

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00355

脐带间充质干细胞对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌生长及转移的影响

卢兆桐^{1*}, 李福泉^{1,2}, 邹志强¹, 袁 来¹, 王玉波¹

1. 济南军区总医院胸外科, 济南 250031
2. 东平人民医院胸外科, 泰安 271500

[摘要] **目的** 利用 Lewis 肺癌动物模型探讨脐带来源的间充质干细胞(MSC)对肺癌生长及转移的影响。**方法** 用 16 只 C57BL/6 小鼠分别建立 Lewis 肺癌模型, 并随机分为对照组(NS 组)和 MSC 组, 每组 8 只。MSC 组分别于接瘤后第 7、12、17 天时, 尾静脉注射脐带 MSC (1×10^6 /只), 在第 21 天时处死全部荷瘤小鼠, 观察瘤体生长情况及肺转移情况。**结果** NS 组和 MSC 组的平均瘤体质量分别为 (4.5875 ± 1.04) g、 (4.155 ± 1.13) g, 两组相比差异无统计学意义 ($P=0.59$)。NS 组和 MSC 组的平均肺转移数分别为 (3.75 ± 1.39) 个、 (1.13 ± 1.13) 个, 两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 抑制转移率为 70.0%。**结论** 脐带来源的 MSC 对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌本身的生长无影响, 但能够抑制肿瘤的转移。

[关键词] Lewis 肺癌; 脐血干细胞移植; 间质干细胞; 肿瘤转移

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0355-04

Effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice

LU Zhao-tong^{1*}, LI Fu-quan^{1,2}, ZOU Zhi-qiang¹, YUAN Lei¹, WANG Yu-bo¹

1. Department of Cardiothoracic Surgery, General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031, Shandong, China
2. Department of Cardiothoracic Surgery, People's Hospital of Dongping, Taian 271500, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To study the effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs) on the growth and metastasis of lung cancer using Lewis lung carcinoma animal models. **Methods** Animal models of Lewis lung carcinoma were established in 16 C57BL/6 mice and were randomly divided into normal saline (NS) group and MSC group ($n=8$). Mice in the MSC group were injected with 1×10^6 MSCs via the tail vein at day 7, 12, and 17. All mice were sacrificed to observe the lung metastases and the tumor size at day 21. **Results** The average tumor weight was (4.5875 ± 1.04) g in the NS group and (4.155 ± 1.13) g in the MSC group ($P=0.59$). The average number of lung metastasis nodules was 3.75 ± 1.39 in the NS group and 1.13 ± 1.13 in the MSC group ($P < 0.01$), showing an inhibitory rate of 70%. **Conclusion** Umbilical cord-derived MSCs have no effects on the growth of Lewis lung carcinoma in mice, but they can inhibit tumor metastasis.

[Key words] Lewis lung carcinoma; cord blood stem cell transplantation; mesenchymal stem cells; neoplasm metastasis
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 355-358]

肺癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 并呈逐年增加的趋势。目前临床肺癌的治疗手段主要包括手术治疗、放化疗及生物治疗等。尽管综合治疗措施对恶性肿瘤的治疗疗效有所提高, 但预后仍然很差, 肿瘤的侵袭与转移难以控制是导致疾病的进展和治疗失败主要原因之一。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是一类来源于骨髓基质的非造血性多能干细胞, 具有自我增殖和多向分化等功能。近年来研究发现 MSC 对卡波西肉瘤

等肿瘤细胞的生长有明显的抑制作用^[1-2], 但 Djouad 等^[3]指出 MSC 的免疫调节功能可能是促进肿瘤生长的原因之一。本实验采用 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌模型研究脐带来源的 MSC 对肺癌的生长及其转移的影响, 为临床综合治疗肿瘤寻求新的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 脐带取自济南军区总医院产科健康足月顺产胎儿, 经产妇及其家属书面同意用于科学研

[收稿日期] 2011-07-10 **[接受日期]** 2012-03-10

[作者简介] 卢兆桐, 硕士, 教授, 硕士生导师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0531-51666106, E-mail: 181771308@qq.com

