

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.011

· 基础研究 ·

骨髓间充质干细胞体内外对胃癌细胞的趋向性

祝荫¹, 程明², 谢勇³, 陈江³, 罗时文³, 张焜和³, 吕农华^{1,3} (1. 南昌大学第一附属医院消化科, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院骨科, 江西 南昌 330006; 3. 南昌大学第一附属医院消化系疾病研究所, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的: 探讨人骨髓间充质干细胞(human bone marrow-derived mesenchymal stem cell, hBMSC)对胃癌细胞的趋化性, 为将MSC研发成为胃癌基因治疗载体提供实验依据。方法: 骨髓培养法分离培养hBMSC并进行流式细胞术鉴定。Transwell实验检测hBMSC对胃癌MKN45细胞和人成纤维细胞(human fibroblast, hFB)的趋化能力。建立MKN45细胞裸鼠移植瘤模型, 感染Lenti-EGFP(MOI为50)的hBMSC或hFB细胞经尾静脉注射入荷瘤小鼠, 荧光显微镜下观察移植瘤组织及各脏器GFP的表达。结果: 培养第3代的hBMSC细胞CD44、CD105阳性率为(96.7 ± 1.84)%、(98.1 ± 0.95)%, 而CD34、CD45表达阴性。hBMSC细胞向MKN45细胞的趋化能力明显强于胃上皮细胞GES-1组及空白对照细胞[(239.5 ± 54.3) vs (43.57 ± 4.6)、(37.3 ± 4.7)个, $P < 0.01$], 且hBMSC向MKN45细胞的趋化能力明显强于hFB细胞向MKN45细胞的趋化能力[(239.5 ± 54.3) vs (27.7 ± 16.7), $P < 0.01$]。与hFB相比, hBMSC对胃癌移植瘤组织具有明显趋向性; hBMSC组移植瘤组织内可见GFP表达, 移植瘤小鼠部分肝脏(20%)及肺脏(20%)有GFP表达, 但较移植瘤组织内GFP表达率和强度均低($P < 0.05$)。结论: hBMSC在体内外对胃癌细胞均有特异性趋化作用, 有望研发为胃癌基因治疗的良好载体。

[关键词] 胃癌; 间充质干细胞; 细胞载体; 趋化作用

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0647-06

Chemotaxis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to gastric cancer cells *in vivo* and *in vitro*

ZHU Yin¹, CHENG Ming², XIE Yong³, CHEN Jiang³, LUO Shi-wen³, ZHANG Kun-he³, LÜ Nong-hua^{1,3} (1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China; 2. Department of Osteology, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China; 3. Institute of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the tropism of human bone-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) to gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* and to provide evidence for MSC as the vehicle for gene therapy of gastric cancer.

Methods: hBMSCs were isolated and cultured using bone marrow plating method, and identified by flow cytometry. Migration abilities of hBMSCs to gastric cancer MKN45 cells and human fibroblast (hFB) cells were examined by Transwell assay. the tumor nude mice model transplanted by MKN45 cells was established. And Lenti-EGFP infected-hBMSC or hFB (MOI = 50) cells were subcutaneously injected into tumor-bearing mice, then GFP expression in transplanted tumors and different organs were observed under a fluorescence microscope. **Results:** The positive expression rates of CD44 and CD105 in the third passage hBMSC were (96.7 ± 1.84)% and (98.1 ± 0.95)% respectively, while CD34 and CD45 were negatively expressed. Chemotaxis of hBMSC to MKN45 cells was significantly higher than that to gastric epithelial GES-1 cells (239.5 ± 54.3 vs 43.57 ± 4.6, 37.3 ± 4.7; $P < 0.01$), and chemotaxis of hBMSC to MKN45 cells was sig-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81060198);江西省教育厅项目(No. GJJ09429);江西省科技厅项目(No. 2010BSA12800)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81060198), the Foundation from Education Bureau of Jiangxi Province(No. GJJ09429), and the Foundation from Science and Technology Bureau of Jiangxi Province(No. 2010BSA12800)

[作者简介] 祝荫(1977-),女,江西省景德镇市人,博士,副主任医师,主要从事胃癌发病机制及治疗方面的研究工作。E-mail: zhuyin27@sina.com.cn

