论著

文章编号:1000-5404(2013)11-1102-05

成骨细胞诱导乳腺癌侧群细胞获得骨模拟特性的研究

杨晓宁,周 艳,齐晓伟,王明浩,范林军,姜 军 (400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心)

[摘要] **目的** 以乳腺癌细胞株 MDA-MB231 和成骨细胞株 MC3T3-E1 为对象,研究在共培养条件下乳腺癌侧群细胞向成骨细胞转化的能力。**方法** 通过流式细胞技术分选出 MDA-MB231 乳腺癌侧群细胞,将其与成骨细胞株 MC3T3-E1 按照 1∶1的细胞比例分别置于 Transwell 间接共培养体系的上、下小室中(实验组),设置相同密度的单纯乳腺癌侧群细胞为对照组,观察侧群细胞的形态变化。通过细胞免疫荧光技术及 Western blot,比较 2 组侧群细胞中 OPN、Runx2、Wnt-1 表达水平的改变。**结果** 实验组细胞分化明显,细胞免疫荧光技术检测实验组侧群细胞中 OPN、Runx2、Wnt-1 表达水平明显高于对照组。Western blot 检测表明实验组侧群细胞中 OPN(5.15±0.35)、Runx2(6.22±0.36)、Wnt-1(9.30±0.28)的蛋白表达水平均高于对照组 OPN(1.00±0.15)、Runx2(1.00±0.14)、Wnt-1(1.00±0.13),差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 与成骨细胞株共培养后,乳腺癌侧群细胞获得成骨细胞相关生物学特性。

[关键词] 乳腺癌;侧群细胞;MDA-MB231;成骨细胞 MC3T3-E1

[中图法分类号] R329.2; R322.71; R737.9 [文献标志码] A

Osteomimicry of side population cells induced by osteoblast *in vitro*

Yang Xiaoning, Zhou Yan, Qi Xiaowei, Wang Minghao, Fan Linjun, Jiang Jun (Center of Breast Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the differentiation of side population cells from breast cancer cell line MDA-MB231 to osteoblasts after co-cultured with osteoblastic cell line MC3T3-E1 in Transwell chamber. **Methods** Side population cells were obtained by flow cytometry from MDA-MB231 cells. And then the obtained side population cells and MC3T3-E1 cells were placed into the upper and lower chambers of Transwell co-culture system respectively at a ratio of 1 to 1. Side population cells at the same density placed in the both chambers served as control. The morphology and proliferation of the side population cells was observed by phase-contrast microscopy. The expression of OPN, Runx2 and Wnt-1 was detected by immunofluorescence staining and Western blotting. **Results** The side population cells were obviously differentiated in the co-culture system. Immunofluorescence staining indicated the expression of above 3 proteins was significantly stronger than in the control. Western blotting showed the same results (OPN: 5.15±0.35 *vs* 1.00±0.15, Runx2: 6.22±0.36 *vs* 1.00±0.14, Wnt-1: 9.30±0.28 *vs* 1.00±0.13, $P<0.05$). **Conclusion** Our co-culture system induces side population cells from MDA-MB231 cells to obtain relative biological characteristics of osteoblasts.

[**Key words**] breast neoplasm; side population cells; MDA-MB231; osteoblastic cell line MC3T3-E1

Supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5173). Corresponding author: Jiang Jun, Tel:86-23-68754160, E-mail: jcbd@medmail.com.cn; Fan Linjun, Tel:86-23-68765636, E-mail: flj212@medmail.com.cn

骨骼是乳腺癌优先转移的部位[1]。转移至骨的乳腺癌细胞可获得部分成骨细胞样的细胞表型,并表达骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、骨涎蛋白(bone sialoprotein,BSP)和骨连蛋白[2-3]等特异性骨蛋白。将乳腺癌细胞在骨转移过程中表达特异性骨蛋白的现象称为骨模拟,目前认为这可能是导致乳腺癌易于发生骨转移的原因之一,但其机制尚不清楚。研究表明,乳腺癌干细胞是诱导乳腺癌骨转移起始和形成的主要细胞,在骨转移过程中发挥重要作用[4-6],而肿瘤干细胞具有多向分化的潜能。因此我们推测乳腺癌干细胞在

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5173)

[通信作者] 姜 军,电话:(023)68754160,E-mail:jcbd@medmail.com.cn
范林军,电话:(023)68765636,E-mail:flj212@medmail.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1445.008.html(2013-03-27)

