

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01115

肝癌细胞系 EHBC-512 的建立及其生物学特性分析

邹奇飞¹, 侯 瑛², 刘 健¹, 葛瑞良¹, 沈 锋^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗一科, 上海 200438
2. 中国科学院神经科学研究所, 上海 200031

[摘要] **目的:**建立一株新的肝癌细胞系 EHBC-512 并分析其生物学特性, 为后续研究奠定基础。**方法:**切取肝癌手术标本进行体外原代培养, 采用光镜、电镜观察细胞形态, 流式细胞检测细胞周期, 并进行染色体核型分析, 免疫荧光及化学发光法检测细胞上清液 AFP 的表达; 裸鼠体内种植观察异种成瘤情况。**结果:**光镜下细胞形态具有肝癌细胞特征; 电镜下细胞具有较多的线粒体, 核异形性明显, 染色体众数为 110~120 条。细胞群体倍增时间为 48 h, 贴壁率达 90%。免疫荧光染色显示: 细胞 AFP、CK18 表达, CEA、CK19 未表达; 细胞高分泌 AFP, 上清液 AFP 含量 > 1 210 $\mu\text{g/L}$ 。裸鼠体内成瘤病理检测与原发灶保持相同的结构和细胞形态。**结论:**成功建立一株生物学特性稳定并能体外高分泌 AFP 的人类肝癌细胞系 (EHBC-512), 为肝癌研究提供新的研究工具。

[关键词] 肝肿瘤; 肝细胞癌; 细胞培养; 细胞系; 生物学特性

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)10-1115-04

Establishment and characterization of a human hepatocellular carcinoma cell line EHBC-512

ZOU Qi-fei¹, HOU Ying², LIU Jian¹, GE Rui-liang¹, SHEN Feng^{1*}

1. Department of Comprehensive Treatment I, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Institute of Neuronal Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a new hepatocellular carcinoma cell line EHBC-512 and to analyze its biological property, so as to lay a foundation for future study. **Methods:** The specimen of liver cancer was resected during operation and was primary cultured. The morphology of cells was observed under optical and electron microscope. The cell cycle was examined with flow cytometry; the chromosome karyotype was also analyzed. The expression of AFP in the culture supernatant was detected by immunofluorescence and chemoluminescence. The cultured cells were implanted into nude mice for observation of tumor formation. **Results:** The cultured cell line had the character of liver cancer under light microscope, and had rich mitochondria, with obvious nuclear heteromorphism and a chromosome number of 110-120. The doubling time of the cells was 48 h, and the adherence rate was 90%. Immunofluorescence showed that the cells were positive of AFP and CK18 and negative of CEA and CK19. The production of AFP was higher and the content of AFP was higher than 1 210 $\mu\text{g/L}$. The histology of the exografts was similar to that of the primary tumor. **Conclusion:** We have successfully established a new hepatocellular cell line EHBC-512, which can stably secrete AFP *in vitro*, providing a novel tool for liver cancer research.

[KEY WORDS] liver neoplasms; hepatocellular carcinoma; cell culture; cell line; biological characterization

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(10):1115-1118]

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 常合并肝硬化和肝内转移, 预后极差^[1-3]。手术仍然是目前肝癌最有效的治疗方法, 但由于大部分患者就诊时已属于中晚期, 大部分均发生肝内外转移, 故手术切除率低, 术后复发率较高^[4-6]。因此, 迫切需要深入研

究肝癌的发病机制, 寻找有效的肝癌治疗手段。肝癌细胞系在当前肝癌理论和应用研究中具有十分重要的价值。但由于肿瘤的异质性和复杂性^[7], 随着体外传代次数的增加, 肿瘤细胞的特性会发生一定的改变, 如某些基因的丢失, 增加与体内实体瘤间的差异, 同时

[收稿日期] 2009-03-01 **[接受日期]** 2009-09-02

[基金项目] 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项基金(2008ZX10002-025)。Supported by the Grant from State Key Project for Research of Infectious Diseases(2008ZX10002-025)。

[作者简介] 邹奇飞, 博士生, 主治医师。E-mail: qfzou2003@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875005, E-mail: shenfengfdgd@yahoo.com.cn

