

• 实验研究 •

高转移性人乳腺癌细胞亚克隆的筛选

潘秀华 王立梅 李希 冯玉梅

【摘要】 目的 筛选高转移潜能的人乳腺癌细胞亚克隆,为人类乳腺癌转移相关的体内外研究提供实验对象。**方法** 通过有限稀释法分离和培养人乳腺癌细胞 MDA-MB-435S 的单克隆;采用细胞生物学方法体外评价亚克隆的克隆形成、增殖、运动和侵袭能力;将 MDA-MB-435S 亚克隆细胞通过乳腺脂肪垫接种于免疫双缺陷 SCID 鼠,验证体外筛选克隆的体内转移能力。定量资料采用独立样本 t 检验进行统计学分析。**结果** 筛选得到 MDA-MB-435S 的高转移亚克隆 14-E5;14-E5 与亲代细胞呈梭形、伪足较长的细胞形态明显不同,体积比亲代细胞小,呈多边形,触角增多;细胞的体外克隆形成能力、运动能力、侵袭能力及体内自发转移能力均较亲代显著增强($P < 0.050$);细胞周期 S 期和 G2/M 期比例比亲代减少,增殖能力较亲代降低($t = 7.047, P = 0.002$);细胞异质黏附能力、体内成瘤率与亲代之间的差异无统计学意义($P > 0.050$)。**结论** 筛选并建立了高转移潜能人乳腺癌细胞亚克隆细胞株 14-E5,可以用于乳腺癌转移基因筛选、转移机制研究、抗转移药物的研发和评价抗转移实验性治疗疗效。

【关键词】 乳腺肿瘤;转移;亚克隆**【中图分类号】** R737.9**【文献标识码】** A

Screening of subclones of high metastatic human breast cancer cells PAN Xiu-hua, WANG Li-mei, LI Xi, FENG Yu-mei, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To isolate subclones of high metastatic potential from human breast cancer cell line MDA-MB-435S in the interest of researches on metastasis of breast cancer *in vitro and in vivo*. **Methods** Cell monoclones with different metastatic potential were isolated from their parental cell line MDA-MB-435S by limiting dilution. Then the cloning formation, proliferation, invasion and migration abilities of these subclones were identified *in vitro* via biology methods. Subclone with high metastasis capability was verified by injecting MDA-MB-435S subclone cells into fat pad of SCID mice to observe the spontaneous metastasis ability *in vivo*. Quantitative data were analyzed using independent samples t test. **Results** A subclone with high metastatic capability 14-E5 from MDA-MB-435S was isolated. 14-E5 subclone was polygon, with more pseudopodiums and smaller than MDA-MB-435S which is fusiform shape with long pseudopodium. The clonality of 14-E5 was stronger than parental cell line MDA-MB-435S ($t = 3.720, P = 0.003$). The motility ($t = 5.575, P = 0.005$), invasion capability ($t = 9.177, P = 0.001$), and the spontaneous

基金项目:国家自然科学基金项目(30471671,30872518);天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC19800);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0743)

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院生物化学及分子生物学室 教育部乳腺癌防治重点实验室(潘秀华、王立梅、李希、冯玉梅);221004 江苏 徐州,徐州医学院机能科研实验中心(潘秀华)

通信作者:冯玉梅, E-mail: ymfeng@tjmu.edu.com

metastasis capacity of 14-E5 were also stronger than MDA-MB-435S. The proportion of cells in DNA synthesis and mitosis states was lower in 14-E5 than in MDA-MB-435S ($t = 7.047, P = 0.002$). No significant differences of heterogeneity adhesion capacity and tumorigenicity were found between 14-E5 and MDA-MB-435S ($P > 0.050$). **Conclusions** 14-E5 subclone with high metastatic capability will be valuable in screening breast cancer metastatic gene, investigating the mechanisms of metastasis, exploring anti-metastasis medicine, and supervising experimental therapeutic efficacy of anti-metastasis.

