

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00488

骨髓间充质干细胞抑制肾癌 A498 细胞增殖及侵袭能力

邓 震, 刘 军, 朱凌峰, 陈书尚, 吴卫真, 谭建明*

南京军区福州总医院泌尿外科, 福州 350001

[摘要] **目的** 探讨骨髓间充质干细胞对肾癌细胞系 A498 增殖和侵袭能力的影响。**方法** 将骨髓间充质干细胞及人成纤维细胞分别与肾癌 A498 细胞共培养, 利用流式细胞仪测定细胞周期, 检测骨髓间充质干细胞及人成纤维细胞对 A498 细胞增殖能力的影响; Transwell 侵袭实验分析肾癌 A498 细胞体外侵袭能力; qRT-PCR 检测共培养后肾癌 A498 细胞 *Snail* 和 *E-cadherin* 基因的表达。**结果** 骨髓间充质干细胞可明显抑制 A498 细胞的增殖及侵袭能力 ($P < 0.05$); qRT-PCR 结果表明, 与骨髓间充质干细胞共培养后, A498 细胞中 *Snail* 基因表达下调 ($P < 0.05$), 而 *E-cadherin* 基因表达上调 ($P < 0.05$)。成纤维细胞对 A498 细胞所起的作用与骨髓间充质干细胞相反。**结论** 骨髓间充质干细胞体外可抑制 A498 细胞的增殖和侵袭。

[关键词] 肾肿瘤; 骨髓; 间质干细胞; 细胞增殖; 肿瘤侵袭

[中图分类号] R 737.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0488-04

Inhibitory effect of bone marrow mesenchymal stem cells against proliferation and invasion of human renal cell carcinoma A498 cells

DENG Zhen, LIU Jun, ZHU Ling-feng, CHEN Shu-shang, WU Wei-zhen, TAN Jian-ming*

Department of Urology, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350001, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To study the inhibitory effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) on the proliferation and invasion of human renal cell carcinoma cell line A498. **Methods** Human renal cell carcinoma cell line A498 cells were co-cultured with BM-MSCs or human dermal fibroblasts-adult (HDF-a) cells separately, and then cell proliferation was detected by flow cytometry and cell invasion ability was detected by transwell assay in each group. qRT-PCR was used to exam *Snail* and *E-cadherin* mRNA expression in A498 cells, HDF-a-treated A498 cells and BM-MSCs-treated A498 cells. **Results** BM-MSCs greatly inhibited the proliferation and invasion of A498 cells ($P < 0.05$). qRT-PCR showed that co-culture with BM-MSCs significantly down-regulated *Snail* mRNA expression ($P < 0.05$) and up-regulated *E-cadherin* mRNA expression ($P < 0.05$) in A498 cells. Compared with BM-MSCs, HDF-a played an opposite role as for the above items. **Conclusion** BM-MSCs play an important role in the proliferation and invasion of LNCaP cells, which may cast new light for the biotherapy of human renal cell carcinoma cancer.

[Key words] kidney neoplasms; bone marrow; mesenchymal stem cells; cell proliferation; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5):488-491]

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)发病率居泌尿系恶性肿瘤的第3位, 约占成人实体恶性肿瘤的2%~3%。不同国家或地区肾癌发病率不同, 发达国家肾癌发病率高于发展中国家, 我国近年来肾癌的发病率和死亡率均有上升趋势^[1]。提高肾癌的诊治水平, 探讨肾癌的多种治疗手段, 延长肾癌患者的生存期及生活水平, 成为泌尿外科医生面对的重

要课题之一。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)是目前研究最为广泛的成体干细胞之一, 具有自我更新和多向分化潜能。大量研究表明, BM-MSCs 与肿瘤的发生和发展具有密切关系^[2-4], 不仅表现为对肿瘤有明显的募集作用, 还表现在干预肿瘤细胞的生物学行为。本研究将

[收稿日期] 2014-09-11 **[接受日期]** 2015-01-21

[基金项目] 福建省科技厅基金(2012D022)。Supported by Fund from the Science and Technology Department of Fujian Province (2012D022)。

[作者简介] 邓 震, 博士, 主治医师。E-mail: dengzhen1201@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0591-22859398, E-mail: tanjim156@xmu.edu.cn

