

# 不同种类生长抑素类似物对肝细胞肝癌 作用差异的实验研究\*

吕修和, 王春晖, 谢艳<sup>△</sup>

四川大学华西医院 消化内科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 观察 SOM230、奥曲肽、兰瑞肽对体内外 Bel-7402 肝癌细胞的作用,分析其疗效差异及可能的机制。方法 采用不同浓度( $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L) SOM230、奥曲肽和兰瑞肽处理 Bel-7402 肝癌细胞,作用 24 h、48 h 和 72 h 时,采用 CCK8 法检测细胞增殖;采用  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度的 3 种药物处理细胞 24 h、48 h 和 72 h, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡;荧光定量 PCR 检测药物作用前后细胞生长抑素受体(SSTR)表达的变化。建立 Bel-7402 细胞裸鼠移植瘤模型,干预组分别予 SOM230、奥曲肽、兰瑞肽 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ,对照组予同体积生理盐水,连续用药 6 周(皮下注射),荧光定量 PCR 及 Western blot 检测肿瘤组织中 SSTR 的基因及蛋白表达变化。结果 3 种药物均可抑制 Bel-7402 细胞的增殖,但均无法促进其凋亡。在体外水平,SSTR1、SSTR4 在各组间的表达量均不随时间发生变化;与对照组比较,SSTR2 在干预组中的表达量均表现为随干预时间延长而减少( $P < 0.05$ ),而 SSTR5 在干预组中的表达量均表现为随干预时间延长先增加后减少( $P < 0.05$ )。3 种药物均可提高荷瘤裸鼠的生存质量和生存率。在体内水平,SSTR1 基因在 SOM230 组表达量较奥曲肽、兰瑞肽及对照组增加;SSTR2 基因在 3 个干预组中的表达量较对照组均增加;SSTR5 基因在 SOM230 组及兰瑞肽组中的表达量较奥曲肽组及对照组增加;上述差异均具统计学意义( $P < 0.05$ )。Western blot 从蛋白水平验证了上述结果。结论 在一定浓度范围内,采用针对 SSTR2 和 SSTR5 具有高亲和力的生长抑素类似物(SSTA)长期治疗可抑制肝癌细胞的生长。

**【关键词】** 生长抑素 肝肿瘤 Bel-7402 细胞 移植瘤

**Differences of Therapeutic Efficacy Between Different Kinds of Somatostatin Analogue for Primary Hepatocellular Carcinoma** LÜ Xiū-he, WANG Chun-hui, XIE Yan<sup>△</sup>. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: xier917@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of SOM230, octreotide and lanreotide on hepatocellular carcinoma cell line Bel-7402 *in vivo* and *in vitro*, and to analyze the differences of their therapeutic efficacy with relevant mechanisms. **Methods** At different time points (24, 48, 72 h), the cell counting kit-8 (CCK8) was used to evaluate cell proliferation (drug concentration  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L) and the Annexin V-FITC/PI staining was used to assess cell apoptosis (drug concentration  $1 \times 10^{-5}$  mol/L), while the real-time quantitative PCR was used to detect cellular SSTR expression changes before and after interventions. A transplanted tumor model was set up, and the tumor-bearing nude mice were treated by three drugs with a common dose of 100  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  or same volume of normal saline, respectively. After a treatment period of 6 weeks, real-time quantitative PCR and Western blot test were performed to detect the expression changes of SSTR in tumor tissues from the level of gene and protein. **Results** All three drugs could inhibit the cell proliferation of Bel-7402. However, they were unable to promote the cell apoptosis. *In vitro*, the expressions of SSTR1, SSTR4 genes did not change over time in each group. The expressions of SSTR2 gene were decreased in three intervention groups while the expressions of SSTR5 gene were increased first and then decreased. Compared with the control group, all differences have statistical significance ( $P < 0.05$ ). All three drugs could improve the survival rate and quality of life for nude mice bearing hepatoma. *In vivo*, the expression of SSTR1 gene in SOM230 group was increased when compared with that of the other groups; the expressions of SSTR2 gene in three intervention groups were increased when compared with that of the control group; the expressions of SSTR5 gene in SOM230 group and lanreotide group were increased when compared with that of the octreotide group and the control group, and all differences have statistical significance

\* 四川省应用基础研究项目(No. 2012JY0076)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: xier917@126.com

( $P < 0.05$ ). The Western blot test confirmed these results from the protein level. **Conclusion** In a certain concentration range, the long-term treatment of SSTA with high affinities to SSTR2 and SSTR5 could inhibit the growth of HCC.

