

人脐带间充质干细胞对舌鳞状细胞癌 Cal-27 细胞侵袭和迁移能力的影响

张馨予^{1#} 吴双燕^{2#} 吴鸿¹ 徐竹青¹ 王云英³ 徐晓娜³ 李新¹ 郑建金^{1*}

(1. 青岛大学口腔医学院 山东 青岛 266003;

2. 青岛市口腔医院多学科 山东 青岛 266001; 3. 青岛市市立医院中心实验室 山东 青岛 266000)

[摘要] 目的:探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)对舌鳞状细胞癌 Cal-27 细胞侵袭和迁移能力的影响。方法:细胞划痕实验检测 HUC-MSCs 分泌的细胞因子对 Cal-27 细胞迁移能力的影响;Transwell 小室比较共培养前后 Cal-27 细胞的侵袭和迁移能力;逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测共培养前后 Cal-27 细胞的侵袭、迁移相关基因的表达水平;Western blot 技术检测肿瘤侵袭转移相关蛋白分子基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2 和 MMP-9 的蛋白表达的情况。结果:条件培养基培养的 Cal-27 细胞的迁移距离短于对照组;共培养后 Cal-27 细胞的侵袭和迁移细胞数目减少;侵袭迁移相关基因、蛋白的表达水平下调。结论:HUC-MSCs 与 Cal-27 细胞共培养可以抑制 Cal-27 细胞的侵袭和迁移。

[关键词] 人脐带间充质干细胞 舌鳞状细胞 Cal-27 条件培养基 侵袭和迁移 基质金属蛋白酶

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2019)05-0443-05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.05.008

Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Invasion and Migration of Cal-27 Cells from Tongue Squamous Cell Carcinoma. ZHANG Xin-yu^{1#}, WU Shuang-yan^{2#}, WU Hong¹, XU Zhu-qing¹, WANG Yun-ying³, XU Xiao-na³, LI Xin¹, ZHENG Jian-jin^{1*}. 1. School of Stomatology of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Stomatological Hospital, Qingdao 266001, China; 3. Central Laboratory of Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) on the invasion and migration of Cal-27 cells in tongue squamous cell carcinoma. **Methods:** HUC-MSCs conditioned medium was prepared. Cal-27 cells were cultured and the effect of HUC-MSCs secreted factors on Cal-27 cell migration was detected by cell scratch test. The invasiveness and migration of Cal-27 cells before and after co-culture were compared in Transwell cells. Expression levels of genes related to invasion and migration of Cal-27 cells were detected by RT-PCR before and after co-culture. The changes of MMP2 and MMP9 protein expression in tumor invasion and metastasis-related protein molecules were detected by western blot. **Results:** The migration distance of Cal-27 cells was shorter than that of the control group. After co-culture, the number of invasion and migration of Cal-27 cells decreased. The expression levels of aggression-related genes and proteins were down-regulated. **Conclusion:** The co-culture of HUC-MSCs and Cal-27 cells can inhibit the invasion and migration of Cal-27 cells.

[Key words] Human umbilical cord mesenchymal stem cells Tongue squamous cell carcinoma Cal-27 Conditioned medium Invasion and migration Matrix metalloproteinases

基金项目 青岛市科技局重点项目(编号:15-9-2-79-nsh)