BM-MSCs 与 A498 细胞共培养,观察 BM-MSCs 对 A498 增殖和侵袭能力的影响,并对其机制进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 A498 细胞及人成纤维细胞 HDF-a(ATCC 公司); RPMI 1640 培养液、DMEM 培养液、胎牛血清、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品; RNA 提取试剂 TRIzol 为 Invitrogen 公司产品。Transwell 为 Millicell 公司产品。流式细胞术相关抗体: CD29 抗体(BD PharMingen), CD73、CD105 抗体(Santa Cruz Biotechnology), CD14、CD34、CD45、CD90 抗体(NeoMarker 公司); FITC 和 Cy3 荧光素二抗(Sigma 公司)。

1.2 BM-MSCs 采集、分离、培养及鉴定 BM-MSCs 采集、分离、培养、鉴定参照本实验室以往流程^[5], 简述如下: 无菌抽取健康供者 10 mL 骨髓液, 肝素抗凝, Ficoll 梯度密度离心法分离, 获取单个核细胞层, 用 PBS 洗涤 2 次后计数细胞, 按 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶, 用含 10% (体积分数) 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液培养。3 d 后去除非贴壁细胞, 每 3 d 更换培养液, 当贴壁细胞达 80% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 细胞按 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种传代。取生长状态良好的第 5 代细胞, 用 1 mL PBS 洗涤后, 与一抗孵育液(一抗按 1:50 稀释)室温下孵育 1 h; PBS 洗涤 2 次后, 分别与 FITC 或 Cy3 二抗(稀释倍数分别为 1:32 和 1:50)室温下避光孵育 30 min; PBS 洗涤 2 次后, 弃去 PBS, 再加入 500 μL PBS 重悬细胞。利用流式细胞技术鉴定表面分子标记物(CD73、CD90、CD105、CD34、CD45、CD29 和 CD14)。

1.3 BM-MSCs 与 A498 细胞共培养 将 BM-MSCs 或 HDF-a 细胞置于 Transwell 上室, A498 细胞置于下室, 共培养 48 h 后, 常规胰酶消化置于下室的 A498 细胞, PBS 冲洗 3 次后, 进行后续实验。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期 分为实验组、阴性对照组和阳性对照组, 实验组为 BM-MSCs 与 A498 细胞共培养, 阴性对照组为野生型 A498 细胞, 阳性对照组为 HDF-a 与 A498 细胞共培养。取对数生长期的细胞 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 胰酶消化, 离心收集细胞, 弃上清, 用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入预冷 75% 乙

醇, 4℃ 固定过夜。离心收集细胞, 以 1 mL PBS 洗细胞 2 次, 加入 500 μL PBS[含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙啶(PD), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A, 0.2% Triton X-100], 4℃ 避光孵育 30 min。用流式细胞仪以标准程序检测, 一般计数 2 万~3 万个细胞, 结果用细胞周期拟合软件 Mod-Fit 分析。

1.5 细胞侵袭实验 实验分为实验组、阴性对照组和阳性对照组, 实验组为 BM-MSCs 与 A498 细胞共培养, 阴性对照组为野生型 A498 细胞, 阳性对照组为 HDF-a 与 A498 细胞共培养。用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面, 4℃ 风干。消化共培养后的细胞, 用含 BSA 的无血清培养基重悬。调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。取细胞悬液 200 μL 加入 24 孔板 Transwell 小室。培养 32 h 后用棉签擦去基质胶和上室内细胞, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.5% 结晶紫染色 10 min。使用正置显微镜进行观察和拍照, 采用 3~5 个视野进行细胞计数, 并求平均值。

1.6 qRT-PCR 测定目的基因表达 用 TRIzol 试剂提取各组 A498 细胞的总 RNA, 反转录为 cDNA, 进行扩增。引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成。Snail 引物序列: 上游 5'-CAT TCA GGC CAC CTT CTT TC-3', 下游 5'-TCC AGT AAC CAC CCT GCT GA-3'; E-cadherin 引物序列: 上游 5'-GGA GGC AGA GGC AGT CAG AT-3', 下游 5'-GGT TTG CAG AGA CAG GGT TTC-3'; β -actin 作为内参照, 其引物序列: 上游 5'-AGA AAA TCT GGCACC ACA CC-3', 下游 5'-AGA GGC GTA CAGGGA TAG CA-3'。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min 后结束反应。定量分析采用 ABI 7500 软件, 各组重复 3 次, 取其平均值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数进行单因素方差分析, 组间比较采用 q 检验, 检验水准(α) 为 0.05。

