

以氧化鐵奈米粒子接合癌症幹細胞特定抗體有效追蹤

乳腺癌幹細胞在活體的表現及應用

盧珍姣¹ 蕭仲凱² 廖漢文³ 吳忠信¹

¹國立師範大學生命科學系，臺北市文山區汀州路四段88號

²佛教慈濟醫療財團法人綜合醫院放射科，新北市新店區建國路 289 號

³臺大醫院影像醫學部放射科，台北市中山南路 1 號

摘要

乳腺癌在世界上是女性好發腫瘤的流行病學中，最常見的惡性腫瘤之一。有部分的科學家研究頑強與難治癒的乳癌細胞的原因，源自於稱之為癌症幹細胞（CSC）的一群細胞。相關研究報導癌症幹細胞具有特定且專一性的表面抗原標記乳腺癌的侵襲和轉移其與可溶性CD44表達在CSC是相當重要的。

目前，超順磁性氧化鐵奈米粒子（SPION）追蹤乳腺癌細胞和細胞內的定位如何，仍是未知數。SPION已部分用於生物醫學的應用，例如成像所使用的核磁共振攝影（MRI）的顯影劑，包含氧化鐵奈米粒子，我們選擇了CD44抗體接合SPION（直徑為45-60奈米），作為一個追蹤器藉由MRI評估其顯影對比能力來偵測乳腺癌幹細胞（BCSC）中CD44抗體的過度表達。在我們的初步數據，我們選擇了免疫缺陷小鼠（SCID小鼠）。將乳腺癌細胞植入小鼠後腿皮下部位兩週後，這些小鼠以尾靜脈注射CD44抗體接合SPION前後與MRI成像做比對。使用SPION和CD - 44抗體標記的染色方法都能顯示在腫瘤內的相同的位置上。我們猜測CD44抗體接合SPION的確是一個強大的工具，用於活體動物中監測乳腺癌CD44 +的表現。這些腫瘤活性的進一步研究對未來的成功治療是有益的。

關鍵詞：超順磁性氧化鐵納米粒子（SPION），乳腺癌，癌症幹細胞（CSC），CD44抗體

Detection of Breast Cancer Stem Cells in Living Animal

Chen-Wen Lu¹, Jong-Kai Hsiao², Hon-Man Liu³, and Chung-Hsin Wu¹

¹Department of Life Science, National Taiwan Normal University, Taipei, 10610, Taiwan.

²Medical Imaging, Taipei Tzu Chi General Hospital, Sindian, Taipei, 23142, Taiwan.

³Department of Medical Imaging National Taiwan University Hospital, Taipei, 10048, Taiwan.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most prevalent malignancy in women worldwide. Recent research shows part of the breast cancer cells are tenacious and difficult to cure, and these cells are called cancer stem cells(CSC). Cancer stem cell has specific surface antigen markers in some related report. In Breast cancer, the soluble CD44 expression is very important in CSC, especially in invasion and

metastasis.

Currently, how the superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) tracking breast cancer cells and the localization inside the cells are still unknown. SPION have been used for biomedical applications such as stem cell labeling or used as contrast medium in magnetic resonance imaging (MRI).

We chose CD44 antibodies conjugated with SPION (diameter: 45–60 nm) as a tracker for detection of CD44-overexpressing breast cancer stem cells (BCSC) *in vitro and in vivo*. In our preliminary data, we chose immune deficient mice (SCID mice) bearing breast cancer cells. After two weeks of tumor implantation, we imaged these mice with MRI before and after CD44-SPION intravenous injection. Co-localization of SPION and CD-44 marker showed both of these two stains on the same location in the tumor. We suggested that CD44-SPION is a powerful tool for monitoring CD44⁺ breast cancer cells in living animal. Further study for verification of these tumor activity is beneficial to the of successful treatment in the future.

Key Words: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), Breast cancer, Cancer stem cell (CSC),

CD44 antibodies.

