

• 论 著 •

## 人肝癌细胞系 P2-HCC 的建立及体外诱导分化特性的初步研究

朱海英<sup>1\*</sup>, 张 朵<sup>1</sup>, 谢东甫<sup>1</sup>, 王新民<sup>1</sup>, 周旭宇<sup>2</sup>, Joseph T Lau<sup>3</sup>, 胡以平<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433; 3. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

**[摘要]** **目的:** 从人肝细胞癌中分离肝癌细胞并对其体外诱导分化特性进行分析, 试图得到有关导致肝癌发生的“癌干细胞”的相关资料。**方法:** 首先将人原发性肝癌组织小块在裸鼠皮下过继接种, 然后将生成的肿瘤进行原代培养并得到单层生长的肿瘤细胞系, 利用体外诱导实验对其形态及分子表型的变化情况进行观察和分析。**结果:** 所分离获得的细胞系具有肝肿瘤细胞的特征, 但也表达某些干细胞的分子标志如 c-met。体外诱导分化实验提示胰岛素/氢化可的松、二甲亚砷可能具有诱导该细胞向成熟肝细胞方向分化的作用, 诱导后的细胞又重新表达葡萄糖-6-磷酸酶, 白蛋白表达明显升高。**结论:** 人 P2-HCC 细胞具有强大的增殖能力, 体外实验提示其具有一定的向成熟肝细胞分化的潜能。这些细胞的发生与肝癌干细胞及肝细胞的关系尚待进一步研究。

**[关键词]** 癌, 肝细胞; 肿瘤细胞, 培养的; 细胞分化

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0247-04

### Establishment and differentiation of human hepatoma cell line P2-HCC *in vitro*

ZHU Hai-ying<sup>1</sup>, ZHANG Duo<sup>1</sup>, XIE Dong-fu<sup>1</sup>, WANG Xin-min<sup>1</sup>, ZHOU XU-yu<sup>2</sup>, Joseph T Lau<sup>3</sup>, HU Yi-ping<sup>1\*</sup> (1. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. The Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Elm and Carlton Streets, Buffalo, NY 14263, USA)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To isolate hepatoma cells from human primary hepatocarcinoma and characterize their inductive differentiation *in vitro*, searching for data about "hepatic cancer stem cell" which results in hepatocarcinogenesis. **Methods:** Fresh surgical human primary hepatocarcinoma specimen was implanted i. p. in NOD/SCID mouse and was allowed to grow. Then the neoplasm was harvested and cells were isolated and a cell line named P2-HCC was obtained. P2-HCC was induced with medium including insulin/hydrocortisone or DMSO, and then the differentiation of phenotype and changes of some proteins expression, such as albumin, c-met, G-6-P of P2-HCC were observed. **Results:** P2-HCC cell line was a hepatocarcinoma cell line which displayed characteristics of cancer cell. P2-HCC expressed c-met, which was regarded as a signature of liver stem cell or liver progenitor cell. When insulin/hydrocortisone and DMSO existed in medium, cells could differentiate into mature hepatocyte and lead to the reexpression of G-6-P, distinctly raising expression of albumin. **Conclusion:** The results suggest that P2-HCC can differentiate into mature hepatocyte, but the correlation between P2-HCC and liver cancer stem cell remain to be probed further.

**[KEY WORDS]** carcinoma, hepatocellular; tumor cells, cultured; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 247-250]

“癌干细胞(cancer stem cell)”或称“肿瘤形成细胞(tumorigenic stem cell)”是近几年来人们非常关注的一个概念。从细胞生物学角度分析, 现有的研究结果使人们越来越倾向于认为肿瘤的发生是这种癌组织中具有“干细胞”特性的细胞分裂和分化的结果<sup>[1]</sup>, 但也有资料证明肝细胞癌可以由正常的成熟肝细胞去分化而成<sup>[2]</sup>, 折衷的观点认为肝细胞癌的发生是多途径的, 即一部分是由肝癌干细胞的活动引起的, 但也不排除成熟肝细胞来源。现有的对癌干细胞的研究主要集中在白血病<sup>[3]</sup>、乳腺癌<sup>[4]</sup>和脑瘤干细胞<sup>[5]</sup>, 并且取得了很好的进展, 但对肝癌干

细胞是否存在仍然未见更深入研究的报道。本研究分离了人的原发性肝癌细胞系, 发现所分离获得的细胞系具有肝肿瘤细胞的特征, 但也表达某些干细胞的分子标志。体外诱导分化试验提示胰岛素/氢化可的松(IH)、二甲亚砷(DMSO)具有诱导该细胞分化为成熟肝细胞的作用。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30470876, 30270668, 30270603, 30200138); 上海市科委重大项目(03DJ14020)。