究。Lewis 肺癌细胞株由北京军事医学科学院提供; DMEM 培养液和胎牛血清均为美国 Gibco 公司产品, 单克隆抗体 CD105、CD34、CD106、CD45 和 CD31 均购自美国 Sigma 公司; 普通显微镜及倒置显微镜均为日本 Olympus 公司产品。C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号为 SCXK(京)2006-0009, 共 16 只, 均为雄性, 体质量 18~22 g, SPF 级。

1.2 脐带 MSC 的分离与培养 PBS 冲洗脐带标本 2 遍后用组织剪将脐带剪成 2 cm 左右的小段, 去除脐带内血管和外层羊膜。将分离好的脐带剪成约 1 mm³ 大小的组织块, 取适量接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 放入 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养。4~5 d 半量换液, 观察贴壁细胞至 80% 融合时, 用 0.5% 胰酶消化, 传代培养。

1.3 细胞免疫表型的鉴定 细胞消化后制备单细胞悬液, 分别加入小鼠抗人 FITC 标记的单抗 CD105、CD34、CD106、CD45 和 CD31, 用流式细胞仪 (FACSCalibur 型, 美国 BD 公司) 检测分析。

1.4 Lewis 肺癌动物模型的建立^[4]及分组 复苏 Lewis 肺癌细胞接种于 C57BL/6 小鼠右前肢腋下, 待瘤体长至 2 cm×2 cm×1 cm 大小时断颈椎处死小鼠, 无菌条件下剥取腋下瘤体, 剔除表面结缔组织及内部坏死组织, 剪碎后放入匀浆器, 研磨瘤组织成为细胞悬液, 用 100 目滤器过滤, 滴加生理盐水 (NS) 调整细胞密度至 1×10⁷/ml。在每只 C57BL/6 小鼠右前肢腋下接种 0.2 ml 细胞悬液, 然后随机分为 NS 组和 MSC 组, 每组 8 只; MSC 组分别于接瘤后第 7、12、17 天时, 尾静脉注射脐带 MSC (1×10⁶/只)。在第 21 天时处死全部荷瘤小鼠, 进行指标观察。

1.5 观察指标及方法 观察两组小鼠的活泼状态, 分别于接瘤后第 5、8、11、14、17、20 天用游标卡尺测量肿瘤直径, 计算肿瘤体积 $V(\text{cm}^3) = 4/3\pi r^3$ (其中 π 为圆周率, r 为肿瘤半径) 并绘制肿瘤生长曲线。于接瘤后第 21 天时断颈处死全部小鼠, 完整剥离腋下瘤体, 观察肿瘤坏死程度。用电子秤称瘤体质量, 计算抑瘤率, 抑瘤率 (%) = (NS 组平均瘤体质量 - MSC 组平均瘤体质量) / NS 组平均瘤体质量 × 100%。

剪开小鼠胸腔, 完整取出两侧肺脏, 计数两肺表面肿瘤转移个数, 计算抑制转移率, 抑制转移率 (%) = (NS 组平均转移数 - MSC 组平均转移数) / NS 组平均转移数 × 100%。用电子秤称量双肺

质量后, 将肺组织放入甲醛溶液中固定, 待作切片及 H-E 染色。

1.6 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析, 数值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料比较采用 t 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 脐带 MSC 形态及其表型鉴定 原代培养第 5 天即可见贴壁生长的成纤维样细胞, 10 d 后迅速增殖, 开始出现较大的细胞克隆, 14 d 左右时可达到 80% 融合, 形态呈均一的长梭形, 旋涡状排列 (图 1A)。经诱导可分化成脂肪细胞 (图 1B) 和成骨细胞 (图 1C)。流式细胞仪检测贴壁细胞均表达 CD105、CD106, 不表达造血细胞表型 CD34、CD45 和内皮细胞特异性表型 CD31。

2.2 MSC 对 Lewis 肺癌生长的影响 16 只小鼠于接瘤后第 7 天在右前腋下均可触及瘤体长出, 两组小鼠瘤体生长曲线差异无统计学意义 ($P=0.458$, 图 2A)。于第 21 天时处死全部荷瘤小鼠, 两组瘤体大小无明显区别, NS 组的平均瘤体质量为 (4.587 5 ± 1.04) g, MSC 组的平均瘤体质量为 (4.155 ± 1.13) g, 两组相比差异无统计学意义 ($P=0.59$, 图 2B); 抑瘤率为 9.4%。

