文章编号:1000-5404(2013)11-1107-04

论著

槐耳清膏对乳腺癌细胞系SUM-159细胞干性特征的影响

胡保全,唐 鹏,齐晓伟,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** 探讨槐耳清膏对源自人乳腺癌细胞系SUM-159的干细胞是否具有抑制或者杀伤作用。**方法** 以人乳腺癌细胞系SUM-159为细胞模型,以0、1、10、100 mg/mL的槐耳清膏溶液处理细胞,观察槐耳清膏给药前后细胞形态学的变化;应用CCK-8法检测IC_{50}值,观察给药前后细胞克隆形成能力和成球能力的变化;流式细胞术检测给药前后$ALDH1^{high}$细胞比例的变化。**结果** CCK-8检测结果显示:槐耳清膏对SUM-159细胞系的IC_{50}值约为10 mg/mL。以浓度为0、1、10 mg/mL的槐耳清膏作用于SUM-159细胞,发现随着浓度的增加,克隆形成的菌落数目逐渐减少($P<0.05$),成球数目和体积也逐渐降低($P<0.05$)。10 mg/mL槐耳清膏作用该细胞后,流式细胞术检测结果显示,$ALDH1^{high}$细胞的比例由给药前的2.8%降到1.5%;1 μg/mL紫杉醇作用该细胞后,$ALDH1^{high}$细胞的比例由给药前的2.8%升到9.1%。**结论** 槐耳清膏对人乳腺癌细胞系SUM-159细胞的克隆形成和成球能力具有明显的抑制作用,同时能够降低SUM-159细胞中$ALDH1^{high}$细胞的比例,提示槐耳清膏可能对乳腺癌干细胞具有一定的抑制或杀伤作用。

[关键词] 乳腺癌;干细胞;SUM-159;槐耳清膏
[中图法分类号] R289.5; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

Effect of Huaier ointment on stemness in breast cancer cell line SUM-159

Hu Baoquan, Tang Peng, Qi Xiaowei, Jiang Jun (Center of Breast Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether Huaier ointment, a paste based on Huaier aqueous extract, has the inhibitory or lethal effect on the stem cells derived from human breast cancer cell line SUM-159. **Methods** CCK-8 assay was used to determine IC_{50} values of Huaier ointment. The morphological changes, colony forming ability and sphere forming ability were observed in SUM-159 cells before and after drug treatment at a dose of 0, 1, 10, and 100 mg/mL. The percentage of $ALDH1^{high}$ cells was detected by flow cytometry before and after administration. **Results** CCK-8 assay showed that IC_{50} value of Huaier ointment in SUM-159 cells was approximately 10 mg/mL. After Huaier ointment were applied on SUM-159 cells at a dose of 0, 1, and 10 mg/mL, the number of formed colonies was gradually reduced as the dose increased ($P<0.05$), and the number and size of cell spheres were also decreased ($P<0.05$). The percentage of $ALDH1^{high}$ cells was decreased from 2.8% to 1.5% after the treatment of 10 mg/mL Huaier ointment, while the percentage was increased to 9.1% after the administration of 1 μg/mL paclitaxel. **Conclusion** Huaier ointment exerts significant inhibitory effect on the colony and sphere formation abilities of SUM-159 cells, and reduces the percentage of $ALDH1^{high}$ cells, which suggesting the agent might inhibit or kill breast cancer stem cells.

[**Key words**] breast neoplasms; stem cell; SUM-159 cells; Huaier ointment

Supported by the Enterprise Cooperation Fund(2009GTL01). Corresponding author: Jiang Jun, Tel: 86-23-68754160, E-mail: jbcd@medmail.com.cn

乳腺癌是女性发病率和病死率最高的恶性肿瘤,且发病率呈逐年增高趋势[1]。虽然近年乳腺癌的治疗水平有了较大提高,患者的生存率较前改善,但是乳腺癌的复发一直是困扰临床治疗的关键难题。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC_S)被认为是肿瘤复发的根源之一[2-4],已成为研究热点。槐耳清膏是我国自主研发的一种已经用于临床肿瘤治疗的中药制剂[5-10],有效成分主要为槐耳多糖蛋白(PS-T)。有研究显示槐耳清膏抗肿瘤作用机制可能与调节机体免疫能力和诱导肿瘤细胞凋亡相关[6-7]。但槐耳清膏对乳腺癌干

