

本文引文格式:宋雪翼,邵倩倩,于滢,等. PHA-665752 通过抑制 HGF/c-Met 信号通路增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性[J]. 右江民族医学院学报, 2024, 46(5): 653-660.

【论著与临床报道】

## PHA-665752 通过抑制 HGF/c-Met 信号通路增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性

宋雪翼<sup>1</sup>, 邵倩倩<sup>1</sup>, 于滢<sup>1</sup>, 刘洋<sup>1</sup>, 涂丽<sup>1</sup>, 唐小龙<sup>1,2</sup>

(1. 安徽理工大学医学院, 安徽 淮南 232001;

2. 安徽理工大学第一附属医院, 安徽 淮南 232001)

**摘要:**目的 研究 HGF/c-Met 对肝癌细胞迁移、增殖及索拉非尼敏感性的影响及作用机制, 并通过抑制 HGF/c-Met 信号通路的异常活化增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性。方法 通过免疫组化和细胞实验分析肝癌组织及 SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 的表达和细胞迁移能力。采用 c-Met 抑制剂 PHA-665752 以及转染 c-Met 敲低慢病毒的方式抑制 HGF/c-Met 信号通路的活化, 并通过 Transwell 实验、EdU 实验、CCK-8、克隆形成实验、AO/EB 等方法分析 HGF/c-Met 对细胞迁移、增殖、索拉非尼敏感性的影响及作用机制。通过小鼠实验探讨 HGF/c-Met 对异种植物增殖的影响。结果 与未经索拉非尼治疗的肝癌组织相比, 经过索拉非尼治疗的肝癌组织中 c-Met 高表达。在 SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 的表达水平不同, 高表达 c-Met 的 SK-Hep1 细胞具有更强的迁移能力。通过促进和抑制 SK-Hep1 细胞中 c-Met 的活化, 发现 HGF/c-Met 通过激活 MAPK/ETS-1 促进细胞迁移、增殖, 降低细胞对索拉非尼敏感性, 抑制 HGF/c-Met 信号通路活化能够降低细胞迁移能力、增殖能力, 并增强细胞对索拉非尼敏感性。结论 HGF/c-Met 信号通路的异常活化抵抗了索拉非尼对 SK-Hep1 细胞的毒性作用, 使用 PHA-665752 增强了 SK-Hep1 细胞对索拉非尼敏感性。

**关键词:** 癌, 肝细胞; 肝细胞生长因子受体; 索拉非尼

中图分类号: R730.261

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2024)05-0653-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.05.001

### PHA-665752 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by inhibiting HGF/c-Met signaling pathway

SONG Xueyi<sup>1</sup>, SHAO Qianqian<sup>1</sup>, YU Ying<sup>1</sup>, LIU Yang<sup>1</sup>, TU Li<sup>1</sup>, TANG Xiaolong<sup>1,2</sup>

(1. School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China; 2. The First Hospital of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects and mechanisms of HGF/c-Met on the migration, proliferation, and sorafenib sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cells, and to enhance the sensitivity of HCC cells to sorafenib by inhibiting the abnormal activation of the HGF/c-Met signaling pathway. **Methods** The expression and cell migration of c-Met in HCC tissues and SK-Hep1 and Huh-7 cells were analyzed using immunohistochemistry and cell assay. The activation of HGF/c-Met signaling pathway was inhibited by the c-Met inhibitor PHA-665752 and transfection of c-Met knock-down lentivirus. The effects of HGF/c-Met on cell migration, proliferation and sensitivity of sorafenib and its mechanism were analyzed by Transwell assay, EdU assay, CCK-8 assay, clonal formation assay and AO/EB assay. The effect of HGF/c-Met on the proliferation of xenografts was studied using mice. **Results** Compared with HCC tissues treated without sorafenib, c-Met

基金项目: 国家自然科学基金项目(82071862)

第一作者: 宋雪翼, 在读硕士研究生, 研究方向: 肿瘤学, E-mail: songxueyi977@163.com

通讯作者: 唐小龙, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 肿瘤学, E-mail: txljd2006@126.com

was highly expressed in HCC tissues treated with sorafenib. The expression levels of c-Met were different in SK-Hep1 and Huh-7 cells, and SK-Hep1 cells with high c-Met expression exhibited stronger migration ability. By promoting and inhibiting the activation of c-Met in SK-Hep1 cells, it was found that HGF/c-Met promoted cell migration and proliferation by activating MAPK/ETS-1, reduced cell sensitivity to sorafenib, and inhibiting the activation of the HGF/c-Met signaling pathway could decrease cell migration and proliferation abilities while enhancing cell sensitivity to sorafenib. **Conclusion** The abnormal activation of HGF/c-Met signaling pathway resisted the toxic effect of sorafenib on SK-Hep1 cells, and the use of PHA-665752 enhanced the sensitivity of SK-Hep1 cells to sorafenib.

