

# 来源于人胎肝干细胞的肝癌细胞系建立及初步研究

朱争艳, 杜智, 李涛, 张金卷

朱争艳, 杜智, 李涛, 张金卷, 天津第三中心医院肝胆疾病研究所, 卫生部人工细胞工程技术研究中心 天津市 300170

通讯作者: 朱争艳, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津第三中心医院肝胆疾病研究所, 卫生部人工细胞工程技术研究中心. Zhuzhengyan@eyou.com  
电话: 022-84112143

收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2005-01-05

## 摘要

**目的:** 研究肝癌细胞发生发展及变化规律, 探讨胎肝干细胞体外长期培养的变异归宿问题。

**方法:** 原代分离培养人胎肝干细胞, 从中筛选出一生长旺盛之集落, 体外长期培养, 并对其生物学特性进行初步鉴定, 进行了细胞倍体分析; 应用流式细胞仪分析了细胞周期; 在Scid鼠体内接种细胞进行成瘤性验证。

**结果:** 从人胎肝组织中成功分离出一胎肝干细胞集落, 在体外长期培养下可分化为肝癌细胞。其细胞增值核抗原指数高达100%; 倍体分析常见多倍体细胞; 流式细胞仪分析细胞周期, 结果G1期细胞约占48%, G2期细胞约占18%, S期细胞约占34%。Scid鼠体内成瘤实验显示, 接种细胞后2-3 wk成瘤, 具有100%的成瘤性。显微镜下所见细胞大小不一, 异型性明显, 核仁大, 核分裂活跃。

**结论:** 人胎肝中存在具有干细胞特性的原始细胞, 确实可分化为肝癌细胞。从人胎肝干细胞中分离培养出肝癌细胞对于肝癌发生发展及其变化规律的深入研究奠定了基础。

朱争艳, 杜智, 李涛, 张金卷. 来源于人胎肝干细胞的肝癌细胞系建立及初步研究. 世界华人消化杂志 2005;13(6):779-780  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/779.asp>

## 0 引言

肝癌是严重危害人类健康和生命的恶性肿瘤之一, 探讨肝癌的发生发展规律是肿瘤研究者长期不懈努力的奋斗目标。目前认为肝干细胞是体内存在的一种具有自我增殖能力和多向分化潜能的干细胞, 可以分化为肝细胞和胆管上皮细胞等多种细胞, 也有人认为肝癌可能来源于肝干细胞<sup>[1-3]</sup>。为此, 我们分离人胎肝干细胞, 体外长期培养扩增, 并对其生物学特性进行了初步鉴定, 现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 组织标本选自6月龄水囊引产胎儿肝脏。细胞培养用试剂DMEM购自Gibco公司; 新鲜胎牛血清购自天津联星生物技术有限公司; 胶原酶为Sigma公司产品; Percoll为Amersham Biosciences公司产品; 兔抗人白蛋白多抗, 鼠抗人AFP、CK18&19、CD34、Vimentin

单抗及LSAB组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; 培养瓶、培养板购自Costar公司。

## 1.2 方法<sup>[4, 13]</sup>

**1.2.1 胎肝干细胞的分离** 水囊引产中期(6月龄)妊娠胎儿(孕妇身体健康, 肝功能正常, 胎儿处置获得其父母的知情同意), 以自制循环装置经脐静脉-肝脏-腔静脉循环胶原酶溶液(Collagenase Solution, 含NaCl 8.0 g/L、NaHCO<sub>3</sub> 0.35 g/L、KCl 0.4 g/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.078 g/L、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.151 g/L、HEPES 2.38 g/L、CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.74 g/L, IV型胶原酶1.0 g/L)30 min, 流速100 mL/min, 消化后的肝细胞经200目网滤过, 去除未消化组织, 利用Percoll贮存液配制密度分别为1.110, 1.070, 1.035 kg/L的Percoll使用液, 逐层加入内有肝细胞沉淀的离心管中, 4℃ 3 000 r/min, 离心30 min; 取底层界面细胞, 胎盘蓝染色测定细胞活力。细胞于含10 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

