

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.007

# 肝癌干细胞表面标志物 CK19 在化学诱癌过程中的差异表达

张珍妮,匡志鹏,杨帆,吴继宁

## Differential Expression of Stem Cell Marker CK19 in Process of Chemical Carcinogenesis of Liver Cancer

Zhang Zhenni, Kuang Zhipeng, Yang Fan, Wu Jining

Department of Experimental Research, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding Author: kuang Zhipeng, E-mail: kgzhou@163.com

**Abstract, Objective** To explore the differential expression of CK19 in the process of chemical carcinogenesis of liver cancer for C57BL/6J mice. **Methods** The experimental group was 50 male C57BL/6J mice which were induced primary liver cancer by chemical, and 50 normal male C57BL/6J mice were as the control group which was raised normally. The mice were killed every 4 weeks to collect the specimen and detect the changes of CK19 gene and protein by RT-PCR, FQ-RT-PCR and Western blot methods, at the same time, pathological changes were observed through HE Stain. **Results** The results showed that the experimental mice had obvious nodules after 16 weeks chemical induction, the size of the nodules was between 2mm and 25mm in diameter. The pathological changes showed well-differentiated hepatocellular carcinoma with the features of structure disorder, dysplasia, pathological mitotic and part of liver tissue cirrhosis. RT-PCR, FQ-RT-PCR and Western Blot showed that CK19 was not highly expressed in the liver tissue of the experimental group mice till after 16 weeks. The mRNA level of CK19 in HCC tissues of 4th, 8th, 12th, 16th and 20th week were separately  $(2.133 \pm 0.470)$ ,  $(2.395 \pm 0.472)$ ,  $(2.767 \pm 0.729)$ ,  $(3.217 \pm 0.627)$ , and  $(14.095 \pm 5.812)$ , it was markedly higher than that of the corresponding control group at the same stage ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The liver cancer stem cell marker CK19 gene maybe involve in the occurrence and development of HCC, but the regulatory mechanism of CK19 in the process of chemical carcinogenesis is not quite clear and worth of further exploration.

**Key words:** Liver cancer; Stem cell; CK19; C57BL/6J mice

**摘要;目的** 检测 CK19 基因在化学诱发 C57BL/6J 小鼠肝癌过程中各阶段的表达差异。**方法** 对 50 只 C57BL/6J 雄性小鼠通过化学法诱发肝癌,以 50 只正常 C57BL/6J 雄性小鼠为对照组。观察诱癌小鼠的生长状况,每 4 周处死一批小鼠获取组织标本进行病理学、荧光实时定量 PCR(FQ-RT-PCR)法、Western blot 等检测 CK19 基因及蛋白表达差异。**结果** 在化学诱癌第 16 周后处死的小鼠出现明显的灰白色小结节,直径为 2 mm 大小,第 20 周时肝癌结节直径在 5 ~ 25 mm 之间,呈多发性。早期病理改变主要是肝细胞排列结构轻度紊乱,细胞轻度的异型增生。病理切片显示为中、高分化的肝癌细胞,可见瘤巨细胞和病理性核分裂,间质肝纤维组织增生,提示有肝硬化改变;RT-PCR, Western blot 结果显示,实验组小鼠在化学诱癌第 16 周开始 CK19-mRNA 表达升高,第 20 周时明显增强;荧光定量结果显示,CK19 mRNA 在化学诱癌第 4、8、12、16 及 20 周的小鼠肝癌组织中的表达水平分别为  $(2.133 \pm 0.470)$ 、 $(2.395 \pm 0.472)$ 、 $(2.767 \pm 0.729)$ 、 $(3.217 \pm 0.627)$  和  $(14.095 \pm 5.812)$ ,与同期对照组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 肝癌干细胞标志物 CK19 参与了肝癌的发生发展,其表达量随诱癌时间的延长而逐渐增加,但其对肝癌发生发展的确切调控机制有待深入研究。

