论著

文章编号:1000-5404(2010)07-0630-04

骨髓间充质干细胞与胶质瘤细胞非接触共培养后相关生物学特性分析

张亚兰[1],朱 静[1],田 杰[2],刘官信[1],张晓萍[1],邓 兵[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:儿科研究所,重庆市重点实验室[1],心血管内科[2])

[摘要] **目的** 在体外通过大鼠胶质瘤C6细胞与大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)非接触共培养,以探明BMSCs是否受到肿瘤微环境的作用获得肿瘤细胞的相关生物学特性。**方法** 通过6孔板结合Transwell小室建立BMSCs和C6胶质瘤细胞的共培养体系,以共培养组为实验组,设单独培养的BMSCs为对照组;相差显微镜下观察培养后2组细胞形态学的改变;核干细胞因子(nucleostemin, NS)检测细胞增殖力的变化;荧光定量PCR和Western blot检测细胞中mdm2、p53 mRNA水平及其蛋白的变化;免疫荧光法检测神经胶质细胞特异的胶质纤维酸蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)在细胞中的定位及表达。**结果** 共培养后实验组细胞呈现类似胶质瘤细胞样的形态,表达神经胶质细胞特异的GFAP蛋白;NS蛋白反映的细胞增殖能力未发生改变;共培养后实验组p53 mRNA水平明显低于对照组($P<0.01$),而p53蛋白的表达水平显著高于对照组[(1.63 ± 0.31) *vs* (0.85 ± 0.12), $P<0.05$];实验组mdm2 mRNA及其蛋白的表达水平均明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** 肿瘤微环境可能会使大鼠骨髓间充质干细胞获得肿瘤细胞的相关生物学特性。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;胶质瘤细胞;非接触共培养;GFAP蛋白

[中图法分类号] R329.2; R322.8; R730.264 **[文献标志码]** A

Biological characteristics of rat mesenchymal stem cells non-contact co-cultured with glioma cells

Zhang Yalan[1], Zhu Jing[1], Tian Jie[2], Liu Guanxin[1], Zhang Xiaoping[1], Deng Bing[1] ([1]Pediatric Research Institute, [2]Department of Cardiovasology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study whether rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) obtain tumor characteristics when co-cultured with rat glioma cells by non-contact culture *in vitro*. **Methods** A co-cultural system was established between rat BMSCs and rat glioma cell line C6 by using 6-well plate and Transwell chamber. Cells were divided into 2 groups, experimental group (co-cultural BMSCs), and control group (BMSCs cultured alone). The morphological changes of BMSCs were observed by phase-contrast microscopy. Cell proliferation was determined by the level of nucleostemin (NS) protein. p53 and mdm2 mRNA were examined by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). The expression of p53 protein and mdm2 protein were detected by Western blotting. The expression and localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was studied by immunofluorescence staining. **Results** Experimental cell group demonstrated glioma-like cell morphology and expressed GFAP protein. The ability of prolification had no significant change in experimental group compared with control group. p53 mRNA was decreased significantly ($P<0.01$) and the level of p53 protein was increased also ($P<0.05$) in experimental group as compared to those of control group. mdm2 mRNA and mdm2 protein were significantly increased as compared to control group ($P<0.05$). **Conclusion** Certain cytokines of tumor microenvironment can cause rat BMSCs to obtain tumor characteristics, which provides a preliminary experimental basis for the clinical safe application of BMSCs during cancer treatment.

