

EpCAM 和 CD13 在不同肝癌细胞系中的表达和乙型肝炎病毒 X 蛋白对其表达的影响*

闫霞¹, 江建新^{2**}, 黄早早³, 吴超³, 刘平³, 姚弘毅³

(1. 中国人民解放军第四五七医院, 湖北 武汉 430012; 2. 贵阳医学院附院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550004; 3. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院, 湖北 武汉 430077)

[摘要] 目的: 探讨肝癌干细胞标记物 EpCAM 和 CD13 在不同肝癌细胞系中的表达及乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)对 EpCAM 和 CD13 表达的影响。方法: Western blot 检测正常肝细胞系(LO2 细胞)和肝癌细胞系(Huh7, Bel-7404, Hep3B, QSG-7701 细胞)中肝癌干细胞标记物 EpCAM 和 CD13 的表达情况,同时建立稳定转染 HBx 基因的 Bel-7404(Bel-7404/HBx)细胞系,用 Real-time PCR 和 Western blot 检测转染后 EpCAM 和 CD13 表达情况。结果: EpCAM 和 CD13 在不同的肝癌细胞系中表达水平完全不同;转染 HBx 基因后 EpCAM 的 mRNA 和蛋白表达水平明显上调,分别为对照组的(2.04 ± 0.16)和(2.03 ± 0.25)倍;而 CD13 的 mRNA 和蛋白表达水平明显下调,分别为对照组的(69 ± 8)%和(55 ± 7)%。结论: 肝癌干细胞可能存在多个干细胞亚群,在不同的肝癌细胞中干细胞标记物的表达水平不同,而 HBx 对不同亚群的影响也不同。

[关键词] 癌,肝细胞;干细胞;EpCAM;CD13;乙型肝炎病毒 X 蛋白;转染

[中图分类号] R735.7; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)03-0307-04

The Expression of Liver Cancer Stem Cell Marker EpCAM and CD13 in Different Liver Cancer Cell Lines and the Influence of Hepatitis B Virus X Protein on Their Expression

YAN Xia¹, JIANG Jianxin², HUANG Zaozao³, WU Chao³, LIU Ping³, YAO Hongyi³

(1. No. 457 Hospital of PLA, Wuhan 430012, Hubei, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou China; 3. Affiliated Liyuan Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of liver cancer stem cell marker EpCAM and CD13 in different liver cancer cell lines and the influence of Hepatitis B virus X protein on their expression. **Methods:** Western blot was adopted to investigate the expression of liver cancer stem cell markers EpCAM and CD13 in normal liver cell line (LO2) and liver cancer cell lines (Huh7, Bel-7404, Hep3B, QSG-7701). Meanwhile a stable transfection with HBx gene cell line BEL-7404/HBX was established. The expression of EpCAM and CD13 were detected by Real-time PCR and Western blot after transfection. **Results:** The tendency of EpCAM and CD13 expression are completely different in different liver cancer cell lines. After HBx gene transfection, the expression of EpCAM mRNA level and protein level were both increased, by 2.04 ± 0.16 and 2.03 ± 0.25 to the control group ($P < 0.05$); while the expression of CD13 level and protein level were both decreased, by (69 ± 8)% and (55 ± 7)% to the control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** There may be multiple subgroups of liver stem cells in liver cancer stem cell, and influence of Hepatitis B virus X protein on them is varied.

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81160311)

**通信作者 E-mail: jx731003@163.com

网络出版时间: 2014-06-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140623.0022.042.html>

[Key words] cancer, liver cell; stem cell; EpCAM; CD13; Hepatitis B virus X protein; transfection

