

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002892

hESCs 与 A549 细胞共培养后上清液在
体外抗肺癌细胞的作用研究唐 涛¹, 杨鑫玥², 齐东东¹, 冯 涛², 刘成军¹

(1. 重庆医科大学附属大学城医院呼吸中心, 重庆 401331; 2. 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的: 研究人胚胎干细胞 H9 与肺癌细胞 A549 共培养上清液对 A549 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响。**方法:** 建立人胚胎干细胞 H9 与肺癌 A549 细胞直接接触式共培养体系, 收集共培养上清液, 将共培养上清液作用于肺癌 A549 细胞。以单独培养的 A549 细胞上清液为空白对照组, 单独培养的人胚胎干细胞 H9 上清液为对照组。显微镜下观察共培养上清液对肿瘤细胞生物行为学的影响; 用 CCK-8 检测共培养上清液对肿瘤细胞增殖能力的影响; Hoechst 染色法检测共培养上清液对肿瘤细胞的凋亡影响; 细胞划痕实验检测共培养上清液对肿瘤细胞迁移及侵袭的影响。**结果:** 显微镜下观察到实验组肿瘤细胞数量逐渐减少甚至凋亡; CCK-8 检测到实验组肿瘤细胞的增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$); Hoechst 染色发现实验组细胞核出现典型凋亡形态; 细胞划痕实验结果显示实验组肿瘤细胞的划痕愈合率明显低于空白对照组和对照组 ($P < 0.05$)。**结论:** 人胚胎干细胞 H9 与肺癌 A549 细胞共培养上清液, 在体外可以抑制肺癌 A549 细胞增殖、迁移, 促进肿瘤细胞凋亡, 具有一定的抗癌效应。

【关键词】 人胚胎干细胞; 肺癌; 凋亡**【中图分类号】** R655**【文献标志码】** A**【收稿日期】** 2021-03-02Antitumor effect of supernatant from co-culture of human embryonic stem
cells and A549 cells on lung cancer cells *in vitro*Tang Tao¹, Yang Xinyue², Qi Dongdong¹, Feng Tao², Liu Chengjun¹

(1. Respiratory Center, The University-Town Hospital of Chongqing Medical University; 2. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the inhibitory effect of supernatant from contact co-culture of human embryonic stem cells (hESCs) and tumor A549 cells on proliferation, apoptosis, invasion and migration of A549 cells. **Methods:** The direct co-culture system of hESCs H9 and lung cancer A549 cells was established, and the supernatant was tested in the inhibition of A549 cells. The A549 cell supernatant was used as the blank control group, and the hESC H9 supernatant was used as the control group. The inhibitory effects were examined in tumor cell morphology using microscope, cell proliferation with CCK-8 assay, and cell apoptosis with the Hoechst staining. Wound healing assay was used to detect the migration and invasion of tumor cells. **Results:** The number of tumor cells in the experimental group was gradually reduced and even apoptosis was observed under the microscope. CCK-8 method detected that the proliferation of tumor cells in the experimental group was significantly inhibited ($P < 0.05$). Hoechst staining found that the nuclei of the experimental group showed typical apoptotic morphology. The results of wound healing assay showed that the percentage of wound closure of tumor cells in the experimental group was significantly lower than that of the blank control group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** We conclude that the supernatant of co-culture cells had an inhibitory effect on tumor cells *in vitro*.

【Key words】 embryonic stem cell; lung cancer; apoptosis

世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布的 2020 年全球最新癌症负担数据显示: 2020 年全

球新发肺癌 220 万例, 位居新发癌症第二; 2020 年肺癌死亡人数为 180 万, 位居癌症死亡人数第一, 远超其他癌症类型; 肺癌是男性发病率和死亡率最高的癌症; 在女性中, 肺癌发病率位居第三, 死亡率位居第二^[1]。近年来, 尽管肺癌手术方式不断革新、放化疗手段日渐改进、靶向免疫治疗药物推新换代^[2-5], 但

作者介绍: 唐 涛, Email: 1105374190@qq.com,

研究方向: 外科学、胸心外科。

通信作者: 刘成军, Email: 1147861514@qq.com。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210918.1512.002.html>

