

间充质干细胞与肿瘤的关系研究进展

侯 睿

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)是一类具有强大自我更新能力及多向分化潜能的成体干细胞,在特定的体外和体内条件下不仅可分化为中胚层的骨、软骨细胞等,还可跨胚层横向分化^[1,2]。体内的 MSCs 具有免疫调节及支持造血等多种功能,而体外培养的 MSCs 相比其他成体细胞具有易于分离、扩增及进行遗传修饰的特点,这使得 MSCs 被普遍认为是基因治疗的理想载体,在骨髓移植、移植抗宿主反应、恶性肿瘤防治、而其在组织工程及再生医学等方面具有广泛的应用价值。但有越来越多的研究表明,间充质干细胞与肿瘤的形成与发展密切相关,这使得 MSCs 在临床应用中的安全性仍有待进一步研究证实。本文就近年来间充质干细胞与肿瘤关系的研究进展综述如下:

一、MSCs 参与肿瘤间质的形成

业已明确, MSCs 在其增生分化过程中容易形成间质或结缔组织,并且具有迁移至身体的损伤部位以促进损伤愈合的倾向。与创伤对 MSCs 的募集作用相似,肿瘤组织也可以通过释放各种化学信号和趋化因子(如血管内皮生长因子 VEGF)来募集 MSCs 迁徙至瘤灶形成间质,对肿瘤实质起支持作用^[3]。肿瘤组织对 MSCs 的趋化作用已被多项实验所证实, Nakamizo 等^[4]发现,带有荧光素标记的人 MSCs 分别自左侧和右侧颈动脉打入神经胶质瘤小鼠模型体内后,均可聚集至脑肿瘤区域内,而即使是打入神经胶质瘤灶对侧大脑半球的 MSCs 也依然会向肿瘤处迁移。这提示 MSCs 对肿瘤组织产生了靶向聚集,且这种聚集与优势血供或其他解剖学因素无关系。Menon 等^[5]自尾静脉向结直肠癌裸鼠模型注射被羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(56 - carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester, CFDASE)标记的 MSCs(CFDASE - MSCs),于注射后第 7 天将肿瘤切除并进行冷冻切片检测,镜检结果表明 CFDASE -

MSCs 大量聚集在肿瘤周围,支持 MSCs 向肿瘤部位靶向迁移并定殖的论点,其迁移机制可能与肿瘤微环境分泌具有募集作用的趋化因子有关。而进一步的研究表明, MSCs 在迁移至肿瘤组织后,便可定居、增生、分化,形成肿瘤间质^[6]。Studený 等^[7]研究发现,将人骨髓 MSCs 与人黑色素瘤细胞共同种植入裸鼠异种移植模型后,裸鼠皮下形成了肿瘤,而细胞学和生物化学分析表明有大量的 MSCs 增生分化形成了成纤维细胞。这些 MSCs 一部分整合到肿瘤结构内,形成肿瘤间质,另一部分在瘤灶周围形成纤维包膜。而在另一项更加直观的研究中, Zhu 等^[8]将 MSCs 与结肠癌细胞混合注入裸鼠体内,其成瘤率明显较单独注射结肠癌细胞时为高。结合肿瘤间质在血供、营养、气体交换、废物排泄以及抑制免疫细胞入侵等方面对肿瘤实质形成所起到的促进作用,可以推断, MSCs 很有可能直接参与了肿瘤间质的形成。

二、MSCs 在体外可发生恶性转化

近十几年来,肿瘤干细胞为肿瘤发生、发展及转移的根源和决定性因素这一观点已逐渐被学术界所接受。然而对于肿瘤干细胞的来源问题仍是众说纷纭。不难发现,与成体干细胞极为相似,肿瘤干细胞也具自我更新、增生以及分化能力等特性,这强烈提示成体干细胞可能是某些肿瘤干细胞的来源^[9]。从人类急性粒细胞性白血病中分离的白血病干细胞表达 CD34⁺和 CD38⁻,与造血干细胞表型一致^[10];另有学者分离了支气管肺泡干细胞,转入 K - ras 基因并得到稳定表达的亚细胞系可在体外持续增生更新,进而打入实验动物体内则成为肺癌细胞的前体,可引起肺腺癌^[11]。这些研究均提示肿瘤干细胞很有可能来源于成体干细胞。而有关 MSCs 在体外发生恶性转化的报道更是为此论点提供了直接依据。

