论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1726-04

不同转移潜能乳腺癌细胞亚系的建立与生物学特性的分析

张 涛[1],汤为学[2],蔡 辉[3],李少林[3] (重庆医科大学:[1]附属第一医院肿瘤科,[2]基础医学院病理生理学教研室,[3]基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨利用细胞穿透人工基质膜能力的差异筛选不同转移潜能乳腺癌细胞的可行性,并分析二者生物学特性差异。**方法** 人乳腺癌细胞系MDA-MB-435s经过连续人工基质膜侵袭试验后获得高、低转移潜能细胞株,并应用细胞生长曲线测定、侵袭力、黏附率实验,促血管形成实验分析所筛选出的不同转移潜能乳腺癌细胞的生物学性质的差异。**结果** 获得2株转移潜能不同的乳腺癌细胞株,它们具有差异明显的体外生长速度、侵袭力、黏附力和促血管形成能力。**结论** 利用细胞穿透人工基底膜能力的差异能够筛选出高、低转移潜能的乳腺癌细胞。

关键词: 乳腺癌;肿瘤转移;细胞株;生物学特性
中图法分类号: R73-354;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Establishment of breast cancer cell sublines with different potential of metastasis and their biological characteristics

ZHANG Tao[1], TANG Wei-xue[2], CAI Hui[3], LI Shao-lin[3] ([1]Department of Oncology, The First Affiliated Hospital; [2]Department of Pathophysiology, [3]Department of Nuclear Medicine, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the validity of selecting subclones of human breast cancer cells with high- and low-metastatic potentiality, based on their different ability of penetrating the matrigel *in vitro*, and analyze their biological characteristics. Methods Continuous *in vitro* invasion assays in matrigel were applied to screen two subclones of human breast cancer cell line MDA-MB-435s, characterized by high- and low-metastatic potentiality. Cell growth curve assay, invasion assay, adhesion assay and angiopoiesis-promoting assay were conducted to explore the different biological properties of these two subclone cells. Results Two subclones of MDA-MB-435s, of high- and low-metastatic potentiality respectively, were obtained through continuous *in vitro* invasion assay, manifesting significant difference in growth rate, invasion ability, adhesion ability and angiopoiesis-promoting ability. Conclusion It is feasible to obtain subclones of human breast cancer cells of high- and low-metastatic potentiality by utilizing their difference in penetrating the matrigel *in vitro*.

Key words: breast cancer; neoplasm metastasis; cell subclone; biological characteristics

流行病学资料显示,乳腺癌在我国肿瘤发病率谱的位置在逐年上升,90%以上的乳腺癌患者最终死于肿瘤转移或复发。因此,阐明乳腺癌侵袭转移发生的关键机制,建立相应的阻断途径,是根治其希望所在。为了在分子水平对乳腺癌侵袭转移机制进行研究,获得具有相同的遗传背景,不同转移潜能的肿瘤细胞株十分重要。本实验拟利用乳腺癌MDA-MB-435s细胞穿透与基底膜结构极为相似的人工基质膜能力的差异来筛选高、低转移潜能细胞株,为后续研究建立具有稳定转移表型的肿瘤亚系。

基金项目: 重庆市卫生局医学科研项目(07-2-082)
Supported by the Medical Research Funds by Chongqing Bureau of Public Health (07-2-082)
作者简介: 张 涛,男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事乳腺癌综合治疗方面的研究,发表论文6篇。电话:13708311156
通信作者: 李少林,电话:(023)68485060,E-mail: shaolinli202@sina.com
收稿日期: 2008-04-03;**修回日期:** 2008-05-30

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s,小鼠成纤维细胞株(NIH 3T3)购自中科院上海细胞所建立;人脐静脉血管内皮细胞(HuVEC)购自南京凯基生物科技发展有限公司;RPMI1640(Gibco,美国),胰蛋白酶(华美生物工程公司);胎牛血清与小牛血清(兰州民海生物制品公司);细胞培养瓶与细胞培养板(Nunc,USA);基底凝胶(basement member matrigel,10 mg/ml,购自美国 B. D 公司);Transwell 侵袭小室(Milipore PI8P01250,美国 Costar 公司,聚碳酸酯微孔膜孔径 8 μm)。酶标仪(Thermo1500,购自 Electron 公司)。

