论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0016-04

# 乳腺癌前病变组织原代成纤维细胞生物学特征初步研究

孙 艳[1,2],彭琼乐[1,2],王黎阳[1,2],赵浏阳[1,2],袁 泉[1],李 俊[1],柳满然[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:临床检验诊断学教育部重点实验室[1],基础医学院细胞生物学及遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 比较乳腺导管不典型增生成纤维细胞(atypical intraductal hyperplasia fibroblasts,AFs)与正常乳腺成纤维细胞(normal fibroblasts,NFs)、乳腺癌肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts,CAFs)在生物学特征上的差异。**方法** 采用Ⅰ型胶原酶法分离并培养 AFs、NFs 和 CAFs,免疫细胞荧光化学检测其粘连蛋白(fibronectin,FN)表达以鉴定细胞纯度。比较3种细胞的细胞生长曲线、细胞周期和周期蛋白 cyclin D1、$p21^{waf1}$及 p53 的变化。**结果** 获得并鉴定了 NFs、AFs、CAFs;其生长速度依次增加($P<0.05$),细胞周期 S 期百分比(8.24±2.47)、(16.94±4.77)、(33.31±7.90)依次增大($P<0.05$);与 NFs 相比,AFs 周期蛋白 cyclin D1 表达增加($P<0.05$),$p21^{waf1}$和 p53 蛋白表达降低($P<0.05$);与 CAFs 相比,AFs 的周期蛋白 cyclin D1 没有升高($P<0.05$),$p21^{waf1}$蛋白和 p53 蛋白表达更强($P<0.05$)。**结论** AFs 相对于 NFs 和 CAFs,细胞生长增殖具有特异性,这种变化提示乳腺肿瘤的癌前病变阶段 AFs 可能是 NFs 逐步向 CAFs 转变的过渡阶段。

[关键词] 乳腺癌;微环境;成纤维细胞;细胞周期

[中图法分类号] R737.9; R329-33; R329.28 [文献标志码] A

# Biological characteristics of fibroblasts primarily cultured form breast precancerosis

Sun Yan[1,2], Peng Qiongle[1,2], Wang Liyang[1,2], Zhao Liuyang[1,2], Yuan Quan[1], Li Jun[1], Liu Manran[1,2]([1]Key Laboratory of Diagnostic Medicine of Ministry of Education, [2]Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the biological characteristics of breast primary atypical intraductal hyperplasia fibroblasts (AFs) in tumorigenesis of breast cancer, normal mammary fibroblasts (NFs) and the breast primary cancer-associated fibroblasts (CAFs). **Methods** The primary human breast fibroblasts were isolated by collagenase Ⅰ digestion from normal mammary tissue, atypical intraductal hyperplasia and mammary tumor. The purity of these fibroblasts was identified by immunofluorescent staining using the specific first antibody to fibronectin, the fibroblast biomarker. The proliferation and cell cycle for each kind of fibroblasts was detected by MTT assay and flow cytometry. The expression of cyclin D1, p53 and $p21^{waf1}$ in the fibroblasts was detected by Western blotting. **Results** More than 95% of the isolated fibroblasts were positive to fibronectin. Comparing with NFs (8.24±2.47), AFs (16.94±4.77) had higher growth rate and more cells at S-phase of cell cycle ($P<0.05$). However, there were lower growth rate and lesser S-phase cells ($P<0.05$) when compared these parameters in AFs with that in CAFs (33.31±7.90). Similar changes were found on the expression of cyclin D1, $p21^{waf1}$ and p53 among AFs, NFs and CAFs. **Conclusion** Different biological characteristics of AFs with NFs and CAFs indicate that AFs are on the way of transformation of NFs to CAFs in the precancerous lesion of breast cancer.

