神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000783

脑胶质瘤微环境中人脐带间充质干细胞 STAT3 过度激活及生物学行为改变分析

汪 玲,朱 静,田 杰,谭 彬,燕 莎

(重庆医科大学附属儿童医院儿童发育与疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市干细胞治疗工程技术研究中心,重庆 400014)

【摘 要】**目的**:探讨人脐带间充质干细胞 hUCMSCs(human umbilical cord mesenchymal stem cells)在 U251 脑胶质瘤微环境中是否存在 STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)过度激活及细胞生物学行为改变。**方法**:本实验将不同处理的细胞分为 3 组:空白对照组(hUCMSCs 单独培养)、实验组(hUCMSCs 与 U251 共培养)、阳性对照组(U251 单独培养)。流式细胞术检测细胞周期;RT-qPCR 检测 STAT3 及其下游原癌基因 c-Myc 和抗凋亡基因 Bcl-xl 的 mRNA 的表达;Western blot 及免疫荧光检测激活状态的 p-STAT3 及 c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白表达及定位;Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力。**结果**:实验组 hUCMSCs 排列紊乱,成簇分布,呈现轻度异型性;实验组细胞周期 G1 期比例显著低于对照组(P=0.000);实验组 STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 的 mRNA 表达水平均明显高于空白对照组(P<0.05);实验组 p-STAT3、STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 的蛋白表达明显高于空白对照组(P<0.05),且主要定位于细胞核内。实验组细胞的迁移和侵袭能力均显著高于对照组(P<0.05)。**结论**:hUCMSCs 在 U251 胶质瘤微环境中存在 STAT3 的过度激活及生物学行为改变,出现恶性转变倾向。

【关键词】人脐带间充质干细胞;脑胶质瘤微环境;信号传导与转录活化因子 3

【中图分类号】R730.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-07-24

Over activation of STAT3 and biological behavior transformation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in human glioma microenvironment

Wang Ling, Zhu Jing, Tian Jie, Tan Bin, Yan Sha

(*Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood Founded by Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Stem Cell Therapy Engineering Technical Center;*)

【Abstract】***Objective***:To investigate whether hUCMSCs exist over activation and expression of STAT3 and undergo biological behavior transformation when exposed to U251 human glioma microenvironment. ***Methods***:Cells was divided into three groups in this experiment:blank group(hUCMSCs were separately cultured),experimental group(hUCMSCs were indirectly co-cultured with U251 human glioma cells),positive control group(U251 human glioma cells were separately cultured). Morphology of cells was detected by invertedmicroscope. Cell cycle was detected by flow cytometry. The mRNA expressions of STAT3,c-Myc and Bcl-xl were tested by real-time PCR. The protein expressions and locations of p-STAT3,c-Myc and Bcl-xl were detected by immunofluorescence. The protein expressions of p-STAT3,STAT3,c-Myc and Bcl-xl were also measured by Western blot. The ability of migration and invasion were tested by Transwell. ***Results***:The experimental group cells arranged in disorder and clustered,showing mild atypia. The cells proportion of experiment group in G1 phase was significantly lower than that of the blank group(P=0.000). The mRNA expression levels of STAT3,c-Myc and Bcl-xl in experimental group were significantly higher than those in blank group(P<0.05). p-STAT3,STAT3,c-Myc and Bcl-xl protein expressions were significantly higher than blank group(P<0.05),and they were mainly situated in the nuclei. The protein expressions of STATS also showed significant changes in experimental group. Migration and invasion ability of the experimental group were significantly higher than those of blank group(P<0.05). ***Conclusion***:hUCMSCs exist abnormal activation and over expression of STAT3 and trend to biological behavior transformations when exposed to U251 human glioma microenvironment. And these factors may lead to malignant transformation of hUCMSCs.

