

## · 研究论文 ·

## 亚硝酸盐调控人肝癌 SMMC-7721 细胞癌干细胞特性

刘良策<sup>2</sup>, 孟珊珊<sup>3</sup>, 归冠<sup>2</sup>, 李鲁娟<sup>3</sup>, 刘彬<sup>2</sup>, 梁红霞<sup>2</sup>, 皇甫超申<sup>1\*</sup>

(河南大学 1. 医学院环境医学研究所, 2. 护理学院, 3. 第一附属医院, 河南 开封 475004)

**摘要:** 有证据表明肝癌含有一定数量的具有自我更新能力的癌干细胞亚群。然而, 癌干细胞是如何被调控的还不清楚。肿瘤微环境中一些生物介质可以导致癌干细胞快速可逆性改变。本文旨在探讨, 在肿瘤微环境中较高含量, 又是细胞关键的调控因子的亚硝酸盐是如何调控人肝癌干细胞样细胞表型的。用 SMMC-7721 细胞系无血清培养获得细胞球。流式细胞术检测细胞周期, 体外克隆形成实验和球形形成实验检测细胞自我更新能力, 侵袭实验检测细胞侵袭能力, 癌干细胞标志物检测采用流式细胞术和 Western blot 方法, MTT 检测细胞活力。皮下注射 SMMC-7721 球形形成细胞建立裸鼠移植瘤模型, 活性氧 (ROS) 检测试剂盒检测移植瘤组织内 ROS 水平, 免疫荧光检测组织内缺氧有诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )。结果显示, SMMC-7721 细胞系来源的球细胞自我更新能力增强, 干细胞标志物表达增加, 耐药性增强, 提示球形形成细胞富集了较多的具有癌干细胞特征的细胞。用亚硝酸钠 (150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理亲本细胞和球形形成细胞后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增加, 肝癌干细胞标志物 CD133、CD90 和 EpCAM 表达增加, 细胞耐药能力和侵袭能力增强。与亲本细胞相比, 亚硝酸盐对球形形成细胞的上述作用明显增强。体内实验结果也显示, 亚硝酸盐促进球形形成细胞移植瘤生长, 组织内 ROS 水平下降, HIF-1 $\alpha$  累积。结果表明, 亚硝酸盐通过上调肝癌干细胞“干性”增强肝癌细胞侵袭能力。

**关键词:** 亚硝酸盐; 人肝癌细胞; 癌干细胞; 耐药; 侵袭

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 08-1241-09

## Involvement of sodium nitrite in the regulation of cancer stem cell properties in human hepatoma cells

LIU Liang-ce<sup>2</sup>, MENG Shan-shan<sup>3</sup>, GUI Guan<sup>2</sup>, LI Lu-juan<sup>3</sup>, LIU Bin<sup>2</sup>,  
LIANG Hong-xia<sup>2</sup>, HUANGFU Chao-shen<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Environmental Medicine of Medical College, 2. Nursing College, 3. First Affiliated Hospital, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** Increasing evidence suggests that hepatocellular carcinomas (HCCs) are sustained by a distinct subpopulation of self-renewing cells known as cancer stem cells (CSC). However, our understanding of their regulation is limited. Rapid reversible changes of CSC-like cells within tumors may result from the effect of biological mediators found in the tumor microenvironment. This paper aims to explore how nitrite, a key cellular modulator whose level is elevated in many tumors, affects CSC-like phenotypes of human hepatoma cells SMMC-7721 cells. The SMMC-7721 cell line was cultured under serum-free conditions to produce floating spheres. The distribution of cell cycle was analyzed by flow cytometry, the capability of cells self-renew was detected by colony-forming capabilities and spheroid-formation assay, the expression of stemness protein such as CD133, CD90 and EpCAM were determined by flow cytometry and Western blot, cell invasion

收稿日期: 2017-01-05; 修回日期: 2017-02-21.

基金项目: 国家环保公益项目专项 (200809115); 省部共建河南大学科研项目 (SBGJ090702).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-378-3880585, E-mail: chaoshen6403@henu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0018

was analyzed by transwell assay, and viability of SMMC-7721 parental cells and spheroids cancer cells was determined by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide (MTT) assay. Xenograft tumor models were established by subcutaneously injecting SMMC-7721 spheroids cancer cells, the transplanted tumor tissue ROS levels was detected by reactive oxygen species (ROS) test kits, the expression of HIF-1 $\alpha$  was observed by immunofluorescence. Our results showed that the SMMC-7721 spheroid cells were enriched with CSCs properties, indicated by the ability to self-renew, increased expression of CSCs markers, and increased resistance to chemotherapeutic drugs. Additionally, SMMC-7721 parental cells and spheroids cancer cells were treated with 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sodium nitrite for 6 days, compared with control cells, an increased accumulation of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase cells was observable in treatment cells. Indeed, our data demonstrated that in parent cells and spheres cells that were treated with sodium nitrite for different time, the cells' ability to chemoresistance and invasion, clone-forming efficiencies and the spheres forming ability were significantly higher than that of control cells. Exposure of sodium nitrite regulated CSC-like phenotype, indicated by increased expression of known CSC markers, CD133, CD90 and EpCAM in the exposed parental cells, as well as in dormant spheroids cancer cells. Compared with the parent cells, the above effects of nitrite on the spheres cells were significantly enhanced. *In vivo* data also presented a more significant promotion of tumor xenograft growth from the nitrite treatment than from either of the control. Mechanistic analysis indicated that nitrite induced the upregulation of HIF-1 $\alpha$  as well as the downregulation of ROS in the tumor microenvironment. These results suggest that nitrite increases the invasiveness of SMMC-7721 cells through up-regulation of tumor stemness.

