

超氧化物歧化酶抑制 AFP 表达对肝癌细胞 PLC/PRF/5 恶性生物学行为的影响^Δ

陈 移^{1,2,3*}, 陈宝莹², 周育丽^{2,3}, 徐海霞⁴, 曹 钰², 谷 悦², 朱明月^{1,2,3}, 李孟森^{1,2,3#}(1. 热带转化医学教育部重点实验室, 海口 571199; 2. 海南医科大学基础医学与生命科学学院, 海口 571199; 3. 海南省肿瘤发生和干预重点实验室, 海口 571199; 4. 海南医科大学第一附属医院脊柱外科, 海口 570102)

中图分类号 R915;R363 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)17-2120-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.17.07



摘要 目的 探索超氧化物歧化酶(SOD)给药对肝癌细胞PLC/PRF/5恶性生物学行为的影响,并分析SOD与甲胎蛋白(AFP)表达量的相关性,以期将SOD作为肝细胞癌用靶药向至AFP提供新思路。**方法** 以人正常肝细胞L-02、AFP表达阴性的人肝癌细胞HLE、AFP表达阳性的人肝癌细胞PLC/PRF/5为实验细胞。采用Western blot法和SOD活性检测试剂盒检测改变AFP表达前后L-02、HLE、PLC/PRF/5细胞中的AFP和SOD表达及SOD活性;采用细胞划痕实验和CCK-8实验检测不同浓度SOD[0(对照)、0.188、0.375、0.75、1.5、3 U/mL]给药对PLC/PRF/5细胞迁移和增殖的影响;采用Western blot法检测上调SOD表达对PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为相关蛋白AFP、肉瘤病毒蛋白(Src)表达的影响。**结果** 与L-02组和HLE组比较,PLC/PRF/5组细胞中的SOD1、SOD2表达量以及SOD活性均显著降低($P<0.05$)。下调PLC/PRF/5细胞中的AFP表达后,与PLC/PRF/5组比较,PLC/PRF/5-shAFP组(即低表达)细胞中的SOD1、SOD2表达量以及SOD活性均显著升高($P<0.05$)。SOD作用48 h时,与对照组比较,0.375、0.75、1.5、3 U/mL SOD组的PLC/PRF/5细胞划痕愈合率均显著降低($P<0.05$);SOD作用72 h时,与对照组比较,0.375、0.75、1.5 U/mL SOD组的PLC/PRF/5细胞划痕愈合率显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组比较,0.375、0.75、1.5、3 U/mL SOD组的PLC/PRF/5细胞增殖率显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与上调SOD1、SOD2表达前的PLC/PRF/5组比较,PLC/PRF/5-oeSOD1组和PLC/PRF/5-oeSOD2组(即过表达)细胞中的AFP、Src表达量均显著降低($P<0.05$)。**结论** 一定浓度的SOD可抑制PLC/PRF/5细胞的迁移和增殖等恶性行为,SOD的表达量和活性与AFP呈负相关。

关键词 超氧化物歧化酶;甲胎蛋白;肝细胞癌;恶性生物学行为;抗癌药物

Effects of superoxide dismutase inhibition of AFP expression on the malignant biological behavior of PLC/PRF/5 liver cancer cells

CHEN Yi^{1,2,3}, CHEN Baoying², ZHOU Yuli^{2,3}, XU Haixia⁴, CAO Yu², GU Yue², ZHU Mingyue^{1,2,3}, LI Mengsen^{1,2,3}(1. Key Laboratory of Tropical Translational Medicine of Ministry of Education, Haikou 571199, China; 2. School of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 3. Hainan Provincial Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention, Haikou 571199, China; 4. Dept. of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect of superoxide dismutase (SOD) administration on the malignant behavior of PLC/PRF/5 liver cancer cells, and analyze the correlation between SOD and alpha-fetoprotein (AFP) expression, to provide new ideas for targeting AFP with SOD as a drug for hepatocellular carcinoma. **METHODS** Normal human liver cells L-02, AFP-negative human liver cancer cells HLE, and AFP-positive human liver cancer cells PLC/PRF/5 were used as experimental cells. Western blot assay and SOD activity detection kit were used to detect the expression of AFP, SOD and activity of SOD in cells before and after changing AFP expression; the effects of different concentrations of SOD [0 (control), 0.188, 0.375, 0.75, 1.5, 3 U/mL] administration on the migration and proliferation of PLC/PRF/5 cells were detected using cell scratch assay and CCK-8

Δ 基金项目 国家自然科学基金-地区科学基金项目(No.82460602); 海南省自然科学基金项目(No.822RC710); 海南省科协青年科技英才学术创新计划项目(No.QCXM201922); 海南医科大学大学生创新创业训练计划项目(No.X202411810104)

