

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.12.010

转染 pCE 质粒的干细胞对肝癌治疗的影响

冯 刚¹, 罗利琼², 张丽娟¹, 何 柳¹

Effect of Transfected Stem Cells with pCE Plasmid on Therapy for Liver Cancer

FENG Gang¹, LUO Li-qiong², ZHANG Li-juan¹, HE Liu¹

1. Department of Oncology, Puai Hospital Affiliated of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430033, China; 2. Department of Oncology, Tianyou Hospital Affiliated of Wuhan University of Science and Technology

Corresponding Author: ZHANG Li-juan, E-mail: drfg36@sohu.com

Abstract: Objective To observe stem cells with pCE plasmid therapy for liver cancer, and explore its related mechanism. **Methods** After injection of stem cells into tail vein, inhibiting tumor ratio was calculated, satellite lesions in the liver, change of tumor mass in pathology, expression of SDF-1 were studied. The difference among control group, group of stem cells, group of stem cells with pCE plasmid, and group of 5-Fu were compared. **Results** Stem cells with pCE plasmid could inhibit proliferation of cancer cells (56%) in the following 10 day ($P < 0.05$), compared with control group (0%), group of stem cells (8%) and group of 5-Fu (78%), respectively. Expression of SDF-1 from group of stem cells with pCE plasmid after treatment was increased ($OD = 0.48$), different from control group ($OD = 0.35$), group of stem cells ($OD = 0.39$) and group of 5-Fu ($OD = 0.36$) ($P < 0.05$). Expression of SDF-1 from all groups before treatment did not have difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Stem cells with pCE plasmid could inhibit proliferation of cancer cells through the help of SDF-1.

Key words: Gene therapy; Stem cells; Liver neoplasms; Chemokine CXCL12

摘要:目的 观察转染 pCE 质粒的干细胞对肝癌的治疗作用。**方法** 采用尾静脉直接注射法治疗大鼠肝脏转移瘤,设立阴性对照、干细胞、转染 pCE 质粒的干细胞组和 5-Fu 组,通过观察转移瘤在肝脏组织中的生长情况和卫星灶形成,肝脏组织的病理学改变,检测基质衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)表达,比较 4 组对肝癌的治疗作用。**结果** 转染 pCE 质粒的干细胞组对肿瘤细胞的生长抑制率(56%)与阴性对照组(0)、干细胞组(8%)和 5-Fu 组(78%)比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗前 4 组 SDF-1 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。转染 pCE 质粒的干细胞组 SDF-1 在治疗后分泌增加($OD = 0.48$),与阴性对照组($OD = 0.35$)、干细胞组($OD = 0.39$)和 5-Fu 组($OD = 0.36$)比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 转染 pCE 质粒的干细胞有抑制肝癌生长的作用,SDF-1 表达水平上升是其机制之一。

关键词: 基因治疗;干细胞;肝肿瘤;趋化因子 CXCL12

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2010)12-1370-04

0 引言

基因治疗是一种临床应用极具潜力的治疗手段,具有可操作性。目前干细胞的研究证实干细胞有很好的趋向性,能归巢到最终分化的器官^[1-3]。为了探讨转染目的基因至大鼠骨髓来源的间充质干细

胞对大鼠肝脏肿瘤治疗的可能性^[4],本课题通过建立大鼠 Walk-256 株肝脏转移瘤模型,观察转染 pCE 质粒至大鼠骨髓间充质干细胞对大鼠肝癌治疗效果,并探讨其治疗作用机制,为肝癌的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠 Walk-256 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;大鼠 Wister 品系(SPF 级,4~6 周龄,体重 180~220g,雄性)购自湖北省疾病预防控制中心实验动物研究中心,合格证号:SCXK(鄂)2003-

收稿日期:2010-04-27;修回日期:2010-10-05

基金项目:武汉市科技局晨光计划科研基金资助项目(200750731292)

作者单位:1. 430033 武汉,华中科技大学同济医学院附属普爱医院肿瘤科;2. 武汉科技大学附属天佑医院肿瘤科

通信作者:张丽娟, E-mail: drfg@sohu.com

作者简介:冯刚(1971-),男,学士,副主任医师,主要从事肿瘤学研究

0005;SPF 级动物实验室(武汉大学动物中心);本实验室构建纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)的真核表达载体 pCE 质粒,体外转染 pCE 质粒至大鼠骨髓间充质干细胞,并培养保存;大鼠 SDF-1 的 ELISA 试剂盒购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 Walk-256 细胞株肝脏转移瘤模型的建立 收集腹水瘤细胞(大鼠肝癌细胞系 Walk-256),制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,采用直接肝内注射接种法,接种于 Wister 品系大鼠肝内,每只 0.2 ml。SPF 级环境饲养。

