

### 【基础研究】

作者简介:薛会朝(1971-),男,河南滑县人,硕士,副主任医师,研究方向:乳腺疾病基础与临床。

nificant difference in the proportion of  $SR^{-}HER-2^{+}$  phenotype between breast cancer stem cells and their differentiated cells ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The positive expression of ER, PR and HER-2 was lower in breast cancer stem cells. With the differentiation of breast cancer stem cells, the positive expression of ER, PR and HER-2 increase gradually.

**Key words:** breast cancer; tumor stem cells; estrogen receptor; progesterone receptor; human epidermal growth factor receptor 2

乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,目前发病率高居女性恶性肿瘤首位。乳腺癌的治疗原则是以手术为主的个体化综合治疗。但是,化学治疗后部分患者仍然会出现复发及转移,这可能是由于患者体内存在肿瘤干细胞<sup>[1]</sup>,直接影响个体化综合治疗的效果<sup>[2]</sup>。雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)是乳腺癌术后常见的检测指标<sup>[3]</sup>。通过对 ER、PR 和 HER-2 的检测,可以及时了解治疗效果,实施进一步的针对性治疗<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨 ER、PR 和 HER-2 在乳腺癌干细胞及其分化细胞中的表达及意义,以期对乳腺癌的治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 选取 2016 年 1 月至 2016 年 10 月新乡医学院第一附属医院标本室保存的新鲜乳腺癌标本 35 例,患者均为女性,年龄 30 ~ 80 岁,平均  $(51.25 \pm 10.12)$  岁;所有患者术后经病理诊断确诊为乳腺浸润性导管癌,且术前未接受放射治疗、化学治疗和内分泌治疗。本研究相关方案均提交医学伦理部门审核批准,符合相关伦理学要求;所有患者均对研究情况知情,并签署同意书。

**1.2 试剂与仪器** 胎牛血清(上海麦仓生物科技有限公司),胶原酶 III(上海乔源生物制药有限公司),胶原酶 I(南京奥多福尼生物科技有限公司),多聚赖氨酸(上海逸哈生物科技有限公司),甲醇(北京美科美生物技术开发有限公司),Anti-Biotin MicroBeads(上海浩然生物技术有限公司),兔抗人 ER、PR、HER-2 抗体(美旋生物上海科研试剂有限公司);CR-21G 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司),光学显微镜(北京诺博莱德科技有限公司),MACS 分选系统(北京伯乐良成科技有限公司)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 单细胞悬液制备** 取适量乳腺癌组织,剪碎后用含胎牛血清的胶原酶 III 进行消化 6 h,过滤,多次离心进行细胞纯化。将细胞接种至经胶原酶 I 预处理的培养瓶中,观察细胞生长情况,对贴壁细胞进行收集和消化,制备单细胞悬液<sup>[5]</sup>,备用。

**1.3.2 细胞分选** 利用免疫磁珠分选法<sup>[6]</sup>进行细胞分选,分选出乳腺癌干细胞( $CD44^{+}CD24^{-}/low$  细胞)和分化细胞( $CD44^{-}CD24^{-}$  细胞)。取细胞悬液,进行细胞重悬后添加 10  $\mu$ L  $CD24^{-}$  Biotin,充分混合均匀之后进行孵育。孵育 15 min 后添加 20  $\mu$ L Anti-Biotin MicroBeads,充分混合均匀之后进行孵育。孵育 15 min 后进行离心,利用 MACS 分选系统获得  $CD24^{-}/low$  细胞,并按照上述相同的步骤进行分选,最终获得  $CD44^{+}CD24^{-}/low$  细胞。按照相同的方法分选出  $CD44^{-}CD24^{-}$  细胞。

