

• 实验研究 Experimental research •

射频消融亚致死性温度对肝癌干细胞的影响

郝美君, 刘 凯, 郭向华, 欧阳雅博, 乔录新, 石 英, 陈德喜, 郑加生

【摘要】 目的 研究亚致死温度射频消融(RFA)对肝癌干细胞(LCSC)产生及其相关转录因子表达的影响。**方法** 利用小鼠 Hep1-6 肝癌细胞株和肝细胞癌(HCC)患者临床样品,检测 LCSC 相关标志物和转录因子的表达。**结果** 不同温度分别刺激 Hep1-6 细胞后发现,45℃是不能诱导细胞死亡的亚致死性温度。流式细胞仪(FCM)检测显示 45℃处理可引起 CD13⁺、CD44⁺、CD90⁺、CD133⁺ Hep1-6 细胞水平明显上调,提示 45℃温度导致 Hep1-6 细胞中以上各型 LCSC 产生增加;实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测显示 45℃温度导致 CD13、CD90、CD133 mRNA 水平明显上调。CD13 mRNA 水平在 5 例 HCC 患者复发肝癌组织中均明显上调,CD133 mRNA 在 4 例复发肝癌中上调,CD90 mRNA 仅在 1 例复发肝癌中上调;FCM 检测显示 CD13⁺ LCSC 水平在 4 例复发肝癌中明显上调,CD133⁺ LCSC 水平仅在 1 例复发肝癌中上调,提示 CD13⁺ LCSC 水平上调与 45℃温度关系更密切。RT-qPCR 检测显示 4 例 CD13⁺ LCSC 上调的复发肝癌患者 13 个 LCSC 相关转录因子中 Sox2、Stat1 明显上调,FCM 检测显示 45℃处理 Hep1-6 细胞后 Sox2、Stat1 mRNA 明显上调。用 Sox2、Stat1 siRNA 分别沉默了 Sox2、Stat1 基因,表明 Sox2、Stat1 均参与了 45℃温度诱导的 CD13⁺ LCSC 产生。**结论** RFA 治疗中 45℃亚致死性温度所致 CD13⁺ LCSC 水平增高与 Sox2、Stat1 表达有关。该结果对肝癌复发研究有一定借鉴意义。

【关键词】 肝细胞癌;射频消融;亚致死温度;肝癌干细胞

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2017)-07-0636-05

The effect of radiofrequency ablation with sublethal temperature on the stem cells of hepatocellular carcinoma HAO Meijun, LIU Kai, GUO Xianghua, OUYANG Yabo, QIAO Luxin, SHI Ying, CHEN Dexi, ZHENG Jiasheng. Affiliated Beijing You'an Hospital of Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHEN Dexi, E-mail: dexichen@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the effect of radiofrequency ablation (RFA) with sublethal temperature on the production of liver cancer stem cells (LCSCs) and on the expression of LCSCs-related transcriptional factors. **Methods** Mouse hep1-6 hepatoma cell line and clinical samples of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) were used to test the expressions of LCSCs-related markers and transcriptional factors. **Results** Different temperatures were used to stimulate Hep1-6 cells, and it was proved that the temperature of 45℃ was a sublethal temperature that could not induce cell death. Flow cytometry testing showed that treatment with 45℃ could obviously increase CD13⁺, CD44⁺, CD90 and CD133⁺ Hep1-6 cells, suggesting that treatment with 45℃ could increase the production of above mentioned types of LCSCs in hep1-6 cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay indicated that the temperature of 45℃ could cause significant increase in CD13, CD90 and CD133 mRNA. In all 5 HCC patients, CD13 mRNA in the recurrent HCC lesions was remarkably increased, CD133 mRNA was increased in 4 patients with recurrent HCC, and CD90 mRNA was increased in only one patient with recurrent HCC. Flow cytometry testing revealed that CD13⁺ LCSCs were strikingly increased in 4 recurrent HCC patients, while CD133⁺ LCSC was increased in only one patient, suggesting that more close correlation existed between the increase

