

人胚胎干细胞抑制人肝癌细胞系 SK-Hep1 增殖并促进凋亡

张 婷^{1,2}, 霍本念^{1,2}, 刘 洁^{1,2}, 刘梦楠¹, 冯 涛^{1,2*}

(重庆医科大学 1. 分子医学与肿瘤研究中心; 2. 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

摘要: 目的 探究在人胚胎干细胞 hESCs 与人肝癌细胞系 SK-Hep1 共培养微环境中 hESCs 对 SK-Hep1 人肝癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响。方法 建立 hESCs 与 SK-Hep1 人肝癌细胞系的非接触式共培养体系, 将与 hESCs 共培养的 SK-Hep1 细胞作为实验组, 单独培养的 SK-Hep1 细胞作为对照组。MTT 法检测 SK-Hep1 细胞的增殖能力; Transwell 小室法检测 SK-Hep1 的侵袭与迁移能力; Hoechst33258 染色后观察共培养后 SK-Hep1 细胞核的变化; 流式细胞术检测 SK-Hep1 细胞凋亡率。结果 与 hESCs 共培养后, SK-Hep1 细胞的增殖能力受到抑制, 随着时间增加, 抑制效果越显著 ($P < 0.05$); 细胞侵袭、迁移穿过 Transwell 小室的数量显著减少 ($P < 0.05$); 发生核固缩、变形和浓染的 SK-Hep1 细胞较对照组增多; 细胞凋亡比率较对照组显著增加 ($P < 0.05$)。结论 人胚胎干细胞对 SK-Hep1 人肝癌细胞系有抑制作用。

关键词: 胚胎干细胞; 肝癌细胞; 抑制作用

中图分类号: R329.2 文献标志码: A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2017.03.006

Human embryonic stem cells inhibit proliferation and promote apoptosis of human hepatoma cell line SK-Hep1

ZHANG Ting^{1,2}, HUO Ben-nian^{1,2}, LIU Jie^{1,2}, LIU Meng-nan¹, FENG Tao^{1,2*}

(1. Research Center of Molecular Medicine and Cancer; 2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore effects of human embryonic stem cells (hESCs) on proliferation, invasion and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells in the co-culture of micro environmen of hESCs and SK-Hep1.

Methods Single cultured SK-Hep1 cells were served as control group while SK-Hep1 which non-contact co-cultured with hESCs was regarded as experimental group. The proliferation ability of SK-Hep1 was measured by MTT method; invasion and migration ability of SK-Hep1 cells were detected by Transwell chamber method; the nucleus variation and cell apoptosis of SK-Hep1 were detected by Hoechst33258 chromosome and flow cytometry.

Results The proliferation of SK-Hep1 cells in the experimental group was obviously inhibited as compared with control group ($P < 0.05$); the number of SK-Hep1 cells which passed through the Transwell chambers were significantly reduced as compared with control group in invasion and migration experiment ($P < 0.05$); more nucleus pycnosis and deformation appeared in experimental group than that in control group. And apoptosis rate of SK-Hep1 cells in the experimental group was significantly higher than that of in the control group ($P < 0.05$).

收稿日期: 2016-08-04 修回日期: 2016-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(81071770)

* 通信作者 (corresponding author): 478240069@qq.com

Conclusions Human embryonic stem cells have inhibitory effect on human hepatoma cell line SK-Hep1.

Key words: embryonic stem cells; hepatoma cell; inhibition

早在 1892 年,首次提出肿瘤胚胎性起源学说的概念^[1]。此后研究证明胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)与肿瘤细胞的确在自我更新、分化以及端粒酶活性等方面具有一定的相似性^[2-4]。但是随着研究的深入开展,有文献报道肿瘤细胞基质具有诱导正常细胞癌变的性质,而胚胎细胞则可以将肿瘤细胞向正常细胞诱导,进而表现出一定的抗肿瘤特质^[5],因此,科研人员将胚胎细胞与肿瘤的相互作用作为突破口,为肿瘤的治疗寻找除手术、化疗和放疗以外的新方法。hESCs 在肿瘤微环境中可以分泌具有抑制癌细胞增殖的可溶性物质^[6]。将囊胚与 HO-8910PM 人卵巢癌细胞进行共培养发现肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移等能力受到抑制^[7]。肿瘤治疗迫在眉睫, hESCs 的研究为肿瘤的治疗找到了新方向。由于原发性肝癌危害大,疗效差,副作用强,并且关于将 hESCs 用于肝癌治疗的研究报道甚少,因此本实验初步探究 hESCs 体外对人肝癌细胞的影响,为 hESCs 与肝癌细胞相互作用机制研究与肝癌的干细胞治疗研究奠定基础,找到安全、有效的治疗新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: PSCeasy 人多潜能干细胞解冻液、PSCeasy 人多潜能干细胞完全培养基、干细胞传代工作液 EDTA 和 Matrigel 胶(北京赛贝生物试剂公司); F12/DMEM 高糖培养基、胎牛血清 FBS(Gibco 公司); MTT 试剂盒、Hoechst33258(碧云天生物技术公司); Transwell 小室、细胞培养板(康宁公司)。

