



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105452450 B

(45)授权公告日 2020.07.07

(21)申请号 201480045085.3

(22)申请日 2014.06.18

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105452450 A

(43)申请公布日 2016.03.30

(30)优先权数据  
201304704-8 2013.06.18 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.02.14

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/SG2014/000290 2014.06.18

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02014/204406 EN 2014.12.24

(73)专利权人 新加坡科技研究局  
地址 新加坡新加坡

(72)发明人 栗泽元一 山下敦

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 武晨燕 迟姗

(51)Int.Cl.  
C12N 5/095(2006.01)

(56)对比文件

US 2012276069 A1,2012.11.01,

US 2012276069 A1,2012.11.01,

WO 2010138082 A1,2010.12.02,

WO 2010138082 A1,2010.12.02,

Solis MA et al.Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cell.《Biochem Res Int》.2012,第2012卷

Guvendiren M et al.Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics.《Nat Commun》.2012,第3卷

审查员 蔡玉品

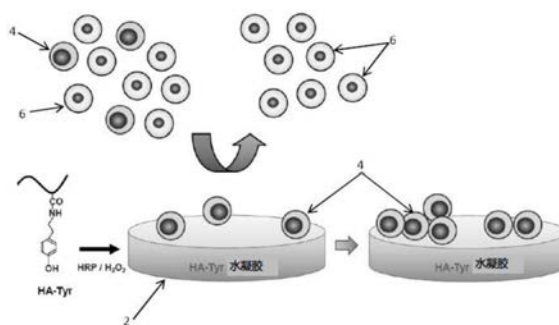
权利要求书2页 说明书12页 附图10页

(54)发明名称

培养癌干细胞的方法

(57)摘要

本发明提供了培养癌干细胞群的方法。该方法包括将癌干细胞引入到细胞培养基质之上或之中,细胞培养基质为含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式。



1. 一种培养癌干细胞群的方法,包括将所述癌干细胞引入到细胞培养基质上或细胞培养基质中,其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,其中所述凝胶具有在0.1kPa至4.0kPa的范围的值的刚度,并且其中所述癌干细胞包含与所述糖胺聚糖相互作用并且是所述糖胺聚糖的受体的标志物,其中所述糖胺聚糖是透明质酸,并且其中所述标志物是CD44。

2. 权利要求1所述的方法,包括在所述细胞培养基质上孵育所述癌干细胞。

3. 权利要求2所述的方法,包括移除没有贴附于所述细胞培养基质的癌细胞。

4. 权利要求1所述的方法,包括选择储能模量的值在30Pa-100,000Pa的范围的所述凝胶。

5. 权利要求1所述的方法,包括从由下列各项组成的组中选择所述取代的苯烷基胺:苯甲胺、苯乙胺、苯丙胺、苯丁胺和苯戊胺。

6. 权利要求5所述的方法,包括将所述取代的苯乙胺选择为酪胺。

7. 权利要求6所述的方法,包括将所述酪胺选择为间-酪胺或对-酪胺。

8. 权利要求1所述的方法,包括选择取代度的值在1-20的范围的所述缀合物。

9. 权利要求4所述的方法,其中当所述细胞培养基质的刚度为0.1至4.0kPa范围内的值时,所述癌干细胞变得对抗癌药物有抗性。

10. 权利要求9所述的方法,其中当所述细胞培养基质的刚度小于或等于0.5kPa时,所述癌干细胞变得对抗癌药物有抗性,并且其中当存在所述抗癌药物时,所述癌干细胞具有至少70%活力。

11. 权利要求9或10所述的方法,包括从顺铂或多柔比星中选择所述抗癌药物。

12. 一种从多个癌细胞中选择性分离癌干细胞群的方法,包括以下步骤:

a. 使所述多个癌细胞接触细胞培养基质,其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,其中所述凝胶具有在0.1kPa至4.0kPa的范围的值的刚度;和

b. 使所述癌干细胞与所述细胞培养基质相互作用从而从所述多个癌细胞中分离所述癌干细胞,

其中所述糖胺聚糖是透明质酸,

其中所述癌干细胞包含标志物CD44,并且

其中所述步骤b. 包括使所述癌干细胞通过受体-配体结合与所述细胞培养基质的所述糖胺聚糖结合的步骤。

13. 一种筛选用于癌干细胞群的药物的方法,包括在细胞培养基质上或在细胞培养基质中培养所述癌干细胞的步骤,其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,其中所述凝胶具有在0.1kPa至4.0kPa的范围的值的刚度,并且其中所述癌干细胞包含与所述糖胺聚糖相互作用并且是所述糖胺聚糖的受体的标志物,其中所述糖胺聚糖是透明质酸,并且其中所述标志物是CD44。

14. 包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶作为细胞培养基质的用途,所述细胞培养基质对癌干细胞群具有选择性,其中所述凝胶具有在0.1kPa至4.0kPa的范围的值的刚度,并且其中所述癌干细胞表达通过受体-配体结合与所述糖胺聚糖相互作用的标志物,其中所述糖胺聚糖是透明质酸,并且其中所述标志物是CD44。

15. 细胞培养基质用于筛选抗癌药物的用途,所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,所述细胞培养基质具有在所述细胞培养基质上或在所述细胞培养基质中培养的癌干细胞,其中所述凝胶具有在0.1kPa至4.0kPa的范围的值的刚度,并且其中所述癌干细胞包含与所述糖胺聚糖相互作用并且是所述糖胺聚糖的受体的标志物,其中所述糖胺聚糖是透明质酸,并且其中所述标志物是CD44。

## 培养癌干细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及培养癌干细胞群的方法。本发明还涉及凝胶作为细胞培养基质的用途。

### 背景技术

[0002] 癌干细胞 (CSC) 是癌细胞的亚群 (在肿瘤或血液癌内发现), 就它们能够产生特定癌症中发现的所有细胞类型而言, 它们类似于正常的干细胞。这包括诸如自我更新、癌症的播散或分化成多种类型的癌细胞的特征。这样的细胞据信能够在肿瘤中作为独特的群体持续存在, 由于形成新的肿瘤而导致癌症复发和转移。

[0003] 在癌症治疗中的一个关键挑战将是根除CSC。癌症患者的不良预后和高死亡率据信是由CSC的性质引起的, 所述性质包括自我更新、转移、药物抗性和抗辐射性。常规的抗癌药物可以杀死大量肿瘤细胞但最终不能根除CSC。存活的CSC播散并再生出新的肿瘤细胞, 这与患者的不良预后和复发密切相关。为了开发用于根除CSC并筛选新的抗癌药物的有效方法, 已经在通过对标记有不同的单克隆抗体的癌细胞进行荧光激活的细胞分选 (FACS) 来鉴定和表征CSC方面花费了许多努力。CD44是最常研究的CSC标志物之一。具有CD44<sup>高</sup>/CD24<sup>低</sup>、CD44<sup>高</sup>/CD133<sup>高</sup>、CD44<sup>高</sup>/醛脱氢酶1家族成员A1 (ALDH1A1)<sup>高</sup>和CD44<sup>高</sup>/上皮细胞粘附分子 (EpCAM)<sup>高</sup>的癌症细胞亚群显示药物抗性和肿瘤发生。然而, 这样的群体在培养中通常很小且不稳定, 使得难以进行标准的高通量细胞活力测定。事实上, 通过FACS分选制备的富含CSC的群体在体外培养过程中快速减少。

[0004] 存在着提供一种培养癌干细胞的方法的需求, 该方法克服了或至少改善上述的一种或多种缺点。

[0005] 存在着提供一种能够支持对癌干细胞的选择、维持和繁殖的细胞培养基质的需求。

### 发明内容

[0006] 根据第一个方面, 提供了一种培养癌干细胞群的方法, 该方法包括将所述癌干细胞引入到细胞培养基质之上或之中, 其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式。

[0007] 有利地, 含有与糖胺聚糖相互作用的标志物的癌干细胞可以在凝胶上选择性地培养。标志物的表达水平可以控制癌细胞群在凝胶上的增殖。

[0008] 癌干细胞可以存在于癌细胞系中, 并且因此用于培养癌干细胞的方法也可以用于培养富含癌干细胞的癌细胞系, 所述癌干细胞具有标志物的高表达。因此, 在一个实施方案中, 用于培养癌干细胞群的方法可以包括用于培养癌细胞系的方法, 该方法包括在细胞培养基质上或在细胞培养基质中引入癌细胞系, 其中细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式。

[0009] 凝胶的刚度或交联密度可以改变以促进癌干细胞或癌细胞系的生长和维持。凝胶

的刚度或交联密度还可以影响癌干细胞或癌细胞系对所选的化疗药物的药物抗性。

[0010] 根据第二个方面,提供了一种从多个癌细胞系中选择性分离癌干细胞群的方法,该方法包括以下步骤:(a)使多个癌细胞系接触细胞培养基质,其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式;和(b)使癌干细胞与细胞培养基质相互作用从而从多个癌症细胞系中分离癌症干细胞。

[0011] 根据第三个方面,提供了一种筛选用于癌干细胞群的药物的方法,该方法包括在细胞培养基质上或在细胞培养基质中培养癌干细胞的步骤,其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,并且其中凝胶具有等于或小于100kPa的刚度。

[0012] 根据第四个方面,提供了包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶作为细胞培养基质的用途。

[0013] 根据第五个方面,提供了细胞培养基质用于筛选抗癌药物的用途,所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,所述细胞培养基质具有在细胞培养基质上或在细胞培养基质中培养的癌干细胞。

[0014] 定义

[0015] 在本文中使用的下列词和术语应当具有所指示的含义:

[0016] 术语“癌干细胞标志物”或“标志物”要被广义地解释为指可以用来分离和鉴定癌干细胞的基因和它们的蛋白产物。

[0017] 术语“选择”或“选择性地”以及它们的语法变体要被广义地解释为指从多个癌细胞、癌干细胞或癌细胞系或者多种类型的癌细胞、癌干细胞或癌细胞系的混合物中分离所需类型或目标类型的癌细胞或癌干细胞。

[0018] 词“基本上”不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可以完全不含Y。在需要时,词“基本上”可以从本发明的定义中省略。

[0019] 除非另外指明,术语“包括”和“包含”以及它们的语法变体意在代表“开放式的”或“包含式的”语言使得它们包含所引述的要素而且允许包含另外的未引述的要素。

[0020] 当在本文中使用时,术语“约”,在配方的组分的浓度的语境中,典型地意指所述值的 $\pm 5\%$ ,更典型地所述值的 $\pm 4\%$ ,更典型地所述值的 $\pm 3\%$ ,更典型地,所述值的 $\pm 2\%$ ,甚至更典型地,所述值的 $\pm 1\%$ ,并且甚至更典型地所述值的 $\pm 0.5\%$ 。