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2017.07.014

基金项目:国家自然科学基金(81402556、81272266)、NSFC-NIH 国际合作项目(81361120401)、首都发展基金(首发 2014-1-1151)、北京市肝病研究所流式平台基金(BJIH-01602)

作者单位:首都医科大学附属北京佑安医院(郝美君、刘 凯、郭向华、欧阳雅博、乔录新、石 英、陈德喜、郑加生)、北京市肝病研究所(郝美君、郑加生)

通信作者:陈德喜 E-mail: dexichen@ccmu.edu.cn

of CD13⁺ LCSCs and the temperature of 45°C. RT-qPCR assay showed that in 4 recurrent HCC patients with increased CD13⁺ LCSC, the Sox2 and Stat1 among 13 LCSCs-related transcriptional factors were obviously increased. Flow cytometry testing showed that 45°C treatment also increased the expression of Sox2 and Stat1 mRNA in Hep1-6 cells. Finally, Sox2 and Stat1 could be knockdown by siRNAs, indicating that both Sox2 and Stat1 transcriptional factors were involved in 45°C-induced production of CD13⁺ LCSCs in Hep1-6 cells.

Conclusion In RFA therapy, the use of sublethal temperature of 45°C can increase CD13⁺ LCSCs, which is related to the promotion of Sox2 and Stat1 expression. The results of this study can be used for reference in the research of liver cancer recurrence. (J Intervent Radiol, 2017, 26: 636-640)

【Key words】 hepatocellular carcinoma; radiofrequency ablation; sublethal temperature; liver cancer stem cell

肝细胞癌(HCC)致死率在我国排名第2^[1-2],目前主要治疗手段除了手术切除和肝移植外,以射频消融(RFA)为代表的微创治疗也得到广泛应用^[3-4]。RFA以灼损方式杀死局部肿瘤,但其热量辐射也会使局部区域亚致死性温度不能杀伤肿瘤细胞而导致残癌发生。长期随访资料表明一次RFA治疗的残癌发生率为3%~52%,且复发率较高(50%~65%)^[5-7],甚至5年后复发率高达91%^[7-8]。肿瘤干细胞(CSC)在肿瘤细胞中所占比颇小,具有自我更新、无限分裂和多能性等特点,对放疗和化疗有很强的抵抗能力^[9]。在大部分肿瘤细胞被杀死情况下,存活CSC可作为“种子”导致肿瘤复发^[7-8]。研究表明CSC与机体正常干细胞共享一套转录因子(Oct4、Sox、Nanog等),对维持CSC和正常干细胞的干性发挥关键作用^[9-10]。肝癌干细胞(LCSC)在肝癌复发中作用主要涉及手术切除后肝癌复发研究,LCSC与RFA治疗后肝癌复发研究相对较少。本研究主要探讨RFA治疗与LCSC产生的关系。

1 材料与方法

1.1 临床样品采集

5例初发HCC患者RFA治疗前和肝癌复发后接受穿刺,收集肝癌组织,并保存于液氮中。患者临床资料见表1、图1。

1.2 细胞培养和不同温度处理

高糖DMEM培养基购自美国HyClone公司,胎

牛血清、胰酶、青链霉素购自美国Gibco公司。将小鼠Hep1-6肝癌细胞株接种于每孔含200 μl DMEM完全培养基(含10%胎牛血清和1%青链霉素)的24孔细胞培养板中,置于37°C、5% CO₂ 孵箱培养。将细胞消化并收集在1.5 ml离心管中,分别置于37、40、45、50、55°C金属浴仪上10 min,然后将细胞重新铺板,正常培养24 h。