**Key words:** nitrite; human hepatocellular carcinoma; cancer stem cell; chemoresistance; invasion

越来越多的证据表明, 肿瘤化疗或放疗后复发的主要原因是肿瘤组织内含有数量不一的肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs)<sup>[1]</sup>。与普通的肿瘤细胞相比, 肿瘤干细胞呈现出增殖速度减慢, 药物外排能力增强, 耐药和侵袭能力增加等特征<sup>[2]</sup>。肝癌是人类常见恶性肿瘤, 已经发现肝癌组织内也有少量的肿瘤干细胞<sup>[3]</sup>。在肝癌组织内, 肿瘤干细胞受肿瘤微环境的影响, 未分化的肿瘤干细胞与已分化的普通肿瘤细胞之间存在相互转换现象, 包括“干性” (stemness) 获得与失去的过程<sup>[4]</sup>。然而具体是其中哪些化学或细胞因子调控肿瘤干细胞的这种可塑性, 目前还不清楚<sup>[5]</sup>。肝癌组织内部是一个缺氧酸性环境, 内含有较高浓度的一氧化氮和亚硝酸盐<sup>[6]</sup>。亚硝酸盐在酸性环境下可以还原为一氧化氮, 一氧化氮可以促进肿瘤干细胞数量增加和干细胞表征增强<sup>[7]</sup>。亚硝酸盐本身在细胞上作用的靶点主要是线粒体呼吸链复合物, 通过与氧气竞争性结合位点, 造成细胞内缺氧, 进而促使细胞缺氧因子累积, 诱导细胞发生上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 而 EMT 可以诱导已分化的肿瘤细胞转化为肿瘤干细胞<sup>[8]</sup>。课题组前期发现, 亚硝酸盐有诱导肝癌细胞发生 EMT, 促进增殖和侵袭作用<sup>[9]</sup>, 外源性给予亚硝酸盐会导致小鼠肝癌组织内部亚硝酸盐蓄积, 促进癌细胞肺转移<sup>[10]</sup>。综合文献和课题组前期发现, 作者推测亚硝酸盐有可能直接参与肝癌干细胞数量的调控和“干

性”的调节。

鉴定肿瘤干细胞的方法主要有流式细胞术检测边缘群, 半悬浮培养观察细胞球形形成以及检测干细胞标志物等<sup>[11]</sup>。为此, 本研究用半悬浮培养法获取的人肝癌 SMMC-7721 细胞球作为球形形成细胞, 常规培养的细胞为亲本细胞, 观测了亚硝酸盐处理后这两种细胞群体中具有干细胞特征的细胞数量变化以及干细胞表型的变化, 以探讨亚硝酸盐对人肝癌肿瘤干细胞的调控作用。

## 材料与方法

**材料和主要仪器** 人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所, 生长在含 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中培养。亚硝酸钠 (sodium nitrite, SN) 购自天津市晨福化学试剂厂 (分析纯); DMEM 高糖培养基、DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司; FBS、青链霉素混合液、结晶紫染料购自杭州四季青生物公司; 二甲基亚砷 (DMSO)、噻唑兰 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide, MTT)、顺铂 (cisplatin)、人重组表皮生长因子 (EGF)、人重组碱性成纤维生长因子 (bFGF)、B27、活性氧检测试剂盒购自 Sigma 公司; Transwell 小室购自 BD 公司; CD90 兔抗人单克隆抗体、EpCAM 兔抗人单克隆抗体、CD133 兔抗人单克隆抗体、兔

抗人 HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )、 $\beta$ -actin 单克隆抗体、ECL Western blot 化学发光检测试剂盒及二抗购自 Abcam 公司; 超低吸附 6 孔板购自美国 Corning 公司; NovoCyte 流式细胞仪 (ACEA, 美国); BCA 蛋白质定量试剂盒 (北京康为世纪公司); DYY-7C 型电泳仪、WD-9413B 凝胶成像分析仪 (北京市六一仪器厂)。

**球形形成细胞获取及传代** 将肝癌 SMMC-7721 细胞在含 10% FBS、1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中。待细胞长满瓶底面积 80% 时, 换 DMEM/F12 无血清培养基 (含 1% 青链霉素、20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  EGF、10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  bEGF、2% B27), 消化并吹打成单个细胞, 收集细胞悬液, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 再以 DMEM/F12 无血清培养基重悬。调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个接种于超低吸附 6 孔板, 每孔接种 5 000 个细胞, 再加入 DMEM/F12 无血清培养基 2 mL, 将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。隔天换液, 观察细胞悬浮生长状态, 每天拍照记录细胞球形成的情况。培养 1 周后, 细胞球直径达 50  $\mu\text{m}$  时收集细胞悬液, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化细胞球, 吹打分散成单个细胞, DMEM 高糖培养基重悬细胞, 得到的细胞为球形形成细胞。常规培养的细胞作为亲本细胞。

**细胞周期检测** 调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个, 分 4 组: 亲本细胞和球形形成细胞对照组加入 DMEM 普通培养基, 亲本细胞和球形形成细胞处理组培养基中加入浓度为 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$ 。细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。隔天换液, 6 天后收集细胞, 75% 乙醇固定 4 h 以上, 离心, 吸弃固定液, 加入含 RNA 酶的碘化丙啶 (PI) 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min, 流式细胞术检测细胞周期。

**体外克隆形成实验** 细胞处理和分组同上。调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个接种于普通 6 孔板中, 每孔的总体积均为 2 mL。将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。隔天换液, 每天观察细胞克隆的生长情况, 1 周后, 弃培养液, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 2 次, 每孔加入结晶紫染料 1 mL, 染色 15 min, 随机选取 3 个视野, 计数每个视野下细胞数大于 50 的克隆形成数, 并拍照记录。

**细胞球形形成实验** 细胞分组和处理同上。制成单细胞悬液, DMEM/F12 无血清培养基重悬细胞, 调整细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个, 接种于超低吸附 6 孔板中, 每孔的 DMEM/F12 无血清培养基和细胞悬液的总体积均为 2 mL。将 6 孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  恒温培

养箱中培养。隔天换液, 每天观察各组细胞球形成情况, 1 周后在倒置显微镜下观察, 随机选取 3 个视野, 计数细胞球直径大于 50  $\mu\text{m}$  的细胞数, 并拍照记录。

