

溶瘤腺病毒 ZD55 对类肝癌干细胞的抑制效应^{*}

张新敏^{**} 张 蓉^{**} 孟树林 谢文杰 王毅刚^{***}

(浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 溶瘤腺病毒能够靶向和杀死癌症干细胞,被认为是一种很有前景的抗癌药物。已有研究表明,溶瘤腺病毒 ZD55 能够靶向肝癌,并且表现出明显的细胞毒性效应。然而,其对肝癌干细胞是否具有同样地杀伤效力仍需进一步探讨。利用悬浮培养富集类肝癌干细胞,并验证其肝癌干细胞的特征。进一步通过 MTT、结晶紫染色、Hoechst 染色、Western blot 和流式细胞术等检测 ZD55 对类肝癌干细胞的细胞存活率、凋亡诱导和病理效应等。结果发现,悬浮培养的类肝癌干细胞具有自我更新和分化能力、高表达干细胞相关转录因子(如 NANOG 和 OCT4)、处于静息状态和具有耐药性等特性,溶瘤腺病毒处理后表现出明显的细胞毒性效应和杀伤特性,类肝癌干细胞的最低生存率仅为 26.7%。ZD55 能够非常明显地诱导类肝癌干细胞凋亡,其凋亡率最高达到 60%。因此,ZD55 可能会成为靶向肝癌干细胞的一种很有前景的治疗药物,对肝癌的临床治疗具有一定的应用价值。

关键词 溶瘤腺病毒, ZD55, 类肝癌干细胞, 抑制效应

学科分类号 R735.7

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0036

肝癌的发病率全球第五,致死率全球第三,其中肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占肝癌的 90%以上^[1]。肝癌恶性程度高,病情进展快,早期症状不明显,一旦出现症状,往往已属中晚期,故治疗难度大。肝癌也是中国最常见的癌症,发病率占世界病例的 50%以上^[2],严重影响了人们的身体健康,因此,展开对肝癌治疗的研究尤为重要。

目前,治疗肝癌的传统方法主要有手术切除、化疗和放疗等,但这些方法一般适用于早期病人,对于晚期病人则难以治愈^[3]。最近研究认为,癌症干细胞使癌细胞在表型和功能上具有异质性^[4],即癌症干细胞处于细胞层次的顶端,它通过分化能产生更多非干细胞子代,在这种情况下,癌症干细胞被认为是推动肿瘤生长和肿瘤耐药、转移而引起复发的原因^[5]。癌症干细胞最早在白血病中被证实存在^[6],随后在脑癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌等实体瘤中被发现^[7-10]。癌症干细胞具有自我更新和分化潜能,以及处于静息状态、耐药性和高成瘤性等特征,故传统的治疗方法不能完全杀伤癌症干细胞,

只能暂时消除癌症,治疗后癌症很可能复发和转移。目前,对肝癌干细胞的研究也有较大进展,多个研究组已经报道了肝癌干细胞高表达一些表面标志物,比如 CD133、CD44、CD90、EpCAM 和 OV6 等^[11-15],肝癌干细胞的概念在许多方面已经被进一步验证,包括自我更新能力、高致瘤性、对化疗和放疗具有抗性,以及导致肝癌愈后复发等。

目前,富集肿瘤干细胞的方法主要有两种:癌症干细胞表面标志物分选和特殊的培养方法富集癌症干细胞。表面标志物的分选会存在一定的不稳定性,因为不同病人存在一定的差异性,不同的细胞系之间也有区别,因此,不同的研究人员会得出不同的癌症干细胞表面标志物。肿瘤细胞的悬浮培养

^{*} 国家自然科学基金(81272687),浙江省自然科学基金(LZ13H160004)和浙江理工大学 521 人才培养计划资助项目。

^{**} 并列第一作者。

^{***} 通讯联系人。

Tel: 0571-86843187, Fax: 0571-86843185

E-mail: wangyigang43@163.com

收稿日期: 2016-01-29, 接受日期: 2016-03-23

是在体外富集肿瘤干细胞的一种培养方法^[6], 该方法即是将癌细胞接种到含有特定培养液的低吸附板中进行悬浮培养, 正常贴壁的癌细胞在这种培养条件下可以形成具有癌症干细胞特性的球状小体, 该小体高表达干细胞转录因子, 对传统化疗药物具有耐药性, 处于静息状态等特点。

溶瘤病毒治疗作为一种新型的治疗方法, 能有效地杀死癌细胞。溶瘤病毒通过多种方式杀死癌细胞, 比如病毒直接感染癌细胞、裂解癌细胞或者通过抑制血管生成和诱导抗肿瘤免疫反应来间接的杀死癌细胞^[17-18]。ZD55 作为一种新的溶瘤腺病毒系统, 通过删除腺病毒 E1B 的 55 ku 改造而成, 对肝癌细胞具有很强的杀伤效果, 但是其对肝癌干细胞的杀伤效果目前还未见报道。因此, 本文利用悬浮培养的方法富集 Huh7 类肝癌干细胞, 并进一步探讨溶瘤腺病毒 ZD55 对该细胞的杀伤效果, 为临床应用提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 Huh7、HepG2、PLC/PRF/5 和溶瘤腺病毒 ZD55 由本实验室保存; 细胞培养液 DMEM、DMEM/F12、胎牛血清 FBS、B27 和 Accutase 消化液购自美国 Gibco 公司; 重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和重组人表皮生长因子(EGF)购自 peprotech 公司; 胰酶细胞消化液、IP 裂解液、蛋白上样缓冲液、1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、Hoechst33342、Tween-20 和细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 蛋白质 marker 购自 Thermo 公司; 5- 氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)、盐酸阿霉素(doxorubicin, DOX)、丝裂霉素(mitomycin, MMC)、硫利达嗪(thioridazine, THO)和结晶紫购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; MTT 购自 Amresco 公司; NANOG、ABCG2、Survivin、XIAP、DR5、STAT3、p-STAT3、ERK、p-ERK 和 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司, OCT4 和 Albumin 抗体购自 AR 公司; 二抗购自联科生物技术有限公司; 超低吸附板(6 孔)购于 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 悬浮培养富集类肝癌干细胞

