

- lesions in biopsy specimens of glomerulonephritic patients[J]. *Am J Nephrol*, 1989, 9(1):30-37
- 5 Chen Y, Tang L, Feng Z, *et al.* Pathological predictors of renal outcomes in nephrotic idiopathic membranous nephropathy with decreased renal function[J]. *J Nephrol*, 2014, 27(3):307-316
- 6 Taguchi T, Oyamada M, Harada T. Pathology of membranous nephropathy[J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 2011, 53(5):684-691
- 7 Bazzi C, Petrini C, Rizza V, *et al.* Urinary excretion of IgG and alpha(1)-microglobulin predicts clinical course better than extent of proteinuria in membranous nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38(2):240-248
- 8 Bazzi C, Petrini C, Rizza V, *et al.* Fractional excretion of IgG predicts renal outcome and response to therapy in primary focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(2):328-335
- 9 Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, *et al.* Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(4):1400-1407
- 10 Cattran DC. Idiopathic membranous glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(5):1983-1994
- 11 Cattran DC, Reich HN, Beanlands HJ, *et al.* The impact of sex in primary glomerulonephritis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(7):2247-2253
- 12 Quiros PL, Ceballos M, Remon C, *et al.* [Systemic arterial hypertension in primary chronic glomerulonephritis: prevalence and its influence on the renal prognosis][J]. *Nefrologia*, 2005, 25(3):250-257
- 13 Naini AE, Harandi AA, Ossareh S, *et al.* Prevalence and clinical findings of biopsy-proven glomerulonephritis in Iran[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2007, 18(4):556-564
- 14 周姗姗, 李建文, 陈敢, 等. 112例特发性膜性肾病的临床与病理分析[J]. *现代医院*, 2014, 14(7):10-12
- 15 王纓, 胡贵荣, 赵青. 不同年龄特发性膜性肾病临床及病理分析[J]. *南昌大学学报:医学版*, 2015, 55(3):58-61
- 16 蔡娟娟, 顾开宏, 郭玉, 等. 不同年龄特发性膜性肾病患者临床与病理分析[J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(10):594-598
- 17 章斌. 肾小管间质损伤在盐敏感性高血压发生中的作用[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2003, 12(3):278-280
- 18 Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005, 14(1):43-52
- 19 李瑛, 刘伏友, 彭佑铭, 等. 尿蛋白成分与选择分数预测肾小管间质损伤程度[J]. *中华内科杂志*, 2007, 46(4):315-316
- (收稿日期:2017-09-19)
(修回日期:2017-10-11)

ALDH1 高表达对乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞特性的影响

冀 峰 李 克

摘 要 目的 探讨 ALDH1 高表达对乳腺癌 MCF-7 细胞干细胞特性的影响,为乳腺癌的治疗提供理论依据。**方法** 构建慢病毒 ALDH1RNA,转染乳腺癌 MCF-7 细胞,嘌呤霉素筛选稳定高表达 ALDH1 的亚克隆,命名为 MCF-ALDH1 细胞株。荧光定量 PCR 和 Western blot 法检测 MCF-ALDH1 细胞株及对照细胞中 ALDH1 在 mRNA 和蛋白水平的表达;克隆形成实验、悬浮球形成实验及裸鼠成瘤实验检测 MCF-ALDH1 及对照组细胞的干细胞特性,MTT 法测定细胞的耐药性。**结果** 与 MCF-7 组细胞比较,MCF-ALDH1 细胞株的 ALDH1 在 mRNA 和蛋白表达量明显升高;MCF-ALDH1 细胞克隆形成数目为 128 ± 22 个,高于 MCF-ALDH1 细胞球克隆形成数 (46 ± 15 个);悬浮成球实验,MCF-ALDH1 细胞悬浮成球数目明显增多 (16 ± 2 个),高于对照细胞悬浮球数 (8.0 ± 1.5 个);肿瘤细胞在裸鼠皮下接种后,MCF-7 细胞组有 3 只裸鼠成瘤,MCF-ALDH1 有 5 只成瘤,瘤体积明显大于 MCF-7 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。耐药实验显示,MCF-ALDH1 对顺铂、紫杉醇的耐药性明显提高。**结论** 高表达 ALDH1 的乳腺癌 MCF-7 细胞干细胞特性增强,ALDH1 可能成为乳腺癌治疗的靶点之一。

