

肝癌细胞系 Huh7 中肿瘤干细胞分离及鉴定

梁 晨, 单娟娟, 沈俊杰, 刘 立, 钱 程

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 利用肿瘤干细胞具有自我更新能力的特点,首次采用悬浮培养技术从 Huh7 细胞系中得到肝癌(干)细胞球,并通过 RT-PCR、流式细胞术和免疫荧光等方法检测它们的干细胞标记和分化标记。结果显示 Huh7(干)细胞球的干性相关基因表达上调;分化相关基因表达下调;流式细胞仪检测结果表明 88.82% 的 Huh7(干)细胞球表达 *EpCAM* 基因,与正常 Huh7 细胞相比表达上调。表明该方法具有富集肝癌干细胞的效果,为以后肝癌干细胞建立更高效的分离方法提供了一种新的技术方法。

关键词: 肿瘤干细胞; 肝癌(干)细胞球; 生长因子; *EpCAM*

中图分类号: Q786

文献标识码: A

0 引 言

随着对癌症发生机制的深入研究,肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)^[1-2]的概念被提出并逐渐成为研究者关注的热点。继在急性粒细胞白血病^[3]、乳腺癌^[4]、肺癌^[5]、胶质瘤^[6]等癌组织中发现具有干细胞特征的细胞后,肝癌中存在干细胞这一观点也被认可。

人们基于肝癌干细胞不同的表现特征而采取了相应的分离方法,常见的方法有细胞表面分子标记物分选法、侧群细胞(side population, SP)分选法和悬浮培养法等。

细胞表面分子标记物分选法是通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)或免疫磁珠分选技术(magnetic activated cell sorting, MACS)分选出具有某一特异性标记的细胞亚群。相继有文献报道 CD133^[7]、CD90^[8]、*EpCAM*^[9]可能是肝癌干细胞的标记,但这些标记并不具有代表性且相互抵触。

SP 细胞分选法是利用肿瘤干细胞具有耐药性可将小分子物质排出胞外的原理,采用流式细胞术将不被荧光染料 Hoechst 33342 染色或着色较浅的细胞分离出来的方法。Haraguchi 等^[10]首次分析 Huh7、Hep3B 和 HepG2 的细胞亚群,发现 Huh7 和 Hep3B 两株细胞系中存在具有很强成瘤能力和抗凋亡特征的 SP 细胞亚群,但 Hoechst 33342 具有细胞毒性,且 SP 细胞只存在于某些细胞系中,因而不具有普遍性。

悬浮培养法是使用无血清培养基添加各种生长因子使贴壁生长的细胞形成球状克隆的方法。人们已通过悬浮培养的方法从神经组织^[11]、乳腺^[12]和皮肤^[13]等组织中筛选并扩增出了成体干细胞。Tsuchiya 等^[14]使用该方法从 C57BL/6 鼠中成功培养出了能连续传代的胎肝干/祖细胞(hepatic stem/progenitor cells)。本文将该方法用于培养肝癌干细胞,获得 Huh7 细胞球并对其进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材 料

人肝癌细胞株 Huh7(上海生命科学院细胞生物学研究所);Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco)、DMEM/F12(1 : 1) (Gibco)、Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco);生长因子 bFGF (Peprotech), HGF (Peprotech);RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas);SYBR^(R) Premix Ex Taq™(Perfect Real Time) (TaKaRa);抗体 EpCAM (BD)、CD45 (BD)、SSEA-1(BD)、CD117 (BD)。

1.2 方 法

1.2.1 贴壁培养法

六孔板每孔种 1×10^5 个 Huh7 细胞,同时加入 2 mL 10% FBS 的 DMEM 培液,在 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中孵育,待细胞汇合度达到 70%~80%,消化细胞并种到新的六孔板中按上述条件继续培养。

1.2.2 悬浮培养法

以无血清的 DMEM/F12 作为基础培养基,添加 HGF(10 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)等生长因子制成标准培养基。六孔板 (ultra-low plates, BD) 中种 1×10^4 cell/孔密度的 Huh7 细胞,同时加入 2 mL 10% FBS 的 DMEM 培液,在 37℃、5% CO₂ 浓度的培养箱中孵育,每隔 2 d 半量换入新鲜的标准培养基,待细胞球直径大于 50 μm 时进行传代培养。

细胞球传代时先将悬浮的球收集到离心管中,以 900 r/min 的转速离心 3 min,移除培液后加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EGTA 消化,再加入新鲜培液将细胞球轻轻吹打至成为单个细胞后收集到离心管中,以 900 r/min 的转速离心 3 min,移除上清后再加入新鲜的培养液,血球计数板计数后按原来的细胞浓度铺到新的六孔板中,并按上述方法进行培养得到传代的细胞球。