1994 年 Lapidot 等^[1]通过特异性细胞表面标志物 CD34⁺ 和 CD38⁻ 首次分离出了白血病干细胞,随后在恶性肿瘤中也相继发现了类似肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)的细胞亚群^[2-3]。肿瘤干细胞的分离及鉴定有赖于其表达的特异性标记物,如 CD133、EpCAM、CD44 等^[4]。目前已发现多个肝癌干细胞标记物,其中 EpCAM 和 CD13 被认为是最具潜力的标记物^[4-5]。目前肝癌的发生机制尚不清楚,但较为肯定的是乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)和其发生、发展密切相关。HBx 可以导致裸鼠的恶性转化,致使抑癌基因 P53 失活,还可与细胞内多个信号通路相互作用,最终导致了肝癌的发生、发展^[6-7]。但 HBx 和肝癌干细胞的关系目前尚不清楚,为了探讨 EpCAM 和 CD13 在不同肝癌细胞系中的表达及 HBx 对 EpCAM 和 CD13 表达的影响,进行了以下研究。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 荧光定量 PCR 仪由 ABI 公司生产, sybrGreen 购于 Life technologies 公司,鼠抗人 HBx 单克隆抗体和鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体和兔抗人 CD13 单克隆抗体购于 abcam 公司;脂质体转染剂 lipofectamine 2000, G418 为美国 Invitrogen 公司产品,逆转录试剂盒购于 Promega 公司,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成, pEGFP-N1-HBx 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建;正常人肝细胞 L02 细胞和肝癌细胞系 Huh7、Bel-7404、Hep3B、QSG-7701 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 稳定表达 HBx 的 Bel-7404 细胞系的建立与鉴定 将 BEL-7404 细胞接种于 24 孔板中。在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中生长至 60% ~ 75% 融合时,按照试剂说明书将 pEGFP-N1-HBx 和 pEGFP-N1 质粒用脂质体转染 BEL-7404 细胞。转染 24 h 后,将细胞消化,1 传 24 分布于 24 孔板中。用含 700 mg/L G418 的培养液筛选 14 d,得到单克隆,改用含 350 mg/L G418 的培养液维持至传代,备份。得到的细胞系命名为 Bel-7404/HBx 细胞系

和 Bel-7404/pEGFP-N1 细胞系。并通过 RT-PCR 和 Western Blot 对该细胞系进行鉴定。RT-PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 45 s, 30 次循环, 72 ℃ 延伸 10 min;重复 3 次。所用引物见表 1。

1.3 Real-time PCR 技术检测细胞中 EpCAM 和 CD13 mRNA 的表达 收集长满瓶的 Bel-7404/pEGFP-N1 细胞和 Bel-7404/HBx 细胞,提取细胞总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 的浓度和纯度,取 2 μ g 的 mRNA 逆转录为 cDNA,每组 cDNA 均以基因引物加荧光染料复合物 sybrGreen Mix (2 \times) 进行定量 PCR 反应,每个反应做 3 个复孔。总反应体系为 20 μ L: sybrGreen Mix 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 10 μ mol/L 上游引物和 10 μ mol/L 下游引物各 0.6 μ L, ddH₂O 6.8 μ L。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 15 s、60 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s (40 次循环)。反应完成后在 ABI 7 000 软件系统中调整基线和阈值,读出各反应孔 Ct 值。Ct 值代表基因的起始拷贝数,可根据 Ct 值比较基因的表达量。基因表达水平差异的比较:变化倍率 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}) / (Ct_{\text{阴性对照}} - Ct_{\text{内参基因}})$ ^[8]。所用引物见表 1。

1.4 Western blot 检测 Bel-7404 细胞中 EpCAM 和 CD13 蛋白的表达 收获长满瓶的 L02、Huh7、Bel-7404、Hep3B、QSG-7701、Bel-7404/pEGFP-N1 和 Bel-7404/HBx 细胞,用三去污裂解液提取细胞总蛋白,所得总蛋白经 10%、15% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳转移至 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入鼠抗人 HBx 单克隆抗体 (17 kDa) 1:250 稀释;鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体 (40 kDa) 1:200 稀释;兔抗人 CD13 单克隆抗体 (110 kDa) 1:200 稀释;鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (42 kDa) 1:200 稀释,4 ℃ 孵育过夜。洗膜 3 次,加入 HRP 标记的兔抗鼠二抗、羊抗兔二抗,浓度 1:2 000, 37 ℃ 孵育 1 h,洗脱二抗,用化学发光法 (ECL) 显色, X 线片曝光。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间的两两比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列
Tab. 1 Primer sequences for PCR