**【Key words】** Somatostatin Liver cancer Bel-7402 cells Xenografts

原发性肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为临床常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别位居全球所有肿瘤的第六位和第三位,严重威胁人类的生命健康<sup>[1]</sup>。近年来,生长抑素及其类似物(somatostatin analogue, SSTA)的抗肿瘤作用日益受到人们关注,但其针对 HCC 治疗作用的诸多基础及临床研究结果并不一致<sup>[2]</sup>。SSTA 主要通过激动生长抑素受体(somatostatin receptor, SSTR)起作用,其抗肿瘤疗效的差异与激动的不同 SSTR 亚型有关<sup>[3]</sup>;故研究不同亚型 SSTR 抗 HCC 的作用及疗效差异的原因是了解 SSTA 抗 HCC 机制的重要方法。

目前 SSTA 治疗 HCC 的疗效差异是否与 SSTA 激动的 SSTR 亚型的数量及持续时间有关, SSTA 又如何导致 HCC 上 SSTR 的变化,具体机理目前尚未阐明<sup>[4]</sup>。本研究旨在比较 3 种所针对 SSTR 类型及亲和力各有不同的 SSTA(SOM230、奥曲肽和兰瑞肽)在体内外对 Bel-7402 肝癌细胞的作用,分析其疗效差异及可能的机制,并观察干预过程中 SSTR 的变化规律,寻找治疗 HCC 的可能关键受体靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、细胞株及实验动物

SOM230 粉剂由 Novartis 制药有限公司赠送;奥曲肽及兰瑞肽(纯度  $> 98\%$ )粉剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司。特级胎牛血清购自美国 Gibco 公司;RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;CCK8 试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自日本同仁化学研究所。TRIzol 试剂、首链 cDNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司;qPCR master mix 购自美国 KAPA 公司;SSTR1~5 亚型引物由上海生工生物工程有限公司合成。RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及超敏 ECL 化学发光试剂(BeyoECL Plus)盒均购自江苏碧云天生物技术研究;SSTR 亚型(1, 2, 5)兔抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物工程公司及 Abcam 生物科技公司; $\beta$ -actin 兔抗人多克隆抗体购自美国 ABclonal

公司。人肝癌 Bel-7402 细胞株购自南京科佰生物科技有限公司。BALB/c nu/nu 裸鼠, SPF 级, 雄性, 4~5 周, 体质量 16~19 g, 购自成都达硕生物科技有限公司。

### 1.2 细胞培养

Bel-7402 肝癌细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞密度达 80%~90% 时,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍,0.25% 胰蛋白酶消化 1 min, 1 400 r/min 离心 3 min, 加入新培养基并吹打均匀后分装到培养瓶中。每隔 2 日进行上述消化、传代。取对数生长期细胞用于后续实验,各项实验均重复 3 次。

### 1.3 CCK8 比色法检测细胞增殖活性

将 Bel-7402 细胞以  $7.5 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔培养板培养过夜。弃上清,每孔加入含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h,后分 3 组分别加入终浓度为  $1 \times 10^{-10}$ 、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  和  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 不同干预药物的培养基,每个浓度设 3 个复孔。以不含药物的培养液培养细胞作为对照,以不含药物及细胞的培养基孔作为空白,每孔终体积为 200  $\mu$ L。3 板分别继续培养 23 h、47 h、71 h 后,每孔加入 CCK8 试剂 20  $\mu$ L,再次培养 1 h 后采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度(A)值,分析数据。

### 1.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

按细胞浓度为  $5 \times 10^5$  /孔将 Bel-7402 细胞接种于 6 孔培养板培养过夜。含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h,后分别加入含终浓度为  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 不同干预药物的培养基处理细胞 24 h、48 h 及 72 h,并以不含药物的培养基培养细胞作为对照,每孔终体积为 2 mL。消化收集细胞,PBS 洗涤后 1 000 r/min 离心 3 min,共两次,清除 PBS 液后按 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒说明操作,加入缓冲液 500  $\mu$ L, Annexin V 及 PI 各 5  $\mu$ L,混匀避光 15 min,1 h 内送流式细胞仪检测。

### 1.5 荧光定量 PCR 检测 SSTR 基因表达量

将 Bel-7402 细胞接种于 6 孔板中,用含 1% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基饥饿培养 24 h,3 个实