**[作者简介]** 朱海英(1969-), 女(汉族), 博士, 副教授。

\* Corresponding author. E-mail: zinnia516@hotmail.com, yphu@smmu.edu.cn



1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂和仪器 6~10 周龄 BALB/c 品系糖尿病/严重免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠,购自上海实验动物中心,由本实验室 SPF 级动物房提供。细胞培养用 DMEM、Trypsin / EDTA 购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,PBS 自备。CCK-8 细胞增殖试剂购自 Dojindo 公司。一次性培养瓶及培养板均购自 Gibco 公司,倒置相差显微镜、荧光显微镜及显微摄影装置为 Nikon 公司产品。

1.2 肿瘤的异体接种和细胞的原代培养 取长海医院普通外科手术切除新鲜肝细胞癌组织,用含 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 HBSS 冲洗标本,将其切成 0.5 mm<sup>3</sup> 的小块然后加少许 HBSS,然后注射到 NOD/SCID 小鼠皮下,皮下出现肿瘤,取出按照上述方法再次将其接种到 NOD/SCID 小鼠皮下,再次生成肿瘤,取出切成 0.5 mm<sup>3</sup> 的小块,加 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min,其间用吸管轻轻吹打几次,用含 5% 血清的培养液终止消化,然后离心收集细胞,PBS 洗 2 次,尽量去除红细胞,最后用改良 IMDM-HAM F12 培养液(IMEM 和 F12 培养液 1:1 混合,加入 5% 胎牛血清,20 ng/ml EGF,5 μg/ml 胰岛素及非必需氨基酸)重悬细胞,接种于培养皿中,第 2 天细胞贴壁后换液,以去除红细胞。

1.3 细胞的克隆化培养及细胞生长曲线的测定 选取生长良好的肿瘤细胞,计数后稀释至 10/ml,然后接种于 96 孔板中,每孔接种 0.1 ml。第 2 天逐孔观察,记录有单细胞生长的孔,待细胞生成克隆后扩大培养。将细胞按 10<sup>4</sup>/ml 接种于 6 孔板中,然后每天消化细胞,经 0.4% 锥虫蓝染色后计数活细胞数目。每孔计数 3 次,取平均值,每天计数 3 孔取平均值,共计数 6 d。

1.4 细胞核型分析 接种一定数量的细胞,待对数生长期时加入 10 μg/ml 的秋水仙素,4 h 后收集细胞,制备染色体标本,光学显微镜下计数 100 个分裂相的染色体数,并进行染色体众数分析。

1.5 细胞体外分化诱导和增殖试验 接种细胞,待 50% 融合时换用诱导培养液继续培养逐日观察。诱导培养液:AD-10-IH(高糖的 DMEM,10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素,10 μg/ml 胰岛素,5×10<sup>-7</sup> mol/L 氢化可的松);AD-10-DMSO(高糖的 DMEM,10% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素,2% DMSO)。将细胞接种于 96 孔板,按照上述方法更换诱导培养后,隔天加入 CCK-8 细胞增殖检测试剂,测定 D<sub>450</sub> 值作为

细胞增殖指标,每次测定 3 孔,取其平均值。实验步骤按照说明书进行。

1.6 RT-PCR 用 RT-PCR 方法检测白蛋白(Alb)、葡萄糖磷酸酶(G-6-P)、肝细胞生长因子受体(c-met)的表达。将贴壁培养的细胞消化成单细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min 后,完全弃去上清液,用“EZ Spin Column RNA Isolation Kit”试剂盒抽取细胞总 RNA。逆转录反应酶为 Promega 公司产品,反应体系及条件参照试剂说明书。所用引物序列、扩增片段长度及退火温度如表 1 所示(引物由上海生工生物公司合成)。PCR 扩增反应体系为 50 μl:dNTP 200 μmol/L,上下游引物各 1 μmol/L,cDNA 100 ng,Taq 酶 2.5 U。PCR 反应条件为:95℃ 5 min 变性后,进入循环:94℃ 30 s→退火(温度见表 1)30 s→72℃ 1 min 循环 30 次,然后 72℃ 延长 10 min。以 1.2% 的琼脂糖凝胶,上样 10 μl PCR 产物进行电泳鉴定。

