

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2009·01·019

## 人肝癌细胞系 EH-H1 的建立及其相关生物学特性

钱炎珍<sup>1△</sup>, 黎江<sup>2△</sup>, 李林芳<sup>1</sup>, 刘辉<sup>2</sup>, 刘韬<sup>2</sup>, 姜梨华<sup>1</sup>, 施乐华<sup>1</sup>, 苏长青<sup>1</sup>, 吴孟超<sup>1</sup>, 钱其军<sup>1,2\*</sup> (1. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438; 2. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

**[摘要]** 目的: 采用原代培养的方法建立一株人肝癌细胞系 EH-H1, 并对其生物学特性进行分析。方法: 将取自东方肝胆外科医院诊断为原发性肝细胞癌的组织标本分离成单细胞悬液, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行原代和传代培养, 在普通显微镜以及电子显微镜下观察细胞的形态, 并绘制细胞的生长曲线。用放射免疫法检测细胞系 AFP 和 HBV 的含量, 采用染色体 G 显带方法进行细胞染色体核型的分析, 裸鼠皮下接种细胞检测该细胞的成瘤能力。结果: 成功建立一株新的人肝癌细胞系, 命名为 EH-H1。EH-H1 细胞体外连续传代 80 代以上, 细胞形态不变, 生长周期恒定在 24 h。放射免疫检测 EH-H1 各代细胞 HBV 均为阴性, AFP 分泌微量(0.6 μg/L)。染色体 G 带显示, EH-H1 细胞染色体为非整倍体, 以超 2 倍体为主。该细胞经皮下接种可使裸鼠致瘤(10/10), 移植瘤病理组织学类型和分化程度与肝细胞癌一致。结论: 通过原代培养建立的肝癌细胞系 EH-H1 与原发癌保持相似的生物学特性, 可望成为一个稳定的细胞系。

**[关键词]** 肝癌细胞系; 原代培养; 生物学特性

**[中图分类号]** R735.7; Q813.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2009)01-084-04

## Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line EH-H1 and its biological characteristics

QIAN Yan-zhen<sup>1△</sup>, LI Jiang<sup>2△</sup>, LI Lin-fang<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>2</sup>, LIU Tao<sup>2</sup>, JIANG Li-hua<sup>1</sup>, SHI Le-hua<sup>1</sup>, SU Chang-qing<sup>1</sup>, WU Meng-chao<sup>1</sup>, QIAN Qi-jun<sup>1\*</sup> (1. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 2. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a human hepatocellular carcinoma cell line EH-H1 by primary culture and to investigate its biological characteristics. **Methods:** Tumor tissues obtained from patients treated in our hospital were made into single-cell suspension and were primary cultured, passaged in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The morphology of the cells was observed under light and electronic microscope; the cell growth curve was plotted. Radioimmunoassay was employed to examine the AFP and HBV expression. Cytogenetic study was performed with the cell line using G-banding chromosome analysis. The tumorigenicity of the cell line was studied in nude mice by subcutaneous injection. **Results:** We have successfully established a novel hepatocellular carcinoma cell line EH-H1, which could be passaged for over 80 generations with unchanged morphology and growth cycle (24 h). Radioimmunoassay results demonstrated that all EH-H1 cells were HBV negative with slight AFP expression (0.6 μg/L). G banding results indicated that EH-H1 cells were aneuploid cells, primarily hyperdiploid. Tumors were formed in all the 10 mice subcutaneously inoculated with EH-H1 cells. The pathological types and differentiation degrees of the newly formed tumors were identical to their parental hepatocellular carcinoma. **Conclusion:** The established EH-H1 cell line in this study maintains the biologic characteristics of its original carcinoma, and might be a stable cell line of human hepatocellular carcinoma.