[Key words] marrow-derived mesenchymal stem cells; rat glioma cells; non-contact co-culture; GFAP protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670871). Corresponding author: Zhu Jing, Tel: 86-23-63630294, E-mail: zhujing310@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30670871)

[通信作者] 朱 静,电话:(023)63630294,E-mail:zhujing310@yahoo.com.cn

恶性肿瘤严重威胁人类身体健康,其治疗也成为人们关注的焦点。肿瘤生物治疗(biotherapy)是应用现代生物技术及其产品靶向性治疗肿瘤,有效克服放化疗副作用,是肿瘤治疗的新模式。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)易于体外分离培养扩增,易于外源基因的导入,具有极好的迁移能力、肿瘤趋向性[1]和低免疫源性[2],这些特点使BMSCs成为肿瘤生物治疗的首选载体。干细胞巢即干细胞生存的微环境,巢的成分改变可能导致正常的干细胞肿瘤转化[3]。本实验通过BMSCs与大鼠胶质瘤细胞C6非接触共培养,以此探明BMSCs是否受肿瘤微环境的作用获得了肿瘤细胞的相关生物学特性,旨在为临床利用BMSCs作为载体治疗肿瘤提供安全保证。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

雄性Wistar大鼠,体质量(40±10)g,清洁级,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心;C6胶质瘤细胞株由重庆医科大学儿科研究所肿瘤研究室提供。悬挂式Transwell细胞培养小室(Millicell公司,美国),RNA提取试剂盒(北京百泰克公司),PrimeScript RT reagent Kit试剂盒(大连宝生物公司),荧光定量PCR试剂盒(北京天根公司),Nuclear Extract Kit试剂盒(深圳晶美公司),小鼠p53及mdm2单克隆抗体、核干细胞因子(nucleostemin公司,NS)兔多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国),小鼠GFAP单克隆抗体(Thermo公司,美国),TRITC-山羊抗小鼠、TRITC-山羊抗兔荧光抗体和辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠IgG(北京中杉公司)。

1.2 细胞培养与共培养

参照吕铁伟等[4]方法分离大鼠的股骨和胫骨骨髓,培养纯化原代的BMSCs,传至第4代时进行共培养实验。C6胶质瘤细胞用与BMSCs相同的培养基培养,2~3 d后可达90%融合,0.25%胰酶消化后传代。

1.3 共培养体系的建立及分组

采用具有PET膜的Transwell悬挂式培养小室结合6孔板进行非接触共培养,将第4代的BMSCs细胞种植于放有小室的6孔板内,小室内种植C6细胞,调整2种细胞的比例为1∶1,作为实验组;另以第4代BMSCs单独种植于6孔板为对照组。各组每隔24小时换液1次,每天观察细胞生长情况。

1.4 细胞形态学观察

相差显微镜下每天观察BMSCs的生长状态,并照相记录。

1.5 RNA的提取及实时定量PCR检测

各组细胞共培养7 d后提取总RNA,测定$D(260)/D(280)$值,计算RNA的纯度。使用PrimeScript RT reagent Kit快速反转录合成cDNA,所有操作严格按照说明书进行。实时定量PCR p53、mdm2、β-actin引物(表1)使用前稀释成10 μmol/L,-20 ℃保存。20 μl体系中2.5×RealMasterMix/20×SYBR solution 9 μl,上游引物0.5 μl,下游引物0.5 μl,cDNA模板2 μl,超纯水8 μl。反应条件:95 ℃预变性2 min,95 ℃变性10 s,退火20 s(p53退火温度为60 ℃,mdm2为56 ℃),68 ℃延伸20 s,共40个循环;每个反应均设空白对照,每个样品设置3个复孔。优化反应条件使得目的基因和内参的扩增效率近似相等且接近于100%,将对照组的mRNA表达量设为1,根据$2^{-\triangle\triangle Ct}$计算实验组mRNA的相对表达量。

表1 各基因引物序列、产物大小及溶解温度

基因	引物序列	产物大小(bp)	溶解温度(℃)
p53	正义:5′-GCCATCTACAAGAAGTCACAACAC-3′	146	86.5
	反义:5′-CTGTCGTCCAGATACTCAGCATAC-3′		
mdm2	正义:5′-CTATCGGGTCACAGTCTATCAGG-3′	161	83
	反义:5′-AGTTCTCACGAAGGGTCCAAC-3′		
β-actin	正义:5′-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3′	50	85
	反义:5′-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3′		

