

# 梯度密度离心法分离肝癌细胞及其转移性细胞株的建立

张 萌, 胡少为, 姜桔红, 文剑明

(中山大学附属第一医院病理学教研室, 广东 广州 510080)

**摘 要:** 【目的】建立新的肝细胞癌细胞系, 为肝癌实验研究提供更多纯化癌细胞。【方法】从肝细胞癌患者原发灶和门脉癌栓中获取癌组织, 采用 Percoll 浓度梯度分离癌细胞进行培养, 用微环境消化法获取癌细胞克隆并建立细胞系, 对培养成功的细胞系进行生长曲线测定、染色体 G 带核型分析、对比基因组杂交和裸鼠接种成瘤实验。【结果】对 20 例肝癌组织进行癌细胞分离培养和克隆, 成功建立 2 例细胞系 H2M 和 H4M, 这 2 株细胞均来自门脉癌栓, 它们的染色体数目测定均为超 3 倍体 (71~78 条)。CGH 检测显示 H2M 主要的细胞遗传学改变为染色体 4q、13q、16q、17p 和 19p 缺失和 1q、3q、5p、6p、7q 和 8q 扩增, 其中有一条标记染色体含有 1q 和 6p [t(1;6)染色体]; 而 H4M 染色体 8p、9、13q、16q 缺失和 6p、7p、11p、11q13 扩增, 其中有一条标记染色体含有一长的均染区 (hsr)。H2M 细胞接种裸鼠 1 个月, 产生典型的人肝细胞癌, 但 H4M 接种尚未能成瘤。【结论】Percoll 浓度梯度分离癌细胞和微环境消化法取得癌细胞克隆是建立原代细胞系的有效方法。2 例肝癌细胞系的建立为以后肝癌研究提供了实验材料, 所测出的肝癌细胞系的细胞遗传学改变及在裸鼠接种成瘤, 为肝癌细胞癌基因和抑癌基因筛选提供了研究线索和实验模型。

关键词: 肝癌; 细胞株; 核型; 比较基因组杂交

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0670-04

## Isolation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Density Gradient Centrifuge and Establishment of Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cell Lines

ZHANG Meng, HU Shao-wei, JIANG Ju-hong, WEN Jian-ming

(Department of Pathology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To establish hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines and provide more pure liver carcinoma cells for HCC studies. 【Methods】The carcinoma tissues were obtained from the primary lesion and metastatic lesion in portal vein of HCC. The carcinoma cells were isolated by Percoll density gradient centrifuge and cultivated. The cell clones were then obtained by micro-environmental digestion and cell lines were established. The growth curves, G band chromosome karyotype, comparative genomic hybridization (CGH) of the established cells were characterized. The cells were implanted in nude mice for tumorigenesis. 【Results】20 cases of HCC cells were isolated and cultivated. Two cell lines (designated as H2M and H4M) were successfully established from 2 cases of emboli of portal vein. The karyotype showed that both cell lines are a hypertriploid (71~78 chromosomes). A marker chromosome containing 1q and 6p [t(1;6)] was found in H2M cells and a huge marker chromosome containing a long homogeneously staining region (hsr) in H4M cells. The main genetic alterations analyzed by CGH were a high copy number amplification of 1q, 3q, 5p, 6p, 7q and 8q and loss of 4q, 13q, 16q, 17p 19p in H2M cells, whereas, amplification of 6p, 7p, 11p, 11q13 and loss of 8p, 9, 13q, 16q in H4M cells. Implantation of H2M cells in nude mice for a month produces typical human hepatocellular carcinoma, but no tumor for H4M cells. 【Conclusions】Percoll density gradient centrifuge and micro-environmental digestion is an effective method for cloning of primary carcinoma cell and cell line establishment. Two established HCC cell lines will provide culture cells for HCC studies. The genetic alterations detected in both cell lines also provide clues and cell models for further screening of oncogenes

收稿日期: 2007-09-05

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20060558017)

作者简介: 张 萌 (1956-), 女, 广东梅州人, 副主任技师, E-mail: zhangm9@mail.sysu.edu.cn; 文剑明, 通讯作者, 教授, 博士生导师, E-mail: wenjm@mail.sysu.edu.cn

and tumor suppressor genes in HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; HCC cell lines; karyotype; comparative genomic hybridization

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):670-673]

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见癌症之一。尽管已有多个肝癌细胞系供实验室研究用,但这些细胞多由国外研究人员建立,而且极少从门脉转移灶建立<sup>[1]</sup>。此外,已建立的细胞系缺乏细胞遗传学改变的资料,不能为肝癌基因、抑癌基因的筛选及肝癌转移机制研究提供线索。本文描述 2 例门脉转移性肝癌细胞系的建立过程并检测其分子遗传学改变,旨在为 HCC 的深入研究提供实验工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本来源

