

## CD105/CD133 筛选鉴定 SMMC-7721 株 干细胞表面标志物的实验研究

吴立胜<sup>1</sup>, 鲁旭<sup>1</sup>, 耿小平<sup>2</sup>, 卢寅<sup>1</sup>, 张俊松<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察人肝癌细胞株 SMMC-7721 中膜抗原 CD133、CD105 的表达情况并对不同亚群的生物学性状进行体内实验研究。方法 以含 10% 胎牛血清的 DMEM 对 SMMC-7721 株细胞培养; 采用流式细胞仪方法分选检测 CD133、CD105 在 SMMC-7721 中表达情况并分选出 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 4 个亚群; CCK-8 和 Transwell 侵袭实验分别检测 4 个亚群和未分选细胞组的增殖及侵袭能力; 软琼脂克隆实验检测 5 组细胞成球能力; 裸鼠成瘤实验了解 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>、

CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 亚群和未分选组的成瘤能力。结果 流式细胞仪分选的 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 4 种细胞亚群的比例分别为 1.61%、0.01%、97.88% 和 0.50%。CD133<sup>+</sup> 亚群的增殖和成球能力较 CD133<sup>-</sup> 亚群及未分选细胞组强, 而 CD105<sup>+</sup> 亚群侵袭能力较 CD105<sup>-</sup> 亚群及未分选细胞组强。CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 组与 CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 组及未分选细胞组相比成瘤所需的时间短、所需细胞数少、成瘤的体积大。结论 CD133 在人肝癌细胞株 SMMC-7721 中的表达与其增殖成球能力有关, CD105 与其侵袭能力有关, CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 具有体内高度的成瘤能力。CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 亚群在人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 中具有肿瘤干细胞特性。

**关键词** CD133; CD105; 原发性肝癌; 干细胞

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0158-06

2014-11-04 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划(编号: 1301zc04065); 合肥市科技局[编号: 2013(26)]

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学第三附属医院(合肥市第一人民医院) 微创外科, 合肥 230061

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院肝脏外科, 合肥 230022

作者简介: 吴立胜, 男, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师;  
耿小平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xp-geng@163.net

肿瘤干细胞也称作肿瘤起始细胞, 目前尚无确切的定义, 一般认为是一种罕见的具有自我更新、分

## The influence of ATRA and its derivative on the cell apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231

Zhou Jiali, Yan Yunwen, Jiang Qiaoling, et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University;

Dept of Key Laboratory, Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the influence of all-*trans* retinoic acid (ATRA) and its derivative 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl ester (ATPR) on the apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** MDA-MB-231 was treated with different concentrations of ATRA and ATPR for 48 h. Hoechst staining and flow cytometry were used to observe cell apoptosis. The mRNA level of apoptosis-related protein Caspase-3 was analyzed by RT-PCR. Western blot was performed to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** Compared with ATRA, the same concentrations of ATPR promoted the apoptosis of MDA-MB-231 more obviously ( $P < 0.05$ ), and the effect was dose-dependent. RT-PCR showed ATPR significantly raised the mRNA level of Caspase-3 ( $P < 0.05$ ). Western blot displayed that ATPR decreased the expression of anti-apoptotic protein such as Bcl-2, NF- $\kappa$ B, survivin ( $P < 0.05$ ) and increased the expression of pro-apoptotic protein Bax, Grim-19, Caspase-3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Contrasted to ATRA, ATPR is able to promote the cell apoptosis of MDA-MB-231 more markedly.

**Key words** breast cancer; MDA-MB-231; ATPR; apoptosis

化多能性、肿瘤起始和对放化疗抵抗等特性的肿瘤细胞亚群。随着肿瘤干细胞学说的提出和深入研究,原发性肝癌肿瘤干细胞的存在也得到了越来越多的证实<sup>[1-4]</sup>,但目前发现的不同类型表面标志物是否能够真正代表具有相应的肿瘤生物学特性尚不清楚,如何判断和检测人肝癌干细胞表面标志物仍处于探讨研究状态。该研究旨在通过体内外实验对经流式细胞仪分选后的原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 不同亚群进行分析研究,了解 CD133 联合 CD105 表达在人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 中的肿瘤干细胞特性情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验细胞株和实验动物** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 由安徽医科大学药理教研室惠赠; SPF 级雄性免疫缺陷裸小鼠(BALB/c 裸鼠) 4 周龄, 18~20 g, 购自上海市斯莱克实验动物有限公司。

