

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01126

## 肝癌中少量侧群细胞的分离、纯化及在体内荷瘤能力

王鑫,何雅琴,杨文,王红阳\*

第二军医大学东方肝胆外科研究所国际合作信号转导研究中心,上海 200438

**[摘要]** **目的** 从侧群(side population, SP)表型细胞具有干细胞特性的角度出发,对肝癌细胞系中的 SP 细胞进行检测、分离和评价。**方法** 利用 SP 细胞能将荧光染料 Hoechst33342 泵到细胞外的特性,结合流式细胞技术进行分离纯化。**结果** 在肝癌细胞系 PLC、Huh7、Hep3B、SMMC7721 及 1 例临床肝癌组织中检测到 SP 细胞的比例依次为 0.8%、0.3%、0.6%、0.3%、0.4%;未在 HepG2 中检测到 SP 细胞。NOD-SCID 荷瘤实验发现 SP 细胞较非 SP 细胞具有更高的成瘤性。**结论** 肝癌细胞系及标本组织含有少量的 SP 细胞,这些 SP 细胞比非 SP 细胞具有更强的成瘤性,为进一步分析 SP 细胞的肿瘤干细胞特性奠定了基础。

**[关键词]** 肝肿瘤;肝细胞癌;肿瘤干细胞;侧群细胞;肿瘤发生;Hoechst33342

**[中图分类号]** R735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1126-05

### Enrichment and tumorigenicity identification of cells with side population phenotype from hepatocellular carcinoma in NOD-SCID mice

WANG Xin, HE Ya-qin, YANG Wen, WANG Hong-yang\*

International Co-operation Laboratory on Signal Transduction, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To identify, isolate, and evaluate cells with side population phenotype (SP, with the property of stem cells) from hepatocellular carcinoma. **Methods** Capable of pumping fluorochrome Hoechst33342 outside of cells, SP cells were isolated and purified by flow cytometry. **Results** We found that the ratios of SP cells in PLC, Huh7, Hep3B, SMMC7721 cell line and an HCC specimens were 0.8%, 0.3%, 0.6%, 0.3%, and 0.4%, respectively. We did not find SP cells in HepG2. NOD-SCID subcutaneous transplant experiments showed that SP cells had a high ability of tumorigenicity than non-SP cells. **Conclusion** Hepatocellular carcinoma cell lines and specimens contain a small number of SP cells, which have a higher tumorigenicity than non-SP cells; this finding paves a way for further analysis of the stem-like property of SP cells.

**[Key words]** liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; neoplastic stem cells; side population; tumorigenesis; Hoechst33342

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(10):1126-1130]

近几年,乳腺癌干细胞、脑瘤干细胞以及急慢性髓系白血病干细胞等的发现不断证明着肿瘤干细胞假说的正确性;肿瘤中存在着肿瘤干细胞,只有少部分肿瘤干细胞具有成瘤能力并维持肿瘤表型,实体肿瘤是一种干细胞疾病的新观点正在被人们接受<sup>[1-2]</sup>。由于肿瘤干细胞缺乏高度特异性的表面标志,如何分离、评价肿瘤干细胞是当前研究的热点。目前是否是肿瘤干细胞主要依靠肿瘤干细胞移植 NOD-SCID 小鼠体内荷瘤情况来加以评价<sup>[3]</sup>。

1996 年, Goodell 等<sup>[4]</sup>在用 DNA 染料 Ho-

echst33342 为小鼠全骨髓细胞染色进行流式分析细胞周期时,意外发现有一群细胞染色偏低,这部分细胞占骨髓细胞的 0.05%,其中富含造血重建细胞,横向侧群细胞(side population, SP)由此得名。这一发现提示 SP 可能是干细胞的表型。2006 年, Chiba 等<sup>[5]</sup>发现肝癌细胞系中存在少量 SP 细胞, NOD-SCID 鼠接种  $1 \times 10^3$  的 SP 细胞能够成瘤,而接种  $1 \times 10^6$  的非 SP 细胞不能够成瘤,推断肝癌 SP 细胞可能是肿瘤干细胞。本研究旨在探索出一套可靠、稳定的 SP 细胞检测分选体系,并观察分离培养的

[收稿日期] 2011-04-25

[接受日期] 2011-08-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30600333)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30600333)。

[作者简介] 王鑫,博士。E-mail: wang3j@gmail.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875361, E-mail: hywangk@vip.sina.com