[通信作者] 吕农华(LV Nong-hua, corresponding author), E-mail: lunonghua@163.com

nificantly higher than that of hFB cells ($P > 0.05$). hBMSC migrating to MKN45 were significantly higher than hFB (239.5 ± 54.3 vs 27.7 ± 16.7 , $P < 0.01$). Compared with hFB cells, hBMSC showed obvious chemotaxis to gastric transplanted tumor tissues; in hBMSC group, GFP was highly expressed in transplanted tumor tissues, as well as in liver (20%) and lung tissues (20%), but the later were significantly lower than that in transplanted tumor tissues ($P < 0.05$). **Conclusion:** The chemotaxis of hBMSC to gastric cancer is obvious and specific, and hBMSC may be a good vehicle for gene therapy of gastric cancer.

[**Key words**] gastric cancer; mesenchymal stem cell; cell vehicle; chemotaxis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 647-652]

虽然近几十年多数国家胃癌发病率有所下降,但胃癌仍是全世界第二常见肿瘤,是世界上第二大癌症死因(每年约 700 000 患者病死),其中 42% 新增病例在中国^[1]。尽管早期胃癌的治疗效果较为乐观,但对进展期胃癌而言,大多有淋巴和血行转移,相当一部分患者确诊时已失去手术时机,化疗及综合治疗的疗效欠佳。因此,有必要探索新的治疗方法。肿瘤基因治疗是目前的研究热点,基因治疗成功的关键之一在于有效载体的选择。目前常用的病毒、脂质体等载体靶向性不佳,限制了其临床应用。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是具有多向分化潜能的非造血干细胞,在一定条件下具有分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞等的功能。近期,针对脑胶质瘤、胰腺癌、转移性肺癌的多项研究^[2-4]显示, MSC 具有趋瘤性,具有向原发及转移肿瘤灶趋化的能力。本研究探讨人骨髓间充质干细胞(human bone mesenchymal stem cell, hBMSC)对胃癌细胞的趋向性,为将 MSC 研发为胃癌基因治疗载体提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胃癌细胞株 MKN45 由第四军医大学西京消化病医院吴开春教授惠赠,人成纤维细胞(human fibroblast, hFB)由南昌大学第一附属医院烧伤研究所廖立新博士惠赠,胃上皮细胞株 GES-1 由本实验室保存。BALB/c(nu/nu)裸鼠,雌性,6~8 周龄,19~25 g, SPF 级(无特定病原体),由国家啮齿类种子中心(中国药品生物制品检验所实验动物中心)提供[实验动物合格证号: SCXK(京)2005-004]。实验动物在江西省药物研究所 SPF 条件下饲养。

高糖 DMEM 培养基、低糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 优等胎牛血清购自 Hyclone 公司, 胰蛋白酶、EDTA、Polybrene 购自 Sigma 公司, PE 标记的小鼠抗人 CD34、PerCP 标记的小鼠抗人 CD45 购自 Becton Dickinson 公司, PE 标记的小鼠抗人 CD44、

CD105 抗体购自 eBioscience 公司。携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced Green fluorescent protein, EGFP)的慢病毒(Lenti-EGFP)购自上海吉凯基因化学有限公司。Transwell 共培养体系(8 μ m 孔径)购自美国 Corning 公司。

1.2 hBMSC 的分离、培养及鉴定

经患者知情同意,自男性 28 岁股骨闭合性骨折患者行切开复位内固定术时取股骨骨髓 3 ml, 肝素抗凝。采用直接贴壁法,骨髓经低糖 DMEM 等量稀释混匀后 350 \times g 离心 15 min, 2 次,离心后沉淀加入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% 湿度的孵育箱内培养, 72 h 后换培养基, 弃掉未贴壁细胞,以后每 2~3 d 换液 1 次。待细胞达 80% 融合时,用 0.125% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化,第 3~6 代用于实验。流式细胞仪检测 CD34、CD44、CD45 及 CD105 的表达,鉴定 hBMSC。

1.3 建立 EGFP 标记的 hBMSC 及 hFB 细胞

取对数生长期的 hBMSC 及 hFB,用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养基调整细胞密度至 $8 \times 10^3/\text{cm}^2$,种植于培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养。24 h 后吸去培养液,按 MOI=50 加入相应体积的慢病毒颗粒(Lenti-EGFP),同时补充 5 μ g/ml 的 Polybrene 及完全培养基;10 h 后,换为 10% FBS 的 L-DMEM 培养基继续培养,病毒感染 24~72 h,用荧光显微镜观察 EGFP 表达,流式细胞仪检测转染效率。

