

不同来源 MCF-7 细胞系的增殖速度及 ER α 表达上的差异

许炜茹^{1,2} 林洪生^{2*} 陈信义¹ 张英²

(¹北京中医药大学, 北京 100029; ²中国中医科学院广安门医院肿瘤科, 北京 100053)

摘要 通过体外培养不同来源的乳腺癌 MCF-7 细胞系发现细胞的形态、增殖速度都存在很大的差异。随后进行了 NOD/SCID 小鼠异种移植实验并对瘤体进行免疫组织化学的检测, 发现两株 MCF-7 细胞系均丢失人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her2), 并且其中一株细胞系的雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 也丢失。本研究提示 MCF-7 细胞系细胞增殖速度变快可能与 ER α 的丢失相关。

关键词 乳腺癌; MCF-7 细胞系; 雌激素受体

乳腺癌是激素依赖性肿瘤, 其发生发展与激素受体的表达密切相关。研究结果证实乳腺癌细胞中的激素受体结合特定的激素能形成复合物, 该复合物能够刺激癌细胞的生长、分裂, 孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 的存在能加强雌激素受体的作用。因此, 激素受体与乳腺癌之间的关系备受关注, 尤其是雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 与乳腺癌的发生发展之间的关系。

目前, 雌激素受体中的雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α) 是内分泌治疗的靶点。关于此受体的研究通常采用 ER α 阳性的人乳腺癌 MCF-7 细胞系。我们在对 MCF-7 进行研究的过程中发现不同来源的 MCF-7 细胞系体外培养时存在很大的形态学差异, 随后对两个不同来源的细胞系进行了比较系统的体内外生物学特性的比较, 发现两株 MCF-7 细胞系的体内外增殖速度差异很大, 并且均丢失人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, Her2); 此外, 其中一株 MCF-7 细胞系还出现 ER α 丢失。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器 一株 MCF-7 细胞系购自中国科学院上海细胞库, 命名为 MCF-7-a; 另一株由中国医学科学院肿瘤研究所张书人教授馈赠, 命名为 MCF-7-b。MEM 培养基、胰蛋白酶粉为 Gibco 公司产品。EDTA-2Na 为北京化学试剂公司产品。人胰岛素注射液为丹麦诺和诺德公司产品。雌二醇缓释片为 Innovative Research of America 公司产品。

Matrigel 为 BD 公司产品。ER α 、PR、Her2 抗体为康为世纪生物科技有限公司产品, 二抗是 Lab Vision 公司产品。酶标仪购自 BIO-TEK 公司。倒置相差显微镜购自 Nikon 公司。

1.1.2 实验动物 非肥胖型糖尿病 / 重症联合免疫缺陷 (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency, NOD/SCID) 雌性小鼠 5 只, 6~8 周龄, 体重 18.5~19.6 g, 购自协和医科大学实验动物中心, 饲养于 SPF 环境中。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养条件 MCF-7 细胞用含体积分数为 10% 的胎牛血清、200 IU/L 人胰岛素、 1×10^5 U/L 青霉素和 1×10^5 U/L 链霉素的 MEM 培养基培养。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的混合气体培养箱中培养。细胞传代时用含质量浓度 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L 的 EDTA 进行消化。

1.2.2 生长曲线、倍增时间测定 分别收获对数生长中期、生长状态良好的 MCF-7-a、MCF-7-b 细胞, 以 1×10^3 个 / 孔接种于 96 孔板, CO₂ 培养箱中常规培养。采用 MTT 法, 酶标仪下分别测量 A₅₅₀, 绘制细胞生长曲线, 根据 Patterson 公式计算细胞在对数期的倍增时间 (T_d), $T_d = T \lg 2 / \lg (N_t / N_0)$ 。T 为对数增殖期时间, N_t 为对数增殖期结束时的细胞数, N₀ 为对数增殖期开始时的细胞数。

1.2.3 MCF-7 细胞体内培养 MCF-7 细胞接种前 2 天在 NOD/SCID 小鼠皮下埋雌二醇缓释片。将每

收稿日期: 2009-09-07 接受日期: 2010-01-11

国家自然科学基金资助项目 (No.30772867)

* 通讯作者。Tel: 010-88001192, E-mail: drlinhongsheng@163.com

只小鼠欲接种量的细胞重悬于 100 μ l 的 MEM 和 Matrigel (1:1) 混合液中, 接种于小鼠双侧乳脂垫下。每周 2 次, 测量肿瘤最大直径与垂直径, 观察小鼠体重。当肿瘤体积超过 3 000 mm^3 后脱颈处死全部小鼠, 取肿瘤组织。小鼠肿瘤体积按以下公式计算: $V=ab^2/2$ (a 为最长径, b 为 a 的垂直径)。