2 结果

2.1 BM-MSCs 的鉴定 将体外分离纯化并扩增后的 BM-MSCs 利用流式细胞仪进行表面分子鉴定。其中, CD73、CD90、CD105、CD29 呈阳性反应,

表达细胞比例分别为 $(96.9 \pm 0.3)\%$ 、 $(96.7 \pm 0.3)\%$ 、 $(94.0 \pm 0.4)\%$ 、 $(97.4 \pm 0.4)\%$; CD34、CD45、CD14 呈阴性反应,表达细胞比例分别为 $(0.7 \pm 0.2)\%$ 、 $(1.3 \pm 0.2)\%$ 、 $(0.2 \pm 0.1)\%$ 。

2.2 BM-MSCs 对 A498 细胞周期的影响 流式细胞术检测结果表明:与 BM-MSCs 共培养的 A498 细胞中,处于 G_0/G_1 期细胞的比例高于野生型 A498 细胞 $[(70.57 \pm 5.63)\% \text{ vs } (63.23 \pm 4.71)\%, P < 0.05]$,且上述两者均高于与 HDF-a 共培养的 A498

细胞 $[(54.23 \pm 3.17)\%, P < 0.05]$ 。结果提示与 BM-MSCs 共培养明显抑制了 A498 细胞的生长。

2.3 BM-MSCs 对 A498 细胞体外侵袭能力的影响 Transwell 实验结果(图 1)表明:与 BM-MSCs 共培养的 A498 细胞穿过滤膜的数量少于野生型 A498 细胞 $(72.00 \pm 17.78 \text{ vs } 116.67 \pm 11.37, P < 0.05)$,且上述两者均少于与 HDF-a 共培养的 A498 细胞 $(156.67 \pm 26.76, P < 0.05)$ 。结果提示 BM-MSCs 可使 A498 细胞侵袭能力降低。

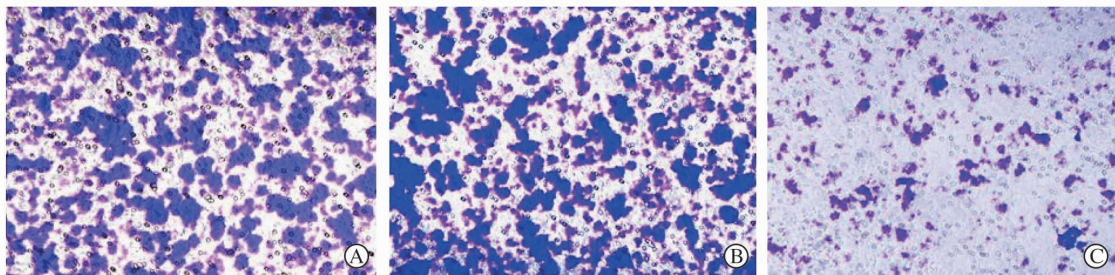


图 1 BM-MSCs 抑制 A498 细胞的侵袭能力

Fig 1 BM-MSCs suppressed the invasion ability of A498 cells

A: A498 cells; B: A498 cells co-cultured with HDF-a cells; C: A498 cells co-cultured with BM-MSCs. BM-MSCs: Bone marrow mesenchymal stem cells. Original magnification: $\times 400$

2.4 BM-MSCs 对 A498 细胞 *Snail* 和 *E-cadherin* 基因表达的影响 qRT-PCR 检测结果表明:与 BM-MSCs 共培养的 A498 细胞 *Snail* mRNA 表达水平低于单纯 A498 细胞和与 HDF-a 共培养的 A498 细胞 $(0.240 \pm 0.137 \text{ vs } 1.000 \pm 0.169, 1.990 \pm 0.408, P < 0.05)$;而 *E-cadherin* mRNA 在与 BM-MSCs 共培养的 A498 细胞表达水平高于单纯 A498 细胞、与 HDF-a 共培养的 A498 细胞 $(2.690 \pm 0.248 \text{ vs } 1.000 \pm 0.137, 0.680 \pm 0.266, P < 0.05)$ 。结果提示 BM-MSCs 可抑制肾癌 A498 细胞上皮间充质转化能力。

3 讨论

近年来大量研究报道了间充质干细胞(MSCs)能特异地向肿瘤及肿瘤转移部位迁移,这一向肿瘤募集的现象已经得到共识^[2-4],但 MSCs 对肿瘤细胞的作用存在较多争议,主要表现在 MSCs 是促进肿瘤细胞生长^[6-9],还是抑制肿瘤细胞生长^[10-14]。Yu 等^[9]将脂肪组织中提取的 MSCs 与肺癌 H460 细胞或神经胶质瘤 U87MG 细胞一同注入裸鼠体内,发现 MSCs 可促进肿瘤细胞生长。Sun 等^[6]报道

