

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.02.003

❖ 基础研究 ❖

敲低 BCLAF1 对肝癌 SMMC-7221 细胞增殖、侵袭及耐药性的影响

朱朝玉, 范长儒, 张玉良

(临沂市肿瘤医院普通外科二病区, 山东 临沂 276034)

【摘要】目的: 探讨敲低 BCLAF1 对肝癌 SMMC-7221 细胞增殖、侵袭及耐药性的影响。**方法:** 构建 shRNA-BCLAF1 载体, 按照空白对照组、shRNA-NC (阴性对照) 组、shRNA-BCLAF1 组转染 SMMC-7221 细胞; 分别采用 qPCR 及 Western blot 鉴定干扰效果; MTT 法检测各组细胞增殖活性; Transwell 检测各组细胞侵袭能力; 划痕实验检测各组细胞迁移能力; 使用 0、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉非尼对各组细胞进行处理, 比较细胞活性; Western blot 法检测各组 16 $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼处理后 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平。**结果:** shRNA-BCLAF1 组 BCLAF1 基因 mRNA 及蛋白相对表达量均低于空白对照组、shRNA-NC 组 ($P < 0.05$); 常规培养 48 h 后, shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞增殖率低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞侵袭率、迁移率低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$); shRNA-BCLAF1 组各浓度索拉非尼处理条件下 SMMC-7221 细胞活性低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$); 16 $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼处理后, shRNA-BCLAF1 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达量低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。**结论:** 敲低 BCLAF1 能抑制肝癌 SMMC-7221 细胞增殖、侵袭, 降低对索拉非尼的耐药性, 机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

【关键词】 BCLAF1; 肝癌; 增殖; 侵袭; 耐药性

【中图分类号】 R246.5 **【文献标志码】** A

Effects of knocking down BCLAF1 on proliferation, invasion and drug resistance of liver cancer SMMC-7221 cells

ZHU Chao-yu, FAN Chang-ru, ZHANG Yu-liang

(Department 2 of General Surgery, Linyi Cancer Hospital, Linyi 276034, Shandong, China)

【Abstract】Objective: To explore the effects of knocking down BCLAF1 on the proliferation, invasion and drug resistance of liver cancer SMMC-7221 cells. **Methods:** The shRNA-BCLAF1 vector was constructed. The SMMC-7221 cells in blank control group, shRNA-NC (negative control) group and shRNA-BCLAF1 group were transfected. The interference effects were identified by qPCR and Western blot. The proliferation activity of cells in each group was detected by MTT. The invasion ability of cells in each group was detected by Transwell. The migration ability of cells in each group was detected by scratch assay. Cells in each group were treated with sorafenib (0, 4, 8, 12, 16 $\mu\text{mol/L}$). The cells viability was compared. The expression levels of PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt proteins after treatment with 16 $\mu\text{mol/L}$ sorafenib in each group were detected by Western blot. **Results:** The relative expression levels of BCLAF1 gene and proteins in shRNA-BCLAF1 group were significantly lower than those in blank control group and shRNA-NC group ($P < 0.05$). After 48 h of routine culture, proliferation rate of SMMC-7221 cells in shRNA-BCLAF1 group was significantly lower than that in blank control group and shRNA-NC group ($P < 0.05$). The invasion rate and migration rate of SMMC-7221 cells in shRNA-BCLAF1 group were significantly lower than those in blank control group and shRNA-NC group ($P < 0.05$). The viability of SMMC-7221 cells treated with different concentrations of sorafenib in shRNA-BCLAF1 group was significantly lower than that in blank control group and shRNA-NC group ($P < 0.05$). After treatment with 16 $\mu\text{mol/L}$ sorafenib, relative expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins in shRNA-BCLAF1 group were significantly lower than those in blank control group and shRNA-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Knocking down BCLAF1 can inhibit the proliferation and invasion of liver cancer SMMC-7221 cells, and reduce their resistance to sorafenib. The mechanism may be related to inhibiting PI3K/Akt signaling pathway.

