



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.010
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(11):1431-1438.

· 基础研究 ·

Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的肿瘤干细胞生物学行为比较

董华英¹, 王伟¹, 陈元文², 包俊杰², 陈鑫², 吴诚义²

(1. 海南省人民医院 乳腺外科, 海南 海口 570311; 2. 重庆医科大学附属第一医院 普通外科, 重庆 400016)

摘要

目的: 比较人 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的肿瘤干细胞的生物学行为差异。

方法: 用 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌组织培养分离并培养原代乳腺癌细胞, 获取富含肿瘤干细胞的微球体 (MS); 用胰酶将 MS 消化成单细胞 (微球体细胞, MSDC), 比较两类乳腺癌 MSDC 的体外增殖和自我更新能力、ALDH1+ 表型肿瘤干细胞含量, 以及移植 NOD/SCID 小鼠后的成瘤情况。

结果: Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌组织分离的原代乳腺癌细胞均能培养出 MS, 但相对于 Luminal A 型乳腺癌, HER-2 阳性乳腺癌来源的 MS 形成时间短, 生成的 MS 体积大; HER-2 阳性乳腺癌来源的 MSDC 无论在无血清或添加血清的培养基中的增殖与再生能力均明显强于 Luminal A 型乳腺癌来源的 MSDC, 且前者含 ALDH1 表型干细胞比例明显高于后者 (均 $P < 0.05$); HER-2 阳性乳腺癌的 MSDC 在 NOD/SCID 小鼠体内成瘤能力也强于 Luminal A 型乳腺癌来源的 MSDC。

结论: Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌分离出来肿瘤干细胞生物学行为存在明显的差异, 两者可能有不同肿瘤干细胞起源。

关键词

乳腺肿瘤; 肿瘤干细胞; 微球体; 受体, erbB-2

中图分类号: R737.9

Comparison of biological behaviors in cancer stem cells derived from Luminal A and HER-2-positive breast cancer

DONG Huaying¹, WANG Wei¹, CHEN Yuanwen², BAO Junjie², CHEN Xin², WU Chengyi²

(1. Department of Breast Surgery, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China; 2. Department of General Surgery, the Frist Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract

Objective: To compare the difference in biological behaviors between two types of tumor stem cells derived from human Luminal A and HER-2-positive breast cancer.

Methods: Primary breast cancer cells were isolated from specimens of Luminal A and HER-2-positive breast cancer tissues and cultured, and then the mammospheres (MSs) were obtained, which were highly enriched in tumor stem cells. MSs were dissociated into single cells (mammospheres-derived cells, MSDCs) by trypsin digestion, and then the proliferative and regenerative abilities in vitro, the proportions of ALDH1+ cell population, and the tumor formation abilities after inoculation into NOD/SCID mice were compared between

基金项目: 海南省卫生计生科教基金资助项目 (02A2150014P1)。

收稿日期: 2017-08-04; 修订日期: 2017-10-16。

作者简介: 董华英, 海南省人民医院副主任医师, 主要从事乳腺疾病基础与临床方面的研究。

通信作者: 吴诚义, Email: NFMWK1192@hospital-cqmu.com

MSDCs from the two types of breast cancer.

Results: MSs formed in the primary cultured breast cancer cells either isolated from Luminal A or HER-2-positive breast cancer tissue. However, in HER-2-positive breast cancer, the MSs formation time was shorter and their volume was larger than those in Luminal A breast cancer. The proliferative and regenerative abilities in MSDCs from HER-2-positive breast cancer were significantly higher than those in MSDCs from Luminal A breast cancer either cultured in serum-free medium or medium containing serum, and the proportion of ALDH1+ cell population in the former was significantly higher than that in the latter (all $P < 0.05$). The tumor formation ability of MSDCs from HER-2-positive breast cancer was stronger than that of MSDCs from Luminal A breast cancer in NOD/SCID mice.

Conclusion: The tumor stem cells isolated from Luminal A and HER-2-positive breast cancer have significantly different biological behaviors. So the two types of breast cancer may originate from different tumor stem cells.