一、前言

乳腺癌(Breast Cancer)在世界上是女性好發腫瘤的流行病學中，最常見的惡性腫瘤之一 (1)。在美洲地區中，以美國為例，根據估計調查發現，女性生活族群中約有12%的比例，會患上乳腺癌 (2)。相較於亞洲地區的台灣而言，乳腺癌則顯著集中在台北市及其周邊地區 (3)。

根據流行病學研究，癌症發病率主要與社會的經濟形態有關，近年來促進由於社會經濟地位變化及其他種種因素，如飲食，生活方式和醫療保健的間接效應的影響，引發癌症的變異性增加 (4, 5)。

大部分的治療方法是不能完全治癒。而一些科學家提出乳腺癌的治療，可能源自於癌症幹細胞的抵抗(6-9)。

這些細胞則是具有自我更新，並能產生大數目且具有部分分化能力的細胞，這一類具有部分幹細胞能力的癌症細胞稱之為癌症幹細胞(Cancer Stem Cell ; CSC) (10-14)。

近年來的研究報導指出，可溶性表面抗原 CD44 在癌症幹細胞(CSC)的表現，是乳腺癌的侵襲和轉移中專一性不可獲缺的重要指標之一 (15)。

目前，超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) 已被廣泛地用於各種生物醫學之應用。臨床上，例如幹細胞成像的核磁共振攝影，亦稱磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) (16-18)。

截至目前為止，如何透過超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) 來追蹤

乳腺癌細胞和細胞內的定位仍然還是一個未知數。為了了解其癌症的作用機制或許超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) 可能為我們提供了一項利器，以超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) 的攝入可促進對細胞內的定位，並且通過 MRI 作為檢測 CD44-過度表現於乳腺癌幹細胞(Breast Cancer Stem Cell ; BCSC) 的一個重要的臨床檢測方法。我們選擇了結合有超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) (45-60 奈米直徑) 的 CD44 抗體作為乳腺癌幹細胞(Breast Cancer Stem Cell ; BCSC) 的一個檢測方法追蹤器。

在我們的初步數據顯示，將未添加及添加 10 µg Fe/ml 於含人類乳癌細胞株 (Breast Cancer Cell Line ; MDA-MB-231) 與培養基之共同培養 24 小時後，以普魯士藍染劑 (Prussian blue staining) 確認含鐵之氧化鐵奈米粒子於細胞內已被染成藍色來確認超順磁性氧化鐵奈米粒子可標示人類乳癌細胞株 (Breast Cancer Cell Line ; MDA-MB-231)。我們的結果表明，細胞的某些部分可以由 CD44-SPION 標記成功。另外，以細胞活性試驗(Cell Viability assay ; MTT assay) 檢測對細胞增殖的影響。細胞處理 24 小時高濃度的 CD44-SPION 後，乳腺癌細胞株表現出細胞增殖沒有影響。

在我們初步的動物研究中，我們選擇了免疫缺陷小鼠 (SCID 小鼠) 作為實驗動物模式。腫瘤植入兩個星期後，我們於靜脈注射 CD44-SPION 前後，進行磁振造影 (Magnetic

Resonance Imaging ; MRI) 追蹤檢查。我們觀察到在這些腫瘤信號強度的變化於注射 CD44-SPION 前後有明顯的改變情形。磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) 掃描後，將小鼠犧牲，以福馬林液 (Formalin solution) 固定腫瘤組織。初步的腫瘤組織以普魯士藍染劑及免疫組織染色法共同標定超順磁性氧化鐵奈米粒子 (Superparamagnetic iron oxide nanoparticles ; SPION) 和 CD-44 標記的結果顯示，這兩種標示法都顯示在腫瘤內的相同位置上。

我們初步預測，為驗證這些腫瘤活性的更進一步研究，用於監控活體動物 CD44+乳腺癌的高度抗體表現，CD44 抗體接合 SPION 是一個有利的工具。

二、實驗材料與方法

超順磁性氧化鐵奈米粒子

我們以台灣少數具有製造標準化流程的磁量生技公司 (MagQu Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 所研發的磁性氧化鐵 (Ferucarbotran ; Fe₃O₄) 奈米粒子 (S.Y. Yang et al., 2010) 接合癌幹細胞的表面標誌 (CD44)，以用來建立及偵測癌幹細胞在動物體內之增生活性的表現。