1.2.4 免疫组化分析 肿瘤标本用 4% 多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、组织切片; 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴修复 30 min; 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 蒸馏水新鲜配置 3% 双氧水, 室温 10 min 灭活内源性酶; 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加适当稀释的一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 滴加二抗, 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色, 苏木素轻度复染。脱水, 透明, 封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照, 已知阳性片作为阳性对照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件作 t 检验分析 P 值。

2 结果

2.1 两株 MCF-7 细胞的形态学分析

两株 MCF-7 细胞在光镜下形态差异明显。MCF-7-a 细胞大小不一, 有少数极大细胞, 细胞有成团生长的趋势; MCF-7-b 细胞单一、一致, 偶见较大细胞(图 1)。

2.2 两株 MCF-7 细胞的生长情况

细胞生长曲线显示, MCF-7-a 细胞株的生长速度较 MCF-7-b 细胞株慢(图 2)。根据 Patterson 公式计算细胞在对数期的倍增时间, 结果显示 MCF-7-a 细胞系的 T_d 为 (53.12 ± 4.64) h, 而 MCF-7-b 细胞系的 T_d 为 (25.32 ± 3.52) h, 表明 MCF-7-a 细胞系的对数期倍增时间明显较 MCF-7-b 细胞系长 ($P < 0.01$)。

2.3 两株 MCF-7 细胞异种移植成瘤的情况

NOD/SCID 小鼠胸部的双侧乳脂垫分别接种 MCF-7 细胞, 左侧接种 MCF-7-a 细胞, 右侧接种 MCF-7-b 细胞。MCF-7-a 细胞异种移植后成瘤的速度明显较 MCF-7-b 慢(图 3、图 4)。

2.4 瘤体的免疫组化分析

ER α 、PR 阳性表达位于细胞核, 以肿瘤细胞核出现棕色或棕黄色颗粒者为阳性细胞; Her2 阳性表达位于细胞膜, 以肿瘤细胞膜出现棕色或棕黄色颗粒者为阳性细胞。着色阳性细胞数 $> 10\%$ 为阳性。无阳性着色或着色颗粒细微浅黄, 阳性细胞数 $< 10\%$ 为阴性。结果显示 ER α 在 MCF-7-b 细胞株中丢失, Her2 在 MCF-7-a、MCF-7-b 细胞株中均丢失(表 1、图 5)。

3 讨论

本文研究的 MCF-7 是一株典型的 ER α 、PR、Her2 阳性的人乳腺癌细胞系, 在研究过程中我们发现两种不同来源的 MCF-7 细胞的形态、成瘤速度和成瘤大小均存在明显的差异, 随后针对瘤组织进行免疫组织化学的检测发现这两株细胞均丢失 Her2, 并且 MCF-7-b 细胞系丢失了 ER α 。其实, ER α 的表达本身并不稳定, 受很多因素的影响。Sommer 等^[1]研究发现 ER α 阳性乳腺癌在不断发展中逐渐演变为 ER α 阴性乳腺癌, 与基因微卫星不稳定、杂合性缺失、



Fig.1 Cell morphology (100 \times)
A: MCF-7-a cell line; B: MCF-7-b cell line.

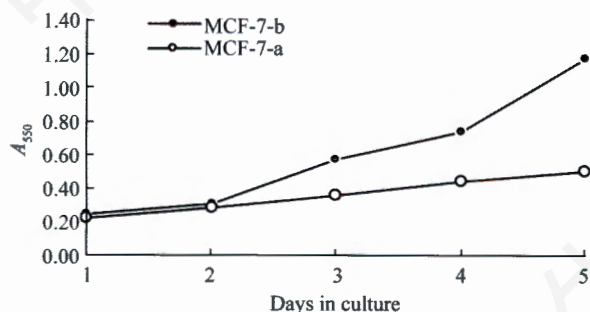


Fig.2 The proliferation of MCF-7-a and MCF-7-b cell lines

突变有关。随后 Stoner 等^[2]发现在低氧或肿瘤早期无新生血管形成阶段时 ER α 蛋白酶前体出现降解, ER α 表达降低。Hamelers 等^[3]提及不同实验室来源的 MCF-7 细胞系对雌激素具有不同的反应。这就提示我们不同实验室来源的 MCF-7 细胞系的雌激素受