**Key words:** carcinoma, hepatocyte; hepatocyte growth factor receptor; sorafenib

肝癌是全球范围内常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,在全球癌症发病率中位居第六位,其死亡率在所有癌症死亡率中排第三位<sup>[2]</sup>。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的肝癌类型<sup>[3]</sup>。大多数患者确诊时已是晚期,治疗方式有限。近年来,靶向治疗为晚期肝癌提供了一种新的选择<sup>[4]</sup>。然而,由于 HCC 的发生机制复杂,单一的治疗手段难以有效控制该病的进展,因此需要进一步研究其发病机制和治疗方法,以便在临床应用中更好地治疗患者。

索拉非尼是一种多激酶抑制剂,通过破坏丝氨酸/苏氨酸激酶和受体酪氨酸激酶的结合来靶向血管生成和抑制肿瘤增殖<sup>[5]</sup>。2007 年美国食品药品监督管理局批准索拉非尼用于治疗不可切除的 HCC<sup>[6]</sup>。尽管接受索拉非尼治疗的肝细胞癌患者总体存活率有所提高,但晚期患者存活期有限,易产生抗性<sup>[7]</sup>。因此,提高索拉非尼的治疗效果是重中之重。

近年研究表明,肿瘤细胞 HGF/c-Met 信号通路的异常活化与肿瘤进展紧密相关。肝细胞生长因子受体(c-Met)是一种酪氨酸激酶受体,在多种细胞类型中表达,包括上皮细胞和肝细胞<sup>[8]</sup>。其与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)结合后,启动如 MAPK、PI3K、STAT 和 NF- $\kappa$ B 等下游信号通路,进一步调控细胞增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化<sup>[9-10]</sup>。这些生物学效应与肿瘤细胞对靶向药物的抗性有关<sup>[11]</sup>。HGF 诱导的 c-Met 磷酸化、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)表达参与 HCC 细胞侵袭。ETS-1 是 ETS 蛋白家族中的一种转录因子,含有 ETS 结构域和 DNA 结合结构域<sup>[12]</sup>。在 HGF 存在下,ETS-1 能从细胞质转移到细胞核,并与其靶基因如基质金属蛋白酶(MMPs)的启动子区域结合,调节 MMPs 转录促进癌细胞侵袭。MMPs 的表达在 ETS-1 下游受到调控<sup>[13]</sup>。然而,HGF/c-Met 信号通路在索拉非尼治疗期间调控迁移和增殖的机制尚待阐明。此外,探索抑制 c-Met 的活化是否可以恢复对索拉非尼的敏感性并逆转迁移表型是至关重要的。因此,开发新的靶向药物和合理的联合治疗策略势在必行。PHA-665752 是一种有效的选择性小分子 ATP 竞争性 c-Met 抑制剂,

能够有效抑制 c-Met 的活化并且与肿瘤生长抑制相关<sup>[14]</sup>。本研究的目的是分析 HGF/c-Met 对肝癌细胞迁移、增殖及索拉非尼敏感性的影响及作用机制,并期望通过 PHA-665752 抑制 c-Met 活化,从而增强肝癌细胞对索拉非尼敏感性。

## 1 材料与方法

1.1 患者和 HCC 组织标本 本研究共纳入 30 例患者,其中 15 例患者不接受索拉非尼治疗,15 例患者接受索拉非尼治疗。所有患者均于 2021 年至 2023 年间在蚌埠医学院第一附属医院行根治性肝细胞癌切除术或穿刺治疗。临床标本的采集在征得患者知情同意后,并遵守安徽理工大学伦理委员会批准的方案(批准号:20220010)。患者均符合《原发性肝癌诊疗规范(2019 年版)》的诊断标准<sup>[15]</sup>,同时符合纳入标准:术前经过 CT、MRI、超声造影等检查确诊为肝细胞癌,手术后病理证实为肝细胞癌。15 例接受索拉非尼治疗的患者,除了索拉非尼外,他们都没有接受过任何术前癌症治疗。所有涉及的 HCC 组织切片已经获得了患者的知情同意,用于本课题的研究。有关患者临床病理特征的更多信息,见表 1。

表 1 30 例 HCC 患者的临床病理特征分析

临床病理特征	未经索拉非尼治疗	经索拉非尼治疗
性别		
男性	13	12
女性	2	3
年龄/岁		
$\leq 50$	5	2
$> 50$	10	13
HBV		
阳性	11	13
阴性	4	2
肝硬化		
无	6	3
有	9	12
肿瘤数量		
单个	15	10
多个( $\geq 2$ )	0	5

表 1(续) 30 例 HCC 患者的临床病理特征分析

临床病理特征	未经索拉非尼治疗	经索拉非尼治疗
肿瘤大小/cm		
≤5	13	10
>5	2	5
肿瘤包膜		
完整	13	9
不完整	2	6
TNM 临床分期		
I~II	15	12
III~IV	0	3
血管侵犯		
无	9	5
有	6	10
分化		
I~II	10	8
III~IV	5	7

1.2 细胞培养 肝癌细胞系(SK-Hep1 和 Huh-7)购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),在添加 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基中生长,并在含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 潮湿培养箱中保存。

1.3 病毒转染 SK-Hep1 细胞接种于 6 孔板。24 h 后,用 5 μg/mL 的 polybrene 处理细胞,并用不同体积靶向 c-Met 的 shRNA 慢病毒及对照慢病毒[生工生物工程(上海)股份有限公司]或过表达 c-Met 的腺病毒及对照腺病毒[生工生物工程(上海)股份有限公司]感染细胞。转染后 72 h 提取总蛋白,Western Blot 检测 SK-Hep1 细胞中 c-Met 的表达。选择干扰效率最高的 shRNA 干扰慢病毒进行后续实验。

1.4 试剂和抗体 RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司,索拉非尼和 PHA-665752 购自美国 Medchem Express 公司,肝细胞生长因子(HGF)购自美国 R&D Systems 公司,c-Met、Phospho-Met(Tyr1349)、ERK1/2、Phospho-Erk1/2、β-actin、ETS-1、BIM 和 phospho-p90RSK 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,MMP-9 兔抗购自英国 Abcam 公司,EdU-594 试剂盒、结晶紫染液购自上海碧云天生物技术有限公司,RIPA 裂解液、溴化乙锭(EB)购自江苏凯基生物技术有限公司,吖啶橙(AO)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.5 细胞划痕实验 3×10<sup>5</sup> 个细胞在含 RPMI 1640 (15%FBS)培养液的 6 孔板中培养;在 80% 汇合的单层细胞中用 10 μL 移液管尖端进行划痕;连续吸入两次 PBS 来清除细胞碎片;然后将细胞在不含血清的 RPMI 1640 培养液中培养(各组药物添加其中);迁移

