

基底样乳腺癌与管腔 A 乳腺癌干/祖细胞的表型分析

陈元文¹, 吴诚义², 董华英² (1. 重庆市第五人民医院普外科 400062; 2. 重庆医科大学附属第一医院普外科, 重庆 400016)

【摘要】 目的 比较人基底样乳腺癌和管腔 A 乳腺癌干/祖细胞分化前后的细胞表型变化。**方法** 应用乳腺癌细胞球无血清悬浮培养法获取乳腺癌干/祖细胞; 分别以荧光免疫技术和流式细胞术检测基底样乳腺癌和管腔 A 乳腺癌干/祖细胞分化前后细胞角蛋白 CK14、CK18、CK19 和 CD44、CD24 的表达情况; 分析原代细胞内 CD44⁺CD24⁻细胞水平与克隆形成率的关系。**结果** 基底样乳腺癌干/祖细胞表达 CK19⁺/CK14⁺, 不表达 CK18⁻, 经血清诱导分化后, 管腔上皮标志 CK18 和肌上皮标志 CK14 呈阳性表达; 管腔 A 乳腺癌干/祖细胞呈 CK18⁺/CK19⁺/CK14⁻表型, 诱导分化后管腔上皮标志 CK18 和 CK19 表达, 而肌上皮细胞标志 CK14 则不表达; CD24 在基底样乳腺癌表达极低或无表达, 但在管腔 A 乳腺癌高表达。基底样乳腺癌原代细胞中水平较高的是 CD44⁻/CD24^{-/Low} 细胞, 含 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞 (2.52 ± 0.58)%, 而管腔 A 乳腺癌 CD44⁻/CD24⁺ 细胞所占的比例最高, 但不含 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞或水平极低。**结论** 基底样乳腺癌和管腔 A 乳腺癌干/祖细胞有不同的细胞表型, 二者的分化能力和分化方向也不同, 可能起源于不同的乳腺上皮细胞。

【关键词】 乳腺癌分子亚型; 乳腺癌干/祖细胞; 无血清培养; 细胞表型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.02.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)02-0165-03

Phenotypic analysis of stem/progenitor cells derived from basal-like and luminal-A breast cancer CHEN Yuan-wen¹, WU Cheng-yi², DONG Hua-ying² (1. Department of General Surgery, Chongqing Municipal Fifth People's Hospital, Chongqing 400062, China; 2. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To compare the phenotypic change of stem/progenitor cells from basal-like breast cancer and luminal-a breast cancer before and after differentiation. **Methods** The breast cancer stem/progenitor cells were obtained by the breast cancer mammosphere (MS) serum-free Maitland culture; the expression of CK14, CK18, CK19, CD44 and CD24 before stem/progenitor cells differentiation in basal-like breast cancer and luminal-a breast cancer were detected by the immunofluorescence and the flow cytometry; the relation between the content of CD44, CD24 cells in the primary cells with the cloning efficiency (Msf) were analyzed. **Results** The stem/progenitor cells of basal-like breast cancer showed the CK19⁺/CK14⁺ CK18⁻ phenotype, after the induced differentiation, expressed the luminal epithelium marker CK18 and myoepithelium marker CK14. The stem/progenitor cell phenotype of basal-like breast cancer and luminal-a breast cancer showed CK18⁺/CK19⁺/CK14⁻, after the induced differentiation, expressed the luminal epithelium marker CK18 and CK19, did not express CK14; CD24 had the extreme low expression or no expression in basal-like breast cancer, but had high expression in luminal a breast cancer. CD44⁻/CD24^{-/Low} cells had higher content in basal-like breast cancer primary cells, containing CD44⁻/CD24^{-/Low} cells for (2.52 ± 0.58)%, but luminal a breast cancer had highest content of CD44⁻/CD24⁺ cells, did not contain CD44⁺/CD24^{-/Low} cells or their content was extremely low. **Conclusion** The stem/progenitor cells of basal-like breast cancers and luminal-A breast cancer exhibit different phenotypes. Their differentiation ability and direction are different, which implied that they could be originated from different normal mammary epithelial cells.

【Key words】 molecular subtype of breast cancer; breast cancer stem/progenitor cells; serum-free culture; cell phenotype

基底样乳腺癌和管腔 A 乳腺癌是乳腺癌的 2 个分子亚型, 二者不仅在临床病理特点和基因表达谱有明显差异, 在生长过程中也表现出细胞表型不同^[1-3]。本文收集基底样乳腺癌和管腔 A 乳腺癌, 通过原代细胞培养获取其干/祖细胞, 以 CK14、CK18 和 CK19 三种细胞角蛋白, 两种与肿瘤干/祖细胞相关的标记物 CD24 和 CD44 作为检测指标, 初步探讨这两种乳腺癌分子亚型干/祖细胞在分化过程中的表型变化。

