耐药现状,本研究建立了索拉菲尼耐药 HCC 细胞系 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor,结果显示 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞有着更强的侵袭能力,并且索拉菲尼耐药 HCC 细胞系 Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞中 CA9 和 CXCR4 的蛋白表达水平相对于 Huh7 和 HepG2 细胞提高。在本研究中,经 AMD3100 处理后, Huh7、HepG2、Huh7/Sor 和 HepG2/Sor 细胞的侵袭能力受到了抑制,同时降低了细胞中 CA9 和 CXCR4 的蛋白表达水平。以上研究表明 CA9 和 CXCR4 可能在 HCC 中的索拉菲尼的耐药性产生过程中扮演了重要的作用,并促进了 HCC 的侵袭。对 CXCR4 的拮抗可有效降低 HCC 的索拉菲尼耐药性,并降低 HCC 的侵袭能力。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin* 2018, 68 (6): 394–424.
- [2] Cabral L K D, Tiribelli C, Sukowati C H C. Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: the relevance of genetic heterogeneity [J]. *Cancers (Basel)* 2020, 12(6): 1576.
- [3] Yokota S, Yonezawa T, Momoi Y, et al. Sorafenib inhibits tumor cell growth and angiogenesis in canine transitional cell carcinoma [J]. *J Vet Med Sci* 2022, 84(5): 666–74.
- [4] Eckert A W, Horter S, Bethmann D, et al. Investigation of the prognostic role of carbonic anhydrase 9 (CAIX) of the cellular mRNA/protein level or soluble CAIX protein in patients with oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci* 2019, 20(2): 375.
- [5] Koukourakis I M, Gkegka A G, Xanthopoulou E, et al. Prognostic and predictive relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in squamous cell head-neck cancer patients treated with radical radiotherapy/chemo-radiotherapy [J]. *Curr Oncol* 2022, 29(6): 4274–84.
- [6] Garcia-Bermudez J, Badgley M A, Prasad S, et al. Adaptive stimulation of macropinocytosis overcomes aspartate limitation in cancer cells under hypoxia [J]. *Nat Metab* 2022, 4(6): 724–38.
- [7] Xia S, Pan Y, Liang Y, et al. The microenvironmental and metabolic aspects of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *EBio Medicine* 2020, 51: 102610.
- [8] Tsai C N, Yu S C, Lee C W, et al. SOX4 activates CXCL12 in hepatocellular carcinoma cells to modulate endothelial cell migration

- and angiogenesis *in vivo* [J]. *Oncogene* 2020 ,39(24) : 4695 – 710.
- [9] Kruszyna Ł ,Murawa D ,Jagodziński P P ,et al. The expression and prognostic significance of VEGF and CXCR4 in gastric cancer: correlation with angiogenesis ,lymphangiogenesis and progression [J]. *Curr Issues Mol Biol* 2022 ,44(7) : 3075 – 88.
- [10] Lei H W ,Huang B R ,Cai J ,et al. CXCR4 antagonist AMD3100 enhances therapeutic efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in rats with hepatocellular carcinoma [J]. *Kaohsiung J Med Sci* 2022 ,38(8) : 781 – 9.
- [11] Song J S ,Chang C C ,Wu C H ,et al. A highly selective and potent CXCR4 antagonist for hepatocellular carcinoma treatment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021 ,118(13) : e2015433118.
- [12] Wang Y ,Wang Z ,Jia F ,et al. CXCR4-guided liposomes regulating hypoxic and immunosuppressive microenvironment for sorafenib-resistant tumor treatment [J]. *Bioact Mater* 2022 ,17: 147 – 61.
- [13] Zhou K X ,Xie L H ,Peng X ,et al. CXCR4 antagonist AMD3100 enhances the response of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation [J]. *Cancer Lett* 2018 ,418: 196 – 203.
- [14] Méndez-Blanco C ,Fondevila F ,García-Palomo A ,et al. Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors [J]. *Exp Mol Med* 2018 ,50(10) : 1 – 9.
- [15] Yang C B ,Feng H X ,Dai C L. Development and validation of an immune-related prognosis signature associated with hypoxia and ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Med* 2022 ,11(11) : 2329 – 41.

AMD3100 reverses Sorafenib resistance by down-regulating CA9 and CXCR4 expression

Qin Jiwei ,Zheng Hao ,Xu Zhijun ,Li Xuefeng ,Sun Cheng

(*Organ Transplantation Center ,The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China ,Hefei 230001*)

Abstract Objective To investigate the mechanism of AMD3100 reversing the resistance of human hepatocellular carcinoma cells to Sorafenib by regulating carbonic anhydrase IX (CA9) and chemokine receptor 4 (CXCR 4) .

Methods The Sorafenib resistant cell lines Huh7/Sor and HepG2/Sor were established from human hepatocellular carcinoma cells Huh7 and HepG2. The effects of Sorafenib alone or in combination with AMD3100 on the proliferation of Huh7 ,HepG2 ,Huh7/Sor ,HepG2/Sor cells were detected. The difference of invasive ability between Sorafenib resistant cells and non-resistant cells ,and the effect of AMD3100 on the invasive ability of hepatocellular carcinoma cells were observed. And the regulation effect of Sorafenib alone or in combination with AMD3100 on the expression of CA9 and CXCR4 proteins in Huh7 ,HepG2 ,Huh7/Sor and HepG2/Sor cells was detected. **Results** Compared with the Control group ,AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) increased the inhibitory effect of Sorafenib on the proliferation of Huh7/Sor and HepG2/Sor cells ($P < 0.05$) . Compared with Huh7 cells ,the invasive ability of Sorafenib resistant Huh7/Sor cells was significantly enhanced ($P < 0.05$) ,and AMD 3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) decreased the invasive ability of Huh7 and Huh7/Sor cells ($P < 0.05$) . Compared with Huh7 and HepG2 cells ,the protein expression of CA9 and CXCR4 in Huh7/Sor and HepG2/Sor cells increased ($P < 0.05$) . AMD3100 (50 $\mu\text{mol/L}$) down-regulated the protein expression of CA9 and CXCR4 in Huh7 ,HepG2 ,Huh7/Sor and HepG2/Sor cells ($P < 0.05$) .

Conclusion AMD3100 can reduce the resistance of human hepatocellular carcinoma cells to Sorafenib by down-regulating the expression of CA9 and CXCR4 ,and enhance the inhibition of Sorafenib on the proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells.

Key words hepatocellular carcinoma; AMD3100; carbonic anhydrase IX; chemokine receptor 4; Sorafenib; drug resistance