1.6 Western blot检测p53及mdm2蛋白水平

利用Nuclear Extract Kit,提取阴性对照组和实验组细胞核蛋白,10%的SDS-PAGE分离,半干法转膜,封闭液封闭过夜,加入小鼠抗大鼠p53、mdm2一抗(1∶200稀释)和小鼠抗大鼠β-actin一抗(1∶3 000稀释),室温孵育2 h,洗膜,加辣根过氧化酶标记的山羊抗小鼠IgG(1∶5 000稀释),室温孵育1.5 h,洗膜,化学发光法显色。利用UVI光密度扫描仪检测图像峰面积作为蛋白的表达量,β-actin为内参,比较实验组和对照组蛋白表达变化。

1.7 免疫荧光法检测NS蛋白及GFAP蛋白

待BMSCs 80%融合时消化接种于铺有盖玻片的6孔板中建立共培养体系,7 d后进行免疫荧光检测。弃去原培养基,PBS清洗,丙酮固定,0.2% Triton X-100通透,正常山羊血清封闭30 min,加入NS一抗及胶质纤维酸蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)一抗(1∶100稀释),用PBS代替一抗设置阴性对照,湿盒中4 ℃过夜;洗去一抗,加二抗(TRITC标记的山羊抗小鼠及山羊抗兔IgG,1∶100稀释)37 ℃避光孵育30 min,PBS清洗,DAPI染核,封片,荧光显微镜镜检并拍照。使用IPP 6.0专业图像软件进行TRITC和DAPI下的同视野合成,观察10个视野,计数阳性细胞数,阳性率为阳性细胞数/细胞总数,取其平均值。

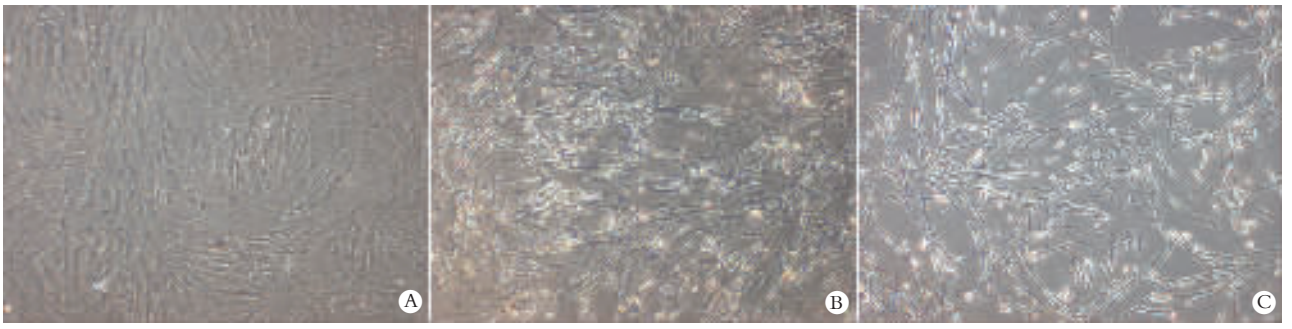
1.8 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 17.0统计软件进行分析,两个样本均数的比较采用独立样本t检验。

2 结果

2.1 BMSCs的形态特征

接种24 h后倒置显微镜下观察发现,大部分悬浮的圆形细胞为红细胞,部分细胞贴附于瓶底,为短梭型、三角型、多角型;48 h后首次换液,见绝大部分细胞贴壁,形态变为长梭形,呈集落样生长;培养7~8 d时,集落增多融合成片,漩涡样生长。4代BMSCs形态均一,细胞扁平,成纤维细胞样,分布均匀,排列有序。与C6胶质瘤共培养7 d后,实验组细胞形态发生显著变化,细胞质向核周收缩,变细变长,细胞核变小,呈现神经胶质瘤细胞样的形状(图1)。

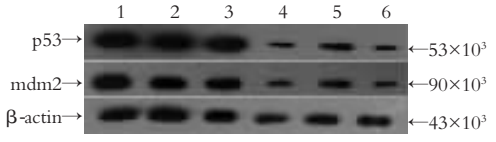


A:对照组;B:实验组;C:C6胶质瘤细胞

图1 培养7 d后对照组和实验组BMSCs细胞形态的变化 (倒置相差显微镜 ×100)