人肝癌细胞 PLC/PRF/5、Huh7、HepG2 在含有 10% FBS 的 DMEM 细胞培养液中进行正常的贴

壁培养。待细胞长到 80%~90% 缝合度时, 用胰酶消化细胞, 收集细胞并弃去血清, 用无血清的 DMEM/F12 重悬, 计数待用。悬浮培养是在超低吸附 6 孔板中加入 DMEM/F12 无血清培养液进行非贴壁培养, 此培养液中添加了 20 μ g/L bFGF、20 μ g/L EGF、1 $\times$ B27、100 U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素。每孔铺 5×10^4 个细胞, 2 天后, 添加新鲜的含有生长因子的 DMEM/F12 培养液, 4 天后收集类肝癌干细胞球, 1 000 r/min, 离心 5 min, 用 Accutase 消化液消化成单个细胞, 计数待用。

1.2.2 蛋白质印迹(Western blot)检测

将等量的蛋白质样品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后按照湿转膜法转膜(PVDF 膜), 用 5% BSA 封闭 2~3 h, 将 PVDF 膜与 NANOG、ABCG2、Survivin、XIAP、DR5、STAT3、p-STAT3、ERK、p-ERK、GAPDH、OCT4、Albumin 等一抗抗体 4℃ 孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 然后加入相应的二抗, 室温孵育 1~2 h, 再用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后与 ECL 反应, 在超灵敏化学发光仪显影。

1.2.3 克隆形成实验

Huh7 和 Huh7 sphere 细胞被消化成单个细胞, 然后以 1 000 个 / 孔的浓度在含有 10% 血清的 DMEM 培养液的 6 孔板中进行贴壁培养, 10 天后, 弃去上清, 用 4% 多聚甲醛固定细胞之后, 用结晶紫染色, 多于 20 个细胞的克隆被计数。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期

将 Huh7 细胞和 Huh7 sphere 细胞分别用胰酶和 Accutase 消化液消化成单个细胞, 2 000 r/min, 离心 3 min, 用预冷的 PBS 洗 1 次, 弃去上清, 加入 1 ml 75% 的无水乙醇, -20℃ 固定过夜。2 000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清, PBS 洗涤 1 次, 离心后, 可以残留 50 μ l PBS, 轻弹离心管底部, 防止细胞成团。根据碧云天细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每种细胞样品中加入 0.5 ml 染色液, 混匀后, 37℃ 温浴 30 min, 然后在流式细胞仪上检测细胞周期。

1.2.5 MTT 检测细胞活性

细胞以 5 000 个 / 孔的浓度接种到 96 孔板中, 12 h 后, 加入不同 MOI 的 ZD55 病毒或者不同浓度梯度的化疗药物(5-Fu、MMC、DOX、THO), 然后放到 37℃ 5% CO₂ 培养箱里培养。到指定的时间点时, 每孔加入 20 μ l MTT, 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱里培养 4 h 后, 吸掉上清, 每孔加入 150 μ l

DMSO, 放到摇床上震荡 20 min 后, 使晶体完全溶解, 然后放在酶标仪上测 A_{490} 的吸光值, 根据公式计算细胞存活率.

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零孔}})$$

1.2.6 结晶紫染色检测细胞活性

Huh7 sphere 细胞被 Accutase 消化液消化成单个细胞后, 以每孔 2×10^4 个细胞接种到 48 孔板中, 不同 MOI 的 ZD55 病毒感染细胞. 48 h 后, 弃掉培养液, 每孔加入 500 μl 结晶紫, 室温染色 20 min, 弃去结晶紫, 用蒸馏水轻轻洗去残留的结晶紫染液, 放到 37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱里烘干后拍照.

1.2.7 Hoechst33342 染色法检测细胞凋亡

Huh7 sphere 细胞以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板中, 12 h 后, 不同 MOI 的 ZD55 病毒感染细胞. 48 h 后, 加入 1 μl 1 g/L 的 Hoechst33342 染色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱里孵育 30 min, 在荧光显微镜下观察 Huh7 sphere 细胞核的形态.

1.2.8 流式细胞术检测细胞凋亡率

在 6 孔板中以每孔 3×10^5 个细胞接种 Huh7 sphere 细胞, 分别用 PBS、1 MOI ZD55、10 MOI ZD55、20 MOI ZD55 处理细胞, 72 h 后, 收集细

胞培养液以及细胞, 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 用预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 然后用 500 μl 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞, 在分别加入 5 μl FITC 和 10 μl PI, 混匀后, 室温避光孵育 5 min, 流式细胞仪分析.

1.2.9 实验数据的统计学分析

所有实验结果通过均值 $\pm$ 标准差表示. 统计学分析通过 *t*-test 检验进行分析, $P < 0.05$ 时, 具有显著性; $P < 0.01$ 具有非常显著性; $P < 0.001$ 时具有极显著性. 所有实验独立重复 3 次.

