文章编号:1000-5404(2012)08-0761-04

论著

骨髓间充质干细胞表达分泌型蛋白IFN-β/EGFP对前列腺癌PC-3细胞增殖的影响

詹以安,王共先,傅 斌 (330006 南昌,南昌大学第一附属医院泌尿外科研究所)

[摘要] **目的** β干扰素(interferon-beta, IFN-β)/增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)真核质粒转染人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs),观察转染后的hMSCs(IFN-β-hMSCs)对前列腺癌细胞株PC-3增殖情况的影响。**方法** 构建IFN-β/EGFP分泌型真核表达质粒pEGFP-N2-IFN-β,脂质体介导下转染hMSCs,使用荧光显微镜检测IFN-β/EGFP蛋白中绿色荧光的表达;ELISA法检测细胞上清中IFN-β的表达水平。将IFN-β-hMSCs与PC-3在Transwell培养体系中共培养,同时设立hMSCs共培养组、空质粒转染hMSCs共培养组、PC-3单独培养组为对照组,分别于共培养后第1、3、5天对PC-3进行台盼蓝染色,计数存活细胞数目。**结果** 荧光显微镜下观察到IFN-β-hMSCs显示出绿色荧光,ELISA检测证实IFN-β-hMSCs的细胞上清中存在IFN-β的分泌表达。实验组PC-3细胞增殖受抑制,实验组与各对照组之间比较差异存在统计学意义($P<0.05$)。**结论** 分泌型蛋白IFN-β/EGFP在hMSCs中可获得表达且保持其各自的生物学特性,在Transwell共培养中可以有效抑制前列腺癌细胞增殖。

[关键词] 前列腺肿瘤;癌;β干扰素;增强型绿色荧光蛋白;骨髓间充质干细胞
[中图法分类号] R737.25;R394-33;R341 [文献标志码] A

Effect of human mesenchymal stem cells expressing secreted protein IFN-β/EGFP on proliferation in prostate cancer cells line PC-3

Zhan Yi'an, Wang Gongxian, Fu Bin (Institute of Urology, First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of interferon-β (IFN-β)/ enhanced green fluorescent protein (EGFP)-expressing mesenchymal stem cells (IFN-β-hMSCs) on the proliferation of prostate cancer cell line PC-3. **Methods** The secreted eukaryotic expressed vector for recombinant secreted protein IFN-β/EGFP was constructed and then transfected into hMSCs by lipofectamine. EGFP was detected by inverted fluorescence microscopy. The expression of IFN-β in the medium of hMSCs-IFN-β was detected by ELISA. IFN-β-hMSCs were incubated with prostate cancer cell line PC-3 in Transwell co-culture system. hMSCs, mock-hMSCs and PC-3 served as control cells. PC-3 cells were trypsinized and viable cells were counted respectively in 1, 3, and 5 d using a hemocytometer after trypan blue staining. **Results** Fluorescence microscopy showed that the cells had positive fluorescent signals, and IFN-β was detected in the culture medium of IFN-β-hMSCs. IFN-β-hMSCs resulted in a significant decrease in PC-3 cells survival as compared with control groups ($P<0.05$). **Conclusion** hMSCs expresses secreted protein IFN-β/EGFP successfully after gene transfection, and IFN-β-hMSCs cells inhibit growth significantly in the prostate cancer cells. IFN-β and EGFP keep their individual characteristics with no interference with each other.

[**Key words**] prostatic neoplasms; carcinoma; interferon beta; enhanced green fluorescent protein; mesenchymal stem cell

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30560153). Corresponding author: Wang Gongxian, Tel:86-791-88692581, E-mail:wanggx-mr@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30560153)
[通信作者] 王共先,电话:(0791)88692581,E-mail:wanggx-mr@126.com

骨髓间充质干细胞是细胞治疗和基因治疗理想的靶细胞[1-3]。本研究在前期已证实人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)向前列腺癌具有良好的趋向转移性的基础上[4],使用分泌型β干扰素(Interferon-beta, IFN-β)/增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)重组质粒转染hMSCs,通过EGFP的绿色荧光及IFN-β的ELISA分析检测IFN-β/EGFP在转染细胞中的表达情况,判断IFN-β/EGFP是否保留着两种蛋白各自的活性,探讨转染后的hMSCs对前列腺癌细胞PC-3体外增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