1.2.3 RT-PCR 法检测细胞球中的基因表达

将普通培养条件下的 Huh7 细胞和上述培养条件下得到的 Huh7 细胞球裂解后提取总 RNA,定量后进行反转录成 cDNA,将 cDNA 样品用 ddH₂O 稀释后进行荧光定量 PCR 实验,以检测干细胞标记 OCT4、SOX2、*Nanog*、*Kif*、分化标记 *TAT*、*G6PC* 等基因在 mRNA 水平的表达情况。以 GAPDH 基因的表达量为内参,普通培养条件下的 Huh7 细胞的表达量记为 1。

1.2.4 流式细胞术检测细胞球表面标记表达

将普通培养条件下的 Huh7 细胞和上述培养条件下得到的 Huh7 细胞球按上述方法消化后制成单细胞悬液,加入适量抗体,4℃孵育 30 min,900 r/min 离心 3 min,弃去上清,PBS 洗两遍,200 μLPBS 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.5 免疫荧光法检测细胞球表面标记表达

上述培养条件下得到的 Huh7 细胞球种在盖玻片上贴壁 2 h,4%多聚甲醛固定,PBS 洗 2 遍,抗体 4℃孵育 30min,PBS 洗 2 遍,甘油封片,激光共聚焦显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 悬浮培养法富集 Huh7(干)细胞球

以无血清的 DMEM/F12 作为基础培养基,添加 HGF (hepatocyte growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor) 等生长因子,并辅以低粘附细胞培养板降低肝癌细胞的贴壁性。利用该条件笔者从 Huh7 肝癌细胞系中成功获得悬浮生长的肿瘤(干)细胞球,并可以连续传代。当细胞球从条件培养恢复至正常培养条件时细胞可重新贴壁生长,并保持良好活力,结果如图 1 所示。

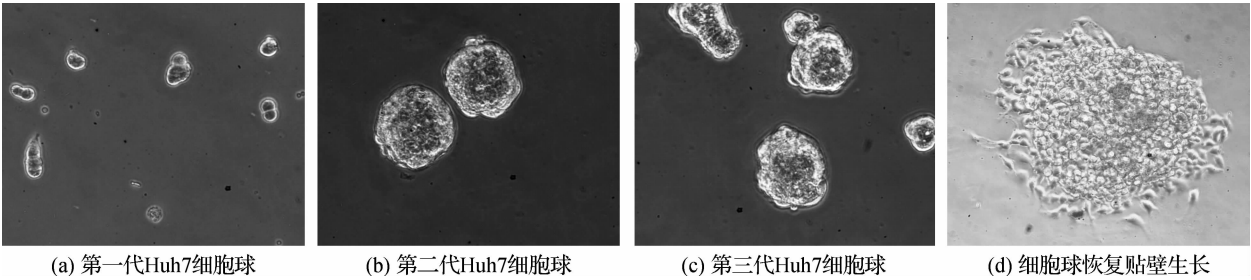


图1 悬浮培养法获得的 Huh7(干)细胞球(放大倍数:100×)

2.2 Huh7(干)细胞球特性鉴定

RT-PCR 检测悬浮培养获得的 Huh7(干)细胞球中干细胞相关基因表达情况(图 2)。结果显示多数干细胞相关基因在肝癌干细胞球中上调表达:OCT4 上调 5.53 倍、Nanog 上调 3.83 倍、KIF 上调 3.41 倍;而分化基因如 TAT、G6PC 等表达下调。结果表明得到的 Huh7(干)细胞球是有富集干细胞的能力的。

Epithelial Cell Adhesion Molecule(EpCAM)是鉴定肿瘤细胞成瘤能力的标记物之一,它在 CSCs 致瘤过程起到重要的作用^[9,15]。流式细胞仪分析结果显示 88.82% 的 Huh7(干)细胞球都表达 EpCAM,免疫荧光的结果也验证了流式细胞仪分析的结论(图 3、图 4)。Huh7(干)细胞球的其他一些表面标记 CD45、SSEA-1(stage-specific embryonic antigen 1)及 CD117 与 Huh7 细胞相比表达量略有上升(图 3)。

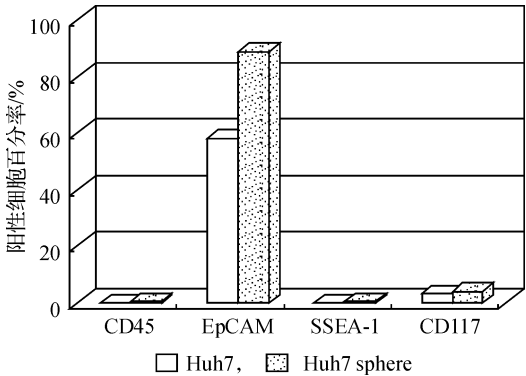
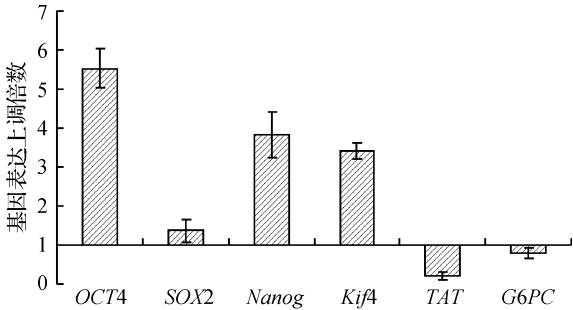
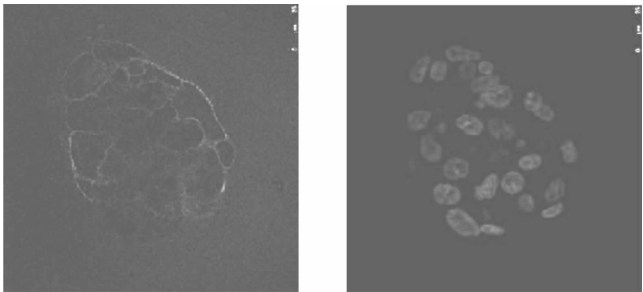


