

结肠癌微环境对HMSC-bm形态、增殖、周期及CD34、CD90的影响

赵慧巧 卢年华 张旭东 柳娜 刘雪枫 陈正君 景明*

(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

摘要 该文旨在探究不同条件结肠癌微环境对人骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells-bone marrow, HMSC-bm)的影响。实验将不同配比的HMSC-bm和SW480细胞经Transwell非接触共培养3天、5天和7天后,通过检测HMSC-bm的显微形态、增殖能力、细胞周期以及细胞表面标志分子CD34、CD90的变化,研究结肠癌微环境对HMSC-bm的影响,同时设立HMSC-bm单独培养组和SW480单独培养组作为对照组。研究发现,随着结肠癌细胞比例增加,共培养时间延长,HMSC-bm细胞的显微形态发生显著改变,HMSC-bm细胞增殖速度加快,且CD34阳性表达率逐渐增多;CD90阳性表达率逐渐减少。这说明,结肠癌微环境可能诱导HMSC-bm细胞发生恶性转化,且该恶性转化与细胞比例和诱导时间有关。

关键词 结肠癌微环境;骨髓间充质干细胞;细胞周期;CD34;CD90

Effect of Colon Cancer Microenvironment on the Morphology, Proliferation, Cycle, CD34 and CD90 of HMSC-bm

Zhao Huiqiao, Lu Nianhua, Zhang Xudong, Liu Na, Liu Xuefeng, Chen Zhengjun, Jing Ming*

(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the effects of different conditions of colon cancer microenvironment on human mesenchymal stem cells-bone marrow (HMSC-bm). In the experiments, the different ratios of HMSC-bm and the colon cancer cell SW480 were non-contact co-cultured with Transwell for 3 d, 5 d and 7 d. The microscopic morphology, proliferative capacity, cell cycle and cell surface marker molecules CD34 and CD90 of each group were tested to investigate the effects of different colon cancer microenvironment on HMSC-bm. At the same time, HMSC-bm alone culture group and SW480 alone culture group were set up as control groups. The results found that with the increase of the proportion of colon cancer cells, the co-culture time was prolonged, the microscopic morphology of HMSC-bm cells was significantly changed, the proliferative capacity of HMSC-bm cells was enhanced, and the positive expression rate of CD34 was gradually increased; the positive rate of CD90 expression gradually cut back. This study indicates that the microenvironment of colon cancer may induce malignant transformation of HMSC-bm cells, and this malignant transformation is related to the proportion of cells and induction time.

Keywords colon cancer microenvironment; bone marrow mesenchymal stem cells; cell cycle; CD34; CD90

收稿日期: 2017-12-04

接受日期: 2018-02-02

国家自然科学基金(批准号: 81560717)和甘肃省自然科学基金(批准号: 1606RJZA001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13919026589, E-mail: 1339512509@qq.com

Received: December 4, 2017

Accepted: February 2, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81560717) and the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.1606RJZA001)

