

乳腺癌相关成纤维细胞对 MCF7 细胞调控效应的研究

李 振, 屠道远, 甄林林, 刘敏敏

摘要 目的 研究乳腺癌相关成纤维细胞(CAFs)对 MCF7 细胞的调控效应,探讨肿瘤微环境在乳腺癌发展中的作用。

方法 采用 I 型胶原酶法分离并培养 CAFs。DCFHDA 法进行活性氧自由基(ROS)检测。应用鸡胚卵黄囊尿囊膜进行血管生成实验。**结果** 共培养乳腺癌 MCF7 细胞和 CAFs 能促进二者增殖,并可促进 ROS 生成。在共培养体系中加入过氧化物酶能抑制 ROS 生成。另外,共培养能明显促进乳腺癌细胞新生血管的生成,而在 CAFs 中过表达过氧化物酶能显著抑制该过程。**结论** CAFs 对乳腺癌 MCF7 细胞的 ROS 表达具有调节作用,并可促进肿瘤新血管生成。

关键词 乳腺癌相关的成纤维细胞; 乳腺癌 MCF7 细胞; 活性氧自由基; 血管生成

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0348-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.004

研究^[1]表明,肿瘤细胞的增殖与浸润依赖于和周围间质细胞之间复杂的相互作用,肿瘤微环境被认为是与肿瘤进展和治疗反应相关。局部微环境中的缺血和(或)低氧可致大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)产生,进而引起多种氧化还原敏感性转录因子 NF- κ B、AP-1 和 STAT 等^[2]的活化,促进肿瘤进展。

研究^[3-4]提示乳腺癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)对肿瘤的发生、发展起着重要作用。CAFs 与正常乳腺间质成纤维细胞有明显的差异,可以募集内皮祖细胞到肿瘤局部促进肿瘤新生血管生成和肿瘤生长^[5]。CAFs 与乳腺癌细胞之间存在着能量代谢偶联,肿瘤细胞通过改造周围微环境,使其更加适应自身快速生长的状态^[6]。该实验研究 CAFs 对乳腺癌 MCF7 细胞的调控效应以及如何促进肿瘤新生血管,探讨肿瘤微环

境在乳腺癌发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 2014 年 10 月,在患者知情同意下,获取 5 例未行新辅助化疗的乳腺癌手术标本。乳腺癌细胞系 MCF7 细胞(中科院上海细胞库);含有 12-SV40 的腺病毒(山东维真生物科技有限公司);DMEM/F12 培养基(美国 HyClone 公司);10% 胎牛血清(上海赛默飞世尔科技有限公司);I 型胶原酶和透明质酸酶(美国 Sigma 公司);活性氧检测试剂盒和 ROS 清除剂过氧化物酶(上海弘顺生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 CAFs 的分离、纯化和与 MCF7 细胞共培养

本研究应用原代细胞培养方法从临床乳腺癌患者手术切除的癌组织中分离并培养 CAFs。具体方法:取 1 cm³ 大小乳腺癌组织块,去除脂肪组织,剪碎至 1 mm³ 大小,加入含 100 U/ml 胶原酶 1 + 150 U/ml 透明质酸酶的消化培养基,37 °C 孵育 12 ~ 8 h;过 80 目筛网,滤液 1 500 r/min,6 min;细胞沉淀重悬于生长培养基,37 °C 温箱培养 1 周。细胞长满达 80% 后,胰酶消化,显微镜下观察到部分细胞先被消化下来后,缓慢加入含有 10% 胎牛血清的生长培养基终止消化,勿吹打,吸取上清液置另一新培养瓶,置 37 °C 培养。通过感染含有 12-SV40 的腺病毒使细胞永生,建立稳定培养的细胞系。

1.2.2 应用荧光素酶法检测细胞增殖 稳定表达荧光素酶的 CAFs(1.5×10^5) 和 MCF7 细胞(3×10^5) 单独或共同在 6 孔板中培养,细胞接种后 1、3、5 d 测定荧光素酶活性。

1.2.3 DCFHDA 法检测 ROS 表达 MCF7 细胞(3×10^5) 和 CAFs(1.5×10^5) 单独或共同在 6 孔板中培养,24 h 后应用 DCFHDA 进行 ROS 染色。应用 Image J 软件定量 ROS 的表达水平。

