

· 实验研究 ·

基质硬度对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响

陈莉 李长樱 杨新华 范林军 张毅 张帆 姜军

【摘要】 目的 研究乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在不同硬度基质上黏附率、增殖能力及整合素(integrin) $\beta 1$ 表达变化的差异,探讨肿瘤细胞的生物学性状和细胞外基质硬度的相关性。**方法** 将乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分别种植到不同硬度的人工模拟基质上(硬度分别为 1、20、40 kPa),3 d 后观察比较 MDA-MB-231 细胞克隆形成差异。用四唑盐(MTT)比色试验观察 MDA-MB-231 细胞增殖活性的变化。Western blot 检测细胞 Integrin $\beta 1$ 蛋白表达的变化。**结果** 在硬度 40 kPa 的人工基质上,乳腺癌细胞增殖能力、克隆形成能力及 Integrin $\beta 1$ 蛋白表达均高于其它两组,且差异有统计学意义。**结论** MDA-MB-231 细胞更容易在硬性较高的基质上增殖,其机制需进一步探讨。

【关键词】 人乳腺癌细胞;细胞外基质;整合素

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effect of hardness of extracellular matrix on proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cell line CHEN Li, LI Chang-ying, YANG Xing-hua, FAN Lin-jun, ZHANG Yi, ZHANG Fan, JIANG Jun. Department of Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To observe the proliferation ability, cell clone formation and integrin $\beta 1$ protein expression of MDA-MB-231 cell line on different matrixes and to explore relevance between biological behavior of MDA-MB-231 cell and hardness of extracellular matrix. **Methods** MDA-MB-231 cell was planted to different hardness of matrix (1, 20, 40 kPa respectively). The influence of different hardness of matrix on proliferation of MDA-MB-231 cell was detected by MTT test. The expression of integrin $\beta 1$ protein was determined by Western

作者单位:400038 重庆,第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心(陈莉、杨新华、范林军、张毅、张帆、姜军);100070 北京,首都铁路卫生学校临床教研组(李长樱)

通讯作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

blot. Cell clone formation was observed by microscopy. **Results** The expression level of intergrin $\beta 1$ protein and the proliferation ability of MDA-MB-231 cell on 40 kPa matrix were higher than other groups. The number of cell clones was greater than that formed in soft matrix. **Conclusions**

MDA-MB-231 cell is more likely to growth on hard matrix. The hardness of matrix may be involved in biological behavior of MDA-MB-231 cell and its mechanisms deserves further research.

【Key words】 Human breast carcinoma cell; Extracellular matrix; Intergrin $\beta 1$

生物体从器官、组织到细胞等各个层次上的生命运动均是在一定力学环境中进行的。生物体的形态、结构、功能均与其所处的力学环境密切相关。细胞的力学信号转导主要有整合素途径、Ca 离子途径和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径^[1],其中整合素途径是最主要的途径,整合素被认为是最关键的力感受器分子^[2-3]。既往研究表明,不同硬度的细胞外基质能通过细胞表面感应分子将力信号转化为生物学信号从而影响细胞的生长形态^[4],但不同硬度的细胞外基质能否通过力传导途径影响细胞的增殖能力目前尚不清楚。为此,作者通过研究乳腺癌 MDA-MB-231 细胞在不同硬度的人工基质上增殖能力、克隆形成能力和整合素相关蛋白表达的变化,探讨细胞外基质的物理学因素对肿瘤细胞生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

MDA-MB-231 乳腺癌细胞株购于中国科学院上海细胞库,置于 37 °C, 5% CO₂ 孵箱内培养。RPMI1640 培养基(Gibco 公司),新生牛血清购自中美合资兰州民海生物制品有限公司。抗 Intergrin $\beta 1$ 单克隆抗体购自 Santa cruz 公司。

1.2 人工基质配制

1 kPa 胶体配制:1 ml 丙烯酰胺混合液(10% 丙烯酰胺 + 0.03% 二丙烯酰胺)加入 10 μ L 过硫酸胺和 0.4 μ l 四甲基二乙胺(TEMED)。10 kPa 胶体配制:1 ml 丙烯酰胺混合液(10% 丙烯酰胺 + 0.13% 二丙烯酰胺)加入 10 μ L 过硫酸胺和 0.4 μ l TEMED。40 kPa 胶体配制:1 ml 丙烯酰胺混合液(10% 丙烯酰胺 + 0.26% 二丙烯酰胺)加入 10 μ L 过硫酸胺和 0.4 μ l TEMED。浓度-弹性模量(kPa)关系:当丙烯酰胺的浓度为 10% 时,弹性模量 $E = 42.6[\text{bis}] - 48.1[\text{bis}]^2$ ($R^2 = 0.99$)。配制完胶体并调整 pH,用紫外线消毒照射 30 min

