

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200224.1349.002.html\(2020-02-24\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200224.1349.002.html(2020-02-24))

缺氧对人乳腺癌细胞微球体培养的影响*

范原铭¹, 侯婧², 徐宏宇¹, 谢佳良¹, 何伟¹, 李胜难³, 陈叶恒¹

(重庆市长寿区人民医院:1. 普外二科;2. 肿瘤科;3. 病理科 401220)

[摘要] **目的** 研究人乳腺癌细胞微球体(MSs)在缺氧条件下的分选培养效率,以寻找富集乳腺癌干细胞的可能优选方案。**方法** 在缺氧及常氧条件下对接受过化疗的人乳腺癌组织细胞进行无血清悬浮培养,观察记录成球情况。流式细胞技术检测各组细胞中的 CD44⁺CD24^{-/Low} 表型细胞比例,Western blot 检测各组细胞中 CD44、CD24 和乙醛脱氢酶 1(ALDH1)的表达水平。**结果** 缺氧状态下 MSs 球体生长速率及其直径与常氧状态下有明显差异($P < 0.05$)。流式细胞技术检测结果显示:CD44⁺CD24^{-/Low} 表型细胞在缺氧 MSDCs 组及常氧 MSDCs 组中比例分别为(82.35±6.28)%、(1.17±0.05)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 结果发现缺氧 MSDCs 组中的 CD44 和 ALDH1 表达水平与常氧 MSDCs 组和 MDA-MB-231 细胞组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 CD24 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 缺氧可以在无血清培养中促进 MSs 的成球,增加乳腺癌干细胞样细胞的比例。

[关键词] 乳腺肿瘤;肿瘤干细胞;低氧;CD44CD24;乙醛脱氢酶 1**[中图分类号]** R73-3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1053-05

Effects of hypoxia on the culturing of mammospheres*

FAN Yuanming¹, HOU Jing², XU Hongyu¹, XIE Jialiang¹, HE Wei¹, LI Shengnan³, CHEN Yeheng¹

(1. Department of General Surgery II; 2. Department of Oncology; 3. Department of Pathology, Changshou People's Hospital, Chongqing 401220, China)

[Abstract] **Objective** To study the sorting culture efficacy of mammospheres (MSs) under hypoxia, and discuss the possible improvement programs of breast cancer stem cells enrichment. **Methods** The cells from breast cancer tissue of human had received chemotherapy were cultured in serum-free media under hypoxia and normoxia. The formation of MSs were observed and recorded. The flow cytometry method was used for testing the ratio of CD44⁺CD24^{-/Low} cells. The expressions of CD44, CD24 and aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) were tested by Western blot. **Results** The growth rate and diameter of MSs under hypoxia were significantly different from those under normoxia ($P < 0.05$). The result of flow cytometry showed the ratio of CD44⁺CD24^{-/Low} under hypoxia (82.35±6.28)% and normoxia (1.17±0.05)%, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There were significant differences in CD44 and ALDH1 expression between the hypoxia MSDCs group and the normoxia MSDCs by Western blot ($P < 0.05$), but not any statistic difference in CD24 expression ($P > 0.05$). **Conclusion** Hypoxia could not only promote the growth efficiency of MSs, but also increase the ratio of breast cancer stem cell-like cells.

[Key words] breast neoplasms; cancer stem cell; hypoxia; CD44CD24; aldehyde dehydrogenase 1

肿瘤干细胞是一类具有强大自我更新及不定分化能力的肿瘤细胞,它与肿瘤发生、复发、远处转移及放疗化疗抵抗等肿瘤生物学特性密切相关^[1]。因此包括乳腺癌在内的多种实体肿瘤干细胞已经成为研究的重点^[2-4]。但乳腺癌干细胞的分选工作一直以来都很难取得重大突破。近年来免疫磁珠分选及无血清非黏附成球悬浮培养的方法广泛应用于乳腺癌干细

胞的分选和培养^[5-7],尤其是无血清悬浮培养法应用更为广泛,该法所得到的乳腺癌细胞微球体(mammospheres, MSs)在多个方面表现出乳腺癌干细胞的特性^[1]。而缺氧状态普遍存在于肿瘤及其周围组织中,它对肿瘤的影响不仅可以抑制非肿瘤干细胞的肿瘤细胞和正常细胞的增殖、分化,也使部分有较强生存和适应能力的细胞存活下来^[8]。