1.2.4 过氧化物酶抑制共培养促进的 ROS 产生 MCF7 细胞(3×10^5) 和 CAFs(1.5×10^5) 单独或共同在 6 孔板中培养,24 h 后用过氧化物酶(3 000 U/ml)处理 2 h,检测 ROS 的表达水平。

2017-12-05 接收

基金项目: 江苏省科技厅、江苏省人才办资助项目(编号: BRA2014129); 淮安市科技局资助项目(编号: HAS2013021)

作者单位: 南京医科大学附属淮安第一医院甲乳外科,淮安 223300

作者简介: 李 振,男,硕士研究生;

甄林林,男,主任医师,责任作者, E-mail: simu1027@sina.com

1.2.5 应用鸡胚卵黄囊尿囊膜进行血管生成实验

应用携带过氧化物酶的腺病毒感染 CAFs 获得过表达过氧化物酶的 CAFs 细胞。MCF7 细胞(1×10^6) 和 CAFs(1×10^6) 单独或共同与 Matrigel 混合,接种到 9 d 的鸡胚卵黄囊尿囊膜上,5 d 后照相,计数血管分叉数目代表新的血管生成指数。结果表示为 $\bar{x} \pm s(n=10)$ 。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析,所有实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 共培养可促进细胞增殖 稳定表达荧光素酶的 MCF7 细胞(3×10^5) 和 CAFs(1.5×10^5) 单独或共同在 6 孔板中培养(图 1A)。稳定表达荧光素酶的 CAFs(1.5×10^5) 和 MCF7 细胞(3×10^5) 单独或共同在 6 孔板中培养(图 1B)。细胞接种后 1、3、5 d 测定荧光素酶活性。本研究显示共培养 5 d 后肿瘤细胞(4.1 ± 1.1) 和 CAFs 细胞(2.2 ± 0.6) 较单独培养的肿瘤细胞(2.7 ± 0.8) 和 CAFs(1.4 ± 0.4) 出现

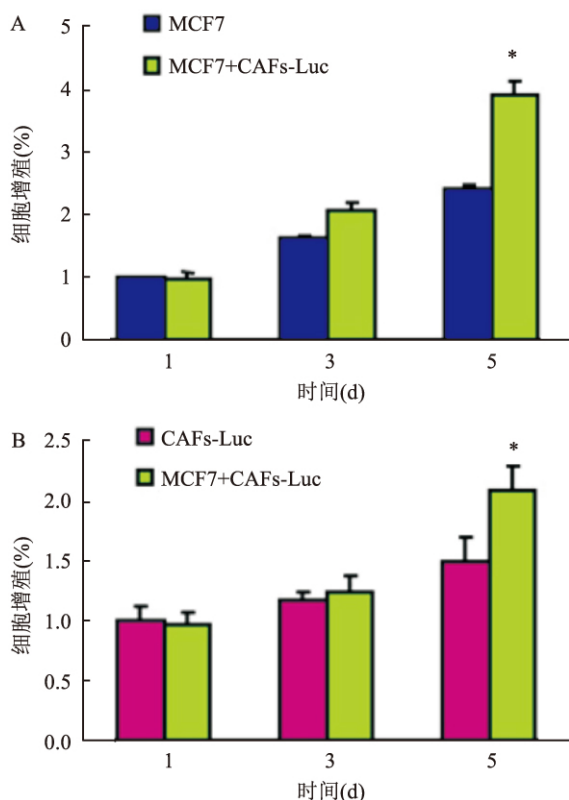


图 1 测定 MCF7 细胞和 CAFs 增殖

A: 稳定表达荧光素酶的 MCF7 细胞单独和共培养后 1、3、5 d 荧光素酶活性比较; B: 稳定表达荧光素酶的 CAFs 单独和共培养后 1、3、5 d 荧光素酶活性比较; 与单独培养 MCF7 细胞比较: * $P < 0.05$

增殖($t = 3.2549, 3.5082, P = 0.0044, 0.0025$)。

2.2 共培养促进 ROS 生成 细胞接种 24 h 后,测定荧光素酶活性。应用 Image J 软件定量 ROS 的表达水平。共培养 MCF7 细胞(3.3 ± 1.2) 和 CAFs(4.2 ± 1.4) 较单独培养 MCF7 细胞(1.0 ± 0.2) 和 CAFs(1.0 ± 0.3) 均能促进 ROS 的生成($t = 5.9786, 7.0676, P = 0.0000$)。见图 2。