**关键词:** 肝癌; 干细胞; CK19; C57BL/6J 小鼠

中图分类号:R730.3; R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)10-1188-05

收稿日期:2012-03-10;修回日期:2012-07-20

作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部

通信作者:匡志鹏, E-mail:kgzhou@163.com

作者简介:张珍妮(1982-),女,硕士,住院医师,主要从事肿瘤免疫与基因治疗研究

## 0 引言

尽管肝癌的治疗手段越来越先进,治愈率似乎也在不断提高,但根据流行病学分析,其发病率仍然呈明显上升趋势。因此肝癌发生的分子机制仍然是

研究的焦点和难点。目前认为肝癌是一种干细胞性疾病,从肝癌组织分离鉴定出的小部分细胞具有明显的干细胞特征,并在肝癌细胞株中得到进一步证实,说明肝癌存在干细胞。有研究表明细胞角蛋白(cytokeratin 19, CK19)相关基因表达能够精确预示患者的生存和肿瘤复发,认为 CK19 是肝癌干细胞标志之一<sup>[1-2]</sup>。近年来有关 CK19 在 HCC 中的表达及其在 HCC 发生发展中的生物学行为作用备受关注<sup>[3]</sup>。因此本文通过建立小鼠肝癌动物模型来探讨 CK19 基因及蛋白在 HCC 发生的不同阶段中的表达差异,从而揭示其在肝癌发生过程中所起的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品,M-MuLV 反转录试剂盒为 MBI Fermentas 公司产品,Real Master Mix(SYBR Green)为北京天根公司产品。引物由上海生工生物有限公司合成。T-PER (tissue protein extraction reagent)蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒及快速、敏感的超级信号转导基板发光底物试剂盒均购自 Beyotime 公司;CK19 单克隆抗体购自 Giawazld 公司,β-actin 单克隆抗体购自 Kang Chen 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自杭州华安生物技术有限公司。

### 1.2 C57BL/6J 小鼠肝癌的诱导

二乙基亚硝胺(DEN)购自 Sigma 公司,四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )购自天津化学试剂研究所。乙醇和橄榄油购自北京化学试剂公司;C57BL/6J 雄性小鼠购自中科院上海实验动物中心,符合国标 GB14922-94 SPF 级质量标准。所有动物实验均按照上海实验动物中心管理委员会动物管理和使用的有关标准执行。实验组小鼠以 DEN 大剂量一次腹腔注射 100 mg/kg。3 天后开始用四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )和橄榄油(配制体积比 20:80)灌胃,0.05 ml/10 g,2 次/周。第 3 周 DEN 再灌胃 1 次,50 mg/kg,同时开始给予含有 9% 乙醇饮用水,第 4 周开始  $\text{CCl}_4$  加大剂量到 0.08 ml/10 g。同时喂以正常小鼠颗粒饲料。对照组小鼠仅以正常小鼠颗粒饲料喂养,并自由饮用灭菌普通水,观察小鼠的生长情况、精神食欲、体重等变化。诱癌开始后每隔 4 周处死 5 只小鼠,并同样方法处理同期对照组小鼠。

### 1.3 RT-PCR 检测 CK19 mRNA 的表达

提取肝组织的总 RNA,反转录为 cDNA;CK19 上游引物 5'-CCGCGGTGGAAGTTTAGTGG-3',下游引物 5'-GGTCCGGGTCCCTGCTTCT-3',预计产物长度为 189bp;β-actin 基因上游引物:5'-GGT-

GACGAGGCCAGAGCAAGAG-3',下游引物:5'-CCCGGCCAGCCAGGTCCAG-3',预计产物长度为 388bp。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,56.4℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环。PCR 产物行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,使用凝胶图像分析系统(英国 UVI FireReader 公司)进行吸光度扫描,观察电泳结果。

### 1.4 荧光实时定量 PCR 检测 CK19 mRNA 的表达

采用美国 MJR 公司全自动荧光定量 PCR 仪检测 CK19 mRNA 定量表达。反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 30 s,56.4℃ 30 s,72℃ 30 s,共 40 个循环,反应结束后,电脑自动分析荧光信号并将其转换 CT 值,并根据标准曲线得出拷贝数。通过制作标准曲线对实验进行质量控制,用内参基因 β-actin 对 mRNA 含量的变异进行校正。结果用双标准曲线法进行定量。

### 1.5 Western 印迹法检测 CK19 蛋白表达

用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,以 β-actin 为内参,12% SDS-PAGE 电泳,每泳道蛋白上样量为 10 μg。转膜、封闭后,一抗(β-actin 工作浓度 1:10 000,CK19 工作浓度 1:1 000)4℃ 培育过夜;TBST 洗膜,按快速、敏感的超级信号转导基板化学发光法试剂盒的说明书发光、压片。