关键词 ALDH1 乳腺癌 干细胞特性

中图分类号 R737.9

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.016

Expression and Significance of ALDH1 in Cancer Stem Cell-like Characteristics in Breast Cancer Cell Line MCF-7. Ji Feng, Li Ke. Department of Thyroid and Breast Surgery, The Center Hospital of Kaifeng, Henan 475003, China

基金项目:河南省科技厅基础与前沿项目(112300410044)

作者单位:475003 开封市中心医院乳腺甲状腺外科(冀峰);450000 郑州,河南省肿瘤医院内科(李克)

通讯作者:李克,副教授,硕士生导师,电子信箱:like760320@163.com

Abstract Objective To investigate the expression and significance of ALDH1 in cancer stem cell-like characteristics in breast cancer cell line MCF-7. **Methods** RNA lenti-virus particles targeting ALDH1 gene were transfected into MCF-7 cells. Subclones with stable ALDH1 expression were selected by puromycin and named MCF-ALDH1 cells. The mRNA and protein expression of ALDH1 were detected by real-time quantitative PCR and Western blot tests. Cell differentiation, stem cell potential were observed by clone formation assay and suspension sphere-forming assay. The abilities of tumor-formation of cells were detected through inoculating the cells into the nod mouse. To detect the drug-resistance ability of cells by MTT test. **Results** Compared to the MCF-7 cells, the expression of mRNA and protein of ALDH1 by MCF-ALDH1 cells were significantly increased. Clony forming numbers (128 ± 22) of the MCF-ALDH1 cells was higher than controls (46 ± 15) ($P < 0.05$). The proportion of sphere-initiating cells in MCF-ALDH1 and controls was (16 ± 2) versus (8.0 ± 1.5 , $P < 0.05$). The average tumor volume of MCF-ALDH1 was greater than controls ($P < 0.05$). The drug resistance index of MCF-ALDH1 was higher than controls. **Conclusion** Experimental findings from this study showed that MCF-7 cells highly expressing ALDH1 genes, with higher proliferation and differentiation, in vivo tumorigenicity and potential of stem cells. ALDH1 may be used as an target to cure breast cancer.

Key words ALDH1; Breast cancer; Stem cell-like characteristics

肿瘤干细胞(cancer stem cells)是肿瘤发生的始动细胞,是肿瘤发生、发展、侵袭、转移、复发及耐药的决定因素^[1-3]。ALDH1是乳腺癌干细胞的标志性分子之一,可以用于乳腺癌干细胞的鉴定及分离^[4]。ALDH1在干细胞中具有较高的活性,在细胞内催化乙醛氧化为乙酸的NADP+依赖性酶,与患者预后呈负相关^[5,6]。本实验将构建表达ALDH1的慢病毒,转染乳腺癌MCF-7细胞,探讨ALDH1的高表达对乳腺癌MCF-7细胞干细胞特性的影响,为乳腺癌的治疗提供指导策略。

材料与方法

1. 实验动物:4周龄雄性裸鼠10只,实验动物合格证号SCXK(京)2009-0015,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,体重约20g,无菌条件下饲养。

2. 实验材料:将ALDH1的序列提交GenePharma公司,由该公司构建并进行慢病毒包装。鼠抗人ALDH1抗体(美国CST公司),引物序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成,荧光定量PCR试剂(北京康为世纪生物科技有限公司)。

3. 建立稳定高表达ALDH1的细胞株:分为实验组和对照组,实验组(MCF-ALDH1)加入含ALDH1的慢病毒,对照组(MCF-7)加入等量对照慢病毒。将MCF-7细胞消化计数后均匀接种到12孔板中,培养过夜,待细胞达到30%~40%融合时,选择状态比较好的细胞,吸除培养液,换上配制好的转染混合液。加入转染试剂培养12h或过夜后,换上含培养液,培养72h后加入嘌呤霉素,筛选出稳定表达ALDH1的细胞及对照细胞。