验组分别给予含  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 不同干预药物的培养基培养, 对照组给予无药物的培养基培养, 每组设 3 个复孔。待 24 h、48 h 及 72 h 后收集各组细胞, 冰冷的 PBS 洗涤 3 次, 每孔内加入 TRIzol 试剂 1 mL 静置 10 min, 转移至 EP 管内, 余按总 RNA 提取步骤提取。所得总 RNA 用紫外分光光度仪测其纯度及浓度, 分装于  $-80$  °C 冰箱保存。分别计算每个样本所需原液量, 设置逆转录体系 20  $\mu$ L, 条件为: 25 °C 孵育 5 min, 42 °C 孵育 60 min, 70 °C 孵育 5 min 后终止反应。于所得 cDNA 溶液中加入等量去离子水稀释为两倍体积。按照荧光 mix 10  $\mu$ L、上游及下游引物各 1  $\mu$ L (4  $\mu$ mol/L)、PCR 反应水 7  $\mu$ L、稀释后样本 1  $\mu$ L 配制荧光定量反应体系, 上荧光定量 PCR 仪扩增 (SSTR1~5), 条件为: 95 °C 孵育 3 min, 95 °C 解链 3 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 1 s。保存反应信息, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 以对照组基因表达量为 1, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算实验组各基因相对表达量。本研究所采用引物序列见表 1。

表 1 引物序列基本信息

Table 1 Basic characteristics of primer sequences

Gene	Sequence (5'-3')	Product/ bp
SSTR1	F:GGGCTATCTGCCTGTGCTAC R:GCTCAGCAAACACGTTGACC	186
SSTR2	F:ACCTCAATGGCTCTGTGGTG R:CTTGGCATAGCGGAGGATGA	161
SSTR3	F:AGAACCTGAGAATGCCTCCTC R:GCCGCAGGACCACATAGATG	176
SSTR4	F:GGTCGTCTTTGTGCTCTGCT R:CTGGAAGAATCGGCGGAAG	175
SSTR5	F:TGTTTGCGGGATGTTGGCT R:CTGTTGGCGTAGGAGAGGA	124
$\beta$ -actin	F:TCATGAAGTGTGACGTGGACATC R:CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT	156

## 1.6 裸鼠移植瘤模型建立

取 Bel-7402 细胞按  $5 \times 10^6$ /只接种于 BALB/c nu/nu 裸鼠前腋皮下, 4 周后肿瘤生长至最长径为 2.5~3.0 cm, 完整取下瘤块, 立即浸入含 100 U/mL 青霉素及链霉素的生理盐水中, 取生长旺盛的部分切成 2 mm  $\times$  2 mm  $\times$  2 mm 大小的瘤块备用。常规消毒裸鼠皮肤, 戊巴比妥钠 70 mg/kg 腹腔注射麻醉。取正中切口进腹, 将肝左叶提出腹腔, 眼科剪剪一斜行切口后放入瘤块; 明胶海绵加压止血并逐层关腹。建模裸鼠随机均分为 SOM230 组 [100  $\mu$ g/(kg  $\cdot$  d)], 奥曲肽组 [100  $\mu$ g/(kg  $\cdot$  d)], 兰瑞肽组 [100  $\mu$ g/(kg  $\cdot$  d)] 及对照组 (等量生理盐水), 每组 8 只, 术后第 2 天开始给药 (皮下注射), 共

干预 6 周。给药期间观察裸鼠的食欲、精神状态及消化道出血情况。干预结束后, 行戊巴比妥钠麻醉后处死荷瘤鼠, 取下肝癌组织, 测量肿瘤最长径长度 (cm) 及质量 (g), 放入冻存管内并迅速投入液氮罐中速冻, 后存放于  $-80$  °C 冰箱中。

## 1.7 荧光定量 PCR 检测肿瘤组织中 SSTR 基因表达量

取各组所得肿瘤组织 100 mg/样本放入研钵, 倒入液氮并充分研磨至呈粉末状, 加入含 1 mL Trizol 试剂的 EP 管内, 手动匀浆 5 min, 余按总 RNA 提取及逆转录步骤操作。取所得逆转录 cDNA 样本, 按照荧光 mix 10  $\mu$ L、上游及下游引物各 1  $\mu$ L (4  $\mu$ mol/L)、PCR 反应水 7  $\mu$ L、样本 1  $\mu$ L 配制荧光定量 PCR 反应体系, 荧光定量 PCR 仪扩增 (SSTR1、2、5)。反应条件及相对定量方法与 1.5 部分相同。

