

癌相关成纤维细胞离体培养中激活性状的研究

付志璇,朱玉萍,罗 奇,冯海洋,李德川
(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘 要: [目的] 研究离体培养的癌相关成纤维细胞(CAFs)能否保持激活性状。[方法] 免疫组织化学和免疫荧光法检测乳腺癌及正常乳腺组织成纤维细胞激活标志物平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达情况。利用免疫细胞化学检测体外培养 CAFs 及正常乳腺组织来源成纤维细胞内 α -SMA 表达状态;Western blot 检测 CAFs 和正常乳腺组织来源的成纤维细胞的 α -SMA 和 PDGFR 代次表达情况。[结果] 乳腺癌组织内 CAFs 呈 α -SMA 广泛表达。然而免疫荧光检测显示只有部分 CAFs 呈 α -SMA 阳性表达。体外培养的 CAFs 免疫细胞化学检测显示只有部分细胞呈 α -SMA 阳性表达。Western blot 检测显示一定代次后 CAFs 仍能保持 PDGFR 和 α -SMA 的表达。[结论] CAFs 是异质性细胞群;CAFs 体外有限传代后仍能维持激活性状。

关键词: 乳腺肿瘤;癌相关成纤维细胞;平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)03-0195-06
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.03.B007

The Study on the Activated State of Cancer-associated Fibroblasts Cultured *in vitro*

FU Zhi-xuan, ZHU Yu-ping, LUO Qi, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate whether the activated state of cancer-associated fibroblasts (CAFs) cultured *in vitro* could be kept. [Methods] Fibroblasts activated marker α -SMA in breast cancer and normal tissues were detected by immunohistochemical staining (IHC) and immunofluorescent assay (IF). α -SMA in primary cultured CAFs and fibroblasts derived from normal breast tissue(NF) were detected by immunocytochemistry (ICC). α -SMA and PDGFR in CAFs and NF at different passages were detected by Western blot. [Results] α -SMA was widely expressed in CAFs in breast cancer tissue. However, IF showed merely partial fibroblasts in cancer mesenchymal tissue expressing α -SMA. ICC performed in cultured CAFs also demonstrated partial cells expressing α -SMA. Western blot assay for α -SMA and PDGFR showed CAFs were able to keep the both activated markers after 6 passages. [Conclusion] CAFs have the heterogeneity of cells. And CAFs are able to keep their activated state after several passages *in vitro*.

Subject words: breast neoplasms; cancer-associated fibroblasts; smooth muscle actin(SMA)

成纤维细胞(fibroblast)是疏松结缔组织内的主要细胞,分泌前胶原、纤连蛋白等细胞外基质和多种蛋白酶类,参与组织支架结构构建、维持组织细胞外基质的动态平衡^[1]。在创伤愈合过程中,成纤维细胞因局部损伤因子的刺激,出现快速增殖或从周边向创伤处迅速迁移,并被创伤炎症因子激活,转变成肌

纤维母细胞(myofibroblasts, MFs)^[2,3]。激活的成纤维细胞分泌大量的胶原等细胞外基质成分,并与新生毛细血管等共同形成肉芽组织,填补伤口组织缺损,为表皮细胞爬行与生长创造支架条件。在创伤修复完成之后因炎症激活条件等因素的消失,激活的成纤维细胞发生凋亡或游走消失^[3]。

研究发现,癌组织内也出现大量激活的成纤维细胞——癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)^[4,5]。这些 CAFs 与创伤愈合组织内激活的成纤维细胞类似,能分泌大量细胞外基质成

基金项目:国家自然科学基金(81372210);浙江省医药卫生科技计划(2011KYB023)

通讯作者:李德川,主任,主任医师,硕士;浙江省肿瘤医院大肠外科,浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路38号(310022);E-mail: lide@zjcc.org.cn