使用直徑 52 nm 之磁性氧化鐵 (Ferucarbotran ; Fe₃O₄) 奈米粒子以葡聚醣包覆以增加溶解度 (MagQue 磁量生技有限公司，台北，台灣)。以此材料進行研究 (圖 1)。

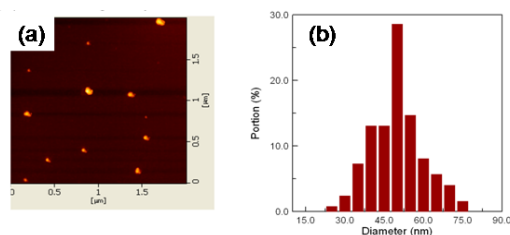


Figure 1 (a) Image of magnetic nanoparticles (bright dots) taken with magnetic force microscope (MFM). (b) Size distribution of SPION are 52.06 nm and 10.14 nm (cores).

乳腺癌細胞株培養與超順磁性氧化鐵奈米粒子標定

乳腺癌細胞株 (MDA-MB-231, ATCC-HTB-26) 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 (FIRDI ; Taiwan)。將濃度 100 微克的 Fe/ml 的 CD44-SPION (MagQu Co., Ltd., Taipei, Taiwan) 添加到培養基中與細胞共同培養。生

長培養基由 Dulbecco 改進的 Eagle 培養基 / F12 培養基 (DMEM/F12, GIBCO) 中，另外添加了 10% 胎牛血清 (FBS; HyClone 公司，猶他州，美國)，100 微克/毫升鏈黴素和 100 U / mL 青黴素 (GIBCO, 美國)。所有細胞培養於 37°C，5% CO₂，我們將人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 以癌幹細胞的表面標誌 (CD44) 接合磁性氧化鐵 (Ferucarbotran) 奈米粒子進行標示，標示方式如下：將人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 以磁量生技公司所研發的癌幹細胞的表面標誌 (CD44) 接合磁性氧化鐵 (Ferucarbotran) 奈米粒子。細胞試驗是以未添加及添加 10 μg Fe/ml 於含人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 培養基之共同培養 2-24 小時待之後進行普魯士藍染色試驗，免疫螢光染色試驗和 MRI 掃描之研究使用。

細胞活性測試

細胞活性及增殖是用 0.5 毫克/ml 的 MTT (3 - (4,5 - 二甲基吡啶-2 - 基) -2,5 - 二苯基溴化) 測定。以未添加及添加 10 μg Fe/ml 於含人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 培養基之共同培養 2-24 小時待之後，將 MTT 加入到培養基中，以 0.5 毫克/毫升和細胞培養 1 小時，在 37°C 下，在 5% CO₂ 培養箱中的培養。培養後，由活細胞產生藍色的甲臍染料 (formazan) 可以在吸光度在 570nm 處用酵素免疫全波長分析儀比對成比例的活細胞數 (Photometer-Multiskan EX; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)。

普魯士藍染色試驗

以 1×10^5 人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 細胞數目，添加 100 微克的 Fe/ml 的 CD44-SPION，培養 2-24 小時之後進行細胞內及活體內標定能力之測定。亞鐵氰化鉀成分之普魯士藍染劑 (Prussian blue staining) 確認含鐵之氧化鐵奈米粒子於細胞內已被染成藍色來確認磁性氧化鐵奈米粒子可標示人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231)。細胞用 2% 亞鐵氰化鉀 (普魯士藍) 和 1M 鹽酸 5 分鐘。然後將細胞用 Nikon TE2000-S 倒置顯微鏡 (19) 觀察標記的使用和不使用 CD44-SPION (圖 3) 的乳腺癌細胞，進行觀察。

此外，實驗動物選取免疫功能不全之小鼠 (SCID mice) 以皮下注射人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 於後腿兩側約 2-3 週乳癌細胞生長約 0.5 公分大小，將含有癌幹細胞的表面標誌 (CD44) 接合磁性氧化鐵 (Ferucarbotran) 奈米粒子以尾靜脈注射 24 小時後，將小鼠犧牲，取其乳癌細胞腫塊，與上述同樣

