

基因与细胞治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000110

骨髓间充质干细胞在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中
瘤性转化的生物学分析

张春敏, 朱 静, 燕 莎, 崔建邦

(重庆医科大学附属儿童医院中心实验室、儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中是否发生了生物学特性的改变。**方法:**全骨髓贴壁筛选法分离培养 SD 大鼠 BMSCs, 免疫荧光(immunofluorescence, IF)法检测 BMSCs 表面标志分子 CD90⁺、CD105⁺、CD45⁻; 活细胞荧光染料 CM-Dil 标记 BMSCs(CM-Dil+BMSCs), 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测标记效率, 台盼蓝染色法连续监测 BMSCs 死亡率; CM-Dil+BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞直接接触共培养为直接共培养组, BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞非接触共培养为间接共培养组, 阳性对照组为 C6 脑胶质瘤细胞单独培养, 阴性对照组为 BMSCs 单独培养, 培养 7 d 后, IF 法检测各组酸性胶质纤维蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、CD90、CD105 表达情况; FCM 分选实验组 CM-dil+BMSCs 和 C6 脑胶质瘤细胞, 实时荧光定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测各组 GFAP、PTEN、Bcl-xl、CyclinD1、CD90、CD105 基因的表达。**结果:**①培养至第 3 代的 BMSCs 90% 以上表达 CD90、CD105 且不表达 CD45; ②IF 结果显示直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 细胞表达 GFAP 水平较阴性对照组 BMSCs 均增高。③RT-qPCR 结果显示直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 细胞 GFAP、PTEN、Bcl-xl、CyclinD1 基因表达水平较阴性对照组 BMSCs 明显增高($P<0.05$), 且直接共培养组与间接共培养组比较无明显差异($P>0.05$); 同时, 直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 的 CD90、CD105 基因表达水平较阴性对照组 BMSCs 显著降低($P<0.05$)。**结论:**BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中存在潜在瘤性转化的倾向。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 酸性胶质纤维蛋白; C6 脑胶质瘤细胞

【中图分类号】R737.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-25

作者介绍: 张春敏, Email: zhangchunmin1987@163.com,

研究方向: 骨髓间充质干细胞瘤性转化。

通信作者: 朱 静, Email: jingzhu@cqmu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31140035)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000110.html>

- [4] Fujiwara K, Yamada T, Mishima K, et al. Morphological and immunohistochemical studies on cleft palates induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in mice[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48(2): 68-73.
- [5] Yuan X, Liu LL, Pu YL, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces a proteomic pattern that defines cleft palate formation in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(7): 2270-2274.
- [6] Yao Z, Chen D, Wang A, et al. Folic acid rescue of ATRA-induced cleft palate by restoring the TGF- β signal and inhibiting apoptosis[J]. J Oral Pathol Med, 2011, 40(5): 433-439.
- [7] Li CH, Shi B, He W, et al. Is it possible to antagonize 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study[J]. Toxicol Ind Health, 2010, 26(5): 281-286.
- [8] Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development[J]. Dev Biol, 2007, 301(2): 309-326.
- [9] Lindén J, Lensu S, Tuomisto J, et al. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance[J]. Front Neuroen-

doocrinol, 2010, 31(4): 452-478.

- [10] 王朝和, 原丽欣, 曹明琳, 等. 2,3,7,8-四氯二苯并二噁英对体内氧化应激反应的研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16(2): 99-101.
- [11] Cuervo R, Covarrubias L. Death is the major fate of medial edge epithelial cells and the cause of basal lamina degradation during palatogenesis[J]. Development, 2004, 131(1): 15-24.
- [12] Lü XY, Armfinn HS, Asta J, et al. Antioxidant effect of 5-methyl-tetrahydrofolate stronger than ascorbic acid[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25(9): 824-827.
- [13] Lu F, Zahid M, Wang C, et al. Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells[J]. Cancer Prev Res (Phila), 2008, 1(2): 135-145.
- [14] Tutel'yan VA, Gapparov MM, Telegin JY, et al. Flavonoids and resveratrol as regulators of Ah-receptor activity: protection from dioxin toxicity[J]. Bull Exp Biol Med, 2003, 136(6): 533-539.