24 h 和 48 h 后,使用相差显微镜观察细胞的迁移能力。

1.6 Transwell 实验 将无血清培养基中的细胞( $n=5\times 10^4$ )添加到 Transwell 小室(广州洁特生物过滤股份有限公司)的上层。48 h 后,PBS 洗涤迁移细胞,4%多聚甲醛固定,0.5%结晶紫染色,光学显微镜计数。在 HGF、索拉非尼和 PHA-665752 处理组的实验中,在下层含血清培养基中提供浓度为 50 ng/mL 的 HGF、4 μM 的索拉非尼和 1 μM 的 PHA-665752。上述实验重复 3 次。

1.7 Western Blot 用 PBS 洗涤贴壁的单层细胞两次,收集细胞后用 RIPA 裂解液裂解。然后,将蛋白裂解液(25 μg)进行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 Western Blot。采用化学发光凝胶成像仪(上海培清科技有限公司)检测抗体结合。以 β-actin 为内参,利用 ImageJ 软件测定目标条带强度,计算相对值。

1.8 细胞活力检测 96 孔板中每孔接种 2×10<sup>3</sup> 细胞,接种 24 h 后,用不同浓度的索拉非尼、索拉非尼联合 HGF 或索拉非尼、HGF 和 PHA-665752 的混合物在含有 10% 胎牛血清的培养基中处理细胞 24 h。在指定的时间点测量吸光度。

1.9 EdU 实验 在 24 孔板上用指定药物预处理 HCC 细胞。使用 EdU-594 试剂盒定量细胞增殖,测量 5-乙基-2'-脱氧尿苷(EdU)与 DNA 的结合。使用倒置荧光显微镜摄取荧光图像,以确定增殖细胞的比例。上述实验重复 3 次。

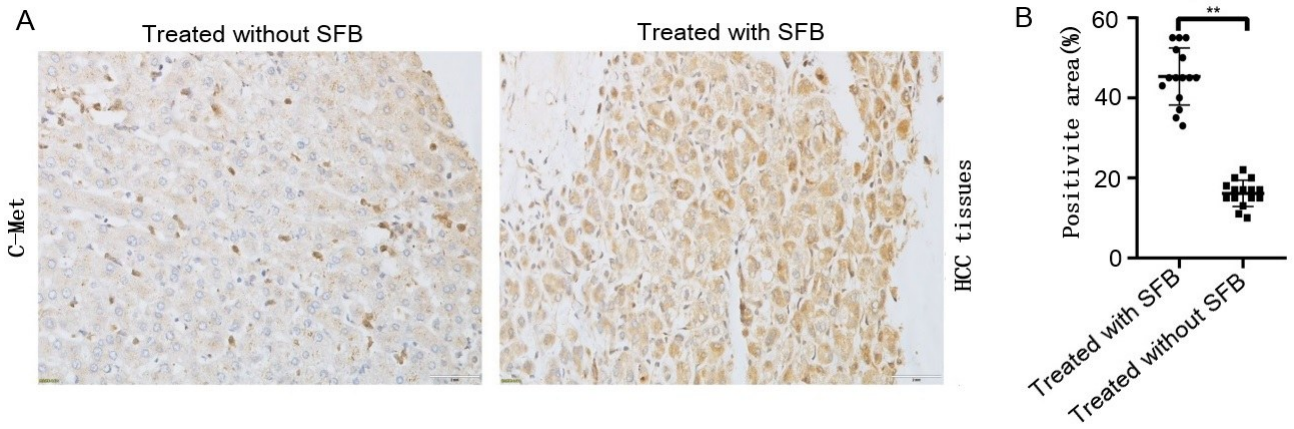
1.10 克隆形成实验 用不同的药物组合刺激细胞,孵育 1 周。将得到的细胞克隆固定在甲醇中,并用 0.1%结晶紫染色。计数直径>1 mm 的细胞克隆。每个样品重复测定 3 次。

1.11 AO/EB 染色 不同药物组合处理细胞 24 h,进行 AO/EB 染色。细胞中加入含 100 μg/mL AO 和 100 μg/mL EB 的 PBS 混合物。孵育后,去除染色液,用 PBS 冲洗细胞。在荧光显微镜下观察染色的细胞,并摄取图像进行荧光信号分析。

1.12 统计学方法 实验至少进行 3 次,所有实验数据计量资料采用( $\bar{x}\pm s$ )表示。两两比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。采用 GraphPad prism 8 进行统计分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 c-Met 在索拉非尼治疗的 HCC 组织中高表达 接受索拉非尼治疗的 HCC 组织中 c-Met 的表达高于未接受索拉非尼治疗的 HCC 组织( $P<0.01$ ),见图 1。



注:A. HCC 组织中 c-Met 表达的免疫组化染色代表性图像( $n=30$ )( $\times 200$ );

