

间充质干细胞与肿瘤的关系

边振宇 汤亭亭*

(上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科, 上海 200011)

摘要 最近的研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与多种肿瘤的发生发展有密切关系。MSCs对多种肿瘤具有趋向性,外源性(局部混合注射或静脉注射)MSCs可参与肿瘤间质的形成,同时MSCs的免疫抑制作用可以促进肿瘤在体内的生长。通过细胞因子介导或直接的细胞接触,MSCs与多种肿瘤细胞之间存在相互作用。MSCs可以抑制肿瘤细胞的凋亡,促进肿瘤细胞的增殖及肿瘤的转移。由于MSCs易于分离、体外扩增及进行基因修饰,因此可以利用MSCs对肿瘤的趋向性,使MSCs携带抗肿瘤基因来实现对肿瘤的靶向治疗。

关键词 间充质干细胞;肿瘤;靶向治疗

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种存在于骨髓与其他组织间质内的非造血系成体干细胞,具有自我更新、增殖及多向分化的潜能,在体外可诱导分化为骨、软骨、肌肉、脂肪和神经等组织细胞,在体外扩增超过 10^4 倍时仍保留其多向分化的能力^[1,2]。在表型上,MSCs表达CD29、CD44、CD90、CD71、CD73和CD105等表面标志,但不表达CD14、CD34、CD45等造血细胞的表面标志^[3]。MSCs在再生医学及组织工程中的应用是目前的热点;另外由于MSCs具有支持造血及免疫调节功能,在临床骨髓移植及移植物抗宿主病防治中具有良好的应用前景。最近有研究表明,MSCs对多种肿瘤具有趋向性并参与肿瘤间质的形成,而MSCs易于分离、体外扩增及进行基因修饰^[4],因此可以使MSCs携带抗肿瘤基因来实现对肿瘤的靶向治疗。本文着重讨论MSCs在肿瘤发生发展中的作用以及在肿瘤治疗方面的应用前景。

1 MSCs对肿瘤的趋向性

实验证明体外培养的MSCs输入有损伤的动物体内时,MSCs可以被募集到创伤部位^[5-9]。肿瘤被称为永不愈合的创伤,而实质性肿瘤的微环境与损伤的组织环境相似^[10,11]。目前已有众多研究表明MSCs可以被募集至实质性肿瘤部位^[12-15]。

在Studený等^[12]的研究中,MSCs通过尾静脉注入肺内有黑色素瘤的裸鼠体内,再用免疫组化的方法来检测MSCs来源的细胞在黑色素瘤结节及肺实质内的分布。结果发现在静脉注射1天后,MSCs随机分布于肺实质和肿瘤结节内;8天后,MSCs主要分布

于肿瘤内并已从正常肺组织内清除;60天后,肿瘤内仍然检测到MSCs,而在肺实质内检测不到。这些实验结果提示MSCs在荷瘤动物体内的分布是选择性的,肿瘤微环境而非肺实质支持其存活以及其向间质的整合。在Studený等^[13]的另一项研究中,接种MDA-231乳腺癌细胞8天形成乳腺癌裸鼠模型后,将 β -半乳糖苷酶(β -gal)标记的MSCs(MSCs-gal)连续3周以每周 10^6 的剂量通过静脉注入荷瘤鼠或健康小鼠体内,再用5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)行组织化学显色(蓝色),以追踪小鼠肺及其他器官内的MSCs分布情况。结果发现在乳腺癌肺转移部位有大量的蓝色阳性细胞,提示MSCs可以到达血管外间隙并有助于肿瘤结缔组织间质的形成。相反,在作为对照的健康小鼠,仅有非常少的单个蓝色阳性细胞分散在肺内。二组动物的其他检测器官(肝、脾、肾、肌肉)均没有MSCs分布的迹象。这些结果提示肿瘤微环境对MSCs的趋向起重要作用。Nakamizo等^[14]将荧光标记的正常人MSCs输入神经胶质瘤小鼠模型的颈动脉,发现不论是肿瘤同侧还是对侧颈动脉注入的MSCs均可聚集到脑肿瘤内。这提示MSCs可选择性聚集于肿瘤组织中,而不是由于优势血供所造成的。他们也同样发现将MSCs输入神经胶质瘤对侧大脑半球,MSCs可向肿瘤处迁移。Menon等^[15]向负荷了结直肠癌的裸鼠模型经尾静脉