* 第一作者 副研究员, 硕士生导师。研究方向: 肿瘤发生与干预的分子机制、药物干预肿瘤的分子机制。E-mail: cheniyi@muhn.edu.cn

通信作者 研究员, 博士生导师, 博士。研究方向: 肿瘤发生与干预的分子机制、肿瘤药物的作用机制。E-mail: mengsenli@163.com

assay. The effects of SOD overexpression on the expression of malignant biological behavior-related proteins AFP and sarcoma virus protein (Src) in PLC/PRF/5 cells were detected using Western blot. **RESULTS** Compared with L-02 group and HLE group, the expression levels of SOD1 and SOD2, and SOD activity in PLC/PRF/5 cells were significantly reduced ($P<0.05$). After down-regulating AFP expression in PLC/PRF/5 cells, compared with PLC/PRF/5 group, the expression

levels of SOD1 and SOD2, as well as SOD activity, were significantly increased in the PLC/PRF/5-shAFP group (low-expression) ($P<0.05$). After 48 hours of SOD treatment, compared with control group, the scratch healing rates of PLC/PRF/5 cells in the 0.375, 0.75, 1.5 and 3 U/mL SOD groups were significantly reduced ($P<0.05$); after 72 hours of SOD treatment, compared with control group, the scratch healing rates of PLC/PRF/5 cells in the 0.375, 0.75, and 1.5 U/mL SOD groups were significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with control group, proliferation rates of PLC/PRF/5 cells were significantly reduced in the 0.375, 0.75, 1.5 and 3 U/mL SOD groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the PLC/PRF/5 group before up-regulating SOD1 and SOD2 expression, the expression levels of AFP and Src in the PLC/PRF/5-oeSOD1 and PLC/PRF/5-oeSOD2 groups (over-expression) after up-regulating SOD1 and SOD2 expression were significantly reduced ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** A certain concentration of SOD can inhibit malignant behavior such as migration and proliferation of PLC/PRF/5 cells, and the expression level and activity of SOD are negatively correlated with AFP.

KEYWORDS superoxide dismutase; alpha fetoprotein; hepatocellular carcinoma; malignant behavior; anti-cancer drugs

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是维持机体活性氧(reactive oxygen species, ROS)动态平衡的主要抗氧化物,可催化超氧化物转化为 H_2O 和 O_2 ,消耗过量的ROS^[1-3]。在自然状态下,ROS和抗氧化物维持动态平衡,但在发生氧化应激时,大量ROS的产生或滞留可致DNA过度损伤,进而导致癌症发生^[2-3]。因此SOD被认为具有抗炎、抗肿瘤及免疫调控等功能,在化妆品、医学等领域得以广泛应用。研究显示,SOD可作为保健品的主要成分改善身体机能,在化妆品中添加SOD也被验证是安全、无毒副作用的,SOD还可作为靶向消炎药物使用^[4-6]。此外,国内外学者在SOD预防和治疗心脑血管疾病、自身免疫疾病以及肿瘤的研究方面也取得了一定进展,其中Lee等^[7]研究以多细胞球体作为实体瘤模型发现SOD具有抗肿瘤效果,Wang等^[8]研究显示SOD2过表达能够抑制肝癌细胞的转移,还有多项动物实验证实外源SOD单独或联合使用可用于治疗肠损伤^[9]、肾损伤^[10]、肺损伤^[11]及多种癌症的治疗^[12-13]。然而,在分子机制层面尚无确凿的证据表明通过服用抗氧化物能够降低癌症的发病率或抑制肿瘤的恶化程度。

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)是全球高发的消化系统恶性肿瘤,我国2022年的PLC新发病例数和病死人数分别为36.765 7万和31.654 4万,分别位于我国恶性肿瘤新发病例数和病死人数的第4位和第2位^[10,12]。值得注意的是,我国人口约占全球人口的17.4%,而PLC新发病例数和病死人数占全球恶性肿瘤新发病例数和病死人数的42.45%和40.14%^[14-17]。因此,我国构建完善的PLC防控、诊断和治疗体系尤为必要。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为PLC中最常见的病理类型,是目前PLC预防和治疗的主要研究对象。

本课题组前期研究显示,甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)作为HCC的临床诊断血清指标,已被证实具有诱导肝细胞恶性转化并促进肝癌细胞恶性行为的作用;而SOD在人正常肝细胞L-02和AFP表达阴性的人肝癌细胞HLE中的表达量相当,在AFP表达阳性的人肝癌细胞PLC/PRF/5中的表达降低,提示SOD可能

与AFP表达阳性的肝癌细胞的恶性行为有关^[18-19]。本研究以AFP表达阳性的人肝癌细胞PLC/PRF/5为主要研究对象,探索SOD给药对PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为的影响,并分析SOD与AFP表达量的相关性,以期将为SOD开发为靶向AFP的抗HCC用药提供新思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括IMS-100型制冰机(南京贝登医疗股份有限公司)、Centrifuge 5417R型离心机(德国Eppendorf公司)、hh-2型数显恒温水浴锅(上海力辰邦西仪器科技有限公司)、PowerPac型电泳仪(美国Bio-Rad公司)、Orbital Shake TS-1和TS-2型脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)、SPRING-R20(i+)型纯水系统(广州誉维生物科技仪器有限公司)、ZWY-103B和ZWY-100D型恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)、IX 81型荧光共聚焦显微镜(日本Olympus公司)、Epoch型全波长酶标仪(美国Bio Tek公司)、Tanon 5200 Multi型化学发光成像仪(上海天能生命科学有限公司)、Cryosystem 2000型液氮罐(美国Chart-MVE公司)、UNIVERSAL 320型台式离心机(德国Hettich公司)、LABSELECT 13112A型细胞培养瓶(北京兰杰柯科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

