

• 实验研究 •

间充质干细胞对小鼠前列腺癌生长和血管生成促进作用的研究

唐礼功¹ 谢森¹ 潘铁军¹ 李志雄¹ 陈欢欢¹

[摘要] 目的:探讨间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)对 RM-1 小鼠前列腺癌细胞生长的影响及其可能机制。方法:从小鼠骨髓中无菌分离培养扩增 MSCs。将 MSCs 与 RM-1 细胞混合后接种于 Balb/c 小鼠皮下,观察肿瘤生长情况;采用免疫组化法检测肿瘤组织血管生成情况(CD34 染色);采用 Realtime PCR 法和 ELISA 法检测 MSCs 促进血管生成相关分子的表达情况。结果:MSCs 与 RM-1 小鼠前列腺癌细胞混合后接种于 Balb/c 小鼠皮下,与对照组相比, MSCs 可明显促进肿瘤生长($P < 0.05$);前列腺癌组织中 CD34 免疫组化染色结果证实 MSCs 组较对照组微血管密度显著升高($P < 0.05$);Realtime PCR 及 ELISA 结果显示 MSCs 条件培养上清中 VEGF 表达显著升高。结论:MSCs 可能通过表达 VEGF 促进前列腺癌血管形成,从而达到促进肿瘤生长的目的。

[关键词] 前列腺癌;间充质干细胞;血管生成;血管内皮生长因子

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2012)09-0703-04

The effect of mesenchymal stem cells on angiogenesis of prostate cancer cell line RM-1 in vivo

TANG Ligong XIE Sen PAN Tiejun LI Zhixiong CHEN Huanhuan

(Department of Urolog, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command of PLA, Wuhan, 430070, China)

Corresponding author: , E-mail: dr. xiesen@medmail.com.cn

Abstract Objective: To investigate the effect of mesenchymal stem cells(MSCs) on angiogenesis of prostate cancer cell line RM-1 in vivo. **Methods:** MSCs were isolated and culture-expanded from mouse bone marrow. Prostate cancer cell line RM-1 cells were mixed with MSCs and subcutaneous plated in Balb/c mice to observe the tumor growth in vivo. CD34 immunohistochemistry staining were used to examine the micro-vessel density(MVD) in tumor tissue. Realtime PCR and ELISA assay were employed to detect the expression of proangiogenesis factors in MSCs. **Results:** Compared with control groups, MSCs could effectively promote the growth of RM-1 cells in vivo ($P < 0.05$). The result from immunohistochemistry demonstrated that the MVD of prostate cancer tissue is significantly higher in MSCs group than control group. Realtime PCR showed that there existing VEGF expression in MSCs and the result from ELISA assay confirmed that VEGF could be detected in the condition medium of MSCs. **Conclusions:** MSCs may promote the growth of prostate cancer cell line RM-1 in vivo by stimulate angiogenesis via production of VEGF.

Key words prostate cancer cell; mesenchymal stem cells; angiogenesis; vascular endothelial growth factor

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,主要存在于骨髓组织和结缔组织器官间质中。作为多能干细胞的 MSCs,在一定诱导条件下既可向成骨细胞、脂肪细胞等中胚层细胞分化^[1,2],也可向外胚层神经细胞及内胚层肝卵圆性细胞分化^[3~5]。已有实验表明 MSCs 具有向肿瘤局部特异性趋化的特性。Hung 等^[6]发现 MSCs 可靶向进入微小肿瘤灶,随后增殖分化,成为肿瘤基质的

重要成分。Nakamizo 等^[7]将荧光标记的正常人 MSCs 输入 U87 神经胶质瘤小鼠模型的颈动脉,发现不论是在肿瘤同侧或对侧颈动脉注入 MSCs 均可聚集到脑肿瘤内。他们还发现将 MSCs 输入神经胶质瘤对侧大脑半球, MSCs 仍可向肿瘤处迁移。类似的现象在肺癌及 Kaposi's 肉瘤等多个动物模型中均存在^[8,9]。肿瘤的生长需要大量的营养物质,那么营养输送途径的建设和畅通对肿瘤组织的生长起到了至关重要的作用。肿瘤血管生成是肿瘤发生发展的关键步骤,当肿瘤直径达到 1~2 mm 之后,若没有新生血管生成提供营养,肿瘤不