1.2　方法

1.2.1　MDA-MB-435s 的培养　　乳腺癌细胞系 MDA-MB-435s 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,于 37 ℃,5% CO_2 条件下培养,每 72 h 胰酶消化传代 1 次,取对数期的细胞用于实验。

1.2.2　含细胞趋化因子的条件培养基的制备　　NIH3T3 细胞传代培养至 80% 面积,无血清的 RPMI1640 液洗涤 3 次,以 3 ml 无血清 RPMI1640 液于 37 ℃,5% CO_2 条件下继续培养 24 h。收集培养液,离心(2 000 r/min,15 min),取上清,过滤除菌后分装于 2 ml 的冻存管中,-20 ℃保存。

1.2.3　细胞亚系建立　　经预实验确定,将 Matrigel(10 mg/ml)与 1640 培养液以 1∶4的比例混合成 50 μl 溶液(胶的浓度为 2 mg/ml),均匀铺平于 Transwell 小室的聚碳酸酯微孔膜上,成胶 30 min 后,置于超净台内紫外线照射过夜。实验前 30 min 再次成胶,取 MDA-MB-435s 细胞 400 μl(细胞数 2×10^5)的细胞悬液接种到成胶 Transwell 小室内,将小室放入 24 孔板;24 孔板内加入含趋化因子的条件培养基 600 μl ,加盖后置入37 ℃,5% CO_2 条件下培养 24 h,在倒置显微镜下观察 MDA-MB-435s 少量细胞穿过人工基底膜,贴壁于 24 孔板上,此时所收集细胞为高转移潜能细胞;吸去条件培养基,加入 10% 胎牛血清继续培养,待细胞长满,消化至 50 ml 培养瓶中扩大培养;将 Transwell 小室移至另一孔内,此孔加 600 μl 条件培养基,加盖后置入 37 ℃,5% CO_2 条件下继续培养 264 h,每 2 天更换小室培养液和 24 孔板内条件培养基。288 h 后终止实验,吸去小室内液体,胰酶消化膜表面黏附的细胞后,收集的小室膜表面细胞定为低转移潜能细胞,加入含 10% 胎牛血清的培养基扩大培养。

1.2.4　细胞黏附实验　　于 96 孔培养板中每孔分别加入 1×10^5/孔高、低亚群的乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞 200 μl ,培养 30、60、90、120 min 后,吸去上清液,用 PBS 轻洗 3 次,加 200 μl 1640 液,于 120 min 后给每孔加 20 μl MTT,4 h 后吸去上清液,每孔加 200 μl 二甲亚枫,然后在酶标仪测定各孔细胞的吸光度值(D 值)。按公式:黏附率(%) = 黏附细胞吸光度值/细胞总数吸光度值。

1.2.5　细胞侵袭实验　　带 Transwell 微孔膜的 24 孔培养板由 Milliopore 公司提供,于 24 孔板内加入含趋化因子的无血清培养基 600 μl,小室分别加入含 2×10^5 高、低转移株乳腺癌细胞的 10% RIMP1640 液 400 μl,各重复 3 个小室。37℃,5% CO_2 条件下培养 20 h。取出培养小室 ,将上室细胞用棉签轻轻擦干净,PBS 轻洗 3 次后,用 95% 乙醇固定 10 min,给予 Transwell 微孔膜 HE 染色,取下小室微孔膜反转贴于载玻片上,中性树胶封片。随机选择 12 个 200 倍显微视野 ,计数由小室迁移至微孔膜下的细胞数量,求得单个视野的平均穿膜细胞数。

1.2.6　细胞生长曲线实验　　将收集的高、低转移潜能细胞 5×10^3 ml^{-1} 接种至 96 孔板中,每孔 200 μl,各设 8 个平行孔,分别培养 0、1、2、3、4、5、6、7 d。于实验结束前加入 MTT 20 μl,4 h 后吸出上清液,各孔均加入二甲亚枫 200 μl,酶标仪(570 nm)测定各孔的吸光度值[D(570)],求其平均值。

