

### 【基础研究】

通信作者:焦路阳(1971-),男,河南新乡人,学士,主任技师,研究方向:肿瘤微环境与肿瘤免疫;E-mail: jiaoluyang2009@163.com。

expression lentivirus pHBLV-HIF1A-3flag-ZsGreen-Puro, respectively. The transfection efficiency of cells in the control group and experimental group was confirmed by the expression of green fluorescent protein (GFP) through fluorescence microscope; the relative expressions of HIF-1 $\alpha$  and phosphorylated protein kinase B (p-Akt), protein kinase B (Akt), p-p65 and p65 protein in Akt/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway in the three groups were detected by Western blot; the rate of CD133 positive cells in the control group and experimental group were detected by flow cytometry. In addition, the cells in the experimental group were randomly divided into HepG2-HIF-1 $\alpha$  group, Akt kinase inhibitor group and NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor group; the cells in the Akt kinase inhibitor group and NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor group were treated with the final concentration of 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5, 25.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Akt kinase inhibitor or 3.0, 6.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor; the cell viability in the Akt kinase inhibitor group and NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor group was detected by tetramethylazazole salt assay. The rate of CD133 positive cells in the three groups was detected by flow cytometry.

**Results** The proportion of GFP positive cells in the control group and experiment group was significantly higher than that in the blank control group ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference in the proportion of GFP positive cells between the control group and the experimental group ( $P > 0.05$ ). The relative expression of HIF-1 $\alpha$  in the experimental group was significantly higher than that in blank control group and control group ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference in the relative expression of HIF-1 $\alpha$  between the blank control group and control group ( $P > 0.05$ ). The rate of CD133 positive cells in the control group and the experimental group was  $(4.42 \pm 0.29)\%$  and  $(15.43 \pm 0.41)\%$ , respectively. The rate of CD133 positive cells in the experimental group was significantly higher than that in the control group ( $t = 22.160, P < 0.05$ ). The p-Akt/Akt and p-p65/p65 in the experimental group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the cell viability among the 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.3, 12.5 and 25.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Akt kinase inhibitor groups ( $F = 1.301, P > 0.05$ ); there was no significant difference in the cell viability among the 3.0, 6.0, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0, 400.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor groups ( $F = 2.300, P > 0.05$ ). The rate of CD133 positive cells in the Akt kinase inhibitor group and NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor group was significantly lower than that in the HepG2-HIF-1 $\alpha$  group ( $t = 10.170, 8.932; P < 0.05$ ). There was no significant difference in the rate of CD133 positive cells between the Akt kinase inhibitor group and NF- $\kappa$ B signal pathway inhibitor group ( $t = 1.745, P > 0.05$ ).

**Conclusion** HIF-1 $\alpha$  can promote the expression of stem cell marker CD133 in hepatoma cells through AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway, enhance the characteristics of hepatoma stem cells.

**Key words:** hepatoma; hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; protein kinase B; nuclear factor- $\kappa$ B; stem cell marker; CD133

肝癌是我国常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,作为实体瘤其内部通常存在缺氧,而肿瘤组织缺氧时可表达缺氧诱导因子;缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是一种主要的缺氧诱导因子,在肿瘤的发生、发展及治疗中起到关键作用<sup>[2-5]</sup>。近期有研究报道,HIF-1 $\alpha$ 在多种肿瘤细胞中诱导干细胞的产生<sup>[6-7]</sup>;本课题组先前研究证实,HIF-1 $\alpha$ 可促进肝癌细胞干细胞增多,从而使肝癌细胞对化学治疗药物表阿霉素耐药<sup>[8]</sup>。但是 HIF-1 $\alpha$ 在肝癌细胞中诱导干细胞的产生机制仍不清楚。

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt)/核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)信号通路活化在多种肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,该信号通路与其他通路相互作用共同参与细胞的增殖、分化和凋亡等生物学过程<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 家族成员能两两结合成同源性或异源性二聚体,最为常见的是 p50/p65 异源二聚体,其能迅速被多种刺激激活<sup>[10]</sup>。Akt 为 NF- $\kappa$ B 的上游信号,其活化后诱导 NF- $\kappa$ B 活化,使 p65 蛋白磷酸化并进入细胞核,可诱导细胞周期素 (cyclin D1)、原癌基因 c-myc、上皮间质转化 (epithelial mesenchymal transformation, EMT) 相关蛋白的