## 1.8 Western blot 检测肿瘤组织中 SSTR 蛋白表达量

取各组所得肿瘤组织 150 mg/样本放入研钵, 充分研磨后倒入含 600  $\mu$ L RIPA 裂解液的 EP 管, 玻璃匀浆器匀浆 10 min, 冰上静置 30 min。4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上层蛋白并分装。BCA 试剂盒进行蛋白定量, 样本与 SDS-PAGE 上样缓冲液 (5 $\times$ ) 按 4 : 1 比例涡旋混匀, 100 °C 煮 5 min,  $-20$  °C 保存。取各组总蛋白样品按 60  $\mu$ g/孔上样, 行 80 g/L SDS-PAGE 电泳分离蛋白; 采用半干法, 按 1.3 mA/cm<sup>2</sup> 膜面积计算, 恒流 1 h 将凝胶上的蛋白电转移至 PVDF 膜上; 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h 后, 再用稀释的 SSTR1、2、5 一抗 (1 : 100)、 $\beta$ -actin (1 : 2 000) 4 °C 下孵育膜过夜; TBST 洗涤 5 min  $\times$  3 次后, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (1 : 10 000) 室温下孵育 2 h; 经 TBST 再次洗涤 5 min  $\times$  3 次后, 使用 BeyoECL Plus 发光检测试剂与膜反应 1 h, 暗室内 X 光胶片压片曝光, 显示结果。使用 Quantity One 软件分析条带, 计算每一样本的 SSTR1、SSTR2 和 SSTR5 蛋白表达的相对量, 即相应蛋白条带的灰度值与 GAPDH 条带的灰度值之比。

## 1.9 统计学方法

实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间均数比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3 种药物对 Bel-7402 细胞增殖的影响

在  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度范围内, SOM230、奥曲肽和兰瑞肽对 Bel-7402 细胞的增殖均有程度不同的剂量相关性抑制,且抑制程度随时间而改变(图 1)。与对照组相比:在 24 h 时,3 种药物浓度为  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 及以上时,各干预组抑制效应均随着药物浓度的增加而增强,且不同干预药物组间的作用无明显差异,表现趋同;在 48 h 时,需较高浓度方可维持抑制效应,即抑制效应在药物浓

度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 及以上时较为明显,不同干预药物组间的抑制效应亦无明显差异;在 72 h 时,细胞增殖曲线呈现“金字塔”形,兰瑞肽和奥曲肽组在药物浓度为  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 时抑制效应趋近于对照组, SOM230 组在药物浓度为  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 时抑制效应趋近于对照组,当药物浓度在  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-10}$  mol/L 之间时,不同干预药物组间的抑制效应差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

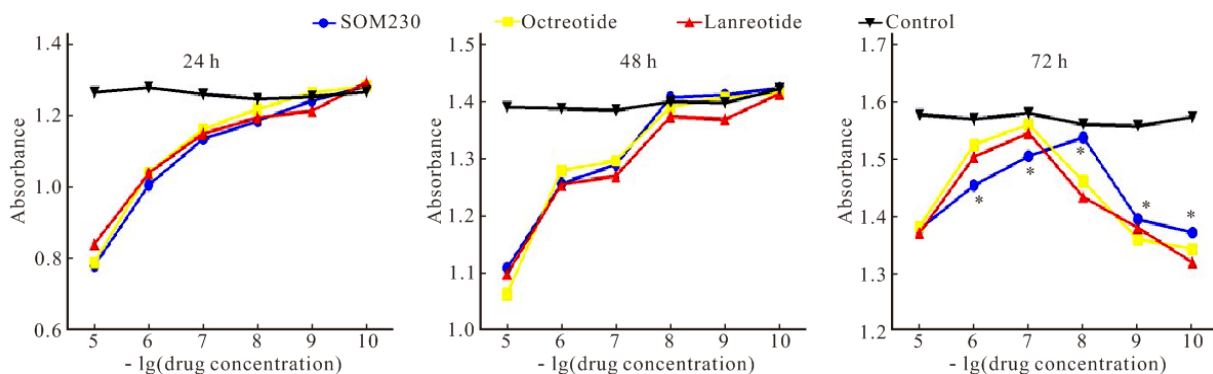


图 1 不同干预药物对 Bel-7402 细胞增殖的影响

Fig 1 Effect on cell proliferation in different groups based on *in vitro* experiment

\*  $P < 0.05$ , vs. octreotide and lanreotide groups at the same time point. Drug concentrations ranged from  $1 \times 10^{-5}$  mol/L to  $1 \times 10^{-10}$  mol/L