体含量可能有差异。这正与我们的研究结果类似, 但是究竟是什么原因促使 ER α 表达的改变呢? 进一步的深入研究发现 MCF-7 细胞系是从乳腺癌患者的



Fig.3 Bilateral subcutaneous tumors derived from MCF-7-a and MCF-7-b cell lines

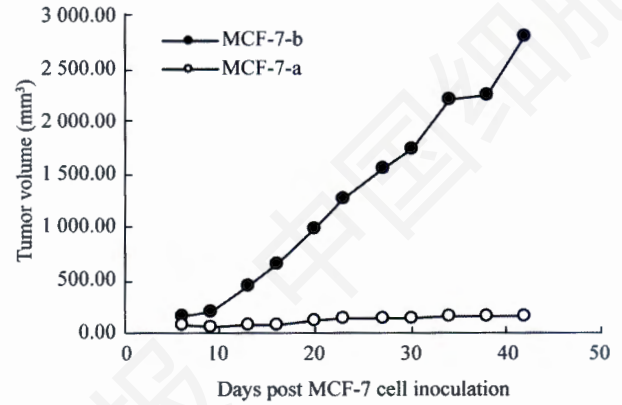


Fig.4 Tumor volumes derived from MCF-7-a and MCF-7-b cell lines

Table 1 The expression of ER α , PR, Her2 from MCF-7-a and MCF-7-b cell lines

Receptors	MCF-7-a	MCF-7-b
ER α	(+)	(-)
PR	(+)	(+)
Her2	(-)	(-)

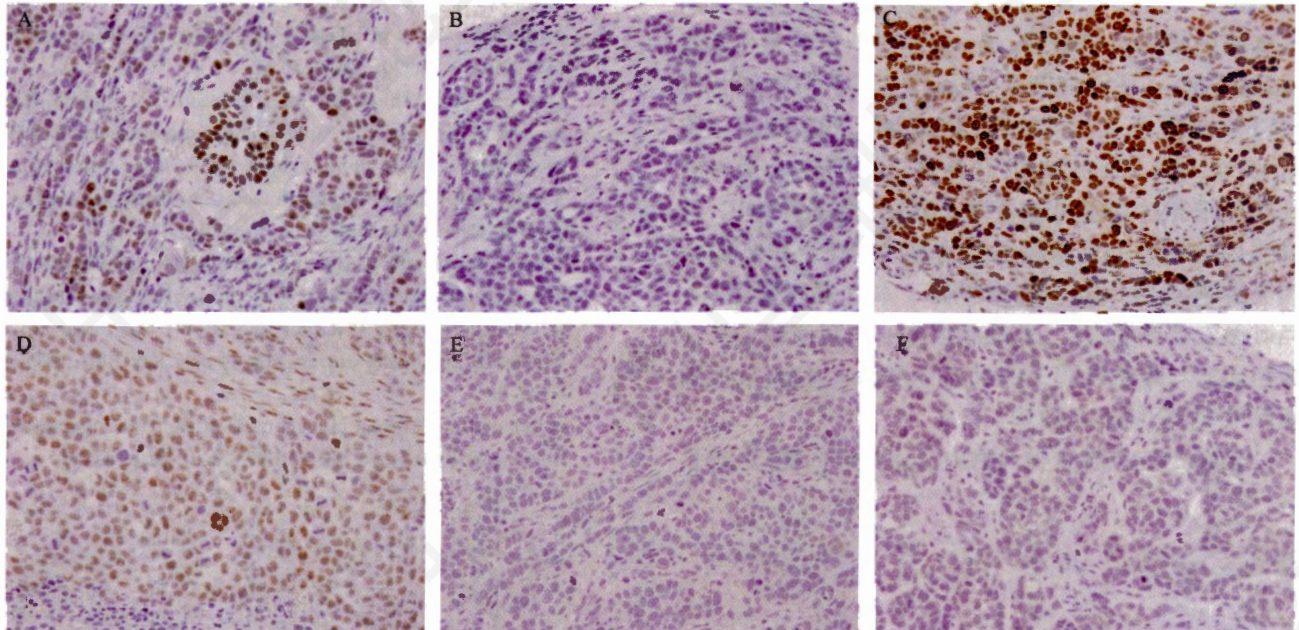


Fig.5 The result of immunohistochemistry (400 \times)

A: ER α expression of tumors derived from MCF-7-a cell line; B: ER α expression of tumors derived from MCF-7-b cell line; C: PR expression of tumors derived from MCF-7-a cell line; D: PR expression of tumors derived from MCF-7-b cell line; E: Her2 expression of tumors derived from MCF-7-a cell line; F: Her2 expression of tumors derived from MCF-7-b cell line.