也增加实验结果的不确定性。因此,本研究从人体肝癌标本取材,尝试建立一株新的肝癌细胞系EHBC-512,并探讨其生物学特性,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及组织来源 高糖 DMEM 培养液 (Gibco 公司),胎牛血清、IV 型胶原酶 (Sigma 公司),兔抗人 AFP 抗体、鼠抗人 CEA 抗体、鼠抗人 CK18 抗体、鼠抗人 CK19 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司)。组织来源:肝癌组织取自第二军医大学东方肝胆外科医院 2008 年 5 月 12 日手术切除标本,患者男,31 岁,发现肝占位 2 周入院,CT 提示肝右叶原发性肝癌,门静脉后支栓塞,AFP>1 750 μg/L,HBsAg 阳性。术后病理:肝细胞癌三级,粗梁型,小结节型肝硬化,无包膜,门静脉癌栓。

1.2 原代细胞培养及细胞形态观察 无菌条件下切取肝癌手术标本,用加双抗的培养液清洗数次,无菌手术剪剪成 1 mm³ 大小组织块,IV 型胶原酶 37℃ 消化 1 h,无菌纱布过滤。红细胞裂解液去除红细胞,DMEM 加 10% 胎牛血清 37℃、5% CO₂ 体外培养,每 2~3 d 更换新鲜培养液,反复贴壁法去除成纤维细胞。1 个月后出现数个克隆,选较大的克隆,胰酶消化后传代。传至第 10 代时进行相关指标检测,并命名为 EHBC-512。体外培养细胞用倒置显微镜观察;取对数生长期细胞 5×10⁵,PBS 洗数次,离心取沉淀戊二醛固定,按常规电镜制作方法进行包埋、超薄切片,染色和透射电镜观察。

1.3 细胞生长曲线的绘制及贴壁率的测定 细胞生长曲线的绘制:调整细胞密度,取 1×10⁵ 细胞接种于 6 孔板,每个样品重复 3 个孔。每 24 h 进行计数,连续计数 5 d。取培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。贴壁率的测定:取 1×10⁵ 细胞种于 6 孔板,标准条件下培养,每组重复 3 个孔。每 2 h 取一组进行消化贴壁细胞计数,连续计数 24 h。以培养时间为横坐标,贴壁细胞数/接种细胞数为纵坐标,绘制贴壁率曲线。

1.4 细胞周期的检测及核型分析 细胞周期的检测:取对数生长期细胞,胰酶消化、离心,预冷 PBS 洗数次,离心后取沉淀,加入 4℃ 预冷的 75% 乙醇,冰浴 30 min,离心,PBS 重悬,加入 Hoechst 33258,冰上 30 min,离心,PBS 重悬后进行流式细胞周期检测。核型分析:在对数生长第 10 代细胞中加入秋水仙素,30 min 后加入增强剂,过 30 min 消化,离心,去上清,加入 0.075 mmol/L 的 KCl,37℃ 30 min,加入 1 ml 固定液,吹打均匀,2 500×g 离心 10 min,离心,去上清,加入固定液 6~8 ml,室温置 30 min,固定 2 次,收集细胞进行染色体核型分析。

1.5 平板克隆形成试验及肿瘤指标的检测 6 孔板每孔加入 1×10³ 细胞,每组做 3 个复孔。培养 2~3 周,出现肉眼可见观察克隆后停止培养,固定、染色后进行克隆计数。克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。肿瘤指标的检测:取第 30 代细胞种于圆玻片上,4% 多聚甲醛固定 20 min,1% Triton 破膜室温 5 min,10% 山羊血清封闭 30 min,一抗分别为 AFP、CEA、CK18、CK19,4℃ 过夜,PBS 洗后加入荧光二抗,室温 1 h,Hoechst 复染,水性封片剂封片后镜检摄片。细胞贴壁长满培养皿底部后,收取上清液采用化学发光法检测 AFP 分泌。

1.6 裸鼠体内成瘤 4~5 周龄 BALB/c-nu/nu 裸鼠 (上海斯莱克实验动物有限公司),SPF 环境下饲养。取第 30 代 5×10⁶/200 μl 细胞注射于裸鼠背部皮下,4 周后观察。肿瘤生成后切取部分瘤组织作 H-E 染色,并与患者原肿瘤组织进行比较。