【Key words】 BCLAF1; Liver cancer; Proliferation; Invasion; Drug resistance

在全球范围内, 肝癌的发病率在所有癌症中排名第第六位, 在癌症相关死亡中排名第二^[1]。肝细

胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占原发性肝恶性肿瘤的 75% ~ 90%, 是肝癌相关死亡的主要原因^[2]。早期 HCC 的症状通常不明显, 当症状出现时, 大多数 HCC 已经发展至晚期。HCC 外科治疗选择主要是肝移植和手术切除, 然而, 有相当数量的中晚期患者已不适合手术治疗, 导致预后很差^[3]。因此, 探寻可用于 HCC 治疗的新靶标尤为重要。Bcl-2 相关转录因子 1 (bcl-2-associated transcription factor 1, BCLAF1) 最初发现是作为一种能与 Bcl-2 家族发生作用的蛋白质。多年来, 据报道 BCLAF1 参与多种生物过程, 包括 T 细胞活化、肺发育、溶菌感染程序的控制、DNA 损伤和修复^[4-5], 甚至转录后事件, 例如 mRNA 的剪接加工^[6]。此外, BCLAF1 基因的突变或异常表达也与人类癌症密切相关。尽管大多数研究表明 BCLAF1 通过抑制 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白发挥肿瘤抑制因子作用, 但最近的一项研究报道 BCLAF1 调节结肠癌细胞的肿瘤发生, 其敲除能抑制结肠癌细胞增殖, 过表达增强致瘤潜力^[7]。本研究通过敲低 BCLAF1, 借以探讨其对肝癌 SMMC-7221 细胞增殖、侵袭及耐药性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌 SMMC-7221 细胞 (目录号: TCHu52) 购买自中国上海中科院细胞库; RNA 提取试剂盒 (货号: ZP401)、反转录试剂盒 (货号: ZR102)、qPCR 试剂盒 (货号: ZF201) 购买自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 引物合成及 shRNA-BCLAF1 载体构建由自上海吉凯基因技术有限公司完成; 转染试剂 Lipofectamine 2000 (货号: 11668019) 购买自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; RPMI 1640 细胞培养基 (货号: 31800022)、胰蛋白酶 (货号: 25200056) 购买自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (货号: 04-001-1ACS) 购买自以色列 BI 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: 20201ES76) 购买自上海翊圣生物科技有限公司; 兔抗人 BCLAF1 (货号: 26809-1-AP)、PI3K (货号: 67071-1-Ig)、p-PI3K (货号: 60225-1-Ig)、Akt (货号: 60203-2-Ig)、p-Akt (货号: 66444-1-Ig)、 β -actin (货号: 66009-1-Ig) 单抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 二抗 (货号: 10285-1-AP) 购买自美国 Proteintech Group 公司; MTT 检测试剂盒 (货号: ZY2050-500T) 购买自上海泽叶生物技术公司; Transwell 小室 (货号: 3421) 购买自美国 Corning 公司; 索拉非尼 (货号: Y0002098) 购买自美国 sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与脂质体转染 取出冻存的 SMMC-7221 细胞, 置于 37 °C 水浴条件下融化, 冻存液部分溶解时取出, 在无菌操作台下吸取冻存液加入完全培养基混匀后离心去上清液, 加入适量添加有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 浓度条件下恒温培养。观察培养细胞生长到合适状态后, 按照空白对照组、shRNA-NC (阴性对照) 组、shRNA-BCLAF1 组分别进行转染, 在聚苯乙稀管中制备 A 液: 0.8 μ g DNA (空白对照组无 DNA; shRNA-NC 组为 shRNA-NC 载体; F: 5'-GAAACACAGACGGAGGGAA-3', R: 5'-TTCCCTC-CGTCTGTGTTTC-3'; shRNA-BCLAF1 组为 shRNA-BCLAF1 载体; F: 5'-GAAGGACAGACGCAAGGAA-3', R: 5'-TTCCTTGCGTCTGTCTTTC-3', 靶向 BCLAF1 基因编码序列 2733-2751bp) 稀释于 50 μ L 无血清无抗生素的培养液中, B 液: 2 μ L Lipofectamine 2000 稀释于 50 μ L 无血清无抗生素的培养液中, 轻轻混合 A、B 液, 室温中置 10 ~ 15 min; 吸去 SMMC-7221 细胞培养孔的培养基, 用无血清培养基清洗细胞两次; 将混合后的 A、B 液加入培养孔, 前后摇动培养板使其分布均匀; 将细胞放入培养箱孵育 4 ~ 6 h 后, 可以更换含血清培养基, 培养 24 ~ 48 h 后可以观察转入基因表达情况。

