

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00001

来源于门静脉癌栓的人肝癌细胞系 CSQT-1 的建立及生物学特性分析

胡华生¹,程树群^{1*},石洁¹,郭卫星¹,薛捷¹,李楠¹,谢东²,吴孟超¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肿瘤综合治疗科,上海 200438

2. 中国科学院上海生命科学研究院营养研究所,上海 200032

[摘要] **目的:**从肝癌及门静脉癌栓中分别取材建立人肝癌细胞系,探讨其生物学特性。**方法:**取人肝癌及门静脉癌栓新鲜手术标本,利用胶原酶消化法进行肿瘤细胞原代培养并扩大克隆培养建系。采用光镜、电镜、染色体核型分析及异种移植瘤实验对新建细胞系生物学特性进行观察。**结果:**来源于门静脉癌栓的人肝癌细胞在体外稳定培养已经将近1年,传至100余代,命名为CSQT-1。该细胞系具有典型的恶性上皮细胞特征,其群体倍增时间为48 h;染色体中位数为87~90,为亚四倍体;裸鼠皮下异种移植可形成移植瘤,该细胞系中CD133⁺表达比较稳定。**结论:**细胞系特征显示该细胞系是一株新建的来源于门静脉癌栓的人肝癌细胞系。

[关键词] 肝肿瘤;细胞系;门静脉;肿瘤循环细胞;肿瘤干细胞

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0001-04

Establishment and characterization of a human hepatocellular carcinoma cell line CSQT-1 derived from portal vein tumor thrombus

HU Hua-sheng¹, CHENG Shu-qun^{1*}, SHI Jie¹, GUO Wei-xing¹, XUE Jie¹, LI Nan¹, XIE Dong², WU Meng-chao¹

1. Department of Oncological Comprehensive Treatment, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Institute of Nutritional Sciences, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai 200032

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a human hepatocellular carcinoma cell line derived from portal vein tumor thrombus and study its biological characteristics. **Methods:** Specimens of liver cancer and its metastasis-portal vein tumor thrombi (PVTT) were freshly resected during operation. The tissues were primary cultured by collagenase I digestion method and proliferated. The cell line derived from PVTT grew well. The biological characteristics of the cells were studied by light microscopy, electron microscopy, chromosome analysis, and transplantation experiment. **Results:** The cell line derived from portal vein tumor thrombus, named CSQT-1, has been cultivated for one year and sub-cultured for more than 100 passages *in vitro*. The cells either grew as compact colonies (in clusters) or as a monolayered sheet, with a doubling time of 48 h, and exhibited a typical malignant epithelial morphology. The median range of chromosome number was 87-90. Tumor nodes were observed under the skin of nude mice after subcutaneous xenograft transplantation for a month. The established cell line stably expressed CD133. **Conclusion:** We have successfully established a human hepatocellular carcinoma cell line from PVTT.

[KEY WORDS] liver neoplasms; cell line; portal vein; neoplasm circulating cells; cancer stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):1-4]

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。近年来,肝癌患者的总体疗效虽有一定提高,但大部分中晚期患者由于已发生门静脉转移形成门静脉癌栓,手术切除率低,术后复发率高^[1],总体疗效仍不

满意。肝癌转移的重要原因之一即为向门静脉内生长而形成门静脉癌栓^[2-3]。国内外对其形成机制的研究还不够系统和深入,并缺乏相应的研究平台。本研究采用体外原代培养的方法,成功建立一株来

[收稿日期] 2008-06-11 **[接受日期]** 2008-09-18

[基金项目] 上海市科委基础研究重点资助项目(07JC14066),上海市教育发展基金会曙光学者培养计划资助项目。Supported by Key Basic Research Program Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai(07JC14066) and Shuguang Scholar Program of Education Development Foundation Committee of Shanghai.

[作者简介] 胡华生,硕士生。E-mail:huhuasheng@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81870785, E-mail:chengshuqun@yahoo.com.cn

源于人肝癌门静脉癌栓的肝癌细胞系,为研究肝癌门静脉癌栓形成机制提供实验材料。

1 材料和方法

1.1 标本来源 标本取自我院收治的43岁男性肝癌患者。术前征得患者本人同意,签署知情同意书。术后病理诊断为:肝细胞癌,粗梁型Ⅲ级;伴门静脉癌栓。

1.2 培养方法 将手术切除的新鲜肝癌及门静脉癌栓标本浸入到含抗生素的RPMI1640培养液中,4℃条件下送实验室。在无菌操作台内,将新鲜组织剔除血管、包膜、血污及坏死组织,然后剪碎成约 1.0 mm^3 大小,用D-Hank液充分洗涤后,用无菌剪刀把组织剪成浆糊状,加入0.1% I型胶原酶溶液1 ml,37℃恒温水浴振荡消化15~30 min,经直径 $72\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛滤过,除去未消化组织,将细胞接种于一次性塑料培养皿中($d=35\text{ mm}$),放入5.0%CO₂、37℃培养箱中培养。隔天换一次液,待细胞长满瓶底面积80%左右按1:2传代。