**1.1.2 主要试剂与仪器** CD133/(AC133)-PE 抗体(德国 Miltenyi 公司); APC Mouse Anti-Human CD105、Matrigel 胶、流式细胞分选仪(美国 BD 公司); 细胞培养瓶、Transwell 小室(美国 Corning 公司); DMEM 高糖培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司); CCK-8 细胞增殖试剂盒(中国贝博公司); 低温冰箱(-80 °C、-20 °C)、4 °C 冰箱(中国美菱公司); 超净台(中国苏州净化公司); 酶标仪、恒温水浴箱(美国 Thermo 公司); 离心机(美国 CDK 公司); 显微镜(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及传代** 用 DMEM 高糖培养基对肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞进行培养, 培养基内加入 10% 胎牛血清、含浓度为 100 U/L 的青霉素、100 mg/ml 的链霉素和 2 mmol/L 的谷氨酰胺, 细胞培养瓶置入 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的恒温(37 °C) 培养箱, 细胞换液 2 d 1 次, 同时观察细胞生长情况, 待细胞长满培养瓶底面积约 80%~90% 时则需要细胞传代, 一般需要 4~5 d。

**1.2.2 表型分析及流式细胞术分选** 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞用胰蛋白酶消化 1.5 min, PBS 液洗涤后制成单细胞悬液并精确计数, 调整细胞密度至  $5 \times 10^6$  个/ml。取 4 只流式管, 分别标记为 A、B、C、D, 其中 A、B 和 C 管分别加入 100  $\mu$ l 制备好的单细胞悬液, D 管加入 1 ml 单细胞悬液, 再分别向 A 管中加入 5  $\mu$ l 抗 CD105 的抗体, B 管中加入 5  $\mu$ l 抗

CD133 的抗体, C 管中加入 25  $\mu$ l 抗 CD105 抗体和 50  $\mu$ l 抗 CD133 的 2 种抗体, D 管中则不加任何抗体; 置入培养箱中孵育 15 min; 按 D、A、B、C 的顺次上流式细胞分选仪, 分析人肝癌细胞株 SMMC-7721 单细胞悬液中的 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup> 和 CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 各细胞亚群的比例情况。

**1.2.3 体外增殖能力检测** 将已调整好细胞密度  $1 \times 10^3$  个/ml 的分选后人肝癌细胞株 SMMC-7721 的亚群细胞按 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 和未分选细胞顺序标识为 5 组, 再分别将各组细胞以 200  $\mu$ l/孔接种至 96 孔板中, 其中每组均设置 3 个平行孔, 共接种 5 板; 接种完毕的 96 孔培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的恒温培养箱中培养, 于每日上午约 10 点取 1 板避光条件下加入 20  $\mu$ l CCK-8 试剂, 培养箱孵育 1 h 后酶标仪在 450 nm 波长处测各亚群细胞的光密度(optical density, OD) 值。

**1.2.4 克隆生长能力检测** 取 1.2% 低熔点琼脂糖 10 ml 与等体积的 2  $\times$  DMEM 充分混匀, 以混合液 1 ml/孔铺至 24 孔板底层(冰上操作) 制备底层琼脂胶并冷凝成胶冻状; 调整细胞密度, 用 2  $\times$  DMEM 培养基对经流式细胞术分选后培养的 SMMC-7721 细胞 4 种亚群和未经流式分选的细胞进行计数调整, 使各组细胞密度为  $2 \times 10^2$  个/ml; 取 0.7% 低熔点琼脂糖与 2  $\times$  DMEM 等比例混合液 1 ml 铺至 24 孔板底层(在冰上操作) 制备顶层琼脂胶并冷凝成胶冻状, 每组均设置 3 个平行实验孔; 置 24 孔板于培养箱中培养 14 d, 计算每组软琼脂凝胶中大于 50 个细胞的克隆数, 分别计算, 取得平均值及标准差。

