

人乳腺癌细胞微球体生物学特性研究

范原铭¹,侯婧²,董宁¹,王强¹,顾敏^{3△}

(1. 重庆市长寿区人民医院普外科 401220; 2. 重庆市长寿区人民医院肿瘤科 401220;

3. 重庆市长寿区妇幼保健院外科 401220)

摘要:目的 研究人乳腺癌细胞微球体(MSs)的生物学特性,建立乳腺癌干细胞实验模型。方法 无血清悬浮培养人乳腺癌 MCF-7 细胞(MCF-7 组),并获取 MSs(MSs 组)。利用细胞划痕实验、transwell 实验及动物成瘤实验检测 MSs 在细胞迁移、侵袭性生长及体外成瘤等方面的生物学特性。结果 细胞划痕实验提示:MSs 组划痕带可在 48 h 后愈合,而 MCF-7 组划痕带在 48 h 后未能愈合;transwell 实验提示 MSs 组中可见到(76.24±0.35)个细胞通过生物膜,而 MCF-7 细胞组中为(17.38±0.18)个($P<0.05$);动物成瘤实验提示:MSs 在成瘤速度及移植瘤体积方面均强于 MCF-7 细胞。结论 MSs 具有极强的迁移、侵袭性生长及动物体内成瘤的能力,可作为实验模型应用于乳腺癌干细胞相关研究中。

关键词:乳腺肿瘤;肿瘤干细胞;无血清培养

中图分类号:R73

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)04-0456-03

Study on the biological characteristics of human breast cancer cell mammospheres

Fan Yuanming¹, Hou Jing², Dong Ning¹, Wang Qiang¹, Gu Min^{3△}

(1. Department of General Surgery, Changshou People's Hospital, Chongqing 401220, China;

2. Department of Oncology, Changshou People's Hospital, Chongqing 401220, China;

3. Department of Surgery, Changshou Women and Children's Hospital, Chongqing 401220, China)

Abstract: Objective To study the biological characteristics of the human breast cancer cell mammospheres(MSs), and construct breast cancer stem cell experiment model. **Methods** MCF-7 cells were cultured in the serum-free media supplemented with growth factors (the MCF-7 group), and the MSs was collected (the MSs group). The migration, invasive and animal tumor formation abilities of MSs were detected by wound healing, transwell invasive assay and animal tumor formation test. **Results** The wound line of MSs healed after 48 hours, but the line of MCF-7 cells could not heal after 48 h. The number of the cells going through the membrane in MSs group was (76.24±0.35), and the number in MCF-7 cells was (17.38±0.18) ($P<0.05$). MSs had stronger animal tumor formation ability than MCF-7 cells. **Conclusion** MSs have stronger abilities in migration, invasive and animal tumor formation, and could be used in the studies of breast cancer stem cell as experimental model.

Key words: breast neoplasms; neoplastic stem cell; culture in serum-free media

乳腺癌作为威胁我国妇女生命健康的头号肿瘤杀手,由于其发病率呈逐年上升趋势,故越来越成为众多学者关注和研究的重点。而随着对肿瘤的研究深入,“肿瘤干细胞”的理论应运而生。肿瘤干细胞是指一小部分具有自我更新以及多向分化潜能,并且具有极强的成瘤能力的肿瘤细胞。这类细胞可以不断分化、增殖出新的肿瘤细胞,具有了无限增殖以及远处转移的特点。本文拟利用人乳腺癌无血清悬浮培养的方法获得具有肿瘤干细胞特性的人乳腺癌细胞微球体(mammospheres, MSs),并通过细胞划痕实验、transwell 实验及动物成瘤实验来了解 MSs 所具有的生物学特性,以期 MSs 应用于乳腺癌干细胞研究提供实验模型。

1 材料与方 法

1.1 材料 人乳腺癌 MCF-7 细胞(中科院上海细胞库); DMEM-F12、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、上皮特异性抗原 EDA、红细胞裂解液(鼎国生物公司); BALB/c 雌性裸鼠(重庆医科大学实验动物中心); 高速离心机(日立公司); 2.5 μL 及 20.0 μL Gilson 移液器(吉尔森公司); 24 孔板(鼎国生物公司)。本实验在重庆市神经病学重点实验室完成。

