

靶向 Wnt 信号的溶瘤腺病毒抑制肝癌干细胞研究*

章 健 来维洁 李 强 金 瑾 肖伯端 郭 婉 王毅刚**

(浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018)

摘要 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第五大癌症并成为癌症死亡的主要原因, 传统治疗早期肝癌取得了一定的进展, 但是癌症的复发、转移和耐药仍未得到根本解决, 这些现象可通过癌症干细胞理论(cancer stem cell, CSC)进行解释. 本研究通过悬浮富集培养的方法, 获得了 MHCC-97H 细胞的三维立体球细胞(sphere cell), 并检测其干细胞特性, 通过删除 5 型腺病毒的 E1A CR2 区域 24 bp 碱基, 并用 Wnt 活性转录元件 TCF/TEF 调控 E1A 基因表达, 同时插入抗癌基因 TSLC1, 得到了双靶向溶瘤腺病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1, 通过 MTT、结晶紫染色实验、Hoechst、细胞划痕、蛋白质印迹技术、Transwell 及免疫荧光技术检测重组病毒对肝癌类干细胞的 EMT(epithelial-mesenchymal transition)转化、杀伤、凋亡以及迁移的作用. 结果表明, 悬浮富集培养的 MHCC-97H sphere 细胞具有自我更新、分化能力、静息性以及耐药性, 高表达肝癌干细胞表面标志物(如 CD133 等), 重组病毒处理后表现出明显的杀伤效果及抑制细胞迁移与侵袭的特性, 靶向抑制 MHCC-97H sphere 细胞能力更强($P < 0.001$), 且重组病毒能有效诱导肝癌类干细胞通过 caspase 途径发生凋亡. 因此, 重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 有可能成为靶向肝癌干细胞的治疗药物, 具有一定的临床应用前景.

关键词 肝癌类干细胞, 溶瘤腺病毒, Wnt 信号通路, TSLC1

学科分类号 R735.7

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0380

根据《2015 中国癌症统计》显示, 中国 2015 年有 429.2 万例癌症新发病例以及 281.4 万例癌症死亡病例. 随着发病率和死亡率的增加, 癌症已经成为中国人群死亡的首要原因和主要的公共健康问题^[1]. 肝癌是目前全球第五大常见的癌症, 并成为癌症死亡的主要原因之一. 目前通过手术、化疗以及传统抗癌药物等方式能有效消除肿瘤组织, 但是在对术后患者的统计分析可以得出, 现有的治疗方法对于治疗癌症的复发以及转移的效果不佳, 这可以由癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)理论来解释.

自从 CSC 首次在血液恶性肿瘤被证实^[2], 近年来科研人员在越来越多的其他器官恶性肿瘤中也发现 CSC 的存在, 证明了肿瘤干细胞与肿瘤发生之间的关系. 当前的研究发现肝癌中存在一种介于成熟肝细胞和肝癌细胞之间的混合型细胞, 免疫分析显示, 28%~50%的肝癌高度表达干细胞表面标志物如 CK7 和 CK9^[3], 而且 CK7 与 CK19 的表达情

况与手术切除和肝移植后的复发率也有关联^[4]目前多个研究表明, Wnt/ β -catenin^[5]、Notch^[6]、Hedgehog、FGF、TGF- β /BMP 信号网络涉及维持组织内稳态, 调节正常干细胞的自我更新和祖细胞的增殖或分化^[7-9].

TSLC1(tumor suppressor of lung cancer 1)是一种新型肿瘤抑制基因, 是免疫球蛋白超家族的成员^[10], 全长约 300 kb, 编码生成 422 个氨基酸残基的跨膜糖蛋白. 在绝大多数的肿瘤细胞中都能发现 TSLC1 的异常表达, 其中 TSLC1 的失活会引起细胞黏附损伤, 促使肿瘤转移和生长. 目前已有研究表明 TSLC1 对肝癌细胞有较好的抑制作用^[11], 但

* 国家自然科学基金(81272687), 浙江省自然科学基金(LZ13H160004, LY16H160056)和浙江省大学生科技创新活动计划(2016R406007)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86843187, E-mail: wangyigang43@163.com

收稿日期: 2016-12-10, 接受日期: 2017-03-17

是对于肝癌类干细胞的研究还未出现. TSLC1 还可以激活凋亡蛋白酶 caspase3 引起细胞的凋亡^[12], 而 caspase3 的最重要底物是多聚(ADP- 核糖)聚合酶 PARP, 所以 TSLC1 可能与 Wnt 信号通路的 β -catenin 和 APC 作用, 通过诱导细胞凋亡抑制肿瘤细胞的增殖.

1 材料与方法

1.1 实验材料

肝癌细胞株 MHCC-97H 由本实验室保存; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存. 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; 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; 胰酶细胞消化液、IP 裂解液、蛋白上样缓冲液、1 mol/L Tris-HCl、1.5 mol/L Tris-HCl、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; 结晶紫购自 Sigma 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; MTT 购自 Amresco 公司; Survivin、XIAP、ERK、E-cadherin、N-cadherin 抗体购自 Cell Signaling Technology 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 引物序列

本研究使用的引物列于表 1.

Table 1 Primer sequences for recombinant virus identification and quantitative RT-PCR

Primers	Sequences
GAPDH-forward	5' TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC 3'
GAPDH-reverse	5' TGGAAGATGGTGATGGGAT 3'
OCT4-forward	5' CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA 3'
OCT4-reverse	5' CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA 3'
EpCAM- forward	5' GCGGCTCAGAGAGACTGTG 3'
EpCAM- reverse	5' CCAAGCATTTAGACGCCAGTTT 3'
CD24-forward	5' TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC 3'
CD24-reverse	5' GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA 3'
CD133-forward	5' AAGCATTGGCATCTTCTATGG 3'
CD133-reverse	5' AAGCACAGAGGGTCATTGAGA 3'
CD90-forward	5' GACCCGTGAGACAAAGAAGC 3'
CD90-reverse	5' GCCCTCACACTTGACCAGTT 3'
ABCG2-forward	5' GTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTT 3'
ABCG2-reverse	5' TCCTCCAGACACACCACGGATA 3'

2 研究方法

2.1 溶瘤腺病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24)-TSLC1 的制备及鉴定

将腺病毒 E1A 基因的启动子删除并替换 Wnt 活性转录元件 TCF/TEF 获得靶向病毒载体 pshuttle-TCF/TEF-E1A (Δ 24), 同时将抗癌基因 TSLC1 克隆进该载体, 得到了双靶向溶瘤腺病毒穿梭载体 pshuttle-TCF/TEF-E1A(Δ 24)-TSLC1, 可用于溶瘤病毒的重组(图 1a). 利用同源重组的方式将穿梭载体 pshuttle-TCF/TEF-E1A(Δ 24)-TSLC1 转化含有腺病毒骨架质粒 Pa deasy-1 的 BJ5183, 得到腺病毒基因组 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1, 通过 *Pme* I 线性化后转染 HEK293 细胞获得溶瘤病毒 Ad.wnt-E1A (Δ 24 bp)-TSLC1. 对照病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-EGFP 构建策略相同(图 1b).

2.2 悬浮富集培养肝癌类干细胞及干细胞特征检测

在超低吸附 6 孔板中加入 DMEM/F12 无血清培养液进行非贴壁的培养, 此培养液中添加了 20 g/L bFGF、20 g/L EGF、1 $\times$ B27、20 g/L IGF、100U/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素. 每孔铺 1 $\times$ 10⁵ 个细胞, 2 天后, 添加含生长因子的新鲜培养液 2 ml, 4 天后收集类肝癌干细胞球, 1 000 r/min, 离心 5 min, 用 Accustase 消化液消化成单个细胞, 计数待用. 通过蛋白质印迹(Western blot)及定量 RT-PCR 检测肝癌干细胞标志物(如 CD133、CD24、EpCAM 等)在 sphere 细胞中的表达情况.