(2021-09-18)

肺癌患者 5 年生存率仍不足 20%。综上所述,肺癌危害极大,日益成为全球健康的沉重负担。同时,现有的肺癌常规治疗方案局限,难以满足日益增长的临床治疗需要,因此肺癌的生物治疗应运而生^[6]。生物治疗是一种已被证明的、具有显著临床优势及疗效的新兴抗肿瘤治疗方法,日益成为治疗肺癌的一种重要手段,目前已进入前沿研究阶段。干细胞治疗属于生物治疗的一种。

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)是从原始性腺或早期胚胎细胞中分离出来的一类原始细胞,具有多向分化潜能、无限增殖及自我更新等生物学特性,同时胚胎干细胞的增殖分化受基因严格控制,其分化总是向着修复组织损伤方向进行^[7]。肿瘤作为机体的有害刺激,hESCs 可能会向着抑制肿瘤增殖的方向分化。因此,实验收集 hESCs 与肿瘤细胞共培养上清液,观察上清液对肿瘤细胞是否有体外抑制效应,以验证上清液是否具有体外抗癌效果,为 hESCs 用于临床治疗肿瘤做初步的探讨,为临床开发治疗肺癌新方法提供可能的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人胚胎干细胞系 H9 细胞购自北纳生物技术有限公司,人肺癌 A549 细胞株保存至重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心;PSCeasy[®] II 人多潜能干细胞基础培养基、添加因子、EDTA、Basement Membrane Matrix 基质胶(北京赛贝生物技术有限公司);胎牛血清、DMEM 培养基(美国 HyClone 公司);Y-27632 (MedChemExpress 中国公司);Cell Counting Kit-8 试剂盒、Hoechst 33258(重庆莱格尔生物技术开发有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 参照人胚胎干细胞系 H9 培养说明书,细胞培养于基质胶上,培养基为 PSCeasy[®] II 人多潜能干细胞完全培养基,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。每天换液 1 次,细胞汇合度达 80% 时,用 EDTA 37℃消化 5 min,离心细胞去上清液,用 PSCeasy[®] II 人多潜能干细胞完全培养基重悬,按 1:5~1:10 的比例传代。A549 细胞用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的 DMEM 完全培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,3~4 d 传代 1 次,取对数期细胞进行实验。

1.2.2 上清液的制备 取对数生长期的 A549 细胞,以每孔 5×10^5 个接种于已经铺满 70% 胚胎干细胞 H9 的 6 孔板中,每孔加入人多潜能干细胞完全培养基 3 mL 于细胞培养箱内共培养。共培养 48 h 后收集上清,3 000 r/min 离心 10 min 除

去细胞碎片,0.22 μm 微孔滤膜过滤,保存于-20℃冰箱中备用。使用时将上清与 DMEM 完全培养基分别制成 20%、40%、60%和 80%体积分数共培养上清液。体积分数(%)= $\frac{V_{\text{上清液}}}{V_{\text{培养基}}} \times 100$ 。单独培养的 H9 细胞和 A549 细胞,传代培养 48 h 后收集上清液,依共培养上清液的制备方法,制成 H9 上清液和 A549 上清液。

1.2.3 细胞形态学观察 取对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中,每孔细胞数为 5×10^5 个。待细胞恢复贴壁生长状态后进行以下细胞处理:实验组每孔分别加入 20%、40%、60%或 80%体积分数共培养上清液 2 mL,对照组加入单独培养的 H9 上清液 2 mL,空白对照组加入单独培养的 A549 细胞上清液 2 mL。将处理 48 h 后的 A549 细胞于倒置显微镜下观察细胞形态的变化并拍照记录。

1.2.4 CCK-8 检测共培养上清对 A549 细胞增殖的影响 取对数生长期的 A549 细胞,按每孔细胞数 3×10^3 个接种于 96 孔板中。当细胞长到 70%汇合度后进行处理,实验分组及处理:实验组每孔分别加入 0%、20%、40%、60%、80%体积分数共培养上清液 100 μL,对照组每孔分别加入 0%、20%、40%、60%、80% 体积分数 H9 单独培养的上清液 100 μL;空白对照组每孔分别加入 0%、20%、40%、60%、80%体积分数 A549 单独培养的上清液 100 μL。每组设 3 个复孔,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,细胞处理 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 4 h 后,450 nm 处测量光密度(optical density, OD)值,绘制细胞生长曲线,并计算 H9 对 A549 细胞的增殖抑制率。根据上述实验方法重复 3 次。细胞存活率(%)=($\text{OD}_{\text{加药组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}$)/($\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}$) $\times 100$ 。