表 1 RT-PCR 引物的序列、片段大小及退火温度

Tab 1 Primers, products and annealing temperature of RT-PCR

| Gene    | Primer sequence                            | Products (bp) | Annealing temperature (t/℃) |
|---------|--------------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Alb     | 5'- CCT TTG GCA CAA TGA AGT GGG TAA CC -3' | 355           | 62.9                        |
|         | 5'- CAG CAG TCA GCC ATT TCA CCA TAG G -3'  |               |                             |
| G-6-P   | 5'-GGC ACA GCA GGT GTA TAC TA -3'          | 1 101         | 58                          |
|         | 5'- AGA GGA CCA CCT GAG CTG AC -3'         |               |                             |
| c-met   | 5'-GGG TCG CTT CAT GCA GGT TGT GGT -3'     | 372           | 60                          |
|         | 5'-ATG GTC AGC CTT GTC CCT CCT TCA -3'     |               |                             |
| β-actin | 5'- GCA CTC TTC CAG CCT TCC TTC C -3'      | 516           | 55                          |
|         | 5'- TCA CCT TCA CCG TTC CAG TTT TT -3'     |               |                             |

1.7 供体细胞体外标记 EGFP 报告基因 将稳定转染有 pLNCG C1 载体 DNA 的 PT67 细胞系接种于直径为 100 mm 的培养皿中,待细胞生长至大约 60% 融合时换新鲜培养液,继续培养 24 h,收获病毒上清,加入 8 μg/ml 的 polybrene,以 0.45 μm 滤膜过滤,通过感染 NIH-3T3 细胞的方法测定病毒的滴度。供体细胞生长至大约 40% 汇合时,加入收获的含病毒培养液上清培养 20 h,换为新鲜细胞培养液继续培养 24~48 h;加入含 800 μg/ml G418 的细胞培养液培养 7 d,得到稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)的供体细胞。

1.8 荷瘤实验 将表达 GFP 的细胞用胰酶消化后吹打成单细胞悬液,调整细胞密度,将细胞悬液注射至 NOD/SCID 小鼠皮下。每个注射点注射细胞悬液 100 μl,实际注射细胞数为 10<sup>7</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>,观察细胞的成瘤情况。



## 2 结 果

2.1 P2-HCC 细胞系的建立及其生物学特性 经过 2 次肿瘤组织的过继接种(以同月龄小鼠皮下形成直径 0.5 cm 肿瘤块为标准,第 1 次接种后成瘤时间约为 3 个月,第 2 次接种后的成瘤时间为 1 个月)后,通过单层细胞培养和克隆化培养建立了 P2-HCC 细胞系,为典型的贴附型上皮样细胞。细胞呈多角形,成规则镶嵌排列,细胞大小、形态均一(图 1A)。细胞增殖速度较快;当细胞生长至融合时,细胞呈现重叠生长状态,表现出癌细胞特有的接触抑制丧失的特性(图 1B)。核型分析表明染色体数目为非整倍体,众数分布在 75 条。荷瘤实验结果表明细胞的成瘤能力强,10<sup>2</sup> 个细胞也能在 6 周内形成直径 0.5 cm 的肿瘤,而且组织切片分析表明形成的肿瘤与人的原发性肿瘤非常相似。冰冻切片检测了荷瘤小鼠的脾、肾、脑、胃,均未发现带有荧光的细胞,说明 P2-HCC 没有体内转移能力。