**流式细胞术检测各组细胞肿瘤干细胞表面标志物** 待各组细胞生长至对数期时, PBS 漂洗 2 遍, 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制成细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个的单细胞悬液, 用 PBS 缓冲液重悬细胞。按照说明书每组分别加入 1:1 000、1:1 500、1:1 000 的 CD90、CD133、EpCAM 流式抗体各 1 mL, 充分混匀后常温孵育 30 min, 流式细胞仪检测肿瘤干细胞标志物的表达量。

**Western blot 检测肿瘤干细胞表面标志物的表达** 消化收获各种处理的细胞, 用 RIPA 200  $\mu\text{L}$  充分裂解提取蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 均衡每组蛋白浓度后, 以 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离。转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 分别加入 CD133 (1:2 000)、CD90 (1:1 500)、EpCAM (1:2 000) 一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭袋中孵育过夜, 二抗孵育 1 h。化学发光法显示结果, 压片曝光。凝胶图像分析系统拍照, 采用 IPP 软件对目的条带进行灰度分析。实验重复 3 次。

**Transwell 侵袭实验** 细胞分组和处理同上。当细胞生长到对数生长期, 消化收获细胞, 用无血清 DMEM 培养基洗 3 次, 各组分别接种  $1\times 10^5$  个细胞于已行 matrigel 包被的 transwell 小室中, 滤膜微孔直径为 8  $\mu\text{m}$ , 小室内的培养基为无血清的 DMEM, 亲本细胞处理组和球形形成细胞处理组加入相应剂量的亚硝酸钠, 体积 200  $\mu\text{L}$ , 然后于小室外即 24 孔板的孔内加入 800  $\mu\text{L}$  含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 以提供细胞侵袭运动的趋化因子。每组 3 个复孔, 培养 24 h 后自 24 孔板中取出 transwell 小室, PBS 轻轻冲洗 3 次, 用自备小棉签小心擦净小室底部微孔滤膜上层的细胞, 然后将小室置于甲醇固定液中放置 10 min, 取出小室放于结晶紫中染色 5 min; 沿小室底部边缘剪下滤膜, 显微镜下观察穿过 matrigel 及微孔至滤膜反面的细胞, 实验重复 3 次, 于 200 倍光学显微镜下计数 5 个视野的细胞, 取平均值。

**MTT 法检测各组耐药性实验** 收集各组生长至对数期的细胞并消化, 制成细胞浓度为每毫升  $1\times 10^4$  个接种于 96 孔板, 每孔加入培养基 200  $\mu\text{L}$ , 每组 5 个复孔, 重复 6 次, 并设置调零孔。各组在恒温培养箱中培养 24 h 后, 依次加入 0、0.625、1.25、2.5、5 和 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  质量浓度梯度的顺铂, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$  培养 4 h 后, 吸去培养液,

每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 于振荡器上振摇, 待紫色晶体完全溶解后, 在酶标仪上测定 570 nm 处的吸光度值 ( $A$  值)。以含有等体积的培养液和 DMSO 的无细胞孔测得的吸光度值为空白对照。

**移植瘤实验** BALB/c 裸鼠 [合格证号 SCXK(豫)2010-0002] 5 只, 由河南省实验动物中心提供, 裸鼠全部为雄性, 日龄 28~35 天, 体重 18~22 g, 常规裸鼠饲养。动物实验得到河南大学医学院医学伦理委员会批准。收集球形形成细胞, 计数, 调整细胞悬液浓度为每毫升  $1 \times 10^5$  个。将球形成细胞分 2 组, 亚硝酸盐处理组用  $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaNO}_2$  孵育 24 h, 对照组加等体积的培养液。每组取 0.1 mL 分别接种于同一只裸鼠左或右侧腋窝皮下, 每天观察小鼠一般情况, 隔日测量一次移植瘤体积。饲养至 21 天, 处死动物, 完整取出移植瘤称重, 立即行冰冻切片。同时计数肺表面白色的转移灶。

**移植瘤冰冻切片检测活性氧 (ROS)** 实验结束时取出移植瘤, 冰冻切片, 按试剂盒说明书对示踪剂 DCFH-DA 进行处理, 使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 在 DM2500 徕卡荧光显微镜下拍照。

**移植瘤组织免疫荧光法检测 HIF-1 $\alpha$**  实验结束时取出移植瘤, 冰冻切片, 冷丙酮固定 6 min, 自然干燥。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育 15 min, 10% BSA 4  $^\circ\text{C}$  封闭过夜, PBS 冲洗 3 次, 每张盖玻片加 100  $\mu\text{L}$  兔抗人 HIF-1 $\alpha$  工作液, 4  $^\circ\text{C}$  过夜孵育, PBS 洗 3 次, 加 Alexa 594 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, DAPI 复染, 37  $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 自来水冲洗, 自然干燥, 硅油封片, DM2500 徕卡荧光显微镜下拍照。用 Image-pro plus 图像分析软件分析荧光强度。

**统计学分析** 数据均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 13.0 软件包处理, 正态分析和方差齐性检验后, 进行单因素方差分析处理组与对照组的差别, 处理组之间两两比较采用行  $\times$  列表的卡方检验。  $P < 0.05$  被认为统计学具有显著性。

## 结果

### 1 肝癌 SMMC-7721 细胞能够在无血清培养基中悬浮培养形成细胞球

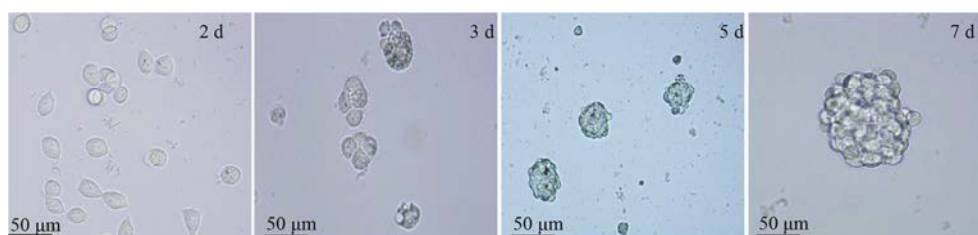
以无血清条件培养基于超低黏附 6 孔板中悬浮培养肝癌 SMMC-7721 细胞, 结果显示部分细胞随培养时间的延长开始克隆生长, 逐渐形成立体、悬浮生长的细胞球, 体积逐渐增大, 而未成球的细胞则逐渐凋亡; 当多个细胞球距离较近时会融合成更大的细胞球, 1 周后细胞球体积达到最大, 以后不再增长 (图 1)。

