

人低分化原发性肝癌细胞系 TJ3ZX-01 建立及其细胞起源的初步研究

张世光 高英堂^{1,2} 宋文芹 陈力 朱争艳² 王毅军¹ 王鹏² 杜智^{1,2*}

(南开大学生命科学学院, 天津 300071; ¹天津市第三中心医院, 天津 300170;

²天津市人工细胞重点实验室, 天津 300170)

摘要 采用组织破碎直接培养法在体外建立一株人低分化原发性肝癌细胞系 TJ3ZX-01, 并对其生物学特征进行鉴定, 利用免疫细胞化学染色与流式细胞术分析, 探讨低分化原发性肝癌起源。细胞染色结果表明 CK18⁺、CK19⁺、波形蛋白⁺、AFP^{low}、PCNA⁺、Hep⁻, 认为该细胞系具有上皮细胞的特征, 但肝细胞标记物表达较低, 不具有明显的成熟肝细胞特征; 利用流式细胞仪分析细胞表面标记物 CD29、CD34、CD45、Thy-1 (CD90)、CD133、CD49f 在细胞中的表达情况, 其阳性细胞的比例在传代过程中保持稳定的水平, 其中少量细胞可能具有干细胞与前体细胞的性质, 显示此例低分化原发性肝癌的来源为肝干细胞或前体细胞。

关键词 低分化; 肝细胞癌; 癌干细胞; 细胞起源

肝癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发生机制与细胞起源仍然存在着较大的争议; 肿瘤干细胞理论认为癌症是一种干细胞疾病, 肿瘤中存在着一种具有干细胞性质的、对肿瘤发生与发展起决定作用的细胞亚群, 这类细胞来源于干细胞突变的积累^[1]。随着白血病^[2]与某些实体瘤^[3-8]中这种具有干细胞性质细胞亚群的发现, 究竟是否所有肿瘤都起源于干细胞或前体细胞, 是否所有肿瘤中都存在着肿瘤干细胞引起了研究者的极大兴趣。由于肝细胞本身具有很强的增殖能力, 其增殖过程中有可能突变形成肿瘤细胞导致肿瘤的发生, 目前被研究者广泛认同的理论是肝干细胞与前体细胞以及肝细胞都可能导致肝癌的发生, 低分化肝癌起源于骨髓干细胞与卵圆细胞、高分化肝癌起源于肝细胞, 肝细胞首先经蜕分化形成小肝细胞引起肝癌的发生, 而卵圆细胞、肝干细胞与骨髓干细胞也都可能通过积累突变形成肿瘤^[9-11], 不同类型的肝细胞癌在形态与预后等方面存在着很大差异。近年来对肝癌干细胞的研究取得较大进展, 肝癌干细胞及肝癌起源的研究对今后肝癌的治疗及预后具有重要的意义, 针对不同类型的肝癌可以采取更加有效的方式进行治疗。本实验通过对低分化肝癌细胞的分离与培养, 旨在研究不同类型肝细胞癌的细胞起源及讨论不同类型肝癌细胞中肿瘤干细胞存在的可能性。

1 材料与方

1.1 组织来源

组织来源于2006年9月20日天津市第三中心医院肝癌手术标本, 患者为男性, 56岁, 经病理诊断为低分化原发性肝细胞癌III-IV级, 表面抗原HBsAg阳性, 伴有结节性肝硬化及伴灶性脂肪变性。

1.2 细胞培养

将肿瘤组织置于培养皿中, 经PBS清洗后, 用手术剪将组织剪成1 mm³的小块, 充分吹打, 细胞悬液经100目滤网过滤, 离心机(KDC-2046, 科大创新股份有限公司中佳分公司) 500 g 离心5 min 弃上清液, 加入溶血素混匀37 °C静置10 min 去除红细胞, 500 g 离心5 min 弃上清液, 获得的细胞经PBS冲洗后, 台盼蓝染色检测细胞活性大于90%, 以1×10⁷个细胞数接种于100 ml 培养瓶中, 加入D-MEM/F-12培养液(Gibco公司), 含20%胎牛血清(晶美生物工程有限公司)、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素, 置于37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 培养72 h 换液去除未贴壁的细胞, 倒置相差显微镜(IX-71, Olympus, 日本)下每天观察细胞生长情况, 反复贴壁法去除成纤维细胞, 培养后观察发现细胞呈克隆化生长, 挑取克隆生长的细胞进行扩大培养, 每3天换液, 细胞开始时生长较慢,