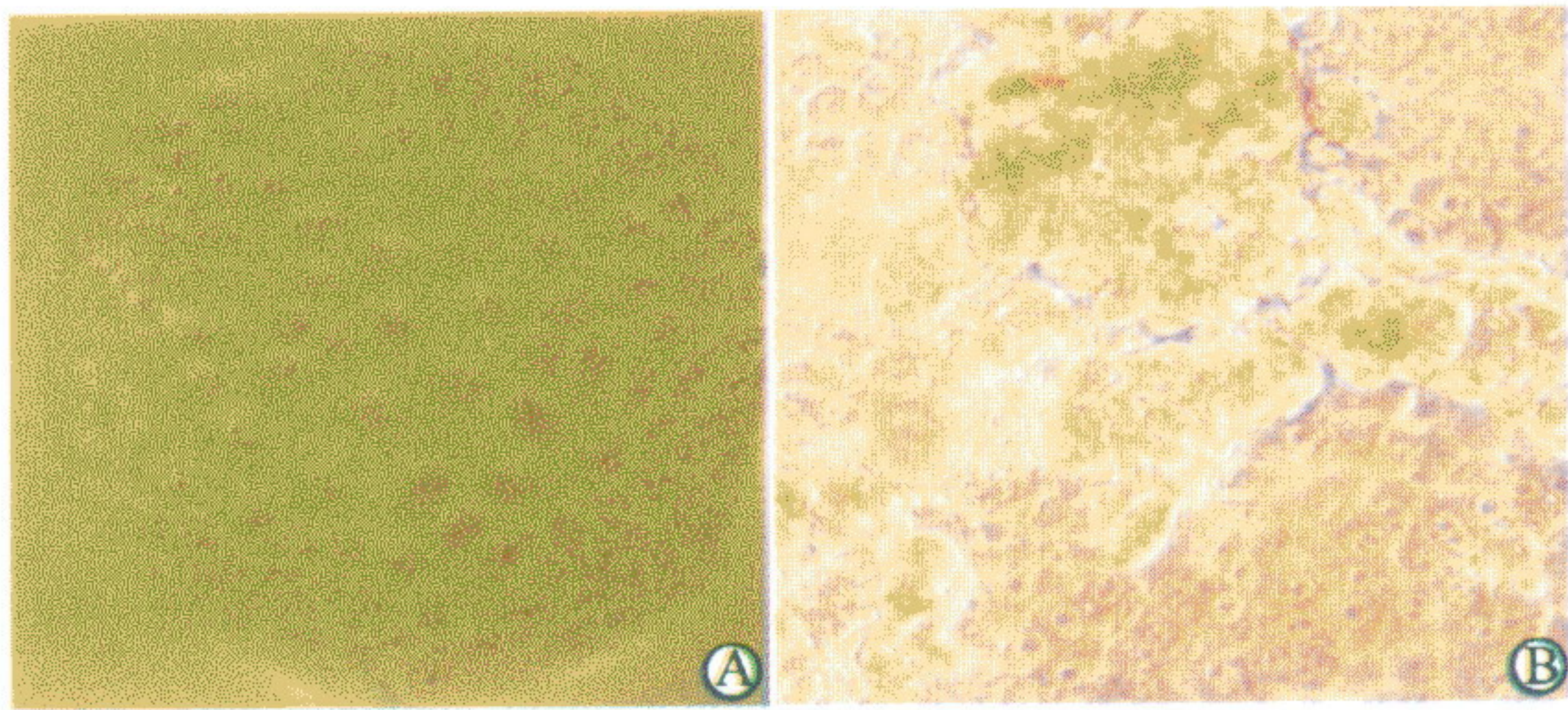


图 1 P2-HCC 的体外生长

Fig 1 Growth of P2-HCC *in vitro* (×100)

A: Cloning growth of P2-HCC; B: Overlapping growth of P2-HCC

2.2 P2-HCC 细胞系的体外诱导 P2-HCC 细胞系经体外诱导后失去癌细胞特性,表现出成熟肝细胞特性。细胞在用 AD-10-IH 培养后的第 5 天,细胞形态发生变化,细胞变得扁平,细胞之间界线清晰,折光性强,细胞核清晰可见,特别明显的是大约有 10% 的细胞出现双核,细胞的生长特性非常类似于原代培养的肝细胞(图 2A)。第 6 天双核细胞比例增加,到第 7 天双核细胞比例增加至 30% 左右,肝细胞特性更加明显,如果及时换液,细胞可以维持 15 d 左右。细胞生长至融合后,未见重叠生长,细胞生长曲线也说明其生长受到一定程度的抑制(图 3)。以上现象提示细胞在体外失去了肝癌细胞生长特性,表现出成熟肝细胞生长特性。细胞在 AD-10-DMSO 中生长和分化情况与此有些差异。在更换 AD-10-DMSO 后细胞生长似乎并未受到明显抑制,生长曲线与对照相似(图 3),直到诱导后的第 10 天才观察到有 5% 的双核细胞出现(图 2B),而且可以

