

新辅助化疗后乳腺导管癌干/祖细胞克隆形成观察*

陈元文¹, 乔正荣¹, 吴诚义^{2△}, 董华英² (1. 重庆市第五人民医院普外科 400062; 2. 重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016)

【摘要】 目的 观察人乳腺癌新辅助化疗后干/祖细胞的生存及克隆形成情况。方法 应用非黏附性乳腺癌细胞微球(MS)悬浮培养法获取乳腺癌干/祖细胞;通过连续的单克隆实验检测乳腺癌细胞球细胞的克隆形成和自我更新能力,血清诱导检测其分化能力;裸鼠模型检测 MS 细胞移植瘤生长能力。结果 化疗后乳腺癌组织内存留丰富的细胞集落,与非黏附性乳腺癌细胞微球一样,可在无血清培养基中连续传代、自我更新,能经血清诱导多向分化,还能在裸鼠体内形成与原发瘤性质相同的移植瘤,表现出干细胞样特性。结论 少次化疗后乳腺癌分化细胞可被有效杀灭,但干/祖细胞仍部分存留,甚至富集,并在组织内形成乳腺癌细胞微球。

【关键词】 乳腺癌; 肿瘤干/祖细胞; 乳腺癌细胞微球; 新辅助化疗

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.01.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)01-0008-03

Observation on stem/progenitor cell clones formation in breast ductal cancer after neoadjuvant chemotherapy* CHEN Yuan-wen¹, QIAO Zheng-rong¹, WU Cheng-yi^{2△}, DONG Hua-ying² (1. Department of General Surgery, Chongqing Municipal Fifth People's Hospital, Chongqing 400062, China; 2. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To observe the stem/progenitor cells survival and the clones formation situation in human breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. **Methods** Human breast cancer stem/progenitor cells were enriched by the nonadherent mammospheres(MS) suspension culture; the serial monoclonal test was performed to determine the clones formation and the self-renewal ability of breast cancer stem cells, and the differentiation ability was detected by the serum induction; the growth ability of MS cell xenograft tumors was detected by the nude mouse model. **Results** Rich cell clones survived in breast cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy, as same as the non-adherent MS, which had continuous passage, self-renewal, multi-directional differentiation, forming xenograft tumor with the character similar to primary tumor and manifested the stemcell-like characteristics. **Conclusion** Breast cancer differentiation cells could be effectively killed after less times chemotherapy, but the partial stem/progenitor cells still survive, even enrich and form breast cancer MS.

【Key words】 breast cancer; cancer stem/progenitor cells; mammosphere; neoadjuvant chemotherapy

肿瘤干/祖细胞具有无限的扩增和自我更新能力,对化疗药物有天然的抵抗力,是影响乳腺癌化疗效果的重要因素之一,也是乳腺癌复发的根源^[1]。为了揭示乳腺浸润导管癌干/祖细胞在化疗后的变化及机制,本研究通过人乳腺癌原代细胞无血清悬浮培养,研究新辅助化疗后乳腺导管癌干/祖细胞克隆形成情况,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 4 月至 2011 年 3 月重庆医科大学附属第一医院收治的经病理检查确诊为乳腺浸润性导管癌的住院患者 55 例,根据是否化疗分为两组,化疗组 25 例,术前接受新辅助化疗方案(多西他赛+表柔吡星+环磷酰胺),接受 1 个疗程化疗 5 例、2 个疗程 5 例和 3 个疗程 15 例。未化疗组 30 例,未接受过化疗。标本的收集征得患者及家属同意,并在血供阻断前从新鲜肿瘤组织边缘,无囊变、坏死、钙化及电凝的部位小心、无菌取材,所取组织立即置于由 DMEM/F12 加抗菌药物制成的标本取样液中,于 15 min 内送至细胞培养室立即处理,如不能立即处理则保存于 4℃ 冰箱,24 h 内完成接种。手术过程中获取 55 例乳腺癌活体标本。