[基金项目] 企业合作基金(2009GTL01)
[通信作者] 姜 军,电话:(023)68754160, E-mail:jcbd@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1445.005.html(2013-03-27)

细胞(breast cancer stem cells,BCSCs)是否具有抑制或者杀伤效应,少见文献报道。本研究以乳腺癌细胞株SUM-159为CSC_S模型,初步探讨槐耳清膏对BCSCs生物行为学的影响。

1 材料与方法

1.1 主要药品及试剂

槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供(将槐耳清膏配置成500 mg/mL待用),紫杉醇购自扬子江药业集团有限公司,F12细胞培养液、优质胎牛血清购自Gibco公司,B27、bFGF、EGF均购自Invitrogen公司。

1.2 主要仪器

美国BD公司流式细胞仪、紫外分光光度计均由第三军医大学西南医院中心实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 乳腺癌细胞株SUM-159由第三军医大学西南医院病理学研究所郭玉明博士惠赠。采用终浓度为含5%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、5 μg/mL胰岛素、1 μg/mL氢化可的松、4 μg/mL庆大霉素的F12液体培养体系,置37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养,每2天换液1次,实验选用对数生长期细胞。成球培养采用F12培养基,终浓度内含0.5%胎牛血清、2% B27、20 ng/mL bFGF、20 ng/mL EGF。培养条件同前。

1.3.2 观察形态变化 将SUM-159细胞接种于96孔板,以0、1、10、100 mg/mL的槐耳清膏溶液处理细胞,3 d后用PBS洗细胞2遍,倒置显微镜下观察SUM-159细胞形态变化。

1.3.3 槐耳清膏对SUM-159细胞IC_{50}的测定 用流式细胞仪将SUM-159细胞按每孔3×10^3/100 μL接种于96孔板,设实验组、对照组、空白组,每组设5个平行孔,培养24 h后分别加入0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100、500 mg/mL的槐耳清膏溶液,继续培养72 h,每孔加入10 mL的CCK-8,37 ℃孵育2 h,测定450 nm的光密度值[$D(450)$],计算细胞的抑制率。肿瘤抑制率=[$D(450)_{对照组}-D(450)_{实验组}$]/[$D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}$]×100%。分析计算$IC_{50}$值,实验重复3次。

1.3.4 槐耳清膏对SUM-159细胞克隆形成能力的影响 用流式细胞仪将SUM-159细胞按800/mL接种于24孔板。用0、1、10、100 mg/mL的槐耳清膏溶液处理细胞,以不加槐耳清膏溶液处理的细胞作为阴性对照。12 d后室温条件下,用0.1%结晶紫染色细胞15 min,PBS清洗2次,拍照。重复该实验3次。

1.3.5 槐耳清膏对SUM-159细胞成球能力的影响 取生长状态良好的SUM-159细胞制成单细胞悬液,用流式细胞仪接种24孔低粘附板,每孔1 500个细胞,置入F12成球培养基中悬浮培养,并将槐耳清膏溶液以不同浓度(0、1、10 mg/mL)加入培养基,第1、2天每6小时晃动1次,防止细胞贴壁。7 d后计算成球率、观察成球大小并拍照。

1.3.6 流式细胞检测ALDH阳性比例 参照ALDEFLUOR试剂盒说明书进行,主要步骤:将对照的SUM-159细胞、紫杉醇和槐耳清膏作用1周后的细胞消化、离心后弃去上清液,PBS洗2遍后,用400 μL反应缓冲液重悬细胞,并调整细胞浓度至1×10^6/mL。取200 μL细胞悬液加入测试管,2 μL抑制剂DEAB加入对照管,然后在测试管内加入2 μL活化的ALDEFLUOR底物,混匀后立即吸取200 μL细胞悬液转移至对照管,吹打混匀,将对照管和测试管于37 ℃孵育30 min,将测试管和对照管1 000 r/min离心5 min,吸去上清液,分别用200 μL缓冲液重悬细胞,送第三军医大学西南医院实验室上流式细胞仪检测。