观察到细胞的重叠生长。

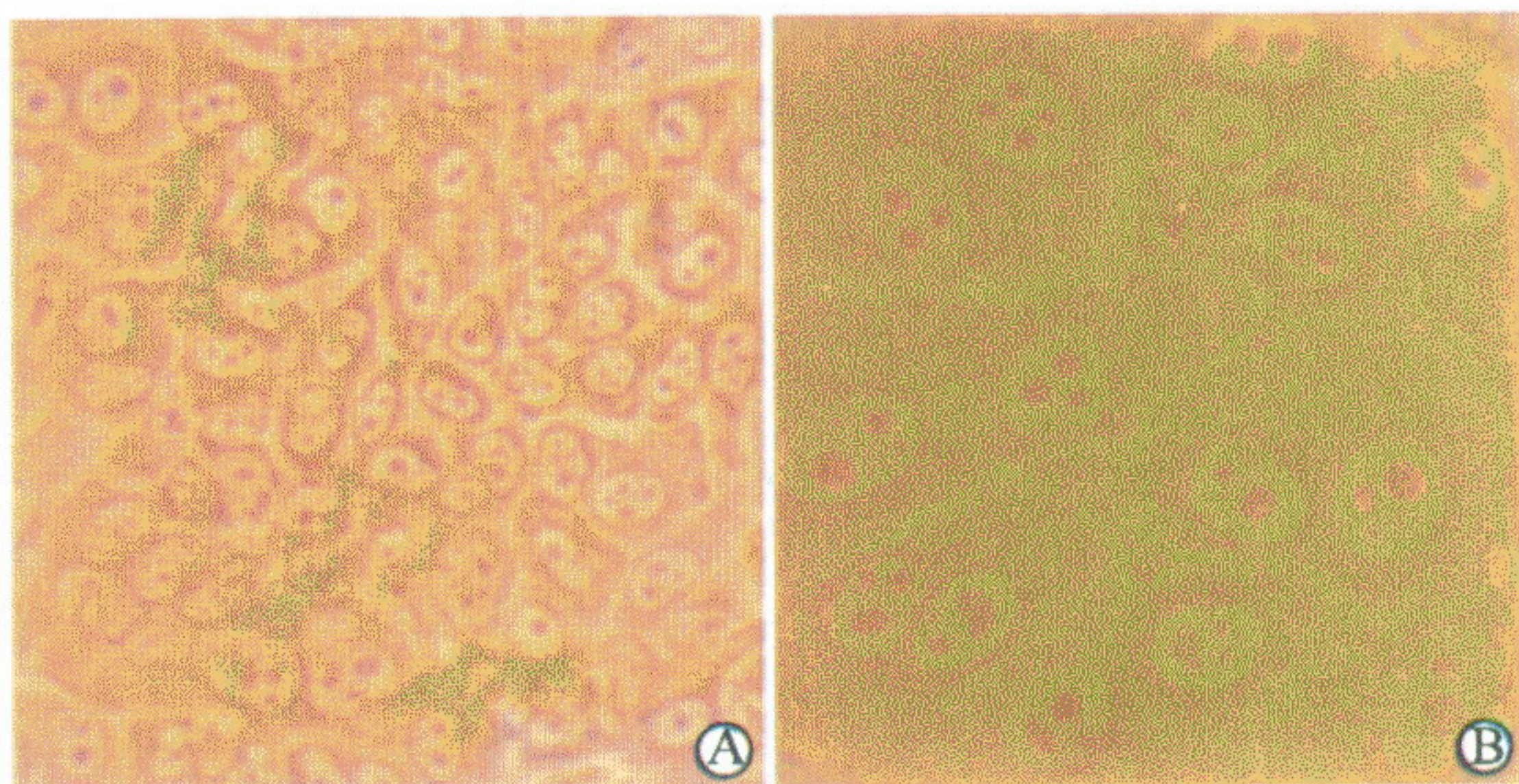


图 2 P2-HCC 经 IH 和 DMSO 诱导之后的形态变化

Fig 2 Phenotype changes of P2-HCC after IH and DMSO induction

A: Double-nuclear cell at day 5 after IH induction (×100);

B: Double-nuclear cell at day 10 after DMSO induction (×400)