【Key words】 Breast neoplasms; Metastasis; Subclone

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,而转移是乳腺癌患者死亡的主要原因。乳腺癌转移相关基因和分子标志物的筛选、肿瘤转移分子机制的研究及抗转移实验性治疗疗效的评价均需要大量体内和体外的实验研究,具有高转移生物学行为的细胞系和转移模型是必不可少的实验工具。目前对肿瘤及肿瘤转移的认识表明,肿瘤细胞具有异质性。异质性的肿瘤含有不同转移潜能的细胞亚群,而在原发肿瘤中,只有高转移潜能的细胞亚群才可能产生转移表型。本研究通过有限稀释方法分离不同转移潜能的人乳腺癌细胞亚克隆,采用细胞生物学方法体外评价细胞的侵袭转移潜能,并通过乳腺脂肪垫接种免疫双缺陷鼠验证体外筛选克隆的体内转移能力,从而建立高转移性人乳腺癌亚克隆细胞系。

1 材料与方法

1.1 细胞系及培养

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S 来源于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。细胞培养于含 10 % 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37 °C、5 % CO₂、饱和湿度条件下培养箱内培养,用 0.25 % 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 动物及饲养

免疫双缺陷(severe combined immunodeficiency, SCID)鼠购自中国医学科学院动物研究所。雌性 SCID 小鼠 18 只,鼠龄为 4~6 周,体质量 13~18 g,在恒温(25~28 °C)、恒湿(45%~50%)、无病原体(specific pathogen free, SPF)条件饲养,水和食物均经高压灭菌供动物自由摄入。

1.3 MDA-MB-435S 单克隆细胞株的分离

取对数生长期的 MDA-MB-435S 细胞,采用连续稀释法稀释至细胞数为 $5 \times 10^3 \text{ L}^{-1}$,以每孔 0.2 ml(每孔含 1 个细胞)种植于 96 孔培养板培养过夜,挑选只含 1 个细胞的孔进行单克隆培养,直至生长为细胞集落。挑选生长良好的细胞克隆,用 0.25 % 的胰蛋白酶溶液消化后移至 24 孔培养板扩大培养;待生长至 80 % 饱和度后,再相继移至 6 孔板和培养瓶中扩大培养。分离得到的亚克隆细胞命名为 14-E5 后冻存于液氮中。

1.4 14-E5 亚克隆细胞生物学行为的体外评价

取对数生长期细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液后计数,分别进行平板克隆形成实验、异质黏附能力测定、运动能力测定、体外侵袭实验和细胞增殖能力检测。

1.4.1 克隆形成实验:以每孔 300 个细胞接种 6 孔板培养,显微镜下观察克隆形成状况,20 d 后用 95% 乙醇固定 15 min,结晶紫染色 10~30 min,蒸馏水冲洗 3 次后计数细胞数 > 50 的克隆,计算克隆形成率 = (克隆数/细胞数) × 100%。实验重复 3 次。

1.4.2 异质黏附能力测定:以每孔 1×10^5 个细胞接种 24 孔板培养箱,3 小时后吸取培养液计数未贴壁细胞数,计算黏附率 = (1 - 未黏附细胞数/细胞总数) × 100%。实验重复 3 次。

1.4.3 运动能力测定:以每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板,培养至 80%~90% 饱和度时用 200 μ l 微量加样器尖部均匀用力在孔底划一直线,在划痕处拍照记为 0 h 距离,24 h 后在同处拍照记为 24 h 后距离,迁移距离 = 0 h 距离 - 24 h 后距离。实验重复 3 次。

1.4.4 体外侵袭实验:从 -20 °C 冰箱中取出侵袭小室(BD 公司,孔径 8 μ m),加入 37 °C 预热的无血清培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中水化 2 h,小心移除培养基,将 750 μ l 含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 加入到下室,用无菌镊子将侵袭小室放入 24 孔板中,加 0.5 ml 细胞悬液(1×10^5 个/ml)于上室,培养 24 h 后取出侵袭小室,用棉签轻轻拭去膜上面的细胞。用 4% 的多聚甲醛固定膜背面的细胞后行 HE 染色,将膜切下后放在载玻片上树胶封片。显微镜下计数穿过膜的细胞:200 倍的光镜下以水平线和垂直线将膜分为四个象限,在每个象限及膜的中心各取一个视野计数取平均值。实验重复 3 次。