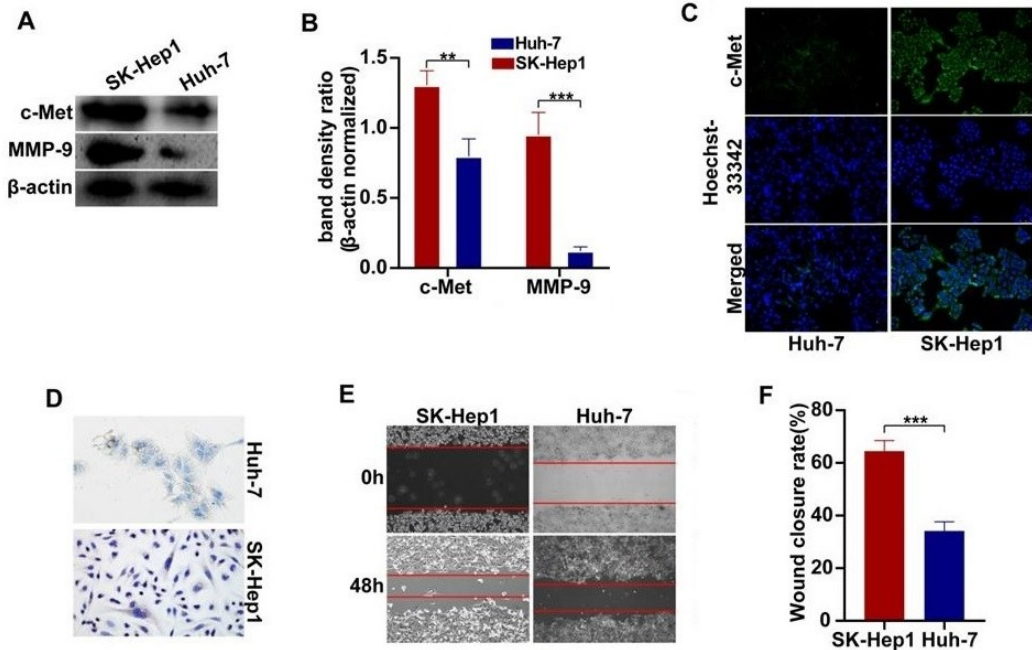
B. 免疫组化染色平均阳性面积统计图; \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 c-Met 在索拉非尼治疗的 HCC 组织中高表达

## 2.2 c-Met 高表达的 HCC 细胞具有较强的迁移能力

通过 Western Blot 检测了 SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 表达水平,发现 SK-Hep1 细胞中 c-Met 表达水平较高( $P < 0.01$ ),见图 2A、图 2B。间接免疫荧光和免疫细胞化学结果证实了 Western Blot 的发现,并提示 c-Met 表达于细胞膜和细胞质中,见图 2C、图

2D。接下来,对这两株细胞进行了划痕愈合实验,计算得出,SK-Hep1 和 Huh-7 细胞系在 48h 后的划痕愈合率分别为 64.52% 和 33.84%,见图 2E、图 2F。高表达 c-Met 的 SK-Hep1 细胞具有较强的迁移能力( $P < 0.001$ )。



注:A、B. SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 和 MMP-9 蛋白表达水平的 Western Blot 分析;C. 间接免疫荧光检测

SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 表达( $\times 100$ );D. 免疫细胞化学检测 SK-Hep1 和 Huh-7 细胞中 c-Met 表

达( $\times 100$ );E、F 细胞划痕试验评价 SK-Hep1 和 Huh-7 细胞在 48 h 后的划痕愈合率( $\times 100$ )。

$n=3$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

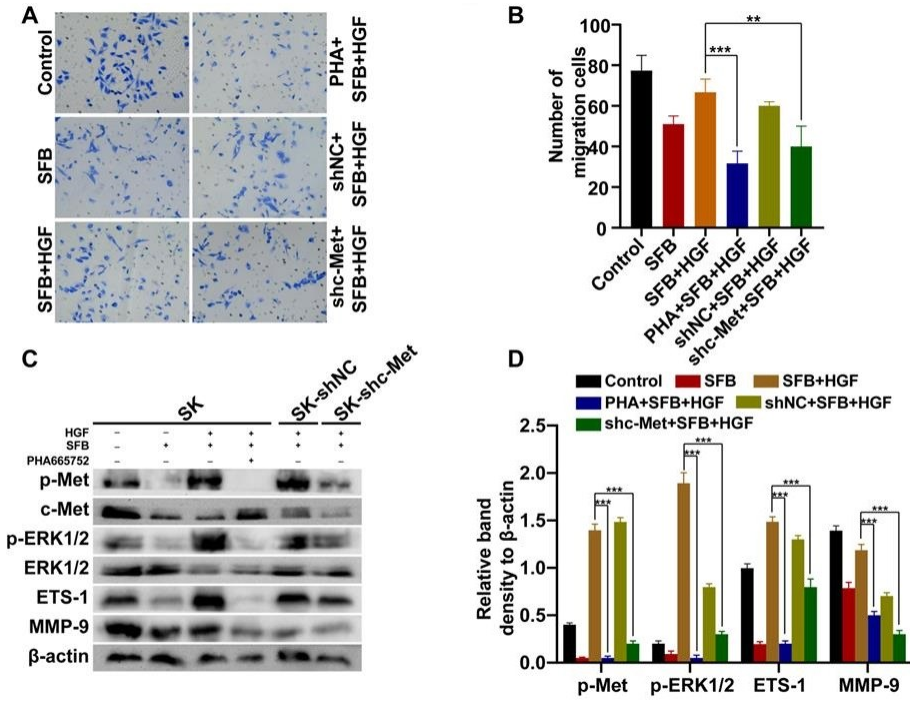
图 2 c-Met 高表达的 HCC 细胞具有较强的迁移能力

2.3 c-Met/MAPK/ETS-1 通路可恢复索拉非尼对 SK-Hep1 细胞迁移的抑制作用 为了研究高水平活化 c-Met 对 SK-Hep1 细胞系细胞迁移的影响,本课题组进行了索拉非尼治疗组和索拉非尼联合 HGF 组的