适当的诱导条件下能够分化为成骨细胞样表型的乳腺癌干细胞,从而具有更强的骨转移能力。目前研究显示,在包括乳腺癌在内的多种癌组织中,侧群细胞具有无限增殖和成瘤能力的干细胞样特性,并可在常规化疗后存活,导致癌症的复发与转移,这与肿瘤干细胞的特性极其相似,因此侧群细胞被认为是乳腺癌干样细胞[7-9]。本实验通过分离乳腺癌 MDA-MB231 细胞株的侧群细胞,与成骨细胞株 MC3T3-E1 进行 Transwell 间接共培养来最大限度地模拟体内微环境,观察骨微环境对乳腺癌侧群细胞生物学特性的影响,旨在为进行深入的分子机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源

乳腺癌细胞株 MDA-MB231、成骨细胞株 MC3T3-E1 购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂及仪器

Hoechst33342、维拉帕米(Sigma 公司),DMEM 高糖培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶(HyClone 公司),干性培养因子 B_{27}(Gibco,美国),bFGF、EGF(Invitrogen,美国),0.4 μm Transwell 共培养小室(Coring,美国),FACSort 流式细胞仪(BD 公司,美国)由第三军医大学提供。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 乳腺癌细胞株 MDA-MB231 采用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基培养;成骨细胞株 MC3T3-E1 用含有 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 α-MEM 培养基。2 种细胞均置于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养,待细胞生长至对数生长期,用 0.25% 胰酶进行消化传代,备用。乳腺癌侧群细胞采用含有 2% B_{27}、20 μg/mL bFGF、20 μg/mL EGF 的 DMEM/F12 培养基,培养条件的条件同前。

1.3.2 流式细胞分选乳腺癌侧群细胞 取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB231 细胞,制备成单细胞悬液,调整细胞数为 10^6/mL,设置实验组及对照组。实验组及对照组各加入 Hoechst33342,调整浓度至 5 μg/mL,对照组再加入维拉帕米 50 μg/mL,避光 37 ℃水浴 90 min,期间 15 min 振荡 1 次,最后加入 2 mL 冰磷酸缓冲液(PBS)终止反应,1 500 r/min,4 ℃离心 10 min 后弃上清,PI 加入至终浓度 2 μg/mL,FACSort 流式细胞仪进行分选。

1.3.3 细胞共培养 采用 Transwell 板(孔直径 0.4 μm,Corning 公司)构建共培养体系,分为实验组及对照组。实验组将乳腺癌侧群细胞按照 1×10^5 接种于 Transwell 共培养板的下室,成骨细胞 MC3T3-E1 按照同等密度接种于 Transwell 共培养板的上室;对照组在 Transwell 培养板上下层均接种同实验组密度相同的乳腺癌侧群细胞。同时部分细胞传至预先放入圆玻璃爬片的 6 孔板内,每日观察细胞的形态变化,每 3 天换液 1 次,第 7 天终止培养。细胞爬片以 4% 中性甲醛固定,用于免疫细胞化学检测,其余细胞提取蛋白,用于 Western blot 检测。

1.3.4 细胞免疫荧光 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次;0.3% Triton X-100 室温下破膜 30 min;PBS 漂洗 3 次;5% 正常山羊血清封闭 30 min;弃血清,不漂洗;分别加入一抗[鼠抗 OPN,1∶300(Abcam, USA);鼠抗 Runx2, 1∶300(Abcam, USA);鼠抗 Wnt-1, 1∶400(Abcam, USA)],同时设置 PBS 代替一抗的阴性对照,4 ℃过夜;0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次;37 ℃下,二抗(FITC-羊抗鼠, 北京中杉金桥)孵育 30 min;0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次;DAPI 复染 5 min 后,PBS 洗涤 3 次,封片,荧光显微镜镜下采集图片。

