

文章编号:1005-6947(2008)01-0048-03

· 基础研究 ·

# HepG2 亚群中细胞角蛋白 19 的表达差异

周红兵, 樊菁, 任彦顺, 李丙所, 党军强, 窦科峰

(第四军医大学西京医院 肝胆外科, 陕西 西安 710033)

**摘要:**目的 探讨细胞角蛋白 19 (CK19) 在 HepG2 细胞系中不同细胞亚群的表达差异及其意义。  
方法 采用免疫细胞化学方法观察 CK19 在边缘群 (SP) 及非边缘群 (non-SP) 2 个不同肝癌亚群中表达的变化及含量。结果 SP 细胞仅占细胞总体的 1.6% ; SP 细胞 CK19 表达明显高于 Non-SP 细胞 ( $P < 0.01$ )。结论 CK19 在肝癌细胞中表达有差异, 强阳性多数分布在 SP 细胞亚群中; 进一步证实了肿瘤的异质性。  
[中国普通外科杂志, 2008, 17(1):48-50]

**关键词:** 癌, 肝细胞; 细胞角蛋白 19; 边缘群

**中图分类号:** R 735.7 **文献标识码:** A

## Differential expression of CK19 in subpopulations of HepG2 cell lines

ZHOU Hongbing, FAN Jing, REN Yanshun, LI Bingsuo, DANG Junqiang, DOU Kefeng  
(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expression characteristics of cell keratin 19 (CK19) in different subpopulations of HepG2 cell lines of human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** Immunocytochemical staining was performed to show the expression of CK19 in SP and non-SP cells. **Results** With the Hoechst 33342 extrusion assay, SP cells were found to account for 1.6% of the HepG2 cells, and CK19 was much more expressed in SP cells than in non-SP cells. **Conclusions** The differential expression of CK19 can be seen in HepG2 cell lines, and most CK19 positive cells are from SP cells, indicating that HCC is heterogeneous.  
[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1):48-50]

**Key words:** Carcinoma, Hepatocellular; CK19; Side Population

**CLC number:** R 735.7 **Document code:** A

关于肿瘤的发生发展比较有影响力的解释是随机理论和等级理论。前者认为肿瘤是由一个相对同源的群体构成, 仅有小部分经历了随机事件而获得广泛增殖和形成新肿瘤的能力; 并认为在肿瘤细胞中存在金字塔式的结构, 它类似于正常组织中细胞组成的结构。位于塔顶的是肿瘤干细胞 (CSCs), 它们能自我更新, 分裂为子代细胞并形成新的肿瘤<sup>[1]</sup>。近年来, 利用流式细胞荧光激活分选法可以获得组织中具有原始干细胞特征的

成体细胞, 利用类似的方法可将肝癌细胞分成两个不同特征的亚群<sup>[2]</sup>。探讨 CK19 在这两个不同亚群细胞中的表达差异对阐明和验证肝癌组织中是否存在具有干细胞特征的肿瘤细胞具有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

HepG2 细胞系 (人高转移肝癌细胞系) 购自西安超英生物公司, 荧光染料 Hoechst33342 购自 Sigma 公司, DMEM/F12 培养基购自 Invitrogen 公司, 鼠抗人 CK19 一抗及 FITC 连接的山羊抗鼠二抗 (中杉金桥), FACS Advantage II 型六色荧光流式细胞仪购自美国 BD 公司, IX70 Olympus 激光共聚焦显微镜购自日本 Olympus 公司。

收稿日期:2007-07-24; 修订日期:2007-12-05。

作者简介:周红兵,男,第四军医大学西京医院医师,主要从事肝肿瘤方面的研究。

通讯作者:窦科峰 E-mail:gdwk@fmmu.edu.cn

## 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞系 HepG2 细胞中加入含有 10% 胎牛血清 (FCS) 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基,5% CO<sub>2</sub> 孵箱中 37℃ 孵育。

1.2.2 细胞亚群的分选及检测

1.2.2.1 分选方法 将 HepG2 细胞常规消化, HBSS 洗涤, 制备成单细胞悬液; 细胞密度为  $1 \times 10^9/L$ 。等分细胞悬液, 两组均加入荧光染料 Hoechst 33342 使终浓度为 6 mg/L; 其中一组再加入维拉帕米, 终浓度 50 mmol/L。37℃ 避光水浴 90 min, 冰上 10 min 终止染色; 冰预冷 HBSS 洗涤细胞并重悬浮, 再加入碘化丙啶 (PI) 使终浓度为 2 mg/L。

