

乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中侧群细胞的分选及其与非侧群细胞的生物学特点比较

左铁¹⁾, 李定彪¹⁾, 杜兴华²⁾, 雷鸣³⁾

(1) 昆明市延安医院胸外科, 云南昆明 650041; 2) 云南省中西医结合医院, 云南昆明 650032; 3) 云南开放大学, 云南昆明 652200)

[摘要] **目的** 分离乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中的侧群细胞 (side population cells, SP), 并比较侧群细胞和非侧群细胞 (non-side population cells, NSP) 的基本生物学特点. **方法** 经 Hoechst33342 染色后, 利用流式细胞技术分选乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中 SP 和 NSP 2 个细胞亚群, 比较 2 群细胞的形态、增殖和周期等特点. **结果** 分选得到的 SP 细胞约占 5.2%, 其增殖速度较 NSP 细胞快, 且细胞形态较粗大. NSP 细胞的 G₁ 期所占比例为 73.63%, 高于 SP 细胞的 G₁ 期所占比例为 54.16%. **结论** SP 和 NSP 细胞的形态有差异, SP 细胞的增殖速度快于 NSP 细胞, NSP 细胞的周期阻滞在 G₁ 期, 提示 SP 细胞可能在乳腺癌细胞的生长过程中具有重要的作用.

[关键词] 乳腺癌细胞 MDA-MB-435s; SP 细胞; 增殖

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0022-03

Separation of Side Population Cells from Breast Cancer Cell MDA-MB-435s and Comparing the Biological Characteristics with Non-side Population Cells

ZUO Tie, LI Ding-biao, DU Xing-hua, LEI Ming

(1) Dept. of Thoracic Surgery Kunming Yan'an Hospital, Kunming Yunnan 650041; 2) Integrated TCM-WM Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032; 3) Yunnan Openning College, Kunming Yunnan 650220, China)

[Abstract] **Objective** To isolate the side population cells (side population cells, SP) from breast cancer cells MDA-MB-435s, and compare the characteristics of the basic biology with non-side population cells (non-side population cells, NSP) 's. **Methods** After Hoechst33342 staining, flow cytometry was used for sorting both SP and NSP cells from breast cancer cells MDA-MB-435s. The morphology, proliferation and cycle characteristics were compared between SP and NSP cells. **Results** SP cells approximately accounted for 5.2% after sorting, the proliferation rate of SP cells was higher than NSP cells, and the morphology of SP cells were coarser. NSP proportion of cells in G₁ phase was 73.63%, which was higher than the proportion of SP cells in G₁ phase (54.16%). **Conclusion** Morphological differences were found between NSP and SP cells, the cell proliferation rate of SP cells is higher than NSP cells. NSP cell cycle arrest in the G₁ phase, suggesting that SP cells may have an important role in the growth of breast cancer cells.

[Key words] Breast cancer cells MDA-MB-435s; SP cells; Proliferation

肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 是存在于肿瘤中的一小部分能够产生新的肿瘤细胞并能自我复制的细胞, 具有自我更新、多向分化、无限增殖等特性, CSC 在肿瘤的形成、生长、浸润及转移中起着决定性作用^[1,2]. 目前对肿瘤干细胞的分

析主要有 2 种方法, 一种是根据不同细胞表面的抗原标志物进行分析, 另一种是利用 SP 细胞外排染料 Hoechst33342 而呈淡染的性质来分析. SP 细胞法更为简便, 应用的更为普遍^[3-5]. 笔者采用流式细胞法来分选乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中 SP 和

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011c092)

[作者简介] 左铁 (1972~), 男, 重庆市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事乳腺肿瘤的诊治与研究工作.

NSP 细胞, 并比较两群细胞的基本生物学特性.

1 材料与方法

1.1 细胞株与试剂

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435S (中国科学院上海细胞库), Leibovitz's L-15 培养基 (GIBCO 公司), 胰蛋白酶 (HyClone 公司), 胎牛血清 (GIBCO 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS), Hoechst33342 (碧云天), Verapamil (GIBCO 公司), PI (碧云天), CCK-8 试剂盒 (DOJINDO), 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (碧云天).

1.2 主要仪器

CO₂ 恒温细胞培养箱 (Thermo 公司), 超净工作台, 台式离心机, 倒置显微镜, 恒温水浴锅, 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司), 多功能酶标仪, 荧光显微镜.

1.3 细胞的培养及分选

用含 10% 胎牛血清和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素的 Leibovitz's L-15 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 及充分饱和湿度的细胞培养箱中培养人乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s, 待细胞处于对数生长期时, 加入胰蛋白酶消化, 用含血清的培养基中和, 并用吸管吹打重悬, 收集到无菌离心管中, 室温下半径 6 cm、1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 用含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬, 调整细胞密度为 10⁶/mL. 将重悬细胞分为 2 组, 第 1 组加入 Hoechst33342 至终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第 2 组加入 Hoechst33342 至终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 同时加入维拉帕米至终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 150 min, 期间每隔 15 min 震荡 1 次, 最后加入 2 mL 冰磷酸缓冲液终止反应. 半径 6 cm、1 500 r/min 离心 15 min 后弃上清, 用含 2% 胎牛血清的 PBS 洗 1 次, 再用冰冷的含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬, 加入 PI 至终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用流式细胞仪进行分析和分选, 上机前 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存.