1.2 仪器与试剂 胎牛血清购自杭州四季青公司;DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司;血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自 Peprotech 公司;B27 添加剂购自 Gibco 公司;鼠抗人 CD34 单克隆抗体、鼠抗人 nestin 抗体及抗 ESA 抗体购自迈新生物技术公司;红细胞裂解液购自碧云天生物公司。本实验在重庆市眼科学重点实验室完成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与传代 标本在无菌条件下剪成约 1 mm³ 大小组织块,吸管反复吹打,200 目细胞筛滤过、1 000 r/min 离心 5 min,加入红细胞裂解液离心,去除红细胞、死细胞及其他组织碎片,除去上清液。经此处理,未化疗标本可获取大量单细胞悬液,化疗后标本则获取的是细胞集团,为表述方便称之为“化疗细胞微球”。用含有 20 U/L EGF、20 U/L bFGF 和 2% B27 添加剂的 DMEM/F12 无血清培养基重新悬浮,并接种于培养瓶。3~5 d 换液 1 次。每日在相差显微镜下观察非黏附性乳腺癌细胞微球(MS)的形成和生长过程。待培养瓶内背景干净后,收集 MS,离心后去除上清液,加入含 0.25% 胰酶-EDTA 的磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液,室温下孵育 10 min,

* 基金项目:重庆市卫生局医学科学研究项目(06-2-028)。 作者简介:陈元文,男,主治医师、讲师,外科学博士,主要从事普外科基础与临床研究工作。 △ 通讯作者, E-mail:chengyiw@126.com。

并用巴氏管轻轻吹打,将 MS 酶解成单细胞, $400 \times g$ 离心 5 min, 收集单细胞, 并以 DMEM/F12 重悬, 400 目(孔径 $40 \mu\text{m}$) 细胞筛滤过, 取 1 滴细胞悬液加入 4% 台盼蓝细胞染色, 检测细胞活性, 红细胞计数器下计数细胞数。制作的单细胞悬液供后面实验用。

1.3.2 免疫荧光分析乳腺癌微球细胞表型鉴定 将单细胞悬液涂抹到多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 制作细胞涂片; 略干后以 4% 多聚甲醛固定 10 min 备用; 0.5% Triton 穿孔 15 min; 吸取 1% 山羊血清滴加其上, 置于染色湿盒中, 37°C 孵育 30 min; 加入 1% BSA 稀释的一抗(抗 CD34、抗 nestin、抗 ESA), 于 37°C 孵育 2 h; 加入 1% BSA 稀释的二抗(抗 IgG-FITC 或抗 IgG-Rhodamine), 于 37°C 杂交 1 h; 每步间以 PBS 漂洗 2 次, 每次 5 min。缓冲甘油封片剂封片。荧光显微镜下观察。

1.3.3 二次非黏附性乳腺癌细胞微球培养和单克隆形成实验

将化疗组原代细胞球和未化疗组第 1 代乳腺球单细胞, 以含生长因子的无血清培养液重悬, 细胞计数后以每孔 100 个细胞接种于 24 孔培养板, 进行第 2 次非黏附性乳腺球培养。培养箱内培养 3 周, 每周观察克隆形成情况, 以检测自我更新能力和克隆形成能力。

1.3.4 乳腺微球细胞的诱导分化和逆向分化 取生长状况良好的细胞微球, 重悬于含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 以 1×10^6 /孔接种于放有经多聚赖氨酸预处理盖玻片的 6 孔板中培养, 3~5 d 更换培养基 1 次, 于倒置相差显微镜下动态观察细胞分化和生长情况。培养 10 d 后取出盖玻片。