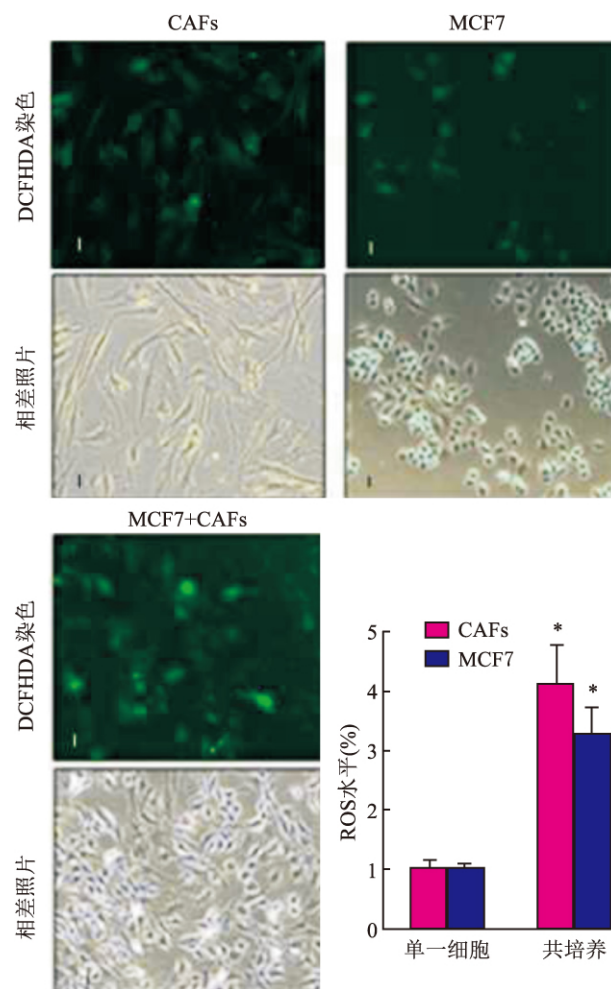


图 2 测定共培养 MCF7 细胞和 CAFs 的 ROS 水平 $\times 400$ 与单一细胞组比较: * $P < 0.05$

2.3 ROS 清除剂过氧化物酶能抑制共培养促进的 ROS 生成 应用 ROS 的清除剂过氧化物酶处理后,未过氧化物酶处理共培养组(0.3 ± 0.1) 与过氧化物酶处理后共培养组(1.0 ± 0.2) 相比,共培养组细胞诱导的 ROS 生成明显受到抑制($t = -9.8995, P = 0.0000$)。见图 3。

2.4 共培养能显著促进新的血管生成 通过应用鸡胚卵黄囊尿囊膜进行血管生成实验显示,接种 CAFs 不能诱导新的血管生成;接种 CAFs + MCF7 细胞共培养组(4.9 ± 1.7) 与单独接种 MCF7 细胞组

(1.2 ± 0.3) 相比,血管生成明显增多($t = 6.7779, P = 0.0000$); 而过氧化物酶处理后的 CAFs + MCF7 细胞组(2.7 ± 1.2) 与接种 CAFs + MCF7 细胞共培养组(4.9 ± 1.7) 相比,血管生成明显减少($t = -3.3433, P = 0.0036$)。由此表明 CAFs 不能诱导新的血管生成,而 MCF7 细胞能诱导肿瘤新的血管生成。更为重要的是,共同接种 MCF7 细胞和 CAFs 能显著增强肿瘤新的血管生成,在 CAFs 中过表达过氧化物酶则明显抑制肿瘤新的血管生成,提示共培养长生的 ROS 在促进乳腺癌新的血管生成中起重要作用。见图 4。