实验。目的是分析活化的 c-Met 是否可以抵消索拉非尼对 SK-Hep1 细胞的迁移抑制。结果显示,HGF 显著降低索拉非尼的迁移抑制作用,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。此外,本课题组使用慢病毒转染的 c-

Met 敲低的 SK-Hep1 细胞(SK-Hep1shc-Met)和用 c-Met 抑制剂(PHA-665752)、索拉非尼和 HGF 预处理的 SK-Hep1 细胞进行了实验,敲低 c-Met 组与加入 PHA-665752 处理组结果显示索拉非尼对 SK-Hep1 迁移的抑制显著增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 3A、图 3B。为了探索 HGF/c-Met 调控 SK-Hep1 细胞迁移的潜在机制,本课题组检测了不同药物处理 SK-Hep1 细胞中 HGF/c-Met 和 ERK/

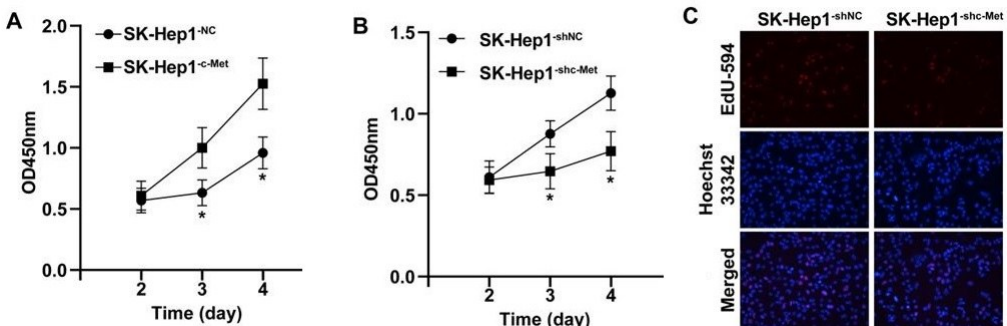
MAPK 通路关键激酶的表达和磷酸化水平。加入 HGF 可显著增强 c-Met 磷酸化,SK-Hep1 细胞的 MAPK 信号通路被显著激活,MAPK 下游的 ETS-1 也表现出高表达水平,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。然而,加入 c-Met 抑制剂(PHA-665752)可以消除 HGF 诱导的 c-Met 磷酸化的增加。此外,敲低 c-Met 的 SK-Hep1 细胞下调了 c-Met 表达和磷酸化水平,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 3C、图 3D。

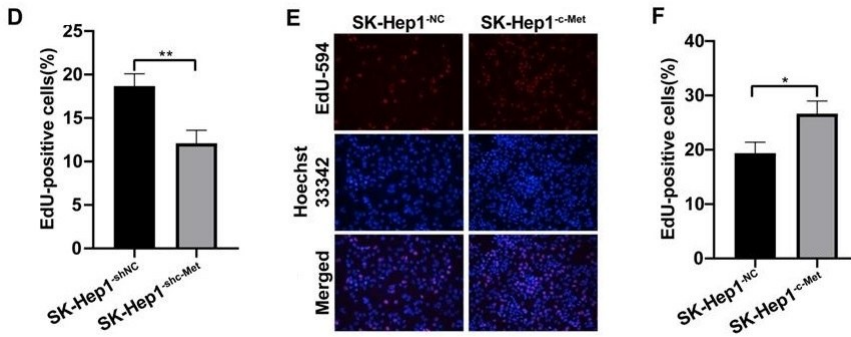


注: A、B. 通过 Transwell 实验分析索拉非尼对 SK-Hep1、SK-Hep1shNC 和 SK-Hep1shc-Met 细胞的迁移抑制能力( $\times 100$ ); C、D. Western Blot 分析各处理组 c-Met /MAPK/ETS-1/MMP-9 主要蛋白分子的表达和活化水平。  
 $n = 3, ** P < 0.01, *** P < 0.001$ 。SFB: 索拉非尼; HGF: 肝细胞生长因子。  
 图 3 下调 c-Met/MAPK/ETS-1 通路可恢复索拉非尼对 SK-Hep1 细胞迁移的抑制作用

2.4 HGF/c-Met 促进 SK-Hep1 细胞增殖 本研究通过转染 c-Met 过表达腺病毒或 c-Met 敲低慢病毒进一步探讨 c-Met 在 HCC 肿瘤细胞增殖能力的影响。4 d 的增殖实验结果显示,与 SK-Hep1 NC 相比,c-Met 过表达显著增强了 SK-Hep1 细胞的增殖(见图 4A)。相反,转染 c-Met 敲低腺病毒后,SK-Hep1 细胞的增

殖明显受到抑制(见图 4B)。EdU 增殖实验分析表明,下调 c-Met 表达可显著抑制 HCC 细胞增殖,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 4C、图 4D,而过表达可显著促进细胞增殖,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4E、图 4F。



