

人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞的异质性与生物学行为关系的初探*

黎凤明¹, 王静妮^{2#}, 王春苗³, 农世凯¹, 洪娟娟³, 侯华新^{1△}

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530020; 3. 广西医科大学生命科学研究院, 南宁 530021)

摘要 目的: 比较人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞异质性, 探讨其与耐药、侵袭、迁移生物学特性的关系。**方法:** 以 p53 野生型 HepG2 和 p53 缺失型 Hep3B 细胞为研究对象, 采用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)分析细胞对顺铂(DDP)、紫杉醇(PTX)、依托泊苷(VP-16)、索拉非尼(So)的敏感性, 细胞计数试剂盒(CCK-8)法和平板克隆形成实验测定细胞的生长曲线及克隆形成能力, 划痕、Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力, 建立人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型, 记录小鼠生长情况及出瘤时间, 苏木精-伊红法(HE法)观察瘤组织及各脏器的病理学改变, 蛋白免疫印迹法(western blotting法)检测细胞和组织中 p53、骨髓细胞白血病-1(Mcl-1)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤(Bcl-2)、穹窿主体蛋白(MVP)、多药耐药蛋白 1(MDR1)、基质金属蛋白酶-2(MMP2)、E 钙粘蛋白(E-cadherin)的表达差异。**结果:** MTT 结果显示, 相对 HepG2 细胞, Hep3B 细胞对化疗药物的敏感性较低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); Hep3B 细胞具有更高的克隆、侵袭和迁移能力($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); 在裸鼠皮下移植瘤模型中, Hep3B 组随着时间的延长体重出现明显下降, 出瘤时间也明显长于 HepG2 ($P < 0.001$), 且在种植了 Hep3B 的裸鼠中, 出现了癌细胞肝转移现象; 与 HepG2 细胞相比, Hep3B 细胞 Bax、p53 蛋白表达下调, Bcl-2、Mcl-1、MVP、MDR1、MMP2、E-cadherin 蛋白表达上调($P < 0.05$, $P < 0.001$), 移植瘤组织的 p53 及 MMP2、E-cadherin 的表达与细胞的表达趋势一致($P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论:** Hep3B 细胞具有更明显的耐药、抗凋亡和侵袭、迁移能力, 本研究可为临床上两种不同生物学特性的肝细胞癌治疗方案的确定提供实验依据。

关键词 肝癌; 肿瘤异质性; 生物学特性; 侵袭转移; 耐药

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2023)03-0398-08

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.009

Preliminary research on the relationship between heterogeneity and biological behavior of human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells*

Li Fengming¹, Wang Jingni^{2#}, Wang Chunmiao³, Nong Shikai¹, Hong Juanjuan³, Hou Huaxin^{1△}. (1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530020, China; 3. Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To compare the heterogeneity of human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells, and to explore the relationship between the heterogeneity and the biological characteristics of drug resistance, invasion and migration. **Methods:** HepG2 (p53 wild-type) and Hep3B (p53 deficient) cells were used as research subjects. The sensitivity of the two cell lines to cisplatin (DDP), paclitaxel (PTX), etoposide (VP-16) and sorafenib (So) was analyzed by tetramethylazolium salt colorimetric method (MTT). Cell counting kit-8 (CCK-8) assay and plate clone formation assay were used to detect the cellular growth curve and clone formation ability. The migration and invasion abilities of cells were detected by scratch and Transwell assay. Subcutaneous

transplantation tumor models of human hepatocellular carcinoma in nude mice were established, and the growth and tumor emergence time of mice were recorded. The transplanted tumor tissues and each viscera with HE to observe the pathological changes.

*基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.82260714); 广西自然科学基金重点项目(No.2020GXNSFDA238016)

#共同第一作者

△通信作者, E-mail: houhuaxin@163.com

收稿日期: 2022-12-29

Western blotting was conducted to detect the expression differences of p53, myelocytic leukemia-1 (Mcl-1), Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma (Bcl-2), major vault protein (MVP), multidrug-resistant protein 1 (MDR1), matrix metalloproteinase-2 (MMP2), and E-cadherin in cells and tissues. **Results:** MTT results showed that Hep3B cells were less sensitive to chemotherapy drugs than HepG2 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) and Hep3B cells revealed stronger abilities in proliferation, migration and invasion ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). In the model of subcutaneous tumor transplantation in nude mice, the body weight decreased significantly with the extension of time, the time of tumor emergence was also longer than that of HepG2 ($P < 0.001$), and liver metastasis of cancer cells was observed in nude mice implanted with Hep3B. Compared with HepG2 cells, the protein expressions of Bax and p53 in Hep3B cells decreased, the protein expressions of Bcl-2, Mcl-1, MVP, MDR1 and E-cadherin significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.001$) and the expressions of p53, MMP2 and E-cadherin in transplanted tumor tissue were consistent with the expression trend of cells ($P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion:** Hep3B cells show more obvious drug resistance, anti-apoptosis, invasion and migration abilities. This study can provide experimental basis for the determination of two clinical treatments of hepatocellular carcinoma with different biological characteristics.