1.3 RNA提取和实时定量聚合酶链反应检测

将Hep1-6细胞和肝癌组织制成匀浆,用TRIzol试剂提取总RNA。按TaKaRa逆转录试剂盒说明书(大连宝生物工程公司)操作生成cDNA。每个cDNA样品10倍稀释,按SYBR Green试剂盒(美国ABI公司)说明书进行实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测。每孔8 μl,条件为4 μl SYBR Green Mix, 1 μl 10倍稀释模板,上下游引物各0.5 μl,最后用去离子水补至8 μl; 95°C 15 s, 60°C 40个循环。各基因引物购自美国Bio-Rad Laboratories公司。

1.4 RNA干扰试验

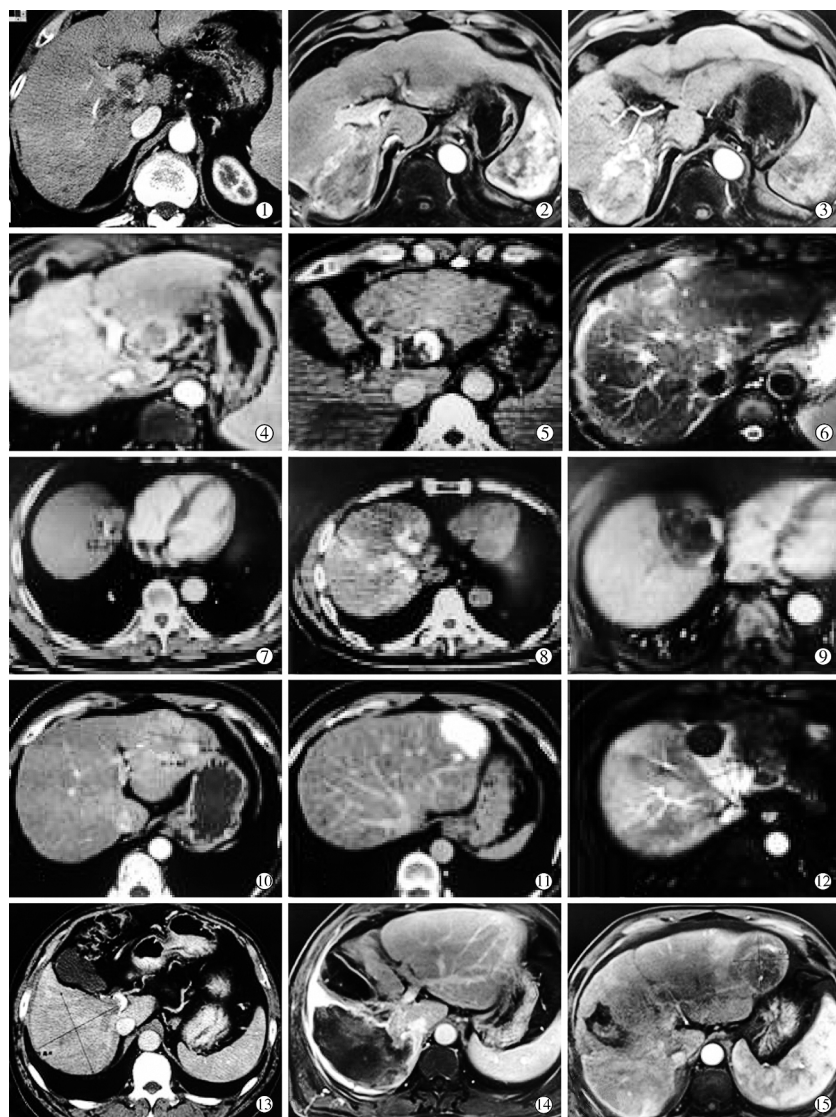
按Kim等^[7]报道方法进行RNA干扰实验。Sox2、Stat1 siRNA和对照siRNA购自美国Santa Cruz生物技术公司。Lipo2000转染siRNA 24 h后继续以下检测。

1.5 细胞活性、流式细胞仪检测和免疫印迹检测

按MTT法细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书所示完成细胞活性检测,具体方法参照Nguyen等^[9]文献报道。流式细胞仪(FCM)检测(抗体均购自美国BD医疗公司)和免疫印迹检测(抗体购自英国