(责任编辑: 唐秋姗)

Biological analysis of malignant transformation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the microenvironment of C6 glioma cells

Zhang Chunmin, Zhu Jing, Yan Sha, Cui Jianbang

(Key Laboratory of Child Development and Disorders Founded by Ministry of Education, Central Laboratory, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

[Abstract] **Objective:** To discuss the changes of the biological characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) in the microenvironment of C6 glioma cells. **Methods:** Whole bone marrow adherent cultivation was used to isolate and culture SD rat BMSCs. Immunofluorescence (IF) was used to detect the surface makers of BMSCs (CD90⁺, CD105⁺, CD45⁻). BMSCs was labeled with a fluorescent dye CM-Dil (CM-Dil+BMSCs) and the labeling efficiency was examined with flow cytometry (FCM). The inhibitory rate of CM-Dil+BMSCs was continuously tested by trypan blue staining assay. In direct-co-culture group, CM-Dil+BMSCs was directly co-cultured with C6 glioma cells; in indirect-co-culture group, BMSCs was indirectly co-cultured with C6 glioma cells; in positive control group, C6 glioma cells was separately cultured and in negative control group, BMSCs was separately cultured. After 7 d, IF was applied to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) of each group. Gene expression of GFAP, PTEN, Bcl-xl, CyclinD1, CD90, CD105 of each group was detected by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results:** (1) It was showed by IF that more than 90% of the third generation of BMSCs expressed CD90, CD105, but not CD45. (2) Expression of GFAP of BMSCs in direct-co-culture group and indirect-co-culture group was increased compared with that in negative control group, while the expression of CD90 and CD105 were decreased. Gene expression of GFAP, PTEN, Bcl-xl, CyclinD1 was significantly increased in direct-co-culture group and indirect-co-culture group compared with that in negative control group ($P < 0.05$). There was no difference between direct-co-culture group and indirect-co-culture group ($P > 0.05$). Gene expression of CD90, D105 was significantly decreased in direct-co-culture group and indirect-co-culture group compared with that in negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** BMSCs in the microenvironment of C6 glioma cells have the potential malignant transformation tendency.

[Key words] bone marrow-derived mesenchymal stem cells; glial fibrillary acidic protein; C6 glioma cells

骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 因其多向分化潜能和靶向迁移到肿瘤或炎症部位的特性, 成为了临床多种疾病治疗的重要载体^[1-3]。因此, BMSCs 应用的安全性成为其广泛应用于临床疾病靶向治疗载体的必备前提。本文通过构建 SD 大鼠 BMSCs 与大鼠 C6 脑胶质瘤细胞共培养模型, 探讨 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤微环境中生物学特性的变化, 从而为 BMSCs 的临床安全应用提供实验依据。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验动物 SD 大鼠, 性别随机, 3~4 周龄, 体质量约 40~60 g, 由重庆医科大学实验动物中心购买; C6 脑胶质瘤细胞系由重庆医科大学附属儿童医院儿童发育与疾病研究教育部重点实验室肿瘤研究室惠赠。

1.1.2 实验分组 阳性对照组: C6 脑胶质瘤细胞单独培养 7 d; 阴性对照组: BMSCs 单独培养 7 d; 直接共培养组: CM-Dil+BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞直接接触共培养 7 d; 间接共培养组: BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞非接触共培养 7 d; 每个实验分组独立重复 3 次。

1.2 主要试剂

小鼠抗大鼠酸性胶质纤维蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 单克隆抗体 (Abcam 公司), 小鼠抗大鼠 CD105、CD45 单克隆抗体 (Epitomics 公司), 兔抗大鼠 CD90 单克隆抗体 (Origene 公司), DMEM/F12 培养基 (Gibco 公司), CM-Dil 荧光染料 (Invitrogen 公司), 台盼蓝染液 (Count star 公司), AlexaFluor488 标记山羊抗兔 IgG、AlexaFluor488 标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉公司), DAPI 染色液 (Beyotime 公司), 总 RNA 快速提取试剂盒 (KeyGEN Biotech 公司), SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (Takara 公司), PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara 公司), 实时荧光定量聚合酶链反应 (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 上下游引物 (Invitrogen 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 全骨髓贴壁筛选法分离培养 SD 大鼠 BMSCs 分离 SD 大鼠股骨和胫骨, 冲洗骨髓, 贴壁筛选分离培养 BMSCs。