成人骨髓来自成年健康志愿者髂骨骨髓,前列腺癌细胞株PC-3来源于美国全球生物资源中心,真核表达质粒pEGFP-N2购自美国BD Biosciences Clontech公司,Wizard PureFection质粒DNA纯化系统购自美国Promega公司,内切酶*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ购自美国Fermentas公司,Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司,人类β干扰素ELISA分析试剂盒购自美国PBL Biomedical Laboratories,12孔Transwell培养体系购自美国Coring公司,兔抗人IFN-β单克隆抗体CD44、CD29、CD34购自北京博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 hMSCs分离培养及细胞分子标志的检测 由南昌大学第一附属医院医学科研伦理委员会审批许可,供者签署知情同意书,无菌操作下行骨髓腔穿刺法,采集成年健康志愿者髂骨骨髓5 ml,采用密度梯度离心法分离,反复贴壁法纯化hMSCs。取生长良好的第3代hMSCs,经多聚甲醛固定后,分别加入CD29、CD34、CD44兔抗人单克隆抗体,异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔(二抗)荧光显色,DAPI衬染细胞核。对照文献[5-6],倒置荧光显微镜下观察CD29、CD34、CD44在hMSCs中的表达情况。

1.2.2 质粒pEGFP-N2-IFN-β的构建及鉴定 包含人IFN-β cDNA基因序列的质粒pCDNA3.1-IFN-β由本室前期构建保存,设计引物从pCDNA3.1-IFN-β模板中克隆具有分泌信号肽的IFN-β序列,引物序列:上游5′-CTGAATTCACTGTTCGTGTTGTCAACATGAC-3′,下游5′-GAGGATCCCGCTGCTGCTGCCGCCGCTGCTGCTGCCGCCGCTGCTGCTG-3′,基因片段与真核表达质粒pEGFP-N2通过*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ位点进行粘端连接,提纯重组质粒,命名为pEGFP-N2-IFN-β。*Eco*RⅠ和*Bam*HⅠ双酶切琼脂糖凝胶电泳鉴定,核苷酸测序分析由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.3 pEGFP-N2-IFN-β转染hMSCs及其细胞增殖活力的检测 取第3代的hMSCs接种至12孔培养平板,每孔1×10^5个细胞,至细胞生长达80%融合时进行转染,转染方法按照Lipofectamine 2000操作手册进行。实验质粒pEGFP-N2-IFN-β转染后的hMSCs命名为IFN-β-hMSCs,对照质粒空白质粒pEGFP-N2转染后的hMSCs命名为P-hMSCs。收集转染后的细胞,每24小时行MTT法检测细胞增殖活力。

1.2.4 RT-PCR检测转染后hMSCs中的IFN-β mRNA的表达 转染48 h后提取细胞总RNA,设计与合成上游引物:5′-GAGCTAGCACTGTTCGTGTTGTCAACATGACC-3′,下游引物:5′-CAGAATTCCAGGCTAGGAGATCTTCAGTTTCGGAGGTAACCTG-TAAGT-3′;RT-PCR扩增IFN-β片段,产物经琼脂糖凝胶电泳分析。以P-hMSCs、hMSCs作为阴性对照。

1.2.5 检测IFN-β-hMSCs中IFN-β/EGFP蛋白的表达 转染后24 h倒置荧光显微镜下观察EGFP绿色荧光表达。分别于转染后4、24、48、72、96、120 h收集200 μl细胞上清,应用ELISA法检测实验组和各对照组细胞上清中IFN-β的表达。按照PBL Biomedical Laboratories ELISA分析试剂盒操作手册进行。

1.2.6 IFN-β-hMSCs与前列腺癌细胞株PC-3共培养 共培养模式通过12孔Transwell培养体系实现。PC-3接种于Transwell培养平板的下层(第2天),细胞数5×10^5/孔,IFN-β-hMSCs接种于Transwell培养平板的上层(第0天),细胞数1×10^5/孔。两层细胞间介有0.4 μm孔径的半透膜以达到微环境互通。同时设立空白对照组(PC-3单独培养组)、阴性对照组(hMSCs+PC-3共培养组、P-hMSCs+PC-3共培养组)。每组设立4个样孔,实验重复3次。

1.2.7 IFN-β-hMSCs对PC-3增殖的影响 分别于共培养后第1、3、5天用0.25%胰蛋白酶消化Transwell培养平板下层的前列腺癌细胞株PC-3,并在5 min内用2%台盼蓝对收集的PC-3进行台盼蓝染色。血细胞计数器计数存活细胞数目,各组间相互比较。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较用单因素方差分析,两两比较使用Dunnett-*t*检验。