Key words

Breast Neoplasms; Neoplastic Stem Cells; Microspheres; Receptor, ErbB-2

CLC number: R737.9

乳腺癌是一个高度异质性的疾病，研究发现其至少分为十几个亚型，由于技术条件所限，临床上无法精准分型，目前临床上常分为4个亚型：Luminal A型、Luminal B型、HER-2阳性和三阴性乳腺癌^[1-4]。研究^[5]发现，乳腺癌细胞可能起源于未分化的、具有自我更新和一定多系分化潜能的细胞亚群，即乳腺癌干细胞（breast cancer stem cells, BCSC）。笔者前期研究^[6-9]发现Luminal A型和基底样型乳腺癌生物学特性存在明显差异，其可能起源于不同类型的BCSC。目前对Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的原代肿瘤干细胞研究尚不多见，本研究拟从Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的癌组织中分离乳腺癌原代细胞，通过无血清悬浮培养技术获取富含BCSC的非黏附性微球体（mammospheres, MS），比较Luminal A型和HER-2阳性BCSC的特性，探讨Luminal A型和HER-2阳性BCSC的生物学行为的差异。

1 材料与方法

1.1 标本来源

择取重庆医科大学附属第一医院普通外科2016年1月—2016年6月收治的未接受过新辅助治疗的乳腺癌女性患者20例，术前均经空芯针穿刺后确诊为乳腺癌。年龄38~60岁，平均年龄43.6岁。根据免疫组化进行分型，其中Luminal A型10例，HER-2阳性乳腺癌10例。标本的收集均经患者和亲属同意，手术开始前取材，一般切取1~1.5 cm³标本，放置于含有DMEM-F12培养基的灭菌广口瓶中，尽快送达实验室进行细胞培养。本研究经重

庆医科大学伦理部门审核批准。

1.2 实验主要试剂、仪器和实验地点

DMEM-F12培养基，B27细胞培养添加剂，胰蛋白酶和胎牛血清（Gibco），D-Hank's平衡液（HyClone），表皮生长因子（EGF）和碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）（美国PeproTech公司），Matrigel胶（美国BD Bioscience），ALDEFLUOR[®]干细胞鉴定试剂盒（加拿大StemCell公司）；倒置显微镜（Olympus Corporation），超净工作台（江苏苏净集团），Thermo Forma 371高温灭菌CO₂细胞培养箱。本实验在眼科学重庆市重点实验室完成。

1.3 MS的无血清培养传代及形态观察

修剪标本，剪除多余的脂肪和凝血，放置标本于培养皿中，用眼科手术剪剪碎标本，然后用D-Hank's液反复冲洗剪碎的组织使细胞充分过滤，收集细胞后离心，弃上清，红细胞裂解液裂解红细胞后再次离心收集细胞，用添加生长因子的DMEM-F12培养基（1:50 B27，20 ng/mL EGF，20 ng/mL bFGF）重悬细胞，台盼蓝染色，调整细胞浓度，以 1×10^5 个细胞/mL接种于25 mm²的细胞培养瓶中，于37℃，5%CO₂恒温培养箱中培养。3 d左右换液1次。每日在显微镜下观察MS的形成和发展过程。7~10 d左右传代1次，传代时离心收集细胞后用D-Hank's液冲洗两遍，加入0.05%的胰蛋白酶消化细胞10 min，细化过程中可用滴管吹打细胞，球体消失后再次离心收集细胞，调整细胞浓度后继续在无血清培养基中培养。

1.4 MS的细胞克隆形成实验

用胰酶将MS消化成单细胞，即微球体细胞

(mammospheres-derived cells, MSDC)。MS用胰酶消化后用添加生长因子的无血清培养基重悬细胞, 调整细胞浓度, 以每孔100个细胞接种于24孔板, 于恒温培养箱内培养, 每2 d每孔添加少量培养液, 7 d后按下列公式计算各孔的MS形成率(mammospheres formation efficiency, MSFE)。MSFE (%) = MS数量/接种细胞数量 × 100%。每次传代后同法计算MSFE。

1.5 MSDC 的在无血清培养基和添加血清的培养基中的生长曲线

用胰酶将MS消化成单细胞, 即MSDC。随机选取Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌标本各5例, 收集第2代MSDC, 将细胞用24孔板培养无血清培养, 每孔 1×10^3 个细胞, 每例标本细胞被分为4组, 每组细胞3孔。3 d后计数, 每次取1组细胞, 消化成单细胞, 分别用细胞计数板计数, 计算数据平均数, 隔3 d计算数据1次, 连续3次。根据计数结果, 绘制MS的生长曲线。同法将MSDC接种于有经多聚赖氨酸预处理盖玻片的24孔培养板中, 收集细胞并绘制生长曲线。

1.6 流式细胞术检测 MSDC 及其分化细胞中的 ALDH1⁺ 细胞

离心收集MSDC, 反应缓冲液重悬细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 /mL; 吸取1 mL细胞悬液至测试管, 5 μ L抑制剂DEAB加入阴性对照管, 吸取5 μ L活化底物加入到测试管, 与细胞悬液混匀, 立即吸取0.5 mL细胞悬液转移到对照管, 液体混匀, 将试管于37 $^{\circ}$ C的细胞培养箱中孵育30 min; 然后250 r/min离心5 min收集细胞, 弃上清液, 用0.5 mL缓冲液重悬测试管和对照管细胞, 4 $^{\circ}$ C保存细胞于24 h内上机检测或立即上机检测。