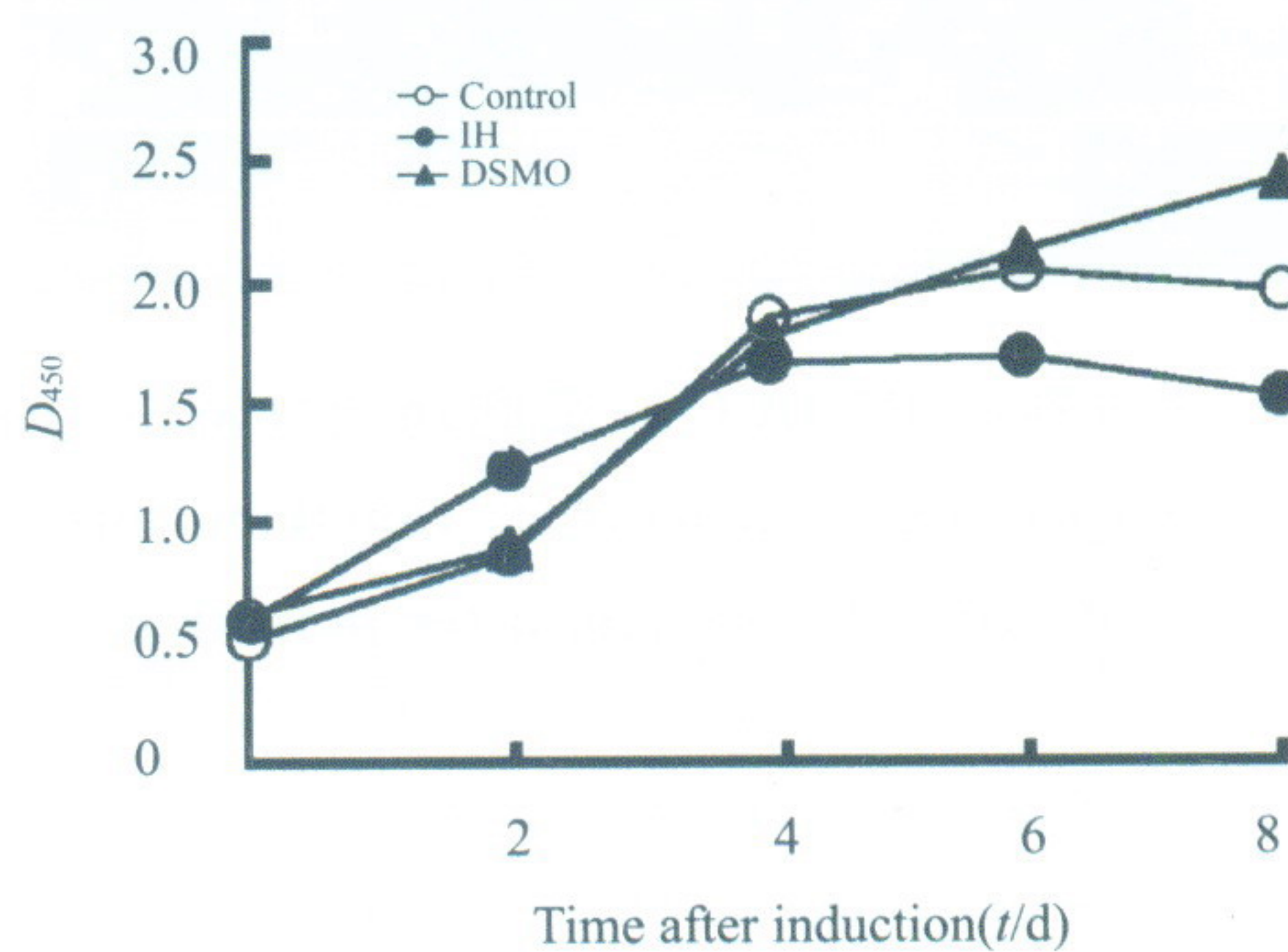


图 3 IH、DMSO 诱导过程中细胞增殖情况

Fig 3 Cell proliferation after IH and DMSO induction

RT-PCR 和免疫组化的结果显示,诱导前后细胞的某些蛋白的表达发生变化,这种变化与形态变化具有一致性。诱导后的细胞中白蛋白的表达要远远高于诱导前的细胞,G-6-P 在诱导前细胞不表达,诱导后的细胞中有表达(图 4)。以上现象提示细胞在体外失去了肝癌细胞生长特性,表现出成熟肝细胞生长特性。用 SMMC-7721 作为对照,没有出现上述变化。RT-PCR 结果显示 P2-HCC 诱导前后都表达 c-met,而且表达量没有明显变化。作为对照的 SMMC-7721 细胞也有 c-met 的表达。

## 3 讨 论

Al-Hajj 等<sup>[4]</sup>首先利用 NOD/SCID 小鼠(严重免疫缺陷/糖尿病小鼠)将筛选到的人 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/Low</sup>乳腺肿瘤细胞注射到 NOD/SCID 小鼠皮下乳房垫上,生成与人原发乳腺癌相似的肿瘤,认为这种细胞就是肿瘤形成细胞(tumorigenic breast cancer cells),提出体内成瘤能力是筛选肿瘤干细胞的重要依据。本研究中利用这一小鼠品系,通过肿