1.4.5 细胞增殖能力:以每孔 2×10^4 个细胞种植于 24 孔板,每天随意取 3 个孔计数取平均值,共取 7 d。纵坐标以细胞数为单位,横坐标以时间为单位绘制生长曲线。根据公式 $Td = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 计算细胞的群体倍增时间,其中 t 为培养时间, N_0 及 N_t 为接种后及培养 t 小时后的细胞数。实验重复 3 次。

1.4.6 细胞周期检测:取 1×10^6 个细胞,用生理盐水洗涤 2 次后加入 500 μ l 生理盐水吹打成单细胞悬液,快速加入预冷的 95% 乙醇中 4 °C 固定过夜;1000 r/min 离心 5 min 除去乙醇后用 PBS 洗涤 2 次,加入 50 mg/ml RNAaseA 于 37 °C 反应 30 min,再加入 50 μ g/ml 碘化丙锭(Propidium Iodide, PI)于室温下避光染色 30 min,之后,用流式细胞仪检测细胞周期。计算细胞增殖指数(proliferating index, PI) = $[(S + G_2/M)/(G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.5 体内评价 14-E5 亚克隆的转移能力

将 SCID 鼠分为接种 MDA-MB-435S 细胞组(接种 MDA-MB-435S 组)和

接种 14-E5 亚克隆细胞组(接种 14-E5 组)。取 $100\ \mu\text{l}$ (约 1×10^7 个细胞) MDA-MB-435S 和亚克隆细胞分别接种于 SCID 鼠的乳腺脂肪垫。每隔一天观察小鼠精神、饮食及排便等一般情况;记录成瘤时间,用游标卡尺测量肿瘤长、短径,根据公式 $V = \text{长径} \times \text{短径}^2 \times 0.5$ 计算肿瘤体积^[1]。10 周后全部处死解剖,肉眼大体观察转移情况,取所有移植瘤和肺及肝脏,经 10% 福尔马林固定,梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,常规切片,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下判断肿瘤的组织学类型和转移状况。