¹ 广州军区武汉总医院泌尿外科(武汉,430070)

通信作者:谢森, E-mail: dr. xiesen@medmail.com.cn

能继续生长。本课题拟通过研究 MSCs 对前列腺癌细胞 RM-1 体内生长的影响及其促进肿瘤血管生成的机制,为研究前列腺癌发生发展机制提供进一步证据。

1 材料与方法

1.1 材料和动物

SPF 级 Balb/c 小鼠购自中国科学院实验动物中心,4~6 周龄,雄性,饲养于本院动物中心 SPF 环境;抗小鼠 VEGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,抗小鼠 CD34 单克隆抗体购自 Abbiotec 公司;小鼠 VEGF ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 小鼠骨髓间充质干细胞体外培养、纯化、扩增及鉴定

将 Balb/c 小鼠在超净台上断颈处死后,取股骨和胫骨,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔,直至髓腔发白。收集细胞悬液,离心,计数,进行原代接种。经多次传代扩增培养,使 MSCs 逐渐得到纯化和扩增。

1.3 RM-1 前列腺癌细胞移植瘤体内实验

RM-1 小鼠前列腺癌动物模型:将 Balb/c 小鼠骨髓源性 MSCs(1×10^5 cell/100 μ l)与 RM-1 细胞(1×10^6 cell/100 μ l)按照 1:10 混合,然后接种 Balb/c 小鼠右腋下。实验分为三组,每组 10 只:①单纯接种 RM-1 细胞组;②单纯接种 MSCs 组;③MSCs 与 RM-1 混合接种组。

1.4 Real-time PCR 法检测 VEGF 表达

用柱式总 RNA 抽提试剂盒提取各组细胞总 RNA,用逆转录酶 M-MLV 逆转录成第一链 cDNA。用 VEGF 引物,上游:5'-GGAGATCCT-TCGAGGAGCACTT-3',下游:5'-GGCGATT-TAGCAGCAGATATAAGAA-3'。按 PCR 反应程序进行扩增:预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s,PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。绘制溶解曲线,实时定量检测扩增产物。

1.5 MSCs 条件培养液 (Conditioned medium, CM) 的制备

MSCs 培养至 80% 融合度后,更换新鲜无血清低糖 DMEM 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱内继续培养 24 h,收集培养上清,离心 10 min,以去除细胞碎屑成分,用 0.22 μ m 孔径一次性滤器过滤除菌,置于-20 $^{\circ}$ C 中保存备用。

1.6 酶联免疫吸附实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

分别设空白孔(空白对照孔不加样品,其余各步操作相同)、标准品孔、待测样品孔,各孔均设三复孔。标准品孔中加入不同稀释浓度的标准品 200 μ l,在样本反应孔中加入待测样品 200 μ l,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。弃去孔中液体,拍干,加洗液反

复洗 3 次。每孔加入生物素标记的抗 IgG 抗体 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h。弃去孔中液体,拍干,加洗液反复洗 3 次。每孔加入 50 μ l 链酶亲和素 HRP,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。弃去孔中液体,拍干,加洗液反复洗 3 次。每孔先加入显色剂 A50 μ l,再加入显色剂 B50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min。每孔加终止液 50 μ l,终止反应(此时蓝色立转黄色)。以空白空调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。测定应在加终止液后 15 min 以内进行。

以标准品浓度为横坐标,OD 值为纵坐标。在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度,再乘以稀释倍数;或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

1.7 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件。存活时间用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组内差别用 One-Way ANOVA 检验,两组间差异用两样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 的分离、培养和鉴定结果

