

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00017

## 胆管上皮细胞株抑制共培养的肝癌 HepG2 细胞株增殖

何 瑶<sup>1\*</sup>, 黄文生<sup>2</sup>, 杨荣萍<sup>1</sup>, 任 明<sup>1</sup>

1. 中山大学附属第一医院消化科, 广州 510080

2. 中山大学附属第一医院外科, 广州 510080

**[摘要]** **目的** 通过体外共培养肝内胆管上皮细胞株(mIBEC)与肝癌细胞株 HepG2, 探讨 mIBEC 对 HepG2 细胞株的可能作用。**方法** 体外共培养 HepG2 与 mIBEC, 采用 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay 分别测定并比较 HepG2 细胞单独培养时以及 mIBEC 共培养后增殖的情况; 实时定量 PCR 法分别测定 HepG2 细胞单独培养时以及 mIBEC 共培养后其 Ki67 及 caspase3 mRNA 表达水平; 蛋白质免疫印迹法分别测定 HepG2 细胞单独培养时以及 mIBEC 共培养后其 caspase3 蛋白表达水平。**结果** 与 mIBEC 共培养后 24~72 h, HepG2 细胞增殖水平低于其单独培养时的水平( $P < 0.01$ ), 且伴有 Ki67 mRNA 表达的下调( $P < 0.05$ ); 与 mIBEC 共培养后, HepG2 细胞 caspase3 mRNA 及蛋白表达水平较其单独培养时均上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** mIBEC 可抑制共培养的 HepG2 细胞增殖; caspase3 激活表达上调可能是 mIBEC 抑制共培养的 HepG2 细胞增殖的机制之一。

**[关键词]** 肝肿瘤; 胆管上皮细胞; HepG2 细胞; 共培养; caspase3; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)01-0017-04

## Biliary epithelial cells inhibit proliferation of co-cultured hepatic cancer cell line HepG2

HE Yao<sup>1\*</sup>, HUANG Wen-sheng<sup>2</sup>, YANG Rong-ping<sup>1</sup>, REN Ming<sup>1</sup>

1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

2. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the possible effect of mouse intrahepatic biliary epithelial cell line (mIBEC) on co-cultured human hepatoma cell lines HepG2. **Methods** HepG2 and mIBEC cells were co-cultured in a membrane-separated Transwell system. CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI) was used to examine HepG2 cell proliferation in the system with or without co-cultured mIBEC. Real-time PCR (RT-PCR) was used to determine Ki67 and caspase3 mRNA expression in HepG2 cells in a system with or without co-cultured mIBEC. Western blotting analysis was used to determine caspase3 protein level in HepG2 cells. **Results** The proliferation of the co-cultured HepG2 cells was significantly lower than those cultured alone ( $P < 0.01$ ). Expression of Ki67, a cell proliferation marker, was also significantly down-regulated in mIBEC co-cultured HepG2 cells ( $P < 0.05$ ). The levels of caspase3 mRNA and protein were significantly up-regulated in mIBEC co-cultured HepG2 cells compared with HepG2 cells cultured alone ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** mIBEC can inhibit the proliferation of co-cultured HepG2, and caspase3 activation might be one of the reasons for the inhibitory effect of mIBEC against HepG2 cells.

**[Key words]** liver neoplasms; biliary epithelial cells; HepG2 cells; co-culture; caspase3; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1):17-20]

肝脏中存在多种类型的细胞, 其中肝细胞及肝内胆管上皮细胞同为上皮来源的细胞, 且均来源于具有双向分化潜能的同一祖细胞——肝脏祖细胞 (hepatoblast)<sup>[1]</sup>, 而且该 2 种细胞在机体需要时可发生相互转分化以补偿受损减少的细胞<sup>[2-4]</sup>。肝细

胞及胆管上皮细胞除在组织起源及解剖上密切相关外, 在功能上亦是相互作用、相互制约, 密不可分, 如胆汁的形成及排泌需要这 2 类细胞协同作用才能完成<sup>[5]</sup>; 胆管上皮细胞具有分泌各种细胞/炎性因子的作用, 可通过自分泌或旁分泌方式与包括肝细胞在

