

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.003

· 研究快报 ·

5-FU 对小鼠乳腺癌 4T1 细胞株中肿瘤干细胞样细胞的富集作用

王欣荣^{1,2}, 刘登湘³, 刘丽华⁴, 单保恩² (1. 邢台市人民医院 检验科, 河北 邢台 054001; 2. 河北医科大学 第四医院, 临床生物细胞科, 河北 石家庄 050011; 3. 邢台市人民医院 生物治疗实验室, 河北 邢台 054001; 4. 河北医科大学 第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:**探讨以氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)处理并通过荷瘤小鼠模型体内传代的方法富集乳腺癌干细胞样细胞的可行性,为靶向肿瘤干细胞治疗奠定基础。**方法:**以乳腺癌细胞株4T1皮下接种小鼠制备荷瘤模型,以一定剂量5-FU腹腔注射4周;处死小鼠后取肿瘤组织制成细胞悬液,并接种小鼠制备下一代小鼠荷瘤模型,5-FU处理及再次传代方法同上,共传4代。对照组小鼠给予生理盐水注射,其余处理同模型组。流式细胞术检测各代肿瘤组织中CD44⁺CD24^{-/low}细胞比例, Hoechst 33342染色法检测侧群(side population, SP)细胞的比例,免疫组化法检测CD55和ALDH1蛋白的表达,倒置显微镜观察乳腺癌细胞微球体的形成,小鼠致瘤实验检测不同肿瘤细胞的致瘤能力。**结果:**各代对照组小鼠模型肿瘤组织中CD44⁺CD24^{-/low}细胞比例为(11.5±0.9)%, SP细胞比例为(9.7±1.3)%, ALDH1表达阴性, CD55强阳性表达细胞数为(0.6±0.3)%, 乳腺癌细胞微球体比例为(0.5±0.2)%; 5-FU处理组4代小鼠模型肿瘤组织中CD44⁺CD24^{-/low}细胞比例分别为(49.8±1.2)%、(56.8±1.7)%、(66.4±1.5)%、(69.0±1.6)%, SP细胞比例分别为(25.0±1.2)%、(42.6±2.8)%、(58.4±2.1)%、(61.3±2.6)%, ALDH1阳性表达细胞比例为(3.8±0.7)%、(14.1±2.4)%、(25.2±3.1)%、(27.5±2.7)%, CD55强阳性细胞比例为(7.8±1.6)%、(10.1±2.0)%、(15.6±1.4)%、(17.3±1.9)%, 乳腺癌细胞微球体形成比例为(5.9±0.4)%; 两组各相应指标之间差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。5-FU作用后富集了肿瘤干细胞的第3代肿瘤细胞的致瘤作用显著强于对照组细胞($P < 0.05$)。**结论:**5-FU作用并通过荷瘤小鼠体内传代能够富集小鼠乳腺癌4T1细胞株中的肿瘤干细胞样细胞。

[关键词] 乳腺癌4T1细胞株; 乳腺癌干细胞; 5-氟尿嘧啶; 化学治疗

[中图分类号] R737.9; Q279

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0478-08

Enriching effect of 5-fluorouracil on cancer stem cell-like cells from mouse breast cancer cell line 4T1

WANG Xin-rong^{1,2}, LIU Deng-xiang³, LIU Li-hua⁴, SHAN Bao-en² (1. Laboratory Department, People's Hospital of Xingtai, Xingtai 054001, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Laboratory of Biotherapy, People's Hospital of Xingtai, Xingtai 054001, Hebei, China; 4. Department of Clinical Bio-cell Therapy, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possibility of enriching breast cancer stem cell-like cells by cell passage in a tumor-bearing mouse model treated with 5-fluorouracil (5-FU) *in vivo* and to lay a foundation for cancer stem cell-targeted therapy. **Methods:** To establish a tumor-bearing model by inoculating breast cancer cell line 4T1 into mouse subcutaneously. 5-FU was injected into these mice intraperitoneally according to different groups. The mice were executed 4 weeks after injection. Cell suspension made from mouse tumor was injected into the mice again to establish the next generation of tumor-bearing mouse model. The mice were treated with 5-FU in the third and fourth generation as above. Four genera-

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(No. 2012206135);邢台市科技计划资助项目(No. 2012-ZC-085)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. 2012206135), and the Science and Technology Research Program of Xingtai City (No. 2012-ZC-085)

[作者简介] 王欣荣(1971-),女,硕士,主要从事肿瘤干细胞方面的研究。E-mail: xinrongwang2009@yahoo.com.cn

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoshan@yahoo.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120926.0850.005.html>