SP 细胞的生物学特性。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 肝癌细胞系 PLC、Huh7、Hep3B、HepG2 细胞由德国马普生化所提供, SMMC7721 细胞购自中国科学院上海细胞库。肝癌组织样本取自第二军医大学东方肝胆外科医院原发性肝细胞肝癌患者的手术切除组织, 获患者知情同意。4~6 周龄雄性 NOD-SCID 小鼠购自上海斯莱克实验动物中心[实验动物许可证号 SCXK(沪)2008-2006, 合格证号 0056407], SPF 级饲养环境, 小鼠笼具、饮水、垫料均经消毒处理, 用<sup>60</sup>Co 辐照专用饲料喂养。染料 Hoechst33342、阻断剂维拉帕米(verapamil)购自 Sigma-Aldrich 公司, Matrigel 胶购于 Invitrogen 公司。

1.2 主要仪器 紫外流式细胞分选仪(Beckman Coulter 公司), FACSCalibur 流式细胞分析仪(BD 公司), 血小板计数器、倒置相差显微镜系统(Olympus 公司)。

1.3 肝癌标本细胞的分离 采用 Seglen 体外灌流法<sup>[6]</sup>分离肝癌细胞。无菌条件下, 取手术肝癌组织标本 100 mg, 将标本置于培养皿中, 用 37℃ 含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 前灌洗液自残存血管中反复灌注, 至大部分呈灰白色, 用 37℃、0.05% 的胶原酶解离组织, 37℃ 震荡, 消化 30 min, 三层无菌纱布过滤, 900×g 离心 4 min, 弃上清, 如此反复 3 次, 最后用含 10% 胎牛血清 DMEM 完全培养液制成密度为 1×10<sup>6</sup>/ml 的单细胞悬液。

1.4 肝癌细胞系、标本组织中 SP 表型检测及分选 血小板计数器精确计数细胞量, 使细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/ml; 在细胞悬液中加入 Hoechst33342, 使其终浓度为 5 μg/ml, 放入 37℃ 恒温水浴箱中孵育 90 min, 每 30 min 摇匀一次; 4℃ (800~1 000)×g 离心 10 min, 用 4℃ 含 20 μg/ml PI 的 IMDM 培养液重悬细胞, 以标记死细胞; 上紫外流式细胞仪检测, 激发光波长为 350 nm, 采集波长为 450 nm 和 675 nm, 350 UV 激发光源, 610 nm 双色短通反射滤镜, 450 nm 和 675 nm 边缘长通滤片分别检测散射光蓝光及红光部分, 线性模式采集信号, 测量前向散射和侧向散射二维参数图, 检测细胞均一性。以 Hoechst red 为 X 轴, Hoechst blue 为 Y 轴作二维散点图, 将 Hoechst red 及 Hoechst blue 且 verapamil 处理组缺失的区域设定为 SP 细胞的“门”(gate), 方便划选 SP 细胞及 Non-SP 细胞, 以便不同批次样本的检测和分选, 得到发光偏弱的就是 SP 细胞<sup>[7]</sup>。分选出 SP 细胞及 Non-SP 细胞, 同时以 verapamil 处理组作为

对照。

1.5 SP 细胞周期检测 迅速用 PBS 清洗分选出的 PLC-SP 细胞 3 次, (600~800)×g 离心、70% 乙醇重悬细胞, 4℃ 固定 0.5 h, PBS 清洗 3 次, 100 μg/ml RNase 室温静置 30 min; 用 20 μg/ml 的 PI 染色后上 BD FACSCalibur 流式仪进行分析。

1.6 SP、Non-SP 细胞生物学性状观察 取分选及培养的各种细胞在倒置显微镜下观察其延展贴壁、生长情况、细胞形态等特征的变化。

1.7 NOD-SCID 小鼠荷瘤实验 将培养至 85% 融合的肝癌系 PLC 细胞消化、离心, 制成 DMEM 培养液加 Matrigel 胶 100 μl 单细胞悬液, 按 1×10<sup>2</sup>、1×10<sup>3</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>6</sup> 的细胞量分别接种至 NOD-SCID 小鼠背部皮下。对分选出的 PLC-SP、Non-SP、SMMC-SP、Non-SP 细胞同前方法分别按照 1×10<sup>3</sup>、2×10<sup>4</sup> 的细胞量接种至 NOD-SCID 小鼠背部皮下。左背皮下接种 Non-SP 细胞, 右背皮下接种 SP 细胞, 每只 NOD-SCID 小鼠保证 2 处接种细胞量相同。不间断记录临床病变, 16~20 周后统计成瘤率, 部分处死后解剖观察瘤体。每组注射 6 只。

