

## ·实验研究 Experimental research·

## 索拉非尼对不同的人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达的影响

徐 瀚, 周 石, 王黎洲, 安天志, 蒋天鹏, 宋 杰, 李 兴

**【摘要】** 目的 研究索拉非尼对不同的人肝癌细胞株 HepG2、Hep3B、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、MHCC97H、MHCC97L、HCCLM3、HCCLM6 中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达的影响。方法 免疫印迹法和溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)比色法检测索拉非尼在不同人肝癌细胞株中对 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达的影响及索拉非尼对不同人肝癌细胞株的抑制作用。结果 不同的人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达较正常人肝细胞(HL-7702)均显著上调( $P<0.01$ )。索拉非尼对 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3 和 HCCLM6 肝癌细胞株的细胞毒活性  $IC_{50}$  值分别为 14.56、9.14、9.46、17.21、9.29  $\mu\text{mol/L}$ 。分别以 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  剂量索拉非尼处理 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 后, B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达均较对照组显著下调( $P<0.01$ )。结论 B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中通常过表达, 可影响肿瘤免疫逃逸, 可能是未来肝癌防治的一个新靶点。

**【关键词】** 肝癌细胞; B7-H3 蛋白; B7-H4 蛋白; 免疫印迹法; MTT 法

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2018)-01-0058-05

**The effect of sorafenib on the expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins in different human hepatocellular carcinoma cell lines** XU Han, ZHOU Shi, WANG Lizhou, AN Tianzhi, JIANG Tianpeng, SONG Jie, LI Xing. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: LI Xing, E-mail: lixing111@sina.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of sorafenib on the expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins in different human hepatocellular carcinoma cell lines, including HepG2, Hep3B, BEL-7402, BEL-7404, BEL-7405, QGY-7701, QGY-7703, SMMC-7721, MHCC97H, MHCC97L, HCCLM3 and HCCLM6. **Methods** Western blotting and MTT assay were used to check the influence of sorafenib on the expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins in different human hepatocellular carcinoma cell lines and to test the inhibitory effect of sorafenib on different human hepatocellular carcinoma cell lines. **Results** Compared with normal human liver cells (HL-7702), the expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins in different human hepatocellular carcinoma cell lines were significantly up-regulated ( $P<0.01$ ). The cytotoxic activity  $IC_{50}$  values of sorafenib to Hep3B, BEL-7404, MHCC97H, HCCLM3 and HCCLM6 were 14.56, 9.14, 9.46, 17.21 and 9.29  $\mu\text{mol/L}$  respectively. After treating Hep3B, BEL-7404, MHCC97H, HCCLM3 and HCCLM6 with sorafenib at the doses of 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  separately, the expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins were strikingly down-regulated when compared with the control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The over-expressions of B7-H3 and B7-H4 proteins in different human hepatocellular carcinoma cell lines are a common finding, which can influence tumor immune escape. It may be a new target for prevention and treatment of liver cancer in future. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 58-62)

**【Key words】** hepatocellular carcinoma cell; B7-H3 protein; B7-H4 protein; Western blotting; MTT assay

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2018.01.014

基金项目: 贵州省普通高等学校工程研究中心项目(黔教合 KY2016-012)

作者单位: 550004 贵阳 贵州医科大学附属医院介入科

通信作者: 李 兴 E-mail: lixing111@sina.com

原发性肝癌是世界上最常见癌症之一,死亡率位居癌症死亡第 2<sup>[1]</sup>。据 2000 年癌症发病率报告,原发性肝癌在女性最常见恶性肿瘤中排名第 8,在男性中名列第 5<sup>[2]</sup>。因此,亟需尽快寻找一种针对肝癌的新治疗方法及新治疗靶点。目前对肝癌的治疗策略包括传统外科切除术<sup>[3]</sup>、细胞生物治疗<sup>[4-5]</sup>、介入治疗<sup>[6-7]</sup>、局部放疗<sup>[8]</sup>、传统化疗<sup>[9]</sup>、中药治疗<sup>[10]</sup>及分子靶向药物治疗等。索拉非尼是目前唯一被我国及欧美多个国家批准应用于中晚期肝癌治疗的分子靶向药物,其通过抑制血管内皮生长因子(VEGF)水平,达到抑制肝癌组织新生血管及微血管生成目的<sup>[11]</sup>。B7 蛋白家族包括 B7-1、B7-2、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4,它们是一组与 T 细胞和 B 细胞活化及免疫功能有关的共刺激分子,被广泛应用于自身免疫疾病和癌症治疗<sup>[12-13]</sup>。本研究旨在以免疫印迹法(western blot, WB)观察不同人肝癌细胞株(HepG2、Hep3B、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、MHCC97H、MHCC97L、HCCLM3、HCCLM6)和正常人肝细胞株(HL-7702)蛋白表达,在其中筛选出 B7-H3 和 B7-H4 蛋白高表达细胞株并应用索拉非尼, WB 和溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)比色法检测 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达,了解索拉非尼对不同人肝癌细胞株的抑制作用及 B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中过表达是否常见,从而为肝癌预防和治疗提供一候选新靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品和试剂