1.3.5 Western blot 检测 细胞共培养结束后,4 ℃ 0.01 mol/L PBS 洗涤后,按照 RIPA 试剂盒说明书(购自 Pierce 公司)操作步骤提取细胞蛋白。取等量标准化后的蛋白溶液加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液并沸水煮 5 min。取 25 μL 变性的蛋白溶液,行 SDS-PAGE(5% 积层胶和 10% 分离胶)电泳,并以电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭,加一抗[鼠抗 OPN, 1∶3 000(Abcam, USA);鼠抗 Runx2, 1∶3 000(Abcam, USA);鼠抗 Wnt-1, 1∶4 000(Abcam, USA);鼠抗 GAPDH,1∶10 000(Abcam, USA)]及二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP)行免疫印迹检测, ECL 试剂盒发光,胶片曝光。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件行独立样本 t 检验比较 OPN、Runx2 和 Wnt-1 的表达水平差异。

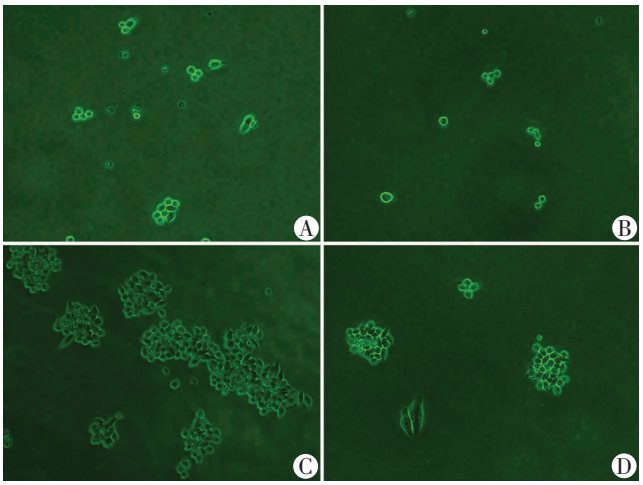
2 结果

2.1 流式细胞技术分选结果

乳腺癌 MDA-MB231 细胞株中侧群细胞分选比例为 2.6%。

2.2 MDA-MB231 侧群细胞与成骨细胞株 MC3T3-E1 共培养后形态学变化特点

与成骨细胞共培养的乳腺癌侧群细胞增殖活跃,第 7 天出现大量梭形细胞,细胞聚集成团状生长;单独培养的乳腺癌侧群细胞,细胞增殖缓慢,第 3 天时,细胞仍为圆形,之后虽有梭形细胞出现,但比例略少于实验组(图 1)。



A、C:实验组;B、D:对照组;A、B:培养 3 d;C、D:培养 7 d

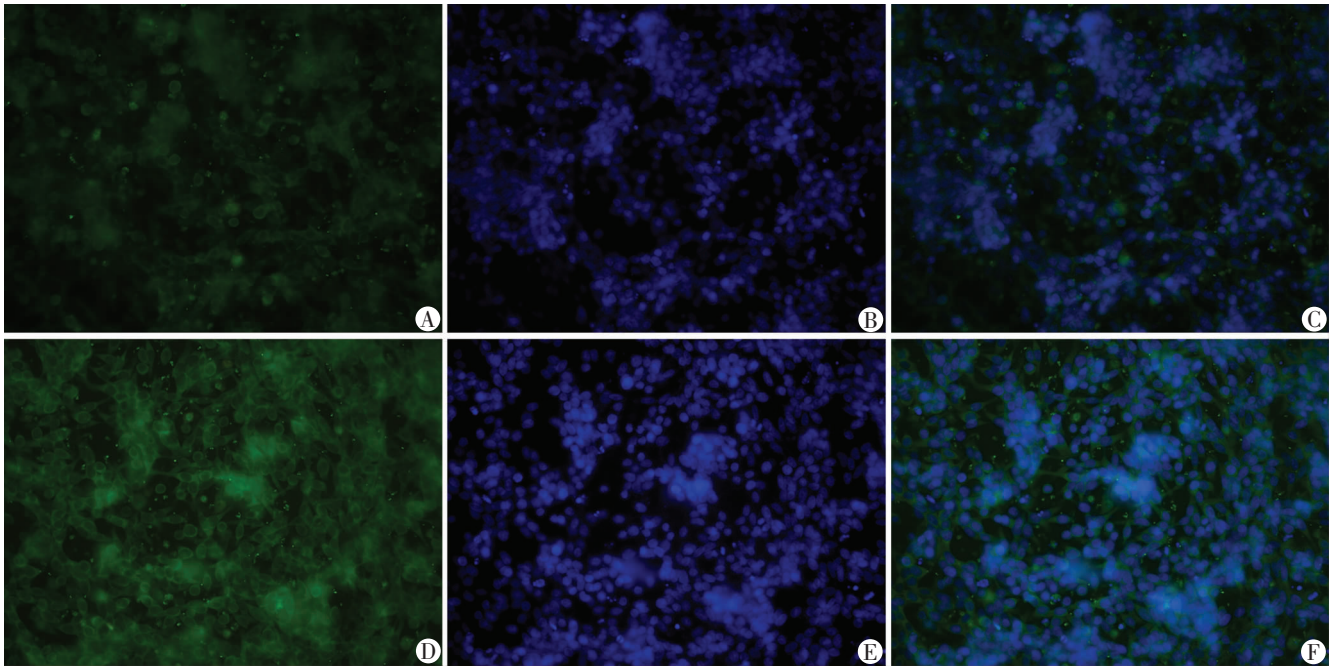
图 1 相差显微镜观察 MDA-MB231 侧群细胞与成骨细胞株 MC3T3-E1 共培养后形态学变化 (×100)