Rubio 等^[12]报道人 MSCs 在体外培养 8 个月(分裂了 90 ~ 140 次)后发生了恶性转化,该转化细胞接种至动物体内可发生肿瘤。进一步针对不同培养阶段 MSCs 的分析表明,该转化细胞的染色体变异(三体、单体、重排、倒位等)显著增多,端粒酶和 VEGF 表

达明显升高,而钙黏蛋白、c-myc、cyclin-D 等一些肿瘤相关基因的表达均有上调,而 Rb、p16 等抑癌基因的表达则显著下降^[13]。由此,他们结合 MSCs 体外培养的生长特性后提出了 MSCs 发生恶性转化的两个关键环节:首先是 c-myc 的表达上调和 p16 基因的表达抑制使体外培养的 MSCs 度过衰老期,获得继续增生的能力;而继续增生的 MSCs 随着端粒的缩短将进入危机期,这时只有少部分高表达端粒酶活性,且 Rb 蛋白过磷酸化, P16 蛋白缺失的 MSCs 才能渡过危机期,并最终转化具有恶性表型的 MSCs^[13-15]。Miura 等^[16]在体外连续培养大鼠骨髓 MSCs,一年后细胞的增生能力大大增强,形态明显改变,怀疑发生了恶性转化。第 29 代细胞接种至裸鼠体内可形成肉瘤,其形态较原代明显变小。培养至第 54 代时细胞体积变得更小,接种后的成瘤时间也短于第 29 代细胞。随着体外培养的 MSCs 不断传到直至发生恶性转化,其多项细胞表面标记发生了显著变化。MSCs 在第 1 代时表达 Sca-1、CD13、SSEA-1、Flk-1 和 CD-90,后 3 项于第 57 代时转阴。而且,第 27 代 MSCs 有 40% 存在 2 号染色体三体,有 40% 含有 10 对以上的双微体。至第 55 代时,有 90% 的细胞含有比第 27 代更多数量的双微体,并伴有 14 号染色体丢失及其他类型的染色体畸变,由此可见染色体的异常改变也随着传代的进行而逐渐显现出来^[12,16]。荧光原位杂交结果表明 15 号染色体上的原癌基因 c-myc 发生了异常扩增,导致了双微体的形成,Western blot 分析也证实 MSCs 的 c-myc 表达水平在第 14 代时已较原代有所增高,并随着传代的进行而继续增高。此外,根据转化 MSCs 的端粒酶活性显著增高的事实,有人推测 c-myc 可与端粒酶基因上游的调控位点特异性结合,在转录水平上增强端粒酶基因的表达,但具体机制仍不清楚。与上两例相类似的报道还有很多^[17-20]。不仅成体 MSCs 在体外有恶变可能,Xu 等^[21]在对人胚胎 MSCs 进行体外诱导分化时发现,随着传代次数增多,人胚胎 MSCs 逐渐变为圆形,生长方式由贴壁变为悬浮,具有很强的自我更新能力,可连续传代数十次,其表面抗原及细胞核型与原代的胚胎 MSCs 相比均存在异常。将该细胞接种至免疫缺陷小鼠体内,可形成肿瘤,并有部分发生了转移。除了干细胞单独体外培养可自发恶性转化之外,刘厚奇等^[22]还发现,人胚胎表皮干细胞在与黑色素瘤细胞进行共同培养 7 天之后,发生了恶性转化,具体表现表现在干细胞的克隆形成率提

高,胞间黏附能力下降,接触抑制丧失。生化分析表明这部分细胞 E-CAD 表达下降,且部分细胞表达突变型 P53 蛋白,而此两种分子对肿瘤的发生和发展均有关键作用。而结合 Bonitsis、Stretch 等^[23,24]对黑色素瘤低表达 E-CAD,高表达突变型 P53 的报道,不难看出,经黑色素瘤诱导恶变后的表皮干细胞与黑色素瘤细胞在相关生物学特性上具有一致性。