收稿日期: 2008-05-30 接受日期: 2008-09-10

上海市科技发展基金(No.064307055)和教育部新世纪人才计划(No. NCET-06-0401)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-63138341-5397, Fax: 021-63137020, E-mail: tingtingtang@hotmail.com

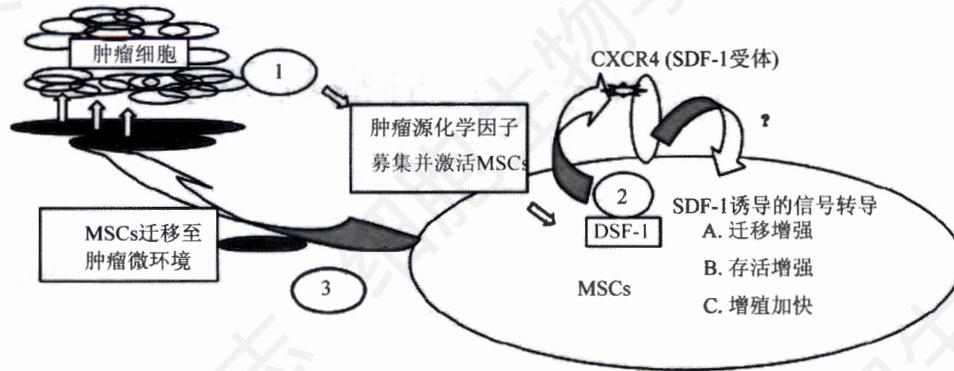


图1 MSCs激活的可能分子机制^[15]

注射 10^6 羟基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (56-carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester, CFDA-SE) 标记的 MSCs, 7 天后切除肿瘤并采用冰冻切片检测, 荧光显微镜下可见肿瘤周围有 CFDA-SE 标记的 MSCs, 提示 MSCs 可以迁移并固定在肿瘤部位。Menon 等认为 MSCs 激活的可能分子机制如下: (1) 肿瘤微环境释放化学因子/细胞因子将 MSCs 募集至肿瘤部位。(2) 肿瘤微环境来源的细胞因子作用于 MSCs 表面的受体并激活信号转导通路促进基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1) 的分泌。(3) 增加的 SDF-1 以自分泌的作用方式促进肿瘤微环境中 MSCs 的存活、增殖以及迁移 (图 1)。

2 MSCs参与肿瘤间质的形成

所有的实质性肿瘤, 不论其发生部位, 若其生长到超过 1~2 mm 大小就需要间质。间质提供血液供应满足肿瘤的营养、气体交换、废物排泄, 并且间质可能会限制炎症细胞的内流, 为肿瘤细胞提供一个避免免疫排斥的屏障^[11]。MSCs 在发育过程中有助于形成间质或结缔组织 (包括骨、脂肪、肌肉、软骨及肌腱) 并且通常会迁移至身体的损伤部位以促进损伤的愈合。与创伤相似, 肿瘤可以释放血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等信号和因子来募集 MSCs 用来形成起支持作用的间质^[16]。Studený 等^[12]在裸小鼠异种移植模型中研究了人骨髓来源的 MSCs 与人源的黑色素瘤细胞之间的相互作用。MSCs 用 SP-DiI 荧光标记 (SP-DiI 为一种荧光染料, 与细胞膜结合紧密并且不会转移至邻近的细胞上, 其荧光强度仅随着细胞分裂而降低) 并与黑色素瘤细胞预混合, 然后在裸鼠皮下注射, 用荧光显微镜及免疫组化的方法来检测 MSCs 在肿瘤内的分布, 结果发现有相当一部分 MSCs 转化形成的成纤

