

- estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial [J]. JAMA, 2002, 288(3):321–333.
- 4 Bonduki CE, Lourenço DM, Motta EL, et al. Effect of estrogen – progestin hormonal replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women [J]. Clinics; Sao Paulo, 2007, 62(5): 553 – 560.
- 5 Bushnell CD, Hurn P, Colton C, et al. Advancing the study of stroke in women: summary and recommendations for future research from an NINDS – Sponsored Multidisciplinary Working Group [J]. Stroke, 2006, 37(9):2387 – 2399.
- 6 ESHRE Capri Workshop Group. Venous thromboembolism in women: a specific reproductive health risk [J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(5):471 – 482.
- 7 王振义. 血栓与止血——基础理论与临床 [M]. 上海: 科学技术出版社, 2004.
- 8 Aleman MM, Walton BL, Byrnes JR, et al. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis [J]. Thromb Res, 2014, 133:S38 – 40.
- 9 Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y. Diagnosis of thrombosis by hemostatic markers [J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(7):1232 – 1236.
- 10 Wyseure T, Declercq PJ. Novel or expanding current targets in fibrinolysis [J]. Drug Discov Today, 2014, 19(9):1476 – 1482.
- 11 Fisher MJ. Brain regulation of thrombosis and hemostasis: from theory to practice [J]. Stroke, 2013, 44(11):3275 – 3285.
- 12 Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. Recent insights and future perspectives [J]. Circ J, 2010, 74(5): 836 – 843.

(收稿日期:2015-05-19)

(修回日期:2015-06-01)

人脐带间充质干细胞对肝癌细胞增殖性及凋亡的影响

廖卫滔 肖佳 郑刚 夏鸿彬 何成宜 周少朋 陈志英

摘要 目的 探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal cell, MSC)对肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)癌细胞增殖和凋亡的影响,为HCC的治疗提供新的思路。**方法** 取50%覆盖率的MSC培养皿,换上新鲜的DMEM/F-12培养基,待其培养至100%的覆盖率后收集培养基备用,即为MSC条件培养基。用新鲜DMEM/F-12培养基加上等量的MSC条件培养基的混合培养基培养HepG₂人类肝癌细胞株24、48和72h,使用MTT法测定HepG₂细胞的增殖活性、通过Hoechst33342和PI双染色后在荧光倒置显微镜下观察计数以测定HepG₂细胞的凋亡、用Transwell侵袭实验和黏附实验测定HepG₂细胞侵袭能力以及通过Western blot法检测凋亡相关信号通路蛋白的表达。**结果** 混合培养基培养HepG₂细胞24h后,对其生长和凋亡及侵袭黏附能力没有显著影响($P > 0.05$)。但是培养延长到48h和72h后,HepG₂细胞的活性、增殖能力、侵袭能力和黏附能力都受到显著的抑制,这些变化伴随着细胞分裂相关因子Ki-67、PCNA和组蛋白H3磷酸化水平下调,以及细胞凋亡执行者caspase-3的激活和抗凋亡蛋白Bcl-2的抑制。**结论** 体外间接共培养实验表明,人脐带间充质干细胞具有抑制肝脏肿瘤细胞增殖及促进其凋亡的作用。

关键词 人脐带间充质干细胞 肝癌 增殖 凋亡 侵袭

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.026

Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell on the Proliferation of Apoptosis of Hepatoma Cells. Liao Weitao, Xiao Jia, Zheng Gang, et al. Laboratory for Gene and Cell Therapy, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangdong 518055, China

Abstract Objective To examine the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell (MSC) on the proliferation of apoptosis of hepatoma cells and to provide novel therapeutic strategy for liver cancer. **Methods** Culture of MSC with 50% confluence was replaced with fresh DMEM/F-12 medium. When the confluence reached 100%, all culture used DMEM/F-12 was considered as the conditioning medium. This kind of medium was mixed with fresh DMEM/F-12 at 1:1 to treat human hepatoma cell line HepG₂ for 24, 48 and 72 hours. Cellual viability was measured by MTT assay, apoptosis was quantified by Hoechst33342/PI co-staining, cell invasion ability and adhesion ability were measured by transwell assay and in vitro adhesion assay, respectively. Change of key signaling compo-