1.3.2 CM-Dil 标记 BMSCs 后检测荧光标记效率并监测细胞死亡率 培养至第 3 代的 BMSCs 生长密度达 90% 融合时, 胰蛋白酶消化成单个细胞悬液, 调整细胞总数为 1×10^6 个, 1 ml 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬, 加入 2 μ l 浓度为 1 mg/ml 的 CM-Dil 染液, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, PBS 洗 2 次, 用含有 10% 胎牛血清 (fetal bovin serum, FBS) 的 DMEM/F12 完全培养基重悬后取

一部分细胞培养 24 h 后 FCM 检测标记效率;另一部分以 1×10^4 个细胞密度种入 24 孔板中,同时将同批未标记 CM-Dil 的 BMSCs 以 1×10^4 个细胞密度种入另外一块 24 孔板中作为空白对照组,每组平行 3 个孔做为重复孔,连续 8 d 每 24 h 分别消化 3 个孔 CM-Dil+BMSCs 和空白对照组 BMSCs,台盼蓝染色后 30 s 内计数,计算细胞死亡率=死细胞数/(活细胞数+死细胞数) $\times 100\%$ 。

1.3.3 直接共培养模型的构建 培养至第 3 代的 BMSCs 经过 CM-Dil 标记后按照 0.5×10^6 个细胞量种到 75 ml 玻璃培养瓶中,24 h 后加入含 0.5×10^6 个 C6 脑胶质瘤细胞的细胞悬液,每 24 h 更换培养基,并在倒置荧光显微镜下观察细胞生长状况,直至培养 7 d。同时平行建立阳性对照组和阴性对照组。

1.3.4 间接共培养模型的构建 培养至第 3 代的 BMSCs 和 C6 脑胶质瘤细胞以 1:1 比例种到 Transwell 插入式培养皿与 6 孔板结合的间接共培养装置中,形成 2 种细胞不直接接触但培养液处于动态接触的状态,每 24 h 更换培养基,并在倒置显微镜下观察细胞生长状况,直至培养 7 d。

1.3.5 免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 检测细胞表面 CD90、CD105、CD45、GFAP 表达 1 mm $\times$ 1 mm 盖玻片做细胞爬片,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 4% 多聚甲醛固定 10~15 min, PBS 洗 5 min, 3 次; 1% Triton 通透 10 min, PBS 洗 5 min, 3 次; 5% 牛血清白蛋白 (bull serum albumin, BSA) 封闭 30 min, 加一抗 (1:400 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗 5 min, 3 次; 根据一抗来源加对应二抗 (1:200 稀释) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗 5 min, 3 次; DAPI (1:20 稀释) 染液染核 10 min, PBS 洗 5 min, 3 次; 封片, 荧光显微镜观察。

1.3.6 RNA 提取及 qRT-PCR 各组细胞培养 7 d 后胰蛋白酶消化成单个细胞悬液, PBS 洗 2 次, 直接共培养组细胞经 FCM 分选后收集 CM-Dil+BMSCs 细胞, 提取各组总 RNA (参照总 RNA 快速提取试剂盒操作说明), 测定浓度后, 将提取的总 RNA 逆转录成 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 (参照 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit 操作说明), 对所得 cDNA 进行 qRT-PCR 扩增 [参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 操作说明], 分析各组相关基因相对表达量。

1.4 统计学处理

数据使用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理, qRT-PCR 数据采用双 delta-t 法分析, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 表面标志分子 CD90、CD105、CD45 表达情况