1.7 NOD/SCID 小鼠移植瘤实验

选择4~6周龄NOD/SCID雌性小鼠10只, 置

入SPF级清洁动物房带层流架鼠盒中饲养, 分为Luminal A型组和HER-2阳性组, 每组5只。收集细胞并用培养液重悬, 调整细胞浓度为 2×10^4 /mL, 加入基质胶, 配成体积比1:1的混合物, 此时细胞浓度为 1×10^4 /mL, 取0.1 mL接种于NOD/SCID小鼠左前胸皮下。定期观察皮下肿瘤生长情况, 记录肿瘤出现的时间, 测量肿瘤的大小, 隔日观察1次, 观察7周, 第8周处死小鼠, 将肿瘤完整剥离后观察肿瘤的体积、颜色及质地, 取各组肿瘤组织以10%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色后用显微镜观察。

1.8 统计学处理

所有实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过SPSS 17.0中文版进行数据分析, MSFE (%) 采用单因素方差分析, 两组间比较用t检验, 多组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 位差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种类型乳腺癌的 MS 培养及形态特征

两类乳腺癌均可在无血清悬浮培养状态下形成微球体状细胞团, 形成过程相似。接种48~72 h后可形成MS, 7 d左右MS达到成熟状态, 体积不再增大。HER-2阳性乳腺癌的细胞增殖快, MS形成较早, 细胞密度更高, 细胞之间连接更加紧密, 但组成球体的细胞直径小。其成熟MS直径较大, 平均直径为(123 ± 8) μ m, 培养过程中球体更容易贴壁生长, 出现分化细胞(图1A); Luminal A型乳腺癌的成熟MS直径较小, 平均直径为(52 ± 5) μ m, 组成球体的细胞数量少, 直径大, 更容易悬浮生长, 但容易产生悬浮的单细胞(图1B)。

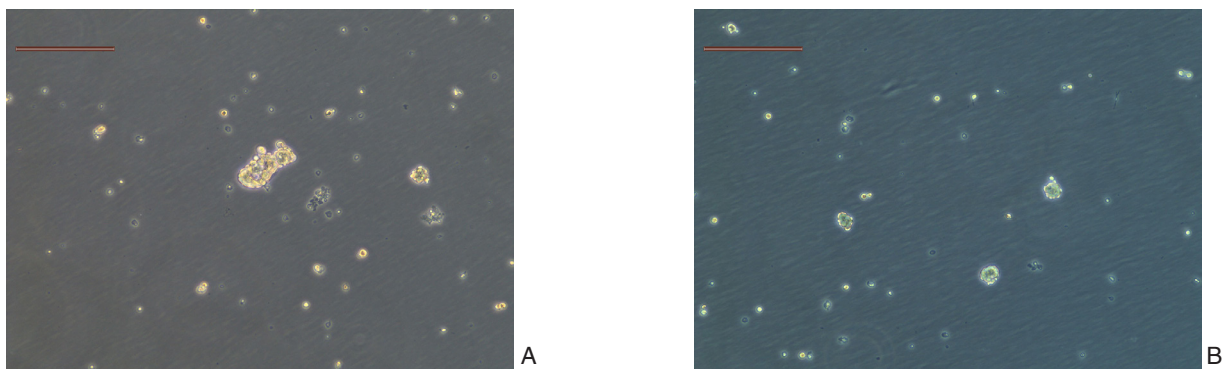


图 1 MS 形态特征 ($\times 200$) A: 来源于 HER-2 阳性型乳腺癌的成熟 MS; B: 来源于 Luminal A 型乳腺癌的成熟 MS
Figure 1 Morphological characteristics of MSs ($\times 200$) A: Mature MSs derived from HER-2-positive breast cancer; B: Mature MSs derived from Luminal A breast cancer

2.2 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的 MSDC 的传代能力和克隆形成能力比较

两类乳腺癌的MSDC经无血清悬浮培养均可形成MS结构样的细胞团,并能连续传代,在传代过程中随着传递次数的增多,产生的MS体积逐渐变小,数量也相应的减少。HER-2阳性乳腺癌的MSDC具有更强的传代能力,传代次数可达10代,而Luminal A型乳腺癌的MSDC最多传至6代,传至第7代时培养基中已无MS形成。HER-2阳性乳腺癌的MSDC的原代克隆为 $(4.28 \pm 0.68)\%$,而Luminal A型乳腺癌仅为 $(2.46 \pm 0.36)\%$,两者有统计学差异($P < 0.05$)。为了更加直观的比较两类乳腺癌传代过程的MSDC克隆形成率变化,随机选取两类乳腺癌各5例标本,统计数据后绘制图表如下(图2)。