**1.2.5 Transwell 小室侵袭实验** 按购买的 Transwell 小室说明书进行人工基底膜的制备。用无血清 DEME 培养基将已分选获得的各 SMMC-7721 亚群和未分选细胞制成单细胞悬液, 再计数调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  个/ml 浓度。在已制备好的上室各孔加入 100  $\mu$ l 细胞, 每组细胞设置 3 个平行孔(冰上操作), 下室加入 600  $\mu$ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 将培养板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 24 h 以上后取出上室, 吸尽上室内的培养基, 用棉签擦去聚碳酸酯膜上表面的细胞, 然后将小室置于 2% 多聚甲醛中固定 15 min, 再用苏木精-伊红染液染色 2 min, PBS 洗涤后随机选择 5 个视野, 于 200 倍光镜下计数穿膜细胞数, 计算均值及标准差。每组试验重复 3 次。

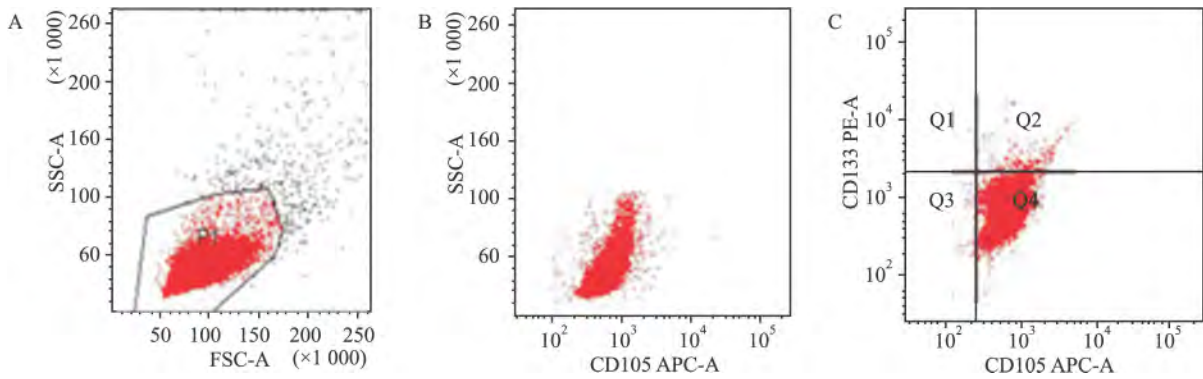


图1 人肝癌细胞株 SMMC-7721 中 CD105、CD133 的分布情况

A: 抗 CD133<sup>+</sup> PE 抗体单标; B: 抗 CD105<sup>+</sup> APC 抗体单标; C: 抗 CD133<sup>+</sup> PE 抗体和抗 CD105<sup>+</sup> APC 抗体双标

**1.2.6 裸鼠皮下接种移植瘤** 雄性免疫缺陷裸小鼠 18 只 (BALB/c 裸鼠) 在 SPF 级动物实验室经过 2 个阶段 1 周的饲养, 过度到无特殊病原体的饲养标准。按随机数字表然后将 18 只裸鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 选取将经过流式细胞仪分选得到 CD105<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>、CD105<sup>-</sup>/CD133<sup>-</sup> 亚群细胞和未分选细胞 3 组细胞重悬于无血清的 DMEM 中, 调整各组细胞悬液浓度为目标浓度后再接种到裸鼠背部皮下。每只裸鼠注入 0.2 ml, 继续饲养, 从接种时间算起, 每 2 周观察和测量每只裸鼠的移植瘤的情况, 记录有无移植瘤和移植瘤的体积大小; 对于接种约 1 个月没有明显肿瘤形成的小鼠, 再接种较高浓度的细胞悬液至肿瘤形成。典型的成瘤实验结果拍照纪录。所有的成瘤实验于接种 3 个月后终止, 将 18 只 BALB/c 裸鼠按颈椎脱臼法处死, 手术完整剥离裸鼠移植瘤, 游标卡尺逐个测量移植瘤的长径 (a)、短径 (b), 计算移植瘤体积。移植瘤体积 (mm<sup>3</sup>) = (a × b<sup>2</sup>) ÷ 2。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。细胞克隆能力、生长能力、侵袭能力的比较采用单因素方差分析方法, 组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 体内实验移植瘤体积比较采用配对样本 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 CD133、CD105 在 SMMC-7721 细胞株中流式细胞仪分选** 流式细胞仪表型测定检测显示人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞 CD105<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>、CD105<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup>、CD105<sup>-</sup>/CD133<sup>-</sup> 亚群的比例分别为 1.61%、0.01%、97.88% 和 0.50%。见图 1。单独以 CD133<sup>+</sup> 标识肝癌 SMMC-7721 细胞的比