2.3 MSC 对 Lewis 肺癌转移的影响 肉眼观察未发生肿瘤转移的肺脏表面光滑、红润, 富有弹性; 而发生肿瘤转移的肺脏表面可见多个鱼肉样转移灶, 呈暗红色 (图 3A)。NS 组的平均肺转移数为 (3.75 ± 1.39) 个, MSC 组的平均肺转移数为 (1.13 ± 1.13) 个, 两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3C); 抑制转移率为 70.0%。NS 组的平均肺质量为 (0.277 7 ± 0.016) g, MSC 组的平均肺质量为 (0.230 7 ± 0.020 4) g, 两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 3D)。肺组织标本切片 H-E 染色后显微镜下观察可见肺组织转移灶处实变, 肺泡结构消失, 周围肺泡间隔增宽, 毛细血管扩张 (图 3B)。

3 讨论

MSC 是一种起源于中胚层发育早期的具有全能干细胞特点的一类干细胞, 因具有自我增殖、多向分化和免疫调节等特点而日益受到关注^[5-6]。目前临床上已经将 MSC 用于各种损伤、肝硬化、股骨头坏死等难治性疾病的治疗, 并已取得令人鼓舞的临床效果^[7-9]。

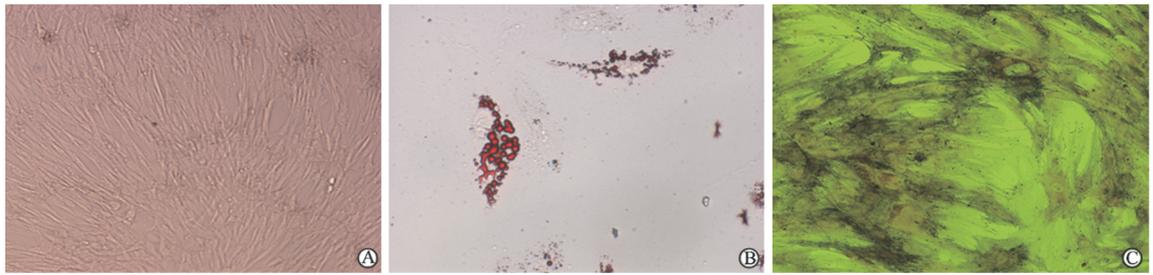


图 1 脐带 MSCs 形态及分化

Fig 1 Characterization and differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs)

A: MSC characterization; B: Differentiation to adipocytes (Oil-Red-O); C: Differentiation to osteoblasts (Alizarin Reds). Original magnification: $\times 200$

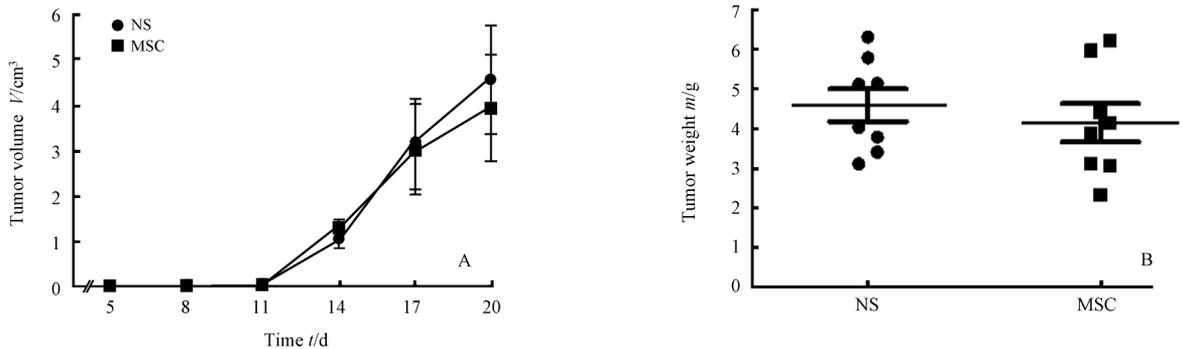


图 2 脐带 MSCs 对 Lewis 肺癌生长的影响

Fig 2 Effect of umbilical cord-derived MSCs on the growth of Lewis lung carcinoma

