

# 血管内皮细胞对肝癌干细胞样细胞增殖及成瘤的影响

易善永 南克俊 阮静 张丽娟 柯洋

**【摘要】** 目的 探讨血管内皮细胞对肝癌干细胞样细胞增殖及成瘤的影响,并初步了解血管微环境对肝癌干细胞样细胞作用。方法 用磁珠分选技术分选 MHCC97H 细胞株中的肝癌干细胞样细胞,将其分别接种到普通软琼脂和内皮细胞条件软琼脂中,观察集落形成情况;将其与血管内皮细胞混合细胞接种到裸鼠皮下,观察移植瘤形成情况。结果 肝癌干细胞样细胞在普通培养基和内皮细胞条件培养基中集落形成率分别为:  $(14.25 \pm 2.94) \%$  vs.  $(33.49 \pm 5.46) \%$ , 差异具有统计学意义 ( $P=0.036$ )。两组移植瘤的体积和重量分别为  $(1442.73 \pm 67.51) \text{ mm}^3$  vs.  $(862.93 \pm 135.12) \text{ mm}^3$ ;  $(1.45 \pm 0.15) \text{ g}$  vs.  $(0.91 \pm 0.19) \text{ g}$ , 差异具有统计学意义 ( $P=0.008$ ;  $P=0.043$ )。结论 血管内皮细胞是肿瘤干细胞血管微环境的重要组成部分,血管内皮细胞不仅在体外培养时能够促进肝癌干细胞样细胞的生长与增殖,而且在体内也能促进其移植瘤的生长。

**【关键词】** 肝肿瘤; 肿瘤干细胞; 内皮, 血管; 血管内皮细胞

**Effects of HUVECs on the proliferation *in vitro* and tumorigenesis *in vivo* of CD133 positive cells** Yi Shan-yong\*, NAN Ke-jun, RUAN Jing, ZHANG Li-juan, KE Yang. \*Department of Oncology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China

Corresponding author: NAN Ke-jun, Email: nankij@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of vascular endothelial cells(VECs) on the proliferation *in vitro* and tumorigenesis *in vivo* of liver cancer stem-like cells(LCSLC). **Methods** LCSLC were inoculated in both normal serum-containing media and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) conditioned serum-containing media. After 2 weeks, the number of the colony formation was assessed by counting under microscope. LCSLC either alone or in combination with HUVECs were inoculated into the bilateral back of every nude mouse. After 4 weeks, xenograft tumors were measured. **Results** The ratios of colony formation of LCSLC in HUVEC conditioned media and unconditioned identical media were  $(33.49 \pm 5.46)\%$  and  $(14.25 \pm 2.94)\%$ , which demonstrated statistical significance( $P=0.036$ ). The results strongly indicated that LCSLC cultures grown in HUVEC conditioned media formed significantly more colony compared with LCSLC grown in unconditioned identical media. The volume and weight of xenograft tumors of LCSLC group and mixed cells group were  $(1442.73 \pm 67.51) \text{ mm}^3$  vs.  $(862.93 \pm 135.12) \text{ mm}^3$ ;  $(1.45 \pm 0.15) \text{ g}$  vs.  $(0.91 \pm 0.19) \text{ g}$ . There were significant differences between the two groups ( $P=0.008$  or  $P=0.043$ ). The data suggested that HUVEC could promote the growth of xenograft tumors *in vivo*, also. **Conclusion** VECs are critical component of the cancer stem cells vascular niche. VECs could enhance the self-renewal and proliferation capacity of LCSLC *in vitro*, and they also accelerated the initiation and growth of xenograft tumors.

**【Key words】** Liver neoplasms; Neoplastic stem cells; Endothelium, vascular; Human umbilical vein endothelial cells

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.15.054

基金项目: 郑州市科技攻关项目(121PPTGG504-3); 郑州市卫生局博士创新项目(2011)

作者单位: 450007 郑州大学附属郑州中心医院肿瘤科(易善永、张丽娟、柯洋); 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤中心(南克俊); 天津医科大学眼视光学院(阮静)