SOD、抗 β -肌动蛋白(β -actin)小鼠单克隆抗体、QuickBlock™ Western二抗稀释液、QuickBlock™ Western一抗稀释液、胰酶细胞消化液(批号分别为S0088、AF0003、P0258-100 ml、P0256-100 ml、C0203-100 ml)均购自上海碧云天生物技术有限公司;高糖DMEM培养基、青霉素-链霉素溶液(批号分别为PM150210、PB180120)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;免疫染色封闭液、动物全蛋白提取试剂盒、Bradford法蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8试剂、Bis-Tris预制胶(4%~12%, 15孔)、快速封闭液I、EZ-Buffers C 10×Western转膜液、SOD活性检测试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗、HRP标记的鼠抗兔IgG二抗、HRP标记的兔抗鼠IgG二抗、HRP标记的山羊抗鼠IgG二抗、

抗 AFP 小鼠单克隆抗体、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 小鼠单克隆抗体、抗 SOD1 小鼠单克隆抗体、抗 SOD2 小鼠单克隆抗体、嘌呤霉素盐酸盐 (批号分别为 E674004、C510003、C503031、E606335-0500、C691103-0001、C510053-0020、C520003-0001、D799593-0050、D110058-0025、D110065-0100、D110098-0100、D110087-0025、D199611-0100、D190090-0200、D199859-0100、D199597-0100、A610593-0025) 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 抗兔肉瘤病毒蛋白 (sarcoma virus protein, Src) 单克隆抗体 (批号 AB109381) 购自英国 Abcam 公司; 带有 ZsGreen 标签的干扰 AFP 表达的慢病毒 (滴度 2.0×10^8 TU/mL) 及其对照 (仅为带 ZsGreen 标签的慢病毒, 滴度 1.5×10^8 TU/mL) (批号分别为 HH20231109HKZX-LV01、HH20231109HKZX-NC) 均购自汉恒生物科技(上海)有限公司; 带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标签的过表达 AFP 的慢病毒 (滴度 2.5×10^9 TU/mL) 及其对照 (仅为带有 GFP 标签的慢病毒, 滴度 3.5×10^8 TU/mL) (批号分别为 LV-AFP22678-1、LV-CON335) 均购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; SOD1 过表达质粒 pENTER-SOD1 和 SOD2 过表达质粒 pENTER-SOD2 (批号分别为 NM000454、NM000636) 均购自美国 Vigene Biosciences 公司; ECL 化学发光底物试剂盒 (批号 BL520A) 购自合肥白鲨生物科技有限公司; PageRuler™ 预染蛋白分子量标准品、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (批号分别为 26616、3219327) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 胎牛血清 (批号 11011-8611) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 磷酸盐缓冲液为实验室自配。

1.3 实验细胞

人正常肝细胞 L-02 (AFP 表达阴性, 批号 SNL-141)、AFP 表达阴性的人肝癌细胞 HLE (批号 SNL-702) 均购自武汉尚恩生物技术有限公司, AFP 表达阳性的人肝癌细胞 PLC/PRF/5 (批号 TCHu119) 购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 分组与细胞培养

实验分为人正常肝细胞 L-02 组 (L-02 组)、AFP 表达阴性的人肝癌细胞 HLE 组 (HLE 组)、AFP 表达阳性的人肝癌细胞 PLC/PRF/5 组 (PLC/PRF/5 组)。将冻存于液氮中的 L-02、HLE、PLC/PRF/5 细胞于 37°C 水浴解冻后, 以 800 r/min 离心 5 min。吸弃上清液后, 用 1 mL 含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液的高糖 DMEM 培养基 (以下简称“完全培养基”) 重悬细胞, 移至细胞培养瓶后加完全培养基至 5 mL, 混匀后, 于 37°C 、饱和湿度、5% CO_2 培养箱中培养至细胞汇合率为 80%~90%。需传代或铺板操作的细胞用 1 mL 胰酶细胞消化液消化洗脱,

再用 2 倍体积的完全培养基终止消化, 得细胞悬液用于后续实验。

2.2 L-02、HLE、PLC/PRF/5 细胞中 AFP 和 SOD 表达及 SOD 活性检测

2.2.1 AFP 和 SOD 表达的检测

AFP、SOD 表达采用 Western blot 法检测。根据“2.1”项下方法进行分组和细胞培养。使用动物全蛋白提取试剂盒提取各组细胞全蛋白, 采用 Bradford 法检测全蛋白浓度, 用裂解液将不同细胞全蛋白浓度调整至同一水平后, 加入蛋白上样缓冲液, 并在 100°C 下将蛋白变性 10 min。使用 Bis-Tris 预制胶以 120 V 恒定电压进行电泳, 冰浴下以 150 mA 恒定电流进行转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 AFP、SOD1、SOD2 一抗 (稀释度均为 1:1 000), 4°C 摇床孵育过夜 (14~18 h); 加入二抗 (稀释度为 1:1 000), 37°C 摇床孵育 1 h; 于膜上滴加 ECL 化学发光底物试剂, 显影, 采用 Image J 软件进行分析, 以目标蛋白与内参蛋白 (β -actin) 条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。上述实验重复 3 次。

2.2.2 SOD 活性检测

根据“2.1”项下方法进行分组和细胞培养。每毫升提取液细胞用量为 5×10^6 个, 使用酶标仪测定 560 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 并计算 SOD 活性 (U/50 μg 总蛋白)。具体操作按照 SOD 活性检测试剂盒说明书进行。上述实验重复 3 次。