Keywords hepatocellular carcinoma; tumor heterogeneity; biological characteristics; invasion and migration; drug resistance

肝癌在全球癌症杀手中位列第三,我国肝癌患病率位居世界第一,居我国癌症死因的第二位^[1]。研究肝癌发生、发展及治疗新机制、新策略是各国科学家研究的热点。肿瘤在发生与发展过程中,其不同肿瘤子细胞呈现出分子生物学或基因方面的改变^[2],从而使同一组织来源的不同肿瘤细胞的生长速度、侵袭能力、对药物的敏感性等产生差异,即异质性^[3-4]。肝癌与其他肿瘤一样,也具有高度异质性,导致患者进展相差很大,对手术和放、化疗的敏感度也不一样^[5]。为深入了解肝癌恶性生物学行为,需要建立多种细胞模型,如具有高转移性、对化疗药物产生耐药、携带乙肝病毒、分泌 AFP 蛋白等不同生物性状的细胞株。通过了解这些肝癌细胞的耐药、侵袭、迁移、分泌病毒等不同特性,才能做到精准治疗,减少耐药,从而提高治疗效果。

本课题组前期采用肝癌 Hep3B 和 HepG2 细胞在裸鼠体内建立皮下移植瘤模型,发现这两株细胞成瘤时间相差较大,且前者出现肝脏转移,而后者无转移现象,何种原因导致该结果的发生?其生物学行为存在哪些差异?对这两株细胞的不同性质的系统比较目前鲜有文献报道。本研究通过体内、外实验,对两株细胞的生长速度、侵袭、迁移、对化疗药物的敏感性等性质进行研究,探讨异质性与生物学行为关系,为建立适用于临床和实验研究的细胞模型,推动深入研究肝癌的发生和发展机制、肝癌诊断标志物和治疗药物的筛选奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和动物 p53 野生型的人肝癌细胞株 HepG2 由广西肿瘤防治研究所传代保株, p53 缺失型的 Hep3B 细胞购于中国科学院细胞库。BALB/c-nude 裸鼠,雄性,4 周龄,SPF 级层流柜内分笼饲养于广西医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK 桂 2020-0004,本研究动物实验获得广西医科大学动物伦理委员会审查批准(审批号:202105015)。

1.2 试剂与仪器 GAPDH 抗体购自广州晶欣生物科技有限公司, p53 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, B 细胞淋巴瘤 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、骨髓细胞白血病-1 (Mcl-1)、多药耐药蛋白 1 (MDR1)、基质金属蛋白酶-2 (MMP2)、E 钙粘蛋白 (E-cadherin) 抗体购自美国 CST 公司, 穹窿主体蛋白 (MVP) 抗体购自沈阳万类生物科技有限公司。仪器:EVOS FL Auto 型全自动细胞成像系统购自美国 Life Scientific 公司;全波长酶标仪 Microplate reader 购自美国 Biotek 公司;Odessey 双色红外成像系统购自美国 Licor 公司。

1.3 细胞培养 采用 DMEM 培养基对 HepG2 细胞进行培养, MEM 培养基对 Hep3B 细胞进行培养, 细胞用含有 10% FBS 的培养基(含青霉素 100 kU/L 和链霉素 100 kU/L)置于 37 °C、5% CO₂ 及 95% 湿度的恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

1.4 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测细胞对药物的敏感性 调整 HepG2 细胞浓度为 3×10^4 个/mL、Hep3B 为 6×10^4 个/mL, 接种细胞于 96 孔板中, 培养 24 h 后向培养板中分别加入含不同浓度顺铂(cisplatin, DDP)、紫杉醇(paclitaxel, PTX)、依托泊苷(etiposide, VP-16)、索拉非尼(sorafenib, So)等药物的培养基, 每个浓度设置 3 个平行孔, 对照组只加相应培养基, 继续培养 72 h, 每孔中加入 20 μ L 的 MTT(5 mg/mL)溶液, 继续培养 4 h 后弃去孔内培养液, 加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO)溶液, 置于摇床上避光快速震荡 10 min, 用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(OD)值。

1.5 细胞标准曲线和生长曲线测定 标准曲线: 分别取 HepG2 和 Hep3B 细胞, 分别以 4×10^4 个/孔、 2×10^4 个/孔、 1×10^4 个/孔、 5×10^3 个/孔、 2.5×10^3 个/孔、 1.25×10^3 个/孔、625 个/孔接种于 96 孔板, 每个浓度设置 3 个复孔, 置于培养箱培养 6 h 后, 加入 CCK-8 试剂, 于培养箱中继续孵育 30 min。检测 450 nm 处的 OD 值, 以细胞数量为横坐标, OD 值为纵坐标绘制标准曲线。

生长曲线: 两种细胞分别以 800 个/孔接种于 96 孔板中, 于培养箱中分别孵育 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d, 采用 CCK-8 法检测 450 nm 处的 OD 值。以细胞培养时间为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。并在细胞生长曲线上确定细胞数增加 1 倍所需要的时间。

1.6 平板克隆形成实验 两种细胞分别以 500 个/孔接种至 12 孔板, 于培养箱中继续培养, 于第 2、第 4、第 6、第 8、第 10 天分别终止培养。弃去培养液, PBS 洗涤 3 次, 多聚甲醛固定 10 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 洗涤, 显微镜下观察、拍照, 统计超过 50 个细胞的集落, 计算克隆形成率。