2 结 果

2.1 Huh7 sphere 细胞高表达肝癌干细胞相关特性蛋白且具有分化能力

人肝癌细胞 Huh7、HepG2、PLC/PRF/5 经过悬浮培养, 均能形成非贴壁、三维球状小体, 我们称之为 sphere 细胞, 而正常的贴壁细胞为 parent 细胞(图 1a), 标尺为 200 μm . NANOG、OCT4、Survivin 和 XIAP 等在癌症干细胞中高表达^[19-22], 而成熟肝细胞的标志蛋白 Albumin 下调表达^[20]. 另外, 相关信号蛋白的磷酸化水平发生变化(如

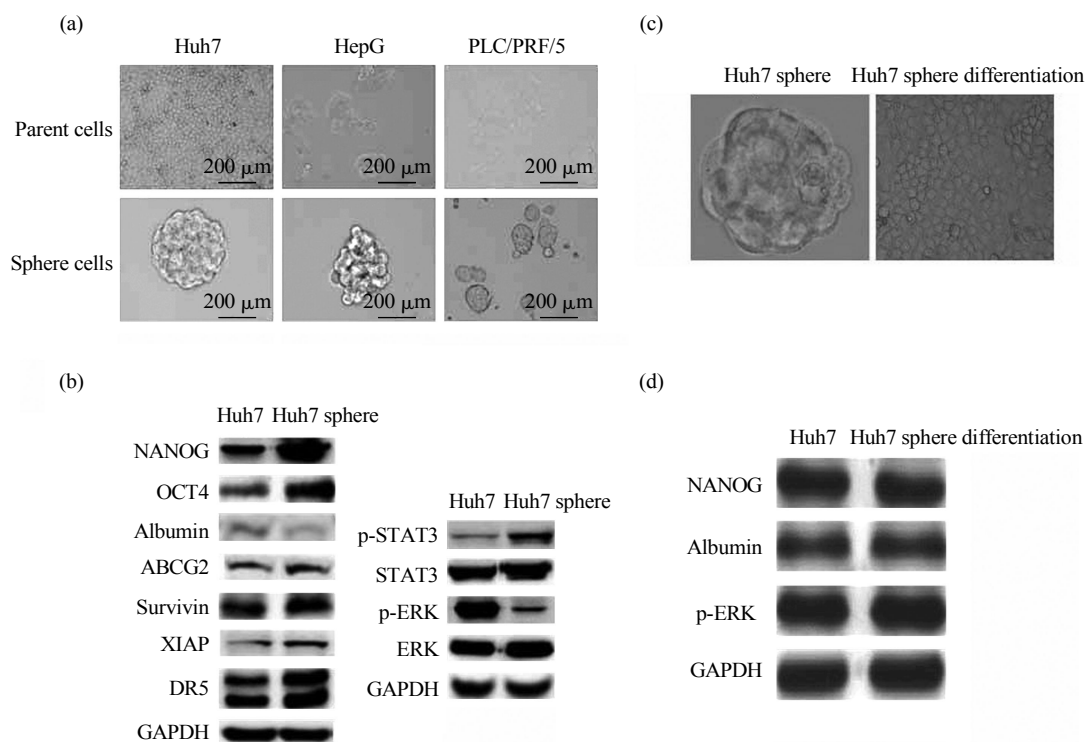


Fig. 1 The upregulated expression of liver cancer stem cell-related proteins and differentiated ability in Huh7 sphere cells
(a) Morphology observation of Huh7, HepG2, PLC/PRF/5 sphere and parent cells. (b) Related protein expression of Huh7 and Huh7 sphere cells. (c) Huh7 sphere cells differentiated to their parental counterparts through culturing adherently in 10% FBS medium by 7 days. (d) NANOG, Albumin, p-ERK protein expression in Huh7 cells and Huh7 sphere differentiation.

STAT3、ERK), 以维持癌症干细胞的自我更新^[23-24]. 最新研究发现, THO 对肿瘤干细胞的特异杀伤能力与细胞表面的多巴胺有关(比如 DR5)^[25]. 通过 Western blot 检测发现, NANOG、OCT4、ABCG2、Survivin、XIAP 和 DR5 在 Huh7 sphere 细胞中均高表达, 而 Albumin 的蛋白水平和 ERK 的磷酸化水平显著下调, 同时 STAT3 的磷酸化水平显著提高(图 1b). 将 Huh7 sphere 细胞在含有 10% 的血清中培养 7 天后, 发现 Huh7 sphere 经血清培养后分化成正常 Huh7 细胞的状态(图 1c, 标尺 400 μm); 我们又提取 Huh7 和 Huh7 sphere 血清培养后的细胞总蛋白, 通过 Western blot 检测了 NANOG、Albumin 和 p-ERK 在 Huh7 sphere 和 Huh7 细胞中表达基本无差别(图 1d), 说明 Huh7

sphere 细胞具有分化能力.

2.2 Huh7 sphere 细胞处于静息状态

处于静息状态是癌症干细胞的主要特征之一. 为了检测悬浮培养富集的 Huh7 sphere 细胞是否处于静息状态, 我们进行了克隆形成和细胞周期分析实验. 结果显示, Huh7 细胞形成的克隆明显多于 Huh7 sphere 细胞克隆, 且大约是 Huh7 sphere 细胞克隆的 3 倍(图 2a). 通过细胞周期检测发现, Huh7 sphere 细胞处于 G0/G1 期的细胞比例为 50.1%, 而 Huh7 为 33.2%, Huh7 sphere 细胞处于 G0/G1 期的细胞的比例明显高于 Huh7 细胞(图 2b). 以上结果表明, 与 Huh7 细胞相比, 更多的 Huh7 sphere 细胞处于静息状态.