作者简介 张馨予(1991~),女,山东人,硕士在读,主要从事口腔颌面外科的研究学习。

吴双燕(1965~),女,山东人,主任医师,硕士,主要从事牙体牙髓病临床、教学、科研工作。

* 通讯作者 郑建金, E-mail: zhjj19631016@sina.com

为共同第一作者

舌鳞状细胞癌(tongue squamous cell carcinoma, TSCC)是口腔最常见的恶性肿瘤之一,恶性程度高、易发生局部侵袭及颈部淋巴结转移,严重影响患者预后^[1]。目前治疗方面以手术为主,辅助放疗、化疗。但是由于舌鳞状细胞癌局部侵袭力强,淋巴结转移率高,患者5年生生存率仅为50%^[2-4]。因此,寻找抑制 TSCC 侵袭和转移的治疗方法尤为重要。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有分化为不同来源间充质组织的能力^[5]。随着免疫学和细胞生物学的发展, 基因治疗及细胞因子治疗等靶向生物治疗手段得到越来越多的重视^[6]。人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, HUC-MSCs) 是具有吸引力的癌症靶向治疗工具, 并具有迁移到肿瘤的能力, 可作为肿瘤治疗的靶向载体^[7]。本实验将 HUC-MSCs 与 Cal-27 细胞共培养, 比较共培养前后 Cal-27 细胞侵袭和迁移能力的变化, 并对其发生机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料 HUC-MSCs (美国 Sciencel 公司); 培养液成分包括 MSCS (Mesenchymal stem cells, MSCS) 培养基、5% 胎牛血清、1% 干细胞生长因子、1% 青霉素/链霉素。本实验使用第 4~7 代 HUC-MSCs。舌鳞癌细胞 Cal-27 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。其培养液成分包括 RPMI1640 培养基、10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素溶液; SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); 小鼠单抗 β -激动蛋白 (β -actin)、辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗 (武汉博士德生物工程有限公司); RIPA 裂解液、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中用含 10% 胎牛血清及青/链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基传代培养 Cal-27 细胞; 用含 5% 胎牛血清及青/链霉素双抗的 MSCM 培养基传代培养 HUC-MSCs。

1.2.2 条件培养基的配置 用含有 5% 胎牛血清的 MSCM 培养 HUC-MSCs, 待细胞达到 80% 以上融合时, 将培养液换成不含血清的单纯 MSCM 培养基继续培养, 24 h 之后将培养瓶中上层培养基吸出至离心管中, 1500 r/min, 离心 5 min, 取离心后上清液, 经 0.22 μ m 的无菌滤器过滤, -80 °C 保存备用。

1.2.3 细胞划痕实验 取两组 Cal-27 细胞接种于 6 孔板中培养, 待细胞铺满瓶底 90% 时用 10 μ L 枪头在孔中垂直划线, 吸掉培养基, 用磷酸缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗; 实验组 A: 加入 60% 条件培养基; 对照组 B: 加入等量的 MSCM 培养基; 两组培养基均含有 5% 胎牛血清, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 分别于 0、24、48 h 取

样拍照。实验重复 3 次。

1.2.4 体外细胞迁移实验 实验分 3 组, 每组设 3 个复孔, 将等量的 Cal-27 细胞接种于不含血清 Transwell 小室的上室中, A 组、B 组、C 组的下室中分别接种 HUC-MSCs 细胞悬液、Cal-27 细胞悬液、无细胞, 下室均含有 5% 胎牛血清; 将 24 孔板放置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养; 24 h 后取出 Transwell 小室, 吸弃并洗涤小室, 棉棒轻轻擦掉小室内的细胞; 甲醇固定 30 min, PBS 冲洗; 0.1% 结晶紫染色 20 min; PBS 冲洗, 显微镜下随机选 5 个视野, 拍照, 计数。实验重复 3 次。

1.2.5 体外细胞侵袭实验 基质胶准备: 将冻存于 -20 °C 的 matrigel 基质胶放于 4 °C 冰箱中过夜, 变成液态; 根据使用说明书进行铺胶, 放入 37 °C 培养箱中 6~8 h, 当出现“白色层”时, 说明已经变为固态; 其余实验步骤与 Transwell 迁移实验一致。