2.2 2组细胞中p53、mdm2 mRNA及蛋白的表达

设定对照组p53、mdm2的mRNA表达量为1,共培养7 d后,实验组p53 mRNA的相对表达量为(0.24±0.15),较对照组表达降低($P<0.01$);实验组mdm2 mRNA相对表达量为(3.18±0.80),较对照组表达升高($P<0.01$)。非接触共培养7 d后,实验组p53蛋白表达水平为(1.63±0.31),显著高于对照组(0.85±0.12)($P<0.05$),mdm2蛋白的表达水平由对照组的(0.43±0.09)增加到实验组的(0.93±0.14),2组间差异有统计学意义($P<0.05$)。说明培养后实验组细胞中发生了p53蛋白的突变和mdm2蛋白的扩增(图2)。



1~3:实验组;4~6:对照组

图2 培养7 d后2组BMSCs中p53和mdm2蛋白的表达水平

2.3 NS蛋白反映的细胞增殖能力的变化

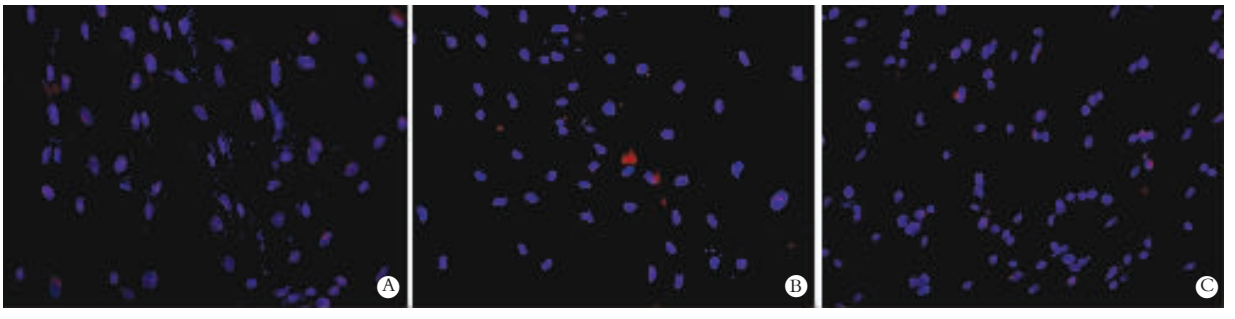
培养7 d后免疫荧光结果显示,实验组和对照组所有的细胞均表达NS蛋白,表达率近100%,2组间NS蛋白的表达无明显差异(图3),表明BMSCs与胶质瘤细胞非接触共培养7 d后自身的增殖能力没有受到明显影响,其仍然具有很强的增殖能力。

2.4 2组细胞中GFAP蛋白免疫荧光检测

GFAP蛋白正常定位于细胞质,细胞核无表达。与C6胶质瘤细胞共培养7 d后,实验组BMSCs胞质中均见到较强的GFAP蛋白的表达,阳性率100%,而对照组只有极少的细胞表达GFAP蛋白,表达强度较弱,阳性率13%,2组间GFAP蛋白的表达有显著差异(图4)。

