曲格列酮对 HepG2 及 CD133$^+$肝癌干细胞的毒性差异研究

许赫雷[1,2]，吴纯启[2]，董延生[2]，邓 红[1,2]，井 潇[1,2]，韩 刚[2]，杨 威[3*]，王全军[2*]，王茜莎[1*]

1. 广东药科大学药学院，广东 广州 510006
2. 军事医学科学院毒物药物研究所，抗毒药物与毒理学国家重点实验室，国家北京药物安全评价研究中心，北京 100850
3. 广东省生物资源应用研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用公共实验室，广东 广州 510260

摘 要：目的 分离与鉴定肝癌细胞 HepG2 中 CD133 标记的肝癌干细胞（LCSC），初步探讨曲格列酮（Tro）对 HepG2 及 CD133$^+$ LCSC 的细胞毒性差异。**方法** 利用流式细胞仪分选纯化 HepG2 中的 CD133$^+$和 CD133$^-$细胞，采用悬浮微球形成法、平板克隆形成法、Transwell 侵袭和迁移实验检测 HepG2、CD133$^+$和 CD133$^-$细胞的自我更新能力；BALB/c 裸鼠体内成瘤实验检测 HepG2 和 CD133 LCSC 细胞的成瘤能力；流式细胞术检测 HepG2、CD133$^+$ LCSC 细胞周期，MTT 法测定其对索菲替尼的耐药性；MTT 法检测 Tro 对 HepG2、CD133$^+$ LCSC 的毒性情况，全自动生化分析仪测定其对细胞上清天冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）、白蛋白（ALB）、尿素氮（BUN）和总蛋白（TP）水平的影响，荧光法检测 Tro 对细胞 CYP450 总活性和 ROS 水平的影响。**结果** CD133 标记的 CSC 在 HepG2 中占（0.72±0.05）%，CD133$^+$细胞分选后纯度为 98.7%；CD133$^+$细胞微球形成能力、克隆形成能力以及 Transwell 迁移与侵袭能力、肿瘤形成能力明显高于亲本（P＜0.05、0.01）；CD133$^+$细胞群大多处于 G_0/G_1 期，G_2/M 期未阻滞，并且对索菲替尼表现较大耐药性（P＜0.05、0.01）；Tro 处理 12、24、48、72 h 后，CD133$^+$ LCSC 半数抑制浓度（IC_{50}）显著低于 HepG2（P＜0.05、0.01）；80 μmol/L Tro 处理 48 h 时，LCSC 上清 AST、TP、LDH、ALB、BUN 生化指标不同程度升高，CYP450 总活性和 ROS 水平出现明显抑制（P＜0.05、0.01）。**结论** 成功筛选和鉴定具有高增殖能力的 CD133$^+$ HepG2 CSC，其在 Tro 引起肝细胞毒性方面较 HepG2 细胞更敏感，细胞毒性差异显著，为 Tro 靶向 CD133$^+$ LCSC 的细胞毒性研究提供新思路。

关键词：HepG2；CD133；肝癌干细胞；曲格列酮；肝细胞毒性；索菲替尼

中图分类号：R965 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 6376(2017)04 - 0455 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.04.005

Cytotoxicity differences of Troglitazone on HepG2 and CD133 liver cancer stem cells

XU He-lei[1,2], WU Chun-qi[2], DONG Yan-sheng[2], DENG Hong[1,2], JING Xiao[1,2], YANG Wei[3], WANG Quan-jun[2], WANG Xi-sha[1]

1. School of Pharmacy, Guang dong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China
2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Academy of Military Medical Sciences, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
3. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China

Abstract: Objective To isolate and identify CD133 liver cancer stem cells (LCSC) in HepG2 cells, and to investigate the cytotoxicity of troglitazone (Tro) on HepG2 and its liver stem cells. **Methods** The CD133$^+$ and CD133$^-$ population in the HepG2

收稿日期：2016-12-13

基金项目：国家重大新药创制科技重大专项（2013ZX09302303, 2012ZX09301-001-008）；北京市科委基金项目（Z131100006513010）

作者简介：许赫雷（1989—），男，硕士研究生，研究方向为心血管药理与药物毒理学。E-mail: xuheleigdpu@163.com

***通信作者** 王茜莎，副教授，研究方向为肿瘤药理学。E-mail: serann1122@gmail.com

王全军，研究员，研究方向为药物毒理学。E-mail: wangquanjunbeijing@163.com

杨 威，研究员，研究方法为药物毒理学。E-mail: yangwei0719@163.com

cell line were sorted by flow cytometry. Cells of CD133 sphere formation, colony formation assay, Transwell invasion migration assay, and BALB/c nude mice *in vivo* tumor formation were used to identify proliferative capacity of HepG2 cells and CD133 LCSC. Flow cytometry was used to detect the cell cycle of HepG2 and $CD133^+$ LCSC, and LCSC drug resistance to sorafenlb was evaluated by MTT. The toxicity of Tro to CD133 LCSC was detected by MTT assay, automatic biochemical analyzer was used to detect the contents of AST, LDH, TP, ALB and BUN changes in cell supernatants after administration, and the effect of Tro on the total activity of CYP450 and level of ROS was examined by fluorescence method to compare the cytotoxicity differences. **Results** CD133 expression in LCSC were found to be (0.72 ± 0.05) % in HepG2 and 98.7% in $CD133^+$ cells. The ability of sphere formation, colony formation and Transwell invasion migration of $CD133^+$ cells were higher than those of parental cells ($P < 0.05$ and 0.01). Compared with HepG2 cell, the ability of $CD133^+$ cell tumor formation was significantly increased. At the same time, $CD133^+$ cells were mostly in G_0/G_1 phase, G_2/M phase was not blocked, and the drug resistance of sorafenlb was higher than HepG2 cell ($P < 0.05$ and 0.01). IC_{50} of $CD133^+$ cell was significantly lower than that of HepG2 after treated with Tro for 12, 24, 48 and 72 h ($P < 0.01$). TP, LDH, ALB and BUN in LCSC treated with 80 μmol/L Tro for 48 h increased significantly, and the total activity of CYP450 and ROS were significantly inhibited ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Highly proliferative $CD133^+$ HepG2 tumor stem cells was successfully isolated and identified, which was more sensitive than HepG2 cells in liver cytotoxicity induced by Tro, showing significant cytotoxicity difference. This study provides a new idea for the study of $CD133^+$ HepG2 cells specific toxicity.