[0021] 在本公开全文中,某些实施方案可以以范围格式公开。应当理解以范围格式的描述仅为了方便和简便并且不应当被解释为对公开的范围的固定不变的限制。因此,对范围的描述应当被认为已经具体地公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,对范围诸如1-6的描述应当被理解为已经具体地公开了诸如下列的子范围:1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何这均适用。

[0022] 在本文中某些实施方案还可以宽泛地和概括性地描述。落在上位公开内容内的较窄种类和亚类分组中的每一个也形成本公开的一部分。这包括对具有限制性条款或从上位概念中去除任何主题的负面限制的实施方案的概括性描述,无论本文中是否具体地描述了被去除的材料。

## 具体实施方式

[0023] 现在将公开用于培养癌干细胞群的方法的示例性的、非限制性的实施方案。

[0024] 该方法包括在细胞培养基质之上或之中引入癌干细胞,其中细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式。

[0025] 癌干细胞可以包含标志物(也称为癌干细胞标志物)。

[0026] 癌干细胞可以存在于癌细胞系中,并且因此用于培养癌干细胞的方法也可以用于培养富含癌干细胞的癌细胞系,所述癌干细胞具有癌干细胞标志物的高表达。因此,在一个实施方案中,用于培养癌干细胞群的方法可以包括用于培养癌细胞系的方法,该方法包括在细胞培养基质上或在细胞培养基质中引入癌细胞系,其中细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式。

[0027] 癌干细胞标志物的表达水平可以控制癌细胞群在凝胶上的增殖。癌干细胞标志物的表达水平被定义为单个细胞中癌干细胞标志物分子的数目。表达水平可以被表示为当与比较细胞相比较时癌干细胞标志物的相对表达水平的平均值。平均相对表达水平可以通过流式细胞分析(FACS)来测量。当确定某个细胞(或细胞系)是否具有癌干细胞标志物的“高”表达水平时,癌干细胞标志物的相对表达水平的平均值可以是与比较细胞相比大于20的值。癌干细胞标志物的相对表达水平的平均值可以是与比较细胞比较大于30、大于40、大于50、大于60、大于70、大于80、大于90、大于100、大于110或大于150。表达水平还可以通过测定癌干细胞标志物的mRNA表达水平来获得。作为实例,比较细胞可以是BT-474(ATCC® HTB-20™,获自美国弗吉尼亚州马内萨斯的ATCC)。

[0028] 癌干细胞可以在细胞培养基质上孵育。孵育条件可以是处于约36℃至约37℃的温度,约5分钟至约24小时的持续时间,和在湿化气氛中。作为实例,孵育条件可以是在37℃在5%二氧化碳的湿化气氛中1小时。

[0029] 孵育后,可以去除不与细胞培养基质贴附的任何癌细胞。可以通过用合适的缓冲液洗涤细胞多次来去除未贴附的细胞。可以用示例性的缓冲液诸如磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞1-5次,或洗涤3次。通过洗涤细胞,可以获得高度表达标志物诸如CD44、EpCAM和其他标志物的细胞。

[0030] 癌干细胞标志可以与凝胶中存在的糖胺聚糖相互作用。癌干细胞标志物可以是糖胺聚糖的受体。标志物可以选自:CD44、HA-介导的游走受体(RHAMM)和细胞内粘附分子-1(ICAM-1)。

[0031] 当在凝胶上培养时,癌干细胞的生长和维持可以通过Nanog、Sox-2或EpCAM的mRNA表达来确定。对于Nanog,癌干细胞的mRNA表达水平可以为在聚苯乙烯细胞培养板对照上生长的相同细胞的至少2倍。对于Sox-2,癌干细胞的mRNA表达水平可以为在聚苯乙烯细胞培养板对照上生长的相同细胞的至少1.25倍。对于EpCAM,癌干细胞的mRNA表达水平可以为在聚苯乙烯细胞培养板对照上生长的相同细胞的至少2.25倍。

[0032] 凝胶的刚度或交联密度可以充当对可以在凝胶上培养的癌干细胞(或癌细胞)的选择的备选或额外的控制。凝胶的刚度或交联密度还可以控制确实选择性地在凝胶上生长的癌干细胞(或癌细胞)的生长和/或维持。凝胶的刚度或交联密度还可以影响癌干细胞(或癌细胞)对所选的化疗药物的药物抗性。

[0033] 凝胶的刚度可以是选自以下范围的值:约0.1kPa-约100kPa、约0.1kPa-约1kPa、约

0.1kPa-约2kPa、约0.1kPa-约3kPa、约0.1kPa-约4kPa、约0.1kPa-约5kPa、约0.1kPa-约6kPa、约0.1kPa-约7kPa、约0.1kPa-约8kPa、约0.1kPa-约9kPa、约0.1kPa-约20kPa、约0.1kPa-约30kPa、约0.1kPa-约40kPa、约0.1kPa-约50kPa、约0.1kPa-约60kPa、约0.1kPa-约70kPa、约0.1kPa-约80kPa、约0.1kPa-约90kPa、约1kPa-约10kPa、约2kPa-约10kPa、约3kPa-约10kPa、约4kPa-约10kPa、约5kPa-约10kPa、约6kPa-约10kPa、约7kPa-约10kPa、约8kPa-约10kPa、约9kPa-约10kPa、约10kPa-约100kPa、约20kPa-约100kPa、约30kPa-约100kPa、约40kPa-约100kPa、约50kPa-约100kPa、约60kPa-约100kPa、约70kPa-约100kPa、约80kPa-约100kPa、约90kPa-约100kPa、或约5kPa-10kPa。凝胶的刚度可以是约0.1kPa、0.2kPa、0.4kPa、0.5kPa、1.0kPa、2.5kPa或4.0kPa。

[0034] 凝胶的交联密度可以是选自以下范围的值：约 $1 \times 10^{-6}$ -约 $1 \times 10^{-3} \text{mol/cm}^3$ 、 $1 \times 10^{-5}$ -约 $1 \times 10^{-3} \text{mol/cm}^3$ 、 $1 \times 10^{-4}$ -约 $1 \times 10^{-3} \text{mol/cm}^3$ 、 $1 \times 10^{-6}$ -约 $1 \times 10^{-5} \text{mol/cm}^3$ 或 $1 \times 10^{-6}$ -约 $1 \times 10^{-4} \text{mol/cm}^3$ 。

[0035] 凝胶的储能模量可以是选自以下范围的值：约30-约100,000Pa、约30-约1,000Pa、约30-约10,000Pa、约30-约50,000Pa、约50,000-约100,000Pa、约1,000-约10,000Pa或约10,000-约100,000Pa。

[0036] 凝胶可以是水凝胶。凝胶或水凝胶可以是糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物。糖胺聚糖可以是未硫酸化的糖胺聚糖诸如透明质酸(HA)。取代的苯烷基胺可以是取代的苯甲胺、苯乙胺、苯丙胺、苯丁胺或苯戊胺。

[0037] 在苯烷基胺是苯乙胺的情况下，苯乙胺可以是酪胺诸如间-酪胺或对-酪胺。凝胶可以是酶促交联的凝胶。凝胶可以由HA-酪胺缀合物构成，HA-酪胺缀合物可以使用通过催化剂诸如过氧化氢和辣根过氧化物酶催化的酪胺部分的氧化偶联来形成。

[0038] 在凝胶中，取代度(定义为每100个糖胺聚糖重复单位中取代的苯烷基胺分子的数目)可以为选自以下范围的值：约1-约20、约1-约5、约1-约10、约1-约15、约5-约20、约10-约20或约15-约20。取代度可以为约6。

[0039] 当细胞培养基质或凝胶的刚度小于或等于100kPa或1.0kPa时，癌干细胞可以变成耐受抗癌药物。当存在抗癌药物时，细胞可以具有至少70%活力。抗癌药物可以是顺铂或多柔比星。

[0040] 还提供了从多个癌细胞中选择性分离癌干细胞群的方法，该方法包括以下步骤：

[0041] a. 使多个癌细胞接触细胞培养基质，其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式；和

[0042] b. 使癌干细胞与所述细胞培养基质相互作用从而从多个癌细胞中分离所述癌干细胞。

[0043] 为了使癌干细胞和细胞培养基质之间产生相互作用，步骤(b)可以包括使癌干细胞通过受体-配体结合与细胞培养基质的糖胺聚糖结合的步骤。为了发生受体-配体结合，癌干细胞包含是糖胺聚糖的受体的标志物。

[0044] 癌干细胞标志物的表达水平还可以影响癌干细胞(或含有这种癌干细胞的癌细胞系)与糖胺聚糖结合的能力。

[0045] 还提供了筛选用于癌干细胞群的药物的方法，该方法包括在细胞培养基质上或所述细胞培养基质中培养癌干细胞的步骤，其中所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的

苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,并且其中所述凝胶具有等于或小于100kPa的刚度。刚度可以等于或小于1.0kPa、0.5kPa、0.4kPa、0.2kPa或0.1kPa。

[0046] 还提供了包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶作为细胞培养基质的用途。

[0047] 细胞培养基质可以对癌干细胞群具有选择性。癌干细胞可以表达通过受体-配体结合与糖胺聚糖相互作用的标志物。

[0048] 还提供了细胞培养基质用于筛选抗癌药物的用途,所述细胞培养基质为包含糖胺聚糖和取代的苯烷基胺的缀合物的凝胶的形式,所述细胞培养基质具有在细胞培养基质上或在细胞培养基质中培养的癌干细胞。

[0049] 待被筛选的抗癌药物可以不受特殊的限制,并且可以包括顺铂或多柔比星以及任何其他抗癌药物。

## 附图说明

[0050] 附图图示了公开的实施方案并且用来解释所公开的实施方案的原理。然而,要理解的是附图仅被设计用于举例说明的目的,并且不作为对本发明的限制的定义。

[0051] 图1是示意图,显示了用于支持对含有癌干细胞标志物的癌细胞群的选择和培养的凝胶。

[0052] 图2(a)是在不同浓度的过氧化氢时凝胶的储能模量的图表。结果显示为平均值±标准差(n=3)。图2(b)是显示利用不同浓度的过氧化氢制备的HA-Tyr水凝胶(1.75%(w/v))的交联物之间的交联密度和分子量的图。结果显示为平均值±标准差(n=3-5)。

[0053] 图3是显示对(a)MDA-MB-231、(b)MCF-7和(c)BT-474癌细胞系中含有癌干细胞标志物的癌细胞的量的流式细胞分析(FACS)的多张图表。对所有细胞系进行同种型对照。