【Key words】human umbilical cord mesenchymal stem cells;U251 glioma microenvironment;signal transducer and activator of transcription 3

作者介绍:汪 玲,Email:851251859@qq.com,研究方向:间充质干细胞恶性转化。

通信作者:朱 静,Email:jingzhu@cqmu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81370261);重庆市渝中区自然科学基金资助项目(编号:20130119)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151013.2306.006.html(2015-10-13)

胶质细胞瘤是最常见的人类脑肿瘤，由于其易扩散侵袭性生长，手术难以完全切除，临床治疗效果欠佳。近年来利用人脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cells，hUCMSCs）良好的肿瘤趋化性作为载体靶向治疗脑胶质瘤开展了大量实验研究并取得了较大的进展[1-2]，hUCMSCs 有望成为脑胶质瘤基因治疗的理想载体，有效解决脑胶质瘤复发的难题。目前关于 hUCMSCs 靶向治疗安全性的问题尚未作评估，国内外均有研究提示，MSCs 在体内外特定条件中有恶性转化的风险[3-4]。本课题组前期实验证实，将大鼠骨髓间充质干细胞置于 C6 大鼠脑胶质瘤微环境中，因受到异常信号分子的影响 STAT3（signal transducer and activator of transcription 3）异常激活导致其恶性转化[5]。鉴于此，本实验将探究在 U251 脑胶质瘤微环境中 hUCMSCs 是否存在 STAT3 过度激活及生物学特性改变，为干细胞临床安全应用提供前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人脐带间充质干细胞 hUCMSCs 由重庆市干细胞治疗工程技术研究中心惠赠，U251 脑胶质瘤细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基和胎牛血清（Gibco 公司）；胰蛋白酶（Sigma 公司）；RNA 快速提取试剂盒（百泰克）；全蛋白提取试剂盒和 ECL 化学发光试剂盒（凯基生物）；引物（上海生工）；抗体：STAT3、p-STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl（Abcam 公司）；Transwell 小室（CORNING）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 hUCMSCs 及 U251 细胞均采用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基普通条件培养，待贴壁生长至融合度约 80%~90%经以 1:2 传代培养。实验组间接共培养：采用 0.4 μm 孔径 Transwell 悬挂式培养小室结合 6 孔板进行非接触共培养，将 hUCMSCs 细胞种植于放有小室的 6 孔板内，小室内种植 U251 胶质瘤细胞，每 24 h 更换培养液。实验将不同处理的细胞分为 3 组，空白对照组：单独培养的 hUCMSCs；实验组：与 U251 胶质瘤细胞间接共培养的 hUCMSCs；阳性对照组：单独培养的 U251 胶质瘤细胞。均置于相同条件下培养 2 周。每组平行 3 个孔做为重复孔，每个实验分组独立重复 3 次。

1.2.2 细胞形态学观察 倒置相差显微镜观察各组细胞生长状态。

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期 胰酶消化，PBS 清洗 2 遍后弃上清，70%乙醇固定，4 ℃过夜，RNase 消化，PI 染色后流式细胞仪检测。

1.2.4 Real-time PCR 检测各组细胞 STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 的 mRNA 的表达 参照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞 RNA，反转录成 cDNA，采用实时荧光定量 PCR 检测相关基因表达。目的基因的引物序列见表 1，选定 GAPDH 为内参，结果以 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 表示。

1.2.5 Western blot 半定量检测 p-STAT3、STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白表达 试剂盒提取培养 2 周后的各组细胞总蛋白，行不连续凝胶电泳，湿转法转膜，牛奶封闭后，一抗（p-STAT3 1:2 000、STAT3 1:500、c-Myc 1:1 500、Bcl-xl 1:2 000、β-actin 1:1 000）4 ℃摇床孵育过夜，二抗（HRP 标记山羊抗兔 IgG 1:3 000、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 1:6 000），ECL 系统化学发光显色。

1.2.6 免疫荧光检测 p-STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白表达及定位 取培养 2 周后的各组细胞，待细胞融合度约 60%，多聚甲醛固定，经 1%Triton-X 作用后，牛血清白蛋白封闭，加一抗（p-STAT3 1:200、c-Myc 1:200、Bcl-xl 1:150）混合 4 ℃孵育过夜，复温 30 min 后洗去一抗，加二抗（cy3-山羊抗兔 IgG 1:200）37 ℃避光孵育 1 h，DAPI 染核后封片，荧光显微镜观察并拍照。观察 10 个视野，计数阳性细胞数及细胞总数，计算阳性率。

