



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.008  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.008  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):958-962.

· 基础研究 ·

## 索拉非尼对人肝癌细胞生长抑制作用的体外研究

李克跃, 石承先, 汤可立

(贵州省人民医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550002)

### 摘要

**目的:** 探讨索拉非尼对人肝癌(HCC)细胞体外生长及肿瘤相关基因表达的影响。

**方法:** 用不同浓度(0、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )索拉非尼作用人HCC细胞(Hep3B2.1-7)24 h后,用CCK-8法观察细胞的增殖情况,并分别用real-time PCR与Western blot检测各组HCC细胞p53、PTEN、TGF- $\beta$ 1的mRNA与蛋白表达。

**结果:** 与0  $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼处理组(对照组)比较,其余各浓度索拉非尼处理组HCC细胞增殖均明显降低(均 $P<0.05$ );p53、PTEN的mRNA与蛋白表达明显升高,而TGF- $\beta$ 1的mRNA与蛋白表达明显降低(均 $P<0.05$ ),以上作用均呈一定的浓度依赖性。

**结论:** 索拉非尼对HCC细胞体外生长有抑制作用,其作用机制与调控肿瘤相关基因的表达有关。

### 关键词

癌,肝细胞;蛋白激酶抑制剂;体外研究

中图分类号: R735.7

## Role of sorafenib on inhibition of growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro

LI Keyue, SHI Chengxian, TANG Keli

(Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the influence of sorafenib on growth and expressions of tumor-related genes in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells in vitro.

**Methods:** Human HCC cells (Hep3B2.1-7) were exposed to different concentrations (0, 5, 10, and 20  $\mu\text{mol/L}$ ) of sorafenib for 24 h, and then, the cell proliferation was analyzed by CCK-8 assay, and the mRNA and protein expressions of p53, PTEN and TGF- $\beta$ 1 in the HCC cells were determined by real-time PCR and Western blot, respectively.

**Results:** Compared with the group of cells with 0  $\mu\text{mol/L}$  sorafenib treatment (control group), in the other groups of cells with sorafenib treatment, the cell proliferation rates were all significantly decreased (all  $P<0.05$ ); the mRNA and protein expressions of p53 and PTEN were significantly increased, while the mRNA and protein expressions of TGF- $\beta$ 1 were significantly decreased (all  $P<0.05$ ). All these effects of sorafenib showed a certain concentration-dependent manner.

**Conclusion:** Sorafenib can inhibit the growth of human HCC cells in vitro, and the mechanism may be attributed to its regulating the expressions of tumor-related genes.

收稿日期: 2015-05-20; 修订日期: 2015-06-09。

作者简介: 李克跃, 贵州省人民医院主治医师, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

通信作者: 石承先, Email: ChengxianL@aliyun.com

**Key words** Carcinoma, Hepatocellular; Protein Kinase Inhibitors; In Vitro  
**CLC number:** R735.7

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是人类癌症死因中排第3位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。HCC预后较差的原因与其术后具有较高的复发和转移率的特性密切相关。HCC的复发、转移与p53基因的表达及功能异常密切相关,修复表达及功能异常的p53基因是目前HCC治疗的靶点之一<sup>[2-4]</sup>。磷酸酶张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 的缺失或表达异常在HCC的发生发展中发挥了重要作用,是治疗HCC的靶点之一<sup>[5-7]</sup>。转化生长因子 $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 在HCC组织中的表达增高,可被用于HCC恶性程度及预后的判断<sup>[8-10]</sup>。索拉非尼 (sorafenib) 具有一定的抗HCC作用<sup>[11-12]</sup>,但其具体机制未彻底阐明,对HCC中p53、PTEN及TGF- $\beta$ 1的作用也不清楚。本研究对培养的人HCC细胞使用不同浓度的索拉非尼干预,观察其对HCC细胞增殖及p53、PTEN、TGF- $\beta$ 1的mRNA与蛋白表达的影响,为合理应用索拉非尼治疗HCC提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂、仪器