收稿日期: 2008-05-21 接受日期: 2008-09-08

天津市重点科技攻关专项(No.05YFSZSF02500)和天津市基金项目(No.08JCYBJC08300)资助

* 通讯作者。Tel: 022-84112128, E-mail: zhi-du@163.com

21~28天传代一次,9代后生长较快,7天传代一次,目前已获得稳定增殖的上皮样细胞,同时该细胞在低浓度血清(5%)中仍可以稳定生长,命名为TJ3ZX-01。

1.3 生物学特征鉴定

1.3.1 克隆化生长细胞扩大培养 挑取原代培养细胞中呈克隆化生长的细胞,转入24孔板中进行扩大培养,细胞增殖后转入培养瓶中培养,获得性状稳定的细胞群体。

1.3.2 细胞形态 取9代细胞进行HE染色,光学显微镜下观察细胞形态,并取对数生长期的细胞经0.25%胰蛋白酶(Gibco公司)消化后,加入固定液,制备电镜标本,透射电镜(JEM-1010, JEOL, 日本)观察细胞超微结构。

1.3.3 生长曲线与倍增时间 取11代生长的细胞经0.25%胰蛋白酶消化后以每孔 1×10^4 个密度接种于96孔板中,加入0.1 ml培养液培养,连续培养7天,期间视细胞生长情况补加培养液,于接种后1、3、5、7天使用MTT法检测;每组6孔,同时以培养液作为空白对照,于490 nm波长处利用酶标仪(Multiskan MK 3, Labsystems, 芬兰)检测各组细胞的吸光度值,取均值绘制生长曲线。

1.3.4 细胞周期 取处于对数生长期的细胞,0.25%胰蛋白酶消化制备单细胞悬液,95%乙醇固定48 h, PBS冲洗后加入1 ml碘化丙锭(propidium iodide, PI) 4 °C避光染色30 min,流式细胞仪(FACs, BECKMAN COULTER®EPICS®ALTRA)在488 nm激发波长下,测定细胞荧光强度,使用MultiCycle软件对该细胞周期DNA含量进行分析,确定细胞周期分布。

1.3.5 细胞核型分析 在细胞培养液中加入秋水仙素至终浓度0.4 $\mu\text{g/ml}$,继续培养2 h,0.25%胰蛋白酶消化细胞,0.075 mmol/L KCl低渗处理15 min,甲醇/冰醋酸(3:1)固定液固定2 h,滴片干燥后吉姆萨染色,统计并分析细胞核型。

1.3.6 克隆与集落形成 分别配制0.7%、1.2%琼脂糖溶液。混匀后高压灭菌,置于50 °C水浴中。配制2×D-MEM/F-12 (2× 抗生素, 40% FPS)。等量混合1.2%琼脂糖与2×D-MEM/F-12,加入6孔板中,室温下凝固。消化细胞,制备单细胞悬液并计数。取 1×10^2 个细胞加入2×D-MEM/F-12与0.7%琼脂糖中(1:1)。定量加入6孔板中。制成双层软琼脂培养基。置37 °C、5% CO₂培养箱中培养14天,观察细胞克隆形成情况。

1.3.7 成瘤能力 取15代肿瘤细胞,胰蛋白酶消

化后加入PBS制备单细胞悬液,以 5×10^6 个细胞数接种5周龄SCID鼠(中国军事医学科学院)腋背皮下,30天后观察小鼠成瘤情况。

1.3.8 细胞侵袭能力 细胞经胰蛋白酶消化后,以 1×10^5 个细胞数接种于1:8稀释matrigel (BD公司)包被的transwell小室(Costar公司)中,37 °C、5% CO₂培养箱中培养24 h,95%乙醇固定后吉姆萨染色,200×显微镜下随机选取5个视野进行细胞计数,取均值表示细胞的侵袭能力,以肝癌细胞SMMC-7721作为对照组进行侵袭能力的比较。