## 2.2 3 种药物对 Bel-7402 细胞凋亡的影响

与对照组相比:在 24 h 时,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 不同干预药物均未表现出对 Bel-7402 细胞凋亡的促进作用;在 48 h 及 72 h 时, SOM230 组部分表现出对 Bel-7402 细胞早期凋亡的促进作用,细胞凋亡率分别为  $(7.8 \pm 1.2)\%$  及  $(8.5 \pm 1.3)\%$ , 对照组则分别为  $(3.4 \pm 0.9)\%$  及  $(4.3 \pm 1.2)\%$ , 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但奥曲肽和兰瑞肽组仍未表现出对细胞凋亡的促进作用。

## 2.3 3 种药物作用前后 Bel-7402 细胞 SSTR 表达量的变化

采用  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 作为干预浓度, 荧光定量 PCR 结果显示(图 2): Bel-7402 细胞共表达 SSTR1、SSTR2、SSTR4、SSTR5 四种受体, 无 SSTR3 表达。SSTR1、SSTR4 在各组中的表达量均不随时间发生变化, 且各组间表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较, SSTR2 在 3 个实验组中的表达量均表现为随干预时间延长而减少( $P < 0.05$ ); 24 h 时, 奥曲肽及兰瑞肽组 SSTR2 表达量较 SOM230 组更低( $P < 0.05$ ); 48 h 及 72 h 时, 3 个实验组间表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与对照组比较, SSTR5 在 3 个实验组中的

表达量均表现为随干预时间延长先增加后减少( $P < 0.05$ ); 24 h、48 h 及 72 h 时, 各实验组间表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 2.4 3 种药物对移植瘤裸鼠生活质量和生存率的影响

药物干预的 6 周期间, 对照组裸鼠较 SOM230、奥曲肽及兰瑞肽组提前 2 周出现进食量下降、消瘦及活动减少, 且 3 只于实验第 4~5 周时出现可见血便。实验第 42 天, 对照组仅剩 3 只动物存活, 生存率为 37.5%; SOM230 组、奥曲肽组及兰瑞肽组裸鼠的生存率则分别为 75.0%、62.5% 和 62.5%。实验组及对照组裸鼠均未出现明确的腹水及黄疸表现。干预结束后处死各组尚存活裸鼠, 各组所得瘤重分别为: SOM230 组  $(2.46 \pm 0.42)$  g, 奥曲肽组  $(1.24 \pm 0.32)$  g, 兰瑞肽组  $(1.65 \pm 0.34)$  g, 对照组  $(3.57 \pm 0.43)$  g。实验组瘤重均较对照组瘤重低, 且差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 奥曲肽组及兰瑞肽组瘤重较 SOM230 组瘤重低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.5 3 种药物对移植瘤中 SSTR 基因表达的影响

荧光定量 PCR 结果显示(图 3): SSTR1 在 SOM230 组表达量较奥曲肽、兰瑞肽及对照组增加,

差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。SSTR2 在 3 个实验组中的表达量较对照组均增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但 SOM230、奥曲肽、兰瑞肽 3 组间的表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。SSTR5

在 SOM230 及兰瑞肽组中的表达量较奥曲肽组及对照组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); SOM230 组及兰瑞肽组间、奥曲肽组及对照组间表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