**[基金项目]** 国家自然科学基金海外杰出青年项目资助(No. 30728028)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30728028)

**[作者简介]** 钱炎珍(1984-),女,浙江省嵊州市人,学士,从事肿瘤基因治疗方面的研究;黎江(1986-),女,湖南省醴陵市人,硕士研究生,从事肝癌基因治疗方面的研究。△两者共为第一作者

\* 通讯作者( Corresponding author). E-mail: qianqj@sino-gene.cn

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma cell line; primary culture; biological characteristics

[ Chin J Cancer Biother, 2009, 16(1): 84-87 ]

肝癌在我国是一种常见的肿瘤,其发病率高,复发转移快,病死率高,是目前最严重的癌症之一,被称作“癌症之王”。因此,迫切需要寻找更加有效的治疗方法。体外培养肿瘤细胞不仅是研究肿瘤生物学特性及筛选抗癌药物的模型,还可以以此为抗原建立相应的单克隆抗体等。自1960年陈瑞铭应用组织培养技术首次成功地建立了第1例人肝癌细胞系以来,迄今国内外已建立了31株人体肝癌细胞系,均采用组织块直接培养法,为肝癌的防治研究提供了理想的实验模型。但此种建株方法,对标本要求严格,带有很大的偶然性;由于肿瘤的异质性和复杂性,随着体外传代次数的增多,瘤细胞的特性会发生较大的改变,需不断建立肝癌细胞系,对其做进一步的深入研究。本实验以胶原酶消化分离肝癌组织标本,采用原代细胞培养方法建立了一株人肝癌细胞系,对其生物学特性进行分析,为肝癌的防治研究提供了有用的模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物、试剂和仪器

4~6周龄BALB/c品系裸鼠,购自中科院实验动物中心[实验动物合格证号:SCXK(沪)2003-0003],由第二军医大学SPF级动物房饲养。SMC7721细胞为本室保存。细胞培养用DMEM、Trypsin/EDTA购自Gibco公司,胎牛血清购自PAA公司。AFP和HBV放射免疫试剂盒购自上海生物制品研究所。一次性培养瓶及培养板均购自Gibco公司,倒置相差显微镜、荧光显微镜及显微摄影装置为Nikon公司产品。

### 1.2 组织来源

取自东方肝胆外科医院肝癌患者手术标本。该患者男性,42岁,临床诊断为原发性肝细胞癌。术前检测血清甲胎蛋白 $39.5\ \mu\text{g/L}$ ,表面抗原HBsAg阳性,转氨酶在正常范围内。

### 1.3 原代细胞培养及细胞传代

肝癌组织经PBS冲洗后剪成 $1\ \text{mm}^3$ 大小,用0.4%的IV胶原酶(Sigma)在 $37\ ^\circ\text{C}$ 下消化30 min,用孔径120目的不锈钢网过滤得细胞悬液。 $4\ ^\circ\text{C}$ , $300\times g$ 离心5 min,弃上清,加入3 ml含有10%的胎牛血清DMEM培养液重新悬浮至25 mm培养皿中,置含5%  $\text{CO}_2$ 的 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养,每2.5 d半量换液1次。当细胞在瓶底汇合达80%时,弃培养液,用PBS液

将细胞冲洗2遍,用胰酶消化,体外传代,细胞长至20代时进行冻存,命名EH-H1。

### 1.4 细胞形态学、细胞的克隆化培养及细胞生长曲线的测定

将指数生长期的肝肿瘤细胞用细胞刮和胰酶处理,用2.5%戊二醛固定,按常规制备扫描和透射电镜标本,进行超微结构观察。选取生长良好的肝肿瘤细胞,计数后稀释至 $10\ \text{个/ml}$ ,然后接种于96孔板,每孔接种0.1 ml。第2天逐孔观察,记录有单细胞生长的孔,待细胞生成克隆后扩大培养。将指数生长期的细胞 $5\times 10^4$ 个接种到35 mm的培养皿中,连续培养8 d。每天随机取出3个皿用锥虫蓝拒染法计数活细胞,绘制细胞生长曲线,并计算细胞的群体倍增时间。