2.3 MTT 及结晶紫染色检测病毒对肝癌细胞的杀伤效果

细胞以 3 000 个 / 孔的浓度接种到 96 孔板中, 12 h 后, 加入不同 MOI 的目的病毒 Ad.wnt-E1A (Δ 24 bp)-TSLC1 以及对照病毒, 放置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱里培养到指定的时间点, 每孔加入 20 μ l MTT, 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱里培养 4 h 后, 吸掉上清, 每孔加入 150 μ l 的 DMSO, 放到摇床上震荡 20 min 后, 放在酶标仪上测吸光度(A₄₉₀), 然后根据公式计算细胞存活率. 细胞存活率=(实验组吸光值-调零组吸光值)/(对照组吸光值-调零孔吸光值) $\times$ 100%; 通过结晶紫实验检测重组病毒对肝癌类干细胞的病理作用.

2.4 Hoechst33342 染色检测细胞凋亡及凋亡途径检测

以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板中, 12 h 后, 不同 MOI 的 Ad.wnt-E1A(Δ 24)-TSLC1 病毒感

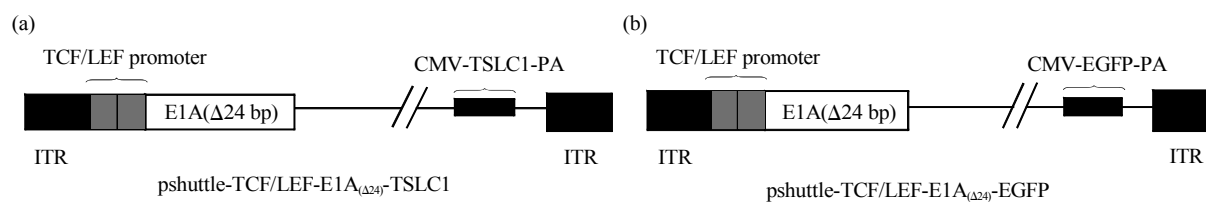


Fig. 1 The Strategy of shuttle plasmid of target virus pshuttle-TCF/LEF-E1A(Δ24 bp)-TSLC1 and control virus

染细胞 48 h 后, 加入 $1 \mu\text{l}$ 10 g/L 的 Hoechst33342 染色液, 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱里孵育 30 min, 在荧光显微镜下观察 normal 97 h 及 sphere 97 h 细胞核的形态. 通过 Western blot 检测 caspase-3, caspase-9 及 PARP 在病毒处理后的表达情况, 检测重组病毒是否通过 caspase 途径诱导细胞凋亡.

2.5 流式细胞术检测重组病毒诱导细胞凋亡

将细胞用胰酶和 Accutase 消化液消化成单个细胞, 1000 r/min , 离心 5 min, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 弃去上清, 可以残留 $50 \mu\text{l}$ PBS, 轻弹离心管底部, 防止细胞成团. 根据 BD 公司细胞凋亡检测试剂盒说明书, 每种细胞样品中加入 $100 \mu\text{l}$ 结合缓冲液, $5 \mu\text{l}$ FITC Annexin V, $5 \mu\text{l}$ PI 染色液, 混匀后, 37°C 温浴 15 min, 加入 $400 \mu\text{l}$ 结合缓冲液, 然后在流式细胞仪上检测细胞周期.

2.6 细胞划痕检测重组病毒抑制肝癌类干细胞迁移

首先用直尺和记号笔在 6 孔板背后均匀地划横线, 大约每隔 $0.5 \sim 1 \text{ cm}$ 1 道, 每孔至少穿过 5 条线; 每个孔铺 3×10^5 个细胞, 具体数量因细胞不同而异; 第 2 天用加样器头比着直尺进行划痕, 不能太用力, 加样器头要垂直, 不能倾斜; 划好后, 用 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入新鲜的培养液; 加入不同 MOI 的病毒, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中进行培养, 24 h, 48 h 后显微镜观察细胞.

2.7 Transwell 小室检测重组病毒抑制细胞侵袭及迁移

实验前晚将实验所需的 24 孔板及小室放于 -20°C 预冷, 并将 Matrigel 放于 4°C 溶解, 将细胞培养液换成无血清培养液饥饿处理. 小室上层铺 Matrigel, 每个小室底部加 $70 \mu\text{l}$, 37°C 使其凝固, 24 孔板中, 下室加 $500 \mu\text{l}$ $10\% \text{ FBS} + \text{DMEM}$, 上室加 $200 \mu\text{l}$ $2\% \text{ FBS} + \text{DMEM}$, 每孔加 1×10^5 个细胞. 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养 24 h 后, 结晶紫染色后, 用湿润的棉签擦去基质胶和没有侵袭的细胞, 将

Transwell 小室反过来用显微镜观察, 拍照.

2.8 免疫荧光检测重组病毒抑制肝癌类干细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)

细胞以每孔 5×10^4 个接种到 24 孔板中, 每孔加完全培养液 $500 \mu\text{l}$, 24 h 后每孔加入 10MOI 的病毒 $50 \mu\text{l}$, 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 培养 48 h 后吸去培养液, 用 PBS 洗 3 次, 沿壁缓慢加入 4% 多聚甲醛, 每孔 1 ml , 室温放置 $15 \sim 20 \text{ min}$ 固定细胞. 用 PBS 洗去多聚甲醛, 每孔加入 $500 \mu\text{l}$ $5\% \text{ BSA}$ 封闭, 室温孵育 1 h, 用 PBS(含 $1\% \text{ BSA}$)洗去 BSA, 加入 E 钙黏素(E-cadherin)及 N 钙黏素(N-cadherin)抗体, 4°C 孵育过夜, 用 PBS 洗去一抗(3 遍, 摇床 10 min/次), 二抗孵育 1 h(37°C , 避光), 用 PBS 洗去二抗(3 遍, 摇床 10 min/次), DAPI 染色, 室温 5 min, 用 PBS 洗去染液(3 遍, 摇床 10 min/次), 用抗荧光猝灭封片液封片, 周围用指甲油固定, 于暗盒中 4°C 保存. 用共聚焦显微镜进行观察.

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.

3 实验结果

3.1 MHCC-97H sphere 细胞表现类干细胞特性且具分化能力

人源肝癌细胞 MHCC-97H 细胞经过无血清悬浮培养能形成三维悬浮, 体型均一的球体细胞, 我们称之为 sphere 细胞, 正常贴壁生长的细胞为 normal 细胞(图 2a, 右上角为细节放大图); 存活蛋白(survivin)和 XIAP 为癌症干细胞高表达蛋白^[13-14]; CD133^[15]、CD24^[16]、CD90、ABCG2^[17]、EpCAM^[18]及 OCT4 目前已经被证实为肝癌表面标志物. ERK 的磷酸化水平变化与维持干细胞的自我更新能力有关^[19]. 通过 Western blot 检测发现, 癌症干细胞特

异性蛋白 survivin 和 XIAP 表达上调, 而 ERK 的磷酸化水平下调明显(图 2b). 通过 RT-PCR 检测发现, 肝癌类干细胞在分子水平高表达 CD133、CD24、CD90、ABCG2、EpCAM 及 OCT4 等肝癌干细胞表面标志物(图 2d); 我们将 97H sphere 细胞用 DMEM+10%FBS 培养液培养 7 天后, 发现细胞

能正常贴壁生长, 细胞形态与 normal 细胞相同. 用 Western blot 技术检测发现 survivin、XIAP 和 ERK 在血清培养液中培养的 normal 细胞和 sphere 细胞中表达无差异(图 2c). 实验表明, 富集培养得到的 MHCC-97H sphere 细胞具有类干细胞特性.