### 2 亚硝酸盐阻滞球形形成细胞于 $G_0/G_1$ 期的作用强于亲本细胞

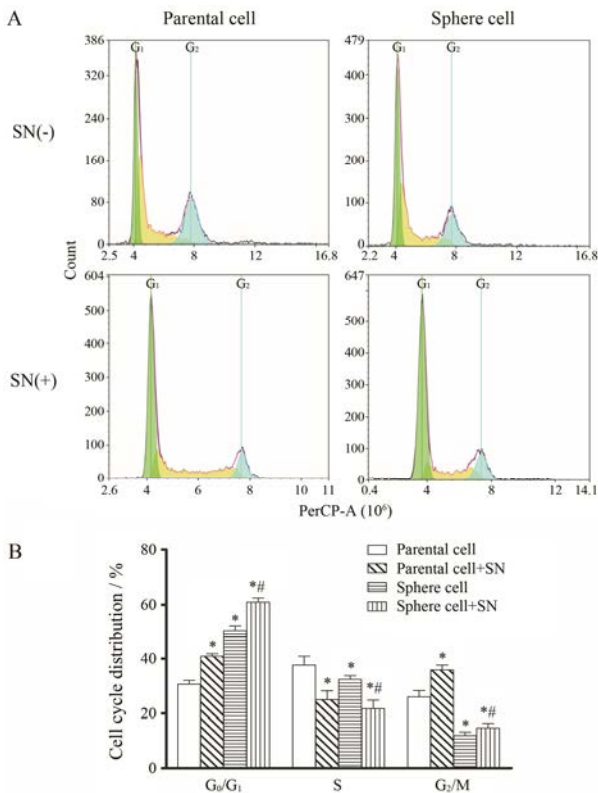
肿瘤干细胞的一个显著特征就是多处于静止状态, 生长缓慢。图 2 结果显示, 球形形成细胞处于  $G_0/G_1$  期细胞明显多于亲本细胞。与未处理组相比, 经亚硝酸盐处理后, 无论是亲本细胞还是球形形成细胞被阻滞于  $G_0/G_1$  期的细胞数明显增多, S 期细胞减少, 而处于细胞分裂期的  $G_2/M$  期则明显减少。与亲本细胞相比, 亚硝酸盐对球形形成细胞  $G_0/G_1$  期的阻滞作用明显增强。在亚硝酸盐作用下, 球形形成细胞  $G_0/G_1$  期的阻滞比未处理的球形形成细胞增强。

### 3 亚硝酸盐对球形形成细胞自我更新能力增强作用大于亲本细胞

细胞体外细胞克隆形成能力和球形形成能力是判断细胞自我更新能力常用的指标。体外细胞克隆形成实验结果如图 3A 和 B 所示, 球形形成细胞的克隆形成个数高于亲本细胞; 与未处理的亲本细胞或球形形成细胞相比, 经过亚硝酸盐处理后, 各组克隆形成个数显著提高; 同样, 亚硝酸盐处理后球形形成细胞克隆形成个数显著高于亲本细胞。在亚硝酸盐作用下, 球形形成细胞克隆形成个数比未处理的球形形成细胞增多。说明亚硝酸盐能够增加 SMMC-7721 细胞的克隆形成个数, 增强肝癌干细胞克隆形成能力。球形形成实验结果如图 3C 和 D 所示, 球形形成细胞的球形形成个数高于亲



**Figure 1** Induction of sphere cells from SMMC-7721 cell lines (magnification, 40  $\times$ ). Tumor sphere culture was performed in ultra-low attachment dishes for different times. Dark dots represent dead differentiated cells. Survived cancer stem cells have formed clusters named spheres. Formation of spheres was observed from day 3 to 7; the sphere size increased during this period

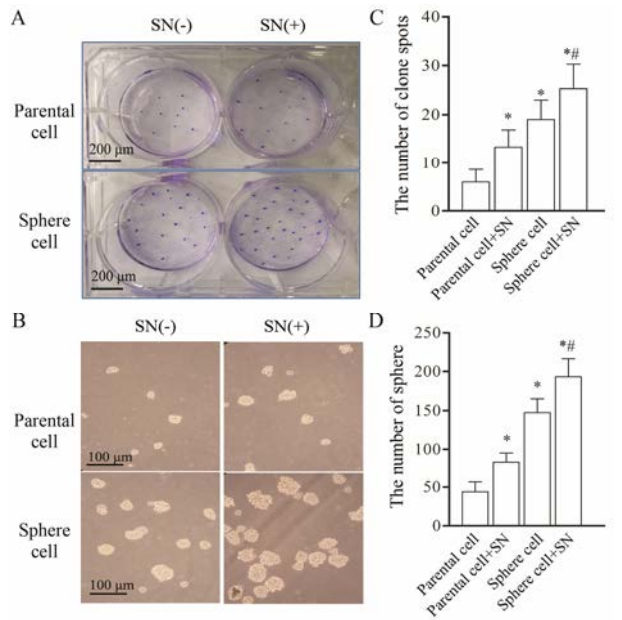


**Figure 2** Effects of sodium nitrite (SN) on distribution of cell cycle in SMMC-7721 parental and sphere cells. A: The cells stained with propidium iodide were subjected to flow cytometric analysis to determine the cell distributions at each phase of the cell cycle; B: The quantified results of flow cytometry analysis showed that treatment with SN ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h) resulted in parental and sphere cells arrest in  $G_0/G_1$  phase, compared with the parent cells, the proportion of  $G_0/G_1$  phase cells were increased approximately 1.5 folds in sphere cells, while the  $G_2/M$  phase proportion was significantly decreased.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs parental cell group; # $P < 0.05$  vs sphere cell group