例为 1.62%, 而 CD105<sup>+</sup> 的流式分选结果为 99.49%。

**2.2 人肝癌细胞株 SMMC-7721 各亚群及未分选细胞的增殖能力检测** 采用 CCK-8 检测分选获得的 4 种 SMMC-7721 细胞亚群及未分选细胞。结果显示, 在细胞接种于 96 孔板后的第一个 24 h, 各组细胞的数目 (以 OD<sub>450</sub> 表示) 的差异无统计学意义 (*P* = 0.059); 而 48 h 以后各组细胞的数量差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。此外, 通过分析可知 CD133<sup>+</sup> 细胞亚群 (包括 CD105<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> 和 CD105<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>) 的数量多于 CD133<sup>-</sup> 的细胞亚群及未分选细胞; 而两种 CD133<sup>+</sup> 亚群及两种 CD133<sup>-</sup> 亚群之间细胞数量的差异无统计学意义。见图 2。

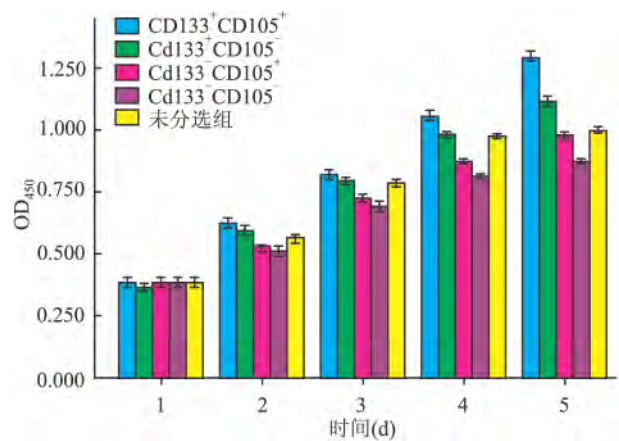


图2 连续 5 d 各组细胞之间的 OD 值比较

**2.3 软琼脂克隆培养实验** 软琼脂克隆培养 14 d 后, 计数 4 种细胞亚群及未分选细胞的克隆数分别为 (50.3 ± 7.4)、(35.0 ± 3.5)、(25.3 ± 1.5)、(11.3

$\pm 2.1$ ) 和  $(18.0 \pm 2.6)$ , 各组间克隆数的差异有统计学意义 ( $F = 3\ 938.213, P < 0.05$ )。其中,  $CD133^+/CD105^+$  与  $CD133^+/CD105^-$  形成的克隆数之间差异无统计学意义 ( $P = 0.06$ ),  $CD133^-/CD105^+$  和  $CD133^-/CD105^-$  之间差异无统计学意义 ( $P = 0.315$ )。见图 3。

**2.4 Transwell 小室侵袭实验** Transwell 小室在常规条件下培养 24 h, 固定、染色聚碳酸酯膜下表面的细胞。计数  $CD133^+/CD105^+$ 、 $CD133^-/CD105^+$ 、未分选细胞、 $CD133^+/CD105^-$  和  $CD105^-/CD133^-$  细胞组的跨膜细胞数分别为  $(109.3 \pm 1.15)$ 、 $(96.7 \pm 3.79)$ 、 $(80.0 \pm 1.00)$ 、 $(33.3 \pm 1.53)$ 、 $(28.3 \pm 1.15)$ , 各组间细胞数量差异有统计学意义 ( $F = 1\ 002.852, P = 0.029$ )。进一步分层分析, 两组  $CD105^+$  细胞亚群之间的跨膜细胞数量差异有统计学意义 ( $P = 0.045$ ); 而两组  $CD105^-$  的细胞亚群之间差异无统计学意义 ( $P = 0.285$ )。见图 4。

## 2.5 动物实验

**2.5.1 观察裸鼠皮下移植瘤** 所有的成瘤实验于接种 3 个月后终止, 饲养及实验过程中无裸鼠死亡, 将 18 只 BALB/c 裸鼠按颈椎脱臼法处死, 手术完整剥离裸鼠皮下移植瘤。实验过程中观察到 1 000 个  $CD133^+/CD105^+$  细胞在第 1 个月就能在 2 只(本组共 6 只)裸鼠内产生肿瘤, 而注射同样细胞数的  $CD133^-/CD105^-$  亚群和未分选组则未能观察到肿瘤产生; 然后调整细胞数量至 3 000 个细胞数进行