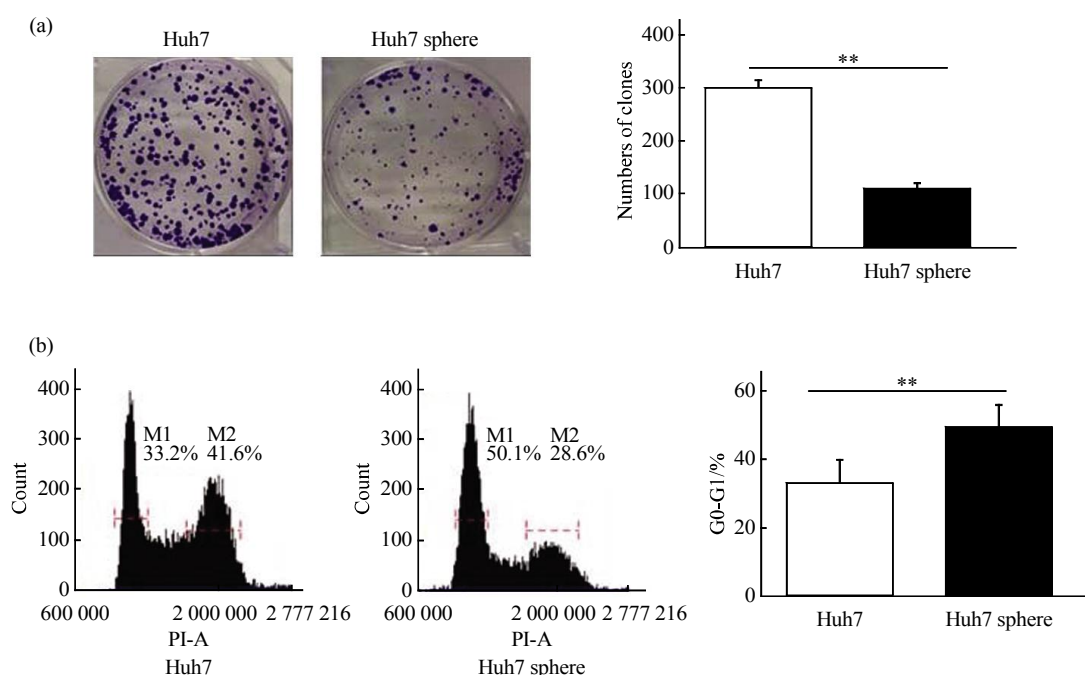


Fig. 2 Huh7 sphere cells exist in the quiescent status

(a) Clone formation assay. The number of clones containing more than 20 cells was counted (** $P < 0.01$). (b) Cell cycles of Huh7 and Huh7 sphere was measured by flow cytometry assay (** $P < 0.01$).

2.3 Huh7 sphere 细胞对化疗药物具有耐药性

对传统化疗药物具有耐药性, 是癌症干细胞的重要特征之一. 因此, 我们检测了 Huh7 sphere 细胞是否也具有耐药性. 以不同浓度的 5-Fu、MMC 和 DOX 等 3 种传统化疗药物处理 Huh7 和 Huh7 sphere 细胞. MTT 染色实验发现, 5-Fu 作用 48 h

后, Huh7 sphere 细胞随着药物浓度的增加其耐药性相对于 Huh7 细胞显著增强. 而当 DOX 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, Huh7 sphere 表现出很明显的耐药性. MMC 处理后, Huh7 sphere 细胞的存活率明显高于 Huh7 细胞. 以上数据表明 Huh7 sphere 细胞对 3 种化疗药物均具有耐药性(图 3).

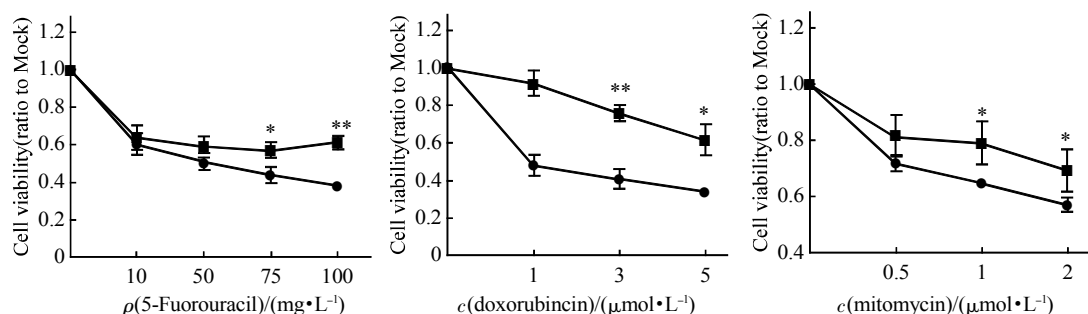


Fig. 3 Huh7 sphere cells are resistance to conventional chemotherapeutics

Huh7 sphere cells displayed apparent resistance to cytotoxic chemotherapy than Huh7 cells after treatment with 5-Fluorouracil, doxorubicin and mitomycin for 2 days. Cell viability was detected with MTT assay and repeated for three times. The relative cell viability was shown by fold change to the corresponding mock (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). ●—●: Huh7; ■—■: Huh7 sphere.