Key words: HepG2; CD133; liver cancer stem cells; troglitazone; hepatotoxicity; sorafenlb

肿瘤干细胞（cancer stem cells，CSC）作为正常干细胞和癌细胞中具有自我更新的、高致瘤和药物耐药细胞亚群，在调控肿瘤细胞的增殖、复发、转移和耐药中发挥关键作用，多用于化疗药物的筛选和靶向治疗。其中肝癌干细胞（liver cancer stem cells，LCSC）在最近几年的研究中，不断用于探索肝癌耐药机制的研究[1-2]、靶向 CSC 增殖信号研究[3-4]、抗 CSC 药物的筛选[5-6]等。

曲格列酮（troglitazone，Tro）作为 II 型糖尿病治疗药物，由于严重的特异质肝毒性撤市，但其引起的肝细胞毒性机制仍未得到较好的阐明。最近几年研究发现，Tro 对多种肿瘤细胞具有细胞毒性，损伤癌细胞[7-8]，从而抑制癌细胞增殖。

LCSC 可通过不同途径对大多数抗肿瘤药物产生耐药，但 LCSC 对暴露于肝毒性药物所显示的细胞毒性差异尚不清楚。因此，研究 Tro 作用于肝癌细胞及其干细胞的毒性差异，不仅对进一步研究 Tro 特异质肝毒性具有重要意义，而且为靶向 LCSC 的毒性研究提供新思路。本研究以 CSC 标志物 CD133 筛选 HepG2 细胞中 LCSC，探讨 Tro 对 $CD133^+$ LCSC 及其亲本细胞的毒性差异。

1 材料

1.1 实验细胞与动物

人肝癌 HepG2 细胞，购买于中国协和医科大学细胞资源中心，用含 15%胎牛血清（FBS）的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养，每 3～4 天换液或传代 1 次，取对数生长期细胞进行后续实验。

Balb/c- nu/nu 小鼠，雄性，4～6 周龄，体质量 18～21 g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（京）2012-0001，饲养于国家北京药物安全评价研究中心屏障环境内，动物实验均按照国际实验室动物伦理行为准则要求进行。

1.2 药物及主要试剂

曲格列酮（美国 R&D 公司，批号 4A/141218），索菲替尼（美国 MCE 公司，批号 19678）。

Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）细胞培养基、FBS、磷酸缓冲盐溶液（PBS）、DMEM/F12（1∶1）细胞培养基、B27，美国 Gibco 公司；胰蛋白酶 Trypsin，美国 SIGMA 公司；碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、表皮生长因子（EGF），美国 PeproTech 公司；Matrigel 基质胶、PI，美国 BD 公司；人 CD133/1（AC133）-PE、同型对照 Mouse IgG1-PE、FcR，德国 Miltenyi Biotec；ROS 和 LDH 检测试剂盒，中国 Beyotime 公司。

1.3 主要仪器

BD FACS Calibur 流式细胞仪、BD FACS Aria II SORP 分选型流式细胞仪，美国 BD 公司；CKX41- A32RC 型倒置显微镜，日本 Olympus 公司；ELX-800 型酶标仪，美国 BIO-TEK 公司；7180 全自动生化分析仪，日本日立公司；6 孔和 24 孔超低吸附孔板培养板、8.0 μm Transwell，美国 Corning 公司。

2 方法

2.1 LCSC 分选

将对数生长期 HepG2 细胞用 PBS 缓冲液清洗 3 次，0.25%胰蛋白酶消化细胞成单细胞悬液，300×*g* 离心 10 min 后弃上清，PBS 缓冲液重悬细胞，细胞计数，取 10^7/100 μL 4 份，加 FcR 阻断剂 20 μL 阻断非特异结合，CD 133/1-PE 抗体 20 μL 混匀，4 ℃避光孵育 30 min；PBS 缓冲液洗涤，300×*g* 离心 10 min 弃上清，过 400 目细胞筛，1 mL 分选液重悬成单细胞进行流式细胞仪分选 HepG2 $CD133^+$和 $CD133^-$细胞。

2.2 CD133 细胞自我更新能力

2.2.1 悬浮微球形成实验 取对数生长期 HepG2 细胞和分选后 $CD133^+$和 $CD133^-$ HepG2 细胞，细胞胰蛋白酶消化后制单细胞悬液，按每孔 300 个细胞接种于超低吸附 24 孔板内，添加无血清 DMEM/F12 培养基 3 mL，含 20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF、20 μL/mL B27，隔 3 天半量换液，连续培养 12 d，于倒置显微镜下观察计数拍照，按每个肿瘤球至少含 50 个细胞计数，取全部视野下形成数，计算微球增殖率。

微球增值率＝形成球数/接种细胞总数

2.2.2 平板克隆形成实验 取 HepG2 细胞和分选后 $CD133^+$和 $CD133^-$细胞，HepG2 胰蛋白酶消化后计数，200 个细胞/孔种于 24 孔板，设 4 个复孔，无血清培养基孵育 14 d 后用预冷 PBS 清洗细胞，20%甲醇固定 20 min，0.2%结晶紫染色 20 min，流水轻微冲洗，室温风干后于光学显微镜下观察，计数克隆形成数，计算克隆形成率。