1.7 细胞迁移率和侵袭能力测定 迁移率: 以 2×10^5 个/孔细胞密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱培养, 待细胞均匀长满后取出孔板, 用 20 μ L 枪头垂直于孔板底部画线划掉细胞, 弃去孔内培养基, PBS 清洗, 于培养箱中继续培养。于划痕后 0 h、24 h、48 h 显微镜下定时定点拍照。按照如下公式计算细胞迁移率: $D=(D_0-D_t)/D_0$, 其中 D 为迁移率, D_0 为 0 h 的划痕宽度, D_t 分别为 24 h 和 48 h 的划痕宽度。

侵袭能力: 以 8×10^4 个/孔细胞密度种植于 Transwell 小室, 下室加 650 μ L 含 20% FBS 的培养基, 24 h 和 48 h 后取出 Transwell 小室, 4% 多聚甲醛固定

30 min, 并用 0.1% 结晶紫染色 20 min, 显微镜下随机选择 5 个视野拍照计数, 计数穿至膜下层的细胞数。

1.8 蛋白免疫印迹法(western blotting法)检测蛋白表达水平 组织蛋白样品制备: 将适量瘤组织用剪刀剪碎, 加入适量裂解液, 冰上匀浆, 在 4 $^{\circ}$ C, 下离心 30 min, 收集上清液。细胞蛋白样品制备: 收集各组细胞, 加入 RIPA 蛋白裂解液, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 \times g 离心 30 min, 取上清液。分别取 20 μ g 组织蛋白和 30 μ g 细胞蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 冰上转膜, 将 NC 膜置于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h。与相应一抗溶液(稀释比例均为 1:1 000)于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 荧光二抗(兔抗、鼠抗稀释比例均为 1:15 000)室温下避光孵育 1 h, TBST 避光洗膜 3 次, 使用 Odyssey 红外扫描仪扫描蛋白条带, 获取图像结果, 通过 Image J 软件计算灰度值。

1.9 人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 调整 HepG2 和 Hep3B 细胞浓度为 8×10^6 个/mL, 取 0.1 mL 接种于裸鼠右腋皮下。当 HepG2 和 Hep3B 两组裸鼠成瘤后, 隔天观测两组裸鼠移植瘤体积、体重变化。裸鼠皮下移植瘤的体积(V)用游标卡尺进行测量, 依据公式: $V=ab^2/2$, a 为肿瘤的长径, b 为肿瘤的短径。

1.10 苏木精—伊红法(HE法)观察移植瘤病理学特征及各脏器肿瘤细胞转移情况 当裸鼠肿瘤体积约为 800 mm \times 800 mm \times 800 mm 左右, 处死裸鼠, 分别取出瘤组织和各脏器组织, 经多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋, 4 μ m 切片。切片常规用二甲苯脱蜡, 经各级乙醇脱水, 苏木精染色 5 min, 纯水冲洗, 1% 盐酸乙醇分化 30 s, 纯水浸泡 15 min。置于伊红染色液 2 min, 常规脱水后用中性树脂封片, 拍照记录。

1.11 统计学方法 以上主要实验均独立重复 3 次。采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用 *t* 检验, GraphPad Prism 8.01 绘制生长曲线和柱形图。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2 和 Hep3B 细胞对化疗药物的敏感性

采用 MTT 法分别测定 DDP、PTX、VP-16、So 4 种肝癌临床常用化疗药对 HepG2、Hep3B 肝癌细胞的增殖抑制作用。如表 1 所示, 作用时间 72 h 时, 化疗药物 DDP、PTX、VP-16、So 对 HepG2、Hep3B 细胞