2 结果

2.1 形态学观察 倒置相差显微镜:细胞镜下呈多角形,大小不一,细胞间排列紧密,可见多核巨细胞,并呈团块状生长,铺满培养皿底部后有重叠生长 (图 1A)。H-E 染色 (图 1B、1C) 显示细胞核增大,核仁明显。电镜观察 (图 1D、1E、1F):细胞核大,异形性明显,核仁聚于核膜,胞质较少,有较多的线粒体和溶酶体,可见光面内质网和核糖体。

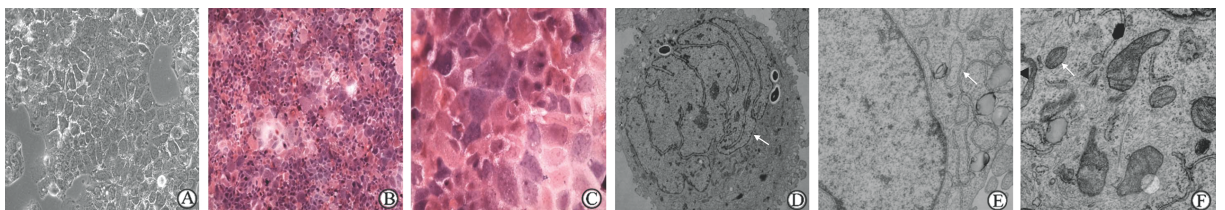


图 1 EHBC-512 形态学观察结果

Fig 1 Morphology of EHBC-512 cells

A: Liver cells; B, C: H-E staining; D-F: Under transmission electron microscope. D: Cell nucleus (arrow); E: Rough endoplasmic reticulum (arrow); F: Mitochondrion (arrow). Original magnification: ×20 (A), ×10 (B), ×40 (C), ×3 000 (D), ×5 000 (E), ×8 000 (F)

2.2 生长曲线及贴壁率曲线的绘制 生长曲线(图 2A);细胞在 DMEM 培养液加 10%胎牛血清培养情况下细胞稳定生长,半高度法测得细胞群体倍增时

间为 48 h。贴壁率曲线(图 2B);细胞在 DMEM 培养液加 10%胎牛血清培养条件下,16 h 其贴壁率达 90%。

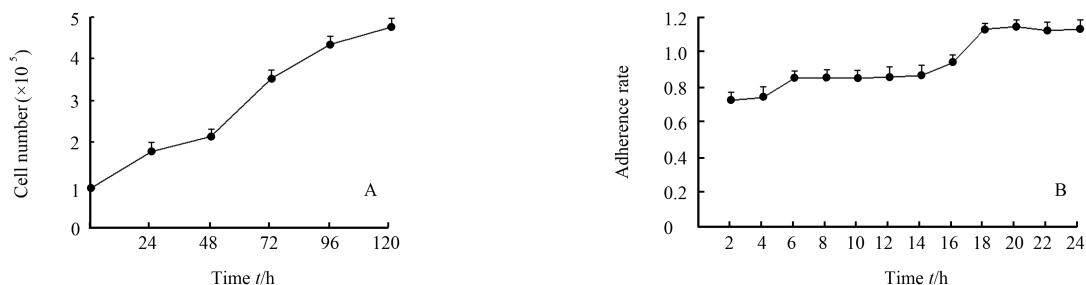


图 2 生长曲线(A)及贴壁率(B)曲线

Fig 2 Growth curves (A) and adherence rate (B) of EHBC-512

Adherence rate; Cell adherence in per 9.78×10^4 cells. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 细胞周期及染色体分析 DNA 周期分析:G₁期为 39.25%,G₂期 24.87%,S 期为 15.09%。选取中期分裂相细胞进行观察,细胞染色体结构和数量均异常,特征为五倍体,众数 110~120。染色体 R 显带分析 5p+,9p+,17p+,Yq+,另有 3 个 Marker 染色体(图 3)。