**1.2.2 细胞传代培养** 细胞长满一瓶后, 用0.5 g/L Trypsin/EDTA消化, 计数后以2×10<sup>5</sup>/L的密度接种至新的培养瓶中继续培养。

**1.2.3 免疫细胞化学检测** 原代及传代培养至第4、6代时, 将细胞固定后用IHC-LSAB法检测AFP、AAT、CK18、CK19、Albumin、CD34、LCA及Vimentin等分子标志。

**1.3 细胞的长期培养扩增** 挑选一生长旺盛之细胞克隆, 将细胞消化后复悬于含10 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中, 接种于培养瓶中, 在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。每3 d半量换液, 倒置显微镜下观察细胞的增生和形态变化, LSAB法检测AFP、AAT、Albumin、CK18、CK19、Vimentin等标记物的表达及增值细胞核抗原PCNA的表达。

**1.4 细胞倍体分析** 取对数生长期细胞, 加秋水仙碱作用4 h, 使其终止在细胞分裂中期, 制备染色体, Giemsa染色, 显微镜下计数染色体。

**1.5 流式细胞仪分析细胞周期。**

**1.6 Scid鼠体内成瘤实验** 约10<sup>6</sup> (0.1 mL)细胞接种于Scid鼠右肩下, 左肩注射0.1 mL生理盐水作阴性对照。

## 2 结果

采用脐静脉灌流消化法从胎儿肝脏中得到许多体积较小的圆形细胞, 也有少数体积较大、形状不规则、含有2-3个细胞核的典型的成熟肝细胞。进一步用Percoll分离液不连续密度梯度离心分离得到纯度较高的小圆形细胞。胎盘蓝染色细胞活力大于90%。第2 d换液后, 仅见数个小的梭形细胞及更少的形状未发生变化的成熟肝细胞。随后可

见成熟肝细胞逐渐碎裂、消失,而小梭形细胞缓慢增生成片,中央为排列紧密的长梭形或成纤维样细胞,周边为体积较大的圆形或不规则形的上皮样细胞,大多数细胞只有一个细胞核,核仁多个,清晰可见,核周布满颗粒状物。成片生长的细胞于大约3 wk后汇合,铺满整个瓶底。传代培养40 d后出现一生长旺盛的克隆,细胞增生速度加快,约每3-5 d传代1次,呈现圆形或形状不规则的上皮样细胞形态。现已传至13 mo。

2.1 细胞的表型标志 经免疫细胞化学方法检测AFP、AAT、CK18、CK19、Albumin等的表达,结果均为弱阳性,而CD34、LCA结果为阴性。PCNA表达100%阳性。

2.2 流式细胞仪分析细胞周期,结果G1期细胞约占48%,G2期细胞约占18%,S期细胞约占34%。核型分析,多见多倍体细胞。

2.3 Scid鼠体内成瘤实验显示,接种细胞后2-3 wk成瘤,显微镜下所见细胞大小不一,异型性明显,核仁大,核分裂活跃<sup>[7]</sup>。

### 3 讨论

本实验采用了脐静脉灌流消化法,结合Percoll不连续密度梯度离心法分离细胞,所收集到的细胞多为小圆细胞(体积约为成熟肝细胞的1/4),但也混杂有特征鲜明的成熟肝细胞。原代培养时部分成熟肝细胞可通过换液除去,即使有少量贴壁,也会随着培养时间的延长而逐渐破碎、消失。连续观察发现分离得到的肝干细胞系是由数个小圆细胞增生而来。免疫细胞化学结果表明该细胞微量表达Albumin、CK18、AFP、AAT,不表达CK19、CD34、LCA等分子。因为Albumin、CK18和CK19分别是成熟肝细胞和胆管上皮细胞的特征标志;CD34是原始造血干细胞的表面标志。CD34、LCA阴性,既排除了该细胞来源于淋巴细胞和造血干细胞。