各组注射, 结果提示,  $CD133^+/CD105^+$  亚群在第 3 个月 6 只均有肿瘤生成, 而未分选组则有 4 只有肿瘤生成,  $CD133^-/CD105^-$  亚群在第 3 个月仅 3 只有肿瘤生成。实验结果表明, 分选后的  $CD133^+/CD105^+$  亚群裸鼠的皮下移植瘤生长具有明显性, 而分选后的  $CD133^-/CD105^-$  亚群和未分选组裸鼠的皮下移植瘤生长明显缓慢。见图 5、6。

**2.5.2 测量裸鼠皮下移植瘤** 终止实验后, 手术完整剥除各组皮下移植瘤, 游标卡尺测量各组的长、短径并按公式计算出裸鼠移植瘤体积。结果显示  $CD133^+/CD105^+$  亚群裸鼠皮下移植瘤体积为  $(1.652 \pm 0.014) \text{ mm}^3$ ,  $CD133^-/CD105^-$  亚群裸鼠皮下移植瘤体积为  $(0.807 \pm 0.053) \text{ mm}^3$ , 未分选组裸鼠的皮下移植瘤体积为  $(0.831 \pm 0.069) \text{ mm}^3$ ;  $CD133^+/CD105^+$  亚群和  $CD133^-/CD105^-$  亚群及未分选组裸鼠的皮下移植瘤体积比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 而  $CD133^-/CD105^-$  亚群与未分选组裸鼠的皮下移植瘤体积比较差异无统计学意义。

## 3 讨论

近年来肿瘤干细胞学说的研究不断深入, 但仍然缺乏对肿瘤干细胞精确分子标志物的了解。迄今为止, 虽已有多种假定肿瘤干细胞相关标志物被鉴定, 但相关标志物也并非特异性表达在大多数相应的肿瘤细胞中<sup>[5]</sup>; 原发性肝癌的肿瘤干细胞表面标志物的研究也处于探讨状态。过去几年间,  $CD133$

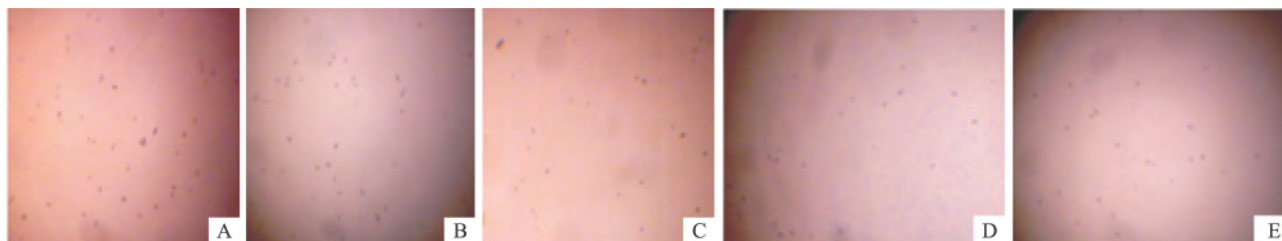


图 3 各组细胞克隆形成 GIMSA  $\times 200$

A:  $CD133^+/CD105^+$ ; B:  $CD133^-/CD105^+$ ; C: 未分选细胞; D:  $CD133^+/CD105^-$ ; E:  $CD133^-/CD105^-$



图 4 镜下各组细胞 Transwell HE  $\times 200$

A:  $CD133^+/CD105^+$ ; B:  $CD133^-/CD105^+$ ; C: 未分选细胞; D:  $CD133^+/CD105^-$ ; E:  $CD133^-/CD105^-$



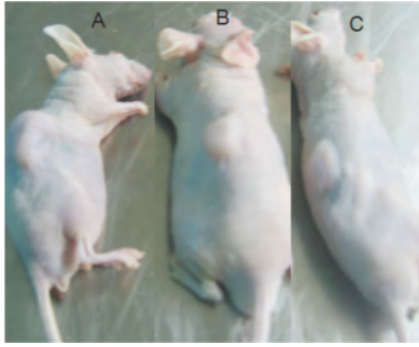


图5 成瘤后的裸鼠

A: CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>; B: CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>; C: 未分选组