1.2.6 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测各组相关基因 mRNA 的表达 按照 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明提取实验组 (经条件培养基培养的 Cal-27 细胞) 和对照组 (正常培养的 Cal-27 细胞) 细胞的总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量, 在逆转录酶作用下合成 cDNA, 再进行 PCR 扩增反应, 以 β -actin 为内参。引物序列如下: MMP-9: F: 5'-GTACCACGGCCAAC-TACGAC-3', R: 5'-GCCTTGGAAAGATGAATG-GAA-3'; MMP-2: F: 5'-AAGTCTGGAGCGAT-GTGACC-3', R: 5'-GAGTCCGTCCTTACCGT-CAA-3'; β -actin: F: 5'-TCGTGCGTGACATTA-AGGAG-3', R: 5'-ATGCCAGGGTACATGGTA-AT-3'。PCR 反应条件: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环。荧光信号实时监测和数据分析由荧光定量 PCR 仪自动完成, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 mRNA 的相对表达水平。

1.2.7 Western blot 法检测目的蛋白的表达 使用细胞裂解液分别提取对数期的实验组 (经条件培养基培养的 Cal-27 细胞) 和对照组 (正常培养的 Cal-27 细胞) 细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 电泳, 蛋白转置硝酸纤维膜 (nitrocellulose, NC 膜), 用含 5% 的脱脂牛奶室温下封闭 2 h, 一抗 β -actin (1:200)、MMP-9 (1:1000)、MMP-2 (1:500) 孵育 4 °C 过夜, TBST 缓冲液洗涤, 二抗 (1:50000) 室温避光孵育 2 h。PBS 洗涤, 加入电化学发光溶液显色曝光。 β -actin 作为内参, 采集图像。

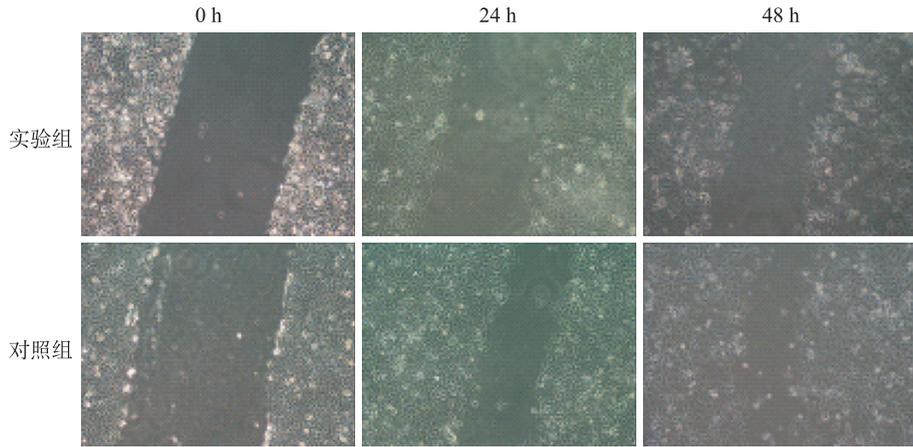


图 1 划痕实验结果(×200)
Fig. 1 Results of scratch test (×200).

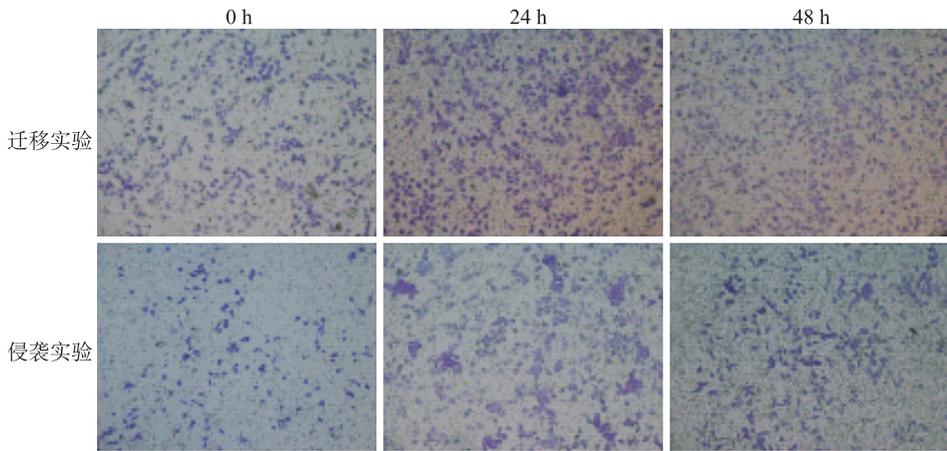


图 2 细胞迁移和侵袭实验结果(×100)
Fig. 2 Migration and invasion of Cal-27 cells (×200).