1.1.2 细胞系: 人肝癌细胞 SK-Hep1(本实验室保存); 人胚胎干细胞 hESCs(北京赛贝生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与共培养体系的建立: 常规贴壁细胞培养法将 SK-Hep1 人肝癌细胞养至贴壁; hESCs 接种在包被过 Matrigel 基质胶的细胞培养板中,用 E8 培养基培养至细胞贴壁,待细胞汇合度达到 80% 以上进行传代、冻存。将对数期增殖 SK-Hep1 人肝癌细胞接种在 Transwell 小室底部,待细胞贴壁

以后,插入铺有 hESCs 的细胞培养板中,培养基更换为高糖 DMEM 培养基,建立共培养体系,作为实验组;将接种过 SK-Hep1 细胞的 Transwell 小室插入无 hESCs 的培养板中,作为对照组。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖: 在 Transwell 小室内接种 2.5×10^5 个/孔 hESCs; 以 1×10^5 个/孔在细胞培养板中接种 SK-Hep1 细胞,按 1.2.1 进行培养。细胞培养 12、24、36、48 和 60 h 后,分别取出实验组与对照组 Transwell 小室,加入 20 μ L MTT(5 g/L) 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 4 h,弃去培养基,每孔加入 150 μ L DMSO 溶解结晶物,于酶标仪 490 nm 处检测吸光度值并记录。

1.2.3 Transwell 检测细胞侵袭与迁移: 以 100 μ L/孔向孔径为 8 μ m 的 Transwell 小室中加入 Matrigel 基质胶工作液,孵育 4 h。以 2.5×10^5 个/孔在 12 孔板内接种 hESCs,以 1×10^5 个/孔在 Transwell 小室内接种 SK-Hep1 细胞,按 1.2.1 进行培养。向实验组、对照组下室加入含 10% FBS 培养基,上室加无 FBS 的 DMEM 培养基 24 h 后,取出小室,甲醇固定 15 min,用棉签轻轻擦去小室内部基质胶与细胞,再用 1% 结晶紫溶液染色,在低倍显微镜下观察,随机选取 5 个视野计数并拍照,以穿过 Transwell 小室底膜的细胞数量表示细胞侵袭、迁移能力大小。Transwell 迁移实验不在小室底部铺胶,其余操作步骤同上。

1.2.4 Hoechst33258 染色检测细胞核形态的变化: 消化对数期 SK-Hep1 人肝癌细胞,将细胞调整为 1.5×10^5 个/mL,取 400 μ L 加入小室,按 1.2.1 进行培养。48 h 后取出实验组与对照组 Transwell 小室,固定 15 min,用 Hoechst33258 染色后,于荧光倒置显微镜下观察细胞核形态的变化。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡: 细胞培养 48 h 后,分别取出实验组与对照组 Transwell 小室,胰蛋白酶消化并收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个 SK-Hep1 细胞,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学分析

所有实验均重复 3 次,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 软件、独立样本 *t* 检

验对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖

hESCs 与 SK-Hep1 共培养,SK-Hep1 细胞的增殖能力从 24 h 开始受到显著的抑制($P < 0.05$) 随着时间增加 抑制效果越明显 60 h 后 部分细胞脱壁。因此在后续实验中,取共培养 48 h 的 SK-Hep1 细胞做研究(表 1)。