1.2.2 qPCR 鉴定干扰效果 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取各组 SMMC-7221 细胞 RNA, 使用反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA, 按照 qPCR 试剂盒说明书配置反应体系进行 qPCR, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法以 β -actin 作为内参计算 BCLAF1 mRNA 的相对表达量。BCLAF1: F: 5'-AAGGTCTGGTCTGGTCTG-3', R: 5'-GAGCATTCTGTGTTGCGATT-3', 扩增片段大小 122bp; β -actin: F: 5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3', R: 5'-CTAAGTCATAGTCCGCTAGAA-3', 扩增片段大小 185 bp。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.3 Western blot 鉴定干扰效果 提取各组 SMMC-7221 细胞蛋白, 使用 PBS 冲洗细胞, 加入 0.25% 胰蛋白酶进行消化处理 3 ~ 5 min, 用完全培养基终止消化反应, 重悬细胞后用 PBS 清洗两次, 离心弃上清。加入 50 μ L 细胞裂解液, 冰浴条件下超声粉碎细胞 10 s, 重复 3 次, 离心收集上清液。按照 BCA 法使用试剂盒测定蛋白质浓度; 根据测量浓度加入相应体积的待测样品于 SDS-PAGE 凝胶中, 以 25 mA 恒定电流电泳 1 ~ 2 h; 将凝胶转印到 PVDF 膜上, 浸入封闭液中 2 h, 用 TBST 清洗膜 3 次, 3 min/次; 加入适当比例稀释的 BCLAF1 蛋白一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗膜 3 次; 加入对应浓