收稿日期: 2014-09-09; **修回日期:** 2014-10-26

分,持续表达平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、PDGFR。这些 α -SMA 阳性成纤维细胞(即类似 MFs)具有收缩能力;分泌旺盛可造成大量细胞外基质的沉积^[6]。因此这些 CAFs 可能与组织挛缩及质地变硬有关^[2,3,7]。然而一些研究发现,CAF 不会出现类似于创伤修复后的激活成纤维细胞凋亡清除事件。更有研究指出,CAF 的激活状态非可逆^[8]。有研究者据此称实体恶性肿瘤是一种“无法愈合的创伤”。而有研究表明 CAFs 能强烈地刺激肿瘤细胞的生长与转移^[9,10]。因此,众多的 CAFs 研究,不得不考虑体外培养的 CAFs 其激活性状能否维持。本研究试图研究乳腺癌组织内 CAFs 是否呈激活性状,并对体外培养的细胞进行检测研究。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠抗人 α -SMA、兔抗人 Vimentin、兔抗人 CK(pan) 抗体及 DAB 均购自迈新生物公司;GAPDH、PDGFR- α 购自 Epitomic;抗鼠抗兔荧光二抗购自联科生物公司。FGF-basic:PEPROTECH 公司。DMEM/F12、青链霉素:GIBCO 公司;胎牛血清:Hyclone 公司。两性霉素 B:Sigma 公司。RIPA:碧云天公司;激光共聚焦:Olympus 公司。普通光镜:上海六一公司;电泳仪:BioRad 公司。

1.2 免疫组织化学染色

取乳腺癌和正常乳腺/纤维腺瘤组织,经环保固定液固定、石蜡包埋及病理组织切片。之后用鼠抗人 α -SMA,兔抗人 Vimentin 检查组织内 α -SMA 阳性成纤维细胞。DAB 显色或用荧光二抗显影,并用普通光镜成像或激光共聚焦成像。

1.3 原代细胞培养

取术前病理确诊为浸润性乳腺癌的新鲜手术标本,在无菌条件下取大小约为 0.3cm×0.3cm×0.2cm 肿瘤组织和癌旁乳腺组织(旁开 3cm 以上)。将组织剪成细碎小块,加普通成纤维细胞培养液进行培养。培养条件:37℃,5%CO₂,饱和湿度。培养液:高糖型 DMEM/F12+10%胎牛血清+5ng/ml FGF-basic+100U/ml 青链霉素+10ng/ml 两性霉素 B。1 周后弃去残余组织块,获得贴壁细胞。经 4 代以上传代,分别获得 CAFs 和正常组织来源的成纤维细胞(NF)。

1.4 免疫细胞化学或免疫荧光

将培养所得的 CAFs 与 NF 接种于圆形盖玻片上,用环保固定液固定,分别用鼠抗人 α -SMA、兔抗人 Vimentin、兔抗人 CK(pan)一抗检测细胞的表达情况。用 DAB 法显色,或用抗鼠抗兔荧光二抗显影。光镜成像或激光共聚焦成像。

1.5 细胞蛋白 Western blot

收集 6~8 传代的 CAFs 与 NF 细胞蛋白(RIPA 裂解),以相同蛋白质量上样量进行电泳转膜。用鼠抗人 α -SMA 一抗检测 α -SMA 表达情况。内参选用 GAPDH。

1.6 图像分析与统计分析

免疫组织和免疫细胞化学图用 IPP6.0 分析与处理,Western blot 结果用 Image J 分析。

2 结果

2.1 癌组织内 CAFs 表达 α -SMA 情况

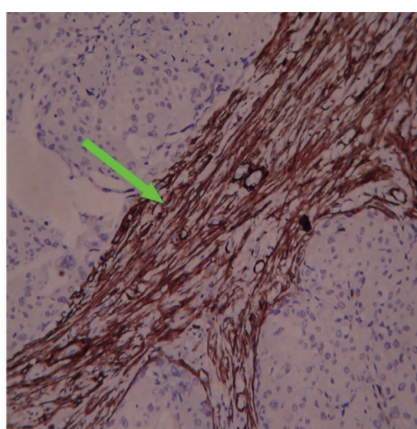
用鼠抗人 α -SMA 一抗对乳腺癌组织、正常乳腺组织进行免疫组织化学染色,可以看到,在癌组织间质内存在大量的 α -SMA 阳性间质成纤维细胞存在(即 CAFs)。而在正常乳腺组织内,只有腺泡和/或导管周围的肌上皮细胞呈现 α -SMA 表达,正常组织间质成纤维细胞无 α -SMA 表达(Figure 1A,B)。组织免疫荧光双标检测更精确地显示,只有癌间质或癌周边的成纤维细胞呈现 α -SMA 与 Vimentin 共表达。而在纤维腺瘤(正常)组织的成纤维细胞中无 α -SMA。腺泡和导管肌上皮虽有 α -SMA 表达,但无 Vimentin 表达,此类细胞为肌上皮细胞(Figure 1D)。