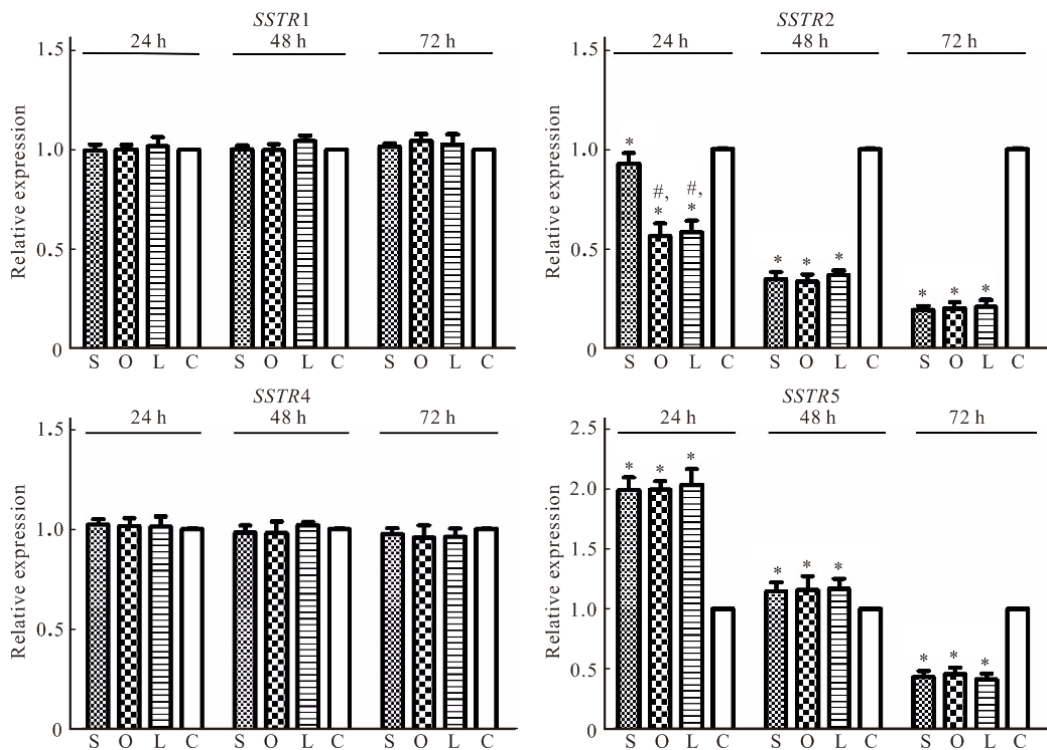


图 2 不同干预药物对 Bel-7402 细胞 SSTR 基因表达量的影响 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Fig 2 Relative expression of SSTR genes in different groups based on *in vitro* experiment ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

S: SOM230 group; O: Octreotide group; L: Lanreotide group; C: Control group. \*  $P < 0.05$ , vs. control group; #  $P < 0.05$ , vs. SOM230 group

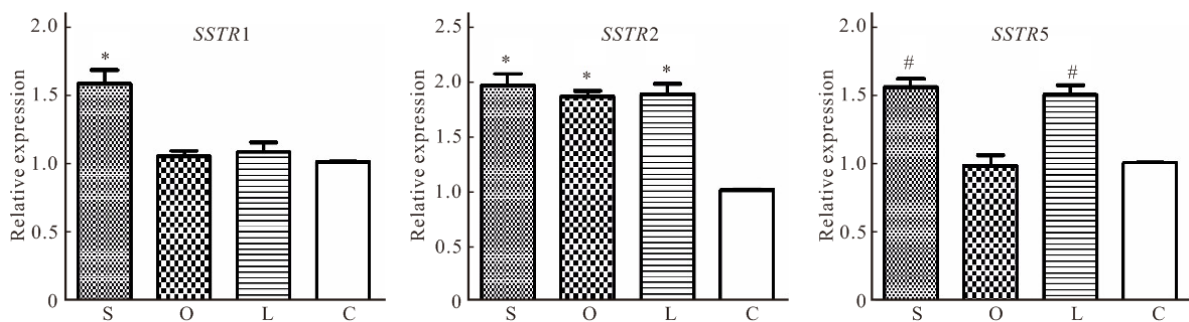


图 3 不同干预药物干预 6 周后对移植瘤中 SSTR 基因表达量的影响 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

Fig 3 Relative expression of SSTR genes in different groups based on *in vivo* experiment for 6 weeks ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )

S: SOM230 group; O: Octreotide group; L: Lanreotide group; C: Control group. \*  $P < 0.05$ , vs. control group; #  $P < 0.05$ , vs. octreotide and control groups

2.6 3 种药物对移植瘤中 SSTR 蛋白表达量的影响

Western blot 结果提示 (图 4): SSTR2 在 SOM230、奥曲肽、兰瑞肽组中较对照组均增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但 SOM230、奥曲

肽、兰瑞肽 3 组间的表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。SSTR1、SSTR5 在 SOM230 组及兰瑞肽组中的表达量较奥曲肽组及对照组增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 但 SOM230 组与兰瑞肽组间、奥