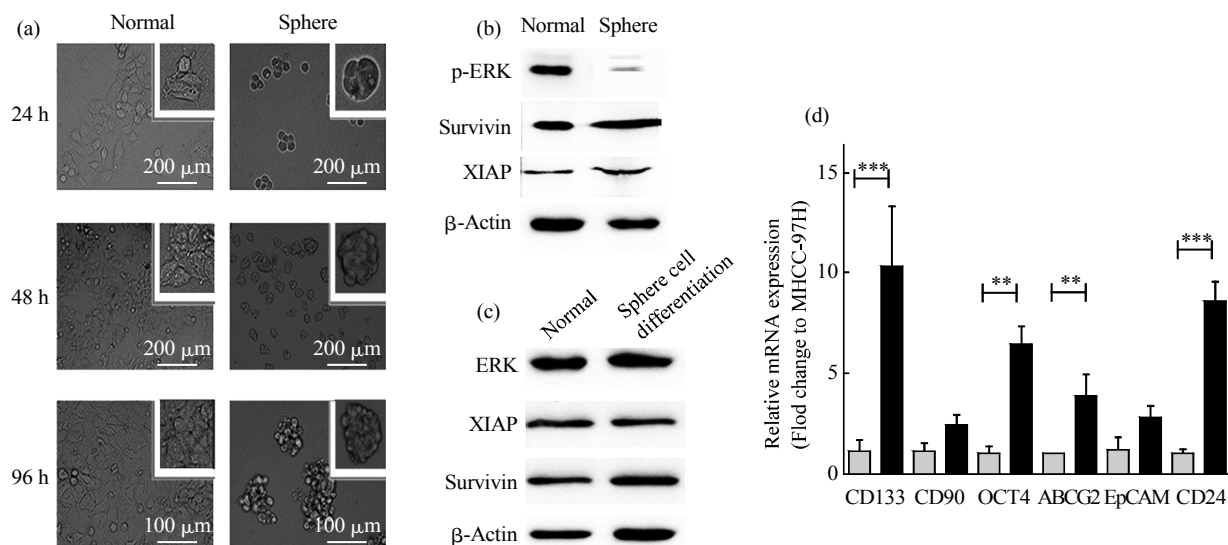


Fig. 2 Suspension culture of hepatocellular stem cells and detections of tumor stem cell marker protein

(a) Human hepatocarcinoma cell MHCC-97H can form a uniform body of spherical cells after suspension-free serum suspension culture, which we called sphere cell. (b) Detection of tumor stem cell marker protein-ERK. (c) Detection of tumor stem cell marker protein, survivin. (d) Detection of tumor stem cell marker protein, XIAP. (e) MHCC-97H sphere cells were cultured in DMEM + 10% FBS for 7 days. ERK, XIAP and survivin protein expression in MHCC-97H normal cell and MHCC-97H sphere differentiation cell. □: MHCC-97H normal; ■: MHCC-97H Sphere.

最近研究发现, 肿瘤干细胞具有间质细胞的特性, 高表达间质细胞标志蛋白(如 N-cadherin)^[20], 我们通过化学免疫荧光和激光共聚焦技术, 检测 MHCC-97H normal 细胞和 MHCC-97H sphere 细胞中 N-cadherin 表达情况, 结果表明 N-cadherin 在肝癌类干细胞中高表达而在 MHCC-97H normal 细胞中下调表达直至丢失(图 3b 标尺 50 μm). 肿瘤干细胞具有静息性的特点, 为此我们通过流式细胞术检测 MHCC-97H normal 及 MHCC-97H sphere 细胞的细胞周期, 实验结果表明, 肝癌类干细胞中有 75.3% 的细胞处于 G1 期, 而正常贴壁生长的肝癌细胞只有 50.9%, 说明富集培养得到的肝癌类干细胞具有静息的特性(图 3a).

3.2 MHCC-97H sphere 细胞对化疗药物具耐药性

对化疗药物具耐药性也是肿瘤干细胞的特性之一, 我们为检测 MHCC-97H sphere 细胞是否也具有耐药性, 通过不同浓度的盐酸阿霉素(doxorubicin)、木犀草素(luteolin)和阿司匹林(aspirin) 3 种肿瘤治疗药物处理 MHCC-97H normal 细胞和 MHCC-97H sphere 细胞 48 h, MTT 检测发现, aspirin 处理 48 h 后, MHCC-97H sphere 细胞的耐药性随着药物浓度增加而显著提高, doxorubicin 浓度为 0.06 mmol/L 时, MHCC-97H sphere 细胞表现出很明显的耐药性, luteolin 处理 48 h 后, MHCC-97H sphere 细胞相对 MHCC-97H normal 细胞表现更强的耐药性. 以上实验结果表明, MHCC-97H sphere 细胞对 3 种肿瘤治疗药物均有耐药性.