1.2.5 Hoechst 33258 染色 细胞处理同“细胞形态学观察”。处理 48 h 后的细胞用 PBS 清洗 3 次,避光每孔加入 Hoechst 33258 工作液 1 mL,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中染色 30 min,再用 PBS 清洗 3 次,荧光显微镜下观察细胞形态并采集图像。实验重复 3 次。

1.2.6 细胞划痕实验 用记号笔在 6 孔板背后,用直尺均匀划横线,每隔 0.5 cm 一道,横穿过孔。取对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中,每孔细胞数为 5×10^5 个,过夜铺满皿底,待细胞恢复贴壁生长状态后进行以下处理。第 2 天用 1 mL 枪头比着直尺,垂直于背后的横线划痕。用 PBS 洗细胞 3 次,去除划下细胞。实验分组及处理:共培养上清液处理组细胞加入 80%体积分数共培养上清液 1 mL,H9 上清液处理组细胞加入 80%体积分数 H9 单独培养的上清液 1 mL;A549 上清液处理组细胞加入 80%体积分数 A549 单独培养的上清液 1 mL。置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。按 0 h、12 h、24 h 取样,于倒置显微镜下观察细胞划痕形态的变化并拍照记录,将照片运用 Image J 软件处理。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

单独培养的 H9 上清液处理组和单独培养的 A549 细胞上清液处理组细胞,细胞形态未见明显变化。而共培养上清液处理后的 A549 细胞在显微镜下观察到其形态与对照组和空白对照组细胞相比变化明显,主要体现在细胞数目和细胞形态这 2 个方面的变化。从细胞数目来看,共培养上清液处理组 A549 细胞数量增长缓慢,且随浓度梯度增加,每个显微镜视野下 A549 细胞数量逐渐减少。从细胞形态来看,部分共培养上清液处理后的 A549 细胞出现老化、凋亡迹象,表现为细胞边缘变形皱缩,细胞变小且形态不规则,甚至细胞变得透明且漂浮于培养基中,呈现典型死细胞状态。结果显示,共培养上清液可抑制 A549 细胞增殖,诱导 A549 细胞凋亡,且随共培养上清液浓度增加,其抑制作用增强,共培养上清液浓度为 80% 时抑制作用最强(图 1)。

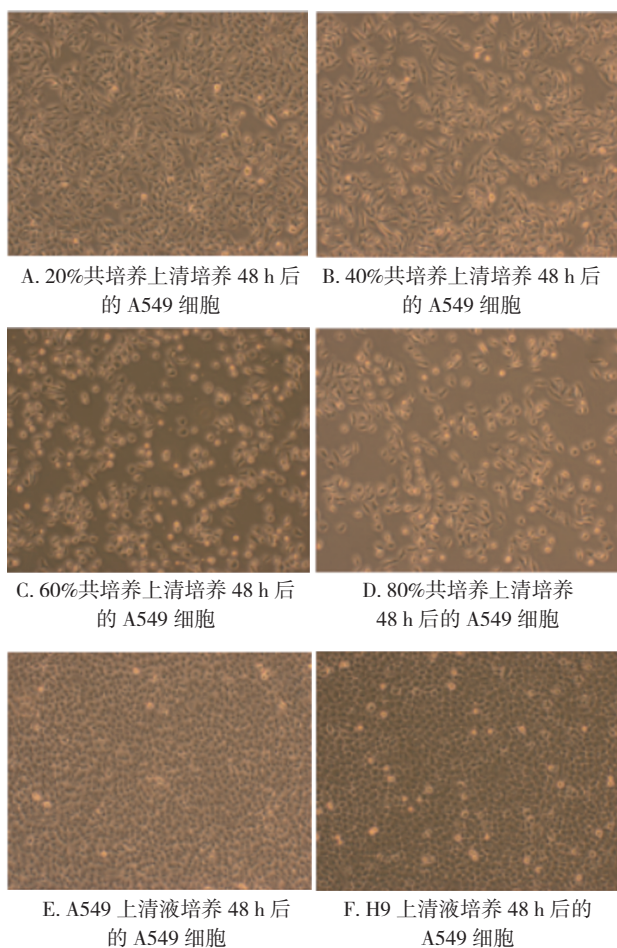
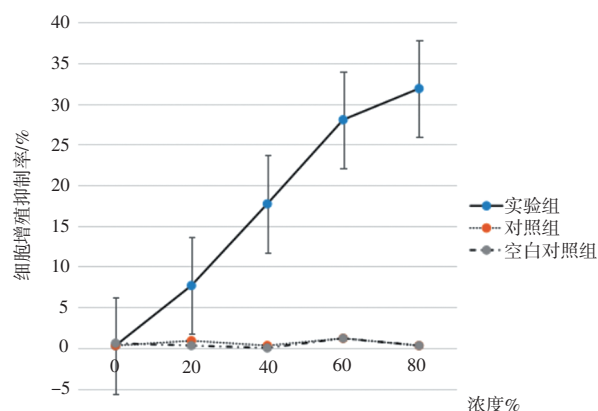