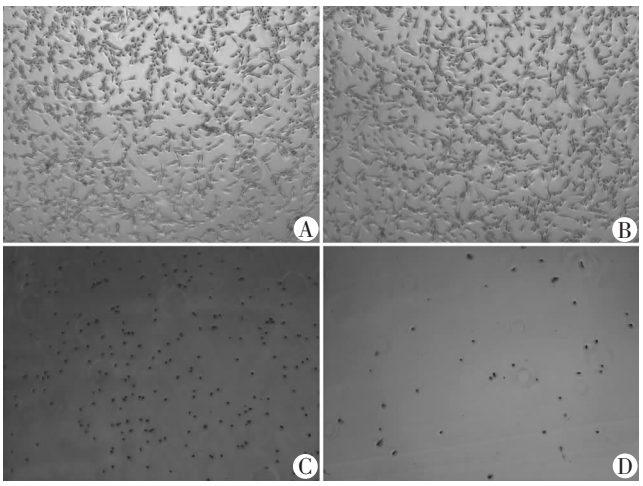
1.4 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析,组建比较行LSD方法;用Graphpad Prism5计算IC_{50}。

2 结果

2.1 细胞形态学观察及IC_{50}测定

槐耳清膏可抑制SUM-159细胞增殖,且随着浓度的增加对细胞的抑制作用越明显。未加入槐耳清膏的细胞呈梭形状,细胞折光性好(图1A);1 mg/mL槐耳清膏组细胞生长状况受到轻度影响(图1B);10 mg/mL槐耳清膏组细胞生长状况明显抑制,细胞形态变圆,可见部分细胞发生死亡(细胞膜破裂、细胞核碎片,图1C);100 mg/mL槐耳清膏组细胞几乎都死亡(图1D)。通过绘制生存曲线(图2)可以计算出该药物对SUM-159细胞的IC_{50}约为10 mg/mL。



A:阴性对照组;B:1 mg/mL槐耳清膏组;C:10 mg/mL槐耳清膏组;D:100 mg/mL槐耳清膏组

图1 倒置显微镜观察加入槐耳清膏培养72 h后SUM-159细胞形态变化 (×40)

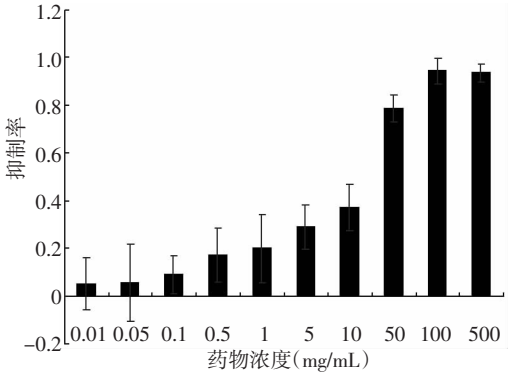


图2 槐耳清膏对SUM-159细胞的抑制作用

2.2 槐耳清膏对SUM-159细胞克隆形成能力的影响

随着槐耳清膏溶液浓度的递增,SUM-159细胞的克隆形成能力明显减少。阴性对照组克隆形成数为(125.0±7.9)个。当槐耳清膏浓度为1 mg/mL,克隆形成能力降低,克隆形成数为(96.4±9.8)个,当浓度达到10 mg/mL时,克隆形成数(19.0±4.3)个,较阴性对照组均有明显减少($P<0.05$);而当浓度达到100 mg/mL时,几乎不能形成克隆集落[(0.6±0.8)个]。

2.3 槐耳清膏对SUM-159细胞成球能力的影响

为了进一步检测槐耳清膏对SUM-159细胞干性能力的鉴定,把不同浓度的槐耳清膏加入SUM-159细胞成球培养基中,培养7 d后,观察发现,随着槐耳清膏浓度的递增,SUM-159细胞成球的体积和数目比阴性对照组均受到明显抑制[阴性对照组成球数(45.33±4.72)个;1 mg/mL槐耳清膏组成球数(38.83±2.64)个;10 mg/mL槐耳清膏组成球数(9.00±2.90)个,$P<0.05$]。见图3。