### 1.5 放射免疫法检测 EH-H1 细胞中的 AFP 和 HBV 的含量

收集培养的细胞上清液,用AFP和HBV放射免疫试剂盒测定AFP及HBV的含量,具体操作以说明书为准,并以新鲜培养液作对照。

### 1.6 G 显带法检测 EH-H1 细胞的染色体核型

取指数生长期80%~90%汇合单层培养细胞,加入秋水仙胺使培养液最终质量浓度为 $0.05\ \text{g/ml}$ 。培养箱继续培养3 h后用胰酶消化收获细胞。常规方法低渗、固定制备染色体标本。G显带后,计算出良好铺展的100个中期核分裂相的染色体数,并对其中的50个进行核型分析。

### 1.7 EH-H1 细胞的裸鼠成瘤实验

选择原代以及第20代EH-H1细胞,按 $1\times 10^7$ 细胞/只接种于10只BALB/c裸鼠右臀皮下,接种1周后,观察成瘤情况。实验结束取出肿瘤进行病理切片分析。

## 2 结 果

### 2.1 肝癌组织细胞原代培养及传代

培养第2天细胞基本贴壁,第5天时上皮样细胞开始生长,且长势较快,有的部位呈克隆样生长,很快聚集成团;第13天后在25 mm培养皿中长满上皮样细胞,每3 d传代1次,开始以1:2稀释传代,第3代以后以1:3稀释传代,通过克隆化培养以及反复的胰酶传代,建立EH-H1细胞系。细胞培养的血清量始终为培养液的10%,细胞生长良好。EH-H1细胞至今培养1年多,传代80多次,细胞生长迅

速且恒定,增殖的周期约为 24 h。

### 2.2 EH-H1 细胞的形态学特征

形态学上,EH-H1 呈多角形,核仁大且可见分裂相。细胞呈单层片状成长,细胞紧密镶嵌,细胞生长失去接触抑制,显示典型的恶性上皮细胞的表型特征(图 1A)。电镜观察体外培养的 EH-H1 细胞可见细胞核异形性明显,核深染,核仁清晰、大,胞质少,核内异染色质丰富,胞质内见丰富颗粒及空泡。扫描电镜见细胞表面有丰富的微绒毛(图 1B)。

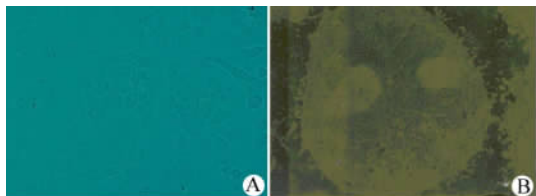


图 1 EH-H1 细胞的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of EH-H1 cells

A: EH-H1 cells with huge nucleolus and mitotic figure.

Cells grew in mono-layer and confluence( ×250 ); B: The ultramicro-morphology of EH-H1. The nucleus is irregular, with microcapsule and microvillus on cell surface( ×10 000 )

### 2.3 EH-H1 细胞的生长曲线

EH-H1 细胞接种之后 24 h 开始增殖,第 6 天进入平台期,增殖倍数为 12 倍(图 2)。第 50 代细胞经 Hochest33258 荧光染色检查支原体为阴性。

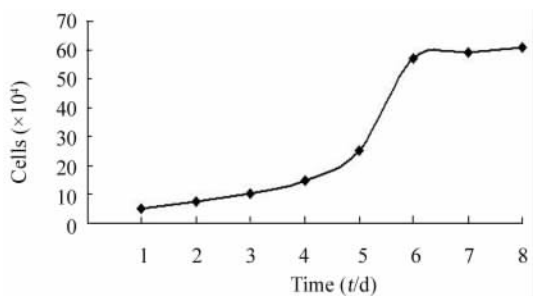


图 2 EH-H1 细胞生长曲线

Fig. 2 Growth curve of EH-H1 cells

### 2.4 EH-H1 细胞 AFP 和 HBV 的含量

第 1 代、39 代、50 代的细胞上清液,以及新鲜的培养液 AFP 放射免疫分析结果均为 0.6 μg/L,患者血清 AFP 放射免疫分析结果为 94.3 μg/L。对各代细胞上清以及新鲜培养液进行分析,AFP 差异无统计学意义( P > 0.05 );而对患者血清及 EH-H1 细胞上清进行比较,AFP 差异具有统计学意义( P < 0.05 )。EH-H1 各代细胞与 SMMC7721 细胞的培养液上清比较,AFP 差异无统计学意义( P > 0.05 )。