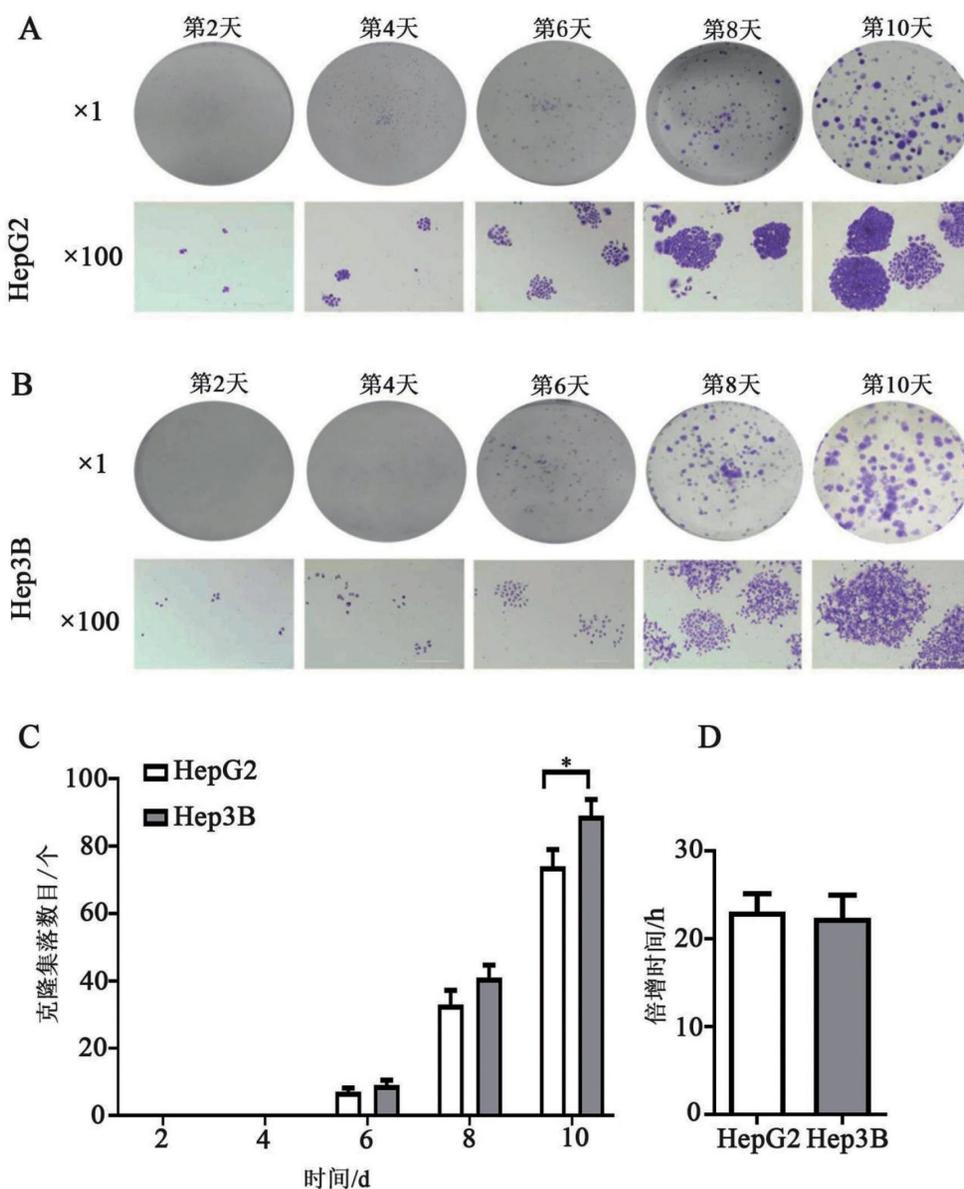
胞均有一定程度的增殖抑制作用,其中化疗药物DDP、PTX、VP-16对Hep3B细胞的敏感性均明显弱于HepG2细胞($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。

表1 4种化疗药作用于HepG2、Hep3B肝癌细胞的IC₅₀值

化疗药	IC ₅₀ /($\mu\text{mol/L}$)		<i>t</i>	<i>P</i>
	HepG2	Hep3B		
DDP	2.51±0.11	6.32±0.72	9.060	0.000
PTX	1.19±0.40	3.66±0.57	6.144	0.004
VP-16	17.18±5.79	37.72±5.59	4.456	0.011
So	14.39±1.99	17.31±0.51	2.462	0.070

2.2 HepG2和Hep3B细胞的生长特性比较 克隆形成实验结果显示,HepG2和Hep3B细胞在第2、第4天均未形成集落,第6天开始出现明显的集落,通过对比集落特征,发现HepG2形成的集落细胞紧密,而Hep3B形成的集落细胞排列较为疏松,相同细胞数形成的集落体积相对HepG2大,第10天Hep3B细胞形成的集落数明显多于HepG2细胞,差异有统计学意义($t=3.700, P=0.021$),见图1A~图1C。

同时,通过检测HepG2和Hep3B细胞的生长曲线,发现HepG2细胞的倍增时间稍长于Hep3B细胞[(23.08±4.60)h vs (22.33±5.90)h],但两者比较差异无统计学意义($t=0.222, P=0.830$),见图1D。