的普魯士藍染劑(Prussian blue staining)確認含鐵之氧化鐵奈米粒子於細胞內已被染成藍色。

免疫染色法標定表面標誌

以未添加及添加 10 µg Fe/ml 於含人類乳癌細胞株 (MDA-MB-231) 共同培養在培養基 2-24 小時之後，以緩衝液 (1x PBS solution) 洗滌細胞 3 次，然後在 4% 多聚甲醛溶液 (Paraformaldehyde ; Sigma-Aldrich 友和公司) 在室溫下固定 10 分鐘，並用 PBS 洗滌兩次。以 2% 胎牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin; BSA) 溶液作用 30 分鐘，阻斷非特异性結合後，並用 PBS 洗滌兩次，加入抗體 CD44 結合 (R & D 系統，1:200) 室溫作用 2 小時，用 PBS 洗滌。接著用 5 微克/毫升 4', 6 - 二脒基-2 - 苯基吲哚 (DAPI; 分子探針) 染色 5 分鐘，在室溫下進行。然後將細胞用 Nikon TE2000-S 倒置顯微鏡觀察成像。

磁共振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI)

將人類乳癌細胞 (MDA-MB-231, 5×10^6) 以皮下注射到免疫功能不全之裸鼠 (雌性 SCID) 的左右大腿的後側面，待 2-3 星期左右腫瘤長成約 0.5 公分大小後，以磁共振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) (Bruker 公司，德國)，再經過最佳化的 MRI 序列掃描下，發現小鼠全身的臟器及後腿兩側之癌細胞腫塊可以在 MRI 影像圖檔中清晰的掃描出來。之後將含有癌幹細胞的表面標誌 (CD44) 接合磁性氧化鐵 (Ferucarbotran) 奈米粒子以尾靜脈注射 18 小時後，再進行 MRI 掃描後，乳癌細胞腫塊部位於 T2 訊號中呈現對比。

細胞腫塊組織染色

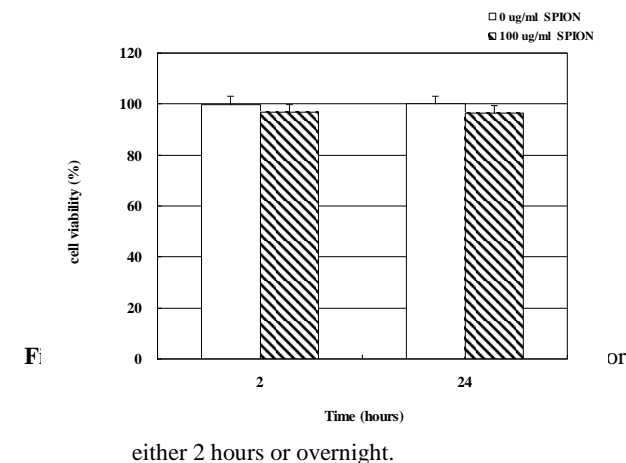
MRI 掃描後，將小鼠犧牲，並用普魯士藍 PB 染色確認氧化鐵 (Ferucarbotran ; Fe₃O₄) 奈米粒子於細胞內，並用免疫組織染色法，使用 DAB 受質呈色，使其染成棕色以確認 CD44 表面標記表現於細胞。

三、結果

(一) CD44-SPION 對乳癌細胞活性之影響

將未添加及添加 100 µg Fe/ml 於含人類乳癌細胞株 (Breast Cancer Cell Line ; MDA-MB-231) 與培養基之共同培養 2-24 小時後，以 MTT 試劑檢測對細胞活性及增殖的影響。在我們的初步數據顯示，細胞處理 24 小時高濃度的

CD44-SPION 後，並不影響乳癌細胞株的細胞活性。



(二) 普魯士藍染色標定細胞內 CD44-SPION 之表現

顯微鏡觀察標記添加和不添加 CD44-SPION 的乳癌細胞，細胞的某些部分可以由 CD44-SPION 標記形成藍色，顯示，磁性氧化鐵奈米粒子具有標示人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 的能力 (圖三)。

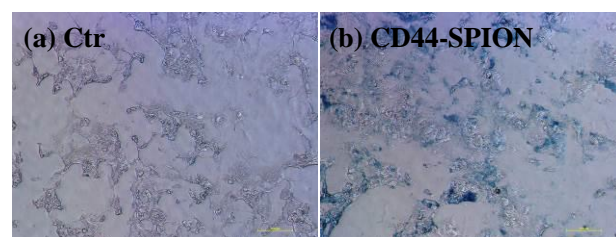


Figure 3 Microscopic observation of Breast cancer cells labeled without (a) and with (b) CD44-SPION.