细胞培养采用 10%胎牛血清 RPMI-1640 培养基(HyClone, Logan, Utah, USA)和 DMEM 培养基(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA);抗  $\beta$ -肌动蛋白、B7-H3 蛋白、B7-H4 蛋白(一抗)及辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany);索拉非尼原粉药剂(LKT Laboratories, St Paul, Minnesota, USA);增强型二辛可酸(BCA)蛋白测定试剂盒(Beyotime, Haimen, China)。

### 1.2 细胞培养

人肝癌细胞株包括 HepG2、Hep3B、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、MHCC97H、MHCC97L、HCCLM3、HCCLM6(美国菌种保藏中心 ATCC, Manassas, VA, USA);正常人肝细胞株为 HL-7702(ATCC, Manassas, VA, USA)。所有细胞均在 37℃、5%二氧化碳和 95%空气环境

中置于含 10%胎牛血清并加入 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基中培养。

### 1.3 索拉非尼抑制人肝癌细胞株测定

采用 MTT 比色法评价索拉非尼对 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 肝癌细胞株的抗增殖活性作用。将不同人肝癌细胞株接种于 96 孔培养板中,培养 24 h 后分别给细胞加入 0(对照)、1.25、2.5、5、10、15、20、40  $\mu\text{mol/L}$  剂量索拉非尼,48 h 后混合 MTT 并再培养 3 h,最后用微板读数器(Perkin-Elmer, USA)在 570 nm 处检测光密度(OD)。以公式抑制率(%)=(OD 对照-OD 处理)/OD 对照 $\times 100\%$ <sup>[14]</sup>计算索拉非尼对不同人肝癌细胞株抑制率。

### 1.4 WB 检测

对 HepG2、Hep3B、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、MHCC97H、MHCC97L、HCCLM3、HCCLM6、HL-7702 细胞株,分别以 0(对照)、5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  剂量索拉非尼进行处理,48 h 后用增强型 BCA 蛋白测定试剂盒分别提取并测定以上细胞株中总蛋白浓度;采用 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS/PAGE)分离每个细胞株约 30  $\mu\text{g}$  总蛋白,然后移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,化学发光法检测抗  $\beta$ -肌动蛋白、B7-H3、B7-H4 蛋白等一抗,随后偶联山羊抗兔/HRP 孵育,抗  $\beta$ -肌动蛋白抗体检测蛋白质负荷。

### 1.5 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件(IBM, USA)进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,数据经单因素方差分析后再以事后分析(Dunnett *t* 检验)进一步比较不同组间差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

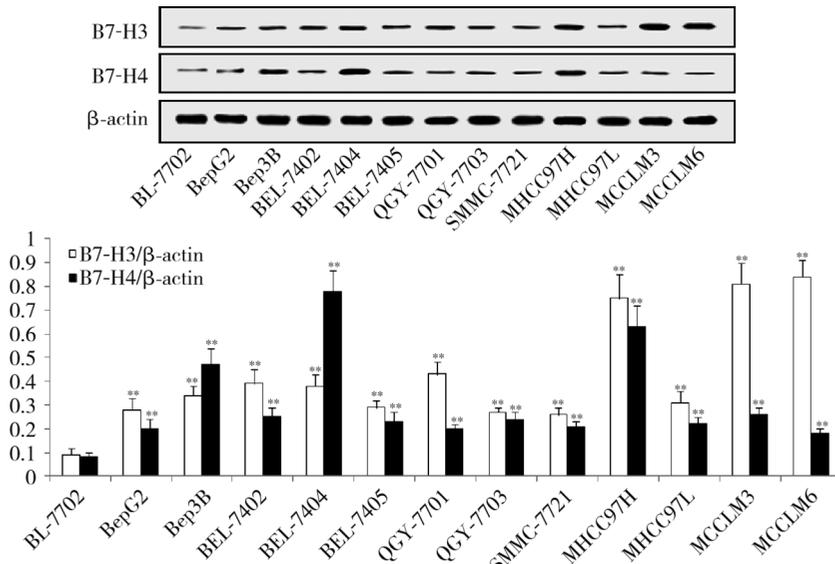
## 2 结果

### 2.1 人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达

WB 法检测显示,所有人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达与正常人肝细胞株(HL-7702)相比,均显著上调( $P<0.01$ ),见图 1。