## 2 结果

2.1 肝癌细胞系、肝癌标本组织中 SP 检测 通过 Hoechst33342 蓝光和红光双参数图, SP 细胞亚群位于左下角 2 种荧光均为阴性或很弱的区域, 此区域在活细胞中所占的比例即为肿瘤细胞株中 SP 细胞的含量; 决定所分选的肝癌细胞中是否为真正意义上的 SP 细胞, 以 verapamil 能否阻断 Hoechst33342 染色为标准, 当加入 verapamil 后 SP 细胞亚群数量明显减少至 0.01% 甚至为 0, 方可证实细胞株中确实存在 SP 细胞。通过多次重复检测, 在 PLC、Huh7、Hep3B、SMMC7721 细胞系中分选的 SP 细胞比例分别为 0.8%、0.3%、0.6%、0.3%, 从 1 例原发性肝细胞肝癌的癌组织中分选的 SP 细胞比例为 0.4%。未在 HepG2 中检测到 SP 细胞。具体结果见图 1。

2.2 PLC-SP 细胞的细胞周期分析 结果显示: 在 PLC 细胞中, G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub>~M 期、S 期的细胞比例分别为 49.87%、10.62%、39.51%。G<sub>2</sub>~M 期和 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期峰形曲线平滑, 没有肩峰(图 2A)。而 PLC-SP 细胞绝大部分都在 G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 静止期。G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub>~M 期、S 期的细胞比例分别 90.15%、0.00%、9.85%(图 2B)。同时检测划选的 C 门的 Non-SP 细胞也为二倍体型。