MSCs: Mesenchymal stem cells; NS: Normal saline. A: Growth curves of the tumors from day 0 to 20; B: Weight of the tumors at day 21. $n=8, \bar{x} \pm s$

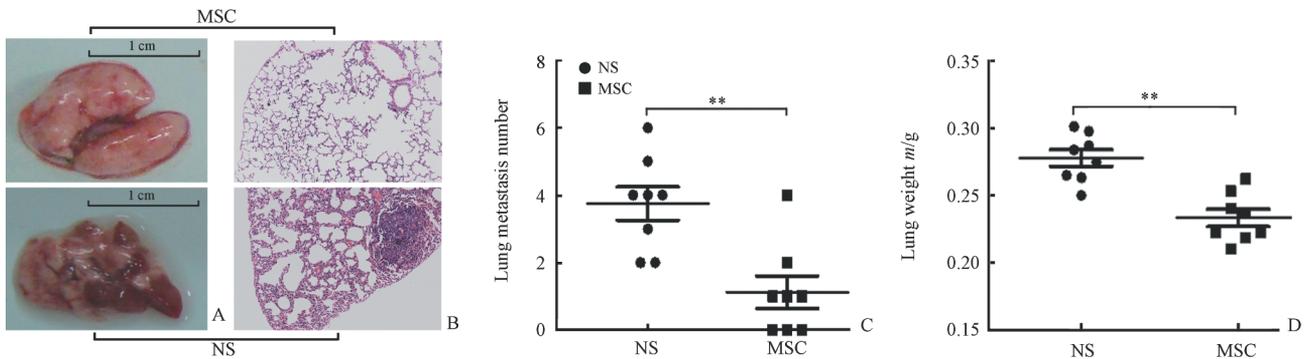


图 3 脐带 MSCs 对 Lewis 肺癌转移的影响

Fig 3 Effect of umbilical cord-derived MSCs on the metastasis of Lewis lung carcinoma

MSCs: Mesenchymal stem cells; NS: Normal saline. A: Macroscopic picture of the lung metastases; B: Representative H-E staining image of lung metastases; C: Reduction in lung metastases number per lung area with MSCs; D: Reduction in lung weight with MSCs. $** P < 0.01$ vs NS group; $n=8, \bar{x} \pm s$. Original magnification: $\times 100$ (B)

近年来研究显示, MSC 在体内不仅具有向损伤和炎症等部位迁移的能力,而且还具有向肿瘤原发灶及转移灶迁移的能力^[10]。目前, MSC 对恶性肿瘤生长与转移影响的研究结果并不一致,一些实验结果表明 MSC 对肿瘤的生长与转移有促进作用^[3,11-12],然而也有相反的报道,如 Li 等^[13]研究发现 MSC 可抑制肝癌转移, Pisati 等^[14]利用人皮肤来源的干细胞直接注入到小鼠脑胶质瘤中,发现也能够

抑制肿瘤的生长。在这些结果中有的来自小鼠体内实验^[12],有的来自体外实验^[15],有的是将 MSC 与肿瘤细胞同时注入到小鼠同一部位^[3],有的则是在距离肿瘤较远的部位输注^[16],这些实验细节的不同可能导致了不同的实验结果。Karnoub 等^[15]研究发现人 MSC 对 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞生长无明显影响,但可促进 MCF-7/Ras 细胞的生长,说明即使同来源的肿瘤,组织学类型不同, MSC 对

其影响也可能不同,其作用机制尚未明确。因此,研究 MSC 对恶性肿瘤的影响不仅应具体到肿瘤的组织学类型、MSC 和瘤细胞的数量比例、MSC 的最佳输注时间,而且选用的荷瘤动物应能准确地反映人体内真实的变化。