2.2 Transwell 检测细胞侵袭与迁移

细胞侵袭实验中,实验组穿过小室的细胞与对照组比显著减少。细胞迁移实验中,实验组穿

过小室的细胞数量较对照组显著减少($P < 0.05$) (图 1)。

2.3 Hoechst33258 染色结果

实验组细胞核出现染色质凝集,大量细胞核染色加深,发生固缩,出现边集现象,核的形态改变呈新月状,有的甚至出现核分裂、凋亡小体和空泡。对照组中细胞染色质分布均匀,细胞核呈均匀蓝色,细胞核的形态结构相对完整,细胞处于正常状态(图 2)。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

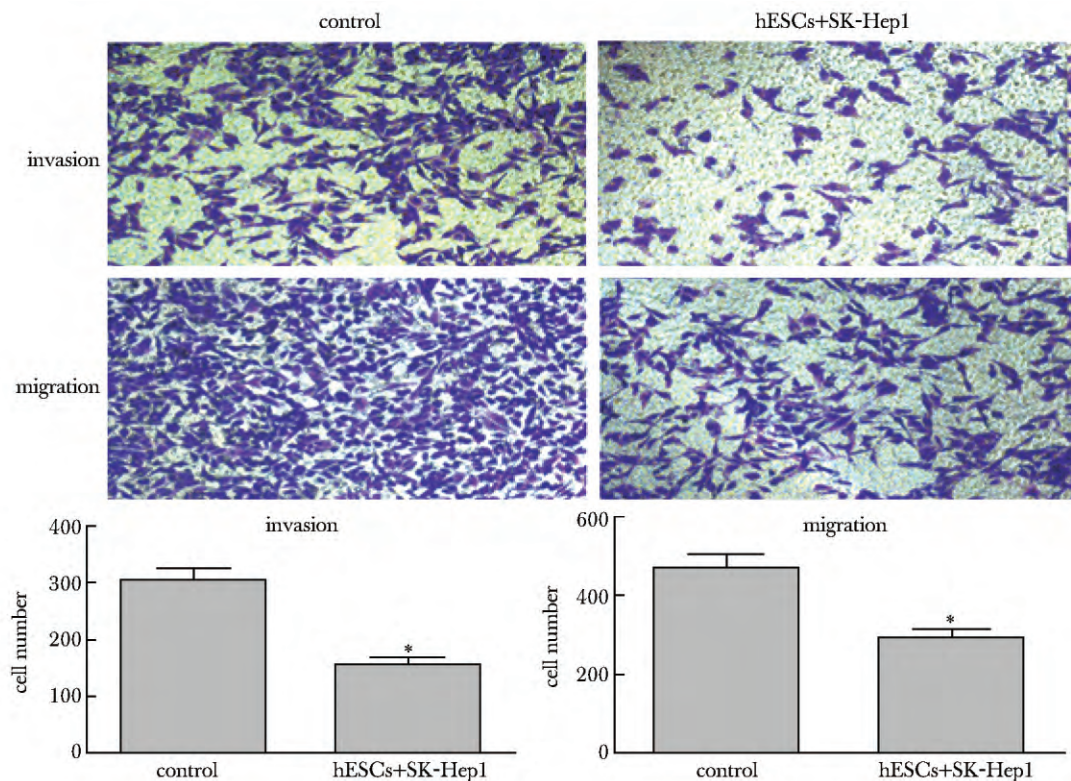
实验组细胞凋亡率与对照组比显著升高($P < 0.05$) (图 3)。

表 1 hESCs 对 SK-Hep1 细胞增殖能力影响

Table 1 Effect of hESCs on SK-Hep1 cell proliferation ability($\bar{x} \pm s$ $n=3$ A value)

group	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours	60 hours
control group	0.25 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.52 ± 0.02
experimental group	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.02*	0.28 ± 0.02*	0.29 ± 0.03*	0.32 ± 0.02*

* $P < 0.05$ compared with control group.