作者单位:518055 中国科学院深圳先进技术研究院基因和细胞治疗技术研究室(廖卫滔、郑刚、夏鸿彬、何成宜、陈志英);519000 珠海,中山大学附属第五人民医院麻醉科(廖卫滔、周少朋);510632 广州,暨南大学生命科学与技术学院免疫生物学系(肖佳)

通讯作者:周少朋,电子信箱:zsp005@163.com;陈志英,电子信箱:zy.chen1@siat.ac.cn

nents were studied by Western blot. **Results** Conditioning medium showed no significant impact on the proliferation, apoptosis and invasion of HepG₂ after 24 - hour incubation ($P > 0.05$). However, when treatment during was extended to 48 and 72 hours, the proliferation and invasion were significantly inhibited by the conditioning medium while cellular apoptosis was invoked. These were accompanied by the down - regulation of Ki - 67, PCNA and histone H3 phosphorylation. Cleaved caspase - 3 was increased while the expression of anti - apoptotic protein Bcl - 2 was inhibited. **Conclusion** Human umbilical cord mesenchymal stem cell was capable of inhibiting proliferation and invasion, as well as promoting apoptosis of human hepatoma cells in vitro.

Key words Human umbilical cord mesenchymal stem cell; Liver cancer; Proliferation; Apoptosis; Invasion

肝癌是全世界常见的恶性肿瘤,它可分为原发性肝癌和转移性肝癌,而肝癌又以原发性肝癌中的肝细胞肝癌(HCC)最为常见。手术切除是目前根治原发性肝癌的首选治疗手段,因为原发性肝癌手术切除后复发率很高,所以术后一般辅以放化疗治疗。肝移植是根治原发性肝癌的有效方法,但是目前肝脏来源过少、费用高以及免疫排斥反应等问题存在阻碍肝移植的广泛开展。

近年来间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)被广泛用于肿瘤方面的研究,Studeny 等^[1]发现供体 MSC 主要在肿瘤部位聚集。Beckermann 等^[2]发现 MSC 主要在胰腺癌肿瘤组织中聚集。MSC 的这一特性现在被称为肿瘤趋向性(tumor tropism)。很多研究表明当 MSC 在肿瘤组织聚集并与肿瘤细胞接触后,它可能通过以下机制发挥抑制肿瘤的效应:①在白血病模型中, MSC 通过分泌 dickkopf - 1(DKK - 1)蛋白反向调控 Wnt 通路抑制肿瘤细胞的增殖^[3];②在卡波西肉瘤模型中,研究者发现 MSC 通过抑制 PI₃K/Akt 通路阻止肿瘤细胞的增殖^[4];③另外一系列体外实验发现 MSC 不单可以抑制肿瘤细胞的增殖,也可以促进其凋亡。Qiao 等^[5]发现在有 MSC 存在的情况下,肝癌细胞 c - myc、Bcl - 2 和 PCNA 的表达水平均呈下降趋势,导致增殖活性降低,凋亡水平增加。MSC 还可以诱导并提高细胞周期抑制蛋白 p21 的活性,使得肿瘤细胞阻滞于 G₀/G₁ 期^[6]。在一项大鼠 HCC 模型研究中发现注射 MSC 直接抑制肿瘤组织的生长,改善了肝脏组织表观和功能^[7]。本研究将着重探讨来源于人类脐带的 MSC 对于肝癌细胞系 HepG₂ 的增殖及凋亡的影响。

材料与方法

1. 材料:(1) HepG₂ 细胞:购自美国 ATCC 公司。HepG₂ 细胞是使用 DMEM/F - 12 完全培养基并放置 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。DMEM/F - 12 完全培养基是在 DMEM/F12 培养基溶液中加入 10% 的 FBS,1% 的双抗(100 ×)配制而成。(2)人脐带间充质干细胞(MSC)的分离和培养:人脐带由深圳市南山医院提供;脐带是按伦理要求经过家属填写《捐