**[收稿日期]** 2010-09-14

**[接受日期]** 2010-10-28

**[基金项目]** 广东省自然科学基金(4009383). Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province(4009383).

**[作者简介]** 何 瑶, 博士, 副教授, 硕士生导师.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 020-87755766-8182, E-mail: heyaowyx@yahoo.com.cn

内的肝脏中各种细胞发生相互作用,影响肝脏的发育<sup>[6-9]</sup>。肝脏内各种细胞间的相互作用对维持肝脏内环境的稳定起着重要作用。一旦肝脏的内环境遭到破坏,即可能发生恶性肿瘤,其中肝细胞癌是危害性最大的恶性肿瘤之一。目前虽然已有较多证据表明胆管上皮细胞与肝细胞的关系密不可分,但当肝细胞癌发生时,胆管上皮细胞对癌变肝细胞的作用如何仍未见报道。因此,本研究拟通过体外共培养小鼠肝内胆管上皮细胞株(mouse intrahepatic biliary epithelial cell line, mIBEC)及人肝癌细胞株 HepG2,探讨 mIBEC 对 HepG2 细胞株的可能影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞株购自美国 ATCC 菌种保藏中心, mIBEC 由美国加利福尼亚洛山矶 Cedars—Sinai 医疗中心惠赠。E-MEM 培养液购自 Invitrogen 公司(Carsbad, CA, 美国),所有抗体均购自 AbD Serotec 公司(Raleigh, NC, 英国)。Transwell 非接触共培养系统购自 Corning 公司(Life Sciences, MA, 美国)。

1.2 HepG2 及 mIBEC 培养 以含 1% 胎牛血清的 Earle's 极限必需培养液(Earle's minimal essential medium, E-MEM)分别培养 HepG2 及 mIBEC, 加入适量谷氨酰胺及丙酮酸钠,均置于含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内培养,供后续 HepG2 单独培养或 HepG2 与 mIBEC 共培养所用。

1.3 体外共培养 HepG2 与 mIBEC 于 6 孔或 96 孔培养板中种下 HepG2 细胞,培养过夜使其贴壁。次日采用 Transwell 非接触共培养系统,将 mIBEC 种于 Transwell 中。该 Transwell 带有 0.4 μm 孔径的聚碳酸酯膜,可将共培养的 2 种细胞分隔开来,但不影响各种介质在 2 种细胞间的交换。分别于共培养后不同时间点收集 HepG2 细胞,供后续检测细胞增殖及提取蛋白质、mRNA 所需。

### 1.4 HepG2 细胞增殖检测

1.4.1 细胞增殖实验 采用 96 孔板共培养 HepG2 细胞(10<sup>4</sup>/孔)与 mIBEC(10<sup>4</sup>/孔)。分别于共培养 0、24、48 及 72 h 4 个时间点收集 HepG2 细胞,采用 CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega Corporation, Madison, WI),以色谱比色法检测细胞数,测定 HepG2 细胞增殖情况。以 HepG2 单独培养为对照,分别于与共培养相应的时间点测定 HepG2 单独培养时的增殖情况。

1.4.2 实时定量 PCR 法测定 Ki67 mRNA 表达水平 采用 6 孔板共培养 HepG2 细胞(5×10<sup>5</sup>/孔)与 mIBEC(5×10<sup>5</sup>/孔),分别于共培养 2、24、48 及 72 h

4 个时间点收集 HepG2 细胞,以实时定量 PCR 方法检测 Ki67 mRNA 的表达。以 HepG2 单独培养为对照,分别于与共培养相应的时间点收集 HepG2 细胞,测定其 Ki67 mRNA 的表达。

### 1.5 HepG2 caspase3 表达水平检测

1.5.1 实时定量 PCR 法检测 HepG2 细胞 caspase3 mRNA 表达水平 采用 6 孔培养板进行细胞培养。分别收集单独培养及与 mIBEC 共同培养 72 h 后的 HepG2 细胞,以实时定量 PCR 方法检测 caspase3 mRNA 的表达。