1.2.7 Transwell 检测迁移能力 饥饿处理细胞 12 h，Transwell 上室加入 200 μl 浓度为 1×10^5 个/ml 的无血清细胞悬液，下室 500 μl 含 10% FBS 培养基，24 h 后轻拭去上室细胞，甲醇固定，结晶紫染色，显微镜计数上、下、中、左、右 5 个视野的细胞数。

1.2.8 Transwell 检测侵袭能力 基质胶与无血清培养基按 1:8 稀释后，Transwell 上室分别加入 50 μl 混合液，37 ℃培养箱过夜进行基质包被，Transwell 上室加入 200 μl 浓度为 2×10^5 个/ml 的无血清细胞悬液，下室 500 μl 含 20% FBS 培养基，24 h 后轻拭去上室细胞及基质胶，甲醇固定 10 min，结晶

表 1 Real-time PCR 引物序列

Tab.1 Real-time PCR primer sequence of target gene

目的基因	上游引物	下游引物	片段大小
STAT3	5'-TGGAGGAGAGAATCGTGGAG-3'	5'-ATTTGACCAGCAACCTGACTT-3'	150 kb
c-Myc	5'-CCTCCACTCGGAAGGACTATC-3'	5'-TTCGCCTCTTGACATTCTCC-3'	135 kb
Bcl-xl	5'-CCTCTCCCGACCTGTGATAC-3'	5'-GCTCAACCAGTCCATTGTCC-3'	187 kb
GAPDH	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	258 kb

紫染色 15 min，PBS 洗净，显微镜计数上、下、中、左、右 5 个视野的细胞数。

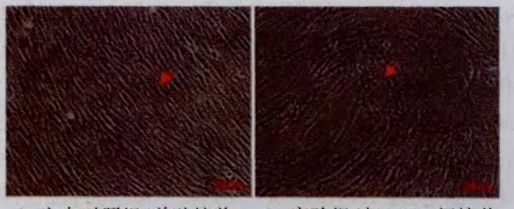
1.3　统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，各组间比较采用单因素方差分析，组间两样本均数之间的比较采用 LSD-t 检验；只存在两个分组的两样本均数之间的比较采用独立样本 t 检验，检验水准均为 α=0.05。

2　结　果

2.1　各组细胞形态学特征

空白对照组 hUCMSCs 细胞贴壁生长，长梭形，排列有序，集落成漩涡状，折光性差。实验组 hUCMSCs 经共培养后细胞呈多形性，核质比增大，胞内颗粒增多，细胞成团杂乱生长，排列紊乱，呈轻度异型性。U251 胶质瘤细胞呈多形性或长梭形，胞体表面有较多的突起，细胞透亮度大、胞体折光性佳，排列无规则（图 1）。



A. 空白对照组（单独培养 2 周的 hUCMSCs）　B. 实验组（与 U251 间接共培养 2 周的 hUCMSCs）



C. 阳性组（单独培养 2 周的 U251 细胞）

图 1　倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化（100×）

Fig.1　Morphology of cells by invertedmicroscope（100×）

2.2　流式细胞术检测各组培养 2 周后细胞周期

实验组细胞 G1 期比例明显低于对照组（P<0.05），S 期和 G2 期均明显高于对照组（P<0.05）（表 2）。

表 2　流式细胞术检测各组细胞周期时相分布（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.2　Distribution of cell cycle phase by flow cytometry（$\bar{x} \pm s$，n=3）

分组	G1	S	G2
空白对照组	85.893 ± 0.611	5.677 ± 0.693	8.430 ± 0.983
实验组	75.453 ± 1.115[a]	11.413 ± 0.343[a]	13.133 ± 0.877[a]
P 值	0.000	0.000	0.003

注：a，与空白对照组比较差别有统计学意义，P<0.05

2.3　Real-time PCR 检测培养 2 周各组细胞 STAT3、c-Myc 和 Bcl-xL 的 mRNA 的表达

培养 2 周后实验组细胞 STAT3、c-Myc 和 Bcl-xL 的mRNA 的相对表达量与空白对照组相比明显增高，差异有统计学意义（P<0.05）。结果显示实验组 hUCMSCs 的 STAT3 的转录水平上增高，其下游基因的转录也明显增高（表 3）。

