

肝癌干细胞的分离及对索拉菲尼耐药的机制初探

梁书欣*, 刘芳铃, 吴婷婷, 马正航, 林楠, 凌敏[#]

广西医科大学基础医学院, 广西 南宁

收稿日期: 2025年9月2日; 录用日期: 2025年11月11日; 发布日期: 2025年11月24日

摘要

目的: 探讨肝癌干细胞对索拉菲尼耐药的作用机制, 为肝癌的靶向治疗提供理论依据。方法: 采用无血清培养法分离培养肝癌干细胞, 通过Qrt-pcr检测肝癌干细胞表面标志物的表达情况; 将肝癌干细胞和亲本肝癌细胞分别置于含有不同浓度索拉菲尼的培养基中培养, 采用CCK8法检测细胞的存活率; 利用Western Blot检测肝癌干细胞中OCT4A、STST3和p-STAT3的表达情况。结果: 肝癌干细胞在无血清培养基中能够形成典型的干细胞球, 且干细胞CD133、EpCAM及CD44等标志物的表达水平较亲本肝癌细胞高; 在索拉菲尼作用下, 肝癌干细胞的存活率高于亲本肝癌细胞。Western Blot检测发现, 肝癌干细胞中OCT4A、STAT3和p-STAT3的表达水平显著高于亲本肝癌细胞。结论: 采用无血清培养法能够从肝癌细胞中分离出具有肿瘤干细胞特性的肝癌干细胞。肝癌干细胞可能是导致肝癌对索拉菲尼耐药的重要原因, 其机制可能涉及OCT4A通过激活STAT3信号通路来调控肝癌干细胞耐药性。

关键词

肝癌, 索拉菲尼, 肝癌干细胞, 耐药性

Isolation of Hepatocellular Carcinoma Stem Cells and Preliminary Investigation into Their Mechanisms of Sorafenib Resistance

Shuxin Liang*, Fangling Liu, Tingting Wu, Zhenghang Ma, Nan Lin, Min Ling[#]

School of Basic Medicine, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

Received: September 2, 2025; accepted: November 11, 2025; published: November 24, 2025

*第一作者。

[#]通讯作者。

文章引用: 梁书欣, 刘芳铃, 吴婷婷, 马正航, 林楠, 凌敏. 肝癌干细胞的分离及对索拉菲尼耐药的机制初探[J]. 生物医学, 2025, 15(6): 1125-1131. DOI: 10.12677/hjbm.2025.156121

Abstract

Objective: To investigate the mechanism underlying sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma stem cells (HCSCs) and to provide a theoretical basis for targeted therapy of hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** HCSCs were isolated and cultured using serum-free medium. Expression of HCSC surface markers was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). HCSCs and parental HCC cells were exposed to graded concentrations of sorafenib, and cell viability was assessed by CCK-8 assay. Protein levels of OCT4A, STAT3, and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) in HCSCs were evaluated by Western blot. **Results:** Under serum-free conditions, HCSCs formed typical spheroids and exhibited significantly higher expression of the stemness markers CD133, EpCAM, and CD44 compared with parental HCC cells. Upon sorafenib treatment, HCSCs displayed higher viability than their parental counterparts. Western blot analysis revealed markedly elevated expression of OCT4A, STAT3, and p-STAT3 in HCSCs. **Conclusion:** Serum-free culture successfully enriches HCSCs with tumor-initiating properties. HCSCs may be a critical driver of sorafenib resistance in HCC, and the mechanism may involve OCT4A to regulate HCC stem cell resistance by activating the STAT3 signaling pathway.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Sorafenib, Hepatocellular Carcinoma Stem Cells, Drug Resistance

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在所有恶性肿瘤中位居前列,且死亡率极高[1]。在我国,肝癌的发病率和死亡率也居高不下,严重威胁着人民的生命健康。尽管近年来在肝癌的诊断和治疗方面取得了一定进展,但大部分肝癌患者被发现时一般处于晚期,5年生存率仍处于较低水平[2] [3]。索拉菲尼(Sorafenib)是目前被批准用于晚期肝癌治疗的靶向药物,能够显著延长患者的生存期[4]。然而,索拉菲尼在临床应用中仍面临诸多挑战,如耐药现象的出现[5]。肝癌的高复发率和耐药性是导致治疗失败的主要原因之一[6] [7]。