(图 5A)。瘤组织病理切片染色(图 5B)和原患者肿瘤标本(图 5C)病理结果进行比较显示,两者细胞形态及组织结构相似。

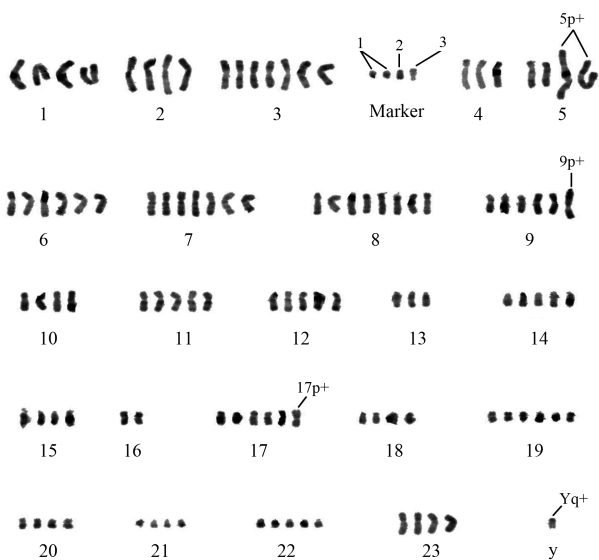


图 3 染色体核型分析

Fig 3 Chromosome karyotype analysis

2.4 克隆形成率及肿瘤指标检测 克隆形成率为 20%~30%。免疫荧光染色(图 4)显示:细胞 AFP 表达较强,CEA 则未见明显表达,大部分细胞表达 CK18,而未表达 CK19。细胞上清液中 AFP 含量大于 $1210 \mu\text{g/L}$ 。

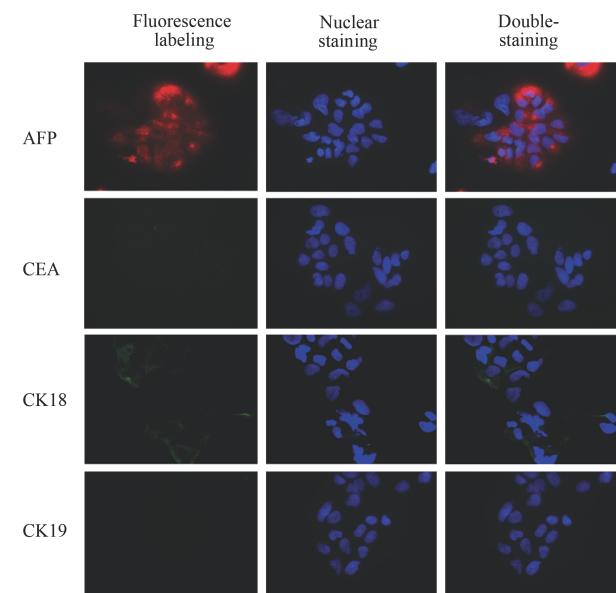


图 4 免疫荧光染色检测各项肿瘤指标

Fig 4 Immunofluorescence detection of different tumor markers

Original magnification: $\times 40$

2.5 裸鼠体内成瘤 裸鼠体内成瘤, 5×10^6 细胞接种于裸鼠背部皮下,2 个月内 1/5 裸鼠有肿瘤生成

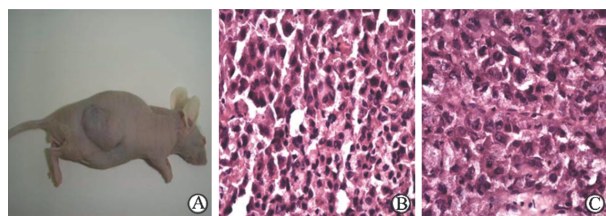


图 5 裸鼠皮下移植

Fig 5 Xenografts in nude mice

A; Subcutaneous xenograft; B; Xenograft (H-E staining); C; Patient's primary tumor (H-E staining). Original magnification: $\times 40$ (B,C)

3 讨论

建立体外人体肝癌细胞系是肝癌基础及临床研究不可缺少的工具。目前采用的肝癌细胞系较多,包括人肝癌细胞系:BEL-7402^[8]、SMMC-7721^[9]、MHCC-97^[10]、Hep3B^[11]、PLC/PRF/5^[12]等;动物肝癌细胞系:如大鼠的RLC-801^[13]、小鼠的MH₁₃₄^[14]。但随着肝癌研究的不断深入,对肿瘤异质性和复杂性方面的要求越来越高,同时随着肝癌细胞系不断地体外传代,其一些肿瘤特征逐渐消失,如SMMC-7721经过长时间的体外传代,其AFP的分泌功能会丧失。因此,需要不断建立新的具有肝癌特征的稳定细胞系来体现其复杂性,丰富肝癌基础及临床研究手段。