表 3　Real-time PCR 检测各组细胞 STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 的 mRNA相对表达量（$\bar{x} \pm s$，n=3）

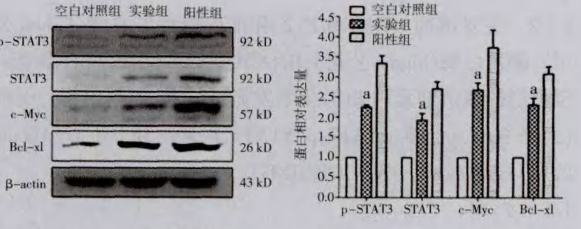
Tab.3　mRNA expressions of STAT3,c-Myc and Bcl-xl in each group by real-time PCR（$\bar{x} \pm s$，n=3）

分组	STAT3	c-Myc	Bcl-xl
空白对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
实验组	1.760 ± 0.169[a]	2.500 ± 0.584[a]	2.037 ± 0.087[a]
阳性组	5.773 ± 1.139	5.947 ± 0.606	3.903 ± 0.698
F 值	43.267	81.821	39.417
P 值	0.008	0.009	0.020

注：a，与空白对照组比较差别有统计学意义，P<0.05

2.4　Western blot 检测 2 周后各组细胞 p-STAT3、STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白表达

实验组细胞 p-STAT3、STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白相对表达量均明显高于空白对照组，差别有统计学意义（P<0.05）。结果显示暴露于 U251 胶质瘤微环境的 hUCMSCs 的 STAT3 蛋白高表达且异常激活为 p-STAT3，其下游肿瘤相关蛋白 c-Myc 和 Bcl-xl 的均高表达（图 2、表 4）。



A. Western blot 检测各组细胞蛋白表达　　B. 为 A 图蛋白表达水平的统计量化图

注：a，与空白对照组比较差别有统计学意义，P<0.05

图 2　Western blot 检测各组细胞 p-STAT3、STAT3、c-Myc和 Bcl-xl 蛋白表达

Fig.2　Protein expressions of p-STAT3,STAT3,c-Myc and Bcl-xl by Western blot

2.5　免疫荧光检测 p-STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 蛋白表达及定位

p-STAT3 表达定位于细胞核，实验组核内表达率（89.173 ± 2.714）%高于空白对照组（4.290 ± 0.757）%（P=0.000）；c-Myc 蛋白定位于细胞核，实验组阳性率（76.273 ± 7.576）%明显高于空白对照组（13.087 ± 2.034）%（P=0.000）；而 Bcl-xl 胞质

表 4 Western blot 检测各组细胞 p-STAT3、STAT3、c-Myc 和 Bcl-xl 的蛋白相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Protein expressions of p-STAT3,STAT3,c-Myc and Bcl-xl in each group by Western blot（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	p-STAT3	STAT3	c-Myc	Bcl-xl
空白对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
实验组	2.257 ± 0.059[a]	1.933 ± 0.163[a]	2.683 ± 0.181[a]	2.317 ± 0.165[a]
阳性组	3.343 ± 0.189	2.713 ± 0.177	3.740 ± 0.434	3.090 ± 0.185
F 值	316.006	115.241	77.650	163.320
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较差别有统计学意义，P<0.05

与胞核均有表达，但主要定位于细胞核外膜，实验组阳性表达率为（76.887 ± 5.149）%，明显高于空白对照组（9.063 ± 1.352）%（P=0.000）（图 3）。