4. 荧光定量PCR及Western blot法检测ALDH1

的表达:取MCF-ALDH1及对照细胞,用Trizol法提取总RNA,转录成cDNA。PCR扩增ALDH1,上游引物:5'-CTTCTTCCTTGAACCCCATGC-3';下游引物:5'-AGGAGTGCCTGTAAGTGGGG-3',产物118bp,β-actin为内参,上游引物:5'-CCTAGAAGCATTTCGGGTGG-3';下游引物:5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3',产物为220bp。取MCF-ALDH1及对照细胞提取总蛋白,采用BCA法测定蛋白浓度并将样本蛋白稀释至适宜浓度,12%SDS-PAGE电泳2h,转膜1.5h,转膜后用5%脱脂奶粉封闭1h,加入鼠抗人ALDH1抗体4℃孵育过夜,TBST洗涤后加山羊抗鼠二抗孵育1h,暗室显影,用GADPH为内参。

5. 细胞克隆形成实验:将对数增长期的MCF-ALDH1及对照细胞消化计数,以每孔500个接种在6孔板中,设3个复孔。培养2周左右,弃去培养基用PBS洗2次,加入多聚甲醛固定15min,0.2%结晶紫染色0.5h,计数>50个细胞的克隆数。

6. 悬浮成球实验:将MCF-ALDH1及对照细胞以每孔200个接种在低黏附6孔板中,设3个复孔,用DMEM/F12无血清培养基(含EGF 10ng/ml, bFGF 20ng/ml, B27等)培养2周,观察直径>50μm的悬浮球体数,取5个视野,求平均值。

7. 移植瘤裸鼠模型的建立:分为MCF-ALDH1和对照细胞组,每只裸鼠皮下接种 1×10^5 个细胞,每组5只裸鼠,无菌条件下饲养。每隔2天称重裸鼠,观察出瘤时间,瘤体生长情况,4周后解剖裸鼠取瘤,记录瘤体积。

8. MTT法测定MCF-ALDH1耐药指数:分为MCF-ALDH1和对照细胞组,取对数生长期细胞 $4 \times$

10^3 个/孔,接种到 96 孔板,设 3 个复孔,24h 后更换含有不同浓度紫杉醇、顺铂、5-FU 的培养基,设不加药物空白对照。48h 后加入 MTT,测定 490nm 处的吸光度值(A),软件 GraphPad Primer 5 计算半数抑制 IC_{50} ,耐药指数(RI) = $IC_{50}(MCF-ALDH1) / IC_{50}(MCF-7)$ 。

9. 统计学方法:所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较应用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高表达 ALDH1 的细胞株 MCF-ALDH1 的建立:荧光定量 PCR 结果如图 1 所示,与亲本细胞相比,MCF-ALDH1 细胞 ALDH1 基因在 mRNA 水平表达明显升高,为对照组的 2 倍以上,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 法结果如图 2, MCF-ALDH1 细胞 ALDH1 表达明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

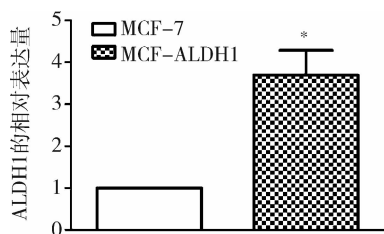


图 1 ALDH1 在 mRNA 水平的表达
与 MCF-7 比较, * $P < 0.05$

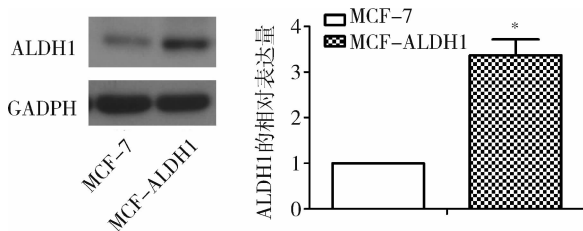


图 2 ALDH1 在蛋白水平的表达
与 MCF-7 比较, * $P < 0.05$

2. 细胞克隆形成实验:与对照组细胞比较,对照组克隆数为 46 ± 15 个, MCF-ALDH1 细胞克隆形成数目为 128 ± 22 个,明显增多,差异有统计学意义($t = 12.4, P < 0.05$),详见图 3。

3. 悬浮成球实验:对照细胞悬浮球为 8.0 ± 1.5 个, MCF-ALDH1 细胞悬浮成球数目明显增多,为 16 ± 2 个,差异有统计学意义($t = 9.28, P < 0.05$),详见图 4。