1.4 胃癌 MKN45 细胞皮下移植瘤模型的建立

用速眠新 846 合剂按 0.5 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉裸鼠^[5]。取对数生长期 MKN45 细胞用胰酶消化,用 PBS 制成单细胞悬液,将 0.2 ml(含 4×10^6 个细胞)细胞悬液接种于裸鼠右侧腋窝中部外侧皮下。当原代皮下移植瘤长至直径约 1 cm 时,在无菌条件下颈椎脱臼法处死裸鼠。75% 酒精消毒裸鼠皮肤后,用无菌眼科剪、眼科镊剥离皮下肿瘤,将其剪成 2 mm \times 2 mm \times 2 mm 瘤组织块接种于裸鼠右侧腋窝中部外侧皮下,缝合切口,将裸鼠放回层流架中定期观察。

1.5 Transwell 实验检测 hBMSC 向胃癌细胞的趋化

分别取生长状态良好的 MKN45、GES-1 细胞,胰蛋白酶消化后, 1.5×10^5 /孔接种于 24 孔板,培养过夜,同时设置仅加培养基的空白对照组。第 2 天,将细胞换液为无血清的培养液,将其置入 Transwell 的上室中,分别取生长状态良好的 hBMSC、hFB 细胞,用 0.125% 的胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化后,用无血清的 L-DMEM 培养基重悬,调整细胞密度,分别将含 hBMSC、hFB 细胞悬液加入 Transwell 上室,每孔 4×10^4 个细胞。放入 37℃、5% CO₂、95% 湿度的孵箱继续培养,24 h 后取出 Transwell 上室,用 PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 10 min。PBS 冲洗后用棉签轻轻将上室膜内侧细胞擦去,结晶紫室温染色 5 min, PBS 洗 2 次,光镜下(×100)观察结果,随机选取 5 个视野计数,取细胞平均值。

1.6 hBMSC 向胃癌移植瘤组织的趋化实验

取 15 只 BALB/c (nu/nu) 裸鼠,雌性,6~8 周,体重 15~23 g,用第 2 代皮下移植瘤组织块接种至裸鼠右侧腋窝中部外侧皮下。当皮下移植瘤长径约 1.5 cm 时,随机分为 3 组,分别将转染了 Lenti-EGFP 的 hBMSC、hFB 重悬于 PBS 中,调整密度为 1.5×10^7 /ml,每只裸鼠尾静脉注 0.2 ml 细胞悬液,同时设置直接注射 Lenti-EGFP 的对照组。具体分为 hBMSC、hFB 和 Lenti-EGFP(1.5×10^8 U/ml) 3 组。将裸鼠放回层流架中定期观察精神状态、活动及饮食、饮水情况。1 周后颈椎脱臼法处死裸鼠,取出瘤体、心、肝、脾、肺、肾, -80℃ 保存。瘤体及器官组织行冰冻切片,15 μm 厚度,甘油封片,荧光显微镜下观察荧光表达情况。

1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据统计用 SSPS13.0

软件,采用单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMSC 形态观察及表型鉴定结果

骨髓培养后 72 h,可见散在贴壁梭形或多角形细胞,分布不均;6~10 d 后细胞逐渐增多,呈巢状生长,形成细胞集落;10~14 d 细胞逐渐汇集成片、融合,可以传代。第 3 代后细胞均匀良好。流式细胞术检测第 3 代 hBMSC 中 CD44、CD105 的阳性率为 $(96.7 \pm 1.84)\%$ 、 $(98.1 \pm 0.95)\%$ (图 1), CD34、CD45 表达阴性,可见第 3 代 hBMSC 纯度很高。

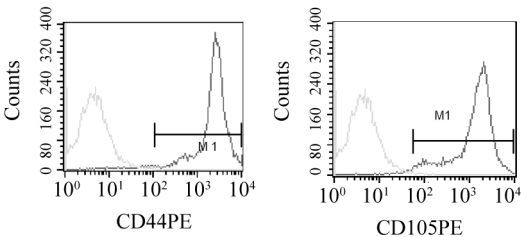


图 1 流式细胞术检测第 3 代 hBMSC 中 CD44、CD105 的表达
Fig.1 Expression of CD44 and CD105 in the third passage hBMSC as detected by flow cytometry