1.3 细胞增殖动力学测定 利用常规MTT法绘制细胞生长曲线,利用半高度法计算细胞群体倍增时间;按以下步骤完成克隆形成实验并计算克隆形成率:接种分散均匀的细胞于6孔板,每孔1 000个细胞,静止培养2~3周,当培养板中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。甲醇固定后加适量结晶紫染色,计数克隆数。克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

1.4 细胞特性检测 按常规方法,取第40代细胞进行R显带核型分析,流式细胞仪检测CSQT-1细胞周期(PI染色法),分别取第10代和第40代细胞培养上清进行AFP、HBsAg检测。根据文献^[4]的方法,将第15代和35代的细胞进行CD133抗体标记后上流式细胞仪分析。

1.5 裸鼠成瘤实验 取第40代对数生长期的CSQT-1细胞;6只BALB/c-nu/nu裸鼠(4~6周龄,购自上海中国科学院斯莱克实验动物研究中心)每只在双侧鼠背部皮下接种CSQT-1细胞悬液,按接种细胞数量不同分为2组,A组裸鼠每只接种细胞数为 8×10^5 (0.2 ml),B组裸鼠每只接种细胞数 8×10^6 (0.2 ml)。观察成瘤情况。

2 结果

来源于门静脉癌栓的人肝癌细胞在体外稳定培养已经将近1年,稳定传代至100代,命名为CSQT-1,而来源于同一患者的肝癌原发灶的细胞则未能在体外稳定传代。

2.1 形态观察 在倒置相差显微镜下观察培养的活细胞,大多呈椭圆形,肿瘤细胞排列紧密,接触性抑制丧失(图1)。扫描电镜显示细胞表面有微绒毛或指状突起(图2)。透射电镜显示细胞外形不规则,核大有畸变,核质比例增大,核膜有凹陷,胞质内有丰富的游离核糖体、粗面内质网、溶酶体等细胞器,清晰可见,细胞表面有微绒毛,可见细胞间紧密连接(图3),未发现支原体污染。

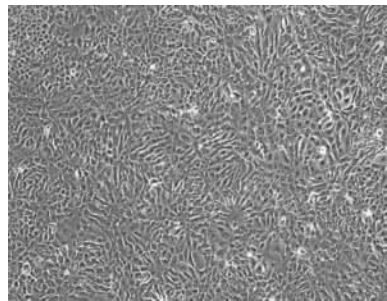


图1 单层生长的细胞形态上呈典型的恶性上皮细胞特征

Fig 1 Cells grow in monolayer sheets and exhibit a typical malignant epithelial morphology

Original magnification: ×40

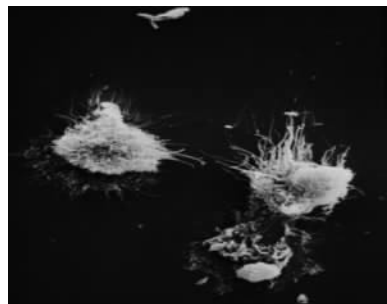


图2 细胞表面可见微绒毛

Fig 2 Microvilli on cell surface

Original magnification: ×2 000

2.2 细胞特性检测 细胞分别在DMEM培养液和DMEM/F12培养液条件下,绘制出该细胞系的生长曲线(图4),利用半高度法计算细胞群体倍增时间为48 h;通过计算得到肿瘤细胞的克隆形成率为20%。第10代和第40代的细胞上清均检测不到AFP和HBsAg的分泌。第15代细胞CD133⁺所占比例约为24.53%,第35代细胞CD133⁺所占比例约为22.67%,不同代数之间的细胞其CD133⁺的细胞比例比较稳定。

2.3 细胞遗传学特征 R显带分析显示该细胞系染色体来源于人,但结构和数量均异常,介于三倍体和四倍体之间,中位数在87~90条,为亚四倍体(图5)。检测25个细胞核型发现,染色体12号、19号、22号数