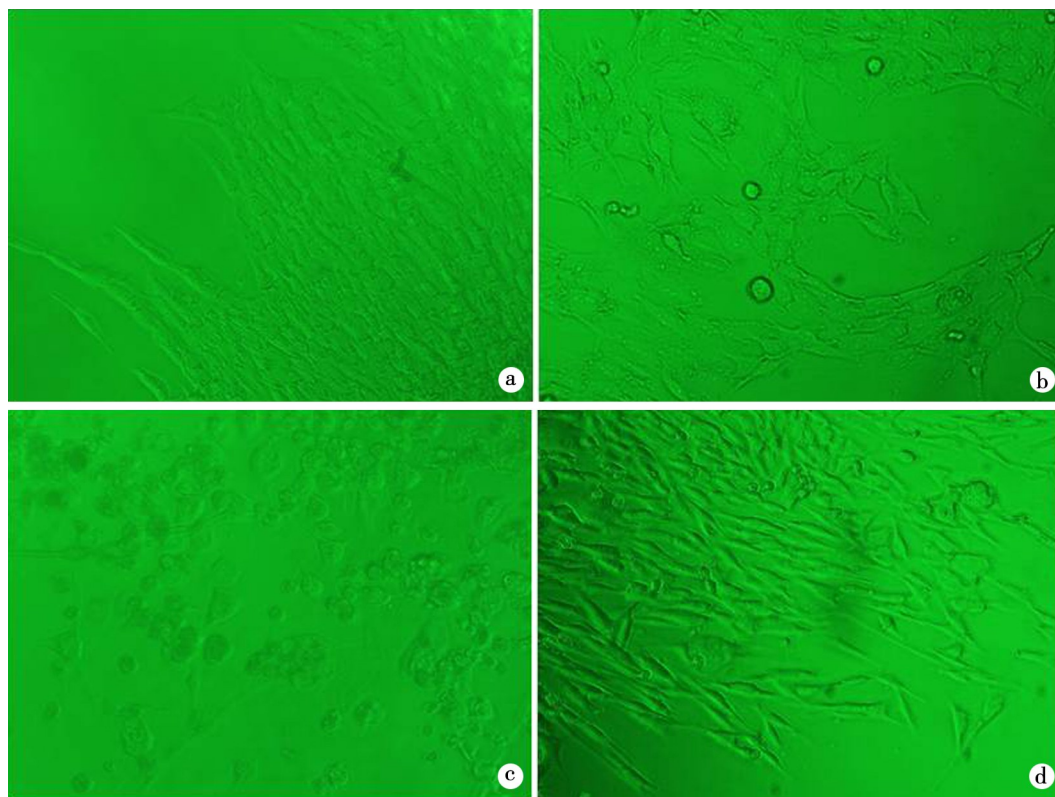
1.6 统计学方法

定量资料采用独立样本 t 检验, $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有限稀释法获得乳腺癌细胞亚克隆

采用有限稀释法获得 52 株 MDA-MB-435S 细胞的亚克隆 14-E5,初步观察发现细胞形态与生长方式有差异,证实 MDA-MB-435S 细胞系中存在异质性细胞亚群(图 1)。

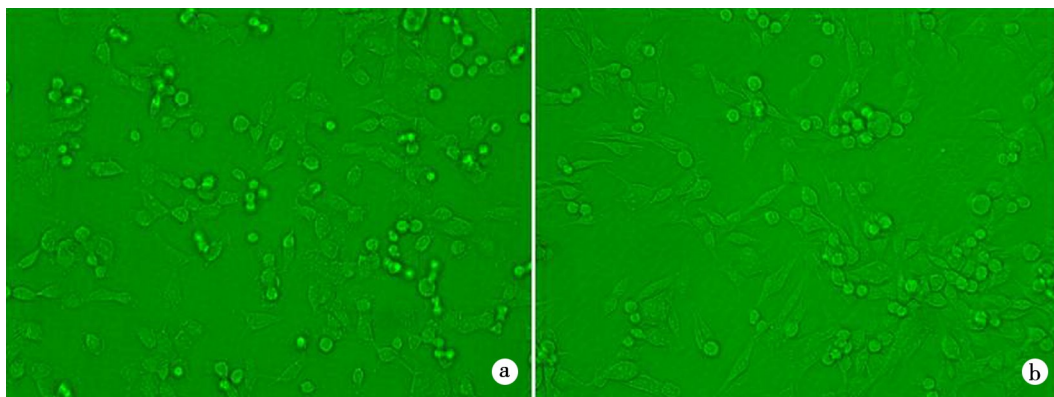


a:10-A3;b:8-C6;c:11-E6;d:6-F4

图 1 MDA-MB-435S 不同亚克隆细胞的形态和生长方式($\times 100$)