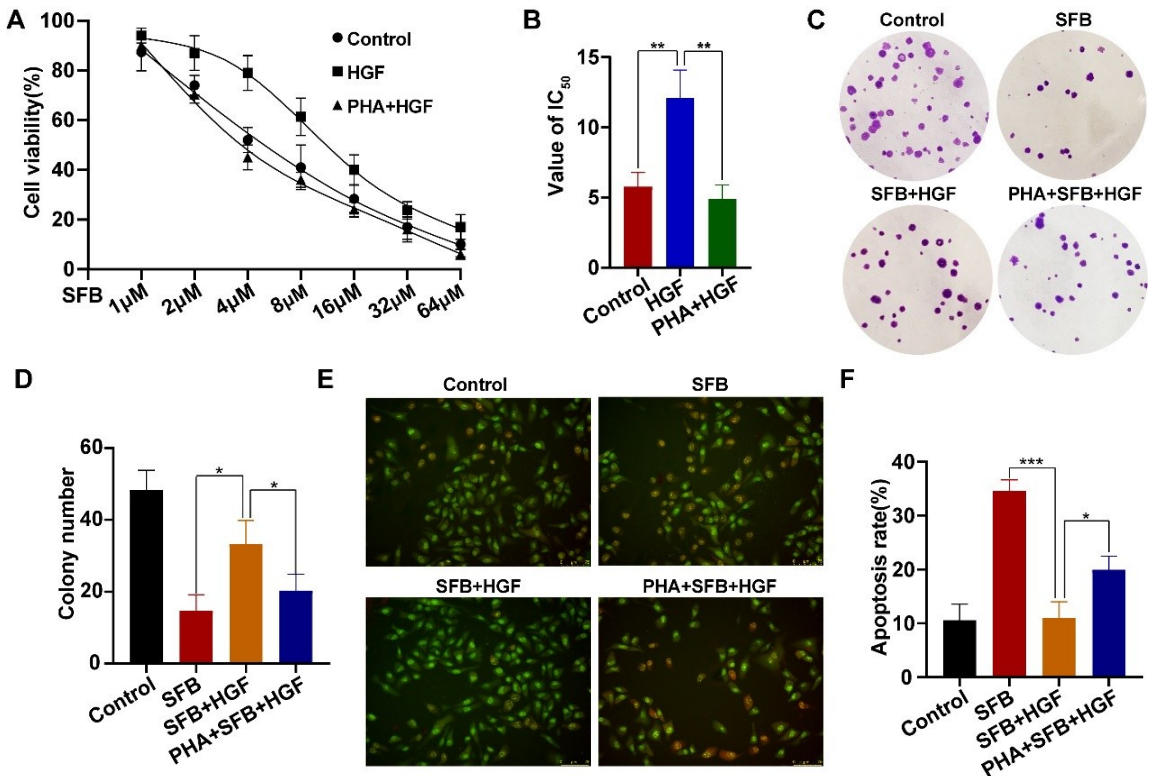


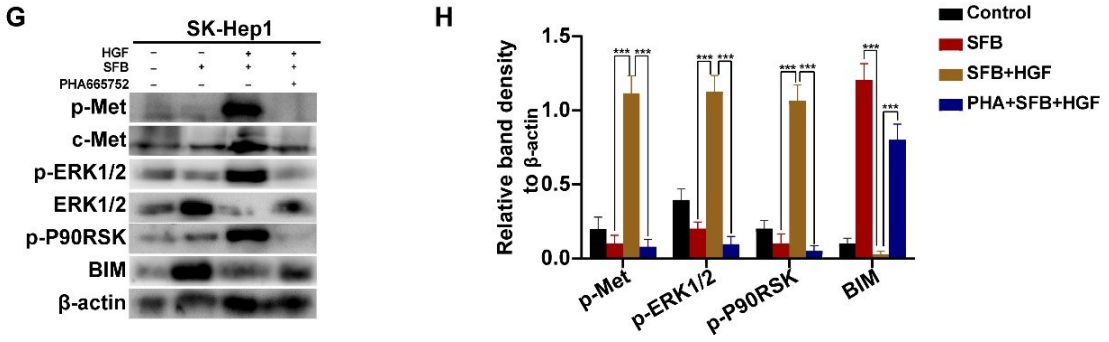
注:A、B. 使用 CCK-8 分析 c-Met 过表达和敲低的 SK-Hep1 细胞的细胞增殖能力,检测波长为 450 nm;C~F. EdU 法检测 c-Met 过表达和敲低后 SK-Hep1 细胞的增殖情况( $\times 100$ )。n=3,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

图 4 HGF/c-Met 通路促进 SK-Hep1 细胞的增殖

2.5 PHA-665752 通过靶向 c-Met 调节 HCC 细胞对索拉非尼的敏感性 为了研究 HGF/c-Met 调节 HCC 对索拉非尼敏感性的作用,在 SK-Hep1 细胞中加入 HGF 与 PHA-665752 预处理,然后加入不同浓度的索拉非尼进行培养。CCK-8 细胞活力测定结果显示,与单一药物索拉非尼相比,HGF 的额外刺激使 SK-Hep1 细胞对索拉非尼的敏感性降低。此外,PHA-665752 恢复了 SK-Hep1 细胞对索拉非尼的敏感性,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图 5A、图 5B。为了进一步证实 c-Met 在细胞增殖中的作用是通过激活 HGF/c-Met 介导,本课题组用 PHA-665752 预处理 SK-Hep1 细胞,研究在 HGF 和索拉非尼存在下克隆团的数量,如图 5C 和 5D 所示,PHA-665752 抑制过表达 c-Met 的 SK-Hep1 细胞对索拉非尼的增殖抗性,差异有统计