### 1.6 病理学观察

获取的部分诱癌组肝癌组织和正常对照组肝癌组织及肝组织用 2.5% 中性多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,制成 5 μm 厚的连续切片,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜观察病理形态变化。

### 1.7 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  检验。结果以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

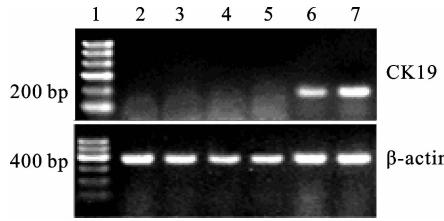
### 2.1 诱发小鼠肝癌的病理形态学改变

正常组小鼠肝脏肉眼无异常变化,色暗红,质地柔软,见图 1A,镜下可见肝小叶完整,肝细胞呈索状排列,细胞大小一致,无异型性,见图 1B;实验组诱癌第 12 周以前的小鼠肝脏组织,肉眼暗红色,质软,表面无明显的结节,镜下可见部分区域肝细胞轻度异型增生,肝小叶结构完整,间质有轻度淋巴细胞浸润,见图 1C。在化学诱癌第 16 周时病理改变主要是肝细胞排列结构轻度紊乱,细胞开始出现较明显的异型增生,见图 1D。在化学诱癌第 20 周处死的小鼠肝脏,可见肝脏表面出现大小不等灰白色小结节,直径约 5~25 mm 之间,见图 1E,镜下可见细胞

排列结构明显紊乱,染色质明显增粗,细胞核增大、核染色明显变深。细胞大小、形状各异,可见瘤巨细胞和病理性核分裂,见图 1F。

## 2.2 RT-PCR 定性检测 CK19 的表达情况

在诱癌的第 12 周以前,实验组及正常对照组肝组织中均未见 CK19 mRNA 表达;实验组在诱癌第 16 周时开始出现 CK19 基因的表达,至第 20 周时表达水平显著增高,见图 2。



1 is Mark; 2, 3, 4, 5 is respectively normal mice, induced cancer 4th, 8th, 12th week, there were no target gene expression; 6, 7 is respectively induced cancer 16th, 20th week, CK19 gene expressed (189 bp), expresseion levels were significantly in 20th week. The following figure shows  $\beta$ -actin(388 bp)

图 2 CK19 基因在不同诱癌阶段的表达电泳图

Figure 2 The electrophoresis figure of CK19 gene expression in different stage of carcinogenesis

## 2.3 实时定量 PCR 检测 CK19 在肝癌组织及正常肝组织中的表达

CK19 基因及内参  $\beta$ -actin 实时定量 PCR 标准曲线直线回归图及反应熔解曲线,见图 3。在诱癌

的第 4、8、12、16 及 20 周的 CK19 及相对应阶段的内参  $\beta$ -actin 标准曲线斜率分别为  $-0.3059$ 、 $-0.3138$ 、 $-0.3105$ 、 $-0.3136$ 、 $-0.3065$  和  $-0.3060$ 、 $-0.3175$ 、 $-0.3164$ 、 $-0.3065$ 、 $-0.3074$ ;相关系数分别为  $0.997$ 、 $0.992$ 、 $0.998$ 、 $0.999$ 、 $0.999$  和  $0.999$ 、 $0.998$ 、 $0.999$ 、 $0.999$ 、 $0.999$ 。通过双标准曲线法分析,诱癌过程中小鼠肝癌组织中 CK19 mRNA 的表达水平均高于正常小鼠肝组织,随着诱癌时间的延长,在第 16 周和第 20 周时,CK19 mRNA 的表达量显著增加,两者的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