表1 5例HCC患者临床资料

参数	患者1		患者2		患者3		患者4		患者5	
性别(年龄/岁)	男(67)		男(58)		男(64)		男(49)		男(52)	
Child-Pugh 分级	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
BCLC 分期	C	C	A	B	A	A	B	C	C	C
肿瘤枚数	初发 1	复发 3	初发 1	新发 1	初发 1	复发 2	初发 1	复发 1	初发 1	新发 1
最大肿瘤位置	S6 段	S7 段	S2 段	S4 段	S8 段	S8 段	S2 段	S4 段	S5~8 段	S2 段
最大肿瘤直径/cm	11.0×8.0	1.4×1.7 2.0×1.9 3.6×1.7	2.6×2.3	1.9×1.5	1.0×1.0	1.0×0.5 1.0×0.5	6.0×3.8	2.4×4.1 伴门静脉 癌栓	9.9×9.5 伴门静脉 癌栓	5.7×6.1



患者 1:①初发病灶;②RFA 术后;③复发病灶。患者 2:④S2 段初发病灶;⑤RFA 术后;⑥S4 段新发病灶。患者 3:⑦初发病灶;⑧RFA 术后;⑨复发病灶。患者 4:⑩初发病灶;⑪RFA 术后;⑫门静脉复发肿瘤。患者 5:⑬初发病灶;⑭RFA 术后;⑮左叶新发病灶

图 1 5 例 HCC 患者 RFA 治疗前后 CT 影像

Abcam 公司)过程参照 Yamashita 等^[10]文献报道。

1.6 统计分析

计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,95%作为显著性差异。

2 结果

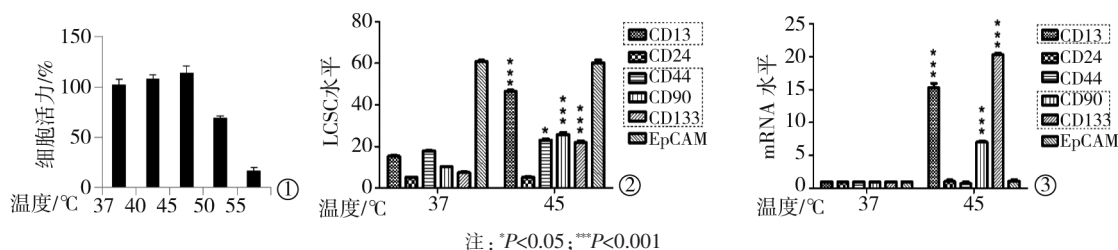
2.1 亚致死性温度导致 LCSC 水平增加

MTT 法检测显示,Hep1-6 细胞分别经 37、40、45℃处理未出现死亡,50℃时 40%细胞死亡,55℃导致 90%细胞死亡(图 2①)。后续实验中将 45℃用作亚致死性温度。FCM 检测结果显示,45℃处理导致 CD13⁺、CD44⁺、CD90⁺、CD133⁺ Hep1-6 细胞水平明显上调,提示亚致死性温度处理 Hep1-6 细胞导致各

型 LCSC 水平增加(图 2②)。RT-qPCR 检测进一步发现,45℃处理导致 CD13、CD90、CD133 mRNA 水平明显上调(图 2③),说明 CD13⁺、CD90⁺、CD133⁺ LCSC 产生与 CD13、CD90、CD133 转录增加有关。