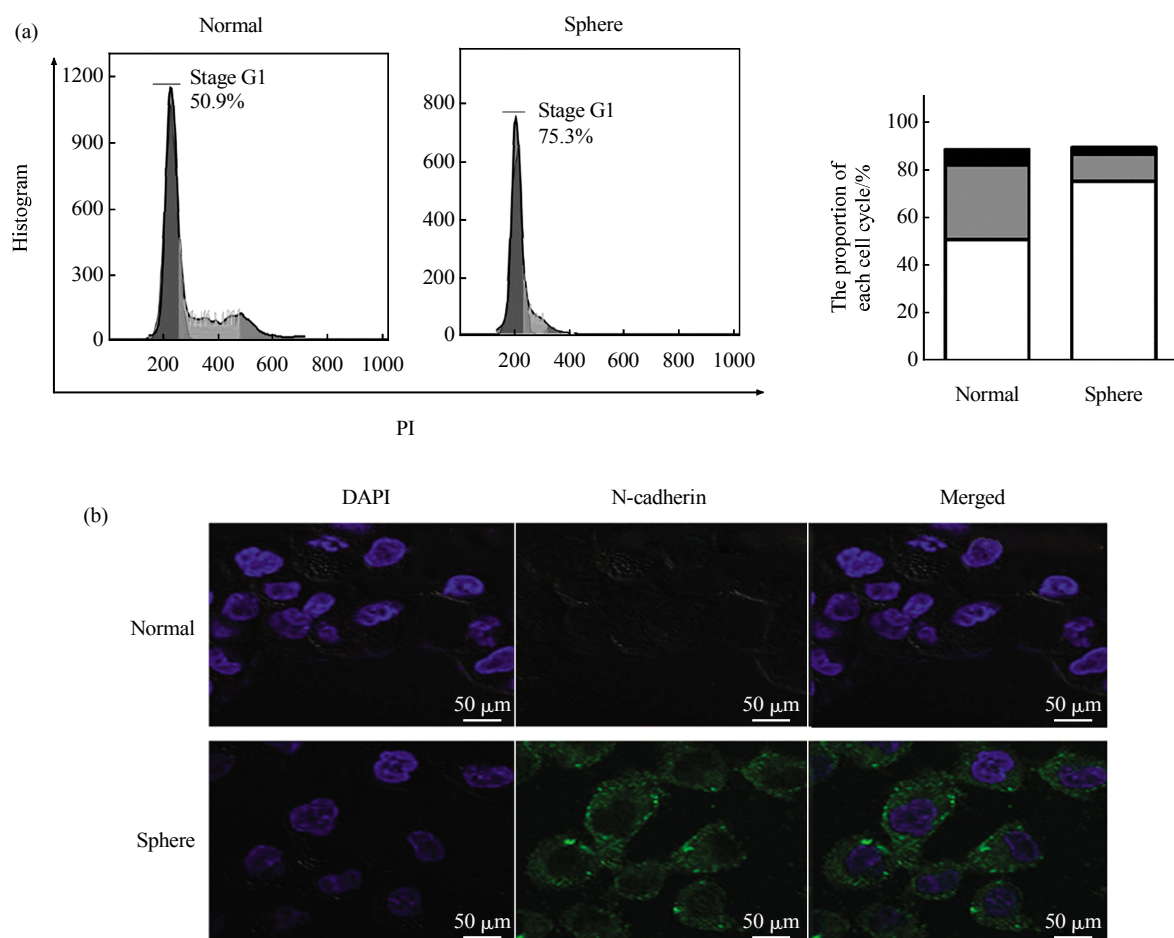


Fig. 3 Liver cancer stem cell cycle and interstitial feature detection

(a) Flow cytometry was used to detect the cell cycle of MHCC-97H normal cell and MHCC-97H sphere cell. □ : G0/G1 phase; ▨ : S phase; ■ : G2/M phase. (b) The expression of N-cadherin in MHCC-97H normal and MHCC-97H sphere cells was detected by laser confocal microscopy.

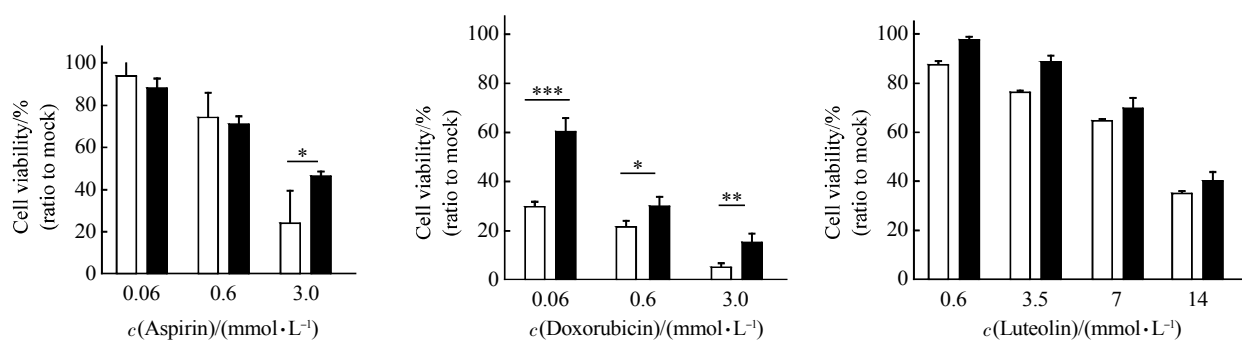


Fig. 4 MHCC-97H sphere cells resistant to traditional chemotherapeutic drugs

After treatment with aspirin for 48h, the drug resistance of MHCC-97H sphere cells increased significantly with the increase of drug concentration. When doxorubicin concentration was 0.06 $\mu\text{mol/L}$, the cells of MHCC-97H showed obvious drug resistance. After 48 h treatment with luteolin, MHCC-97H sphere cells showed stronger resistance to MHCC-97H normal cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). □ : Normal; ■ : Sphere.

3.3 目的病毒 Ad.wnt-E1A ($\Delta 24$ bp)-TSLC1 能抑制 MHCC 97H sphere 细胞的生存率

为了证明重组病毒对 MHCC 97H sphere 细胞的抑制作用, 我们用不同 MOI 的目的病毒感染 97H sphere 细胞以及 97H normal 细胞, 同时用对照病毒 Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-EGFP 设定对照组. 实验表明, 目的病毒对 97H normal 细胞以及 97H sphere 细胞有抑制作用, 对 normal 细胞的杀伤效果随病毒 MOI 的增加越来越显著(图 5a). 为了证明目的病毒对肝癌类干细胞的杀伤效果, 我们通过

MTT 检测细胞活力实验, 发现目的病毒对 sphere 细胞的杀伤效果明显高于对 normal 细胞(图 5b). 为了进一步证明目的病毒对 MHCC 97H 细胞的抑制作用, 我们用结晶紫实验检测病毒对细胞的病理效应. 结晶紫实验表明随着病毒 MOI 的增加, 病毒对 MHCC 97H 细胞的杀伤效果越来越明显(图 5c). 以上实验表明, 目的病毒 Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-TSLC1 能较好地抑制 MHCC-97H 细胞的存活, 并对 MHCC-97H sphere 细胞的抑制效果更明显.

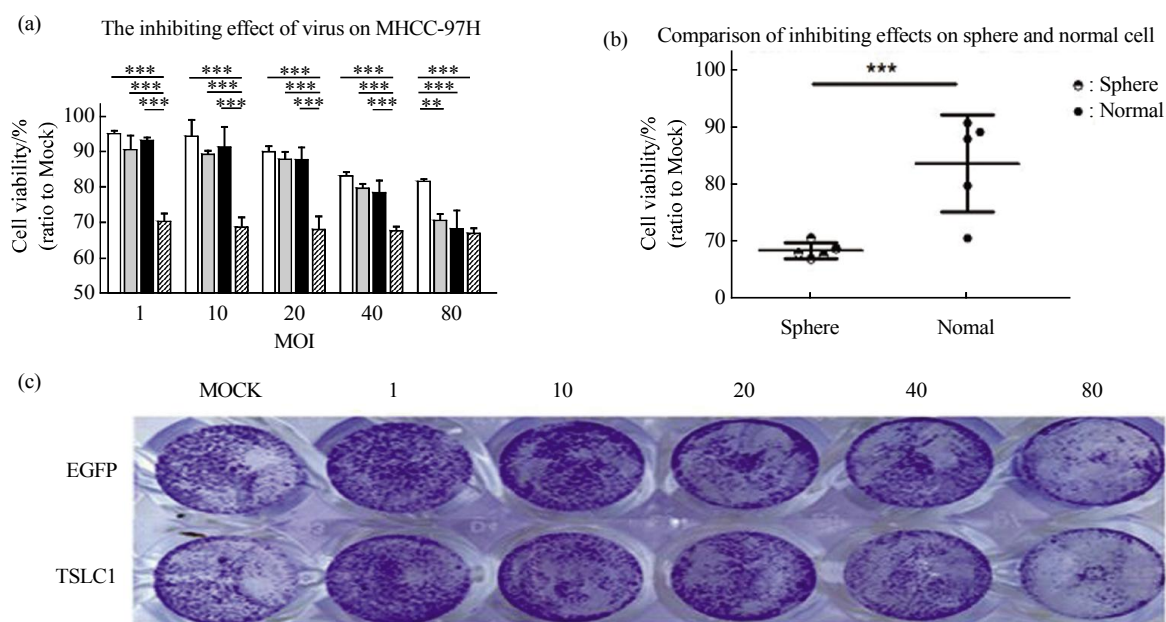


Fig. 5 The inhibiting effect of Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-TSLC1 on MHCC 97H cell

(a) The inhibiting effect of target virus and control virus on MHCC-97H sphere cell and normal cell. The cell viability was shown fold change to the corresponding mock (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$). □ : Normal-EGFP; ■ : Normal-TSLC1; ■ : Sphere-EGFP; ▨ : Sphere-TSLC1. (b) Cell viability assay of MHCC-97H sphere cell and normal cell following treatment with Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp) - TSLC1 at the indicated MOIs after 72 h (** $P < 0.001$). (c) Measurement of the cytotoxicity of target virus and control virus at MHCC-97H cells by crystal violet staining.