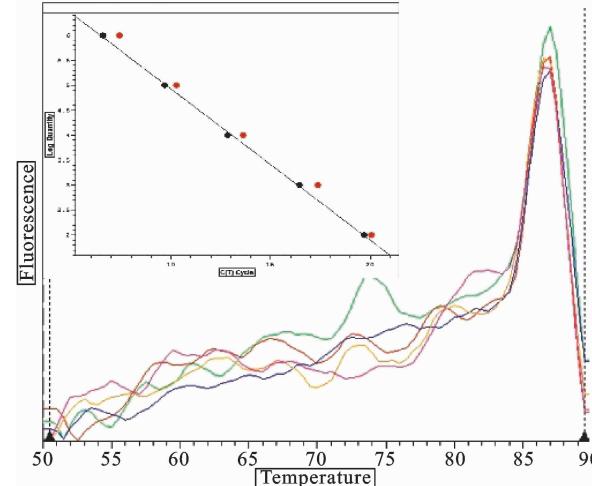
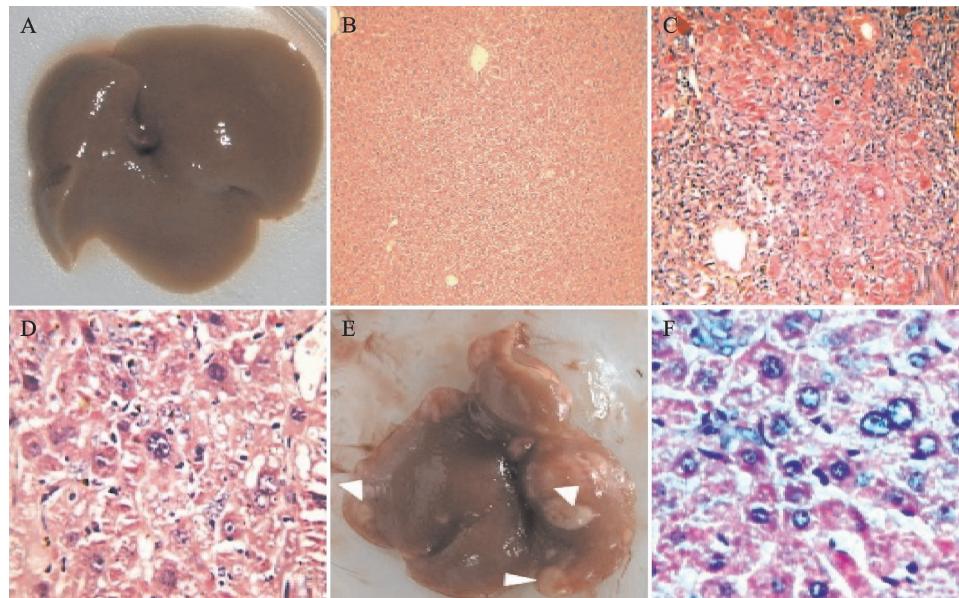


图 3 CK19 基因及内参  $\beta$ -actin 实时定量 PCR 标准曲线直线回归图及反应熔解曲线

Figure 3 CK19 gene and  $\beta$ -actin Real-time PCR standard curve linear regression diagram and reaction melting curve



A: normal liver tissue; B: normal liver tissue microscope(HE  $\times 100$ ); C: carcinogenesis in the 12th week microscope(HE  $\times 100$ ); D: carcinogenesis in the 16th week microscope(HE  $\times 400$ ); E: carcinogenesis in the 20th week; F: carcinogenesis in the 20th week microscope(HE  $\times 400$ )

图 1 不同诱癌阶段小鼠肝脏表面观和组织镜下观

Figure 1 The surface view and histopathology of mouse liver in different stage of carcinogenesis

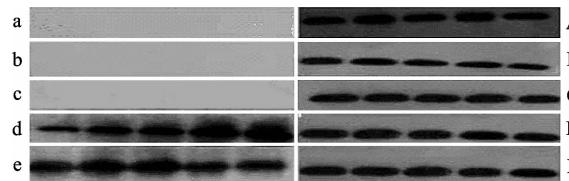
表 1 小鼠肝癌组织及正常组织中 CK19 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s, n=20$ )Table 1 CK19mRNA expression levels in mice liver cancer tissue and normal tissue( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

Groups	n	Cancer inducing time(weeks)				
		20	4	8	12	16
Experimental group	10	2.133 ± 0.470	2.395 ± 0.472	2.767 ± 0.729	3.217 ± 0.627	14.095 ± 5.812
Control group	10	0.872 ± 0.128	0.961 ± 0.185	1.688 ± 0.378	1.972 ± 0.437	1.489 ± 0.542
t		8.190	8.951	4.155	5.152	6.829
P		0.000	0.000	0.001	0.000	0.000