在 EH-H1 的所检测的各代细胞中,HBV 的结果均为阴性。

### 2.5 EH-H1 细胞的染色体核型

对第 20 和 39 代细胞进行染色体分析,均为超 2 倍体核型。染色体数目分布为 50 ~ 67。染色体结构异常涉及 1、3、9、10、14、15、19、和 22 号,尤其是 14 号和 15 号染色体 p11.2 发生的频率最高(图 3)。



图 3 第 20 代 EH-H1 细胞 G 显带染色体核型分析

Fig. 3 Chromosomal karyotype analysis of EH-H1 20 generation G-banding

### 2.6 EH-H1 细胞的裸鼠成瘤率和病理学观察

原代细胞及第 20 代 EH-H1 细胞接种 1 周后出现米粒大小的结节,成瘤率 100% ( 10/10 )。3 周后取出瘤体,移植瘤外观呈结节状,切面灰白色,质较硬,瘤体大者,可见局部组织坏死,病理组织学检查,发现其癌组织排列以粗梁型为主,纤维间质丰富,可见假腺管结构,癌细胞呈多边形,核大深染(图 4),其组织学类型及分化程度与原肿瘤类似。

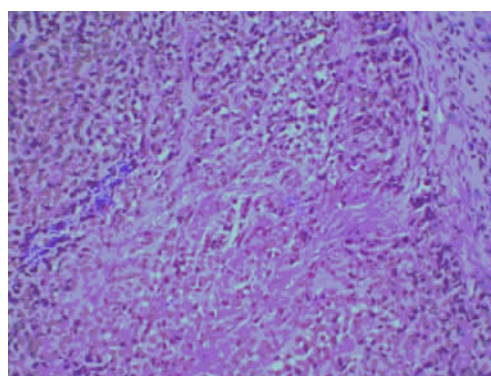


图 4 EH-H1 细胞裸鼠移植瘤组织的病理学观察( H-E, ×200 )

Fig. 4 Pathological observation of EH-H1 cells after orthotropic transplantation in nude mice( H-E, ×200 )

Thick bridge alignment of cancer tissue is the main type, affluence of fiber interstitial substance, nothocryptae structure clear, the malignant cell turned polygonal, karyomegaly anachromasis

### 3 讨论

自 1960 年陈瑞铭等<sup>[1]</sup>建立世界上第 1 株人体肝癌细胞系 BEL-16, 到目前有正式报道的至少有 31 株肝癌细胞系。这些肝癌细胞系的建立为人们认识肝癌的发病机制及生物学行为, 探索肝癌防治方法提供了理想模型。但由于肿瘤的异质性和复杂性, 不同地区和种族的肿瘤各有其特性。体外建立肝癌细胞系是研究肝癌机制、探索其治疗方法必不可少的手段, 包括肝癌细胞在内的许多肿瘤细胞的体外培养建系均非常困难, 原发肿瘤组织由于离体后环境变化, 细胞往往会发生衰退死亡, 导致体外细胞建系的成功率极低, 即使能在体外生存, 也常发生某些生物学特性的改变或丢失<sup>[2,3]</sup>。

本实验采用胶原酶消化法分离肝癌组织标本, 得到肝癌细胞, 通过克隆化培养得到 EH-H1 细胞株。EH-H1 细胞来源于病理诊断为原发性肝细胞肝癌的瘤组织, 迄今已在体外培养 1 年多, 传代 80 多次, 细胞生长迅速而恒定, 增殖的周期约为 24 h, 细胞呈多边形上皮样, 细胞生长失去接触抑制。细胞核异形性明显, 核深染, 核仁清晰、大, 胞质少, 核内异染色质丰富, 细胞生长旺盛。在实验中发现患者血清的 AFP 放射免疫分析值达到 94.3  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 而新建细胞株 EH-H1 的 AFP 分泌微量。