1.2 方 法

1.2.1 MSs 的培养 将人乳腺癌 MCF-7 细胞接种于含有生长因子的 DMEM-F12 培养基中,培养基配方包含 1:50 B27, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF。在 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中进行孵育。每 3 天换液 1 次, 2 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞后半量换液及全量换液交替进行。在 MSs 形成后每 5~7 天传代 1 次, 传代时 2 000 r/min 离心 5 min, 收集 MSs。胰酶消化 5 min 后吹打至 MSs 消失, 从而终止消化, 获取微球体细胞(mammospheres-derived cells, MSDCs), 离心收集细胞, 继续上述无血清培养。

1.2.2 细胞划痕实验 将 MSs 用胰酶消化成 MSDCs, 移液器取生长状态良好的 MSDCs 约 30 万个, 用适量培养基将其配制 13 mL 细胞悬液。将 MSDCs 细胞悬液加入 24 孔板的中间两排, 每孔 1 mL。24 孔板置于 37 ℃ 培养箱过夜。次日观察到细胞开始贴壁后, 用移液器沿 24 孔板中间直线划痕。培养液冲洗掉划下的细胞, 加入 DMEM-F12 无血清培养基, 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养。按第 0、24、48 小时拍照记录。同时选取 MCF-7 细胞作为对照(MCF-7 组)。

1.2.3 transwell 实验 胰酶将 MSs 消化成单细胞, 加入培养基配制 5×10⁶/mL 的细胞悬液。transwell 上室膜上每孔加

入 200 μ L MSDCs 悬液,下室每孔加入 500 μ L 无血清培养基。培养 48 h 后,取出上室擦去表层细胞,90%乙醇固定 30 min,自然晾干。结晶紫染色 20 min 后显微镜下计数细胞通过情况。设 MCF-7 组为对照。

1.2.4 动物成瘤实验 将 MSs 消化成单细胞,用培养液稀释为 2×10^3 /mL 的悬液。1 mL 注射器(7 号针头)将其种植于裸鼠的左侧背部皮下,每只裸鼠注射 0.1 mL。同时采用 2×10^6 /mL MCF-7 细胞悬液种植于同一裸鼠的右侧背部作为对照。本组实验共接种 6 只裸鼠,分别编为 I ~ VI 号。接种后动物均放置于动物房内饲养。接种 7 d 后连续观察成瘤情况。1 个月 后处死动物并取出移植瘤进行石蜡包埋切片及 HE 染色。

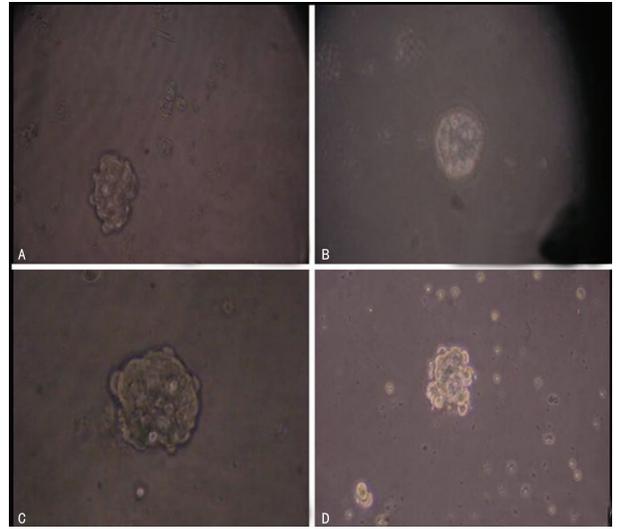
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MSs 的培养 在无血清悬浮培养第 5 天后可以观察到 MSs 的形成。在培养第 10 天时观察到 MSs 球体变大,且边缘出现明显的折光带。培养第 15 天时 MSs 球体体积停止增长,此时球体结构最为紧密。在将 MSs 进行传代培养时可以看到,新生成的 MSs 球体较之前有所变小,且结构较为松散,周围有较多的单个细胞。在传代培养 2 代后无法形成新的 MSs。见图 1。