人HCC细胞系Hep3B2.1-7购自中国科学院典型培养物保藏中心 (CCTCC); DMEM (高糖型, Hyclone); 胎牛血清 (上海生工); 0.25%胰蛋白酶消化液、青霉素-链霉素溶液 (Hyclone); RNA提取试剂盒、反转录试剂盒 (上海生工); SYBR Premix Ex Taq™实时PCR试剂盒 (TAKARA); Tp53上游引物序列5'-TAG TGT GGT GGT GCC CTA TGA G-3', 下游引物序列: 5'-AGT GTG ATG ATG GTG AGG ATG G-3', PTEN上游引物序列: 5'-CGG CAG CAT CAA ATG TTT CAG-3', 下游引物序列: 5'-AAC TGG CAG GTA GAA GGC AAC TC-3', TGF- $\beta$ 1上游引物序列: 5'-ACT ACG CCA AGG AGG TCA-3', 下游引物序列: 5'-AGA TTT CGT TGT GGG TTT C-3';  $\beta$ -actin上游引物序列: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3', 下游引物序列: 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3' (Introgen公司合成); 抗p53抗体 (ab26)、PTEN抗

体 (ab32199)、TGF- $\beta$ 1抗体 (ab92486) (abcam); 抗 $\beta$ -actin抗体、山羊抗小鼠IgG-biotin (北京全是金)。甲苯磺酸索拉非尼 (拜耳公司) 用DMEM培养液溶解,临用时加培养液稀释至所需浓度。

### 1.2 细胞培养

将细胞移入25 cm<sup>2</sup>的培养瓶中,加入含10%FBS的培养基至5 mL,细胞密度为4~5 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL,置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养。每2~3 d换培养液1次,2~4 d细胞布满瓶底后使用0.25%胰蛋白酶消化传代,本实验选用8~10代细胞。

### 1.3 细胞分组及其处理

待细胞长到60%左右后,将各组细胞使用无血清的DMEM培养基饥饿过夜,次日各组细胞加入含不同浓度 (0、5、10、20  $\mu$ mol/L) 索拉非尼的培养基培养24 h。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 HCC细胞增殖的测定** 用CCK-8法进行。将细胞接种于96孔板,调整细胞浓度为5 $\times$ 10<sup>4</sup>/mL,每孔体积为100  $\mu$ L,每孔做5个复孔。各组细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱饥饿过夜后加入不含或含有不同浓度索拉非尼的培养基培养24 h,每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂培养3 h,在酶标仪上450 nm波长处测定其光密度值 (OD值),采用目前普遍使用的扣除本底策略来消除误差。

**1.4.2 real-time PCR法检测p53、PTEN、TGF- $\beta$ 1 mRNA表达** 将各组细胞提取RNA,把纯度好、完整性高的RNA合成cDNA。按2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Premix 10  $\mu$ L,上游引物0.4  $\mu$ L,下游引物0.4  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L配成总量20  $\mu$ L体系进行real-time PCR反应。反应条件为95 $^{\circ}$ C 30 s,然后进入PCR循环,95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,进行40个循环。目的基因的表达使用相对定量法,以 $\beta$ -actin作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。

**1.4.3 Western blot法检测p53、PTEN、TGF- $\beta$ 1蛋白表达** 提取各组细胞总蛋白,用BCA法定量蛋白浓度,所得蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电转至PVDF膜后以封闭液封闭,一抗稀释液按1:5 000比例稀释检测蛋白的一抗,4 $^{\circ}$ C冰箱内孵育过夜。去掉一抗孵育液后用TBST在摇

床洗涤 3 次，二抗稀释液按 1:5 000 比例稀释 HRP 标记的二抗后在室温振荡孵育 2 h，倒掉二抗孵育液后用 TBST 洗涤 3 次，以电化学发光，显影和定影方法对胶片进行拍照和扫描，以  $\beta$ -actin 为内参，Quantity one 系统分析目标条带的相对灰度值。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件系统进行统计学计算，实验结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，用单因素方差分析 (bonferroni 方法) 进行数据处理， $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的索拉非尼对人 HCC 增殖的影响

与 0  $\mu\text{mol/L}$  索拉非尼处理组 (对照组) 比较，其余各浓度 (5~20  $\mu\text{mol/L}$ ) 索拉非尼处理组 HCC 细胞增殖均明显降低 (均  $P < 0.05$ )，且呈一定的