肝干细胞在成年哺乳类动物肝脏中,以小卵圆形细胞的形式存在于终末小胆管(Hering管)中,又称HOC或肝前体细胞,具有双向分化潜力,可分化为肝细胞和胆管上皮细胞<sup>[5-6,8]</sup>,但其在人类肝癌发生中的作用仍有争议<sup>[9-10]</sup>。来自形态学、血清学方面的资料表明,HOC可能与肝癌相关,但迄今没有发现直接证据<sup>[11-12]</sup>。我们的实验结果表明肝干细胞在体外培养条件下可以发展为肝癌细胞。流式细胞仪分析该细胞S期细胞约占34%;核型分析,多见多

倍体细胞。Scid鼠体内移植实验显示,该细胞具有成瘤性,接种细胞后2-3 wk成瘤,光镜下可见细胞大小不一,排列不规则,异型性明显,核仁大,核分裂活跃,PCNA增值指数达100%。提示该细胞在体外具有极强的增生特性。该细胞冻存后复苏仍具有上述特性。我们的实验表明肝癌可以来源于肝干细胞,肝干细胞在一定的条件下可以转化肝癌细胞。从而直接证明了肝干细胞在人类肝癌的发生中起着非常重要的作用。该细胞系的建立及其生物学特性的研究为肝癌发生发展的规律以及肝干细胞生物学特性的深入研究奠定了基础<sup>[14-15]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 Libbrecht L, De Vos R, Cassiman D, Desmet V, Aerts R, Roskams T. Hepatic progenitor cells in hepatocellular adenomas. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1388-1396
- 2 Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-Specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003;21:98-104
- 3 Theise ND, Yao JL, Harada K, Hytioglou P, Portmann B, Thur Tsui W, Ohta H, Nakanuma Y. Hepatic 'stem cell' malignancies in adults: four cases. *Histopathology* 2003;43:263-271
- 4 朱争艳, 杜智, 李涛, 张金卷, 马瑞丽. 人胎肝干细胞的体外培养及诱导分化. *临床肝胆病杂志* 2004;20:267-269
- 5 Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferative oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001;158:1313-1323
- 6 Sandhu JS, Petkov PM, Dabeva MD, Shafritz DA. Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *Am J Pathol* 2001;159:1323-1334
- 7 邵永顺, 陈孝平, 张志伟, 张万广, 李开艳, 吴在德. 裸鼠肝内种植人肝癌组织的肿瘤特征. *世界华人消化杂志* 2004;12:563-566
- 8 Xiao JC, Jin XL, Ruck P, Adam A, Kaiserling E. Hepatic progenitor cells in human liver cirrhosis: immunohistochemical, electron microscopic and immunofluorescence confocal microscopic findings. *World J Gastroenterol* 2004;10:1208-1211
- 9 马俊勋, 方驰华. 卵圆细胞及其与原发性肝癌关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:563-566
- 10 龚加庆, 方驰华, 李维, 田伏洲. 卵圆细胞参与实验性肝癌形成过程的研究. *中华外科杂志* 2004;42:291-293
- 11 Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 2003;23:385-396
- 12 廖冰, 薛玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪. 癌基因对大鼠卵圆细胞分化和转化的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:344-346
- 13 赵运转, 魏来, 韩梅, 李凌松. 胎肝来源间充质干细胞的分离、培养与多向分化. *中华肝脏病杂志* 2004;12:711-713
- 14 何祖平, 张好建, 汪蕴, 王建今, 丰美福. 肝干细胞的可塑性和分化机制的研究进展. *生物化学与生物物理进展* 2003;18:568-570
- 15 何念海, 赵文利, 王宇明. 成体干细胞可塑性及对肝脏的重建作用. *世界华人消化杂志* 2004;12:205-208

编辑 张海宁