度二抗,室温孵育 2 h, TBST 清洗膜 3 次;避光加入 ECL 发光染色,使用凝胶成像仪进行成像分析。采用 TotalLab2.0 进行灰度分析,以 β -actin 作为内参,计算蛋白的相对表达量,其相对表达水平用目的蛋白条带灰度与内参蛋白条带灰度的比率表示。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖活性 取对数生长期且生长状态良好的上述各组 SMMC-7221 细胞进行传代培养,计数后以 5×10^3 个细胞每孔接种 $100 \mu\text{L}$ 于 96 孔板,培养 48 h 后取出培养细胞,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT 溶液培养 4 h,去除培养基加入 $150 \mu\text{L}$ DM-SO 溶液,摇床震荡 10 min,置于酶标仪(美国 Molecular Devices, SpectraMax iD)在 570 nm 波长下测量各孔吸光度值,增殖率 = 各组吸光度值/空白对照组吸光度值。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.5 Transwell 检测细胞侵袭能力 分别将各组 SMMC-7221 细胞以 1×10^5 个细胞每孔接种 $200 \mu\text{L}$ 于 Transwell 上腔中,同时加入 $500 \mu\text{L}$ 含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,培养 24 h。24 h 后,吸取 Transwell 上腔多余液体, PBS 清洗 3 次。棉棒在上腔内轻轻旋转以吸去残留水分,加入结晶紫染料。5 min 后,用自来水缓慢缓冲去除染料溶液。显微镜下观察透膜细胞数,随机取 $400 \times$ 显微镜视野 5 个,侵袭率 = 各组透膜细胞数/空白对照组透膜细胞数 $\times 100\%$ 。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期且生长状态良好的上述各组 SMMC-7221 细胞以 1×10^6 个细胞每孔接种 $100 \mu\text{L}$ 于 6 孔板中,培养至融合率达到 95% 后,使用无菌枪头尖端垂直于培养皿表面进行划痕, PBS 冲洗悬浮细胞,更换新鲜培养基。分别于划痕即刻及划痕培养 48 h 后置于显微镜下观察拍照,采用 Image J 2.1.4.7 对图片进行分析,根据公式:细胞迁移率 = (划痕即刻划痕宽度 - 培养 48 h 后划痕宽度)/划痕即刻划痕宽度 $\times 100\%$ 进行计算。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.7 耐药性检测实验 取对数生长期且生长状态良好的各组 SMMC-7221 细胞进行传代培养,计数后以 5×10^3 个细胞每孔接种于 96 孔板,分别加入添加有浓度分别为 0、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉非尼的新鲜培养基。培养 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞增殖活性,方法同 1.2.4,在 570 nm 波长下测量各孔吸光度值,根据公式:细胞活性(%) = 各组各浓度索拉非尼培养条件下吸光度值/各组 0 $\mu\text{mol/L}$ 的索拉非尼培养条件下吸光度值 $\times 100\%$ 计算细胞活性。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.2.8 Western blot 法检测 PI3K、p-PI3K、Akt、p-

Akt 蛋白表达水平 取 1.2.7 中 16 $\mu\text{mol/L}$ 索拉非尼处理各组 SMMC-7221 细胞,抽提蛋白,按照 1.2.3 种方法测定各组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平。每组 SMMC-7221 细胞重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析与处理。计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA 敲除 BCLAF1 基因表达效果比较

qPCR 结果显示,空白对照组 BCLAF1 基因相对表达量为 (1.061 ± 0.042) 与 shRNA-NC 组 (0.982 ± 0.034) 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 BCLAF1 基因相对表达量为 (0.428 ± 0.038) 低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示,空白对照组 BCLAF1 蛋白相对表达量 (0.978 ± 0.061) 与 shRNA-NC 组 (0.991 ± 0.032) 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 BCLAF1 蛋白相对表达量 (0.346 ± 0.045) 低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 1。

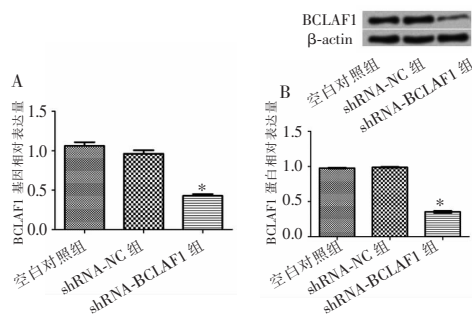


图 1 shRNA 敲除 BCLAF1 基因 mRNA 和蛋白表达效果

A. qPCR 检测各组 SMMC-7221 细胞 BCLAF1 基因 mRNA 相对表达量; B. Western blot 检测各组 SMMC-7221 细胞 BCLAF1 蛋白表达。* $P < 0.05$, 与 shRNA-NC 组相比。

2.2 各组 SMMC-7221 细胞增殖活性比较

MTT 法检测结果显示,空白对照组 SMMC-7221 细胞增殖率为 $(100.0 \pm 0.00)\%$, 与 shRNA-NC 组 $(98.26 \pm 0.71)\%$ 比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞增殖率为 $(64.48 \pm 1.34)\%$, 低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组 SMMC-7221 细胞侵袭能力比较

Transwell 检测结果显示,空白对照组 SMMC-7221 细胞侵袭率为 $(100.0 \pm 0.00)\%$, 与 shRNA-NC

组(98.25 ± 2.51)% 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞侵袭率为 (34.59 ± 2.27)%, 低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 3。