维细胞整合到了肿瘤结构内并在肿瘤周围形成纤维包膜, 并且 SP-DiI 的荧光强度降低甚至消失, 这说明 MSCs 在肿瘤内有增殖。Hung 等^[17]用正电子发射断层扫描术 (positron emission tomography, PET) 及肿瘤组织样本的原位分析技术检测发现, MSCs 可靶向进入微小肿瘤灶, 随后增殖分化, 并参与肿瘤间质形成。为了验证 PET 检测的结果以及量化示踪 MSCs 在肿瘤内的增殖, 研究者逐步消化肿瘤组织样本以获得含有肿瘤细胞和间质细胞两种成分的单细胞悬液, 再用流式细胞仪检测增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 阳性的细胞, 结果显示示踪的 MSCs 在肿瘤间质形成的过程中增殖数次。Zhu 等^[18]的研究显示 MSCs 与结肠癌细胞混合注射时有较高的肿瘤形成率, 而单独皮下注射肿瘤细胞时肿瘤形成率则较低, 这一差异具有显著的统计学意义。病理学检查显示在混合细胞注射的动物体内, 肿瘤外向生长并向周围组织浸润和侵袭, 在肿块的表面有广泛的坏死及丰富的血管分布; 免疫组化检查显示肿瘤组织细胞的增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和第八因子 (factor VIII, F-VIII) 阳性而转移抑制基因 (nm23) 阴性。这些结果显示当皮下注射的肿瘤细胞与 MSCs 混合时, 肿瘤细胞的增殖能力、血管生成能力以及转移能力增加。

3 MSCs的免疫抑制作用有利于肿瘤的生长

MSCs 在体内具有免疫抑制作用, 体外输入的同种异体 MSCs 可以延迟对组织不相容的皮肤移植物的排斥^[19]。MSCs 在体外能够抑制 T 细胞的增殖^[19-21], 并可抑制由混合淋巴细胞培养 (mixed lymphocyte culture, MLCs) 或非特异性的有丝分裂原诱导的 T 细胞同种异体反应^[19,20]。MSCs 抑制的程度是剂量依赖性的^[20,21]。Djouad 等^[21]的体内研究发现, 当异体黑

色素瘤细胞(从C57BL/6小鼠的黑色素瘤分离获得)与MSCs共同注入主要组织相容性抗原复合物(MHC)不匹配的C3H小鼠(C3H小鼠和C57BL/6小鼠存在MHC抗原差异: MHC抗原分别为H-2^k单倍体与H-2^b单倍体), 或同源的C57BL/6小鼠体内时, 两者的肿瘤形成率相似; 而在MHC不匹配的异体小鼠体内单独注射黑色素瘤细胞时则无肿瘤形成。他们还发现不论与肿瘤细胞共同接种、全身注入, 还是在远离肿瘤处皮下注射, MSCs均可促进肿瘤形成。他们认为这是由于MSCs在体内具有系统性免疫抑制作用, 这一作用是通过可溶性因子介导的。此外, MSCs的免疫抑制作用使小鼠肾癌细胞与MSCs共同注射至同源小鼠的皮下时, 所形成的肿块较单独注射癌细胞时提前出现^[22]。

4 MSCs与肿瘤细胞之间存在相互作用

最近的研究表明MSCs与多种肿瘤细胞之间存在相互作用。Gunn等^[23]的研究表明体外培养的MSCs与骨髓瘤细胞存在相互作用, 培养过MSCs的条件培养基内含有的白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)能够促进骨髓瘤细胞的增殖, 而骨髓瘤细胞所分泌的dickkopf-1(DKK-1, Wnt抑制剂)能抑制MSCs的成骨分化, 因为未分化的MSCs所分泌的IL-6显著多于分化的MSCs, 这样骨髓瘤细胞对MSCs成骨分化的抑制可以使MSCs维持在未分化的状态, 从而使其从MSCs所分泌细胞因子中获得最大“利益”(图2)。对黑色素瘤与MSCs关系的研究表明MSCs与黑色素瘤细胞间接共培养后, 原来不表达内皮标志物的MSCs可以获得内皮表型, 而且黑色素瘤细胞的内皮标志物的表达也上调, 同时MSCs与黑色素瘤细胞的增殖均加快, 研究者认为这与黑色素瘤细胞所分泌的VEGF有密切的关系。这一研究结果提示MSCs