### 2.2 索拉非尼对人肝癌细胞株的抑制作用

在 B7-H3 和 B7-H4 蛋白高表达的所有肝癌细胞株中选择最为明显的 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 等 5 种肝癌细胞株,探讨索拉非尼对其表达的影响。在此实验之前,先用 MTT 比色法测定索拉非尼对这些人肝癌细胞株的细胞毒性,



注: \*\* 与正常人肝细胞株 (HL-7702) 相比,  $P$  均  $< 0.01$

图 1 B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中表达

以确定索拉非尼对这些肝癌细胞株有抑制作用, 结果发现索拉非尼对上述 5 种肝癌细胞株均具有抑

制作用, 它们的半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值分别为 14.56、9.14、9.46、17.21、9.29  $\mu\text{mol/L}$ , 见图 2。

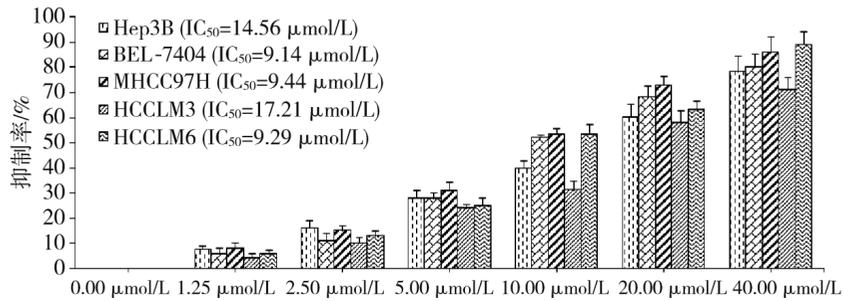
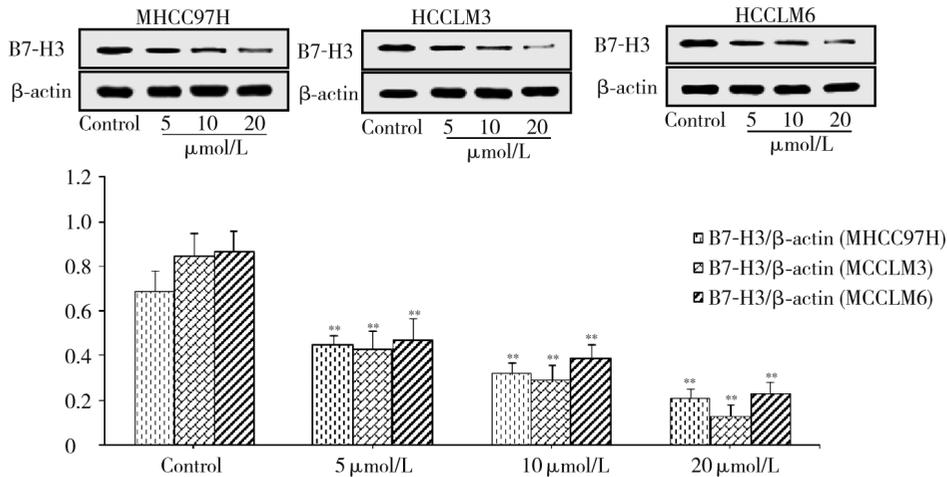


图 2 索拉非尼对不同人肝癌细胞株抑制率

2.3 索拉非尼对 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达的影响  
分别以 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  剂量索拉非尼处理不同人肝癌细胞株 (Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、

HCCLM3、HCCLM6) 48 h 后 WB 检测显示, 不同人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达均较对照组明显下调 ( $P < 0.01$ ), 见图 3、4。