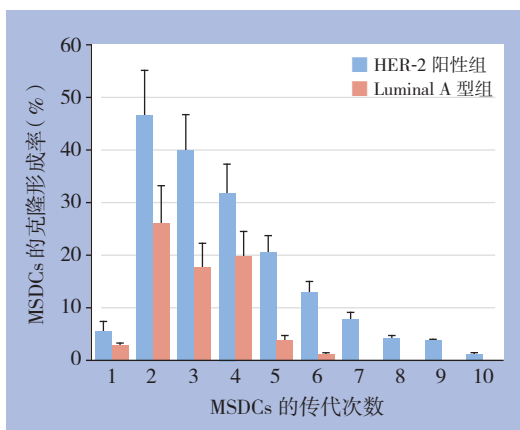


图2 两类乳腺癌MSDC连续传代过程中的克隆形成率
Figure 2 Colon formation rates of the MSDCs derived from Luminal A and HER-2-positive breast cancer after serial passages

2.3 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的 MSDC 增殖能力的比较

在无血清培养基中两者的MSDC均呈球形生长,起初3 d两者差异较小,新生MS数量少,增殖能力差异不太明显,3 d后,相对于Luminal A型乳腺癌,HER-2阳性乳腺癌的MSDC增殖速度较快,两者之间有明显差异($P < 0.05$)。6 d后两者的MS数量增长均变缓,生长趋于稳定期,生长曲线走势平缓(图3)。

2.4 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的 MSDC 分化潜能比较

在添加胎牛血清的培养基中,单细胞不再悬

浮生长,细胞改为贴壁生长。两者均有一段时间的生长停滞期,细胞增殖较慢,但HER-2阳性乳腺癌的MSDC在接种2 d后增殖迅速,4 d后即可与周围细胞完全融合;Luminal A型的MSDC于4 d后才迅速增殖,5 d后细胞完全融合。两者的MSDC分化生长曲线:2 d内两者生长曲线平缓,且有上升趋势,两者对数生长期相似,但相对Luminal A型组,HER-2阳性乳腺癌的MSDC增殖速度较快($P < 0.05$)(图4)。

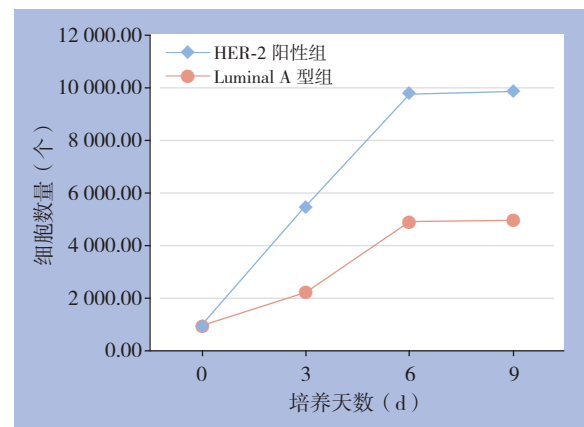


图3 MSDC在无血清培养基中的生长曲线
Figure 3 The growth curves of MSDCs in the serum-free medium

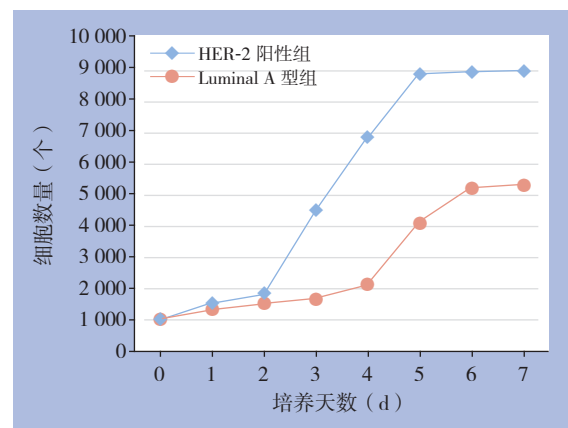


图4 培养基中添加胎牛血清后MSDC的生长曲线
Figure 4 The growth curves of MSDCs in medium containing fetal bovine serum

2.5 ALDH1⁺表型细胞在MSDC中的表达

两种亚型的乳腺癌MSDC中均含有ALDH1⁺表型细胞,通常HER-2阳性乳腺癌较Luminal A型的MSDC含有更高比例的ALDH1⁺表型细胞,前者ALDH1⁺表型细胞的平均水平 (13.26 ± 1.20) 明显高于后者 (5.20 ± 0.58) ,两者有统计学差异($P < 0.05$)(图5)。