1.3.5 乳腺球细胞体内成瘤能力分析 参照平轶芳等^[2]的方法。实验用动物为 4~6 周无胸腺雌性裸鼠。动物分为化疗接种组、未化疗接种组和分化细胞接种组(对照组), 每组 5 只。取化疗组“化疗细胞微球”、未化疗组的乳腺球细胞和血清诱导分化的乳腺癌细胞, 经 0.25% 胰酶消化、PBS 洗涤 2 次后, 用 PBS 调整密度为 1×10^6 /mL。按每只裸鼠 0.1 mL (1×10^5 细胞) 细胞悬液接种于裸鼠左前胸部皮下, 各随机接种 5 只裸鼠。继续饲养并观察成瘤情况及肿瘤生长情况。每周测量移植瘤的最长径(L)和最宽径(W)并依据公式计算移植瘤的体积(V): $V=L \times W/2$ 。术后 6 周处死取材, 经 10% 中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 做 $4 \mu\text{m}$ 切片, 用于 HE 染色, 做组织学检查及光镜观察。

2 结果

2.1 大体形态比较 未化疗组标本切面呈灰白色, 组织鲜活, 细胞生长旺盛。接受一个疗程化疗的乳腺癌标本, 可见大片坏死组织和存活组织共存。2 个疗程化疗后标本, 肿块明显缩小, 坏死组织较少; 3 个疗程化疗标本肿块进一步缩小, 结构纤维化, 质地变硬。

2.2 新辅助化疗后乳腺癌组织富含乳腺癌干/祖细胞球 免疫荧光检测 CD34、nestin 蛋白和上皮特异性抗原 ESA, 结果显示所有标本的 CD34 和 nestin 蛋白均未见明显表达, 而上皮特异性抗原 ESA 则呈强阳性表达。标本经机械剪切和 200 目细胞筛滤过后, 重悬并接种于培养瓶中, 立即镜下观察细胞状态。显微镜下可见未化疗组以单细胞为主, 亦可见极少量外形不规则的细胞团, 团内细胞直径小, 细胞间连接松散, 间有结缔组织(图 1); 接种 2~3 d 后, 细胞团均崩解、消失, 单细胞大部分死亡, 只有少量体积较大、较亮的细胞呈悬浮性生长, 并开始分裂形成细胞微球; 术前接受新辅助化疗的 25 例标本, 其中, 经 3 个疗程化疗的 8 例标本镜下鲜见存活的肿瘤细胞, 未能获得足

够的细胞进行培养。另外标本, 镜下所见单细胞较少, 但可见大量细胞团, 呈球形, 外形规则, 团内细胞大, 细胞间连接紧密, 很多细胞尚处在分裂过程中, 细胞间未见明显的纤维结缔组织, 形态与未化疗组形成的细胞微球极其相似(图 2)。这种“化疗细胞微球”在不含生长因子的无血清培养基中可继续存活, 表面少部分细胞死亡, 大部分细胞则持续保持活力。

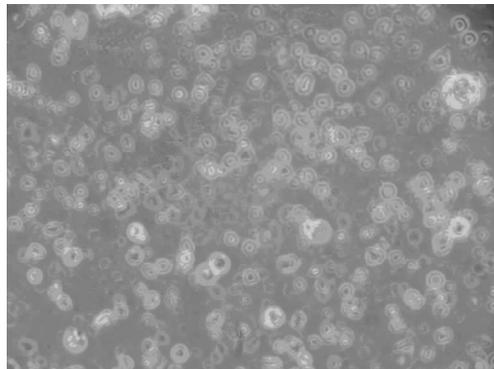


图 1 未化疗患者乳腺癌细胞被分解为单细胞(光镜 $\times 200$)

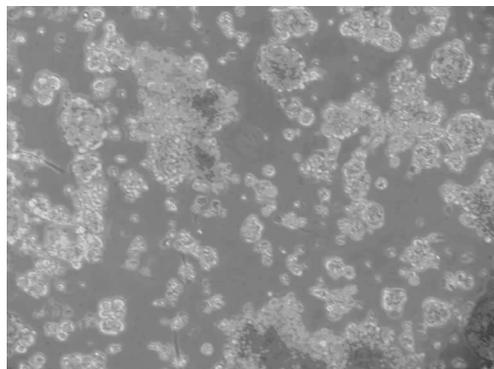


图 2 化疗后患者乳腺癌内的癌细胞集落(光镜 $\times 40$)