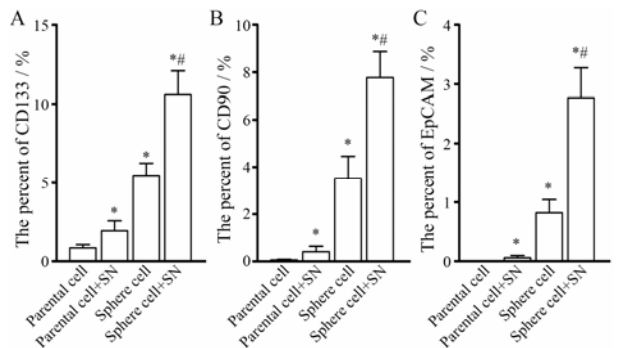
本细胞; 与未处理的亲本细胞或球形形成细胞相比, 经过亚硝酸钠处理后, 各组球形形成个数显著提高; 同样, 亚硝酸钠处理后球形形成细胞球形形成个数显著高于亲本细胞。在亚硝酸盐作用下, 球形形成细胞球形形成个数比未处理的球形形成细胞增多。结果提示, 亚硝酸钠能显著增强肝癌 SMMC-7721 细胞的球形形成能力。亚硝酸钠对球形形成细胞成球的促进作用明显大于亲本细胞, 提示球形形成细胞可能富集了更多的肝癌干细胞。

**4 亚硝酸钠促进球形形成细胞肿瘤干细胞标志物表达的作用强于亲本细胞**

图 4 流式细胞术检测结果显示, 球形形成细胞组 CD133、CD90 和 EpCAM 表达量明显高于亲本细胞; 与未处理的亲本细胞或球形形成细胞组相比, 亚硝酸钠处理后明显增强各组 CD133、CD90 和 EpCAM 的表达量; 同样, 在亚硝酸钠处理后, 与亲本细胞组相



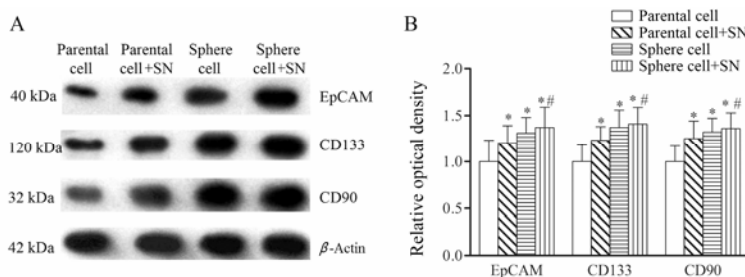
**Figure 3** SN enhanced tumor the self-renewal capacity of SMMC-7721 parental and sphere cells. A: The numbers of colonies were counted after staining with crystal violet; B: The spheres were imaged under a light microscope (magnification, 100 $\times$ ); C: The histogram indicated the number of colonies; D: The quantified tumor spheres numbers of B.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs parental cell group; # $P < 0.05$  vs sphere cell group



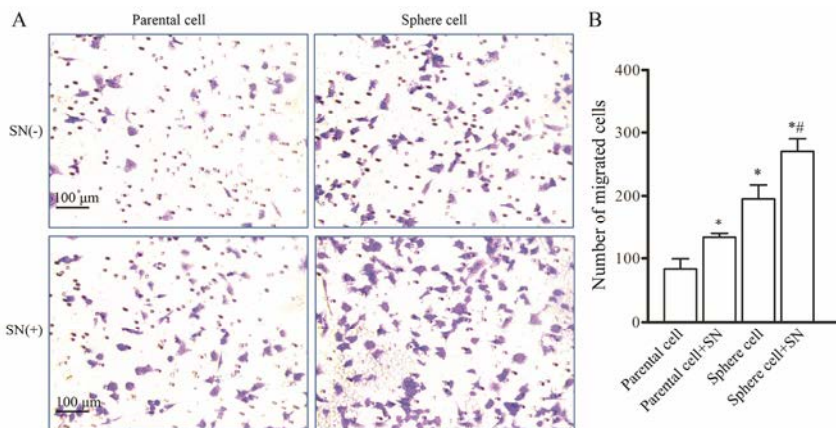
**Figure 4** Effects of SN on the expressions of hepatoma stem cell related proteins in SMMC-7721 parental cells and sphere cells. Flow cytometry analysis showed that treatment with SN ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h) resulted in parental and sphere cells increased the expressions of CD133 (A), CD90 (B) and EpCAM (C), compared with the parent cells, and these marker were increased approximately three folds in SMMC-7721 sphere cells.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs parental cell group; # $P < 0.05$  vs sphere cell group

比, 球形形成细胞组 CD133、CD90 和 EpCAM 表达量增加更为明显。在亚硝酸盐作用下, 球形形成细胞标志物表达水平比未处理的球形形成细胞升高。

为进一步验证流式细胞术检测肿瘤干细胞标志物相关蛋白的表达结果, 本实验又利用 Western blot 方法检测了上述 3 种蛋白表达 (图 5), 结果与图 4 一致。



**Figure 5** Effects of SN on the expressions of hepatoma stem cell related proteins in SMMC-7721 parental cells and sphere cells. A: Western blot data showed that the expressions of the CD133, CD90 and EpCAM proteins were upregulated in sphere cells compared with those in parental cells. Treatment with SN ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h) resulted in parental and sphere cells increased the expressions of markers, compared with the parent cells, and the above effects of nitrite on the spheres cells were significantly enhanced. B: The quantified results of A.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$  vs parental cell group; # $P<0.05$  vs sphere cell group



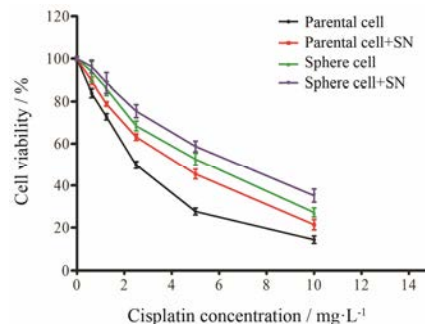
**Figure 6** Effect of SN on the invasion ability of SMMC-7721 parental cells and sphere cells. A: Transwell invasion assays the cells invading the matrigel after 24 h of culture as shown by the microscopic images (magnification, 100 $\times$ ). Invading cells were fixed in formaldehyde and stained with crystal violet. B: The quantified results of A.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . \* $P<0.05$  vs parental cell group; # $P<0.05$  vs sphere cell group