1.5.2 蛋白质免疫印迹法检测 HepG2 细胞 caspase3 蛋白表达水平 采用 6 孔培养板进行细胞培养。分别收集单独培养及与 mIBEC 共同培养 72 h 后的 HepG2 细胞。裂解提取上述细胞的总蛋白,以 25 700×g 4℃ 离心 10 min,去除细胞碎片后收集上清,用酚试剂法测蛋白浓度。用凝胶加样缓冲液调节蛋白浓度至 2 g/L,以 120 V、50 mA、2 h 行聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 100 V、100 mA、2.5 h 电转膜。电转完成后,用 1×TBS 漂洗膜 1 次,置于 5% 脱脂奶粉中(1×TBS+1 000:1 Tween-20)37℃ 封闭 1.5 h。分别加入兔抗人 caspase3 抗体(1:1 000,5% 牛奶稀释)、小鼠抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(1:2 000,5% 牛奶稀释),置摇床上 4℃ 过夜。TBST 洗 3 次,10 min/次。分别加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔或抗鼠 IgG(1:3 000),室温震荡孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 10 min。将膜放在 PARAFILM 封口膜上,滴加显色液,显色 5 min,纯水终止显色,晾干。扫描分析条带的光密度值,以 GAPDH 光密度值作为标准进行校正,计算 caspase3 光密度。

1.6 实时定量 PCR 采用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)分别自单独培养及与 mIBEC 共培养后的 HepG2 细胞中提取 RNA,以 500 ng 所提取 RNA 为模板进行反转录 PCR 获取 cDNA 模板。采用 QuantiTect SYBR Green PCR 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA), TaqMan ABI PRISM 7300 实时 PCR 系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)对来自不同时间点的 HepG2 细胞 cDNA 模板进行定量扩增。所用引物:人 Ki67 基因(正义:5'-CCA ATC CTG TCG CTT AAT CC-3', 反义:5'-TGG CGC ACA TAG ACT ACT CC-3'; GenBank BC024238. 2),扩增片段长度 125 bp;人 caspase3 基因(正义:5'-TGT GAG GCG GTT GTA GAA GA-3', 反义:5'-GGG CTC GCT AAC TCC TCA C-3'; GenBank NM\_004346. 3),扩增片段长度 121 bp。

每次进行 PCR 扩增时均采用等量的水替代模板作为阴性对照,而采用 GAPDH 作为加样对照。所测目标基因 mRNA 的绝对值可通过以其 GAPDH mRNA 含量进行校正而获得。每个样本均重复检测 3 次。为排除非特异性扩增,对所有样本的扩增产物均以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.7 统计学处理 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用医学统计软件(MedCalc, Belgium)进行统计分析,采用 Mann-Whitney 试验检验结果的显著水平。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 mIBEC 抑制共培养的 HepG2 细胞增殖 增殖实验结果显示,与 mIBEC 共培养后 HepG2 细胞 24~72 h 的增殖水平低于其单独培养时的水平( $P < 0.01$ ,图 1)。

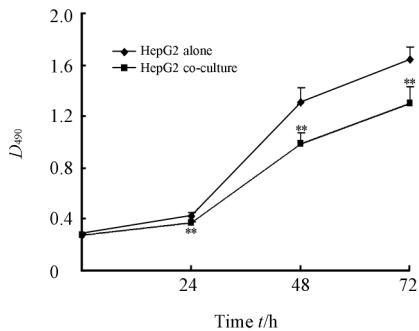


图 1 HepG2 细胞增殖检测

Fig 1 Detection of HepG2 cell proliferation

\*\*  $P < 0.01$  vs HepG2 cultured alone.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 mIBEC 下调共培养 HepG2 细胞中 Ki67 mRNA 的表达 与 mIBEC 共培养后, HepG2 细胞的 Ki67 mRNA 表达水平低于其单独培养时的水平( $P < 0.05$ ,图 2)。

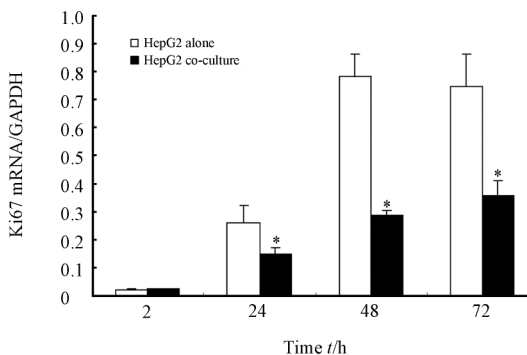


图 2 HepG2 细胞 Ki67 mRNA 表达检测

Fig 2 Expression of Ki67 mRNA in HepG2 cells

\*  $P < 0.05$  vs HepG2 cultured alone.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 mIBEC 上调共培养 HepG2 细胞中 caspase3 mRNA 的表达 与 mIBEC 共培养 72 h 后 HepG2 细胞 caspase3 mRNA 表达水平为  $1.98 \pm 0.34$ , 较其单独培养时的( $0.78 \pm 0.11$ )上调( $P < 0.05$ )。