骨髓贴壁培养 72 h 后,去除悬浮细胞;继续培养 3 天后可见分散的细胞克隆形成,细胞形态为长梭形,贴附与培养皿底,呈成纤维细胞样生长,核仁明显,核染色质稀疏。传代后的细胞形态与原代相似。MSCs 细胞可诱导分化成为脂肪细胞和成骨细胞。MSCs 表面标记物鉴定 CD90、CD105 及 CD29 表达呈阳性,CD34 和 CD45 表达呈阴性。

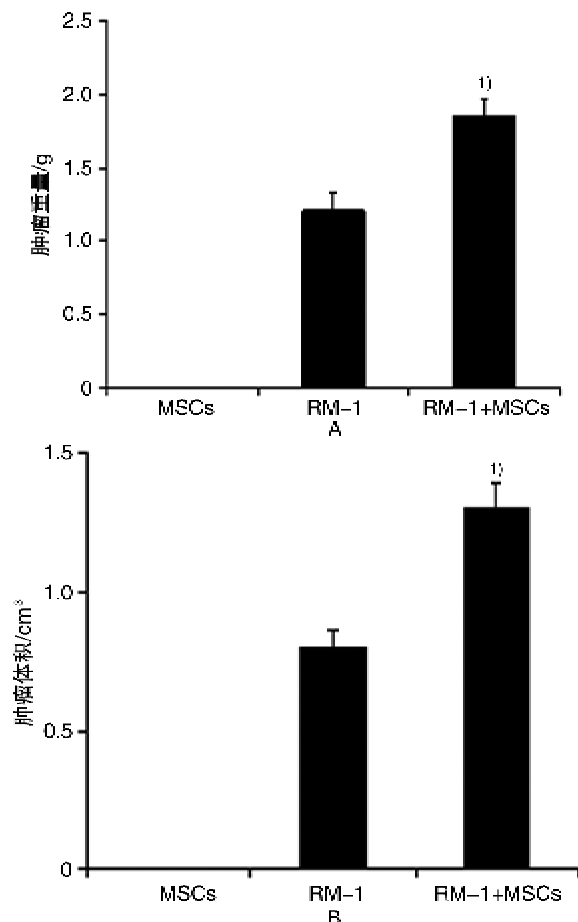
2.2 MSCs 对 RM-1 小鼠前列腺癌细胞体内生长的影响

为了研究 MSCs 对 RM-1 小鼠前列腺癌细胞体内生长的影响,我们将 MSCs(1×10^5)与 RM-1 细胞(1×10^6)按照 1:10 混合后接种于 Balb/c 小鼠右腋下。对照组分别为①单纯接种 RM-1 组和②单纯接种 MSCs 组。接种后 18 天处死小鼠,观察肿瘤重量和体积。

结果如图 1 所示,与单纯接种 RM-1 组相比,MSCs 可显著促进 RM-1 细胞在体内的生长($P < 0.01$),而单纯接种 MSCs 则未见肿瘤形成。上述结果提示,MSCs 可有效促进 RM-1 前列腺癌细胞在体内的生长,而单纯 MSCs 在小鼠体内无法成瘤。

2.3 MSCs 对 RM-1 小鼠前列腺癌组织血管形成的影响

由于肿瘤的生长与肿瘤组织中血管形成密切相关,我们采用 CD34 免疫组化染色来研究 MSCs 对 RM-1 小鼠前列腺癌组织中血管形成的影响。



A, MSCs 对 RM-1 细胞皮下瘤重量的影响 ($P < 0.05$); B, MSCs 对 RM-1 细胞皮下瘤体积的影响 ($P < 0.05$)

图1 MSCs 对 RM-1 小鼠前列腺癌细胞皮下成瘤生长的影响

每组随机选取 10 个视野计数血管数量。结果如图 2 所示,与单纯接种 RM-1 组相比, MSCs 与 RM-1 混合接种组的血管密度显著升高 ($P < 0.01$)。上述结果提示, MSCs 可能通过促进血管形成来促进 RM-1 小鼠前列腺癌细胞在体内的生长。