曲肽组与对照组间表达量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

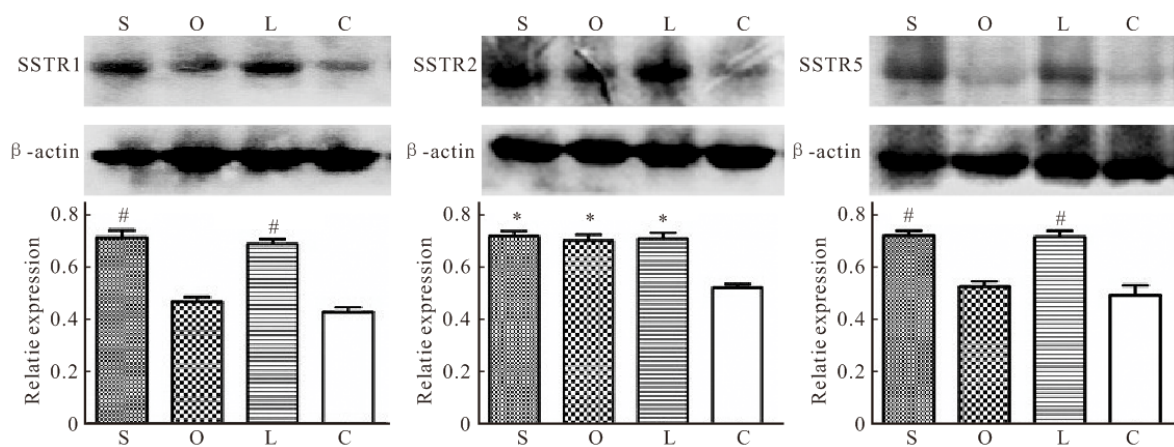


图 4 不同干预药物干预 6 周后对移植瘤中 SSTR 蛋白表达量的影响(Western blot)

Fig 4 Relative expression of SSTR proteins in different groups based on *in vivo* treatment for 6 weeks (Western blot)

S: SOM230 group; O: Octreotide group; L: Lanreotide group; C: Control group. \*  $P < 0.05$ , vs. control group; #  $P < 0.05$ , vs. octreotide and control groups

### 3 讨论

本研究发现,在体外实验中,3种 SSTA 均可抑制 Bel-7402 细胞的增殖,且抑制作用在早期(24 h、48 h)随浓度的增加而增强;随着干预时间的延长(72 h),其抑制效应在药物低浓度时更强,提示可能与高浓度下细胞表面 SSTR 出现饱和与内化有关<sup>[5]</sup>。3种 SSTA 在 72 h 时的作用差异也提示 SOM230 作为更长效 SSTA 在抑制 HCC 细胞增殖方面较奥曲肽和兰瑞肽更具有优势。在促进细胞凋亡方面,3种药物并未显示出明显的作用,仅 SOM230 组在高浓度长时间干预下可增加细胞早期凋亡率,但无法排除是其本身理化结构所致<sup>[6]</sup>。在受体基因表达方面,Bel-7402 细胞表面 SSTR2 及 SSTR5 的基因表达量在 3 种 SSTA 干预后均出现下调,提示细胞表面 SSTR 在短时间药物干预下可能因受体的饱和而导致表达的下调,进而可以解释 HCC 对 SSTA 治疗早期出现的不敏感现象<sup>[7]</sup>;其中 SSTR2 与 SSTR5 的表达在 3 个实验组间表现的差异,则提示不同亚型的 SSTR 在不同药物作用后出现的变化及机制可能并不完全相同<sup>[8]</sup>,其机制仍需未来进一步探究。本研究结果提示 SSTR2、SSTR5 在药物干预过程中表达量发生变化,SSTR1 与 SSTR4 则无变化,表明 SSTR2、SSTR5 在细胞水平可能是 SSTA 类药物抑制细胞增殖作用的主要靶点受体。

在体内实验中,与既往的研究结果类似,我们在

建造裸鼠体内移植瘤的实验中观察到,SSTA 类药物可改善裸鼠的消瘦、乏力、血便等恶病质状态,并进一步提高其生存率。这些结果再次证实 SSTA 类药物确实存在针对 HCC 的治疗价值<sup>[6,9-10]</sup>。在较长时间(6 周)药物作用下,裸鼠体内移植瘤中所表达的各类 SSTR 亚型随作用药物的不同,其基因及蛋白水平的表达量也发生相应变化。SSTR1 在 SOM230 组中的基因表达量表现为较其他 3 组增加;SSTR2 表现为在 3 个实验组中的基因表达量均较对照组增加,但 3 个实验组间表达量无明显差异;SSTR5 表现为在 SOM230 组及兰瑞肽组中的基因表达量较其他两组增加。SSTR 亚型基因表达量的增加提示在长期药物作用下作为 G 蛋白偶联受体的 SSTR 所出现的上调现象,可增强对体内 HCC 细胞生长的抑制作用<sup>[11-12]</sup>;同时,这些结果又可以部分解释晚期肝癌患者不能从 SSTA 治疗中获益的现象,即在 SSTR 表达存在个体差异的情况下,部分患者无法坚持长期的治疗以达到较好的抗肿瘤效果<sup>[8]</sup>。此外,以上结果又与不同 SSTA 作用于不同 SSTR 亚型的亲和力表现基本吻合,即 SOM230 对 SSTR1、2、5 有较高的亲和力,奥曲肽及兰瑞肽对 SSTR2、5 有较高的亲和力,提示药物对受体的亲和力是影响体内 SSTR 表达量的一个重要因素<sup>[13-14]</sup>;而尽管 SOM230 较其他两种药物对 SSTR5 有更高的亲和力,奥曲肽及兰瑞肽较 SOM230 对 SSTR2 有更高的亲和力<sup>[15]</sup>,但在本研究所采用的干预浓度下,干预组间并未出现基因表