[**Key words**] breast cancer; microenvironment; fibroblast; cell cycle

Supported by the National Natural Science Foundation for Directors of China (30940096), the National Natural Science Foundation of China (81072147), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5099), the Key Foundation of Chongqing Medical University (XBZD201006) and the Starting Funds for Talents Returning From Overseas of Chongqing Medical University (02001011890). Corresponding author: Liu Manran, Tel:86-23-68485184, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金主任基金(30940096);国家自然科学基金(81072147);重庆市科委自然科学基金(CSTC2010BB5099);重庆医科大学校重点基金(XBZD201006);重庆医科大学优秀留学归国人员启动基金(0200101189)

[通信作者] 柳满然,电话:(023)68485184,E-mail:mliu-hncq@hotmail.com

最近的研究提示,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts,CAFs)与正常组织来源的成纤维细胞相比,生物特征与功能发生了明显变化,并对肿瘤的发生、发展起着重要作用[1]。在乳腺癌癌变(tumor onset)过程中,有人提出癌前上皮细胞是由于多个基因突变和相关基质的刺激而被"激活",基质细胞通常表达成肌纤维母细胞标记蛋白[2]。乳腺导管不典型增生是乳腺良性病变中最具有癌变危险的病理阶段,其特征是导管中的上皮细胞出现不典型的异常增生,部分上皮细胞出现恶变细胞的早期特征,被认为是乳腺良性病变向乳腺癌发展的临界恶变阶段,具有显著的临床意义[3]。为了初步了解乳腺肿瘤癌变过程中,癌前病变组织微环境成纤维细胞的生物学变化及其对乳腺肿瘤发生的潜在影响,本研究以正常乳腺组织、乳腺导管不典型增生组织(atypical intraductal hyperplasia)、乳腺导管原位癌组织(ductal carcinoma *in situ*,DCIS)分离获得的正常成纤维细胞(normal fibroblasts,NFs)、不典型增生成纤维细胞(atypical intraductal hyperplasia fibroblasts,AFs)和 CAFs 为对象,对比研究了三者的细胞增殖、细胞周期变化、细胞周期调控相关蛋白的变化,希望了解 AFs 与 NFs 和 CAFs 在生物特征上的相似性和差异性,为进一步探讨成纤维细胞是否参与乳腺上皮细胞癌变提供初步的理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例选择和标本

所有标本来源于重庆医科大学附属第一医院内分泌外科。正常乳腺组织来源于乳腺病患者麦默通(Mammotome)乳腺微创手术样本,乳腺不典型增生组织和乳腺导管原位癌组织来源于确诊的乳腺癌手术样本,其中乳腺癌患者未经术前化疗,包块直径小于 2 cm,手术中阻断供血前切取 0.5 $cm^3$ 新鲜组织置于培养基中,30 min 内送回实验室进行组织处理。

### 1.2 主要试剂

胎牛血清 FBS 及胰蛋白酶购于 Gibco 公司,Ⅰ型胶原酶和四氮唑蓝购于 Sigma 公司,粘连蛋白(fibronectin,FN)抗体兔抗人多克隆抗体购于 Santa Cruz 公司,cyclin D1 鼠抗人单克隆抗体、$p21^{waf1}$ 鼠抗人单克隆抗体及 p53 兔抗人多克隆抗体购买于北京中杉金桥生物技术有限公司,β-actin 兔抗人多克隆抗体购买于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 乳腺原代成纤维细胞培养

新鲜的乳腺组织置于 4 ℃ PBS 中清洗 2 次,在 35 mm 培养皿中剪成糜状,用 1 mg/ml 的Ⅰ型胶原酶 37 ℃消化 6 ~ 12 h,将消化后的组织反复吹打并离心,加入含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基 3 ml,于 5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养。24 h 后更换新鲜培养基,之后 2 ~ 4 d 更换 1 次新鲜培养基至细胞生长到 90% 密度。选用第 2 ~ 4 代的细胞用于实验,同 1 组实验数据选用同 1 代的细胞,以确保实验数据的准确性和可比性。