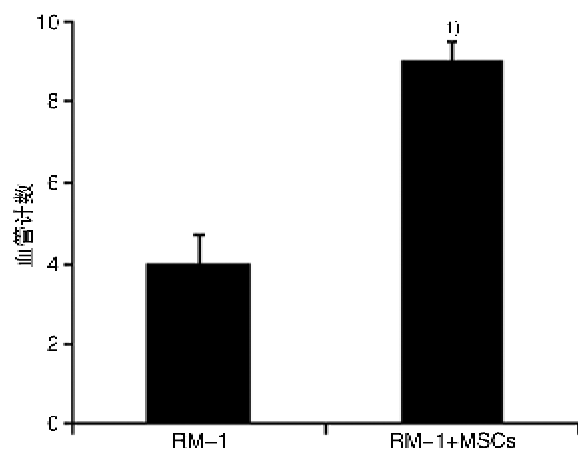
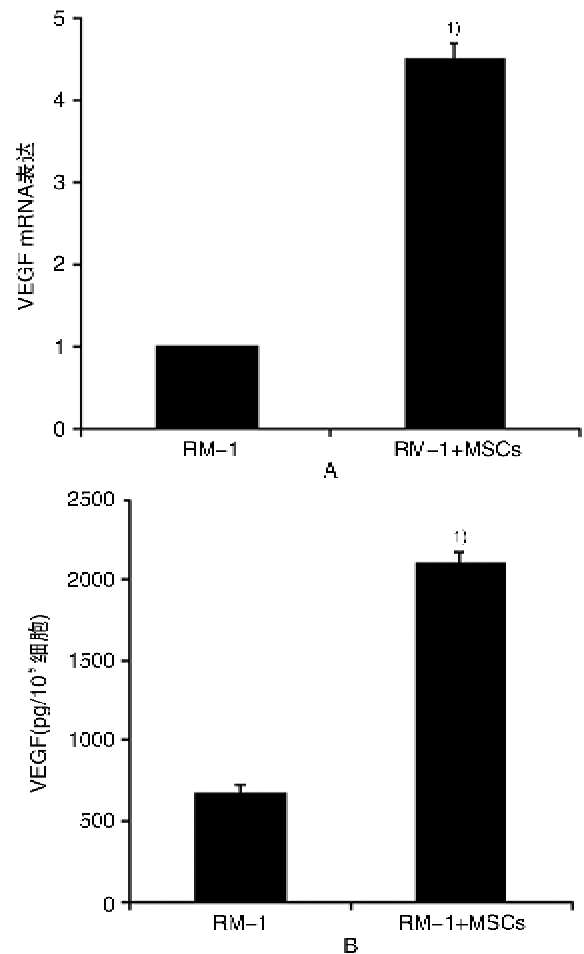


图2 MSCs 促进 RM-1 细胞皮下瘤血管形成 ($P < 0.05$)

2.4 MSCs 通过分泌 VEGF 促进小鼠 RM-1 前列

腺癌组织血管形成

VEGF 是目前已知最强的促血管生成因子,我们采用 Realtime PCR 和 ELISA 法检测 MSCs 中 VEGF 的表达情况。结果如图 3 所示, MSCs 可在 mRNA 水平和蛋白水平高表达 VEGF ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。上述结果提示, MSCs 促进 RM-1 小鼠前列腺癌组织血管形成的功能可能由 VEGF 介导。



A, Realtime PCR 法检测 VEGF mRNA 表达 ($P < 0.05$); B, ELISA 法检测 VEGF 蛋白表达 ($P < 0.05$)

图3 VEGF 的 mRNA 和蛋白的表达

3 讨论

MSCs 是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞,主要存在于骨髓组织和结缔组织器官间质中。在一定的诱导条件下, MSCs 既可向成骨细胞、脂肪细胞等中胚层细胞分化,还可向外胚层的神经细胞及内胚层的肝卵圆细胞分化^[1,5]。由于 MSCs 的多向分化潜能及免疫原性弱等优点,使其成为组织工程理想的种子细胞来源。MSCs 还具有免疫抑制功能,有研究表明,将 MSCs 用于治疗移植抗宿主病 (Graft-Vrsus-Host Diseases, GvHD), 获得良好效果^[10]。