克隆形成率＝克隆形成数/接种细胞总数

2.2.3 Transwell 侵袭与迁移实验 侵袭实验中 Transwell 小室内加入 1∶5 Matrigel 胶 37 ℃水化 30 min，1% FBS 培养基制备 HepG2、$CD133^+$和 $CD133^-$单细胞悬液，500 个/100 μL/孔，下室加含 20 % FBS 培养基 600 μL，孵育 24 h，甲醇固定 20 min，结晶紫染色计数，迁移实验 Transwell 内不加 Matrigel 胶，其它同上。计算迁移或侵袭率。

迁移或侵袭率＝迁移或侵袭数/接种细胞总数

2.3 CD133 标记 LCSC 在裸鼠体内致瘤性

Balb/c 小鼠随机分 4 组，每组 4 只。分别将 5×10^3 HepG2；5×10^3、2×10^4 $CD133^+$和 5×10^3、2×10^4 $CD133^-$细胞与 Matrigel 胶 1∶1 注于皮下，定期测量体质量、肿瘤长径（*a*）和短径（*b*），根据公式 $V=ab^2/2$ 计算肿瘤体积，观察 60 d 内成瘤小鼠数量。

2.4 细胞周期与索菲替尼耐药检测

相同数量的 HepG2 细胞、$CD133^+$和 $CD133^-$细胞用预冷 PBS 清洗 2 次，300×*g* 离心 5 min，小心吸弃上清，70%乙醇固定过夜，洗涤后加 Ranse A 37 ℃孵育 30 min，加入 300 μL 5 mg/mL PI 进行流式细胞仪分析。

HepG2、$CD133^+$、$CD133^-$细胞按 5 000/100 μL/孔接种于 96 孔板，每组设 6 个复孔，边缘用 150 μL PBS 缓冲液填充，细胞贴壁后用含 160、80、40、20 和 10 μmol/L 浓度索菲替尼处理细胞 24、48、72 h 后加入 MTT 作用 4 h，加入 DMSO 轻微震荡后检测吸光度（*A*）值，计算半数抑制浓度（IC_{50}）。

2.5 Tro 对 HepG2 及 $CD133^+$ LCSC 的毒性差异

2.5.1 MTT 法检测 Tro 对 HepG2、$CD133^+$ LCSC 的毒性 HepG2、$CD133^+$细胞按 5 000/100 μL/孔接种于 96 孔板，每组设 6 个复孔，边缘用 150 μL PBS 缓冲液填充，细胞贴壁后用含 320、160、80、40、20 和 10 μmol/L 浓度的 Tro 处理细胞 12、24、48、72 h 后加入 MTT 作用 4 h，加入 DMSO 轻微震荡后检测 *A* 值，计算 IC_{50}。

2.5.2 细胞上清中分泌酶的测定 HepG2、$CD133^+$细胞按 5 000/100 μL/孔接种于 24 孔板，采用各自培养条件培养，80 μmol/L Tro 处理细胞 48 h 为 Tro 组，另设不加药细胞为对照组。把培养上清转入离心管，4 ℃、900×*g* 离心 10 min 取上清并迅速用全自动生化分析仪测定其天冬氨酸氨基转移酶（AST）、乳酸脱氢酶（LDH）、白蛋白（ALB）、尿素氮（BUN）和总蛋白（TP）的水平。

2.5.3 CYP450 酶活性和 ROS 水平的测定 HepG2、$CD133^+$细胞按 5 000/100 μL/孔接种于 24 孔板，采用各自培养条件培养，每组设 8 个复孔，80 μmol/L Tro 处理 48 h 后，按照 CYP450 酶总活性荧光定量试剂盒说明书测定；ROS 水平检测分组同上，HepG2 采用原位装载 DCFC-DA 探针，$CD133^+$细胞采用收集细胞后装载 DCFC-DA 探针，37 ℃细胞培养箱中孵育 30 min，每隔 3～5 min 颠倒混匀 1 次，无血清培养液洗涤细胞 3 次，多功能酶标仪 488 nm 激发波长，525 nm 发射波长下测定。

2.6 统计学分析

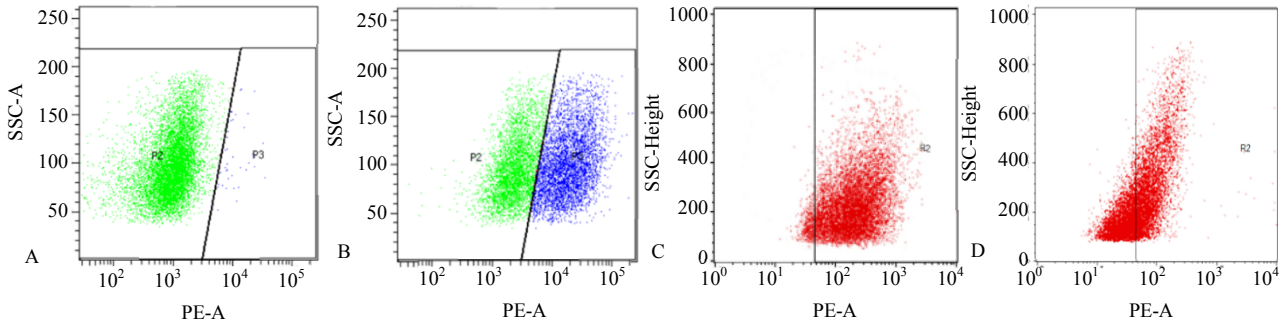
数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计软件