本研究建立的肝癌细胞系EHBC-512在体外长期培养,能稳定生长传代;细胞形态为多边形,大小异形性明显;细胞失去接触抑制现象,长满后能重叠生长,较易形成克隆。电镜下细胞核大而明显,核质比倒置,大量的线粒体表明其旺盛的生长和代谢能力。染色体核型分析显示其来源于人,有明显的染色体结构和数量异常,众数约为120。分析其组织来源,免疫荧光染色显示,肝细胞来源标志物CK18强阳性表达,而胆道标志物CK19未见表达,同时,大部分细胞都有AFP强阳性表达,表明EHBC-512为一株肝细胞来源的肝癌细胞系。裸鼠体内成瘤试验中,取皮下生长的瘤组织病理检测,并与原发肿瘤比较发现,两者有着相同的细胞形态和组织学结构,进一步说明,该细胞系为肝癌细胞系。经过较长时间的体外培养,在贴壁细胞上清中仍能检测到AFP的表达,并且表达量较高,说明EHBC-512保留着肝细胞癌的特性,是理想的肝癌基础和临床研究的新工具。

[参考文献]

[1] Yang B W, Liang Y, Xia J L, Sun H C, Wang L, Zhang J B, et al. Biological characteristics of fluorescent protein-expressing human hepatocellular carcinoma xenograft model in nude mice [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 20: 1077-1084.

- [2] Huang L, Pickle L W, Das B. Evaluating spatial methods for investigating global clustering and cluster detection of cancer cases [J]. *Stat Med*, 2008, 27: 5111-5142.
- [3] Thompson Coon J, Rogers G, Hewson P, Wright D, Anderson R, Cramp M, et al. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: systematic review and economic analysis [J]. *Health Technol Assess*, 2007, 11: 1-206.
- [4] Llovet J M, Bruix J, Gores G J. Surgical resection versus transplantation for early hepatocellular carcinoma: clues for the best strategy [J]. *Hepatology*, 2000, 31: 1019-1021.
- [5] Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy [J]. *J Hepatol*, 2003, 38: 200-207.
- [6] Choti M A. Transplantation *versus* resection for hepatocellular carcinoma in the mild cirrhotic: framing the debate [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13: 1021-1022.
- [7] Young S D, Hill R P. Dynamic heterogeneity: isolation of murine tumor cell populations enriched for metastatic variants and quantification of the unstable expression of the phenotype [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1986, 4: 153-176.
- [8] 陈瑞铭, 朱德厚, 叶秀珍, 沈鼎武. 人体肝癌体外细胞系(BEL-7402)的建立及其特征 [J]. *科学通报*, 1975, 20: 434-436.
- [9] 董荣春, 周荣华, 吕发度, 陶文照. SMMC-7721 人体肝癌细胞株的建立及其生物学特性的初步观察 [J]. *第二军医大学学报*, 1980, 1: 5-9.
- Dong R C, Zhou R F, Lü F D, Tao W Z. Establishment and characterization of a human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1980, 1: 5-9.
- [10] Li Y, Tang Z Y, Ye S L, Liu Y K, Chen J, Xue Q, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97 [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7: 630-636.
- [11] Aden D P, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles B B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [J]. *Nature*, 1979, 282: 615-616.
- [12] Doi I. Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma [J]. *Gann*, 1976, 67: 1-10.
- [13] 沈翠英, 马瑾瑜. 大鼠肝癌细胞株RLC-801和RLC-802的生物学特性 [J]. *上海第一医学院学报*, 1983, 10: 34-39.
- [14] 程一耀, 钱振超, 郑怀祖, 王明俭, 许广源, 王大庆. MH134-88 体外细胞系的建立及其生物学特性的研究 [J]. *大连医学院学报*, 1992, 14: 20-23.

[本文编辑] 贾泽军