MSCs 具有向肿瘤局部特异性趋化的特性。

目前已有众多研究表明, MSCs 可以被募集至实质性肿瘤部位。Hung 等^[6]发现 MSCs 可靶向进入微小肿瘤灶, 随后增殖分化, 成为肿瘤基质的重要成分。Nakamizo 等^[7]将荧光标记的正常人 MSCs 输入 U87 神经胶质瘤小鼠模型的颈动脉, 发现不论是在肿瘤同侧或对侧颈动脉注入 MSCs 均可聚集到脑肿瘤内。他们还发现将 MSCs 输入神经胶质瘤对侧大脑半球, MSCs 仍可向肿瘤处迁移。类似的现象在肺癌及 Kaposi's 肉瘤等多个动物模型中均存在^[8,9]。肿瘤血管生成是肿瘤发生发展的关键步骤。肿瘤的生长需要大量的营养物质, 那么营养输送途径的建设和畅通对肿瘤组织的生长起到了至关重要的作用。微血管的形成是肿瘤血管建设的表现, 微血管的数量可以衡量肿瘤组织的营养状况。VEGF 是重要的血管生长因子, 不仅具有促进血管生成的属性, 也可以刺激或调节多种细胞生成、分泌其他的与血管生成有关的细胞因子, 如 IL-6, IL-8, TGF- β 1 和 MCP-1 等。

本研究中, 我们将 MSCs 与 RM-1 小鼠前列腺癌细胞混合后接种于 Balb/c 小鼠皮下, 与对照组相比, 发现 MSCs 在体内可显著促进肿瘤生长。通过前列腺癌组织进行 CD34 免疫组化染色, 与对照组相比, 发现 MSCs 组微血管密度显著升高。Real-time PCR 结果显示 MSCs 中有 VEGF 表达, ELISA 结果显示 MSCs 条件培养上清中有 VEGF 表达。本实验结果提示, 在体内 MSCs 可能通过表达 VEGF 从而促进肿瘤血管形成, 达到促进肿瘤生长的目的。

MSCs 作为一种极具临床应用前景的干细胞药物, 已经在美国进入 III 期临床实验, 用于治疗 GvHD 及克隆氏病等。由于 MSCs 具有向肿瘤组织特异性趋化的特性, 因此有研究者提出将其用于抗肿瘤药物载体用于肿瘤靶向治疗。但我们的研究发现, MSCs 具有促进肿瘤血管生成的功能, 对肿瘤生长可能起到促进作用。因此, 将 MSCs 用于肿瘤靶向治疗前应对其进行改造, 有效抑制其促肿瘤生长的功能。由于 MSCs 具有多方面的生物学功能, 因此, MSCs 还可能通过其它功能促进肿瘤生长, 我们将在下一步实验中继续深入研究。

参考文献

[1] GRANERO-MOLTO F, WEIS J A, LONGOBARDI

- L, et al. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine; application to bone and cartilage repair [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8(3):255-268.
- [2] VASHI A V, KERAMIDARIS E, ABBERTON K M, et al. Adipose differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using Pluronic F-127 hydrogel in vitro [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(5):573-579.
- [3] PACARY E, TIXIER E, COULET F, et al. Crosstalk between HIF-1 and ROCK pathways in neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, neurospheres and in PC12 neurite outgrowth [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 35(3):409-423.
- [4] PORADA C D, ZANJANI E D, ALMEIDA-PORAD G. Adult mesenchymal stem cells; a pluripotent population with multiple applications [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1(3):365-369.
- [5] BANAS A, TERATANI T, YAMAMOTO Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2007, 46(1):219-228.
- [6] HUNG S C, DENG W P, YANG W K, et al. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(21):7749-7756.
- [7] NAKAMIZO A, MARINI F, AMANO T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8):3307-3318.
- [8] STUDENY M, MARINI F C, DEMBINSKI J L, et al. Mesenchymal stem cells; potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anti-cancer agents [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(21):1593-1603.
- [9] KHAKOO A Y, PATI S, ANDERSON S A, 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.
- [10] LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419):1439-1441.

(收稿日期:2012-07-17)