进行单因素方差分析。采用 Graphpad Prism 6.0 软件计算 IC_{50} 与绘图。

3　结果

3.1　HepG2 细胞 CSC 标志物检测

对 HepG2 肝癌细胞系中 CSC 的标志物 CD133 进行流式细胞仪分析，CD133 表型在 HepG2 细胞含量为（0.72±0.05）%，其中阳性和阴性细胞亚型表达率分别为（58.5±2.3）%和（47.9±2.9）%。在保持 HepG2 良好状态下分选获得 $CD133^+$和 $CD133^-$细胞，其分选后纯度为 98.7%、53.76%。见图 1。



A-HepG2 细胞 CD133 表型水平；B-HepG2 细胞 CD133 阳性和阴性亚型表达率；C-分选后 $CD133^+$纯度；D-分选后 $CD133^-$纯度

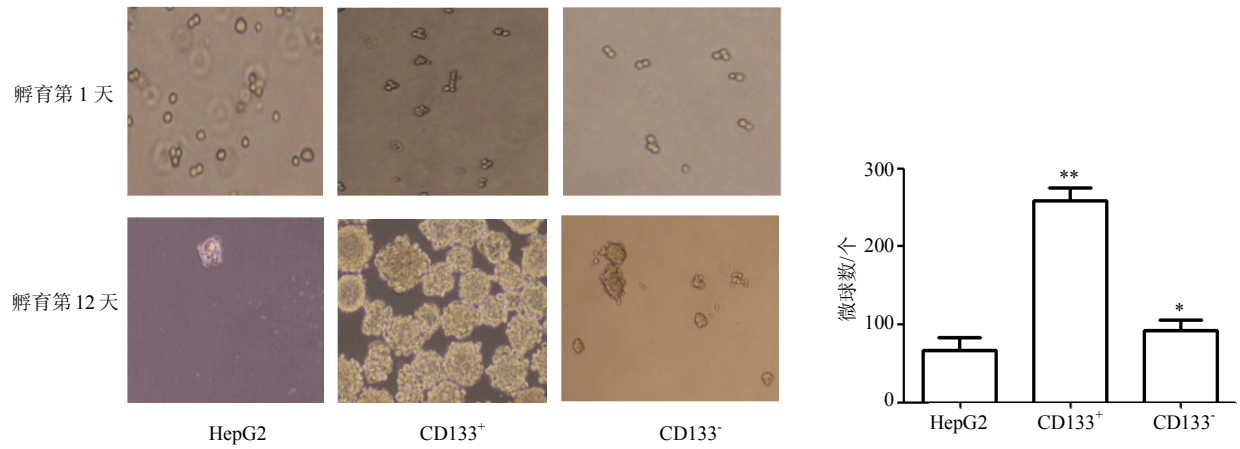
A-CD133 phenotype level in HepG2 cell; B-HepG2 cell CD133 positive and negative subtype expression rate; C-HepG2 $CD133^+$ purity after sorting; D-HepG2 $CD133^-$ purity after sorting

图 1　流式细胞仪检测 HepG2 CSC 标志物 CD133 表达

Fig. 1　Expression of HepG2 surface marker CD133 examined by FACS

3.2　CD133 细胞自我更新能力

3.2.1　悬浮微球形成能力　在超低吸附孔板中，无血清培养基连续培养 12 d 后，$CD133^-$、$CD133^+$细胞形成微球数显著高于 HepG2 细胞（P＜0.05、0.01），其中 $CD133^+$细胞形成微球数远高于 $CD133^-$细胞。HepG2 细胞出现死亡，增值率为（12.2±1.7）%，$CD133^+$细胞不断增殖，形成悬浮微球团块，其单个细胞增殖率为（51.98±3.10）%。结果见图 2。



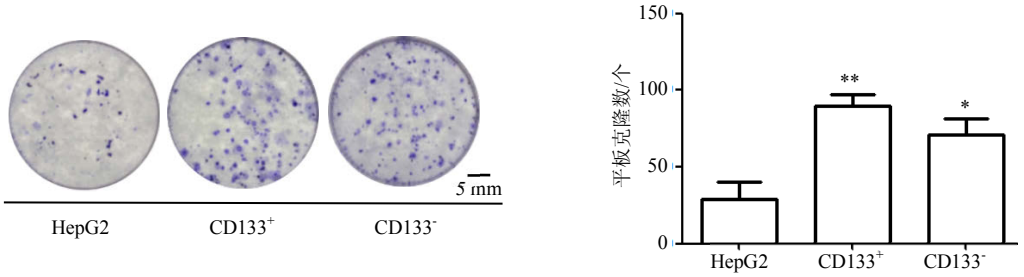
与 HepG2 细胞比较：$^*P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01

$^*P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* HepG2 cell

图 2　无血清培养条件下 CSC 的悬浮微球形成能力（$\bar{x}\pm s$, $n=5$）

Fig. 2　Spere formation assay of CSC cells in serum-free culture medium ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.2.2　平板克隆形成能力　与亲本细胞比较，$CD133^+$和 $CD133^-$细胞克隆数显著增加（P＜0.05、0.01）。$CD133^+$细胞克隆形成率为（44.91±0.36）%，显著高于亲本细胞 HepG2 的（14.63±0.55）%和 $CD133^-$细胞的（35.38±0.5）%。说明 $CD133^+$细胞具有显著克隆形成能力。结果见图 3。