2.4 Huh7 sphere 细胞对 THO 和 ZD55 没有耐药性

用 THO 处理 Huh7 和 Huh7 sphere 细胞, 结果显示, THO 对 Huh7 sphere 细胞具有更好的杀伤效果, 这与 THO 能够识别细胞表面多巴胺受体从而特异性靶向癌症干细胞的结论一致^[23](图 1b, 4a), 同时也说明悬浮培养的 Huh7 sphere 细胞具有类肝癌干细胞特性. 我们接着用不同 MOI(1、5、10、15、20)的 ZD55 病毒处理 Huh7 和 Huh7 sphere 细

胞 48 h 后, 通过 MTT 检测细胞活性发现, ZD55 对 Huh7 细胞和 Huh7 sphere 细胞具有相似的杀伤效果(图 4b). 然而, 相对于小分子药物 THO 而言, 溶瘤腺病毒 ZD55 在各个浓度梯度范围内分别对 Huh7 sphere 细胞和 Huh7 细胞的杀伤程度均无显著差异性, 表明 ZD55 具有自己独特的细胞感染机制, 对 Huh7 sphere 和 Huh7 细胞的杀伤能力更加一致.

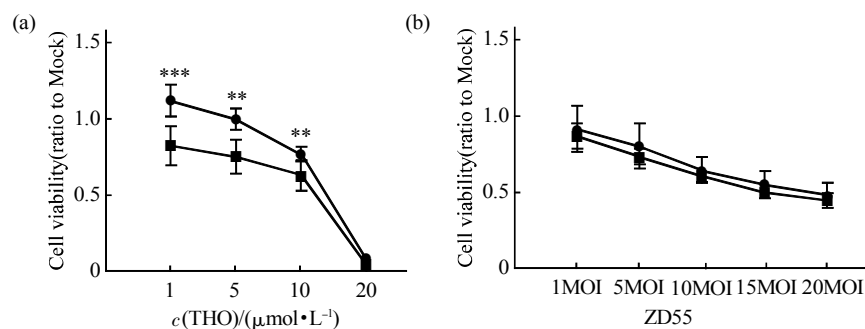


Fig. 4 Huh7 sphere cells are not resistance to THO or ZD55

(a) Assessment of the cell viability of Huh7 and Huh7 sphere cell after treatment with THO. (b) Assessment of the cell viability of Huh7 and Huh7 sphere cell after treatment with ZD55. Cell viability was detected with MTT assay and repeated for three times. The relative cell viability was shown by fold change to the corresponding Mock (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). ●—●: Huh7; ■—■: Huh7 sphere.

2.5 ZD55 有效抑制 Huh7 sphere 细胞的生存率

为了证明 ZD55 对 Huh7 sphere 细胞的抑制效应, 我们用不同 MOI 的 ZD55 感染 Huh7 sphere 细胞, 通过 MTT 实验检测细胞活性发现, ZD55 在作用 24 h 后对 Huh7 sphere 基本无杀伤效果, 但在处理 48 h 后, 其对 Huh7 sphere 细胞杀伤效果随着时间的积累或 MOI 的增加越来越明显(图 5a). 为

了检测是否在作用 24 h 时 Huh7 sphere 细胞对 ZD55 具有耐药性(杀伤效果弱), 我们用不同 MOI 的 ZD55 感染 Huh7 细胞, 24 h 后通过 MTT 检测细胞活性发现, ZD55 对 Huh7 细胞同样基本无杀伤效果(图 5b), 说明 24 h 时病毒颗粒数量还不足以裂解细胞, 故检测不到杀伤效果. 进一步利用结晶紫染色实验检测 ZD55 对 Huh7 sphere 细胞的病

理效应. 结果发现, 随着 MOI 的增加, ZD55 病毒对 Huh7 sphere 细胞的杀伤效果越来越显著(图 5c).

以上实验结果显示, ZD55 能有效地抑制 Huh7 sphere 细胞的存活.