本研究拟观察在缺氧状态下无血清悬浮培养 MSs 的成球生长情况,并检测其中乳腺癌干细胞相关分子标记物的表达水平,为优化乳腺癌干细胞分选方法提供新的思路。

1 材料与材料

1.1 材料

入组共 23 例患者(2015 年 4 月至 2018 年 12 月)均由重庆市长寿区人民医院石蜡切片证实为乳腺浸润性导管癌。所有患者均签订知情同意书。患者年龄 43~55 岁,中位 49.5 岁。在标本收集前所有患者均接受 3 个周期的化疗(吡柔比星 40 mg/m²+多西他赛 75 mg/m²+环磷酰胺 500 mg/m²)。

1.2 主要试剂和仪器

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞(中科院上海细胞库);ALDH1 兔抗人多克隆抗体、CD24 鼠抗兔单克隆抗体、CD44 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);GelDoc2000 凝胶成像系统(美国 BioRad 公司);灭菌型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);稳压 DNA 电泳仪(美国 BioRad 公司)、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Mini 离心机(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)、水平电泳槽(北京市六一仪器厂)。本实验在重庆市长寿区人民医院病理科实验室及重庆市神经病学重点实验室完成。

1.3 方法

1.3.1 标本收集

课题组选择的组织块尽量靠近肿瘤中心,不建议

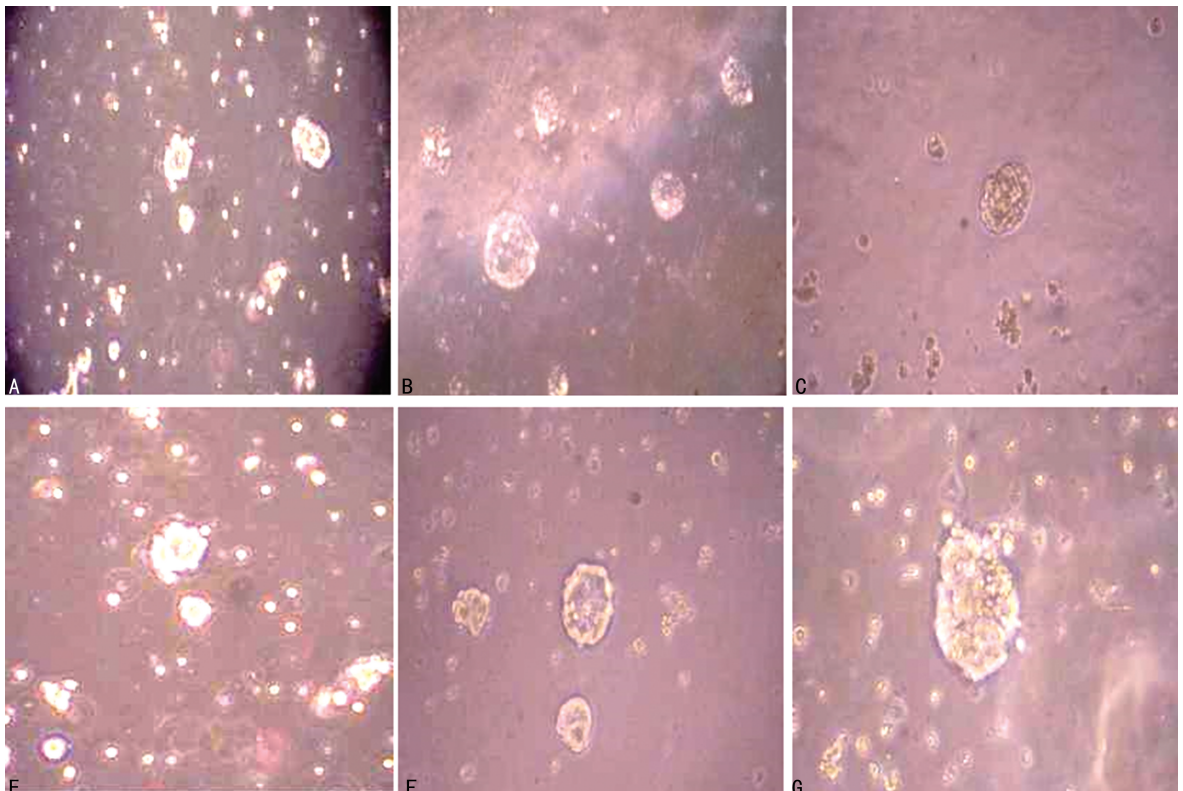
选择含有坏死组织及脂肪组织的标本。标本获得后放入 DMEM-F12 培养液中保存,且转运过程保持低温状态。