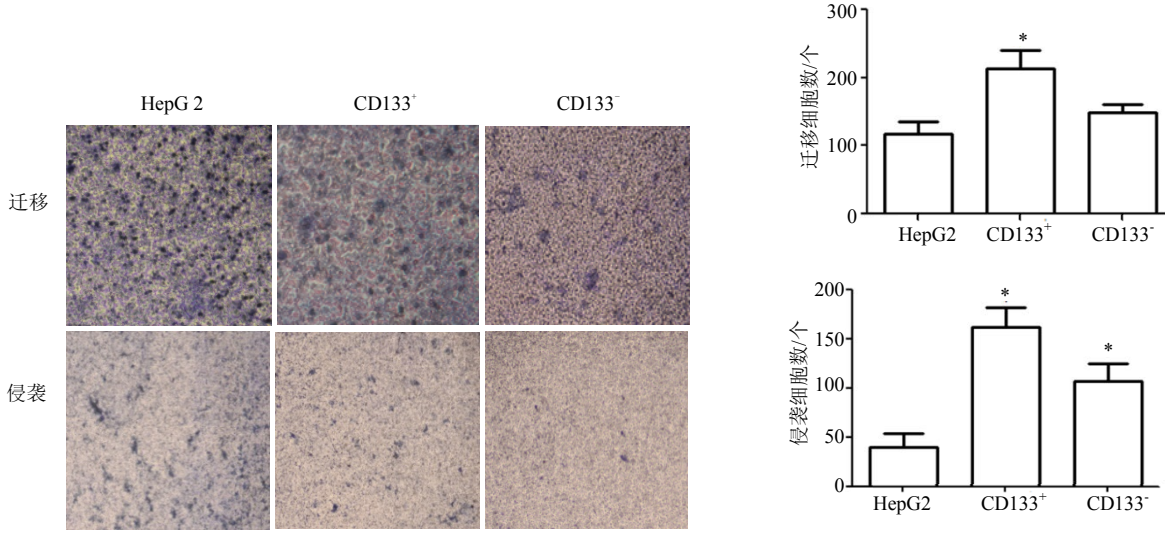
与 HepG2 细胞比较：$^{**}P<0.01$

$^{**}P < 0.01$ *vs* HepG2 cell

图 3 CD133$^+$ LCSC 平板克隆形成能力（$\bar{x}\pm s$, $n=5$）

Fig. 3 Flat plate clony assay of CD133$^+$ cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.2.3 迁移和侵袭能力 Transwell 小室 24 h 迁移和侵袭结果显示，CD133$^+$和 CD133$^-$细胞经过对 Marigel 胶侵袭消化，侵袭细胞数显著高于亲本细胞（$P<0.05$），而在迁移中，CD133$^-$细胞相比亲本细胞无明显差异。CD133$^+$细胞迁移和侵袭率分别为（43.93±0.27）%和（32.33±0.41）%，较 HepG2 细胞的（23.40±0.36）%和（8.00±0.29）%差异明显。结果见图 4。



与 HepG2 细胞比较：$^{*}P<0.05$

$^{*}P < 0.05$ *vs* HepG2 cell

图 4 CD133$^+$ LCSC Transwell 迁移和侵袭能力（$\bar{x}\pm s$, $n=5$）

Fig. 4 Ability of migration and invasion of CD133$^+$ LCSC ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.3 CD133 标记 LCSC 在裸鼠体内致瘤性

Balb/c 小鼠体内致瘤性结果显示，在相同时间内，CD133$^+$细胞的成瘤率随注射细胞的增加不断增加；同时，在等同细胞数量中，CD133$^+$细胞致瘤时间明显比 HepG2 提前，肿瘤形成率高于阴性细胞和亲本细胞（表 1）。随时间增长，瘤体积增大，CD133$^+$细胞肿瘤体积增长最快，结果见图 5、6。

3.4 CD133 LCSC 细胞周期和耐药能力

流式测定细胞周期结果显示，CD133$^+$细胞大多处于 G_0/G_1 期，处于 DNA 合成前期，同时 G_2/M 期未得到阻滞，说明 DNA 合成功能完好，与 HepG2 比较，CD133$^+$细胞具有潜在增殖分化能力。结果见图 7。

MTT 检测 CD133$^+$ LCSC 对索菲替尼耐药结果显示，CD133$^+$细胞在索菲替尼作用 24、48 和 72 h

表 1　HepG2 和 CD133 LCSC 细胞的成瘤能力

Table 1　Tumor formation ability of HepG2 and CD133 LCSC

细胞系	表型	注射细胞数	成瘤小鼠/只			
			注射后 15 d	注射后 30 d	注射后 45 d	注射后 60 d
HepG2	$CD133^+$	5 000	0/4	2/4	4/4	4/4
		20 000	1/4	3/4	4/4	4/4
	$CD133^-$	5 000	0/4	0/4	3/4	4/4
		20 000	0/4	2/4	4/4	4/4
	HepG2	5 000	0/4	0/4	0/4	1/4

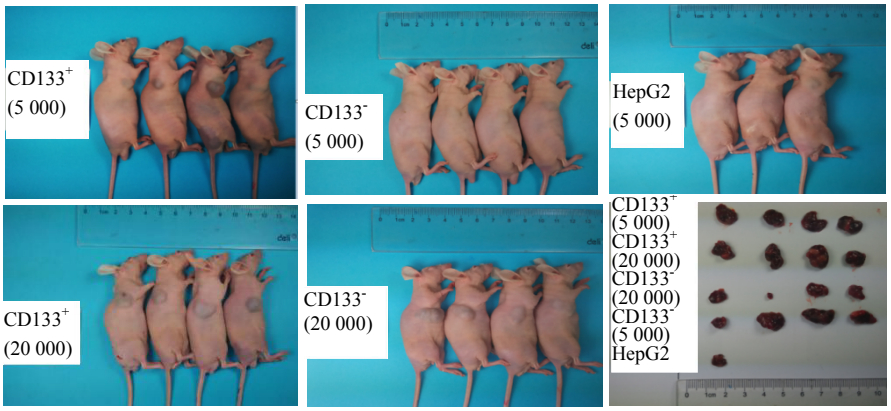


图 5　Balb/c 小鼠 sc $CD133^+$、$CD133^-$和 HepG2 细胞肿瘤形成图

Fig. 5　Images of tumors formed in Balb/c mice injected subcutaneously with $CD133^+$ LCSC, $CD133^-$ LCSC, and HepG2