tions of the mouse model were established in all. The mice in control group were injected with normal saline instead of 5-FU, and the following four generation tumor-bearing models were treated as 5-FU group. Flow cytometry was used to measure the proportion of $CD44^+ CD24^{-/low}$ cells in different tumor tissues; Hoechst 33342 staining was used to measure the proportion of SP (side population) cells; and expressions of ALDH1 and CD55 proteins were detected by immunohistochemistry. The formation of mammospheres was observed under an inverted microscope. Tumorigenic ability of different tumor cells was detected by mouse tumorigenesis experiment. **Results:** In the control group, the proportion of $CD44^+ CD24^{-/low}$ cells in mouse tumor was $(11.5 \pm 0.9)\%$, and the proportion of SP cells was $(9.7 \pm 1.3)\%$. The expression level of ALDH1 was negative, the proportion of cells in which CD55 was highly expressed, was $(0.6 \pm 0.3)\%$, and the proportion of mammospheres was $(0.5 \pm 0.2)\%$. While in 5-FU treated group, the proportions of $CD44^+ CD24^{-/low}$ cells were respectively $(49.8 \pm 1.2)\%$, $(56.8 \pm 1.7)\%$, $(66.4 \pm 1.5)\%$ and $(69.0 \pm 1.6)\%$; the proportions of SP cells were respectively $(25.0 \pm 1.2)\%$, $(42.6 \pm 2.8)\%$, $(58.4 \pm 2.1)\%$ and $(61.3 \pm 2.6)\%$; the proportions of cells in which ALDH1 was positively expressed, were respectively $(3.8 \pm 0.7)\%$, $(14.1 \pm 2.4)\%$, $(25.2 \pm 3.1)\%$ and $(27.5 \pm 2.7)\%$, and the proportions of cells in which CD55 were highly expressed, were respectively $(7.8 \pm 1.6)\%$, $(10.1 \pm 2.0)\%$, $(15.6 \pm 1.4)\%$ and $(17.3 \pm 1.9)\%$, and the proportion of mammospheres was $(5.9 \pm 0.4)\%$. The significant differences were found between the two groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The third generation tumor cells enriching cancer stem cells were more tumorigenic than the control tumor cells. **Conclusion:** 5-FU enriches the cancer stem cell-like cells in mouse breast cancer cell line 4T1 by the cell passage in the tumor-bearing mouse model *in vivo*.

[**Key words**] breast cancer cell line 4T1; breast cancer stem cell; 5-fluorouracil; chemotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 478-485]

肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)学说的提出为癌症研究提供了崭新的思路^[1],使通过靶向性杀死肿瘤干细胞从而根治肿瘤和防止肿瘤的复发和转移成为可能。目前,在多种肿瘤中已发现并鉴定出 CSC,包括白血病^[2]、乳腺癌^[3]、脑肿瘤^[4,5]、肝癌^[6-7]、结肠癌^[8-9]等,而乳腺癌干细胞作为第一个在实体瘤中被鉴定的 CSC 受到了广泛的关注。通过靶向杀灭 CSC 彻底治愈恶性肿瘤,是当前肿瘤研究的新方向。因为缺乏特异性的表面标志,肿瘤干细胞的分离方法主要是富集 CSC,分选出的只是富含 CSC 的细胞^[10],乳腺癌肿瘤干细胞的研究同样如此。如何筛选出更接近源头的乳腺癌干细胞,是对其开展靶向治疗的关键。目前富集和分离乳腺癌干细胞的主要方法有:流式细胞仪检测细胞表面标记物 $CD44^+ CD24^{-/low}$ ^[3],Hoechst 33342 染色分选侧群(side population, SP)细胞^[11]和无血清微球体培养法^[10,12]。利用化疗方法获取富含乳腺癌 CSC 的动物模型已有报道,经过多柔比星处理和多次传代形成的小鼠移植瘤细胞传代力、成瘤力和侵袭转移能力较强,可以富集大量的 CSC^[13]。本研究利用一定剂量氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)建立富含乳腺癌干细胞的小鼠模型,检测模型肿瘤组织中 $CD44^+ CD24^{-/low}$ 和 SP 细胞比例、ALDH1 和 CD55 蛋白的表达、细胞微球体形成比例,以及肿瘤细胞的成瘤能力,探讨该模型富集和扩增乳腺癌细胞中 CSC

的作用,为进一步研究乳腺癌干细胞的逃逸机制和靶向乳腺癌干细胞的抗癌治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

小鼠乳腺癌细胞株 4T1 由河北医科大学第四医院科研中心提供。优级胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司,DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司,EGF 和 bFGF 购自 Peprotech 公司,B27 购自 Invitrogen 公司,胰岛素购自万邦医药公司,染料 Hoechst 33342 购自 Sigma 公司。大鼠抗小鼠或人 CD44-PE 单克隆抗体(克隆号 KM114)和大鼠抗小鼠 CD24-FITC 单克隆抗体(克隆号 M1/69)购自美国 SANTA CRUZ 公司,兔抗小鼠或大鼠 CD55 多克隆抗体(克隆号 H-319)购自美国 SANTA CRUZ 公司,兔抗小鼠或大鼠 ALDH1 单克隆抗体(克隆号 EP1933Y)购自美国 ABcam 公司。氟尿嘧啶注射液购自天津金耀氨基酸有限公司。BALB/c 雌性小鼠购自河北医科大学实验动物中心(合格证号 905012、906216、906607、908157)。

1.2 4T1 细胞培养

4T1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于 5% CO_2 培养箱中 37 °C 培养,以 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞传代,取对数生长期细胞用于实验。收集细胞后,用 PBS 液洗涤 2 次,