表达,进而促进细胞的增殖、侵袭<sup>[11]</sup>。目前, Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路在肝癌干细胞中是否发挥作用研究报道较少。基于此,本研究通过比较 HIF-1 $\alpha$  高表达与低表达肝癌细胞内 Akt 及 p65 的磷酸化水平,探讨 Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路在 HIF-1 $\alpha$  诱导肝癌干细胞中发挥的作用,并用 Akt 和 p65 抑制剂进行验证,以期为基于 HIF-1 $\alpha$  的肝癌治疗提供更多的实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂与仪器** 肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院细胞库, HIF-1 $\alpha$  高表达慢病毒 pHBLV-HIF1A-3flag-ZsGreen-Puro 和对照空载体慢病毒 pHBLV-ZsGreen-Puro 购自上海汉恒生物科技有限公司, 嘌呤霉素、青霉素-链霉素双抗、达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 培养液、胎牛血清购自美国 Sigma 公司, 磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylation protein kinase B, p-Akt)、p-p65 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Akt、p65、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。CD133-APC

流式抗体购自美国 Biolegend 生物科技公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物科技有限公司,四甲基偶氮唑盐(methylthia zolyldiphenyl-tetrazolium bromide,MTT)、Akt 激酶抑制剂及 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂芒果苷购自美国 MCE 公司,其他所用试剂均为国产分析纯。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱及全波长扫描酶标仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司,BIO-RAD Mini Trans-Blot垂直电泳系统购自美国伯乐公司,Axio Observer A1 倒置荧光显微镜购自德国卡尔蔡司集团,BD Calibur 流式细胞仪购自美国碧迪公司,Amersham Imager 6000 化学发光荧光成像系统购自美国 General Electric Company 公司,Countstar 智能细胞分析仪购自上海睿钰生物科技有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及慢病毒转染** 肝癌细胞 HepG2 用含质量分数 1% 青霉素-链霉素双抗、体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 恒温培养箱中培养,当细胞达到 90% 融合度时用质量分数 0.25% 胰酶消化并计数,按每孔  $1 \times 10^6$  个细胞铺于 6 孔板,将细胞随机分为空白对照组、对照组和实验组。按照汉恒生物慢病毒说明书进行转染,首先从冰箱中取出慢病毒融化,吸去细胞原有培养基,加入 1 mL 含 4 mg · L<sup>-1</sup> 聚凝胺的新鲜培养基;空白对照组不加病毒原液,对照组细胞中加入 20  $\mu$ L 病毒滴度为  $2 \times 10^{11}$  TU · L<sup>-1</sup> 的 pHBLV-ZsGreen-Puro 病毒原液,实验组细胞中加入 20  $\mu$ L 病毒滴度为  $2 \times 10^{11}$  TU · L<sup>-1</sup> 的 pHBLV-HIF-1 $\alpha$ -3flag-ZsGreen-Puro 病毒原液;轻轻混匀,第 2 天吸去含有病毒的培养液,换新鲜培养液继续培养。为得到稳定表达 HIF-1 $\alpha$  的细胞株 HepG2-HIF-1 $\alpha$ ,在感染 72 h 后将细胞消化,制成单细胞悬液,以每孔 1 个细胞的量接种于 96 孔板,加入嘌呤霉素,每 3 d 换液 1 次,3 周后消化细胞并扩大培养。

**1.2.2 荧光显微镜下观察细胞绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)表达** 取空白对照组、对照组和实验组生长至 60%~80% 融合度的细胞,于荧光显微镜下观察细胞,并使用化学发光荧光成像系统采集照片;计数绿色荧光下细胞数量和同一视野白光下细胞的数量,计算 GFP 阳性细胞比例,GFP 阳性细胞比例 = 绿色荧光下细胞的数量/白光下细胞数量  $\times 100\%$ 。