20 例肝癌组织取自中山大学附属第一医院肝胆外科手术标本,每份癌组织均取原发灶和门脉癌栓,经病理检查证实和进行细胞培养。

### 1.2 细胞培养

原发瘤及门脉癌栓组织用含 5 倍浓双抗 (500 u/mL 青霉素和 500  $\mu$ g/mL 链霉素) PBS 冲洗后剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小,用 0.1% 的胶原酶 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 在 37<sup>o</sup> 下消化 30 min,用 120 目不锈钢网过滤。将细胞悬液铺入装有等渗梯度密度 Percoll™ (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) 的 50 mL 塑料离心管的上层, Percoll 浓度梯度从底层至最高层依次为 70%、50%、40%,每层 5 mL。4<sup>o</sup> 下 3 500  $\times$ g 离心 30 min,离心后在 40% 层内吸取含细胞的 Percoll 液,用 F12 培养液稀释 5 倍,275  $\times$ g 离心 10 min。沉淀细胞洗涤 3 次。最后用含 20% 胎牛血清、10 ng/mL 表皮生长因子 (EGF)、10  $\mu$ g/L 转铁蛋白、10 mmol/L 谷氨酰胺、100 mg/L 丙酮酸钠、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的 F12 培养液悬浮。将 5 mL 含 1  $\times 10^6$  细胞的培养液接种在 25 cm<sup>2</sup> 塑料培养瓶 (Corning, USA),置 37<sup>o</sup>、饱和湿度的 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养。

### 1.3 癌细胞克隆

培养数天后,通过微环境消化法获取癌细胞克隆。具体方法如下:先将细胞稀释传代,待细胞生长 2~3 d,然后在倒置显微镜下对单个分散存在的癌细胞克隆位置在平皿底部用油性笔定位标

记。将培养液吸去,加入 2 mL 的 0.25% 胰酶与 0.02% EDTA 的消化液预消化。用一弯头管口平整的玻璃吸管吸取约 10  $\mu$ L 的消化液,让消化液保持在吸管口处,将吸管口置于所标记的细胞克隆上面,吹出微量的培养液,随即将培养液重新吸回吸管。将含细胞的消化液置入 24 孔培养板内,加入约 1 mL 的培养液继续培养。待细胞增多时再进行扩大培养。

采用这种方法,成功培养 2 例男性肝癌患者的肝癌细胞系,2 例均取自门脉癌栓,分别命名为 H2M 和 H4M。

### 1.4 生长曲线

将培养第 12 代的 H4M 细胞 5.4  $\times 10^4$  接种在直径 5 cm 的塑料平皿,于接种后第 2 天开始将细胞消化计数,每天消化 3 个平皿的细胞数并计算平均值,连续 7 d,最后绘制细胞生长曲线和倍增时间。H2M 采用第 16 代细胞,接种密度为 7  $\times 10^4$  每平皿,计算方法同上。

### 1.5 细胞核型分析

于培养的 H2M 和 H4M 细胞中加入 0.3  $\mu$ g/ml 的秋水仙素,继续培养 3h,胰酶消化收获细胞,经 0.07 mmol/L 氯化钾低渗处理 30 min,于 1:3 冰醋酸甲醇液固定 2 h 后滴片,所获的中期分裂相染色体用标准胰酶-基姆萨 (G 带) 分带染色法染色。

### 1.6 比较基因组杂交

用蛋白酶 K 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 消化培养的 H2M 和 H4M 细胞,抽提肿瘤细胞基因组 DNA。取健康人周围血淋巴细胞制备基因组 DNA 作正常参照。从健康男性淋巴细胞培养中获取中期分裂相染色体。比较基因组杂交 (CGH) 采用以前所描述的方法<sup>[2]</sup>。用缺口平移法分别将 1  $\mu$ g H4M 基因组 DNA 和性别相同的正常参照基因组 DNA 标记绿色-dUTP 和红色-dUTP。将 500 ng 标记的癌细胞 DNA 和正常 DNA 探针变性后与正常中期相染色体在 37<sup>o</sup> 湿盒中杂交 48 h。用 0.4  $\times$  SSC/0.3% NP-40 在 75<sup>o</sup> 洗涤玻片 2 min、室温下用 2  $\times$  SSC/0.1% NP-40 洗涤 2 min,然后用 1  $\mu$ g/mL DAPI 复染和用抗褪色溶液封片。