2.2 免疫细胞化学检测 CAFs 中 α -SMA 表达情况

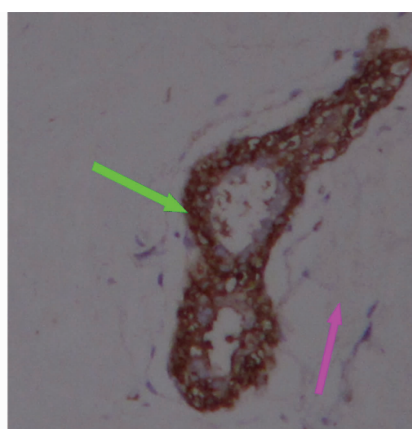
体外培养的 CAFs 与 NF 经免疫细胞化学检测,结果表明,所有 NF 与 CAFs 细胞均呈 Vimentin 阳性表达,且细胞呈长梭形,证明两类细胞均为间充质成纤维细胞。经过体外培养和传代的 CAFs 可见有部分细胞呈现 α -SMA 阳性表达(Figure 2D),而 NF 内无此阳性细胞存在(Figure 2C)。两类细胞的 CK(pan) 阴性检测结果则排除细胞是上皮源性可能(Figure 2E,2F)。

2.3 Western blot 多次传代后的 CAFs、 α -SMA 表达

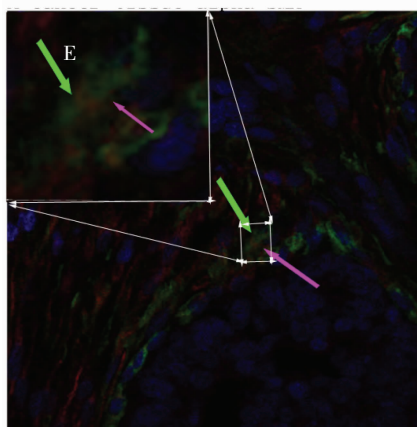
提取同源配对的 CAFs 与 NF 细胞内蛋白,经 Western blot 检测(Figure 3),发现 CAFs 在 6 次传代



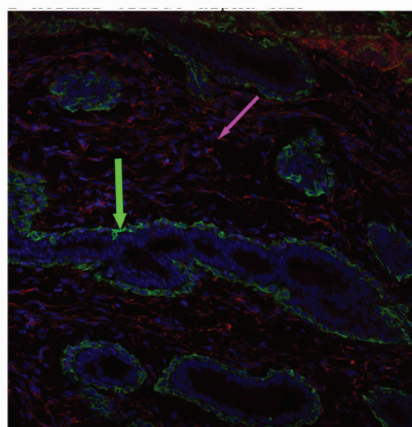
A: α-SMA expression in cancer tissue (×100)



B: α-SMA expression in normal tissue (×100)



C: α-SMA/Vimentin expressions in cancer tissue (×100)



D: α-SMA/Vimentin expressions in fibroadenoma (×200)

Note: A: α-SMA was strong expressed by fibroblasts in the mesenchyme of breast cancer (brown). B: α-SMA was only expressed in the myoepithelium around tube and acinus in normal breast tissue (brown). C: α-SMA (green) and Vimentin (red) were co-expressed in fibroblasts around cancer cell cluster. E was the local amplification of the rectangle area in C (double staining cells as the arrows pointed). D: In breast fibroadenoma, α-SMA(-), Vimentin(+) expression was found in mesenchymal fibroblasts, and α-SMA(+), Vimentin(-) was found in myoepithelium around acinus.