*Corresponding author. Tel: +86-13919026589, E-mail: 1339512509@qq.com

网络出版时间: 2018-05-15 18:10:02

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180515.1809.012.html>

结肠癌是发生于结肠部位的常见恶性消化道肿瘤,其发病率世界排名第三位^[1]。在我国,随着人们生活环境和饮食结构的改变,结肠癌的发病率不断攀升,成为仅次于胃癌的恶性消化道肿瘤。目前,结肠癌传统的治疗手段尚无确切的疗效,仍然存在疗效低、复发率高等问题。肿瘤生物治疗是运用生物技术和生物制剂对从病人体内采集的免疫细胞进行体外培养和扩增后,回输至病人体内的方法,以此来激发和增强机体自身免疫功能,从而达到治疗肿瘤的目的。该疗法是继传统手术、化疗和放疗后的第四代肿瘤治疗手段,为肿瘤的临床治疗提供新的思路^[2]。而骨髓间充质干细胞(human mesenchymal stem cells-bone marrow, HMSC-bm)因为具有易于体外分离、培养、快速增殖、易于外源基因或药物导入、良好的肿瘤趋向性等特点^[3],常用作肿瘤生物治疗的载体^[4]。同时,肿瘤细胞微环境中HMSC-bm的安全性问题日益引起人们的关注。有些研究表明, HMSC-bm在肿瘤微环境中培养有恶性转化的趋势^[2,5]。本实验采用HMSC-bm与结肠癌细胞SW480非接触共培养,研究肿瘤微环境中SW480和HMSC-bm不同比例,不同诱导时间对HMSC-bm细胞形态、增殖、周期及表面标志物CD34、CD90的影响,为深入研究HMSC-bm的安全临床应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂 实验所有仪器和试剂包括: CO₂细胞培养箱(Thermo Fisher公司)、IX53型倒置荧光显微镜(Olympus公司)、Countstar自动细胞计数仪、酶联免疫检测仪(Bio-Rad公司)、流式细胞仪(Beckman公司)、Transwell(Corning公司, Cat No.3450, Lot No.27716033)、CD34/FITC抗体和CD90/PE抗体(美国BD公司)、MSCM(Sciencell公司, Cat No.7501, Lot No.21237)、DMEM(HyClone公司, Cat No.SH30022.01, Lot No.AB217804, Bottle No.01317)、胎牛血清(CLARK公司, Cat No.FB15011, Lot No.JC50166)、胰蛋白酶(Solarbio公司, Cat No.T1300, Lot No.20161013)、PBS(HyClone公司, Cat No.SH30256.01, Lot No.AB10111039, Bottle No.00342)、MTT(Solarbio公司, Cat No.M8180, Lot No.1212U051)、DMSO(Solarbio公司, Cat No.D8370,

Lot No.520C035)、PI(Solarbio公司, Cat No.C0080, Lot No.20161011)。

1.1.2 HMSC-bm细胞培养 HMSC-bm购于美国Sciencell公司。采用MSCM完全培养基,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养,细胞丰度<50%时,每48 h换液1次;细胞丰度>50%时,每24 h换液1次。待细胞丰度达到90%时,0.25%胰蛋白酶消化传代,第4代用于细胞实验。

1.1.3 SW480细胞培养 SW480细胞购于中国科学院上海细胞库。采用含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的高糖DMEM培养液,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养,每48 h换液1次,待细胞丰度达到90%时,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2 方法

1.2.1 分组 癌细胞对照组: SW480细胞采用含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的高糖DMEM培养液,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中单独培养。

干细胞对照组: HMSC-bm采用MSCM完全培养基,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中单独培养。

细胞共培养组: 利用Transwell悬挂式非接触共培养体系建立SW480细胞与HMSC-bm细胞共培养模型,取对数生长期HMSC-bm细胞,经0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,计数,调整细胞浓度后按表1接种细胞,将SW480细胞接种于Transwell上室; HMSC-bm细胞接种于Transwell下室,分别培养3天、5天、7天后停止培养,收集细胞转移至培养瓶内继续培养、扩增,并开展后续实验。

1.2.2 细胞形态学观察 将各组细胞置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态,并拍照记录。

1.2.3 绘制细胞生长曲线 收集对数生长期的各组细胞,用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,并调整细胞浓度至 5×10^4 /mL,接种于96孔培养板,每组设6复孔,每孔100 μ L,共7块96孔培养板,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度培养箱中培养,每隔48 h换液1次,分别于接种后第1、2、3、4、5、6、7天的固定时间消化成单细胞悬液后,用细胞计数仪进行细胞计数。以时间为横坐标、单位细胞数(细胞数/mL)为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 收集对数生长