图 1 显微镜下观察共培养上清液对 A549 细胞生物行为学的影响 (200×)

2.2 CCK-8 检测上清液对 A549 细胞增殖的影响

随着共培养上清液浓度的增加(0%、20%、40%、60%和

80%), A549 细胞的生长抑制率逐渐增大,在共培养上清液浓度为 80% 时, A549 细胞受到显著抑制 ($P < 0.05$), 抑制率为 $(31.85 \pm 0.89)\%$ 。而对照组和空白对照组中 A549 细胞生长抑制率无统计学差异 ($P > 0.05$), 均未受到明显抑制。这一结果表明共培养上清液能抑制 A549 细胞增殖且其抑制作用呈浓度依赖性, 而单独培养的 H9 上清液和 A549 细胞上清液对 A549 细胞增殖无抑制作用(图 2)。



注:实验组,不同浓度梯度共培养上清液培养 24 h 后的 A549 细胞;对照组:不同浓度梯度 H9 上清液培养 24 h 后的 A549 细胞;空白对照组:不同浓度梯度 A549 上清液培养 24 h 后的 A549 细胞

图 2 CCK-8 检测上清液对 A549 细胞增殖的影响

2.3 Hoechst 33258 染色

Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下观察,发现对照组和空白对照组中 A549 细胞均表现为正常活细胞状态,细胞发出微弱的蓝色荧光,细胞核大小较均一,染色质分布均一;而实验组 A549 细胞出现典型的凋亡现象,细胞发出亮蓝色荧光,出现染色质凝集和边集化,细胞核表现为核缩小、核皱缩断裂、核呈块状或点状蓝色荧光等,且随着共培养上清液浓度增大,凋亡程度加剧(图 3)。

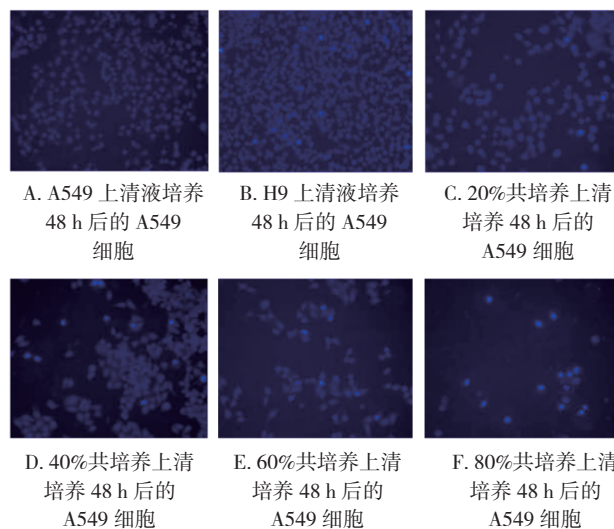


图 3 Hoechst 染色法检测共培养上清液对 A549 细胞凋亡的影响 (200×)