2.4 槐耳清膏对SUM-159细胞中ALDH1阳性细胞比例的影响

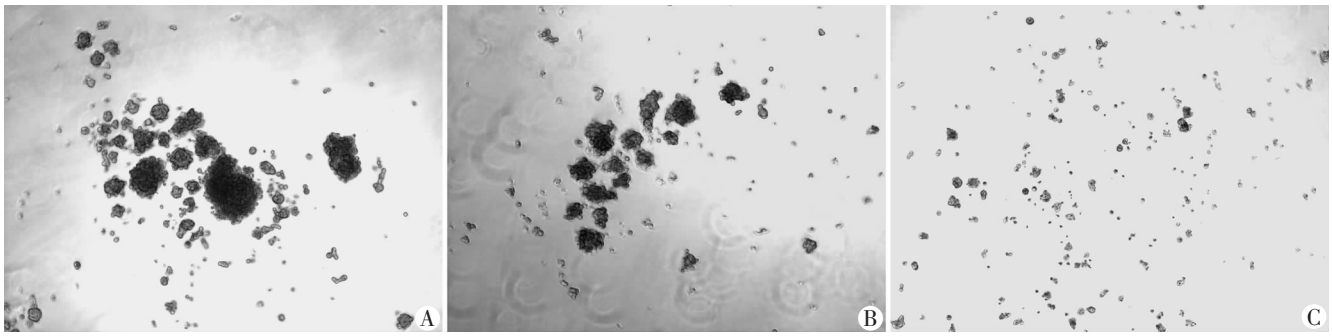
乳腺癌细胞系SUM-159细胞中$ALDH1^{high}$细胞的比例为2.8%。当以1 μg/mL的紫杉醇作用该细胞1周后,其比例升高到9.1%,而以10 mg/mL的槐耳清膏液作用后,$ALDH1^{high}$细胞比例由2.8%降到了1.5%,提示槐耳清膏对BCSCs具有一定的杀伤作用。

3 讨论

随着乳腺癌诊治研究的发展,乳腺癌的生存率有了一定的提高,但是仍有部分患者死于各类转移[11]。近年研究表明:肿瘤的形成、转移与CSCs相关[12-13]。传统的肿瘤化疗长期效果不佳的原因可能是化疗可以杀伤大部分肿瘤细胞,但是对CSCs却不能完全清除,结果可能起到富集CSCs的作用。虽然CSCs耐药的机制尚不清楚,但已有研究证实残留的CSCs是导致乳腺癌复发、转移的重要原因之一[13]。因此,研究CSCs的特性和杀灭CSCs的方法成为肿瘤学临床和基础研究的热点[14-16]。

槐耳清膏作为我国传统医学中一类新药的代表,不仅能够抑制肿瘤的生长,还能够调剂机体的免疫能力。研究发现槐耳清膏能够抑制白血病细胞系K562细胞的增殖及诱导其凋亡,与下调Bcl-xl mRNA的表达并上调Bax mRNA的表达有关[17]。另有研究证实,槐耳颗粒可以抑制血管内皮细胞构建新生血管,从而明显抑制肿瘤血管的生成[18]。槐耳清膏还可以逆转耐药基因MDR-1 mRNA表达从而使肿瘤细胞恢复对化疗药的敏感性[19]。目前,槐耳清膏制剂"槐耳颗粒"已经较为广泛地用于对肝癌、甲状腺癌、结肠癌、乳腺癌等的治疗[7,9-10,20]。

研究CSCs首先要分选和鉴定CSCs。目前常用方法有:①克隆形成实验:CSCs能在软琼脂培养板或者低粘附板形成克隆集落;②成球实验:CSCs能在富含F12、bFGF、EGF的干细胞培养基中生存并形成明显的团状,而普通细胞则无法生存[21];③标记物流式分选:因其分选速度快、精确度高等优点成为目前最为常用的分选方法。人乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase,ALDH)是乳腺癌中较为常用的干细胞分选标记物之一[22]。因此,本研究以人乳腺癌细胞系SUM-159为细胞模型,采用ALDH1为标记物分选BCSCs,并通过对比给槐耳清膏前后克隆形成能力、细胞成球能力以及$ALDH1^{high}$细胞比例变化情况对槐耳清膏是否具有抗BCSCs的作用进行初步探讨。本实验结果显示:随着槐耳清膏用药剂量的加大,乳腺癌细胞系SUM-159的克隆形成能力逐渐下降(阴性对照组和槐耳清膏1 mg/mL组比较差异无统计学意义,而阴性对照组和槐耳清膏1 mg/mL组均与槐耳清膏10 mg/mL组乳腺癌细胞系SUM-159的克隆形成能力存在统计学差异,槐耳清膏100 mg/mL组则不能形成有效的克隆集落)。成球实验也得到了类似的结果。提示槐耳清膏能够抑制乳腺癌细胞系SUM-159中的干细胞。



A:阴性对照组;B:1 mg/mL槐耳清膏组;C:10 mg/mL槐耳清膏组

图3 不同浓度的槐耳清膏对SUM-159细胞成球能力的影响 (LM ×40)