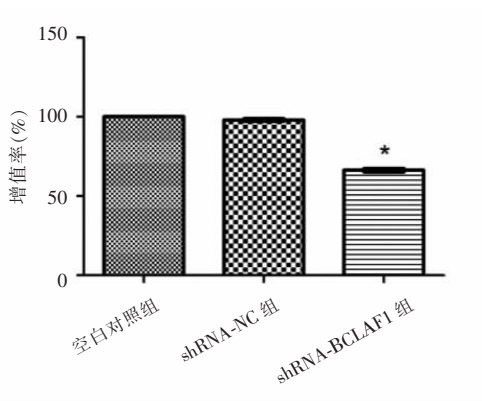


图 2 各组 SMMC-7221 细胞增殖率
* $P < 0.05$, 与 shRNA-NC 组相比

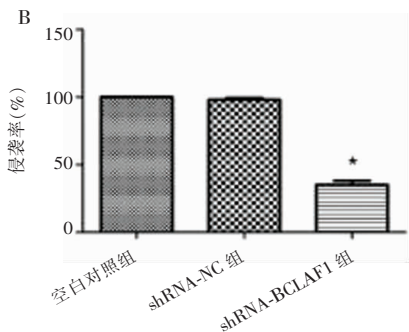
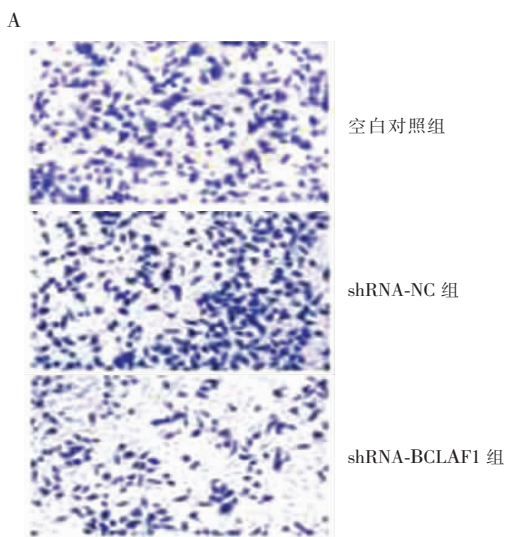


图 3 各组 SMMC-7221 细胞侵袭能力

* $P < 0.05$, 与 shRNA-NC 组相比; A. 各组 SMMC-7221 细胞侵袭能力(100 \times); B. 各组 SMMC-7221 细胞侵袭率。

2.4 各组 SMMC-7221 细胞迁移能力比较

划痕实验结果显示, 空白对照组 SMMC-7221 细胞迁移率为 (84.61 ± 2.12)% 与 shRNA-NC 组 (86.22 ± 1.41)% 比较, 差异无统计学意义 ($P >$

0.05), shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞迁移率 (34.59 ± 1.62)%, 低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组 SMMC-7221 细胞耐药性比较

MTT 法检测结果显示, 空白对照组各浓度索拉非尼处理条件下 SMMC-7221 细胞活性与 shRNA-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组各浓度索拉非尼处理条件下 SMMC-7221 细胞活性低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 5。

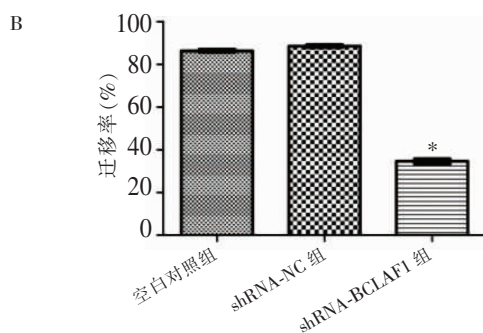
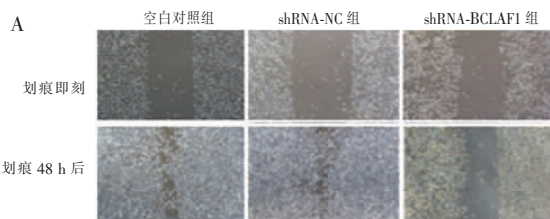