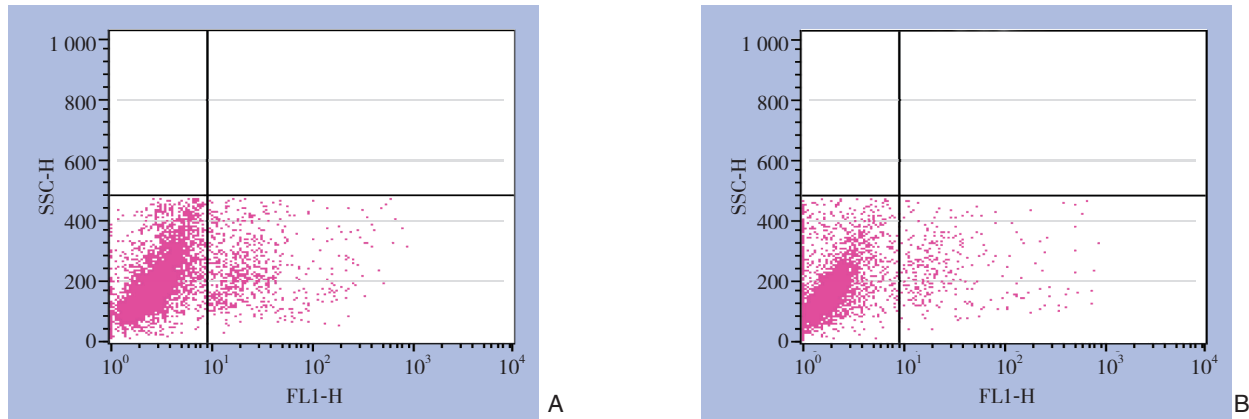


图 5 流式细胞术检测 MSDC 中 ALDH1+ 表型细胞 A: 来源于 HER-2 阳性型乳腺癌的 MSDC; B: 来源于 Luminal A 型乳腺癌的 MSDC

Figure 5 The ALDH1+ phenotype cells in MSDCs detected by flow cytometry A: MSDCs derived from HER-2-positive breast cancer; B: MSDCs derived from Luminal A breast cancer

2.6 Luminal A 型和 HER-2 阳性乳腺癌的 MSDC 致瘤能力比较

HER-2 阳性乳腺癌组 5 只小鼠均可成瘤, 接种 2 周后在接种部位肉眼可见肿瘤包块形成, 8 周测直径 10.0~18.0 mm, Luminal A 型组只有 3 只小

鼠成瘤, 接种 3 周后在接种部位可扪及肿瘤包块, 8 周后直径达 5.2~13.0 mm (图 6)。两类乳腺癌病理切片 HE 染色后镜下观察发现细胞大小不等, 细胞核增大, 染色加深, 核浆比例倒置, 具备恶性肿瘤的典型特征 (图 7)。

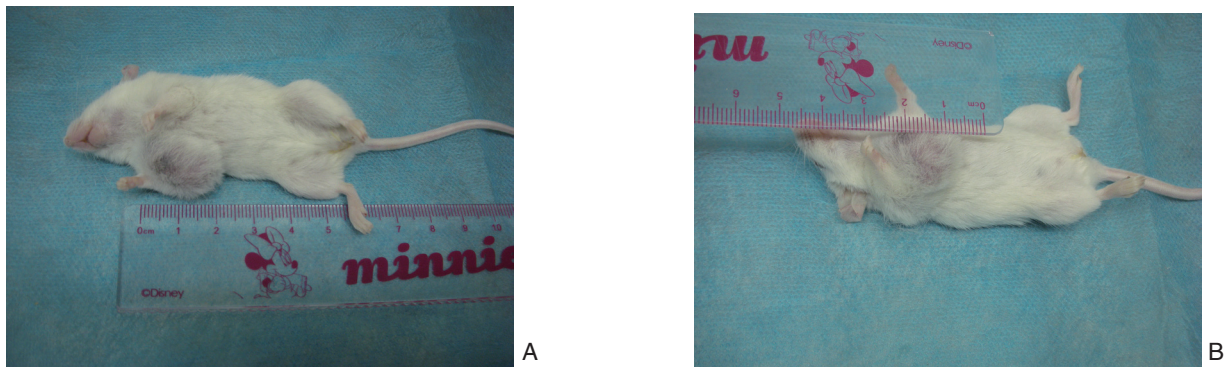


图 6 移植瘤生长情况 A: HER-2 阳性乳腺癌 MSDC 移植; B: Luminal A 型乳腺癌 MSDC 移植
Figure 6 Growth of xenograft tumors A: Transplantation with MSDCs derived from HER-2-positive breast cancer; B: Transplantation with MSDCs derived from Luminal A breast cancer