* $P < 0.05$ compared with control group

图 1 胚胎干细胞对 SK-Hep1 细胞侵袭和迁移能力的影响

Fig 1 Effect of hESCs on invasion and migration abilities of SK-Hep1 cells($\times 200$, $\bar{x} \pm s$ $n=3$)

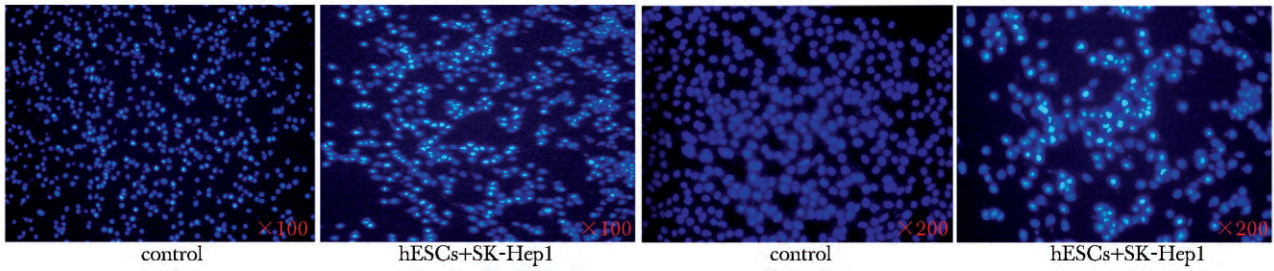
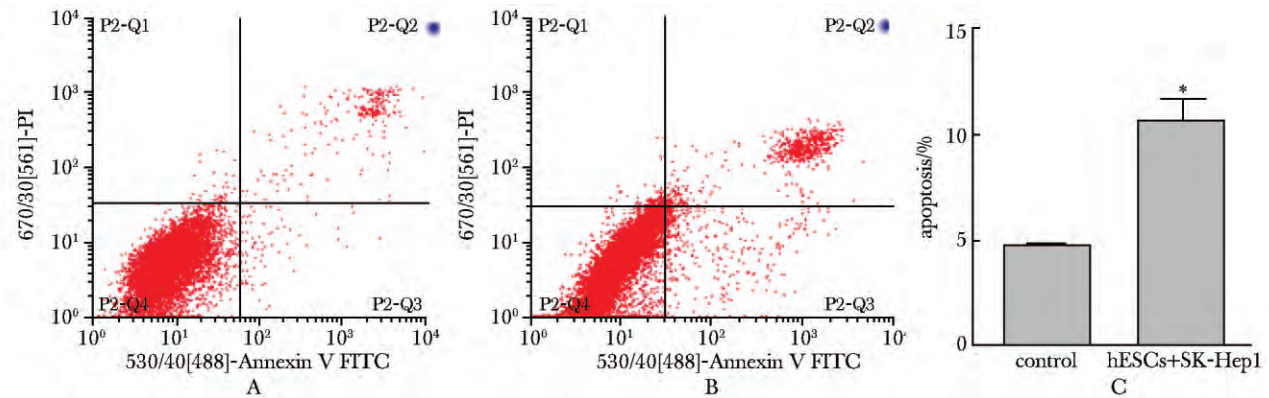


图2 胚胎干细胞对细胞核形态的影响

Fig 2 Effect of hESCs on the karyomorphism of SK-Hep1(×100)



A. control group; B. hESC + SK-Hep1 group; C. statistical graph of cell apoptosis rate in both group;

**P* < 0.05 compared with control group

图3 流式细胞术检测胚胎干细胞对 SK-Hep1 细胞凋亡的影响

Fig 3 Effect of hESCs on apoptosis of SK-Hep1 cells by flow cytometry($\bar{x} \pm s$ *n* = 3)

3 讨论

胚胎干细胞来源于囊胚内细胞团。有文献报道,正常小鼠囊胚可以逆转肿瘤恶性表型^[8],该结果为本实验研究共培养环境中 hESCs 对 SK-Hep1 人肝癌细胞系的影响提供了依据。由于干细胞培养基可以抑制细胞分化,不利于 hESCs 对 SK-Hep1 的刺激做出反应,因此细胞共培养阶段将培养基更换为 DMEM 培养基。在整个共培养过程中,只隔离细胞,细胞分泌物与培养基皆可自由通过 Transwell 小室^[9],以此研究 hESCs 对 SK-Hep1 人肝癌细胞的作用。

细胞异常增殖是肿瘤发生的重要原因之一。在共培养环境中,从 24 h 开始 hESCs 显著抑制 SK-Hep1 细胞增殖,随着共培养时间增加, hESCs 对其增殖抑制越明显。由于 hESCs 与 SK-Hep1 细胞相互作用可能是通过共用培养基完成的,在整个共培养过程中并未更换培养基。当共培养 60 h 后,部分细胞由于