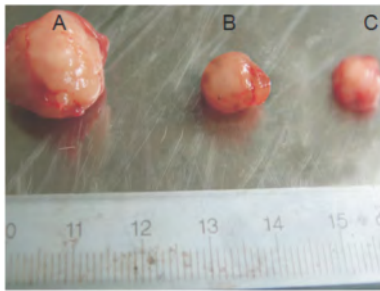


图6 移植瘤体积

A: CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>; B: CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup>; C: 未分选组

作为原发性肝癌表面标志物被广泛关注,但 CD133 不能作为原发性肝癌的表面标志物的特异性标记<sup>[6]</sup>。目前对于肿瘤干细胞标志物的研究多集中于膜表面抗原的联合检测,如检测急性髓细胞白血病的 CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup><sup>[7]</sup>、检测胰腺癌的 ESA<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup><sup>[8]</sup>。在此实验中也采用膜抗原的联合检测方法。研究<sup>[9-10]</sup>显示 CD105 更适合作为原发性肝癌中血管生成的特殊标志物。前期的体外实验研究<sup>[11]</sup>探讨了 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 在 HepG2 细胞株中的肿瘤干细胞特性。有学者认为 HepG2 细胞株来自于肝母细胞瘤,在 HepG2 细胞株的体外实验结果并不能完整验证 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 细胞亚群在肝癌中的肿瘤干细胞特性,SMMC-7721 肝癌细胞株有贴壁性强,且容易形成体内实验转移瘤等特点,因此选择 SMMC-7721 肝癌细胞株进行相关实验。

流式细胞术分选结果表明 SMMC-7721 细胞膜表面 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 的比例为 1.61%。生长曲线显示 CD133<sup>+</sup> 细胞亚群的生长速度明显快于 CD133<sup>-</sup> 细胞亚群及未分选细胞,CCK-8 增殖试验结果显示 CD133<sup>+</sup> 细胞亚群的 OD<sub>450</sub> 值为 CD133<sup>-</sup> 细胞亚群的 1.5 倍。通过软琼脂克隆培养试验,2 周后

CD133<sup>+</sup> 细胞亚群的克隆数量为 CD133<sup>-</sup> 细胞亚群 4.55 倍,同样证明了 CD133<sup>+</sup> 细胞亚群的生长速度快于 CD133<sup>-</sup> 细胞亚群。在细胞增殖实验中细胞膜抗原 CD105 对人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖无明显影响,而细胞膜抗原 CD133 主要诱发或主导细胞增殖加强。克隆实验表明人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 的成瘤活性与膜抗原 CD133 密切相关。Transwell 小室侵袭实验显示 CD105<sup>+</sup> 细胞亚群穿膜细胞数是 CD105<sup>-</sup> 细胞亚群 2 倍余;进一步分层分析可知,两组 CD105<sup>-</sup> 的细胞亚群之间的跨膜细胞数量差异无统计学意义,而两组 CD105<sup>+</sup> 细胞亚群之间则差异有统计学意义;提示人原发性肝癌细胞株 SMMC-7721 侵袭能力与 CD105 密切相关,而 CD133 对其侵袭能力的作用影响有限。

验证肿瘤干细胞最具有说服力的实验是其体内的成瘤能力<sup>[12]</sup>,CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 细胞亚群在 1 000 个细胞数和第 1 个月即能在裸鼠身上能明显成瘤,较 CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 和未分选组速度明显增快,CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 亚群组的体内成瘤率高,成瘤体积大,所需细胞数少。实验结果表明,分选后的 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 亚群裸鼠的皮下移植瘤生长具有明显性,而分选后 CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> 亚群和未分选组裸鼠的皮下移植瘤生长明显缓慢。成瘤实验的结果证明 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 亚群组的体内成瘤能力明显增强。

综上所述,本研究通过体外的增殖能力、侵袭能力实验和体内裸鼠成瘤实验,证实 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 细胞亚群的增殖能力、侵袭能力、自我更新能力及致瘤能力均强于其他亚群,说明 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 细胞亚群含有更多干细胞样特性的肿瘤细胞,即在 SMMC-7721 细胞株中,CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 更能够精确鉴定肝癌干细胞特性。综合前期在人肝细胞株 HepG2 中的研究结果,本研究提示 CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> 亚群更能代表人肝癌肿瘤生物学特性的原始细胞。

### 参考文献

[1] Rountree C B, Senadheera S, Mato J M, et al. Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice [J]. Hepatology 2008, 47(4): 1288-97.  
 [2] Zhang F, Chen X P, Zhang W, et al. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence [J]. Histopathology 2008, 52(2): 224-32.