图 4 各组 SMMC-7221 细胞迁移能力

A. 各组 SMMC-7221 细胞迁移能力(40 \times); B. 各组 SMMC-7221 细胞迁移率。* $P < 0.05$, 与 shRNA-NC 组相比。

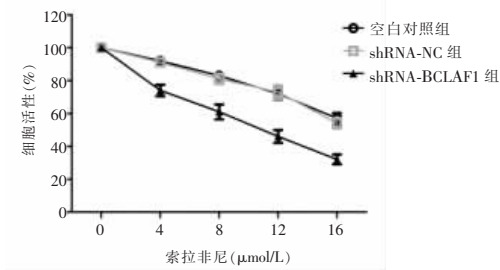


图 5 各组 SMMC-7221 细胞耐药性

2.6 各组索拉非尼处理后 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达情况比较

Western blot 结果显示, 各组 PI3K、Akt 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 空白对照组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比率与 shRNA-NC 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); shRNA-BCLAF1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比率低于空白对照组及 shRNA-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 6。

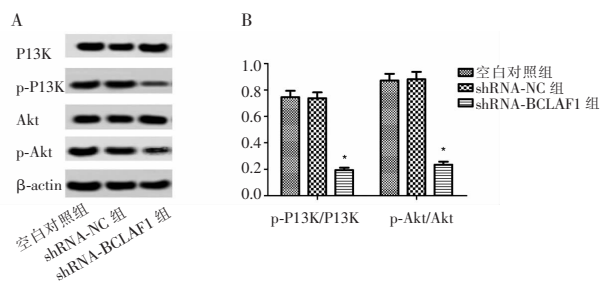


图6 各组索拉非尼处理后 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达情况

A. 各组 SMMC-7221 细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达；
B. 各组 SMMC-7221 细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比率。* $P < 0.05$, 与 shRNA-NC 组相比。

3 讨论

HCC 预后持续不良的原因之一是大部分病例诊断已到晚期,缺乏有效的治疗方案。尽管对多种化疗和靶向治疗药物进行了评估,但对晚期 HCC 疾病唯一被证实的治疗方法是索拉非尼,而且总体生存益处不大。因此,探索 HCC 发展机制、寻找可能的治疗靶点有助于改善 HCC 预后。

BCLAF1 最初被鉴定为腺病毒 E1B19K (BCL-2 的同系物) 的蛋白质伴侣。BCLAF1 参与对 BCL-2 的调控,通过与抗凋亡蛋白(如 BCL-2)结合而引起凋亡。然而,其功能仍然令人迷惑,因为在缺乏 BCLAF1 的小鼠细胞中未观察到明显的细胞凋亡缺陷。此外,BCLAF1 可通过拮抗 fbeclin-1 和 BCL-2 的相互作用诱导自噬^[8]。最近发现 BCLAF1 与几种人类恶性肿瘤有关。BCLAF1 在胰腺导管腺癌、结肠直肠癌和膀胱癌中上调,并促进肿瘤进展^[9-10]。BCLAF1 在 HCC 中的临床意义和功能尚不清楚。Zhou 等^[11] 证明 BCLAF1 在 HCC 中经常上调,BCLAF1 的上调与 Edmondson 分级、较低的总生存率和不良预后有关,表明 BCLAF1 作为癌基因可能参与 HCC 发展。为明确 BCLAF1 对 HCC 的作用,本研究通过观察敲低 BCLAF1 后对肝癌 SMMC-7221 细胞的影响,探讨 BCLAF1 在 HCC 中的功能。qPCR 和 Western blot 结果显示,shRNA-BCLAF1 组 BCLAF1 基因、蛋白相对表达量降低($P < 0.05$),证明干扰因素明显抑制 BCLAF1 表达。MTT 法检测结果表明,shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞增殖能力低于空白对照组及 shRNA-NC 组($P < 0.05$);Transwell 检测结果表明,shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞侵袭能力低于空白对照组及 shRNA-NC 组($P < 0.05$);划痕实验结果表明,shRNA-BCLAF1 组 SMMC-7221 细胞迁移能力低于空白对照组及 shRNA-NC 组($P < 0.05$),与既往研究一致,表明 SMMC-7221 细胞在敲低 BCLAF1 基因表达后,增