2.3 改变 AFP 表达后 L-02、HLE、PLC/PRF/5 细胞中 AFP 和 SOD 表达及 SOD 活性检测

采用慢病毒感染改变各细胞中 AFP 的表达。慢病毒感染前 18~24 h, 将处于对数生长期的 L-02、HLE 及 PLC/PRF/5 细胞以每孔 2.5×10^5 个接种于 6 孔板中, 次日细胞汇合率达 30%~40% 时即可进行慢病毒感染。L-02 和 HLE 细胞使用带有 GFP 标签的过表达 AFP 的慢病毒感染以上调 AFP 的表达 (L-02-oeAFP 组和 HLE-oeAFP 组), 并使用仅带有 GFP 标签的慢病毒作为对照以排除后续实验中慢病毒的干扰 (L-02-GFP 组和 HLE-GFP 组); PLC/PRF/5 细胞使用带有 ZsGreen 标签的干扰 AFP 表达的慢病毒以下调 AFP 的表达 (PLC/PRF/5-shAFP 组), 并使用仅带有 ZsGreen 标签的慢病毒作为对照以排除后续实验中慢病毒的干扰 (PLC/PRF/5-ZsGreen 组)。依据预实验测定的各细胞系最适感染复数 (multiplicity of infection, MOI), 按公式计算病毒体积: 病毒体积 (μL) = 细胞数 \times MOI/病毒滴度 (TU/mL) $\times 10^3$ 。其中, L-02 细胞的 MOI=5, HLE 细胞的 MOI=8, PLC/PRF/5 细胞的 MOI=10。弃去原培养基, 用磷酸盐缓冲液清洗 1 次, 加入各病毒混合液, 37°C 孵育 6 h 后补加等体积完全培养基。继续培养 48 h, 荧光显微镜下观察 ZsGreen 或 GFP 的绿色荧光阳性率, 确认感染效率 > 80%。感染 72 h 后, 更换含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素盐酸盐的

完全培养基,每2~3 d换液1次,持续筛选7~10 d,直至L-02-GFP组、HLE-GFP组、PLC/PRF/5-GFP组细胞全部死亡,检测AFP表达的改变情况以验证感染效率。当PLC/PRF/5-shAFP组细胞中的AFP表达量低于PLC/PRF/5组、PLC/PRF/5-ZsGreen组、L-02-oeAFP组、HLE-oeAFP组细胞中的AFP表达量分别高于L-02组和L-02-GFP组、HLE组和HLE-GFP组,表明AFP表达改变成功,抗性克隆继续扩大培养,建立稳定表达株。再以Western blot法(检测同“2.2.1”项下,以GAPDH为内参)检测各组细胞中SOD1、SOD2的表达,以SOD活性检测试剂盒(检测同“2.2.2”项下)检测各组细胞中的SOD活性。上述实验重复3次。

2.4 SOD 给药对 PLC/PRF/5 细胞恶性生物学行为影响的检测

2.4.1 细胞迁移能力检测

采用细胞划痕实验检测。取“2.1”项下处于对数生长期的PLC/PRF/5细胞,按照每孔 5×10^5 个接种于6孔板中,于细胞培养箱(37 °C, 10%CO₂)中培养至细胞汇合率大于90%,使用10 μL枪头沿孔底中线轻轻制造划痕;各孔分别加入终浓度为0(对照)、0.188、0.375、0.75、1.5、3 U/mL的SOD(浓度依据前期预实验结果得出,下同),每个给药浓度设置2个复孔,放置于细胞培养箱中,并于0、24、48、72 h时对划痕愈合情况进行拍照记录。使用Image J软件进行愈合面积分析并计算细胞划痕愈合率。细胞划痕愈合率(%)=(0 h时划痕面积-不同时间点划痕面积)/0 h时划痕面积 $\times 100\%$ 。上述实验重复3次。

2.4.2 细胞增殖能力检测

采用CCK-8实验检测。取“2.1”项下处于对数生长期的PLC/PRF/5细胞按照每孔 2×10^3 个接种于96孔板中,于细胞培养箱(37 °C, 10%CO₂)中培养至细胞汇合率约为60%;各孔分别加入终浓度为0(对照)、0.188、0.375、0.75、1.5、3 U/mL的SOD,每个给药浓度设置5个复孔,放置于细胞培养箱48 h后,每孔加入100 μL高糖DMEM培养基和10 μL CCK-8试剂。细胞培养箱孵育,从孵育后15 min开始,每15 min用酶标仪测定450 nm波长处的A值,根据A值最佳读值范围,选取各孔读值在0.6~1.0时间点的数值计算细胞增殖率(细胞增殖率= $A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}} \times 100\%$)。上述实验重复3次。

2.5 上调SOD表达后PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为相关蛋白AFP、Src表达的检测

采用瞬时表达质粒转染上调PLC/PRF/5细胞中的SOD表达。取“2.1”项下处于对数生长期的PLC/PRF/5细胞,按照每孔 2.5×10^5 个接种于6孔板中,每孔加入2 mL的完全培养基,置于37 °C、5%CO₂培养箱中培养18~24 h,至细胞汇合率为70%~90%即可进行瞬时表达质粒转染。PLC/PRF/5细胞使用SOD1过表达质粒pENTER-SOD1和SOD2过表达质粒pENTER-SOD2进