2 结果

2.1 hMSCs细胞形态学及分子标志的检测

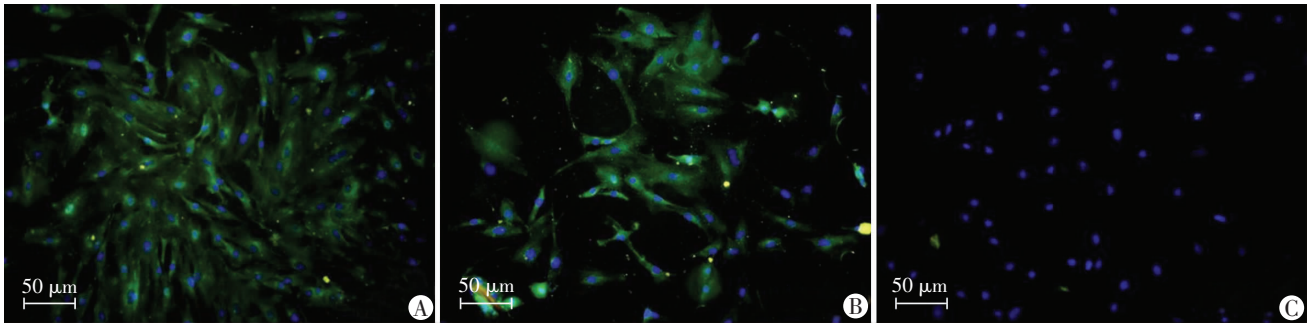
贴壁细胞hMSCs形态呈梭形,有立体感。第3天后细胞增殖加快,呈团簇集落样生长。细胞免疫荧光法显示:CD29和CD44为阳性(绿色荧光),CD34为阴性,符合hMSCs的表型(图1)。

2.2 质粒pEGFP-N2-IFN-β的鉴定

重组质粒pEGFP-N2-IFN-β经*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切后,琼脂糖凝胶电泳显示分别在约4 700 bp和600 bp处出现条带,分别与pEGFP-N2载体和分泌型IFN-β基因大小相对应(图2)。重组质粒pEGFP-N2-IFN-β的核苷酸测序分析报告与设计的碱基排列相符,编码框无错误。

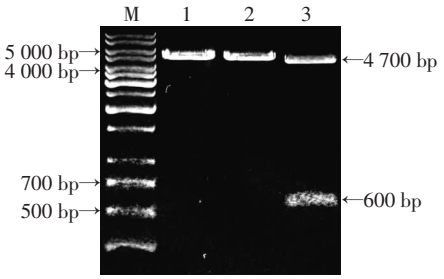
2.3 转染后细胞中EGFP的表达

重组质粒pEGFP-N2-IFN-β转染hMSCs 24 h后,荧光显微镜下发现细胞表达有绿色荧光,转染率50%左右(图3);以空脂质体转染的对照组在荧光显微镜下未能观察到绿色荧光蛋白表达。实验过程中,实验组hMSCs可观察到稳定的绿色荧光表达。



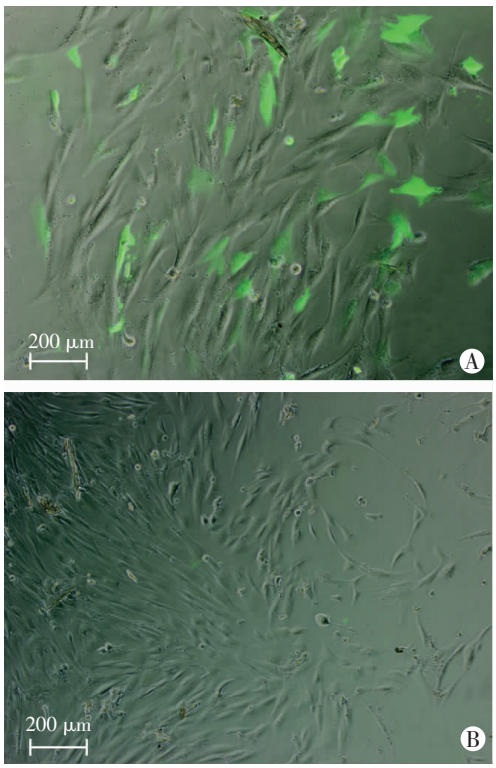
A:CD29 阳性;B:CD44 阳性;C:CD34 阴性　蓝色荧光为 DAPI 衬染的细胞核