表1 实验组分组及细胞接种数目
Table 1 Test grouping and cell number

共培养时间(d) Co-culture time (d)	SW480:HMSC-bm	SW480细胞数/个 SW480 cell number	HMSC-bm细胞数/个 HMSC-bm cell number
3	1:10	1×10^5	1×10^6
	1:1	1×10^5	1×10^5
	10:1	1×10^5	1×10^4
5	1:10	1×10^5	1×10^6
	1:1	1×10^5	1×10^5
	10:1	1×10^5	1×10^4
7	1:10	1×10^5	1×10^6
	1:1	1×10^5	1×10^5
	10:1	1×10^5	1×10^4

期的各组细胞,用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,1 000 r/min离心5 min, PBS清洗2次,缓慢加入预冷的70%乙醇于4 °C固定过夜。1 000 r/min离心5 min,收集固定的细胞, PBS清洗2次,弃上清液,加入500 μ L PBS重悬细胞,再加入2.5 μ L RNase A(10 μ g/ μ L),混匀,37 °C培养30 min,加入含有1% Triton X-100的PI(0.1 mg/mL)染液50 μ L,混匀,室温避光反应30 min,上流式细胞仪进行周期检测。每组重复3次。

1.2.5 流式细胞仪检测HMSC-bm的表面分子CD34和CD90表达 收集对数生长期的各组细胞,每组细胞数调整至 10^6 左右,用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,1 000 r/min离心5 min, PBS清洗2次,收集至EP管中,加入稀释后的一抗,4 °C孵育30 min,洗涤2次,向各组中加入异硫氢酸荧光素(FITC)标记的CD34和藻红蛋白(PE)标记的CD90小鼠抗人的二抗,另设同型对照组,加入与实验组相等的FITC标记的CD34和PE标记的CD90同型对照抗体。4 °C孵育30 min,洗涤3次,重悬细胞后流式细胞仪进行检测。

1.2.6 统计学分析 实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用两样品的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

各组细胞置于倒置荧光显微镜下观察,肿瘤细胞对照组(图1A)SW480细胞呈梭形,边界清晰,形态相似,均匀一致,集落样贴壁生长。正常对照组(图1B)HMSC-bm细胞呈长梭形,边界清晰,形态均匀,