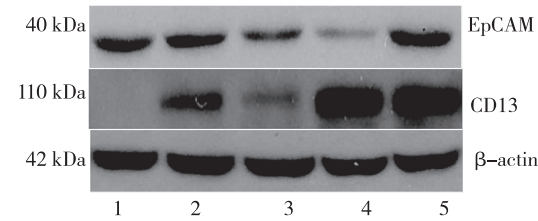
基因	引物	GenBank 号	产物大小 (bp)
HBx	5'-TCCTTTGTTTACGTCCCGTC-3' 5'-TGCCTACAGCCTCCTAATAC-3'	KC510653. 1	373
EpCAM	5'-TAATCGTCAATGCCAGTGACTTC-3' 5'-AGCCATTCAATTCTGCCTTCAT-3'	NM_002354. 2	101
CD13	5'-GCCACCTCTACCATCATCAGC-3' 5'-GAAGGAGAACGAGCCACCAC-3'	M22324. 1	120
β-actin	5'-CTATCCCTGTACGCCTCTG-3' 5'-ATGTCACGCACGATTTCC-3'	XM_006715764. 1	218
β-actin	5'-AGTTGCGTTACACCCTTTCTTGAC-3' 5'-GCTCGCTCCAACCGACTGC-3'	XM_006715764. 1	171

2 结果

2.1 各肝癌细胞系中 EpCAM 和 CD13 表达 用 Western blot 检测各肝癌细胞系中肝癌干细胞标记物 EpCAM 和 CD13 表达,EpCAM 在 Hep3B 细胞中表达最低, QSG-7701 细胞中表达最高; CD13 在 LO2 细胞中没有表达, 而 Huh7、Bel-7404、Hep3B、QSG-7701 细胞中均有表达, Bel-7404 细胞中表达最低, Hep3B 细胞中表达最高, 见图 1。

2.2 稳定表达 HBx 的 Bel-7404 系的鉴定 通过 PCR 和 Western blot 可以检测到 Bel-7404/HBx 中有 HBx mRNA(图 2A) 和蛋白(图 2B) 的表达, 对照

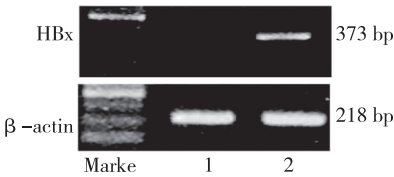
组细胞中未见表达。



1. LO2 细胞, 2. Huh7 细胞, 3. Bel-7404 细胞, 4. Hep3B 细胞, 5. QSG-7701 细胞

图 1 各肝癌细胞系中肝癌干细胞标记物 EpCAM 和 CD13 表达 (Western blot)

Fig. 1 The expression of liver cancer stem cell markers EpCAM and CD13 protein in each liver cancer cell line



1. Bel-7404/pEGFP-N1 细胞, 2. Bel-7404/HBx 细胞

图 2 Bel-7404/pEGFP-N1、Bel-7404/HBx 细胞中 HBx mRNA 和蛋白表达 (Western blot)

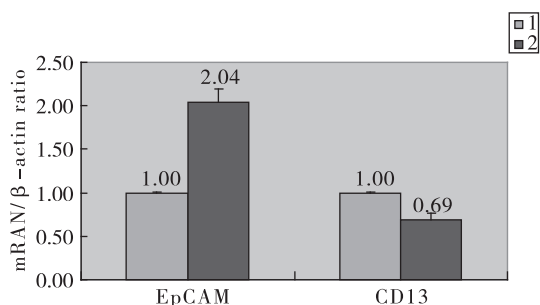
Fig. 2 The expression of HBx mRNA and protein in Bel-7404/pEGFP - N1 and Bel-7404/HBx cells

2.3 转染前后 Bel-7404 中 EpCAM、CD13 mRNA 表达 转染 HBx 基因后 EpCAM 的 mRNA 表达水平为对照组的 (2.04 ± 0.16) 倍 ($P < 0.05$), 而 CD13 的 mRNA 表达水平为对照组的 $(69 \pm 8)\%$ ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 转染前后 Bel-7404 细胞中 EpCAM、CD13 蛋白的表达 转染 HBx 基因后 EpCAM 的蛋白表达水平为对照组的 (2.03 ± 0.25) 倍 ($P < 0.05$), 而 CD13 蛋白表达水平为对照组的 $(55 \pm 7)\%$ ($P < 0.05$), 见图 4。