2.2 亚克隆 14-E5 与亲代细胞生物学行为的比较

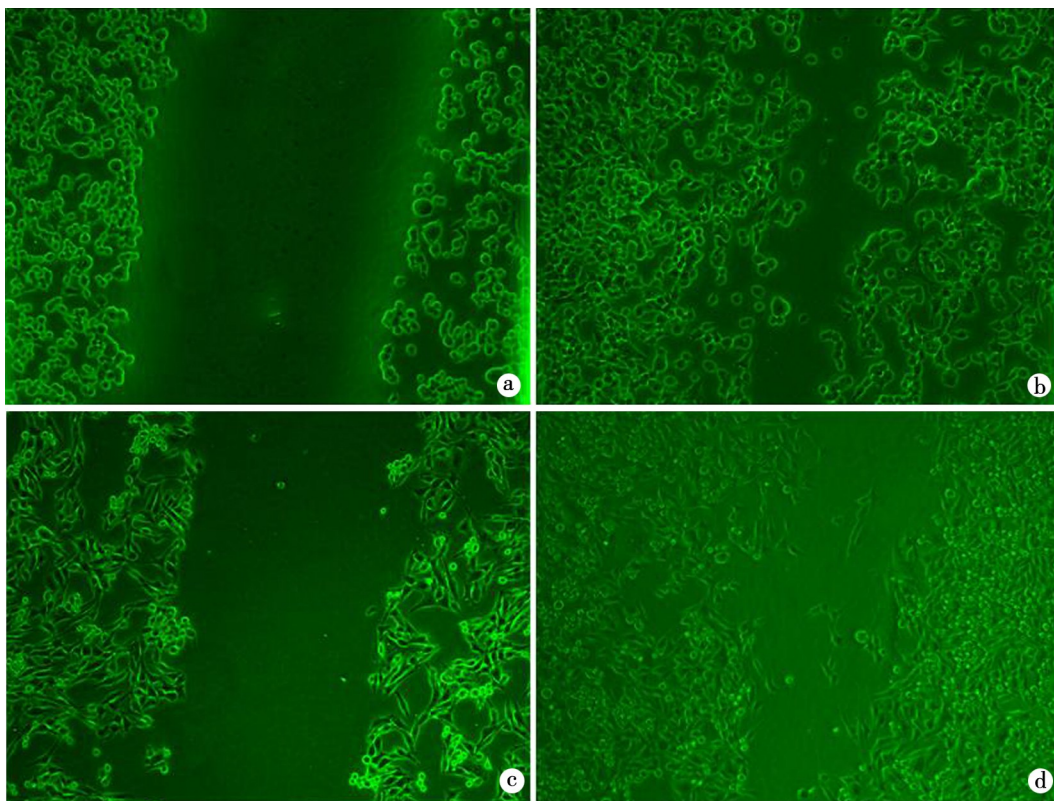
2.2.1 形态学的差异:14-E5 体积比亲代小,呈多边形,触角增多,与亲代 MDA-MB-435S 细胞呈梭形、伪足较长的细胞形态明显不同(图 2)。



a: 14-E5; b: MDA-MB-435S

图 2 14-E5 与 MDA-MB-435S 细胞的形态比较($\times 200$)

2.2.2 运动能力的比较:通过划痕实验测定各细胞亚克隆的运动能力,发现 14-E5 亚克隆 24 h 后迁移距离为 $(428 \pm 74.8) \mu\text{m}$,MDA-MB-435S 细胞迁移距离为 $(178.7 \pm 21.3) \mu\text{m}$,两者差异有统计学意义($t=5.575, P=0.005$;图 3)。

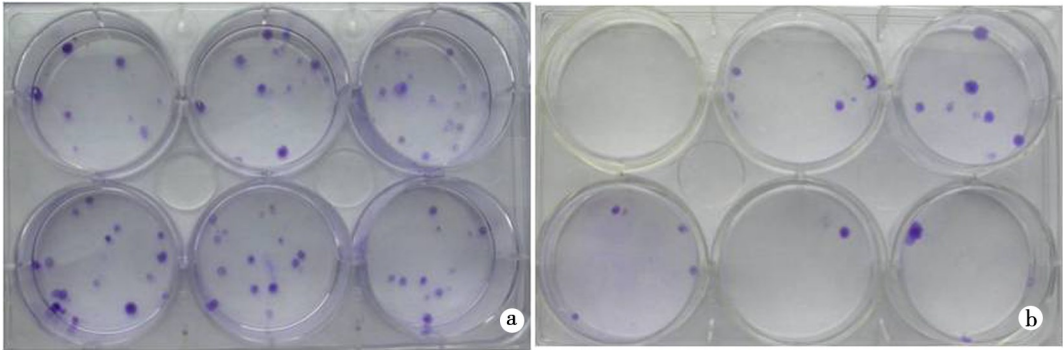


a: 14-E5 0 h; b: 14-E5 24 h; c: MDA-MB-435S 0 h; d: MDA-MB-435S 24 h

图 3 14-E5 与 MDA-MB-435S 细胞的迁移能力比较($\times 100$)

2.2.3 黏附实验结果:14-E5 亚克隆 3 h 后的黏附率为 $(63 \pm 4.7)\%$,MDA-MB-435S 细胞为 $(68 \pm 1.8)\%$,两者差异无统计学意义($t=2.384, P=0.052$)。