**1.3.3 Envision 二步法检测乳腺癌干细胞及其分化细胞中 ER、PR 和 HER-2 表达** 利用 Envision 二步法<sup>[7]</sup>对乳腺癌干细胞及其分化细胞中 ER、PR、HER-2 表达进行检测。取上述 2 种细胞,制备单细胞悬液,调整细胞浓度,滴加在多聚赖氨酸包被的载玻片上,甲醇固定后进行冰浴、血清封闭,添加兔抗人 ER、PR、HER-2 工作液,置于 4  $^{\circ}$ C 环境下进行反应。过夜后,以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,以已知阳性切片作为阳性对照,孵育后置于显微镜下进行观察。ER、PR 和 HER-2 阳性细胞判断标准为细胞核呈现棕褐色或棕黄色颗粒,阳性细胞率  $\leq 10\%$  为阴性,  $> 10\%$  为阳性。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。计数资料以 Fisher 确切概率法进行检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 乳腺癌干细胞及其分化细胞中 ER、PR 和 HER-2 表达比较** 结果见表 1、图 1。同一患者的

乳腺癌干细胞与分化细胞的 ER、PR、HER-2 表达呈现出 3 种情况:(1)乳腺癌干细胞阴性表达,分化细胞阳性表达;(2)乳腺癌干细胞阳性表达,分化细胞

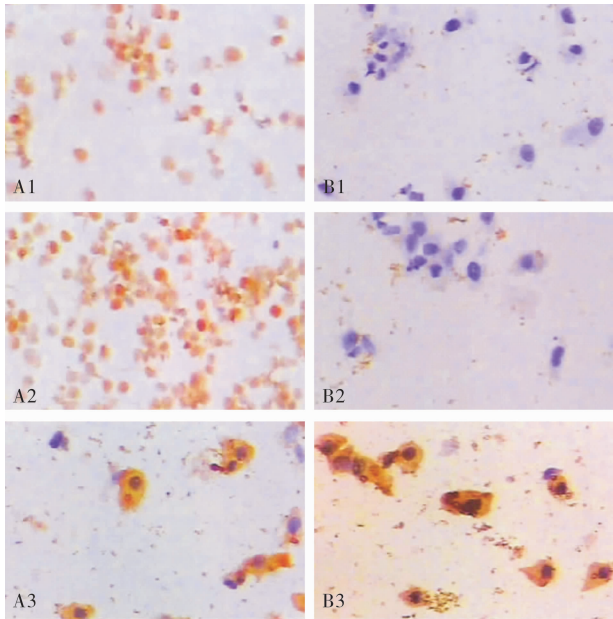
阳性表达;(3)乳腺癌干细胞阴性表达,分化细胞阴性表达。分化细胞中 ER、PR 及 HER-2 阳性表达率显著高于乳腺癌干细胞( $P < 0.05$ )。

表 1 乳腺癌干细胞和其分化细胞中 ER、PR 及 HER-2 表达比较

Tab. 1 Comparison of the expressions of ER,PR and HER-2 in breast cancer stem cells and their differentiated cells

细胞类型	n	ER		PR		HER-2	
		阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)	阴性/例(%)	阳性/例(%)
乳腺癌干细胞	35	29(82.86)	6(17.14)	26(74.29)	9(25.71)	29(82.86)	6(17.14)
分化细胞	35	17(48.57)	18(51.43) <sup>a</sup>	8(22.86)	27(77.14) <sup>a</sup>	17(48.57)	18(51.43) <sup>a</sup>

注:与乳腺癌干细胞比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。



A1 ~ A3 分别为分化细胞中 ER、PR 和 HER-2 表达;B1 ~ B3 分别为乳腺癌干细胞中 ER、PR 和 HER-2 表达。

图 1 乳腺癌干细胞及其分化细胞中 ER、PR 和 HER-2 表达 (Envision 二步法染色, ×200)

Fig. 1 Expressions of ER,PR and HER-2 in breast cancer stem cells and their differentiated cells (Envision two-step staining, ×200)

2.2 乳腺癌干细胞及其分化细胞表型分类 结果见表 2。乳腺癌干细胞及其分化细胞共有 4 种表型,分别为  $SR^+HER-2^-$ 、 $SR^+HER-2^+$ 、 $SR^-HER-2^+$  和  $SR^-HER-2^-$ ,其中,SR 表示 ER 和(或)PR。乳腺癌干细胞的  $SR^-HER-2^-$  表型比例最大,分化细胞的  $SR^+HER-2^-$  表型比例最大;分化细胞的  $SR^+HER-2^-$ 、 $SR^+HER-2^+$  表型比例显著高于乳腺癌干细胞( $P < 0.05$ ),分化细胞的  $SR^-HER-2^-$  表型比例显著低于乳腺癌干细胞( $P < 0.05$ ),但分化细胞与乳腺癌干细胞的  $SR^-HER-2^+$  表型比例比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 乳腺癌干细胞及其分化细胞表型比较