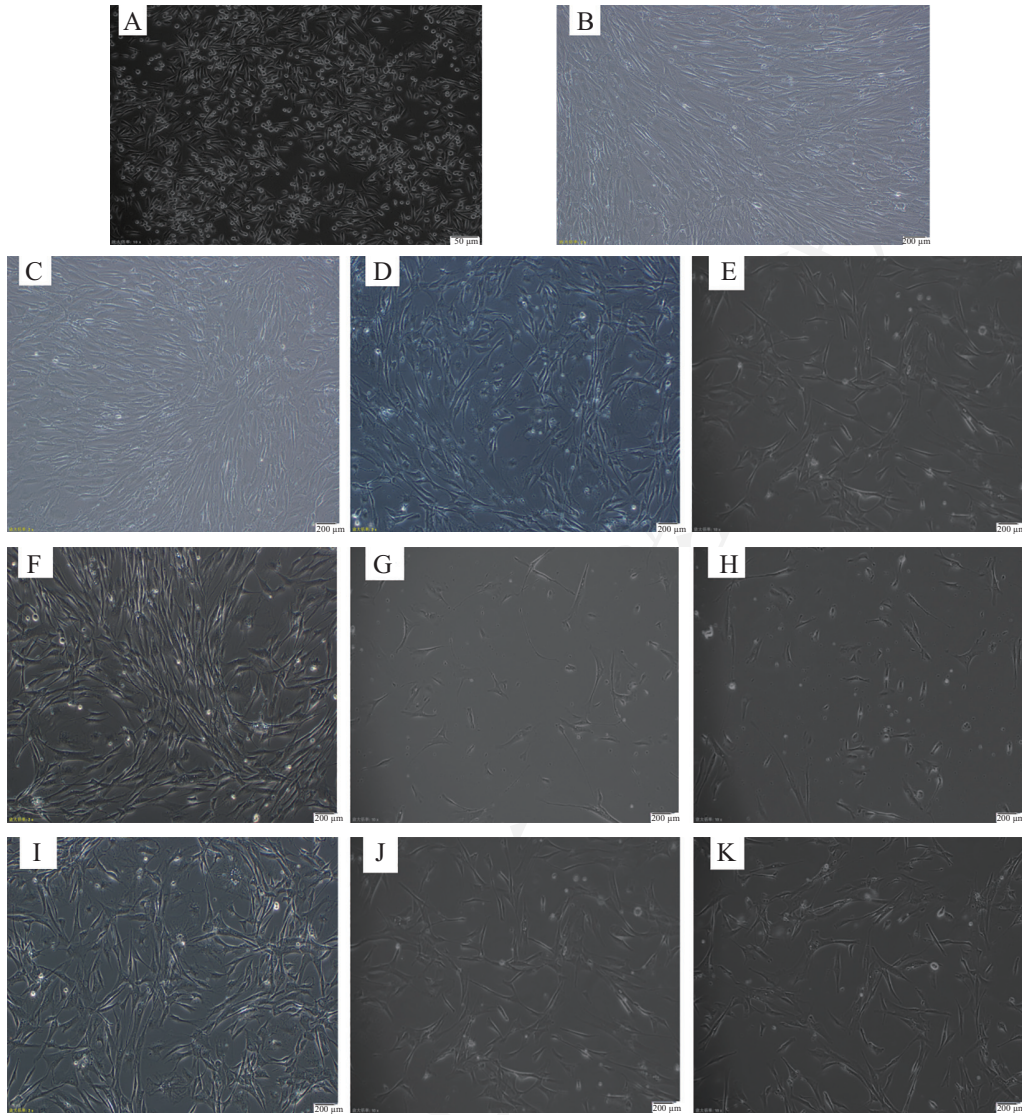
呈纤维状生长。不同细胞比例共培养组中,共培养3天组细胞形态与正常对照组HMSC-bm细胞相似,形态变化不明显,10:1共培养3天组(图1E)偶见细胞收缩变小呈短梭形或多角形。剩余各组中,多数细胞形态明显收缩变小,呈多角形或短梭形,排列散乱,形态与SW480细胞有相似之处,且这些变化随着SW480数量的增加和共培养时间的延长而愈加明显(图1)。

2.2 细胞生长曲线

由图2可知,相较于HMSC-bm细胞单独培养组,SW480与HMSC-bm经Transwell共培养3天后,不同比例的HMSC-bm细胞增殖能力没有显著增强,而共培养5天、7天后,不同比例的HMSC-bm细胞增殖能力不同程度增强,经统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以SW480与HMSC-bm经Transwell共培养7天且SW480:HMSC-bm=10:1时,增殖速度最快,且差异有统计学意义。

2.3 细胞周期的变化

通过流式细胞分析术检测各组细胞 G_1 期、S期及 G_2/M 期细胞比例的变化,以反映各组细胞增殖能力的变化。经FCM检测HMSC-bm细胞周期发现,共培养组HMSC-bm细胞与干细胞对照组HMSC-bm细胞相比, G_1 期细胞比例呈明显的降低趋势,S期及 G_2/M 期细胞比例呈明显的增长趋势($P < 0.05$)。随着SW480细胞培养比例的增加和培养时间的延长,HMSC-bm细胞 G_1 期细胞比例逐渐降低,S期及 G_2/M 期细胞比例逐渐增长($P < 0.05$)。结果表明,经共培养的HMSC-bm细胞增殖能力明显高于单独培养的HMSC-bm细胞,且随着SW480细胞培养比例的增加和培养时间的延长,细胞的增殖能力也逐渐增强(图3)。



A: SW480单独培养组; B: HMSC-bm细胞单独培养组; C: 1:10共培养3天; D: 1:1共培养3天; E: 10:1共培养3天; F: 1:10共培养5天; G: 1:1共培养5天; H: 10:1共培养5天; I: 1:10共培养7天; J: 1:1共培养7天; K: 10:1共培养7天。