**1.2.3 Western blot 检测 HIF-1 $\alpha$  蛋白相对表达量及 Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白 p-Akt/Akt,p-p65/p65 蛋白表达** 取空白对照组、对照组和实验组细胞贴壁生长过夜,第 2 天用冷的 PBS 洗 3 次,加入细胞裂解

液冰上孵育 20 min,12 000  $\times g$  离心 15 min,收集上清得到细胞裂解液。BCA 试剂盒测定细胞裂解液中蛋白浓度,用细胞裂解液将 3 组细胞调至相同浓度;加入上样缓冲液。每个样品上样量为 30  $\mu$ g,采用变性十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)进行电泳,将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt、p-p65、Akt、p65 一抗(滴度均为 1 : 1 000)和 GAPDH 一抗(滴度为 1 : 10 000),4 °C 孵育过夜,Tris 缓冲生理盐水(Tris-buffered saline and Tween-20,TBST)洗涤 5 次,每次 5 min;加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠或抗兔二抗(滴度为 1 : 10 000),室温孵育 1 h,TBST 洗涤 5 次,每次 5 min;用增强化学发光试剂显色,应用 Amersham Imager 600 凝胶成像系统拍照,Image J 软件分析蛋白表达量,HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt、Akt、p-p65、p65 蛋白相对表达量以 HIF-1 $\alpha$ 、p-Akt、Akt、p-p65、p65 蛋白灰度值与 GAPDH 灰度值比值表示,计算 p-Akt/Akt、p-p65/p65 的比值。实验重复 3 次,取均值。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞 CD133 的表达** 取对照组和实验组生长至 90% 融合度的细胞,PBS 冲洗后,加入质量分数 0.25% 的胰酶溶液消化细胞,使用 Countstar 智能细胞分析仪进行细胞计数,取  $1 \times 10^6$  个细胞 PBS 洗涤后加入 100  $\mu$ L APC 标记的 CD133 抗体(滴度为 1 : 100),避光染色 15 min,PBS 洗涤,然后加入 200  $\mu$ L PBS 混匀,应用流式细胞仪检测 CD133 表达,应用 Flowjo 软件进行分析并计算 CD133 阳性细胞率。

**1.2.5 Akt 和 p65 抑制剂干预细胞的细胞活力和 CD133 表达的检测** 取实验组生长至 90% 融合度的 HepG2-HIF-1 $\alpha$  细胞,按照“1.2.4”项方法消化细胞并计数,按每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 96 孔板,随机分为 HepG2-HIF-1 $\alpha$  组、Akt 激酶抑制剂组和 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂组。第 2 天,Akt 激酶抑制剂组加入终浓度为 0.4、0.8、1.6、3.2、6.3、12.5、25.0  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> 的 Akt 激酶抑制剂,NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂组分别加入终浓度为 3.0、6.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂,设置空白对照组,继续培养 24 h;每孔加入 20  $\mu$ L 质量浓度为 5 g · L<sup>-1</sup> 的 MTT 溶液,于培养箱中孵育 2 h,吸弃培养液,加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砷溶解 10 min,于 570 nm 波长处测定吸光度值,计算细胞活力,细胞活力 = 不同浓度处理组细胞吸光值/空白对照组细胞吸光值。实验重复 3 次,取均值。另取 HepG2-HIF-1 $\alpha$  组、AKT 激酶抑制剂组

和 NF-κB 信号通路抑制剂组细胞,按“1.2.4”项方法检测细胞中 CD133 的表达。

**1.3 统计学处理** 应用 GraphPad Prism5 软件进行数据统计与分析,计数资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,2 组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 空白对照组、对照组和实验组 GFP 阳性细胞率及 HIF-1α 蛋白相对表达量比较** 结果见表 1 和图 1、图 2。对照组和实验组 GFP 阳性细胞率显著高于空白对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);对照组与实验组 GFP 阳性细胞率比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。实验组细胞中 HIF-1α 蛋白相对表达量显著高于空白对照组及对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05);空白对照组与对照组细胞中 HIF-1α 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。