有实验研究发现肝癌组织中存在肿瘤干细胞,而肿瘤干细胞的存在可能是导致肿瘤耐药和复发的关键因素。肿瘤干细胞具有自我更新、多向分化以及耐药等特性,能够抵抗传统化疗药物和靶向治疗药物的杀伤作用[8]。因此,探讨肝癌干细胞对索拉菲尼耐药的机制,对于提高索拉菲尼在肝癌治疗中的疗效具有重要意义。

肝癌干细胞具有独特的生物学特性,能够在无血清培养条件下能够形成具有干细胞特性的细胞球,同时高表达 CD133、EpCAM 及 CD44 等表面标志物[9] [10]。本研究旨在通过无血清培养法分离和鉴定肝癌干细胞,并分析肝癌干细胞对索拉菲尼耐药的影响及可能的作用机制,以期索拉菲尼在肝癌治疗中的应用提供新的见解,并为开发针对肝癌干细胞的靶向治疗策略提供实验依据。

2. 材料与方法

2.1. 肝癌干细胞的分离与培养

将肝癌细胞 HepG2、Huh7.4 置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,待细胞生长至 80%~90%

时进行传代。将传代后的肝癌细胞按照 2×10^5 细胞/mL 的浓度接种到含有 EGF (100 $\mu\text{g/mL}$) 和 bFGF (20 ng/mL) 的无血清培养基中, 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养, 每 3 天更换半量培养基。培养 1 周后, 观察细胞形成悬浮的干细胞球情况。

2.2. 肝癌干细胞表面标志物 CD133、EpCAM 及 CD44 的检测

取对数生长期的 HepG2、Huh7 细胞及其对应的干细胞(HepG2 CSCs, Huh7 CSCs)制备单细胞悬液, 以 1×10^5 /孔接种于 6 孔板, 过夜贴壁后换无血清 DMEM/F12 (含 B27、EGF、bFGF 等)维持干细胞状态; 48 h 后按 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录试剂盒合成 cDNA, 随后以 SYBR Premix Ex Taq II 在 ABI 7500 系统上进行 qRT-PCR, 20 μL 体系含 cDNA 2 μL 、上下游引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 程序为 95°C 30 s $\rightarrow$ 95°C 5 s、 60°C 34 s (40 循环), 熔解曲线验证特异性; 所用引物为: CD133 F 5'-TTCTATGCTGTGTCCTGGGC-3'、R 5'-TTGTTGGTG-CAAGCTCTTCAAGGT-3', EpCAM F 5'-GTGCTGGTGTGAACACTG-3'、R 5'-AGCCACATCAGC-TATGTCCA-3', CD44 F 5'-CAGCTACCCAGAAGGAACAGT-3'、R 5'-CTGTTGCTGCTGCTGCTTCT-3', 内参 GAPDH F 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'、R 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'; 每个样品设三复孔, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因相对表达量, 以未分选亲本细胞为对照, 实验独立重复三次, 结果以 $\text{Mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2.3. 肝癌干细胞对索拉菲尼耐药分析

将肝癌干细胞和亲本肝癌细胞(HepG2 和 Huh7.4 细胞系)分别用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液制备细胞悬液, 计数后按照每孔 1×10^4 个细胞的密度接种到 96 孔板中, 分别加入不同浓度的索拉菲尼(2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$), 每组设置 3 个复孔。培养 48 小时后, 采用 CCK8 法检测细胞存活率。

2.4. Western Blot 检测 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达

采用 RIPA 裂解液从肝癌细胞系 HepG2、Huh7.4 和肝癌干细胞 HepG2 CSCs、Huh7.4CSCs 提取细胞总蛋白, 并通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。使用 10% SDS-PAGE 凝胶进行蛋白分离, 并将分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上。膜经 5%脱脂奶粉在 TBST 中封闭 1 小时后, 分别加入 OCT4A 抗体、STAT3 抗体、p-STAT3 抗体(Tyr705)和 GAPDH 抗体(作为内参), 4°C 孵育过夜。随后, 加入相应的一抗对应的二抗(HRP 标记), 室温孵育 1 小时。最后, 使用 ECL 化学发光试剂显色, 并通过化学发光成像系统曝光记录结果。数据分析通过 ImageJ 软件进行条带灰度值分析, 以 β -actin 为内参, 计算各蛋白的相对表达量。