1 材料与方法

1.1 主要材料 本文收集的 17 例乳腺癌标本由重庆医科大学附属第一医院普外科提供, 取材时间 2008 年 4 月至 2010 年 1 月, 所有病例术前未经化疗和放疗, 病理确诊为乳腺浸润性导管癌, 并根据术后免疫组化结果分型: 基底样乳腺癌[ER⁻、HER2⁻、EGFR⁺ 和(或)CK5/6⁺]4 例; 管腔 A 乳腺癌(ER⁺、HER2⁻)13 例。主要试剂包括 DMEM/F12 培养基(Hyclone

公司)、胎牛血清(杭州四季青公司)、表皮生长因子(EGF)和碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)(Peprotech 公司)、红细胞裂解液(碧云天生物公司)、B27 添加剂(Gibco 公司)、CD44-FITC 和 CD24-PE 抗体(Biolegend 公司)。本实验流式细胞检测在重庆医科大学儿科研究所完成,其他部分在重庆医科大学附属第一医院眼科学重点实验室和神经病学实验室完成。

1.2 乳腺癌原代细胞无血清培养 手术切取乳腺癌活体组织,剪成不大于 1 mm³ 组织块,必要时使用胰酶和Ⅲ型胶原酶消化,以 D-Hanker's 液反复冲洗,200 目细胞筛滤过后 1 000 r/min 离心 5 min,加入红细胞裂解液后再次离心,去除红细胞、死细胞及其他组织碎片,制作成乳腺癌单细胞悬液,加入台盼蓝染色,在血细胞计数器下计数活细胞,以 1×10⁵/mL 接种于 DMEM/F12 无血清培养基(含 20 U/L EGF,20 U/L bFGF 和 2% B27 添加剂)中,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。每 3~5 天更换培养液。每日在相差显微镜下观察、计数形成的乳腺癌细胞微球。并按下列公式计算克隆形成率(MSFE):MSFE(%)=细胞球数/接种细胞数×100%。

1.3 乳腺癌干/祖细胞的诱导分化 收集生长旺盛的乳腺癌细胞微球,制作单细胞悬液,以含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬,并以 1×10⁵/孔接种于放有经多聚赖氨酸预处理盖玻片的 6 孔板中培养,3~5 d 更换培养基,于倒置相差显微镜下动态观察细胞分化和生长情况。7~10 d 后收集这些分化细胞供下一步实验。

1.4 荧光免疫实验 为了检测 CK14、CK18 和 CK19 在乳腺癌干/祖细胞分化前、后的表达情况,收集乳腺癌细胞微球分化前、后细胞,分别制成适当浓度的细胞悬液,重悬于含少量血清的培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12)中,滴于多聚赖氨酸包被的盖玻片上,静置约 4 h,待其贴附于载玻片,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,正常山羊血清封闭 20 min,加入 1% BSA 稀释的鼠抗人 CK14-抗孵育过夜,加入 1% BSA 稀释的二抗(兔抗鼠 IgG-FITC 或兔抗鼠 Ig G-RhB),37℃ 孵育 60 min。每个步骤间以 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS)漂洗 3 次,每次 5 min。以正常小鼠 IgG 代替一抗作为阴性对照。同法用 FITC 标记的兔抗鼠 IgG 检测 CK18 和 CK19 的表达。封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。

结果判断标准:“—”表示无或微弱的自发荧光;“+”表示仅能见明确可见的荧光;“++”表示可见明亮的荧光;“+++”表示耀眼荧光。

1.5 流式细胞技术 收集生长旺盛的乳腺癌细胞微球,制作单细胞悬液,以供检测 CD44 和 CD24 的表达。各设实验管和对照管,每管细胞数 10⁵ 个。实验管中加入 20 μL/mL 浓度的 CD44-FITC 和 CD24-PE,对照管加入同剂量的同型对照抗体,混匀后于室温下避光孵育 20 min。PBS 洗 2 遍,再以含 1% 多聚甲醛的 PBS 重悬、固定,以流式细胞仪检测 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞水平,常规检测 2 次。

1.6 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计学软件完成所有统计,原代 MSFE 与分化细胞 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞水平的关系应用斯皮尔曼等级相关分析检验完成。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CK14、CK18 和 CK19 的表达 荧光免疫检测显示,乳腺癌干/祖细胞的分化前、后 CK14、CK18 和 CK19 均表达于细胞

质和细胞膜。6 例基底样亚型的干/祖细胞均表达 CK14 和 CK19,但 CK18 表达较弱,诱导分化后 CK14 和 CK18 的表达增强,而 CK19 则弱表达(图 1)。17 例管腔 A 亚型的干/祖细胞均有 CK18 和 CK19 表达,仅有 6 例弱表达 CK14,诱导分化后 CK14 不再表达(图 2)。