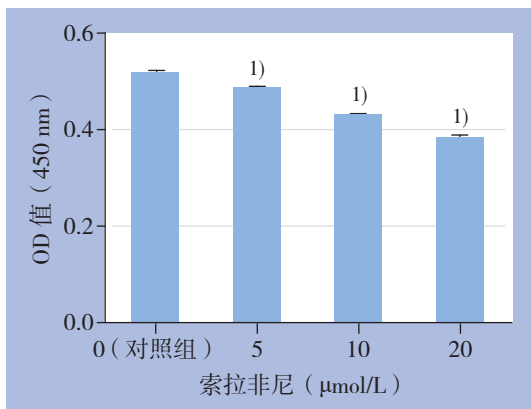


图 1 不同浓度索拉非尼对 HCC 细胞增殖的影响 1) 与对照组比较， $P < 0.01$

Figure 1 Effect of different concentrations of sorafenib on cell proliferation in HCC cells 1)  $P < 0.01$  vs. control group

浓度依赖性 (图 1)。

2.2 不同浓度的索拉非尼对人 HCC 细胞肿瘤相关基因 mRNA 表达的影响

与 0  $\mu\text{mol/L}$  索拉非尼处理组 (对照组) 比较，其余各浓度 (5~20  $\mu\text{mol/L}$ ) 索拉非尼处理后，HCC 细胞的 p53 及 PTEN 的 mRNA 表达明显上调 (均  $P < 0.05$ )，且呈浓度依耐性；而 HCC 细胞的 TGF- $\beta$  1 mRNA 表达明显下调 (均  $P < 0.05$ )，也呈浓度依耐性 (图 2)。

2.3 不同浓度的索拉非尼对人 HCC 细胞 p53、PTEN 及 TGF- $\beta$  1 蛋白表达的影响

与 0  $\mu\text{mol/L}$  索拉非尼处理组 (对照组) 比较，其余各浓度 (5~20  $\mu\text{mol/L}$ ) 索拉非尼处理后，HCC 细胞的 p53 及 PTEN 的蛋白表达明显上调 (均  $P < 0.05$ )，且呈浓度依耐性；而 HCC 细胞的 TGF- $\beta$  1 的蛋白表达明显下调 (均  $P < 0.05$ )，也呈浓度依耐性。蛋白与 mRNA 表达变化趋势一致 (图 3)。

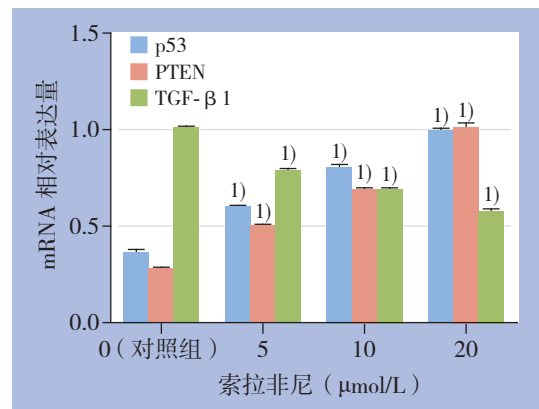


图 2 各组 HCC 细胞肿瘤相关基因 mRNA 的表达 1) 与对照组比较， $P < 0.01$

Figure 2 The mRNA expressions of the tumor-related genes in each group of HCC cells 1)  $P < 0.01$  vs. control group

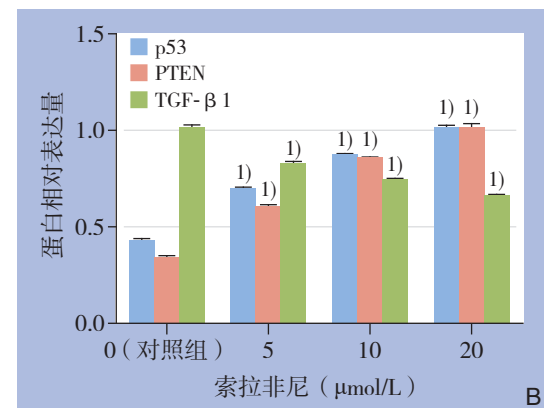
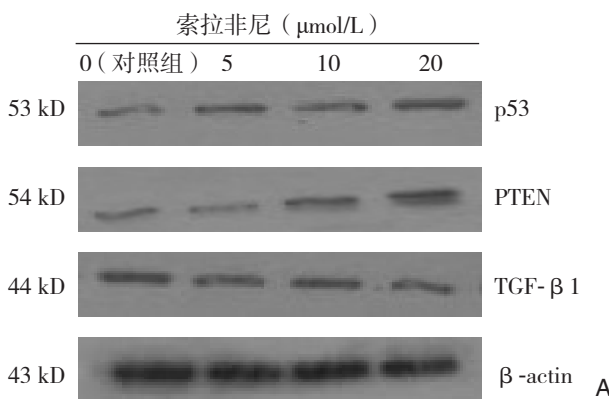