1.2.7　促血管形成实验　　应用 Transwell 微孔膜的 24 孔板,上室加入含 2×10^5 个人脐静脉血管内皮细胞(HuVEC)的细胞悬液 400 μl,于 24 孔板中加入分别含 2×10^5 高、低转移潜能乳腺癌细胞,各 3 个小室。间隔 48 h 更换培养液,4 d 后中止。PBS 轻洗 3 次,95% 乙醇固定 10 min,而后行 HE 染色。取下小室微孔膜,贴于载玻片上,中性树胶封片。结果判定:10 × 10 倍视野下,随机选择 10 个管形分布均匀的视野,计数管腔数,取均值并用医学图像分析系统随机测定 12 个管腔的长度,取均值。

1.3　统计学分析

实验所得数据输入 Excel,利用 SPSS 10.0 统计软件,成组设计资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用重复测量设计的方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　细胞黏附率实验

在不同时间细胞黏附率实验结果表明,高、低转移潜能乳腺癌细胞在 30、60、90 min 和 120 min 时的黏附率均差异显著,有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),具体数据见表 1。

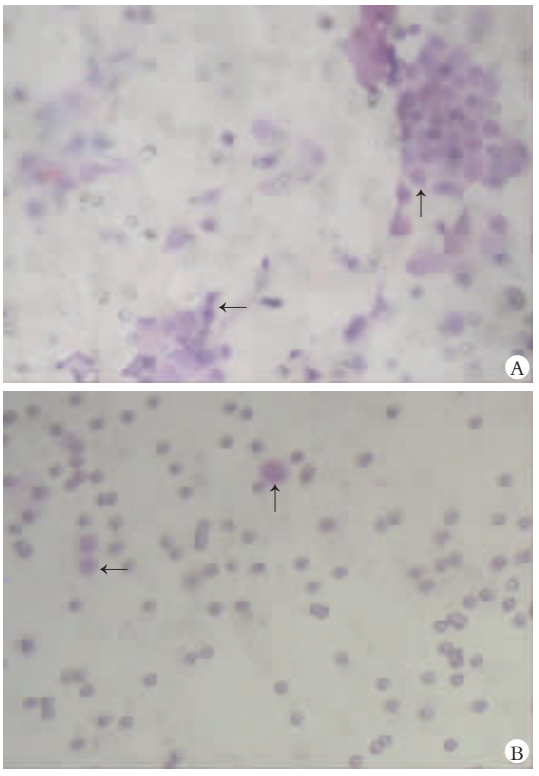
2.2　细胞侵袭实验

侵袭实验结果表明,侵袭实验 20 h 时,所筛选高、低转移潜能细胞穿过 Transwell 小室的数量有明显差异,高转移潜能细胞穿透数量为(61.40 ± 7.08)个/视野;低转移潜能细胞穿透数量为(25.32 ± 4.87)个/视野($P<0.01$,图 1)。

表 1　高、低转移潜能乳腺癌细胞不同时间细胞黏附率变化($\bar{x}\pm s$)

组别	30 min	60 min	90 min	120 min
低转移	0.110 9 ± 0.099 6	0.181 3 ± 0.014 4	0.296 1 ± 0.006 8	0.413 4 ± 0.037 5
高转移	0.179 6 ± 0.010 9[a]	0.277 9 ± 0.007 0[a]	0.391 3 ± 0.003 4[b]	0.575 0 ± 0.020 2[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与低转移潜能细胞组比较