2.2 慢病毒载体介导 EGFP 转染 hBMSC 及 hFB

MOI = 50 时, Lenti-EGFP 转染 24 h 后,激光共聚焦显微镜下即可见, hBMSC、hFB 中有大量荧光表达,分布于胞质及胞核,随着时间延长,荧光表达略增多、增强(图 2)。流式细胞仪检测转染率,结果(图 3)显示, MOI = 50 时转染率均很高, hBMSC 为 96.5%, hFB 为 95.1%。

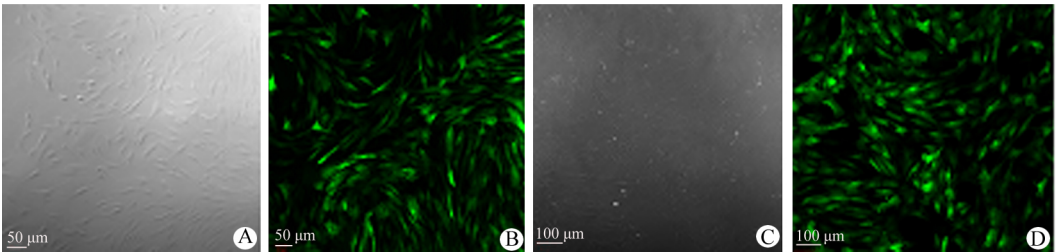


图 2 Lenti-EGFP 感染 hBMSC 表达 EGFP
Fig.2 Expression of EGFP in hBMSC infected with Lenti-EGFP
A, C: Under light microscope; B, D: Under fluorescence microscope; A, B: 24 h; C, D: 72 h

2.3 hBMSC 体外向胃癌细胞的趋化

转染后的 hBMSC 与 MKN45 细胞体外共培养结

果(图 4、5)显示,在 Transwell 共培养体系上室培养 hBMSC 的各组中,趋化至膜对侧的 hBMSC 细胞数

在下室培养 MKN45 细胞、GES-1 细胞、空白对照组中分别为(239.5 ± 54.3)、(43.57 ± 4.6)、(37.3 ± 4.7)个。在 MKN45 细胞组趋化至膜对侧的 hBMSC 细胞数明显高于 GES-1 细胞组及空白对照组($P < 0.01$), GES-1 细胞组与空白对照组无明显差异($P > 0.05$)。上室培养 hFB 的各组中,趋化至膜对

侧的 hFB 细胞数在下室培养 MKN45、GES-1、空白对照组分别为(27.7 ± 16.7)、(16.4 ± 5.1)、(19.1 ± 6.2)个(图 5, $P > 0.05$)。由此提示在体外, hBMSC 对胃癌 MKN45 细胞有明显趋向性, 而 hFB 不具有此特性; hBMSC 对胃上皮 GES-1 细胞无明显趋向性, 相对于 hFB 细胞, hBMSC 主动趋化能力较强。

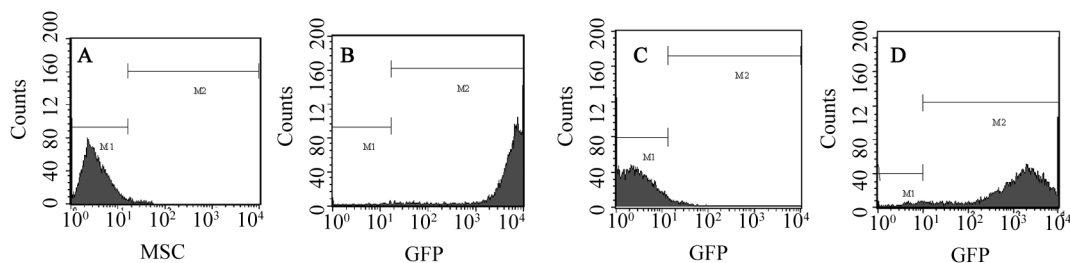


图 3 流式细胞术检测 hBMSC、hFB 中 Lenti-EGFP 的转染效率

Fig. 3 Infection efficiency of Lenti-EGFP in hBMSC and hFB as detected by flow cytometry

