

## • 实验研究 •

## 克隆柱法提取 MCF-7 乳腺癌细胞系中癌干细胞

谢竞 周艳 唐鹏 钟玲 姜军

**【摘要】 目的** 通过克隆柱法提取 MCF-7 乳腺癌细胞中的乳腺癌干细胞,并进行鉴定。**方法** 采用单细胞克隆加低密度干细胞培养基筛选获得呈“球样”生长的乳腺癌干细胞,行 CD44、CD24 免疫荧光细胞化学染色及诱导分化实验。**结果**  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  细胞的比例为 12.1%,且在全克隆中富含  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  细胞。在形成的细胞球中富含  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  细胞,并且在诱导分化时可见明显类管腔样结构形成,并表达 CK18 及 CK14。**结论** 克隆柱法是提取细胞系中癌干细胞的简单有效方法。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 肿瘤干细胞; 克隆柱法

**【中图法分类号】** R737.9

**【文献标识码】** A

**Obtaining cancer stem cells from MCF-7 breast cancer cell line with cloning cylinder method** XIE Jing, ZHOU Yan, TANG Peng, ZHONG Ling, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】 Objective** To isolate cancer stem-like cells from MCF-7 breast cancer cell line with modified cloning cylinder method and to test its feasibility. **Methods** Single cell cloning and stem cell screening with stem cell culture medium were applied to obtain sphere-like breast cancer stem cells. Immunofluorescence staining with CD44 and CD24 and inducement and differentiation experiment were performed. **Results** The proportion of  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  cells was 12.1%, and the proportion in the holoclone was high. The majority of cells in culturing mammospheres were stained positively for CD44 and negatively for CD24. The mammospheres had abundant  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  cells. Sphere-like breast cancer stem cells were obtained from holoclone cells, which were seeded at low density and suspension cultured with stem cell culture medium. When the sphere-like breast cancer stem cells were induced to differentiate, duct-like structures emerged and expressed CK18 and CK14. **Conclusion** The cloning cylinder method is a simple and effective way to obtain breast cancer stem cell-like cells from MCF-7 breast cancer cell lines.

**【Key words】** Breast neoplasms; Tumor stem cells; Cloning cylinder method

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心

通信作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

谢竞、周艳同为第一作者

近年来乳腺癌干细胞的成功分离、鉴定及生物学特性的研究,促进了对肿瘤发生、转移、复发及治疗等方面的认识。有研究证明乳腺癌干细胞具有更强的侵袭转移能力,是乳腺癌细胞亚群中早期发生转移的细胞<sup>[1]</sup>。但是由于乳腺癌干细胞数量较少,提取的乳腺癌干细胞生长缓慢,较难继续传代等特点,影响了乳腺癌干细胞功能的进一步研究。本研究综合文献中各种乳腺癌干细胞提取法,用克隆柱法提取癌干细胞,为在乳腺癌细胞系中筛选肿瘤干细胞提供了较为简便有效的方法,现将方法报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株和试剂

乳腺癌 MCF-7 细胞系本室保存(来源于中国科学院上海细胞所);DMEM 培养基(美国 Gibco);鼠抗人 CD44 单克隆抗体(美国 Neomarkers);兔抗人 CD24 多克隆抗体(美国 Santa Cruz);Cy3 标记羊抗兔 IgG(美国 Sigma);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗小鼠 IgG(美国 Sigma);四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)标记的兔抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 美国 Sigma);鼠抗人 CK18 单克隆抗体(福州迈新);鼠抗人 CK14 单克隆抗体(福州迈新);鼠尾胶原(杭州生友)。

### 1.2 细胞培养

乳腺癌 MCF-7 细胞用含 10% 新生牛血清 DMEM 培养基常规培养扩增,0.25% 胰酶和乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代。