由于对肝癌的确切发病机制尚不清楚, 染色体分析是确立细胞系的重要指标。为此, 本研究采用标准胰酶-基姆萨(G 带)分带染色法对 EH-H1 进行细胞遗传学研究。结果发现, 正常人的细胞染色体为 46 条二倍体, EH-H1 细胞染色体为非整倍体, 以超二倍体为主, 这与多数肝癌细胞系为超三倍体不同。国内外有关肝癌染色体研究<sup>[4,6]</sup>发现, 肝癌细胞系中染色体数目增加是极其普遍的现象, 表明其具有上皮样恶性细胞形态特征。EH-H1 染色体结构异常涉及 1、3、9、10、14、15、19、和 22 号, 尤其是 14 号和 15 号染色体 p11.2 发生的频率最高。

肿瘤干细胞是近几年来人们非常关注的热点。从细胞生物学的角度分析, 人们越来越倾向于认为肿瘤的发生是肿瘤组织中具有“干细胞”特性的细胞分裂和分化的结果<sup>[7]</sup>, 但也有资料证明肝细胞癌可以由正常的成熟肝细胞去分化而成<sup>[8]</sup>, 折衷的观点认为肝细胞癌的发生途径是多样的。Ma 等<sup>[9]</sup>和 Suetsugu 等<sup>[10]</sup>应用 CD133<sup>+</sup> 作为表面抗体标记从人的肝癌细胞系中成功分离出了具有自我更新以及更强的肿瘤形成能力的一群“肝癌干细胞”样细胞。Yang 等<sup>[11]</sup>应用 CD45<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup> 作为表面抗体标记从

人肝癌组织以及外周血液中分离出一小群细胞, 这群细胞具有肿瘤形成能力并且可能可以作为肿瘤干细胞的标志物来分选干细胞。本实验初步证实 EH-H1 细胞中有部分细胞呈现 CD133 阳性(另文发表), 需要进一步证实此细胞株的其他表型特征, 如 CD45、CD90 等。EH-H1 细胞系的成功建立, 使实验获得了研究肝癌的新细胞株, 为今后对肝癌基础研究与临床治疗提供了理想的模型, 丰富了人肝癌细胞系的类型, 有着重要的意义。

### [参考文献]

- [1] 陈瑞铭. 一株人体肝癌细胞的建立和一些初步的观察[G]//中国医学科学. 肿瘤研究论文集. 上海:上海科学技术出版社, 1962: 39-47.
- [2] Sing GK, Pace R, Rrior S, *et al.* Establishment of a cell-line from a hepatocellular carcinoma from a patient with hemochromatosis [J]. *Hepatology*, 1994, 20(1):74-81.
- [3] Masaki T, Shiratori Y, Rengifo W, *et al.* Hepatocellular carcinoma cell cycle: study of Long-Evans cinnamon rats [J]. *Hepatology*, 2000, 32(4):711-720.
- [4] Zimmermann U, Feneux D, Mathey G, *et al.* Chromosomal aberrations in hepatocellular carcinomas: relationship with pathological features [J]. *Hepatology*, 1997, 26(6):1492-1498.
- [5] Nanashima A, Yamaguchi H, Yasutake T, *et al.* Gain of chromosome 20 is a frequent aberration in liver metastasis of colorectal cancers [J]. *Dig Dis Sci*, 1997, 42(7):1388-1393.
- [6] Korn WM, Yasutake T, Kuo WL, *et al.* Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, 25(2):82-90.
- [7] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, *et al.* Stem cells, cancer and cancer stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859):105-111.
- [8] Gournay J, Auvigne I, Pichard V, *et al.* *In vivo* cell lineage analysis during chemical hepatocarcinogenesis in rats using retroviral-mediated gene transfer: evidence for dedifferentiation of mature hepatocyte [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(6):781-788.
- [9] Ma S, Chan KW, Hu L, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2542-2556.
- [10] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, *et al.* Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 351(4):820-824.
- [11] Yang ZF, Ngai P, Ho DW, *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer [J]. *Hepatology*, 2008, 47(3):919-928.

[收稿日期] 2008-11-18

[修回日期] 2008-12-30

[本文编辑] 王莹