IF 法检测培养至第 3 代的 BMSCs 表面 CD90、CD105、CD45 分子, 90% 以上细胞 CD90⁺、CD105⁺、CD45⁺, 见图 1, 绿色荧光为 CD90 分子, 红色荧光为 CD105 分子, 蓝色荧光为细胞核 DAPI 染色。结果提示第 3 代 BMSCs 纯度高, 形态均一。

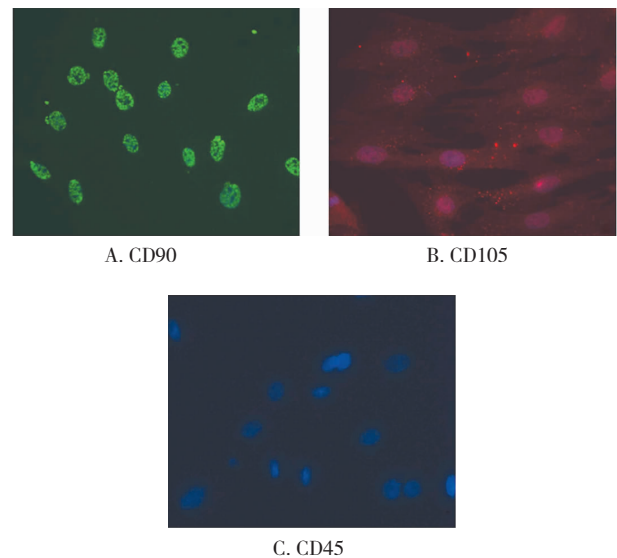


图 1 3 种分子在 BMSCs 的表达 (400 $\times$)

Fig.1 Expression of three molecules in BMSCs (400 $\times$)

2.2 BMSCs 经过 CM-Dil 荧光染料标记后 24 h 荧光标记效率及细胞死亡率

BMSCs 经过 CM-Dil 荧光染料标记后 24 h 荧光标记效率为 98.3% 见图 2; CM-Dil 标记组 BMSCs 死亡率和空白组 BMSCs 比较无明显差异见图 3, 提示 CM-Dil 荧光染料标记效率高, 对 BMSCs 生长和增殖无影响, 可以很好的应用于本文中 BMSCs 的定位。

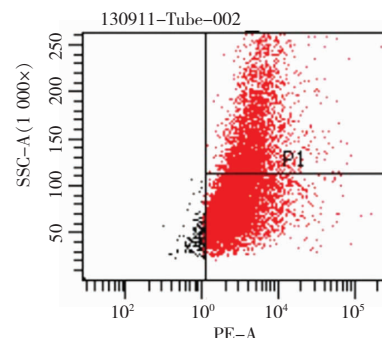


图 2 CM-Dil 标记 BMSCs 后 24 h 荧光标记效率

Fig.2 24 h fluorescence labeling efficiency after BMSCs being labelled by CM-Dil

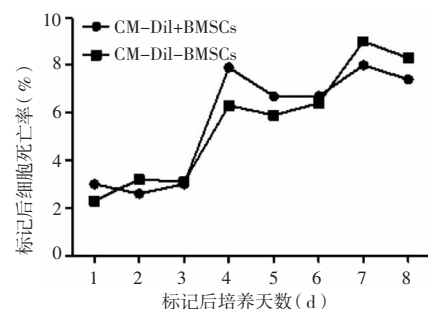


图 3 CM-Dil 标记 BMSCs 后连续监测细胞死亡率

Fig.3 Continuous monitoring of the death rate of CM-Dil labelled BMSCs

2.3 共培养 7 d 后倒置显微镜下观察细胞形态

BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞共培养 7 d 后,直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 较阴性对照组 BMSCs 体积变小,形态细长,图 B 中蓝色箭头所示为 CM-Dil 标记的 BMSCs,黄色箭头所示为 C6 脑胶质瘤细胞,见图 4。