锥虫蓝染色检测细胞存活力 $\geq 95\%$, 用 PBS 液调整单细胞悬液密度为 $7.5 \times 10^6/\text{ml}$, 备用。

1.3 富集乳腺癌 CSC 小鼠模型的建立

BALB/c 雌性小鼠 20 只, 用碘伏消毒小鼠接种部位, 6 号注射器针头吸取 4T1 细胞悬液 0.2 ml (含有 1.5×10^6 个细胞) 接种于小鼠右肩胛皮下。将小鼠随机分成对照组和 5-FU 处理组, 每组 10 只, 对照组小鼠给予生理盐水 0.2 ml, 5-FU 处理组给予 0.2 mg/ml 的 5-FU 0.2 ml, 腹腔注射。接种后 48 h 开始用药, 每天 1 次, 共用 7 d, 7 d 后改为每周 1 次, 共 4 周。4 周后引颈处死小鼠, 无菌取小鼠肿瘤组织, 并将肿瘤组织分为 3 份: 一份以中性甲醛固定进行免疫组化检测; 一份以组织研磨器研磨制成细胞悬液, 用以流式细胞术检测 $\text{CD44}^+ \text{CD24}^{-/\text{low}}$ 细胞比例和 Hoechst 33342 染色荧光显微镜下检测 SP 细胞比例; 另一份用组织研磨器研磨制成细胞悬液, 200 目滤网滤过, PBS 液洗涤 2 次, 锥虫蓝染色并计数, 用 PBS 调整活细胞密度为 $7.5 \times 10^6/\text{ml}$, 同上法接种 BALB/c 小鼠, 制作第二代富含 CSC 的小鼠模型, 如此重复共制作 4 代小鼠模型。

1.4 应用流式细胞术检测小鼠肿瘤组织中 $\text{CD44}^+ \text{CD24}^{-/\text{low}}$ 细胞比例

将对照组和 5-FU 处理组各代小鼠模型肿瘤组织研磨, 制成细胞悬液, 过 200 目滤网, $700 \times g$ 离心 5 min 去除细胞碎片, PBS 液洗涤 2 次, 锥虫蓝染色计数, 以 PBS 调整细胞密度为 $1 \times 10^4/\mu\text{l}$ 。设实验组和同型对照组, 实验组加入 $\text{CD44-PE } 10\mu\text{l}$ 和 $\text{CD24-FITC } 5\mu\text{l}$, 对照组加入同剂量的同型对照抗体, 常温避光温育 24 h 后用流式细胞仪检测 $\text{CD44}^+ \text{CD24}^{-/\text{low}}$ 细胞比例, 常规检测两次。

1.5 应用 Hoechst 33342 染色法检测小鼠肿瘤组织中 SP 细胞比例

将对照组和 5-FU 处理组各代小鼠模型肿瘤组织研磨, 过 200 目滤网, 制成细胞悬液, $700 \times g$ 离心 5 min 去除细胞碎片, PBS 液洗涤 2 次, 锥虫蓝染色计数。取 1×10^6 个单细胞加入 Hoechst 33342 染液至终质量浓度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 37°C 水浴 90 min, 每 15 min 震荡混匀一次, $1\ 000 \times g$ 离心 5 min, PBS 液洗 2 次, 弃上清, 涂片, 于荧光显微镜下以蓝色荧光观察并利用 Image capture 软件拍照, 随机计数 10 个视野中的细胞总数及核无荧光染色细胞 (SP 细胞) 数, 计算核无荧光染色细胞百分数, 即 SP 细胞比例。

1.6 免疫组化法检测小鼠肿瘤组织中 CD55 和 ALDH1 蛋白的表达

CD55 表达于胞质和胞膜, 强阳性表达的细胞呈

棕黄色, 弱阳性表达的细胞呈浅黄色。ALDH1 表达于胞质, ALDH1 阳性表达的细胞呈棕黄色, 阴性表达的细胞呈蓝紫色。计数 1 000 个肿瘤细胞, 并分别计算 CD55 强阳性表达细胞及 ALDH1 阳性表达细胞的比例。

1.7 无血清培养乳腺癌细胞微球体的形成

将各代对照组和 5-FU 处理组小鼠的肿瘤于无菌条件下研磨, 过 200 目滤网, 制成细胞悬液, $700 \times g$ 离心 5 min 去除细胞碎片, PBS 液洗涤 2 次, 经锥虫蓝染色并计数后分别以 $3 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞密度接种到培养瓶中, 以无血清 DMEM/F12 培养基^[14,15] (含 20 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF、1:50 的 B27 添加剂及 5 U/L 胰岛素) 于 5% CO_2 培养箱中 37°C 培养, 2~3 d 离心换液。微球体形成后, $700 \times g$ 离心 5 min, 收集微球体, 将 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 用 PBS 5 倍稀释后消化微球体细胞, 机械吹打使之分离成单个细胞, 再以 $3 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞密度传代于培养瓶, 继续培养于无血清 DMEM/F12 培养基中, 约每 12 d 传代一次。第 12 天微球体形成时计数其中的微球体数目, 计算微球体形成比例。微球体形成比例 (%) = 微球体数目/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.8 动物致瘤实验