3.4 重组病毒能诱导 MHCC-97H sphere 细胞凋亡

为了检测目的病毒 Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-TSLC1 是否通过诱导细胞凋亡途径降低细胞活性. 我们用不同 MOI 的病毒感染 MHCC-97H sphere 细胞和 MHCC-97H normal 细胞 72 h 后, 用 Hoechst 染色. 结果表明, 用目的病毒处理的 sphere 与 normal 细胞核发生碎裂并且随着病毒 MOI 的增加细胞凋亡现象更明显(图 6, 标尺为 200 μ m).

我们进一步通过流式细胞术检测重组病毒 Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-TSLC1 是否通过诱导 MHCC-97H sphere 细胞凋亡从而抑制细胞存活率. 结果表明对照组、5MOI 处理组、10MOI 处理组、20MOI 处理组的凋亡率分别为 10.03%、49%、59%、94.9%, 表明重组病毒 Ad.wnt-E1A($\Delta 24$ bp)-TSLC1 能有效诱导细胞凋亡, 并随着病毒 MOI 的增加, 凋亡现象越来越明显.

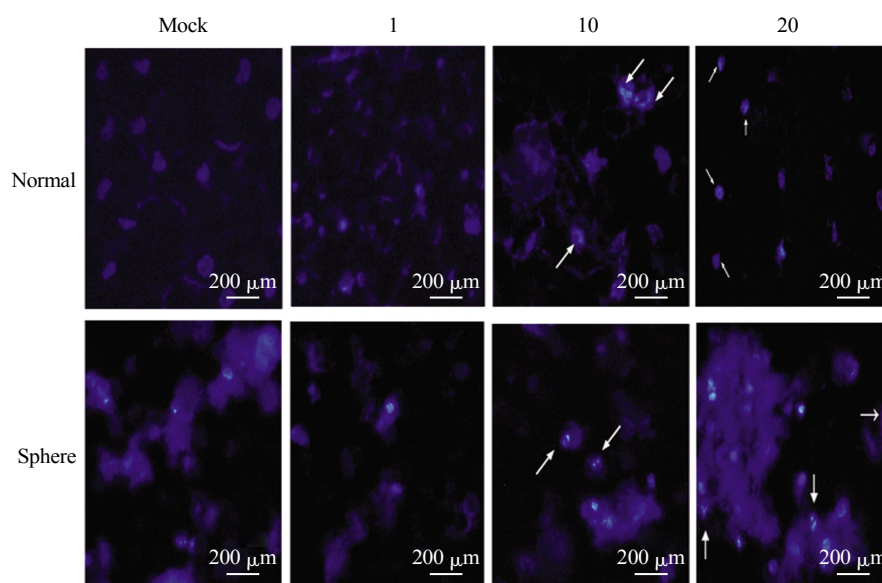


Fig. 6 Apoptosis detection by Hoechst staining

After treated with Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 at 1, 10, 20(MOI) for 72 h, 97H sphere cell and 97H normal cell were detected by Hoechst staining. Treated with DMEM cells were served as control.

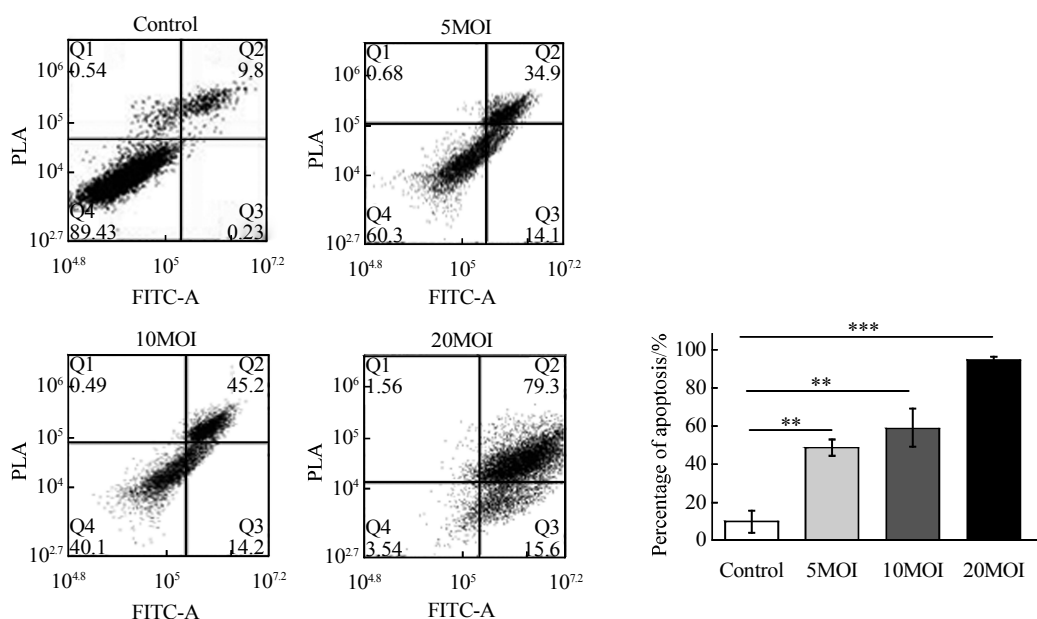


Fig. 7 Flow cytometry was used to detect apoptotic cells in MHCC-97H sphere cells induced by recombinant virus

After treated with Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 at 5, 10, 20(MOI) for 72 h, 97H sphere cell were detected by flow cytometry. The apoptotic rates of the control group, 5MOI treatment group, 10MOI treatment group and 20MOI treatment group were 10.03%, 49%, 59%, 94.9% (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3.5 目的病毒通过 caspase 途径诱导细胞凋亡

为了检测重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 是否通过 caspase 途径诱导 MHCC-97H sphere 细胞凋亡, 我们通过 Western blot 检测在不同 MOI 的病毒处理 MHCC-97H sphere 细胞以及用 30MOI 的目的病毒处理正常肝细胞后 pro-caspase 蛋白的表达

水平, caspase 前体的切割程度可通过蛋白的表达量以及 PARP (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 的表达情况体现, PARP 是细胞凋亡核心成员半胱天冬酶(caspase)的切割底物, 常用作检测 caspase 3 是否激活的指标. 实验结果表明, MHCC-97H sphere 细胞在 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 病毒处

理后, procaspase-3, procaspase-9, 和 PARP 都出现很大程度的剪切, 并且随着 MOI 的增加越来越明显. XIAP 是一种凋亡抑制蛋白, 在病毒处理组中下调表达.

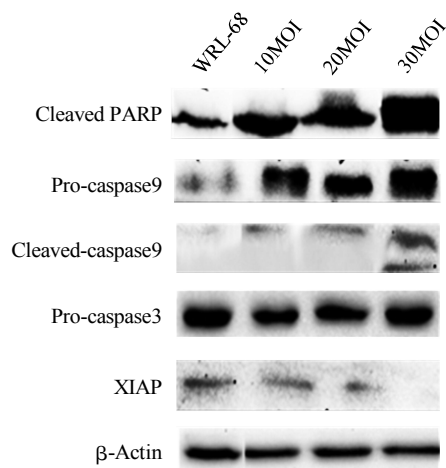


Fig. 8 Detection of Recombinant virus induct liver cancer stem-like cell apoptosis through caspase pathway by Western blot

Caspase3, Caspase9 and PARP shear occurred in the virus-treated group, and became more and more obvious with the increase of virus MOI. XIAP was worked as an inhibitor of apoptosis, which was down-regulated after virus treatment.