3. 结果

3.1. 肝癌干细胞的分离与鉴定

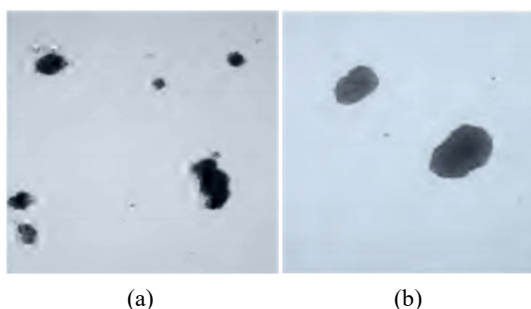


Figure 1. Tumor spheres formed by liver cancer cells (a) Cell spheres formed after serum-free culture of HepG2 cells; (b) Cytospheres formed after serum-free culture of Huh7.4 cells

图 1. 肝癌细胞形成的肿瘤球(a) HepG2 细胞无血清培养后形成的细胞球; (b) Huh7.4 细胞无血清培养后形成的细胞球

使用肝癌细胞 HepG2 和 Huh7.4, 无血清培养 1 周后, 肝癌细胞能够形成典型的干细胞球(见图 1(a), 图 1(b)), 表明利用无血清培养法能够获得肝癌干细胞 HepG2 CSCs、Huh7.4CSCs。

3.2. 肝癌干细胞表面标志物分析

利用 qRT-PCR 检测 HepG2、Huh7.4 细胞及其相应肝癌干细胞表面标记物 CD133、EpCAM 及 CD44 的表达。结果显示, 与亲本的 HepG2、Huh7.4 细胞相比, HepG2 CSCs 及 Huh7.4 CSCs 中干细胞标记物 CD133、EpCAM 及 CD44 的表达显著上调(见表 1), 进一步表明成功分离培养出了肝癌干细胞。

Table 1. Detection of the expression of liver cancer stem cell markers by qRT-PCR

表 1. qRT-PCR 检测肝癌干细胞标记物的表达

组别	基因	表达量的比值
HepG2 细胞系组 a	CD133	3.86 ± 0.19
	EpCAM	2.37 ± 0.17
	CD44	2.79 ± 0.21
Huh7.4 细胞系组 b	CD133	6.21 ± 0.33
	EpCAM	4.32 ± 0.28
	CD44	5.15 ± 0.37

a: HepG2 CSCs 组与 HepG2 细胞组各基因表达量的比值($p < 0.05$);

b: Huh7.4 CSCs 组与 Huh7.4 细胞组各基因表达量的比值($p < 0.05$)。

3.3. 肝癌干细胞对索拉菲尼耐药分析

用 CCK8 实验检测索拉菲尼对肝癌干细胞的毒性。在不同浓度索拉菲尼作用下, 肝癌干细胞的存活率均高于亲本肝癌细胞($p < 0.05$) (见图 2), 表明肝癌干细胞对索拉菲尼具有更强的耐药性。

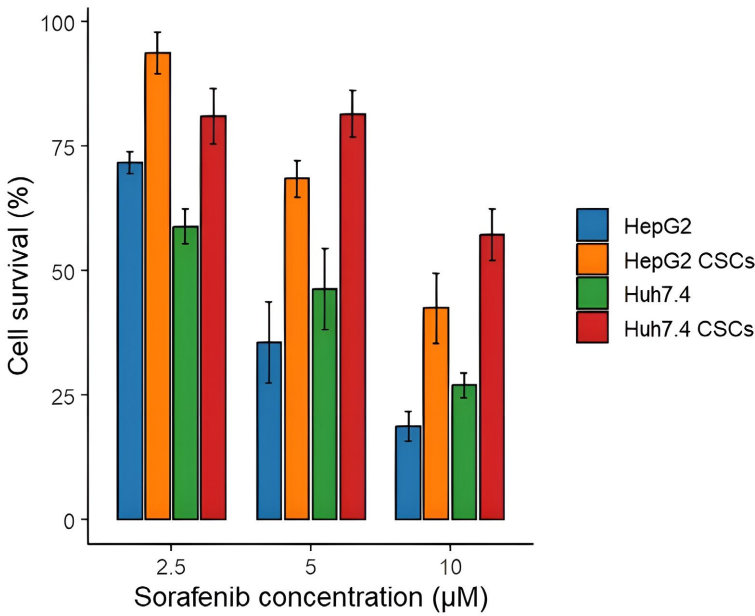


Figure 2. Analysis of resistance of liver cancer stem cells to sorafenib

图 2. 肝癌干细胞对索拉菲尼耐药分析

3.4. 肝癌干细胞 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达分析

为了探讨 OCT4A 调控肝癌干细胞耐药性的分子机制，我们检测了肝癌干细胞中 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达。