Note: comparison between experimental group and control group, the expression level of CK19 mRNA (including liver cancer tissue) in mice liver tissue was significantly higher than normal liver tissue of mice in the control group ( $P < 0.05$ )

## 2.4 Western 印迹法检测 CK19 的表达

正常对照组小鼠肝组织及诱癌第 4、8、12 周肝组织均未出现 CK19 蛋白的表达。但在诱癌第 16 周时开始出现 CK19 蛋白高表达, 第 20 周表达明显增强, 见图 4。



a, A: 4th week; b, B: 8th week; c, C: 12th week; d, D: 16th week; e, E 20th week; left: respectively, CK19 protein expression in carcinogenesis of the experimental group; right:  $\beta$ -actin protein expression in carcinogenesis of the experimental group

图 4 不同化学诱癌阶段中 CK19 蛋白表达情况

Figure 4 CK19 protein expression in different stage of chemical carcinogenesis

## 3 讨论

为了检测 CK19 肝癌干细胞标志物在化学诱癌过程中不同的诱癌阶段的表达差异, 我们通过定期处死小鼠, 通过病理学、免疫印迹和荧光定量 PCR 技术检测其定性和定量表达情况。我们既往曾成功地联合应用 DEN/CCl<sub>4</sub>/Ethanol 诱发 C57BL/6J 小鼠肝癌。但我们的研究发现, 单独使用 DEN 除了造成肝损伤诱发大鼠肝癌外, 还可造成胃肠道等多器官发生肿瘤, 因此考虑用多药联用诱发小鼠肝癌, 既能够在 20 周内诱发小鼠肝癌, 又能极大限度地减少毒副作用, 降低诱癌过程中小鼠的死亡率。既往诱癌成功率 78.89%, 且 83.10% 的肿瘤呈多灶性<sup>[4]</sup>, 本次实验诱癌成功率 100%, 均为多灶性, 无小鼠死亡。未见小鼠其他脏器发生肿瘤。肉眼观察发现, 对照组正常小鼠肝脏无异常变化, 色暗红, 质地柔软; 实验组小鼠在诱癌第 12 周以前的小鼠肝脏

组织, 肉眼暗红色, 质软, 表面无明显的结节, 镜下可见部分区域肝细胞轻度异型增生, 肝小叶结构完整, 间质有轻度淋巴细胞浸润; 在化学诱癌第 16 周处死的小鼠肝脏表面出现肝癌小结节, 直径约 2~5 mm 大小, 灰白色, 呈多发性。早期病理改变主要是肝细胞排列结构轻度紊乱, 细胞明显的异型增生。第 20 周时肝癌结节直径在 5~25 mm 之间, 病理切片显示为中、高分化的肝癌细胞, 细胞排列结构明显紊乱, 染色质明显增粗, 细胞大小、形状各异, 可见瘤巨细胞和病理性核分裂, 胆管上皮细胞增生明显, 可见假胆管, 部分肝小叶结构改建, 间质肝纤维组织增生, 提示有肝硬化改变。CCl<sub>4</sub> 可造成动物肝损伤, 认为主要是与 CCl<sub>4</sub> 自身和其自由基代谢产物有关。CCl<sub>4</sub> 自身的溶酶作用可导致肝细胞损伤, 其主要物质自由基 CCl<sub>3</sub> 是造成肝损伤的主要机制。CCl<sub>4</sub> 还可激活肝星状细胞并导致胶原纤维沉积, 因而造成肝纤维化。长期给予乙醇也可造成肝损伤。

细胞角蛋白在人的上皮细胞系中分为 19 个亚型, 依等电点又可分为酸性的 I 型和中、碱性的 II 型。CK19 是最常见的角蛋白之一, 是酸性角蛋白中的一种, 属于 I 型, 它的抗原性由其含有的蛋白质多肽表达。CK19 相对分子质量为 40~56 kD, 是一种低分子量的角蛋白, 存在于正常上皮和各种上皮来源的肿瘤<sup>[5]</sup>。上皮细胞的恶性转化过程中, 细胞角蛋白结构往往得到保持。在肝脏 CK19 见于胆道分化过程中, 也是祖细胞表型的标志。因此角蛋白可作为一个肝癌干细胞的标志物<sup>[6-7]</sup>。应用 RT-PCR, 荧光定量 PCR 法和 Western blot 免疫印迹法检测均发现, 实验组诱癌小鼠肝组织在 12 周以前未见 CK19 基因和蛋白的表达, 在 16 周以后, 随着时间的延长表达逐渐增强, 而在正常肝脏组织中未见明显表达, 实行定量 PCR 定量检测表明, 在同期的实验组小鼠肝癌组织与对照组正常肝组织中 CK19 基因的表达差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示在