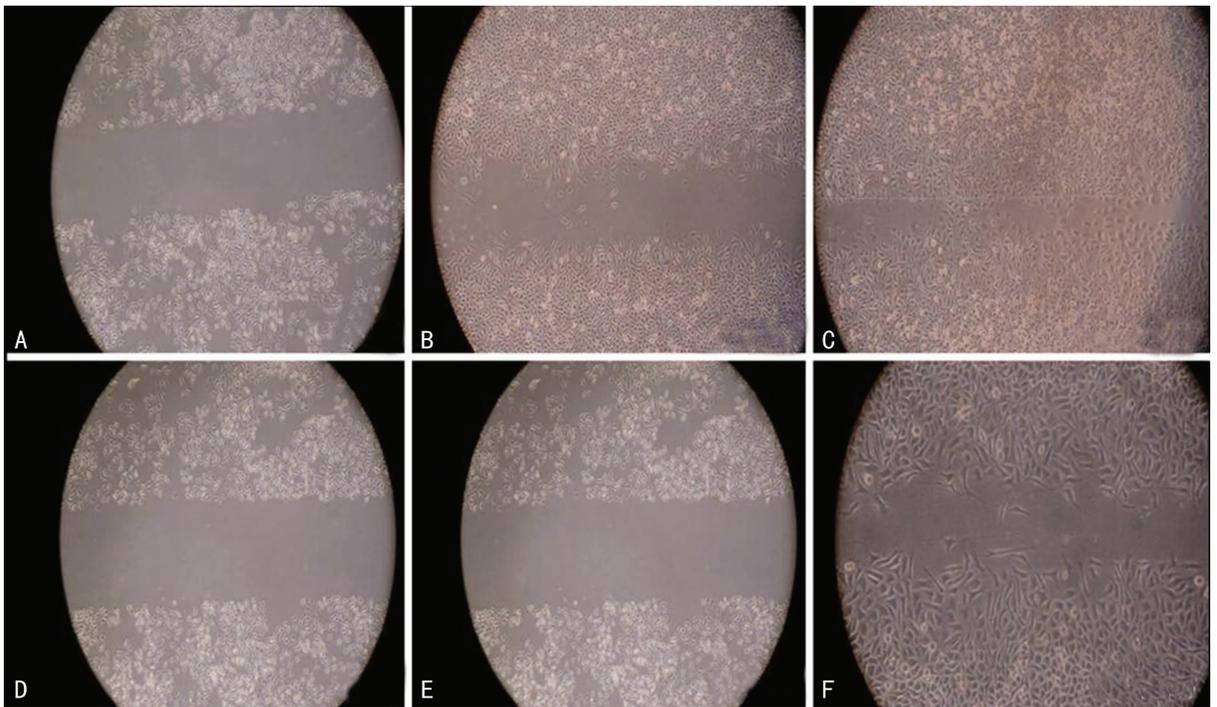
2.2 细胞划痕实验 取对数生长期的 MSDCs 进行划痕实验。结果发现 MSs 组细胞迁徙速度较快,在 24 h 后可以看到

划痕带处已经有细胞出现,并且划痕带较前变窄。48 h 后划痕带已愈合,充满大量细胞,且与 MSDCs 形态一致。MCF-7 组在 24 h 后划痕带处未见细胞出现,48 h 后划痕带未愈合。见图 2。



A:培养第 5 天;B:培养第 10 天;C:培养第 15 天;D:传代培养的 MSs。

图 1 MSs 的培养情况(普通光学显微镜 $\times 100$)