### 5 亚硝酸钠促进球形形成细胞侵袭能力大于亲本细胞

肿瘤细胞分泌的基质金属蛋白酶可以溶解基底膜, 有助于细胞侵袭转移。用 matrigel 包被的 transwell 小室, 模拟基底膜可以用于检测肿瘤细胞的侵袭能力。图 6 结果显示, 球形形成细胞穿膜细胞数明显多于亲本细胞; 与未处理的亲本细胞或球形形成细胞相比, 亚硝酸钠处理后各组穿膜细胞数明显增多; 同样, 在亚硝酸钠处理后, 球形形成细胞组的穿膜细胞数明显多于亲本细胞。在亚硝酸盐作用下, 球形形成细胞侵袭能力比未处理的球形形成细胞增强。结果提示, 球形形成细胞侵袭能力明显强于亲本细胞, 亚硝酸钠可以显著提高 SMMC-7721 亲本细胞和球形形成细胞的侵袭能力; 球形形成细胞可能富集更多的肝癌干细胞, 从而导致其侵袭能力强于亲本细胞。

### 6 亚硝酸钠增强球形形成细胞耐药能力的作用强于亲本细胞

肿瘤干细胞耐受化疗药物损害是其很重要的一个特征。图 7 显示, 在不同浓度顺铂 (cisplatin) 的作



**Figure 7** Effect of SN on the drug resistance of SMMC-7721 parental cells and sphere cells. The cells exposed previously to DMEM or SN ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h, and then treated with a serial dose of cisplatin for 24 h, the viability of cells was reflected by the MTT absorbance ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

用下, 各组细胞的增殖均受到抑制, 但是可以看出, 亲本细胞受该药物的抑制作用明显高于其他 3 组。与未处理组相比, 经过亚硝酸钠处理后, 亲本细胞或球形形成细胞活力明显增强。提示亚硝酸钠处理后, 各组细胞耐药能力明显增强。同样, 在亚硝酸钠处理后, 球

形成细胞的细胞活力明显大于亲本细胞。在亚硝酸盐作用下, 球形成细胞耐药性比未处理的球形成细胞增强。说明亚硝酸盐对球形成细胞抵抗化疗药物损害能力方面的促进作用要明显大于亲本细胞。

### 7 亚硝酸盐增强球形成细胞体内成瘤能力和肺转移能力

图 8A 为实验结束时取出的同一只小鼠左右移植瘤, 共 5 只。肉眼可见 4 只小鼠亚硝酸盐处理组的球形成细胞移植瘤大于另一侧未处理组的球形成细胞形成的移植瘤, 图 8B 是球形成细胞接种不同时间测量的移植瘤体积, 结果显示亚硝酸盐处理组的球形成细胞移植瘤体积在不同时间点均大于未处理组。图 8C 统计结果显示, 亚硝酸盐处理组的球形成细胞移植瘤重明显高于未处理组。图 9 为实验结束时取出的肺, 球形成细胞皮下种植均可引起肺转移, 但是亚硝

酸钠处理组肺转移结节数明显多于未处理组。

### 8 亚硝酸盐减少球形成细胞移植瘤内 ROS 水平

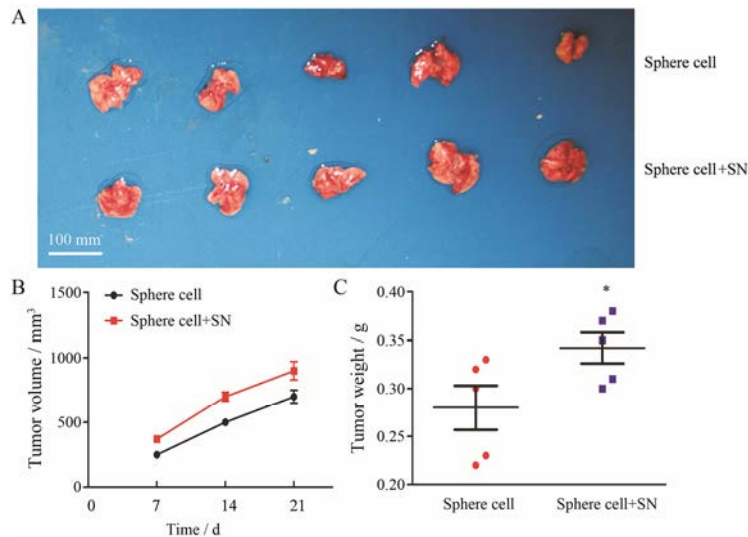
图 10A 为荧光探针 DCFH-DA 检测的组织内 ROS, 经统计分析, 亚硝酸盐预处理的球形成细胞移植瘤组织内荧光强度明显弱于未处理组 (图 10B)。

### 9 亚硝酸盐增加球形成细胞移植瘤内 HIF-1 $\alpha$ 水平

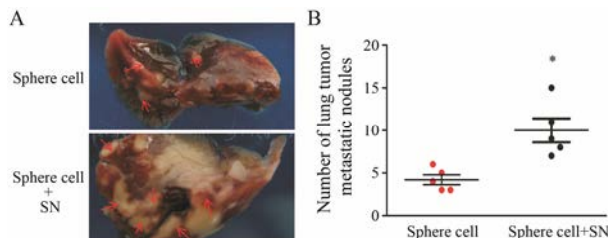
图 11A 红色荧光为免疫荧光检测的组织内 HIF-1 $\alpha$  蛋白水平, 经统计分析, 亚硝酸盐预处理的球形成细胞移植瘤组织内荧光强度明显强于未处理组 (图 11B)。