1.3 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果进行 *t* 检验及方差分析。Western blot 结果使用 BandScan 分析胶片灰度值进行灰度分析得到的相对表达量结果。

2 结果

2.1 细胞划痕实验 实验组中在 24 h、48 h 划痕之间的距离明显大于对照组中相应时间段的距离(图 1)。一定程度上说明 HUC-MSCs 能抑制 Cal-27 细胞的迁移。

2.2 Cal-27 细胞迁移和侵袭实验 未与 HUC-MSCs 共培养的 Cal-27 细胞迁移数目约是共培养后的 2 倍,侵袭细胞数目约为 2 倍(图 2,表 1),说明 HUC-MSCs 能抑制 Cal-27 细胞的迁移和侵袭。

2.3 RT-PCR 检测各组相关基因 mRNA 的表达结果 实验组中各基因的 mRNA 表达量与对照组相比显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

2.4 Western blot 检测 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的

表 1 共培养对 Cal-27 细胞侵袭和迁移的影响

Tab. 1 Statistical unit for the effect of co-culture on invasion and migration of Cal-27 cells $\bar{x} \pm s$

组别	细胞迁移实验	细胞侵袭实验
A 组	44.80 ± 3.70	18.60 ± 2.41
B 组	90.60 ± 2.61 *	43.60 ± 3.91 *
C 组	86.00 ± 5.10 *	40.80 ± 2.39 *

注:A 组:HUC-MSCs 与 Cal-27 共培养的实验组;B 组:Cal-27 细胞与 Cal-27 细胞共培养的对照组;C 组:只加等量培养基的空白对照组。与 A 组比较,* $P < 0.05$

表 2 各组相关基因的 mRNA 表达水平比较

Tab. 2 mRNA expression levels of each gene $\bar{x} \pm s$

组别	MMP-2	MMP-9
实验组	0.0016 ± 0.0003	0.0019 ± 0.0004
对照组	1.3686 ± 0.3435	0.9222 ± 0.2639
<i>t</i> 值	6.893	6.040
<i>P</i> 值	0.002	0.004

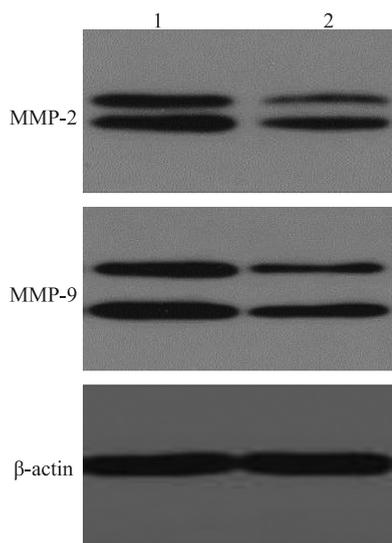
表达结果 经 60% 条件培养基作用的 Cal-27 细胞培养 24 h 后,侵袭和迁移相关蛋白 MMP-2 和

MMP-9 的相对表达量均下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3, 表 3。

表 3 条件培养基对 Cal-27 细胞相关蛋白表达的数据单位

Tab. 3 Statistical comparison of expression of Cal-27 related proteins in conditioned medium $\bar{x} \pm s$

组别	MMP-2	MMP-9
A 组	0.0997 ± 0.0032	0.3003 ± 0.0127
B 组	0.2370 ± 0.0050	0.4147 ± 0.0180
<i>t</i> 值	40.017	8.995
<i>P</i> 值	0.000	0.001



1: 经 HUC-MSCs 条件培养基作用的实验组; 2: 无 HUC-MSCs 条件培养基作用的对照组

图 3 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of MMP-2 and MMP-9.