[0054] 图4(a)是显示MCF-7、HCC1937和MDA-MB-231细胞的FACS的图表。图4(b)是显示通过实时RT-PCR估计的MCF-7、HCC1937和MDA-MB-231细胞中CD44的相对mRNA表达水平的条形图。结果显示为平均值±标准差(n=3)(\*P≤0.005)。

[0055] 图5是显示(a)MCF-7、(b)HCC1937、(c)MDA-MB-231和(d)BT-474癌细胞在凝胶上的粘附随孵育时间而变的多张图表。结果显示为平均值±标准差(n=4)。

[0056] 图6(a)显示了在接种细胞后24小时粘附于聚苯乙烯对照和不同刚度的凝胶的MDA-MB-231细胞的多张相差显微照片。

[0057] 图6(b)是对聚苯乙烯对照和不同刚度的凝胶上细胞铺展面积的定量分析的图表。结果显示为平均值±标准差(n=25)。

[0058] 图7是显示MDA-MB-231在不同刚度的凝胶上的细胞增殖随孵育时间而变的图表。结果显示为平均值±标准差(n=4)\*P≤0.01。

[0059] 图8(a)是在接种细胞后14天时在HA-Tyr水凝胶(I-V,VII)和聚苯乙烯(VI)上的MDA-MB-231细胞和它们的集落的一系列相差显微照片。各种水凝胶的刚度为0.1kPa(I)和(VII)、0.2kPa(II)、0.5kPa(III)、1kPa(IV)、4kPa(V)。(I)中使用的刻度为300μm,而在(VII)中为100μm。图8(b)显示了使用Image-Pro plus图像软件分析软件从相差显微照片测量的集落的尺寸。结果显示为平均值±标准差(n=4)(\*P≤0.001)。

[0060] 图9是显示在聚苯乙烯对照和不同刚度的凝胶上的MDA-MB-231细胞中Nanog、Sox-



2和EpCAM的相对mRNA表达水平的图表,由此通过实时RT-PCR评价mRNA表达水平。结果显示为平均值±标准差(n=3)。

[0061] 图10(a)是显示CD44(CD44s、CD44v3-10和CD44v8-10)的相对mRNA表达水平的图表。图10(b)是显示通过实时RT-PCR评价的HA-Tyr水凝胶上的MDA-MB-231细胞中CSC标志物诸如Sox-2、EpCAM和ALDH1A1的相对mRNA表达水平的图表。结果显示为平均值±标准差(n=3) (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01, \*\*\*P≤0.001)。

[0062] 图11是显示由于存在针对CD44的封闭抗体而防止了MDA-MB-231细胞在HA-Tyr水凝胶上粘附的图表。

[0063] 图12(a)是显示MDA-MB-231细胞中CD44(CD44s、CD44v3-10、CD44v8-10)、EpCAM和ALDH1A1的相对mRNA表达水平的图表,这些细胞是细胞接种1小时随后用PBS洗涤3次后选择的。图12(b)是显示MDA-MB-231细胞中CD44v8-10的相对mRNA表达水平的图表,这些细胞是细胞接种1小时随后用PBS洗涤3次后、在HA-Tyr水凝胶上14天后选择的。mRNA表达水平通过实时RT-PCR评价。结果显示为平均值±标准差(n=3) (\*P≤0.05, \*\*P≤0.01)。

[0064] 图13(a)是显示在顺铂的存在下MDA-MB-231细胞的活力的图表。结果显示为平均值±标准差(n=4)。

[0065] 图13(b)是显示在多柔比星的存在下MDA-MB-231细胞的活力的图表。结果显示为平均值±标准差(n=4)。

#### 具体实施方式

[0066] 附图详述

[0067] 参照图1,提供了显示用于支持含有癌干细胞标志物的癌细胞群4的选择和培养的凝胶2的示意图。

[0068] 在图1中,由HA-酪胺缀合物构成的凝胶2使用通过过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和辣根过氧化物酶(HRP)催化的酪胺部分的氧化偶联来形成。当多个癌细胞(4,6)暴露于凝胶2时,仅那些具有癌干细胞标志物的高表达水平的细胞4将粘附于凝胶2。不具有癌干细胞标志物的高表达水平的那些细胞6将不粘附于凝胶2。因此,通过在凝胶2的存在下培养多个癌细胞,这使得能够从低表达的癌细胞6中选择出高表达的癌细胞4并与之分离开。

[0069] 实施例

[0070] 通过参照具体实施例进一步更详细地描述本发明的非限制性实施例,所述具体实施例不应当被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0071] 透明质酸钠(HA)(Mw=90kDa,密度=1.05g/cm<sup>3</sup>)由JNC Corporation(东京,日本)馈赠。酪胺盐酸盐(Tyr·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、来自牛睾丸的透明质酸酶(400-1,000单位/mg)和顺铂全部购自Sigma-Aldrich(美国明尼苏达州)。辣根过氧化物酶(HRP,100单位/mg)购自Wako Pure Chemical Industries(大阪,日本)。过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)获自Lancaster。多柔比星获自Boryung pharmaceutical(首尔,韩国)。AlamarBlue, CyQUANT<sup>®</sup>细胞增殖测定试剂盒、TRIzol<sup>®</sup>和Taqman<sup>®</sup>基因表达master mix分别由Life Technologies(Singapore)提供。针对人CD44的小鼠单克隆抗体和FITC-缀合的大鼠抗小鼠IgG2a二抗获自GeneTex(新竹,台湾)。大鼠抗CD44单克隆抗体(Hermes-1)购自Abcam(剑桥,英国)。胰蛋白酶-EDTA(0.025%)和青霉

素/链霉素购自PAN Biotech GmbH(艾登巴赫,德国)。热灭活的胎牛血清(FBS)购自GEHealthcare(白金汉郡,英国)。磷酸盐缓冲盐水(PBS,150mM,pH 7.3)、Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)和RPMI-1640培养基所有均由位于Biopolis(新加坡)的培养基制剂工厂提供。

[0072] MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937和BT-474乳腺癌细胞系购自美国菌种保藏中心(马纳萨斯,美国弗吉尼亚州)。MDA-MB-231、HCC1937和BT-474细胞生长在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基中。MCF-7细胞生长在含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的DMEM中。所有细胞系培养在聚苯乙烯组织培养瓶上,并且当达到80%汇合时传代。

[0073] 统计学分析:所有数据表示为均数+标准差(SD)。除非另外说明,值之间的差异使用SigmaStat软件(Systat Software, Inc.)使用t检验评估; $p < 0.05$ 被认为统计学显著。所有试验一式三份地进行。

[0074] 实施例1

[0075] HA-酪胺凝胶的合成

[0076] 酶法交联的由HA-酪胺缀合物构成的HA凝胶使用通过 $H_2O_2$ 和HRP催化的酪胺部分的氧化偶联来形成。在此,将HRP和具有不同浓度的 $H_2O_2$  (0.22mM-1.15mM的 $H_2O_2$ )的溶液加入到HA-Tyr缀合物(3%w/v,在PBS中175 $\mu$ l)中。将适宜量的PBS加入至混合物中使得混合物的总体积为300 $\mu$ l。HA-Tyr缀合物和HRP的终浓度分别为1.75% (w/v) 和0.125单位/ml。将混合物立即涡旋。

[0077] 取代度(每HA的100个重复单位中酪胺分子的数目)通过 $^1H$  NMR测定为6。

[0078] 凝胶的刚度和凝胶形成率可以分别通过 $H_2O_2$ 和HRP浓度独立地来调节。

[0079] 凝胶的流变学测量利用HAAKE Rheoscope 1流变仪(卡尔斯鲁厄,德国)使用3.5cm直径和0.949°锥角的锥板几何形状进行。在37°C以动态振荡模式以1%的恒定变形和1Hz的频率取测量值。为了避免在测量期间样品的滑动,使用粗糙的玻璃底板。将250 $\mu$ l如上制备的凝胶混合物涂在流变仪的底板上。然后将上锥下降至0.025mm的测量间隙,并在锥的周围小心地涂上一层硅油以防止实验期间溶剂蒸发。使流变学测量继续进行直至储能模量( $G'$ )达到稳定水平。

[0080] 如在图2(a)中所见,当利用HA-Tyr缀合物的水溶液(1.75% (w/v))时,HA-Tyr凝胶的 $G'$ 被 $H_2O_2$ 浓度良好地控制,并且范围是70-4,000Pa。 $G'$ 随着 $H_2O_2$ 浓度从0.22mM增加至1.15mM而增加,表明当 $H_2O_2$ 浓度增加时达到较高的交联密度。

[0081] 测定HA-Tyr水凝胶的交联物之间的平均分子量( $M_c$ )和交联密度( $v_e$ )。从储能模量( $G'$ )测量的结果,通过橡胶弹性理论计算交联物之间的平均分子量( $M_c$ )和交联密度( $v_e$ )。如图2(b)中所示,HA-Tyr水凝胶的 $M_c$ 随着 $H_2O_2$ 浓度增加而减小,而HA-Tyr水凝胶的 $v_e$ 随着 $H_2O_2$ 浓度增加而增加。

[0082] 为了评价癌细胞粘附(实施例2)、增殖(实施例3)、维持(实施例4)、对HA-CD44相互作用的抑制(实施例5)和药物抗性(实施例6),使用不同刚度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.5和4.0kPa,在适当的情况下)的许多凝胶。如将从下面的实施例所见,在HA-Tyr水凝胶上的乳腺癌细胞粘附强烈地受水凝胶的刚度调节,并且依赖于CD44-HA相互作用。与聚苯乙烯相比,HA-Tyr水凝胶在维持圆形细胞形态、低细胞增殖和集落形成方面提供了不同的培养环境。HA-Tyr水凝胶的性能超过聚苯乙烯,更好地增强了CD44变体同种型、Sox-2和

ALDH1A1 mRNA 表达水平。水凝胶的机械性能 (诸如水凝胶的组分和刚度) 以及 CD44 变体同种型的表达水平是影响癌细胞的细胞粘附、增殖和恶性的因素。控制 HA-Tyr 水凝胶的刚度是改变乳腺癌细胞的恶性的简单和有效的方式。

[0083] 实施例2

[0084] 癌细胞粘附

[0085] 研究了4种类型的乳腺癌细胞系诸如MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937和BT-474。为了检验这些癌细胞系中CD44阳性细胞的群体,对CD44表面表达进行流式细胞分析(FACS)。