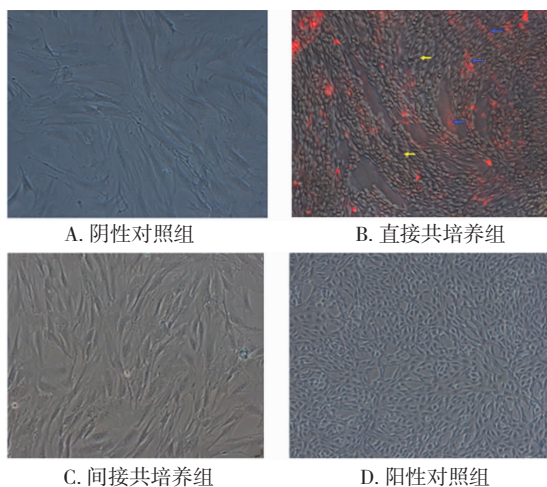


图 4 共培养 7 d 后各组细胞形态(100×)

Fig.4 Cellular morphology after being co-cultured for 7 d(100×)

2.4 IF 检测各组 CD90、CD105 分子的表达

BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞共培养 7 d 后,其表面阳性标志蛋白 CD90、CD105 表达减弱见图 5,绿色为目的蛋白,红色为 CM-Dil 荧光染料标记的 BMSCs,蓝色为细胞核 DAPI 染色。

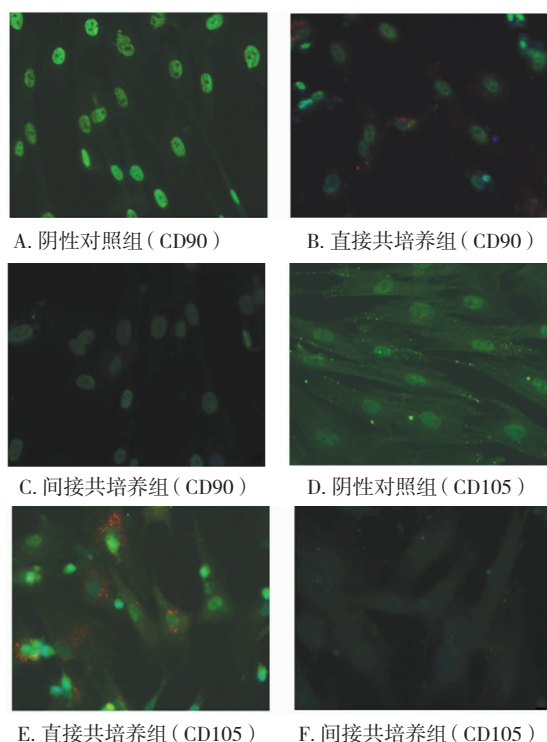


图 5 共培养 7 d 后各组 BMSCs 表面 CD90、CD105 蛋白表达情况 (400×)

Fig.5 Expression of CD90 and CD105 protein of each group in BMSCs after being co-cultured for 7 d (400×)

2.5 IF 检测各组 GFAP 的表达

GFAP 蛋白在阳性对照组 C6 细胞和直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 均较强表达,阴性对照组 BMSCs 不表达或少量表达见图 6,绿色为 GFAP 蛋白,红色为 CM-Dil 荧光染料标记的 BMSCs,蓝色为细胞核 DAPI 染色。

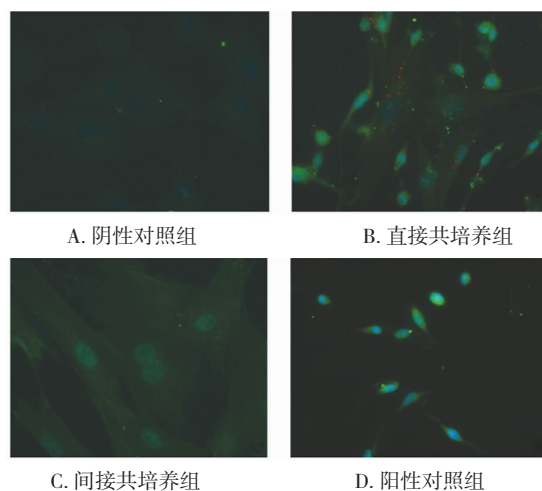


图 6 共培养 7 d 后各组 GFAP 蛋白表达情况 (400×)