Tab. 2 Comparison of the phenotypes of breast cancer stem cells and their differentiated cells

细胞类型	n	$SR^+HER-2^-$	$SR^+HER-2^+$	$SR^-HER-2^+$	$SR^-HER-2^-$
		例(%)	例(%)	例(%)	例(%)
乳腺癌干细胞	35	6(17.14)	3(8.57)	4(11.43)	22(62.86)
分化细胞	35	15(42.86) <sup>a</sup>	11(31.43) <sup>a</sup>	5(14.29)	4(11.42) <sup>a</sup>

注:与乳腺癌干细胞比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

干细胞过度增殖及病变会引发肿瘤<sup>[8]</sup>,乳腺干细胞的病变极有可能是乳腺癌发生以及复发转移等的重要原因之一。现有的癌症药物可有效杀死成熟乳腺癌细胞,但有极少数未成熟的乳腺癌干细胞能抵抗此类药物,它们负责肿瘤的生长和发展。

作为一种激素依赖性肿瘤,乳腺癌患者临床治疗过程中,ER 和(或)PR 阳性等患者内分泌治疗得到了广泛的应用。肿瘤干细胞与肿瘤的复发、转移等密切相关,而以往越来越多的研究证实,乳腺癌干细胞与靶向内分泌治疗之间存在密切的联系<sup>[9-10]</sup>。由此推断,在乳腺癌干细胞中可能存在一定的特殊细胞表型,与其他细胞激素受体之间存在较大的差异,影响到分子靶向治疗的效果<sup>[11]</sup>。GINESTIER 等<sup>[12]</sup>研究报道,在肿瘤出现复发转移时,相应的复发转移灶在分子表达方面也会出现一定的变化,其中,ER 阳性率会下降,HER-2 阳性率则会明显上升。上述结果表明,在出现复发转移的肿瘤中,如果肿瘤细胞亚群具有特殊表型,则具有一定的生长优势。SIMOES 等<sup>[13]</sup>制备  $ER^+/PR^+$  乳腺癌裸鼠模型,并获得  $ER^-/PR^-/CD44^+/CK5^+$  细胞亚型,经检测发现,该细胞亚型与乳腺干细胞存在一些共同的属

性。邵军等<sup>[14]</sup>研究发现,与乳腺癌原发灶进行比较,乳腺癌复发转移灶中的 ER 阳性率会出现明显降低,并认为出现这一现象的原因是原发灶中存在一些具有特殊表型的乳腺癌干细胞,相应的干细胞具有一定的自我更新以及耐药性,可以发生增殖,并逐渐形成转移瘤。本研究发现,同一患者的乳腺癌干细胞与分化细胞的 ER、PR、HER-2 表达呈现出 3 种情况:(1)乳腺癌干细胞阴性表达,分化细胞阳性表达;(2)乳腺癌干细胞阳性表达,分化细胞阳性表达;(3)乳腺癌干细胞阴性表达,分化细胞阴性表达。结果表明,乳腺癌干细胞和分化细胞中 ER、PR、HER-2 可以呈现出不同的表达。本研究结果还显示,分化细胞中 ER、PR 及 HER-2 阳性表达率显著高于乳腺癌干细胞;这可能是导致 HER-2 阳性患者在接受初次治疗之后出现复发的原因之一<sup>[15]</sup>。本研究发现,乳腺癌干细胞 SR<sup>-</sup>HER-2<sup>-</sup>表型比例最大,分化细胞 SR<sup>+</sup>HER-2<sup>-</sup>表型比例最大;分化细胞的 SR<sup>+</sup>HER-2<sup>-</sup>、SR<sup>+</sup>HER-2<sup>+</sup>表型比例显著高于乳腺癌干细胞,分化细胞的 SR<sup>-</sup>HER-2<sup>-</sup>表型比例显著低于乳腺癌干细胞,但分化细胞与乳腺癌干细胞的 SR<sup>-</sup>HER-2<sup>+</sup>表型比例比较差异无统计学意义;表明在乳腺癌干细胞中存在不同的分子亚型,且与 ER<sup>-</sup>、PR<sup>-</sup>、HER-2<sup>-</sup>表型密切相关。因此,在临床对乳腺癌患者进行内分泌治疗时,可结合不同的细胞表型进行针对性治疗,以提高治疗效果<sup>[16-17]</sup>。