对黑色素瘤的血管生成起重要作用^[24]。Sohara等^[25]的研究表明, 神经母细胞瘤细胞在与MSCs相互作用后能够促进MSCs大量分泌具有激活破骨细胞功能的IL-6, 从而导致溶骨性病变的形成。对急性早幼粒细胞白血病的发现, MSCs与急性早幼粒细胞白血病细胞共培养后能够抑制全反式维甲酸与多柔比星所诱导的白血病细胞的凋亡, 这一作用需要二者的直接接触, 并且与信号转导子和转录激活子-3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)以及促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)的磷酸化相关, 这一作用可以通过阻断瘦素受体而被抑制^[26]。Karnoub等^[27]的研究证明将骨髓来源的MSCs与转移能力弱的乳腺癌细胞混合注射后, MSCs能够极大增加乳腺癌细胞在动物模型体内的转移能力。这一作用是通过可溶性细胞趋化因子RANTES(regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)介导的。乳腺癌细胞刺激MSCs重新分泌(*de novo* secretion)RANTES, 然后这一因子又以旁分泌的方式作用于乳腺癌细胞, 从而增强癌细胞的迁移、侵袭以及转移能力。

5 MSCs在肿瘤治疗方面的可能应用

如前文所述输入体内的外源性MSCs优先聚集于肿瘤组织的间质内^[12,13], 而且MSCs在体外能被大量扩增, 易被外源基因转导, 并保持高效、长时间表达, 此外MSCs具有低免疫原性, 能在宿主体内长期存留^[4,21]。因此可采用“特洛伊木马(Trojan horse)”策略治疗肿瘤, 即利用MSCs作为载体携带杀死或抑制肿瘤细胞的基因或药物, 与全身给药方法相比可以减少非特异性分布所造成的不良反应。Nakamura等^[28]在大鼠颅内接种胶质瘤3天后, 在肿瘤内注射IL-2基因修饰的MSCs(MSCs-IL-2), 与未治疗的对照组相比显著延长了荷瘤动物的生存时间。大鼠头颅MRI检查显示注射MSCs-IL-2后的大鼠的颅内病灶明显小于对照大鼠, 当对照大鼠的颅内肿瘤达到致死体积时, 注射MSCs-IL-2的大鼠的颅内病灶仍然较小。Studený等^[13]对免疫缺陷小鼠异种乳腺癌肺转移肿瘤模型的研究发现, 经静脉注射的IFN- β 基因修饰的MSCs(MSCs-IFN- β)能够整合至肿瘤内并抑制肿瘤的生长, 但不分布至正常的组织内; 而全身性应用重组的IFN- β 则不能抑制肿瘤生长。此外采用MSCs-IFN- β 治疗的动物其生存时间显著

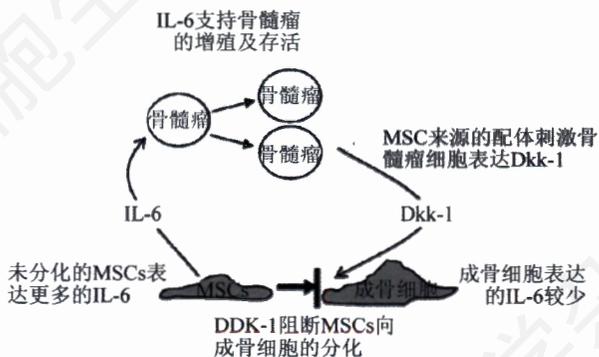


图2 MSCs与骨髓瘤细胞之间的相互作用^[23]

长于未治疗组。静脉注入 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 后所能产生的血清 $\text{INF-}\beta$ 最高水平,与临床上患者注射最大耐受剂量(18×10^6 IU)的 $\text{INF-}\beta$ 后所产生的平均的最大血清浓度相似。在 Studeny 等^[12]的另一项研究中,他们将黑色素瘤细胞与 $\text{INF-}\beta$ 基因修饰的 MSCs 以不同比例共同注射于裸鼠的同一部位,发现即使 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 的数量为黑色素瘤细胞的 1% 时,仍然能够控制肿瘤的生长并显著延长荷瘤动物的生存时间。相反,在肿瘤对侧注射 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 或每天皮下注射 5×10^4 IU 人 $\text{INF-}\beta$ 对肿瘤的生长或裸鼠的生存无任何作用。这些数据提示在肿瘤微环境内产生的 INF 可抑制恶性细胞的生长,而全身应用的相应水平的 INF 难以发挥相同作用。在这一研究中, Studeny 等^[12]还将 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 分别通过尾静脉或皮下注射的方式注入转移性黑色素瘤模型的荷瘤鼠体内,发现经静脉注射的 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 迁移并整合至肿瘤的间质内并在肿瘤微环境内释放 $\text{INF-}\beta$,而经皮下注射的 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 则局限于注射部位。经静脉注射的 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 能够显著延长荷瘤动物的生存时间,而在远离肿瘤部位的皮下注射的 MSCs- $\text{INF-}\beta$ 则无此作用。