行转染以上调SOD1和SOD2的表达(PLC/PRF/5-oe-SOD1组和PLC/PRF/5-oeSOD2组),并使用质粒pENTER进行转染作为对照(PLC/PRF/5-pENTER组),该对照与目的质粒骨架完全一致,仅缺失SOD1/SOD2编码序列。管A按高糖DMEM培养基125 μL、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 7.50 μL配制转染复合物,管B按高糖DMEM培养基125 μL、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 3.75 μL配制转染复合物,将上述试剂轻柔混匀,室温孵育5 min。另取无菌微量离心管,配制DNA稀释液:质粒DNA 5 μg、高糖DMEM培养基250 μL、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent 10 μL,轻柔混匀后,室温孵育5 min。将DNA稀释液等体积分成2份,分别加入管A与管B中,轻轻混匀,室温静置10~15 min,形成DNA-脂质复合物。转染前,将6孔板中的培养基更换为每孔1.5 mL的完全培养基(含血清)。将上述2组DNA-脂质复合物分别均匀滴加至对应孔中,轻轻摇匀。将细胞置于37 °C、5%CO₂培养箱中继续培养。转染6 h后,可根据细胞状态更换为完全培养基;转染48~72 h后,收集细胞进行转染效率分析。当PLC/PRF/5-oeSOD1组的SOD1表达量和PLC/PRF/5-oeSOD2组的SOD2表达量均高于PLC/PRF/5组和PLC/PRF/5-pENTER组,表明PLC/PRF/5-oeSOD1组和PLC/PRF/5-oeSOD2组SOD表达上调成功。再采用Western blot法(检测同“2.2.1”项下,以β-actin为内参)检测上调SOD1、SOD2表达后细胞中恶性生物学行为相关蛋白AFP、Src的表达。上述实验重复3次。

2.6 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.5软件进行统计分析。计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

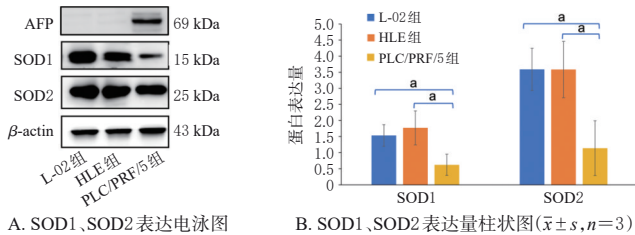
3.1 L-02、HLE、PLC/PRF/5 细胞中 SOD 表达及 SOD 活性检测结果

Western blot检测结果(图1)显示,与L-02组和HLE组比较,PLC/PRF/5组细胞中的SOD1、SOD2表达量均显著降低($P<0.05$)。此外,L-02组和HLE组中未检测出AFP,PLC/PRF/5组中有AFP表达。

SOD活性检测结果显示,PLC/PRF/5组细胞中的SOD活性[(0.05 \pm 0.01)U/50 μg总蛋白]较L-02组和HLE组细胞中的SOD活性[分别为(0.11 \pm 0.02)、(0.11 \pm 0.01)]U/50 μg总蛋白]显著降低($P<0.05$, $n=3$)。

3.2 改变 AFP 表达对 L-02、HLE、PLC/PRF/5 细胞中 SOD 表达及 SOD 活性的影响

Western blot检测结果(图2)显示,下调PLC/PRF/5细胞中的AFP表达后,与PLC/PRF/5组比较,PLC/PRF/



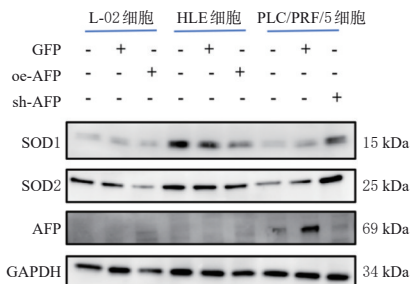
A. SOD1、SOD2 表达电泳图

a: 组间比较, $P < 0.05$ 。

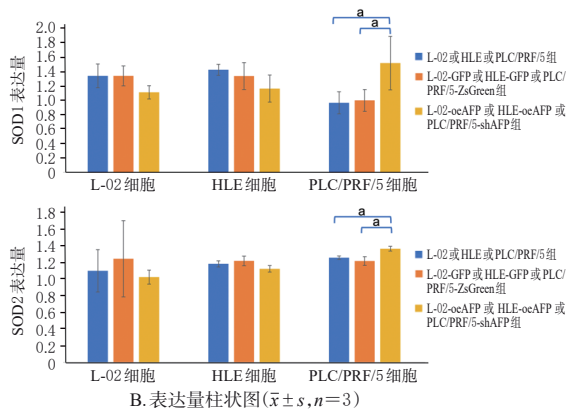
图1 L-02组、HLE组、PLC/PRF/5组细胞中的SOD表达情况

5-shAFP组细胞中的SOD1、SOD2表达量显著升高($P < 0.05$),但上调L-02和HLE细胞中的AFP表达后,L-02-oeAFP组和HLE-oeAFP组细胞中的SOD1、SOD2表达量并无显著变化($P > 0.05$)。