图 1　hMSCs 细胞分子标记免疫荧光法分析



M:DNA 标准;1:*Eco*R Ⅰ 单酶切;2:*Bam*H Ⅰ 单酶切,3:*Eco*R Ⅰ + *Bam*H Ⅰ 双酶切

图 2　pEGFP-N2-IFN-β 双酶切琼脂糖电泳鉴定

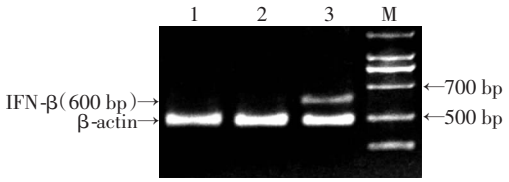


A:质粒 pEGFP-N2-IFN-β 转染 hMSCs;B:空脂质体转染 hMSCs

图 3　转染 24 h 后 hMSCs 中绿色荧光的表达

2.4　转染后细胞中 IFN-β mRNA 的表达

重组质粒 pEGFP-N2-IFN-β 转染 hMSCs 48 h 后,IFN-β 基因在 IFN-β-hMSCs 中有表达,而在 P-hMSCs、hMSCs 中未见表达(图 4)。



1:hMSCs;2:P-hMSCs;3:IFN-β-hMSCs;M:DNA 标准

图 4　RT-PCR 检测转染 48 h 后细胞中 IFN-β mRNA 表达

2.5　ELISA 法检测细胞上清中 IFN-β 含量

在转染后 24 h 内,IFN-β-hMSCs 即可分泌表达 IFN-β,72 h 后表达量有所下降,后期维持在 30 ~ 40 pg/ml(图 5)。各对照组中未能检测出 IFN-β 的表达。

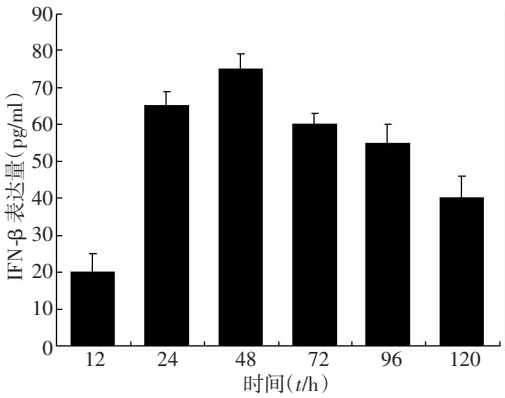


图 5　转染后不同时间 IFN-β-hMSCs 中 IFN-β 的表达

2.6　pEGFP-N2-IFN-β 转染后对 hMSCs 增殖能力的影响

光镜下观察转染后 hMSCs 的形态未见改变,接种后第 2 天细胞即开始出现增殖并进入对数生长期,其对数生长期为 2 ~ 4 d,第 5 天达平台期。MTT 法证实转染组细胞增殖能力和非转染组没有明显区别。

2.7　IFN-β-hMSCs 对 PC-3 细胞增殖的影响

实验组及各对照组在共培养后第 1、3、5 天计数的存活 PC-3 细胞数量见表 1。实验组 PC-3 细胞的增殖明显受抑制,共培养后第 5 天,实验组中存活 PC-3 细胞数量与各对照组相比较,有显著的差异($P<0.05$)。

表1 共培养后第1、3、5天存活的PC-3细胞数量（$\times 10^5$，$n=12$，$\bar{x}\pm s$）

组别	第1天	第3天	第5天
PC-3单独培养组	6.83±0.33	8.92±0.22	10.46±0.33[a]
hMSCs + PC-3共培养组	7.30±0.31	9.65±0.37	10.81±0.35[a]
P-hMSCs + PC-3共培养组	6.92±0.39	8.56±0.43	10.02±0.31[a]
IFN-β-hMSCs + PC-3共培养组	6.70±0.40	6.72±0.45	6.63±0.32

a：$P<0.05$，与IFN-β-hMSCs + PC-3共培养比较

3 讨论

前列腺癌正在影响我国50岁以上男性的生活质量和预期寿命[7-9]。王共先等[4]证实了注射入循环中的hMSCs可以向前列腺癌微环境趋向转移。hMSCs的这种向肿瘤组织趋化转移的特性可能会为其在基因治疗中作为基因运载细胞而发挥独特作用。人IFN-β是一种由成纤维细胞产生的细胞因子，能抑制多种肿瘤来源细胞的增殖[10-11]；EGFP作为标记可以方便地对活细胞的蛋白质分布、基因表达及标记细胞的组织分布等进行实时的、无损的、高灵敏度的检测[12-13]，因此，我们设计用真核表达系统表达可分泌性的蛋白IFN-β/EGFP。本研究中保留了IFN-β天然的分泌信号肽，IFN-β基因克隆在EGFP基因的上游，去除了IFN-β的终止密码子TGA，PCR保证EGFP基因读码框未移位，使EGFP连接在IFN-β蛋白的C端，保留了IFN-β蛋白质N末端的完整信号肽功能区，以便被信号识别颗粒所识别来实现分泌。为了更好地协同发挥二者的生物学活性，我们采用低疏水性和低电荷效应的氨基酸组成的多肽作为二者的连接臂，在分析后选择-GGGSGGSGGG-组成的柔性连接短肽将全长IFN-β基因与EGFP基因克隆在一起，使两者互不干扰地充分折叠成各自的天然构象，保持其各自的生物学活性。