2.3 MDA-MB231侧群细胞与成骨细胞株MC3T3-E1共培养后乳腺癌侧群细胞OPN、Runx2、Wnt-1表达水平的变化

实验组和对照组的乳腺癌侧群细胞在培养7 d后OPN、Runx2、Wnt-1均有阳性表达，但是表达量及荧光强度方面均有差异，实验组共培养体系下乳腺癌侧群细胞中OPN、Runx2、Wnt-1的表达均高于对照组（图2～4）。

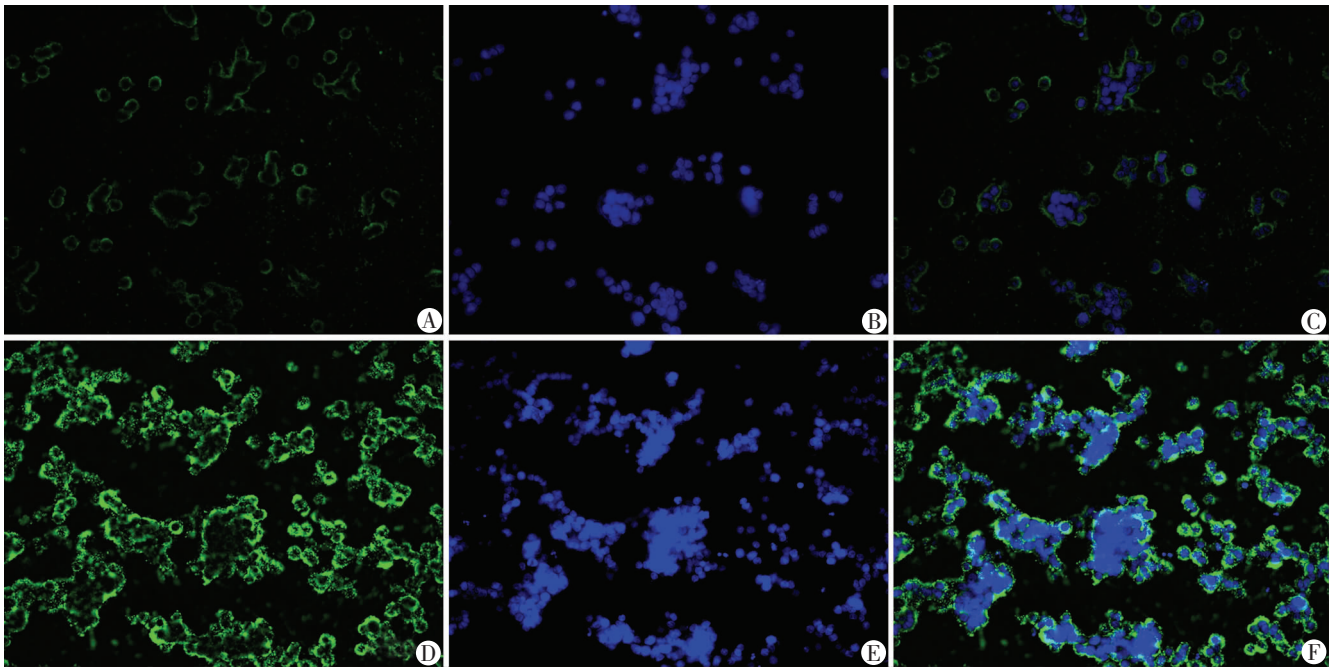
2.4 MDA-MB231侧群细胞与成骨细胞株MC3T3-E1共培养后乳腺癌侧群细胞OPN、Runx2、Wnt-1蛋白的表达变化