### 1.7 图像分析

经 CGH 杂交后的染色体用 Zeiss Axiophot 显微镜分析, 每个中期分裂相用轮转式单色激发碱性苾香红 (rhodamine)、FITC 和 DAPI, 并通过滤镜捕获这三种颜色的图像。用 CGH 程序 (Vysis, Downers Grove, IL) 分别分析三色合成图像。每组样本共分析 5 个中期分裂相, 从 10 条相同染色体所得的荧光数据计算平均比率。根据程序指引分析红色和绿色的荧光比率, DNA 序列拷贝数的增加和丢失 (gain and loss) 分别以肿瘤细胞 DNA (绿色荧光) 与参照 DNA (红色荧光) 的比率  $>1.25$  或  $<0.75$  来界定, 当比率  $>1.50$  时定为高拷贝数扩增 (amplification)。

### 1.8 裸鼠接种成瘤实验

将培养的 H2M 和 H4M 细胞各注射于 12 只 balb/c 裸小鼠腹腔和肝脏内, 每只  $9 \times 10^6$  细胞。接种后观察 1 个月, 看是否成瘤。

## 2 结 果

### 2.1 细胞培养

从 20 例肝癌患者的原发灶和门脉癌栓中获取癌组织进行体外培养, 只有 2 例 (H2M 和 H4M) 克隆培养成功。H2M 和 H4M 肝癌细胞在第 4 代开始加速生长, 已传至 50 多代, 部分细胞液氮保存已逾 2 年。形态学上, 两系癌细胞均呈多角形, 胞浆丰富, 核大, 圆形, 核仁多个而明显, 可见核分裂和瘤巨细胞。癌细胞排列成索状生长, 与肝小叶排列相似 (图 1)。从细胞生长曲线可以看出, H2M 和 H4M 细胞在第 2 天开始呈对数生长, 到第 5 天进入生长平台期。细胞的倍增时间分别为 47 h 和 38 h。

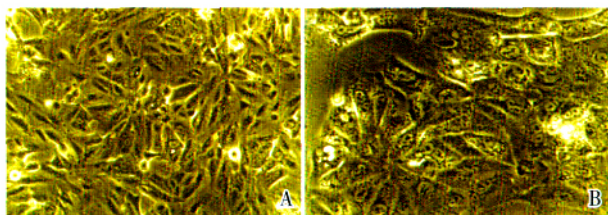


图 1 培养的 H2M 和 H4M 细胞

Fig.1 H2M and H4M cells in tissue culture

A: H2M cells ( $\times 200$ ); B: H4M cells ( $\times 400$ ); The cells grow in monolayer sheet and exhibit typical malignant epithelia morphologically

### 2.2 细胞遗传学

染色体 G 带显示 2 株细胞均为超 3 倍体, 其中 H2M 有一条标记染色体含有 1q 和 6p [t(1;6) 染色体], 而 H4M 有一条染色体含有一长均染区 (homogeneously staining region, hsr, 图 2)。H4M 细胞核型为 71~78, XX; 而 H2M 细胞为 56~78, XY。

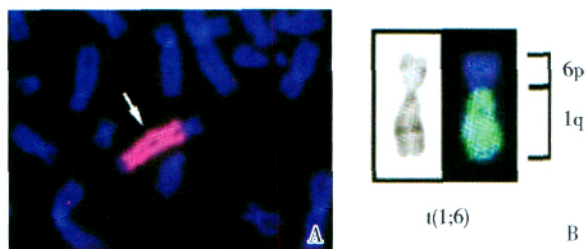


图 2 H2M 和 H4M 细胞的标记染色体

Fig.2 Marker chromosome of H2M and H4M cells

A: the marker chromosome containing homogeneously staining region (hsr) in H4M cell demonstrated by FISH using 11q13 as probe; B: the marker chromosome contained 1q and 6p demonstrated by CGH

### 2.3 比较基因组杂交

CGH 分析显示, H2M 的细胞遗传学改变为 4q、13q、16q、17p 和 19p 缺失和 1q、3q、5p、6p、7q 和 8q 扩增。H4M 的细胞遗传学改变为 8p、9、13q、16q 缺失和 6p、7p、11p 扩增, 而 11q13 为高拷贝数扩增 (amplification)。

### 2.4 裸鼠接种成瘤实验

H2M 细胞接种 balb/c 裸小鼠后 4 周, 腹腔内及肝脏边缘见多发性肿瘤形成, 肿瘤直径 2~10 mm。石蜡切片 HE 染色显示肿瘤为典型的肝细胞癌 (图 3)。H4M 细胞接种后未见肿瘤形成。

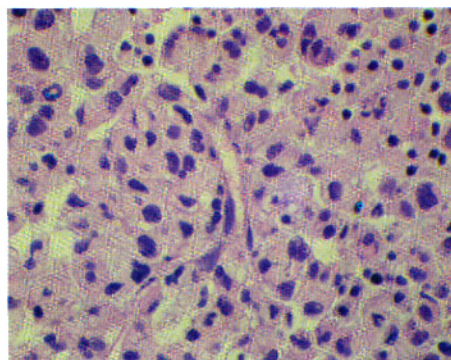


图 3 H2M 细胞裸鼠接种成瘤形态学

Fig.3 The morphology of tumorigenesis of H2M cells in nude mouse ( $\times 400$ )