- [3] 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): 820-4.
- [4] Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells [J]. *J Clin Invest* 2010, 120(9): 3326-39.
- [5] Magee J A, Piskounova E, Morrison S J. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty [J]. *Cancer Cell* 2012, 21(3): 283-96.
- [6] Zeng Z, Ren J, O'Neil M, et al. Impact of stem cell marker expression on recurrence of TACE-treated hepatocellular carcinoma post liver transplantation [J]. *BMC Cancer* 2012, 12: 584.
- [7] Du W, Li X E, Sippl J, et al. Overexpression of IL-3Ralpha on CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> stem cells defines leukemia-initiating cells in Fanconi anemia AML [J]. *Blood* 2011, 117(16): 4243-52.
- [8] Li C, Heidt D G, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells [J]. *Cancer Res* 2007, 67(3): 1030-7.
- [9] Yagmur E, Rizk M, Stanzel S, et al. Elevation of endoglin (CD105) concentrations in serum of patients with liver cirrhosis and carcinoma [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007, 19(9): 755-61.
- [10] Benetti A, Berenzi A, Gambarotti M, et al. Transforming growth factor-beta 1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium [J]. *Cancer Res* 2008, 68(20): 8626-34.
- [11] 张俊松, 汪宏, 吴立胜. CD105、CD133 在人肝癌细胞株 HepG-2 的表达情况及生物学性状的体外研究 [J]. *肝胆外科杂志* 2013, 21(2): 44-6.
- [12] Kelly P N, Dakic A, Adams J M, et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells [J]. *Science* 2007, 317(5836): 337.

## CD105/CD133 as cell surface markers for screening and identification of stem cell in SMMC-7721

Wu Lisheng<sup>1</sup>, Lu Xu<sup>1</sup>, Geng Xiaoping<sup>2</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Invasive Surgery, The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230061;

<sup>2</sup>Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** The objective of this research is to compare the expression of CD105 and CD133 in membrane of human HCC cell line SMMC-7721, different biological characters among the subpopulations *in vitro* and *in vivo*. **Methods** SMMC-7721 cell line was cultured in DMEM containing 10% FBS. Flow cytometry was used to detect CD105, CD133 expression in SMMC-7721 cell *in vitro*. Four cell sub-populations CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> were sorted by flow cytometry. Cell proliferation of these four sub-populations was detected by CCK-8 assay. Sphere formation ability of these four sub-populations was examined by soft agar test. Invasion ability of these four sub-populations was examined by Transwell cell invasion test. *In vivo* tumorigenicity assay was also performed on these four sub-populations using nude mice. **Results** The proportions of four sub-populations CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> were 1.61%, 0.01%, 97.88% and 0.50% sorted by flow cytometry, respectively. CD133<sup>+</sup> subsets cells grew more quickly than those of CD105<sup>+</sup> and unsorted cells. The numbers of colonies formed by CD133<sup>+</sup> subsets cells were more than those of CD105<sup>+</sup> and unsorted cells. Furthermore, the metastatic capacity of CD105<sup>+</sup> subset cells observed by Transwell assay was higher than that of the CD133<sup>+</sup> subsets cells and unsorted cells. *In vivo* tumor experiments showed CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> needed a shorter time and fewer cells, compared with unsorted group and CD105<sup>-</sup>CD133<sup>-</sup> groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Our study finds that human liver cancer cell line SMMC-7721 can be sorted into four sub-groups CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>-</sup>, CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup>/CD105<sup>-</sup> successfully by flow cytometry. It is found that CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> sub-group shows high proliferative potential, high capacity for self-renewal by proliferation assay, clone forming assay and *in vitro* invasion assay. *In vivo* tumor experiment proves CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> sub-group shows a higher degree of tumorigenicity. Therefore, CD133<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup> subset cells are a subpopulation with stem properties in SMMC-7721 cells.

**Key words** CD133; CD105; primary hepatocellular carcinoma; stem cell