### 1.4 细胞免疫荧光化学

将消毒洁净的盖玻片置于 24 孔板中,细胞接种在盖玻片上,待细胞长满 70% 密度后,4% 多聚甲醛固定 30 min,预冷 PBS 清洗,用 5% 的山羊血清封闭 30 min,吸去血清,直接加抗 Fibronectin 一抗(FN,1∶200)4 ℃孵育过夜。第 2 天用预冷的 PBS 清洗,避光加入荧光二抗(FITC,1∶50),37 ℃避光 30 min,PBS 清洗后加入 DAPI 稀释液(1∶10)孵育 10 min,PBS 清洗,70% 甘油封片,显微镜下观察、计数细胞。

FN 阳性的原代细胞纯度 =(绿色细胞数/蓝色细胞核数)× 100%。

### 1.5 四氮唑蓝比色法(MTT 法)

将培养到第 3 代的 NFs、AFs、CAFs 经消化、重悬、计数,每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞种于 96 孔板,每组细胞重复 5 孔,每板各设空白对照 2 个,共 5 板。于 5% $CO_2$、37 ℃培养箱中培养。每 24 小时取出 1 个培养板,每孔加入 MTT 试剂(5 mg/ml)10 μl,继续培养 4 h,然后加入二甲基亚砜(DMSO)200 μl/孔,摇床上室温振摇 15 min,用酶标仪在波长 490 nm 处检测光密度值[$D$(490)],连续检测 5 d,绘制生长曲线。

### 1.6 细胞周期检测(FCM 法)

分别将 NFs、AFs 和 CAFs 种于 6 孔板中,长至 75% 密度时,胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,70% 酒精固定过夜,流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.7 Western blot

碧云天 RIPA 蛋白裂解液提取细胞蛋白,用 G250 法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜,4 ℃封闭过夜。加一抗($p21^{waf1}$,1∶500;cyclin D1,1∶500;p53,1∶500,β-actin,1∶1 000),4 ℃过夜。TBST 洗膜 3 次后加二抗(1∶2 500)室温孵育 1 h,TBST 摇洗 3 次,ECL 发光显色,CCD 图像采集系统采集图像。

### 1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,组间进行 $t$ 检验。

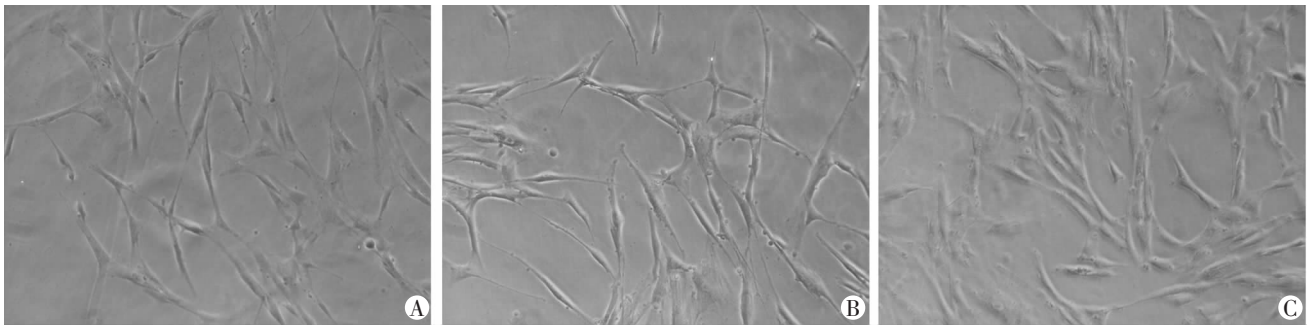
## 2 结果

### 2.1 原代成纤维细胞的获取

Ⅰ型胶原酶消化法消化组织,获得的细胞悬液接种在培养板,12 ~ 24 h 后倒置显微镜下便可明显看见在附着的组织块 4 周已生长有大量成纤维细胞。经传代培养,成纤维细胞体积较大,形态多为梭形、菱形或多角形。但 3 组细胞在形态上无显著差异,见图 1。