雌性 BALB/c 小鼠共 25 只, 抽签法随机分为 5 组, 分组和接种细胞数量情况见表 1。将第三代对照组和 5-FU 处理组小鼠肿瘤组织于无菌条件下研磨, 过 200 目滤网, 制成细胞悬液, $700 \times g$ 离心 5 min 去除细胞碎片, PBS 液洗涤 2 次, 锥虫蓝染色检测细胞的活力。以表 1 中所描述的细胞数量分别接种于小鼠左、右肩胛皮下, 每部位接种 0.2 ml。每 5 d 触摸检查小鼠一次, 观察 12 周, 统计肿瘤生成情况。

表 1 动物致瘤实验及接种情况 (n)

Tab. 1 Animal tumorigenesis experiment and inoculation of cells (n)

Group	N	Left shoulder Pare-4T1 cell	Right shoulder 4T1-3rd cell
A	5	2×10^2	2×10^2
B	5	2×10^3	2×10^3
C	5	2×10^4	2×10^4
D	5	2×10^5	2×10^5
E	5	2×10^6	2×10^6

1.9 H-E 染色观察小鼠移植瘤组织学形态

致瘤实验生成的小鼠肿瘤组织标本, 经中性甲

醛固定 24 h,将组织块切成厚 0.5 cm 大小,放入乙醇-甲醛液中固定 2 h 后移入 95% 乙醇中过夜;经无水乙醇、二甲苯梯度脱水;浸蜡;包埋制备成石蜡块。石蜡标本常规 4 μm 连续切片,进行 H-E 染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两个独立样本组间均数比较用 *t* 检验,多组的组间比较用方差分析,两个样本组间致癌性差异分析采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立富含乳腺癌 CSC 样细胞的小鼠模型

将 4T1 细胞接种小鼠,5~6 d 可摸到有肿瘤形成,给予 5-FU 处理后,以 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例作为检测指标。结果显示,小鼠肿瘤组织中 CSC 比例增加,且随着小鼠传代 CSC 比例逐渐增加,至第 3

代达到高峰;第 4 代小鼠肿瘤组织中 CSC 比例与第 3 代小鼠接近,CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例可达 (69.0 ± 1.6)%,显著高于对照组的(11.5 ± 0.9)% ($P < 0.01$)。将从 5-FU 处理组第 1、2、3、4 代小鼠肿瘤组织分离获得的细胞分别命名为 4T1-1st、4T1-2nd、4T1-3rd、4T1-4th 细胞,对照组小鼠肿瘤组织分离的细胞命名为 Pare-4T1 细胞。

2.2 各代模型小鼠肿瘤组织中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞的比例

FCM 检测结果(图 1)显示,各代对照组小鼠肿瘤组织中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例无明显差异,为 (11.5 ± 0.9)%;用 5-FU 处理后的第 1、2、3、4 代小鼠肿瘤中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞分别为(49.8 ± 1.2)%、(56.8% ± 1.7)%、(66.4 ± 1.5)%、(69.0 ± 1.6)% ,均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。随着传代次数的增加,5-FU 处理组中 CD44⁺CD24^{-/low} 细胞比例逐渐升高,除第 3、4 代之间差异不明显($P > 0.05$)外,其他各代之间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

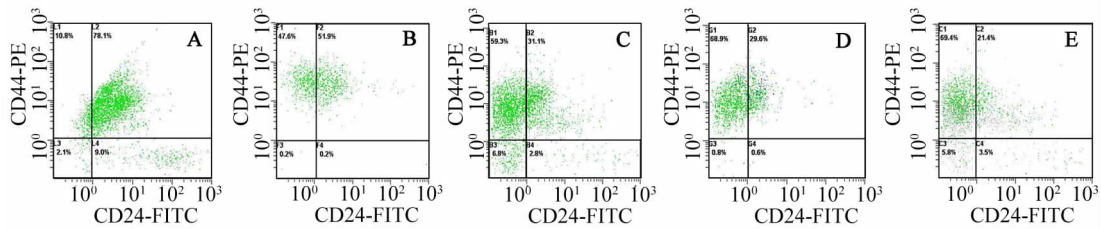


图 1 流式细胞术分析不同肿瘤组织中 CD44、CD24 的表达

Fig. 1 Expressions of CD44 and CD24 in different tumor tissues detected by flow cytometry analysis

A: Pare-4T1 cells; B: 4T1-1st cells; C: 4T1-2nd cells; D: 4T1-3rd cells; E: 4T1-4th cells

2.3 各代模型小鼠肿瘤组织中 SP 细胞的比例

Hoechst 33342 染色结果(图 2)显示,各代对照组小鼠肿瘤组织中 SP 细胞比例无明显差异,平均为 (9.7 ± 1.3)%;5-FU 处理组第 1、2、3、4 代小鼠肿瘤组织中 SP 细胞比例分别为 (25.0 ± 1.2)%、

(42.6 ± 2.8)%、(58.4 ± 2.1)%、(61.3 ± 2.6)% ,均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。随着传代次数的增加,各 5-FU 处理组 SP 细胞比例逐渐升高,除第 3、4 代之间差异不明显($P > 0.05$)外,其他各代之间差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