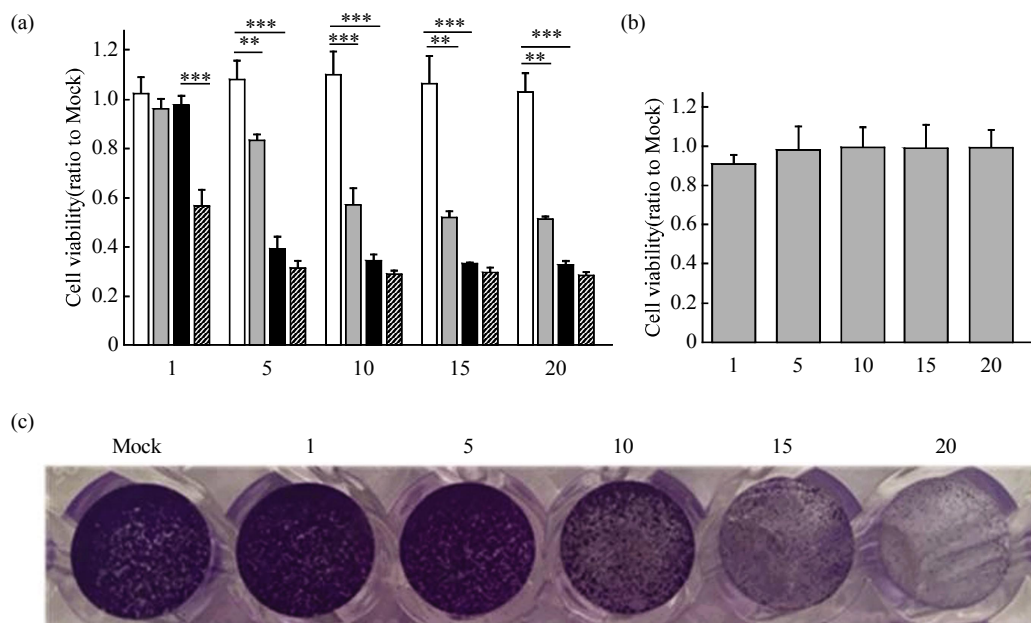


Fig. 5 Inhibiting Effect of ZD55 on Huh7 sphere cells

(a) Cell viability detected of Huh7 sphere cells following treatment with ZD55 at the indicated MOIs by MTT assay. The relative cell viability was shown by fold change to the corresponding mock (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). □: 24 h; ▤: 48 h; ■: 72 h; ▨: 96 h. (b) Cell viability assay of Huh7 cell following treatment with ZD55 at the indicated MOIs after 24 h. (c) Measurement of the cytotoxicity of ZD55 on Huh7 sphere cells by crystal violet staining.

2.6 ZD55 诱导 Huh7 sphere 细胞凋亡

ZD55 对 Huh7 sphere 细胞具有很好的杀伤能力, 我们想知道 ZD55 引起 Huh7 sphere 细胞活性的降低是否由凋亡引起. 用不同 MOI 的 ZD55 病

毒处理 Huh7 sphere 细胞, 48 h 后用 Hoechst33342 进行染色. 结果显示, ZD55 处理后 Huh7 sphere 细胞的核发生碎裂且随着病毒 MOI 的增加, 细胞凋亡的现象越明显(图 6, 标尺为 200 μm).

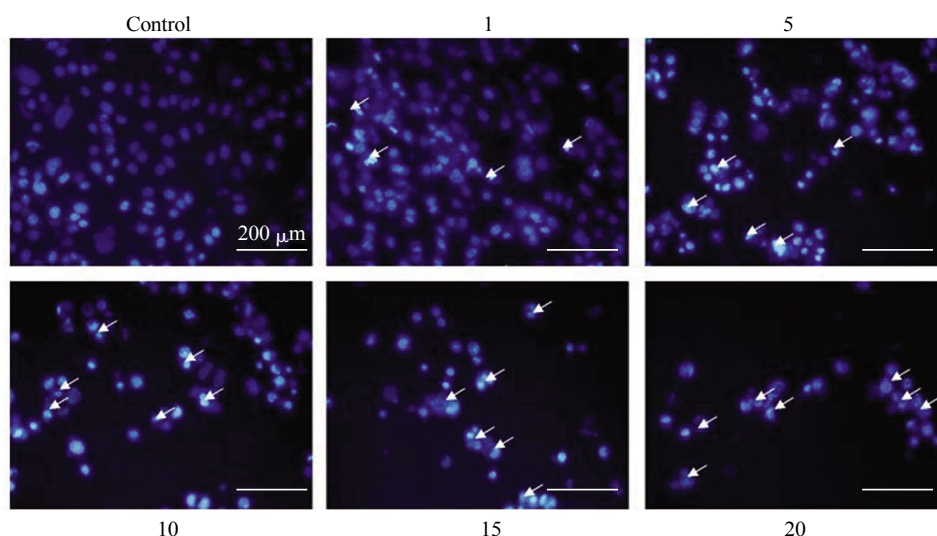


Fig. 6 Apoptosis detection by Hoechst33342 staining

After treated with ZD55 at 1, 5, 10, 15, 20(MOI) for 48 h, Huh7 sphere cells were detected by Hoechst 33342 staining. Uninfected cells served as control.

我们进一步运用流式细胞仪检测 ZD55 对 Huh7 sphere 的杀伤效果是否是通过凋亡实现的. 结果如图 7 所示, 对照组、1 MOI 处理组、10 MOI 处理组和 20 MOI 处理组凋亡率分别为 2.8%、10.9%、27%和 60.9%, 从而表明 ZD55 能够诱导 Huh7 sphere 细胞发生凋亡, 且随着病毒 MOI 的增加, 凋亡现象越明显.

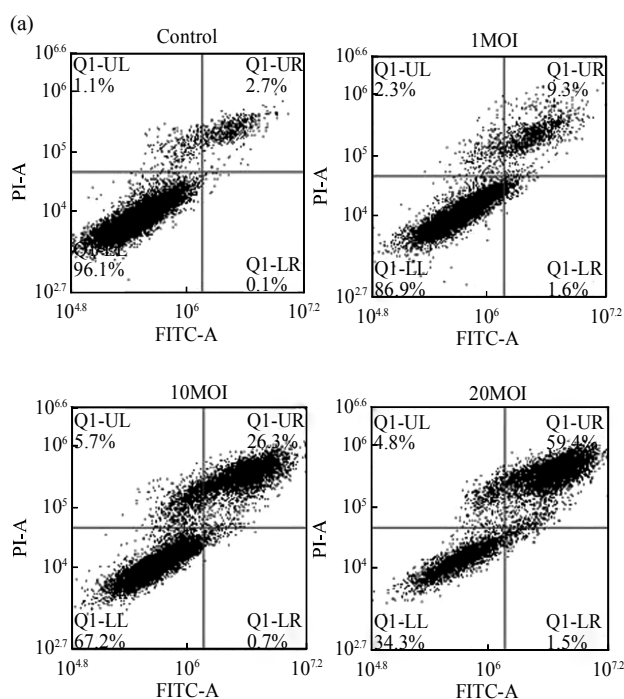


Fig. 7 Apoptosis detection by FACS

(a) After treated with ZD55 at 1, 10, 20(MOI) for 72 h, Huh7 sphere cells were tested by FACS. Uninfected cells served as control. (b) A column drawing representing the mean values of three cytometric assays. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

2.7 Western blot 检测 ZD55 通过 caspase 途径诱导 Huh7 sphere 细胞凋亡

为了检测 ZD55 诱导 Huh7 sphere 细胞凋亡是

否是通过 caspase 途径实现的, 我们通过 Western blot 检测了不同 MOI 的 ZD55 病毒处理 Huh7 sphere 细胞后, 细胞中 PARP 和 caspase 蛋白的表达水平. 结果如图 8 所示, 在病毒 ZD55 处理后, PARP 和 caspase3、caspase8、caspase9 前体都发生了不同程度的剪切, 且随着病毒 MOI 的增大, 剪切程度也随着增大, 可见 ZD55 是通过 caspase 途径诱导 Huh7 sphere 细胞凋亡.