Figure 1 The IHC assay for the activated marker of fibroblasts

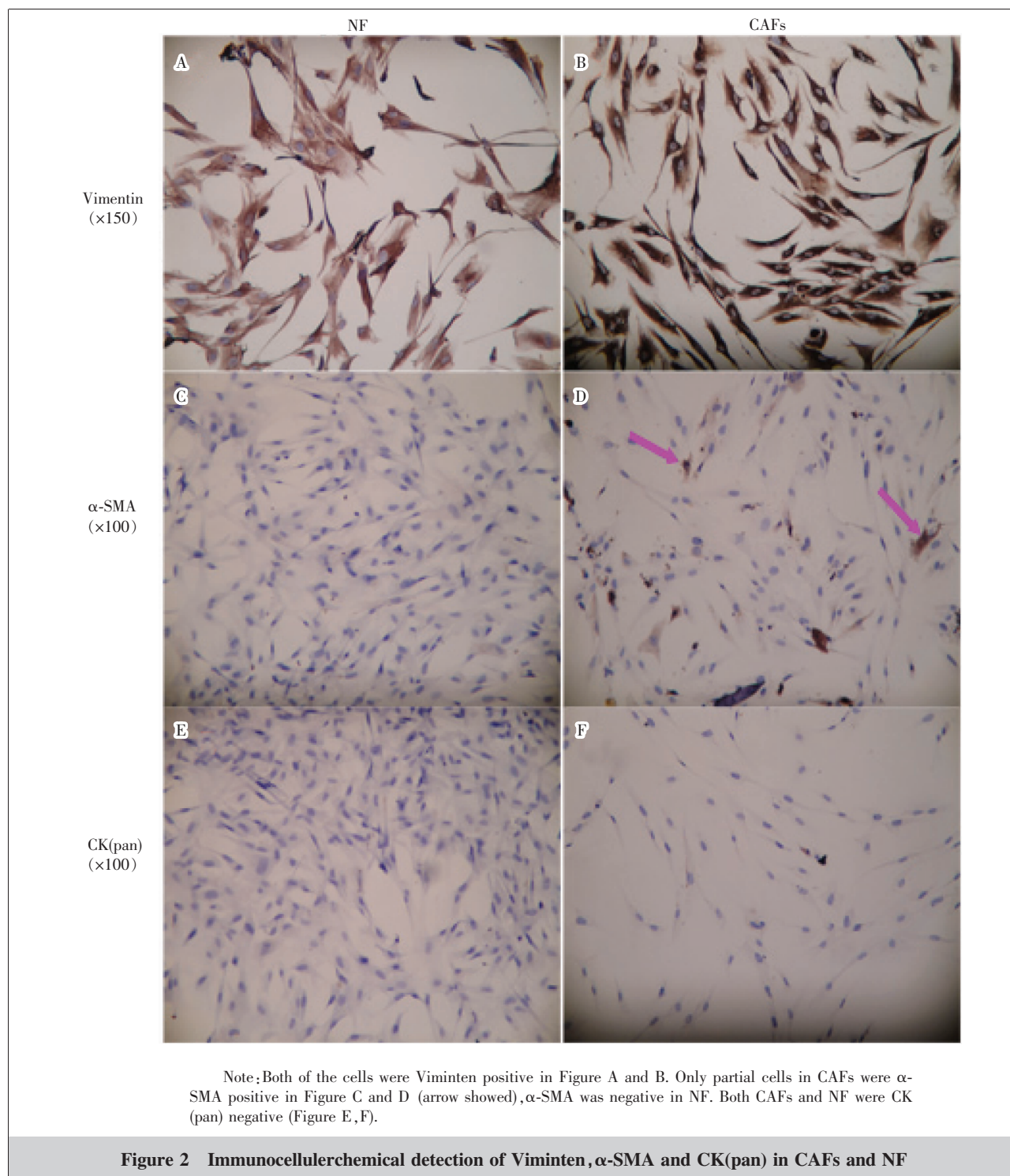
后仍呈 α-SMA 阳性反应,而癌旁组织来源的 NF 无 α-SMA 表达或有微弱的阳性反应。对于成纤维细胞另一激活标志物 PDGFR-α, 本研究未能发现 CAFs 与 NF 有明显的表达差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

在正常人体创伤愈合过程中, 静息的成纤维细胞被激活, 变成 MFs^[2]。MFs 获得收缩张力纤维, 表达 α-SMA 和 fibronectin 的剪接变体 ED-A (the extra domain a variant form of fibronectin), 形成缝隙连接的细胞间接触。这些改变赋予了 MFs 收缩功能, MFs 的收缩促使创伤缩小^[3]。加之激活的成纤维

细胞分泌大量的 ECM 填充于创伤残缺部位, 进一步加速创伤愈合。而当完成创伤修复后, 激活的成纤维细胞发生一种特殊类型的程序性死亡^[11]。当激活的成纤维细胞清除之后, 创伤修复组织渐趋稳定。