三、MSCs 与恶性肿瘤的治疗

由于 MSCs 具有极好的靶向迁移能力和肿瘤趋向性,所以外源 MSCs 进入体内后会聚集在肿瘤组织内,其低免疫原性使得 MSCs 可在宿主体内长期存留^[5,25,26]。而且 MSCs 在体外分离纯化后能大量扩增,易导入外源基因,并能长时间高效表达^[26]。MSCs 的这些特性无疑为肿瘤基因治疗和细胞治疗提供了新的策略。用 MSCs 作为生物载体携带并运送抗肿瘤基因或药物至恶性肿瘤内部,发挥其抗肿瘤作用,并能减少全身给药因非特异性分布所造成的不良反应,是当前 MSCs 有望应用于肿瘤临床治疗的主要研究方向。

在这方面 Studeny 做了大量的探索性工作。他将 IFN- β 基因修饰的 MSCs (MSCs-IFN- β) 自静脉注射至荷有异种乳腺癌肺转移肿瘤的 SCID 小鼠体内,发现 MSCs 能够整合到癌组织内并分泌 IFN- β 抑制肿瘤的生长,而并不对正常的组织造成影响;而全身性应用重组 IFN- β 不能有效抑制肿瘤生长。采用 MSCs-IFN- β 治疗的动物的生存期相比未治组明显延长。静脉接种 MSCs-IFN- β 后所能产生的血清 IFN- β 最高浓度,与临床上患者注射最大耐受剂量的 IFN- β 后所产生的平均的最高血清浓度相当^[7]。与 Studeny 研究类似,Nakamura 等^[27]在大鼠颅内接种胶质瘤细胞,瘤灶形成后在肿瘤内注射 IL-2 基因修饰的 MSCs (MSCs-IL-2),大鼠的生存时间与未治疗的对照组相比有明显延长。头颅 MRI 检查显示注射 MSCs-IL-2 的大鼠的颅内肿瘤体积明显小于对照大鼠,而即使在对照组大鼠的颅内病灶增长至致死体积时,注射 MSCs-IL-2 的大鼠的颅内病灶仍然保持较小。在另一项研究中,Studeny 等^[25]将 MSCs 以 IFN- β 基因修饰后,按一定比例与黑色素瘤细胞共同注射于免疫缺陷小鼠的同一部位,发现即使当 MSCs-IFN- β 与黑色素瘤细胞的注射比例为 1:100 时,仍然能够控制肿瘤的生长并显著延长荷瘤动物的生存时间。在肿瘤对侧注射 MSCs-IFN- β 的抗肿瘤效果次之,而每天皮下注射大剂量

IFN- β 对肿瘤的生长或裸鼠的生存几乎无任何作用。以上实验结果表明, MSCs 于肿瘤部位定殖后在其微环境内产生的 IFN- β (或 IL-2) 可抑制恶性肿瘤的生长, 其治疗效果和不良反应大大优于全身性应用相应剂量的 IFN- β (或 IL-2)。此外, Studeny 等^[7,25] 还分别自尾静脉和皮下将 MSCs-IFN- β 打入荷有黑色素瘤的小鼠体内, 发现经尾静脉注射的 MSCs-IFN- β 可迁移并整合至肿瘤组织内并在其微环境内合成分泌 IFN- β 抑制肿瘤生长, 而皮下注射的 MSCs-IFN- β 则仅局限于注射部位。经静脉注射 MSCs-IFN- β 的小鼠其生存时间较皮下注射组显著延长。该结果提示, 不同的接种方式可能会影响 MSCs 向肿瘤组织的迁移, 并进一步影响其治疗作用。