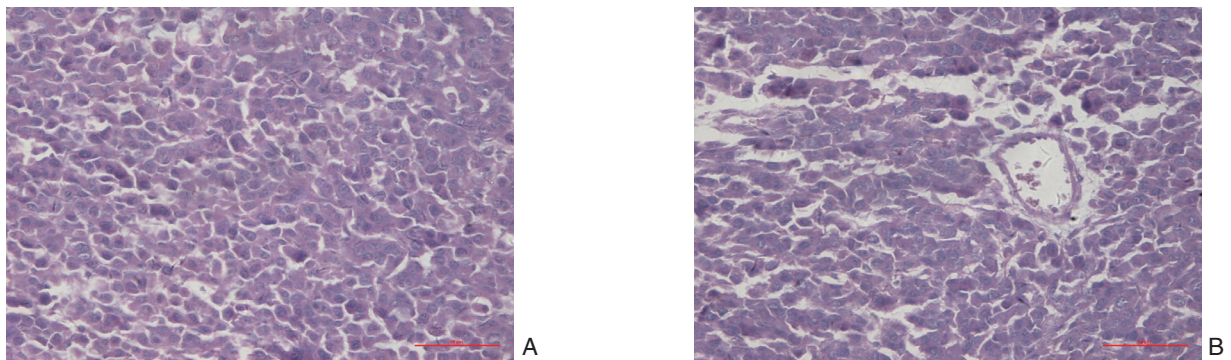


图 7 移植瘤病理切片 (HE × 200) A: HER-2 阳性乳腺癌 MSDC 移植瘤; B: Luminal A 型乳腺癌 MSDC 移植移植瘤
Figure 7 Pathological features of the xenograft tumors (HE × 200) A: Xenograft of MSDCs from HER-2-positive breast cancer; B: Xenograft of MSDCs from Luminal A breast cancer

3 讨论

Luminal A型乳腺癌是各种乳腺癌中最常见分子亚型,其复发率低,对内分泌治疗敏感,而对化学治疗不敏感,预后较好;HER-2阳性乳腺癌常见腋窝淋巴结转移,其恶性程度高,对化学治疗和靶向治疗敏感,预后较差^[10-14]。Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌生物学行为的差异可能跟其干细胞起源不同相关^[15]。本研究证实,Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的原代细胞均可在无血清培养条件下形成富含BCSC的MS,经胰酶消化成单细胞后能够生成新的MS,并且能够连续传代,在添加血清的培养基中可诱导分化,MSDC可在NOD/SCID小鼠皮下种植后形成与原发肿瘤性质相似的肿瘤,MSDC表现出肿瘤干细胞特征,证实Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌均含有BCSC。

在无血清培养系统中,BCSC可通过对称分裂实现自我更新,并增殖形成MS。MS的大小和所含细胞的数量可反映出肿瘤干细胞的增殖能力^[7-8]。本研究显示,HER-2阳性乳腺癌的MS明显比Luminal A型组大,生长曲线显示HER-2阳性组的MSDC增长速度明显快于Luminal A型组的MSDC,培养6 d后,HER-2阳性组的MSDC细胞数接近Luminal A型组MSDC的2倍。因此,HER-2阳性乳腺癌的BCSC在体外相对于Luminal A型乳腺癌的BCSC对称分裂和增殖能力更强,提示两类乳腺癌的BCSC自我更新能力存在差异。

通过体外连续克隆形成实验可以观察两类乳腺癌的BCSC在传代过程中自我更新能力的变化趋势^[16]。本实验发现,HER-2阳性组的MSFE比Luminal A型组高,提示前者的MSDC含有更高比例的肿瘤干细胞,也表明其恶性程度更高。两组乳腺癌的MSDC在连续传代的过程中所形成的MS数量逐渐较少,MS体积逐渐变小,提示目前的无血清培养体系与体内微环境存在差异,难以维持BCSC在体外的长期连续传代,该培养体系有待进一步改进或者发明新的乳腺癌干细胞培养系统。Dey等^[17]在培养乳腺干细胞的过程中发现,乳腺干细胞微球随着传代次数的增加,球体体积变小,数量也相应减少,传至5代后基本没有乳腺球形成。他们发现干细胞自身的老化与无血清培养基中的高氧微环境和球体细胞端粒酶的丢失有关,其可进一步影响其它未老化细胞的微环境(niche),最终导致乳腺干细胞自我更新能力和