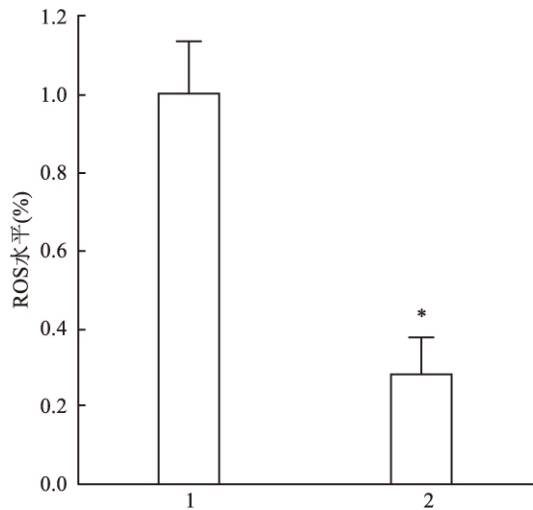
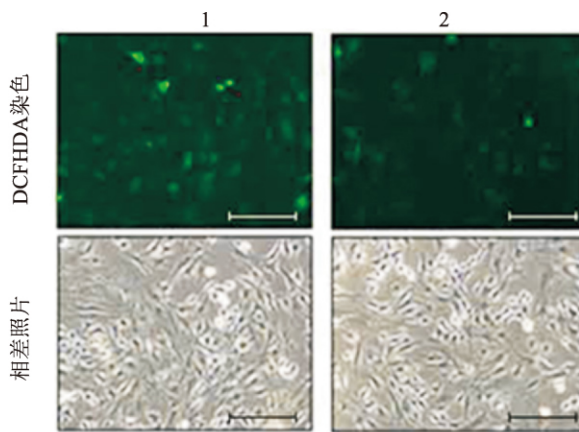


图3 过氧化物酶处理后 ROS 水平变化 ×400

1: 未过氧化物酶处理共培养细胞 ROS 水平; 2: 氧化物酶处理后共培养细胞 ROS 水平; 与未过氧化物酶处理共培养细胞比较: * $P < 0.05$

3 讨论

在肿瘤形成过程中,间质细胞不只是充当被动的结构支架和功能支持的角色,在一定程度上可诱

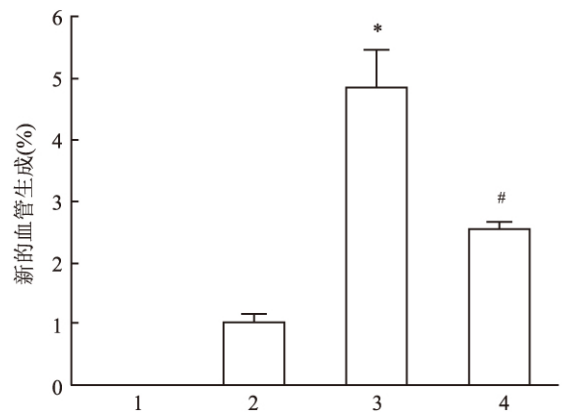
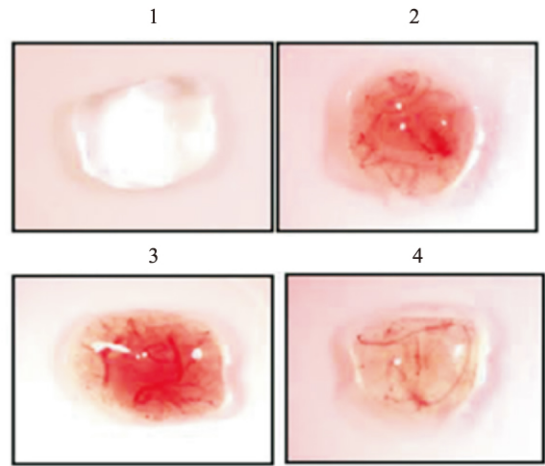


图4 诱导新的血管生成情况

1: 单独接种 CAFs; 2: 单独接种 MCF7 细胞; 3: 接种 CAFs + MCF7 细胞共培养组; 4: 接种过氧化物酶处理后的 CAFs + MCF7 细胞组; 与单独接种 MCF7 细胞组比较: * $P < 0.05$; 与接种 CAFs + MCF7 细胞共培养组比较: # $P < 0.05$

发和促进肿瘤的发生^[7]。乳腺上皮细胞和间质细胞之间的相互动态作用维持乳腺结构的完整性和内环境稳态。但肿瘤发生发展过程中,局部微环境内稳态被破坏和局部缺血低氧致使肿瘤周围环境处于氧化应激状态。氧化应激过程中会产生 ROS 分子、改变 NADH/NAD⁺ 比例、干扰机体正常防御机制并伤害正常组织细胞^[2]。氧化应激也可促进肿瘤释放血管生成因子并导致一系列信号激活,进而促进肿瘤的生长和转移^[8-11]。最新的研究^[6]显示 CAFs 与乳腺癌细胞之间存在着能量代谢偶联,肿瘤细胞通过改造周围微环境,使其更加适应自身快速生长的状态。因此,肿瘤微环境研究正越来越受到重视。一系列的体外实验均支持这样一种假说,即 CAFs 不同于正常组织来源的成纤维细胞,其通过改变自身线粒体活性,增加乳酸和酮体的产生,从而为肿瘤