2.4 mIBEC 上调共培养 HepG2 细胞中 caspase3 蛋白表达水平 蛋白质免疫印迹结果(图 3)显示,与 mIBEC 共培养 72 h 后 HepG2 细胞 caspase3 蛋白表达  $D$  值为  $0.15 \pm 0.02$ , 较其单独培养时的( $0.05 \pm 0.01$ )上调( $P < 0.05$ )。

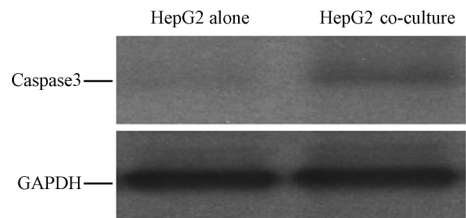


图 3 HepG2 细胞 caspase3 蛋白表达检测

Fig 3 Expression of caspase3 protein in HepG2 cells

## 3 讨论

众多证据已证明肝内胆管上皮细胞及肝细胞间的关系密不可分。肝内胆管上皮细胞及肝细胞具多种功能,包括分泌各种细胞因子参与肝脏免疫应答、调节肝脏内环境及参与细胞间的相互作用<sup>[9-11]</sup>。尽管在成熟肝脏中的胆管上皮细胞及肝细胞均为最终分化的成熟的上皮细胞,但它们均保留着在必要时相互转化的潜能,当肝细胞受损时,胆管上皮细胞可转分化为肝细胞以重建丢失的肝实质细胞,而肝细胞亦同样可分转化为胆管上皮细胞以补偿受损丢失的胆管上皮细胞<sup>[2,3,12]</sup>。多种细胞因子参与了调节及平衡肝细胞及胆管上皮细胞分化及转分化的过程,如各种趋化因子、 $\beta$ -连环蛋白、TGF- $\beta$  及与调节细胞外基质平衡相关的各种因子等<sup>[13-15]</sup>。体外研究发现,在人类生长因子(HGF)与表皮生长因子(EGF)联合作用下,TGF- $\beta$  的表达增加主要发生于具转分化为胆管上皮潜能的肝细胞内<sup>[15]</sup>,而 Berg 等<sup>[14]</sup>则发现参与细胞间转分化的另一因子—— $\beta$ -连环蛋白主要存在于胆管上皮细胞中。提示不同的细胞因子可通过作用于肝细胞或胆管上皮细胞促进 2 种细胞间转分化的发生。此外 Limaye 等<sup>[15]</sup>还发现肝细胞或胆管上皮细胞可同时分泌产生各种趋化因子,参与 HGF 与 EGF 联合作用后肝细胞与胆管上皮细胞间的转分化。

由此可见,在生理状态下,肝内胆管上皮细胞与肝细胞间通过分泌产生各种细胞因子而发生相互作用。但当肝脏细胞发生病理改变(如肝细胞发生癌

变)时2种细胞之间的相互作用如何则未见报道。本实验中我们通过体外共培养 mIBEC 及 HepG2 细胞,直接观察 mIBEC 对 HepG2 细胞间的作用,结果证实 mIBEC 可抑制共培养 HepG2 细胞的增殖。这与研究报道的胆管上皮细胞分泌的多种细胞因子对促进肝脏细胞成熟起着重要作用的结果相吻合<sup>[1,11]</sup>,提示肝内胆管上皮细胞与肝细胞间的相互作用在维持肝细胞正常分化、防止肝细胞癌的发生发展中起着重要的作用。