多向分化能力的下降。

在培养基添加胎牛血清后,BCSC无法维持其干性,其增殖方式不再以对称分离为主,转变为不对称分裂,产生大量分化细胞,此种细胞就是乳腺癌细胞。因此,肿瘤的生长速度取决于BCSC的分化增殖速度^[18]。本研究生长曲线显示,HER-2阳性乳腺癌较Luminal A型乳腺癌的MSDC分化速度快,提示HER-2阳性乳腺癌生长速度快,恶性程度高。动物致瘤实验发现,HER-2阳性乳腺癌成瘤时间短,形成的肿瘤体积大,进一步证实HER-2阳性乳腺癌细胞具有更强的增殖能力。

研究^[19]表明,肿瘤细胞中干细胞所占的比例越大,其恶性程度也越高,高度恶性的乳腺癌中其BCSC的比例高达25%。HER-2阳性乳腺癌的MSDC原代克隆形成率(4.28 ± 0.68)%明显高于Luminal A型乳腺癌($2.46\% \pm 0.36\%$),提示前者含有更高比例的BCSC。研究^[20-27]发现,CD44⁺/CD24^{-low}细胞亚群具有BCSC的特征,其主要存在于基底样型乳腺癌肿瘤干细胞之中,而ALDH1是公认的肿瘤干细胞标记物之一,在多种恶性肿瘤中均存在该表型细胞。本研究流式细胞术检测发现,HER-2阳性组的MSDC含有更高比例的ALDH1⁺表型细胞,进一步印证了HER-2阳性乳腺癌所含BCSC比例高于Luminal A型乳腺癌,提示HER-2阳性乳腺癌具有低分化和高度恶性的肿瘤干细胞基础。

综上所述,本研究证实Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的肿瘤干细胞生物学特点存在明显差异,提示两者性质不同,可能存在不同的起源,推测其分别起源于乳腺上皮干细胞和管腔型祖细胞转化而来。由于各分子亚型乳腺癌细胞标记物尚不能统一,也提示BCSC也可能存在异质性。但本研究尚不能证实Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的BCSC是由不同的乳腺上皮细胞转化而来,还有待进行两者BCSC之间以及其与正常乳腺上皮干/祖细胞的基因比照研究证实。随着干细胞技术的进步,进一步纯化BCSC,研究Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的肿瘤干细胞特性,对确定不同类型乳腺癌的干细胞起源,针对不同类型乳腺癌制定精准的个体化治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] 江泽飞,许凤锐.乳腺癌分子分型对治疗的影响[J].中华普