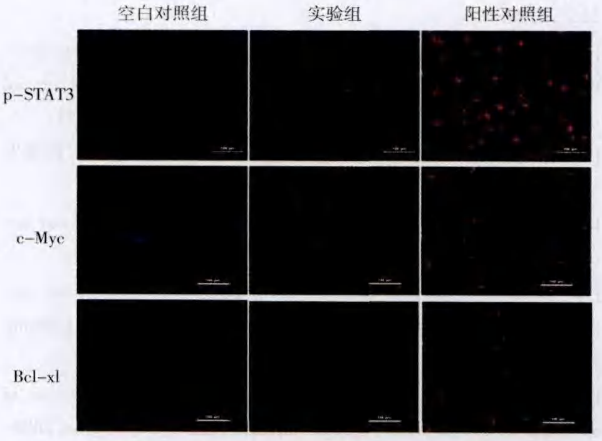
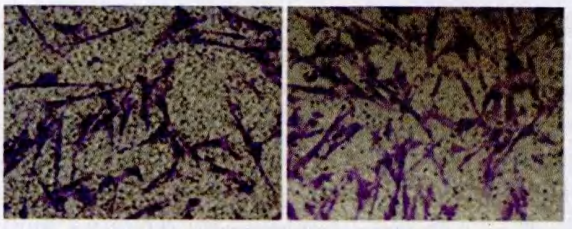


图 3 免疫荧光检测蛋白表达及定位（200 ×）

Fig.3 The protein expression and location by immunofluorescence（200 ×）

2.6 Transwell 检测培养 2 周后迁移能力

迁移实验 24 h 后，空白对照组穿膜细胞数为（27.600 ± 1.442），实验组穿膜细胞数为（46.200 ± 4.015）2 组比较有统计学差异（P=0.002）（图 4）。



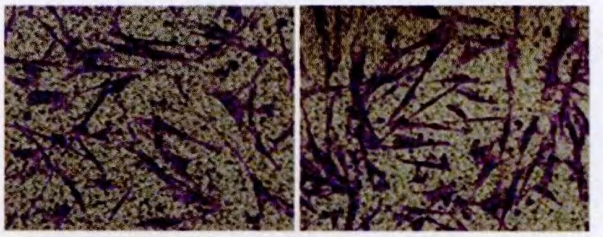
A. 空白对照组　　B. 实验组

图 4 Transwell 实验检测细胞迁移能力（100 ×）

Fig.4 Ability of migration by Transwell（100 ×）

2.7 Transwell 检测培养 2 周后侵袭能力

经 Transwell 侵袭检测 24 h 后，空白对照组穿膜细胞数为（16.800 ± 3.117），实验组穿膜细胞数为（33.800 ± 2.227），两者比较有统计学差异（P=0.002）（图 5）。



A. 空白对照组　　B. 实验组

图 5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力（100 ×）

Fig.5 Ability of invasion by Transwell（100 ×）

3 讨 论

胶质细胞瘤是发生于神经外胚层的脑肿瘤，发病率居脑原发性肿瘤首位[6]。多年来，应用传统手术治疗、化疗和放疗等治疗方式疗效仍不甚理想。利用间充质干细胞向胶质瘤定向迁移和抗肿瘤的作用[7]，携带特定治疗因子的间充质干细胞可发挥强大的抗肿瘤功效，但目前尚没有其治疗胶质瘤的安全性评估。国内外均有间充质干细胞恶性转化的报道，提示干细胞微环境的改变可能与其恶性转化相关，但具体机制不明[4-8]。因此，临床用于靶向治疗脑胶质瘤的 hUCMSCs 在肿瘤细胞、各种细胞因子、炎症介质、细胞间质及微血管等共同营造的胶质瘤微环境中是否发生恶性转化，是 hUCMSCs 临床安全应用应解决的关键性问题。

细胞的恶性转化与多条信号通路相关，其中 JAK-STAT 通路与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关[9]。U251 脑胶质微环境中异常高分泌肝细胞生长因子 HGF、IL-6 和碱性成纤维生长因子 BFGF 等酪氨酸激酶信号分子[10]，此类炎症因子可导致 STAT3 持续性地磷酸化激活为 p-STAT3 进入细胞核内，调节增殖和凋亡相关基因的表达[11]。本实验从 STAT3 信号通路的角度出发来探讨脑胶质瘤微环境中的

