短篇论著

文章编号:1000-5404(2013)23-2590-03

# 人乳腺癌相关成纤维细胞对 MDA-MB-231 细胞的影响

彭琼乐[1*],杨得志[2*],赵浏阳[1],王黎阳[1],孙 艳[1],柳满然[1] (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];545001 广西 柳州,柳州市中医院病理科[2])

[摘要] **目的** 探讨人乳腺癌相关成纤维(cancer associated fibroblasts,CAFs)细胞对 MDA-MB-231 细胞生长、增殖和侵袭的影响。**方法** 实验分2组:MDA-MB-231 细胞单独培养组(对照组)和 MDA-MB-231 与 CAFs 细胞共培养组(实验组)。以细胞计数法观察人乳腺癌 CAFs 细胞对 MDA-MB-231 细胞生长的影响;运用流式细胞术检测人乳腺癌 CAFs 细胞对 MDA-MB-231 细胞周期的影响;采用条件培养基,通过 Transwell 小室侵袭实验观察人乳腺癌 CAFs 细胞对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。**结果** 与对照组比较,实验组 MDA-MB-231 细胞的生长速度明显增强($P<0.05$),细胞周期 S 期细胞百分比[(32.35±4.50)%]和细胞增殖指数 PI[(42.91±2.44)%]明显增高($P<0.05$);在 CAFs 细胞的条件培养基下,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力明显增强($P<0.01$)。**结论** 人乳腺癌 CAFs 细胞能够显著促进 MDA-MB-231 细胞的生长、增殖和侵袭。

[关键词] 乳腺癌微环境;CAFs;MDA-MB-231 细胞
[中图法分类号] R73-35;R737.9 [文献标志码] A

肿瘤的生长和侵袭不仅取决于恶性肿瘤细胞本身,而且与肿瘤微环境的某些细胞和胞外基质密切相关[1]。癌相关的成纤维(cancer associated fibroblasts,CAFs)细胞是肿瘤微环境中最主要的宿主细胞。与肿瘤微环境其他成员相比,CAFs 所占比例最大,在某些肿瘤组织中约占基质成分的80%[2]。越来越多的研究表明,CAFs 与肿瘤细胞的交流十分密切:一方面通过细胞-细胞间的直接接触,另一方面通过产生一系列分泌成分,如细胞因子、趋化因子、基质金属蛋白酶(MMPs)、金属蛋白酶抑制剂(TIMP)或表达某些特殊的受体等,参与细胞结构重建、黏膜免疫、肿瘤微环境和肿瘤干细胞特有生长环境的维护等[3-5],从而促进肿瘤细胞的生长、增殖、侵袭和转移,降低肿瘤细胞对放化疗的敏感性[6-7]。而 CAFs 对乳腺肿瘤的发生、发展的影响较复杂。本研究采用共培养或条件培养基(condition medium, CM)下的 Transwell 小室侵袭实验,观察 CAFs 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长、增殖和侵袭的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人乳腺癌微环境 CAFs 细胞由本课题组培养,从临床乳腺癌组织中原代分离培养[8];MDA-MB-231 细胞由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、DMEM/H 培养基和 DMEM/H 无酚红培养基购自 Gibico 公司,DMSO 购自碧云天生物技术有限公司,Transwell 小室购自 Millipore 公司,ECM 胶购自 Sigma 公司,6/24 孔板购自 Coster 公司,结晶紫粉末和草酸铵购自鼎国昌盛生物技术有限责任公司,其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 CAFs 与 MDA-MB-231 细胞的间接共培养

将 Transwell 小室(0.4 μm)放入 6 孔培养板,癌细胞和 CAFs 分别培养于小室和培养板小孔内,通过分泌蛋白相互影响,构成模拟体内肿瘤微环境的培养系统,以研究细胞间的相互作用[9]。选择对数生长期的 CAFs 和 MDA-MB-231 细胞,更换培养基为含0.5% FBS 的 DMED/H 无酚红培养基,饥饿培养24 h,胰蛋白酶消化细胞,行细胞计数,并记录。实验分2组:MDA-MB-231 细胞单独培养组(对照组)和 MDA-MB-231 与 CAFs 细胞共培养组(实验组);在6孔板上各个实验孔接种 $1\times10^4$ 个 MDA-MB-231 细胞,实验组 Transwell 小室内接种 $3\times10^3$ 个CAFs 细胞,对照组小室内加入相同体积不含细胞的培养基;用含0.5% FBS 的 DMEM/H 无酚红培养基培养,每组设3个复孔。