赠同意书》后获得。分离后首先浸泡在 0.9% 的 NaCl 溶液中,分离间充质组织并离心。随后在含 1 mg/ml 的 I 型胶原酶和双抗的 HBSS 缓冲液中培养消化 24h。完成后在 DMEM/F - 12 培养基中长期培养。(3)试剂:DMEM/F - 12 完全培养基购自美国 Cyclone 公司的中国代理上海玉博生物科技有限公司;胎牛血清和双抗(青霉素和链霉素)购自美国 Gibco 公司的中国代理上海玉博生物科技有限公司;MTT、PI(碘化丙啶)、Hoechst 33342 购自上海碧云天公司;Ki67(鼠抗)、PCNA(鼠抗)、Survivin(兔抗)、Bcl - 2(兔抗)和 caspase - 3 抗体(兔抗)购自美国 Cell Signaling 公司中国代理上海川翔生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂购自美国 Bio - Rad 公司中国代理上海拜力生物科技有限公司;transwell 移迁实验的细胞 24 孔培养板、BD Matrigel、结晶紫染液购自上海前尘生物科技有限公司;细胞黏附实验所需纤维连接蛋白购自 Sigma - Aldrich 公司;组蛋白 H3 磷酸化 ELISA 试剂盒购自艾美捷科技有限公司;4% 多聚甲醛固定液购自广州市行知生物科技有限公司;DAPI 购自上海市上海鲁汶生物科技有限公司。

2. HepG₂ 细胞和 hUCMScs 的培养:单独培养时均是使用 DMEM/F - 12 完全培养基(加入 10% 胎牛血清)并放置 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

3. 条件培养基的收集:当 hUCMScs 培养至 50% 覆盖率时,换上新鲜的 DMEM/F - 12 培养基,待其培养至 100% 的密度后收集该培养基即为 MSC 条件培养基。

4. hUCMScs 与 HepG₂ 的共培养实验:培养人类肝癌细胞系 HepG₂ 至 60% 密度,然后将其培养基换成新鲜 DMEM/F - 12 培养基加上等量的 MSC 条件培养基的混合培养基,继续培养 HepG₂ 细胞 24、48 和 72h。在该 3 个时间节点收取细胞进行生物化学和分子生物学分析。

5. 细胞活性测定:共培养实验完成后,在培养基中加入终浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT,然后将细胞放至细胞培养箱中培养 2h。之后在每孔内加入 1 ml DMSO 进行溶解、混匀,吸取 150 μl 至 96 孔细胞培养板内,在酶标仪上以 570 nm 波长读板。

6. 细胞凋亡比例测定:共培养实验完成后,在每孔内加入 5 μg/ml 的 Hoechst 33342 和 5 μg/ml 的 PI,混匀后放至细胞培养箱中培养 20 min,然后在荧光倒置显微镜下观察计数。

7. Ki - 67 免疫组化测定:共培养实验完成后,按照常规方法进行 Ki - 67 的荧光免疫组化染色,使用 5 μg/ml 的 Hoechst 33342 进行复染,在荧光倒置显微镜下观察。

8. 癌细胞体外侵袭能力测定:制备好 Matrigel 的 transwell

培养板后,在培养板下室加入 500 μ l 条件培养基,上室种植密度为 1×10^5 个/毫升的 HepG₂ 细胞 200 μ l,37℃,5% CO₂ 分别培养 24、48 和 72h。在相应时间点取出后 PBS 洗 2 遍,用棉球擦去上室表面细胞,4℃ 甲醇固定 15min;再用 PBS 洗 2 遍,DAPI 染色 1min 室温下染色 1min 后荧光显微镜观察计数。侵袭抑制率(%) = (1 - 实验组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数) × 100%。