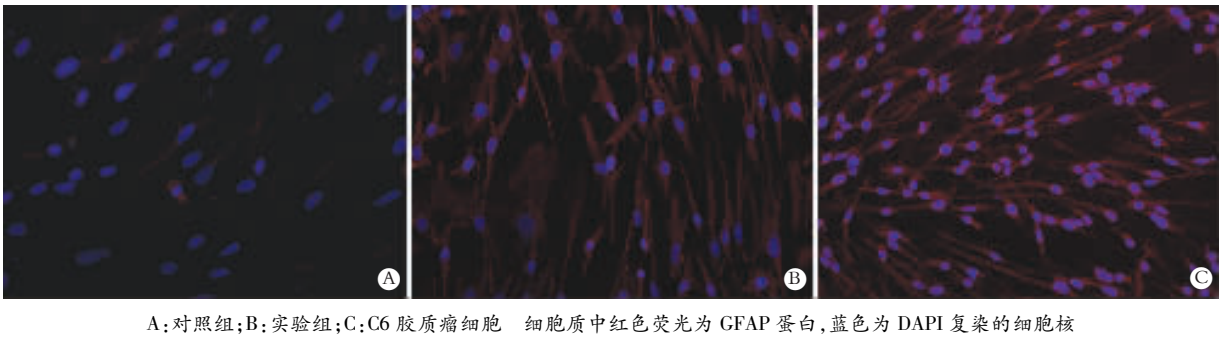
3 讨论

近年来,BMSCs在临床的应用日益广泛,利用多向分化潜能诱导其向骨、软骨、神经、心肌分化,以治疗相关组织疾病;利用BMSCs肿瘤趋向性、免疫原性低和可



A:对照组;B:实验组;C:C6胶质瘤细胞中NS蛋白的表达 蓝色为DAPI染的细胞核,细胞核中密集分布的红色颗粒为NS蛋白

图3 免疫荧光检测培养7 d后实验组和对照组BMSCs中NS蛋白的表达水平 (×200)



A:对照组;B:实验组;C:C6胶质瘤细胞 细胞质中红色荧光为GFAP蛋白,蓝色为DAPI复染的细胞核

图4 免疫荧光检测培养7 d后实验组和对照组BMSCs中GFAP蛋白的表达水平 (×200)

以增殖的特点,将免疫性细胞因子基因转导入 BMSCs,基因在肿瘤局部高效表达细胞因子以增强抗肿瘤效应[5,6]。但是 BMSCs 在上述环境中的安全性问题仍不是很清楚。已有研究报道 BMSCs 在体外长期培养能自发发生恶性转化[7,8],这也就证明了干细胞微环境的改变可以导致 BMSCs 分化受阻并恶性增殖。

本研究中从原代干细胞开始培养,根据贴壁筛选分离法进行纯化,使用纯度较高的 4 代 BMSCs 进行实验;利用 Transwell 小室建立共培养体系,小室底层为聚碳酸酯膜(PET 膜),孔径为 0.4 μm,细胞不能自由的通过小孔,而下层的 BMSCs 可以实时的接受上层 C6 细胞分泌的细胞因子的作用,以此系统来模拟改变了的干细胞微环境,探讨肿瘤细胞分泌的细胞因子对 BMSCs 的影响。共培养 7 d 后,实验组细胞形态不均,排列紊乱,细胞体积变得细长,胞核变小,类似于神经胶质瘤细胞的形态。GFAP 是神经胶质细胞及其肿瘤特征性蛋白,其基因及表达产物是胶质细胞及其肿瘤区别于其他细胞的特异性的标志物。本研究结果提示共培养后实验组细胞均表达 GFAP 蛋白,这就证明了胶质瘤微环境某些细胞因子使得 BMSCs 分化成神经胶质细胞或转化成胶质瘤。因为 BMSCs 具有多向分化潜能,Karaoz 等[9]研究发现体外培养的 BMSCs 自身会表达少量 GFAP 蛋白,本研究也发现对照组 13% BMSCs 表达 GFAP 蛋白,与上述结果一致,这提示 BMSCs 在体外培养环境中可能有一定的自分化潜能。

NS 蛋白是 2002 年 Tsai 等[10,11]发现的一种核 p53 结合蛋白,定位于干细胞和肿瘤细胞胞核内,参与干细胞和肿瘤细胞的增殖调控,能维持干细胞的扩增,其过表达或表达降低都会影响细胞的增殖力,但当干细胞分化成成熟的组织细胞后 NS 的表达即降低或消失。本研究中实验组和对照组 NS 蛋白的表达无明显差异,提示在肿瘤微相关细胞因子作用下 BMSCs 仍能维持较强的增殖能力,结合上述 GFAP 的检测结果,说明与胶质瘤共培养后的 BMSCs 可能已经转化成胶质瘤细胞。