1.3.2 获取乳腺癌单细胞

将标本切分成尽可能细小的碎块,与细胞培养液混合制作成组织悬液。将其高速离心(1 000 r/min)后加入红细胞裂解液,均匀吹打及漂洗。再次离心后重悬细胞,室温条件下培养 1 h 后离心收集细胞,将其接种于培养基中(1:50 B27、20 ng/mL EGF、20 ng/mL bFGF),并置于恒温培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。

1.3.3 培养和传代

将乳腺癌单细胞(约 2×10⁴ 个/mL)分别置于 16 个培养瓶中,分为常氧组(*n*=8)及缺氧组(*n*=8)。缺氧组实验条件为密闭的 O₂ 1%、CO₂ 5%、N₂ 94% 低氧培养箱。细胞换液等操作需要尽量缩短操作时间,且需在密闭的无菌操作台上完成,避免破坏缺氧状态。培养过程中每隔 3 d 更换 1 次培养液。在观察到 MSs 出现之后,每隔 5~7 d 传代 1 次。离心 5 min 后收集 MSs,胰酶消化后将获得的微球体细胞(mammospheres-derived cells, MSDCs),多次离心后将 MSDCs 继续无血清培养,并观察形成次代细胞球,同时镜下观察 MSs 体积变化,并以球体直径为量化数据,MSs 成球效率=首次成球时直径大于 100 μm MSs 数/接种细胞总数×100%。



A:常氧组第 8 天;B:常氧组第 10 天;C:常氧组第 15 天;D:缺氧组第 5 天;E:缺氧组第 10 天;F:缺氧组第 15 天。

图 1 两组 MSs 培养(×100)

1.3.4 流式细胞技术

实验分为缺氧 MSDCs 组、常氧 MSDCs 组及 MDA-MB-231 细胞组。实验中需要选择各组中首次成球且体积较大的球体,通过胰酶消化后制作成细胞悬液用于实验,检测 CD44⁺ CD24^{-/Low} 表型细胞比例。同时本实验均已设置同型对照。按操作说明进行检测,实验过程重复 3 次。

1.3.5 Western blot

按前述方法获得各组 MSDCs 后,按常规进行蛋白的提取,Western blot 检测 CD44、CD42、ALDH1 表达。

1.4 统计学处理

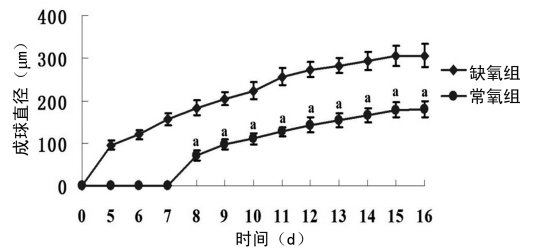
采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验及方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSs 培养

缺氧组和常氧组 MSs 最早出现的时间分别是第 5 天和第 8 天。缺氧组和常氧组成球效率分别为 (5.6 ± 0.5%)%、(3.1 ± 0.3)% ,差异有统计学意义