H2M cells show a typical morphology and tissues arrangement of HCC after seeding in nude mouse

### 3 讨 论

本实验采用胶原酶消化肿瘤组织, 用 Percoll 浓度梯度分离得到较纯的癌细胞, 但仍不能完全把癌细胞与成纤维细胞或血管内皮细胞分开。因此在随后癌细胞的纯化培养中, 我们采用微环境消化克隆法来纯化癌细胞。尽管已有多种方法进行癌细胞克隆<sup>[3]</sup>, 但我们的实践证明, 微环境消化克隆法特别适用于原代癌细胞的纯化, 该方法可一次取得较多的癌细胞, 成功率较高。该方法可重复进行, 直至取得纯化的细胞株。本实验培养成功 2 个肝癌细胞系, 为进一步进行实验研究提供了纯化的肝癌细胞材料。

此外, 我们采用染色体分带和 CGH 法初步分析了所获得的肝癌细胞系的细胞遗传学特征, 发现 H2M 的细胞遗传学改变主要为 1q 和 8q 扩增, 而 4q 丢失。H4M 则主要表现为 8p 丢失和 11q13 高拷贝数扩增等各种染色体畸变。这些细胞遗传学改变与肝细胞癌的发生发展、转移和有效治疗方法的选择有密切关系<sup>[4, 5]</sup>, Cheng 等<sup>[6]</sup>人根据肝脏门脉解剖特点和肝细胞癌癌栓发展范围将静脉内癌栓分成 4 种类型, 发现不同癌栓类型的患者术后的预后有很大的差别。由于这 H2M 和 H4M 均从门静脉癌栓建立 (门静脉癌栓虽不等于肝细胞癌肝外转移, 但被认为是肝内转移<sup>[7, 8]</sup>), 故我们成功建立的这两株细胞可为肝癌转移的研究提供非常有用的工具。

特别值得注意的是 H4M 细胞系中发现有 11q13 的高度扩增, 这一部位正是周期素 cyclin D1 基因 CCND1 所在位点, Cyclin D 已被认为是肝细胞癌治疗靶点<sup>[9]</sup>, 该基因的高表达能促进细胞增殖, 减少细胞凋亡。我们的实验已经证明了 H4M 的 cyclin D1 mRNA 和蛋白的过表达<sup>[10]</sup>。

目前从肝癌组织中建立细胞系, 特别是建立转移性癌细胞系仍很困难, 本实验所获得的 2 例细胞株其中的 1 例能在裸鼠接种后成瘤, 加上对这 2 株细胞的遗传学改变检测结果, 为阐明肝癌浸润转移机制、寻找新的癌基因和抑癌基因, 以及

抗肝癌药物筛选等实验研究提供了实验癌细胞材料。

参考文献:

- [1] CHEN Y B, YAN M L, GONG J P, et al. Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant monoclonal cell line HepG2/mdr1 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 20(8):703-707.
- [2] GUAN X Y, FANG Y, SHAM J S T, et al. Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization [J]. *Gene Chromosome Cancer*, 2000, 29(2):110-116.
- [3] 文剑明. 肿瘤细胞培养 [A]. 薛庆善. 《体外培养的原理与技术》. 北京: 科学出版社, 2001: 705-749.
- [4] TEUFEL A, STAIB F, KANZLER S, et al. Genetics of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 28(16):2271-2282.
- [5] MIDORIKAWA Y, MAKUUCHI M, TANG W, et al. Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 14 (10):1487-1492.
- [6] CHENG S Q, WU M C, CHEN H, et al. Tumor thrombus types influence the prognosis of hepatocellular carcinoma with the tumor thrombi in the portal vein [J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(74):499-502.
- [7] MATSUDA M, SUZUKI T, KONO H, et al. Predictors of hepatic venous trunk invasion and prognostic factors in patients with hepatocellular carcinomas that had come into contact with the trunk of major hepatic veins [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14(3):289-296.
- [8] 夏金堂, 陈胜利, 温敏杰, 等. 原发性肝癌合并静脉流出道癌栓的诊治 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3S): 123-125.
- [9] ROUGIER P, MITRY E, BARBARE J C, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC): an update [J]. *Semin Oncol*, 2007, 34(2 Suppl 1):S12-20.
- [10] 胥健敏, 文剑明, 张 萌, 等. 肝细胞癌周期素 D1 基因扩增和表达研究 [J]. *中华病理学杂志*, 2004, 33 (1):26-30.

(编辑 徐 杰)