

筛选鉴定Thy-1标记阳性肝癌细胞系中的卵圆细胞样干细胞： 可能是肝肿瘤干细胞吗？☆

程变巧, 江 艺

Screening and identification of oval cells-like stem cells of Thy-1-labeled positive hepatoma carcinoma cells: Are they tumor stem cells?

Cheng Bian-qiao, Jiang Yi

Abstract

BACKGROUND: There may be tumor stem cells during metastasis and recurrence of liver cancer. The number of tumor stem cells is very few, so it is difficult to be identified. Thy-1 is a surface marking protein of oval cells. Specific marker can indirectly confirm the existence of tumor stem cells in the tumor, which is a focus in recent studies.

OBJECTIVE: To study whether Thy-1 positive marked oval cells was expressed in hepatoma carcinoma cells, and investigate its screening and identification.

METHODS: Flow cytometry was used to identify that Thy-1 positive expression in hepatoma carcinoma cells HepG2 and BEL-7402 and normal hepatocytes QSG-7701. Immunomagnetic bead sorting was utilized to select hepatoma carcinoma cells with Thy-1. Immunofluorescence was used to identify selected efficiency. Naked mouse inoculated with hepatoma carcinoma cells in the skin test was assigned to three groups. In the Thy-1⁺ cells group, naked mice were inoculated with Thy-1⁺ cells (5×10^5 /mouse) underneath the skin of the back. In the HepG2 cell positive control group, naked mice were inoculated with HepG2 cells (0.5×10^7 /mouse) underneath the skin of the back. In the Thy-1⁻ cells negative control group, naked mice were inoculated with Thy-1⁻ cells (0.5×10^7 /mouse) underneath the skin of the back. Tumorigenicity in each group was observed one month later.

RESULTS AND CONCLUSION: Thy-1 expression in hepatoma carcinoma cells HepG2 and BEL7402 was significantly greater compared with normal hepatocytes QSG7701 ($P < 0.05$). Positive rate of immunofluorescence staining was 85% in the Thy-1⁺ cell group, 1% in the HepG2 cell positive control group, 0% in the Thy-1⁻ cell negative control group. There were nubble of five mice in HepG2 cell positive control and Thy-1⁺ groups, and the volume was large. However, there was one nubble in Thy-1⁻ group, and the volume was significantly small ($F=144.568, P < 0.05$). Results indicated that hepatoma carcinoma cells contained Thy-1 labeled positive oval cells-like stem cells, which may be tumor stem cells in hepatoma carcinoma cells.

Department of
Hepatobiliary
Surgery, Fuzhou
General Hospital of
Nanjing Military Area
Command of Chinese
PLA, Fuzhou
350002, Fujian
Province, China

Cheng Bian-qiao☆,
Doctor, Attending
physician,
Department of
Hepatobiliary
Surgery, Fuzhou
General Hospital of
Nanjing Military Area
Command of Chinese
PLA, Fuzhou
350002, Fujian
Province, China
nyd0129@tom.com

Cheng BQ, Jiang Y. Screening and identification of oval cells-like stem cells of Thy-1-labeled positive hepatoma carcinoma cells: Are they tumor stem cells? Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10): 1795-1798. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Correspondence to:
Jiang Yi, Doctor,
Chief physician,
Doctoral supervisor,
Department of
Hepatobiliary
Surgery, Fuzhou
General Hospital of
Nanjing Military Area
Command of Chinese
PLA, Fuzhou
350002, Fujian
Province, China
jiangyi183@yahoo.
com.cn

Received: 2009-10-01
Accepted: 2010-01-25

摘要

背景: 肝癌的转移复发被认为可能存在有肿瘤干细胞, 后者在肿瘤细胞中数目极少, 使得临床鉴别存在一定困难。Thy-1 是卵圆细胞的表面标记蛋白, 通过特异性标记物间接证明肿瘤中存在肿瘤干细胞是目前研究的重点。