9. 癌细胞体外黏附实验:HepG₂ 细胞首先使用无血清的 DMEM(包含 0.2% 胰酶抑制物)清洗 1 遍,然后重悬于培养基中。随后吸取 100 μ l 重悬细胞加入已经包被有 10 μ g/ml 纤维连接蛋白的 96 孔板中,用 1 μ g/ml 的 BSA 封闭。该板在 37℃ 培养指定时间后,用 PBS 洗去未黏附的细胞,然后用 MTT 测定已经黏附的细胞比例。

10. Western blot 法检测:共培养实验完成后,提取每孔细胞总蛋白,经过定量后进行常规 Western blot 法检测增殖和凋亡相关通路蛋白表达量的变化。

11. 组蛋白 H3 磷酸化检测:组蛋白 H3 磷酸化的水平是衡量细胞增殖能力的重要指标之一。笔者利用不同时间点 HepG₂ 细胞总蛋白进行 ELISA 实验,测量各组细胞内组蛋白

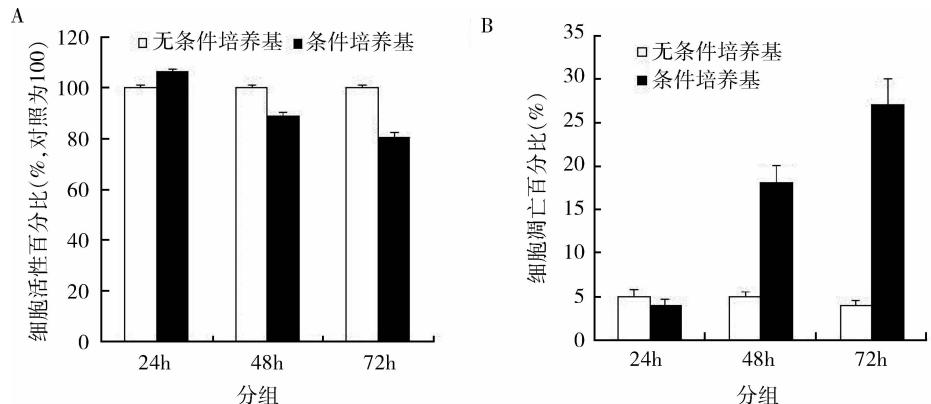


图 1 细胞活性测定结果

3. 癌细胞侵袭和黏附能力测定:体外侵袭和黏附能力是癌细胞成瘤性的重要指标。笔者发现,24h 的 MSC 条件培养基处理对于 HepG₂ 的侵袭能力没有显著影响($P > 0.05$)。但是,随着处理时间的增加,48h 和 72h 处理组的侵袭能力相比起对照组显著下降,提示 MSC 条件培养基可以有效抑制 HepG₂ 的转移能力(图 2)。此外,24h 的 MSC 条件培养基处理对于 HepG₂ 的黏附能力只有少量的影响。但是当处理时间达到 48 或者 72h 后,MSC 条件培养基处理显著降低了 HepG₂ 的体外黏附水平($P = 0.000$,图 3)。

4. 细胞增殖通路测定:为了检测影响 HepG₂ 细胞增殖的分子标志物,笔者进行了 Ki-67 蛋白的免疫组化实验。结果发现,24h MSC 条件培养基处理

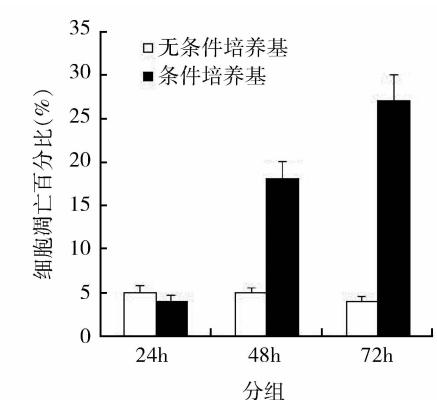
H3 磷酸化的水平。

12. 统计学方法:每个处理时间组为 4 个重复。结果采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。采用方差分析,两两比较时采用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞活性测定结果:使用 MSC 条件培养基处理 HepG₂ 细胞 24h 后,处理组的细胞活性(106.5% ± 1.0%)明显高于对照组(100.0% ± 1.0%)($P = 0.000$)。但是,处理 48h 后,实验组(88.9% ± 1.2%)明显低于对照组(100.0% ± 1.0%)($P = 0.000$);72h 后实验组 HepG₂ 细胞的细胞活性进一步下降(80.6% ± 1.0%),与对照组相比,差异有统计学意义(100.0% ± 1.0%)($P = 0.000$,图 1A)。