3.6 重组病毒能明显抑制肝癌细胞的迁移能力

为了检测重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 抑制肝癌细胞迁移的能力, 我们通过划痕实验检测不同 MOI 的病毒处理 48 h 和 72 h 后细胞迁移情况, 实验结果显示, 空白对照组的细胞维持肿瘤细胞原有的迁移能力, 逐渐通过细胞迁移将划痕覆盖; 目的病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24)-TSLC1 处理的细胞, 细胞迁移能力受到了明显抑制, 划痕宽度没有减少(图 9a), 根据细胞迁移率公式计算各组的细胞迁移率, 对照组细胞 72 h 后细胞迁移率高达 92%, 而病毒处理组相对 0 h 未出现提高, 显示重组病毒能有效抑制细胞迁移(图 9b), 为了进一步检测重组病毒抑制细胞迁移的能力, 通过 Western blot 检测不同 MOI 的病毒处理后 E-cadherin(上皮黏附素)蛋白的表达, 实验结果表明, 病毒处理后的 MHCC-97H 细胞中 E-cadherin 上调表达, 并随着病毒 MOI 的增加越来越明显(图 9c). 这也验证了 E-cadherin 的表达与细胞迁移能力之间的负相关关系.

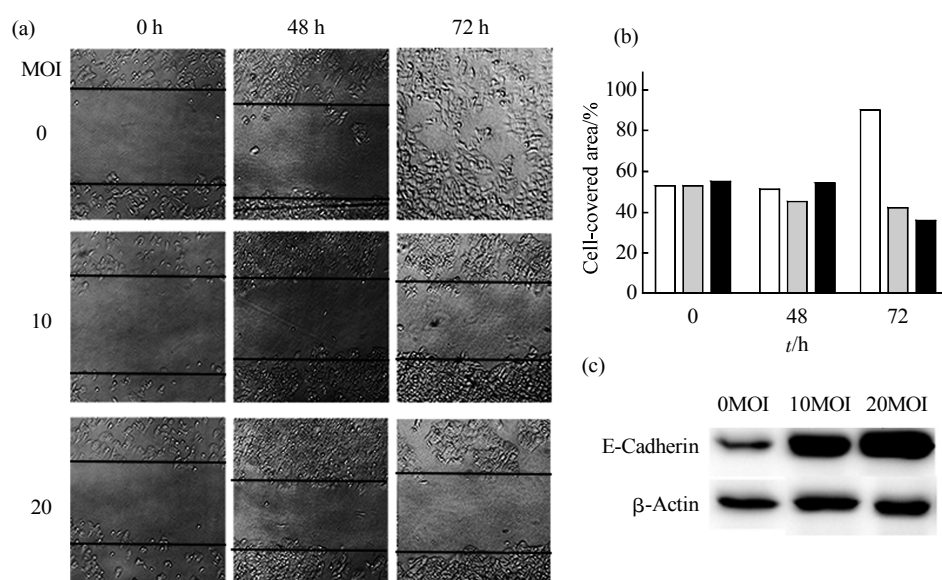


Fig. 9 Detection of migration capacity for MHCC-97H cell treated with 10MOI and 20 MOI of Viruses after 48 h and 72 h
 (a) The cell migration ability of Ad.wnt-E1A (Δ 24) -TSLC1-treated cells was significantly inhibited and the width of scratches was not decreased.
 (b) The cell mobility of control cells was 92% after 72 h, while the virus treatment group did not improve relative to 0 h, indicating that the recombinant virus can effectively inhibit cell migration. □: Blank; ▨: 10MOI; ■: 20MOI. (c) The expression of E-cadherin was up-regulated in MHCC-97H cells after virus treatment, and became more and more apparent with the increase of MOI; This also confirms the negative correlation between E-cadherin expression and cell migration.

3.7 重组病毒能有效抑制肝癌类干细胞侵袭

为了进一步检测重组病毒抑制肝癌类干细胞侵袭的能力, 我们通过 Transwell 小室实验检测不同 MOI Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 处理 24 h 后细胞侵袭. 实验结果表明, 空白对照组细胞保持原有的细胞侵袭能力, 分泌基质金属蛋白酶将基质胶降解, 并通过聚碳酸酯膜进入下室, 发生侵袭(图 10a). 重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 处理后的细

胞, 侵袭受到明显抑制, 10MOI 及 20MOI 处理组细胞侵袭率只为 14%和 6%(图 10b); 为了进一步检测抑癌基因 TSLC1 抑制细胞迁移和侵袭, 通过设定对照病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-EGFP 处理组, 结果表明携带 TSLC1 抑癌基因的目的病毒抑制效果更明显($P=0.00059$)(图 10c), 以上结果均表明重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 能有效抑制肝癌类干细胞发生迁移及侵袭.

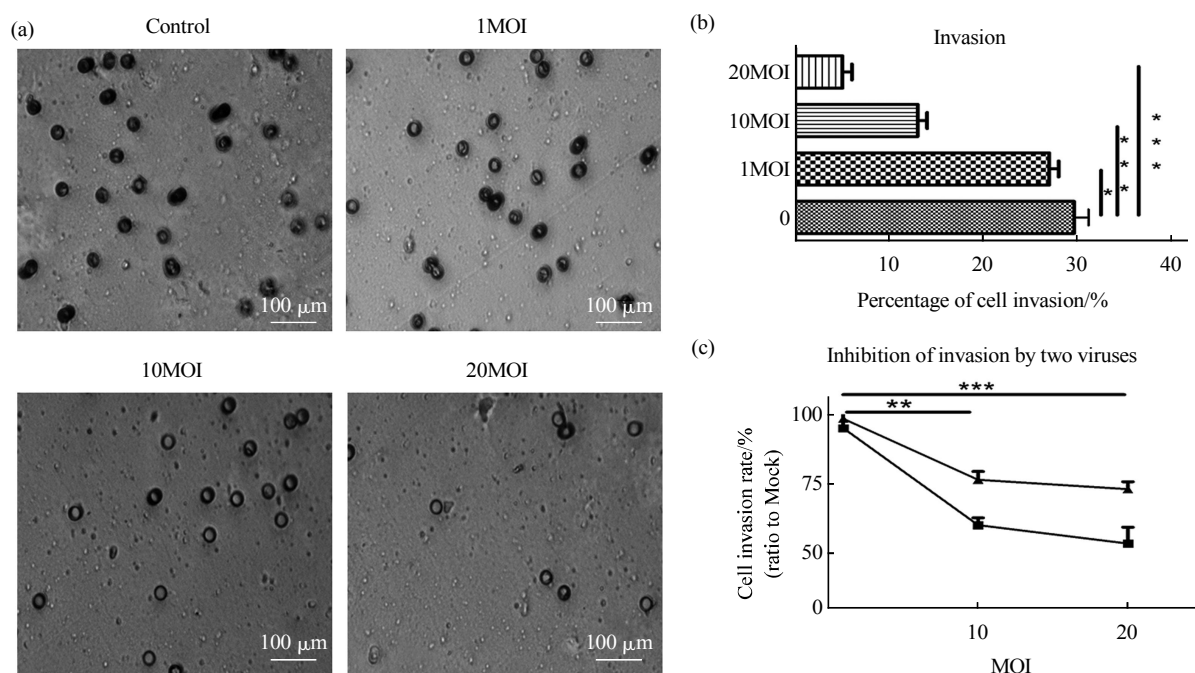


Fig. 10 Recombinant virus Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 effectively inhibited cell invasion and migration

(a) After treatment with different MOI recombinant viruses, the matrix metalloproteinases secreted by the cells degrade the matrix glue and enter the lower chamber through the polycarbonate membrane for invasion. (b) The invasion rate of the cells treated with recombinant adenovirus Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 was significantly inhibited, while that of 10MOI and 20MOI was only 14% and 6%. (c) After 24 h of treatment with Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-EGFP and Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1, the results showed that the target virus was more effective ($P=0.00059$). $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$: EGFP; $\blacksquare$ — $\blacksquare$: TSLC1.