Western Blot 检测显示，肝癌干细胞 HepG2 CSCs、Huh7.4CSCs 中 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达水平均显著高于亲本肝癌细胞(见图 3)。此外，我们还发现用不同浓度索拉菲尼作用肝癌干细胞后，OCT4A 在癌干细胞中的表达水平与索拉菲尼的浓度呈正相关。上述结果表明 OCT4A 可能通过 STAT3 信号通路促进肝癌干细胞耐药。

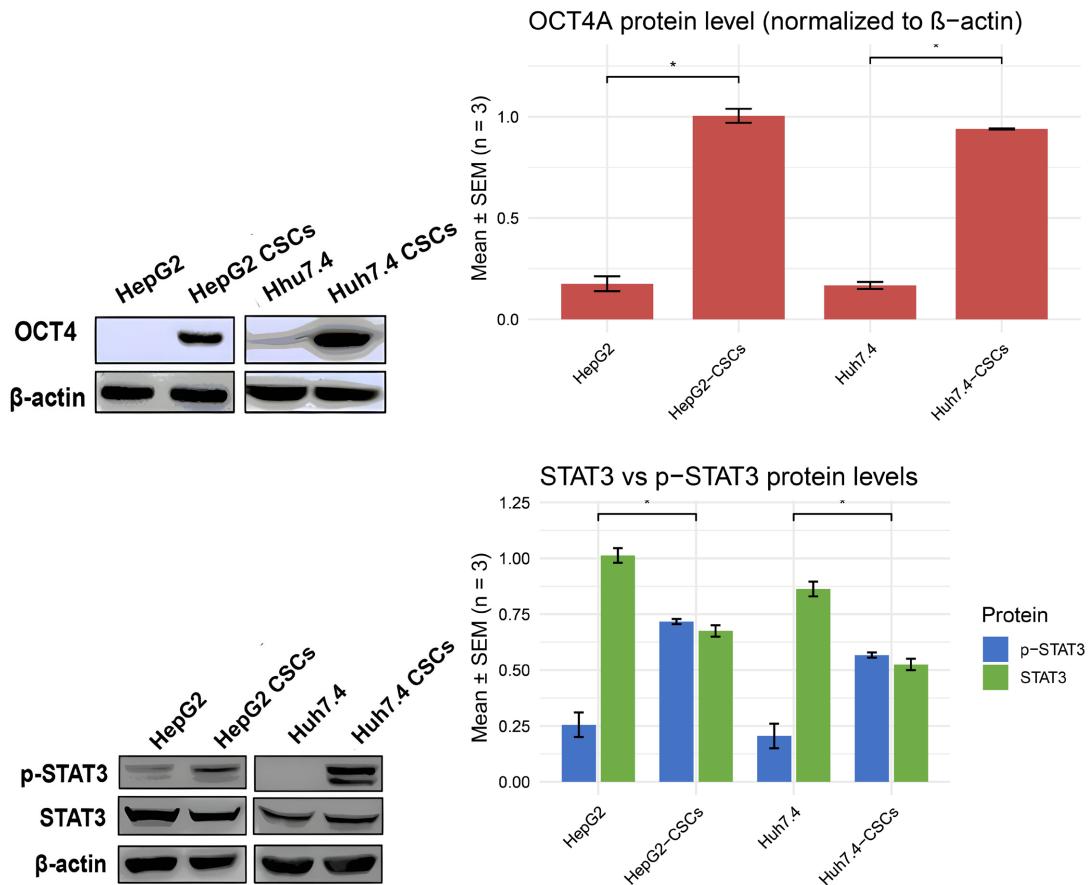


Figure 3. Expression levels of STAT3 and p-STAT3 in HepG2 CSCs and Huh7.4CSCs of hepatocellular carcinoma stem cells
图 3. 肝癌干细胞 HepG2 CSCs、Huh7.4CSCs 中 STAT3 和 p-STAT3 的表达水平