## 讨论

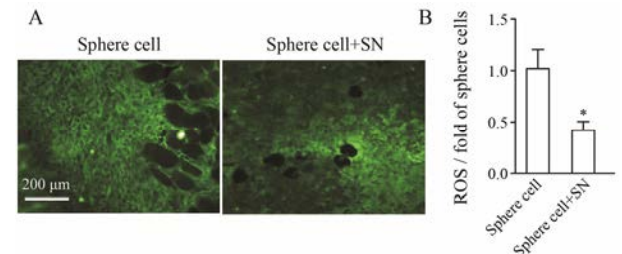
肝癌是高度异质性的恶性肿瘤, CSCs 只是其中数量很少的细胞群。与不具有干细胞特征的肿瘤细胞相比, CSCs 通过 DNA 损伤修复、抑制凋亡通路和产生耐药蛋白等自我保护机制, 增强了肿瘤进展、转



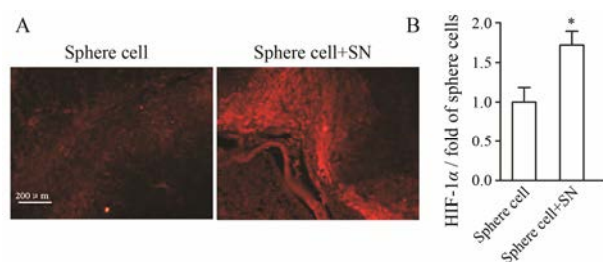
**Figure 8** SN augments the tumorigenic properties of SMMC-7721 sphere cells *in vivo*. A: The untreated or SN pre-treated SMMC-7721 sphere cells were injected subcutaneously in the left and right flank of the same BALB/c nude mice, the xenograft tumor were showed. B: Effect of SN on volume of xenografts in mice bearing sphere cells. C: The plot shows the comparison of corresponding tumor weight (g), measured after harvesting on day 21, in the same mice.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs sphere cell group



**Figure 9** Comparisons in the number of metastatic nodules in the lung. A: At the 21rd day following the interventions, BALB/c nude mice from each group were euthanized and the numbers of tumor nodules (red arrow) in the lung were showed. B: Sphere cells received SN treatments had significant higher findings in tumor metastatic nodules than the one without ( $P < 0.05$ ).  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs sphere cell group



**Figure 10** Effect of SN on ROS production in xenografted tumors. A: The frozen section of xenografted tumors co-cubated with ROS assay kit for 2 h, and then detected by fluorescence microscope. B: Xenografted tumors ROS production was detected by Image-pro plus.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs sphere cell group



**Figure 11** Effect of SN on HIF-1 $\alpha$  expression in xenografted tumors. A: The frozen section of xenografted tumors immunofluorescence staining of HIF-1 $\alpha$ , and then detected by fluorescence microscope. B: Xenografted tumors HIF-1 $\alpha$  expression was detected by Image-pro plus.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs sphere cell group

移、耐药和自我更新能力<sup>[12]</sup>。CSCs的干细胞特征性也被称为“干性”(stemness)。肝癌CSCs的“干性”通常包括体外形成克隆及肿瘤球、在体致瘤能力增强、高表达干细胞相关的生物学标志物等特征<sup>[13]</sup>。肝癌CSCs还表现细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期阻滞和较强的耐药性<sup>[14]</sup>。用无血清培养基悬浮培养获得细胞球,球形成细胞富集了具有干细胞特性的细胞,通常作为干细胞用于研究<sup>[15]</sup>。本实验也发现,用无血清培养基低黏附培养1周获得的肿瘤细胞球,与亲本细胞相比,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例、自我更新能力、肝癌干细胞标志物表达、侵袭能力和耐药性都明显增加。用球形成细胞接种裸鼠皮下成瘤并发现了肺转移灶。结果提示,本实验获得的细胞球富集了肝癌干细胞,可以作为肝癌干细胞样细胞用于调控研究。

越来越多的实验证实,CSCs的数量不是一个稳定的状态,已经分化的肿瘤细胞通过去分化的方式,可重新获得干细胞特性<sup>[16]</sup>。本实验结果显示,未经任何处理的SMMC-7721亲本细胞只包含极少数具有干细胞特性的细胞,经亚硝酸盐处理后,亲本细胞获得了较多的“干性”特征。球形成细胞体内移植瘤实验也显示,经亚硝酸钠预处理的球形成细胞移植瘤体积、重量和肺转移结节数都比未处理组增加。结果提示,亚硝酸盐具有诱导SMMC-7721细胞群体中一些非肿瘤干细胞转化为肿瘤干细胞的能力。肿瘤微环境刺激CSCs自我更新、血管新生和重塑免疫,提供其他有利于肿瘤侵袭转移力和CSCs动态变化的良好环境<sup>[17]</sup>。肿瘤微环境还是一个缺氧酸性环境,内部含有较高水平的亚硝酸盐。亚硝酸盐在酸性环境下可以被还原为一氧化氮。一氧化氮具有诱导普通癌细胞向肿瘤干细胞转化的能力<sup>[18]</sup>。其次,亚硝酸盐作用的靶点是线粒体呼吸链,通过与氧分子竞争性结合呼吸链

复合物,造成细胞内缺氧,HIF-1 $\alpha$ 累积,细胞内ROS水平下降<sup>[19]</sup>。这种现象本研究在球形成细胞体内移植瘤冰冻切片也得到了初步印证。HIF-1 $\alpha$ 积累和ROS水平下调有利于非肿瘤干细胞向肿瘤干细胞转化<sup>[20]</sup>。另外,课题组前期发现,亚硝酸盐通过上调HIF-1 $\alpha$ 的表达,诱导SMMC-7721细胞EMT<sup>[10]</sup>,而EMT被证实是已分化的肝癌细胞向肿瘤干细胞转化的一种主要形式<sup>[21]</sup>。