[0086] 在FACS中,用PBS洗涤细胞,然后通过使用胰蛋白酶-EDTA收获细胞。然后用含有2%FBS的PBS洗涤脱离的细胞,将细胞与抗-CD44抗体在冰上孵育30分钟。在用含有2%FBS的PBS洗涤后,将缀合有异硫氰酸荧光素(FITC)的二抗以生产厂商推荐的浓度加入至细胞悬液,并在暗处在冰上孵育30分钟。然后将细胞洗涤两次并重悬在0.5ml含有2%FBS的PBS中。然后使用BD LSRII流式细胞分析仪(BD Biosciences,美国新泽西州)分析和分选细胞。

[0087] 如图3中所示,可以看到使用FACS在MDA-MB-231(图3(a))、MCF-7(图3(b))和BT-474(图3(c))中分别检测到99.5%、44.2%和0.5%的CD44阳性细胞。MDA-MB-231、HCT116和MCF-7细胞的CD44蛋白表达水平(平均值)是BT-474细胞的103、12和5倍。

[0088] 另外,当在MDA-MB-231、MCF-7、HCC1937之间比较时,可以看到使用FACS检测到在MDA-MB-231细胞上有CD44蛋白的高表达水平,在HCC1937细胞上有中等表达水平,在MCF7细胞上有低表达水平(图4(a))。CD44表达水平被定义为在单个细胞中CD44分子的数目。在这些乳腺癌细胞系之间CD44的不同表达水平基于细胞表面上的蛋白表达水平(图4(a))以及mRNA表达水平(图4(b))进行评价。MDA-MB-231和HCC1937细胞中CD44的mRNA表达水平是MCF-7细胞的8.5和4.5倍。这些结果与图4(a)中所示的CD44蛋白表达水平的结果密切相关。

[0089] 然后研究这些细胞系至HA-Tyr凝胶的表面的癌细胞粘附。在24孔板中制备具有不同刚度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.5和4.0kPa,在适当的条件下)的HA-Tyr凝胶(250 $\mu$ l)。使凝胶沉降过夜。然后用PBS洗涤凝胶三次,并用培养基洗涤一次。将处于培养基中细胞密度为 $1.0 \times 10^5$ 细胞/ml的250 $\mu$ l乳腺癌细胞接种在凝胶上。

[0090] 将培养板返回至孵箱(在37 $^{\circ}$ C在5%CO<sub>2</sub>的湿化气氛中)持续1-9小时的适宜时段。在选择的时间间隔,吸取含有未贴壁的细胞的培养基,并用PBS洗涤孔三次。没有凝胶的细胞培养板用来比较。

[0091] 对于MDA-MB-231、MCF-7和HCC1937,使用CyQUANT<sup>®</sup>细胞增殖测定试剂盒对DNA进行定量以评价贴壁细胞的数目。遵循生产厂商推荐的测定实验规程。通过分别与透明质酸酶(1,000单位/ml)和胰蛋白酶-EDTA孵育收获HA-Tyr水凝胶和聚苯乙烯上的细胞。用PBS洗涤细胞片状沉淀物两次,并通过冷冻-复温循环裂解。然后,将样品溶解在200 $\mu$ l CyQUANT工作液中。然后通过对样品溶液的荧光测量以及基于标准曲线的细胞悬液的已知密度确定细胞的数目。使用微量板读数仪分别利用在480和520nm处的激发光和发射光进行荧光测量。

[0092] 对于BT-474,将贴附于凝胶的细胞在含有10%Alamar Blue染料的培养基中在37 $^{\circ}$ C孵育4小时。使用微量板读数仪分别利用在545和590nm处的激发光和发射光进行对Alamar Blue染料的荧光测量。然后,将100 $\mu$ l Alamar Blue溶液转移到96孔板以测量荧光强度。在此研究中Alamar blue染料的荧光强度被认为是贴附细胞的数目。

[0093] 图5显示HA-Tyr凝胶的表面的细胞粘附。大量MDA-MB-231细胞贴附于HA-Tyr凝胶的表面(图5(c))。贴附的MDA-MB-231细胞数取决于HA-Tyr水凝胶刚度,并且贴附的细胞数随着水凝胶刚度减小而增加。图5(a)和图5(b)还显示MCF-7和HCC1937的细胞粘附分别随着水凝胶刚度减小而增加。图5(a)至图5(c)显示HA-Tyr水凝胶上贴附的细胞数目似乎与CD44表达水平密切相关(图4)。HA-Tyr水凝胶上的乳腺癌细胞粘附随着CD44的表达水平增加而增加。这些结果强烈提示在HA-Tyr水凝胶上的细胞粘附取决于HA和CD44之间的相互作用。

[0094] 相比,仅少量BT-474细胞贴附在HA-Tyr凝胶上(图5(d))。这些结果表明CD44表达水平和/或水凝胶的刚度是影响癌细胞在水凝胶上粘附的因素。通常,CD44的表达水平越高和/或水凝胶刚度越小,则至水凝胶的细胞粘附程度越高。

[0095] 实施例3

[0096] 癌细胞增殖

[0097] 为了确定贴附的MDA-MB-231细胞的细胞形态,使用装配到IX71倒置显微镜(东京,日本)上的Olympus显微镜照相机来获得相差显微照片。参照图6(a),观察到所有贴附的MDA-MB-231细胞是圆形的,无论凝胶刚度为多少,同时观察到许多其他细胞铺展在聚苯乙烯培养瓶上。

[0098] 使用Image-Pro Plus图像分析软件(来自美国马里兰)分析细胞铺展面积。细胞铺展面积显示在图6(b)中,图6(b)清晰地揭示了HA-Tyr凝胶上的细胞铺展面积显著小于聚苯乙烯上的细胞铺展面积,而在各种刚度的各种HA-Tyr凝胶上的细胞铺展面积之间没有显著差异。这些结果表明通过CD44和HA-Tyr凝胶之间的相互作用的细胞粘附可以维持圆形的MDA-MB-231细胞。

[0099] 为了评价各种凝胶(0.1、0.2、0.5、1.0和4.0kPa)上的细胞增殖,将处于培养基中的细胞密度为 $1.0 \times 10^5$ 细胞/ml的250 $\mu$ l MDA-MB-231细胞接种在凝胶上。没有凝胶的细胞培养孔板用来比较。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>的湿化气氛中孵育。培养基每3天更换。为了评价水凝胶上的细胞增殖,使用CyQUANT<sup>®</sup>细胞增殖测定试剂盒如上所述进行荧光测量。

[0100] 如图7中所示,在HA-Tyr凝胶上培养的MDA-MB-231细胞的生长速率比在培养板上培养的细胞的生长速率慢得多。在13天期间,仅刚度为0.1kPa、0.2kPa和0.5kPa的软HA-Tyr凝胶显示细胞生长,而从其他刚度的HA-Tyr凝胶没有观察到细胞生长。

[0101] 这些结果,包括HA-Tyr凝胶的细胞贴附和增殖,与培养板的结果明显不同。这表明MDA-MB-231细胞中表达的CD44与HA-Tyr凝胶中的HA链相互作用。

[0102] 为了进一步研究HA-Tyr水凝胶上的MDA-MB-231乳腺癌细胞的行为,评价了HA-Tyr水凝胶上的集落形成(图8)。圆形的MDA-MB-231细胞在14天后在HA-Tyr水凝胶上形成了集落(图8a I-V,XII),而在聚苯乙烯上没有观察到集落。随着HA-Tyr水凝胶刚度的减小集落的尺寸增加。

[0103] 实施例4

[0104] HA-Tyr水凝胶增强癌干细胞标志物的表达水平

[0105] 研究了在HA-Tyr凝胶(0.2、0.5、1.0和4.0kPa刚度)上培养13天后MDA-MB-231细胞中的Nanog、Sox-2和EpCAM的mRNA表达水平。另外,还研究了HA-Tyr水凝胶(0.1、0.2、0.5、1.0和4.0kPa刚度)上的MDA-MB-231细胞中CD44s(CD44标准品)、CD44v3-10(CD44变体同种

型)、CD44v8-10 (CD44变体同种型)、Sox-2、EpCAM和ALDH1A1基因的转录水平。

[0106] 在此,将处于培养基中的细胞密度为 $1.0 \times 10^5$ 细胞/ml的250 $\mu$ l MDA-MB-231细胞接种在凝胶上。没有凝胶的细胞培养孔板用来比较。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>的湿化气氛中孵育。培养基每3天更换。

[0107] 通过用透明质酸酶(1,000单元/ml)和胰蛋白酶-EDTA处理来收集各种HA-Tyr水凝胶上的MDA-MB-231细胞用于随后的RNA提取。在培养13天后MDA-MB-231细胞的总RNA使用TRIzol (Life technologies,新加坡)提取。为了制备cDNA,将总RNA与含有RT缓冲液、随机六聚体引物、脱氧三磷酸核苷(dNTP)混合物、核糖核酸酶抑制剂和逆转录酶的RT反应混合物(Thermo Scientific,中国)孵育,接着进行脱氧核糖核酸酶处理。

[0108] 使用iQ5多色RT PCR检测系统(Bio-Rad laboratories,新加坡)进行实时定量PCR。反应混合物(Life technologies,新加坡)含有10 $\mu$ L TaqManPCR master mix、1.0 $\mu$ L每种引物、2.0 $\mu$ L cDNA和7.0 $\mu$ L蒸馏水。使用的各种引物为Hs01075861\_m1(全CD44)、Hs01081473\_m1(CD44s)、Hs01081480\_m1(CD44v3-v10)、Hs01081475\_m1(CD44v8-v10)、Nanog(Hs02387400\_s1)、Sox-2(Hs01053049\_s1)、EpCAM(Hs00901885\_m1)和ALDH1A1(Hs00946916\_m1)。用于PCR的加热方案为95℃20秒,40个循环的95℃3秒和60℃20秒。在所有随后使用 $\Delta - \Delta C_t$ 法的计算中使用三次实验的平均阈值循环(Ct)值,并且结果表示为对内源参照基因(GAPDH)归一化并相对于未处理对照(聚苯乙烯板)的基因表达的变化倍数。

[0109] 如图9中所示,观察到来自刚度为0.2kPa的HA-Tyr凝胶的Nanog、Sox-2和EpCAM的mRNA表达水平显著高于来自其他培养板的那些。其他凝胶显示了显著较高的mRNA表达水平,除了Sox-2以外。Nanog和Sox-2已知是干性标志物,并且那些转录因子诱导抗凋亡蛋白表达和药物抗性。此外,ESA(是CSC标志物之一)表达的增强表明在HA-Tyr凝胶上粘附的MDA-MB-231细胞是CSC。