1.4 分选后细胞形态比较及生长曲线测定

取分选得到的 SP、NSP 细胞和未分选的 MDA-MB-435s 细胞, 分别按 5 000 个/孔接种至 2 块 96 孔板中, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 显微镜下观察比较 SP 和 NSP 2 种细胞的细胞形态, 并拍照. 3 种细胞每组各设 3 个平行孔, 用 CCK-8 法测 SP 和 NSP 细胞的增殖能力, 连续测量 5 d.

1.5 SP 细胞和 NSP 细胞的周期比较

取适量分选得到的 SP 和 NSP 细胞, 分别种于 2 个常规 6 孔板中培养. 待细胞生长到对数期时,

分别小心吸取孔内培养液于离心管中, 胰蛋白酶消化, 并用先前收集的培养液终止, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清. 加入 1 mL 预冷的 PBS 洗 1 次, 再加入 1 mL 冰浴预冷的 70% 乙醇, 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h. 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 用 1 mL 预冷的 PBS 洗 1 次, 每管加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液, 缓慢充分重悬, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水浴 30 min, 用流式细胞仪在激发 488 nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况, 并进行分析.

2 结果

2.1 对 MDA-MB-435s 细胞的 SP 亚群分析

乳腺癌细胞株 MDA-MB-435s 经 Hoechst33342 染色后, 在紫外光照射下发出蓝色和红色 2 种荧光, SP 细胞能将 Hoechst33342 泵出细胞而呈现淡染的状态, 用流式细胞仪检测这部分呈淡染的细胞并将其分选出来, 即可得到 SP 细胞. 检测结果如图 1, 图 1A 中无维拉帕米, 流式散点图左下角 R3 门里呈淡染的细胞为 SP 细胞, 约占 5.2%, 而位于散点图中央的细胞密集区为 NSP 细胞; 图 1B 中加维拉帕米, R3 门里的细胞比例明显减少, 几乎为零, 说明该群细胞不能将 Hoechst33342 排出, 所以在流式散点图上不能出现在 Hoechst33342 低染的 R3 区.

2.2 细胞形态及生长曲线比较

分选后得到的 SP 和 NSP 细胞, 经 24 h 培养后, 荧光显微镜下观察两群细胞形态 (图 2). 由图可以看出, SP 细胞的细胞延展性更好. 连续 5 d 用 CCK-8 法测量 SP、NSP 和未分选的 MDA-MB-435s 细胞生长情况, 结果见图 3. 可以看出, 三群细胞在第 1 天区别还不太明显, 而从第 2 天开始, 可以明显看出, SP 细胞的增殖速度大于 NSP 细胞的增殖速度, 同时, 未分选的 MDA-MB-435s 细胞的增殖速度介于两者之间.

2.3 SP 和 NSP 细胞的周期比较

通过流式细胞技术检测用碘化丙啶染色的 SP 和 NSP 两群细胞的周期, 结果见图 4. 由图可知, NSP 细胞的 G₁ 期 (所占比例为 73.63%) 高于 SP 细胞的 G₁ 期 (所占比例为 54.16%), 而 NSP 细胞的 G₂ 期 (所占比例为 8.99%) 和 S 期 (所占比例为 17.38%) 均低于 SP 细胞的 G₂ 期 (所占比例为 19.34%) 和 S 期 (所占比例为 26.51%).

3 讨论

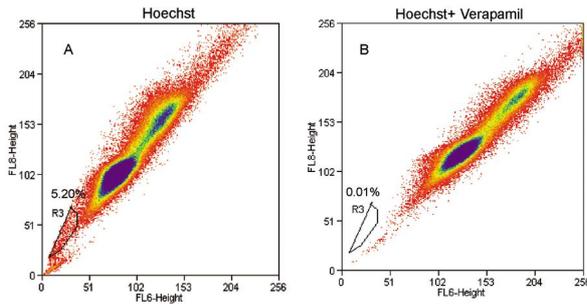


图 1 乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞 SP 亚群分析 (Hoechs33342 和 PI 染色)

Fig. 1 SP subpopulation of breast cancer MDA-MB-435S cells (Hoechs33342 and PI staining)