Fig.6 Expression of GFAP protein of each group after being co-cultured for 7 d (400×)

2.6 qRT-PCR 检测各组 CD90、CD105 基因表达

CD90、CD105 基因表达水平直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 与阴性对照组比较明显降低(直接共培养组: $P_{CD90}=0.000$ 、 $P_{CD105}=0.000$;间接共培养组: $P_{CD90}=0.000$ 、 $P_{CD105}=0.000$),见表 1。

表 1 qRT-PCR 检测各组细胞 CD90 基因、CD105 基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Relative expression levels of CD90 and CD105 genes in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	CD90 基因	CD105 基因
阴性对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
直接共培养组	0.292 ± 0.079 ^a	0.258 ± 0.081 ^a
间接共培养组	0.003 ± 0.001 ^a	0.018 ± 0.011 ^a
F 值	375.730	356.364
P 值	0.000	0.000

注:a,与阴性对照组比较, $P < 0.05$

2.7 qRT-PCR 检测各组 GFAP、PTEN、Bcl-xl、CyclinD1 基因表达

GFAP、PTEN、Bcl-xl、CyclinD1 基因表达水平直接共培养组和间接共培养组 BMSCs 与阴性对照组比较明显增高(直接共培养组: $P_{GFAP}=0.008$ 、 $P_{PTEN}=0.000$ 、 $P_{Bcl-xl}=0.003$ 、 $P_{CyclinD1}=0.000$;间接共培养组: $P_{GFAP}=0.022$ 、 $P_{PTEN}=0.001$ 、 $P_{Bcl-xl}=0.009$ 、 $P_{CyclinD1}=0.000$),直接共培养组和间接共培养组比较无明显差异($P_{GFAP}=0.507$ 、 $P_{PTEN}=0.041$ 、 $P_{Bcl-xl}=0.130$ 、 $P_{CyclinD1}=0.336$),阳性对照组 C6 细胞表达水平明显高于阴性对照组,见表 2。

表 2 qRT-PCR 检测各组细胞 GFAP 基因、PTEN 基因、Bcl-xl 基因、CyclinD1 基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Relative expression of GFAP, PTEN, Bcl-xl and CyclinD1 genes in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	GFAP 基因	PTEN 基因	CyclinD1 基因	Bcl-xl 基因
阴性对照组	0.008 ± 0.002	0.097 ± 0.024	0.034 ± 0.003	0.447 ± 0.056
直接共培养组	5.666 ± 1.698 ^a	2.779 ± 0.329 ^{ab}	1.719 ± 0.591 ^a	2.728 ± 0.668 ^a
间接共培养组	4.550 ± 2.406 ^a	2.170 ± 0.233 ^a	2.014 ± 0.376 ^a	2.071 ± 0.092 ^a
阳性对照组	9.684 ± 2.607 ^a	2.199 ± 0.057 ^a	2.117 ± 0.103 ^a	2.612 ± 0.138 ^a
F 值	12.274	66.552	22.687	18.548
P 值	0.002	0.001	0.000	0.008

注: a, 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; b, 直接共培养组与间接共培养组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年来, BMSCs 因其具有多向分化潜能和靶向迁移到肿瘤或炎症部位的特性, 成为干细胞研究领域的热点。大量研究报道 BMSCs 能够抑制乳腺癌等肿瘤的生长和转移^[4-5]。但在肿瘤发生的复杂环境中, BMSCs 自身的改变尚不清楚。本课题组前期研究^[6]发现 BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞间接共培养 7 d 后 BMSCs 发生了瘤化, 重要机制之一为 C6 脑胶质瘤细胞高分泌白介素-6(interleukin-6, IL-6)从而激活 IL-6/JAK/STAT3 信号通路及其下游相关基因信号导致 BMSCs 发生恶变, 证实了 C6 脑胶质瘤细胞微环境中某些分泌性因子可以诱导 BMSCs 发生恶变, 为了更进一步探讨 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中的改变, 本文通过建立 BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞共培养模型探究 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中分泌性因子和细胞间直接接触作用下生物学特性的改变, 以此来评估 BMSCs 潜在的瘤化风险, 为 BMSCs 临床安全应用提供实验依据。