总之, MSCs 在体内能够趋化至肿瘤部位并增殖分化,参与肿瘤间质形成,同时 MSCs 能够通过与肿瘤细胞之间的相互作用促进肿瘤的发展。此外, MSCs 还可通过其免疫抑制作用避免或降低免疫系统对肿瘤的排斥作用。根据 MSCs 对肿瘤的趋向性可

以实现肿瘤的靶向治疗。然而 MSCs 对肿瘤的具体作用机制仍需进一步阐明,其对肿瘤的靶向治疗的可行性及安全性需要进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Roufosse CA *et al.* *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**: 585
- [2] Pittenger MF *et al.* *Science*, 1999, **284**: 143
- [3] Deans RJ *et al.* *Exp Hematol*, 2000, **28**: 875
- [4] Caplan AI. *Clin Orthop Relat Res*, 2000, **379**: Suppl 67
- [5] Kumagai K *et al.* *J Orthop Res*, 2008, **26**: 165
- [6] Liechty KW *et al.* *Nat Med*, 2000, **6**: 1282
- [7] Mackenzie TC *et al.* *Blood Cells Mol Dis*, 2001, **27**: 601
- [8] Shirley D *et al.* *J Orthop Res*, 2005, **23**: 1013
- [9] Li S *et al.* *J Cell Physiol*, 2008, **215**: 204
- [10] Bissell MJ *et al.* *Nat Rev Cancer*, 2001, **1**: 46
- [11] Dvorak HF. *N Engl J Med*, 1986, **315**: 1650
- [12] Studeny M *et al.* *Cancer Res*, 2002, **62**: 3603
- [13] Studeny M *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 2004, **96**: 1593
- [14] Nakamizo A *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 3307
- [15] Menon LG *et al.* *Stem Cells*, 2007, **25**: 520
- [16] Brower V. *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**: 414
- [17] Hung SC *et al.* *Clin Cancer Res*, 2005, **11**: 7749
- [18] Zhu W *et al.* *Exp Mol Pathol*, 2006, **80**: 267
- [19] Bartholomew A *et al.* *Exp Hematol*, 2002, **30**: 42
- [20] Maitra B *et al.* *Bone Marrow Transplant*, 2004, **33**: 597
- [21] Djouad F *et al.* *Blood*, 2003, **102**: 3837
- [22] Djouad F *et al.* *Transplantation*, 2006, **82**: 1060
- [23] Gunn WG *et al.* *Stem Cells*, 2006, **24**: 986
- [24] Sun T *et al.* *Cancer Lett*, 2008, **263**: 35
- [25] Sohara Y *et al.* *Cancer Res*, 2005, **65**: 1129
- [26] Tabe Y *et al.* *Blood*, 2004, **103**: 1815
- [27] Karnoub AE *et al.* *Nature*, 2007, **449**: 557
- [28] Nakamura K *et al.* *Gene Ther*, 2004, **11**: 1155

The Relationship between Mesenchymal Stem Cells and Tumor

Zhen-Yu Bian, Ting-Ting Tang*

(Department of Orthopedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

Abstract Recent studies have demonstrated that mesenchymal stem cells (MSCs) had close relationship with various tumors. MSCs could be recruited by tumors, and co-injected exogenous MSCs or systemically injected exogenous MSCs involved in the formation of tumor stroma. MSCs had immunosuppressive properties and would promote tumor growth *in vivo*. The interaction between MSCs and tumor cells which mediated by soluble factors or direct cell contact could inhibit the apoptosis of tumor cells, enhance the proliferation of tumor cells and promote tumor metastasis. Cell-mediated anticancer gene strategies could be developed based upon the homing of MSCs to tumor site.

Key words mesenchymal stem cells; tumor; homing

Received: May 30, 2008 Accepted: September 10, 2008

This work was supported by the Shanghai Science and Technology Development Fund (No.064307055) and the Program for New Century Excellent Talents in University (No.NCET-06-0401)

*Corresponding author. Tel: 86-21-63138341-5397, Fax: 86-21-63137020, E-mail: tingtingtang@hotmail.com