2. 凋亡比例测定结果:使用 MSC 条件培养基处理 HepG₂ 细胞 24h 后,处理组与对照组凋亡率差异有统计学意义(图 1B);培养 48h 和 72h 后,处理组的凋亡率都明显高于对照组(图 1B)。



HepG₂ 细胞并未造成细胞内 Ki-67 表达量的明显下降。和细胞活性的结果一样,48 和 72h 处理组的单个细胞内 Ki-67 表达量相较于对照组出现了显著的下降($P = 0.000$),提示 MSC 条件培养基可能通过下调胞内 Ki-67 的表达影响 HepG₂ 的活性。另外细胞内组蛋白 H3 的磷酸化水平的变化也进一步验证了 Ki-67 的定量结果(图 4)。

5. 信号转导通路测定:为了进一步研究 MSC 条件培养基引起 HepG₂ 细胞生长阻滞和凋亡的影响,笔者在两条通路中各挑选了两个关键基因进行蛋白表达变化的分析。在 48 和 72h 这两个时间点上,MSC 条件培养基的处理大幅降低了细胞增殖关键蛋白 PCNA 和 survivin 的表达量,但是大幅增加了细胞凋亡的标志物——激活的 caspase-3 的表达量。此

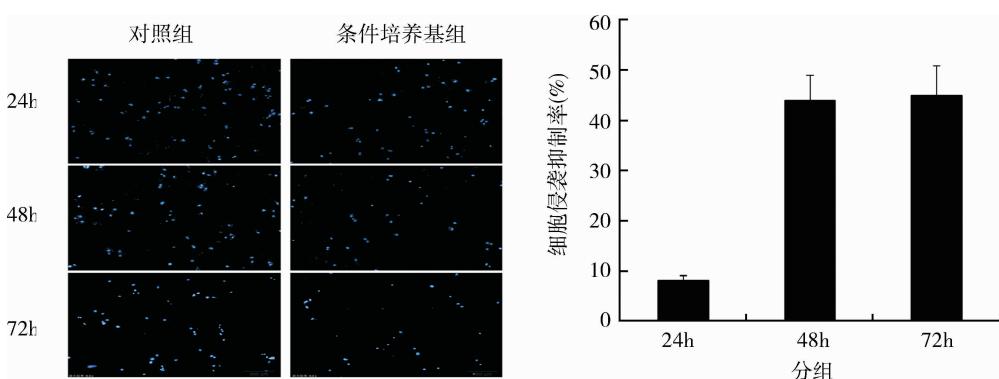


图 2 凋亡比例测定结果

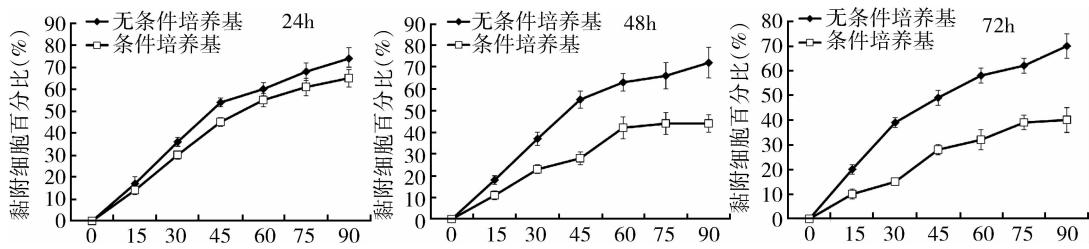


图 3 癌细胞侵袭和黏附能力测定

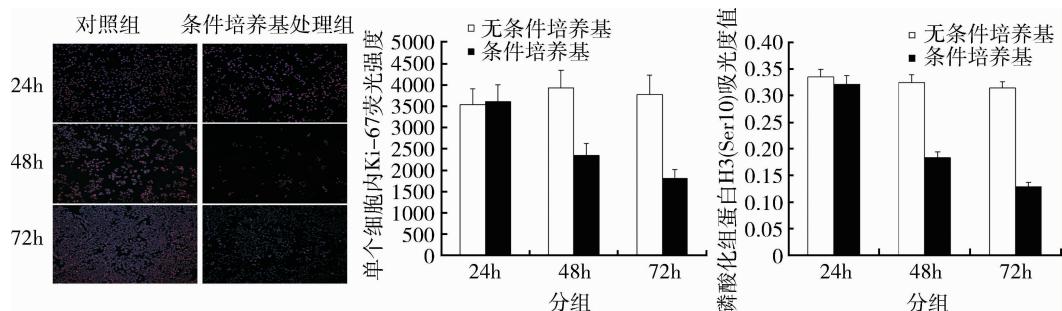


图 4 细胞增殖通路测定

外,细胞内抗凋亡标志蛋白 Bcl - 2 的表达水平被 MSC 条件培养基处理显著抑制(图 5)。

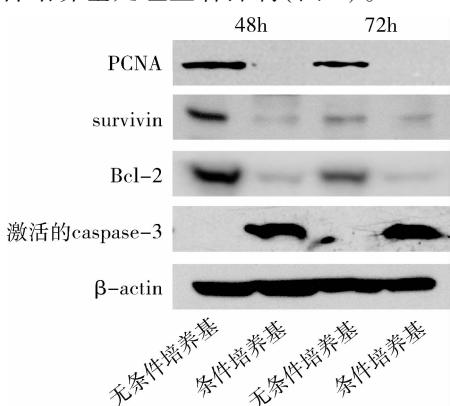