A: SW480 alone culture group; B: HMSC-bm cells alone culture group; C: 1:10 co-culture 3 d; D: 1:1 co-culture 3 d; E: 10:1 co-culture 3 d; F: co-cultured for 1:10 5 d; G: 1:1 co-cultured 5 d; H: 10:1 co-cultured 5 d; I: 1:10 7 d; J: co-culture 1:1 co-culture 7 d; K: 10:1 co-culture 7 d

图1 光学显微镜观察各组单独培养、共培养的细胞

Fig.1 Optical microscope observation of each group of cultured and co-cultured cells

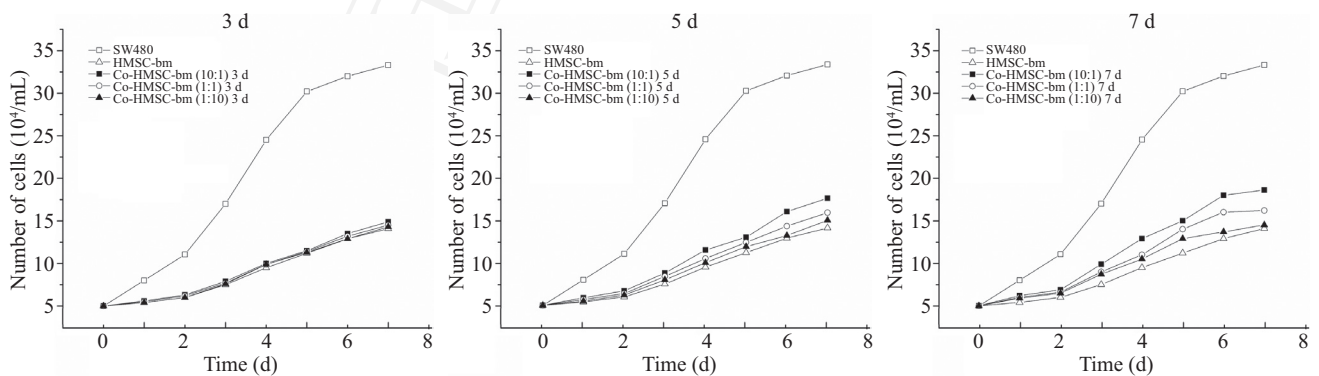
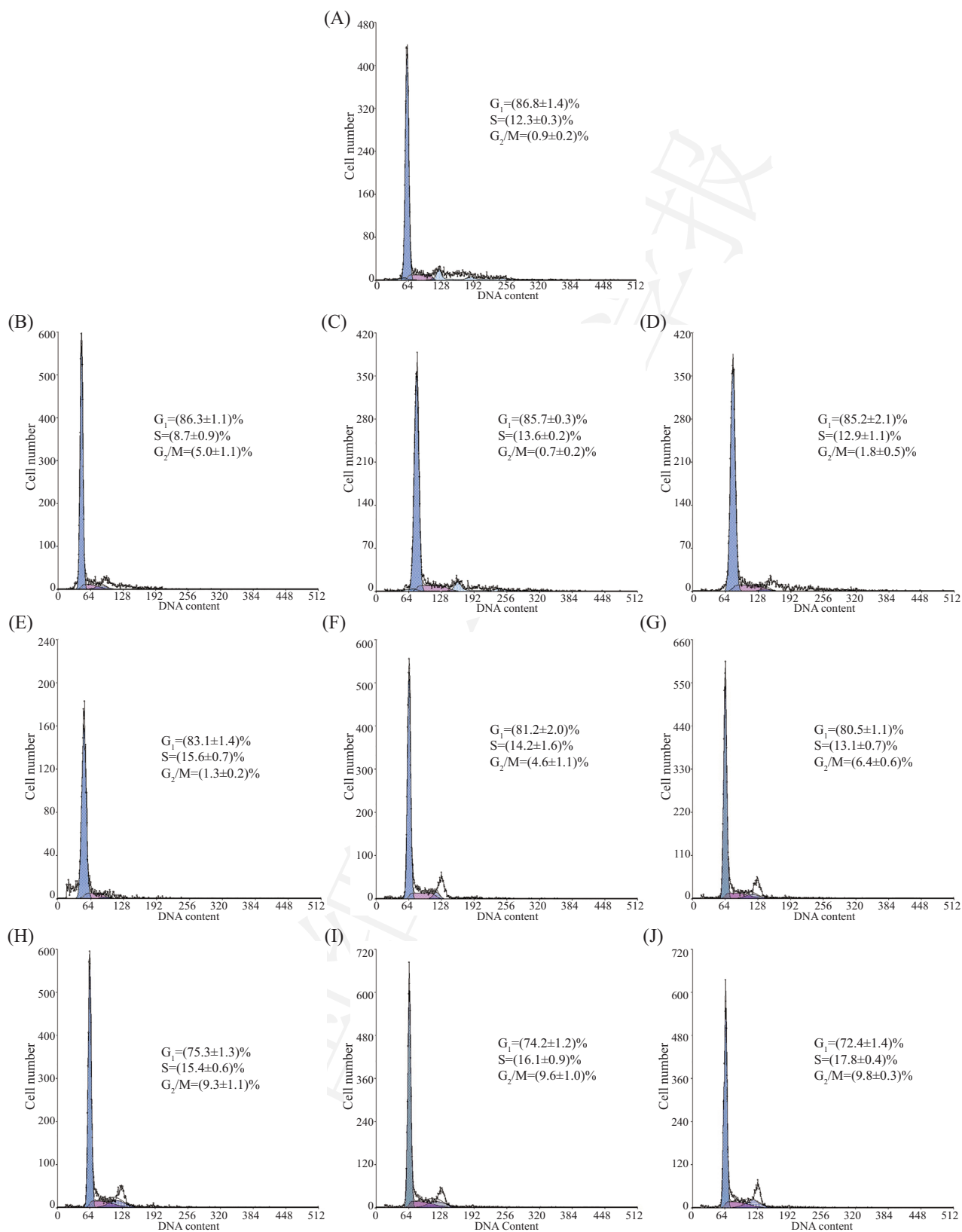