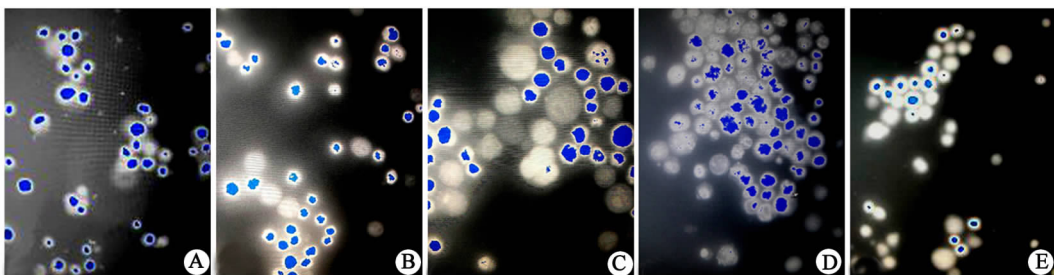


图 2 Hoechst 33342 染色法检测不同肿瘤组织中 SP 细胞的比例(×100)

Fig. 2 Proportion of SP cells in different tumor tissues detected by Hoechst 33342 staining(×100)

A: Pare-4T1 cells; B: 4T1-1st cells; C: 4T1-2nd cells; D: 4T1-3rd cells; E: 4T1-4th cells

2.4 各代模型小鼠肿瘤组织中 CD55 和 ALDH1 蛋白的表达

免疫组化结果(图 3)显示,对照组小鼠肿瘤组织中 ALDH1 表达阴性,CD55 强阳性表达细胞数为(0.6 ± 0.3)% ;5-FU 处理组第 1、2、3、4 代小鼠肿瘤组织中 ALDH1 阳性表达细胞比例为(3.8 ± 0.7)%、(14.1 ± 2.4)%、(25.2 ± 3.1)%、(27.5 ± 2.7)% , CD55 强阳性表达细胞比例为(7.8 ± 1.6)%、(10.1 ± 2.0)%、(15.6 ± 1.4)%、(17.3 ± 1.9)% ,均显著高于对照组($P < 0.01$)。

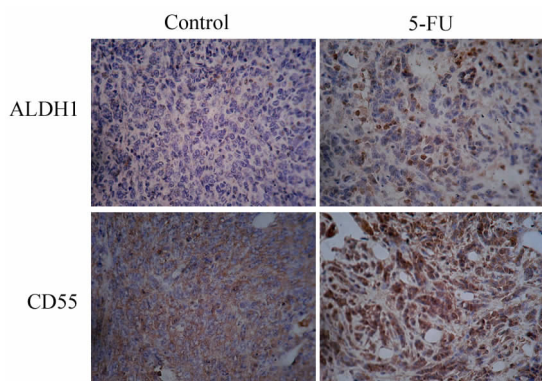


图 3 ALDH1 和 CD55 在不同肿瘤组织中的表达(SP, ×200)
Fig. 3 Expressions of ALDH1 and CD55 in different tumor tissues (SP, ×200)

2.5 无血清培养模型小鼠肿瘤细胞微球体的形成情况

在不同时间点用倒置相差显微镜观察无血清培养小鼠肿瘤细胞生长情况。24 h 时,大部分细胞贴壁。48 h 后,开始有部分细胞因不适应无血清环境呈凋亡状态。第 4 天时约 70% 细胞凋亡和坏死,部分细胞悬浮并出现增殖。第 6 天时可见微球体形成,约有 5~8 个细胞组成,悬浮于培养基中,贴壁细胞进一步减少。随后,悬浮细胞球体积增大,至第 12 天可长至上百个细胞,贴壁细胞基本消失。将微球体消化分离后传代,在无血清培养基中又可形成悬浮微球体,如此重复,细胞数量可明显扩增。

实验结果(图 4、5)显示,第 3 代 Pare-4T1 细胞的微球体形成效率为(0.5 ± 0.2)% ,4T1-3rd 细胞的微球体形成效率为(5.9 ± 0.4)% ,后者约是前者的 12 倍($P < 0.01$)。4T1-3rd 细胞形成的第 1 代微球体可以传代形成相同比例的第 2、3 代微球体,且可传至 5 代;而 Pare-4T1 细胞形成的微球体仅传 3 代后就不再形成细胞球,变得黏附并开始分化。4T1-4th 细胞无血清培养形成微球体的比例为

(6.1 ± 0.3)% ,与第 3 代相比无明显差异($P > 0.05$)。

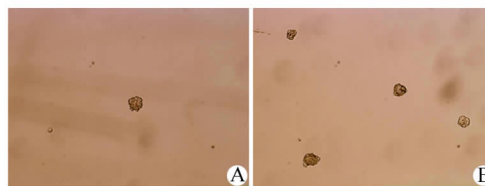


图 4 不同肿瘤细胞无血清培养 12 d 时微球体的形成(×200)
Fig. 4 Mammospheres on day 12 generated from different tumor cells(×200)
A: Pare-4T1 cells; B: 4T1-3rd cells

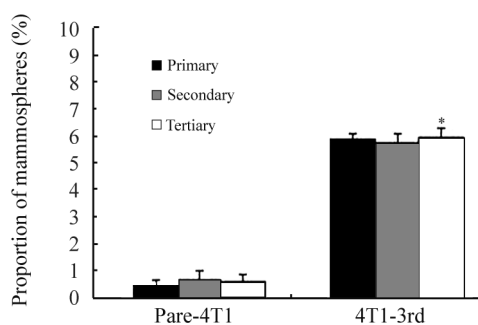


图 5 4T1-3rd 细胞和 Pare-4T1 细胞无血清培养时微球体的形成效率

Fig. 5 Proportion of mammospheres formation of 4T1-3rd cells and Pare-4T1 cells in serum-free culture
* $P < 0.01$ vs Pare-4T1