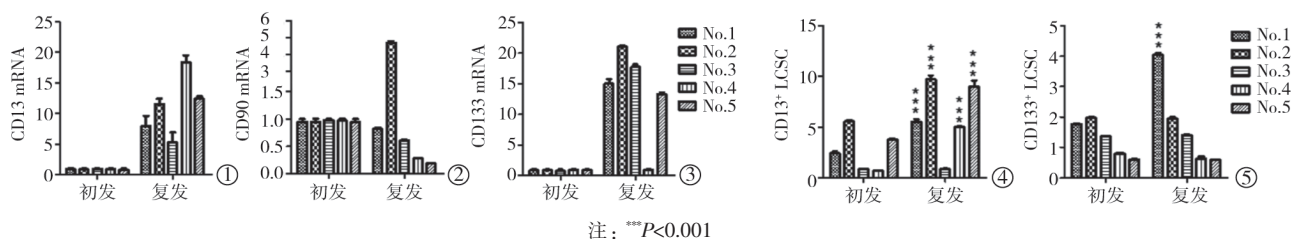
2.2 CD13⁺ LCSC 上调与 RFA 亚致死性温度有关

RFA 术前后肝癌组织匀浆中 CD13 mRNA 水平在 5 例患者复发肝癌组织中均显著上调,CD133 mRNA 在 4 例复发肝癌中上调,CD90 mRNA 仅在 1 例复发肝癌中上调(图 3①②③)。CD13、CD133 表达上调与亚致死性温度处理的 Hep1-6 细胞结果一致。FCM 检测显示,4 例患者复发肝癌中 CD13⁺ LCSC 水平较初发肝癌明显上调,CD133⁺ LCSC 水平仅在 1 例患者中上调(图 3④⑤),提示 CD13⁺ LCSC



①Hep1-6 细胞用 5 种不同温度处理 10 min 后培养 24 h, MTT 法检测示各温度对细胞活性的影响; ②③45 °C 处理 Hep1-6 细胞 10 min 后培养 24 h, FCM 检测 CD13⁺、CD24⁺、CD44⁺、CD90⁺、CD133⁺、EpCAM⁺ LCSC 水平, RT-qPCR 检测 Hep1-6 细胞中 CD13、CD24、CD44、CD90、CD133、EpCAM 表达水平

图 2 亚致死性温度处理 Hep1-6 细胞对 LCSC 水平的影响



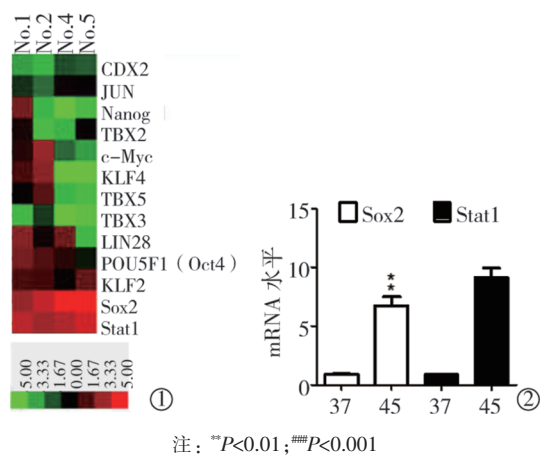
①②③RT-qPCR 检测 CD13、CD90、CD133 表达; ④⑤FCM 检测 CD13⁺、CD133⁺ LCSC 水平

图 3 RFA 治疗对 CD13、CD90、CD133 表达的影响

水平上调与 RFA 产生的亚致死温度有关。

2.3 亚致死性温度使 Sox2、Stat1 上调

RT-qPCR 检测显示, 4 例复发肝癌患者 13 个 LCSC 相关转录因子中仅有 Sox2、Stat1 明显上调, CDX2、JUN、Nanog、TBX2、c-Myc、KLF4、TBX5、TBX3、LIN28、Oct4、KLF2 表达下调(图 4①)。FCM 检测显示, 45 °C 亚致死温度处理 Hep1-6 细胞后, Sox2、Stat1 表达也明显上调(图 4②)。