### 1.3 MCF-7 细胞亚系(MCF-7H)的建立

取处于对数生长期的 MCF-7 细胞,PBS 清洗后 0.25% 胰酶和 EDTA 消化,吸管轻轻吹打,400 目筛网过滤,重悬于培养基中,胎酚蓝染色计数,取 200 个细胞接种于 90 mm 培养皿中,37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱培养,4 h 后显微镜下标记单个贴壁细胞,每天观察细胞生长情况,每 7 d 换液 1 次。待单个细胞克隆长至 50 个细胞以上时,用克隆柱法<sup>[2]</sup>挑选类圆形周边光滑细胞生长紧密的全克隆(holo-clone),接种在 24 孔培养板中,常规培养基培养扩增,将获得的 MCF-7 细胞亚系命名为 MCF-7H。

### 1.4 乳腺癌干细胞的获取

将处于对数生长期的 MCF-7H 细胞,PBS 清洗后 0.25% 胰酶和 EDTA 消化,吸管反复吹打,400 目筛网过滤,PBS 洗 3 次,重悬于乳腺癌干细胞培养基中,胎酚蓝染色计数,以  $1 \times 10^3$  /ml 细胞数接种于培养瓶中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,每天观察细胞生长情况,每 3 d 换液 1 次,将获得的呈球样生长的乳腺癌干细胞命名为 MCF-7S 细胞(MCF-7 stem cells, MCF-7S cells),细胞的传代采用机械吹打法。

### 1.5 乳腺癌干细胞的鉴定

#### 1.5.1 乳腺癌干细胞分子标志物检测:对培养 MCF-7 及 MCF-7S 细胞制备

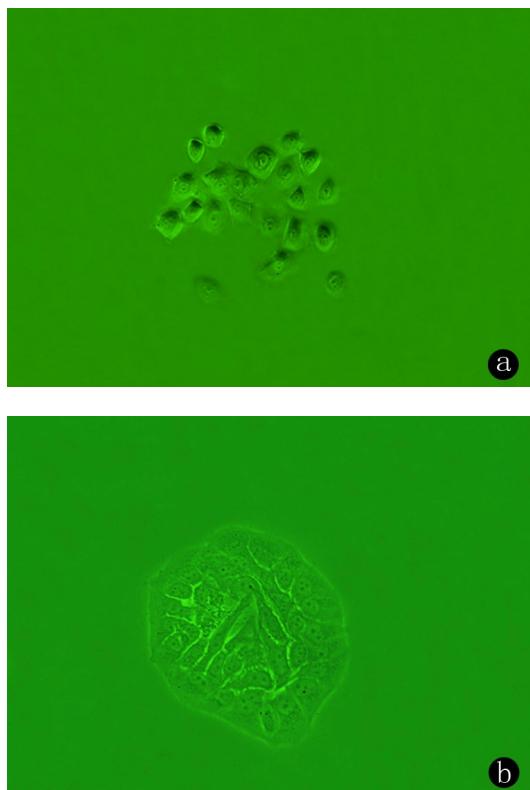
细胞玻片,行 CD44、CD24 免疫荧光细胞化学染色,按照说明书进行。为了避免种属间的交叉反应,两种一抗分别进行显色,CD44 阳性着色呈绿色荧光,CD24 阳性着色呈红色荧光,双阳性着色呈黄色荧光,DAPI 染核呈蓝色荧光。