表 1 空白对照组、对照组和实验组 GFP 阳性细胞率及细胞中 HIF-1α 蛋白相对表达量比较

Tab.1 Comparison of the rate of GFP positive cells and the relative expression of HIF-1α protein in cells among the blank control group,control group and experimental group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	GFP 阳性细胞率/%	HIF-1α 蛋白
空白对照组	3	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.02
对照组	3	97.27 ± 0.81 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>a</sup>
实验组	3	97.40 ± 0.70 <sup>a</sup>	1.22 ± 0.12 <sup>ab</sup>
<i>F</i>		82.540	41.400
<i>P</i>		0.000	0.000

注:与空白对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与对照组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

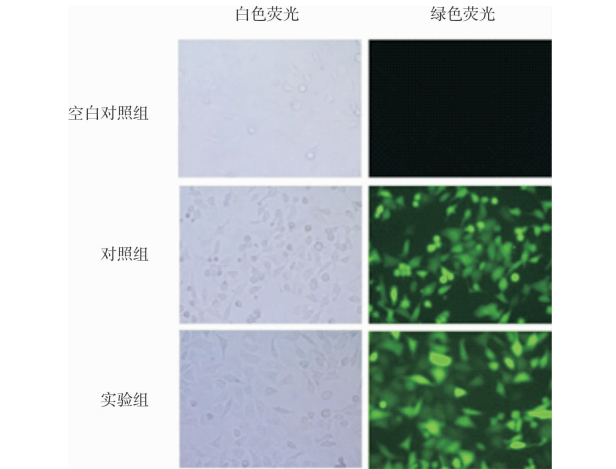
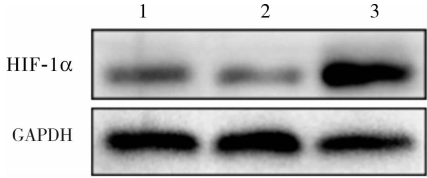


图 1 空白对照组、对照组和实验组细胞蛋白 GFP 蛋白表达(×200)

Fig.1 Expression of GFP protein in cells in the blank control group,control group and experimental group (×200)



1:空白对照组;2:对照组;3:实验组。

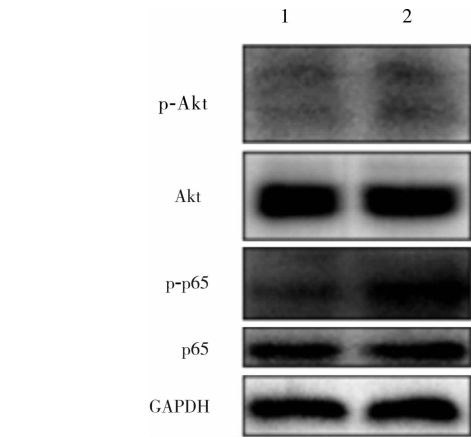
图 2 空白对照组、对照组和实验组细胞中 HIF-1α 表达

Fig.2 Expression of HIF-1α in cells in the blank control group,control group and experimental group

**2.2 对照组和实验组细胞中 p-Akt/Akt、p-p65/p65 比较** 结果见表 2 和图 3。实验组细胞中 p-Akt/Akt、p-p65/p65 蛋白表达水平显著高于对照组,差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

表 2 对照组和实验组细胞中 p-Akt/Akt、p-p65/p65 比较  
Tab.2 Comparison of the p-Akt/Akt and p-p65/p65 in cells between the control group and experimental group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	p-Akt/Akt	p-p65/p65
对照组	3	0.465 ± 0.011	0.505 ± 0.104
实验组	3	0.785 ± 0.154	1.952 ± 0.383
<i>t</i>		17.020	3.600
<i>P</i>		0.003	0.023



1:对照组;2:实验组。

图 3 对照组和实验组细胞中 p-Akt、Akt、p-p65、p65 蛋白表达

Fig.3 Expressions of p-Akt, Akt, p-p65, p65 protein in cells in the control group and the experimental group

**2.3 对照组和实验组 CD133 阳性细胞率比较** 结果见图 4。对照组、实验组 CD133 阳性细胞率分别为 (4.42 ± 0.29)%、(15.43 ± 0.41)%,实验组 CD133 阳性细胞率显著高于对照组,差异有统计学意义 (*t* = 22.160, *P* < 0.05)。