学意义( $P < 0.05$ )。随后,为了研究 c-Met 的抑制是否可以恢复 SK-Hep1 细胞对索拉非尼治疗的敏感性,本课题组在 HGF 和 PHA-665752 存在或不存在的情况下,用相同剂量的索拉非尼处理 SK-Hep1 细胞 24 h,测量细胞凋亡水平,见图 5E、图 5F。Western Blot 分析证实,PHA-665752 恢复了 HGF 刺激前索拉非尼促进 SK-Hep1 细胞凋亡的能力,且促凋亡蛋白 BIM 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。同时通过 Western Blot 检测增殖相关蛋白 p-p90RSK 的表达水平,如图 5G 和 5H 所示,HGF 的加入激活了 c-Met 磷酸化和 MAPK 信号通路,进一步促进了 p-p90RSK 的表达。相反,PHA-665752 预处理会抑制 c-Met 的活化,抑制其增殖作用,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。





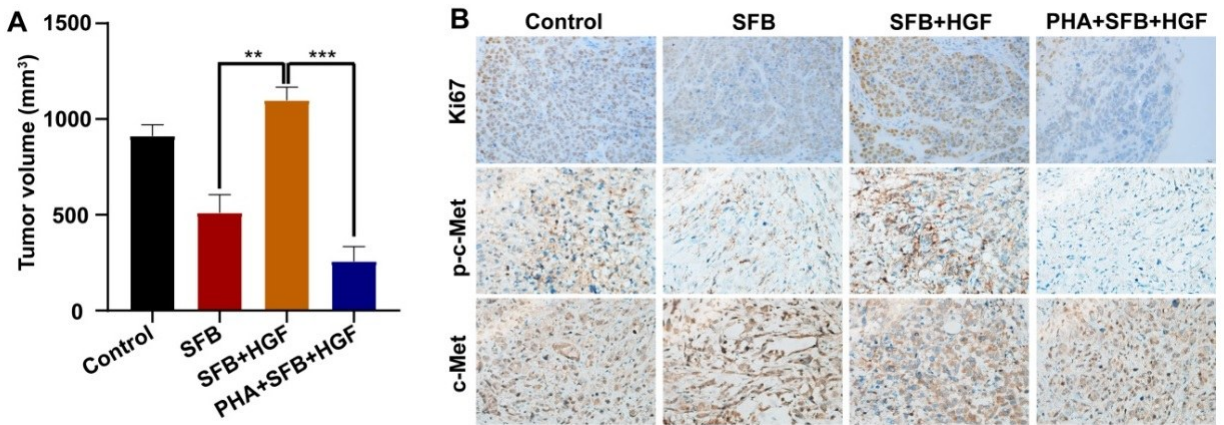
注:A. 采用 CCK-8 法分析不同浓度索拉非尼处理 SK-Hep1 细胞在 HGF 和 PHA-665752 存在或不存在的情况下的细胞活力; B. 索拉非尼在不同治疗组的 IC<sub>50</sub> 值与对照组比较;C、D. 通过克隆形成实验分析 SK-Hep1 细胞的克隆形成率。实验将索拉非尼组、索拉非尼联合 HGF 组、PHA-665752 联合 HGF 和索拉非尼组与未治疗组进行比较;E、F. 采用 AO/EB 试验检测上述 3 组与对照组相比的细胞凋亡水平(×100);G、H. 采用 Western Blot 分析 c-Met/MAPK 通路关键酶、下游增殖相关分子 p-P90RSK、凋亡相关分子 BIM 水平。*n* = 3, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001。

SFB: 索拉非尼;HGF: 肝细胞生长因子。

图 5 PHA-665752 通过靶向 c-Met 调节 HCC 细胞对靶向治疗药物的敏感性

2.6 PHA-665752 通过靶向 c-Met 抑制肿瘤生长  
通过体内实验分析 PHA-665752 对小鼠肝癌细胞异源移植的影响,如图 6A 所示,结果表明 HGF 处理可以拮抗 SFB 对异种移植 HCC 细胞生长的抑制作用。然而,PHA-665752 处理后,小鼠的异源移植植物体明显

减少。此外,免疫组织化学染色结果显示,与对照组相比,SFB 组和 PHA+SFB+HGF 组的 Ki67 增殖指数和 c-Met 活化水平均下降。然而,PHA+SFB+HGF 组的下降更为明显,见图 6B。



注:A. 显示小鼠肿瘤平均体积的统计图;B. 免疫组织化学染色图显示 Ki67、c-Met 和 p-c-Met 的表达(×100)。

\*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001。SFB: 索拉非尼;HGF: 肝细胞生长因子

图 6 PHA-665752 在体内通过靶向 c-Met 抑制肝癌细胞的异源移植生长

### 3 讨论

HCC 是一种高发病率和高死亡率的恶性肿瘤,预计未来几年其发病率和死亡率还会进一步增加<sup>[16]</sup>。虽然靶向药物索拉非尼已成为晚期 HCC 患者推荐的主要治疗方法,但长期治疗后,HCC 患者对索拉非尼的敏感性降低。HCC 患者的晚期诊断和 HCC 肿瘤细胞对大多数常规抗癌药物和靶向治疗药物的耐药是 HCC 治疗的主要障碍<sup>[6]</sup>。

c-Met 通路在人类癌症中常失调,尤其在 HCC 中 c-Met 异常活化与预后差相关<sup>[8]</sup>。有研究报道 HGF/

c-Met 信号促进 HCC 浸润转移<sup>[11]</sup>。c-Met 基因的表达受到不同层次的调控,研究表明,转录因子 ETS-1 与 c-Met 过度表达和细胞侵袭相关<sup>[13]</sup>。然而,HGF/c-Met 对细胞增殖、迁移、SFB 敏感性的影响及作用机制尚不清晰。