[0110] 如在图10中所示,在HA-Tyr水凝胶上CD44v3-10和CD44v8-10的mRNA表达水平显著高于在聚苯乙烯上的表达水平,而CD44s的表达水平与在聚苯乙烯上的几乎相同。有趣的是,CD44v3-10和CD44v8-10的增强表达水平随着HA-Tyr水凝胶刚度的增加而增加(图10a)。这些结果显示HA-Tyr水凝胶可以以水凝胶刚度依赖的方式增强CD44v3-10和CD44v8-10的表达水平,但不增强CD44s表达水平。因此,结果强烈地提示HA-Tyr水凝胶诱导乳腺癌细胞的恶性性质。

[0111] 此外,HA-Tyr水凝胶上的Sox-2和ALDH1A1的mRNA表达水平与聚苯乙烯上的那些相比在HA-Tyr水凝胶上也显著增强(图10b)。ALDH1A1的表达水平不依赖于HA-Tyr水凝胶的水凝胶刚度。此结果表明CD44-HA相互作用以刚度不依赖性方式增强ALDH1A1表达。在Sox-2的情况下,在0.2和0.5kPa HA-Tyr水凝胶上mRNA表达水平显著增加。此外,ALDH1A1(是CSC标志物之一)表达的增强表明在HA-Tyr水凝胶上粘附的MDA-MB-231细胞诱导CSC性质。

[0112] 因此,显示基于HA的细胞培养基质可以用于CSC的选择、培养和维持。

[0113] 实施例5

[0114] 评价了使用抗CD44抗体抑制在HA-Tyr水凝胶上的MDA-MB-231细胞粘附。MDA-MB-231细胞用PBS洗涤并使用胰蛋白酶-EDTA从细胞培养瓶收获。脱落的细胞用不含FBS的RPMI-1640培养基洗涤,并且与30 $\mu$ g/ml抗CD44抗体在冰上孵育1小时。没有抗CD44抗体的细胞悬液用作比较。在用不含FBS的RPMI-1640培养基洗涤后,将处于培养基中的细胞密度为

$1.0 \times 10^5$  细胞/ml 的 250  $\mu$ l MDA-MB-231 细胞接种在 0.1 kPa HA-Tyr 水凝胶上, 0.1 kPa HA-Tyr 水凝胶以如上所述的相似方式在 24 孔板中制备。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 在 5% CO<sub>2</sub> 的湿化气氛中孵育 1 小时。在此之后, 吸取含有未贴壁细胞的培养基, 并用 PBS 洗涤孔三次。为了评价 HA-Tyr 水凝胶上贴附细胞的数目, 使用 CyQUANT<sup>®</sup> 细胞增殖测定试剂盒如上所述进行荧光测量。

[0115] 如图 11 中所示, 与未处理对照相比, 用抗 CD44 抗体预处理大幅度减少至 0.1 kPa HA-Tyr 水凝胶的贴附细胞的百分比。因此, 可以看出 HA-Tyr 水凝胶上的细胞粘附主要通过 HA 链与 CD44 受体的相互作用介导。

[0116] 实施例 6

[0117] 癌细胞选择和维持

[0118] 为了评价癌细胞选择, 分析 HA-Tyr (0.1、0.2、0.5、1.0 和 4.0 kPa) 上贴附的 MDA-MB-231 细胞中 CD44s、CD44v3-10、CD44v8-10、EpCAM 和 ALHD1A1 基因的转录水平。将处于培养基中的细胞密度为  $1.0 \times 10^5$  细胞/ml 的 250  $\mu$ l 乳腺癌细胞接种在水凝胶上。将它们在 37 $^{\circ}$ C 在 5% CO<sub>2</sub> 的湿化气氛中孵育 1 小时, 接着用 500  $\mu$ l PBS 洗涤三次以去除未贴附的细胞。因此, 与实施例 4 相比, 在此使用了额外的洗涤步骤。通过分别与透明质酸酶 (1,000 单位/ml) 和胰蛋白酶-EDTA 孵育收获 HA-Tyr 水凝胶和聚苯乙烯上的细胞。用 PBS 洗涤细胞片状沉淀物两次, 并将其用于测量 mRNA 表达水平。

[0119] 在 4 kPa HA-Tyr 水凝胶上 CSC 标志物诸如 CD44s、CD44v3-10、CD44v8-10、EpCAM 和 ALHD1A1 的 mRNA 表达水平显著高于在聚苯乙烯上的表达水平 (图 12 (a))。特别地, CD44v8-10 水平显著高于在聚苯乙烯上的水平, 甚至在软 (0.1 和 0.2 kPa) HA-Tyr 水凝胶上。由于对活性氧 (ROS) 的抗性, CD44v8-10 已经被充分研究了与乳腺癌转移的相关性。EpCAM 和 ALDH1A1 还充分已知与 CSC 性质相关。因此, 这些结果支持下面的假设: 具有可调的刚度的 HA-Tyr 水凝胶可以用于选择 CSC 细胞。此外, 在 4 kPa HA-Tyr 水凝胶上 CD44v8-10 的 mRNA 表达水平在 14 天后得到维持 (图 12 (b))。在 0.1 和 0.2 kPa HA-Tyr 水凝胶的情况下, CD44v8-10 的 mRNA 表达水平在 14 天后显著增强。这些结果表明在 HA-Tyr 水凝胶上所选的癌细胞的性质不仅得到维持而且得到增强。另外, 额外洗涤步骤的使用得到了高度表达 CD44、EpCAM 和其他标志物的细胞。

[0120] 实施例 7

[0121] 癌症细胞的药物抗性

[0122] 为了评价药物抗性, 在存在或不存在常规抗癌药物诸如顺铂和多柔比星的情况下测量在 HA-Tyr 凝胶上的 MDA-MB-231 细胞活力。在此, 将处于培养基中的细胞密度为  $5.2 \times 10^3$  细胞/ml 的 250  $\mu$ l MDA-MB-231 细胞接种在凝胶 (0.2、0.5、1.0、2.5 和 4.0 kPa) 上。培养基每 3 天更换。细胞接种 10 天后, 将 10-100  $\mu$ M 顺铂或多柔比星加入至凝胶上的培养细胞并孵育 48 小时。然后, 用 PBS 洗涤细胞并如上所述使用 AlamarBlue 细胞活力测定测量荧光强度。在抗癌药物的存在下的细胞活力相对未处理对照组 (0  $\mu$ M) 进行归一化。

[0123] 在顺铂的存在下, 在培养板上的 MDA-MB-231 细胞活力以剂量依赖的方式下降 (参见图 13 (a))。相比, 与细胞培养板相比, 在测试浓度范围内, HA-Tyr 凝胶显示出高得多的细胞活力。值得注意的是, 当 HA-Tyr 具有 0.5 和 1 kPa 时, 在甚至 100 mM 顺铂时细胞活力几乎为 100%。

[0124] 在多柔比星的存在下观察到类似的趋势(图13(b))。甚至在100 $\mu$ M多柔比星的存在下,在0.2和0.5kPa凝胶上保持约80%活力,而在细胞培养板和HA-Tyr凝胶(2.5和4.0kPa)上分别观察到大约10%和20%细胞活力。这些结果清晰地显示HA-Tyr(特别是软凝胶)显著地诱导药物抗性。

[0125] 应用

[0126] 所公开的方法可以用于细胞培养应用以培养所需的癌干细胞或含有癌干细胞的癌细胞系。

[0127] 所公开的方法可以用来从多个不同癌细胞或不同癌细胞的混合物中选择性地分开并由此分离所需的癌干细胞(或癌细胞系)。

[0128] 所公开的凝胶可以用来支持所需的癌干细胞的选择和生长。所公开的凝胶以及癌干细胞可以用作用于癌症疗法的药物筛选平台以确定癌干细胞对其具有药物抗性的抗癌药物或对癌干细胞具有治疗效应的抗癌药物。

[0129] 所公开的方法和凝胶可以用来通过受体-配体结合选择性地分离含有所需的标志物的癌干细胞。

[0130] 显然在不背离本发明的精神和范围的前提下,在阅读前述公开后,对本领域技术人员来说对本发明的各种其他修改和适应性改动是显而易见的,并且意在所有这些修改和适应性改动在附带的权利要求的范围内。