3 讨论

肿瘤的侵袭、转移是由多种因子相互作用发生的结果, 本研究将 HUC-MSCs 与 Cal-27 细胞体外间接共培养, 观察其对 Cal-27 细胞迁移和侵袭的影响。实验方法包括细胞划痕实验、Transwell 迁移实验和侵袭实验、RT-PCR、Western blot 法。结果表明 HUC-MSCs 能抑制 Cal-27 细胞的迁移和侵袭。

越来越多的证据表明, 成体干细胞可能是治疗癌症的重要工具^[8,9]。MSCs 不仅通过细胞分化, 而且通过旁分泌效应分泌多种因子, 如趋化因子、生长因子和细胞因子, 在修复受伤组织中发挥着重要作用^[10]。已经证实, MSCs 可以将分泌的各种因子转入培养基中^[11], 由此推测间接共培养过程中 HUC-MSCs 分泌的各种因子对 Cal-27 细胞的迁移和侵袭产生抑制作用, 具体作用因子及作用机制有待研究。

为了进一步验证这一抑制作用, 本文从基因和蛋白两个方面进行研究。口腔舌癌浸润和转移的一个关键步骤是上皮与固有层之间基底膜的降解, 癌巢周围及周围血管结构的降解^[12]。高水平的蛋白酶甚至延伸到基底膜, 是肿瘤侵袭的一个关键阶段^[13]。高水平的蛋白酶促进基底膜和细胞外基质的降解, 从而提供使肿瘤细胞迁移和转移到血管和淋巴系统的通道^[14]。MMPs 在肿瘤的生长、侵袭、转移和血管生成过程中均有表达^[15], 其中 MMP-2 和 MMP-9 也称 IV 型胶原酶^[16], 是基质溶解的重要调节因子, 在肿瘤的转移过程中起重要的作用^[17]。MMP-2 与肿瘤的侵袭和淋巴转移有关, 而 MMP-9 则通过激活特定的生长因子形成的, 是新生血管的调控者^[18]。

研究报告, MMP-2 和 MMP-9 在肿瘤细胞迁移、逃避宿主免疫监视和肿瘤生长中起着重要的作用, 其表达与局部复发和转移性复发的发生以及患者的生存有一定的相关性。本研究结果发现实验组中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 和蛋白的表达量均下调。表明实验组中 Cal-27 细胞的迁移和侵袭受到抑制, MMP-2 基因和 MMP-9 基因参与了这一过程, HUC-MSCs 对 Cal-27 细胞的迁移和侵袭具有一定程度的抑制作用。

综上所述, 本研究结果表明 HUC-MSCs 对 Cal-27 细胞的侵袭和迁移产生抑制作用, 可能成为新的抗舌癌浸润转移的治疗靶点, 其具体途径和机制需要进一步研究, 为我们进一步的研究提供新的思路。

参考文献

- [1] 蒋芳艳, 王瑜, 陈吉荣, 等. 转录因子 XBP1 在口腔鳞状细胞癌中的表达[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(2): 139-142.
- [2] Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L, et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma [J]. J Pathol, 2015, 236(4): 505-516.
- [3] Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, et al. Metastasis from oral cancer: an overview [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2012, 9(5): 329-335.
- [4] Patel SG, Amit M, Yen TC, et al. Lymph node density in oral cavity cancer: results of the International Consortium for Outcomes Research [J]. Br J Cancer, 2013, 109(8): 2087-2095.
- [5] Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective [J]. Biosci Rep, 2015, 35(2): e00191.
- [6] 高政军, 李金荣. 舌癌中原癌/抑癌基因及凋亡/应激反应相关基因的表达谱研究[J]. 口腔医学研究, 2009, 25(1): 44-47.