MSCs 可通过促进肿瘤血管生成而促进黑素瘤的生长。同时也有较多文献报道了 MSCs 对肿瘤细胞的抑制作用。Cousin 等^[13]通过体外实验发现,脂肪组织来源的 MSCs 可以促进胰腺癌细胞坏死,在体内实验中证实脂肪组织来源的 MSCs 可以表现出持久的抑瘤作用。Qiao 等^[11]证实, MSCs 可通过 Wnt 信号通路抑制肝癌细胞的生长及促进肝癌细胞凋亡。

目前尚缺乏 MSCs 对肾癌细胞作用的相关研究。本实验通过将 BM-MSCs 与肾癌 A498 细胞共培养,发现 BM-MSCs 可以将 A498 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,从而抑制 A498 细胞的生长。共培养 32 h 后,即在不影响细胞活性的时间点进行 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力,结果发现与 BM-MSCs 共培养的 A498 细胞穿过滤膜的细胞数约为对照组的 50%,提示 BM-MSCs 可以抑制 A498 细胞的侵袭能力。同时,以人成纤维细胞 HDF-a 作为阳性对照,实验结果表明同为间充质来源的成纤维细胞可促进肾癌细胞的增殖与侵袭,与 BM-MSCs 对肾癌 A498 细胞的抑制作用正好相反,起到了很好的佐证作用。

研究表明,锌指转录因子 Snail 蛋白可通过转录

抑制 E-cadherin 蛋白的表达诱导上皮间充质转化的发生,从而增强肿瘤细胞的侵袭性^[15]。王晓彬等^[16]通过免疫组化的方法发现,肾透明细胞癌组织 Snail 阳性率高于癌旁组织,而 E-cadherin 阳性率低于癌旁组织,两者的表达均与肾透明细胞癌不同分化程度、分期、浸润和转移有关。本实验通过 qRT-PCR 发现,BM-MSCs 可以抑制 A498 细胞 *Snail* 基因的表达,增强 *E-cadherin* 基因的表达,从而在机制上初步阐明了 BM-MSCs 抑制 A498 细胞生物学行为的原因。但是,MSCs 如何调控 *Snail* 和 *E-cadherin* 基因的表达,以及 MSCs 在体内如何调控肾癌细胞生长尚不清楚,将在今后实验中进一步探索。

[参考文献]

- [1] 那彦群,叶章群,孙 光. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:54.
- [2] 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.
- [3] Goldstein R H, Reagan M R, Anderson K, Kaplan D L, Rosenblatt M. Human bone marrow-derived MSCs can home to orthotopic breast cancer tumors and promote bone metastasis[J]. Cancer Res,2010,70:10044-10050.
- [4] Liu S,Ginestier C,Ou S J,Clouthier S G,Patel S H, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks [J]. Cancer Res,2011,71:614-624.
- [5] Tan J,Wu W,Xu X,Liao L,Zheng F,Messinger S, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial[J]. JAMA,2012,307: 1169-1177.
- [6] 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.
- [7] Zhu W,Xu W,Jiang R,Qian H,Chen M,Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo* [J]. Exp Mol Pathol, 2006,80:267-274.
- [8] Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis[J]. Blood,2007,109:693-702.
- [9] Yu J M, Jun E S, Bae Y C, Jung J S. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth *in vivo* [J]. Stem Cells Dev, 2008, 17:463-473.
- [10] 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.
- [11] Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao R C, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model[J]. Cell Res,2008, 18:500-507.
- [12] Cho J A, Park H, Kim H K, Lim E H, Seo S W, Choi J S, et al. Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line [J]. Cancer,2009,115:311-323.
- [13] Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both *in vitro* and *in vivo* [J]. PLoS One,2009,4:e6278.
- [14] Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1[J]. Leukemia,2009,23: 925-933.
- [15] Bruyere F, Namdarian B, Corcoran N M, Pedersen J, Ockrim J, Voelzke B B, et al. Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers[J]. Urol Oncol,2010,28:591-596.
- [16] 王晓彬, 窦中岭, 史海军, 刘 辉, 李世朋. 转录因子 Snail 及上皮钙黏素在肾透明细胞癌中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志,2012,29:1031-1033.

[本文编辑] 尹 茶