瘤组织块的异体接种分离了 P2-HCC 细胞系。值得注意的是 2 次接种的成瘤时间不同,第 2 次的成瘤时间是第 1 次的 2/3,这提示肝癌组织中存在“肝癌形成细胞”的可能性,另外异体接种的过程似乎是一个“富集”肿瘤形成细胞的过程。但从本实验所分离的 P2-HCC 的体内实验来看,成瘤能力似乎不是评价癌组织中的某些细胞是否具有干细胞性质的绝对指标,还必须结合其表面分子标志的表达情况以及体内、外分化能力给予综合评价。

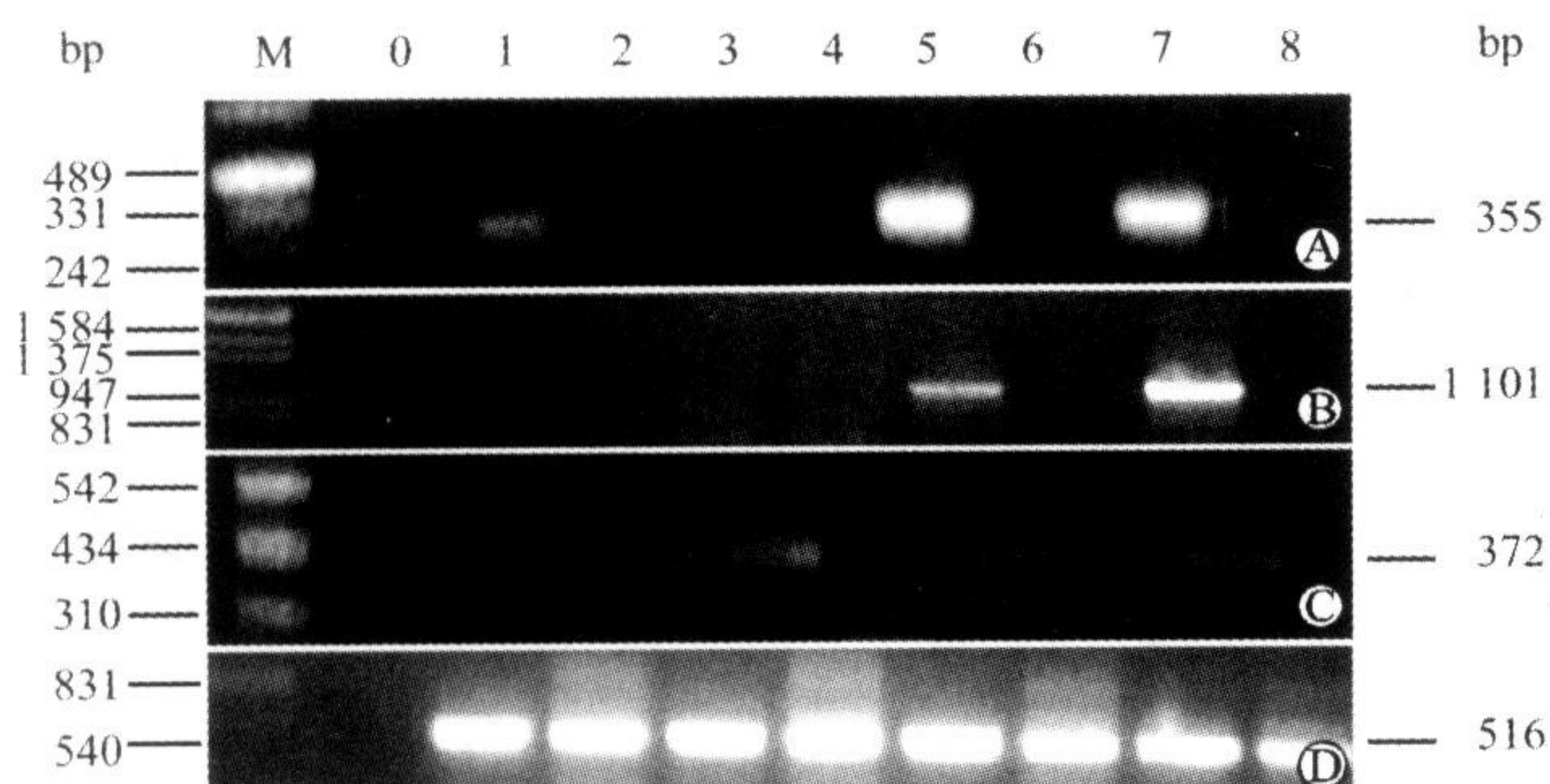


图 4 诱导前后 P2-HCC 肝细胞功能性蛋白的表达

Fig 4 Expression of hepatocyte functional proteins of P2-HCC before and after induction