2.6 第 3 代模型小鼠肿瘤组织细胞有较强的致瘤能力
动物致瘤实验结果(表 2)显示,接种不同数量(2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 个)4T1-3rd 细胞 2.5 个月,在接种细胞处均可见肿瘤生成,而接种 2×10^2 个 4T1-3rd 细胞处未见肿瘤生成。接种 2×10^5 和 2×10^6 个 Pare-4T1 细胞处可见肿瘤形成,而接种 2×10^3 、 2×10^4 个 Pare-4T1 细胞处未见肿瘤形成。接种 Pare-4T1 细胞和 4T1-3rd 细胞的小鼠在肿瘤形成后均发现有肝、肺的转移,但两者无明显差异。

表 2 接种不同 4T1 细胞小鼠的成瘤情况(n)
Tab. 2 Incidence of tumor formation in mouse by inoculating different 4T1 cells(n)

Cell	Cell number				
	2×10^2	2×10^3	2×10^4	2×10^5	2×10^6
Pare-4T1	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5
4T1-3rd	0/5	1/5	2/5	4/5*	5/5

* $P < 0.05$ vs Pare-4T1 group

经 H-E 染色光镜下观察肿瘤组织(图 6)显示,所有小鼠肿瘤组织均为乳腺癌组织。接种 4T1-3rd 细胞和 Pare-4T1 细胞生成的小鼠乳腺癌组织在形态学上比较无明显差异。

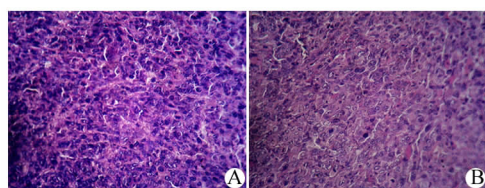


图 6 不同模型小鼠移植瘤组织的病理形态(H-E, $\times 200$)

Fig. 6 Pathological morphology of transplant tumor tissues within different mouse models (H-E, $\times 200$)

A: Pare-4T1; B: 4T1-3rd

3 讨论

肿瘤干细胞理论的提出促使人们重新认识肿瘤细胞的生物学特性,揭开了肿瘤治疗的新篇章。靶向杀灭 CSC 从而彻底治愈恶性肿瘤,是当前肿瘤研究的新方向。肿瘤干细胞是否存在已知或未知的特异性表面标记物尚不清楚,利用已知的表面标记物凭经验筛选 CSC 的方法有些盲目且工作量极大,而流式细胞仪的分选过程也会对细胞造成伤害。分离 SP 细胞的方法从肿瘤干细胞的特性入手,但 Hoechst 33342 对细胞的毒害作用限制了它的进一步应用。无血清微球体悬浮培养法是目前富集 CSC 的一种常用方法^[10,12],被广泛用于富集包括乳腺癌干细胞的各种 CSC,但利用微球体培养获得的细胞数量也很有限。

根据肿瘤干细胞学说,CSC 大多处于休眠状态,停滞于细胞周期中的 G_0 期,高表达 Bcl-2 家族、ABCG2 及多药耐药蛋白 MDR^[16-17],能够快速并有效地将药物排出细胞,因此产生化疗抵抗,对常规化疗不敏感。一些学者认为,肿瘤干细胞的存在正是耐药性产生的关键^[18-20]。Dean 等^[21]在 2005 年提出了耐药 CSC 假说,认为耐药的 CSC 是诱导化疗抵抗的主要细胞。基于这个理论,人们设想利用低剂量化疗药物富集干细胞,该方法简单易行、成本较低。杨松等^[22]利用 5-FU 成功富集了人白血病细胞系 KG-1a 中肿瘤干细胞样亚群细胞 $CD34^+ CD38^-$ 。杨玥等^[23]利用 5-FU 富集了肝癌细胞系 BEL-7402 中的肿瘤干细胞样细胞。但上述研究中获取的肿瘤干细胞在体外的培养过程中容易分化,导致所获得的 CSC 比例降低。本研究采用 CSC 在小鼠体内传代

的方法进而获得高纯度的 CSC。由于异种移植对移植的成功率有所影响,为保证动物致瘤实验的成功,本实验选择来源于 BALB/c 近交系小鼠的乳腺癌细胞株 4T1,尽可能地排除移植时的免疫排斥反应。对小鼠模型给予 5-FU 处理后,杀死了大多数肿瘤细胞,而对化疗抵抗的 CSC 可以存活下来,肿瘤组织中的干细胞比例就会增加,CSC 经过在小鼠体内传代使得数量进一步扩增。本实验结果显示,经 5-FU 作用后小鼠模型第 1、2、3、4 代乳腺癌细胞中,以实验设定的四种指标检测,CSC 样细胞含量均大大提高,说明 5-FU 可以富集小鼠模型中的乳腺癌 CSC。