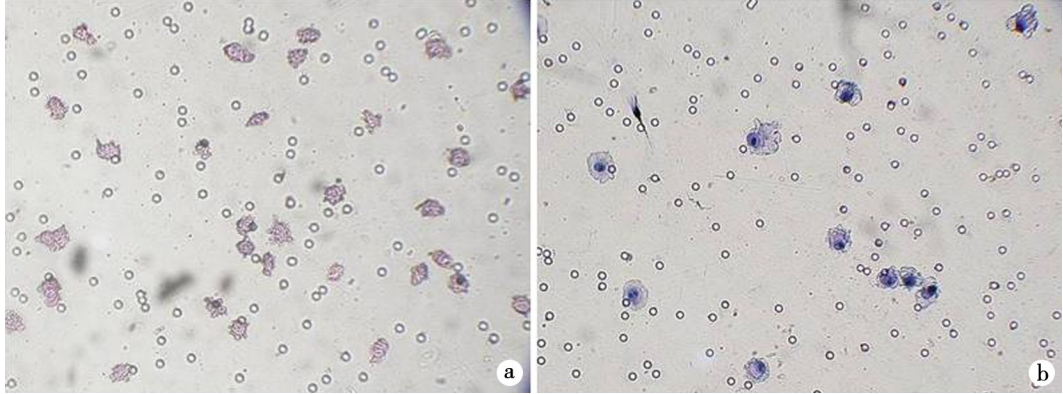
2.2.4 克隆形成率实验结果:14-E5 克隆形成率(2.10 ± 0.66)%,MDA-MB-435S 细胞为(0.77 ± 0.66)%,两者差异有统计学意义($t=3.720, P=0.003$)。14-E5 细胞株的单细胞存活能力比亲代明显增强(图 4)。



a:14-E5;b:MDA-MB-435S

图 4 14-E5 与 MDA-MB-435S 的细胞克隆形成能力比较

2.2.5 体外侵袭能力测定:14-E5 24 h 后侵入侵袭小室下层的细胞数为 26.0 ± 1.5 个(每个高倍视野),MDA-MB-435S 细胞为 13.0 ± 2.0 (每个高倍视野),两者差异有统计学意义($t=9.177, P=0.001$,图 5)。



a:14-E5;b:MDA-MB-435S

图 5 14-E5 与 MDA-MB-435S 细胞的侵袭能力比较(HE 染色 $\times 200$)

2.2.6 细胞生长和增殖能力:14-E5 细胞群体倍增时间为 47 h,亲代细胞群体倍增时间为 45 h,生长曲线显示 14-E5 生长较 MDA-MB-435S 细胞缓慢。

2.2.7 细胞周期:14-E5 细胞增殖指数低于 MDA-MB-435S 细胞($t=7.047, P=0.002$,表 1),提示14-E5细胞的增殖能力较 MDA-MB-435S 低。

表 1 14-E5 与 MDA-MB-435S 的细胞周期比较 (%)