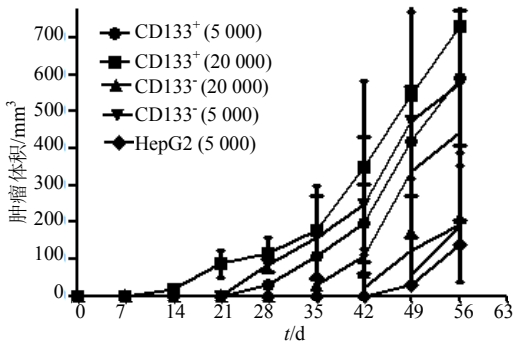


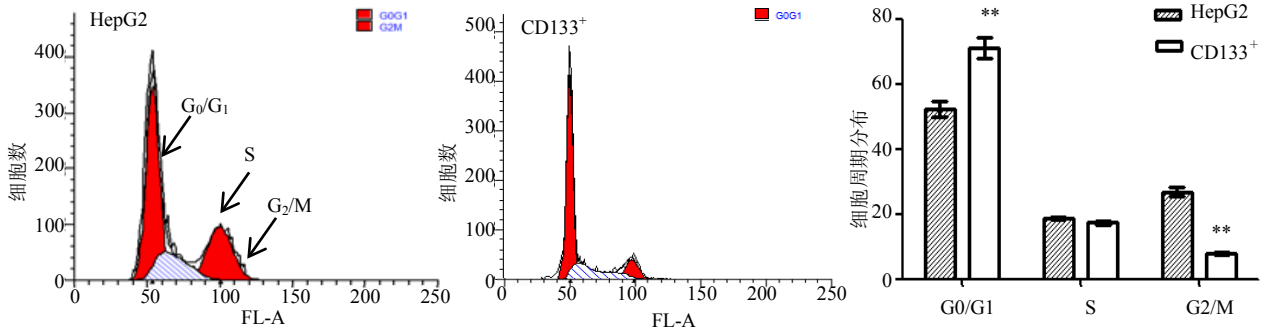
图 6　肿瘤生长体积曲线（$\bar{x} \pm s$, $n = 4$）

Fig. 6　Growth curve of tumor volumes ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

的 IC_{50} 分别为（13.85±1.38）、（41.22±1.75）和（153.10±2.00） μmol/L，与 HepG2 细胞比较，$CD133^+$ LCSC 的耐药性随索菲替尼暴露时间的增加而显著增加，符合 CSC 的耐药性特点[9]，并与之前相关报道肿瘤耐药结果相似。结果见表 2。

3.5　Tro 对 HepG2 及 $CD133^+$ LCSC 的毒性差异

3.5.1　MTT 法测定 Tro 对 LCSC 的细胞毒性　如表 3 所示，Tro 的细胞毒性均随时间的延长而增大，呈现出明显的时间剂量相关性。在不同时间点，Tro 对 $CD133^+$ LCSC 的早期细胞毒性明显超过其亲本细胞，差异显著（$P<0.01$）。在 24～48 h 时间段，



与 HepG2 细胞比较：*$P<0.01$

*$P < 0.01$ *vs* HepG2 cell

图 7　CD133 LCSC 的细胞周期（$\bar{x} \pm s$, $n = 4$）

Fig. 7　Cell cyele of CD133 LCSC ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

表 2 MTT 检测细胞对索菲替尼耐药性（$\bar{x}\pm s$, $n=6$）

Table 2 Sorafenlb resistant were measured by MTT ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

细胞	$IC_{50}/(\mu mol\cdot L^{-1})$		
	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h
HepG2	29.15±1.54	21.10±0.76	19.46±1.49
$CD133^+$	13.85±1.38*	41.22±1.75**	153.10±2.00**

与 HepG2 组比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

*$P<0.05$ **$P<0.01$ *vs* control group HepG2

表 3 Tro 对 LCSC 的细胞毒性（$\bar{x}\pm s$, $n=6$）

Table 3 Cytoxicity of Tro on LCSC ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

细胞	$IC_{50}/(\mu mol\cdot L^{-1})$			
	作用 12 h	作用 24 h	作用 48 h	作用 72 h
HepG2	217.83±1.47	171.18±1.56	79.38±0.54	50.87±0.16
$CD133^+$	150.52±1.25*	99.08±1.90**	43.96±0.71**	14.81±1.30**

与 HepG2 组比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

*$P<0.05$ **$P<0.01$*vs* control group HepG2

LCSC 的细胞损伤程度超过其他时间点，但随着 Tro 暴露时间的延长，Tro 对 2 种细胞的毒性差异逐渐缩小。

3.6 Tro 细胞毒性对培养上清的酶学影响

结果表明，药物作用于 HepG2 和 $CD133^+$细胞 48 h 后，80 μmol/L 的 Tro 使得细胞 AST、TP、ALB、BUN 和 LDH 均有不同程度升高。其中与各自对照组比较，$CD133^+$细胞的 ALB 和 AST、TP 水平上升幅度显著升高（$P<0.05$、$P<0.01$），LDH 水平略有升高，但无明显差异（$P>0.05$），见表 4。

表 4 Tro 对 HepG2 和 $CD133^+$ LCSC 酶学分泌特征的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=8$）

Table 4 Effects of troglitazone on enzyme secretion of HepG2 and $CD133^+$ LSCS ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

细胞	组别	剂量/(μmol·L⁻¹)	AST/(U·L⁻¹)	TP/(g·L⁻¹)	ALB/(g·L⁻¹)	BUN/(mmol·L⁻¹)	LDH/(U·L⁻¹)
HepG2	对照	—	2.71±0.61	1.46±0.23	2.05±0.29	3.81±0.05	37.11±1.36
	Tro	80	4.71±0.73**	2.31±0.44	2.66±0.30*	3.98±0.10	45.67±6.51**
$CD133^+$	对照	—	0.89±0.78	0.55±0.88	1.94±0.16	2.95±0.07	0.88±1.27
	Tro	80	1.77±1.30**	1.14±0.17**	2.33±0.24*	3.11±0.08	1.22±0.97