图2 不同共培养时间各组细胞生长曲线

Fig.2 Cell growth curves of different groups in different co-culture time



A: HMSC-bm cells alone culture group; B: 10:1 co-culture 3 d; C: 1:1 co-culture 3 d; D: 1:10 co-culture 3 d; E: 10:1 co-culture 5 d; F: 1:1 co-culture 5 d; G: 1:10 co-culture 5 d; H: 10:1 co-culture 7 d; I: 1:1 co-culture 7 d; J: 1:10 co-culture 7 d.

A: HMSC-bm cells alone culture group; B: 10:1 co-culture 3 d; C: 1:1 co-culture 3 d; D: 1:10 co-culture 3 d; E: 10:1 co-culture 5 d; F: 1:1 co-culture 5 d; G: 1:10 co-culture 5 d; H: 10:1 co-culture 7 d; I: 1:1 co-culture 7 d; J: 1:10 co-culture 7 d.

图3 流式细胞分析术检测细胞周期结果

Fig.3 Flow cytometric analysis of cell cycle results

表2 HMSC-bm细胞表面标志物CD34和CD90的表达结果($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 2 Expressions of HMSC-bm cell surface markers CD34 and CD90 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

共培养时间(天) Co-culture time (d)	SW480:HMSC-bm	CD34 (%)	CD90 (%)
3	1:10	3.36±2.11*	96.65±4.16
	1:1	6.51±1.06*	95.62±3.27
	10:1	7.34±3.45*	92.31±1.46
5	1:10	12.33±3.89*	86.98±2.37
	1:1	15.47±3.92*	80.89±2.68*
	10:1	20.32±3.21*	78.33±5.11*
7	1:10	29.45±2.47*	75.21±5.61*
	1:1	32.11±2.33*	70.32±5.53*
	10:1	35.23±1.72*	67.77±4.87*
HMSC-bm cells alone culture group		1.40±1.32	96.14±4.53

* $P<0.05$, 与HMSC-bm单独培养组相比。

* $P<0.05$ compared to HMSC-bm alone culture group.