对于 BMSCs 的鉴定, 目前尚无特异性标记物, 近期文献报道^[7-8]BMSCs 表面表达多种抗原以及细胞因子和生长因子受体, 如 SH-2、CD29、CD44、CD90、CD105、STRO-1 等, 而造血干细胞表面抗原 CD45、CD34 则均表现为阴性, 本文采用 IF 法检测第三代 BMSCs 表面阳性分子 CD90、CD105 以及阴性分子 CD45, 其结果显示第 3 代 BMSCs CD90、CD105 阳性表达率均在 90% 以上, CD45 阳性率在 5% 以下, 与文献中报道一致, 说明第 3 代 BMSCs 纯度较高, 生物学特性均一, 可以保证实验结果的可靠性。GFAP 是 C6 脑胶质瘤细胞相对特异的表面标志物^[9-12], 正常情况下, BMSCs 不表达或极少量表达 GFAP 蛋白。本研究中 IF 结果显示, 单独培养的

BMSCs 基本不表达 GFAP, 而与 C6 脑胶质瘤细胞共培养 7 d 后的 BMSCs 表达 GFAP 蛋白增加, 且荧光强度接近单独培养的 C6 脑胶质瘤细胞, 而 CD90、CD105 分子在直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 的表达较阴性对照组 BMSCs 均减弱; RT-PCR 结果与 IF 结果一致, GFAP 基因在阳性对照组 C6 脑胶质瘤细胞和直接共培养组、间接共培养组 BMSCs 表达水平较阴性对照组均明显增高, 而 CD90、CD105 基因表达水平则明显降低, 提示 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中表面特性发生了改变。

众所周知, 癌基因和抑癌基因的协调表达是调控细胞生长的重要分子机制, 在某些外界因素刺激下, 癌基因激活后过量表达和抑癌基因失活或突变都会导致肿瘤的发生。抑癌基因 PTEN 是继 P53 基因后与肿瘤发生密切相关的抑癌基因, 正常情况下可以抑制肿瘤的生长和侵袭, PTEN 缺失灭活都会导致细胞恶变^[13]。Bcl-xl 是凋亡相关的 Bcl-2 家族成员, 具有对抗细胞凋亡作用, Bcl-xl 抗凋亡基因过度激活也是导致肿瘤发生的重要原因^[14-15]; 细胞周期调控蛋白 CyclinD1 是细胞周期 G1/S 期过渡的重要调控因子, CyclinD1 异常表达会导致细胞过度增殖, 也是导致细胞发生恶性转化的重要因素之一^[16-18]。本文采用 RT-qPCR 方法对各组 BMSCs 以及 C6 脑胶质瘤细胞抑癌基因 PTEN、细胞凋亡抑制基因 Bcl-xl、细胞周期调控蛋白 CyclinD1 基因的表达情况进行了检测, 结果显示 BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞共培养 7 d 后 Bcl-xl 基因和 CyclinD1 基因的表达显著高于单独共培养的 BMSCs, 提示 BMSCs 可能受到 C6 脑胶质瘤细胞直接接触刺激以及 C6 脑胶质瘤细胞分泌的某些因子, 如 IL-6^[6]的作用后使其正常生长、增殖的稳态被打破, 细胞周期缩短且细胞凋亡受到抑制, BMSCs 处于高增殖、低凋亡的状态; 但是, 直接共培养组与间接共培养组 BMSCs 细胞

PTEN 抑癌基因表达较阴性对照组 BMSCs 细胞增高, 与抑癌基因缺失导致细胞发生恶性转变相违背, 其原因可能为: 首先, 当癌基因和抑癌基因之间的平衡被打破时, 癌基因的过度激活刺激抑癌基因的拮抗性激活, 因此 PTEN 基因也高表达。其次, PTEN 基因某些位点发生突变, 使其丧失了抑制肿瘤发生的特性, 转而促进肿瘤发生与发展。本文将直接共培养组与间接共培养组结果进行比较后发现 2 组细胞形态改变、表面分子表达一致, 且各个基因表达无明显差异, 提示 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中具有潜在的瘤化倾向, 其机制主要与 C6 脑胶质瘤细胞微环境中分泌性因子相关。