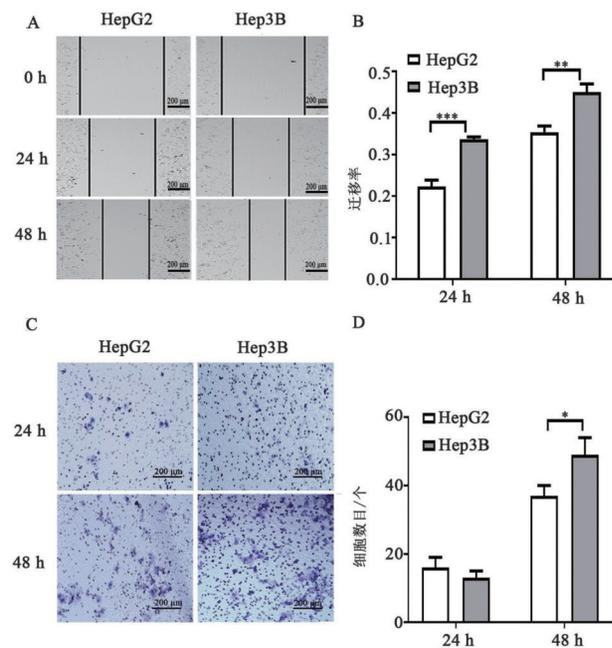


A~C:HepG2和Hep3B细胞集落形成实验结果($n=3$),组间比较,* $P<0.05$;D:HepG2和Hep3B细胞的倍增时间。

图1 克隆形成与生长曲线实验结果

2.3 HepG2 和 Hep3B 细胞迁移和侵袭能力的比较

Hep3B 细胞在 24 h、48 h 时迁移率均高于 HepG2 细胞(24 h: $t=12.020, P=0.000$; 48 h: $t=6.653, P=0.003$), 见图 2A、图 2B; Transwell 实验结果则表明, Hep3B 细胞在 48 h 时发生侵袭的细胞数目显著多于 HepG2 细胞($t=3.565, P=0.024$), 提示相对于 HepG2 细胞, Hep3B 细胞具有更强的侵袭和迁移能力, 见图 2C、图 2D。

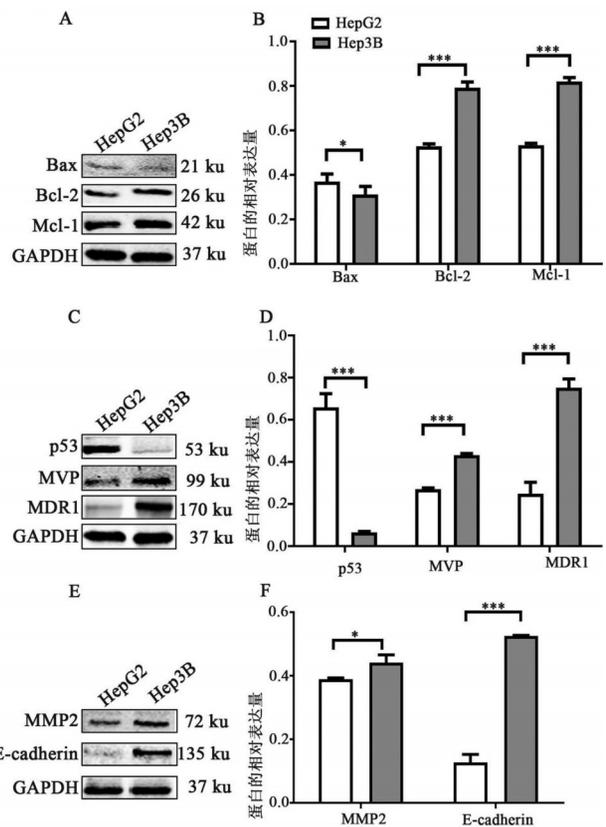


A、B: 采用划痕法检测 0 h、24 h、48 h 细胞迁移能力的变化 ($n=3$), 组间比较, $^{*}P<0.01, ^{***}P<0.001$; C、D: 采用 Transwell 法检测 24 h 和 48 h 细胞侵袭能力的变化 ($n=3$), 组间比较, $^{*}P<0.05$ 。

图 2 HepG2 和 Hep3B 细胞迁移、侵袭能力的比较

2.4 Western blotting 法检测 HepG2 和 Hep3B 细胞内 Bax、Bcl-2、Mcl-1、p53、MVP、MDR1、MMP2、E-cadherin 蛋白的表达情况

HepG2 细胞的 p53 蛋白水平高于 Hep3B 细胞, 与高表达 p53 蛋白的 HepG2 细胞相比, Hep3B 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 蛋白及耐药蛋白 MVP、MDR1 及侵袭转移蛋白 E-cadherin 表达水平升高, 促凋亡 Bax 蛋白水平降低, MMP2 蛋白表达水平升高 ($P<0.05, P<0.001$), 见图 3。

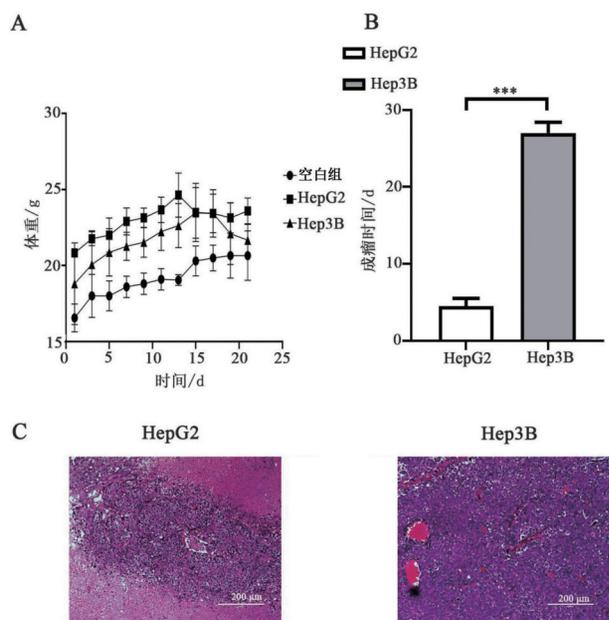


A、B: HepG2 和 Hep3B 细胞内 Bax、Bcl-2、Mcl-1 蛋白的相对表达量 ($n=3$), 组间比较, $^{*}P<0.05, ^{***}P<0.001$; C、D: HepG2 和 Hep3B 细胞内 p53、MVP、MDR1 蛋白的相对表达量 ($n=3$), 组间比较, $^{***}P<0.001$; E、F: HepG2 和 Hep3B 细胞内 MMP2、E-cadherin 蛋白的相对表达量 ($n=3$), 组间比较, $^{*}P<0.05, ^{***}P<0.001$ 。