- [7] Ghaedi M, Soleimani M, Taghvaie NM, et al. Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted delivery of anti-angiogenic protein to solid tumors [J]. *J Gene Med*, 2011, 13(3):171-180.
- [8] Di GH, Jiang S, Li FQ, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells mitigate chemotherapy-associated tissue injury in a pre-clinical mouse model [J]. *Cytotherapy*, 2012, 14(4):412-422.
- [9] Xi Z. Human-derived normal mesenchymal stem/stromal cells in anticancer therapies [J]. *J Cancer*, 2017, 8(1):85-96.
- [10] Ebrahim N, Mostafa O, Dosoky REE, et al. Human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles/estrogen combined therapy safely ameliorates experimentally induced intrauterine adhesions in a female rat model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):175.
- [11] Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(1):11-15.
- [12] Garamszegi N, Garamszegi SP, Samavarchi-Tehrani P, et al. Extracellular matrix-induced transforming growth factor-beta receptor signaling dynamics [J]. *Oncogene*, 2010, 29(16):2368-2380.
- [13] Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(11):560-574.
- [14] Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views [J]. *J Pathol*, 2010, 214(3):283-293.
- [15] Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell*, 2010, 141(1):52-67.
- [16] Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(6):415-433.
- [17] Liotta LA, Steeg PS, Stetlerstevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation [J]. *Cell*, 1991, 64(2):327-336.
- [18] Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cell [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1755(1):37-69.

[收稿日期:2018-09-21]

(本文编辑 关隽)

欢迎订阅 2019 年《医药导报》杂志

《医药导报》杂志系中国药理学会、华中科技大学同济医学院附属同济医院联合主办的医药专业期刊,国内外公开发行人。是国家科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。被美国《化学文摘》(CA)、《国际药学文摘》(IPA)、《乌利希期刊指南》和《WHO 西太平洋地区医学索引》收录。还被万方数据库、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库等国内多家大型数据库收录。设有“特约稿”“药物研究”“药物与临床”“药学进展”“药物制剂与药品质量控制”“用药指南”“新药介绍”“临床药师交流园地”“药物不良反应”“药事管理”“世界新药信息”“作者·编者·读者”等栏目,每期组编某类药物或某类疾病的药物治疗专栏。读者对象是临床医师、药师、医药院校师生和医药研究所、药品检验所的科技工作者及药品监督管理、医药工商企业经营者。

《医药导报》1982 年创刊,始终坚持刊物的科学性、实用性、信息性,以普及、运用、服务为宗旨,着重报道国内外医药研究新成果、新技术、新方法,关注药物临床疗效和不良反应,指导临床合理用药,重视药品质量控制,宣传最新医药政策法规,在医药科研、生产、经营、使用间发挥纽带和桥梁作用。该刊已于 2006 年 7 月开通网站(<http://www.yydbzz.com>),作者、读者可通过网站首页作者投稿系统和作者查稿系统实现在线投稿、查稿,通过过刊浏览栏目免费阅读和下载《医药导报》过刊文章,通过新闻公告栏目了解国内外最新医药动态和编辑部有关信息,通过编读往来栏目与编者互动交流。2016 年 1 月 1 日,《医药导报》微信公众平台正式开通运营,微信公众号亦可以实现上述功能,操作更方便快捷。

《医药导报》杂志月刊,每月 1 日出版,2019 年每期 25.00 元,全年 300.00 元(含邮资),欢迎广大读者积极到当地邮局订阅,如错过邮局订阅时间,可随时向该刊编辑部邮订。地址:武汉市蔡甸区中法生态城同济医院专家社区 C 栋平层《医药导报》编辑部,邮政编码:430199,E-mail: yydbzz@163.com。电话及传真:(027)69378382,69378383,69378384。国内总发行:湖北省邮政报刊发行局。邮发代号 38-173。全国各地邮局均可订阅。国内统一刊号:CN42-1293/R,国际标准出版物号:ISSN1004-0781。广告发布登记号:鄂工商广登[2017]28 号。欢迎广大作者、读者踊跃投稿。