图3 流式细胞仪检测 Huh7(干)细胞球表面标记的表达情况



OCT4(octamer-binding transcription factor 4); SOX2(SRY(sex determining region Y)-box 2);KIF4(kinesin family member 4); TAT(tyrosine amino transferase); G6PC(Glucose-6-phosphatase)

图2 RT-PCR 方法检测 Huh7(干)细胞球干性相关标记和分化标记



(a) 绿色荧光标记EpCAM (b) 蓝色标记细胞核

图4 细胞免疫荧光检测 Huh7(干)细胞球表面 EpCAM 的表达情况(放大倍数:400×)

3 讨论

CSCs 在越来越多地得到人们的认可和关注的同时,它的分离和鉴定方法的确立变得迫切而必要。目前获得 CSCs 的方法都有其缺陷,主要原因是人们对 CSCs 所具有的特征没有统一的答案,因而寻找新的标记和(或)标记的组合是解决这一问题未来的方向和重点。

本研究利用无血清的 DMEM/F12 培养基添加 bFGF(20 ng/mL)和 HGF(10 ng/mL)两种生长因子,在低粘附六孔板中悬浮培养从 Huh7 细胞系中得到了肝癌(干)细胞球。该细胞球表现出了良好的细胞活力,其干性标记基因的表达都有不同程度上调。

与其他两种分离方法相比,悬浮培养法有其显著优势。首先,悬浮培养法由于具有对细胞毒性小和能够保留干细胞特征的优点,因而可以连续培养获得大量的细胞,可同时进行不同方面的研究,保证了实验材料的统一性和研究结果的可靠性。其次,通过悬浮培养得到的细胞球提取核酸,利用基因芯片分析它与普通细

胞系之间核酸表达谱的差异,从而得到更多的生物信息,为以后肿瘤干细胞找寻新的标记(或标记的组合)提供参考。因此,悬浮培养法将是未来肿瘤干细胞分离研究中重要技术方法之一。

参考文献:

- [1] Clarke M F, Dick J E, Dirks P B, et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [2] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414: 105-111.
- [3] Bonnet D, Dick J E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell[J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737.
- [4] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [5] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121(6): 823-835.
- [6] Yu S C, Ping Y F, Yi L, et al. Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87 [J]. *Cancer Lett*, 2008, 265(1): 124-134.
- [7] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype[J]. *Nat Med*, 2001, 7(9): 1028-1034.
- [8] Yang Z F, Ho D W, Ng M N, et al. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(2): 153-166.
- [9] Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(3): 1012-1024.
- [10] Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 506-513.
- [11] Reynolds B A, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. *Dev Biol*, 1996, 175(1): 1-13.
- [12] Dontu G, Abdallah W M, Foley J M, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(10): 1253-1270.
- [13] Toma J G, Akhavan M, Fernandes K J, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(9): 778-784.
- [14] Tsuchiya A, Heike T, Fujino H, et al. Long-term extensive expansion of mouse hepatic stem/progenitor cells in a novel serum-free culture system[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 2089-2104.
- [15] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(10): 2145-2155.

Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells from a Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Huh7

LIANG Chen, SHAN Juan-juan, SHENG Jun-jie, LIU Li, QIAN Cheng

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: With the increasingly deep study on the mechanism of cancer, CSCs becomes a research focus. Several isolation methods are developed based on different phenotypes of CSCs. Spheroids derived from hepatocellular carcinoma cell line Huh7 cells are obtained by suspension culture based on the feature of CSC self-renewal. Stem cell markers and differentiation markers of the Huh7 spheroids are identified by RT-PCR method, FCM and IF. They are demonstrated to have elevated mRNA expressions of stem-cell-related genes and reduced levels of differentiation-related genes. Furthermore, 88.82% of Huh7 spheroids are identified to express epithelial cell adhesion molecule (EpCAM). In conclusion, these Huh7 spheroids may be the enrichment of cancer stem cells in Huh7 cells, providing a new approach to establish a more effective isolation method for liver cancer CSC in future.

Key words: cancer stem cells; hepatic spheroids; grow factor; EpCAM (责任编辑: 许惠儿)