CSCs的“干性”也不是一个稳定的状态。当生物体发育进入终末阶段时,正常的干细胞会利用一套完善的反馈系统,限制细胞“干性”以确保机体进入分化末期,在这个过程中,一部分基因会“沉默”,而另一部分基因则开始表达,使细胞在发育的不同阶段具备特异性的表型。较高“干性”和较低“干性”的胚胎干细胞之间可自发的相互转化<sup>[22]</sup>。CSCs的“干性”受细胞内外细胞因子的调控。有实验发现,IL-6和IL-8有增强肝癌CSCs自我更新和体内成瘤能力<sup>[23]</sup>;TGF- $\beta$ 通过下游靶基因EpCAM在多种肝癌CSCs“干性”维持方面发挥作用<sup>[24]</sup>。本实验显示,在亚硝酸盐作用下,球形成细胞“干性”明显比亲本细胞增强。有实验证实,亚硝酸钠可以促进细胞TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6等细胞因子分泌增加<sup>[25]</sup>。课题组<sup>[9]</sup>前期也发现,亚硝酸盐具有刺激SMMC-7721细胞分泌TGF- $\beta$ 的作用。本实验还显示,在亚硝酸盐作用下,球形成细胞“干性”明显比未处理的球形成细胞增强,提示亚硝酸盐也可能增加球形成细胞的细胞因子分泌。结合上述文献分析,亚硝酸盐可能具有调控干细胞基因,诱导细胞因子分泌来上调肝癌SMMC-7721干细胞“干性”的作用。

本研究所用亚硝酸钠浓度选为150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (相当于16  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的依据是:正常人餐后唾液亚硝酸盐浓度为170  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,到胃内可被稀释10倍以上<sup>[26]</sup>,这就意味着人餐后胃内亚硝酸盐浓度有可能达到17  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,非常接近于本实验处理组所用亚硝酸钠的浓度。

综上所述,人肝癌SMMC-7721细胞在低黏附无血清悬浮培养条件下培养1周,可以获得富集CSCs的细胞球。亚硝酸盐通过抑制人肝癌SMMC-7721细胞内的氧消耗,减少ROS产生,促进HIF-1 $\alpha$ 累积,通过EMT方式,致使一部分已分化的肝癌细胞转化为CSCs。亚硝酸盐还可能通过刺激CSCs细胞因子分泌,使干细胞样细胞“干性”增强,从而促进SMMC-7721细胞侵袭、转移和耐药能力。

## References

- [1] Li M, Wu CF, Zhang JY, et al. Biological characteristics of drug induced tumor cells and its medicine prevention and treatment [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 182–188.
- [2] Orecchioni S, Bertolini F. Characterization of cancer stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1464: 49–62.
- [3] Jiang Y, Gao H, Liu M, et al. Sorting and biological characteristics analysis for side population cells in human primary hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 1890–1905.
- [4] Ma HY, He M, Wei MJ. Research progress on targeting effect and regulating mechanisms of the stemness of cancer stem cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 189–196.
- [5] Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 74.
- [6] Frérart F, Lobysheva I, Gallez B, et al. Vascular caveolin deficiency supports the angiogenic effects of nitrite, a major end product of nitric oxide metabolism in tumors [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7: 1056–1063.
- [7] Yongsanguanchai N, Pongrakhananon V, Mutirangura A, et al. Nitric oxide induces cancer stem cell-like phenotypes in human lung cancer cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308: C89–C100.
- [8] Park SJ, Kim JG, Kim ND, et al. Estradiol, TGF- $\beta$ 1 and hypoxia promote breast cancer stemness and EMT-mediated breast cancer migration [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11: 1895–1902.
- [9] Wang YD, Fu JM, Shi Q, et al. Sodium nitrite induces epithelial-mesenchymal transition of SMMC-7721 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 507–512.
- [10] Xu HR, Lin B, Wang SQ, et al. Sodium nitrite improves epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells in mice bearing H22 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1470–1476.
- [11] Boo L, Ho WY, Ali NM, et al. miRNA transcriptome profiling of spheroid-enriched cells with cancer stem cell properties in human breast MCF-7 cell line [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12: 427–445.
- [12] Safa AR. Resistance to cell death and its modulation in cancer stem cells [J]. *Crit Rev Oncog*, 2016, 21: 203–219.
- [13] Xia H, Li F, Hu X, et al. pH-Sensitive Pt nanocluster assembly overcomes cisplatin resistance and heterogeneous stemness of hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Cent Sci*, 2016, 2: 802–811.
- [14] Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 722.
- [15] Cao L, Zhou Y, Zhai B, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11: 71.
- [16] Islam F, Qiao B, Smith RA, et al. Cancer stem cell: fundamental experimental pathological concepts and updates [J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98: 184–191.
- [17] Oskarsson T, Batlle E, Massagué J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 306–321.
- [18] Puglisi MA, Cenciarelli C, Tesori V, et al. High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells [J]. *J Pathol*, 2015, 236: 479–490.
- [19] Ren X, Ding Y, Lu N. Nitrite attenuated peroxynitrite and hypochlorite generation in activated neutrophils [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 775: 50–56.
- [20] Gammon L, Biddle A, Heywood HK, et al. Sub-sets of cancer stem cells differ intrinsically in their patterns of oxygen metabolism [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e62493.
- [21] Yang X, Ye J, Yan H, et al. MiR-491 attenuates cancer stem cells-like properties of hepatocellular carcinoma by inhibition of GIT-1/NF- $\kappa$ B-mediated EMT [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37: 201–209.
- [22] Francescangeli F, Contavalli P, De Angelis ML, et al. Dynamic regulation of the cancer stem cell compartment by Cripto-1 in colorectal cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22: 1700–1713.
- [23] Wang CQ, Sun HT, Gao XM, et al. Interleukin-6 enhances cancer stemness and promotes metastasis of hepatocellular carcinoma *via* up-regulating osteopontin expression [J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 1873–1889.
- [24] Bellomo C, Caja L, Moustakas A. Transforming growth factor  $\beta$  as regulator of cancer stemness and metastasis [J]. *Br J Cancer*, 2016, 115: 761–769.
- [25] Alyoussef A, Al-Gayyar MM. Thymoquinone ameliorated elevated inflammatory cytokines in testicular tissue and sex hormones imbalance induced by oral chronic toxicity with sodium nitrite [J]. *Cytokine*, 2016, 83: 64–74.
- [26] Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 865–869.