量各增加 1 条, 占 100% (25/25); 结构异常方面, 9q⁺ 和 16p⁺ 均占 100% (25/25); 其他出现频率大于 50%

的数量和结构异常的情况见表 1。DNA 周期分析: G₁ 期为 64.43%, G₂ 期为 19.13%, S 期为 10.38%。

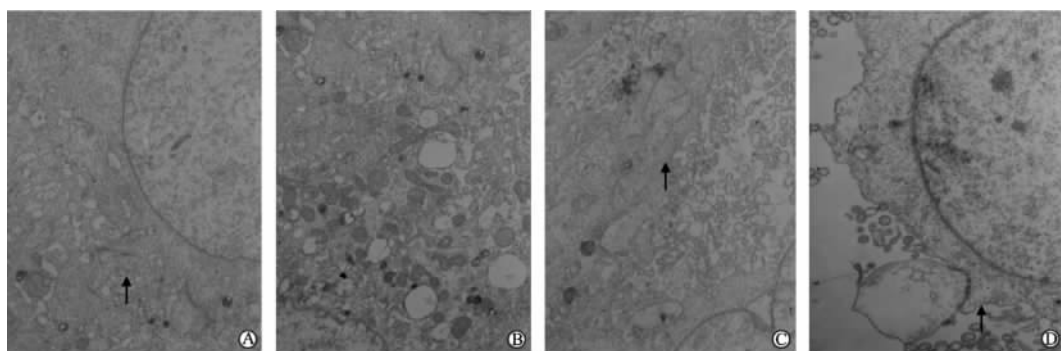


图 3 CSQT1 细胞透射电镜照片

Fig 3 Microphotographs of CSQT-1 cell line (transmission electron microscope, TEM)

A: Golgiosome (arrow); B: Mitochondrion; C: Rough endoplasmic reticulum (RER, arrow); D: Desmosome (arrow). Original magnification: ×3 250(A-C); ×7 500(D)

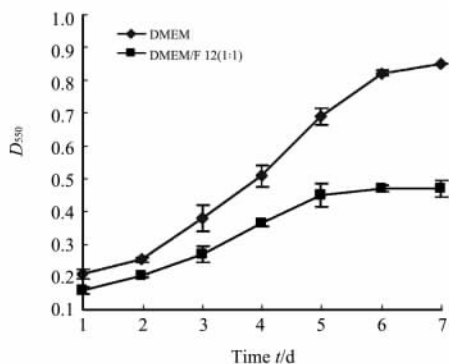


图 4 细胞在两种不同培养基中的生长曲线图

Fig 4 Growth curves of cells in two different media

n = 3, $\bar{x} \pm s$

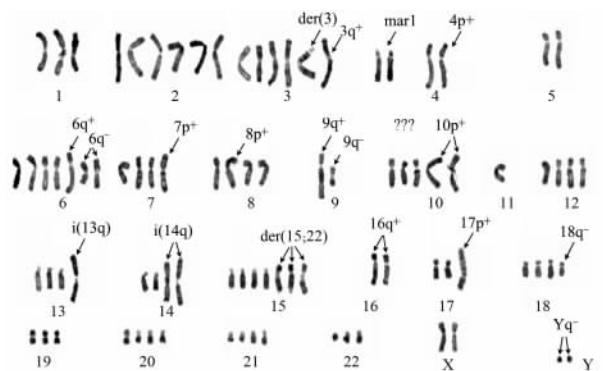


图 5 细胞染色体核型分析

Fig 5 Chromosome karyotype analysis

表 1 25 个细胞染色体核型分析数量和结构异常表 (出现频率 > 50%)

Tab 1 Frequency of abnormal chromosomes in 25 karyotypes (40 passage)

Extra chromosome	Frequency	Extra chromosome	Frequency	Abnormal chromosome	Frequency
+1	15	+18	20	8p ⁺	15
+2×2	19	+19	25	9q ⁻	15
+6	15	+20×2	20	10p ⁺	15
+10	20	+21	15	17p ⁺	20
+12	25	+22	25	18q ⁻	20
+13	20	+X	21	9q ⁺	25
+14	15			16p ⁺	25

Frequency of abnormal chromosomes is over 50% of karyotypes analysed

2.4 异体成瘤 取第 40 代对数生长期的 CSQT-1 细胞分别接种于裸鼠皮下, A 组每只鼠接种 8×10⁵ 个细胞, 有 2 只裸鼠从第 3 周开始出现肿瘤块, 另外 1 只注射部位的注射包块随时间延长而逐渐消失, 1 个月成瘤率为 66.7% (1/3); B 组裸鼠每只接种 8×

10⁶ 个细胞, 从第 10 日 3 只均开始出现明显的肿瘤块, 至 1 个月时裸鼠成瘤率为 100% (3/3), 肉眼观察肿瘤块有明显的血供。病理组织学检查可见癌细胞生长旺盛, 核分裂相增多, 与该患者原肿瘤标本病理结果基本一致 (图 6)。