2.3 化疗组原代细胞球内细胞具有自我更新能力和克隆形成能力 化疗组的“化疗细胞微球”和未化疗组第 1 代乳腺微球制作成单细胞后, 均可在无血清培养基中继续生长, 再次形成细胞微球, 表现出自我更新和克隆形成能力等干细胞特性。

2.4 化疗组原代细胞球具有多向分化潜能 用胎牛血清对化疗组“化疗细胞微球”和未化疗组乳腺癌细胞微球的细胞诱导分化, 两者均可贴壁分化形成扁平的多突起形细胞。收集这些贴壁细胞制作成单细胞悬液, 进行无血清培养, 可再次形成 MS。

2.5 移植裸鼠的形态学观察 注射“化疗细胞微球”和未化疗组的乳腺球细胞 2 周后, 触摸注射部位形成结, 突出于皮下; 3~4 周, 大体观察隆起物逐渐变大; 6 周时处死动物获取标本, 见标本呈灰白色, 质韧, 较小, 约 $0.5 \sim 1.0 \text{ cm}$, 包绕一层疏松结缔组织。类似于乳腺腺体样组织。对照组的分化细胞未见转移瘤形成。

3 讨论

Dontu 等^[3]借鉴培养神经干细胞的神经细胞球法发展了 MS 培养体系。在这种含 bFGF、EGF 的无血清培养液构成的非黏附、非分化的培养环境中, 乳腺细胞可继续存活并扩增成被称作 MS 的非黏附性细胞集落, 其内的细胞不表达分化腔上皮、肌上皮等分化标志物, 在分化条件下培养具有多系分化的能力, 致瘤性也明显提高, 提示其内的细胞为乳腺干/祖细胞, 即乳腺细胞球是一种乳腺干/祖细胞集落, 非黏附性乳腺细胞微球悬浮培养法也成为乳腺干/祖细胞体外培养的一种常规

方法^[4-5]。

本研究观察到,接受新辅助化疗的标本,组织内的肿瘤细胞主要以由多细胞组成的“化疗细胞微球”形式存在,单细胞很少。这种细胞微球不同于离解不完全的细胞团,主要表现在以下几方面,(1)外形不同:细胞团不规则,团内细胞直径小,细胞间连接松散,间有较多结缔组织。“化疗细胞微球”呈球形,外形规则,团内细胞大,细胞间连接紧密,很多细胞尚处在分裂过程中,细胞间未见明显的纤维结缔组织。(2)在无血清培养基中生长状况不同。(3)构成细胞不同:未化疗组细胞团的主体是分化细胞,而化疗组细胞团以未分化细胞为主。“化疗细胞球”可稳定传代形成克隆,经血清诱导可贴壁分化,1 000 个细胞可在裸鼠体内形成肿瘤,证明其具有自我更新能力、分化能力和成瘤能力等干细胞特性。因此,“化疗细胞球”富含未分化的干/祖细胞。分析其原因,肿瘤干细胞通过不对称性分裂产生大量分化细胞,以对称性分裂进行自我复制。未化疗肿瘤组织内的细胞大部分为分化细胞,干细胞数量极少。由于肿瘤干细胞大多处于细胞周期中的 G₀ 期休眠状态,且高表达多药耐药蛋白和 ATP 结合盒式蛋白,能将进入细胞内的化疗药物泵出;高表达 bcl-2 和 survivin 等抗凋亡蛋白^[6-7],这些特点使得肿瘤干细胞对化疗药物有天然的抵抗力,对常规化疗不敏感。占肿瘤细胞主体的分化细胞,很容易被化疗药物杀灭,肿瘤干细胞得以保留。同时,不对称性分裂方式被抑制,对称性分裂被保留,进行自我复制,形成干/祖细胞集落,即本研究观察到的“化疗细胞球”。