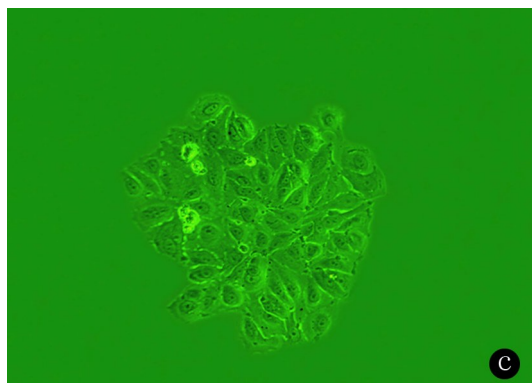
**1.5.2 MCF-7S 细胞的诱导分化**:取生长良好的细胞球,PBS 洗涤 3 次,采用 1 ml 枪头机械吹打成单个细胞或 2~3 个的细胞簇,接种到鼠尾胶原包被的盖玻片上,撤去生长因子,用含 0.5%二甲基亚砜(DMSO)、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氢化可的松及 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,5 d 后取出盖玻片,PBS 清洗后 4%的多聚甲醛固定,免疫细胞化学染色采用 SP 法,操作按照说明书进行,一抗孵育均采用 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,CK18、CK14 分别采用二氨基联苯胺(DAB)及 3-氨基-9-乙基卡唑(AEC)显色,苏木素复染,中性树胶及水溶性封片剂封片。

## 2 结果

### 2.1 细胞系的异质性观察

采用单细胞克隆培养法证实在常规培养的 MCF-7 细胞中确实存在生长形态学的差异,有类圆形、周边规则、细胞间连接紧密的全克隆,有的克隆呈分散生长,形状不规则(亚克隆,paraclone),及其形状处于两者之间的部分克隆(meracclone)(图 1),进一步通过 CD44/CD24 双标免疫荧光染色证实在常规培养的 MCF-7 细胞中也存在分子标志物表达的差异,主要为  $\text{CD44}^{+}\text{CD24}^{+}$ 、 $\text{CD44}^{+}\text{CD24}^{-}$  及  $\text{CD44}^{-}\text{CD24}^{+}$  细胞,其中  $\text{CD44}^{+}\text{CD24}^{-/\text{Low}}$  细胞的比例为 12.1%,且发现在全克隆中富含  $\text{CD44}^{+}\text{CD24}^{-/\text{Low}}$  细胞(图 2~5),进一步通过克隆柱法获得来自全克隆的 MCF-7 细胞亚系(MCF-7H)。





a:亚克隆, 细胞生长松散, 边缘不规则的亚克隆;  
b:周边光滑细胞间连接紧密的全克隆;  
c:形状介于两之间的部分克隆

图 1 常规培养 MCF-7 细胞克隆形成差别(倒置显微镜  $\times 100$ )

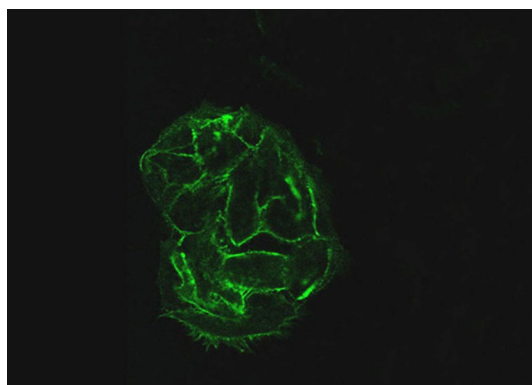


图 2 CD44 在 MCF-7 细胞全克隆中表达(FITC 标记 CD44,  $\times 100$ )

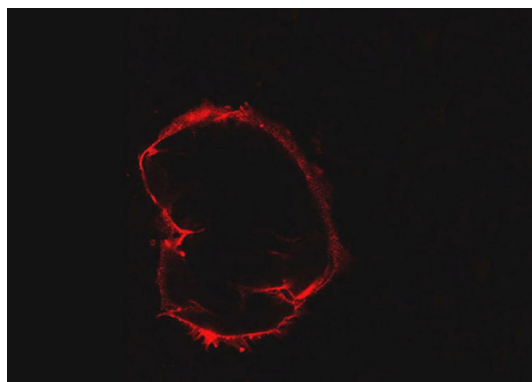


图 3 CD24 在 MCF-7 细胞全克隆中表达(cy3 标记 CD24,  $\times 100$ )