与相应对照组比较：*$P<0.05$ **$P<0.01$

*$P<0.05$ **$P<0.01$*vs* corresponding control group

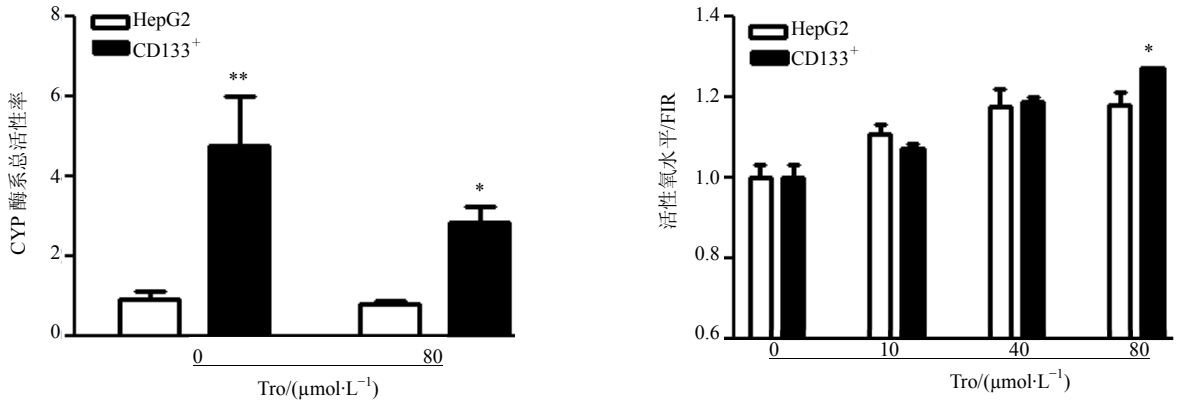
3.7 Tro 对 CYP450 总活性和细胞 ROS 水平的影响

结果可知，$CD133^+$ LCSC 的 CYP450 总活性显著高于其亲本细胞（$P<0.01$），80 μmol/L 作用 48 h 后，Tro 能导致 $CD133^+$ LCSC 的 CYP450 总活性明显降低（$P<0.05$），显示对 CYP450 酶一定的抑制作用。在 ROS 生成量上，随着剂量的增加，$CD133^+$ LCSC 的 ROS 生成不断增加，在 80 μmol/L Tro 暴露时，ROS 生成（1.27±0.06）%高于亲本细胞（1.18±0.07）%（$P<0.05$），结果见图 8。

4 讨论

目前 LCSC 大多通过 CSC 标记物如 CD133、CD90 和 CD44 等进行流式细胞仪分选或免疫磁珠分选获得。跨膜糖蛋白 CD133 作为肿瘤细胞表面抗原，在多种肿瘤组织中可检测到，如胃癌[10-11]、肺癌[12-13]、结肠癌和肝癌[14]等。本实验以肝癌细胞 HepG2 进行研究，以 CD133 为标记物进行流式细胞仪分选，获得 $CD133^+$和 $CD133^-$细胞，实验采用含 EGF、b-FGF、B27 和 N2 的无血清培养基悬浮培养分选的细胞[15]，较好抑制 LCSC 分化，保持 LCSC 的未分化状态，保证了后续实验条件。

在过去已有报道中，LCSC 中的 $CD133^+$细胞较 $CD133^-$细胞有更强的自我更新能力[16-17]，最大程度代表着 CSC 细胞[18]。获得的 LCSC 细胞在增殖能力方面，如在悬浮肿瘤微球形成、单细胞克隆形成、侵袭和迁移能力等方面，$CD133^+$细胞显示增殖能力显著高于亲本细胞和 $CD133^-$细胞，表现较强的自



与 HepG2 细胞比较：$^{*}P<0.05$

$^{*}P < 0.05$ *vs* control group HepG2

图 8　Tro 对 HepG2 和 CD133^{+} LCSC CYP450 总活性和 ROS 水平的影响

Fig. 8　Effects of Tro on CYP450 total activity and ROS level of HepG2 and CD133^{+} LCSC

我更新能力，富有干细胞较强的潜在增殖能力。在细胞周期表达中，CD133^{+}细胞较亲本细胞大多为 G_0/G_1 期，处于静止期，在索菲替尼中也表现较强的耐药性，随着时间的增加，耐药性显著增加，与之前 CSC 相关报道相一致[19]，同时在体外异种肿瘤形成实验中，在相同条件下，CD133^{+}细胞的肿瘤形成能力显著高于亲本和 CD133^{-}，除 CD133^{-}组（5 000）环境因素造成肿瘤形成差异较大，符合了 CSC 的潜在增殖特性，也符合目前报道关于 CSC 的普遍生物学特点[20]。因此 CD133^{+}细胞很大程度代表了 LCSC。

过去研究发现，Tro 在多种肿瘤细胞中暴露出肝细胞毒性，抑制肿瘤的增殖，但 Tro 对来自 CSC 毒性少有报道。之前临床研究发现，在药物治疗过程中，体干细胞如造血干细胞、上皮干细胞、间充质干细胞[21]等受到药物毒副作用损伤，发生血液系统毒性[22]、神经干细胞毒性[23]、器官上皮细胞毒性等。干细胞的损伤将直接影响其向成熟细胞的分化，进而影响脏器的修复。LCSC 作为来自肝癌细胞的群体，保留了正常肝干细胞的大部分功能[24]，比如较强的自我更新增殖能力，表达干性相关蛋白等，因此 Tro 在肝癌细胞和其 LCSC 暴露的细胞毒性差异研究显得至关重要。