在以往实验中研究 MSC 对恶性肿瘤的影响采用的动物多为 T 细胞免疫缺陷性小鼠或重症联合免疫缺陷病小鼠,这些小鼠的免疫系统与人的免疫系统存在较大差异,不能准确反映人体内 MSC 与恶性肿瘤的相互关系。本实验中,我们选用的动物为 C57BL/6 纯系小鼠,它们具有正常的免疫功能,更加接近人体内环境,因此更能准确地反映人体内 MSC 对恶性肿瘤生长与转移的影响。除此之外,以往实验中 MSC 与肿瘤细胞同时注入到动物体内的方法与人体内肿瘤的自然产生与发展规律不同,为更好地模拟人体内的真实变化,本实验在对小鼠接种 Lewis 肺癌 1 周后首次给予 MSC,每 5 天一次,连续 3 个疗程,结果显示: NS 组与 MSC 组相比瘤体生长曲线及平均瘤体质量差异均无统计学意义,但完整取出小鼠双肺后发现 NS 组可见多个鱼肉样肺转移灶,而 MSC 组仅个别小鼠发生了肺转移,经计算 MSC 抑制肺转移率为 70.0%,两组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),说明脐带 MSC 对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌的生长无明显影响,但可明显抑制肿瘤的转移,提示可以利用脐带 MSC 来增强患者的免疫力,遏制肿瘤的转移,从而提高患者的生存率,这可能成为治疗肿瘤的一种新的有效手段。

综上所述,尽管 MSC 在小鼠体内的存活状态、随时间点的具体变化以及 MSC 对肿瘤影响的作用机制尚需进一步研究,但从本研究结果可以看出脐带 MSC 对小鼠 Lewis 肺癌的生长无明显影响,但可抑制肿瘤的肺转移。本研究结果可为今后利用脐带 MSC 修复肺癌化疗时引起的各种损伤提供依据,也为临床综合治疗肺癌提供一种新的方法。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Khakoo A Y, Pati S, Anderson S A, Reid W, Elshal M F, Rovira I I, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma[J]. *J Exp Med*, 2006, 203:1235-1247.

[2] Pisati F, Belicchi M, Acerbi F, Marchesi C, Giussani C, Gavina M, et al. Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models[J]. *Cancer Res*, 2007, 67:3054-3063.

[3] Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals[J]. *Blood*, 2003, 102:3837-3844.

[4] 刘馨,伍治平,左曙光,周永春,陈艳,王熙才.小鼠 Lewis 肺癌原位模型的构建[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13:42-47.

[5] Tropel P, Platet N, Platel J C, Noël D, Albrieux M, Benabid A L, et al. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24:2868-2876.

[6] Jones B J, Brooke G, Atkinson K, McTaggart S J. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells[J]. *Placenta*, 2007, 28:1174-1181.

[7] Abdallah B M, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications[J]. *Gene Ther*, 2008, 15:109-116.

[8] 徐应龙,王坚.间充质干细胞作为载体用于肿瘤治疗[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32:1030-1034.

Xu Y L, Wang J. Mesenchymal stem cells: a delivery vehicle for cancer therapy[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32:1030-1034.

[9] Abdallah B M, Kassem M. The use of mesenchymal (skeletal) stem cells for treatment of degenerative diseases: current status and future perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218:9-12.

[10] Studeny M, Marini F C, Champlin R E, Zompetta C, Fidler I J, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors[J]. *Cancer Res*, 2002, 62:3603-3608.

[11] Shinagawa K, Kitada Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127:2323-2333.

[12] Kyriakou C A, Yong K L, Benjamin R, Pizzey A, Dogan A, Singh N, et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) expressing truncated soluble vascular endothelial growth factor receptor (tsFlk-1) following lentiviral-mediated gene transfer inhibit growth of Burkitt's lymphoma in a murine model[J]. *J Gene Med*, 2006, 8:253-264.

[13] Li G C, Ye Q H, Xue Y H, Sun H J, Zhou H J, Ren N, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit metastasis of a hepatocellular carcinoma model using the MHCC97-H cell line[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101:2546-2553.

[14] Pisati F, Belicchi M, Acerbi F, Marchesi C, Giussani C, Gavina M, et al. Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models[J]. *Cancer Res*, 2007, 67:3054-3063.

[15] Karnoub A E, Dash A B, Vo A P, Sullivan A, Brooks M W, Bell G W, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2007, 449:557-563.

[16] Sun B, Zhang S, Ni C, Zhang D, Liu Y, Zhang W, et al. Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow[J]. *Stem Cells Dev*, 2005, 14:292-298.