营养不足悬浮于培养基中,对实验结果影响较大,因此在实验中选取共培养 48 h 后的 SK-Hep1 人肝癌细胞进行后续研究。肿瘤的侵袭与迁移能力是恶性肿瘤的重要特征之一。有文献报道,小鼠胚胎干细胞可以抑制小鼠 Lewis 肺癌细胞侵袭与迁移^[10],与本实验结果相符,说明 hESCs 可以抑制 SK-Hep1 细胞的侵袭与迁移能力,逆转肿瘤恶性表型。该实验为恶性肿瘤转移治疗奠定了基础。Hoechst33258 凋亡染色与流式细胞凋亡实验结果共同表明 hESCs 能促进 SK-Hep1 人肝癌细胞凋亡。

有研究表明,胚胎干细胞可以被诱导分化为多种免疫细胞,并分泌多种具有抗肿瘤作用的细胞因子^[11-12]。在非接触式共培养体系中,细胞之间只能通过共用培养基及存在于培养基里的细胞因子进行相互影响,因此 hESCs 对 SK-Hep1 的抑制作用可能是 hESCs 分泌了具有抗肿瘤作用的可溶性物质,对 SK-Hep1 起到抑制作用。在胚胎干细胞的相关研究中,并未有报道其自身分泌物具有抗肿瘤作用,因此

推断该抑制作用,可能是由 SK-Hep1 细胞刺激 hESCs 致使 hESCs 做出的相应针对性反应。以上结果提示有必要进一步明确该不明物质并在体内验证其抗肝癌作用。

综上所述,实验证明 hESCs 可以抑制 SK-Hep1 增殖、侵袭与迁移,并能促进其凋亡。该实验为寻找安全有效的肝癌治疗方法提供了理论基础,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Stoika RS, Panchuk RR, Stoika BR. The similarities and the differences of embryogenesis and carcinogenesis [J]. *Ontogenez*, 2004, 35: 85-90.
- [2] Aguilar-Gallardo C, Simón C. Cells, stem cells, and cancer stem cells [J]. *Semin Reprod Med*, 2013, 31: 5-13.
- [3] Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 268-277.
- [4] 史晋叔, 涂怀军, 张娟, 等. P53 对胚胎干细胞分化的影响及作用机制 [J]. *基础医学与临床*, 2014, 34: 1264-1267.
- [5] Miller SJ, Lavker RM, Sun TT. Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: Tumor properties and therapeutic implications [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1752: 25-52.
- [6] Giuffrida D, Rogers IM, Nagy A, et al. Casper RF. Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42: 788-798.
- [7] 张慧娟, 宋学茹, 白晓红, 等. 共培养体系中小鼠囊胚对人卵巢癌细胞系 HO-8910PM 的影响 [J]. *天津医药*, 2010, 38: 306-308.
- [8] Dürr M, Harder F, Merkel A, et al. Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 9185-9191.
- [9] 谭美华, 陈建苏. 体外细胞组织重建中共培养技术的应用 [J]. *基础医学与临床*, 2012, 32: 1111-1114.
- [10] Dong W, Qiu C, Shen H. Effect of Embryonic Stem Cells in a Non-Small Cell Lung Cancer Model: Antitumor Factors and Immune Responses [J]. *Int J Med Sci*, 2013, 10: 1314-1320.
- [11] Yaddanapudi K, Mitchell RA, Putty K, et al. Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer: is abroad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible? [J]. *Plos One*, 2012, 7: e42289, doi: 10.1371/journal.pone.0042289.
- [12] Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, et al. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 75: 248-255.

新闻点击

酗酒与酒精相关癌症风险有关

据美国 WebMD 医学新闻网(2015-11-06)报道,最新研究证明,酗酒增加受伤与酒精相关癌症的风险。

研究发现,目前有喝酒的人患有酒精相关癌症的风险也高了 51%,比如口腔癌、食道癌、胃癌、大肠癌、直肠癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌以及头颈癌;而且研究发现,受伤的风险增加 29%。

然而,研究人员指出,综合死亡、心脏病、脑卒中、癌症或死亡的风险,在高收入与中上收入的国家中,有喝酒的人风险降低 16%;但中低收入与低收入国家的喝酒者,上述风险增加了 38%。

加拿大的研究人员在 2015-09-16 出版的《柳叶刀》(*The Lancet*)中认为,需要有政策阻止酒精滥用问题,尤其是在低收入的国家。