$CD44^+ CD24^{-/low}$ 是乳腺癌 CSC 公认的标志物,但研究表明,它并不是乳腺癌 CSC 特异的表面标记物,例如人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中 $CD44^+ CD24^{-/low}$ 比例高达 $(85 \pm 5)\%$,不符合干细胞仅占细胞总数一小部分的理论^[24],所以需要综合利用多种标志物对 CSC 进行确认。CSC 高表达 ABC 转运子蛋白使得荧光染料 Hoechst 33342 排出细胞,能够将 Hoechst 33342 排出的细胞就是所谓的 SP 细胞^[16]。Hoechst 33342 染料排出实验原来是证明鼠造血干细胞的分离的^[25],后来有证据表明干细胞也可能具有 SP 表型^[26],因此这个实验被成功地用来鉴定不同实体瘤包括乳腺癌中 CSC 样细胞的存在。CD55 是一种补体衰变加速因子,CD55 与肿瘤细胞的活动度、致癌性、侵袭及转移等有关。Xu 等^[27]发现,从 MCF-7 中分离出的 $CD55^{high}$ 、 $CD55^{low}$ 分别落在 SP、MP 部分, $CD55^{high}$ 群细胞可能是一群肿瘤干细胞样性质的细胞,因此,利用检测 CD55 也成为评价 CSC 含量的一个标志方法。ALDH1 已成为分选和鉴定干细胞和 CSC 的通用标志物之一,是 CSC 研究的得力工具^[28]。Ginestier 等^[29]发现,ALDH1 是乳腺癌干细胞的标志物。Croker 等^[30]和 Jauffret 等^[31]研究发现,ALDH1 联合其他方法分选乳腺癌干细胞可以提高分选效率,并且可以评估乳腺癌的预后。本研究利用 $CD44^+ CD24^{-/low}$ 细胞、SP 细胞、ALDH1 和 CD55 表达这四种指标对 5-FU 富集的 CSC 进行了检测,结果表明,通过 5-FU 富集,CSC 样细胞比例大大提高。实验同时也进一步证明,CD55 和 ALDH1 检测也可以作为乳腺癌 CSC 新的标志物,在评价乳腺癌干细胞含量时与乳腺癌干细胞公认的标志物 $CD44^+ CD24^{-/low}$ 细胞数量存在相关性,可作为补充使用。

有研究^[13]认为,小鼠模型第 3 次传代形成的移植瘤细胞传代力、成瘤力和侵袭转移能力较强,可以富集大量 CSC,本实验结果和该种说法基本相一致。

无血清微球体培养应用于干细胞的体外培养, 主要是通过其限制了细胞的贴壁分化, 维持了干细胞的未分化状态^[32]。微球体的形成反映细胞的自我更新能力和无限增殖能力, 微球体形成数目反映了具有自我更新能力细胞的数量。本实验结果表明, 第 3 代小鼠肿瘤细胞 4T1-3rd 的微球体形成率约是 Pare-4T1 细胞的 12 倍, 这说明 4T1-3rd 细胞的自我更新能力大大提高。4T1-3rd 细胞形成的第 1 代微球体可以传代形成相同比例的第 2、3 代微球体, 且可传至第 5 代, 而 Pare-4T1 细胞形成的微球体仅能传至第 3 代后就不再形成细胞球, 说明 4T1-3rd 细胞的体外传代力较强。

驱动并维系肿瘤的发生、发展是肿瘤干细胞最本质的特征, 肿瘤细胞动物致瘤实验是确定肿瘤干细胞特性的一个重要指标^[33]。本研究的小鼠致瘤实验结果显示, 接种 2×10^3 个 4T1-3rd 细胞于小鼠即可形成肿瘤, 而接种 Pare-4T1 细胞需 2×10^5 个才有肿瘤形成, 提示 4T1-3rd 细胞的致瘤能力约是 Pare-4T1 细胞的 100 倍, 说明经 5-FU 作用后的第 3 代移植瘤细胞致瘤力大大增强, 再次验证了利用化疗药物 5-FU 富集 CSC 是成功的。小鼠 4T1 乳腺癌细胞系致瘤性强、具有高转移特性, 形成的肿瘤在生长的早期即发生转移, 这也许是 Pare-4T1 细胞和 4T1-3rd 细胞侵袭转移能力无明显差异的原因。

本实验通过化疗药物富集法在小鼠体内富集了乳腺癌 CSC 样细胞, 并利用多种乳腺癌 CSC 标志物和致瘤性实验证实了富集 CSC 是成功的。但是, 富集 CSC 只是 CSC 特性研究的基础性工作, 仅为寻找靶向杀伤 CSC 的方法提供必要的实验基础。只有深入研究这些细胞的特性, 从分子水平找到癌变的机制, 研制出靶向 CSC 的药物, 才能有望治愈肿瘤。

[参 考 文 献]

[1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.

[2] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7): 730-737.

[3] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 3983-3988.

[4] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5821-5828.

[5] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. Nature, 2004, 432(7015): 396-401.

[6] Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties [J]. Hepatology, 2006, 44(1): 240-251.

[7] Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, et al. Characterization of CD133⁺ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351(4): 820-824.

[8] O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. Nature, 2007, 445(7123): 106-110.

[9] Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells [J]. Nature, 2007, 445(7123): 111-115.

[10] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5506-5511.

[11] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ cancer cells are similarly tumorigenic [J]. Cancer Res, 2005, 65(14): 6207-6219.