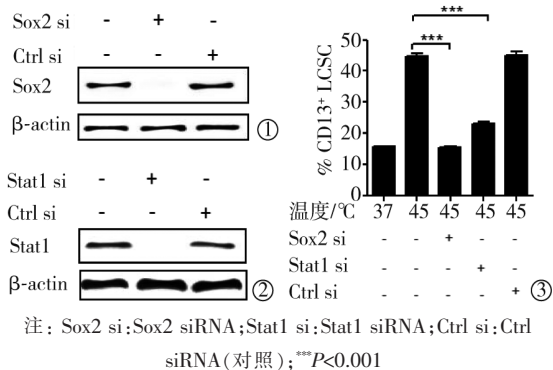
①热点图示 13 个 LCSC 相关转录因子 mRNA 水平(不同程度红色代表不同表达上调倍数, 不同程度绿色代表不同表达下调倍数); ②Hep1-6 细胞用 45 °C 处理后 Sox2、Stat1 mRNA 水平

图 4 RFA 治疗对 LCSC 相关转录因子表达的影响

2.4 Sox2、Stat1 参与 CD13⁺LCSC 产生

免疫印迹检测显示, Sox2、Stat1 siRNA 经 Hep1-

6 细胞转染, 可有效地沉默 Sox2、Stat1 基因表达(图 5); FCM 检测显示, Hep1-6 细胞中用 Sox2 和 Stat1 siRNA 分别沉默 Sox2、Stat1 基因后, 45 °C 亚致死性温度处理诱导的 CD13⁺LCSC 水平明显降低, 表明 Sox2、Stat1 参与了亚致死性温度诱导的 CD13⁺LCSC 产生, 即亚致死性温度可能通过上调 Sox2、Stat1 表达促进 CD13⁺LCSC 产生。



注: Sox2 si: Sox2 siRNA; Stat1 si: Stat1 siRNA; Ctrl si: Ctrl siRNA(对照); ***P<0.001

①②Hep1-6 细胞转染 Sox2、Stat1 siRNA 24 h 后免疫印迹检测 Sox2、Stat1 表达; ③Hep1-6 细胞转染 Sox2、Stat1 siRNA 24 h, 再用 45 °C 处理 10 min, 接着正常培养 24 h 后 FCM 检测 CD13⁺ LCSC 水平

图 5 Sox2、Stat1 对 CD13⁺LCSC 产生的影响

3 讨论

目前关于 LCSC 对 RFA 治疗后肝癌复发影响的研究报道仍然少见。本实验结果显示, RFA 治疗可促进 CD13⁺LCSC 生成。诸多文献报道 CSC 是肿瘤复发的关键因素^[10-11], 因此 CD13⁺LCSC 很有可能

是促进 RFA 治疗后肝癌复发的关键原因。本实验进一步表明, RFA 治疗中产生的亚致死性温度是促进 CD13⁺ LCSC 产生的关键因素, 这与许多 RFA 研究报道一致——RFA 对肿瘤不完全灼损导致残瘤^[12], 残瘤中 CSC 致使肝癌再次复发^[13]; 即使 RFA 使肿瘤组织完全坏死, 但 CSC 仍存在于癌旁组织^[14]。因此, 抑制 LCSC 产生, 应是降低或减缓 RFA 治疗后肝癌发生的有效方法。

本实验也显示 Sox2、Stat1 是 CD13⁺ LCSC 产生的关键转录因子。有研究认为, 手术后 Sox2、Oct4、Nanog 表达上调, 预示肝癌复发可能性较大^[15-16]。RFA 治疗后 Sox2 表达上调, 但 Sox2 表达水平是否可预测 RFA 后肝癌复发情况, 仍需后续实验验证大量临床样本后才能确定。正常干细胞和 CSC 中, Sox2 结合 Oct4 形成的异源二聚体, 可结合至 Nanog 启动子上直接诱导 Nanog 表达^[17], 而 Nanog 水平对于维持正常干细胞和 CSC 干性至关重要^[18]。但 Sox2 表达上调介导的 CD13⁺ LCSC 产生是否也与 Nanog、Oct4 有关, 有待进一步验证。Stat1 是 Stat 家族中首个成员, 对 I、II 型干扰素激活起关键作用。有研究报道, 包括肝癌在内的许多癌症组织中发现 Stat1 表达上调^[19]。少有研究报道 Stat1 在 CSC 中的作用, 更多文献报道 Stat1 在正常干细胞发生中的作用^[20]。