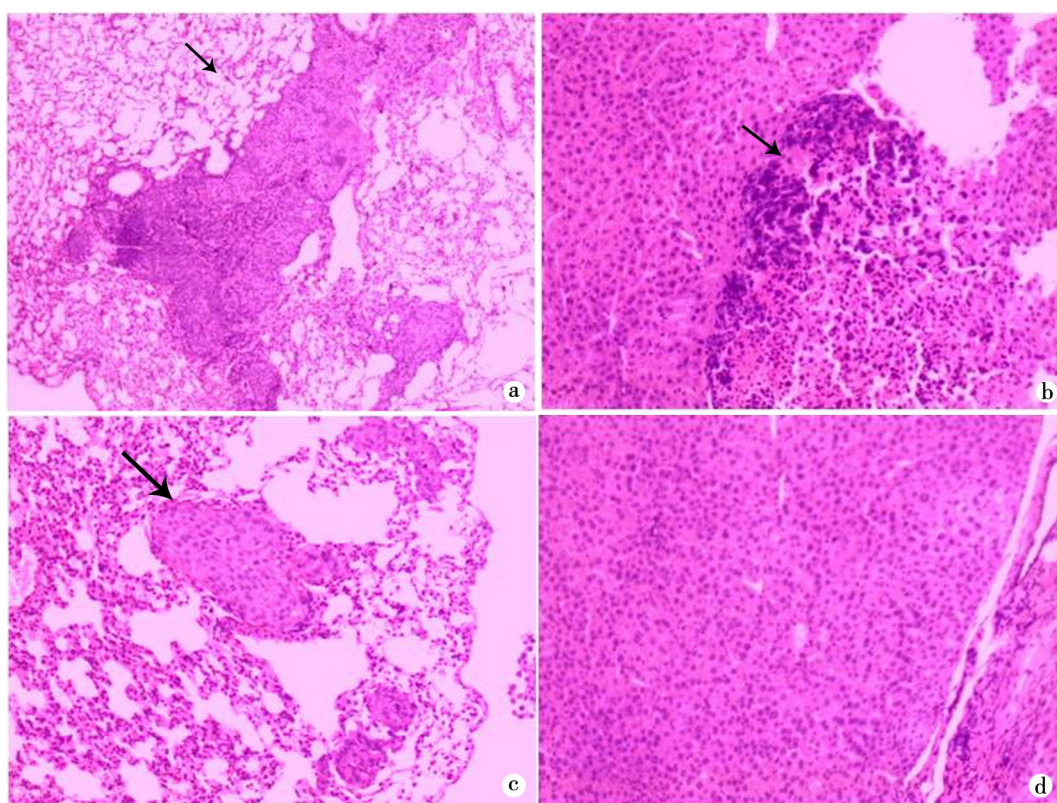
细胞	G ₀ /G ₁ 期	S 期	G ₂ /M 期	PI
14-E5	64.5 ± 2.3	22.7 ± 2.2	12.8 ± 1.1	36.0 ± 2.0^a
MDA-MB-435S	53.7 ± 1.3	29.1 ± 1.5	17.2 ± 0.3	46.0 ± 1.0

PI:细胞增殖指数;a: $P<0.050$,与 MDA-MB-435S 细胞比较

2.3 体内评价 14-E5 亚克隆的转移能力

2.3.1 移植瘤增殖能力:接种 14-E5 组成瘤潜伏期为(16.0 ± 2.2) d, 接种 MDA-MB-435S 组潜伏期(13.0 ± 2.9) d, 两者相比差异无统计学意义($t=1.183, P=0.089$); 两组乳腺脂肪垫接种成瘤率均为 100%。

2.3.2 血行转移能力:接种 14-E5 组 9 只, 其中可评价的 5 只(第 3 周死亡 1 只, 第 5 周死亡 1 只, 第 7 周死亡 2 只, 死因不详), 3 只肉眼可见直径 0.5 mm 的肺转移灶, 其余器官未见转移灶; 组织切片显示 4 只有肺转移, 其中一只伴有肝转移; 接种 MDA-MB-435S 组 9 只, 可评价的有 3 只(第 3 周死亡 2 只, 第 5 周死亡 2 只, 第 8 周死亡 2 只, 死因不详), 解剖后仅 1 只肉眼可见肺转移灶, 其余器官未见转移灶; 组织切片可见 2 只有肺转移, 未见肝脏转移(图 6)。



a: 14-E5 肺转移; b: 14-E5 肝转移; c: MDA-MB-435S 细胞肺转移; d: MDA-MB-435S 细胞肝脏无转移灶; 箭头所指之处为转移灶。

图 6 14-E5 与 MDA-MB-435S 细胞的体内自发转移能力比较(HE 染色 $\times 200$)

3 讨论

早在 1977 年 Fidler 等^[2]就提出肿瘤细胞群体异质性的实验证据和理论, 即在一个原发性恶性肿瘤细胞群体中, 并非所有瘤细胞均具有侵袭和转移能力, 仅某些亚群具有转移潜能而产生转移表型; 在这些具有转移潜能的肿瘤细胞亚群中, 它们各自的转移能力也不一致。从肿瘤细胞系中分离不同转移潜能的细胞亚克隆, 可以为克隆肿瘤转移相关基因和研究肿瘤转移机制提供实验工具。转移相关基因 nm23 是 Radinsky 等^[3]利用小鼠黑色素瘤细胞 B16 的