实验组乳腺癌侧群细胞中OPN（5.15±0.35）、Runx2（6.22±0.36）、Wnt-1（9.30±0.28）的蛋白表达均高于对照组OPN（1.00±0.15）、Runx2（1.00±0.14）、Wnt-1（1.00±0.13），差异具有统计学意义（$P<0.05$，图5）。



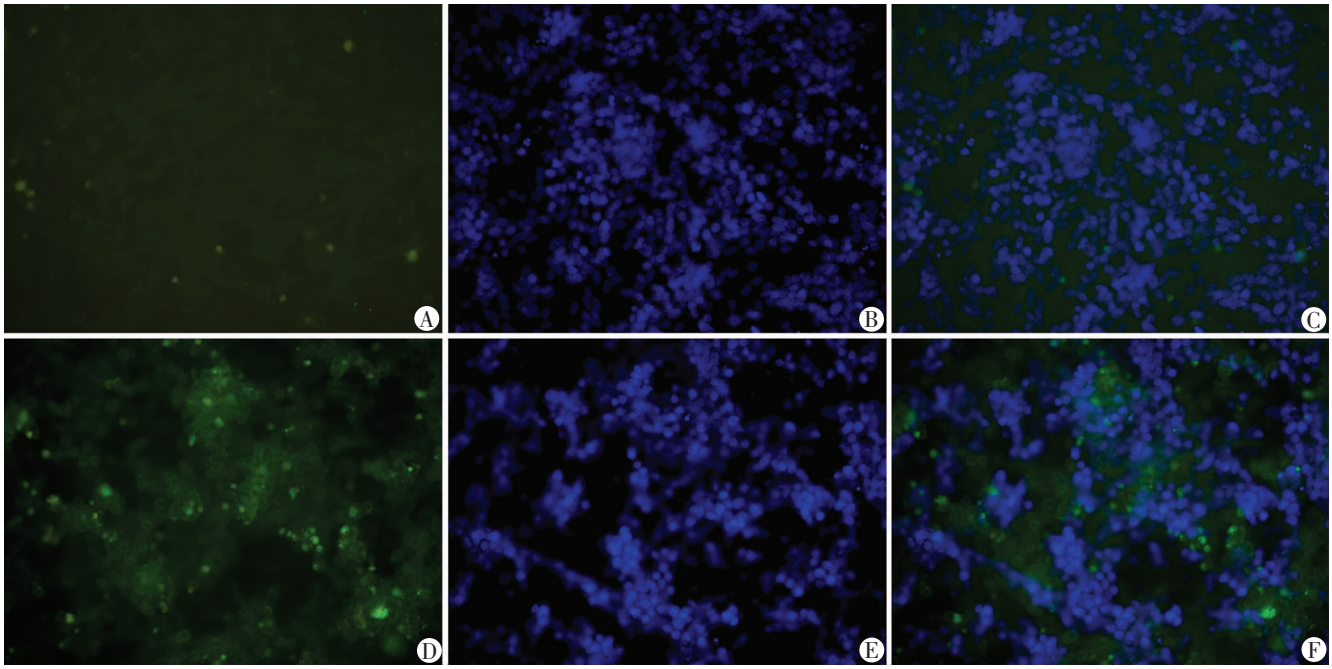
A～C：对照组；D～F：实验组；A、D：细胞质染色；B、E：DAPI；C、F：融合

图2 培养7 d后免疫荧光染色观察2组乳腺癌侧群细胞OPN的表达 （×400）



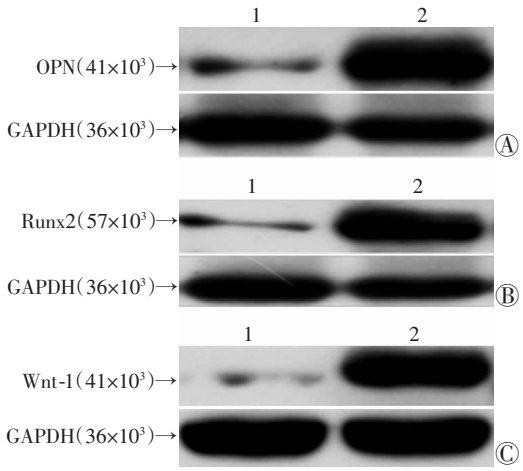
A～C：对照组；D～F：实验组；A、D：细胞质染色；B、E：DAPI；C、F：融合