3.8 溶瘤腺病毒能有效抑制 MHCC-97H 细胞发生 EMT

为了检测重组病毒抑制肝癌类干细胞发生上皮间质转化的能力, 我们通过免疫荧光的方法, 采用激光共聚焦技术检测重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1(20 MOI)处理 MHCC-97H sphere 细胞 48 h 后, 定位于细胞膜上的上皮细胞特性蛋白

E-cadherin 及间质细胞特性蛋白 N-cadherin 的表达情况. 实验结果表明, 对照组细胞高表达间质细胞特性蛋白 N-cadherin, 重组病毒处理后, MHCC-97H sphere 细胞中 E-cadherin 上调表达明显, N-cadherin 下调表达. 说明重组病毒能有效抑制肝癌类干细胞发生 EMT 转化, 从而抑制肝癌类干细胞的迁移及侵袭(图 11).

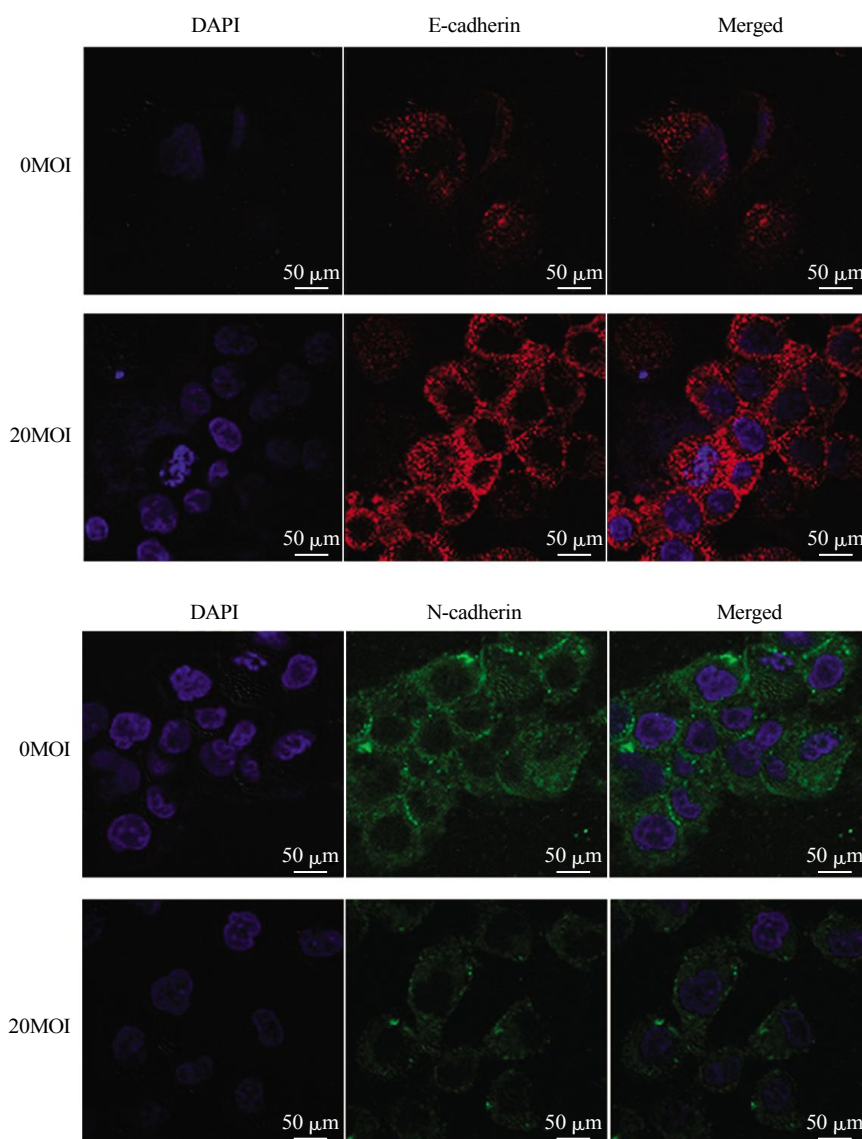


Fig. 11 Immunofluorescence detection of recombinant virus inhibits MHCC-97H sphere cell EMT

E-cadherin expression was up-regulated in MHCC-97H sphere cells after recombinant virus treatment. The expression of N-cadherin was down-regulated in MHCC-97H sphere cells after recombinant virus treatment.

4 结果与讨论

癌症干细胞具有高转移、自我更新和耐药特性，这也是传统治疗手段未能根除癌症复发、转移和耐药的原因，并导致癌症死亡率高^[21]。此前已有报道通过无血清培养富集肿瘤类干细胞^[22]，我们通过此方法富集培养 MHCC-97 肝癌类干细胞并鉴定其具有癌症干细胞特性。实验表明，悬浮培养的 MHCC-97H sphere 细胞在蛋白质水平上高表达 XIAP、survivin 等，而 ERK 磷酸化水平下调明显。其中 XIAP 和 Survivin 蛋白是癌症干细胞的关

键转录因子^[13-14]，ERK 的磷酸化水平变化与维持干细胞的自我更新能力有关^[19]，在分子水平上高表达 CD133、CD24、CD90、ABCG2、OCT4 及 EpCAM 等肝癌干细胞表面标志物。将 MHCC-97H sphere 细胞经 DMEM+10%FBS 含血清培养 5 天后，细胞能正常贴壁生长，蛋白质印迹检测 ERK、survivin 及 XIAP 蛋白表达与正常贴壁生长细胞无差异。通过免疫荧光检测结果表明，MHCC-97H sphere 细胞高表达间质细胞标志蛋白 N-cadherin，流式细胞术分析细胞周期及化疗药物处理结果表明 MHCC-97H sphere 细胞具静息性及耐药性等肝癌

干细胞特性。以上实验证明悬浮培养的 MHCC-97H sphere 细胞具有肿瘤类干细胞特性。

传统治疗方法无法根除肿瘤细胞的主要原因是肿瘤干细胞处于细胞增殖的金字塔顶端并具耐药性，而溶瘤腺病毒载体可以选择性在肿瘤细胞内复制且裂解细胞，而其携带的治疗基因特异性表达加强，两者形成协同作用，显著提高肿瘤治疗的效果。我们通过结晶紫、MTT 及 Hoechst 染色实验证实，重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 对 MHCC-97H 肝癌类干细胞的具杀伤效果，并证实目的病毒对类干细胞的靶向性高于正常贴壁生长细胞，通过细胞划痕实验、蛋白质印迹法及 Transwell 小室实验，并通过免疫荧光技术结合激光共聚焦显微镜检测重组病毒抑制肝癌类干细胞 EMT 转化的效果，惊喜地发现目的病毒能有效抑制肝癌类干细胞发生 EMT，并抑制其发生迁移与侵袭，显示了其良好的临床应用前景。