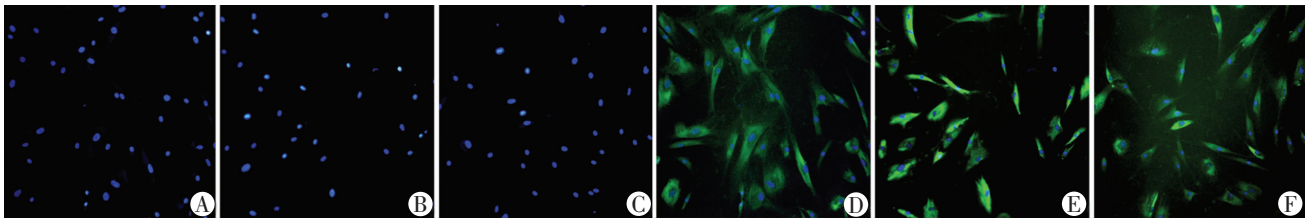
### 2.2 原代成纤维细胞的鉴定

经过 1、2 次传代后,用 FN 进行细胞免疫荧光染色检测,原代获取的 3 类成纤维细胞 FN 表达强阳性,可以有效地区分成纤维细胞和其他杂质细胞。且 3 组不同来源的成纤维细胞纯度均达 95% 以上。见图 2。



A:NFs;B:AFs;C:CAFs

**图1 倒置相差显微镜观察原代成纤维细胞形态变化** （×100）

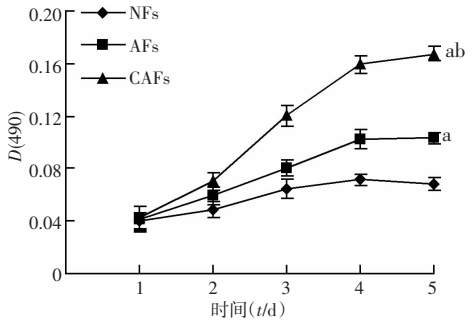


A、D:NFs;B、E: AFs; C、F:CAFs;A、B、C:DAPI 染核(蓝色);D、E、F:FN(绿色)和 DAPI 的合并图

**图2 细胞免疫荧光检测 FN 在成纤维细胞里的表达** （倒置荧光显微镜 ×100）

## 2.3 3组成纤维细胞的生长及细胞周期特征

NFs、AFs、CAFs 的生长曲线见图3。3组成纤维细胞均在2~3 d处于指数生长期,细胞生长旺盛,第4天时细胞进入平台期,生长减慢。MTT 生长曲线显示 CAFs 作为已经被活化的成纤维细胞,比其余2组细胞(NFs、AFs)增殖能力明显增强($P<0.05$)。来源于乳腺癌癌前病变高危组织(不典型增生)的 AFs,其增殖能力介于 NFs,CAFs 之间($P<0.05$)。进一步分析3类成纤维细胞细胞周期构成特点,结果发现(表1):与 NFs 相比,构成 AFs 的 $G_0/G_1$ 成分偏低,S 期成分较多($P<0.05$)。而与 CAFs 相比,构成 AFs 的 $G_0/G_1$ 成分比例明显高于 CAFs,S 期成分则明显少于 CAFs($P<0.05$)。




a:$P<0.05$,与 NFs 比较;b:$P<0.05$,与 AFs 比较

**图3 MTT 法检测3组成纤维细胞的生长曲线**

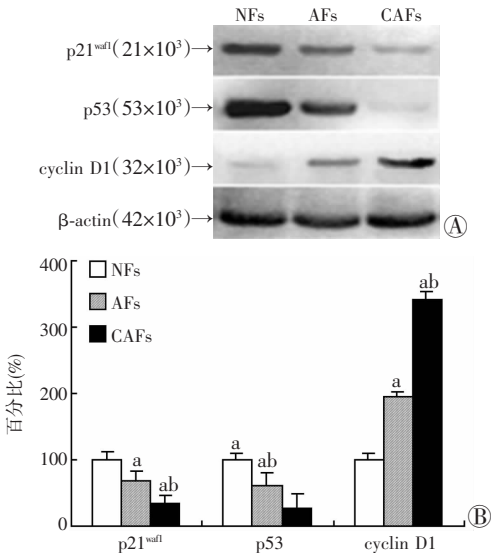
**表1 FCM 法检测3组成纤维细胞细胞周期的变化**（%,$\bar{x}\pm s$）