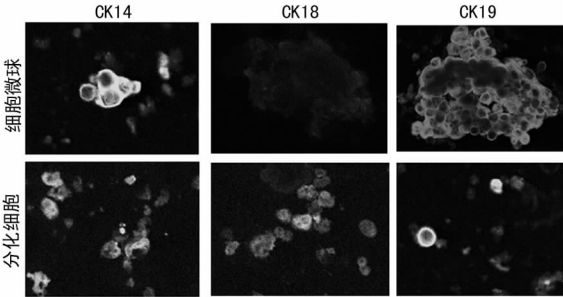


图 1 CK14、CK18 和 CK19 在基底样乳腺癌的乳腺微球及分化后细胞的表达

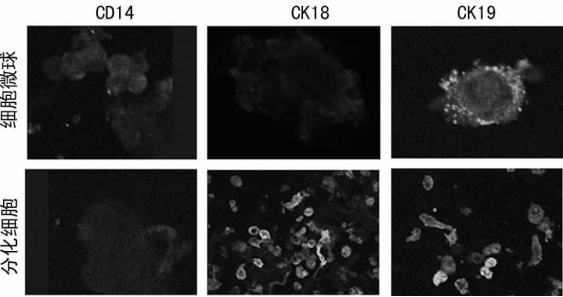


图 2 CK14、CK18 和 CK19 在管腔 A 乳腺癌的乳腺微球及分化后细胞的表达

2.2 CD44 和 CD24 的表达 流式细胞术检测结果显示,乳腺癌包 含 CD44⁺/CD24⁺、CD44⁻/CD24⁺、CD44⁻/CD24⁻ 和 CD44⁺/CD24⁻ 四群细胞。CD24 在基底样乳腺癌无表达或极弱,而在管腔 A 乳腺癌表达较高。CD44⁺/CD24⁺ 细胞在两种亚型的表达水平都极低,在每个标本的表达水平均低于 5%。基底样乳腺癌不仅含较高水平的 CD44⁻/CD24⁻ 细胞,且均检测出 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞,平均水平(27.70±1.40)%,诱导分化后为(2.52±0.58)%,明显低于分化前的水平($P < 0.05$)。

2.3 CD44⁺/CD24⁻ 细胞水平与 MSFE 的关系分析 见图 3。管腔 A 乳腺癌的 CD44⁺/CD24⁻ 细胞水平与原代细胞 MSFE 无明显相关性,但基底样乳腺癌的 CD44⁺/CD24⁻ 细胞水平与原代细胞 MSFE 呈正相关。

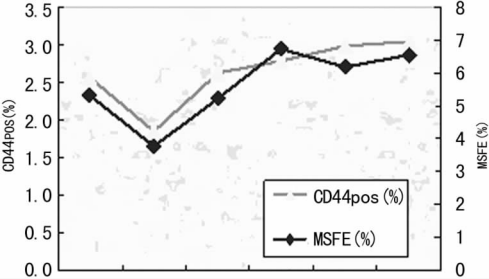


图 3 CD44⁺/CD24⁻ 细胞含量与 MSFE 的关系

3 讨 论

本研究应用无血清悬浮培养法获取的乳腺癌细胞球(MS),是由乳腺癌干/祖细胞构成的细胞集团,可用于肿瘤干

细胞的实验研究^[4]。

细胞角蛋白除了在正常乳腺上皮表达外,也有选择性地表达于不同乳腺癌亚型。基底样乳腺癌就是因为表达 CK5/6, CK14 和 CK17 等在正常乳腺基底细胞表达的角蛋白的一种或几种而得名。不同分化程度的上皮细胞表达的角蛋白也不同,细胞的分化潜能、分化方向和分化过程在一定程度上通过细胞角蛋白的表达来反映,更重要的是在正常细胞到肿瘤的形成过程中细胞角蛋白的表达比较稳定^[5]。因而角蛋白也可用于干细胞、定向祖细胞、分化细胞的鉴别,作为探索乳腺癌的细胞起源及分化过程的重要标记物。

本研究检测到基底样乳腺癌的干/祖细胞呈 CK19⁺/CK14⁺,不表达 CK18,与乳腺上皮干细胞一致。经血清诱导分化后,不仅表达 CK14 等肌上皮标志,也表达管腔上皮标志 CK18、CK19,提示有管腔上皮细胞和肌上皮细胞存在于其子代细胞中,证明基底样乳腺癌的干/祖细胞具有多向分化的潜能,可向管腔上皮和肌上皮双向分化。与乳腺管腔上皮祖细胞一样,管腔 A 乳腺癌干/祖细胞也呈 CK19⁺/CK14⁺ 表型,经诱导分化后显示出 CK18 和 CK19 等管腔上皮标志,而未见肌上皮细胞标志 CK14 表达,提示管腔 A 乳腺癌的干/祖细胞为定向祖细胞,可向管腔上皮分化而不能分化为肌上皮细胞。本研究通过检测乳腺癌细胞分化过程中角蛋白的表达变化,不仅揭示了肿瘤细胞演进发展,还为探索乳腺癌的细胞起源指明了方向,以上结果表明管腔 A 乳腺癌则可能由乳腺管腔上皮祖细胞突变而来,基底样乳腺癌则起源于乳腺上皮的干细胞或多向祖细胞。