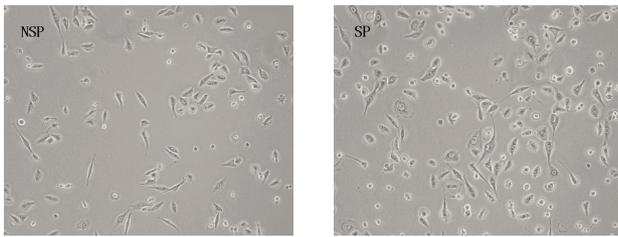


图 2 NSP 细胞和 SP 细胞的细胞形态

Fig. 2 Morphology of NSP cells and SP cells

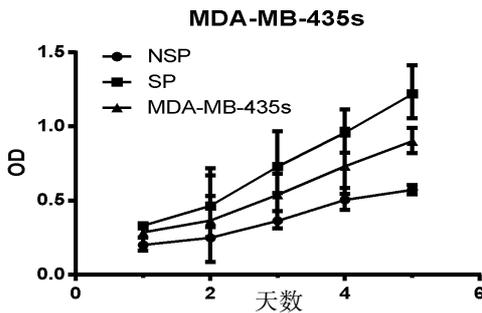


图 3 人乳腺癌 MDA-MB-435s 细胞系 NSP 细胞和 SP 细胞的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of NSP and SP cells in human breast cancer MDA-MB-435s cells lines

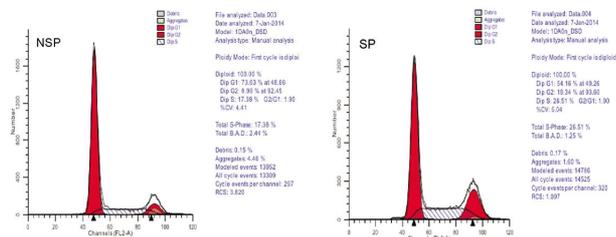


图 4 NSP 和 SP 细胞周期比较

Fig. 4 Comparison of the cell cycle between NSP and SP cells

SP 细胞的分选, 是利用 SP 表型细胞具有外排染料 Hoechst33342 而成淡染的特性实现的, 这一特性与 SP 细胞膜上的转运蛋白 ABCG2 相关^[6]. 近年的研究已发现在肺癌细胞^[7]、肝癌细胞、乳腺癌

细胞等多种肿瘤细胞中存在 SP 细胞, 并有了初步的生物学特性研究分析.

目前, 对于乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 的 SP 细胞分选的报道比较少, 据已有的相关文献, MDA-MB-435s 分选出的 SP 细胞所占比例约为 2.72%^[5]. 本研究通过 SP 细胞法对乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 进行分选, 得到 SP 细胞的比例约占 5.2%, 与文献有所差异, 可能是因为利用 SP 细胞对染料 Hoechst33342 外排的特性来进行分选的过程中, 对于孵育温度、染色时间和维拉帕米的浓度等条件都比较严格, 其中一个条件控制不好, 就可能会导致最终的分选结果的不同. 在对照组加入维拉帕米后, ABCG2 蛋白的转运功能受到阻止, SP 细胞比例明显减少, 几乎为零, 说明笔者从乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中分选得到的是 SP 细胞. 又通过比较 SP 和 NSP 细胞形态、增殖及周期, 发现 2 群细胞形态存在差异, SP 细胞增殖速度高于 NSP 细胞, 同时 SP 细胞在 G₂ 期和 S 期的细胞比例明显大于 NSP 细胞, 证明 SP 细胞的增殖能力比 NSP 细胞强, 更进一步证明笔者分选的这部分细胞为 SP 细胞.

以上研究表明, 乳腺癌细胞 MDA-MB-435s 中存在一定比例的 SP 细胞, 且 SP 细胞和 NSP 细胞在形态、增殖和周期等方面存在一定的差异.

[参考文献]

[1] LI F, TIEDE B, MASSAGUE J, et al. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis [J]. Cell Res, 2007, 17 (1): 3 - 14.

[2] REYA T, MORRISON S J, CLARKE M F, et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells [J]. Nature, 2001, 414 (2): 105 - 111.

[3] 张英, 林洪生, 祁鑫, 等. 人乳腺癌 MCF-7 细胞中 SP 亚群细胞的分离及其生物学行为研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(10): 1 879 - 1 885.

[4] 许建, 王水, 许立生, 等. 乳腺癌细胞系中肿瘤干细胞相关亚群初步研究 [J]. 南京医科大学学报, 2007, 27 (4): 350 - 355.

[5] 王曦, 金从国, 邹天宁, 等. 乳腺癌与 MCF-7 乳腺癌细胞株中 SP 含量的比较 [J]. 昆明医学院学报, 2009, 30 (3): 90 - 93.

[6] KMBRITTON, REYER, IJHARVEY, et al. Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression [J]. Cancers letter, 2012, 323(9): 97 - 105.

[7] 谢彤, 李力, 茅乃权, 等. 人肺癌 A549 细胞系 SP 细胞亚群生物学特性的体外实验研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(10): 736 - 739.

(2014 - 07 - 12 收稿)