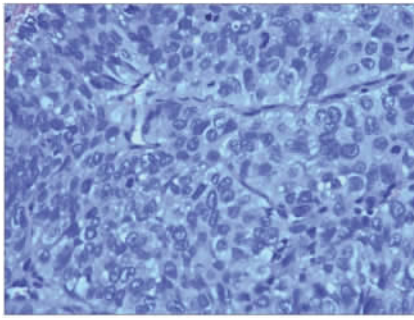


图6 皮下瘤病理检查结果

Fig 6 Histology of xenograft in nude mice(H-E)

Original magnification: $\times 40$

3 讨论

一系列人肝癌细胞系的建立,为在分子生物学水平上探讨肝癌的发病机制、演变及治疗方法,提供了理想的体外模型。目前肝癌细胞建系的瘤源大多取自患者肝癌原发灶或人肝癌裸鼠模型的皮下瘤及肺转移灶等^[5-8],而从门静脉癌栓取材进行细胞建系的报道非常少,仅 Hu 等^[9]报道从门静脉癌栓中及其肝内原发灶中同时进行原代培养,并通过核型分析和比较基因组杂交技术得出染色体 8p 缺失可能与门静脉癌栓形成有关的结论,并未做细胞建系的相关鉴定工作。本实验中通过光镜及扫描、透射电镜观察证实,CSQT-1 符合上皮样恶性细胞特征;在增殖动力学方面,其生长曲线属于无限细胞系曲线,细胞倍增时间较短;克隆形成率为 20%;流式细胞仪结果证明其 DNA 合成旺盛,恶性程度高;异种移植能形成移植瘤。根据第二届全国细胞和组织培养专题讨论会的建系标准,CSQT-1 是一株新建的来源于人门静脉癌栓的肝癌细胞系,为肝癌门静脉癌栓生长机制研究提供了实验材料。

Michor 等^[10]提出肿瘤干细胞仅占细胞总量的一小部分,但却在肿瘤的发生、发展、分化和转移中起到非常重要的作用。Zhou 等^[4]提出 CD133⁺细胞在 Hep-2 细胞中仅占 5%左右,且具有自我更新、多向分化潜能、广泛增殖等干细胞特征,认为可将其作为肝癌干细胞的一个标志物;Ma 等^[11]在肝癌临床样品中分离出 CD133⁺的细胞群,也通过异种移植等方法证实这群细胞具有一些肿瘤干细胞的特性。

本研究在新建的 CSQT-1 细胞系中检测到 CD133⁺的细胞含量在不同代数的细胞中比较稳定,提示该细胞系也含有一部分肝癌干细胞活性样细胞亚群,可能与肝癌干细胞相关,这也为肝癌门静脉癌栓形成与肝癌干细胞相互关系研究提供了实验材料。

[参考文献]

- [1] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74-108.
- [2] 程树群, 吴孟超, 程红岩. 原发性肝癌门静脉癌栓生长特征的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2003, 6: 103-105.
- [3] Cheng S Q, Wu M C, Chen H. Tumor thrombus types influence the prognosis of hepatocellular carcinoma with the tumor thrombi in the portal vein[J]. Hepatogastroenterology, 2007, 54: 499-502.
- [4] Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang J J. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line[J]. Laryngoscope, 2007, 117: 455-460.
- [5] Utsunomiya I, Iemura A, Yano H, Akiba J, Kojiro M. Establishment and characterization of a new human hepatocellular carcinoma cell line, HAK-3, and its response to growth factors[J]. Int J Oncol, 1999, 15: 669-675.
- [6] Ji X N, Ye S L, Li Y, Tian B, Chen J, Gao D M, et al. Contributions of lung tissue extracts to invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells with various metastatic potentials[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129: 556-564.
- [7] Lou C Y, Feng Y M, Qian A R, Li Y, Tang H, Shang P, et al. Establishment and characterization of human hepatocellular carcinoma cell line FHCC-98[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 1462-1465.
- [8] Li Y, Tian B, Yang J, Zhao L, Wu X, Ye S L, et al. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive *in vivo* selection and studies on metastatic characteristics[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004, 130: 460-468.
- [9] Hu L, Wen J M, Sham J S, Wang W, Xie D, Tjia W M, et al. Establishment of cell lines from a primary hepatocellular carcinoma and its metastasis[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2004, 148: 80-84.
- [10] Michor F, Hughes T P, Iwasa Y, Branford S, Shah N P, Sawyers C L, et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia[J]. Nature, 2005, 435: 1267-1270.
- [11] Ma S, Chan K W, Hu L, Lee T K, Wo J Y, Ng I O, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. Gastroenterology, 2007, 132: 2542-2556.

[本文编辑] 孙岩