图 5 信号转导通路测定

讨 论

干细胞能否治疗终末肝脏疾病(如肝硬化和肝癌)是当前再生医学研究的热点。已有的报道指出,虽然 MSC 对于急性肝损伤有较明显的保护作用,但是其很难填补和再生已经纤维化(或硬化)的肝脏组织。对于肝癌,有关 MSC 进行临床治疗的研究报道不多。不同的研究表明, MSC 对 HCC 和其他肿瘤有不同,有时甚至是截然相反的作用。在 HCC 中,一般认为 MSC 既能抑制也可以促进 HCC 的病理发生^[8]。而新的研究认为,骨髓 MSC 主要促进部分肿瘤的生长和转移^[9]。究其原因,很可能不同来源的 MSC 分泌不同的细胞因子和其他信号分子发挥旁分泌的作用,而不同的肿瘤的表面表达不同的受体,从而表现出复杂的生理和病理结果^[10]。所以进一步了解各种

MSC 与不同肿瘤相互作用的分子机制,找出适合的 MSC – 特异肿瘤的配对,能够帮助在临床治疗中诱导有效的肿瘤抑制作用而避免促进作用。

在本研究中,笔者通过体外间接共培养实验研究发现,培养过人脐带间充质干细胞的培养基可以起到抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和黏附,并促进其凋亡的作用,表明人脐带间充质干细胞可能具有抑制肿瘤生长和其成瘤性的作用。这种作用是具有时间特异性的,即处理 24 h 之内未见明显的抑制效果,需要将处理时间延长至 48 h 或 72 h 后才能发挥作用。同时,笔者还分析了 MSC 条件培养基发挥这些作用的分子层面的影响。首先, MSC 条件培养基通过下调细胞内 Ki – 67、PCNA 和组蛋白 H3 的磷酸化的水平抑制 HepG₂ 的增殖。其次,通过激活 caspase – 3 和抑制 Bcl – 2 来促进细胞凋亡。