A: Alb; B: G-6-P; C: C-met; D:  $\beta$ -actin; M: Marker; 0: Water; 1: P2-HCC (RT-PCR); 2: P2-HCC (PCR); 3: SMMC-7721 (RT-PCR); 4: SMMC-7721 (PCR); 5: IH/P2-HCC (RT-PCR); 6: IH/P2-HCC (PCR); 7: DMSO/P2-HCC (RT-PCR); 8: DMSO/P2-HCC (PCR)

肿瘤组织是一个异质性组织,存在着不同分化程度的肿瘤细胞,已有的资料也显示已经建立了多种肝肿瘤细胞系,根据其生长特性和生化特征将其分成去分化的(dedifferentiated hepatoma cell)、分化较好的(well-differentiated hepatoma cell)肿瘤细胞<sup>[6]</sup>,主要依据是根据细胞内表达肝细胞特异的胞质蛋白的种类来进行分类的,人们利用这些体外培养的细胞系进行了很多体外诱导分化实验。例如 Spath 等<sup>[7]</sup>将肝细胞核因子 HNF4 基因转入分离的肝癌细胞后,会诱导癌细胞表现出肝细胞表型,也有人利用 Ginsenoside Rh<sub>2</sub> 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 表达某些成熟肝细胞特异的功能性蛋白质,但未出现肝细胞表型分化<sup>[8]</sup>。曾有报道<sup>[9]</sup>认为胰岛素和氢化可的松共用可以诱导前成脂肪细胞的分化。本实验中联合应用胰岛素和氢化可的松将 P2-HCC 诱导分化为成熟肝细胞样细胞,不但有 30% 的细胞成为双核细胞,而且表现出肝细胞原代培养特性,其肝细胞功能性蛋白表达也出现了相应的变化,特别是作为肝细胞癌变前标志的 G-6-P 重新出现,说明 P2-HCC 经诱导失去了癌细胞的某些特性,转向成熟细胞分化;另外许多实验证明 DMSO 可以诱导胚

胎干细胞和肝前体细胞分化为肝细胞样细胞<sup>[10]</sup>,本实验中也观察到了 DMSO 对 P2-HCC 的诱导作用。但另一方面, IH 与 DMSO 的诱导分化的过程似乎有差异,前者对细胞增殖有一定的抑制作用,而且诱导过程中重新出现接触抑制现象,而后者的抑制作用不明显,细胞仍然重叠生长,提示两种物质的诱导分化的机制可能存在差异。

Suzuki 等<sup>[11]</sup>曾经从胎肝中分离到了一种多潜能干细胞 c-met<sup>+</sup> CD49f<sup>+</sup> c-kit<sup>-</sup> CD45<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup>,认为 c-met 是干细胞的标志之一。本实验 RT-PCR 结果显示 P2-HCC 表达 c-met,而且诱导后没有明显变化,提示 c-met 可能不能作为确定肝干细胞标志的惟一证据。

#### [参考文献]

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, *et al.* Stem cells, cancer and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 105-111.
- [2] Gournay J, Auvigne I, Pichard V, *et al.* *In vivo* cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocyte[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(6): 781-788.
- [3] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid is organized as hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [4] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [5] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5921-5828.
- [6] Chang CM, Lin Y, O-Lee T, *et al.* Induction of plasma protein secretion in a newly established human hepatoma cell line[J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 3(6): 1133-1137.
- [7] Spath GF, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiation hepatoma cells[J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(4): 935-946.
- [8] Zeng XL, Tu ZG. *In vitro* induction of differentiation by ginsenoside Rh<sub>2</sub> in SMMC-7721 hepatocarcinoma cell line[J]. *Pharmacol Toxicol*, 2003, 93(6): 275-283.
- [9] Suryawan A, Swanson LV, Hu CY. Insulin and hydrocortisone, but not triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture[J]. *J Anim Sci*, 1997, 75(1): 105-111.
- [10] Parent R, Marion MJ, Furio L, *et al.* Origin and characterization of a human biopotent liver progenitor cell line[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(4): 1147-1156.
- [11] Suzuki A, Zheng YW, Fukao K, *et al.* Liver repopulation by c-met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver[J]. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51(56): 423-426.

[收稿日期] 2004-10-27

[修回日期] 2004-12-22

[本文编辑] 尹 茶