1.4 细胞起源鉴定

1.4.1 免疫细胞化学染色 应用免疫细胞化学方法检测细胞中甲胎蛋白(AFP)、人细胞角蛋白(CK18、CK19)、肝素酶(Hep)、增殖细胞核抗原(PCNA)与波形蛋白(vimentin)表达情况,所有一抗均为鼠抗人抗体,购自北京中山生物有限公司;采用免疫细胞化学检测试剂盒(晶美生物工程有限公司)提供的标准方法进行实验,DAB显色苏木素套染细胞核观察实验结果。

1.4.2 流式细胞仪检测 取 1×10^6 个细胞分别加入流式细胞抗体CD29、CD34、CD45 (晶美生物工程有限公司)、CD49f (Biolegend公司)、CD90 (BD公司)、CD133 (Miltenyi Biotec公司),室温避光30 min, PBS冲洗后1%多聚甲醛固定,流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 细胞特征鉴定

2.1.1 细胞形态 倒置显微镜观察细胞形态发现TJ3ZX-01肿瘤细胞为上皮样细胞,呈集落生长,细胞之间紧密聚集,没有接触抑制现象,部分细胞重叠生长(图1A),培养后在培养瓶中可以形成肉眼可见的白斑;细胞形态与增殖能力各异,呈多角型和梭型,细胞分泌大量的细胞外基质,可在细胞之间形成多条纤维,细胞具有较强的黏附力,挑取克隆生长的细胞,扩大培养后得到增殖稳定的细胞(图1B);HE细胞染色发现细胞具有异质性的特点,细胞核呈多形性,大小、形态不一致,胞核与胞浆比例大(图1C)。透射电镜观察细胞为椭圆形,表面见指状及丘状突起,核异型,少量异染色质散在分布,胞质见大小不等坏死空腔;核内全为常染色质,仅见少量异染色质,大量线粒体高度凝聚,高尔基氏体扩张,光面内质网较多,核糖体减少,可见髓样小体(图1D)。

2.1.2 生物学特征 在含有20%胎牛血清D-MEM/

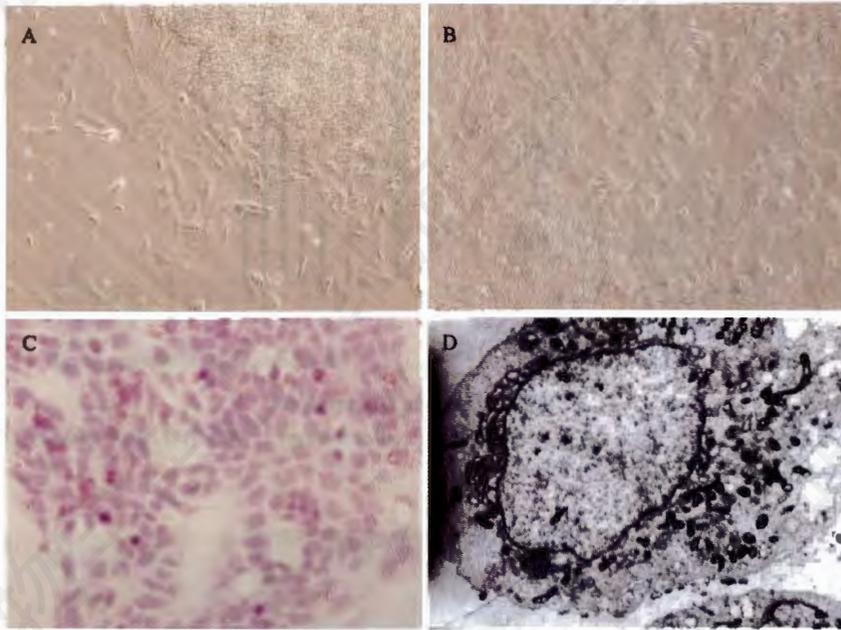


Fig.1 Cell morphology

A: clone growth of TJ3ZX-01 cells (100 \times); B: dilatation cultivation of cells clone (100 \times); C: cells stained with HE (400 \times); D: TJ3ZX-01 cells observed in transmission electron microscope (4 000 \times).