综上所述,人脐带间充质干细胞具有抑制肝脏肿瘤细胞增殖、促进其凋亡的作用。值得注意的是, MSC 由 50% 密度增殖到 100% 密度的时间较短(常规培养条件 24 ~ 36 h 便可完成)。在此如此短的时间内产生的条件培养基就能够显著抑制 HepG₂ 细胞的成瘤性,说明 MSC 在生长过程中很有可能快速分泌一些抑癌物质。近期研究发现,DKK – 1 可能是 MSC 分泌的最重要的抗肿瘤分子之一^[11]。DKK – 1 是 Wnt 通路的直接抑制分子,直接作用的主要受体 Wnt 通路细胞膜上的受体之一——LRP6。除了白血病,亦有报道指出 MSC 分泌的 DKK – 1 可以通过抑制 Wnt 通路减缓乳腺癌细胞的生长^[12]。鉴于 MSC 还可以分泌一些促进肿瘤生长的旁分泌因子,例如白介素 6 等, MSC 在动物模型和临床研究中对于 HCC 生长的分子影响机制还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow – derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon – beta delivery into

tumors [J]. Cancer Res, 2002, 62 (13):3603 – 3608

- 2 Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, et al. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma [J]. Br J Cancer, 2008, 99 (4):622 – 631
- 3 Zhu Y, Sun Z, Han Q, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK – 1 [J]. Leukemia, 2009, 23 (5):925 – 933
- 4 Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma [J]. J Exp Med, 2006, 203 (5):1235 – 1247
- 5 Qiao L, Xu Z, Zhao T, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model [J]. Cell Res, 2008, 18 (4):500 – 507
- 6 Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, et al. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7 (2):245 – 251
- 7 Abdel aziz MT, El Asmar MF, Atta HM, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells in suppression of hepatocarcinogenesis in rats: possible role of Wnt signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30 :49
- 8 Li ZK, He CY, Xiao J, et al. Treating end – stage liver diseases with mesenchymal stem cells: an oak is not felled at one stroke [J]. OA Tissue Engineering, 2013, 1 (1):3
- 9 Zhan J, Li Y, Yu J, et al. Culture medium of bone marrow – derived human mesenchymal stem cells effects lymphatic endothelial cells and tumor lymph vessel formation [J]. Oncol Lett, 2015, 9 (3):1221 – 1226
- 10 Räsänen K, Herlyn M. Paracrine signaling between carcinoma cells and mesenchymal stem cells generates cancer stem cell niche via epithelial – mesenchymal transition [J]. Cancer Discov, 2012, 2 (9):775 – 777
- 11 Chan JK, Lam PY. Human mesenchymal stem cells and their paracrine factors for the treatment of brain tumors [J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20 (10):539 – 543
- 12 Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, et al. Dkk – 1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling [J]. Cancer Lett, 2008, 269 (1):67 – 77

(收稿日期:2015 – 02 – 09)

(修回日期:2015 – 02 – 13)

(上接第 56 页)

- 8 Eya Kalai, Afef Bahous, Nadine Charni, et al. Association of serum levels of aggrecan ARGs, NITEGE fragments and radiologic knee osteoarthritis in Tunisian patients [J]. Joint Bone Spine, 2012, 79 (6):610 – 615
- 9 Melrose J, Isaacs MD, Smith SM, et al. Chondroitin sulphate and heparan sulphate sulphation motifs and their proteoglycans are involved in articular cartilage formation during human foetal knee joint development [J]. Histochem Cell Biol, 2012, 138 (3):461 – 475

- 10 Lotz M, Martel – Pelletier J, Christiansen C, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current statusand perspectives [J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72 :1756 – 1763
 - 11 Struglics A, Lohmander LS, Last K, et al. Aggrecanase cleavage in juvenile idiopathic arthritis patientsls minimally detected in the aggrecanInterglobular domainbut robust at the aggrecan C – terminus [J]. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64 (12):4151 – 4161
- (收稿日期:2015 – 01 – 27)
(修回日期:2015 – 02 – 26)