## 2.2 乳腺癌干细胞的获取及鉴定

常规培养条件下 MCF-7 细胞呈贴壁生长, 在生长密度过饱和时可见部分区域出现团状细胞簇突起。采用低密度接种加干细胞培养基悬浮培养可得到呈球样生长的 MCF-7S 细胞。单个 MCF-7H 细胞接种在干细胞培养基中

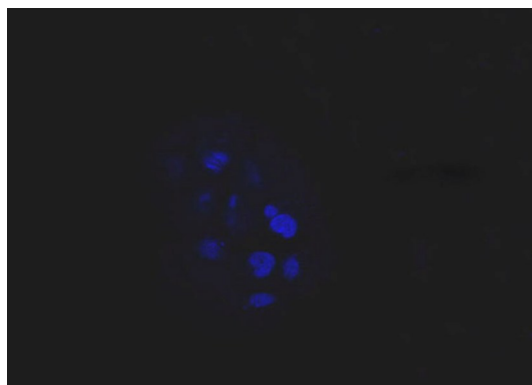


图 4 4',6-二脒基-2-苯基吲哚标记细胞核(×100)

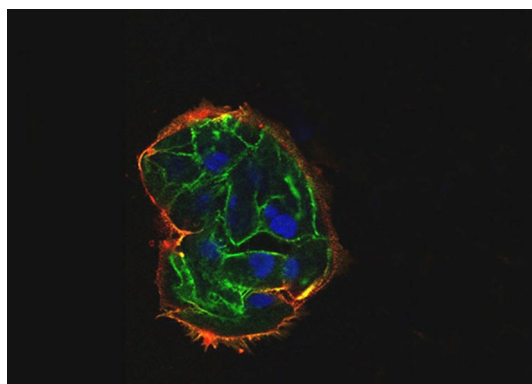


图 5 图 2~4 的叠加图片(×100)

12 d 左右可形成明显的细胞球(图 6),并可在体外连续传代 3 次以上,且传代后的细胞球周边较平滑,细胞间连接紧密,折光性好,周边可见明显生长晕(图 7)。细胞球在常规含血清培养基中培养时可逐渐爬出,转变为其来源细胞的生长状态,继续呈贴壁生长(图 8)。双标免疫荧光染色显示在 MCF-7S 细胞球中富含  $CD44^{+}CD24^{-/Low}$  细胞,并且 MCF-7S 细胞在诱导分化时可见明显类管腔样结构形成,表达腺上皮细胞标记物 CK18 及肌上皮细胞标记物 CK14(图 9~10)。

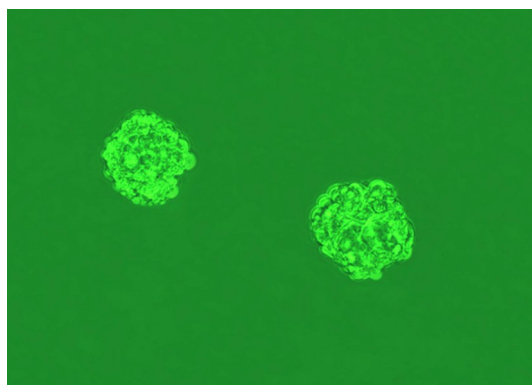
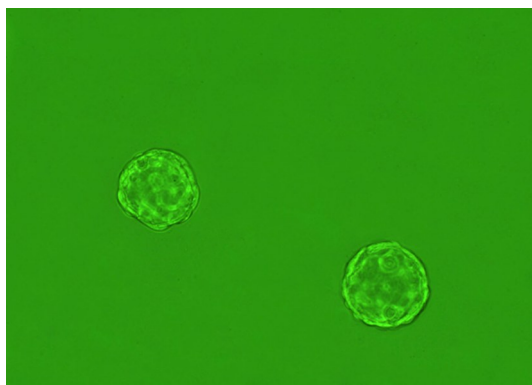