2.4 细胞划痕实验

细胞划痕实验显示,实验组 A549 细胞的划痕愈合率明显低于空白对照组和对照组 ($P<0.05$),而对照组与空白对照组接近 ($P>0.05$) (图 4、图 5)。实验证明共培养上清液能显著抑制 A549 细胞的迁移和侵袭能力。

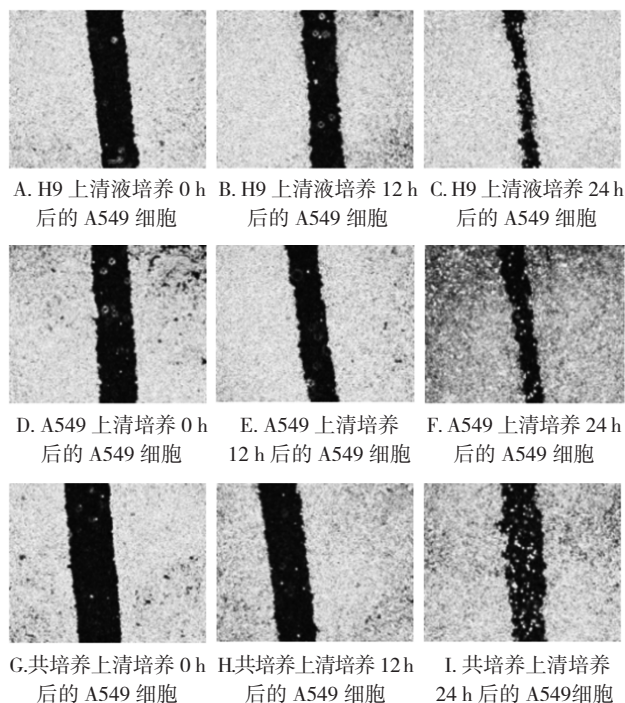
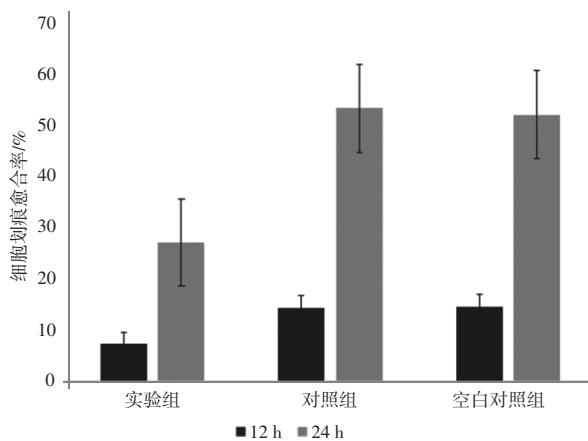


图 4 细胞划痕实验检测共培养上清液对 A549 细胞迁移及侵袭的影响 (100×)



注:实验组,80%体积分数共培养上清液培养的 A549 细胞;对照组:80%体积分数单独培养的 H9 上清液培养的 A549 细胞;空白对照组:80%体积分数单独培养的 A549 上清液培养的 A549 细胞

图 5 细胞划痕实验检测共培养上清液对 A549 细胞迁移及侵袭的影响

3 讨论

hESCs 是从早期胚胎或原始性腺细胞中分离出来的一类原始细胞,具有多向分化、无限增殖及自

我更新等生物学特性。胚胎干细胞具有遗传稳定性^[8],其增殖分化受基因严格控制,总是向着修复组织损伤方向进行分化。肺癌对人体是一种有害刺激,但 hESCs 及肺癌细胞在正常机体内是永远不能相遇的,所以本实验人为建立人胚胎干细胞 H9 与肺癌 A549 细胞直接接触式共培养体系。直接接触式共培养体系兼顾两方面的细胞间相互作用,即通过分泌性细胞因子的细胞间作用和细胞之间或细胞与胞外基质之间的直接接触作用^[9],更能模拟肿瘤细胞生长的微环境。肿瘤微环境是一个复杂的异构细胞环境,除癌细胞外,还由不同的细胞类型组成,受组织血管生成、营养物消耗及调节组织代谢物水平的全身代谢通量等因素影响^[10]。所以,直接接触式共培养能使人胚胎干细胞 H9 与肺癌 A549 细胞更加充分接触,收集共培养后的上清液更能体现 hESCs 对肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响。