剂量上的明显差异,提示在一定浓度下,不同药物对 SSTR 的作用又是类似的,并不因亲合力的不同而不同。本研究中,3种 SSTA 对裸鼠移植 HCC 的治疗作用并无明显差异,提示 SSTR2、SSTR5 可能为 SSTA 发挥药物疗效的主要靶点,对 SSTR1 的作用并不能明显改变其疗效。本研究采用 Western blot 所得蛋白水平的结果与荧光定量 PCR 所得基因水平结果基本一致,进一步验证了上述结论。

本研究表明 3 种 SSTA 对 Bel-7402 细胞体内外作用的结果较为一致,表明 SSTR2、SSTR5 为 SSTA 作用于 HCC 的主要靶点。可以明确的是,在一定浓度范围内,采用针对 SSTR2 和 SSTR5 具有高亲合力的 SSTA 长期治疗可抑制 HCC 的生长,提高实验中荷瘤裸鼠的生存率及生存质量。

### 参 考 文 献

[1] European Association for Study of Liver, European Organization for Research and Treatment of Cancer. EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer*, 2012, 48(5): 599-641.

[2] 邱婷婷, 谢 艳. 生长抑素类似物治疗原发性肝细胞肝癌研究进展. *西部医学*, 2013, 25(10): 1590-1592.

[3] THEODOROPOULOU M, STALLA GK. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*, 2013, 34(3): 228-252.

[4] CHALABI M, DULUC C, CARON P, *et al.* Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy? *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3): 115-127.

[5] 华赞鹏, 李绍强, 赖佳明, 等. 奥曲肽调节自身受体 2 在肝癌上的表达及其影响. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(12): 2325-2329.

[6] 谢 艳, 陈 爽, 王春晖, 等. SOM230 促进 HepG2 细胞原位移植瘤坏死的机制. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(10): 759-764.

[7] HUA YP, YIN XY, PENG BG, *et al.* Mechanisms and influence of octreotide induced regulation of somatostatin receptor 2 on hepatocellular carcinoma. *Chemotherapy*, 2009, 55(5): 312-320.

[8] SAMONAKIS D, NOTAS G, CHRISTODOULAKIS N, *et al.* Mechanisms of action and resistance of somatostatin analogues for the treatment of hepatocellular carcinoma: a message not well taken. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(9): 2359-2365.

[9] 华赞鹏, 黄洁夫, 梁力建, 等. 奥曲肽抑制裸鼠肝癌原位种植瘤生长机制的研究. *中华外科杂志*, 2005, 43(11): 721-725.

[10] 陈 爽, 谢 艳, 王春晖, 等. 奥曲肽致肝癌原位移植瘤坏死的实验研究. *癌症*, 2009, 28(7): 673-678.

[11] FROIDEVAUX S, HINTEMANN E, TOROK M, *et al.* Regulation of somatostatin receptor type 2 (sst2) expression in AR4-2J tumor cells implanted into mice during octreotide treatment. *Cancer Res*, 1999, 59(15): 3652-3657.

[12] BEAUMONT V, HEPWORTH MB, LUTY JS, *et al.* Somatostatin receptor desensitization in NG108-15 cells: a consequence of receptor sequestration. *J Biol Chem*, 1998, 273(50): 33174-332183.

[13] ABDEL-RAHMAN O, LAMARCA A, VALLE JW, *et al.* Somatostatin receptor expression in hepatocellular carcinoma: prognostic and therapeutic considerations. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21(6): 485-493.

[14] RAI U, THRIMAWITHANA TR, VALERY C, *et al.* Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: current view and potential applications. *Pharmacol Ther*, 2015, 152: 98-110 [2016-09-02]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725815000984>. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.007.

[15] BARBIERI F, BAJETTO A, PATTAROZZI A, *et al.* Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. *Int J Pept*, 2013, 2013: 926295 [2016-09-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3582104/>. doi:10.1155/2013/926295.

(2016-10-25 收稿, 2017-03-24 修回)

编辑 余琳