F-12 培养液中培养 7 天, MTT 法检测细胞增殖情况, 取均值绘制细胞生长曲线 (图 2A), 对数生长期细胞倍增时间为 34.4 h。流式细胞仪检测肿瘤细胞多为异倍体, 细胞周期结果显示细胞 80% 汇合程度时 $G_1 = 61.1\% \pm 1.5\%$, $G_2 = 12.7\% \pm 2.7\%$, $S = 26.2\% \pm 2.1\%$, $G_2/G_1 = 1.97$ (图 2B)。软琼脂培养基培养 14 天后, 细胞具有在软琼脂上形成克隆的能力, 可以形成肉眼可见的克隆; 细胞侵袭实验结果显示该肿瘤细胞具有一定的细胞侵袭能力, 侵袭细胞数为 51.1 ± 4.8 , 与 SMMC-7721 细胞侵袭数 60.7 ± 6.2 相比较侵袭性稍差; 致瘤性实验显示该细胞系成瘤能力较弱, 两次 SCID 小鼠皮下接种 5×10^6 个细胞 30 天后仍然未见肿瘤形成, 准备进一步进行原位致瘤实验。

2.1.3 核型分析 染色体检测细胞核型为异倍体 (图 3A), 随机对 64 个细胞的中期分裂相核型进行分析, 染色体数目变化很大, 数目集中于 46~119, 众数集中于 51~70 (图 3B), 占所统计 64 个中期分裂相的 84.4%。

2.2 细胞来源鉴定

2.2.1 免疫细胞化学染色 免疫细胞化学染色结果显示 CK18、CK19、波形蛋白、PCNA 呈阳性, AFP 为弱阳性, Hep 呈阴性 (图 4)。作为上皮细胞标记物的 CK18 与 CK19 呈强阳性, 而肝癌细胞的标记物 AFP 与肝细胞标记物 Hep 则呈现低表达或不表达

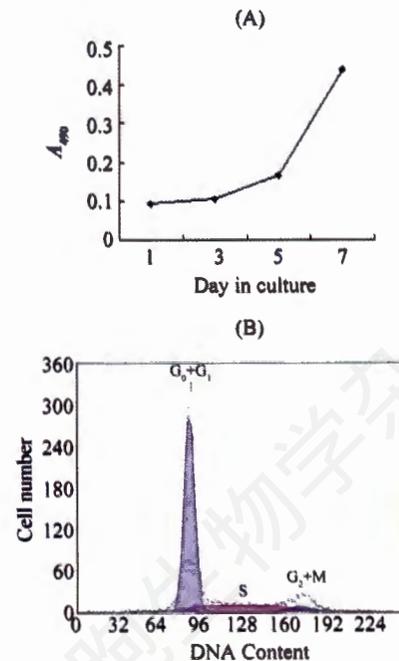


Fig.2 Biology characters

A: growth curve; B: cell cycle detected by FACs.

的特征, PCNA 与波形蛋白表达呈阳性与细胞增殖情况与恶性程度呈正相关。同时 SMMC-7721 细胞的免疫细胞化学染色的结果为 CK18、CK19、Hep、波形蛋白、PCNA 呈阳性表达, AFP 为弱阳性。