后加入 1 ml RPMI1640 培养基,并于胶体表层将 MDA-MB-231 细胞悬液以低密度每孔 50 ~ 100 个细胞接种。观察至少 1 周。

1.3 蛋白免疫印迹检测

细胞转染后 48 h,以 RIPA 裂解液[150 mmol/L NaCl,0.1 g/L NP-40,0.05 g/L 脱氧胆酸盐钠,0.01 g/L 十二烷基磺酸钠(SDS),50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),2 mg/L 亮肽素和 100 mg/L 苯甲基磺酰氟化物]提取细胞总蛋白。采用 BCA 法(美国 Pierce 公司试剂盒)测定总蛋白浓度。总蛋白以每个泳道 30 μ g 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后,采用 Bio-Rad 浸渍电转移系统(转移缓冲液:39 mmol/L 甘氨酸,48 mmol/L Tris 碱,0.37 g/L SDS 及 200 mL/L 甲醇)将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(购自北京鼎国生物制品有限公司)。硝酸纤维素膜依次经过封闭、一抗孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育、洗膜,最后以增强化学发光法(ECL,Pierce 公司试剂盒)呈带。蛋白条带采用 Bio-Rad 公司 Quantity One 软件进行密度分析。

1.4 低密度单克隆培养

将 MDA-MB-231 细胞悬液作梯度倍数稀释,以低密度(每瓶或皿中含 200 ~ 500 个细胞)接种于不同硬度的人工基质上,培养 2 d 后,以 1% 罗丹蓝染色,将所含细胞数大于 30 个的细胞集落计数,显微镜 40 倍视野下,计算克隆形成率($n = 10$)。

1.5 细胞生长曲线的测定

采用四唑盐(MTT)比色法,分别取 MDA-MB-231 细胞株,以每孔 2.5×10^3 个细胞,3 复孔接种于 96 孔细胞培养板,待细胞生长至第 1 ~ 6 天,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l,于 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h,弃上清液后每孔加二甲基亚砜 150 μ l,轻轻振荡 10 min,用酶标仪(波长 490 nm)测定每孔的吸光度值。吸光度值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Excel 软件进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 细胞克隆培养计数

乳腺癌细胞在不同硬度的基质上,2 d 后形成了不同的细胞克隆。在硬性基质上形成的克隆多于软性基质(图 1)。

2.2 MTT 观察 MDA-MB-231 细胞在不同硬度基质上的细胞活性和增殖能力

MDA-MB-231 细胞接种到不同硬度人工基质上细胞活性和增殖能力有差异。在硬度 40 kPa 的人工基质上生长活性高于生长在基质硬度为 20 kPa 和

10 kPa 的两组细胞(图 2)。

2.3 Western blot 检测 MDA-MB-231 细胞在不同硬度基质上 Integrin $\beta 1$ 蛋白的表达。

在不同硬度基质上生长的 MDA-MB-231 细胞的整合素表达有差异,MDA-MB-231 细胞在硬度高的基质上 Integrin $\beta 1$ 蛋白表达升高(图 3)。

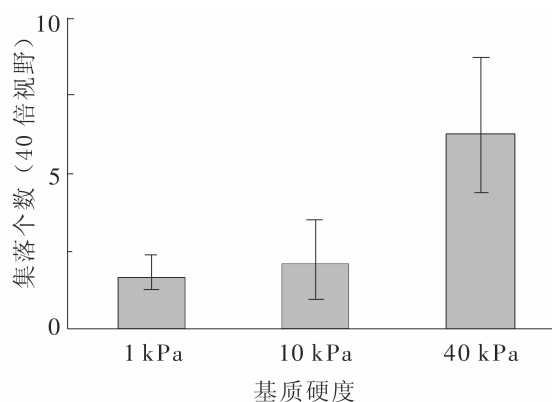
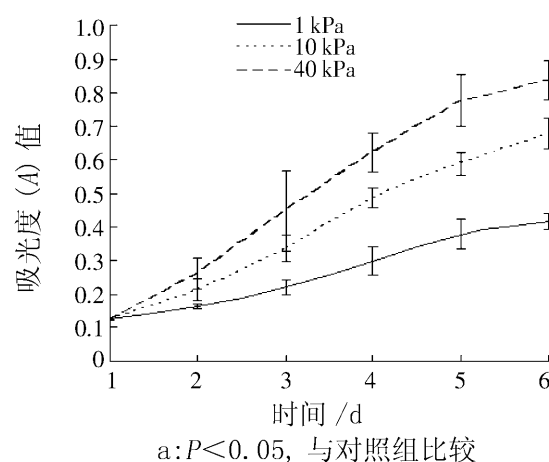
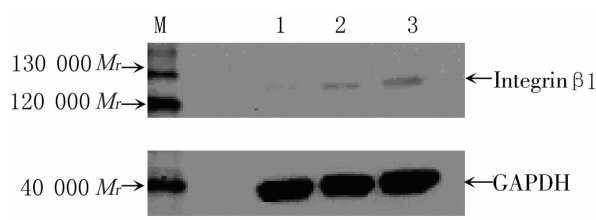