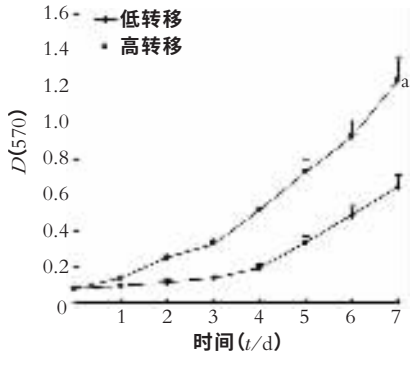


A：高转移潜能细胞；B：低转移潜能细胞　↑：侵袭的肿瘤细胞

图1　高、低转移潜能乳腺癌细胞20 h侵袭结果　（HE×200）

2.3　细胞生长曲线实验

细胞生长曲线实验结果表明，乳腺癌高转移潜能细胞株体外生长速度明显快于低转移潜能细胞株（$P<0.05$，图2）。

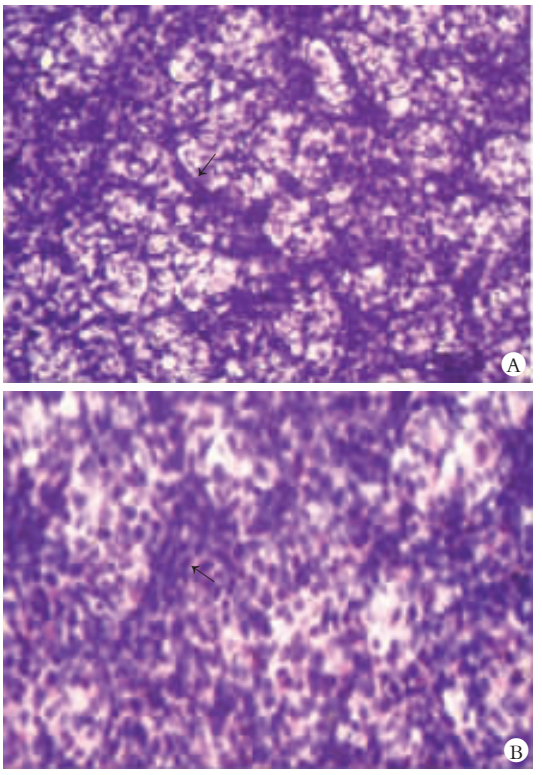


A：高转移潜能细胞株；B：低转移潜能细胞株；a：$P<0.05$，与低转移潜能乳腺癌细胞比较

图2　高、低转移潜能乳腺癌细胞株体外生长曲线

2.4　促血管形成实验

促血管形成实验结果统计分析后表明，乳腺癌高转移潜能细胞与低转移潜能细胞相比较，其促进人脐静脉血管内皮细胞形成血管的能力有显著性差异（$P<0.01$）。高转移潜能细胞株促进人脐静脉血管内皮细胞形成的血管不仅数量上远多于低转移潜能细胞株所诱导的，而且血管管腔的长度也显著长于低转移潜能细胞株所致（图4，表2）。



A：高转移潜能乳腺癌细胞；B：低转移潜能乳腺癌细胞　↑：血管形成

图4　高、低转移潜能乳腺癌细胞促血管形成结果　（HE×100）

表2　高、低转移潜能乳腺癌细胞促血管形成实验结果（$\bar{x}\pm s$）

乳腺癌细胞	每视野血管腔数	血管腔长度（μm）
低转移	5.41±0.82	117.47±19.78
高转移	12.44±1.32[a]	243.54±44.31[a]

a：$P<0.01$，与低转移潜能乳腺癌细胞比较

3　讨论

流行病学资料显示，我国乳腺癌的发病率年增长率为3%～4%[1]，90%以上的乳腺癌患者最终死于肿瘤转移或复发。因此，阐明乳腺癌侵袭转移发生的关键机制，是根治乳腺癌的希望所在。而建立具有稳定转移表型的肿瘤亚系，是研究肿瘤转移机制所需要的最基本材料。本实验利用乳腺癌细胞穿透人工基质膜能力的差异来筛选、建立高、低转移潜能细胞亚系，拟对体外侵袭实验来筛选分离细胞这一方法作初步的探讨和尝试。

临床资料显示，我国乳腺癌病理类型以浸润型导管癌常见，且雌激素受体阴性肿瘤比例较高。本实验选用雌激素受体阴性的乳腺导管癌MDA-MB-435s细胞作为研究对象，对于此类乳腺癌的研究有着重要意义。

筛选不同转移潜能细胞株的方法,近年来多采用细胞单克隆技术[3,4]。其优点在于可将肿瘤细胞异质性降至最低限度,实验结果的重复性和可靠性也最好,但实验因选择扩增的细胞数目多而工作量大。有学者应用生物膜浸润筛选系统来分离具有不同侵袭、移动能力细胞,该方法具有取材方便、成本低廉等特点。采用羊膜作为筛选介质,成功率十分有限,其原因主要在于羊膜存在着较高的污染因素。文献[5]报道,以人的脏层腹膜作为筛选介质是可行且有效的,只是应用脏层腹膜涉及论理学问题,尚难广泛应用。还有学者报道[6-8],应用体内连续筛选法来分离肿瘤细胞,此方法效果确切、稳定。但所研究肿瘤细胞皮下接种肿瘤的转移模型十分难得,会直接影响实验的成功率,其实验周期也较长。