($P < 0.05$),见图 1、2。



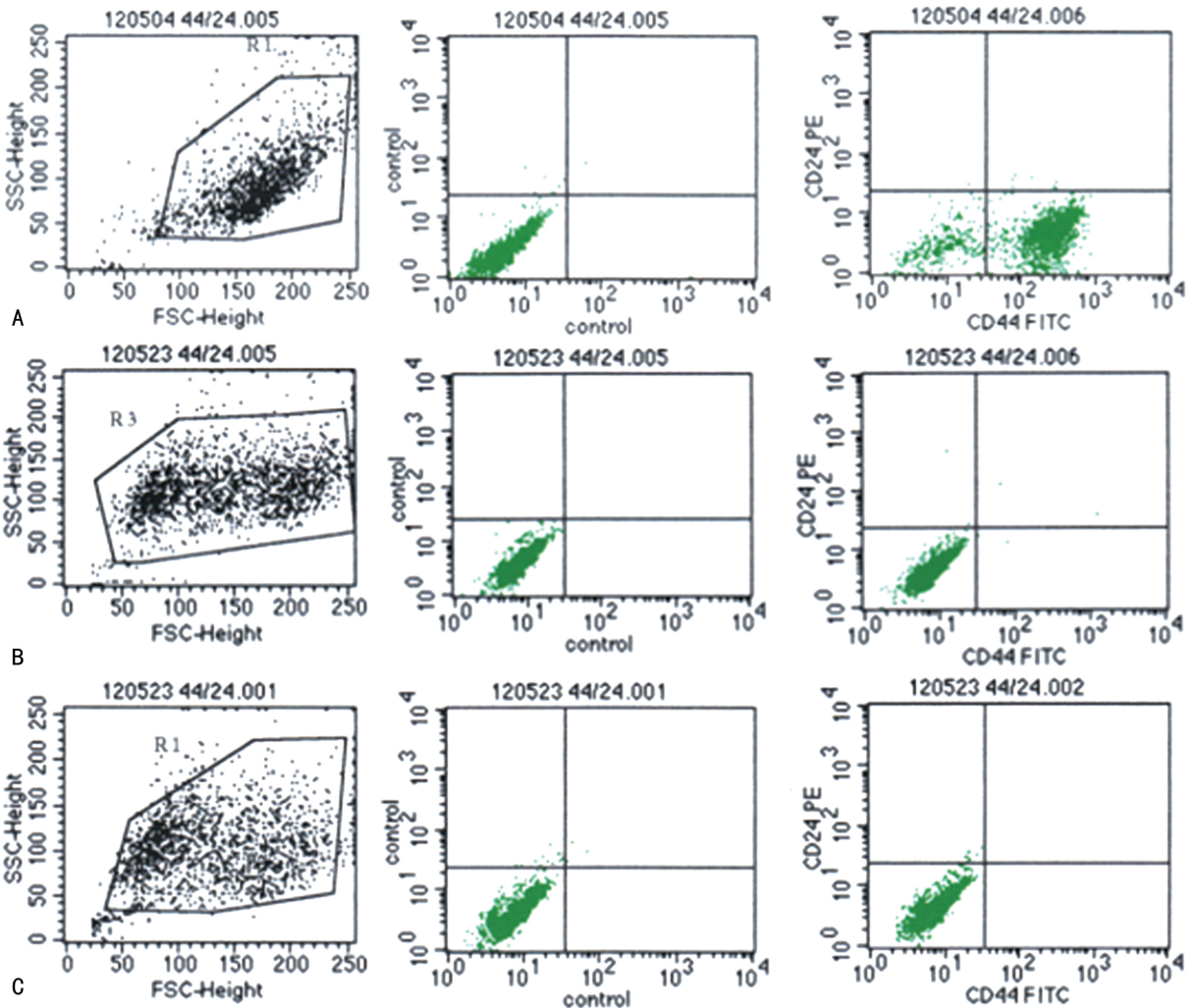
^a: $P < 0.05$, 与缺氧组比较。

图 2 两组球体生长曲线

课题组在与亲代一致的培养条件下,对常氧组及缺氧组 MSs 进行传代培养。缺氧组球体生长时间持续 11 d,第 2 天时观察到次代 MSs 出现,其形态与亲代 MSs 保持一致。而常氧组 MSs 球体生长时间持续 10 d,第 6 天时才观察到次代 MSs 成球,同时其球体体积较缺氧组小。

2.2 流式细胞检测情况

缺氧 MSDCs 组 CD44⁺ CD24^{-/Low} 表型的细胞比例为 (82.35 ± 6.28)% 高于常氧 MSDCs 组 (1.17 ± 0.05)% ,MDA-MB-231 细胞组中其比例为 0,见图 3。