1.2.2 分组与给药 Walk-256 细胞株在肝脏成功建立转移瘤模型 3 天后,对大鼠进行治疗。将荷瘤大鼠随机分为 4 组(每组 10 只):(1)阴性对照组:尾静脉注射 0.9%氯化钠溶液每只 0.2 ml;(2)干细胞组:尾静脉注射干细胞每只 0.2ml($1 \times 10^7 \text{ml}$);(3)转染 pCE 质粒的干细胞组:尾静脉注射转染 pCE 质粒的干细胞每只 0.2ml($1 \times 10^7 \text{ml}$);(4)5-Fu 组:腹腔注射 5-Fu 每只按 500 mg/kg 计算。大鼠在第 10 天治疗结束后留取血液和肿瘤组织标本。

1.2.3 检测方法

(1)在 10 天的治疗期间观察大鼠的一般状况(食量、活动、毛色、体重、精神状态),肝脏肿瘤组织的大小和卫星灶的情况。

(2)计算肿瘤生长抑制率 用游标卡尺测量肿瘤的长径 L ,短径 R ,按 $V = 1/2(LR^2)$ 计算肿瘤体积,肿瘤生长抑制率 = (对照组平均肿瘤体积 - 治疗组平均肿瘤体积)/对照组平均肿瘤体积 $\times 100\%$ 。

(3)HE 染色 取标本,经 4%多聚甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,HE 染色,显微镜观察治疗后各实验组对肿瘤组织病理改变的影响。

(4)SDF-1 酶联免疫吸附测定法 使用酶联免疫吸附仪器在 450nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。

1.3 统计学方法

采用方差分析处理实验数据,统计处理应用 SPSS 11.0 统计软件包($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 大鼠的一般状态

4 组大鼠的食量、活动、毛色、体重及精神状态,在治疗前后无明显变化。

2.2 治疗后肿瘤细胞生长的抑制情况

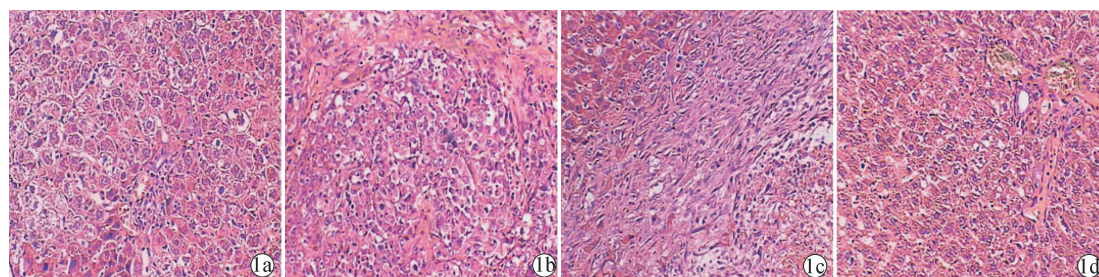
根据 4 组大鼠肿瘤平均体积,绘制肿瘤生长曲线。结果显示各组大鼠进行治疗后,转染 pCE 质粒的干细胞组(抑制率为 56%)可以抑制肿瘤细胞的生长,与阴性对照组(抑制率为 0%)、干细胞组(抑制率为 8%)和 5-Fu 组(抑制率为 78%)相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图略)。

2.3 转移瘤在肝脏的生长和卫星灶情况

4 个实验组在肝脏接种处转移瘤的生长方式是有所差别的。阴性对照组和 5-Fu 组在肝脏接种处均呈内向生长,向肝脏实质浸润生长。干细胞组(10%)与转染 pCE 质粒的干细胞组(20%)在肝脏接种处细胞部分呈外向生长,在肝脏表面被包裹,影响转移瘤的生长;其他的转移瘤在肝脏接种处仍呈内向生长。4 组实验组肝脏均未见有散在的卫星灶,考虑与实验的时间长短有关。