殖、侵袭及迁移能力受到抑制,提示 BCLAF1 在 HCC 中能促进细胞增殖、侵袭及迁移。Mou 等^[12] 报道,BCLAF1 可与 lncNEAT1 启动子直接相互作用并促进 lncNEAT1 (一种转录调节因子,有助于形成易于癌变的转录组,促进肿瘤发生和发展)表达,证明 BCLAF1 通过靶向 lncRNA NEAT1 促进肝癌细胞增殖和侵袭;Shao 等^[4] 报道 BCLAF1 可在缺氧条件下结合 HIF-1 α ,维持长期缺氧条件下 HIF-1 α 活性,促进肿瘤进展。恶性肿瘤较强的增殖及侵袭能力是其发展与转移的关键,提示 BCLAF1 可作为抑制 HCC 发展与转移的靶点在 HCC 治疗中起作用。

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,通过抑制丝氨酸-苏氨酸激酶 BRAF 和 CRAF、受体酪氨酸激酶、血管内皮生长因子受体 (VEGFRs) 和血小板源性生长因子受体 (PDGFR- β),表现出促凋亡和抑制血管生成作用进而抑制 HCC 增殖发展^[13]。迄今为止,索拉非尼仍是 FDA 批准的唯一治疗不能切除的晚期 HCC 的全身药物。然而,肝癌患者对索拉非尼的获得性耐药是一种普遍现象,限制了其临床应用^[14]。Yu 等^[15] 采用 Kaplan-Meier 生存法分析 HCC 中 BCLAF1 与索拉非尼耐药的相关性,表明高表达水平 BCLAF1 可能导致 HCC 患者对索拉非尼耐药。在本研究中,shRNA-BCLAF1 组各浓度索拉非尼处理条件下 SMMC-7221 细胞活性降低($P < 0.05$),提示敲低 BCLAF1 能增强 HCC 细胞对索拉非尼的敏感性,BCLAF1 能介导 HCC 对索拉非尼耐药,与前人研究一致。

PI3K / Akt 通路是人体内至关重要的信号转导途径之一,参与正常的细胞过程,例如细胞存活、增殖和凋亡以及许多生理过程^[16]。然而,这种信号的异常激活已在包括 HCC 在内的人类癌症中广泛报道^[17]。此外,许多研究报告称,PI3K/Akt 信号的异常激活在对索拉非尼的耐药性发展中起关键作用,抑制该途径可提高索拉非尼在多种人类恶性肿瘤中的功效^[18]。最近的研究还发现,PI3K/Akt 通路抑制剂联合索拉非尼表现出强大的抗 HCC 效应,并与抑制 PI3K 及 Akt 磷酸化有关^[19]。在本研究中,索拉非尼处理后,shRNA-BCLAF1 组 p-PI3K、p-Akt 水平降低($P < 0.05$),表明敲低 BCLAF1 能通过抑制 PI3K / Akt 通路降低 HCC 对索拉非尼耐药性,提示 BCLAF1 可能通过激活 PI3K/Akt 通路介导索拉非尼耐药,可将 BCLAF1 作为纠正 HCC 索拉非尼耐药的靶点进一步研究以为临床服务。