实验结果显示,显微镜下观察到实验组肿瘤细胞数量逐渐减少甚至凋亡;CKK-8 法检测到实验组肿瘤细胞的增殖受到显著抑制;Hoechst 染色发现实验组细胞核出现典型凋亡形态;细胞划痕实验结果显示实验组肿瘤细胞的划痕愈合率明显低于空白对照组和对照组。因此,结果表明共培养上清液可以抑制肺癌 A549 细胞增殖、迁移,促进肿瘤细胞凋亡。肺癌的死因往往不是由原发病灶引起,更常见的是肿瘤远处转移而引起的多器官功能衰竭,若通过上清液抑制肺癌的侵袭和迁移,将肺癌转变为一种慢性疾病来治疗,使肺癌患者可以长期带瘤生存,不失为一种好的治疗方案^[11-12]。Yaddanapudi K 等^[13]研究表明胚胎干细胞诱导的抗肿瘤机制可能是由多种效应细胞和细胞因子参与构成的针对胚胎干细胞表面抗原的特异性免疫应答。Giuffrida D 等^[14]研究发现,人胚胎干细胞微环境中含有能够抑制癌细胞生长的可溶性低分子量热稳定因子,该因子可通过抑制细胞周期来减慢癌细胞进程。Lee LM 等^[15]研究发现胚胎干细胞微环境可诱导恶性肿瘤细胞获得一定的良性表型,从而具有抗肿瘤作用。Zheng LD 等^[16]研究发现,在肿瘤细胞刺激下,具有多向分化潜能的干细胞被诱导分化并分泌抗肿瘤因子,可对肿瘤细胞产生一定抑制作用。霍本念等^[17]研究发现人胚胎干细胞分泌的抗肿瘤因子可能通过线粒体途径上调肿瘤细胞 Bax、Caspase-3 表达,下调 Bcl-2 表达,促进肿瘤细胞凋亡。Zhou SF 等^[18]研

究表明,人胚胎干细胞来源的外泌体在抑制肿瘤活性中起重要作用。

共培养上清液表现出的抗癌效应机制可能是在人胚胎干细胞 H9 与肺癌 A549 细胞直接接触式共培养过程中,在肺癌 A549 细胞的刺激下,具有多向分化潜能的干细胞被诱导分化并分泌抗肿瘤因子,从而对肿瘤细胞产生一定抑制作用。然而细胞凋亡是多基因、多因素调控的复杂过程。目前实验结果仅是本研究课题初步研究成果,后续实验将进一步研究上清液中抗肿瘤因子的有效成分、上清液抗肿瘤效应的作用机制以及进行动物实验验证上清液的抗肿瘤效应。

综上所述,本研究初步证实了人胚胎干细胞 H9 与人肺癌 A549 细胞共培养的上清液有一定的体外抑癌效应,可以抑制肺癌 A549 细胞增殖、侵袭和迁移,促进肿瘤细胞凋亡,为 hESCs 用于临床治疗肿瘤奠定初步的实验基础,为临床开发治疗肺癌新方法提供理论依据,但具体作用机制有待后续实验阐明。