2.3 克隆形成能力分析 分选出的肝癌细胞系 SP、Non-SP 在 5 h 内均大部分贴壁, 弃去未贴壁细

胞,贴壁 24 h 后可明显观察到多个“岛屿”样的细胞集落,细胞形态呈上皮样三角形状;Non-SP 细胞胞膜皱缩、伸展不良但未出现明显的死亡细胞。培养

5 d 后,可见 SP 细胞以集落为中心向四周扩散,细胞状态良好。Non-SP 细胞也见增殖,但未见明显集落,呈分散状态,细胞状态欠佳(图 3)。

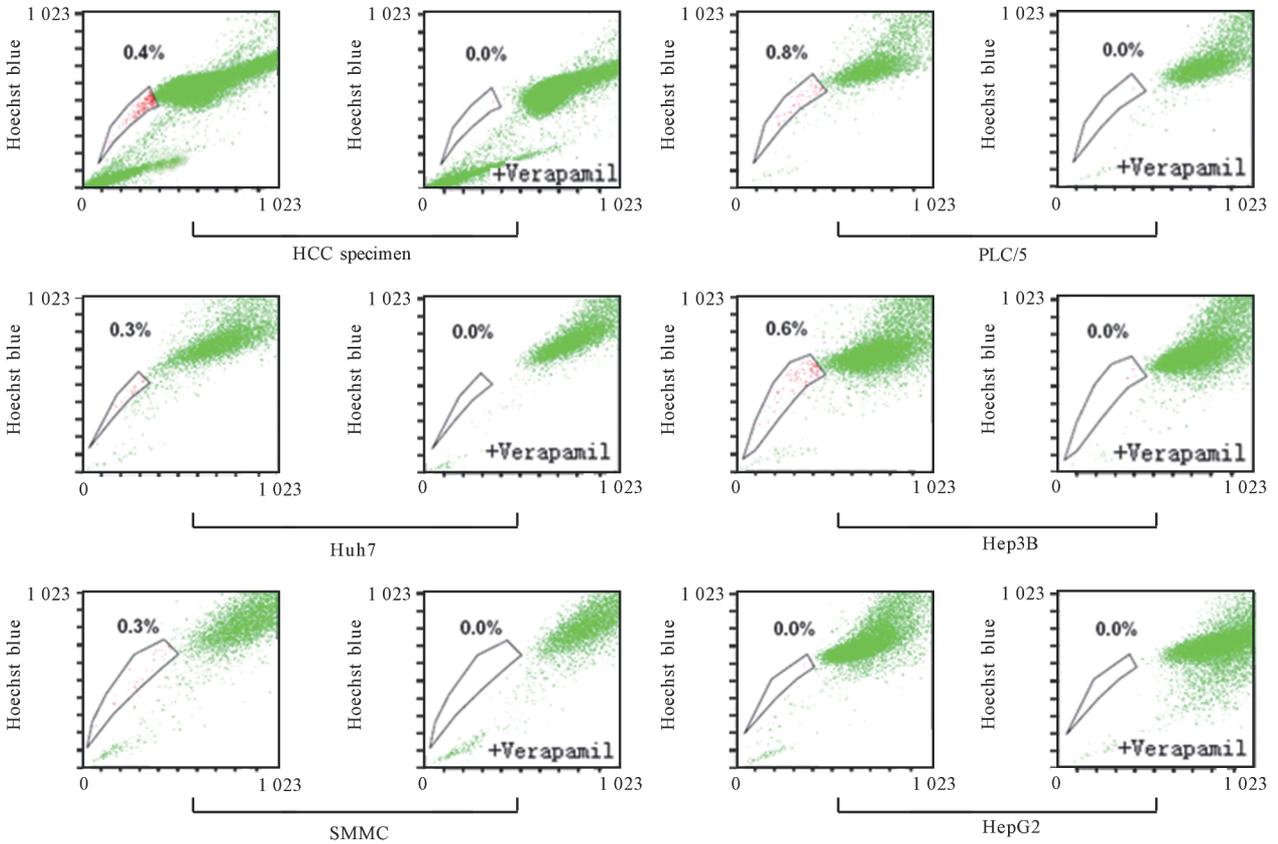


图 1 肝癌细胞系、肝癌标本组织中的 SP 表型细胞的检测

Fig 1 SP phenotype analysis of hepatocellular carcinoma cell lines and tumor tissue by FACS

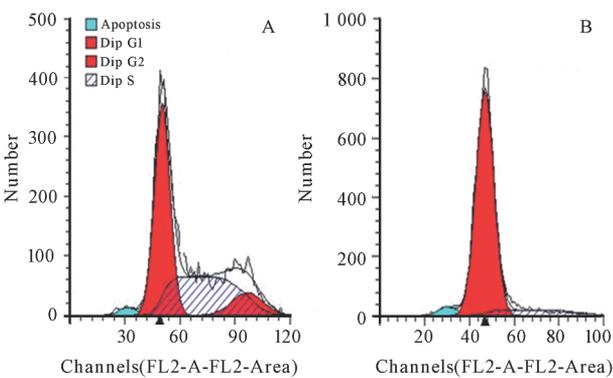


图 2 未处理 HCC(A)及 SP(B)细胞周期检测

Fig 2 Cell cycle analysis of sorted SP cells and unsorted cells for PLC/PRF/5

A: Unsorted HCC cells; B: HCC-SP cells

2.4 荷瘤实验 分别接种  $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  个正常培养的 PLC 细胞的 NOD-SCID 小鼠在荷瘤 16 周后解剖,各处均未见瘤体;而接种  $1 \times 10^6$  个正常培养的 PLC 细胞的 NOD-SCID 小鼠在 4

周时皮下 2 处接种位置均可触摸到米粒大小的瘤体,8 周时瘤体明显突出。接种 SP、Non-SP 细胞的 NOD-SCID 小鼠 16 周后在左侧皮下均未触摸到瘤体。右侧接种  $1 \times 10^3$  个、 $2 \times 10^4$  个 PLC-SP、SMMC7721-SP 的 NOD-SCID 小鼠在接种后约 6 周发现瘤体,小鼠在接种后 16 周成瘤情况及成瘤率见表 1,成瘤情况见图 4。

### 3 讨论

肿瘤干细胞理论提出,单个肿瘤干细胞即可不断自我更新,通过不对称分裂持续增殖,导致新生肿瘤的形成,提示肿瘤干细胞在肿瘤的发生发展中的地位和作用<sup>[2,8]</sup>。SP 细胞是指能将 Hoechst33342 泵出细胞外的一类细胞,首先由 Goodell 等<sup>[4]</sup>在分析细胞周期时发现报道。Hoechst33342 是一种亲脂性荧光活性染料,可跨膜进入活细胞,与 DNA 特异性结合,它主要结合在富含 AT 区域的 DNA 小沟部分。结合 DNA 后荧光大大增强,最大激发光波长约