图3 培养7 d免疫荧光染色观察2组乳腺癌侧群细胞Runx2的表达 （×400）



A～C:对照组;D～F: 实验组;A、D;细胞质染色;B、E: DAPI;C、F:融合

图 4　培养 7 d 免疫荧光染色观察 2 组乳腺癌侧群细胞 Wnt-1 的表达　(×400)



1:对照组;2:实验组

图 5　Western blot 检测 2 组乳腺癌侧群细胞中 OPN(A)、Runx2(B)、Wnt-1(C)蛋白的表达

3　讨论

转移的肿瘤细胞对锚地微环境的适应性,是不同肿瘤易于发生某些器官和部位转移的原因之一。骨是乳腺癌最常见的转移部位,70% 的晚期乳腺癌患者会出现骨转移[10]。研究表明,乳腺癌细胞具有骨模拟的特性可能是其优先转移至骨微环境中且存活的原因[3],其机制尚不清楚。肿瘤干细胞与肿瘤形成、转移密切相关[4-6]。研究发现乳腺癌患者骨髓穿刺检查到的转移肿瘤细胞多为具有干细胞特征的乳腺癌细胞[11],其机制尚待深入研究。利用肿瘤干细胞不同表面标志物分选是常用的干细胞分选技术,但是不同肿瘤之间、同一肿瘤的不同亚型之间,肿瘤干细胞的标志也不尽相同。实体肿瘤中,仍缺乏合适的肿瘤干细胞的表面标志物。通过 Hoechst33342 双波长荧光分析鉴定侧群细胞是另一种有效的鉴定分离干细胞的技术。其原理基于肿瘤干细胞可外排荧光染料 Hoechst33342,在流式细胞图中呈低染状态。虽然产生这一现象的机制尚不清楚,但可以肯定的是,ATP 结合盒膜转运蛋白,又称 ABC 转运蛋白,其家族成员三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 G2(ABCG2)是产生侧群细胞表型的原因,其可泵出荧光染料 Hoechst33342,加入 ABCG2 抑制剂维拉帕米后,可抑制染料外排,减少侧群细胞比例。文献[9,12－13]报道在乳腺癌细胞株 MDA-MB231 中存在着富含肿瘤干细胞特性的侧群细胞,其可促进培养基中肿瘤球体的形成以及裸鼠乳房脂肪垫中肿瘤的生长。

本实验以具有干细胞特性的乳腺癌侧群细胞为研究对象,通过对比 2 种培养体系,观察在与成骨细胞间接共培养的微环境下乳腺癌侧群细胞的适应性变化,探讨乳腺癌侧群细胞亲骨性转移的原因和可能机制。我们发现乳腺癌 MDA-MB231 细胞株侧群细胞与成骨细胞株 MC3T3-E1 的 Transwell 间接共培养体系中乳腺癌侧群细胞较单独培养增殖活跃,生长状态优于单独培养。细胞形态学观察结果显示乳腺癌 MDA-MB231 细胞株侧群细胞与成骨细胞 MC3T3-E1 的 Transwell 间接共培养时乳腺癌细胞中梭形细胞比例高于单独培养。提示在模拟体内骨微环境的共培养体系下,成骨细胞 MC3T3-E1 分泌的某些介质对乳腺癌侧群细胞的变化产

生影响,虽然尚不清楚是哪些介质通过何种信号途径导致乳腺癌细胞系发生形态学变化,但此种变化对乳腺癌细胞的亲骨性转移可能具有重要意义。

研究显示,成骨细胞的分化是经过不同转录因子和信号蛋白调节的多步骤分子途径,包括OPN、Runx2、Osx和Wnt等信号通路[14-16]。而乳腺癌细胞一旦可表达上述分子,其骨转移能力增强。乳腺癌细胞高表达OPN对骨转移的发病起决定作用,同时骨转移患者血浆中OPN表达水平明显高于未出现骨转移的患者,且这种表达水平随着时间和疾病的进展增强[17]。转录因子Runx2在癌细胞骨转移中起关键作用[18-19]。研究证实,Runx2可促进乳腺癌和前列腺癌的转移。在骨转移模型中,高表达水平的Runx2与肿瘤发生、发展及转移相关基因的表达增加相关,这些基因被认为是肿瘤发生、发展的标志物及肿瘤侵袭转移的重要介质[20]。