1.2.2.2 流式细胞仪检测细胞亚群 355 nm UV 激发光源, 610 nm 双色短通反射滤镜, 450 nm 和 675 nm 边缘长通滤片分别检测散射光蓝光及红光部分, 线性模式采集信号, 测量前向散射和侧向散射二维参数图, 检测细胞均一性。以 Hoechst 红为 X 轴, Hoechst 蓝为 Y 轴作二维散点图, 将低 Hoechst 红及低 Hoechst 蓝且维拉帕米组缺失的区域设定为 SP 细胞的“门”(gate), 计算百分比, 分选出 SP 细胞及 non-SP 细胞。

1.2.3 CK19 免疫细胞化学分析 将两种细胞分别接种于盖玻片, 培养方法同前。分别于培养 4, 6, 8, 10 h 后, -20℃ 下丙酮固定细胞 20 min, 并用含 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤。在使用山羊正常血清封闭 1 h 后, 固定的细胞分别用 CK19 一抗在湿盒内 4℃ 过夜。随后使用含有 0.1% 吐温 20 的 PBS 液洗涤, 摇床摇洗 20 min。加入二抗, 37℃ 孵育 2 h。PBS 清洗后, 用 300 mL/L 的甘油缓冲液封闭细胞爬片, 用奥林巴斯聚焦显微镜进行观察。CK19 单抗最适工作浓度为 1:100, 二抗工作浓度为 1:500。

## 1.3 统计学处理

用 SPSS 11.0 统计软件包分析。统计学差异采用配对 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 SP 细胞及 Non-SP 细胞的分选

前向散射和侧向散射二维参数图证明受检细胞大小、形态、胞质均匀性一致, 无 PI 染色细胞, 无杂细胞干扰。二维散点图示: 在细胞集中区域 (P2) 左下角 (P1) 另有小部分散点聚集 (低 Hoechst), 而维拉帕米拮抗组无此区域, 即 SP 细胞区 (图 1)。对 P1 区域的 SP 细胞及 P2 区域的 non-SP 细胞进行分选, 分别获得  $4 \times 10^5$  及  $1 \times 10^6$  个细胞, 两种细胞分别占受检细胞的 1.6% 和 4%。

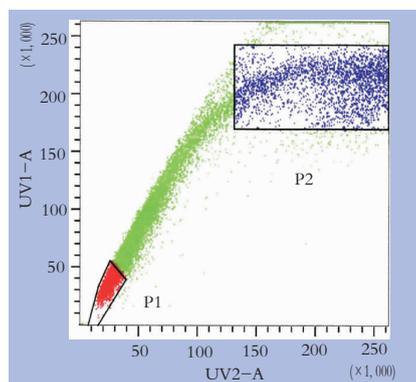


图 1 流式细胞仪二维散点图 Hoechst 红为 X 轴; Hoechst 蓝为 Y 轴

### 2.2 CK19 免疫细胞化学分析

SP 细胞及 non-SP 细胞爬片 4 h 后均贴壁。免疫细胞化学分析发现, SP 细胞及 non-SP 细胞胞质内均可见绿色荧光, 其中 SP 细胞爬片可见许多强荧光显色。利用 Image-Pro Plus 5.0.2 软件分别检测 SP 细胞和 non-SP 细胞爬片的平均积分光密度, 结果表明, SP 细胞及 non-SP 细胞中 CK19 的表达有统计学差异 (图 2 A - B, 表 1)。

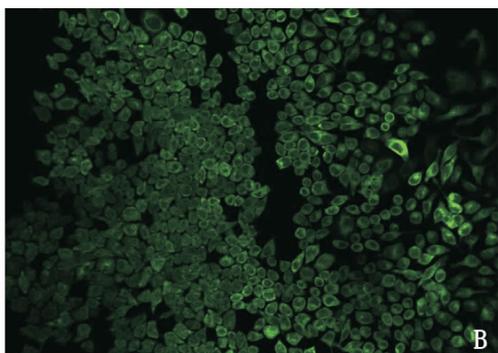
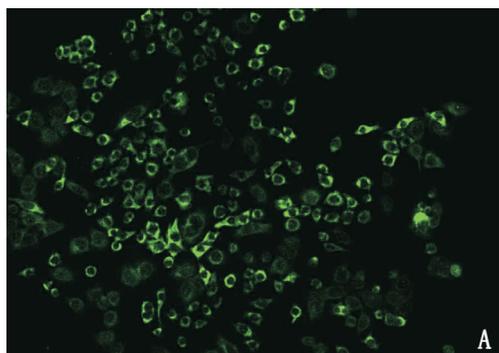