| 组别 | $G_1$期 | S 期 | $G_2$期 |
|---|---|---|---|
| NFs | 73.76±7.25 | 8.24±2.47 | 16.33±4.59 |
| AFs | 69.68±6.92 | 16.94±4.77[a] | 13.06±2.16 |
| CAFs | 54.34±5.85 | 33.31±7.90[ab] | 12.35±2.10 |

a:$P<0.05$,与 NFs 比较;b:$P<0.05$,与 AFs 比较

## 2.4 3种成纤维细胞的细胞周期相关蛋白的变化

周期蛋白 cyclin D1、$p21^{wafl}$ 和 p53 的表达见图4。经密度扫描半定量分析显示,cyclin D1 在 NFs、AFs 和 CAFs 中的表达依次提高,AFs 和 CAFs 表达明显高于 NFs($P<0.05$),而 $p21^{wafl}$ 和 p53 在 NFs、AFs 和 CAFs 中的表达逐渐降低,3组细胞表达差异具有统计学意义($P<0.05$)。




A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 NFs 比较;b:$P<0.05$,与 AFs 比较

**图4 蛋白 $p21^{wafl}$、cyclin D1 和 p53 在3组成纤维细胞中的表达**

## 3 讨论

在乳腺肿瘤微环境的研究中,原代成纤维细胞的培养是开展后期实验的关键。本实验通过Ⅰ型胶原酶

消化法成功获得了原代成纤维细胞,但 NFs、AFs 和 CAFs 之间在形态学上并没有显著的差异。而 Mercier 等[4]发现在浸润型乳腺癌分离得到 CAFs 在形态上较 NFs 更加细长,并认为 CAFs 在形态上的改变可能与其迁移能力增强有关。本结果与其存在差异,可能在不同组织病理阶段中,CAFs 细胞本身具有特异性。本实验使用的 CAFs 来源于乳腺原位癌组织,不同于浸润型乳腺癌和转移性乳腺癌的病理学分级。

FN 通常表达于成纤维细胞和肌上皮细胞的细胞膜表面,是检测成纤维细胞的标记蛋白之一[5]。使用 FN 检测原代成纤维细胞纯度,本研究中 3 类成纤维细胞均超过 95% 的细胞表达 FN,再次证明胶原酶法是获取高质量、高纯度成纤维细胞的较佳分离手段。

本实验检测 NFs、AFs 和 CAFs 的生长曲线和细胞周期发现,其增殖特征有明显差异。NFs、AFs 和 CAFs 的增殖依次增加,细胞周期 S 期百分比依次增大:NFs 增殖缓慢,更多的细胞停留在 $G_1$ 期;CAFs 在恶性上皮细胞的刺激下,增殖明显加快,S 期细胞比例最高;AFs 作为中间过渡阶段,增殖能力介于 NFs 与 CAFs 之间。目前研究认为 CAFs 与癌细胞形成双向信号网络,通过分泌因子相互对话共同帮助癌细胞的发生、发展,其中 CAFs 通过分泌生长因子如 EGF、TGF-β、IGF、CXCL12 等到细胞外基质,对于自身生长和刺激肿瘤生长具有重要作用[6]。体外研究显示,在乳腺癌的发生过程中,过量的 TGF-β1 可以让正常乳腺上皮细胞转化为具有浸润性的癌细胞,通过 TGF-β1 信号,CAFs 可以协助和促进癌细胞增殖、转移[7]。Galie 等[8]还证明在动物模型中,临界恶变的乳腺上皮细胞能够在老化样成纤维细胞的协助下不可逆地转化为完全恶化的癌细胞。以上研究暗示在人体乳腺癌癌前组织中,可能存在癌前上皮细胞自我刺激与基质成纤维细胞的旁刺激作用共同帮助上皮细胞恶变。本实验也证明成纤维细胞会受到上皮细胞的调控,其生物学特性(如增殖、细胞周期)发生了相应变化。