令人颇感意外的是, 有学者报道 MSCs 本身也可在一定程度上抑制肿瘤的生长。Ohlsson 等^[28] 将大鼠结肠癌细胞系 H1D2 和大鼠 MSCs 共同移植到大鼠体内, 结果发现 MSCs 对癌细胞的生长有显著抑制, 移植 7 天后, 镜下可见瘤灶及周边有较多粒细胞和巨噬细胞浸润。病灶体积逐渐缩小, 14 天后再次观察无肉眼可见肿瘤, 30 天后即使用免疫学或分子生物学手段也难以检测到肿瘤的存在。而适当上调接种时 MSCs 的数量, 即可得到更强的抗肿瘤效果。Kha-koo 等^[29] 将 MSCs 打入荷有卡波西肉瘤的动物模型中, 发现 MSCs 除可被趋化至肿瘤处并增殖外, 还可以剂量依赖的方式明显抑制肿瘤生长。将 MSCs 与卡氏肉瘤体外共培养的实验也得到相同的结果。这与之之前 MSCs 参与肿瘤间质的形成从而促进肿瘤生长的实验结论相反。MSCs 到底是促进, 抑制肿瘤生长, 还是对肿瘤存在双重作用, 其具体机制如何, 是当今 MSCs 研究亟待解决的问题。

综上所述, MSCs 不仅可通过改变肿瘤微环境, 参与形成肿瘤间质, 合成分泌生物活性物质以及免疫调节等方式影响肿瘤的生长和转移, 而重要的是 MSCs 自身也可在某些条件下发生恶性转化而具有成瘤性, 其具体作用方式多样, 机制复杂, 目前仍不完全清楚。MSCs 的对肿瘤组织的靶向迁移能力使其成为基因和药物治疗恶性肿瘤的理想载体, 具有广阔的应用前景。然而 MSCs 的体外自发恶性转化倾向所带来的安全性问题也使人们对其日后的长期大规模临床应用感到担忧。而目前对 MSCs 与肿瘤的关系, 特别有关 MSCs 恶性转化的研究大多还停留在实验观察阶段, 其具体作用机制仍不清楚。进一步明确 MSCs 与

肿瘤发生发展的关系, 将为 MSCs 的合理临床应用提供更好的保证和理论支持。而对 MSCs 发生恶性转化过程中各种原癌基因、抑癌基因、细胞周期因子以及端粒酶的表达变化及其相互间作用机制的探索, 将对进一步明确恶性肿瘤的起源、生长以及转移具有重要意义。

参考文献

- 1 Roufousse CA, Direkze NC, Otto WR, *et al.* Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 585-597
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147
- 3 Brower V. Search and destroy: recent research exploits adult stem cells' attraction to cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(6): 414-416
- 4 Nakamizo A, Marini F, Amano T, *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3307-3318
- 5 Menon LG, Picinich S, Koneru R, *et al.* Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 520-528
- 6 Hung SC, Deng WP, Yang WK, *et al.* Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by non-invasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(21): 7749-7754
- 7 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, *et al.* Bone marrow derived mesenchymal stem cell as vehicles for IFN- β delivery to tumors. *Cancer Res*, 2002, 62(13): 3603-3608
- 8 Zhu W, Xu W, Jiang R, *et al.* Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*, 2006, 80(3): 267-272
- 9 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, *et al.* Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414(6859): 105-111
- 10 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997, 3(7): 730-737
- 11 Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 2005, 121(6): 823-835
- 12 Rubio D, Garcia Castro J, Martin MC, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3035-3039
- 13 Rubio D, Garcia S, Paz MF, *et al.* Molecular Characterization of Spontaneous Mesenchymal Stem Cell Transformation. *PLoS One*, 2008, 3(1): 1398-1404
- 14 Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res*, 2005, 576(1-2): 22-38
- 15 Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, *et al.* Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev*, 2004, 18(22): 2736-2746
- 16 Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, *et al.* accumulated chromo-

somal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cell leads to malignant transformation. Stem cell, 2006, 24(4): 1095 - 1103

17 Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, *et al.* Sarcoma Derived from Cultured Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells, 2007, 25(2): 371 - 379

18 Wang Y, Huso DL, Harrington J, *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy, 2005, 7(6): 509 - 519

19 Zhou YZ, Bosch - Marce M, Okuyama H, *et al.* Spontaneous Transformation of Cultured Mouse Bone Marrow - Derived Stromal Cells, 2006, 66: 10849 - 10854

20 Li H, Fan X, Kovi RC, *et al.* Spontaneous Expression of Embryonic Factors and p53 Point Mutations in Aged Mesenchymal Stem Cells: A Model of Age - Related Tumorigenesis In Mice. Cancer Res, 2007, 67: 10889 - 10898