- 外科手术学杂志:电子版, 2015, 9(6):12-15. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2015.06.132.
- Jiang ZF, Xu FR. Breast cancer subtypes: implications of individualized treatment strategies[J]. Chinese Journal of Operative Procedures of General Surgery: Electronic Version, 2015, 9(6):12-15. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2015.06.132.
- [2] 叶青, 江泽飞. 三阴性乳腺癌精准治疗的机遇[J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(24):1074-1077. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2016.24.048.
- Ye Q, Jiang ZF. Opportunities of precision medicine for triple-negative breast cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2016, 43(24):1074-1077. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2016.24.048.
- [3] Alluri P, Newman LA. Basal-like and triple-negative breast cancers: searching for positives among many negatives[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2014, 23(3):567-577. doi: 10.1016/j.soc.2014.03.003.
- [4] Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups[J]. Nature, 2012, 486(7403):346-352. doi: 10.1038/nature10983.
- [5] 董华英, 陈元文. 乳腺癌干细胞分选及培养的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(11):1234-1238.
- Dong HY, Chen YW. Research advances of isolation and culture of breast cancer stem cells[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2010, 19(11):1234-1238.
- [6] 董华英, 吴诚义, 陈元文. 乳腺癌新辅助化疗后的癌干细胞分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20):2172-2176.
- Dong HY, Wu CY, Chen YW. Isolation and culture of breast cancer stem cells derived from breast cancer after neoadjuvant chemotherapy[J]. Journal of Third Military Medical University, 2010, 32(20):2172-2176.
- [7] 陈元文, 吴诚义, 陈鑫, 等. 长程无血清培养人乳腺癌细胞球的生物学特性[J]. 肿瘤, 2010, 30(4):283-287. doi:10.3781/j.issn.1000-7431.2010.04.004.
- Chen YW, Wu CY, Chen X, et al. Biological characteristics of human breast cancer mammospheres cultured in serum-free medium over long term[J]. Tumor, 2010, 30(4):283-287. doi:10.3781/j.issn.1000-7431.2010.04.004.
- [8] 陈元文, 吴诚义, 董华英, 等. 基底样乳腺癌和管腔A乳腺癌干细胞的生物学行为比较[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(21):1209-1213. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.21.003.
- Chen YW, Wu CY, Dong HY, et al. Biological Behaviors of Cancer Stem/Progenitor Cells Derived From Basal-Like and Luminal-A Breast Cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2010, 37(21):1209-1213. doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.21.003.
- [9] 陈元文, 吴诚义, 董华英. 基底样乳腺癌与管腔A乳腺癌干/祖细胞的表型分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2):165-167. doi:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.02.009.
- Chen YW, Wu CY, Dong HY. Phenotypic analysis of stem/progenitor cells derived from basal-like and luminal-A breast cancer[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2014, 11(2):165-167. doi:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.02.009.
- [10] García Fernández A, Chabrera C, García Font M, et al. Differential patterns of recurrence and specific survival between luminal A and luminal B breast cancer according to recent changes in the 2013 St Gallen immunohistochemical classification [J]. Clin Transl Oncol, 2015, 17(3):238-246. doi: 10.1007/s12094-014-1220-8.
- [11] Yoo BH, Axlund SD, Kabos P, et al. A high-content assay to identify small-molecule modulators of a cancer stem cell population in luminal breast cancer[J]. J Biomol Screen, 2012, 17(9):1211-1220.
- [12] Escórcio-Dourado CS, Martins LM, Simplicio-Revoredo CM, et al. Bcl-2 antigen expression in luminal A and triple-negative breast cancer[J]. Med Oncol, 2017, 34(9):161. doi: 10.1007/s12032-017-1022-2.
- [13] Korkaya H, Kim G I, Davis A, et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population[J]. Mol Cell, 2012, 47(4):570-584. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.014.
- [14] Duru N, Candas D, Jiang G, et al. Breast cancer adaptive resistance: HER2 and cancer stem cell repopulation in a heterogeneous tumor society[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(1):1-14. doi: 10.1007/s00432-013-1494-1.
- [15] Shah D, Osipo C. Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far[J]. Genes Diseases, 2016, 3(2):114-123. doi: 10.1016/j.gendis.2016.02.002
- [16] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties[J]. Cancer Res, 2005, 65(13):5506-5511.
- [17] Dey D, Saxena M, Paranjape AN, et al. Phenotypic and functional characterization of human mammary stem/progenitor cells in long term culture[J]. PLoS One, 2009, 4(4):e5329. doi: 10.1371/journal.pone.0005329.
- [18] Shaw FL, Harrison H, Spence K, et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2012, 17(2):111-117. doi: 10.1007/s10911-012-9255-3.
- [19] Geng SQ, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis[J]. Cancer Lett, 2014, 349(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.036.
- [20] Al-Hajj M, Wicha M S, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7):3983-3988.
- [21] Ginestier C, Hur MH, 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]. Cell Stem Cell, 2007,

- 1(5):555–567. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.
- [22] Holah NS, Aiad AE, Asaad NY, et al. Evaluation of the Role of ALDH1 as Cancer Stem Cell Marker in Colorectal Carcinoma: An Immunohistochemical Study[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(1):EC17–23. doi: 10.7860/JCDR/2017/22671.9291.
- [23] Wang J, Wang L, Ho CT, et al. Garcinol from *Garcinia indica* Downregulates Cancer Stem-like Cell Biomarker ALDH1A1 in NSCLC A549 Cells through DDIT3 Activation[J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(18):3675–3683. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00346.
- [24] Kuroda T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis[J]. PLoS One, 2013, 8(6):e65158. doi: 10.1371/journal.pone.0065158.
- [25] Nishida S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Prostate cancer stem-like cells/cancer-initiating cells have an autocrine system of hepatocyte growth factor[J]. Cancer Sci, 2013, 104(4):431–436. doi: 10.1111/cas.12104.
- [26] 韩玉贞, 桑晶, 吕增华, 等. 乳腺癌干细胞含量及其耐药相关蛋白表达的临床病理意义[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(11):1389–1393.
- Han YZ, San J, Lu ZH, et al. Clinicopathologic significance of breast cancer stem Chinese Journal of General Surgery cells concerning their content and expression of drug resistance related proteins[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2012, 21(11):1389–1393.
- [27] 李佳, 房林. 乳腺癌干细胞与其肿瘤治疗的前景[J]. 中国普通外科杂志, 2011, 20(5):533–535.
- Li J, Fang L. Breast cancer stem cell and its perspective in tumor therapy[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2011, 20(5):533–535.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 董华英, 王伟, 陈元文, 等. Luminal A型和HER-2阳性乳腺癌的肿瘤干细胞生物学行为比较[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(11):1431–1438. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.010

Cite this article as: Dong HY, Wang W, Chen YW, et al. Comparison of biological behaviors in cancer stem cells derived from Luminal A and HER-2-positive breast cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(11):1431–1438. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.11.010

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于 20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应对对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出 95% 置信区间。

中国普通外科杂志编辑部