目的: 探讨肝癌细胞中是否存在 Thy-1 标记阳性的卵圆细胞, 并进行筛选鉴定。

方法: 流式细胞仪检测卵圆细胞标记蛋白 Thy-1 在肝癌细胞 HepG2, BEL7402 及正常肝细胞 QSG7701 的阳性表达情况, 免疫磁珠分选 Thy-1 标记阳性的肝癌细胞, 免疫荧光鉴定分选效率。裸鼠皮下接种实验设立 3 组, Thy-1⁺细胞组裸鼠于背部皮下接种分选的 Thy-1⁺细胞 5×10^5 只, HepG2 细胞阳性对照组同法接种 HepG2 细胞 0.5×10^7 只, Thy-1⁻细胞阴性对照组同法接种分选的 Thy-1⁻细胞 0.5×10^7 只, 1 个月后观察各组成瘤性。

结果与结论: 卵圆细胞表面标记蛋白 Thy-1 在肝癌细胞 HepG2, BEL7402 中的表达明显高于正常肝细胞 QSG7701 ($P < 0.05$)。Thy-1⁺细胞组免疫荧光染色阳性率为 85%, HepG2 细胞阳性对照组为 1%, Thy-1⁻细胞阴性对照组几乎无免疫荧光表达。HepG2 细胞阳性对照组、Thy-1⁺细胞组 5 只裸鼠全部成瘤, 且瘤体体积相对较大; 而 Thy-1⁻细胞阴性对照组仅有 1 只裸鼠成瘤, 瘤体体积明显小于前 2 组 ($F=144.568, P < 0.05$), 提示肝癌细胞中存在 Thy-1 标记阳性的卵圆细胞样干细胞, 其可能是肝癌细胞中的肿瘤干细胞。

关键词: 卵圆细胞表面标记蛋白; Thy-1; 卵圆细胞; 肝癌细胞; 肝癌干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.017

程变巧, 江艺. 筛选鉴定 Thy-1 标记阳性肝癌细胞系中的卵圆细胞样干细胞: 可能是肝肿瘤干细胞吗? [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1795-1798. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

解放军南京军区
福州总医院肝胆
外科, 福建省福州
市 350002

程变巧☆, 女,
1976年生, 河南
省漯河市人, 汉
族, 2007年南方
医科大学毕业, 博
士后, 主治医师,
主要从事肝癌干
细胞基础与临床
方面的研究。
nyd0129@tom.
com

通讯作者: 江
艺, 博士, 主任医
师, 博士生导师,
解放军南京军区
福州总医院肝胆
外科, 福建省福
州市 350002
jiangyi183@
yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2010)10-01795-04

收稿日期: 2009-10-01
修回日期: 2010-01-25
(20090801026/
ZS-Q)

0 引言

目前普遍认为肿瘤细胞存在有肿瘤干细胞^[1]。根据肿瘤干细胞在实体肿瘤中研究的深入, 有学者提出肝癌中也可能存在肿瘤干细胞^[2-10], 而且越容易复发的肿瘤, 肿瘤干细胞越有可能存在。但是肿瘤干细胞的含量极少, 使得对肝癌的研究陷入困境, 通过干细胞表面标记蛋白成为研究的突破口^[11-19]。

卵圆细胞是目前公认的肝脏干细胞, 在一定条件下可诱导分化成肝细胞^[20-23], 因此推测肝癌细胞中可能存在卵圆细胞样干细胞。研究证实肝癌中存在卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1, 且与肝癌的发生发展及远处转移密切相关^[13, 15-16]。为此实验探讨卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1在HepG2中的表达情况。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2008-04/2009-07在解放军南京军区福州总院完成。

材料: BALB/c裸鼠15只, 4~6周龄, 雌雄不拘, 体质量10~17 g, 随机分为3组: HepG2细胞阳性对照组、Thy-1⁻细胞阴性对照组、Thy-1⁺细胞组, 5只/组, 由解放军南京军区福州总院动物实验中心提供, 动物质量合格证号: SCXK2007-0005, 实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

细胞与试剂:

细胞与试剂	来源
肝癌细胞系 HepG2, BEL7402, 正常肝细胞 QSG7701	中科院上海细胞库
RPMI1640、青霉素、链霉素、胎牛血清	Hyclone 公司
小鼠抗人 Thy-1 单克隆抗体	santa crzu 公司
羊抗小鼠 IgG-FITC	武汉博士德生物公司
小鼠免疫磁珠 IgG、磁架	美国 Dynal 公司