A:缺氧 MSDCs 组;B:常氧 MSDCs 组;C:MDA-MB-231 细胞组。

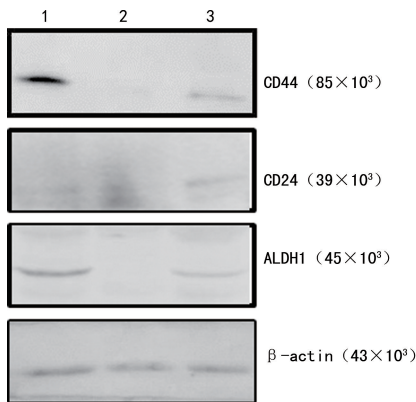
图 3 流式细胞检测 CD44、CD42 表达

2.3 Western blot 检测 CD44、CD24、ALDH1 表达情况

CD44 和 ALDH1 的表达在 3 组中差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 CD24 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1、图 4。

表 1 各组 Western blot 检测情况

指标	缺氧 MSDCs 组	常氧 MSDCs 组	MDA-MB-231 细胞组	P
CD44	7.85 ± 0.41	4.78 ± 0.35	0.56 ± 0.13	<0.05
CD24	4.69 ± 0.26	3.08 ± 0.29	0.43 ± 0.23	>0.05
ALDH1	1.59 ± 0.32	1.92 ± 0.37	2.17 ± 0.26	<0.05



1: 缺氧 MSDCs 组; 2: MDA-MB-231 细胞组; 3: 常氧 MSDCs 组。

图 4 各组电泳条带图

3 讨论

CD44⁺CD24^{-/Low} 早在 20 世纪就已被报道, 已经被作为经典的乳腺癌干细胞分子标记物在乳腺癌的基础科研工作广泛应用^[9]。有学者在检测 MDA-MB-468 细胞株时, 发现其中 CD44⁺CD24⁻的细胞比例较高, 推测 CD44⁺CD24^{-/Low} 可能是乳腺癌干细胞的一种分子标记物^[10]。但是包括 MDA-MB-468 细胞在内的多种上皮细胞系癌变却高表达 CD24, 其中的具体机制目前尚不明确。而 GEDYE 等^[11]在研究中发现 CD44 与 CD24 的表达在细胞中分布并不一致, 前者多出现在细胞膜上, 而后者较多出现在细胞质当中, 推测其可能原因是调控 CD24 细胞膜表达过程中出现了基因片段的修饰现象。肖玉洁等^[12]在 MDA-MB-231 细胞中发现 CD44⁺CD24^{-/Low} 表型细胞比例较高, 与本实验结果不一致。其原因可能为流式细胞检测前出现了 MDA-MB-231 细胞分化, 同时被混入了其他细胞, 从而导致结果差异。笔者建议为保证流式细胞实验结果的可靠性, 必须避免待检细胞遭受污染, 同时在培养过程中避免使用胎牛血清。

虽然诸多学者将 CD44⁺CD24^{-/Low} 广泛应用于乳腺癌干细胞的研究, 但 O'FLAHERTY 等^[13]发现 CD44 的表达可以抑制细胞侵袭和转移, 这对乳腺癌

干细胞研究者提出了新的要求, 即单分子标记物的使用不可避免地会导致实验设计过于片面, 实验结果说服力不强。因此需要寻找其他有效的分子标记物来进行联合研究验证。在后来的研究中 ALDH1 被多位学者所验证推荐, 广泛应用于肿瘤干细胞的研究。有研究表明 ALDH1 参与了早期乳腺癌中的肿瘤细胞上皮间质化的发生, 并被认为是乳腺干细胞的可靠标志物之一^[14]。OBAYASHI 等^[15]在动物实验中发现, ALDH1⁺细胞较 ALDH1⁻具有更强的成瘤性, 可以极小的细胞数级在裸鼠体内成瘤。NIGJEH 等^[16]在进行细胞划痕实验及 Transwell 实验时发现, 乳腺癌细胞株中 ALDH1⁺细胞的外侵及迁移能力显著强于非 ALDH1⁺细胞, 而原因可能与其促进上皮间质化的发生有关。从众多的研究结果中不难看出, ALDH1 已经成为乳腺癌鉴定工作的重要手段, 得到广泛应用。