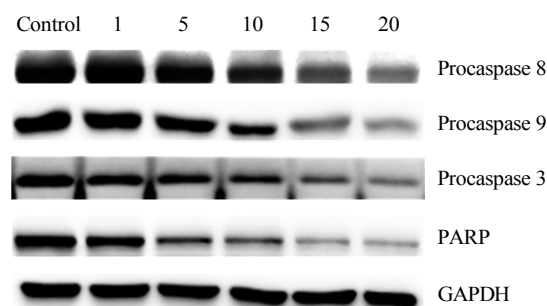


Fig. 8 The expression of apoptosis associated proteins by Western blot analysis

After treated with ZD55 at 1, 5, 10, 15, 20 (MOI) for 48 h, the expression of apoptosis associated protein Huh7 sphere cells were detected by Western blot. Uninfected cells served as control. GAPDH was used as an internal control.

3 结果与讨论

癌症干细胞具有高转移、耐药性和自我更新能力, 是癌症病人死亡率高的根本原因^[9]. 目前, 已有报道通过无血清悬浮培养富集类癌症干细胞^[26]. 我们运用此方法富集 Huh7 类肝癌干细胞并鉴定其具有癌症干细胞特性. 实验表明, 富集的 Huh7 类肝癌干细胞在蛋白质水平上高表达 NANOG、OCT4、ABCG2、Survivin、XIAP、p-STAT3 等, 低表达 p-ERK 和成熟肝癌细胞标志物 Albumin. 其中, NANOG 和 OCT4 是肿瘤干细胞相关转录因子, 在癌症干细胞的自我更新能力方面发挥着重要作用^[19-20]. ABCG2、Survivin 和 XIAP 基因的高表达, 是癌症干细胞具有抗药性的主要原因^[21-22]; p-STAT3 能够结合到 NANOG 的启动子上, 从而激活 NANOG 的转录, 继而维持癌症干细胞的自我更新能力^[23]. 有研究结果表明, 低磷酸化水平的 ERK 在维持干细胞干性方面起着重要作用^[24]. 克隆形成和细胞周期分析实验证明, 悬浮培养的

Huh7 类肝癌干细胞处于静息状态. 在血清存在的情况下, Huh7 类肝癌干细胞可以分化到正常成熟肝癌细胞的状态. 我们进一步发现, 悬浮培养的 Huh7 类肝癌干细胞对传统的化疗药物 (5-Fu、DOX、MMC) 具有耐药性. 总之, 我们通过多方面证明悬浮富集的 Huh7 类肝癌干细胞具有肝癌干细胞的特征.

传统的化疗药物不能有效地消灭肿瘤内的癌症干细胞, 主要原因是癌症干细胞高表达耐药基因, 能够将进入细胞的小分子药物泵出细胞外^[27], 然而, 腺病毒可以避免这一点, 它通过自己特有的感染机制, 进入癌症干细胞后不被泵出细胞外, 表明腺病毒在癌症的治疗中有重要的应用价值^[21-22]. 我们通过 MTT、结晶紫染色实验检测了 ZD55 对 Huh7 细胞和 Huh7 类肝癌干细胞具有同样的杀伤效果, 即 Huh7 类肝癌干细胞对 ZD55 没有明显的耐药性, 且 ZD55 对 Huh7 类肝癌干细胞的杀伤具有剂量依赖性. 此外, 我们也发现 ZD55 能诱导 Huh7 类肝癌干细胞发生凋亡, 显示了其较好的抗肝癌干细胞前景.

我们可以通过进一步改造 ZD55 病毒来增强对肝癌干细胞的靶向能力和杀伤能力. 比如通过改造病毒 E1A 启动子, 使病毒在肝癌干细胞中具有更强的复制能力, 可以携带一些外源抑癌基因, 从而提高病毒的抗癌效果, 携带肝癌干细胞特异性抑制因子靶向关键转录因子, 从而影响肝癌干细胞的功能等.

最近发现, 乳腺癌干细胞和乳腺癌细胞之间可以相互转化^[28], 即乳腺癌干细胞可以分化成乳腺癌细胞, 乳腺癌细胞同样可以转化成乳腺癌干细胞. 我们猜测, 这种可逆性不仅在乳腺癌中, 也可能存在于其他类型的癌症中(如肝癌), 以促使恶性肿瘤细胞转移, 引起肿瘤的复发. 因此, 要想完全治愈肝癌患者, 最理想的药物应是既能有效地杀死肝癌细胞, 也能以同样的效力杀死肝癌干细胞, 只有打破癌症干细胞和非癌症干细胞这两者相互转化之间的平衡, 才能最终消灭肿瘤. 因此, ZD55 可能作为临床上治疗肝癌很有前景的药物, 但其具体的作用机制和作用方式还需要进一步探索.