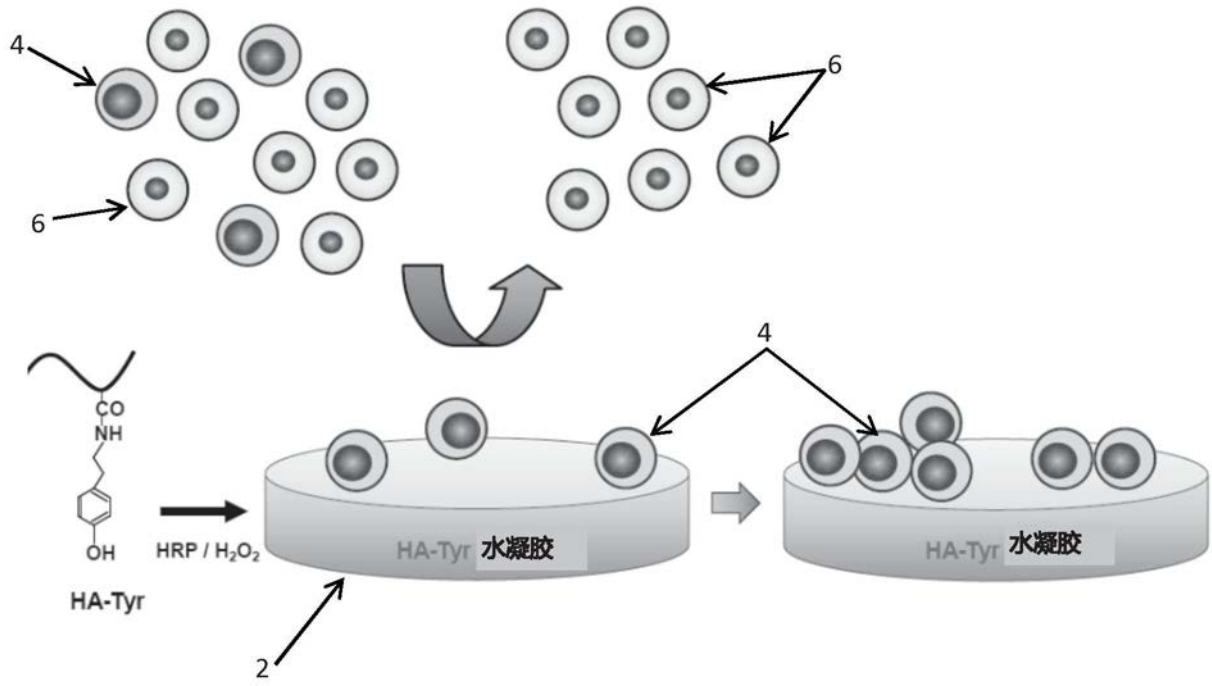


图1

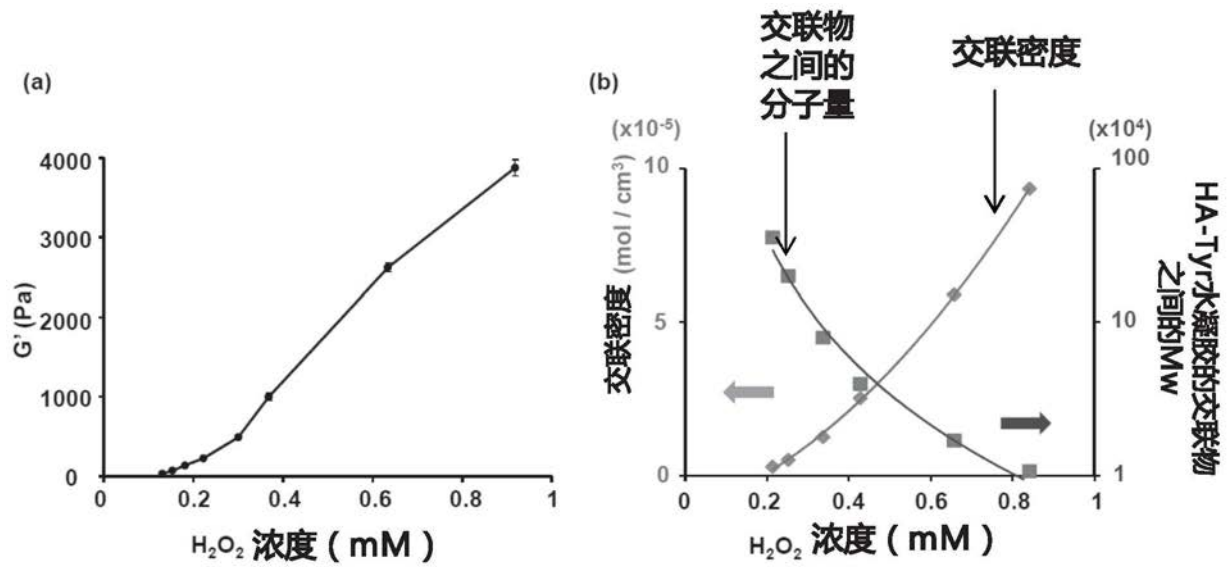


图2



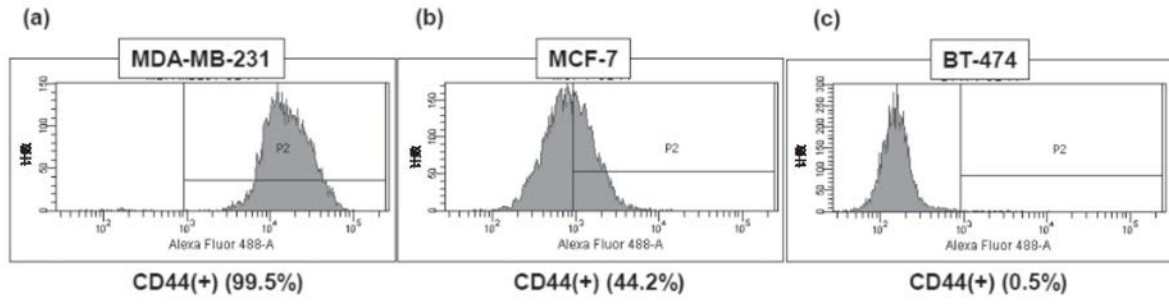


图3

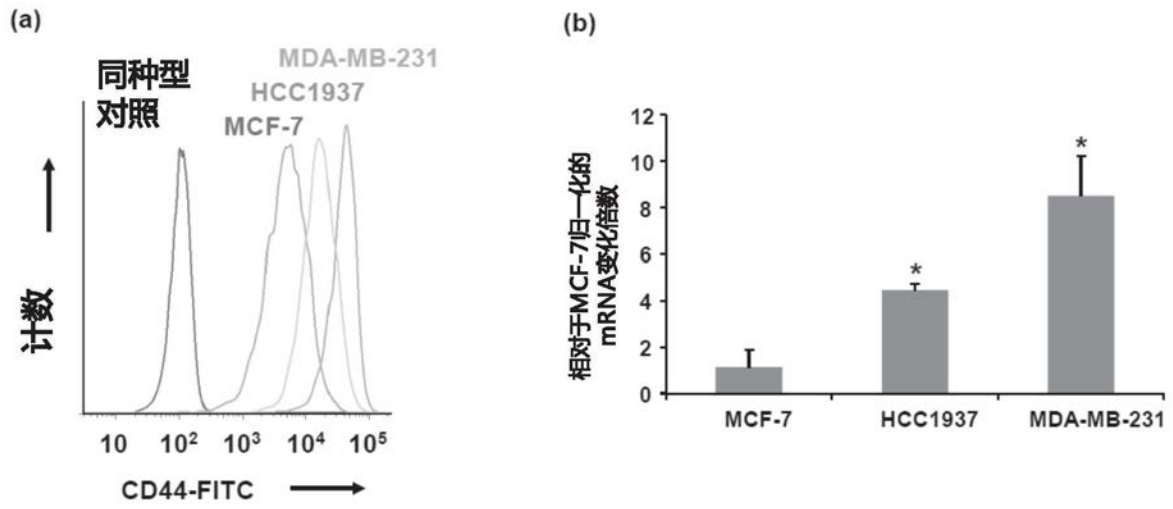


图4

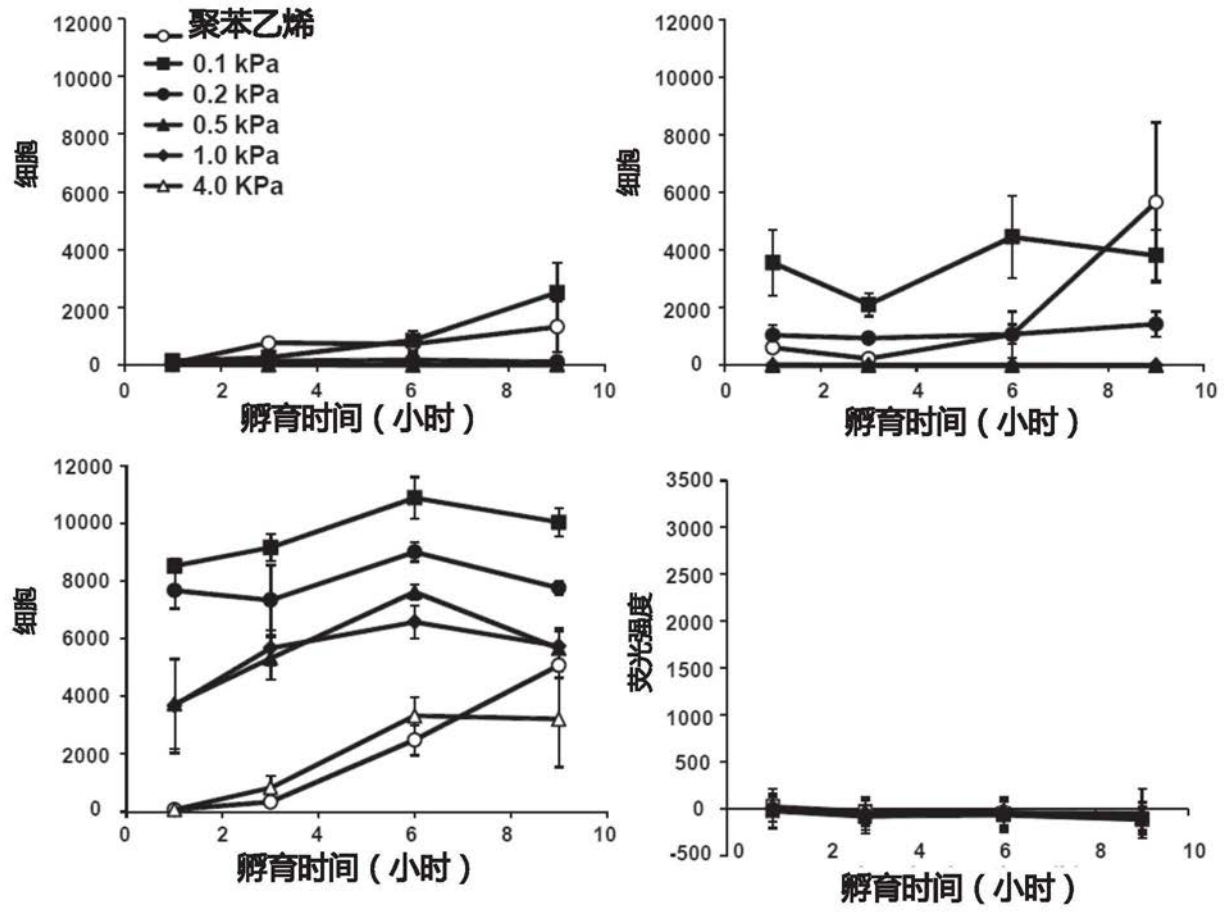


图5

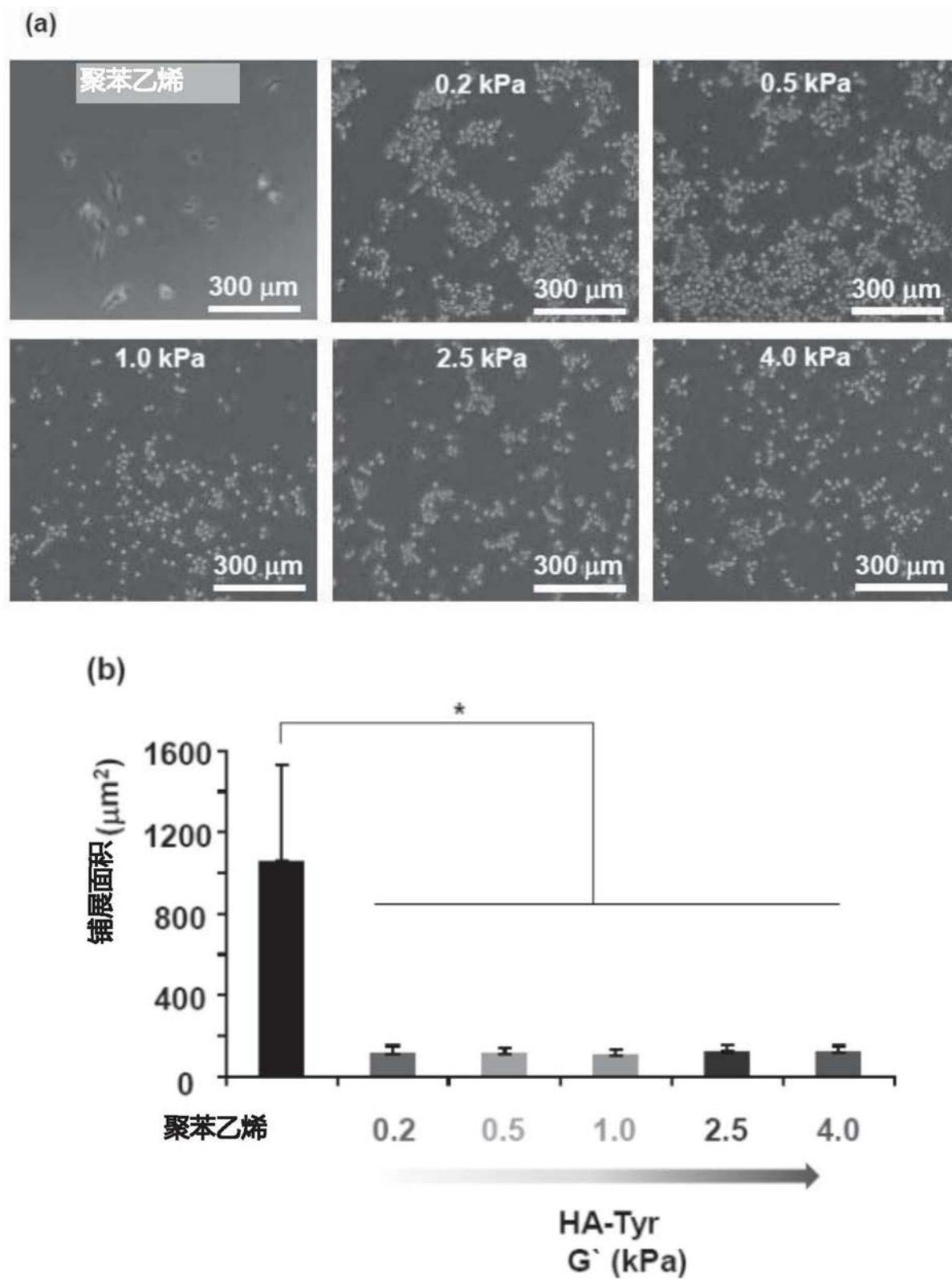


图6