综上,敲低 BCLAF1 能抑制肝癌 SMMC-7221 细胞增殖、侵袭及迁移能力,并降低对索拉非尼的耐药性,机制可能与抑制 PI3K/Akt 通路有关,但

BCLAF1 在 HCC 发展中的具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sim HW, Knox J. Hepatocellular carcinoma in the era of immunotherapy[J]. *Curr Probl Cancer*, 2018, 42(1): 40-48.
- [2] Wong MC, Jiang JY, Goggins WB, et al. International incidence and mortality trends of liver cancer: a global profile[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 45846.
- [3] Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-Based Diagnosis, Staging, and Treatment of Patients With Hepatocellular Carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(4): 835-853.
- [4] Shao A, Lang Y, Wang M, et al. Bclaf1 is a direct target of HIF-1 and critically regulates the stability of HIF-1 α under hypoxia[J]. *Oncogene*, 2020, 39(13): 2807-2818.
- [5] Shao AW, Sun H, Geng Y, et al. Belaf1 is an important NF- κ B signaling transducer and C/EBP β regulator in DNA damage-induced senescence[J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(5): 865-875.
- [6] Vohhodina J, Barros EM, Savage AL, et al. The RNA processing factors THRAP3 and BCLAF1 promote the DNA damage response through selective mRNA splicing and nuclear export[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(22): 12816-12833.
- [7] Zhou X, Li X, Cheng Y, et al. BCLAF1 and its splicing regulator SRSF10 regulate the tumorigenic potential of colon cancer cells [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 4581.
- [8] Lamy L, Ngo VN, Emre NCT, et al. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(4): 435-449.
- [9] Brown GT, Cash B, Alnabulsi A, et al. The expression and prognostic significance of bcl-2-associated transcription factor 1 in rectal cancer following neoadjuvant therapy[J]. *Histopathology*, 2016, 68(4): 556-566.
- [10] Shen B, Tan M, Mu X, et al. Upregulated SMYD3 promotes bladder cancer progression by targeting BCLAF1 and activating autophagy [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7371-7381.
- [11] Zhou X, Wen Y, Tian Y, et al. Heat Shock Protein 90 α -Dependent B-Cell-2-Associated Transcription Factor 1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Proliferation by Regulating MYC Proto-Oncogene c-MYC mRNA Stability[J]. *Hepatology*, 2019, 69(4): 1564-1581.
- [12] Mou SJ, Yang PF, Liu YP, et al. BCLAF1 promotes cell proliferation, invasion and drug-resistance through targeting lncRNA NEAT1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117177.
- [13] Li H, Yang C, Shi Y, et al. Exosomes derived from siRNA against GRP78 modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells suppress Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 103.
- [14] Liang C, Dong Z, Cai X, et al. Hypoxia induces sorafenib resistance mediated by autophagy via activating FOXO3a in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11): 1017.
- [15] Yu S, Wang X, Dou N, et al. B-cell lymphoma-2-associated transcription factor 1 is overexpressed and contributes to sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol Res*, 2019, 49(11): 1329-1340.
- [16] Schaefer T, Steiner R, Lengerke C. SOX2 and p53 Expression Control Converges in PI3K/AKT Signaling with Versatile Implications for Stemness and Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4902.
- [17] Liu L, Chen JG, Cao M, et al. NO donor inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting PI3K/AKT/mTOR and MEK/ERK pathways in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(6): 1303-1314.
- [18] Wang J, Ma S, Chen X, et al. The novel PI3K inhibitor S1 synergizes with sorafenib in non-small cell lung cancer cells involving the Akt-S6 signaling [J]. *Invest New Drugs*, 2019, 37(5): 828-836.
- [19] Li A, Zhang R, Zhang Y, et al. BEZ235 increases sorafenib inhibition of hepatocellular carcinoma cells by suppressing the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5573-5585.

(收稿日期: 2021-08-06

修回日期: 2021-10-02)