2.4 HMSC-bm细胞表面标志物CD34和CD90的表达

经流式细胞术检测HMSC-bm细胞表面标志物CD34和CD90, HMSC-bm单独培养组CD34阳性率为(1.40±1.32)%, 属低表达状态, CD90阳性率为(96.14±4.53)%, 属高表达状态。实验组中, 随着共培养时间的延长, 培养比例的增加CD34阳性率逐渐增加, 且与HMSC-bm单独培养组相比, 差异均有统计学意义, CD90阳性率逐渐降低, 且与HMSC-bm单独培养组相比, 部分差异有统计学意义, 见表2。

3 讨论

肿瘤生物治疗, 亦称为肿瘤生物免疫疗法, 作为一种新兴的、具有显著疗效的肿瘤治疗方式, 已投入临床应用。骨髓间充质干细胞因其自身特点, 常作为肿瘤生物治疗的理想载体。有研究报道, 经白介素-12诱导的骨髓间充质干细胞对移植性肝癌细胞具有显著抑制作用^[6]。Livin基因修饰的骨髓间充质干细胞可改善急性心肌梗死大鼠心功^[7], 可见关于干细胞疗法的肿瘤生物治疗已取得一定进展。但是, 也有研究表明, 胃癌微环境中骨髓间充质干细胞有恶性转化的趋势^[8]。因此, 骨髓间充质干细胞作为肿瘤生物治疗的载体的安全性值得思考。

CD34抗原是一种高度糖基化I型跨膜蛋白, 其选择性的表达于人类造血干细胞, 祖细胞和血管内皮细胞表面中, 随相关细胞的分化成熟而逐渐消

失。CD34在正常及肿瘤性的小血管内皮中都有表达, 是一种与新生小血管相关的抗原, 且其在新生血管内皮中表达远大于非新生血管内皮, 这表明其作用可能与血管生成有关。恶性肿瘤的生长和转移与新生血管的形成关系密切, 因此, 抑制血管生成成为恶性肿瘤的一种疗法。CD34在血管内皮细胞中的表达使之成为最敏感的血管内皮标志物, 为人们提供了鉴别血管源性肿瘤和某些实体肿瘤的新方法^[9]。国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会明确提出CD90阳性表达率≥95%作为人来源的骨髓间充质干细胞鉴定方法之一^[10]。所以本研究选择CD34和CD90作为检测表面标志物。

本实验利用Transwell小室建立SW480细胞和HMSC-bm细胞非接触共培养模型, 小室底层采用PET膜, 孔径为0.4 μm, 该膜仅可以允许细胞因子和信号分子自由通过, 细胞不能透过该膜, 通过这种培养环境研究不同结肠癌微环境下HMSC-bm细胞生物学特性的改变。研究表明, HMSC-bm细胞会受到SW480细胞数量和共培养时间的影响而发生生物学特性的改变, 随着SW480细胞比例的增加, 共培养时间的延长, HMSC-bm细胞的形态会发生显著改变、生长和增殖均加快。流式细胞术检测表面标志物发现, CD34的阳性表达率逐渐增加, CD90阳性表达率逐渐减少。综上所述, HMSC-bm细胞受结肠癌微环境的影响有可能发生恶性转变, 但是仍需从基因、蛋白水平做进一步分析确证。

参考文献 (References)