肝细胞癌变过程中,细胞表型发生了改变,CK19 参与了肝癌发生的始动过程,这也为探索肝细胞癌的细胞起源提供了线索。CK19 是一个 I 型中间丝蛋白,是已知最小的角蛋白,与所有其他角蛋白不同,它并没有一个指定的合作伙伴形成细丝,这意味着其表达的调控不同于其他角蛋白编码基因<sup>[8]</sup>。此外,在许多肿瘤研究中 CK19 已经被广泛地作为微转移和检测循环肿瘤细胞的一个标志<sup>[9]</sup>。肝癌也是极易发生转移的,很有可能与 CK19 有关联,Ding 等<sup>[10]</sup>研究也表明 CK19 的表达跟肝癌的转移有关。通常的化疗、放疗尽管杀灭了大量的肿瘤细胞,然而由于肿瘤干细胞的存在,导致肿瘤细胞迅速得以恢复,从而出现复发和转移。

本研究尽管说明肝癌干细胞表面标志物 CK19 与肝癌的发生发展有密切关系,但是其具体的调控机制还不清楚,以及与其他肿瘤干细胞标志物的共同调控作用机制也需要做进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 49(1): 318-29.
- [2] Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, et al. Cancer stem cells in

hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective[J]. Cancer Letters, 2009, 286(2): 145-53.

- [3] Bird TG, Lorenzini S, Forbes SJ. Activation of stem cells in hepatic diseases[J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(1): 283-300.
- [4] Kuang ZP, Xie YA, Yang F, et al. C57BL/6J mouse liver cancer animal model[J]. Zhongguo Pu Tong Wai Ke Za Zhi, 2007, 16(7): 657-60. [匡志鹏, 谢裕安, 杨帆, 等. C57BL/6J 小鼠肝癌动物模型的建立[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(7): 657-60.]
- [5] Omary MB, Ku NO, Toivola DM, et al. Kentins: guardians of the liver[J]. Hepatology, 2002, 35(2): 251-7.
- [6] Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms[J]. Histopathology, 2002, 40(5): 403-39.
- [7] Lane EB, Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis[J]. Semin Cancer Biol, 1990, 1(3): 165-79.
- [8] Stone MR, O'Neill A, Catino D, et al. Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(9): 4280-93.
- [9] Benoy IH, Elst H, Van der Auwera I, et al. Real-time RT-PCR correlates with immunocytochemistry for the detection of disseminated epithelial cells in bone marrow aspirates of patients with breast cancer[J]. Br J Cancer, 2004, 91(10): 1813-20.
- [10] Ding SJ, Li Y, Tan YX, et al. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(1): 73-81.

〔编辑:刘红武;校对:周永红〕

#### • 简讯 •

## 《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启事

《肿瘤防治研究》杂志创刊于 1973 年,是我国第一本独立的全国性肿瘤专业高级学术刊物。中华人民共和国卫生部主管,中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国 CA、CSA、Ulrich PD、波兰 IC、英国 CABI、Global Health、日本 JST 及国内所有大型数据库收录。

主要栏目有:专题论坛、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、研究简报、技术交流、论著摘要、综述、短篇个案、简讯等。它是我国肿瘤防治研究领域的一面镜子和窗口。

希望广大朋友们对一如既往地给予本刊以热忱的关注:将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展,订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤防治研究事业取得的进步。同时,编辑部将进一步加强自身的建设,努力提升自己的办刊能力,紧紧围绕内容为王、快速反应的要旨,竭尽全力打造精品期刊,以回报朋友们的支持与厚爱。

邮发代号:38-70; 国外代号:MO6482; 订价:15.00 元/册; 出版周期:月刊

中国标准连续出版物号:ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R

投稿网站:<http://www.zlfzyj.com> E-mail:zlfzyj@vip.163.com

电话/传真:0086-27-87670126

通信地址:武汉市武昌卓刀泉南路 116 号《肿瘤防治研究》编辑部 邮政编码:430079