hUCMSCs是否存在 STAT3 的过度激活参与其细胞恶性转化，出现恶性生物学行为改变。

实验结果表明，在受到 U251 胶质瘤细胞分泌因子持续诱导后，实验组 hUCMSCs 形态发生明显改变，细胞排列紊乱，成团聚集，核质比增大。恶性肿瘤最基本的生物学特性是细胞增殖失控，而失控的根本原因是细胞周期调控紊乱。细胞周期检测结果表明与肿瘤细胞共培养促进干细胞通过 G1~S 期这一最重要的周期检测点，其主要受细胞外信号的调控，而失去限制点调控的细胞倾向于在细胞周期中持续循环，导致肿瘤发生。基因表达及蛋白水平提示，与 U251 共培养后的 hUCMSCs 细胞中 STAT3和 p-STAT3 的高表达，表明共培养后的 hUCMSCs 存在 STAT3 的异常激活及高表达。其所调控的下游原癌基因 c-Myc 和抗凋亡基因 Bcl-xL 的表达水平也明显增高。c-Myc 是参与调控细胞增殖、分化及凋亡的原癌基因，在细胞周期的 G1 期调控中有着重要作用。已有研究证明，c-Myc 是人脑胶质瘤中最常发生改变并对其发生、发展起重要作用的癌基因之一[12]；Bcl-xl 作为 Bcl-2 家族的重要成员，在阻遏细胞凋亡，致使细胞凋亡不足，延长细胞寿命起重要作用。细胞增殖失控和凋亡不足是肿瘤发生的重要机制[13]。本实验中 STAT3、p-STAT3、c-Myc 及Bcl-xl 基因和蛋白的异常高表达与文献报道的肿瘤发生过程中经典 JAK-STAT 通路的激活过程是相一致的。迁移和侵袭现象是肿瘤细胞特有的恶性生物学行为，Transwell 实验证实共培养增强了 hUCMSCs 迁移和侵袭能力，这与肿瘤细胞的恶性生物学行为是相吻合的，这提示共培养后的 hUCMSCs 可能具有恶性转化的倾向，且该恶性转化与 STAT3 磷酸化激活后入核在转录水平调控靶基因 c-Myc 及 Bcl-xl 的表达相关，最终导致细胞增殖失控，出现迁移、侵袭等生物学行为的恶性转变。

综上所述，hUCMSCs 暴露于脑胶质瘤微环境中存在恶性生物学行为改变，且 STAT3 的异常激活是导致 hUCMSCs 向恶性转化的重要因素之一，为 hUCMSCs 治疗脑胶质瘤临床应用的风险提供前期实验评估的证据。

参 考 文 献

[1] Yang C, Lei D, Ouyang W. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficifently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro[J]. BioMed Research International, 2014, 11(10): 1155-1168.

[2] Egea V, von BL, Schichor C, et al. TNF-alpha respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(5): 853-863.

[3] Rosland GV, 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.

[4] Pan Q, Fouraschen SMG. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells[J]. Experimental Biology and Medicine, 2014(239): 105-115.

[5] 张亚兰，朱 静，田 杰. 肿瘤微环境中间充质干细胞的相关生物学特性分析[J]. 解放军医学杂志，2010，35(1)：67-70.

[6] Martin-Villalba A, Okuducu AF, von DA. The evolution of our understanding on glioma[J]. Brain Pathol, 2008, 18(3): 455-463.

[7] Fan C, Wang D, Zhang Q, et al. Migration capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells towards glioma in vivo[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(22): 2093-2102.

[8] Rubio D, Garcia S, Paz MF, et al. Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation[J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1398.

[9] Vera J, Rateitschak K, Lange F, et al. Systems biology of JAK-STAT signalling in human malignancies[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2011, 106(2): 426-434.

[10] Qiu B, Zhang D, Wang Y, et al. Interleukin-6 is overexpressed and augments invasiveness of human glioma stem cells in vitro[J]. Clin Exp Metastasis, 2013, 30(8): 1009-1018.

[11] McFarlan BC, Hong SW, Rajbhandari R, et al. NF-kB-Induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78728.

[12] Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(6): 1101-1111.

[13] Tischner D, Woess C, Ottina E, et al. Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity[J]. Cell Death Dis, 2010(1): e48.

（责任编辑：关蕴良）