2.2.2 流式细胞仪检测 对不同代数肿瘤细胞进

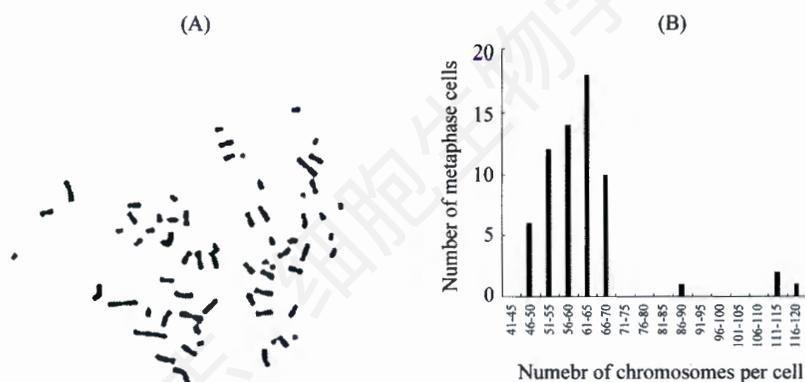


Fig.3 Karyotype analysis

A: karyotype of TJ3ZX-01 cell metaphase plate at passage 12 with 61 chromosomes (1 000×); B: distribution of chromosome number of 64 metaphase spreads at passages 12 of TJ3ZX-01 cell line.

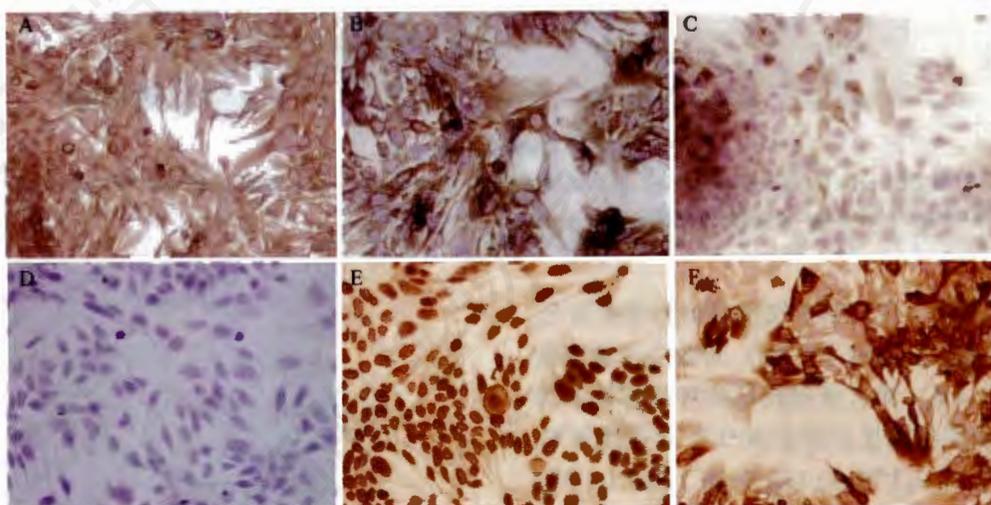


Fig.4 The result of immunocytochemistry (400×)

A: CK18; B: CK19; C: AFP; D: Hep; E: PCNA; F: vimentin. TJ3ZX-01 cell stained with DAB and nucleus stained with hematoxylin.

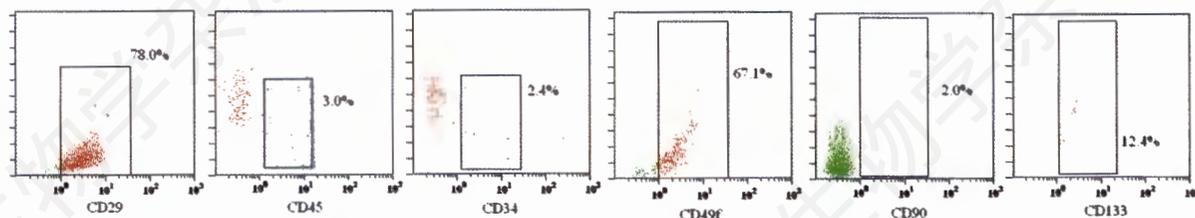


Fig.5 Flow cytometry analysis with different markers

行流式细胞术检测,测定 CD29 (FITC)、CD34 (PE)、CD45 (PE-Cy5)、Thy-1/CD90 (PE)、CD49f (FITC)、CD133 (PE)阳性细胞在肿瘤细胞中所占比例,结果显示肝细胞标记物 CD29、CD49f 在细胞中表达占细胞总数的 78.0%~83.2% 和 67.1%~73.9%,造血干细胞标记物 CD34 的表达占 2.4%~2.6%,干细胞与某些肿瘤干细胞的标志物 CD133 表达量为 12.4%~16.9%,肝干细胞与前体细胞标记物 CD90 阳性率为 1.0%~