4. 移植瘤裸鼠模型的建立:两组裸鼠肿瘤细胞皮

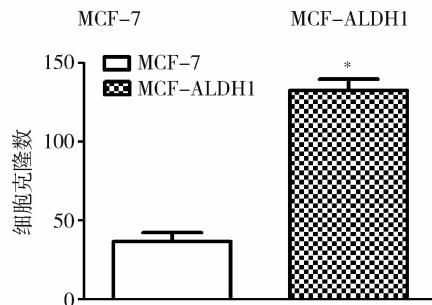
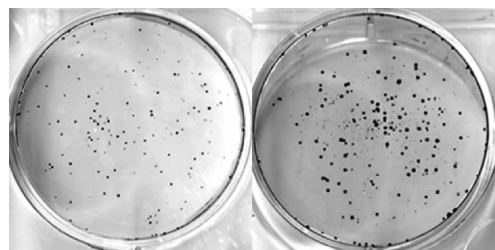


图 3 细胞克隆形成实验
与 MCF-7 比较, * $P < 0.05$

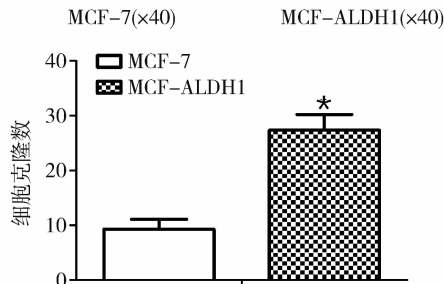
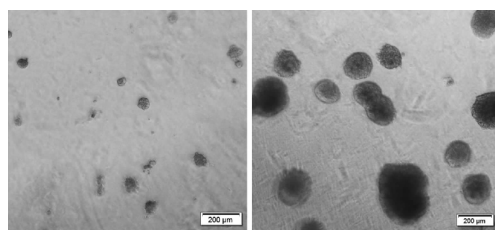


图 4 悬浮成球实验
与 MCF-7 比较, * $P < 0.05$

下接种 4 周后, MCF-7 细胞组有 3 只裸鼠成瘤, MCF-ALDH1 有 5 只成瘤,瘤体积明显大于 MCF-7 组,差异有统计学意义($t = 8.65, P < 0.05$),详见表 1。

表 1 裸鼠成瘤实验结果

组别	成瘤裸鼠(只)	瘤体积(cm^3)
对照组	3	0.68 ± 0.30
实验组	5	$1.32 \pm 0.58^*$

与对照组比较, * $P < 0.05$

5. MTT 法检测 MCF-ALDH1 细胞对化疗药物的敏感度: MCF-ALDH1 对顺铂、紫杉醇的耐药性明显升高,结果见表 2。

表 2 MCF-7 及 MCF-ALDH1 对不同抗癌药物的 RI 测定

药物	IC ₅₀ (μg/ml)		RI
	MCF-7	MCF-ALDH1	
顺铂	0.32 ± 0.05	3.52 ± 0.68	10.47
紫杉醇	0.41 ± 0.12	2.24 ± 0.43	5.57
5-FU	1.56 ± 0.56	2.50 ± 0.24	1.59

讨 论

肿瘤组织中存在着一小群有干细胞特征的细胞,称其为肿瘤干细胞(cancer stem cell,CSC),是肿瘤组织中具有无限增殖潜能的细胞群,所占比例极少,具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞,是肿瘤复发及耐药的根源^[2]。

目前肿瘤干细胞的鉴定和分离主要借助细胞表面的标志物,乳腺癌的肿瘤标志物有 CD44、CD90、ALDH1 等^[6-8]。ALDH1 属于 ALDHs 基因家族,在细胞质中表达,通过氧化视黄醇参与细胞的生长和分化,ALDH1 在多种组织类型的肿瘤干细胞高表达^[5,9]。已被认为是乳腺癌、肺癌、卵巢癌等的通用标志物,证实了 ALDH1 在肿瘤生物学行为中发挥着重要作用^[10-12]。

本实验建立的乳腺癌细胞株高表达 ALDH1,荧光定量 PCR 和 Western blot 法结果显示,ALHD1 在 mRNA 和蛋白水平的表达均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞可以用于后续实验。MCF-7 高表达 ALDH1 后,克隆形成实验、悬浮成球实验以及裸鼠移植瘤实验显示,在体内或者体外,MCF-ALDH1 细胞的克隆形成能力、成球率及成瘤率均明显增高,说明高表达 ALDH1 的 MCF-7 细胞具有干细胞的特性,恶性程度增高,张荷等用含生长因子的无血清培养基培养卵巢癌 HEY 细胞株,形成的卵巢癌干细胞球高表达 ALDH1,细胞恶性程度更高,与本实验的结果一致^[12]。