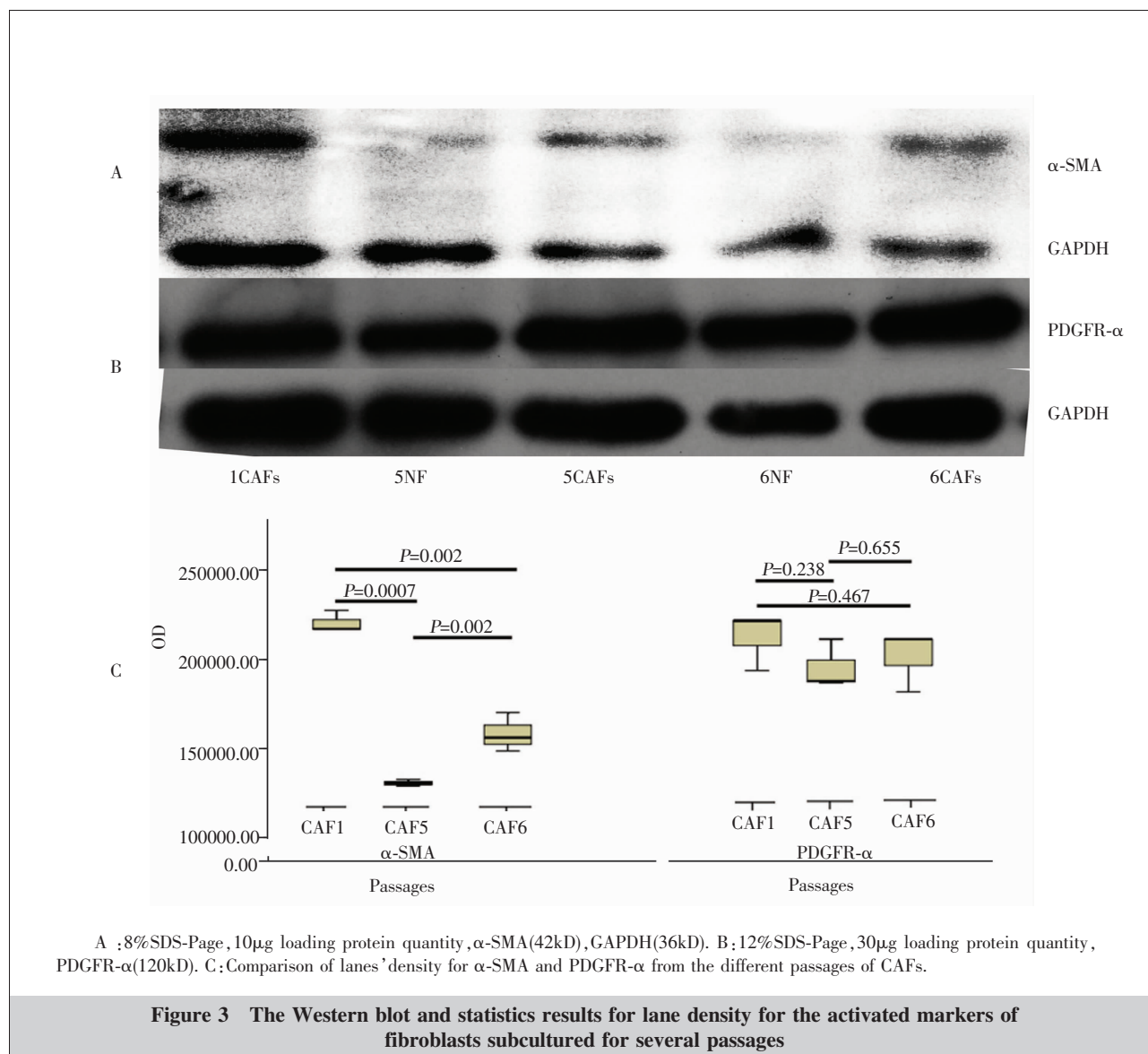
癌组织是由多类型细胞及细胞外基质所组成的不断变化的组织结构。癌组织在肿瘤逐渐发展演化过程中, 形成了自己独特的组织微环境, 即肿瘤微环境^[12]。在此微环境内, 各种细胞及细胞外基质结构都受到来自微环境内的细胞和其分泌物的影响。因肿瘤细胞增殖与运动、间质细胞的作用, 肿瘤组织总是处于不断变化之中。CAFs 是许多恶性肿瘤间质内最主要的细胞类型, 在乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌尤为突出^[13]。恶性肿瘤间质内处于激活状态的 CAFs 与



创伤愈合组织中的 MFs 有一定的相似性, 包括 α -SMA 和 ED-A 的表达、运动与收缩功能。但二者最大的差异是 CAFs 的存活时间, CAFs 不会因凋亡清除, 它们的激活表型也不可逆转。一些研究发现在不同的恶性肿瘤间质中成纤维细胞有几个亚群。这些