实验方法:

细胞培养: 肝癌细胞HepG2, BEL7402与正常肝细胞QSG7701均培养于含体积分数为10%胎牛血清、1×10⁵青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI1640培养液中, 于37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养。

流式细胞仪检测: 2.5 g/L胰酶常规消化细胞, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 1×PBS 0.2 mL调整细胞浓度为1×10⁹ L⁻¹, 加入卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1单克隆抗体(每1×10⁶个细胞加入1 μg抗体)。37℃孵育30 min, 1×PBS洗涤2次, 1 000 r/min离心5 min, 加入IgG-FITC二抗(稀释比为1:100), 37℃孵育30 min, 1×PBS洗涤2次, 最后以400 μL上机检测。

免疫磁珠分选: 具体步骤按照说明书进行。2.5 g/L胰酶常规消化细胞, 离心, 调整细胞计数, 保证细胞数≥10¹⁰ L⁻¹。加入Thy-1一抗(每1×10⁷个细胞加入2 μg), 37℃孵育30 min, 离心后以buffer II重悬细胞。同时每1×10⁷个细胞取25 μL磁珠进行预洗, 磁架上放置2 min, 后弃上清, 最后以相同体积重旋磁珠。标记有一抗的细胞与磁珠进行混合, 4℃孵育20 min, 磁架上放置2 min, 取上清(此时为Thy-1⁻细胞)。以buffer I重悬沉淀, 重复上述步骤2次。最后以预热的buffer III重悬沉淀。每1×10⁷个细胞加入DNAI 4 μL, 常温下孵育15 min, 轻微吹打5~10次, 磁架上放置2 min, 取上清(此时为Thy-1⁺细胞)。重复上述步骤两三次。

荧光显微镜观察分选效果: 取免疫磁珠分选细胞, 以HepG2作为阳性对照组, 分选的Thy-1⁻细胞及Thy-1⁺细胞分别作为阴性组及实验组, 分别加入Thy-1 FITC标记的抗体, 孵育30 min, 1×PBS冲洗3次, 荧光显微镜观察效果。

成瘤能力检测: Thy-1⁺细胞组裸鼠于背部皮下接种分选的Thy-1⁺细胞5×10⁵/只, HepG2细胞阳性对照组同法接种HepG2细胞0.5×10⁷/只, Thy-1⁻细胞阴性对照组同法接种分选的Thy-1⁻细胞0.5×10⁷/只, 1个月后观察各组成瘤能力及瘤体质量。

$$\text{瘤体体积(mm}^3\text{)} = (\text{长径} \times \text{短径}^2) / 2$$

主要观察指标: ①流式细胞仪检测Thy-1在3种肝细胞系中的差异表达情况。②免疫荧光鉴定Thy-1在HepG2中的免疫磁珠分选效率。③裸鼠皮下接种观察肿瘤成瘤性。

设计、实施、评估者: 设计、实施由第一作者完成, 评估由第二作者完成, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者应用SPSS 13.0软件进行完全随机设计的方差分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较行LSD法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1在3种肝细胞系中的差异表达情况 流式细胞仪检测结果显示, 卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1在肝癌细胞HepG2, BEL7402中表达较高, 阳性率约为2.25%, 1.09%; 在正常肝细胞QSG7701中的表达相对较低, 阳性率约为0.25%。Thy-1在两种肝癌细胞中的表达明显高于正常肝细胞($P < 0.05$), 见图1。考虑到HepG2细胞裸鼠成瘤能力较强, 因此实验选择HepG2细胞作为下一步观察对象。