已有研究表明:经过紫杉醇处理后的细胞,其CSCs比例由处理前的4.7%升高至13.6%[4]。提示常规化疗等辅助治疗虽然可以杀死大部分肿瘤细胞,但是对CSCs无明显效果,甚至有富集CSCs作用,这一现象也解释了临床治疗中化疗效果好的乳腺癌患者仍存在部分复发的原因。因此,寻找能够杀伤CSCs的新药显得尤为重要,以便能进一步提高目前的治疗水平。本研究还发现:加入槐耳清膏处理后的细胞,$ALDH1^{high}$细胞比例由2.8%降至1.5%,提示槐耳清膏对CSCs的具有杀伤作用,但其作用的机制尚不清楚。目前已知,Wnt、Notch、Hedgehog等信号通路是CSCs维持自我更新的重要信号通路[23-25],而另外一种中成药——莱菔硫烷(一种绿花椰菜提取物)可通过下调Wnt/β-catenin信号通路杀伤BCSCs[26];还有研究表明通过抑制或者沉默Bcl-2、Bcl-xl等抗凋亡基因的表达,可以诱导CSCs发生凋亡[16]。而槐耳清膏是否也通过上述途径发挥作用目前并不清楚,需要进一步研究证实。

参考文献:

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

[2] Gupta P B, Onder T T, Jiang G, *et al*. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4): 645-659.

[3] Park C Y, Tseng D, Weissman I L. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic[J]. Mol Ther, 2009, 17(2): 219-230.

[4] Li X, Lewis M T, Huang J, *et al*. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(9): 672-679.

[5] Sun Y, Sun T, Wang F, *et al*. A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects[J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(1): 577-582.

[6] Wang X, Zhang N, Huo Q, *et al*. Anti-angiogenic and antitumor activities of Huaier aqueous extract[J]. Oncol Rep, 2012, 28(4): 1167-1175.

[7] Zhang N, Kong X, Yan S, *et al*. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of breast cancer cells by inducing apoptosis[J]. Cancer Sci, 2010, 101(11): 2375-2383.

[8] Xu X, Wei Q, Wang K, *et al*. Anticancer effects of Huaier are associated with down-regulation of P53[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(9): 2251-2254.

[9] 海艳杰, 郑宇, 庄亚严, 等. 槐耳颗粒联合化疗对晚期大肠癌的初步临床研究[J]. 药物流行病学杂志, 2012, 21(2): 53-55.

[10] 杨倩, 唐中华, 徐峰. 槐耳颗粒30例甲状腺癌术后辅助治疗应用[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(7): 683-684.

[11] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277-300.

[12] Shafee N, Smith C R, Wei S, *et al*. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68(9): 3243-3250.

[13] Hambardzumyan D, Squatrito M, Holland E C. Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors[J]. Cancer Cell, 2006, 10(6): 454-456.

[14] Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, *et al*. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges[J]. Pathobiology, 2008, 75(2): 75-84.

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

[16] Lang J Y, Hsu J L, Meric-Bernstam F, *et al*. BikDD eliminates breast cancer initiating cells and synergizes with lapatinib for breast cancer treatment[J]. Cancer Cell, 2011, 20(3): 341-356.

[17] 王运玉, 吴柱国. 槐耳清膏联合羟基脲对K562细胞增殖、凋亡及相关基因表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(3): 190-192, 195.

[18] Ren J, Zheng C, Feng G, *et al*. Inhibitory effect of extract of fungi of Huaier on hepatocellular carcinoma cells[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(2): 198-201.

[19] 李戎, 谢莎, 张莉, 等. 槐耳颗粒逆转人乳腺癌细胞MCF-7耐药的初步机制[J]. 中国实用医药, 2009, 4(17): 1-3.

[20] Lv H, Jiang Y, Liao M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* treatments of Echinococcus granulosus with Huaier aqueous extract and albendazole liposome[J]. Parasitol Res, 2013, 112(1): 193-198.

[21] Vaillant F, Asselin-Labat M L, Shackleton M, *et al*. The emerging picture of the mouse mammary stem cell[J]. Stem Cell Rev, 2007, 3(2): 114-123.

[22] Ginestier C, Hur M H, 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.

[23] Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(5): 548-558.

[24] Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, *et al*. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer[J]. Lung Cancer, 2009, 66(3): 275-281.

[25] Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, *et al*. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3): 195-206.

[26] Li Y, Zhang T, Korkaya H, *et al*. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(9): 2580-2590.

(**收稿**:2013-01-28;**修回**:2013-03-22)

(编辑 龙 亮)