2.4 转移瘤大鼠在治疗后肝脏组织病理学改变

镜下观,4 组治疗后肝脏组织病理学有不同的变化。阴性对照组:肝组织出现大片坏死,有坏死区和出血区,核溶解,核消失。干细胞治疗组:肝小叶呈灶状、带状,有纤维组织增生,形成大小不等的假小叶,癌细胞呈多边形,核大深染,核浆比例增大。转染 pCE 质粒的干细胞组:周边有较多的纤维组织增生和淋巴细胞浸润;5-Fu 治疗组:肝细胞排列紊乱,见图 1。



1a: control group; 1b: group of stem cells; 1c: group of stem cells with pCE plasmid; 1d: group of 5-Fu

图 1 转移瘤大鼠在治疗后肝脏组织病理学改变(HE $\times 200$)

Figure 1 Histological analysis of liver injected with Walk-256 (HE $\times 200$)

2.5 转移瘤大鼠血液中 SDF-1 在治疗前后分泌的情况

基质细胞衍生因子-1 (SDF-1) 又称趋化因子 CXCL12, 在治疗前各实验组大鼠血液中 SDF-1 分泌情况差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。转染 pCE 质粒的干细胞组 SDF-1 在治疗后分泌增加 ($OD = 0.48$), 与阴性对照组 ($OD = 0.35$)、干细胞组 ($OD = 0.39$) 和 5-Fu 组 ($OD = 0.36$) 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

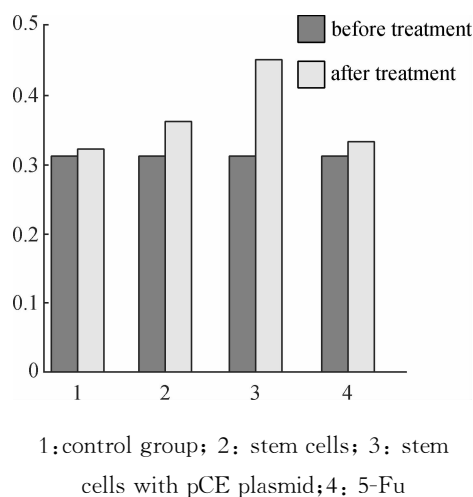


图 2 4 组在治疗前后 SDF-1 的变化

Figure 2 The secretion of SDF-1 before and after treatment

3 讨论

在肝脏等脏器遇到损害时可以产生 SDF-1 等信号分子, 可以与干细胞表面的 CXCR4 相互作用, 使干细胞内 Ca^{2+} 浓度短暂上升, 进而影响细胞骨架结构, 实现干细胞的迁移^[5-8]。肿瘤组织内新生的毛细血管内皮细胞表达黏附分子 $\alpha 4\beta 1$ 的配体, 与骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 表面分布的黏附分子 $\alpha 4\beta 1$ 的受体结合^[9-10], MSCs 能选择性趋向肿瘤新生血管区发生“归巢”效应并逐步向肿瘤实质内渗透^[11-12]。干细胞是具有不断分化和自我更新能力的一类特殊细胞, 其优良的可塑性和强大的迁移能力, 适合作为优良的基因运输载体。导入各种目的基因的干细胞疗法可能为肿瘤治疗提供一个新的治疗手段。

Fn 是一组具有多个功能结构域的细胞外基质高分子糖蛋白, 与细胞表面的整合素分子结合。Fn 具有促进细胞粘连, 促进巨噬细胞的吞噬功能, 调控细胞的生长代谢功能, 影响癌细胞的增殖等^[13-15]。Fn 的 Cell I 和 Hep II 是其发挥生物功能重要的两个结构域, 本实验室构建表达这两个结构域的真核