图 3 Western blotting 检测 HepG2 和 Hep3B 细胞内 Bax、Bcl-2、Mcl-1、p53、MVP、MDR1、MMP2、E-cadherin 蛋白表达

2.5 HepG2 和 Hep3B 细胞移植瘤小鼠生长及瘤体组织学变化

HepG2 和 Hep3B 细胞种植于裸鼠体内后, 随着时间的延长, Hep3B 组裸鼠体重显著下降, 出瘤时间分别是 (4.50 ± 1.00) d 和 (27.00 ± 1.41) d ($t=25.980, P=0.000$), 相对于 HepG2, Hep3B 组出瘤晚, 出瘤后裸鼠生长状态开始变差, 活动、饮食减少。HE 染色观察发现, HepG2 组肿瘤中心有干酪样坏死, 腔室众多, 胞浆嗜碱染色较浅, 细胞核较大, 核大小相近, 核浆比较大, 可见核仁增多, 较规则, 分裂现象少; Hep3B 组肿瘤坏死区域少, 腔室稀少, 血管丰富, 胞浆嗜碱染色较深, 细胞核大小相差大, 核浆比较大, 核仁形态不规则, 数目增多, 分裂现象多, 见图 4。



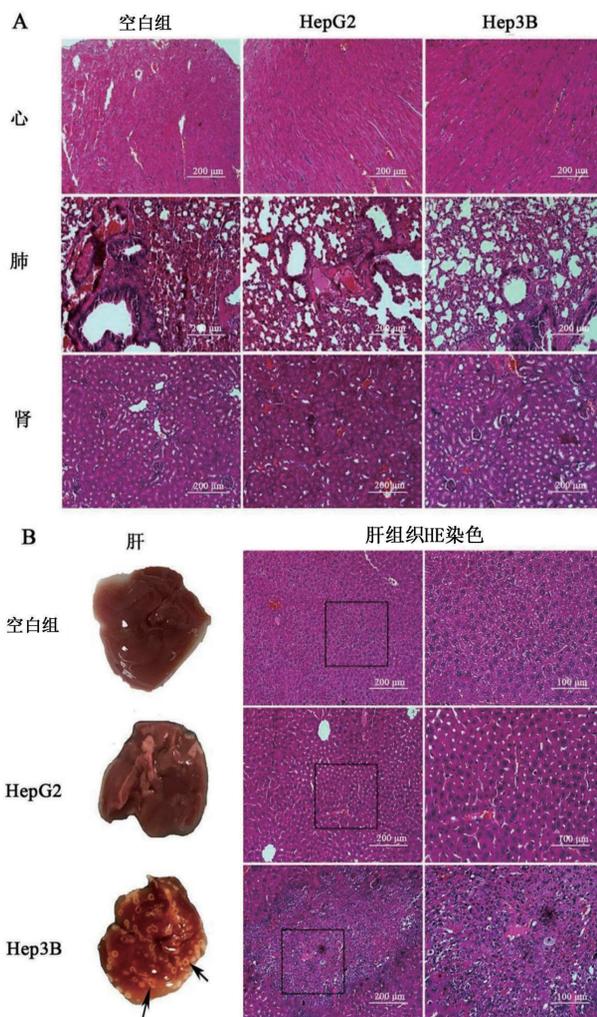
A: 各组裸鼠体重的变化($n=5$); B: 各组裸鼠肿瘤形成的时间($n=5$), 组间比较, $^{***}P<0.001$; C: 各组肿瘤组织的 HE 染色结果。

图4 各组裸鼠体重变化及移植瘤成瘤情况的比较

2.6 移植瘤小鼠各脏器病理情况比较 与空白组比较, 心、肝、肺、肾无异常无转移灶, 解剖裸鼠的肝脏, HepG2 组未发现肝转移现象, Hep3B 出现多个转移灶结节; HE 染色显示, 转移灶边缘嗜碱颜色深, 胞浆嗜碱染色较深, 细胞核大, 核大小相差大, 核浆比较大, 核仁形态不规则, 数目增多, 分裂现象多, 呈典型恶性肿瘤细胞形态, 即肝转移的 Hep3B 肿瘤, 见图 5。

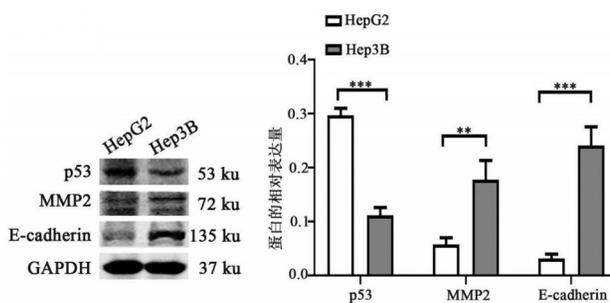
2.7 移植瘤中迁移、侵袭相关蛋白表达差异

Hep3B 移植瘤组织中的 MMP2、E-cadherin 的表达水平高于 HepG2 移植瘤, p53 的表达水平低于 HepG2 移植瘤 ($P<0.01$, $P<0.001$), 见图 6。