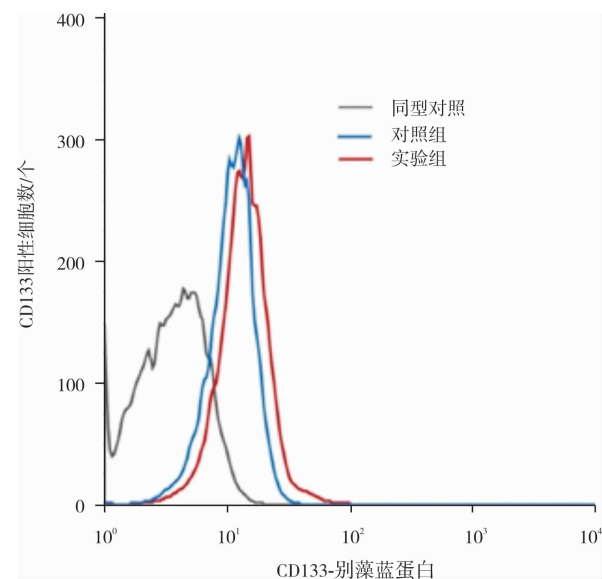


图 4 流式细胞仪检测对照组和实验组细胞中 CD133 的表达  
Fig.4 Expression of CD133 in cells in the control group and experimental group detected by flow cytometry

**2.4 Akt 激酶抑制剂和 NF-κB 信号通路抑制剂干预细胞的细胞活力和 CD133 表达的比较** 0.4、0.8、1.6、3.2、6.3、12.5、25.0 μmol · L<sup>-1</sup> Akt 激酶抑制剂组细胞活力分别为 0.920 ± 0.076、0.833 ± 0.066、0.854 ± 0.082、0.915 ± 0.153、0.913 ± 0.110、0.843 ± 0.039、0.927 ± 0.049,各浓度组间细胞活力比较差异无统计学意义 ( $F = 1.301, P > 0.05$ ); 3.0、6.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 μmol · L<sup>-1</sup> NF-κB 信号通路抑制剂组细胞活力分别为 0.978 ± 0.065、0.894 ± 0.050、0.995 ± 0.028、0.987 ± 0.043、0.982 ± 0.067、1.055 ± 0.112、0.901 ± 0.030、0.937 ± 0.056,各浓度组间细胞活力比较差异无统计学意义 ( $F = 2.300, P > 0.05$ )。HepG2-HIF-1α 组、Akt 激酶抑制剂组和 NF-κB 信号通路抑制剂组 CD133 阳性细胞率分别为 (15.43 ± 0.41)%、(8.61 ± 0.53)%、(9.86 ± 0.47)% ,3 组 CD133 阳性细胞率比较差异有统计学意义 ( $F = 171.9, P < 0.05$ ); Akt 激酶抑制剂组和 NF-κB 信号通路抑制剂组 CD133 阳性细胞率显著低于 HepG2-HIF-1α 组,差异有统计学意义 ( $t = 10.170, 8.932, P < 0.05$ ); Akt 激酶抑制剂组与 NF-κB 信号通路抑制剂组 CD133 阳性细胞率比较差异无统计学意义 ( $t = 1.745, P > 0.05$ )。

3 讨论

肝癌作为一种实体肿瘤,肿瘤内通常存在缺氧,此时 HIF-1α 的降解过程受到抑制,细胞中大量表达 HIF-1α<sup>[11-12]</sup>。HIF-1α 作为一种转录因子调控细胞

内胰岛素、胰岛素样生长因子、表皮生长因子等多种蛋白的表达,对细胞的增殖、迁移、凋亡及干细胞特性等发挥重要调控作用<sup>[13]</sup>。研究结果显示,在乳腺癌中缺氧诱导的 HIF-1α 可通过 A2BR/PKCδ 通路诱导乳腺癌干细胞<sup>[14]</sup>。目前,关于 HIF-α 对肝癌细胞的干细胞特性影响的相关研究报道较少。因此,本研究通过构建 HIF-1α 过表达细胞 HepG2-HIF-1α,观察 HepG2-HIF-1α 与 HepG2 细胞中 CD133 的表达差异,以及细胞中 p-Akt/Akt、p-p65/p65 的表达变化,分析 HIF-α 对肝癌细胞的干细胞特性的影响及机制。