图 2 SP 和 Non-SP 细胞 CK19 表达 (间接免疫荧光染色  $\times 200$ ) A: SP 细胞; B: non-SP 细胞

表1 SP细胞及 non-SP细胞中 CK19 的表达

细胞亚群	培养时间				t 值	P 值
	4h	6h	8h	10h		
边缘群(SP)	1.427487	1.406474	1.401463	1.409786	53.637	<0.01
非边缘群(non-SP)	1.222892	1.213641	1.198912	1.198687		

### 3 讨论

肿瘤的发生机制是当前国内外研究的热点领域。有学者<sup>[3]</sup>提出肿瘤细胞和干细胞都具有幼稚的细胞表型,并提出肿瘤的干细胞起源假说。随着研究的深入,已有多种方法应用于肿瘤组织中具有干细胞样特性的肿瘤细胞的分离。利用干细胞对多种染料具有排斥性的特异性功能标志,结合荧光激活细胞分选法,可得到低荧光并表现为边缘性聚集的 SP 细胞<sup>[4-5]</sup>。目前以这种分离富集干细胞样细胞的方法最为先进。肿瘤细胞和干细胞在无限增殖、多向分化及自我更新机制等方面具有相似性。近年在乳腺癌、白血病、中枢神经系统肿瘤的研究中,发现肿瘤组织只有少数细胞具有无限增生和致瘤的潜能<sup>[6]</sup>。HepG2 细胞系是一株高转移率的肝癌细胞系,本研究利用 HepG2 细胞系表达 CK19 的情况来探讨肝细胞肝癌中是否也存在类似的特点。CK19 的表达有组织 and 分化特异性,是胆管的特异性标志物,是目前筛选出的肝干细胞高度表达且特异性较好的标志物之一。CK19 在正常成体肝脏中仅表达于胆管上皮细胞而不表达于肝细胞。肝细胞阳性表达被认为是来源于已初步分化的肝干细胞<sup>[7]</sup>。当肝细胞发生癌变时,有的癌细胞可表达 CK19,且表达程度与细胞的分化程度呈负相关<sup>[3]</sup>。Takahiro 等<sup>[8]</sup>研究表明,表达 CK19 的肝癌侵袭性更强,恶性程度更高。肝癌细胞表达胆管细胞特异性标志意味着其可能来源于恶变前的某种祖细胞<sup>[9]</sup>。本研究通过流式细胞荧光激活分选法富集了干细胞样肝癌细胞(SP 细胞),用免疫细胞化学方法证实了在 HepG2 细胞系两个亚群都表达

CK19。本结果还发现 CK19 的表达存在明显差异,仅极少部分 HepG2 细胞 CK19 表达呈强阳性,且绝大多数分布在 SP 细胞亚群中。通过计算免疫荧光平均积分光密度,发现 CK19 的表达在两个亚群中确实存在明显差异。提示,仅有少量克隆扩增、形成肿瘤及自我更新能力强的、更为原始的干细胞样肿瘤细胞高表达 CK19,进一步证实了肿瘤的异质性。

#### 参考文献:

- [1] SELL S. Cellular origin of hepatocellular carcinomas [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13 (6): 419 - 424.
- [2] Wu F, Nishioka M, Fujita J, *et al.* Expression of cytokeratin 19 in human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Int J Oncology*, 2002, 20 (1): 31 - 37.
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414 (6859): 105 - 111.
- [4] Guo Y, Follo M, Geiger K, *et al.* Side population cells from different precursor compartments [J]. *Hematother Stem Cell Res*, 2003, 12 (1): 71 - 82.
- [5] 陈学敏,李厚祥. TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ R II 和 CDK4 在原发性肝细胞肝癌中的表达及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (2): 146 - 148.
- [6] Dao MA, Arevalo J, Nolte JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution [J]. *Blood*, 2003, 101 (1): 112 - 118.
- [7] Omary MB, Ku NO, Toivola DM. Keratins: Guardians of the liver [J]. *Hepatology*, 2002, 35 (1): 251 - 257.
- [8] LIU C, WANG J, OU Q J. Possible stem cell origin of human cholangiocarcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (22): 3374 - 3376.
- [9] Takahiro U, Shoji K, Takatsugu Y, *et al.* Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94 (10): 851 - 857.