p53 蛋白和 $p21^{waf1}$ 蛋白是已知调控细胞周期运转的负调控因子,p53 可反式激活 WAF/CIP1 转录,表达 $p21^{waf1}$ 蛋白,$p21^{waf1}$ 蛋白则可以与 cyclin D1 竞争性的结合 CDK4,引起细胞停滞在 $G_1$ 期从而调控细胞的增殖[9-11]。在缺乏 $p21^{waf1}$ 和 p53 蛋白的情况下,细胞就可能会引发细胞周期异常,而同时 cyclin D1 的升高也可能会导致肿瘤发生。本实验发现在 CAFs 中 $p21^{waf1}$ 和 p53 蛋白明显表达下调,cyclin D1 表达则明显升高;导管不典型增生作为乳腺癌癌变的临界阶段,其成纤维细胞 AFs 生长和细胞周期变化介于 NFs 与 CAFs 之间,cyclin D1 蛋白表达明显高于 NFs,而 $p21^{waf1}$ 蛋白和 p53 蛋白表达下调,提示 AFs 逐渐向 CAFs 的特征靠近。这暗示当乳腺导管上皮细胞开始出现不典型增生的同时,上皮细胞周围的成纤维细胞在细胞周期上也发生改变。Hawsawi 等[12]研究发现,p53 与 $p21^{waf1}$ 蛋白在 NFs,乳腺癌癌旁组织分离的成纤维细胞与 CAFs 中的表达也有异常减弱的趋势,说明成纤维细胞可能在恶性上皮细胞的诱导下,逐步出现恶性增殖的特征,这与本研究结果相符。

综上,成纤维细胞生物学特征在乳腺肿瘤癌变过程中发生了一定程度的改变。我们推测在乳腺癌癌变的过程中,AFs 可能代表了乳腺癌前病变阶段由 NFs 逐步向 CAFs 转变的过渡阶段,而乳腺癌最终发生是否有成纤维细胞的参与和促进还有待进一步的验证。

**参考文献:**

[1] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(5): 392-401.

[2] Bhowmick N A, Neilson E G, Moses H L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression[J]. Nature, 2004, 432(7015): 332-337.

[3] Hartmann L C, Sellers T A, Frost M H, *et al*. Benign breast disease and the risk of breast cancer[J]. N Engl J Med, 2005, 353(3): 229-237.

[4] Mercier I, Casimiro M C, Wang C, *et al*. Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 downregulation and RB tumor suppressor functional inactivation: Implications for the response to hormonal therapy[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(8): 1212-1225.

[5] McAnulty R J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(4): 666-671.

[6] Ostman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players[J]. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(1): 67-73.

[7] Massague J. TGFbeta in Cancer[J]. Cell, 2008, 134(2): 215-230.

[8] Galie M, Sorrentino C, Montani M, *et al*. Mammary carcinoma provides highly tumourigenic and invasive reactive stromal cells[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(11): 1868-1878.

[9] Jung Y S, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity[J]. Cell Signal, 2010, 22(7): 1003-1012.

[10] Velasco-Velazquez M A, Li Z, Casimiro M, *et al*. Examining the role of cyclin D1 in breast cancer[J]. Future Oncol, 2011, 7(6): 753-765.

[11] 王燕, 郭乔楠, 章波, 等. 组蛋白乙酰化修饰对 IEC-6 恶性转化细胞细胞周期和 p53、$p21^{waf1}$ 基因表达的调控[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(4): 300-303.

[12] Hawsawi N M, Ghebeh H, Hendrayani S F, *et al*. Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes[J]. Cancer Res, 2008, 68(8): 2717-2725.

(**收稿**:2011-09-14;**修回**:2011-10-09)

(编辑 张 维)