总之, 本实验结果提示 Stat1 参与了 RFA 治疗引起的 LCSC 发生, 为进一步研究 RFA 治疗后肝癌复发提供了研究新靶点。

[参 考 文 献]

- [1] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国肝癌发病状况与趋势分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37: 691-696.
- [2] 李晓燕, 翟 博, 刘 晨. 多电极组合穿刺在较大肝癌射频消融中的应用[J]. 介入放射学杂志, 2009, 18: 348-352.
- [3] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2011, 365: 1118-1127.
- [4] Dodd GD 3rd, Soulen MC, Kane RA, et al. Minimally invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of a major breakthrough[J]. Radiographics, 2000, 20: 9-27.
- [5] Lam VW, Ng KK, Chok KS, et al. Incomplete ablation after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: analysis of risk factors and prognostic factors[J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15: 782-790.
- [6] Raut CP, Izzo F, Marra P, et al. Significant long-term survival after radiofrequency ablation of unresectable hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis[J]. Ann Surg Oncol, 2005, 12: 616-628.
- [7] Kim YS, Rhim H, Cho OK, et al. Intrahepatic recurrence after percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: analysis of the pattern and risk factors[J]. Eur J Radiol, 2006, 59: 432-441.
- [8] Vivarelli M, Guglielmi A, Ruzzenente A, et al. Surgical resection versus percutaneous radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma on cirrhotic liver[J]. Ann Surg, 2004, 240: 102-107.
- [9] Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, et al. Cancer stem cells: an evolving concept[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12: 133-143.
- [10] Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer[J]. J Clin Invest, 2013, 123: 1911-1918.
- [11] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells[J]. J Clin Invest, 2010, 120: 3326-3339.
- [12] Liu K, Jiang T, Ouyang Y, et al. Nuclear EGFR impairs ASPP2-p53 complex-induced apoptosis by inducing SOS1 expression in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6: 16507-16516.
- [13] Solazzo SA, Ahmed M, Schor-Bardach R, et al. Liposomal doxorubicin increases radiofrequency ablation-induced tumor destruction by increasing cellular oxidative and nitrate stress and accelerating apoptotic pathways[J]. Radiology, 2010, 255: 62-74.
- [14] Carpino G, Renzi A, Franchitto A, et al. Stem/progenitor cell niches involved in hepatic and biliary regeneration[J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 3658013.
- [15] Huang P, Qiu J, Li B, et al. Role of Sox2 and Oct4 in predicting survival of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy[J]. Clin Biochem, 2011, 44: 582-589.
- [16] Yin X, Li YW, Zhang BH, et al. Coexpression of stemness factors Oct4 and nanog predict liver resection[J]. Ann Surg Oncol, 2012, 19: 2877-2887.
- [17] Pan C, Jia W, Lu B, et al. Expression of TAT recombinant Oct4, Sox2, Lin28, and Nanog proteins from baculovirus-infected Sf9 insect cells[J]. Gene, 2015, 556: 245-248.
- [18] Torres-Padilla ME, Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage[J]. Development, 2014, 141: 2173-2181.
- [19] Calo V, Migliavacca M, Bazan V, et al. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis[J]. J Cell Physiol, 2003, 197: 157-168.
- [20] Ishihara J, Umemoto T, Yamato M, et al. Nov/CCN3 regulates long-term repopulating activity of murine hematopoietic stem cells via integrin $\alpha\beta 3$ [J]. Int J Hematol, 2014, 99: 393-406.

(收稿日期: 2017-01-16)

(本文编辑: 边 佑)