参 考 文 献

- [1] International Agency for Research on Cancer(IARC). Latest global cancer data:cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020[EB/OL]. [2020-12-15]. <https://www.iarc.who.int/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-19-3-million-new-cases-and-10-0-million-cancer-deaths-in-2020/>.
- [2] 曾 蕾,杨凯旋.晚期非小细胞肺癌的靶向治疗进展[J]. 华西医学,2021,36(1):102-109.
- [3] Zeng L,Yang KX. Progress in the targeted therapy for advanced non-small cell lung cancer[J]. West China Med J,2021,36(1):102-109.
- [4] 罗添乐,罗 斌,姚嘉良,等.肺癌免疫治疗的临床研究进展[J]. 肿瘤学杂志,2021,27(1):74-79.
- [5] Luo TL,Luo B,Yao JL,et al. Progress of clinical research on immunotherapy for lung cancer[J]. J Chin Oncol,2021,27(1):74-79.
- [6] 谢博恒,隋天一,秦 毅,等.机器人辅助与电视辅助胸腔镜肺段切除术治疗早期非小细胞肺癌短期效果比较[J]. 中国肺癌杂志,2019,22(12):767-771.
- [7] Xie BH,Sui TY,Qin Y,et al. Comparison of short-term outcomes of lung segmentectomy by robotic-assisted and video-assisted thoracoscopic surgery[J]. Chin J Lung Cancer,2019,22(12):767-771.
- [8] 唐武兵,陈永发,潘兴喜,等.尼妥珠单抗联合同期放化疗一线治疗局部晚期非小细胞肺癌临床观察[J]. 中华肿瘤防治杂志,2020,27(13):1075-1080,1093.
- [9] Tang WB,Chen YF,Pan XX,et al. Clinical Observation of Nimotuzumab combined with concurrent chemoradiotherapy as first-line in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer[J]. Chin J Cancer Prev Treat,2020,27(13):1075-1080,1093.
- [10] Singh A,Bhatia S,Rana V. Inhalable nanostructures for lung cancer treatment:progress and challenges[J]. Curr Nanomed,2019,9(1):4-29.
- [11] Wadkin LE,Orozco-Fuentes S,Neganova I,et al. OCT4 expression in human embryonic stem cells:spatio-temporal dynamics and fate transitions[J]. Phys Biol,2021,18(2):026003.
- [12] 杨国宏,孙晓冬.胚胎干细胞的研究进展[J]. 中国当代医药,2015,22(33):25-27.
- [13] Yang GH,Sun XD. Research progress of embryonic stem cell[J]. China Mod Med,2015,22(33):25-27.
- [14] 张子畅,穆军升,周 帆.接触共培养对干细胞向心肌细胞分化影响的研究进展[J]. 心肺血管病杂志,2020,39(6):737-739,742.
- [15] Zhang ZC,Mu JS,Zhou F. Research progress on the effect of contact co-culture on the differentiation of stem cells into cardiomyocytes[J]. J Cardiovasc Pulm Dis,2020,39(6):737-739,742.
- [16] Kaymak I,Williams KS,Cantor JR,et al. Immunometabolic interplay in the tumor microenvironment[J]. Cancer Cell,2021,39(1):28-37.
- [17] Bratova M,Karlinova B,Skrickova J,et al. Non-small cell lung cancer as a chronic;a prospective study from the Czech TULUNG registry[J]. In Vivo,2020,34(1):369-379.
- [18] 杨光成.肿瘤被称为慢性病的重要意义[J]. 中国实用医药,2011,6(29):243-244.
- [19] Yang GC. The importance of tumors being called chronic diseases[J]. China Pract Med,2011,6(29):243-244.
- [20] Yaddanapudi K,Mitchell RA,Putty K,et al. Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer:is a broad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible?[J]. PLoS One,2012,7(7):e42289.
- [21] Giuffrida D,Rogers IM,Nagy A,et al. Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth[J]. Cell Prolif,2009,42(6):788-798.
- [22] Lee LM,Seftor EA,Bonde G,et al. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos:assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation[J]. Dev Dyn,2005,233(4):1560-1570.
- [23] Zheng LD,Feng T,He XM,et al. Antitumor effect of supernatant from co-culture of human embryonic stem cells and breast cancer cells on MDA-MB-231 cells *in vitro*[J]. Acta Pharm Sin,2016,51(4):552-557.
- [24] 霍本念,刘 洁,张 婷,等.人胚胎干细胞对 A549、HepG2 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2018,37(5):2236-2242.
- [25] Huo BN,Liu J,Zhang T,et al. Effects of hESCs on proliferation and apoptosis of A549 and HepG2[J]. Genom Appl Biol,2018,37(5):2236-2242.
- [26] Zhou SF,Abdoun M,Arena V,et al. Reprogramming malignant cancer cells toward a benign phenotype following exposure to human embryonic stem cell microenvironment[J]. PLoS One,2017,12(1):e0169899.

(责任编辑:唐秋姗)