A: 各组裸鼠心、肺、肾 HE 染色图; B: 各组裸鼠的肝组织照片 (黑色箭头为转移灶) 及各组裸鼠肝组织的 HE 染色图。

图5 各组裸鼠心、肺、肾、肝的病理情况比较($n=5$)



组间比较, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图6 Western blotting 法检测 p53、MMP2、E-cadherin 蛋白的表达水平

3 讨论

在肿瘤的发生、发展过程中,往往会在中晚期出现形态结构、生长特性、转移能力、侵袭特性以及对放、化疗的敏感性等方面不尽相同的细胞。由此提出了肿瘤异质性观点。目前对不同肿瘤类型和病理分期的个体采用相同治疗方案是肿瘤治疗效果不佳的主要原因之一,因此,根据肿瘤个体分子表型的特征,选择精准治疗和个体化治疗是肿瘤治疗未来发展方向。Journal等^[6]的研究指出,针对受体酪氨酸激酶(RTK)信号通路高表达的肝癌选择So治疗,可获得更高的治疗效率,而当肝癌出现MET和VEGFA位点的扩增则表明除So外,其他RTK抑制剂也可能对肝癌有效。同时,Jochemsen等^[7]的研究提示,野生型p53的肝癌中MDM4表达升高,目前可用的MDM4小分子抑制剂可能对这些肝癌有效。

HepG2源自阿根廷一名高加索男童的原发性肝胚细胞瘤中,为p53野生型的细胞,分化程度较高,生长较快,低转移。Hep3B来自美国男童的肝癌组织,为p53缺失型细胞,分化程度较低,易转移^[8]。本研究发现,HepG2和Hep3B这两株细胞在生长速度、对药物的敏感性、侵袭能力等生物学特性上存在明显的差异,相对于HepG2细胞,Hep3B细胞高表达凋亡抵抗的Bcl-2、Mcl-1蛋白,低表达诱导凋亡的Bax蛋白。有研究表明,肝癌组织中Mcl-1蛋白表达越高,相应Bax蛋白的表达就越低,肝癌的分化就越低,恶性程度越高^[9]。值得注意的是,Mcl-1在肝癌中扩增现象常见,Mcl-1的表达程度与肿瘤细胞对化疗药物的敏感性呈负相关关系^[10-11],Hep3B细胞对DDP、PTX和VP-16的敏感性更低。提示Hep3B分子表型的肝癌的治疗选择常规的化疗药物易出现耐药,或可选择Mcl-1小分子抑制剂用于相应的Mcl-1扩增的肝癌患者的治疗。

p53不仅影响细胞凋亡和细胞衰老,而且p53功能的丧失或变化可能通过影响细胞骨架促进肿瘤细胞侵袭^[12]。MMP2和MMP9是由肝细胞分泌,通过破坏分解细胞外基质促进肿瘤的生长、浸润和转移^[13-15]。多种机制通过调控MMP2的活性来影响肿瘤的转移^[16],已有文献报道,MMP2与甲状腺癌、肺癌、肝癌、口腔癌的发生、发展和转移密切相关^[17-21],并与转移密切相关E-cadherin蛋白在多种类型乳腺癌中具有促进转移的作用^[22]。本研究发现,与

HepG2细胞相比,Hep3B的MMP2和E-cadherin表达明显更高,划痕、Transwell实验结果亦显示Hep3B的迁移、侵袭能力强于HepG2细胞。为了进一步分析和比较HepG2和Hep3B细胞的侵袭和迁移特性,本研究建立了相应的裸鼠皮下移植瘤模型,结果发现,皮下移植Hep3B细胞的裸鼠在肝脏中出现了转移的癌细胞。

综上所述,本研究体内、外实验结果均证实了Hep3B细胞的侵袭、迁移能力强于HepG2细胞,Hep3B的耐药蛋白以及侵袭、迁移相关蛋白表达均高于HepG2,推测这两株细胞生物学行为的差异与细胞的异质性密切相关。研究结果或可为临床上这两种不同生物学特性的肝细胞癌治疗方案的选择提供实验依据,同时也为进一步解决肝癌易转移及耐药问题等提供了方向。

参考文献:

- [1] 杨婉婷,侯恩存.原发性肝癌治疗的研究进展[J].现代肿瘤医学,2016,24(21):3495-3499.
YANG W T, HOU E C. Research progress of primary liver cancer treatment [J]. Journal of Modern Oncology, 2016, 24(21):3495-3499.
- [2] 石兴源,艾亮梅,黄文瑾,等.人非小细胞肺癌A549细胞异质性研究[J].广州医科大学学报,2016,44(6):1-3.
SHI X Y, AI L M, HUANG W J, et al. Heterogeneity of human non-small cell lung cancer cell line A549 [J]. Academic Journal of Guangzhou Medical University, 2016, 44(6):1-3.
- [3] MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future[J]. Cell, 2017, 168(4): 613-628.
- [4] 白日兰,崔久嵬.肿瘤异质性—精准临床诊治的挑战[J].中国肿瘤临床, 2020, 47(21): 1082-1087.
BAI R L, CUI J W. Tumor heterogeneity: the great challenge in precision clinical diagnosis and treatment[J]. Chin J Clin Oncol, 2020, 47(21): 1082-1087.
- [5] 朱明强,丁佑铭.精准医学下的免疫联合疗法在肝癌中的应用研究进展[J].中华肝胆外科杂志, 2022, 28(9): 712-716.
ZHU M Q, DING Y M. Research progress in the application of immunotherapy combined with precision medicine in managing liver cancer [J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2022, 28(9): 712-716.
- [6] CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive and integrative genomic characterization

- of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1327-1341.
- [7] JOCHEMSEN A G. Reactivation of p53 as therapeutic intervention for malignant melanoma[J]. *Curr Opin Oncol*, 2014, 26: 114 - 119.
- [8] 农宜熙,黄俊玲,黄赞松,等. 人肝癌细胞株的特性及其实验应用[J]. *世界华人消化志*, 2017, 25(2): 159-165.
NONG Y X, HUANG J L, HUANG Z S, et al. Characterization and experimental application of human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2017, 25(2): 159-165.
- [9] 罗天平,秦锡虎,朱峰,等. 肝癌组织中 Mcl-1 和 Bax 的表达与临床病理及预后的关系[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2013, 25(2): 131-135.
LUO T P, QIN X H, ZHU F, et al. The relationship between the expression of Mcl-1, Bax and histologic grade, prognosis in human hepatocellular carcinoma [J]. *Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery*, 2013, 25(2): 131-135.
- [10] PEI X Y, DAI Y, FELTHOUSEN J, et al. Circumvention of Mcl-1-dependent drug resistance by simultaneous Chk1 and MEK1/2 inhibition in human multiple myeloma cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e89064.
- [11] WILLIAMS M M, COOK R S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer:could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3519-3530.
- [12] 闫婧伊,郝倩,刘莹,等. p53 在细胞增殖和迁移中对骨架重建的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42(5): 922-927.
YAN J Y, HAO Q, LIU Y, et al. Role of p53 in cytoskeletal reconstruction during cell proliferation and migration [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2020, 42(5): 922-927.
- [13] CHE X, LU R, FU Z, et al. Therapeutic effects of tyrosine-leutide on lung metastasis of human hepatocellular carcinoma SK-HEP-1 and its mechanism affecting ICAM-1 and MMP-2 and -9[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 3357-3368.
- [14] JI Y, XIAO Y, XU L, et al. Drug-bearing supramolecular MMP inhibitor nanofibers for inhibition of metastasis and growth of liver cancer[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, 5(8): 1700867.
- [15] 张淑群,张莹,杨鑫,等. EZH2、MMP-2 及 MMP-9 在肝癌侵袭转移中的作用及关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2019, 40(6): 947-953.
ZHANG S Q, ZHANG Y, YANG X, et al. The role and relationship of EZH2, MMP-2 and MMP-9 in HCC invasion and metastasis [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2019, 40(6): 947-953.
- [16] 柳森森,毛玉宁,张彩勤,等. MMP2 在肿瘤侵袭和转移中的调控机制研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(3): 123-128.
LIU S S, MAO Y N, ZHANG C Q et al. The role of MMP2 in tumor invasion and metastasis [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2022, 32(3): 123-128.
- [17] MURUGAN A K, AL-AMR A, AL-ANSARI M M, et al. Single nucleotide polymorphisms in matrix metalloproteinase 2 (MMP2) enhance BRAFV600E mutation-mediated oncogenicity and invasiveness of papillary thyroid cancer cells[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2021, 28(4):273-289.
- [18] HAN L, SHENG B, ZENG Q, et al. Correlation between MMP2 expression in lung cancer tissues and clinical parameters: a retrospective clinical analysis[J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 283.
- [19] LIU D, KANG H, GAO M, et al. Exosome-transmitted circ_MMP2 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulating MMP2[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(6): 1365-1380.
- [20] TSAI C W, HSU H M, WANG Y C, et al. Contribution of MMP2 promoter genotypes to oral cancer susceptibility, recurrence and metastasis in Taiwan[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12):6821-6826.
- [21] 毛玉宁,柳森森,巩淼淼,等. MMP2 在胃癌侵袭和转移中的作用[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(1):23-30.
MAO Y N, LIU S S, GONG M M, et al. Role of matrix metalloproteinase -2 in the invasion and metastasis of gastric cancer[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2022, 30(1):23-30.
- [22] PADMANABAN V, KROL I, SUHAIL Y, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer[J]. *Nature*, 2019, 573(7774): 439-444.
- 本文引用格式:
黎凤明,王静妮,王春苗,等. 人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞的异质性与生物学行为关系的初探[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(3): 398-405. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.009
LI F M, WANG J N, WANG C M, et al. Preliminary research on the relationship between heterogeneity and biological behavior of human hepatocellular carcinoma HepG2 and Hep3B cells [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2023, 40(3): 398-405. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.03.009