(三) 磁共振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) 追蹤乳癌幹細胞 (BCSC) 內標定 CD44-SPION 之影響

在人類乳癌細胞 (MDA-MB-231) 植入後，以磁共振造影 (Magnetic Resonance Imaging ; MRI) (Bruker 公司，德國)，掃描注射前後用 CD44-SPION，在腫瘤中的體內 MR 成像的分布情形。我們可以看到信號變化於注射 CD44-SPION 前後 (圖 5)。

結果顯示，明顯的信號強度在於注射用 CD44-SPION 後，在左側腫瘤部位顯著信號強度下降，根據 T2 加權成像的 CD-44 的氧化鐵奈米粒子標記後。MRI 掃描顯示，腫瘤 (P < 0.001) 的某一部分顯著信號強度下降。在腫瘤中的體內 MR 成像的分布情形，我們可以看到信號變化於注射 CD44-SPION 前後。乳癌細胞腫塊因含有癌幹細胞的表面標誌 (CD44) 接

合磁性氧化鐵(Ferucarbotran)奈米粒子，因此施打前後可明顯辨識，此結果與組織切片染普魯士藍於乳癌細胞腫塊部位有相同的結果(圖四)。

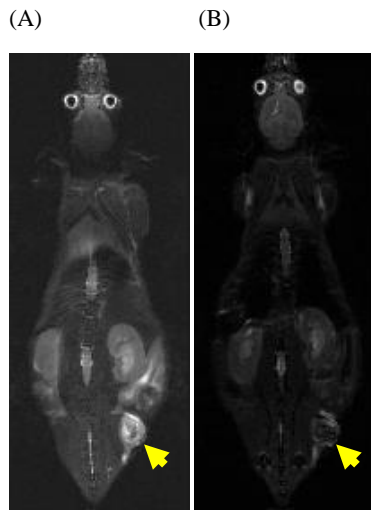


Fig. 4. For evaluation of in vivo detecting CD-44 activity of the tumor and organs, severe immunocompromised mouse implanted with MDA-MB-231 cell lines at the flank were imaged before (A) and after (B) injection of CD-44-SPION.

(四) 免疫染色法和普魯士藍染色共同標定癌幹細胞腫瘤

我們發現，人類乳癌細胞株(MDA-MB-231)之腫塊組織中，細胞表現CD44的部位同時積累了 CD44-SPION。組織學分析也顯示氧化鐵奈米顆粒和CD-44 (+) 細胞表現共同的部位 (圖五)。

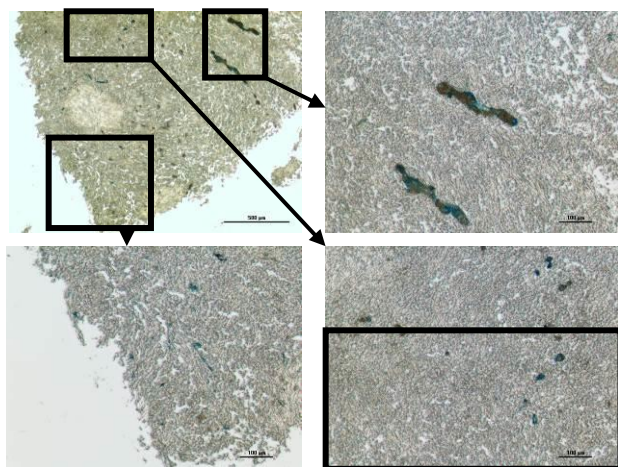


Figure 5 Microscopic view of tumors been labeled with CD-44 iron oxide nanoparticles after Prussian blue staining. The tumor cells were stained blue which means iron oxide deposition at the tumor site.