p53 基因是迄今发现的与肿瘤相关性最高的基因,参与细胞的转录调控和生长周期调控,其正常产物野生型的 p53 蛋白是种抑癌蛋白,它的缺失或失活会引发肿瘤,而 p53 基因突变后形成突变型 p53 蛋白是一种肿瘤促进因子,可以消除野生型 p53 的功能,加速肿瘤的形成;本研究中实验组 p53 mRNA 降低,从而证明实验组野生型的 p53 蛋白表达可能降低;本实验所用抗体检测到的 p53 蛋白为野生型和突变型的混合蛋白,结果实验组 p53 蛋白的表达水平明显高于对照组,这就提示实验组细胞已经发生 p53 蛋白的突变,因为野生型 p53 蛋白的半衰期约为 20 min,而突变型 p53 蛋白半衰期可达 1.7 ~ 7 h 不等,突变型 p53 蛋白半衰期延长使得实验组的检测量增加,实验组细胞中野生型 p53 蛋白的减少并突变型 p53 蛋白表达可能会同时引起 BMSCs 的肿瘤转化。mdm2 是近年来发现的癌基因,参与细胞的基本生理过程,它的过表达和 p53 基因突变相似,均可使正常 p53 基因功能丧失,mdm2 本身也有致癌作用,已在多种肿瘤中发现其突变与扩增;本实验通过定量 PCR 和 Western blot 检测到实验组细胞中的 mdm2 mRNA 和 mdm2 蛋白表达水平均明显高于对照组,证明实验组 BMSCs 细胞中存在 mdm2 蛋白的高度扩增。

总之,通过与 C6 胶质瘤细胞体外非接触共培养,BMSCs 既具有胶质瘤细胞的形态及特征,又获得肿瘤细胞的相关生物学特性,说明肿瘤微环境中的某些细胞因子可以使 BMSCs 增殖分化的调控失调,进而可能引起其肿瘤转化,这为以 BMSCs 作为载体在肿瘤治疗方面的安全应用提供了前期实验依据。需要指出的是,要充分证明 BMSCs 的肿瘤转化还须染色体的检测及体内的成瘤实验,同时体外非接触共培养只是模拟的肿瘤微环境,尚不能说明细胞与细胞之间的相互作用对 BMSCs 的影响,BMSCs 在肿瘤微环境中具体分化和机制探讨有待进一步的体内实验研究。

参考文献:

[1] 程鹏,高志强, 刘云会. 颈内动脉移植骨髓间充质干细胞向 C6 胶质瘤的趋化迁移[J]. 解剖科学进展, 2007, 13(4): 334 - 337.
[2] Maitra B, Szekely E, Gjini K, *et al*. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation[J]. Bone Marrow Transplant, 2004, 33(6): 597 - 604.
[3] 吴银艳, 黄强, 董军, 等. 干细胞 niche 与肿瘤干细胞产生和发展的关系[J]. 癌症, 2008, 27(1): 109 - 112.
[4] 吕铁伟, 田杰, 朱静, 等. 骨髓间充质干细胞体内诱导分化为心肌细胞[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 197 - 203.
[5] Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, *et al*. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model[J]. Gene Ther, 2004, 11(14): 1155 - 1164.
[6] Loebinger M R, Eddaoudi A, Davies D, *et al*. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer[J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4134 - 4142.
[7] Miura M, Miura Y, Padilla-Nash H M, *et al*. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation[J]. Stem cell, 2006, 24(4): 1095 - 1103.
[8] Rosland G V, Svendsen A, Torsvik A, *et al*. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5331 - 5339.
[9] Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, *et al*. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers[J]. Histochem Cell Biol, 2009, 132(5): 533 - 546.
[10] Tsai R Y, McKay R D. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(23): 2991 - 3003.
[11] Yaghoobi M M, Mowla S J, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation[J]. Neurosci Lett, 2005, 390(2): 81 - 86.

(**收稿**:2009-10-26;**修回**:2009-12-08)
(编辑 张 维)