图 3 各组 HCC 细胞肿瘤相关基因蛋白的表达 A: 电泳图; B: 半定量统计图 1) 与对照组比较， $P < 0.01$   
 Figure 3 The protein expressions of the tumor-related genes in each group of HCC cells A: Protein electrophoretogram; B: Semi-quantitative statistical analysis 1)  $P < 0.01$  vs. control group

### 3 讨论

p53基因是目前比较公认的抗癌基因,研究<sup>[2, 13-14]</sup>显示, p53基因的表达及功能异常与HCC的发生及进展密切相关, 修复表达及功能异常的p53基因已经成为HCC治疗的靶点之一。p53基因的缺失将会导致TGF- $\beta$ 1信号转导通路的过度表达从而促进HCC的形成<sup>[15]</sup>。

PTEN基因位于人10号染色体q23.3区, 是具有磷酸酶活性的抑癌基因, 在中枢神经系统、心脏、肝脏、肾脏、胃肠道及皮肤等全身多器官均有表达<sup>[16]</sup>。PTEN与HCC细胞的增殖、迁移及侵袭等密切相关, 干预PTEN的表达是目前治疗HCC的靶点之一<sup>[7, 17]</sup>。PTEN与p53具有一定的互动关系<sup>[18]</sup>。PTEN可使PIP3处于较低水平, 可阻断PI3K的Akt通路, 进而诱导细胞凋亡及细胞周期的阻滞<sup>[19]</sup>。也有报道显示PTEN的抗癌作用可能与其对LKB1-AMPK通路的调控有关<sup>[20]</sup>。TGF- $\beta$ 1能够快速降低PTEN基因在上皮细胞中的表达, 调节上皮细胞中所含有的PTEN基因<sup>[21]</sup>。

TGF- $\beta$ 1在调节细胞的增殖、分化以及凋亡等功能中起重要作用, 在HCC细胞中高度表达<sup>[8]</sup>。研究<sup>[22-24]</sup>表明, TGF- $\beta$ 1在肿瘤的发生中可能起双向调节作用, 在肿瘤形成早期可抑制肿瘤的生长, 而在肿瘤进展期则有促进作用。有报道显示TGF- $\beta$ 1是通过与其相应受体T $\beta$ RI、T $\beta$ R II、内皮蛋白结合形成复合物后调控Smad2及Smad4等蛋白形成TGF- $\beta$ 1-Smad信号传导通路发挥作用的<sup>[24]</sup>。HCC组织中过高的TGF- $\beta$ 1可能是由于HCC细胞自分泌和旁分泌导致的<sup>[25-26]</sup>。在HCC早期, 由于TGF- $\beta$ 1的高灵敏性和特异性, 血清中TGF- $\beta$ 1含量已被认为是一个诊断小HCC的标志<sup>[27]</sup>。由于TGF- $\beta$ 1在肿瘤的侵袭及转移中发挥了重要作用, 抑制TGF- $\beta$ 1的表达已经成为了治疗肿瘤的手段之一<sup>[22]</sup>。

索拉非尼是多种激酶抑制剂, 在体外可抑制肿瘤细胞增殖, 具有较好的抗癌应用前景。以往研究发现索拉非尼具有抑制HCC细胞增殖和促进癌细胞凋亡的作用, 其机理可能与调控Beclin-1的乙酰化水平有关<sup>[12]</sup>, 也可能与对Bcl-2的调控有关<sup>[11]</sup>。本实验结果提示索拉非尼具有一定的抑制HCC细胞增殖的作用, 且能上调HCC细胞内抑癌

基因p53及PTEN的表达, 而对增强细胞增殖能力的TGF- $\beta$ 1基因具有一定的抑制作用。提示索拉非尼可能通过调控p53、PTEN及TGF- $\beta$ 1表达而发挥抗HCC作用。同时, 应该注意到, HCC细胞中各种基因的表达及信号转导通路相互关系复杂, 究竟索拉非尼是如何调控p53、PTEN及TGF- $\beta$ 1表达而发挥抗肿瘤作用, 它对p53、PTEN及TGF- $\beta$ 1的功能是否有影响, 在这个过程中又受到哪些因素的影响, 还需要进一步研究。