SOD活性检测结果(图3)显示,下调PLC/PRF/5细胞中的AFP表达后,PLC/PRF/5-shAFP组细胞中的SOD活性显著升高($P < 0.05$);值得注意的是,上调HLE细胞中的AFP表达后,HLE-oeAFP组细胞中的SOD活性显著降低($P < 0.05$)。



A. 电泳图



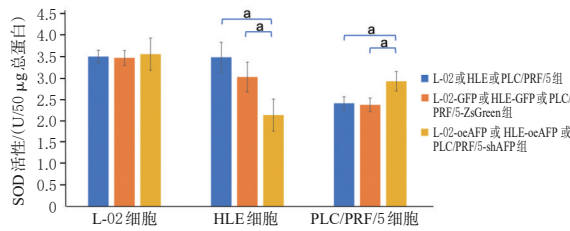
+、-: 分别表示慢病毒的有、无;a: 组间比较, $P < 0.05$ 。

图2 改变AFP表达对L-02、HLE、PLC/PRF/5细胞中SOD表达的影响

3.3 SOD给药对PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为的影响

3.3.1 对细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果(图4、图5)显示,与0 U/mL比较,0.375、0.75、1.5、3 U/mL SOD作用48 h时PLC/PRF/5细胞划痕愈合率显著降低($P < 0.05$);与0 U/mL比较,0.375、0.75、1.5 U/mL SOD作用72 h时PLC/PRF/5细胞



a: 组间比较, $P < 0.05$ 。

图3 改变AFP表达对L-02、HLE、PLC/PRF/5细胞中SOD活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

的划痕愈合率显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而3 U/mL的SOD处理对细胞迁移的抑制作用消失。

3.3.2 对细胞增殖能力的影响

CCK-8细胞增殖检测结果(图6)显示,与对照组比较,0.375、0.75、1.5、3.0 U/mL组的PLC/PRF/5细胞增殖率显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且SOD浓度在0.375~1.5 U/mL之间,PLC/PRF/5细胞增殖率有随SOD给药浓度升高而降低的趋势,而3 U/mL的SOD处理并没有使细胞增殖率继续下降。

3.4 上调SOD表达对PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为相关蛋白AFP、Src表达的影响

Western blot检测结果(图7)显示,与上调SOD1、SOD2表达前的PLC/PRF/5组比较,PLC/PRF/5-oeSOD1组和PLC/PRF/5-oeSOD2组细胞中的AFP、Src表达量均显著降低($P < 0.05$)。

4 讨论

ROS和抗氧化物在自然状态下维持动态平衡^[2-3]。而当发生氧化应激时,大量ROS的产生或滞留,与DNA反应造成DNA损伤^[20-21],进而导致癌症的发生。SOD家族是在进化中较为保守的一个酶家族,是消除细胞ROS的关键酶。在哺乳动物中,SOD家族有3个成员:SOD1在细胞质、细胞核和线粒体内膜上均有表达;SOD2仅被检测到位于线粒体基质中;SOD3则在细胞外表达。对临床血清样本检测的统计研究表明,许多癌症患者血清中的SOD mRNA或蛋白表达量均出现改变^[22-23]。其中,Zhang等^[24]在检测SOD表达量的同时,还检测了各组人群血清中的AFP表达量,结果显示,携带乙型肝炎病毒的肝癌患者血清中AFP表达量显著高于未携带乙型肝炎病毒的肝癌患者以及健康人,而两组患者血清中SOD的表达趋势与AFP相反,即该组试验人群血清中SOD和AFP表达量呈负相关。此外,Xu等^[23]研究显示,HCC患者血清中AFP表达量升高的同时,SOD活性呈下降趋势,该趋势与本研究对不同肝癌细胞中SOD表达量的检测结果一致,表明在肝癌患者的血清或癌组织以及在肝癌细胞中,SOD与AFP的表达呈负相关。