表达载体 pCE 质粒, 并体外转染 pCE 质粒至大鼠骨髓间充质干细胞。通过建立 Walk-256 细胞株的大鼠肝脏转移瘤模型, 观察转染 pCE 质粒的干细胞对肝脏转移瘤的治疗影响。实验中干细胞组 (10%) 与转染 pCE 质粒的干细胞组 (20%) 在肝脏接种处细胞部分呈外向生长, 在肝脏表面被包裹, 影响转移瘤的生长。干细胞组不能抑制肿瘤细胞的生长 ($P > 0.05$), 转染 pCE 质粒的干细胞组可以抑制肿瘤细胞的生长 ($P < 0.05$), 进一步证实 pCE 质粒对肿瘤细胞有抑制作用。4 个实验组肝脏均未见有散在的卫星灶, 考虑与实验的时间长短有关。转染 pCE 质粒的干细胞组, 周边有较多的纤维组织增生和淋巴细胞浸润, 可能是转染 pCE 质粒的干细胞在肝脏内诱发其他的分子机制所致^[16]。在治疗 10 天后, 转染 pCE 质粒的干细胞的 SDF-1 分泌增加, 与阴性对照组、干细胞组和 5-Fu 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SDF-1 是介导干细胞迁移和归巢的一个重要因子^[5,6,8,10], 但是在本实验中, 虽然转染 pCE 质粒的干细胞组的 SDF-1 表达水平有所上调, 可以获取 SDF-1 等信号分子从肝脏发出更多的信号。如果没有干细胞自身的生物学特性等作用的影响, 单一因素的作用难实现向肝脏发生趋化和转移, 也难为 pCE 质粒在肝脏的稳定表达和发挥治疗作用提供前提和优势。然而干细胞是否全部都归巢在肝脏组织, 归巢后的干细胞为何可以使转移瘤模型中数例大鼠肝脏内的肿瘤细胞生长方式发生改变, 这可能需要更多不同肝癌细胞株的体内实验来证实, 具体作用的分化机制也需要进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells[J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [2] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans[J]. Hepatology, 2000, 32(1): 11-16.
- [3] Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into 5-Functional hepatocytes[J]. J Biochem, 2003, 134(4): 551-558.
- [4] Hamada H, Kobune M, Nakamura K, et al. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy[J]. Cancer Sci, 2005, 96(3): 149-156.
- [5] Kollet O, Shvitiel S, Chen YO, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver[J]. J Clin Invest, 2003, 112(2): 160-169.

- [6] Kucia M, Wojakowski W, Rea R, et al. The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner[J]. Arch Immunol Ther Exp(Warsz), 2006, 54(2): 121-135.
- [7] Suratt BT, Petty JM, Young SK, et al. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis[J]. Blood, 2004, 104(2): 565-571.
- [8] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34⁺ cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival[J]. Blood, 2000, 95(3): 756-768.
- [9] N. Lamerant-Fayel, C. da Crola Silva and C. Kieda. Tumor and Host Endothelial Cell Selective Interactions and Modulation by Microenvironmental Chemokines: Tumor-Endothelial Cell Cross Talk Specificity[J]. Cancer Growth and Progression, 2005, 15(0): 219-231.
- [10] Jin H, Su J, Garmy-Susini B, et al. Integrin α 4 β 1 promotes monocyte trafficking and angioplasmidosis in tumors[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2146-2152.
- [11] Carr AN, Howard BW, Yang HT, et al. Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: Support for an endothelium-dependent mechanism[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(4): 925-935.
- [12] Jin H, Aiye A, Su J, et al. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 652-662.
- [13] Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors [J]. Annu Rev Biochem, 1998, 57 (2): 375 - 413.
- [14] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, et al. Canstatin, a novel matrix derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 1209-1215.
- [15] Capo-Chichi CD, Smith ER, Yang DH, et al. Dynamic alterations of the extracellular environment of ovarian surface epithelial cells in premalignant transformation, tumorigenicity, and metastasis[J]. Cancer, 2002, 95(8): 1802-1815.
- [16] Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice [J]. Hepatology, 2004, 40(6): 1304- 1311.

[编辑:周永红;校对:黄国玲]

(上接第 1363 页)

- [5] Brignole C, Marimpietri D, Pagnan G, et al. Neuroblastoma targeting by c-myc-selective antisense oligonucleotides entrapped in anti-GD2 immunoliposome; immune cell-mediated anti-tumor activities[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1-2): 181-186.
- [6] Kirpotin D, Park JW, Hong K, et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro[J]. Biochemistry, 1997, 36(1): 66-75.
- [7] Noble CO, Kirpotin DB, Hayes ME, et al. Development of ligand-targeted liposomes for cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2004, 8(4): 335-353.
- [8] Brignole C, Marimpietri D, Gambini C, et al. Development of Fab' fragments of anti-GD(2) immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma [J]. Cancer Lett, 2003, 197(1-2): 199-204.
- [9] Xianghua Y, Zirong X. The use of immunoliposome for nutrient target regulation (a review) [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006, 46(8): 629-638.
- [10] 韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 等. HER-2 基因靶向 RNA 干扰重组表达载体的构建及序列分析[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(31): 3284-3288.
- [11] Kim WK, Bang MH, Kim ES, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells[J]. J Nutr Biochem, 2005, 16(3): 155-162.

[编辑:周永红;校对:黄国玲]