3 讨论

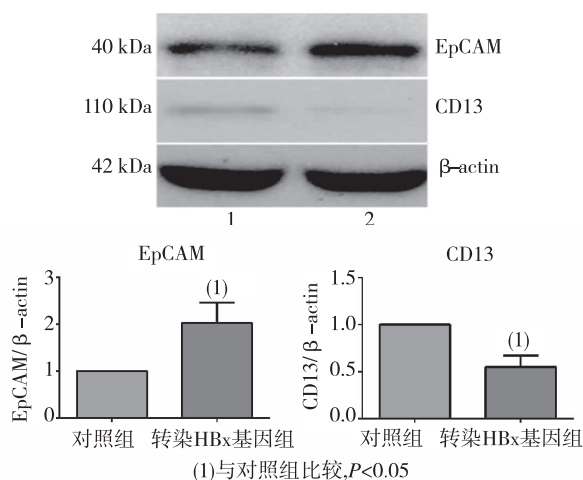
EpCAM 又称为 CD326, 是一种细胞黏附分子, 表达于各种人类癌症的肿瘤启动细胞, 在肝干细胞、胆管上皮细胞、肝脏恶变前组织和肝癌组织中高表达, 而在正常成人肝脏组织中不表达, Kimura 等^[9]发现肝癌 EpCAM + 亚群具有更强的克隆形成率, 发现最少 100 个 EpCAM + 细胞就能形成肿瘤, 而 EpCAM - 细胞则不能成瘤。最近的一项前瞻性



注:1. Bel-7404/pEGFP-N1 细胞,2. Bel-7404/HBx 细胞

图3 转染前后 Bel-7404 细胞组中 EpCAM、CD13 mRNA 的表达

Fig.3 mRNA levels of EpCAM and CD13 gene in Bel-7404 cells before and after transfection



注:1. Bel-7404/pEGFP-N1 细胞,2. Bel-7404/HBx 细胞

图4 转染前后 Bel-7404 细胞中 EpCAM、CD13 蛋白的表达 (Western blot)

Fig.4 Protein levels of EpCAM and CD13 gene in Be-7404 cells before and after transfection

地研究显示,7.5 mL 肝癌患者血液中 EpCAM + 的循环肿瘤细胞 (CTCs) ≥ 2 的患者较 (CTCs) < 2 的患者更早出现肿瘤复发^[10]。CSCs 在肿瘤内多处于“休眠”状态,位于细胞周期中的 G_0 期,这些细胞对放疗和化疗均不敏感,而 CD13 被认为是这种休眠或半静止期的肝癌干细胞的一种标志物。CD13(+) 细胞在细胞周期中主要存在于 G_1/G_0 期;另外,CD13(+) 细胞还具有耐药性,CD13(+) 细胞对阿霉素和 5-FU 具有明显的耐药性^[11]。

本试验在蛋白水平上分别检测了正常肝细胞系和肝癌细胞系中肝癌干细胞标记物 EpCAM 和 CD13 的表达,发现 EpCAM 在正常肝细胞及所检测的肝癌细胞系中均有表达,强弱不等,Hep3B 细

胞中表达最低, QSG-7701 细胞中表达最高;而 CD13 在正常肝细胞中没有表达,肝癌细胞系中均有表达,Bel-7404 细胞中表达最低,Hep3B 细胞中表达最高。由此可见 EpCAM 和 CD13 虽均为肝癌干细胞标记物,但在不同细胞系中表达趋势不同,两者可能分别代表不同的肝癌干细胞亚群。

HBV 感染被公认为是肝细胞发生癌变的最主要的危险因素之一^[12],在 HBV 的编码产物中 HBx 被证明在病毒复制和诱导癌变方面起着重要作用。HBx 参与基因的调控,同肝炎、肝癌的发生、发展关系密切^[6-7,13]。肿瘤干细胞理论认为肿瘤的发生、发展都源于肿瘤干细胞^[14],那么 HBx 同肝癌干细胞的关系又是怎样的呢?

本研究结果显示 HBx 上调了 EpCAM 的表达,推测 HBx 可能促进了表达 EpCAM 的肝癌干细胞亚群的增殖或抑制了其分化使其“干性”得到了维持^[15]。但 HBx 下调 CD13 的表达,基于本实验和现有的文献报道尚不能较好的解释这一现象,有待进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. Nature, 1994(6464):645-648.
- [2] Tirino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization[J]. FASEB J, 2013 (1): 13-24.
- [3] Yamashita T, Wang XW. Cancer stem cells in the development of liver cancer [J]. J Clin Invest, 2013 (5): 1911-1918.
- [4] Song K, Wu J, Jiang C. Dysregulation of signaling pathways and putative biomarkers in liver cancer stem cells (Review)[J]. Oncology reports, 2013 (1):3-12.
- [5] Nagano H, Ishii H, Marubashi S, et al. Novel therapeutic target for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences, 2012 (6):600-605.
- [6] Andrisani OM. Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis [J]. Viruses, 2013 (3):858-872.
- [7] Liu LP, Liang HF, Chen XP, et al. The role of NF-kappaB in Hepatitis b virus X protein-mediated upregulation of VEGF and MMPs[J]. Cancer Invest, 2010 (5):443-451.