尽管肝内胆管上皮细胞可通过多种途径对肝细胞的代谢及功能发生不同影响,但 mIBEC 抑制 HepG2 细胞增殖的确切机制尚未明确。增殖与凋亡的平衡在维持组织器官正常发育中起着关键作用,凋亡减少是细胞增殖癌变的最常见机制之一<sup>[16]</sup>,其发生可由多种因素引起,最为主要的因素与2种蛋白家族有关,即 caspase 酶家族<sup>[17]</sup>及 Bcl-2 家族<sup>[18]</sup>。在“凋亡诱导因素→受体→cAMP, Ca<sup>2+</sup>等→死亡信号→凋亡相关基因激活→caspase 激活, DNase 激活→巨噬细胞吞噬分解细胞”这一细胞凋亡过程中, caspase 是其中的关键介质之一。而本研究发现, mIBEC 可诱导共培养的 HepG2 细胞中 caspase3 mRNA 及蛋白表达的上调,提示 HepG2 细胞的凋亡过程发生改变,结合 mIBEC 可抑制 HepG2 细胞增殖这一结果,我们推测肝内胆管上皮细胞对肝癌细胞增殖的抑制可能是通过诱导 caspase3 激活,使 HepG2 细胞凋亡增加而发挥作用。

综上所述,本实验从体外水平证实了肝内胆管上皮细胞对肝癌细胞的增殖生长有抑制作用,其机制可能是通过诱导肝癌细胞的凋亡而实现。

## [参考文献]

- [1] Lemaigre F P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137: 62-79.
- [2] Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, Tokairin T, Omori Y, Su M, et al. Transdifferentiation of mature rat hepatocytes into bile duct-like cells *in vitro*[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1077-1088.
- [3] Sirica A E, Williams T W. Appearance of ductular hepatocytes in rat liver after bile duct ligation and subsequent zone 3 necrosis by carbon tetrachloride[J]. *Am J Pathol*, 1992, 140: 129-136.
- [4] Michalopoulos G K, Barua L, Bowen W C. Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury[J]. *Hepatology*, 2005, 41: 535-544.
- [5] Nathanson M H, Boyer J L. Mechanisms and regulation of bile secretion[J]. *Hepatology*, 1991, 14: 551-566.
- [6] 何 瑶, 陈白莉, 杨荣萍, 曾志荣, 任 明. 动态研究胆管上皮细胞表达 TGF- $\beta$ s 在胆汁淤积性肝病中的作用[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2010, 31: 85-90.
- [7] Yasoshima M, Kono N, Sugawara H, Katayanagi K, Harada K, Nakanuma Y. Increased expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in pathologic biliary epithelial cells: *in situ* and culture study[J]. *Lab Invest*, 1998, 78: 89-100.
- [8] Lemaigre F P. Notch signaling in bile duct development: new insights raise new questions[J]. *Hepatology*, 2008, 48: 358-360.
- [9] Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, 157: 261-270.
- [10] Chuang Y H, Lan R Y, Gershwin M E. The immunopathology of human biliary cell epithelium [J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31: 323-331.
- [11] Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, Migita K, Shimoda S. Liver architecture, cell function, and disease[J]. *Semin Immunopathol*, 2009, 31: 399-409.
- [12] Michalopoulos G K, Bowen W C, Mulè K, Lopez-Talavera J C, Mars W. Hepatocytes undergo phenotypic transformation to biliary epithelium in organoid cultures[J]. *Hepatology*, 2002, 36: 278-283.
- [13] Lüdtke T H, Christoffels V M, Petry M, Kispert A. Tbx3 promotes liver bud expansion during mouse development by suppression of cholangiocyte differentiation[J]. *Hepatology*, 2009, 49: 969-978.
- [14] Berg T, Rountree C B, Lee L, Estrada J, Sala F G, Choe A, et al. Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival *via* beta-catenin activation[J]. *Hepatology*, 2007, 46: 1187-1197.
- [15] Limaye P B, Bowen W C, Orr A V, Luo J, Tseng G C, Michalopoulos G K. Mechanisms of hepatocyte growth factor mediated and epidermal growth factor mediated signaling in transdifferentiation of rat hepatocytes to biliary epithelium[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 1702-1713.
- [16] Zimmermann K C, Bonzon C, Green D R. The machinery of programmed cell death[J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 92: 57-70.
- [17] Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. *Science*, 1998, 281: 1312-1316.
- [18] Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis[J]. *Nat Med*, 1997, 3: 614-620.

[本文编辑] 尹 茶