[12] Phillips TM, 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.

[13] Yu F, Yao H, Zhu P, et al. Let-7 regulates self-renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131(6): 1109-1123.

[14] 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.

[15] 仇波, 杜江, 张东勇, 等. 人脑胶质瘤组织培养的干细胞样细胞具有体外高侵袭能力 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2012, 19(2): 128-132.

[16] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype [J]. Nat Med, 2001, 7(9): 1028-1034.

[17] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(1): 48-58.

[18] Chen YB, Yan ML, Gong JP, et al. Establishment of hepatocellular carcinoma multidrug resistant monoclonal cell line HepG2/mdr1 [J]. Chin Med J(Engl), 2007, 120(8): 703-707.

[19] Mimeault M, Hauke R, Mehta PP, et al. Recent advances in cancer stem/progenitor cell research: Therapeutic implications for overcoming resistance to the most aggressive cancers [J]. J Cell Mol Med, 2007, 11(5): 981-1011.

[20] Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: A potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy [J]. Life Sci, 2010, 86(17/18): 631-637.

[21] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284.

[22] 杨松, 钟晓明, 张伶, 等. 5-FU 富集人白血病细胞系 KG-1a 中肿瘤干细胞样细胞亚群细胞 [J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30

- (6): 786-790.
- [23] 杨玥, 李德龙, 朱雯静, 等. 5-氟尿嘧啶对肝癌细胞系 BEL-7402 中肿瘤干细胞的富集作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(9): 686-691.
- [24] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, et al. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis [J]. Breast Cancer Res, 2006, 8(5): R59.
- [25] Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo* [J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1797-1806.
- [26] Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: The SP phenotype [J]. Stem Cells, 2006, 24(1): 3-12.
- [27] Xu JX, Morii E, Liu Y, et al. High tolerance to apoptotic stimuli induced by serum depletion and ceramide in side-population cells: High expression of CD55 as a novel character for side-population [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(9): 1877-1885.
- [28] 董华英, 吴诚义. ALDH1 与干细胞和肿瘤干细胞的分选鉴定 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(6): 682-685.
- [29] Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome [J]. Cell Stem Cell, 2007, 1(5): 555-567.
- [30] Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8B): 2236-2252.
- [31] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinic outcome inflammatory breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(1): 45-55.
- [32] Dontu G, Wicha MS. Survival of mammary stem cells in suspension culture: Implications for stem cell biology and neoplasia [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(1): 75-86.
- [33] Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9339-9344.
- [收稿日期] 2012-06-03 [修回日期] 2012-08-18
[本文编辑] 韩丹, 周玲琳

· 科技动态 ·

盐酸麻黄碱通过上调 IL-10 和下调促炎细胞因子预防小鼠内毒素性休克

革兰阴性菌感染机体后,过量的细菌胞壁成分之一脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 又称内毒素)可使疾病发展为脓毒血症或内毒素性休克,导致临床重症感染患者病死率居高不下。LPS 与 Toll 样受体 4(Toll-like receptor, TLR4)结合后,通过活化丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)、核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B),以及磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K),促进下游促炎性细胞因子(如 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-12p40)、一氧化氮(nitric oxide, NO),以及抑炎性细胞因子(如 IL-10)等的产生。致死量的 LPS 会导致过量的促炎性细胞因子产生,使机体多器官功能衰竭甚至死亡。如何维持促炎和抑炎反应的平衡,对于机体维持合适的免疫应答起着重要的作用。

盐酸麻黄碱(ephedrine hydrochloride, EH)来自于中药麻黄,是麻黄碱的盐形式,其性质很稳定。作为肾上腺素能受体激动剂, EH 具有加快心跳和提高血压的作用,但在其抗感染方面的作用尚未见报道。在小鼠腹腔巨噬细胞或单核巨噬细胞株 Raw264.7 中, 论文作者研究发现, EH 促进 LPS 诱导的抑炎细胞因子 IL-10 产生, 但抑制促炎细胞因子和趋化因子等的产生。用 IL-10 阻断性抗体预处理 Raw264.7 细胞后再用 LPS 刺激, 发现 EH 并不是通过增加 IL-10 表达量间接抑制促炎性细胞因子的产生。Western blotting 发现 EH 促进 Raw264.7 细胞中 p38 的磷酸化。p38 特异性抑制剂预处理能阻断 EH 对 IL-10 表达的上调作用, 因此, 认为 EH 通过 p38 途径促进 IL-10 的表达。研究还发现, EH 可抑制 Raw264.7 细胞中 LPS 诱导的 ERK 磷酸化, 可能与其下调促炎性细胞因子的表达有关。在内毒素性休克小鼠模型中, EH 预处理组能降低小鼠的病死率, 接近于地塞米松阳性对照组, 提示 EH 可起到良好的预防作用。

总之, 论文作者发现了 EH 在机体感染免疫中的新作用, 它能双向调控 LPS 诱导的抑炎和促炎信号, 最终抑制机体过度的炎症反应, 有效防止内毒素性休克的产生, 是一种潜在的内毒素性休克治疗药物。

[郑月娟 摘译, 于益芝 审阅. Zheng YJ, Guo ZY, He WG, et al. International Immunopharmacology, 2012, 13(1): 46-53]