通讯作者: 南克俊, Email: nankij@163.com

近年来,一些研究证实,肿瘤来源于肿瘤干细胞,肿瘤干细胞像正常干细胞一样赖以生存于干细胞巢的微环境中<sup>[1-4]</sup>。研究还发现,血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)是肿瘤干细胞血管巢的重要组成部分。VECs与肿瘤干细胞的自我增殖密切相关,并且VECs还能够分泌一些生长因子使肿瘤干细胞维持干细胞状态<sup>[5-6]</sup>。本研究旨在观察MHCC97H细胞株中的CD133<sup>+</sup>细胞,即肝癌干细胞样细胞(liver cancer stem-like cells, LCSLC)在普通软琼脂和內皮细胞条件软琼脂中集落形成情况;探讨血管内皮细胞对LCSLC增殖及成瘤的影响。

## 材料与方 法

### 一、主要材料与试剂

MHCC97H细胞株购于上海中科院细胞库;人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由西安交通大学医学院中心实验室培养提供;Balb/C裸鼠购于中国科学院上海实验动物中心。RPMI-1640培养基(Sigma公司)。鼠抗人PE-CD133、CD133免疫磁珠细胞分选系统(Miltenyi公司),流式细胞仪(BD公司)。

### 二、内皮细胞条件培养液的配制

在14 mm培养皿中,将生长状态为80%的HUVECs用PBS洗涤,然后加入含15% FBS的RPMI-1640培养基12 ml,置于5% CO<sub>2</sub>, 37 °C饱和温度的培养箱中进行培养24 h。将培养液倒出,以1500 r/min,离心10 min,过滤,取其上清。即内皮细胞条件培养液,保存备用。

### 三、免疫磁珠法分选细胞

取呈对数生长期的肝肝癌MHCC97H细胞株数瓶,胰酶消化,用0.4%锥虫蓝染色、计数,使细胞总量保持在1×10<sup>8</sup>数量级。取上述准备好的MHCC97H细胞,按100 μl/10<sup>8</sup>的比例加入FcR阻断试剂;5 min后按100 μl/10<sup>8</sup>的比例加入交联CD133抗体的微磁珠标记MHCC97H细胞。充分混匀后在4~8 °C冰箱内孵育25 min。然后加入缓冲液进行离心,弃上清,制成细胞悬液;过MACS分离柱分选MHCC97H细胞,并收集CD133<sup>+</sup>。

### 四、LCSLC在不同条件培养基中集落形成情况

按1:1比例混合琼脂糖溶液和RPMI-1640培养液,室温下冷却凝固形成培养底板。按1:1的比例使0.6%琼脂糖溶液和RPMI-1640培养液或者内皮细胞条件培养基分别在无菌试管中相混,然后向试管中加入LCSLC细胞悬液(约1000个/ml),充分混匀,再以

1 ml/孔浇灌于已铺有0.6%的琼脂糖底层六孔板中,形成双琼脂层,将上述2组细胞每组接种3孔。待上层琼脂凝固后,置于5% CO<sub>2</sub>, 37 °C的培养箱中培养,每天观察细胞集落生长。2周后,在相差显微镜下观察细胞集落的形成情况,镜下计数含50个细胞以上的集落数量。计算集落形成率(集落形成率=集落形成数/接种细胞数×100%)。

### 五、LCSLC及其与HUVECs混合细胞的成瘤实验

取20只4~6周龄,体重为(21.4±3.2)g雄性裸鼠,随机分为2组(n=10)。取生长状态良好的HUVECs和LCSLC数瓶,调整细胞密度为1×10<sup>5</sup>。分别取密度为1×10<sup>5</sup>的LCSLC及其与HUVECs的混合细胞,分别注射于10只Balb/C裸鼠前肢左侧背部皮下,每只裸鼠接种的细胞悬液量大约为0.2 ml。接种后每周观察两次各组细胞的成瘤情况。应用免疫组化法检测治疗后各组移植瘤组织中CD133的表达情况。用德国LeicaQ550cw图像分析系统照相记录,并分析其灰度值。

### 六、统计学处理

所有计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较应用t检验分析。采用SPSS 17.0统计软件进行分析处理。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 结 果

1. LCSLC在不同条件培养基中集落形成的比较:在双层软琼脂培养过程中,我们观察到LCSLC在内皮细胞条件软琼脂培养基中形成的集落出现早、数目多且体积较大(图1)。LCSLC在普通和內皮细胞条件培养基中集落形成率分为(14.25±2.94) vs. (33.49±5.46)%,两组差异具有统计学意义(P=0.036,图2)。