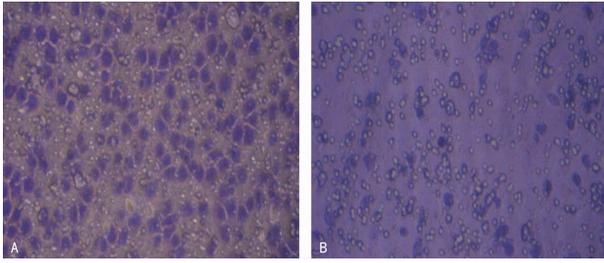
A:MSs 组 0 h;B:MSs 组 24 h;C:MSs 组 48 h;D:MCF-7 组 0 h;E:MCF-7 组 24 h;F:MCF-7 组 48 h。

图 2 细胞划痕实验照片(普通光学显微镜 $\times 40$)

2.3 transwell 实验 在显微镜下随机选取 10 个视野,计数出每个视野的细胞个数平均值。MSs 组中可见到 (76.24 ± 0.35) 个细胞,而 MCF-7 组中为 (17.38 ± 0.18) 个 ($P < 0.05$)。MSs 具有比 MCF-7 细胞更强的侵袭能力,见图 3。

2.4 动物成瘤实验 在接种第 11 天时可以观察到 I、III、IV、V 号裸鼠的右侧背部出现移植瘤,而在接种第 18 天时观察到

仅有 V 号裸鼠的左侧背部出现移植瘤。接种 MSs 后 14 d 时 6 只小鼠均可观察到移植瘤的出现且随着时间推移瘤体逐渐增大,在 21 d 后瘤体生长速率加快。而 MCF-7 组一侧在 21 d 时仅有 2 组小鼠出现移植瘤,且移植瘤生长速率相对较慢,见图 4~5。



A: MSs 组; B: MCF-7 组。

图 3 细胞侵袭能力检测 (transwell×100)



图 4 裸鼠成瘤结果

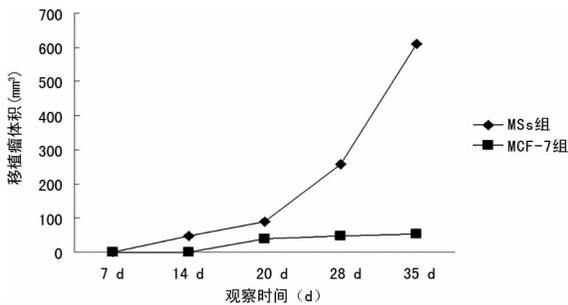


图 5 移植瘤生长曲线

3 讨论

近年来大量的研究证明,肿瘤细胞中有一小部分具有多向分化潜能及自我更新能力的细胞。这与人类造血干细胞的特性相一致,因此有学者将其命名为肿瘤干细胞。其中包括乳腺癌在内的多种实体肿瘤干细胞已经被发现。乳腺癌干细胞的分选培养与证实现已成为众多学者研究的焦点。流式细胞技术磁性激活细胞分选法以及 SP 细胞富集分选法已被认为是肿瘤干细胞分选培养的重要手段^[1-5]。

CD44⁺CD24⁻与 ALDH1⁺被认为是乳腺癌干细胞的相关标记物^[6]。Phillip 等^[7]采用无血清悬浮法从人乳腺癌 MCF-7 细胞中获得了一种可能含有乳腺癌干细胞的乳腺球,其中 CD44⁺CD24⁻细胞的比例为 40.3%。董华英等^[8]利用非黏附性乳腺球悬浮培养法从原代培养的人乳腺癌细胞中得到了具有肿瘤干细胞特性的乳腺癌细胞 MSDCs。并且通过流式细胞技术发现所获得的 MSDCs 中乳腺癌干细胞表面标记物 ALDH1⁺比例较高,而 ALDH1⁺与所选病例的化疗次数有关。本实验利用无血清悬浮培养法从 MCF-7 细胞中获得了 MSs,且 MSs 的培养时间及球体形态与上述学者的研究相符。因此,