A: hBMSC control; C: hFB control; B: hBMSC infected with Lenti-EGFP; D: hFB infected with Lenti-EGFP

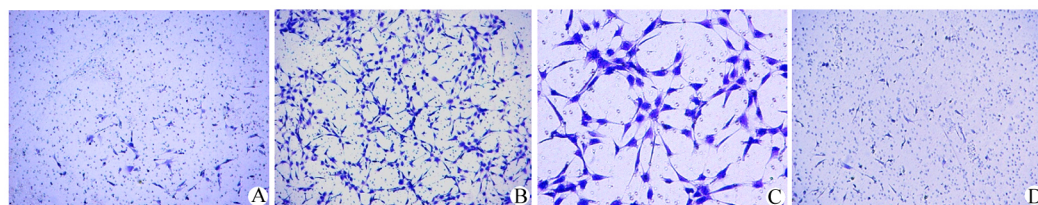


图 4 Transwell 实验检测 hBMSC 向胃癌细胞的趋化

Fig. 4 Chemotaxis of hBMSC to gastric cancer cells as detected by Transwell assay

A: Control ($\times 40$); B: MKN45 cells ($\times 40$); C: MKN45 cells ($\times 100$); D: GES-1 cells ($\times 40$)

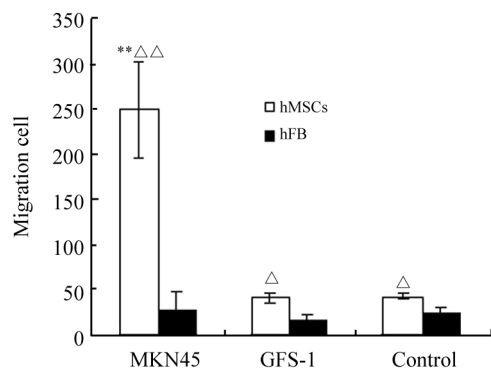


图 5 Transwell 实验检测 hBMSC 向胃癌细胞的趋化

Fig. 5 Chemotaxis of hBMSC to gastric cancer cells as detected by Transwell assay

* $P < 0.01$ vs GES-1 and control groups;

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs hFB group

2.4 hBMSC 向胃癌移植瘤组织的趋化能力

将携带 EGFP 的 hBMSC 通过尾静脉注射入胃癌 MKN45 细胞皮下移植瘤裸鼠, 观察 hBMSC 在体内向胃癌皮下移植瘤组织趋化的情况。结果显示, 注射 hBMSC 的 5 只裸鼠, 移植瘤体内均可见散在绿色荧光; 而注射 hFB 的裸鼠, 瘤体内未见绿色荧光。注射 Lenti-EGFP 的 5 只裸鼠, 仅有 1 例瘤体内可见散在荧光。由此可见, 与 hFB 及 Lenti-GFP 相比, hBMSC 对胃癌移植瘤组织具有明显趋向性。同时观察注射 hBMSC 组裸鼠心、肝、脾、肺、肾冰冻切片 GFP 的表达情况, 结果显示, 1 例肝脏 (20%) 及 1 例肺 (20%) 有散在荧光, 但显著低于移植瘤组织内的荧光表达率和强度 ($P < 0.05$)。心、肾、脾中未见 GFP 表达 ($P < 0.01$), 提示 hBMSC 在裸鼠体内对胃

癌移植瘤组织的趋向具有特异性。

3 讨论

MSC 在机体内可主动募集至炎症或受损部位以修复受损组织,随着研究的深入,MSC 治疗心肌梗死^[6]、急性移植排斥反应^[7]、肝硬化^[8]等疾病的临床试验报道日益增多,因此,MSC 被认为是组织工程的理想种子细胞。早在 1986 年,Dvorak 等^[9]提出“肿瘤是体内永远不愈的伤口”,肿瘤细胞可持续产生细胞因子、炎症趋化因子、化学因子等炎症介质。那么,MSC 是否会像趋向炎症部位一样趋向肿瘤病灶呢?许多研究提示,MSC 在体内具有向肿瘤原发及转移病灶趋化的特性^[10-13],并且以 MSC 为载体,携带 IL-12、胞嘧啶脱氨酶、溶瘤病毒对多种肿瘤有明显治疗效果^[14-17],但目前 MSC 对胃癌的趋向性少有研究报道。