(下转第 314 页)

异性引物进行扩增未见扩增产物,这进一步证实采集的 6 条带绦虫为亚洲带绦虫。与此同时,本实验以幼猪为模型,用采集的虫种的虫卵对其进行感染,观察幼猪体内囊尾蚴寄生情况,对上述鉴定结果进行补充证明,结果发现感染幼猪的肝脏有囊尾蚴寄生,其他组织和肌肉内没有囊尾蚴寄生情况,这与文献的报道相符^[11-12]。这充分说明采集的 6 条带绦虫是亚洲带绦虫。证明云南大理白族自治州凤仪镇有亚洲带绦虫分布^[1]。这可能与白族居民多数喜食生猪肉、猪皮、生肝等有关,是引起绦虫病的重要原因。

4 参考文献

- [1] 陈同,赵光辉,宁长申,等. 我国囊虫病流行病学研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(5):18-20.
- [2] 张晨昊,杨毅梅. 云南西部三地带绦虫生物多态性分子遗传学标记的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2009(4):283-286.
- [3] 杨毅梅,李振,石武祥,等. 云南大理洱海环湖带绦虫流行病学调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2007(2):109-114.
- [4] Yamasaki H, Allan JC, Sato MO, et al. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR [J]. J Clin Microbiol, 2004 (2):548-553.
- [5] Chen PH, Kong DF, Li HZ, et al. Experimental Technology on Human Parasitology [M]. Beijing: Science Press, 1988:76-78.
- [6] 张莉莉,陶洪,张炳翔,等. 亚洲无钩绦虫感染者在云南首次发现[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999(2):95-96.
- [7] Jeon HK, Kim KH, Eom KS. Complete sequence of the mitochondrial genome of *Taenia saginata*: comparison with *solum* and *asiatica* [J]. Parasitol Int, 2007 (3):243-246.
- [8] Rodriguez-Hidalgo R, Geysen D, Benítez-Ortiz W, et al. Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and an improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment [J]. J Parasitol, 2002 (5):1007-1011.
- [9] Gonzalez LM, Montero E, Harrison LJS, et al. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR [J]. J Clin. Microbiol, 2000 (2):737-744.
- [10] Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, et al. Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* Taeniasis [J]. J Clin. Microbiol, 2008 (1):286-289.
- [11] Eom KS, Rim HJ. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp. N [J]. Korean J Parasitol, 1993(31):1-6.
- [12] Eom KS, Jeon HK, Kong Y. Identification of *Taenia asiatica* in China: Molecular, Morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate [J]. J Parasitol, 2002(88):758-764.
- (2014-02-20 收稿, 2014-04-18 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 周 凌
- (上接第 310 页)
- [8] Fang X, Dong W, Thornton C, et al. Benzo(a)pyrene induced glycine N-methyltransferase messenger RNA expression in *Fundulus heteroclitus* embryos [J]. Mar Environ Res, 2010(69 Suppl):S74-76.
- [9] Kimura O, Takahashi T, Ishii N, et al. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) + cell population in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Cancer Sci, 2010 (10):2145-2155.
- [10] Sun YF, Xu Y, Yang XR, et al. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Hepatology, 2013 (4):1458-68.
- [11] 陈莎莎, 赵雪珂, 程明亮, 等. 贵阳市原发性肝癌危险因素病例对照研究 [J]. 贵阳医学院学报, 2013 (1):1-4.
- [12] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. J Clin Invest, 2010 (9):3326-3339.
- [13] Yang SL, Pan XL, Xiong ZF, et al. The influence of hepatitis B virus X protein on the clock genes in liver cells and its significance [J]. Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2011 (8):468-471.
- [14] 王寒琪, 王晋星一, 陈林, 等. 不同迁移能力肝癌细胞中干细胞相关基因 Nanog、Sox2 和 Oct4 的表达 [J]. 贵阳医学院学报, 2013 (1):226-230.
- [15] Arzumanyan A, Friedman T, Ng IO, et al. Does the hepatitis B antigen HBx promote the appearance of liver cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2011 (10):3701-3708.
- (2014-02-25 收稿, 2014-04-05 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