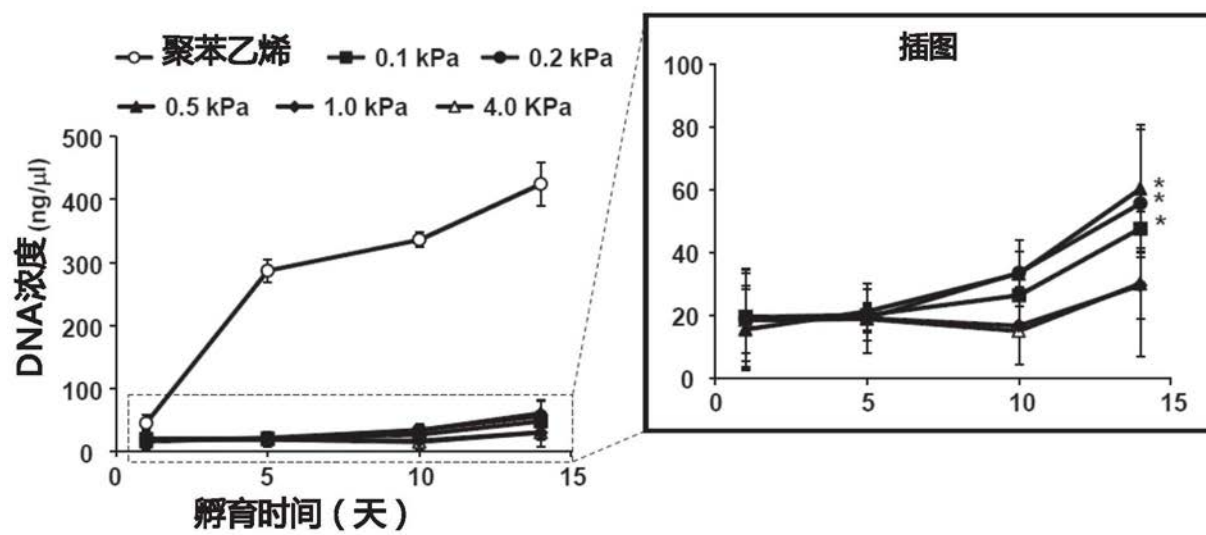


图7

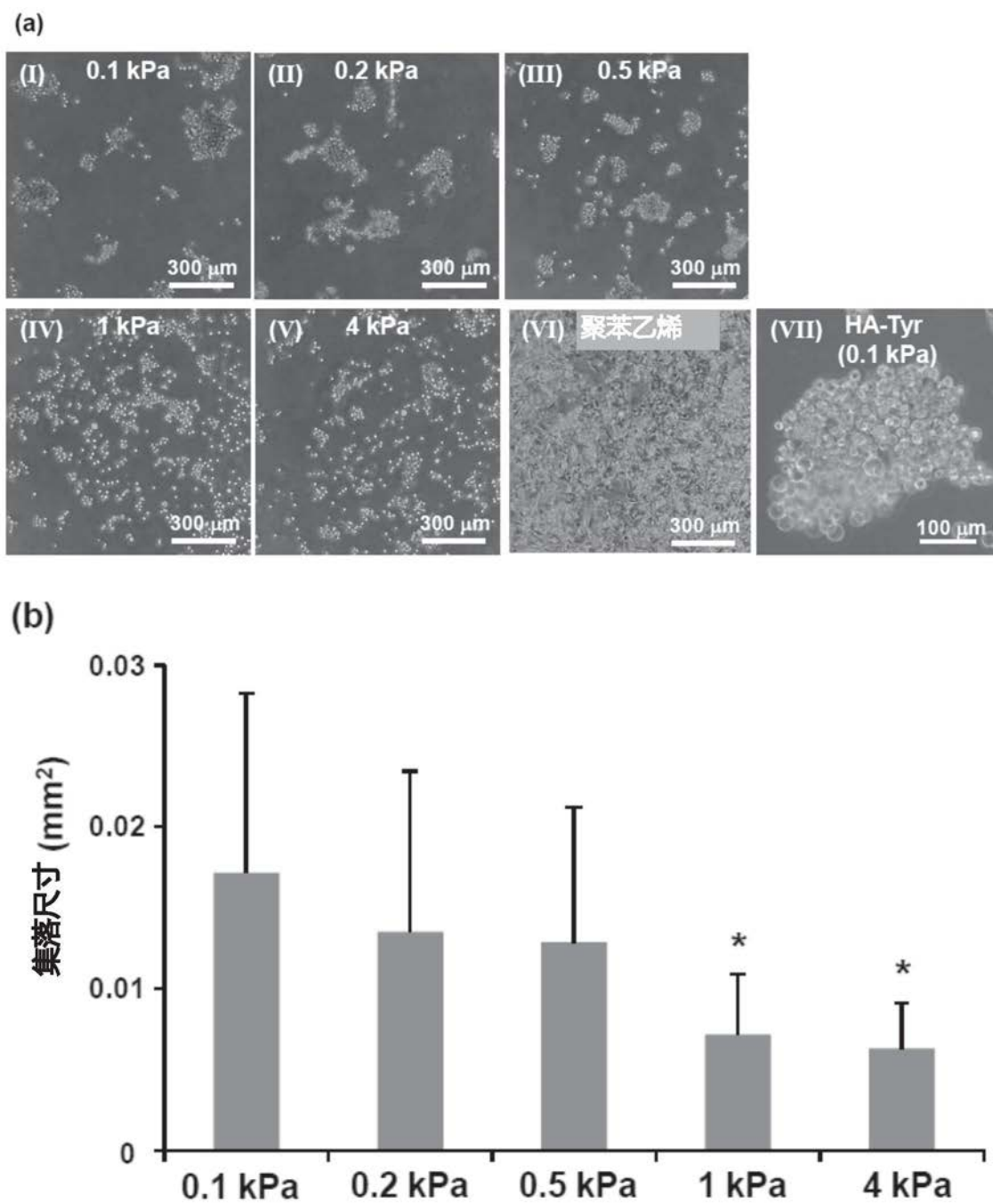


图8

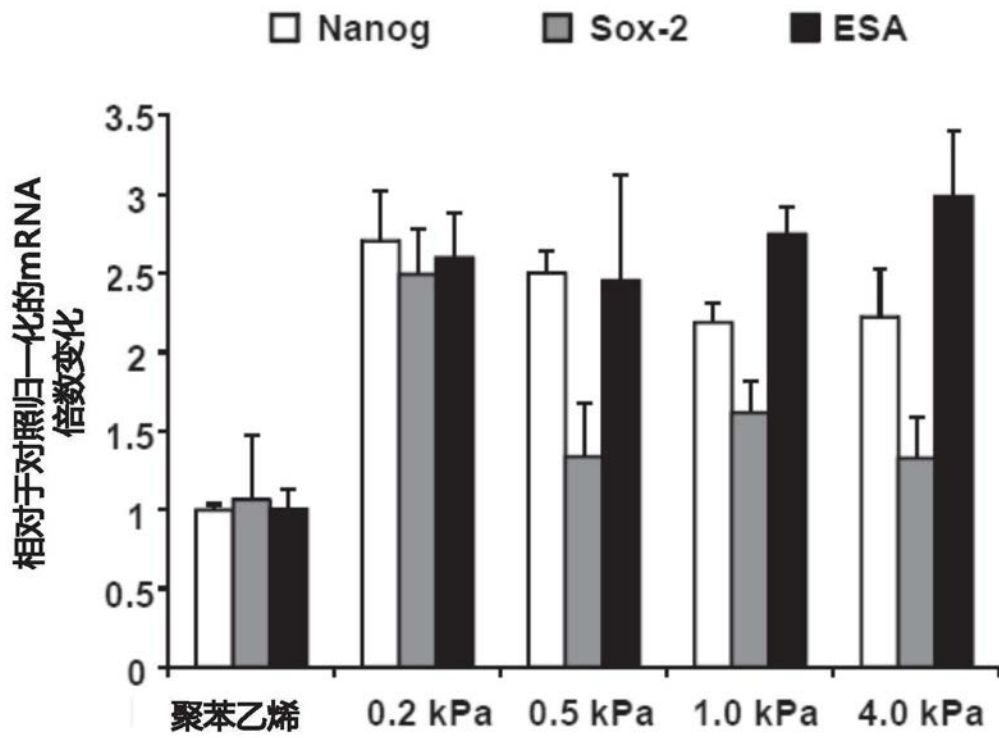


图9

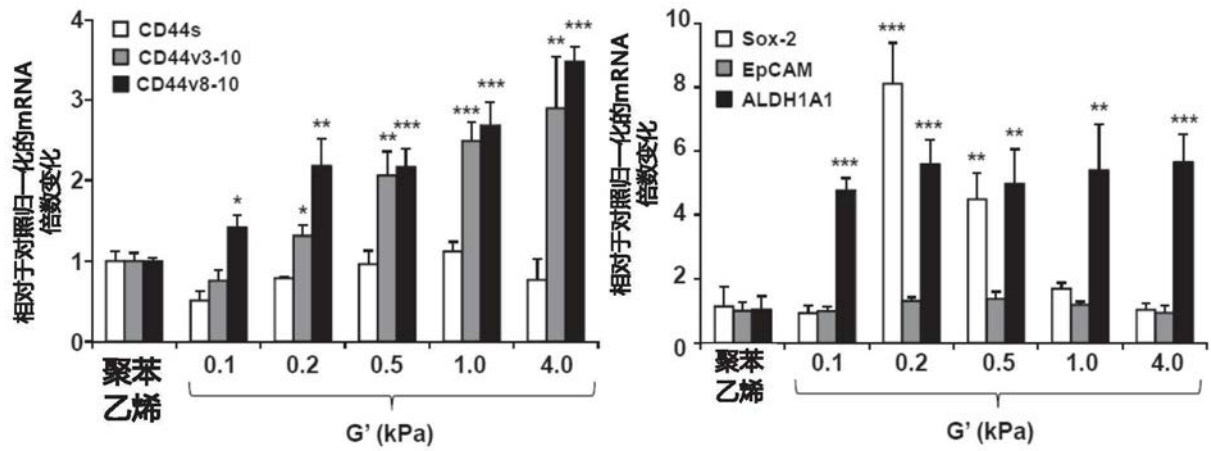


图10

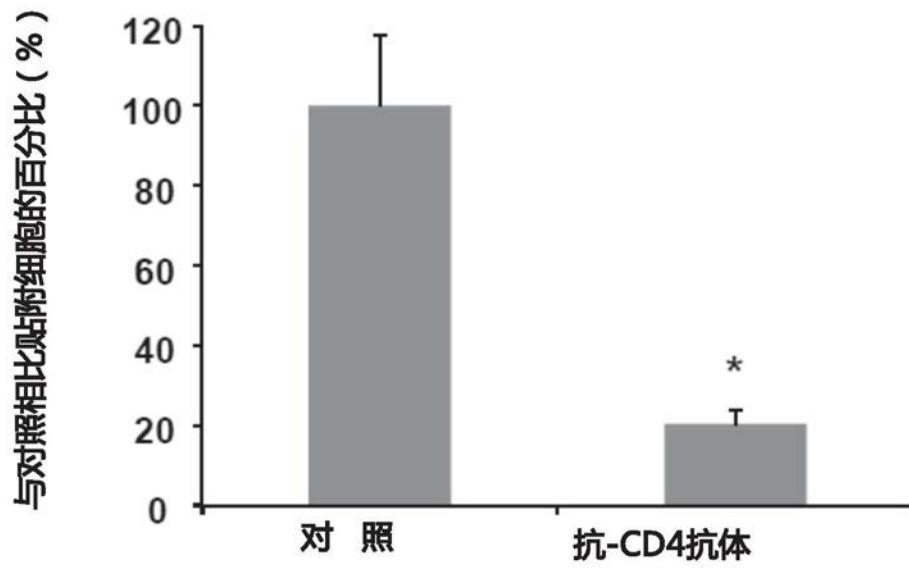
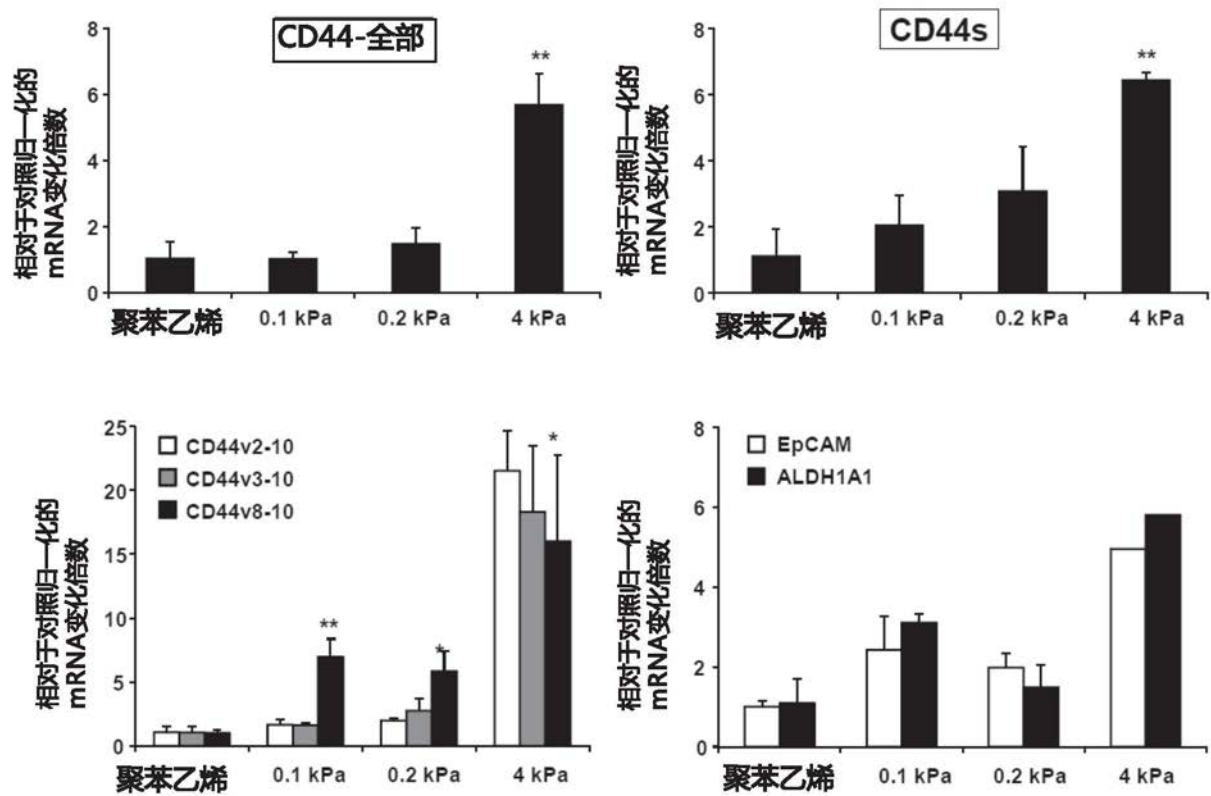


图11

(a)



(b)

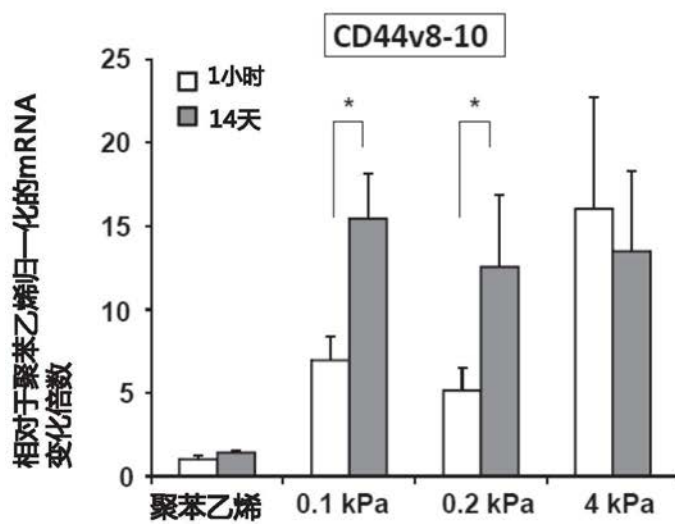