亚群享有其在激活状态的一些共有的激活标志 α -SMA、FSP1、PDGFR、FAP 等^[14]。

本研究利用最常用的也是较为特异的激活标志物 α -SMA, 进行乳腺癌组织的原位检测, 发现在癌组织内存在大量的激活的成纤维细胞 (Figure 1)。这



些细胞与正常组织内的成纤维细胞在 α -SMA 表达上存在极为显著的差异:CAF_s 表达,而 NF 无表达。组织原位的免疫组化和免疫荧光均得出同样的结论。此结果与先前的研究结果一致。但值得一提的是,本研究的抗体双标组织免疫荧光图片提示,并非所有在癌组织间质内出现的成纤维细胞均呈现 α -SMA 的表达。这预示 CAF_s 存在异质性,或在肿瘤间质内存在不同状态的 CAF_s。而体外培养细胞所做的免疫细胞化学表明,在培养的所有成纤维细胞中,只有一部分成纤维细胞呈现 α -SMA 表达 (Figure 2)。本研究结果进一步表明 CAF_s 的异质性。

尽管有证据表明 CAF_s 与 MF_s 在存活时间上有明显的差异,CAF_s 不会因凋亡清除,它们的激活表

型也不可逆转,然而这一结果可能更多地根源于活体的组织微环境。然而体外培养 CAF_s 时则不得不考虑离体培养后,CAF_s 是否仍能保持激活性状,或保持多久,或其阳性细胞有无生长优势。本研究利用体外培养的 CAF_s 与 NF 进行多次传代后所得的细胞蛋白,针对其中的 α -SMA 和 PDGFR- α 进行 Western blot 的检验。其结果提示,经历最多达 6 传代的 CAF_s (本研究最多涉及 6 传代)仍可检测到 α -SMA 表达,且此表达同 NF 相比,仍近似有与无的差异。同时,我们也观察到,体外培养的两类细胞对 PDGFR- α 的表达似乎不存在差异 (Figure 3)。尽管与原代细胞相比, α -SMA 表达有明显弱化倾向,然而多次传代后的 CAF_s 仍能保持 α -SMA 表达。此结

果提示, α -SMA 阳性 CAFs 可以在体外维持一段时间的性状, 或者在体外培养中 α -SMA 阳性 CAFs 没有足够强的生长优势。值得一提的是, 体外对 NF 培养, 可能短时间内不能将肌上皮细胞与之分离, 这将会造成 NF 的 Western blot 检测 α -SMA 弱阳性。然而组织原位的免疫组化则证明, 正常组织内的, 除导管、腺管及血管周边有单层 α -SMA 阳性平滑肌细胞或肌上皮细胞外, 间质内没有 α -SMA 阳性纤维细胞存在, 甚至包括纤维腺瘤内的成纤维细胞亦是如此。

由于 CAFs 对肿瘤细胞和组织不可忽视的作用, 体外 CAFs 维持激活性状的特性将为体外实验研究提供便利。

参考文献:

- [1] Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair[J]. *Nature*, 2013, 504(7479): 277–281.
- [2] Li B, Wang JH. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement[J]. *J Tissue Viability*, 2011, 20(4): 108–120.
- [3] Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(3): 526–537.
- [4] Fu Z, Song P, Li D, et al. Cancer-associated fibroblasts from invasive breast cancer have an attenuated capacity to secrete collagens[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(4): 1479–1488.
- [5] Berdiel-Acer M, Cuadras D, Diaz-Maroto NG, et al. A monotonous and prognostic genomic signature from fibroblasts for colorectal cancer initiation, progression, and metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(9): 1254–1266.
- [6] Ostman A. Cancer-associated fibroblasts: recent developments and emerging challenges [J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25: 1–2.
- [7] Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(7): 1070–1078.
- [8] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 392–401.
- [9] Augsten M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment[J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 62.
- [10] Chu TY, Yang JT, Huang TH, et al. Crosstalk with cancer-associated fibroblasts increases the growth and radiation survival of cervical cancer cells [J]. *Radiat Res*, 2014, 181(5): 540–547.
- [11] Kankuri E, Babusikova O, Hlubinova K, et al. Fibroblast nemoisis arrests growth and induces differentiation of human leukemia cells[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(6): 1243–1252.
- [12] Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 23): 5591–5596.
- [13] Kharaishvili G, Simkova D, Bouchalova K, et al. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance[J]. *Cancer Cell Int*, 2014, 14: 41.
- [14] Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin[J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4): 482–497.