慢病毒过表达载体是生命科学研究中常用的实验方法<sup>[15]</sup>,通常用于细胞或动物内基因的表达与沉默。本研究中将含有 GFP 标签及嘌呤霉素抗性基因的慢病毒载体经 HIF-1A 基因导入至肝癌细胞 HepG2 中,结果显示,对照组和实验组细胞中 GFP 相对表达量显著高于空白对照组;对照组与实验组细胞中 GFP 相对表达量比较差异无统计学意义。实验组细胞中 HIF-1α 蛋白相对表达量显著高于空白对照组及对照组;空白对照组与对照组细胞中 HIF-1α 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义。该结果证明,含有 HIF-1α 基因的慢病毒成功转染至 HepG2 细胞中,并能够正常表达,HepG2-HIF-1α 细胞构建成功。

肿瘤干细胞是指在肿瘤组织内具有自我更新和分化增殖潜能的细胞<sup>[16]</sup>,在肿瘤的发生、发展及治疗过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。国内外研究已证实,包括肝癌在内的多种实体肿瘤中存在肿瘤干细胞,干细胞的存在可能是肿瘤治疗失败的一个主要原因。通常用作肝癌干细胞的标志物有 CD13、CD24、CD44、CD90、CD133、OCT4、EpCAM 等<sup>[18]</sup>。CD133 是一种独特的干细胞标志物<sup>[19-22]</sup>,相对分子质量为 120 000,是一个由大约 850 个氨基酸组成的多肽链,具有 5 个跨膜结构域和 2 个巨大的胞外环,胞外环上具有 4 个潜在的糖基化位点,这些位点可与靶分子的结合位点结合而发挥调控作用。CD133 在肿瘤细胞干性及肿瘤耐药方面发挥重要作用,日本学者 WAKIZAKA 等<sup>[18]</sup> 研究报道,干细胞标志物 CD133 或 EpCAM 的高表达与肝癌患者的生存期缩短相关。LIU 等<sup>[21]</sup> 报道,CD133 与肝癌细胞的化学治疗的抵抗性、放射治疗的抵抗性及代谢重编程相关。本研究结果显示,实验组 CD133 阳性细胞率显著高于对照组,证实 HIF-α 蛋白过表达可增加肝癌细胞系 HepG2 的干细胞特性。



CD133 调控机制已成为近年来的研究热点,研究发现,Wnt/ $\beta$ -catenin、Hedgehog 及 Stat3 信号通路均可促进 CD133 表达,进而导致肝癌细胞持续自我更新<sup>[23-24]</sup>。Akt 在细胞存活和凋亡中起重要作用,近年来研究发现,Akt 信号通路与肝癌细胞的自我更新及干细胞特性相关;CDCA8 可通过抑制 Akt/ $\beta$ -actenin 信号通路抑制肝癌细胞干细胞特性<sup>[25]</sup>;HYD-PEP06 可通过抑制 Akt 信号通路抑制肝癌干细胞特性<sup>[26]</sup>;KAHRAMAN 等<sup>[27]</sup>研究显示,IL-8 可通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导肝癌干细胞特性。细胞内多种蛋白及 miRNA 的异常表达可通过活化 Akt 信号通路使肝癌细胞具有干细胞特性<sup>[28-29]</sup>。HE 等<sup>[30]</sup>研究发现,在肿瘤细胞中 NF- $\kappa$ B 信号通路通常异常活化。HU 等<sup>[31]</sup>研究证实,CD13 可通过 NF- $\kappa$ B 信号通路使肝癌细胞具有干细胞的特性。本研究结果显示,实验组细胞中 p-Akt/Akt、p-p65/p65 显著高于对照组,说明肝癌细胞高表达 HIF-1 $\alpha$  后 Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路被激活。此外,本研究结果显示,不同浓度的 AKT 激酶抑制剂组和 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂组 HepG2-HIF-1 $\alpha$  细胞活力差异均无统计学意义,Akt 激酶抑制剂组和 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂组 CD133 阳性细胞率均显著低于 HepG2-HIF-1 $\alpha$  组;该结果提示,Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路异常活化对肝癌细胞活力无显著影响,而对肝癌细胞的干细胞特性发挥重要的调控作用,HIF-1 $\alpha$  通过促进 Akt 及 NF- $\kappa$ B 的磷酸化激活 Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路来增加肝癌细胞的干细胞特性。