细胞提供能量值更高的“燃料”。这种代谢偶联途径与神经元细胞-星型胶质细胞和快肌纤维-慢肌纤维之间存在的代谢方式有异曲同工之处^[6]。在乳腺肿瘤微环境的研究中,原代肿瘤相关成纤维细胞的培养是开展后期实验的关键。本实验成功建立了乳腺癌原代相关成纤维细胞分离、培养和纯化的方法。

本研究通过一系列体外实验显示,共培养乳腺癌细胞和 CAFs 能促进二者的细胞增殖且共培养体系中的 ROS 生成增多。而应用 ROS 清除剂过氧化物酶处理,能够明显抑制共培养诱导的 ROS 生成。该现象表明 ROS 在乳腺癌细胞及成纤维细胞间起重要相互作用。

血管网络的形成对于肿瘤的生长和转移极其重要^[12]。如果没有血管为肿瘤细胞提供足够的营养,其体积一般不会超过 2~3 mm³,对器官结构和功能也不会有明显不利的影响^[13-15]。目前已知参与血管生成的生长因子约 20 余种,最重要的当属 VEGF 家族,包括 VEGF、PLGF、VEGF-B、VEGF-C 和 VEGF-D 等。其中研究最多的是 VEGF,一种广泛存在的内皮细胞特异性因子。VEGF 既然是促进血管生成的主要因子之一,可以预测,ROS 可能就是通过 VEGF 途径促进肿瘤新生血管的形成。该推测是否成立及其具体作用机制仍有待进一步设计实验来证实。本研究首次从 ROS 方面研究乳腺癌新生血管生成的影响因素,初步显示 ROS 在促进乳腺癌新生血管生成方面起一定作用。上述实验结果初步证实,在肿瘤发展过程中,CAFs 通过增加 ROS 的方式刺激肿瘤细胞增殖。本实验同时也证实了 CAFs 也促进肿瘤新的血管形成,为肿瘤创造了有利的微环境。

综上所述,成纤维细胞生物学特征在乳腺肿瘤癌变过程中发生了一定程度的改变。本研究推测在乳腺癌癌变的过程中,CAFs 通过增加肿瘤微环境的 ROS,刺激肿瘤增殖,并促进肿瘤新生血管的形成,为肿瘤的发生及发展创造有利的环境。而乳腺癌最终发生是否有成纤维细胞的参与和促进还有待进一步的验证。

参考文献

[1] Place A E, Jin Huh S, Polyak K. The microenvironment in breast

- cancer progression: biology and implications for treatment [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(6): 227.
- [2] Alaimo J T, Davis S J, Song S S, et al. Ethanol metabolism and osmolarity modify behavioral responses to ethanol in *C. elegans* [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36(11): 1840-50.
- [3] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392-401.
- [4] Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, et al. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome [J]. *Breast Cancer*, 2012, 19(2): 170-6.
- [5] Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion [J]. *Cell*, 2005, 121(3): 335-48.
- [6] Martinez-Outschoorn U E, Lin Z, Whitaker-Menezes D, et al. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2011, 11(21): 3956-63.
- [7] Sadlonova A, Mukherjee S, Bowe D B, et al. Human breast fibroblasts inhibit growth of the MCF10AT xenograft model of proliferative breast disease [J]. *Am J Pathol*, 2007, 70(3): 1064-76.
- [8] Eng M Y, Luczak S E, Wall T L. ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review [J]. *Alcohol Res Health*, 2007, 30(1): 22-7.
- [9] Hwang P H, Lian L, Zavras A I. Alcohol intake and folate antagonism via CYP2E1 and ALDH1: effects on oral carcinogenesis [J]. *Medical Hypotheses*, 2012, 78(2): 197-202.
- [10] Lu Y, Cederbaum A I. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(5): 723-38.
- [11] Yu H S, Oyama T, Isse T, et al. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3): 367-75.
- [12] Sun Z, Liu Z H, Chen Y F, et al. Molecular immunotherapy might shed a light on the treatment strategies for disc degeneration and herniation [J]. *Medical Hypotheses*, 2013, 81(3): 477-80.
- [13] Trivanović D, Jauković A, Krstić J, et al. Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor-β1 [J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(3): 190-200.
- [14] Kasimir-Bauer S, Bittner A K, König L, et al. Does primary neoadjuvant systemic therapy eradicate minimal residual disease Analysis of disseminated and circulating tumor cells before and after therapy [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 20.
- [15] Mori M, Ito F, Shi L, et al. Ovarian endometriosis-associated stromal cells reveal persistently high affinity for iron [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 578-86.