本研究发现，Tro 在 HepG2 及其干细胞中显示一定的细胞毒性差异，且有显著的剂量-时间相关性，在 72 h 时，CD133^{+} LCSC 所显示的细胞毒性 IC_{50} 达到其亲本细胞的 3 倍，说明 Tro 对 CD133^{+} LCSC 有一定选择毒性，而这种毒性可能与其 CYP450 活性抑制有关，降低对药物代谢，使得细胞内药物蓄积浓度增加。ROS 在多种生理病理中发挥重要作用，也参与多种药物致肝损伤，CD133^{+}细胞释放的 ROS 水平出现增高，很可能与药物引起的氧化应急密切相关，进而损伤细胞，这也与本课题组之前报道噻唑烷二酮类药物致肝损伤机制相一致[25]。细胞培养上清酶学指标的变化一定程度显示肝损伤情况[26]，在细胞群的培养上清释放生化酶类中，药物的暴露促使 AST、LDH、TP 等不程度的释放，但 CD133^{+} LCSC 所释放的酶水平的幅度高于其亲本细胞，可能参与 Tro 致 LCSC 细胞毒性。

综上所述，本研究成功从 HepG2 细胞中获取潜在增殖能力较强的 CD133^{+}LCSC，与其亲代细胞比较，Tro 对其 CD133^{+}LCSC 显示有明显的细胞选择毒性，这种毒性有可能与 Tro 损伤肝细胞代谢作用相关，其具体的机制需进一步研究，本研究为 Tro 靶向 LCSC 的特异毒性研究提供新思路。

参考文献

[1] Jia Q, Zhang X, Deng T, et al. Positive correlation of Oct4 and ABCG2 to chemotherapeutic resistance in CD90^{+} CD133^{+} liver cancer stem cells [J]. Cell Reprogram, 2013, 15(2): 143-150.

[2] Ma S. Biology and clinical implications of CD133^{+} liver cancer stem cells [J]. Exp cell Res, 2013, 319(2): 126-132.

[3] Parasramka M A, Patel T. Long non-coding RNA regulation of liver cancer stem cell self-renewal offers new therapeutic targeting opportunities [J]. Stem Cell Investig, doi: 10.3978/j.issn.2306-9759.2016.01.01. eCo llection 2016..

[4] Zhu P, Wang Y, Wu J, et al. LncBRM initiates YAP1 signalling activation to drive self-renewal of liver cancer stem cells [J]. Nat Commun, 2016, 7: 13608.

[5] Chen J J, Cai N, Chen G Z, et al. The neuroleptic drug pimozide inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2015, May 27. http://www. impactjournals. com/oncotarget/misc/linkedout.php?pii=4307

[6] Zhai B, Zhang X, Sun B, et al. MK2206 overcomes the resistance of human liver cancer stem cells to sorafenib by inhibition of pAkt and upregulation of pERK [J]. Tumour Biol, 2016, 37(6): 8047-8055.

[7] Saha S, Chan D S Z, Lee C Y, et al. Pyrrolidinediones reduce the toxicity of thiazolidinediones and modify their anti-diabetic and anti-cancer properties [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 697(1/3): 13-23.

[8] Mazerbourg S, Kuntz S, Grillier-Vuissoz I, et al. Reprofiling of troglitazone towards more active and less toxic derivatives: a new hope for cancer treatment ? [J]. Curr Top Med Chem, 2016, 16(19): 2115-2124.

[9] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284.

[10] Brungs D, Aghmesheh M, Vine K L, et al. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications [J]. J gastroenterol, 2016, 51(4): 313-326.

[11] Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo H Z, et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer [J]. Pathol int, 2012, 62(2): 112-119.

[12] Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. Cell Death Differ, 2008, 15(3): 504-514.

[13] Sarvi S, Mackinnon A C, Avlonitis N, et al. CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemo-resistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist [J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1554-1565.

[14] Jin Y, Mao J, Wang H, et al. Enhanced tumorigenesis and lymphatic metastasis of $CD133^{+}$ hepatocarcinoma ascites syngeneic cell lines mediated by JNK signaling pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67(4): 337-345.

[15] Prasetyanti P R, Zimberlin C, De Sousa E, et al. Isolation and propagation of colon cancer stem cells [J]. Stem Cell Niche: Methods Protocols, 2013: 247-259.

[16] Ma S, Chan K W, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/ progenitor cells [J]. Gastroenterol, 2007, 132(7): 2542-2556.

[17] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. Int J Cancer, 2007, 120(7): 1444-1450.

[18] Song W, Li H, Tao K, et al. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Clin Pract, 2008, 62(8): 1212-1218.

[19] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4):275- 284.

[20] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity [J]. Int J cancer, 2007, 120(7): 1444-1450.

[21] 余佩英, 郑治秀, 蔡智玲,等. 谷氨酸诱导骨髓间充质干细胞毒性损伤的作用 [J]. 中国临床研究, 2008, 21(6): 651-652.

[22] 曹从云, 孙应彪, 朱玉真. 硫酸镍对造血干细胞毒作用的研究[J]. 中国公共卫生学报, 1998(6):365-365.

[23] 李庆军, 刘 军, 肖颂华,等. 6-羟基多巴对 C17.2 神经干细胞毒性及 NURR1 基因对其保护作用 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(2): 141-145.

[24] Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different [J]. Semin Cancer Biol, 2010, 20(2): 85-92.

[25] Hu D, Wu C, Li Z, et al. Characterizing the mechanism of thiazolidinedione -induced hepatotoxicity: An *in vitro* model in mitochondria [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 284(2): 134-141.

[26] 李 曼, 吴纯启, 许赫雷, 等. 对乙酰氨基酚对大鼠原代肝细胞及 BRL-3A 细胞的毒性作用比较 [J]. 药物评价研究, 2016 (3): 349-356.