本文通过构建 BMSCs 与 C6 脑胶质瘤细胞共培养模型并进行相关指标的检测发现 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中表面特性发生了改变, 且具有潜在的瘤化倾向, 其机制主要与 C6 脑胶质瘤细胞微环境中某些分泌性因子有关, 细胞间直接接触作用对此过程可能也具有一定作用。本研究结果仅限于 BMSCs 在 C6 脑胶质瘤细胞微环境中的改变, 尚不能断定 BMSCs 在其他肿瘤微环境中的变化, 具体机制仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(13): 3603-3608.
- [2] Studeny M, Marini FC, Dembiski JL, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(21): 1593-1603.
- [3] Satake K, Lou J, Lenke LG, et al. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(18): 1971-1979.
- [4] Ling X, Marini F, Konopleva M, et al. Mesenchymal stem cells over-expressing IFN- β inhibit breast cancer growth and metastases through stat3 signaling in a syngeneic tumor model[J]. *Cancer Microenviron*, 2010, 3(1): 83-95.
- [5] Ho IA, Toh H, Ng WH, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress human glioma growth through inhibition of angiogenesis[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(1): 146-155.
- [6] Cui XR, Liu JP, Bai L, et al. IL-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced STAT3 signaling[J]. *Cancer Sci*, 2013, doi: 10.1111/cas.12313[Epub ahead of time].
- [7] Igura K, Okada M, Kim HW, et al. Identification of small juvenile stem cells in aged bone marrow and their therapeutic potential for repair of the ischemic heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305(9): H1354-H1362.
- [8] Bueno DF, Kerkis I, Costa AM, et al. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 427-435.
- [9] Ozawa A, Kadowaki E, Haga Y, et al. Acetylcholine esterase is a regulator of GFAP expression and a target of dichlorvos in astrocytic differentiation of rat glioma C6 cells[J]. *Brain Res*, 2013(1537): 37-45.
- [10] Dhuna K, Dhuna V, Bhatia G, et al. Cytoprotective effect of methanolic extract of *nardostachys jatamansi* against hydrogen peroxide induced oxidative damage in C6 glioma cells[J]. *Acta Biochem Pol*, 2013, 60(1): 21-31.
- [11] Bernardi A, Frozza H, Salbego P, et al. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013(8): 711-729.
- [12] Zhang QS, Zhang M, Liang SJ, et al. Effects of myxoma virus on gliomas of rats models in vivo[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2012, 26(2): 105-107.
- [13] Errafiy R, Aguado C, Ghislat G, et al. PTEN increases autophagy and inhibits the ubiquitin-proteasome pathway in glioma cells independently of its lipid phosphatase activity[J]. *Plos One*, 2013, 8(12): e83318.
- [14] Park D, Magis A, Li R, et al. Novel small-molecule inhibitors of Bcl-xl to treat lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(17): 5485-5496.
- [15] Hu X, Bardhan K, Paschall AV, et al. Deregulation of apoptotic factors Bcl-xl and Bax confers apoptotic resistance to myeloid-derived suppressor cells and contributes to their persistence in cancer[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(26): 19103-19115.
- [16] Korulu S, Yildiz UA, Yuksel M, et al. Protein kinase C activation causes neurite retraction via cyclind1 and p60-katanin increase in rat hippocampal neurons[J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 37(10): 1610-1619.
- [17] Ling H, Jolicoeur P. Notch-1 signaling promotes the cyclind1-dependent generation of mammary tumor-initiating cells that can revert to bi-potential progenitors from which they arise[J]. *Oncogene*, 2012, 32(29): 3410-3419.
- [18] Kopparapu PK, Boorllan SA, Robinson BD, et al. Expression of cyclind1 and its association with disease characteristics in bladder cancer[J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(12): 5235-5242.

(责任编辑: 关蕴良)