Wnt信号通路通过β-catenin/TCF1信号途径激活成骨细胞转录因子Runx2,促进骨质的形成[21]。同时Wnt信号通路可维持乳腺癌干细胞自我更新和分化调节,Wnt-1作为小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)相关肿瘤的插入位点,在肿瘤细胞分化中起重要作用。

本实验在共培养诱导7 d后分别用细胞免疫荧光及Western blot方法检测2种培养体系下乳腺癌侧群细胞中骨转移相关分子的表达情况。结果显示,实验组乳腺癌侧群细胞中OPN、Runx2、Wnt-1的表达水平均显著高于对照组。提示在成骨细胞诱导下,乳腺癌侧群细胞的生物行为学发生变化,其具有了成骨细胞的相关生物学特性。诱导后的乳腺癌侧群细胞Wnt-1表达水平增高,说明其形成肿瘤的能力、调节乳腺癌干细胞自我更新和分化调节的能力及激活Runx2的能力较对照组增强。而诱导后乳腺癌侧群细胞中OPN等成骨细胞相关分子表达水平明显增高,提示与乳腺癌细胞具有适应骨微环境的特性,可能是导致乳腺癌骨转移能力增强的重要原因。这一现象形成的分子机制和临床意义值得进一步研究。

参考文献:

[1] Sterling J A, Edwards J R, Martin T J, *et al*. Advances in the biology of bone metastasis: how the skeleton affects tumor behavior[J]. Bone, 2011, 48(1): 6-15.

[2] Rose A A, Siegel P M. Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis[J]. Bull Cancer, 2006, 93(9): 931-943.

[3] Cox R F, Jenkinson A, Pohl K, *et al*. Osteomimicry of mammary adenocarcinoma cells *in vitro*; increased expression of bone matrix proteins and proliferation within a 3D collagen environment[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41679.

[4] Schabath H, Runz S, Joumaa S, *et al*. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells[J]. J Cell Sci, 2006, 119(Pt 2): 314-325.

[5] Croker A K, 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.

[6] Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, *et al*. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature[J]. Cancer Res, 2009, 69(4): 1302-1313.

[7] Xu W, Lin H, Zhang Y, *et al*. Compound Kushen Injection suppresses human breast cancer stem-like cells by down-regulating the canonical Wnt/β-catenin pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 103.

[8] Nakanishi T, Chumsri S, Khakpour N, *et al*. Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling[J]. Br J Cancer, 2010, 102(5): 815-826.

[9] Wu C, Alman B A. Side population cells in human cancers[J]. Cancer Lett, 2008, 268(1): 1-9.

[10] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[11] Balic M, Lin H, Young L, *et al*. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5615-5621.

[12] Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential[J]. Oncol Rep, 2011, 25(1): 289-296.

[13] 王景涛, 季平, 邓诚, 等. 无血清培养法分选舌癌侧群细胞及其特性的鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(8): 818-821.

[14] Grigoryan T, Wend P, Klaus A, *et al*. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice[J]. Genes Dev, 2008, 22(17): 2308-2341.

[15] Malhotra G K, Zhao X, Band H, *et al*. Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells[J]. J Carcinog, 2011, 10: 38.

[16] Zhang C. Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor Osx[J]. J Orthop Surg Res, 2010, 5: 37.

[17] Shevde L A, Das S, Clark D W, *et al*. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis[J]. Curr Mol Med, 2010, 10(1): 71-81.

[18] Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, *et al*. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression[J]. Cancer Sci, 2010, 101(12): 2670-2675.

[19] Blyth K, Vaillant F, Jenkins A, *et al*. Runx2 in normal tissues and cancer cells: A developing story[J]. Blood Cell Mol Dis, 2010, 45(2): 117-123.

[20] Pratap J, Wixted J J, Gaur T, *et al*. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2008, 68(19): 7795-7802.

[21] Cho R W, Wang X, Diehn M, *et al*. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors[J]. Stem Cells, 2008, 26(2): 364-371.

(**收稿**:2013-02-17;**修回**:2013-03-13)

(编辑 龙 亮)