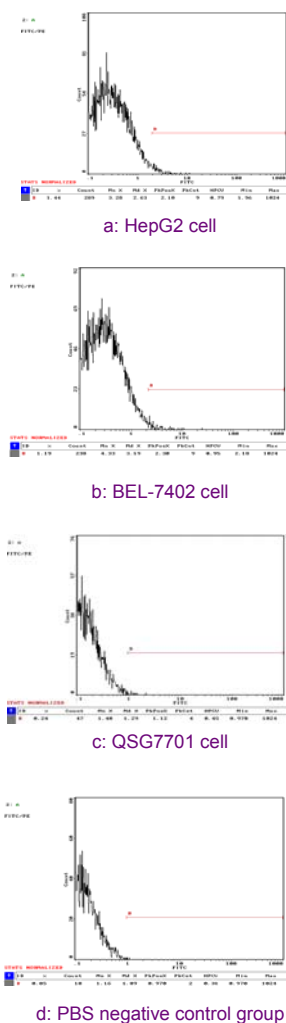


Figure 1 Difference expression of Thy-1 in three cells
图1 卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1在3种肝细胞系的差异表达

2.2 卵圆细胞表面标记蛋白Thy-1在肝癌细胞HepG2中的免疫磁珠分选效率 免疫荧光鉴定结果显示, Thy-1⁺细胞组免疫荧光染色阳性率为85%, HepG2细胞阳性对照组免疫荧光染色阳性率为1%, Thy-1⁻细胞阴性对照组几乎无免疫荧光表达, 见图2。

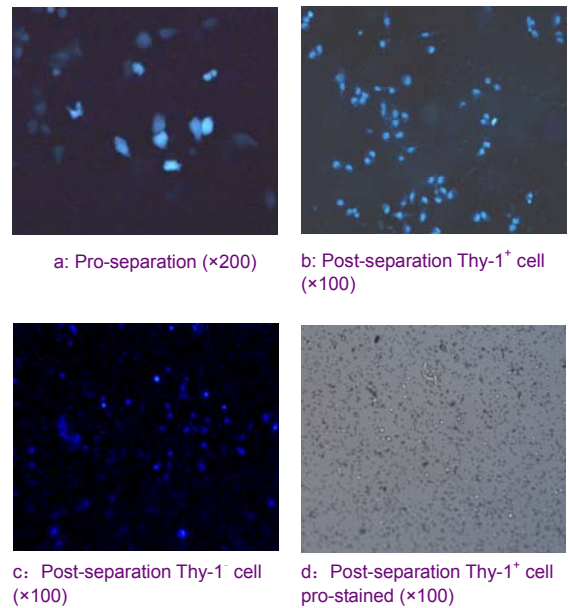


Figure 2 Identification separation efficiency of Thy-1 in HepG2 cells by immunofluorescence staining
图2 免疫荧光染色鉴定Thy-1在HepG2细胞中的分选效率

2.3 裸鼠皮下接种实验观察肿瘤成瘤性 与HepG2细胞阳性对照组一样, Thy-1⁺细胞组小剂量的Thy-1⁺细胞接种裸鼠后全部成瘤, 而Thy-1⁻细胞阴性对照组接种较大剂量的Thy-1⁻细胞仅有1只裸鼠成瘤。

HepG2细胞阳性对照组、Thy-1⁺细胞组的瘤体体积相对较大, 分别为 $(0.550 \pm 0.022) \text{cm}^3$, $(0.524 \pm 0.022) \text{cm}^3$, 两组比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 而Thy-1⁻细胞阴性对照组的瘤体体积仅为 $(0.008 \pm 0.022) \text{cm}^3$, 明显小于前2组($F=144.568$, $P < 0.05$), 提示Thy-1⁺细胞可能是肝癌细胞HepG2中的肿瘤干细胞。

3 讨论

在大多数肿瘤细胞中存在着数量有限、但对肿瘤启动和维持肿瘤生长起主要作用的细胞, 称为“肿瘤干细胞”。卵圆细胞是肝脏干细胞到成熟干细胞的中间产物, 具有典型的干细胞特征, 被认为是具有分化为肝细胞及胆管上皮细胞的双向潜能干细胞, 在宿主受体诱癌剂的作用下可以成为肝癌的始动细胞^[24-25]。Hison等^[26]研究发现, 癌变前位点和肝细胞癌的细胞均表达卵圆细胞和肝细胞的特异性抗原, 提示肿瘤干细胞由正常组织的干细胞突变而来的可能性。Sell等^[27]根据卵圆细胞的形态、表形特征、癌基因表达等大量间接证据, 认为肝癌细胞来源于卵圆细胞。