作为HCC的临床诊断指标,AFP具有诱导肝细胞恶

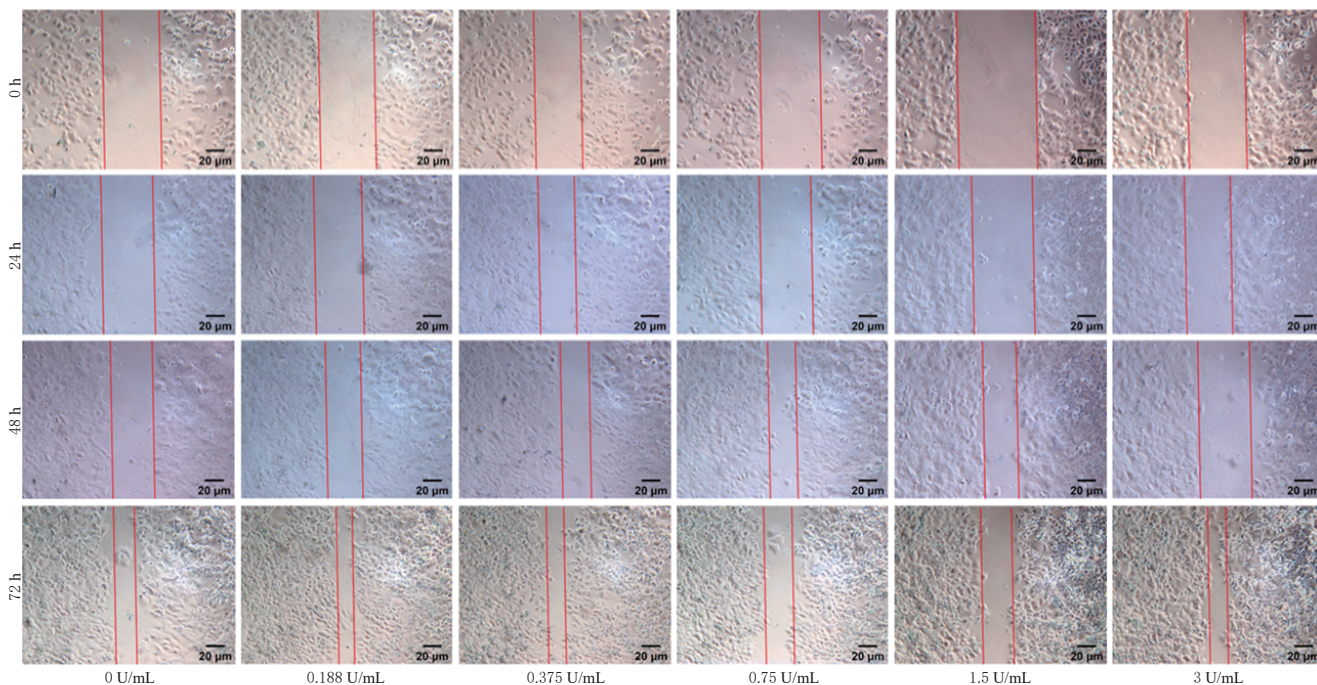
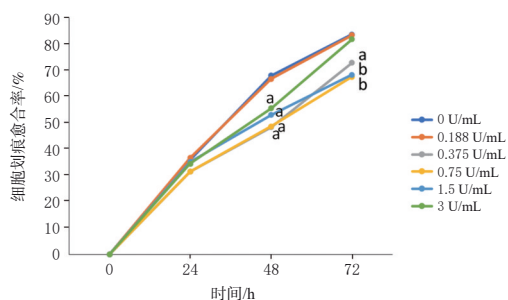
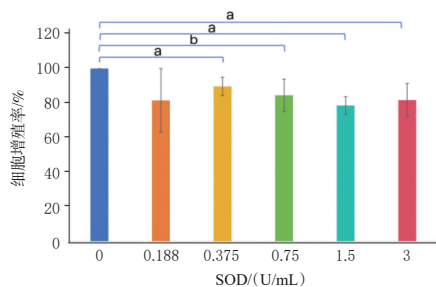


图4 PLC/PRF/5细胞划痕实验结果



a: 与0 U/mL比较, $P < 0.05$; b: 与0 U/mL比较, $P < 0.01$ 。

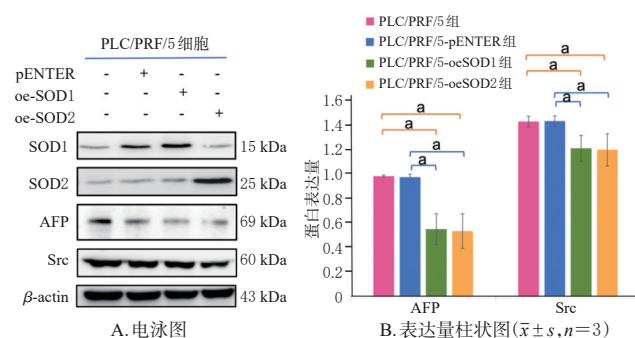
图5 不同浓度SOD给药不同时间的PLC/PRF/5细胞划痕愈合率折线图($\bar{x} \pm s, n = 6$)



a: 组间比较, $P < 0.01$; b: 组间比较, $P < 0.05$

图6 不同浓度SOD给药48 h的PLC/PRF/5细胞增殖率比较($\bar{x} \pm s, n = 15$)

性转化和促进肝癌细胞恶性生物学行为的作用^[3], 而SOD作为在线粒体内膜以及基质中存在的抗氧化物, 其表达量与AFP的负相关性对肝癌细胞PLC/PRF/5的恶性生物学行为有一定影响。本研究检测到SOD1、SOD2在PLC/PRF/5细胞中的表达量较其在L-02和HLE细胞中的表达量显著降低, 且在改变L-02、HLE、PLC/PRF/5细胞中AFP的表达后, SOD的表达量和活性也与AFP呈



+, - : 分别表示质粒的有、无; a: 组间比较, $P < 0.05$ 。

图7 上调SOD表达对PLC/PRF/5细胞恶性行为相关蛋白AFP、Src表达的影响

负相关, 提示肝癌细胞中SOD的表达可能受AFP的调控。

目前临床多将SOD作为癌症诊断的辅助指标, 也有少量动物实验显示外源SOD单独或联合使用对多种脏器损伤^[17-19]及多种癌细胞的恶性生物学行为^[13]有缓解或治疗效果。本研究以AFP表达阳性的肝癌细胞PLC/PRF/5为研究对象, 给予梯度浓度的SOD, 以期确定外源SOD对肝癌细胞恶性行为的影响, 进一步明确SOD与AFP在肝癌中的相关性。本研究细胞划痕实验、CCK-8实验、Western blot检测结果显示, 0.375、0.75、1.5 U/mL的SOD加药处理可抑制PLC/PRF/5细胞的迁移和增殖, 并降低PLC/PRF/5细胞恶性生物学行为相关蛋白AFP和Src的表达, 提示SOD可能对高表达AFP的HCC有治疗效果。然而在本研究细胞划痕实验中, 最高浓度(3 U/mL)的SOD对PLC/PRF/5细胞的迁移能力未见抑制作用, 可能与高浓度SOD给药使癌细胞从抗氧化剂中获益高于抑制作用有关^[25], 其具体机制和相关结论还需