作者认为无血清悬浮培养法可用于实体肿瘤干细胞的分选培养。

肿瘤细胞所具有的无限增殖与远处侵袭是导致肿瘤临床治疗失败的主要原因。而肿瘤干细胞的特点正是具有极强的侵袭及体外成瘤能力^[9-12]。Kim 等^[13]在对胰腺胆道腺癌细胞的研究中发现:表达干细胞标记物 CD133⁺的细胞具有较强的远处迁移及侵袭能力,这类细胞并且具有较强的化疗耐药性。Han 等^[14]从 MCF-7 细胞获得了 MSs,检测其中 N-cadherin、vimentin、 α -SMA 等的表达情况后,发现 MSDCs 细胞间质上皮转化活跃。而这种变化可能导致了 MSs 具有了较强的侵袭能力。动物体内成瘤是检验肿瘤干细胞特性的一项重要手段。Yeh 等^[15]发现肺癌干细胞具有极强的体外成瘤能力,且移植瘤中高表达干细胞标记物 CD44⁺及 CD133⁺。如果加入三氟拉嗪则可抑制其动物致瘤能力。本实验发现 MSs 在成瘤速度及移植瘤体积方面均强于 MCF-7 细胞,且 HE 染色结果符合肿瘤诊断。因此作者认为 MSs 在远处迁移、侵袭性生长及动物成瘤方面具有较强的能力,这与肿瘤干细胞的特性相符合。因此推测无血清悬浮培养所获得的 MSs 具有肿瘤干细胞相关特性,但需要通过下一步实验进行更深入的研究加以证明。

参考文献:

- [1] Kim K, Ihm H, Jy R, et al. High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1095-1100.
- [2] Kim J, Jung J, Lee SJ, et al. Cancer stem-like cells persist in established cell lines through autocrine activation of EGFR signaling[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(3): 607-612.
- [3] Sathi GA, Tamamura R, Tsujigiwa H, et al. Analysis of immunoeexpression of common cancer stem cell markers in ameloblastoma[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(3): 397-402.
- [4] Lu X, Deng Q, Li H, et al. Altered characteristics of cancer stem/initiating cells in a breast cancer cell line treated with persistent 5-FU chemotherapy[J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(5): 821-826.
- [5] Hashimoto K, Shimizu C, Tsuda H, et al. Immunohistochemical detection of breast cancer stem cells in hormone receptor-positive breast cancer and their role in response to endocrine therapy and clinical outcome[J]. *Oncology*, 2012, 82(3): 168-174.
- [6] Yu X, Wang J, Feizpour A, et al. Illuminating the lateral organization of Cell-Surface CD24 and CD44 through plasmon coupling between Au nanoparticle immunolabels[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(3): 1290-1294.
- [7] Phillip SM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(24): 1777-1785.
- [8] 董华英, 吴诚义, 陈元文. 化疗后乳腺癌组织中干细胞微球体的分离, 培养及鉴定[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2011, 37(1): 163-167.
- [9] Jy T, Huang YH, Luo MH, et al. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer[J]. (下转第 461 页)

急性冠状动脉综合征的发生与机体炎症反应激活有关,早期应用大剂量阿托伐他汀能快速降低血清炎症因子水平,从而改善机体的炎症状态,有助于冠状动脉病变斑块的稳定,从而有可能影响急性冠状动脉综合征患者的转归^[11]。有临床研究显示强化他汀治疗不稳定型心绞痛具有较好的临床效果及安全性,能明显降低血清 hs-CRP、TNF- α 水平,具有良好心血管保护作用^[12],急性炎症反应在此过程中起了关键性作用。强化他汀缘于它迅速起效的多效性,服用 3 h 后即可改善内皮功能,24 h 内改善冠状动脉循环,降低炎症因子水平^[13]。本研究发现,心肌梗死对照组与 SHAM 组比较术后 24 h 急性炎症因子 TNF- α 、hs-CRP 水平明显升高,强化他汀组炎症因子水平显著低于心肌梗死对照组;强化他汀组与混合剂量组相比较,炎症因子水平差异无统计学意义($P>0.05$),常规剂量组在心肌梗死大鼠术后短期与心肌梗死对照组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$)。说明心肌梗死手术迅速激活大鼠体内炎症介质的释放,而术前强化他汀可以抑制术后大鼠体内炎症因子水平,通过改善机体的炎症状态,影响心血管病变的转归而起到有益作用。而低剂量他汀持续给药在本研究中未显示出他汀多效性的抗炎效应。