综上所述,乳腺癌干细胞中 ER、PR 及 HER-2 阳性表达率显著低于分化细胞,随着乳腺癌干细胞的不断分化,阳性表达逐渐增加;乳腺癌干细胞的细胞表型大多为 ER<sup>-</sup>、PR<sup>-</sup>、HER-2<sup>-</sup>,可能是导致临床内分泌治疗效果不佳的重要原因。

参考文献:

[1] MORIMOTO K,KIM S J,TANEI T,et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor,positive human epidermal growth factor receptor type 2,and high Ki67 expression[J]. *Cancer Sci*,2009,100(6):1062-1068.

[2] 王慧,康欣梅. 乳腺癌干细胞标志物及乳腺癌干细胞治疗策略[J]. 新乡医学院学报,2015,32(10):964-967.

[3] 王立斌,何亚琴,吴立刚,等. 人乳腺肿瘤干细胞分离培养及鉴

定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2012,28(12):1261-1264.

[4] 张慧明,葛智成,王子函,等. 单一激素受体阳性浸润性 Luminal A 亚型乳腺癌的临床分析[J]. 临床和实验医学杂志,2014,13(5):343-346.

[5] 刘桂超,邬蒙. 三阴乳腺癌与激素受体阴性、HER-2 阳性乳腺癌的临床病理特征及预后对比分析[J]. 肿瘤预防与治疗,2010,23(1):32-35.

[6] ADAMCZYK A,NIEMIEC J A,AMBICKA A,et al. CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy[J]. *J Mol Histol*,2014,45(1):35-45.

[7] 王淑莲,李晔雄,宋永文,等. 激素受体和人表皮生长因子受体 2 的表达与改良根治术后淋巴结阳性乳腺癌患者预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2010,32(7):520-525.

[8] HASHIMOTO K,SHIMIZU C,TSUDA H,et al. Immunohistochemical detection of breast cancer stem cells in hormone receptor-positive breast cancer and their role in response to endocrine therapy and clinical outcome[J]. *Oncology*,2012,82(3):168-174.

[9] RHODES L V,MUIR S E,ELLIOTT S,et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence[J]. *Breast Cancer Res Treat*,2010,121(2):293-300.

[10] 刘珊,张巍,牛昀,等. 乳腺癌干细胞与激素调控的研究进展[J]. 中华医学杂志,2014,94(4):310-312.

[11] 刘珊,张巍,刘夏,等. 雄激素受体阳性乳腺癌干细胞的富集及其特性鉴定[J]. 中华实验外科杂志,2014,31(1):67-69.

[12] GINESTIER C,HUR M H,CHARAFE-JAUFFRET E,et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome[J]. *Stem Cells*,2007,15(5):555-567.

[13] SIMOES B M,VIVANCO M D. Cancer stem cells in the human-mammary gland and regulation of their differentiation by estrogen[J]. *Future Oncol*,2011,7(8):995-1006.

[14] 邵军,潘翠萍,王明伟,等. 乙醛脱氢酶 1 和雌激素受体在乳腺癌原发灶与复发转移灶之间的表达差异[J]. 解剖学报,2013,44(2):224-228.

[15] 玄东春,金文彪,崔海,等. Her-2 与 ALDH1 在乳腺癌中表达与相关性研究[J]. 现代仪器,2012,18(6):26-29.

[16] 杨国华,薛芳沁,陈晓耕,等. 不同分子分型乳腺癌干细胞 MDRI 表达的研究[J]. 南方医科大学学报,2012,32(11):1636-1638.

[17] 桑晶,孙勇,韩玉贞,等. 乳腺癌干细胞激素受体与 HER-2 表达生物学意义的分析[J]. 中华肿瘤防治杂志,2013,20(12):926-929.

( 本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)