### 1.3 流式细胞周期检测(FCM 法)

将共培养的 MDA-MB-231 细胞培养至汇合度约80%,胰酶消化后收集,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。

### 1.4 CM 的制备

将 CAFs 细胞培养于含10% FBS 的 DMEM/H 培养基中,至细胞汇合度约80%时,用含0.5% FBS 的 DMEM/H 无酚红培养基继续培养36 h,收集细胞上清液,1 200 r/min 离心15 min,取上清液,即为 CM。

[基金项目] 国家自然科学基金(81072147);教育部高校博士点基金(20105503110001);教育部留学回国启动基金(2011508);重庆医科大学检验医学院优秀博士基金(070025000204)
* 同等贡献者
[通信作者] 柳满然,电话:(023)68485184,E-mail:manran1122@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1456.001.html(2013-09-14)

### 1.5 Transwell 小室侵袭实验[10]

在每个 24 孔板 Transwell 小室(8 μm)中加入 30 μL 按 1∶7.5 稀释的 ECM 胶,使 ECM 胶均匀平铺在小室的内层,37 ℃ 放置 15 min 使其凝固形成上室,加入 200 μL 含 5 000 个细胞的不含 FBS 的培养基或 CM;下室中加入 600 μL 不含 FBS 的培养基或 CM;培养箱培养 12 h;棉签轻轻擦掉 Transwell 小室内层的 ECM 胶和细胞,0.1% 的结晶紫溶液染色 3 ~ 5 min,流水漂洗;正置相差显微镜下,分别选择膜的左、右、中、上、下 5 个视野,计数迁移至小室外层细胞,绘制柱状图。

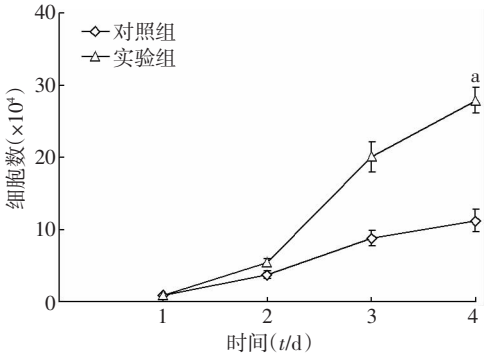
### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 CAFs 细胞促进 MDA-MB-231 细胞的生长

共培养体内环境模拟体系条件下,采用细胞计数实验观察 CAFs 对 MDA-MB-231 细胞的生长影响。与对照组比较,实验组 MDA-MB-231 细胞共培养后能够明显促进细胞的生长($P < 0.05$,图 1)。




a:$P < 0.05$,与对照组比较

**图 1 细胞计数实验观察 2 组 MDA-MB-231 细胞的生长**

### 2.2 CAFs 细胞促进 MDA-MB-231 细胞的增殖

与 MDA-MB-231 细胞单独培养的对照组相比,实验组 $G_0/G_1$ 期细胞比例较少,S 期细胞百分比和细胞增殖指数(PI)明显增高($P < 0.05$,表 1)。

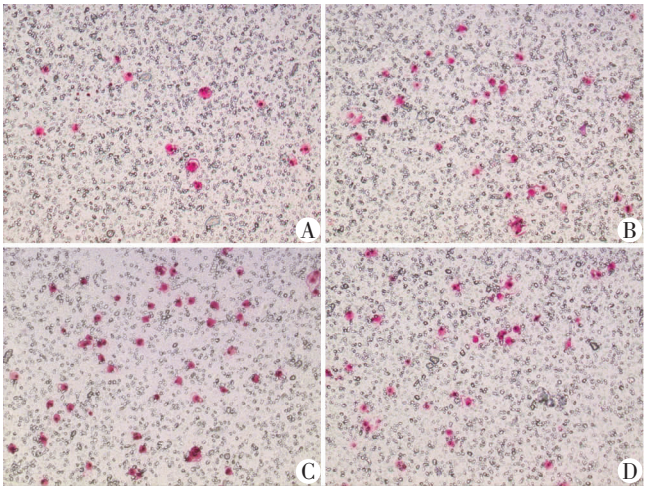
**表 1 两组 MDA-MB-231 细胞周期分布及 PI 比较** [$n = 3$, $(\bar{x} \pm s)\%$]