CD44 又称归航细胞黏附分子,可通过引导乳腺癌细胞寄居于骨髓而促进肿瘤转移,靶向阻断其作用可有效减缓乳腺癌的生长。CD24 的表达水平在正常乳腺组织、乳腺原位癌和浸润性乳腺癌逐渐增高,作用于趋化因子受体 CXCR4,阻止其细胞信号传导,从而抑制由 SDF-1 介导的细胞迁移。CD44⁺/CD24^{-/Low} 表型乳腺癌细胞具有干细胞样特性^[6],一度被认为是乳腺癌干细胞,与肿瘤侵袭转移以及对放、化疗耐受等生物行为密切相关。但 Ginestier 等^[7]应用乙醛脱氢酶 ALDH1 将 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞进一步分为两种亚群:ALDH⁺/CD44⁺/CD24^{-/Low} 亚群、ALDH⁻/CD44⁺/CD24^{-/Low} 亚群,前者 20 个细胞即可接种成瘤,后者则无成瘤能力,证明并非 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞皆为肿瘤干细胞。事实上,部分非 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞,ALDH1 阳性表达,同样表现出一定的成瘤能力,甚至表现出比 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞还强的化疗药物耐受能力。而 Honeth 等^[8]对 240 例乳腺癌标本的免疫组织化学染色结果显示,CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞只存在于 31% 的病例,大部分为基底样乳腺癌。通过基因系列检测显示,CD44⁻/CD24⁺ 细胞可能为 CD44⁺/CD24⁻ 细胞的子代细胞,因为二者的遗传背景有着基本一致。CD44⁺/CD24⁻ 细胞高表达与细胞迁移、侵袭、凋亡和基质降解的基因,与干细胞的基因表达谱相近,其表达水平与肿瘤恶性程度正相关。而 CD44⁻/CD24⁺ 细胞可能与代谢、炎症和免疫等有关,多表达相关基因。虽然通过无血清培养体系 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞也能形成非黏附性细胞微球,但目前并不清楚 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞与肿瘤干/祖细胞之间的关系。本研究检测了 CD44 和 CD24 在干/祖细胞的表达情况,管腔 A 乳腺癌干/祖

细胞内分化程度较高的 CD44⁺/CD24⁺ 细胞百分比最高,分化程度较低的 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞未检测出或水平极低。基底样乳腺癌的 CD44⁻/CD24⁻ 细胞水平较高,且含有一定比例的 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞,提示基底样乳腺癌比管腔 A 乳腺癌分化程度低,这一结论与临床所见是一致的,恶性程度更高的基底样乳腺癌,也更容易发生远处转移,预后较差。

本研究进一步分析了原代细胞内 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞水平与克隆形成率的关系,基底样乳腺癌的 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞水平与原代细胞克隆形成率呈正相关,表明其肿瘤干细胞可能为 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞。发现,管腔 A 乳腺癌虽然不含 CD44⁺/CD24^{-/Low} 细胞,也可形成非黏附性细胞微球,表明管腔 A 乳腺癌内具有克隆形成能力的细胞并非 CD44⁺/CD24^{-/Low} 表型。

综合以上实验结果,基底样乳腺癌的干/祖细胞与乳腺上皮干细胞或多向祖细胞表型接近,可多向分化。管腔 A 乳腺癌的干/祖细胞表达管腔上皮的细胞标志,只能向管腔上皮方向分化,二者可能由不同的乳腺上皮细胞转化来。

参考文献

- [1] Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets[J]. PNAS, 2003, 100(14): 8418-8423.
- [2] Spitalo A, Mazzola P, Soldini D, et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland[J]. Ann Oncol, 2009, 20(4): 628-635.
- [3] Pedraza V, Gomez-Capilla JA, Escaramis G, et al. Gene expression signatures in breast cancer distinguish phenotype characteristics, histologic subtypes, and tumor invasiveness[J]. Cancer, 2010, 116(2): 486-496.
- [4] Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells[J]. Genes Dev, 2003, 17(10): 1253-1270.
- [5] Laakso M, Loman N, Borg A, et al. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors [J]. Mod Pathol, 2005, 18(10): 1321-1328.
- [6] Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [J]. PNAS, 2003, 100(7): 3983-3988.
- [7] Ginestier C, Hur MH, 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.
- [8] Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(3): R53-R59.