图 1 MDA-MB-231 细胞在不同硬度基质上克隆形成比较



a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 在不同硬度基质上的 MDA-MB-231 细胞增殖曲线



M: 标记条带; 1: 细胞生长于 10 kPa 基质; 2: 细胞生长于 20 kPa 基质;
3: 细胞生长于 40 kPa 基质

图 3 不同硬度基质上的 MDA-MB-231 细胞 Integrin $\beta 1$ 表达变化

3 讨论

细胞的生长与所处的力学环境因素密不可分。细胞外基质物理性状对细胞的影响很早就为科学家们所关注^[5]。Shirinsky 等^[6]对内皮细胞施与 20% 0.87 Hz 的周期性力拉伸, 48 h 后, 细胞长轴取向处于与主应变方向 $80^{\circ} \sim 120^{\circ}$ 之间, 应力纤维形成, 且方向与应力方向一致。细胞外基质的拉伸能引起细胞的增殖、表型分化、分泌和黏附等方面的变化。随着对细胞外基质的研究深入, 基质硬度对细胞的影响逐渐被关注。Engler^[7]等的研究表明, 将间充质干细胞(MSC)培养于 0.1 ~ 1 kPa 硬度(模拟脑组织硬度)的人工基质上, 会诱导 MSC 向神经细胞分化; 将 MSC 培养于 8 ~ 17 kPa 硬度(模拟肌肉组织硬度)的人工基质上, 则会诱导 MSC 分化成肌细胞; 在 25 ~ 40 kPa 硬度(模拟骨组织硬度)的人工基质上会向成骨细胞分化。这一发现提示细胞外基质的硬度对干细胞的定向分化具有重要的意义。但基质硬度是否影响细胞的增殖能力尚不清楚。

整合素由 α 和 β 亚基以非共价键结合而形成的跨膜异二聚体糖蛋白, 它的胞外区与细胞外基质相连, 胞内区与细胞骨架相连, 整合素介导细胞内外信号跨膜传递及力-化学信号转换的任务。通过细胞骨架的重排, 引发多种生物学信号参与细胞的增殖和分化^[2]。

本研究选用不同硬度的人工基质并观察了 MDA-MB-231 细胞在不同硬度基质上生物学行为的改变。所选用人工基质硬度分别为 1、10、40 kPa, 分别模拟人脑组织、肌肉组织、骨组织硬度。将乳腺癌 MDA-MB-231 细胞分别接种到以上不同硬度的基质上发现: 在不同硬度细胞基质上细胞的增殖能力、细胞克隆形成能力及整合素表达是不同的。在硬度较高的基质上的乳腺癌细胞增殖能力和细胞克隆形成能力强于生长在软性基质的同类细胞。同时还发现各种基质上生长的乳腺癌细胞 Integrin $\beta 1$ 表达量有所差异, 在硬性基质上 Integrin $\beta 1$ 表达量增高。由此可见, 乳腺癌细胞偏好在硬性基质上生长和增殖, 但其具体机制及整合素介导的力学信号和生物学信号通路是否参与了这一过程还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Li X F, Zeng Y J, Zhao H, *et al.* Advanace in the research of receptor-ligand binding kinetics. *Adv Mechan*, 2000, 30:605 - 612.

- [2] Giancotti F G, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science, 1999, 284 : 1028 – 1032.
- [3] Calderwood D A, Shattil S I, Ginsberg M H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. Biol Chem, 2000, 275: 22 607 – 22 610
- [4] Dennis E D, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science, 2005, 18: 1139 – 1143.
- [5] Lo C M, Wang H B, Dembo M, *et al.* Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophysical Journal, 2000, 79: 144 – 152.
- [6] Shirinsky P, Antonov A S, Birukov K G, *et al.* Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size. Cell Biol, 1989, 109: 331 – 339.
- [7] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell, 2006, 126: 677 – 689.

(收稿日期: 2008-02-10)

(本文编辑: 罗承丽)

陈莉, 李长樱, 杨新华, 等. 基质硬度对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(2): 184 – 189.