2. HUVECs对LCSLC体内成瘤的影响:在第3天混合细胞接种部位已有肿瘤长出,而直到第1周末单纯接种LCSLC的接种部位才有肿瘤长出。到第4周末,每个接种部位均有移植瘤形成,混合细胞组与单纯接种LCSLC组形成的移植瘤体积分别为(1442.73±67.51) mm<sup>3</sup> vs. (862.93±135.12) mm<sup>3</sup>,重量分别为(1.45±0.15) g vs. (0.91±0.19) g。两组移植瘤的大小、重量差异均具有统计学意义(P=0.008; P=0.043,表1)。

表1 两组细胞成瘤大小的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	肿瘤体积(mm <sup>3</sup> )	肿瘤重量(g)
LCSLC	862.93±135.12	0.91±0.19
混合细胞	1442.73±67.51	1.45±0.15
P值	0.008	0.043



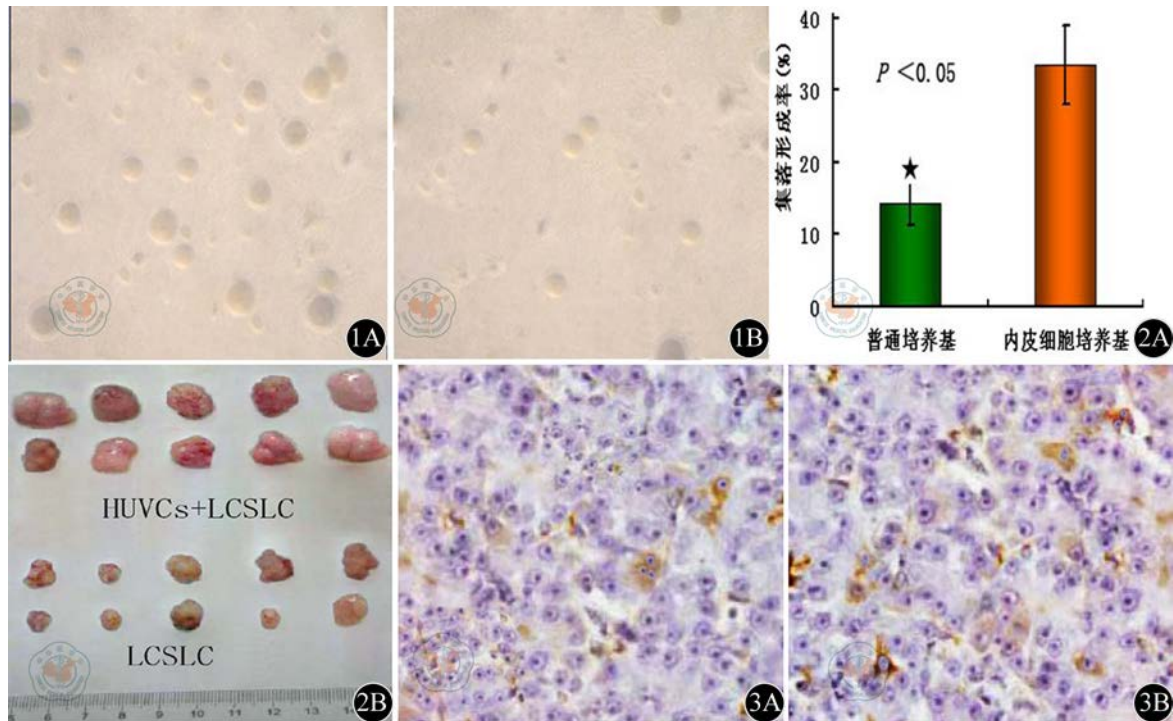


图1 不同条件下LCSLC在软琼脂中集落形成情况(×40)。1A: LCSLC在内皮细胞条件培养基中集落形成; 1B: LCSLC在普通培养基中集落形成 图2 HUVECs的生长及LCSLC集落形成率。2A: LCSLC在不同条件下形成集落情况比较; 2B: 手术切除的移植瘤 图3 移植瘤病理切片CD133免疫组化染色所见(×200)。3A: LCSLC组; 3B: 混合细胞组

3. 免疫组化检测 CD133 的表达结果: 免疫组化结果显示, 各组均可见细胞膜和(或)细胞质呈棕黄色而胞核不染色的 CD133<sup>+</sup>细胞。LCSLC 组和混合细胞组的灰度值依次为: 185.28±16.58 vs. 152.19±18.65。两组相比差异具有统计学意义(P=0.046; 图3)。灰度值与实际表达强度成反比, 即灰度值越低, 阳性表达越强。