胸腔积液中分离建立的^[4], 该细胞系含有 6 个亚群的细胞, 并且将这些亚群分离后分别进行体外培养, 发现这些亚群的细胞生长速度差异较大^[5]。目前, 美国菌种保藏中心(American type culture collection, ATCC)的细胞系被公认为是标准的细胞系, 我们研究所用的 MCF-7-a 细胞系是中国科学院上海细胞库直接从 ATCC 购买后冻存的, 其形态与 ATCC 网站公布的细胞形态基本一致, 并且其细胞大小和形状差异很大, 可见该细胞系含有很多异质性的乳腺癌细胞。另一株 MCF-7-b 细胞系最初来源于美国约翰霍普金斯大学免疫实验室, 该细胞系的细胞较单一、一致。虽然 MCF-7-a 细胞株从 ATCC 购买后仅传了几代, 却也出现了 Her2 的丢失。我们推断经过短期的体外培养后, 因为该细胞系含有很多异质性的细胞, 本身低表达 Her2 的细胞被淘汰^[6]; 而经过长期的体外培养传代后, ER α 阳性的细胞逐渐被淘汰。

本文的研究结果显示 MCF-7-b 细胞系丢失了 ER α 后其体内外的增殖速度均变慢, 这似乎与目前雌激素能刺激肿瘤细胞增殖的理论相违背。我们查阅文献后发现在乳腺癌中激活胰岛素样生长因子 I 受体(insulin-like growth factor-I receptor, IGF-IR)/胰岛素受体底物 -I (insulin receptor substrate-I, IRS-I) 通路能促进细胞增殖、侵袭和转移。ER α 对 IGF-IR 有正向调控作用, 而且 ER α 状态和 IGF-IR 状态呈正相关, 两者常共同表达^[7]。并且此通路 with ER α 阳性的乳腺癌细胞系密切相关。Bartucci 等^[8]发现体外激活 IGF-IR/IRS-I 通路能刺激 ER α 阳性的乳腺癌细胞系 MCF-7 的增殖, 而不能刺激 ER α 阴性的乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的增殖, 该研究证实了 ER α 阴性的乳腺癌细胞的增殖可能依赖于其它通路的作用。这说明 ER α 阴性的乳腺癌细胞的增殖不同于 ER α 阳性的乳腺癌细胞, 这个结论解释了本文的研究结果。当雌激素受体丢失后, 乳腺癌细胞的增殖依赖于其它通路而非与雌激素相关的 IGF-IR/IRS-I 通路, 从而出现细胞的增殖速度加快。

ER α 是抗雌激素类药物内分泌治疗的靶点, 也是

预后的重要指标^[9]。ER α 阳性的乳腺癌细胞株 MCF-7 被广泛地应用于乳腺癌的研究中。我们发现此细胞株的 ER α 受体在体外培养后会丢失, 并且生物学行为也发生了变化。因此, 今后针对 ER α 阳性的乳腺癌细胞系 MCF-7 的研究, 应注意细胞增殖的速度以及 ER α 表达的情况, 以便将其更好地应用于 ER α 的研究。

参考文献(References)

- 1 Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001; 11(5): 339-52.
- 2 Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor α in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16(10): 2231-42.
- 3 Hamelers IH, Van Schaik RF, Sussenbach JS, Steenbergh PH. 17 β -Estradiol responsiveness of MCF-7 laboratory strains is dependent on an autocrine signal activating the IGF type I receptor. *Cancer Cell Int* 2003; 3(1): 10.
- 4 Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5): 1409-16.
- 5 Resnicoff M, Medrano EE, Podhajcer OL, Bravo AI, Bover L, Mordoh J. Subpopulations of MCF7 cells separated by Percoll gradient centrifugation: a model to analyze the heterogeneity of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(20): 7295-9.
- 6 Bacus SS, Kiguchi K, Chin D, King CR, Huberman E. Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen. *Mol Carcinog* 1990; 3(6): 350-62.
- 7 Oesterreich S, Zhang P, Guler RL, Sun XH, Curran EM, Welshons WV, *et al.* Re-expression of estrogen receptor alpha in estrogen receptor alpha-negative MCF-7 cells restores both estrogen and insulin-like growth factor-mediated signaling and growth. *Cancer Res* 2001; 61 (15): 5771-7.
- 8 Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando S, Surmacz E. Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(18): 6747-54.
- 9 Kurebayashi J. Current clinical trials of endocrine therapy for breast cancer. *Breast Cancer* 2007; 14(2): 200-14.

Differences of Proliferation Rate and ER α Expression between MCF-7 Cell Lines from Different Labs

Wei-Ru Xu^{1,2}, Hong-Sheng Lin^{2*}, Xin-Yi Chen¹, Ying Zhang²

(¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ²Oncology Department, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract There were obvious differences between two MCF-7 cell lines from different labs on the morphology and growth rate *in vitro*. The xenotransplantation of two MCF-7 cell lines into NOD/SCID mice were studied. The immunohistochemistry was investigated on the tumors, which showed the loss of human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) in two cell lines, and the loss of estrogen receptor α (ER α) in one cell line. The results suggested that the increase of cell proliferation rate might be correlated with the loss of ER α in MCF-7 cell line.

Key words breast cancer; MCF-7 cell line; estrogen receptor

Received: September 7, 2009 Accepted: January 11, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772867)

*Corresponding author. Tel: 86-10-88001192, E-mail: drlinhongsheng@163.com