注: \*\* 与对照组相比,  $P$  均  $< 0.01$

图 3 索拉非尼对 MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 中 B7-H3 蛋白表达影响

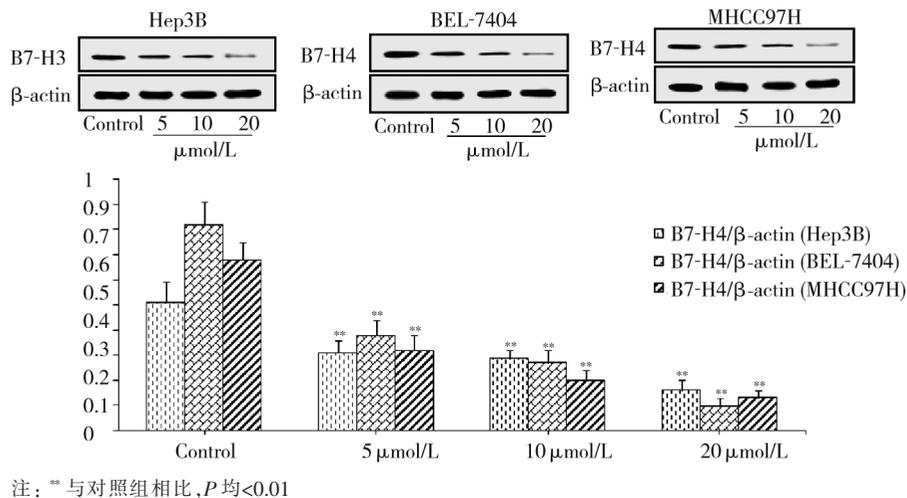


图 4 索拉非尼对 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H 中 B7-H4 蛋白表达影响

### 3 讨论

免疫应答缺陷可能有助于肿瘤细胞生长, T 细胞在免疫应答中通常起着较为重要的作用, 其中共刺激配体 CD80 和 CD86 对机体启动和维持免疫反应密切相关, 它们在肿瘤细胞中表达缺失被认为是肿瘤免疫逃逸的主要原因之一<sup>[15]</sup>。诱导抑制性因子如细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4, CD152) 和程序性细胞死亡分子-1 (PD-1, CD279) 在免疫细胞及肿瘤细胞中表达并与抑制性因子配体结合, 往往能够参与肿瘤发病<sup>[16]</sup>。如今阻断抑制性辅助因子间相互作用已成功地应用于肿瘤治疗<sup>[17]</sup>, 阻断免疫细胞中抑制性辅助因子及肿瘤细胞中抑制性辅助因子配体表达, 可能是防止肿瘤细胞免疫逃逸的重要方法。

B7-H4 和 B7-H3 是 B7 蛋白家族中抑制性辅助因子配体, 与活化 T 细胞免疫功能有关<sup>[18-19]</sup>。Northern 印迹法测定发现 B7-H4 蛋白在胸腺、肺、脾脏转录水平表达<sup>[20]</sup>, B7-H3 蛋白广泛在淋巴器官、肝脏、睾丸、子宫、肺、骨骼肌等转录水平表达<sup>[21]</sup>。B7-H4 和 B7-H3 蛋白似乎只在细胞翻译水平受限<sup>[22]</sup>。有报道发现 B7-H4 和 B7-H3 蛋白在非小细胞肺癌中有表达<sup>[23]</sup>, 也有研究报道 B7-H4 蛋白在人肝癌细胞株 BEL-7404 转录水平表达<sup>[24]</sup>。

索拉非尼是一种多激酶抑制剂, 目前已广泛应用于肝癌治疗<sup>[25]</sup>, 其一方面能通过阻断 RAF/MEK/RAK 等信号通路抑制肿瘤细胞增殖, 另一方面通过抑制血小板衍生生长因子 (PDGF) 受体及 VEGF 因子抑制肿瘤血管生成, 具双重抗肿瘤作用。早在 2008 年, 欧美国家便完成了索拉非尼 SHARP III 期临床试验, 结果显示索拉非尼可使晚期肝癌患者中位生存期延长 44%、中位疾病进展时间 (TTP) 延长

74%、死亡风险降低 31%<sup>[26]</sup>。以中国为主的亚太地区 2009 年完成 Oriental III 期临床试验, 也显示出与欧美国家相近的结果<sup>[27]</sup>。

然而, 目前尚不清楚不同人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达情况及索拉非尼对不同人肝癌细胞株的细胞毒作用。本研究结果显示, B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株 (HepG2、Hep3B、BEL-7402、BEL-7404、BEL-7405、QGY-7701、QGY-7703、SMMC-7721、MHCC97H、MHCC97L、HCCLM3、HCCLM6) 中表达, 与正常人肝细胞株 HL-7702 相比, 均明显上调 ( $P < 0.01$ ); WB 法和 MTT 比色法检测显示索拉非尼通过抑制 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达对 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 等人肝癌细胞株产生细胞毒性, 进而抑制肝癌细胞株生长; 索拉非尼对 Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 肝癌细胞株均有细胞毒活性, 其  $IC_{50}$  值分别为 14.56、9.14、9.46、17.21、9.29  $\mu\text{mol/L}$ ; 与对照组相比, 在分别加入 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  等不同剂量索拉非尼 48 h 后, Hep3B、BEL-7404、MHCC97H、HCCLM3、HCCLM6 等人肝癌细胞株中 B7-H3 和 B7-H4 蛋白表达均发生显著下降 ( $P < 0.01$ )。B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中过表达常见, 因此认为其可能影响肿瘤免疫逃逸, 而降低 B7-H3 和 B7-H4 蛋白在肝癌组织中表达则可能是预防和治疗的候选靶点之一。本研究发现 B7-H3 和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中均过表达, 但其与不同类型肝癌之间的关系尚需更深入研究, 以达到个性化治疗目的。