4. 讨论

肝细胞癌对一线多激酶抑制剂索拉菲尼的先天或获得性耐药，是导致临床疗效受限和患者预后不良的因素之一。越来越多的证据表明，耐药根源并非源于整块肿瘤，而是源于其中极少数具有自我更新、强致瘤和多向分化潜能的肝癌干细胞(LCSC) [5] [11]。目前研究报道 LCSC 的表面分子标记物有 EpCAM [12]、CD13 (ANPEP) [13]、CD24 [14]、CD44 [15]、CD133 [16]及 CD90 [17]等，这些蛋白都与 LCSC 自我更新、高度致瘤性及化疗耐药有关。研究认为，肝癌耐药与干细胞转录因子 OCT4A 密切相关，OCT4A 在高度致瘤性的 LCSC 中异常表达，OCT4A 调控的信号通路可能使 LCSC 对化疗药物耐药[18]，但 OCT4A 调控肝癌干细胞对索拉菲尼耐药的作用机制尚不明确。

本研究中, 我们采用无血清培养法从肝癌细胞 HepG2 和 Huh7.4 分离出肝癌干细胞球 HepG2 CSCs 和 Huh7.4 CSCs, 并且发现 CD133、CD44 和 EpCAM 等肿瘤标志物在肝癌细胞球的表达水平均较亲本细胞高, 这表明肝癌干细胞球 HepG2 CSCs 和 Huh7.4 CSCs 具有肿瘤干细胞特性。我们的研究结果还发现在含有不同浓度索拉菲尼的培养基中, 肝癌干细胞的存活能力比亲本肝癌细胞更强, 说明肝癌干细胞具有更强的耐药性。

已有研究表明, STAT3 信号通路参与癌症进展, 而 STAT3 基因在人类胚胎干细胞中可被 OCT4 结合[19]。为了探讨 OCT4A 调控肝癌干细胞耐药性的分子机制, 我们检测了肝癌干细胞中 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达水平, 结果显示, 肝癌干细胞 HepG2 CSCs、Huh7.4CSCs 中 OCT4A、STAT3 和 p-STAT3 的表达水平均显著高于亲本肝癌细胞(图 3)。此外。我们还发现用不同浓度索拉菲尼作用肝癌干细胞后, OCT4A 在癌干细胞中的表达水平与索拉菲尼的浓度呈正相关。上述结果提示 OCT4A 可能通过 STAT3 信号通路促进肝癌干细胞耐药。然而肝癌细胞 OCT4A 如何激活 STAT3 分子的具体机制尚需进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明采用无血清培养法能够从肝癌细胞系中分离出具有肿瘤干细胞特性的肝癌干细胞, 证实肝癌干细胞可能是导致肝癌对索拉菲尼耐药的重要原因, 其机制可能是 OCT4A 通过激活 STAT3 信号通路调控肝癌干细胞对索拉菲尼耐药。本研究尽管存在仅依赖体外细胞系、机制验证不充分等局限, 但我们的发现不仅拓展了既往对索拉菲尼耐药机制的认知边界, 也为未来联合靶向 OCT4A 或 STAT3 的临床策略奠定了理论基础。