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics, 2014. CA Cancer J Clin, 2014, **64**(1): 9-29
- [2] Nordenstedt H, White D L, El-Serag H B. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. Dig Liver Dis, 2010, **42**(Suppl 3): S206-214
- [3] Wang Y, Huang F, Cai H, *et al.* Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma. J Gene Med, 2008, **10**(5): 518-526
- [4] Magee J A, Piskounova E, Morrison S J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. Cancer Cell, 2012, **21**(3): 283-296
- [5] Meacham C E, Morrison S J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. Nature, 2013, **501**(7467): 328-337
- [6] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature, 1994, **367**(6464): 645-648
- [7] Singh S K, Clarke I D, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res, 2003, **63** (18): 5821-5828
- [8] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, **100**(7): 3983-3988
- [9] Wang P, Suo Z, Wang M, *et al.* *In vitro* and *in vivo* properties of CD133 expressing cells from human lung cancer cell lines. Exp Hematol Oncol, 2013, **2**(1): 16
- [10] Ricci-Vitiani L, Lombardi D G, Pilozzi E, *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature, 2007, **445**(7123): 111-115
- [11] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, *et al.* Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. Cancer Cell, 2008, **13** (2): 153-166
- [12] Zhu Z, Hao X, Yan M, *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer, 2010, **126**(9): 2067-2078
- [13] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, *et al.* Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci, 2010, **101** (10): 2145-2155
- [14] Ma S, Chan K W, Hu L, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. Gastroenterology, 2007, **132**(7): 2542-2556
- [15] Yang W, Yan H X, Chen L, *et al.* Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. Cancer Res, 2008, **68**(11): 4287-4295
- [16] Kai K, Nagano O, Sugihara E, *et al.* Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. Cancer Sci, 2009, **100**(12): 2275-2282
- [17] Guo Z S, Bartlett D L. Oncolytic viruses as platform for multimodal cancer therapeutics: a promising land. Cancer Gene Ther, 2014, **21**(7): 261-263
- [18] Russell S J, Peng K W, Bell J C. Oncolytic virotherapy. Nat Biotechnol, 2012, **30**(7): 658-670
- [19] Huang P, Qiu J, Li B, *et al.* Role of Sox2 and Oct4 in predicting

- survival of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. Clin Biochem, 2011, **44**(8-9): 582-589
- [20] Shan J, Shen J, Liu L, *et al.* Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. Hepatology, 2012, **56**(3): 1004-1014
- [21] Yang Y, Xu H, Shen J, *et al.* RGD-modified oncolytic adenovirus exhibited potent cytotoxic effect on CAR-negative bladder cancer-initiating cells. Cell Death Dis, 2015, **6**: e1760
- [22] Yang Y, Xu H, Huang W, *et al.* Targeting lung cancer stem-like cells with TRAIL gene armed oncolytic adenovirus. J Cell Mol Med, 2015, **19**(5): 915-923
- [23] Lee T K, Castilho A, Cheung V C, *et al.* CD24(+) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. Cell Stem Cell, 2011, **9**(1): 50-63
- [24] Gu H, Li Q, Huang S, *et al.* Mitochondrial E3 ligase March5 maintains stemness of mouse ES cells *via* suppression of ERK signalling. Nat Commun, 2015, **6**: 7112
- [25] Sachlos E, Risueño R M, Laronde S, *et al.* Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. cell, 2012, **149**(6): 1284-1297
- [26] Cao L, Zhou Y, Zhai B, *et al.* Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. BMC Gastroenterol, 2011, **11**: 71
- [27] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, 2005, **5**(4): 275-284
- [28] Chaffer C L, Brueckmann I, Scheel C, *et al.* Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(19): 7950-7955

Inhibiting Effect of Oncolytic Adenovirus ZD55 on Liver Cancer Stem-like Cell*

ZHANG Xin-Min**, ZHANG Rong**, MENG Shu-Lin, XIE Wen-Jie, WANG Yi-Gang***

(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Oncolytic adenovirus could target and kill cancer stem cells and recognized as a promising anticancer agent. Our previous studies showed that oncolytic adenovirus ZD55 was developed to target liver cancer and exhibited obvious cytotoxicity effect. However, it still remained to be confirmed that whether ZD55 could also effectively eliminate liver cancer stem cells. We first utilized the suspension culture to enrich the liver cancer stem-like cells and validate the properties of acquired liver cancer stem cells. Further, we use MTT, Hoechst staining, Western blot, flow cytometry assay to detect cell viability, apoptotic effect and cytopathic effect in liver cancer stem-like cells after treatment with ZD55. The results indicated that liver cancer stem-like cells had the features of self-renewal, differentiation, high expression of cancer stem cell-related transcription factors (eg. NANOG and OCT4), quiescence, chemo-resistance. Oncolytic virus ZD55 resulted in obvious cytotoxicity and killing effect (the minimum cell viability for Huh7 sphere is 26.7%) on liver cancer stem-like cells, and induced significant cell apoptosis (the maximum apoptosis rate for Huh7 sphere is 60%). Thus, ZD55 might virtually represent an attractive therapeutic agent for targeting liver cancer stem cells to achieve better clinical outcome for HCC patients.

Key words oncolytic adenovirus, ZD55, liver cancer stem-like cells, inhibiting effect

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0036

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81272687), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LZ13H160004) and 521 Talent Project of Zhejiang Sci-Tech University.

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-571-86843187, Fax: 86-571-86843185, E-mail: wangyigang43@163.com

Received: January 29, 2016 Accepted: March 23, 2016