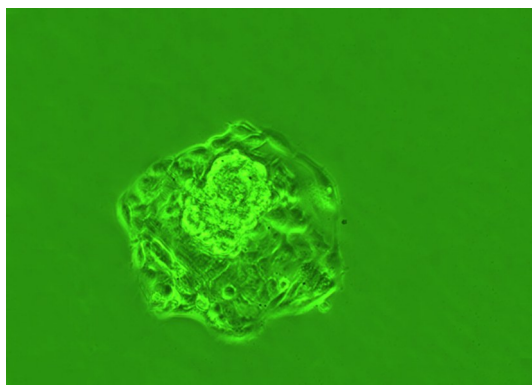
图 6 MCF-7H 细胞在干细胞培养基中培养 12 d 形成的细胞球(倒置显微镜 ×100)





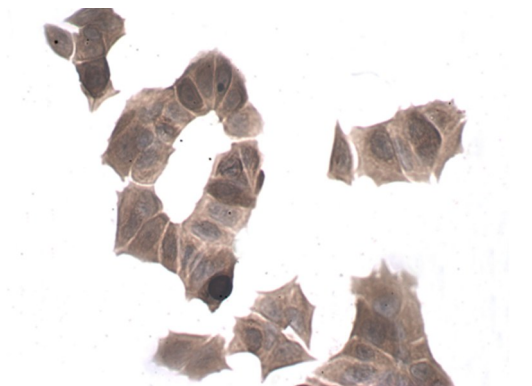
第三代 MCF-7S 细胞球,形态规则,折光性好,周边可见明显生长晕。

图 7 MCF-7 乳腺癌干细胞球(倒置显微镜  $\times 100$ )



MCF-7S 细胞球在常规含血清培养基中可逐渐爬出,继续呈贴壁生长。

图 8 普通培养基中 MCF-7 乳腺癌干细胞(倒置显微镜  $\times 100$ )



MCF-7S 细胞在诱导分化时可形成类管腔样结构,表达腺上皮细胞标记 CK18。

图 9 向腔上皮分化的 MCF-7 乳腺癌干细胞( $\times 100$ )

### 3 讨论

肿瘤干细胞的获取是进行相关研究的基础。目前乳腺癌干细胞筛选方法有多种,但尚缺乏简便有效的方法。目前主要采用的方法有流式细胞仪筛选法和悬浮细胞培养法两种。2003 年 Al Hajj 等<sup>[3]</sup>建立了异种乳腺癌细胞移植

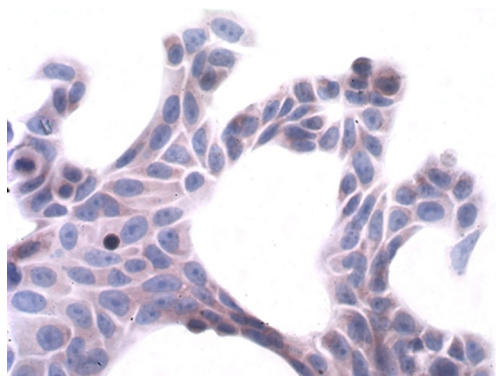


图 10 MCF-7S 细胞诱导分化时肌上皮细胞标记物 CK14 的表达( $\times 100$ )