根据卵圆细胞的常见表面标记蛋白来进行肿瘤卵圆细胞的分离, 是鉴别肝癌中是否存在卵圆细胞并对其

进行基因表达谱研究的前提所在。实验通过对两种肝癌细胞系HepG2, BEL7402及肝正常细胞QSG7701研究发现, 卵圆细胞表面标记蛋白之一Thy-1在3种细胞中均有不同程度的表达, 在恶性程度高的HepG2细胞中表达最强, 约1%左右; 在BEL7402细胞系中的表达次之, 在正常肝细胞系QSG7701中的表达最弱, 约为0.24%。卵圆细胞在正常肝细胞和肝癌细胞中均存在这一现象说明: ①正常干细胞和肝癌细胞中均存在干细胞, 占细胞总数的很少部分, 这符合干细胞的特点^[6]。②肝癌中卵圆细胞所占的比例比正常肝细胞中高, 这可能是因为正常肝细胞已经具备分化完全, 而肝癌细胞具有分化不完全、异常分化的原因, 这也符合肿瘤干细胞具有无限增殖和异常分化的特性。

为进一步确定Thy-1⁺的卵圆细胞是否符合肿瘤干细胞的易成瘤性, 实验利用免疫磁珠分选技术, 对Thy-1表达量较高的HepG2细胞进行Thy-1⁺和Thy-1⁻细胞的分选, 用HepG2细胞作为阳性对照, 分别把Thy-1⁺和Thy-1⁻细胞种植到裸鼠背部皮下, HepG2细胞及Thy-1⁻细胞用相同剂量, 而Thy-1⁺的细胞用较小剂量, 结果发现Thy-1⁺细胞与HepG2细胞具有同样的成瘤能力, 两组成瘤率及瘤体大小均基本相似。而Thy-1⁻细胞的成瘤率较低, 与上述两组比较差异显著, 说明Thy-1⁺细胞具备肿瘤干细胞的无限增殖和分化异常的能力^[11, 28-30]。

目前已经初步证实肝癌中存在卵圆细胞样肿瘤干细胞, 以卵圆细胞为基础, 通过基因或蛋白表达谱之类的研究, 确定肝癌干细胞的特异性表面标记蛋白, 对肝癌的早期诊断、干预治疗及预后评估等具有重要意义。

4 参考文献

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells cancer stem cells. Nature. 2001;414(6859):105-111.
- [2] Wu XZ, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. J Gastroenterol Hepatol. 2006;21(7):1093-1098.
- [3] Alison MR. Liver cancer: a disease of stem cells? Panminerva Med. 2006;48(3):165-174.
- [4] Shupe T, Petersen BE. Evidence regarding a stem cell origin of hepatocellular carcinoma. Stem Cell Rev. 2005;1(3):261-264.
- [5] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. Gastroenterology. 2007;132(7):2542-2556.
- [6] Komuta M, Spee B, Vander Borgh S, et al. Clinicopathological study on cholangiolocellular carcinoma suggesting hepatic progenitor cell origin. Hepatology. 2008;47(5):1544-1556.
- [7] Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. J Clin Oncol. 2008;26(17):2800-2805.
- [8] Kamohara Y, Haraguchi N, Mimori K, et al. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. Surgery. 2008;144(2):119-124.
- [9] Xu X, Xing B, Han H, et al. The Properties of Tumor-initiating Cells from a Hepatocellular Carcinoma Patient's Primary and Recurrent Tumor. Carcinogenesis. 2009; Epub ahead of print
- [10] Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma. Cancer Biol Ther. 2009;8(18):1691-1698.
- [11] Lee ES, Han EM, Kim YS, et al. Occurrence of c-kit+ tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. Am J Clin Pathol. 2005;124(1):31-36.
- [12] Becker G, Schmitt-Graeff A, Ertelt V, et al. CD117 (c-kit) expression in human hepatocellular carcinoma. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2007;19(3):204-208.
- [13] Yang ZF, Ho DW, Ng MN, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. Cancer Cell. 2008;13(2):153-166.