### 参考文献

- [1] Tsochatzis EA, Meyer T, Burroughs AK. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(1):92.
- [2] He X, Liu F, Yan J, et al. Trans-splicing repair of mutant p53 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8705. doi: 10.1038/srep08705.
- [3] Dixit U, Pandey AK, Liu Z, et al. FUSE Binding Protein1 Facilitates Persistent Hepatitis C Virus Replication in Hepatoma Cells by Regulating Tumor Suppressor p53[J]. *J Virol*, 2015, pii: JVI.00729-15. [Epub ahead of print]
- [4] Xie SB, He XX, Yao SK. Matrine-induced autophagy regulated by p53 through AMP-activated protein kinase in human hepatoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2015, doi: 10.3892/ijo.2015.3023. [Epub ahead of print]
- [5] Zhang Y, Zheng L, Ding Y, et al. MiR-20a Induces Cell Radioresistance by Activating the PTEN/PI3K/Akt Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.04.007. [Epub ahead of print]
- [6] Ye ZL, Huang Y, Li LF, et al. Argonaute 2 promotes angiogenesis via the PTEN/VEGF signaling pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, doi: 10.1038/aps.2015.18. [Epub ahead of print]
- [7] Yan SY, Chen MM, Li GM, et al. MiR-32 induces cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting PTEN[J]. *Tumour Biol*, 2015, [Epub ahead of print]
- [8] Dong ZZ, Yao DF, Yao M, et al. Clinical impact of plasma TGF-beta1 and circulating TGF-beta1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(3):288-295.
- [9] Lu Y, Wu LQ, Li CS, et al. Expression of transforming growth factors in hepatocellular carcinoma and its relations with clinicopathological parameters and prognosis[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(2):174-178.
- [10] Paik SY, Park YN, Kim H, et al. Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptors in

- hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules[J]. *Mod Pathol*, 2003, 16(1):86-96.
- [11] Yang F, Li QJ, Gong ZB, et al. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2014, 13(1):77-86.
- [12] Yuan H, Li AJ, Ma SL, et al. Inhibition of autophagy significantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(17):4953-4962.
- [13] Marcel V, Catez F, Diaz JJ. p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity[J]. *Oncogene*, 2015, doi: 10.1038/onc.2015.25. [Epub ahead of print]
- [14] Meng X, Franklin DA, Dong J, et al. MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(24):7161-7167.
- [15] Morris SM, Baek JY, Koszarek A, et al. Transforming growth factor-beta signaling promotes hepatocarcinogenesis induced by p53 loss[J]. *Hepatology*, 2012, 55(1):121-131.
- [16] Gimm O, Attié-Bitach T, Lees JA, et al. Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(11):1633-1639.
- [17] Zhou X, Zhu H, Lu J. PTEN and hTERT gene expression and the correlation with human hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(4):316-319.
- [18] Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, et al. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6):1813-1819.
- [19] Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(5):283-296.
- [20] Huang X, Wullschlegel S, Shpiro N, et al. Important role of the LKB1-AMPK pathway in suppressing tumorigenesis in PTEN-deficient mice[J]. *Biochem J*, 2008, 412(2):211-221.
- [21] Conley-LaComb MK, Saliganan A, Kandagatla P, et al. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1):85.
- [22] Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(11):S44-51.
- [23] Tian M, Schiemann WP. The TGF-beta paradox in human cancer: an update[J]. *Future Oncol*, 2009, 5(2):259-271.
- [24] No authors listed. Correction: Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(3):228.
- [25] Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, et al. Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(15):2309-2321.
- [26] Abou-Shady M, Baer HU, Friess H, et al. Transforming growth factor betas and their signaling receptors in human hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Surg*, 1999, 177(3):209-215.
- [27] Song BC, Chung YH, Kim JA, et al. Transforming growth factor-beta1 as a useful serologic marker of small hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94(1):175-180.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 李克跃, 石承先, 汤可立. 索拉非尼对人肝癌细胞生长抑制作用的体外研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(7):958-962. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.008

**Cite this article as:** LI KY, SHI CX, TANG KL. Role of sorafenib on inhibition of growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(7):958-962. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.008