转染了IFN-β/EGFP基因的hMSCs在表达有功能IFN-β的情况下，其自身的多向分化潜能是否会受到影响？光镜下观察hMSCs的形态未见改变，MTT法检测显示转染组细胞增殖能力与非转染组没有差别，与其他相关文献[14-15]报道一致。

本研究选用hMSCs作为前列腺癌基因靶向治疗的细胞载体，通过基因转染技术，将IFN-β/EGFP基因转染hMSCs，结果发现，荧光显微镜下IFN-β-hMSCs表达出绿色荧光；ELISA检测证实细胞上清中存在IFN-β的分泌表达，将IFN-β-hMSCs与前列腺癌细胞株PC-3体外共培养，可以有效抑制前列腺癌细胞生长。上述结果初步了解了IFN-β/EGFP仍保留着两种蛋白各自的活性，关于IFN-β/EGFP在体内是否具有IFN-β的生物效应以及EGFP的定位和协同的抗肿瘤作用仍需后续的实验验证。

参考文献：

[1] 罗飞，许建中. 间充质干细胞在组织工程中的研究进展[J]. 第三军医大学学报，2003，25(2)：176-178.

[2] 赵玉金，李瑶琛，赖洁娟，等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外培养条件的优化及生物学特性[J]. 第三军医大学学报，2010，32(20)：2163-2167.

[3] 冯一梅，徐辉，邹仲敏，等. hPDGF-A/hBD$_2$双基因转染对大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(6)：472-476.

[4] 王共先，汪泱，胡红林，等. 骨髓间充质干细胞向前列腺癌趋向转移的研究[J]. 中华实验外科杂志，2006，23(5)：582-584.

[5] Pruszak J, Ludwig W, Blak A, *et al*. CD15, CD24, and CD29 define a surface biomarker code for neural lineage differentiation of stem cells [J]. Stem Cells, 2009, 27(12): 2928-2940.

[6] 杨婧，徐惠成，王延洲，等. 丁酸钠对大鼠骨髓间充质干细胞向平滑肌细胞分化的影响[J]. 第三军医大学学报，2011，33(10)：1016-1019.

[7] 王洛夫，江军，靳风烁，等. 前列腺癌144例临床分析[J]. 第三军医大学学报，2004，26(11)：1026-1027.

[8] 王家武，姜庆，樊晓栋. 新辅助内分泌联合治疗与单纯根治性手术对前列腺癌预后和疗效的Meta分析[J]. 第三军医大学学报，2011，33(13)：1388-1391.

[9] 靳风烁. 重视泌尿男生殖系肿瘤的基础与临床研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(13)：1237-1238.

[10] Roberts Z J, Ching L M, Vogel S N. IFN-beta-dependent inhibition of tumor growth by the vascular disrupting agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA)[J]. J Interferon Cytokine Res, 2008, 28(3): 133-139.

[11] Wang G X, Zhan Y A, Hu H L, *et al*. Mesenchymal Stem Cells Modified to Express Interferon-β Inhibit the Growth of Prostate Cancer in a Mouse Model[J]. J Int Med Res, 2012, 40(1): 317-327.

[12] 欧阳东云，徐丽慧，高琦，等. 中国恒河猴Mamu-B*1703/EGFP在K562和B16细胞中的表达及分布[J]. 第三军医大学学报，2010，32(9)：874-878.

[13] 苏艳，张宝江，申煜，等. 信号肽序列对禽流感病毒H5N1 HA蛋白GFP融合分子在真核细胞中表达的影响[J]. 微生物学学报，2009，49(3)：351-356.

[14] Dvorakova J, Hruba A, Velebny V, *et al*. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(9): 1116-1125.

[15] 田道锋，陈谦学，吴立权，等. 人β干扰素基因重组腺病毒载体的构建及在骨髓间充质干细胞的表达[J]. 中华实验外科杂志，2009，26(2)：216-218.

（**收稿**：2011-10-31；**修回**：2011-11-27）

（编辑 龙 亮）