| 细胞 | $G_1$期 | S 期 | $G_2$期 | PI |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 68.24 ± 4.95 | 21.02 ± 5.21 | 10.74 ± 0.87 | 31.76 ± 4.94 |
| 实验组 | 57.10 ± 2.44 | 32.35 ± 4.50[a] | 10.55 ± 2.12 | 42.91 ± 2.44[a] |

a:$P < 0.05$,与对照组比较

### 2.3 CAFs 细胞促进 MDA-MB-231 细胞的侵袭

在未添加 CM 的情况下,即 Transwell 小室的上下室均为不添加 FBS 的培养基,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力较弱,仅少数细胞穿到 Transwell 小室的外层(23.0 ± 8.8,图 2A);当 Transwell 小室的上室或下室中加入 CAFs 细胞的 CM 时,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力明显增强(图 2B、D),穿到 Transwell 小室膜外层的细胞较多(FBS free/CM 与 CM/free 分别为 67.4 ± 6.8,53.0 ± 9.1,$P < 0.01$);当 Transwell 小室的上下室均添加 CAFs 细胞的 CM 时,MDA-MB-231 的侵袭能力最强(110.2 ± 3.0,图 2C)。




A:上下室均为不含 FBS 的培养基;B:上室为不含 FBS 的培养基,下室为 CM;C:上下室均为 CM;D:上室为 CM,下室为不含 FBS 的培养基

**图 2 相差显微镜下观察 CAFs 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响**(×100)

## 3 讨论

目前认为 CAFs 对肿瘤的发生、发展起促进作用[11]。有报道指出乳腺癌发生可能与肿瘤微环境间质中 CAFs 细胞的活化密切相关[12-13]。然而,CAFs 细胞与癌细胞间进行着怎样的交流?这种交流对彼此有什么影响?我们通过 Transwell 小室共培养观察 CAFs 细胞与癌细胞之间的相互作用。

在共培养条件下,以细胞计数实验和流式细胞术观察到 CAFs 细胞能够明显促进 MDA-MB-231 细胞生长和增殖。与单独培养的 MDA-MB-231 细胞相比,与 CAFs 共培养的 MDA-MB-231 细胞生长、增殖增强($P < 0.05$),增殖指数明显提高,这可能与 CAFs 细胞分泌的多种生长因子相关,如 IGF、KGF、EGF 等[14]。

在 CAFs 细胞条件培养基下,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力明显增强,说明 CAFs 细胞能够增强 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。CAFs 与癌细胞的这种相互作用可能是通过某种分泌因子介导的。研究发现,来源于乳腺癌 CAFs 细胞的 SDF-1/CXCL12 可以招募 M2 单核细胞到肿瘤组织中促进肿瘤血管和淋巴管的重建[15],进一步表明 CAFs 细胞可能通过分泌细胞因子与肿瘤细胞进行密切交流。

## 参考文献:

[1] Nyberg P, Salo T, Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis[J]. Front Biosci, 2008, 13: 6537 - 6553.

[2] Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(8): 1324 - 1331.