本研究结论认为, B7-H3 蛋白和 B7-H4 蛋白在不同人肝癌细胞株中通常过表达, 可对肿瘤免疫逃逸机制造成影响, 可能为肝癌预防和治疗提供一个

新靶点。

[参考文献]

- [1] Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan[J]. J Gastroenterol, 2009, 44: 102-107.
- [2] Bosch FX, Ribes J, Cleries R, et al. Epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis, 2005, 9: 191-211.
- [3] Akoa ME, Pomfret EA. Surgical resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19: 381-399.
- [4] Xing SQ, Zhang CG, Yuan JF, et al. Adiponectin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma through differential modulation of thioredoxin proteins[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 93: 221-231.
- [5] 宿敬存, 赵卫, 胡继红, 等. TACE 联合 RFA 及自体细胞因子诱导的杀伤细胞肝动脉灌注治疗原发性肝癌的临床研究[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 24-29.
- [6] Habib A, Desai K, Hickey R, et al. Locoregional therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Liver Dis, 2015, 19: 401-420.
- [7] 刘丽, 邵天朋, 杨涛, 等. 经动脉灌注 rAd-p53 联合 TAE 治疗中晚期肝癌的疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25: 210-213.
- [8] Yang DS, Yoon WS, Lee JA, et al. The effectiveness of gadolinium MRI to improve target delineation for radiotherapy in hepatocellular carcinoma: a comparative study of rigid image registration techniques[J]. Phys Med, 2014, 30: 676-681.
- [9] Chen Y, Chen Y, Xiao D, et al. Low-dose chemotherapy of hepatocellular carcinoma through triggered-release from bilayer-decorated magnetoliposomes[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014, 116: 452-458.
- [10] Hu Y, Wang S, Wu X, et al. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: a focus on hepatocellular carcinoma[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149: 601-612.
- [11] Lee JH, Chung YH, Kim JA, et al. Genetic predisposition of hand-foot skin reaction after sorafenib therapy in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2013, 119: 136-142.
- [12] Lei CX. B7 family-important co-stimulatory molecules[J]. Immunol J, 2002, 18: 54-57.
- [13] Salceda S, Tang T, Kmet M, et al. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation[J]. Exp Cell Res, 2005, 306: 128-141.
- [14] Li W, Li DY, Wang HD, et al. Juglans regia hexane extract exerts antitumor effect, apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells *in vitro*[J]. Trop J Pharm Res, 2015, 14: 399-405.
- [15] Subauste CS, de Waal Malefyt R, Fuh F. Role of CD80(B7.1) and CD86(B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen[J]. J Immunol, 1998, 160: 1831-1840.
- [16] Leibson PJ. The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptor[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16: 328-336.
- [17] Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 4712-4717.
- [18] Wang L, Liu LH, Shan BE. B7-H3: a promising target for tumor immunotherapy[J]. Immunol J, 2012, 28: 726-729.
- [19] Liu CZ, Yang KG, Cheng SS. B7-H4: a new negative regulator of T cell immunity[J]. Chem Life, 2009, 29: 794-798.
- [20] Sica GL, Choi IN, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity[J]. Immunity, 2003, 18: 849-861.
- [21] Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production[J]. Nat Immunol, 2001, 2: 269-274.
- [22] Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited[J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23: 515-548.
- [23] Sun Y, Wang Y, Zhao J, et al. B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 53: 143-151.
- [24] Du ZD, Yu JP, Xu XP, et al. The expression of B7-H4 mRNA in HCC cell lines and the changes in BEL-7404 after using sorafenib[J]. J Med Res, 2011, 40: 30-33.
- [25] Bajetta E, Procopio G, Colombo A, et al. Sorafenib in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Med Ther, 2009, 1: 277-287.
- [26] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Eng Med, 2008, 359: 378-390.
- [27] Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10: 25-34.

(收稿日期:2017-03-30)

(本文编辑:边 倍)