为 350 nm, 最大发射光波长约为 461 nm<sup>[4,7,9]</sup>。利用 SP 细胞能将 Hoechst33342 染料泵出细胞膜外的特性, 结合流式细胞术分离纯化 SP 细胞, 或将成为肿瘤干细胞分离的经典途径<sup>[10-12]</sup>。2006 年, Chiba 等<sup>[5]</sup>从几种肝癌细胞系中分离出少量 SP 细胞, SP 细胞含量稀少, 因此检出的难度较大; 且其含量也不稳定, 常受培养液、细胞密度、染料浓度、染色时间等多种因素影响, 细胞的培养量也要很高。为进一步

核实, 本研究从肝癌患者术后样本组织中也检测到了 SP 表型细胞。本研究经反复检测, 在肝癌细胞系 PLC、Huh7、Hep3B、SMMC7721 及 1 例临床肝癌组织中检测到 SP 细胞, 含量分别为 0.8%、0.3%、0.6%、0.3%、0.4%, 但未在 HepG2 中检测到 SP 细胞; 对分选出的 SP 细胞进行了集落形成能力、细胞周期、超微结构等方面的鉴定。

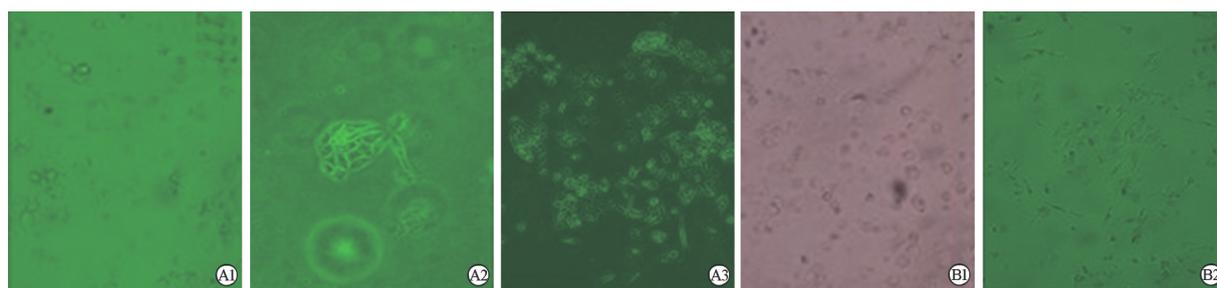


图 3 SP、Non-SP 细胞活性、增殖能力、集落形成对比

Fig 3 Viability, proliferation, and colony-forming efficiency of SP and non-SP cells

A1: SP-5 h; A2: SP-24 h; A3: SP-cultured; B1: Non-SP-5 h; B2: Non-SP-5 d. Original magnification:  $\times 200$ (A1, B1);  $\times 100$ (A2, A3, B2)

表 1 NOD-SCID 小鼠皮下异种细胞移植实验

Tab 1 Tumor-formation experiment of SP cells in NOD/SCID xenotransplant assay

Cell type of inoculation	Cell numbers for injection				
	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1(2) \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$
PLC/5 Unsorted (Unsorted▲Unsorted)	0/1▲0/1	0/1▲0/1	0/1▲0/1	0/1▲0/1	1/1▲1/1
PLC/5 Sorted (Non-SP▲SP)		0/6▲6/6	0/5▲4/5		
SMMC7721 Sorted (Non-SP▲SP)		0/6▲5/6	0/6▲6/6		

▲: Represents mouse. Unsorted cells, sorted SP, and non-SP cells were injected subcutaneously in NOD-SCID mice. A mouse was excluded because of death after inoculation

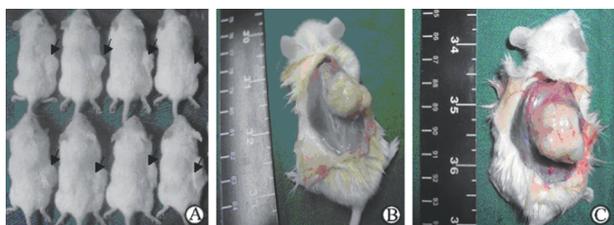


图 4 NOD-SCID 小鼠荷瘤实验 16 周时观察成瘤效果

Fig 4 Tumor formation in NOD-SCID mice

16 weeks after inoculation

A: Tumor formation after inoculation of sorted SP and non-SP cells from SMMC and PLC cells; B: Tumor observed 16-week after inoculation of sorted SP cells from SMMC; C: Tumor observed at 16-week inoculation of sorted SP cells from PLC