四、結論

我們以磁振造影技術 (Magnetic Resonance Imaging ;MRI) 在活體內檢測乳癌幹細胞的亞群。該方法可能有效被應用於癌症幹細胞的檢測和監測治療反應。

我們初步預測，為驗證這些腫瘤活性的更進一步研究，用於監控活體動物 CD44+乳癌的高度抗體表現，CD44 抗體接合 SPION 是一個有利的工具。

五、參考文獻

1. Fan L, Zheng Y, Yu KD, Liu GY, Wu J, et al. (2009) Breast cancer in a transitional society over 18 years: trends and present status in Shanghai, China. *Breast Cancer Res Treat* 117: 409 – 416.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69 – 90.
3. Li-Chun Hu and Jinn-Guey Lay. (2006) Spatial Analysis of Female Cancers in Taiwan. *J. Taiwan Geo. Inf. Sci* (4) : 39-55.
4. King-Jen Chang, Wen-Hung Kuo, Ming-Yang Wang. (2008) The Epidemiology of Breast Cancer in Taiwan. *J. Chinese Oncol. Soc.* 24(2), 85-93.
5. Timothy J Key, Pia K Verkasalo, and Emily Banks. (2001) Epidemiology of breast cancer Reviews. *The Lancet Oncology* (2): 133-140.
6. Fares Al-Ejeh, Chanel E.Smart, Brian J.Morrison, Georgia Chenevix-Trench, J.Alejandro Lopez, Sunil R.Lakhani, Michael P.Brown and Kum Kum Khanna. (2011). Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis* vol.32 no.5 pp.650 – 658.
7. Michael Baumann et al. (2008) Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Reviews Cancer*. 8: 545-554.
8. O'Brien CS, Farnie G, Howell SJ, Clarke RB. (2011) Breast cancer stem cells and their role in resistance to endocrine therapy. *Horm Cancer*. 2(2):91-103.
9. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*

- 367:645-648.
10. Groner B, Vafaizadeh V, Brill B, Klemmt P. (2010) Stem cells of the breast and cancer therapy. *Womens Health (Lond Engl)*. Mar;6(2):205-19.
 11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-3988.
 12. Visvader JE, Lindeman GJ. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8:755-768.
 13. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006) Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66:9339-9344.
 14. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
 15. Caigang Liu et al. (2012) Clinical Implications of CD44 + /CD24 - Tumor Cell Ratio in Breast Cancer. *Cancer Biother Radio*. 27(5): 324-328.
 16. S.Y. Yang, W.C. Wanga, C.B. Lana, C.H. Chena, J.J. Chieha, H.E. Hornga*, Chin-Yih Hongc, H.C. Yang, C.P. Tsaie, C.Y. Yange, I.C. Chengf, W.C. Chung. (2010) Magnetically enhanced high-specificity virus detection using bio-activated magnetic nanoparticles with antibodies as labeling markers. *Journal of Virological Methods* 16414 - 16418.
 17. Hamanou Benachour, Aymeric Sve, Thierry Bastogne1, Céline Frochot, Régis Vanderesse, Jor-dane Jasniewski8, Imen Miladi, Claire Billotey, Olivier Tillement, François Lux, Muriel Barberi-Heyob. (2012) Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photo-dynamic Therapy and MRI. *Theranostics*.; 2(9):889-904.
 18. Lim EK, Kim HO, Jang E, Park J, Lee K, Suh JS, Huh YM, Haam S. (2011) Hyaluronan-modified magnetic nanoclusters for detection of CD44-overexpressing breast cancer by MR imaging. *Biomaterials*. 32:7941-50.
 19. Jong-Kai Hsiao, Ming-Fong Tai, Hung-Hao Chu, Shin-Tai Chen, Hung Li, Dar-Ming Lai, Sung-Tsang Hsieh, Jaw-Lin Wang, and Hon-Man Liu. (2007) Magnetic Nanoparticle Labeling of Mesenchymal Stem Cells Without Transfection Agent: Cellular Behavior and Capability of Detection With Clinical 1.5 T Magnetic Resonance at the Single Cell Level. *Magnetic Resonance in Medicine*. 58:717-724.