动物模型,第一次在实体瘤中鉴定了肿瘤干细胞(TSC)。作者采用流式细胞分选技术(fluorescence activated cell sorting,FACS)得到  $ESA^+Lin^-CD44^+CD24^{-/Low}$  乳腺癌细胞. 这些细胞具有与干细胞相似的自我更新和分化能力,并且只需 200 个细胞就能在 NOD/SCID 鼠体内形成肿瘤,因此又称乳腺癌干细胞。Setoguchi 等<sup>[4]</sup>将流式细胞仪分选技术进行改良,利用干细胞高表达乳腺癌抗药蛋白 1(BCRP1)能够将药物泵出细胞外的特性,用荧光染料 Hoechst 33342 对肿瘤细胞进行预染,然后用流式细胞分选技术,对 C6 神经胶质瘤、人乳腺癌细胞 MCF-7 等 6 种肿瘤细胞系进行研究,结果表明多数肿瘤细胞系中均含有少数的肿瘤干细胞,大约占肿瘤细胞数量的 0.4%~2.0%。这些细胞在体外培养具有干细胞样特点,在 KSL/slc 小鼠体内具有致瘤源性,而其他细胞不具有此特性。但 Hoechst33342 染料对细胞具有一定的毒性,且染色温度、染色时间、维拉帕米浓度等对实验结果影响很大。Ponti 等<sup>[2]</sup>发现悬浮生长的细胞呈现  $CD44^+CD24^-$  和  $Cx43^-$  的特性,并且过表达血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和 VEGF-C 及干细胞标志物 Oct-4。注入  $1 \times 10^3$  个干细胞在 SCID 小鼠脂肪垫中就能生成新的肿瘤,并可在体外进行长期的培养和传代。因而利用细胞的“失巢凋亡”原理通过干细胞培养基悬浮培养的方法也从乳腺癌组织和 MCF-7 细胞系中获得呈球样生长的乳腺癌起始细胞。Ponti 等的试验技术为乳腺癌干细胞的获取提供了较为简易的方法。这一方法也被 Phillips 等<sup>[5]</sup>学者用于从 MCF-7 及 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中获得呈球样生长的乳腺癌干细胞。但直接从 MCF-7 常规培养中的漂浮细胞(floating cells)中筛选干细胞的缺点明显,筛选成功率低,且这部分细胞活性相对较贴壁细胞差,细胞在体外的增殖较慢,细胞活力较差且较难传代。

对克隆形态学的研究最初来源于表皮细胞,根据文献<sup>[6]</sup>报道,表皮细胞的生长存在三种不同的细胞克隆。全克隆中富含干细胞,具有无限增殖的能

力;亚克隆为分化的短暂增殖细胞;部分克隆介于两者之间,又称间生态克隆。最近的研究发现在包括 MCF-7 等多种人类肿瘤细胞中也存在类似现象<sup>[7]</sup>。因此,本实验参照 Ponti 等<sup>[2]</sup>的方法并结合克隆形态学理论进行适当改良,首先通过克隆柱法先从 MCF-7 乳腺癌细胞中获得富含干细胞的亚系(MCF-7H),然后再进一步采用低密度接种加干细胞培养基筛选扩增,获得呈“球样”生长的乳腺癌干细胞。通过先筛选全克隆细胞,再进一步筛选干细胞的方法具有明显的优点:首先是干细胞筛选成功比例高,因为全克隆细胞中干细胞比例明显增高,再进行干细胞培养基筛选时成功率提高;其次是筛选出的干细胞活力增加,并能在体外进行连续传代,进而可以进行干细胞功能的后续研究。同流式细胞筛选法相比,其优势在于可以连续传代并进行后续的基因功能研究;同传统的干细胞培养基悬浮培养筛选相比,其优势在于干细胞筛选成功率提高,且细胞活力增加。因此,克隆柱干细胞筛选方法具有操作简单,传代和保存方便的优点,是在乳腺癌细胞系中筛选肿瘤干细胞的较为简、便高效的方法。

### 参考文献

- [1] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs R K, *et al.* CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006, 8: R59.
- [2] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005, 65: 5506—5511.
- [3] Al Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983—3988.
- [4] Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle*, 2004, 3: 414—415.
- [5] Phillips T M, McBride W H, Pajonk F. The response of CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup> breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98: 1777—1785.
- [6] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 2302—2306.
- [7] Li H, Chen X, Calhoun Davis T, *et al.* PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res*, 2008, 68: 1820—1825.

(收稿日期: 2008-02-10)

(本文编辑: 陈莉)

谢竞, 周艳, 唐鹏, 等. 克隆柱法提取 MCF-7 乳腺癌细胞系中癌干细胞[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2009, 3(2): 187—194.