综上所述,HIF-1 $\alpha$  可通过促进 Akt 及 NF- $\kappa$ B p65 的磷酸化诱导肝癌细胞表面 CD133 的表达,增加肝癌细胞的干细胞特性。但是,本研究未检测 AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路中的其他信号蛋白,而检测其他信号蛋白将更有利于阐明 HIF-1 $\alpha$  诱导肝癌干细胞的特性的机制,后期需进一步研究,以其为以 HIF-1 $\alpha$  为靶点治疗肝癌提供更多理论证据。

## 参考文献:

- [1] ZHANG J, QI Y P, MA N, *et al.* Overexpression of Epcam and CD133 correlates with poor prognosis in dual-phenotype hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2020, 11(11): 3400-3406.
- [2] CAO X, WU W, WANG D, *et al.* Glycogen synthase kinase GSK3 $\alpha$  promotes tumorigenesis by activating HIF1/VEGFA signaling pathway in NSCLC tumor[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 32.
- [3] KAPPLER M, PABST U, WEINHOLD C, *et al.* Causes and consequences of a glutamine induced normoxic HIF1 activity for the

- tumor metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4742.
- [4] AZORÍN E P, LETECHÍA DE LEÓN C, GARCÍA-REYNA M G, *et al.* Mathematical description of the effect of HIF inhibition on the radiobiological response of LNCaP cells[J]. *Appl Radiat Isot*, 2022, 184: 110157.
- [5] SEMENZA G L. Breakthrough science: hypoxia-inducible factors, oxygen sensing, and disorders of hematopoiesis[J]. *Blood*, 2021, Epub ahead of print.
- [6] MUÑOZ-GALVÁN S, FELIPE-ABRIO B, VERDUGO E M, *et al.* Downregulation of MYPT1 increases tumor resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway and increasing the stemness[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 7.
- [7] SAMANTA D, PARK Y, NI X, *et al.* Chemotherapy induces enrichment of CD47<sup>+</sup>/CD73<sup>+</sup>/PDL1<sup>+</sup> immune evasive triple-negative breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(6): E1239-E1248.
- [8] 赵金金, 张海光, 崔非非, 等. 缺氧诱导因子 1 $\alpha$  对肝癌细胞 HepG2 干细胞特性及表阿霉素敏感性的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(2): 354-357.
- ZHAO J J, ZHANG H G, CUI F F, *et al.* Effect of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  on stemness and epirubicin sensitivity of HepG2 hepatoma cells[J]. *J Clin Hepatol*, 2021, 37(2): 354-357.
- [9] SONG M, BODE A M, DONG Z, *et al.* AKT as a therapeutic target for cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [10] ZINATIZADEH M R, SCHOCK B, CHALBATANI G M, *et al.* The nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases[J]. *Genes Dis*, 2021, 8(3): 287-297.
- [11] 王玉君, 林秀艳, 王涛. miR-582-5p 靶向调控 AKT3 对甲状腺乳头状癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *新乡医学院学报*, 2018, 35(11): 954-960.
- WANG Y J, LIN X Y, WANG T. Effect of miR-582-5p targeting AKT3 on proliferation and apoptosis of papillary thyroid carcinoma cells[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2018, 35(11): 954-960.
- [12] XIANG L, SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factors promote breast cancer stem cell specification and maintenance in response to hypoxia or cytotoxic chemotherapy[J]. *Adv Cancer Res*, 2019, 141: 175-212.
- [13] CASADO-MEDRANO V, BARRIO-REAL L, WANG A, *et al.* Distinctive requirement of PKC $\epsilon$  in the control of Rho GTPases in epithelial and mesenchymally transformed lung cancer cells[J]. *Oncogene*, 2019, 38(27): 5396-5412.
- [14] LAN J, LU H, SAMANTA D, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell enrichment[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(41): E9640-E9648.
- [15] PARK J H, SEO J H, JEON H Y, *et al.* Lentivirus-mediated VEGF knockdown suppresses gastric cancer cell proliferation and tumor growth in vitro and in vivo[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 1331-1341.
- [16] WANG R, LI Y, TSUNG A, *et al.* iNOS promotes CD24<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> liver cancer stem cell phenotype through a TACE/AD-

AM17-dependent notch signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2018,115(43):E10127-E10136.