综上所述,术前强化阿托伐他汀能显著降低心肌梗死大鼠术后 24 h 急性炎症反应,抑制血小板活化,而炎症和血小板活化的关系,以及他汀多效性的起效及持续时间等问题尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Glynn RJ, Danielson E, Fonseca FA, et al. A randomized trial of rosuvastatin in the prevention of venous thromboembolism[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(18):1851-1861.
- [2] Andrie RP, Bauriedel G, Braun P, et al. Increased expression of C-reactive protein and tissue factor in acute coronary syndrome lesions: Correlation with serum C-reactive protein, angiographic findings, and modification by statins[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1):135-143.
- [3] Nozue T, Yamamoto S, Tohyama S, et al. Treatment with statin on atheroma regression evaluated by intravascular ultrasound with Virtual Histology (TRUTH Study): rationale and design[J]. *Circ J*, 2009, 73(2):352-355.

- [4] 车兆义, 邹悦, 宋清斌. 大鼠实验中几种常用的采血方法探讨[J]. *局解手术学杂志*, 2008(2):84-85.
- [5] Kolandaivelu K, Bhatt DL. Antiplatelet therapy in coronary heart disease prevention[J]. *Cardiol Clin*, 2011, 29(1):71-85.
- [6] Sharma G, Berger JS. Platelet activity and cardiovascular risk in apparently healthy individuals: a review of the data[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011, 32(2):201-208.
- [7] 丁芳林, 李卓成, 庄义浩. 急性心肌梗死患者 PTCA 术后再灌注损伤及细胞黏附分子的表达研究[J]. *重庆医学*, 2011, 40(30):3048-3050.
- [8] Rodes-Cabau J, Tardif JC, Cossette M, et al. Acute effects of statin therapy on coronary atherosclerosis following an acute coronary syndrome[J]. *Am J Cardiol*, 2009, 104(6):750-757.
- [9] 金春明, 苏咏梅, 刘广勤. 不同离体时间和抗凝剂浓度对血小板激活的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(9):811-814.
- [10] Rosencher J, Zuily S, Varenne O, et al. Acute myocardial infarction secondary to platelet apheresis in a 57-year healthy donor[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(3):e119-120.
- [11] Tawfik MK, Ghattas MH, Abo-Elmatty DM, et al. Atorvastatin restores the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators in rats with acute myocardial infarction[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010, 14(6):499-506.
- [12] 宋少鹏. 瑞舒伐他汀对不稳定型心绞痛患者血清细胞因子和心肌缺血的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2009, 30(2):189-192.
- [13] Wang X, Lin Y, Luo N, et al. Short-term intensive atorvastatin therapy improves endothelial function partly via attenuating perivascular adipose tissue inflammation through 5-lipoxygenase pathway in hyperlipidemic rabbits[J]. *Chin Med J Engl*, 2014, 127(16):2953-2959.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-11-19)

(上接第 458 页)

- Breast Cancer Res Treat, 2012, 136(2):407-417.
- [10] Liu Z, Bandyopadhyay A, Nichols RW, et al. Blockade of autocrine TGF- β signaling inhibits stem cell phenotype, survival, and metastasis of murine breast cancer cells[J]. *J Stem Cell Res Ther*, 2012, 2(1):1-8.
- [11] Abraha MB, Fritz P, Mcc LM, et al. Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer May not be associated with clinical outcome but May favor distant metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 11(3):1154-1159.
- [12] Dalla Pozza E, Lerda C, Costanzo C, et al. Targeting gemcitabine containing liposomes to CD44 expressing pancreatic adenocarcinoma cells causes an increase in the antitumor activity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(5):1396-1404.

- [13] Kim HS, Yoo SY, Kim KT, et al. Expression of the stem cell markers CD133 and nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(8):754-761.
- [14] Han M, Liu M, Wang Y, et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1/2):427-436.
- [15] Yeh CT, Wu AT, Chang PM, et al. Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(11):1180-1188.

(收稿日期:2014-08-10 修回日期:2014-10-12)