由于 SP 细胞具有较强成瘤性的机制尚不明确, 目前以  $\leq 1 \times 10^3$  的 SP 细胞在 NOD-SCID 小鼠体内的成瘤率作为评价肿瘤干细胞属性的重要标准<sup>[13-14]</sup>。NOD-SCID 小鼠, 即 NOD-SCID 免疫三缺

陷小鼠-T/B 缺陷, 可高度模拟人体内环境。本研究对 SP 细胞是否具有肿瘤干细胞高致瘤性的特征进行验证, NOD-SCID 荷瘤实验发现 SP 细胞亚群比 Non-SP 细胞亚群具有明显的更高的成瘤性, Non-SP 细胞亚群中则几乎只含有不能形成克隆集落的肿瘤细胞, 提示这可能与 SP 细胞亚群中富集了肿瘤干细胞有关<sup>[11,14]</sup>。

肿瘤干细胞的发现为肿瘤研究带来了全新的视角<sup>[15]</sup>, 肿瘤干细胞引出的一系列问题将成为今后肿瘤研究的重点<sup>[16]</sup>。相信随着研究的深入, 发现肿瘤干细胞的作用机制, 进而逐步揭开肿瘤真相, 研制新的靶向肿瘤干细胞的药物, 将使人类向攻克肿瘤的目标迈进一大步<sup>[17]</sup>。

(志谢 复旦大学医学院明道楼流式分析中心张国平老师对本实验给予了很大的支持和帮助, 在此表示衷心感谢!)

## [参考文献]

- [1] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [2] Bjerkvig R, Tysnes B B, Aboody K S, Najbauer J, Terzis A J. Opinion: the origin of the cancer stem cell; current controversies and new insights[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 899-904.
- [3] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, Morrison S J, Clarke M F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983-3988.
- [4] Goodell M A, Brose K, Paradis G, Conner A S, Mulligan R C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 1797-1806.
- [5] Chiba T, Kita K, Zheng Y W, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties[J]. *Hepatology*, 2006, 44: 240-251.
- [6] Seglen P O. Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion[J]. *Exp Cell Res*, 1973, 82: 391-398.
- [7] Hirschmann-Jax C, Foster A E, Wulf G G, Goodell M A, Brenner M K. A distinct "side population" of cells in human tumor cells; implications for tumor biology and therapy[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4: 203-205.
- [8] Ailles L E, Weissman I L. Cancer stem cells in solid tumors[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 5: 460-466.
- [9] Telford W G, Bradford J, Godfrey W, Robey R W, Bates S E. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye[J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 1029-1036.
- [10] Lu S, Tian J, Lv Z, Wang H, Bai X, Liu W, et al. The probable role of tumor stem cells for lymph node metastasis in supraglottic carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17: 33-38.
- [11] Challen G A, Little M H. A side order of stem cells; the SP phenotype[J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 3-12.
- [12] Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L, et al. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis[J]. *FASEB*, 2004, 18: 376-378.
- [13] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. *Nature*, 1994, 367: 645-648.
- [14] Asakura A, Rudnicki M A. Side population cells from diverse adult tissues are capable of *in vitro* hematopoietic differentiation[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30: 1339-1345.
- [15] Zhu Z, Hao X, Yan M, Yao M, Ge C, Gu J, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> population in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 2067-2078.
- [16] Bunting K D. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells[J]. *Stem Cells*, 2002, 20: 11-20.
- [17] Byun T, Karimi M, Marsh J L, Milovanovic T, Lin F, Holcombe R F. Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues; potential role in stem cell homeostasis [J]. *J Clin Pathol*, 2005, 58: 515-519.

[本文编辑] 尹 茶

## · 书 讯 ·

## 《你能战胜糖尿病》已出版

本书由邹大进主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0252-6,大32开,定价:20.00元。

本书由长期从事糖尿病临床工作的一线专家编著。内容涵盖了对糖尿病的认识、诊断、治疗及调养等,书中还记录了多位患者与糖尿病作斗争的成功经验。全书文字通俗易懂、深入浅出,实用性强,适合于广大糖尿病患者及其相关人员阅读。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通信地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>