[17]

GALASSI C,VITALE I,GALLUZZI L. Using epigenetic modifiers to target cancer stem cell immunoevasion[J]. *Cancer Cell*,2021,39(12):1573-1575.

[18]

WAKIZAKA K,YOKOO H,KAMIYAMA T, *et al.* CD133 and epithelial cell adhesion molecule expressions in the cholangiocarcinoma component are prognostic factors for combined hepatocellular cholangiocarcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2020, 50 ( 2 ): 258-267.

[19]

WU J,ZHU P,LU T, *et al.* The long non-coding RNA LncHDAC2 drives the self-renewal of liver cancer stem cells via activation of Hedgehog signaling[J]. *J. Hepatol*,2019,70(5):918-929.

[20]

VORA P,VENUGOPAL C,SALIM S K, *et al.* The rational development of CD133-targeting immunotherapies for glioblastoma [J]. *Cell Stem Cell*,2020,26(6):832-844.

[21]

LIU F,QIAN Y. The role of CD133 in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*,2021,22(4):291-300.

[22]

LIU C,CHEN Y J,FAN M H, *et al.* Characteristics of CD133-sustained chemoresistant cancer stem-like cells in human ovarian carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(18):6467.

[23]

FU X,ZHU X,QIN F, *et al.* Linc00210 drives Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation and liver tumor progression through CTNNBIP1-dependent manner[J]. *Mol Cancer*,2018,17(1):73.

[24]

CHEN Z Z,HUANG L,WU Y H, *et al.* LncSox4 promotes the self-renewal of liver tumour-initiating cells through Stat3-mediated Sox4 expression[J]. *Nat Commun*,2016,7:12598.

[25]

JEON T,KO M J,SEO Y R, *et al.* Silencing CDCA8 suppresses hepatocellular carcinoma growth and stemness via restoration of

ATF3 tumor suppressor and inactivation of AKT/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Cancers (Basel)*,2021,13(5):1055.

[26]

TIAN W,LI J,WANG Z, *et al.* HYD-PEP06 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis, epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties by inhibiting PI3K/Akt and WNT/ $\beta$ -catenin signaling activation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021,11(6):1592-1606.

[27]

KAHRAMAN D C,KAHRAMAN T,CETIN-ATALAY R. Targeting PI3K/Akt/mTOR pathway identifies differential expression and functional role of IL8 in liver cancer stem cell enrichment [J]. *Mol Cancer Ther*,2019,18(11):2146-2157.

[28]

HUAN H B,YANG D P,WEN X J, *et al.* HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2017,36(1):86.

[29]

WEI X,YOU X,ZHANG J, *et al.* MicroRNA-1305 inhibits the stemness of LCSCs and tumorigenesis by repressing the UBE2T-dependent Akt-signaling pathway[J]. *Mol Ther Nuc Acids*,2019,16:721-732.

[30]

HE J,GERSTENLAUER M,CHAN L K, *et al.* Block of NF- $\kappa$ B signaling accelerates MYC-driven hepatocellular carcinogenesis and modifies the tumor phenotype towards combined hepatocellular cholangiocarcinoma[J]. *Cancer Lett*,2019,458:113-122.

[31]

HU B,XU Y,LI Y C, *et al.* CD13 promotes hepatocellular carcinogenesis and sorafenib resistance by activating HDAC5-LSD1-NF- $\kappa$ B oncogenic signaling[J]. *Clin Transl Med*,2020,10(8):e233.

( 本文编辑:周二强 )

## 《新乡医学院学报》2022 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于1984年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月5日出版,大16开本,每期100页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、综述等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊、RCCSE中国核心学术期刊(A),目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》《中国医学文摘》《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价10.00元,全年120.00元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com,E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部