在本研究中,c-Met 在接受 SFB 治疗的 HCC 组织中高表达。其次,根据 HCC 迁移能力的差异表型筛选 c-Met 高表达的 HCC 细胞,结果发现 SK-Hep1 细胞高表达 c-Met 且迁移能力更强。接下来,通过测试了活化 c-Met 是否影响 SK-Hep1 细胞的迁移能力,结果

表明 HGF 活化 c-Met 显著降低 SFB 的迁移抑制作用。用干扰 c-Met 表达的慢病毒转染 SK-Hep1 细胞、c-Met 抑制剂 PHA-665752 分析 SFB 是否能增强对 SK-Hep1 细胞迁移的抑制作用,结果显示敲低 c-Met 和用 PHA-665752 处理后,SFB 对 SK-Hep1 迁移的抑制显著增强。为了深入探究 HGF/c-Met 调控 SK-Hep1 细胞迁移的潜在机制,Western Blot 分析显示,c-Met / MAPK / ETS-1 促进 MMP-9 的表达,调节细胞迁移,同时 SFB 通过抑制此通路来发挥作用。虽然有报道表明 c-Met 在癌症中调节肿瘤生长,但 c-Met 在 HCC 进展中的作用有待进一步阐明。通过转染 c-Met 过表达腺病毒或 c-Met 敲低慢病毒对 SK-Hep1 细胞增殖的影响,结果表明,下调 c-Met 表达可显著抑制 SK-Hep1 细胞的生长和增殖。相反,上调 c-Met 表达可促进 SK-Hep1 细胞的增殖。这些结果都表明靶向 c-Met 促进了 HCC 细胞的增殖。

本课题组证明了 PHA-665752 通过靶向抑制 c-Met 恢复 HCC 细胞对 SFB 的敏感性。与对照组相比,SFB 组显著抑制 HCC 细胞增殖,促进细胞凋亡,但这些作用被 HGF 的加入所抵消。然而,当 c-Met 的表达和激活被抑制时,SFB 促进细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用明显恢复。Western Blot 数据显示,PHA-665752 抑制 c-Met 的磷酸化,进而下调 p-ERK1/2,增殖相关蛋白 p-p90RSK 也下调,而促凋亡蛋白 BIM 的表达明显上调。同时,体内实验证明 PHA-665752 通过靶向和抑制 c-Met 的磷酸化,在体内有效地抑制了肝细胞异体移植的生长。

本研究探讨了 HGF/c-Met 通路的异常活化降低了 SFB 对 HCC 的敏感性,c-Met 激酶抑制剂与 SFB 的联合使用可显著增强索拉非尼的治疗效果,为 HCC 的治疗提供了新的策略。因此,未来有必要进一步探讨 HGF/c-Met 通路在 HCC 中的其他作用机制,为 HCC 的治疗提供更加有效和个性化的方案。

#### 参考文献:

- [1] HUANG D Q, MATHURIN P, CORTEZ-PINTO H, et al. Global epidemiology of alcohol-associated cirrhosis and HCC: trends, projections and risk factors [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(1): 37-49.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] GAO Y, LYU L Y, FENG Y, et al. A review of cutting-edge therapies for hepatocellular carcinoma (HCC): perspectives from patents [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(14): 3066-3081.
- [4] CHENG A L, HSU C, CHAN S L, et al. Challenges of combination therapy with immune checkpoint inhibitors for hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 307-319.
- [5] FINN R S, IKEDA M, ZHU A X, et al. Phase Ib study of lenvatinib plus pembrolizumab in patients with unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(26): 2960-2970.
- [6] MA Y F, XU R Y, LIU X K, et al. LY3214996 relieves acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(6): 1456-1464.
- [7] XIA S J, PAN Y, LIANG Y L, et al. The microenvironmental and metabolic aspects of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *EBioMedicine*, 2020, 51: 102610.
- [8] FU J J, SU X R, LI Z H, et al. HGF/c-MET pathway in cancer: from molecular characterization to clinical evidence [J]. *Oncogene*, 2021, 40(28): 4625-4651.
- [9] YU J J, ZHANG L J, PENG J, et al. Dictamnine, a novel c-Met inhibitor, suppresses the proliferation of lung cancer cells by downregulating the PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 195: 114864.
- [10] ZHANG Y C, WU C G, LI A M, et al. Oxaliplatin and gedatolisib (PKI-587) co-loaded hollow polydopamine nano-shells with simultaneous upstream and downstream action to re-sensitize drugs-resistant hepatocellular carcinoma to chemotherapy [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2021, 17(1): 18-36.
- [11] XU R Y, ZHANG Y C, LI A M, et al. LY-294002 enhances the chemosensitivity of liver cancer to oxaliplatin by blocking the PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$  pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1): 508.
- [12] NAZIR S U, KUMAR R, SINGH A, et al. Breast cancer invasion and progression by MMP-9 through Ets-1 transcription factor [J]. *Gene*, 2019, 711: 143952.
- [13] ZHOU Q H, LIU M S, SHAO T, et al. TPX2 enhanced the activation of the HGF/ETS-1 pathway and increased the invasion of endocrine-independent prostate carcinoma cells [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 618540.
- [14] FU R D, JIANG S T, LI J Y, et al. Activation of the HGF/c-MET axis promotes lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma cells with high c-MET expression [J]. *Med Oncol*, 2020, 37(4): 24.
- [15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(2): 112-128.
- [16] WANG H Y, RAO B C, LOU J M, et al. The Function of the HGF/c-met axis in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 55.

收稿日期: 2024-05-06; 修回日期: 2024-06-05