- the proapoptotic activity of deubiquitinating enzyme USP2 [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10) : 1–20.
- [10] Shi D, Grossman S R. Ubiquitin becomes ubiquitous in cancer: emerging roles of ubiquitin ligases and deubiquitinases in tumorigenesis and as therapeutic targets [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(8) : 737–47.
- [11] Amerik A Y, Nowak J, Swaminathan S, et al. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways [J]. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(10) : 3365–80.
- [12] Chen Y, Jackson D A, Harvey H H. A comparison of von bertalanffy and polynomial functions in modeling fish growth data [J]. *Can J Fish Aquatic Sci*, 1992, 49(6) : 1228–35.
- [13] Mcgouran J F, Gaertner S R, Altun M, et al. Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes [J]. *Chem Biol*, 2013, 20(12) : 1447–55.
- [14] Tong X, Buelow K, Guha A, et al. USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30) : 25280–91.
- [15] Shi Y, Solomon L R, Pereda-Lopez A, et al. Ubiquitin-specific cysteine protease 2a (USP2a) regulates the stability of aurora-a [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(45) : 38960–8.
- [16] Benassi B, Marani M, Loda M, et al. USP2a alters chemotherapeutic response by modulating redox [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e812.
- [17] Devine T, Dai M S. Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19: 3248–62.
- [18] Wei T, Biskup E, Gjerdrum L M, et al. Ubiquitin-specific protease 2 decreases p53-dependent apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30) : 48391–400.

Prokaryotic expression and purification of USP2a and activity analysis

Zhang Wanfang, Sun Yinwei, Wang Menghui, et al

(School of Life Science and Technology, Xinxiang University, Xinxiang 453003)

Abstract Objective In order to study the mechanism of USP2a in tumor genesis and development, the primers were designed to PCR the C terminal catalytic domain of USP2a. **Methods** The PCR products were cloned into plasmid pET28a(+). The fusion protein USP2a-C was induced and expressed in *E. coli* BL21 and purified by Ni-NTA affinity chromatogram. The kinetic parameters of USP2a-C were detected by fluorescence, the activity of peptidase and isopeptidase were analyzed by LC-MS/MS. **Results** The soluble fusion protein USP2a-C were successfully expressed and purified. The kinetic parameters of USP2a-C hydrolyzed Ub-AMC with a K_{cat}/K_m of $2.53 \times 10^5 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{s})$. LC-MS/MS results indicated that USP2a-C could hydrolyze Di-Ub and Ub-V⁷⁷ in effectively. **Conclusion** The C terminal catalytic domain of USP2a has the total catalytic activity of deubiquitinating enzymes.

Key words ubiquitin-specific protease 2; activity analysis; LC-MS/MS

(上接第 351 页)

A preliminary study on the regulatory effect of breast cancer associated fibroblasts on MCF7 cells

Li Zhen, Tu Daoyuan, Zhen Linlin, et al

(Dept of Breast and Thyroid Surgery, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300)

Abstract Objective To study the regulatory effect of breast cancer associated fibroblasts (CAFs) on MCF7 cells, and the role of tumor microenvironment in the development of breast cancer. **Methods** CAFs were isolated by collagenase I digestion and cultured. DCFHDA method was used for the detection of reactive oxygen species (ROS). Chick embryo chorioallantoic membrane assay was used to detect angiogenesis. **Results** Co-culture of MCF7 cells and CAFs promoted proliferation of tumor cells and CAFs, and promoted the production of ROS. Addition of peroxidase into co-culture system inhibited the production of ROS. Besides, co-culture of MCF7 cells and CAFs significantly promoted angiogenesis in breast cancer cells; the over expression of peroxidase in CAFs significantly inhibited this process. **Conclusion** CAFs have regulatory effect on the expression of ROS in MCF7 cells, and can promote the angiogenesis in tumor cells.

Key words breast cancer associated fibroblasts; breast cancer MCF7 cells; reactive oxygen species; angiogenesis