基金项目

广西医科大学大学生创新训练计划项目(编号: 202310598011), 广西自然科学基金项目(2025GXNSFAA069060)。

参考文献

- [1] Singal, A.G., Llovet, J.M., Yarchoan, M., Mehta, N., Heimbach, J.K., Dawson, L.A., *et al.* (2023) AASLD Practice Guidance on Prevention, Diagnosis, and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **78**, 1922-1965. <https://doi.org/10.1097/hep.0000000000000466>
- [2] Wang, F., Mubarik, S., Zhang, Y., Wang, L., Wang, Y., Yu, C., *et al.* (2019) Long-Term Trends of Liver Cancer Incidence and Mortality in China 1990-2017: A Joinpoint and Age-Period-Cohort Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**, Article 2878. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162878>
- [3] Zhan, Z., Chen, B., Huang, R., Lin, W., Lan, S., Yao, X., *et al.* (2025) Long-Term Trends and Future Projections of Liver Cancer Burden in China from 1990 to 2030. *Scientific Reports*, **15**, Article No. 13120. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-96615-1>
- [4] Rimassa, L. and Wörns, M. (2020) Navigating the New Landscape of Second-line Treatment in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Liver International*, **40**, 1800-1811. <https://doi.org/10.1111/liv.14533>
- [5] Xia, S., Pan, Y., Liang, Y., Xu, J. and Cai, X. (2020) The Microenvironmental and Metabolic Aspects of Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *EBioMedicine*, **51**, Article ID: 102610. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.102610>
- [6] Yang, Y., Wen, Z., Liu, X., Ma, Z., Liu, Y., Cao, X., *et al.* (2023) Current Status and Prospect of Treatments for Recurrent Hepatocellular Carcinoma. *World Journal of Hepatology*, **15**, 129-150. <https://doi.org/10.4254/wjh.v15.i2.129>
- [7] Safri, F., Nguyen, R., Zerehpooeshnesfchi, S., George, J. and Qiao, L. (2024) Heterogeneity of Hepatocellular Carcinoma: From Mechanisms to Clinical Implications. *Cancer Gene Therapy*, **31**, 1105-1112. <https://doi.org/10.1038/s41417-024-00764-w>
- [8] Liu, C., Li, J., Wang, W., Zhong, X., Xu, F. and Lu, J. (2020) Mir-206 Inhibits Liver Cancer Stem Cell Expansion by Regulating EGFR Expression. *Cell Cycle*, **19**, 1077-1088. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1739808>
- [9] Liu, F. and Qian, Y. (2021) The Role of CD133 in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, **22**, 291-300. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.1916381>

-
- [10] Sun, J., Luo, Q., Liu, L. and Song, G. (2016) Liver Cancer Stem Cell Markers: Progression and Therapeutic Implications. *World Journal of Gastroenterology*, **22**, 3547-3557. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i13.3547>
- [11] Chu, X., Tian, W., Ning, J., Xiao, G., Zhou, Y., Wang, Z., *et al.* (2024) Cancer Stem Cells: Advances in Knowledge and Implications for Cancer Therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **9**, Article No. 170. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01851-y>
- [12] Guan, D., Shi, J., Zhang, Y., Zhao, J., Long, L., Chen, T., *et al.* (2015) Sorafenib Enriches Epithelial Cell Adhesion Molecule-Positive Tumor Initiating Cells and Exacerbates a Subtype of Hepatocellular Carcinoma through TSC2-AKT Cascade. *Hepatology*, **62**, 1791-1803. <https://doi.org/10.1002/hep.28117>
- [13] Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Ohkuma, M., Kim, H.M., *et al.* (2010) CD13 Is a Therapeutic Target in Human Liver Cancer Stem Cells. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 3326-3339. <https://doi.org/10.1172/jci42550>
- [14] Lee, T.K.W., Castilho, A., Cheung, V.C.H., Tang, K.H., Ma, S. and Ng, I.O.L. (2011) CD24⁺ Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through Stat3-Mediated NANOG Regulation. *Cell Stem Cell*, **9**, 50-63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.005>
- [15] Zhu, Z., Hao, X., Yan, M., Yao, M., Ge, C., Gu, J., *et al.* (2009) Cancer Stem/Progenitor Cells Are Highly Enriched in CD133⁺CD44⁺ Population in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer*, **126**, 2067-2078. <https://doi.org/10.1002/ijc.24868>
- [16] Ma, S., Lee, T.K., Zheng, B., Chan, K.W. and Guan, X. (2007) CD133⁺ HCC Cancer Stem Cells Confer Chemoresistance by Preferential Expression of the Akt/PKB Survival Pathway. *Oncogene*, **27**, 1749-1758. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210811>
- [17] Yang, Z.F., Ho, D.W., Ng, M.N., Lau, C.K., Yu, W.C., Ngai, P., *et al.* (2008) Significance of CD90⁺ Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. *Cancer Cell*, **13**, 153-166. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.013>
- [18] Wang, X.Q., Ongkeko, W.M., Chen, L., Yang, Z.F., Lu, P., Chen, K.K., *et al.* (2010) Octamer 4 (Oct4) Mediates Chemotherapeutic Drug Resistance in Liver Cancer Cells through a Potential Oct4-AKT-ATP-Binding Cassette G2 Pathway. *Hepatology*, **52**, 528-539. <https://doi.org/10.1002/hep.23692>
- [19] Cheng, C., Shi, L., Wang, X., Wang, S., Wan, X., Liu, S., *et al.* (2018) Stat3/Oct-4/c-Myc Signal Circuit for Regulating Stemness-Mediated Doxorubicin Resistance of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Inhibitory Effects of Wp1066. *International Journal of Oncology*, **53**, 339-348. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4399>