要进一步的实验验证。

综上所述,一定浓度的SOD可抑制PLC/PRF/5细胞的迁移和增殖等恶性生物学行为,SOD的表达量和活性趋势与AFP呈负相关。

参考文献

- [1] CHANDEL N S, TUVESON D A. The promise and perils of antioxidants for cancer patients[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(2):177-178.
- [2] WANG J, HE W P, TSAI P J, et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Lipids Health Dis*, 2020, 19(1):72.
- [3] ELSHIBANI F A, ALAMAMI A D, MOHAMMED H A, et al. A multidisciplinary approach to the antioxidant and hepatoprotective activities of *Arbutus pavarii* Pampan fruit; *in vitro* and *in vivo* biological evaluations, and *in silico* investigations[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2024, 39(1):2293639.
- [4] 张前荣, 庄尹宏, 温庆放, 等. 丝瓜超氧化物歧化酶(SOD)酶学特性的研究[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(8):3383-3387.
- [5] INOUE T, MAJID T, QUICK A, et al. The role of SOD2 in a mouse model of multiple sclerosis[J]. *FASEB J*, 2012, 26(Suppl. 1):136.
- [6] 张海玲, 刘超, 程欲, 等. 超氧化物歧化酶重组酵母的构建及其发酵条件的优化[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(9):918-921.
- [7] LEE S Y, JEON H M, KIM C H, et al. CuZnSOD and MnSOD inhibit metabolic stress-induced necrosis and multicellular tumour spheroid growth[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(1):195-202.
- [8] WANG R, YIN C, LI X X, et al. Reduced SOD2 expression is associated with mortality of hepatocellular carcinoma patients in a mutant p53-dependent manner[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(6):1184-1200.
- [9] 胡钰萍, 杨少华. 宣木瓜SOD的提取优化及抗氧化性研究[J]. *食品工业*, 2024, 45(8):8-12.
- [10] ZHANG D F, WANG Y B, BI L P, et al. SOD mineralized zeolitic imidazole framework-8 for the treatment of chemotherapy-related acute kidney injury[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 229:113447.
- [11] PAN J R, SU Y, HOU X J, et al. Protective effect of recombinant protein SOD-TAT on radiation-induced lung injury in mice[J]. *Life Sci*, 2012, 91(3/4):89-93.
- [12] STRYCHARZ-DUDZIAK M, FOŁTYN S, DWORZAŃSKI J, et al. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in oropharyngeal cancer associated with EBV and HPV coinfection[J]. *Viruses*, 2020, 12(9):1008.
- [13] QIN Y, DAI W, WANG Y, et al. Fe-SOD cooperates with Nutlin3 to selectively inhibit cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(2):169-175.
- [14] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3):229-263.
- [15] WU W W, ZHANG R C, JIN Y M, et al. Cancer trends and risk factors in China over the past 30 years: 1990-2019[J]. *J Cancer*, 2023, 14(10):1935-1945.
- [16] 腾熠, 张晓丹, 夏长发, 等. 中国与全球癌症发病、死亡和患病对比及其预测分析: GLOBOCAN 2022 数据解读[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2024, 31(23):1413-1420.
- [17] 寻琛, 秦叔逵. 肝细胞癌辅助治疗研究进展和挑战[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2024, 29(9):904-913.
- [18] LI M S, ZHU M Y, LI W, et al. Alpha-fetoprotein receptor as an early indicator of HBx-driven hepatocarcinogenesis and its applications in tracing cancer cell metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2013, 330(2):170-180.
- [19] ZHU M Y, LU Y, LI W, et al. Hepatitis B virus X protein driven alpha fetoprotein expression to promote malignant behaviors of normal liver cells and hepatoma cells[J]. *J Cancer*, 2016, 7(8):935-946.
- [20] SAYIN V I, IBRAHIM M X, LARSSON E, et al. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(221):221ra15.
- [21] LI L, HONG H H, CHEN S P, et al. Activation of AMPK/MnSOD signaling mediates anti-apoptotic effect of hepatitis B virus in hepatoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(17):4345-4353.
- [22] PAPA L N, HAHN M, MARSH E L, et al. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(9):5412-5416.
- [23] XU Y Q, LIU B, CHENG S Q, et al. Serum total superoxide dismutase activity as a predictive factor in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Hepat Mon*, 2024, 24(1):1.
- [24] ZHANG X L, LU Y, RONG C Z, et al. Role of superoxide dismutase in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. *J Res Med Sci*, 2016, 21:94.
- [25] PISKOUNOVA E, AGATHOCLEOUS M, MURPHY M M, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells[J]. *Nature*, 2015, 527(7577):186-191.

(收稿日期:2025-05-12 修回日期:2025-08-09)
(编辑:舒安琴)