21 Xu W, Qian H, Zhu W, *et al.* a novel tumor cell line cloned from human embryonic bone marrow mesenchymal stem cell culture. Oncol Rep, 2004, 12(3): 501 - 508

22 孙红玉, 胡凯猛, 刘厚奇. 黑素瘤细胞诱导人胚上皮干细胞的恶性转化. 第二军医大学学报, 2007, 28(11): 1161 - 1164

23 Bonitsis N, Batistatou A, Karantima S, *et al.* The role of cadherin/eatenin complex in malignant melanoma. Exp Oncol, 2006, 28(3): 187 -

193

24 Stretch J R, Gatter K C, Ralfkiaer E, *et al.* Expression of mutant p53 in melanoma. Cancer Res, 1991, 51(21): 5976 - 5979

25 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted - delivery vehicles for anticancer agents. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(21): 1593 - 1603

26 Djouad F, Plence P, Bony C, *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animal. Blood, 2003, 102(10): 3837 - 3844

27 Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma mode. Gene Ther. Gene Ther, 2004, 11(14): 1155 - 1164

28 Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, *et al.* Mesenchymal progenitor cell - mediated inhibition of tumor growth in vivo and invitro in gelatin matrix. Exp Mol Pathol. 2003, 75(3): 248 - 255

29 Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. J Exp Med, 2006; 203(5): 1235 - 1247

(收稿: 2010 - 08 - 14)

食管癌术前分期诊断方法的研究现状及进展

赵元 于在诚

食管癌是严重威胁人类健康的常见恶性肿瘤, 估计全球每年有 20 万人死于本病, 占男性恶性肿瘤发病率和病死率的第 5 位^[1]。我国是食管癌高发国家之一。近年来, 虽然食管癌的治疗已经取得了长足进步, 但 5 年生存率仍然较低。大量研究表明, 食管癌的浸润深度和淋巴结转移情况是影响食管癌预后的最重要因素^[2]。准确的术前分期将有助于选择合理的治疗方案, 早期食管癌病人接受根治性外科手术, 而对晚期食管癌病人进行术前单纯化疗或联合放、化疗有助于提高手术切除率和延长生存期。传统的上消化道钡餐造影和 X 线胸片仅用于估计肿瘤长度、了解病变部位, 对食管癌的术前分期无明显作用。随着技术的发展, 各种新的方法为临床医师进行精确的术前分期提供了帮助。目前常用于食管癌术前分期诊断的方法包括: CT 扫描、超声内镜(EUS)、超声内镜

引导下的针吸活检(EUS - FNA)、¹⁸ - 氟脱氧葡萄糖正电子发射断层显像术(¹⁸FDG - PET)及胸(腹)腔镜等微创外科技术。

一、CT 扫描在术前分期中的应用

食管癌临床分期应用较早、较普遍的诊断方法是胸部 CT 扫描, 它简单易行、安全无创, 已被临床医师普遍接受。由于设备的普及, CT 扫描已成为国内最常用于食管癌术前临床分期的诊断方法。

1. CT 扫描在术前 T 分期中的应用: CT 扫描对食管癌浸润深度的判断主要根据食管壁的厚度, 一般认为食管壁厚度大于 5mm 提示存在病变, T₁ 和 T₂ 期肿瘤食管壁的厚度约 5 ~ 15mm, T₃ 期 > 15mm, T₄ 期肿瘤可见病变侵犯邻近器官和组织。文献资料显示 CT 对食管癌 T 分期的准确率为 50% ~ 80%^[3]。CT 扫描对晚期食管癌较早期病变的诊断准确率高。有研究报道 CT 诊断晚期食管癌(T₃ ~ T₄ 期)的符合率高达 54% ~ 94%, 而表浅病变(T₁ ~ T₂ 期)的准确率只有 33%^[4, 5]。Kneist W 研究显示 CT 扫描诊断肿瘤侵袭食管周围的准确率为 69. 7%, 诊断无侵袭的准确

作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院普胸外科
通讯作者: 于在诚, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: yuzaicheng@vip.sina.com