2.0% (图 5),各种抗体的表达结果在细胞传代过程中基本保持稳定。

3 讨论

本实验所获得 TJ3ZX-01 细胞系来源于低分化原发性肝癌组织标本,利用各种细胞生物学方法^[12]对其细胞生物学特征进行了研究,结果显示细胞为上皮样细胞,呈克隆生长且生长过程中没有接触抑制现象;细

细胞具有异质性的特点,核异型,染色体为非整倍体,细胞具有侵袭能力并可以在软琼脂培养基中形成克隆,具有明显的肿瘤细胞特征;该细胞致瘤性较弱可能与细胞本身特征及细胞生长状态有关,同时受 SCID 小鼠品系与周龄及其接种的部位等诸多因素的影响,通过对该细胞各种生物学特征的初步鉴定,确认为一例原发性肝癌细胞系。

与人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞系^[13]相比较,两者在形态学上存在着较大的差异,显示着不同的细胞起源。通过免疫细胞化学与流式细胞分析,研究该低分化原发性肝癌细胞的起源,免疫染色结果表明该细胞系 CK18⁺、CK19⁺、波形蛋白⁺、PCNA⁺、AFP^{low}、Hep⁻,其中作为上皮细胞与胆管细胞标记物的 CK18、CK19 在该细胞与 SMMC-7721 细胞中均呈高表达,显示此例细胞与 SMMC-7721 细胞均具有前体细胞的特征;成熟肝细胞标记物 Hep⁻、CK19⁺ 显示此细胞来源不是肝细胞,而 SMMC-7721 细胞 Hep 表达呈阳性,认为与 SMMC-7721 细胞相比较,此细胞来源可能是更为原始的肝干细胞或者肝前体细胞;AFP 作为常见的肝癌检测标志物在部分肝癌中表达,本实验中肝癌细胞与 SMMC-7721 细胞 AFP 表达均较低,可能由于肝癌发展过程中的细胞改变导致某些肝癌特征消失,其特征也可能由于其细胞起源的不同而显示出一定的差异性;此外 PCNA 与波形蛋白表达成阳性与细胞增殖情况及恶性程度有关,其高表达代表细胞增殖情况良好并具有较高的恶性程度。

近年来对肝癌干细胞的研究取得较大进展,Chiba 等^[14]从几种肝癌细胞系中分离得到的 SP 细胞具有某些干细胞的性质,这种 SP 细胞出现于 Huh7 与 PLC/PRF/5 细胞系中,而 HepG2 与 Huh6 细胞中则没有发现,同时目前所研究的细胞系都集中在高分化原发肝癌细胞系,很少涉及到低分化原发性肝癌细胞。因此是否所有不同起源的肝癌细胞中都有干细胞特征细胞存在,以及其表面标记物是否相同目前仍然无法确定。本实验对该肝癌细胞进行流式细胞检测发现肝细胞标记物 CD29、CD49f 的高表达显示细胞仍然具有某些肝细胞性质,CD34 作为造血干细胞及其前体细胞的常用表面标记物在该细胞中也有少量表达,其含量也与大部分研究报道相符。CD133 作为常用的肿瘤干细胞标记物在多种肿瘤中均有报道,Kordes 等^[15]研究发现 CD133⁺ 的肝星状细胞具有前体细胞的性质,Yin 等^[16]在肝癌细胞系 SMMC-7721 中发现了具有干细胞性质的 CD133⁺ 细胞,Suetsugu 等^[17]