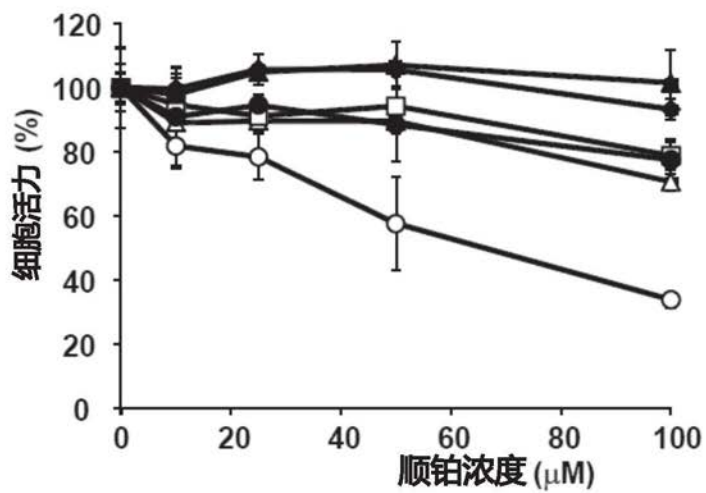


图12



(a)

—○— 聚苯乙烯    —●— 0.2 kPa    —▲— 0.5 kPa    —◆— 1.0 kPa    —□— 2.5 kPa    —△— 4.0 KPa



(b)

—○— 聚苯乙烯    —●— 0.2 kPa    —▲— 0.5 kPa    —◆— 1.0 kPa    —□— 2.5 kPa    —△— 4.0 KPa

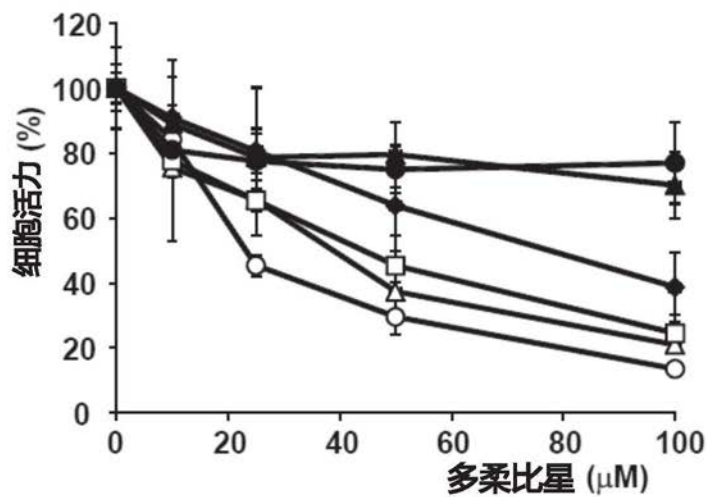


图13