肿瘤干细胞具有更强的耐药性^[13]。Landen 等^[14]研究证实,ALDH1 在卵巢肿瘤组织及细胞系中均有表达,ALDH1 阳性细胞比阴性细胞更具有化疗抵抗性及致瘤性。本实验检测了高表达 ALDH1 的乳腺癌细胞 MCF-7 对顺铂、紫杉醇及 5-FU 的耐药性,发现细胞对顺铂及紫杉醇耐药的耐药性明显增加,说明 ALDH1 和细胞的耐药性相关,机制有待于开展进一步的实验进行探讨。

肿瘤干细胞因其强致瘤性和耐药性备受关注,是开发新型抗癌药物和探索治疗策略的重要目标,研究肿瘤干细胞相关的标志物的功能非常重要。综上所述

述,高表达 ALDH1 的乳腺癌 MCF-7 细胞干细胞特性增强,恶性度增加,ALDH1 可能成为乳腺癌治疗的一个靶点。

参考文献

1 Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know[J]. Pathology, 2017,49(2):111-119

2 刘新丽,李伟东,付丽. 乳腺癌干细胞标志物的研究进展[J]. 中华病理杂志,2014,43(4):282-284

3 Bednarz-Knoll N, Nastaly P, Zaczek A, et al. Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression[J]. Oncotarget, 2015,6(29):26789-26803

4 Tajima H, Makino I, Ohbatake Y, et al. Neoadjuvant chemotherapy for pancreatic cancer: Effects on cancer tissue and novel perspectives[J]. Oncol Lett, 2017,13(6):3975-3981

5 Zhou L, Yu L, Zhu B, Wu S, et al. Metastasis-associated in colon cancer-1 and aldehyde dehydrogenase 1 are metastatic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer[J]. BMC Cancer, 2016,16(1):876

6 Obayashi S, Horiguchi J, Higuchi T, et al. Stathmin1 expression is associated with aggressive phenotypes and cancer stem cell marker expression in breast cancer patients[J]. Int J Oncol, 2017,51(3):781-790

7 Weigand A, Boos AM, Tasbihi K, et al. Selective isolation and characterization of primary cells from normal breast and tumors reveal plasticity of adipose derived stem cells[J]. Breast Cancer Res, 2016,18(1):32

8 Gauck D, Keil S, Niggemann B, et al. See comment in PubMed Commons belowHybrid clone cells derived from human breast epithelial cells and human breast cancer cells exhibit properties of cancer stem/initiating cells[J]. BMC Cancer, 2017,17(1):515

9 Al-Dhfyhan A, Alhoshani A, Korashy HM. Aryl hydrocarbon receptor/cytochrome P450 1A1 pathway mediates breast cancer stem cell-expansion through PTEN inhibition and β -Catenin and Akt activation[J]. Mol Cancer, 2017,6(1):14

10 Yu S, Fourman MS, Mahjoub A. Lung cells support osteosarcoma cell migration and survival[J]. BMC Cancer, 2017,17(1):78

11 He M, Wang D, Zou D, Wang C. Re-purposing of curcumin as an anti-metastatic agent for the treatment of epithelial ovarian cancer: in vitro model using cancer stem cell enriched ovarian cancer spheroids[J]. Oncotarget, 2016,7(52):86374-86387

12 张荷,张纳,袁蒙蒙,等. 高表达 ALDH1 对卵巢癌 HEY 细胞株干细胞特性的影响[J]. 实用医学杂志,2016,32(5):392-395

13 Kulsum S, Sudheendra HV, Pandian R, et al. Cancer stem cell mediated acquired chemoresistance in head and neck cancer can be abrogated by aldehyde dehydrogenase1A1 inhibition[J]. Mol Carcinog, 2017,56(2):694-711

14 Landen CN, Goodman B, Katre AA, et al. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2010,9(12):3186-3199

(收稿日期:2017-08-13)

(修回日期:2017-09-20)