实体肿瘤具有不断生长、外侵的特点, 其耗氧量同样也随之增长。不管是在临床还是基础研究中, 都能观察到肿瘤组织内普遍存在缺氧现象。在普通细胞的培养中, 氧浓度的变化可以对其生长造成影响。而在肿瘤干细胞培养领域, 目前相关研究已证实缺氧可以促进肿瘤干细胞的培养和分选。多位学者的研究发现低氧环境 (1%~8%) 导致胚胎干细胞和神经干细胞的增殖能力增强, 并且增强了细胞的多向分化潜能^[17-18]。本实验为优化无血清悬浮培养法, 将缺氧状态引入 MSs 无血清悬浮培养过程。实验结果证实: 缺氧条件可以明显提高 MSs 的成球速率, 同时获得的 MSs 球体体积更大, 结构更加稳定。但其中缺氧发挥作用的具体机制目前并不清楚, 课题组会在下一步的研究工作中予以探讨。

参考文献

- [1] EHMSSEN S, PEDERSEN M H, WANG G, et al. Increased cholesterol biosynthesis is a key characteristic of breast cancer stem cells influencing patient outcome[J]. Cell Rep, 2019, 27 (13):3927-3938.
- [2] SHANMUGAM G, MOHAN A, KUMARI K, et al. A novel reporter construct for screening small molecule inhibitors that specifically target self-renewing cancer cells[J]. Exp Cell Res, 2019, 383(2):111551.
- [3] LV Z, LIU R D, CHEN X Q, et al. HIF-1 α promotes the stemness of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ β -catenin

- pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(2):726-734.
- [4] MORADI F, BABASHAH S, SADEGHIZAD EH M, et al. Signaling pathways involved in chronic myeloid leukemia pathogenesis: The importance of targeting Musashi2-Numb signaling to eradicate leukemia stem cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2019, 22(6):581-589.
- [5] SWEISS K, OH A, CALIP G S. Superior survival in african american patients who underwent autologous stem cell transplantation for multiple myeloma[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2019, 19(8):506-511.
- [6] BRUNGS D, LOCHHEAD A, IYER A, et al. Expression of cancer stem cell markers is prognostic in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma[J]. *Pathology*, 2019, 51(5):474-480.
- [7] HUANG M Z, ZHANG F C, ZHANG Y Y. Influence factors on the formation of mammospheres from breast cancer stem cells[J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2016, 40(5):500-504.
- [8] ZHOU J, ZHANG H, GU P, et al. NF-kappaB pathway inhibitors preferentially inhibit breast cancer stem-like cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 111(3):419-427.
- [9] OKKELMAN I A, FOLEY T, PAPKOVSKY D B, et al. Multi-parametric imaging of hypoxia and cell cycle in intestinal organoid culture[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1035(2036):85-103.
- [10] JU J H, JANG K, LEE K M, et al. CD24 enhances DNA damage-induced apoptosis by modulating NF- κ B signaling in CD44-expressing breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 32(10):1474-1483.
- [11] GEDYE C, AILLES L. Isolation and characterization of cancer stem cells in vitro[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 946:181-204.
- [12] 肖玉洁, 王婷, 龚辉, 等. 缺氧对乳腺癌干细胞微球体培养及基因表达的影响[J]. *癌症*, 2018, 37(10):467-472.
- [13] O'FLAHERTY J D, BARR M, FENNELL D, et al. The cancer stem-cell hypothesis: its emerging role in lung cancer biology and its relevance for future therapy[J]. *J Thorac Oncol*, 2017, 7(12):1880-1890.
- [14] STRATI A, NIKOLAOU M, GEORGOULIAS V, et al. Prognostic significance of TWIST1, CD24, CD44, and ALDH1 transcript quantification in EpCAM-positive circulating tumor cells from early stage breast cancer patients [J]. *Cells*, 2019, 8(7):1125-1129.
- [15] OBAYASHI S, HORIGUCHI J, HIGUCHI T, et al. Stathmin1 expression is associated with aggressive phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(3):781-790.
- [16] NIGJEH S E, YEAP S K, NORDIN N. Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1):56-59.
- [17] SIEBERT S, FARRELL J A, CAZET J F, et al. Stem cell differentiation trajectories in Hydra resolved at single-cell resolution[J]. *Science*, 2019, 365(6451):1156-1162.
- [18] BURKHART H M, QURESHI M Y, ROSSANO J W, et al. Autologous stem cell therapy for hypoplastic left heart syndrome: Safety and feasibility of intraoperative intramyocardial injections[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 5223(19):31154-31157.

(收稿日期:2019-11-08 修回日期:2020-02-26)