同时本研究还观察到,经过两个疗程化疗的乳腺癌组织内“化疗细胞球”最丰富,3 个疗程后则明显下降。表明化疗药物对乳腺癌干/祖细胞仍有抑制作用,其作用机制可能是对干/祖细胞的杀伤,但更可能是破坏了干/祖细胞生存的微环境^[8],如血管的破坏与纤维化等。因此,少次化疗可有效富集乳腺干/祖细胞,不仅提高实验获取干/祖细胞的效率^[9],还可应用于判断化疗的效果。

本研究显示,3 个疗程的化疗虽然有效杀灭了乳腺癌肿瘤分化细胞,但干/祖细胞仍部分存留,提示乳腺癌化疗应坚持 3 个疗程以上。

参考文献

[1] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. PNAS, 2003, 100(7):3983-3988.

[2] 平秋芳, 卞修武, 姚小红, 等. 人胶质瘤干细胞趋化因子受体 CXCR4 活化促进血管生成的作用[J]. 中华病理学杂志, 2007, 36(3):179-183.

[3] Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells[J]. Genes Dev, 2003, 17(10):1253-1270.

[4] Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, et al. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e64388.

[5] Paranjape AN, Mandal T, Mukherjee G, et al. Introduction of SV40ER and hTERT into mammospheres generates breast cancer cells with stem cell properties[J]. Oncogene, 2012, 31(15):1896-1909.

[6] 李治, 黄韬, 贺艳丽, 等. 乳腺癌干细胞逃逸化疗机制的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1):20-21.

[7] 沈松杰, 孙强. 乳腺癌化疗耐药中肿瘤干细胞的作用及其机制[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(16):1312-1315.

[8] Sun H, Jia J, Wang X, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells isolated from MCF-7 cultures exhibit enhanced angiogenic properties[J]. Clin Transl Oncol, 2013, 15(1):46-54.

[9] 李海志, 易彤波, 武正炎. 悬浮培养联合化疗药物筛选乳腺癌干细胞[J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(3):172-175.

(收稿日期:2013-06-18 修回日期:2013-09-08)

(上接第 7 页)

anterior communicating artery; five-fold increased incidence of rupture[J]. Neurosurgery, 2011, 68(3):731-737.

[3] Chae KS, Jeon P, Kim KH, et al. Endovascular coil embolization of very small intracranial aneurysms[J]. Korean J Radiol, 2010, 11(5):536-541.

[4] Heller R, Calnan DR, Lanfranchi M, et al. Incomplete stent apposition in Enterprise stent-mediated coiling of aneurysms: persistence over time and risk of delayed ischemic events[J]. J Neurosurg, 2013, 118(5):1014-1022.

[5] Chalouhi N, Campbell P, Makke Y, et al. Treatment of complex intracranial aneurysms with a telescoping stent technique[J]. J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2012, 73(5):281-288.

[6] Hauck EF, Tawk RG, Karter NS, et al. Use of the out-reach distal access catheter as an intracranial platform facilitates coil embolization of select intracranial aneurysms: technical note[J]. J Neurointerv Surg, 2011, 3(2):

172-176.

[7] O'Kelly CJ. Should stents be used in the treatment of ruptured intracranial aneurysms[J]. J Neurosurg Sci, 2011, 55(1):27-33.

[8] Ioannidis I, Lalloo S, Corkill R, et al. Endovascular treatment of very small intracranial aneurysms[J]. J Neurosurg, 2010, 112(3):551-556.

[9] Hwang JH, Roh HG, Chun YI, et al. Endovascular coil embolization of very small intracranial aneurysms [J]. Neuroradiology, 2011, 53(5):349-357.

[10] Signorelli F, Scholtes F, Bojanowski MW. Very small intracranial aneurysms: Clip or coil [J]. Neurochirurgie, 2012, 58(2/3):156-159.

[11] 李晓玲, 陈艳, 张紫寅. 支架辅助微弹簧圈栓塞颅内宽颈动脉瘤的疗效分析[J]. 四川解剖学杂志, 2011, 19(4):4-6.

(收稿日期:2013-06-19 修回日期:2013-08-30)