### 讨 论

随着对肿瘤干细胞研究的不断深入, 人们发现肿瘤干细胞和正常干细胞一样也处于一个特殊的微环境中, 又称为血管微环境<sup>[1-4]</sup>。它可为肿瘤干细胞提供一个保护性微环境, 维持其自我更新和分化间的平衡, 使其不受外界因素的影响并保持其未分化状态。此外, 肿瘤干细胞的“归巢”及“动员”又和肿瘤的侵袭与转移有着非常密切的关系。研究表明, 血管内皮细胞是肿瘤干细胞血管微环境的重要组成成分<sup>[5-6]</sup>。

我们在前面的研究中已经证实 CD133<sup>+</sup>MHCC97H 细胞具有肿瘤干细胞的特性, 虽然目前还不能完全肯定它们就是肝癌干细胞, 但是至少可以将其定义为肝癌干细胞样细胞<sup>[7-10]</sup>。本研究发现, LCSLC 在内皮细胞条件软琼脂培养基下形成的集落出现早、数目多、

体积大, 而在普通软琼脂培养基下形成集落出现晚、数量少、体积小。这表明血管内皮细胞可能分泌某些可溶性因子增加或者促进了 LCSLC 体外集落形成。据以往文献报道, 脑肿瘤干细胞样细胞需要血管微环境来支持、维护其干细胞状态, 在细胞培养中也需要血管生长因子来保养和维持其无限增殖能力<sup>[5]</sup>。我们的研究也支持这个观点, 在 LCSLC 培养中血管内皮细胞可能分泌某些生长因子有助于促进其增殖。LCSLC 的自我更新、无限增殖与其周围微环境的某些生长因子密切相关。

在本实验中, 我们将 LCSLC 以及 LCSLC 与 HUVECs 的混合细胞分别接种到裸鼠背部皮下, 混合细胞组较单纯接种 LCSLC 组形成的移植瘤出现早, 体积更大、重量更重, 表明 LCSLC 与 HUVECs 共移植可以促进移植肿瘤的快速生长, 并且免疫组化结果显示, CD133 阳性表达更强, 这进一步证实了血管内皮细胞可以促进肿瘤干细胞的生长与增殖。究其原因可能为: 一方面血管内皮细胞是肿瘤干细胞血管微环境的重要组成部分, 增加血管内皮细胞促进血管微环境的构成, 血管微环境又可以维持 LCSLC 的干细胞状态促进肿瘤的生长; 另一方面血管内皮细胞能够分泌某些可溶性生长因子, 它们具有促进 LCSLC 的自我增殖

及维持其未分化状态作用<sup>[5-6]</sup>。本研究进一步证实了血管微环境在 LCSLC 移植瘤生长中的重要性。

### 参 考 文 献

- [1] Sottoriva A, Sloat PM, Medema JP, et al. Exploring cancer stem cell niche directed tumor growth. *Cell Cycle*, 2010, 9: 1472-1479.
- [2] Yi SY, Hao YB, Nan KJ, et al. Cancer stem cells niche: A target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39: 290-296.
- [3] Borovski T, Melo FD, Vermeulen L, et al. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*, 2011, 71: 634-639.
- [4] Burness ML, Sipkins DA. The stem cell niche in health and malignancy. *Semin Cancer Bio*, 2010, 20: 107-115.
- [5] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*, 2007, 11: 69-82.
- [6] Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 733-736.
- [7] Yi SY, Nan KJ. Tumor-initiating stem cells in liver cancer. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 325-330.
- [8] Shanyong Yi, Kejun Nan, Aihua Yuan, et al. Isolation and characterization of cancer stem-like cells from MHCC97H Cell Lines. *JNMU*, 2009, 23: 194-198.
- [9] Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007, 120: 1444-1450.
- [10] 易善永, 南克俊, 陈静, 等. 吉西他滨常规化疗对肝癌干细胞样细胞的影响. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17: 1270-1272.

(收稿日期: 2013-06-20)

(本文编辑: 马超)

易善永, 南克俊, 陈静, 等. 血管内皮细胞对肝癌干细胞样细胞增殖及成瘤的影响 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (15): 7018-7021.