不同转移潜能亚克隆筛选得到的;Urquidi 等^[4]利用体外有限稀释法建立 MDA-MB-435S 的亚克隆,并通过裸鼠体内移植筛选出高转移性亚克隆 M-4A4、低转移性亚克隆 NM-2C5;Goodison 等^[5]利用不同转移能力亚克隆细胞研究发现肿瘤细胞具有休眠期,证实了肿瘤微环境能够影响转移灶的形成,发现视黄酸受体 β_4 亚型(retinoic acid receptor β_4 , RAR β_4)可能与肿瘤转移有关^[6],并采用光谱核型分析、G 显带技术、荧光原位杂交分析了该细胞亚克隆的遗传学差异,发现它们具有不同的染色体异常^[7]。研究表明,通过体外克隆和(或)体内筛选,可以建立具有高浸润和转移能力或其他生物学特性的细胞亚群,从而为探索肿瘤浸润、转移等生物学特性及其分子基础提供有价值的研究对象^[8-9]。

本研究采用有限稀释法从人乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S 中分离出不同转移潜能的克隆细胞株,发现细胞亚克隆之间的形态不同。组织形态学的差异往往是功能差异的基础,国内外学者已研究发现形态上表现异质性的肿瘤细胞有生物学行为的差异^[10]。本研究通过体外克隆形成实验、细胞黏附能力测定、细胞运动能力测定和细胞侵袭实验相结合的方法,初步筛选出人乳腺癌高转移潜能亚克隆细胞 14-E5,该细胞的克隆形成能力、运动能力和侵袭能力较亲代细胞增强。人乳腺癌细胞移植于免疫缺陷小鼠的乳腺原位,其发生自发转移涉及从原发灶迁移到转移灶形成的完整过程,能较好的模拟人类乳腺癌转移的特点^[11]。因此,本研究采用乳腺脂肪垫接种 SCID 鼠验证克隆细胞株的转移能力,结果发现体外筛选得到的高转移潜能的亚克隆细胞血行转移能力比亲代增强。本研究筛选得到的高转移亚克隆 14-E5 可以作为研究乳腺癌转移机制、研发抗转移药物和评价抗转移实验性治疗疗效的实验工具。

参考文献

- [1] Akla B, Monteil J, Paraf F, et al. A new orthotopic model of breast cancer in immunocompetent rats. *Anticancer Res*, 2003, 23:3761-3766.
- [2] Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res*, 1978, 38: 2651-2660.
- [3] Radinsky R, Weisberg HZ, Staroselsky AN, et al. Expression level of the nm23 gene in clonal populations of metastatic murine and human neoplasms. *Cancer Res*, 1992, 52:5808-5814.
- [4] Urquidi V, Sloan D, Kawai K, et al. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*, 2002, 8:61-74.
- [5] Goodison S, Kawai K, Hihara J, et al. Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin Cancer Res*, 2003, 9:3808-3814.
- [6] Hayashi K, Goodison S, Urquidi V, et al. Differential effects of retinoic acid on the growth of isogenic metastatic and non-metastatic breast cancer cell lines and their association with distinct expression of retinoic acid receptor beta isoforms 2 and 4. *Int J Oncol*, 2003, 22:623-629.
- [7] Goodison S, Viars C, Urquidi V, et al. Molecular cytogenetic analysis of a human breast metastasis model: identification of phenotype-specific chromosomal rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet*, 2005, 156:37-48.

- [8] Wang S, Zhou J, Wang XY, et al. Down-regulated expression of SATB2 is associated with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. J Pathol, 2009, 219: 114-122.
- [9] Hughes L, Malone C, Chumsri S, et al. Characterization of breast cancer cell lines and establishment of a novel isogenic subclone to study migration, invasion and tumorigenicity. Clin Exp Metastasis, 2008, 25: 549-557.
- [10] Lleonart ME, Martin DP, Sanchez PR, et al. Tumor heterogeneity: morphological, molecular and clinical implications. Histol Histopathol, 2000, 15: 881-898.
- [11] Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis *in vivo*. Carcinogenesis, 2005, 26: 513-523.

(收稿日期: 2009-05-04)

(本文编辑: 陈莉)

潘秀华, 王立梅, 李希, 等. 高转移性人乳腺癌细胞亚克隆的筛选[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2010, 4(1): 90-98.