查阅国内外文献,应用侵袭实验对细胞系进行分离回收的较少[9]。本实验将含有层黏连蛋白、纤维连接蛋白和Ⅳ型胶原等的 Matrigel 铺在 Transwell 侵袭小室的多孔滤膜上,形成与基底膜极为相似的人工基质膜。乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞通过膜表面特定受体与人工基质膜相粘连,最终在 NIH 3T3 无血清培养上清的趋化下发生侵袭。

本研究表明细胞侵袭实验开始 20 h 即有肿瘤细胞穿过人工基质膜,24 h 则在 24 孔板底可见极个别细胞贴壁生长,此最短时间穿过人工基质膜的细胞则是侵袭能力最强的亚群,将此时收集的细胞克隆培养,也能将肿瘤异质性降至最低限度。继续培养至 288 h 时,小室中有生长优势的高转移潜能细胞均已穿过人工基质膜,此时仍停留在膜上的细胞就是侵袭能力较差的亚群。

国内外体外侵袭实验的观察时间范围为 4 ~ 72 h[10]。本实验 20 h 出现穿膜细胞,至 288 h 时未出现细胞完全穿膜而无细胞停留膜上的现象,这可能与乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞本身的侵袭能力,细胞的数量以及人工基质膜制作质量有关。后者与分离效应密切相关已有报道。如 Matrigel 胶的浓度过高,即使高转移细胞也无法穿过;Matrigel 胶浓度过低,则不能起到屏障作用。有关胶浓度、胶体积和总量的设定,各个文献报道不一致。本实验查阅文献并经过预实验后证实,Matrigel 胶以 2 mg/ml 的浓度成胶是合适的,其结果重复性和可靠性较好。另外,是否将 Matrigel 胶均匀铺平于 Transwell 小室微孔膜也会影响分离的效果。仅凭肉眼观察其均匀度,是本实验不足之处,最佳方案是进行均质性检验。

从多个体外实验结果可看出,以人工基质膜为介质的筛选模型所筛选出的不同转移潜能细胞亚群在体外侵袭能力、黏附率、细胞生长曲线等实验均确实存在着显著性的差异。所筛选的高转移潜能乳腺癌细胞体外生长速度明显较快,其贴附能力强于低转移潜能细胞,而且其促进人脐静脉血管内皮细胞形成血管的能力显著强于低转移潜能细胞株。

上述结果证实了人工基质膜浸润筛选系统的可行性,这种方法在一定程度上减少了工作量,简化了实验过程,克服了选择扩增时的盲目性,而且也能保证所分离出的两株细胞株来源于同一亲本,他们之间的差异集中在转移表型上,这为进一步比较实验奠定了材料基础。

参考文献:

[1] Dumitrescu R G, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? [J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 208 - 221.

[2] Fidler I J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis[J]. Cancer Res, 1978, 38(9): 2651 - 2660.

[3] 陈　翔, 杨彤涛, 马保安, 等. 不同转移潜能骨肉瘤细胞株的建立与生物学性质的分析[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(21): 1992 - 1995.

[4] 牛　坚, 李向农, 韩泽广. 人胰腺癌不同转移潜能细胞株的分离筛选和鉴定[J]. 胰腺病学, 2007, 7(6): 375 - 377.

[5] 陈长宏, 王曙光, 李大江, 等. 腹膜浸润筛选模型体外筛选胆管癌细胞不同转移性亚群[J]. 重庆医学, 2002, 31(11): 1039 - 1040.

[6] 王　磊, 李大强, 侯意枫, 等. 乳腺癌不同肺转移潜能细胞株表达差异蛋白及其临床意义[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(9): 706 - 709.

[7] 叶丽虹, 吴莲英, 郭　威, 等. 乳腺癌 MCF-7 细胞系转移亚克隆的筛选及其生物学特性研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(1): 61 - 65.

[8] 孙廷谊, 张云汉, 孔令非. 应用自制组织芯片检测乳癌组织中 Survivin 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(6): 1147 - 1148.

[9] 谭晓杰, 侯建国, 贺松琴, 等. 采用体外侵袭实验分离侵袭性人原代肾细胞癌细胞[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 318 - 321.

[10] Seton-Rogers S E, Lu Y, Hines L M, *et al*. Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(5): 1257 - 1262.

（编辑　汪勤俭）