也在 Huh7 细胞系中发现了 CD133⁺ 细胞的表达,而在 HepG2 细胞系中则没有发现,本实验在对该细胞中 CD133 含量测定后发现 CD133⁺ 细胞占细胞总数的 12.4%~16.9%,远远高于 SMMC-7721 中的 0.1%~1%,同时低于在 Huh-7 中的 46.79%,其结果可能是由于不同类型肝癌中肿瘤干细胞之间的差异,也可能来源于体外培养过程中细胞产生的变异。CD90 (Thy-1) 作为肝干细胞与前体细胞标记物在成熟肝细胞中很少表达,Yang 等^[18]在研究肝癌细胞系中发现 CD90⁺ 细胞具有肿瘤干细胞性质,之后又通过对肝癌组织与肝癌患者外周血的研究发现 CD45⁻CD90⁺ 细胞为肝癌干细胞的标记物。其 CD90⁺ 细胞的表达量与该低分化原发性肝癌细胞系相似,大约为 2%。

通过对目前已知的肝癌干细胞的表面标记物检测显示,该低分化原发性肝癌细胞系中存在着这种来源于干细胞或前体细胞并与肝癌起源密切相关的肿瘤干细胞,其各种标记物细胞所占的比率也与目前报道的研究结果相一致,究竟不同起源的肝癌中是否都存在着肿瘤干细胞,各种肿瘤干细胞之间的特征是否相同,仍然需要进一步的研究。相信随着对不同起源肝癌的深入研究,将会对肝癌发生发展机制有新的认识,为临床上彻底治愈肝癌带来新的希望。

参考文献(References)

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111
- [2] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737
- [3] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988
- [4] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821-5828
- [5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401
- [6] Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1030-1037
- [7] Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946-10951
- [8] Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10158-10163
- [9] Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells, *J Gastroenterol Hepatol*, 2006, 21(7): 1093-1098
- [10] Sell S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell*

- Dev Biol*, 2002, 13(6): 419-424
- [11] Tovar V, Villanueva A, Llovet JM. Cell biology and genetics in liver cancer, *Gastroenterol Hepatol*, 2007, 30(6): 360-369
- [12] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养, 西安: 世界图书出版公司, 2004, 189-227
- [13] 董荣春, 周荣华, 吕发度, 等. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察, *第二军医大学学报*, 1980, 1(1): 5-9
- [14] Chiba T, Kita K, Zheng YW, *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties, *Hepatology*, 2006, 44(1): 240-251
- [15] Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, *et al.* CD133⁺ hepatic stellate cells are progenitor cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(2): 410-417
- [16] Yin S, Li J, Hu C, *et al.* CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity, *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-1450
- [17] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al.* Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4): 820-824
- [18] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer, *Hepatology*, 2008, 47(3): 919-928

Establishment of A Poorly Differentiated Hepatocellular Carcinoma Cell Line TJ3ZX-01 and Research for Its Cellular Origin

Shi-Guang Zhang, Ying-Tang Gao^{1,2}, Wen-Qin Song, Li Chen, Zheng-Yan Zhu², Yi-Jun Wang¹, Peng Wang², Zhi Du^{1,2*}
 (College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; ¹Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China; ²Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin 300170, China)

Abstract Cancer cell line TJ3ZX-01 were separated from poorly differentiated hepatocellular carcinomas specimen by the tissue dissection method, and their biological characteristics were identified. The cellular origin of the poorly differentiated HCC cell line was investigated with immunocytochemistry and flow cytometry analysis. Immunocytochemistry detection showed CK18⁺, CK19⁺, vimentin⁺, AFP^{low}, PCNA⁺ and Hep⁻, which demonstrated the cancer cell line had the characteristics of epithelial cells but not the obvious characteristics of liver cells for the markers of the liver cell were low. The liver cell and stem cells surface markers CD29, CD34, CD45, Thy-1 (CD90), CD133 and CD49f expressed in the cell line were stable with passages. A small subset of cells in the cancer cells might has the characters of stem cells or progenitor cells, which indicated that this hepatocellular carcinomas cell line originated from stem cells or progenitor cells.

Key words poorly differentiated; hepatocellular carcinomas; cancer stem cell; cellular origin

Received: May 21, 2008 Accepted: September 8, 2008

This work was supported by the Key Project of Science and Technology of Tianjin City (No.05YFSZSF02500) and the Foundation of Tianjin City (No.08JCYBJC08300)

*Corresponding author. Tel: 86-22-84112128, E-mail: zhi-du@163.com