- 1 赵相轩, 温 锋, 任 莹, 卢再鸣. 细胞凋亡在结肠癌治疗中作用的研究进展. 肿瘤学杂志(Zhao Xiangxuan, Wen Feng, Ren Ying, Lu Zaiming. Progress in the role of apoptosis in the treatment of colon cancer. Chinese Journal of Oncology) 2016; 22(11): 946-50.
- 2 刘永琦, 王 倩, 秦 洁, 李 屹, 舍雅莉, 李静雅. 肿瘤微环境对骨髓间充质干细胞形态、生长及增殖的影响. 中国细胞生物学学报(Liu Yongqi, Wang Qian, Qin Jie, Li Yi, She Yali, Li Jingya. Effects of tumor microenvironment on the morphology, growth and proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(2): 180-7.
- 3 吴建军, 曾 龙, 刘永琦, 岳 嘉, 马占军, 王转玲, 等. 扶正抑瘤方对胶质瘤微环境下BMSC端粒酶及P53表达的影响. 中国中医药科技(Wu JianJun, Zeng Long, Liu Yongqi, Yue Jia, Ma Zhanjun, Wang Lingling, *et al.* Effect of Fuzheng Yiliu Fang on expression of telomerase and P53 in BMSC in glioma microenvironment. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology) 2017; 24(1): 19-23.
- 4 Xu C, Lin L, Cao G, Chen Q, Shou P. Interferon- α -secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect *in vivo*. Oncogene 2014; 33(42): 5047-52.
- 5 景 明, 陈正君, 王雅莉, 张艳霞, 刘雪枫. 结肠癌微环境对骨髓间充质干细胞形态、增殖及CD-(13)、CD-(133)表达的影响. 药学研究(Jing Ming, Chen Zhengjun, Wang Yali, Zhang Yanxia, Liu Xuefeng. Effect of colon cancer microenvironment on morphology, proliferation and expression of CD-(13), CD-(133) in bone marrow mesenchymal stem cells. Pharmaceutical Research) 2014; 33(9): 497-500.
- 6 Jeong KY, lee EJ, Kim SJ, Yang SH, Sung YC. Irradiation-induced localization of IL-12-expressing mesenchymal stem cells to enhance the curative effect in murine metastatic hepatoma. Int J Cancer, 2015; 137(3): 721-30.
- 7 邹 兵, 谢军平, 吴清华, 陈受琳, 肖鲁闽, 苏 海, 等. Livin基因修饰的骨髓间充质干细胞移植治疗对急性心肌梗死大鼠心功能的影响. 中国病理生理杂志(Zou Bing, Xie Junping, Wu Qinghua, Chen Shulin, Xiao Lumin, Su Hai, *et al.* Effects of Livin gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on cardiac function in rats with acute myocardial infarction. Chinese Journal of Pathophysiology) 2016; 32(3): 539-43.
- 8 吴高峰, 刘喜平, 杨柏林, 李沛清, 明海霞, 张 炜. 胃癌微环境对大鼠骨髓间充质干细胞形态、生长及CD34、CD44表达的影响. 中国组织工程研究(Wu Gaofeng, Liu Xiping, Yang Berlin, Li Peiqing, Ming Haixia, Zhang Wei. Effect of gastric cancer microenvironment on the morphology, growth and the expression of CD34 and CD44 on rat bone marrow mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2016; 20(14): 2040-5.
- 9 柏树令, 赵 丹. CD34抗原的生物学特性及其临床应用. 解剖科学进展(Bai Shuling, Zhao Dan. Biological characteristics of CD34 antigen and its clinical application. Advances in Anatomy Science) 2005; 11(1): 54-56.
- 10 李晓峰, 赵劲民, 苏 伟, 崔向荣, 罗世兴, 马爱国. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定. 中国组织工程研究(Li Xiaofeng, Zhao Jinmin, Su Wei, Cui Xiangrong, Luo Shixing, Ma Aiguo. Cultivation and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2011; 15(10): 1721-5.