此外，由于使用组合方案可能导致耐药性和药物之间的相互作用，因此使用分子靶向制剂的联合治疗则可能更有效。我们可以进一步筛选肿瘤干细胞的可用标志物结合理想的肿瘤干细胞靶向疗法，减少对正常细胞的副作用以及保留组织的再生能力是将来肿瘤治疗的新方向，并利用溶瘤腺病毒易改造的特性，用转录效率更高的启动子并携带抑癌基因如 TRAIL^[23]，结合病毒治疗和基因治疗的优势，应有良好应用前景。

目前统计发现，超过 90% 的癌症相关死亡是由于全身转移性疾病的发展导致^[24]，有研究人员提出循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)的理论，并在乳腺癌中证实了 CTC 对于乳腺癌的转移及复发的影响^[25]。我们猜测 CTC 不仅仅存在于乳腺癌中，还可能存在于其他癌症(如肝癌)，引起癌症的转移及复发，这也是根除肿瘤细胞的关键所在。只有既对肿瘤细胞具有杀伤，又能抑制其转移并对肿瘤干细胞进行靶向抑制，才能最终治愈癌症患者。因此，重组病毒 Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 很有可能成为具良好临床应用前景的病毒-基因靶向治疗药物，但其抑癌机制及方式还需探究。

参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer Statistics in China, 2015. *Ca-Cancer J Clin*, 2016, **66**(2): 115-132
- [2] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997, **3**(7): 730-737
- [3] Durnez A, Verslype C, Nevens F, *et al.* The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology*, 2006, **49**(2): 138-151
- [4] Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene*, 2006, **25**(27): 3818-3822
- [5] Hing H K, Sun X, Artavanis-Tsakonas S. Modulation of wingless signaling by Notch in *Drosophila*. *Mech Dev*, 1994, **47**(3): 261-268
- [6] Maloof J N, Whangbo J, Harris J M, *et al.* A Wnt signaling pathway controls hox gene expression and neuroblast migration in *C. elegans*. *Development*, 1999, **126**(1): 37-49
- [7] Hooper J E. Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in *Drosophila* embryos. *Nature*, 1994, **372**(6505): 461-464
- [8] Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(14): 4042-4045
- [9] Katoh M. Network of WNT and other regulatory signaling cascades in pluripotent stem cells and cancer stem cells. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, **12**(2): 160-170
- [10] Yamada D, Yoshida M, Williams Y N, *et al.* Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, 2006, **26**(9): 3610-3624
- [11] 郭科妮. 抑癌基因 TSLC1 对 Wnt 信号通路的影响及其抑制肝癌细胞生长的研究[D]. 浙江: 浙江理工大学, 2013
Guo K N. The effect on the Wnt signaling pathway of tumor suppressor gene TSLC1 and its inhibitory action to hepatoma carcinoma cell[D]. Zhejiang: Zhejiang Sci-Tech University, 2013
- [12] Mao X, Sendtitz E, Truant R, *et al.* Re-expression of TSLC1 in a non-small-cell lung cancer cell line induces apoptosis and inhibits tumor growth. *Oncogene*, 2004, **23**(33): 5632-5642
- [13] Siddharth S, Das S, Nayak A, *et al.* SURVIVIN as a marker for quiescent-breast cancer stem cells-An intermediate, adherent, pre-requisite phase of breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2016, **33**(7): 661-675
- [14] Chellapandian D, Krueger J, Schecher T, *et al.* Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in XIAP deficiency using reduced-intensity conditioning. *Pediatric Blood & Cancer*, 2016, **63**(2): 355-357
- [15] 牛坚, 王月. 下调 CD133 表达对肝癌干细胞上皮间质化和侵袭能力影响及机制探讨. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, **23**(11): 710-715
Niu J, Wang Y. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2016, **23**(11): 710-715
- [16] Liu A Y, Cai Y, Mao Y, *et al.* Twist2 promotes self-renewal of liver cancer stem-like cells by regulating CD24. *Carcinogenesis*, 2014, **35**(3): 537-545
- [17] Haraguchi N, Ishii H K, Tanaka F, *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest*, 2010, **120**(9): 3326-3339
- [18] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology*, 2006, **44**(1): 240-251

- [19] Chen H, Guo R, Zhang Q, *et al.* Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(44): 5936–5943
- [20] Lim J, Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 2012, **139**(19): 3471–3486
- [21] Zhou M, Ren H, Han J, *et al.* Protective effects of kaempferol against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart *via* antioxidant activity and inhibition of glycogen synthase kinase-3 β . *Oxid Med Cell Longev*, 2015, **481405**(1): 1–8
- [22] 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
- [23] Miguel D D, Lemke J, Anel A, *et al.* Onto better TRAILs for cancer treatment. *Cell Death Differ*, 2016, **23**(5): 733–747
- [24] Gkoutela S, Aceto N. Stem-like features of cancer cells on their way to metastasis. *Biol Direct*, 2016, **11**(1): 1–14
- [25] Khatcheressian J L, Hurley P, Bantug E, *et al.* Breast cancer follow-up and management after primary treatment: american society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 2013, **31**(7): 961–965

Inhibition of Hepatocellular Stem Cells by Oncolytic Virus Targeting Wnt Signaling Pathway*

ZHANG Jian, LAI Wei-Jie, LI Qiang, JIN Jin, XIAO Bo-Duan, GUO Wan, WANG Yi-Gang**

(College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth largest cancer in the world and is the main cause of cancer death. Common treatment for early hepatocellular carcinoma has made some progress, but cancer recurrence, metastasis and drug resistance have not been fundamentally resolved, which can be explained by cancer stem cell theory (cancer stem cell, CSC). In this study, we obtained MHCC-97H sphere cells by suspension enrichment culture method and detected their stem cell characteristics. We deleted the 24 bp of the E1A CR2 region of the adenovirus type 5 and used the Wnt transcription element TCF/TEF to regulate E1A and then inserted the anti-oncogene TSLC1 into the vector to obtain the double targeting oncolytic adenovirus Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1. The effect of recombinant adenovirus Ad.wnt-E1A(Δ 24 bp)-TSLC1 on the killing effect, cell apoptosis and migration of hepatocarcinoma stem-like cells were detected by MTT, crystal violet, Hoechst staining, cell scratch, Western blot and immunofluorescence, respectively. The results show that MHCC-97H sphere cells have the capability of self-renewal and differentiation, and high expression of hepatocyte stem cell surface marker (such as CD133). After dealt with recombinant virus, it showed obvious killing effect and inhibition of cell migration and EMT (Epithelial-mesenchymal transition). Therefore, ability of targeting inhibition of 97H sphere cells was significantly higher than that of 97H cells ($P < 0.001$). The recombinant virus could induce apoptosis of hepatocellular stem-like cells through caspase pathway. Therefore, the recombinant adenovirus Ad.wnt-E1A (Δ 24 bp)-TSLC1 may be a promising therapeutic agent for targeting hepatoma stem cells, which has certain application value to clinical treatment.

Key words liver cancer stem-like cells, oncolytic adenovirus, Wnt signaling pathway, TSLC11

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0380

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81272687), Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LZ13H160004, LY16H160056) and College Students' Science and Technology Innovation Activities in Zhejiang Province (2016R406007).

**Corresponding author.

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

Received: December 10, 2016 Accepted: March 17, 2017