[3] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue re-

pair[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127(3): 526-537.
[4] Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, *et al*. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(14): 4966-4971.
[5] Dang T T, Prechtl A M, Pearson G W. Breast cancer subtype-specific interactions with the microenvironment dictate mechanisms of invasion[J]. Cancer Res, 2011, 71(21): 6857-6866.
[6] Bailey K M, Wojtkowiak J W, Hashim A I, *et al*. Targeting the metabolic microenvironment of tumors[J]. Adv Pharmacol, 2012, 65: 63-107.
[7] Ward C, Langdon S P, Mullen P, *et al*. New strategies for targeting the hypoxic tumour microenvironment in breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2013, 39(2): 171-179.
[8] 彭琼乐, 孙艳, 赵浏阳, 等. 人乳腺癌相关成纤维细胞的原代培养及其生物学特性[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(10): 1368-1372.
[9] 张茜, 金若敏. 细胞共培养技术的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(3): 330-332.
[10] Liu M, Sakamaki T, Casimiro M C, *et al*. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion[J]. Cancer Res, 2010, 70(24): 10464-10473.
[11] De-Wever O, Demetter P, Mareel M, *et al*. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth[J]. Int J Cancer, 2008, 123(10): 2229-2238.
[12] Micke P, Ostman A. Exploring the tumour environment: cancer-associated fibroblasts as targets in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2005, 9(6): 1217-1233.
[13] Orimo A, Weinberg R A. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type[J]. Cell Cycle, 2006, 5(15): 1597-1601.
[14] Bremnes R M, Donnem T, Al-Saad S, *et al*. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(1): 209-217.
[15] Koyama H, Kobayashi N, Harada M, *et al*. Significance of tumor-associated stroma in promotion of intratumoral lymphangiogenesis: pivotal role of a hyaluronan-rich tumor microenvironment[J]. Am J Pathol, 2008, 172(1): 179-193.

(**收稿**:2013-06-06;**修回**:2013-07-28)
(编辑 汪勤俭)

## 短篇论著

**文章编号**:1000-5404(2013)23-2592-03

# 双相障碍患者家庭功能及亲密度适应性情况调查

张旭静[1,2,3],史占彪[1,2],徐夏菲[3],戴 茜[3],张彦恒[3],张金凤[1,2] (100101 北京,中国科学院心理研究所[1];100049 北京,中国科学院大学应用心理学[2];071000 河北 保定,河北省第六人民医院临床七科[3])

[**摘要**] **目的** 了解双相障碍患者与正常人群的家庭功能及亲密度和适应性的差异。**方法** 采用家庭功能量表(Family Assessment Device,FAD)及家庭亲密度与适应性量表中文版(Family Adaptability and Cohesion Scale Ⅱ-Chinese Version, FACESⅡ-CV),对40例双相障碍患者(患者组)及40例健康志愿者(对照组)进行调查。**结果** 患者组家庭功能在问题解决(13.78±3.22)、角色(25.45±3.49)、行为控制(21.45±3.19)和总的功能(26.35±5.33)等方面的评分显著高于正常对照组($P<0.05$),患者组的家庭适应性评分显著低于正常对照组(44.33±7.74 *vs* 47.50±5.29,$P<0.05$),家庭亲密度评分略低于正常对照组,但两者无显著性差异(66.08±9.57 *vs* 67.21±6.06,$P>0.05$)。实际家庭类型两组存在显著性差异($P<0.05$)。**结论** 双相障碍患者的家庭功能状况较差,提示在疾病治疗及康复过程中,可以有针对性的加强家庭心理治疗干预。

[**关键词**] 双相情感障碍;家庭功能;亲密度;适应性
[**中图法分类号**] R195.4; R749.4 [**文献标志码**] A

双相障碍(bipolar disorder,BP)也称双相情感障碍,是一组常见的重性精神疾病,指既有躁狂发作或轻躁狂发作,又有抑郁发作的一类心境障碍。与抑郁障碍相比,双相障碍的临床表现更复杂,治疗更困难,预后更差,自杀风险更大,是一种严重危害人们心身健康的精神障碍,给患者及家属带来沉重的负担[1]。双相障碍已经成为目前精神医学的一个研究热点。双相障碍发病的原因尚不十分清楚,目前倾向认为,遗传与环境因素在其发病过程中均有重要作用。家庭是环境因素中的一个重要方面,家庭功能对青少年情绪问题有一定预测作用[2]。双相障碍的患者的复发和恢复受环境的影响。国外无论是横断面还是纵向研究都发现,家庭环境的功能属性,尤其是疾病发作后的家庭功能与双相障碍及重度抑郁的症状严重程度有关;在合并药物治疗的情况下进行系统的家庭治疗对稳定抑郁

[**通信作者**] 史占彪,E-mail: shizb@psych.ac.cn
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1456.002.html (2013-09-14)