本研究通过 Transwell 共培养体系探讨 hBMSC 在体外对胃癌 MKN45 细胞的趋向性,结果显示,在胃癌 MKN45 细胞组趋化至膜对侧的 hBMSC 细胞数明显高于胃上皮 GES-1 细胞组及空白对照组 ($P < 0.01$),提示 hBMSC 在体外对胃癌细胞有明显的趋向性,而对胃上皮细胞无明显趋向性。上室培养 hFB 的各组中,趋化至膜对侧的 hFB 细胞数在下室培养 MKN45、GES-1、空培养基 3 组间均无显著差异 ($P > 0.05$),表明 hFB 对胃癌细胞无明显特异性趋向性。在下室的 MKN45、GES-1、空培养基 3 组中,上室 hBMSC 组趋化至膜对侧细胞数均明显高于上室 hFB 组 ($P < 0.05$),提示相对于 hFB 细胞,hBMSC 主动趋化运动能力更强。

本研究用慢病毒载体将 EGFP 转染入分离纯化的 hBMSC,EGFP 可长期稳定表达,将 EGFP 做为示踪剂通过荧光显微镜直接观察 hBMSC 在体内向胃癌移植瘤组织趋化趋化的情况。实验中将携带 EGFP 的 hBMSC 通过尾静脉注射入荷胃癌移植瘤裸鼠体内,7 d 后处死裸鼠,将瘤组织行冰冻切片,在荧光显微镜下观察 EGFP 表达情况。结果显示,注射 hBMSC 的裸鼠,移植瘤组织内均可见散在绿色荧光,而注射 hFB 的裸鼠,移植瘤组织内未见绿色荧光 ($P < 0.01$),提示与 hFB 相比,hBMSC 对胃癌移植瘤组织具有明显趋向性。选择 hFB 为对照细胞是因为 MCS 最初发现时是描述为成纤维细胞样细胞,同时 hFB 在形态上与 MCS 相似^[18]。体内外研究均显示,hFB 对胃癌细胞无趋向性,提示不是所有人体细胞都能定位于人胃癌病灶,hBMSC 对裸鼠胃癌移植瘤的趋向性并不是因为在裸鼠体内胃癌细胞

与人 MSC 起源相同导致的相互作用,而是因为 hBMSC 向肿瘤病灶主动趋化的结果。这与 Nakamizo 等^[19]研究 hBMSC 对脑胶质瘤趋向性的结果相一致。

本研究同时观察了注射 hBMSC 组裸鼠心、肝、脾、肺、肾冰冻切片 GFP 的表达情况,结果显示,仅 1 只裸鼠的肝脏(20%)及另 1 只裸鼠的肺(20%)有散在荧光,心、肾、脾中均未见 GFP 表达,与移植瘤组织内荧光表达率相比明显降低 ($P < 0.01$),表明 hBMSC 在裸鼠体内对胃癌移植瘤组织的趋向具有特异性。Kucerova 等^[20]研究了人脂肪起源的间充质干细胞(adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells,AT-MSC)对裸鼠体内人结肠癌的趋瘤性,发现尾静脉注射 AT-MSC 后 9 d,除了肿瘤病灶外,部分裸鼠的肺及肝脏中有少量 AT-MSC 定植;20 d 后肿瘤病灶仍有 AT-MSC 定植,但肺、肝脏、脾、肾、肌肉中均无 AT-MSC 定植。本研究中注射 Lenti-GFP 后有 1 只裸鼠移植瘤组织内可见绿色荧光,表明慢病毒可随静脉血流至部分肿瘤病灶,但无特异性,提示与目前基因治疗常用的慢病毒载体相比,hBMSC 对胃癌组织具有更明显的趋向性。

总之,hBMSC 对胃癌组织细胞具有明显的趋向性,且具有特异性,本研究为将 hBMSC 研发为基因治疗载体靶向胃癌治疗提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Doucette T, Rao G, Yang Y, et al. Mesenchymal stem cells display tumor-specific tropism in an RCAS/Ntv-a glioma model [J]. Neoplasia, 2011, 13(8): 716-725.
- [3] Kallifatidis G, Beckermann BM, Groth A, et al. Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer [J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(4): 231-240.
- [4] Loebinger MR, Eddaoudi A, Davies D, et al. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer [J]. Cancer Res, 2009, 69(10): 4134-4142.
- [5] 何国平,褚芳,孙玉芳,等.两种人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(5): 328-330.
- [6] Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(24): 2277-2286.
- [7] Le Blanc K, Frasson F, Ball L, et al. Developmental committee of the european group for blood and marrow transplantation. Mes-

- enchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: A phase II study [J]. *Lancet*, 2008, 371 (9624): 1579-1586.
- [8] Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10):1199-1205.
- [9] Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing [J]. *N Engl J Med*, 1986, 315: 1650-1659.
- [10] 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.
- [11] Seo SH, Kim KS, Park SH, et al. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(5): 488-495.
- [12] Park SA, Ryu CH, Kim SM, et al. CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(1): 97-103.
- [13] Gao Y, Yao A, Zhang W, et al. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *Oncogene*, 2010, 29(19): 2784-2794.
- [14] Duan X, Guan H, Cao Y, Kleinerman ES. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into ewing sarcoma tumors [J]. *Cancer*, 2009, 115(1): 13-22.
- [15] Cavarretta IT, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(1): 223-231.
- [16] You MH, Kim WJ, Shim W, et al. Cytosine deaminase-producing human mesenchymal stem cells mediate an antitumor effect in a mouse xenograft model [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(8): 1393-1400.
- [17] García-Castro J, Alemany R, Cascalló M, et al. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: An exploratory study [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(7): 476-483.
- [18] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *In vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers [J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20(3): 263-272.
- [19] Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3307-3318.
- [20] Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, et al. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13): 6304-6313.
- [收稿日期] 2011-08-20 [修回日期] 2011-09-26
[本文编辑] 王莹

· 科技动态 ·

P53 诱导产生的长链非编码 RNA 参与 P53 下游靶基因的广泛抑制

P53 是一个重要的肿瘤抑制基因,当细胞受到损伤时,P53 会引起 DNA 修复、细胞周期阻滞或细胞凋亡等生物学效应,从而维持细胞基因的完整性,但 P53 抑制其下游基因的分子机制尚不清楚。论文作者通过长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lincRNA)来阐述 P53 是如何参与其下游基因的广泛抑制。

目前在哺乳动物基因组中发现了 1 000 多个 lincRNA,这些 lincRNA 进化非常保守,推测其在多种生物学过程中发挥重要作用。作者通过 2 个缺失内源性 P53 基因的实验体系(小鼠胚胎成纤维细胞和肺癌细胞)发现 11 个 lincRNA 的转录活化依赖于 P53。基因芯片结果显示,干扰 lincRNA-p21 后会使原本被 P53 抑制的几百个目的基因活化,证明 lincRNA-p21 在 P53 依赖的基因转录中发挥抑制子的作用。LincRNA-p21 干扰后能增强细胞的存活,但对细胞周期无影响;相反,过表达 lincRNA-p21 后会减弱细胞的存活,促进细胞凋亡。通过生物素标记的 lincRNA-p21 进行 RNA pull down 实验,经质谱鉴定 lincRNA-p21 结合的蛋白为不均一核蛋白 K(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, hnRNP-K),并且发现 lincRNA-p21 5'端的 778 个核苷酸能与 hnRNP-K 结合。相对于全长 lincRNA-p21 序列,过表达 5'端结合序列不能有效地诱导细胞凋亡。干扰 hnRNP-K 后发现,原本被 P53 和 lincRNA-p21 共同抑制的基因发生脱阻抑,证明 hnRNP-K 参与了 P53 和 lincRNA-p21 对下游基因的抑制作用。同时还发现, hnRNP-K 能与绝大部分靶基因的启动子区域结合,当干扰了 lincRNA-p21 后, hnRNP-K 失去了与靶基因启动子结合的能力,因此, lincRNA-p21 介导了 hnRNP-K 与靶基因启动子区域的结合。

综上所述,当细胞 DNA 受到损伤时,P53 能结合到 lincRNA-p21 的启动子区域,活化转录 lincRNA-p21, lincRNA-p21 与 hnRNP-K 结合后能特异性地结合到靶基因的启动子上,导致靶基因的转录受阻,引起细胞凋亡,维持细胞基因组的完整性。

[郑青亮 摘译,侯晋 审阅. Huarte M, Guttman M, Feldser D, et al. *Cell*, 2010, 142(3): 409-419.]