- [14] Xie Z, Choong PF, Poon LF, et al. Inhibition of CD44 expression in hepatocellular carcinoma cells enhances apoptosis, chemosensitivity, and reduces tumorigenesis and invasion. Cancer Chemother. Pharmacol. 2008;2(6):949-957.
- [15] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, et al. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. Hepatology. 2008;7(3):919-928.
- [16] Sun YL, Yin SY, Xie HY, et al. Stem-like cells in hepatitis B virus-associated cirrhotic livers and adjacent tissue to hepatocellular carcinomas possess the capacity of tumorigenicity. Gastroenterol Hepatol. 2008;3(8Pt1):1280-1286.
- [17] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology. 2009;36(3):1012-1024.
- [18] Mansuroglu T, Baumhoer D, Dudas J, et al. Expression of stem cell factor receptor c-kit in human nontumoral and tumoral hepatic cells. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009;21(10):1206-1211.
- [19] Zhu Z, Hao X, Yan M, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133(+)/CD44(+) population in hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer. 2009; Epub ahead of print
- [20] Fang CH, Chen TJ, Liu SJ. Investigation of the role of hepatic oval cell in primary hepatocarcinogenesis using specific Y chromosome. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2006;44(21):1501-1504.
- [21] Chen QR, Xiang J, Liao B, et al. Evolutionary characters of oval cells in experimental hepatocarcinogenesis. Ai Zheng. 2007;26(7):719-723.
- [22] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2009;49(1):318-329.
- [23] Strick Marchand H, Morosan S, Charneau P, et al. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(22):8360-8365.
- [24] Becker R, Luthgens B, Oesch F, et al. Ha-ras Val12 but not p53 ser247 leads to a significant neoplastic transformation rate of the putative rat liver stem cells (oval cell). Carcinogenesis. 1996;17:2635-2640.
- [25] Qiu DK, Ma X, Peng YS, et al. Locational and quantitation rate of hepatic oval in chronic liver diseases-pathologic analysis of 29 liver samples from patients with chronic liver diseases. Zhonghua Xiaohua Zazhi. 2000;20:301-303.
- [26] Hixson DC, Faris RA, Thompson NL, et al. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. Pathobiology. 1990;58(2):65-77.
- [27] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;51(1):1-28.
- [28] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature. 2001;414(6865):105-111.
- [29] Zhou SL, Li P. Zhonghua Ganzangbing Zazhi. 2006;14(5):364-366. 周思朗, 李鹏. 大鼠肝癌干细胞生物学行为研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2006,14(5):364-366.
- [30] Yan Z, Fang CH, Gao P, et al. Nanfang Yike Daxue Xuebao. 2006;26(9):1304-1306. 颜政, 方驰华, 高鹏, 等. 人原发肝细胞癌干细胞表面标志的初步研究[J]. 南方医科大学学报, 2006,26(9):1304-1306.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的创新点: 卵圆细胞是肝脏的干细胞, 根据其表面标记蛋白试图找出肝癌的干细胞标记是课题研究创新点。

课题评估的“金标准”: 实验将免疫磁珠筛选出的卵圆细胞标记蛋白 Thy-1⁺用较小剂量进行裸鼠皮下接种, 通过观察其成瘤性来进行说明 Thy-1⁺细胞是肝癌干细胞。

课题的偏倚与不足: 实验没有进行临床组织学和血清学证实。此外, 根据成功接种裸鼠的瘤体进行组织学和基因、蛋白水平实验, 进一步证实是 Thy-1⁺的瘤体模型, 是下一步研究的内容。再者动物接种实验部分标本偏少, 需要扩大标本量。

提供临床借鉴的价值: 卵圆细胞是肝脏的正常干细胞, 研究认为其是肝癌的始动细胞, 与肝癌发生密切相关。Thy-1 是卵圆细胞的标记蛋白, 在肝癌中有一定的表达。实验结果证实 Thy-1⁺细胞是肝癌干细胞, 在肝癌患者进一步行血清学和组织学检测中, 有助于对肝癌病情的复发及远处转移和预后进行预测。