

脂肪间质干细胞通过SDF-1促进胰腺癌细胞增殖、侵袭的体外研究

俞富祥¹ 宋才鑫¹ 吴志伟¹ 朱千东¹ 季世强² 张启瑜^{1*}

(¹浙江省温州医科大学附属第一医院肝胆胰外科, 温州 325000;

²上海第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外一科, 上海 200438)

摘要 探讨脂肪间质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)对胰腺癌(pancreatic cancer, PaCa)细胞增殖、侵袭的影响及其产生作用的原因。从腹腔脂肪分离纯化培养ADSCs, 通过半透膜在6孔塑料培养板上建立PaCa细胞与ADSCs的双层培养体系, 单独培养的PaCa细胞作为对照。通过CCK-8比色法检测ADSCs对PaCa细胞增殖的影响; ELISA法测定培养液中基质细胞源性因子-1(SDF-1)的浓度; RT-PCR法测定PaCa细胞及ADSCs中CXCR4的表达; 评估测定SDF-1对PaCa细胞增殖的影响; AMD3100对ADSCs与PaCa细胞共培养的影响。结果显示, ADSCs可促进PaCa细胞的增殖与侵袭; SDF-1在ADSCs中高表达而在PaCa细胞几乎不表达; 相反, CXCR4 mRNA在PaCa细胞中高表达, 而在ADSCs中低表达; SDF-1对PaCa的促增殖作用呈浓度依赖性; AMD3100能降低ADSCs对PaCa活性的影响。ADSCs具有促进PaCa细胞增殖及侵袭的潜能, 这种作用可能与SDF-1/CXCR4轴有关。

关键词 脂肪间质干细胞; 胰腺癌; 增殖; 侵袭; SDF-1

Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Promoted the Proliferation and Invasion of Pancreatic Cancer Cells by SDF-1 *in Vitro*

Yu Fuxiang¹, Song Caixin¹, Wu Zhiwei¹, Zhu Qiangdong¹, Ji Shiqiang², Zhang Qiyu^{1*}

(¹Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; ²Department of Liver Surgery I, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract The aim was to explore the effects of adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) on the proliferation and invasion of pancreatic cancer (PaCa) cells *in vitro* and the possible mechanism involved. ADSCs were isolated and co-cultured with PaCa cells. CCK-8 assay was used to detect the proliferation of PaCa cells. An ELISA was used to determine the concentration of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) in the supernatants. RT-PCR was performed to detect the expression of *SDF-1* and *CXCR4* in PaCa cells and ADSCs. The proliferation of PaCa cells by SDF-1 was measured. AMD3100 regulated the activity of PaCa cells after co-culture of ADSCs and PaCa. ADSCs could promote the proliferation and invasion of PaCa cells; The expression of SDF-1 was high in ADSCs, but not in PaCa cells. On the contrary, Higher *CXCR4* mRNA levels were detected in the PaCa cells compared to

收稿日期: 2013-05-06 接受日期: 2013-06-28

浙江省重中之重外科学组项目(批准号: 浙教高科2008-255)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-55579453, E-mail: zqy80@163.com

Received: May 6, 2013 Accepted: June 28, 2013

This work was supported by Zhejiang Province Key Surgery Projects (Grant No. Zhejiang High-Tech 2008-255)

*Corresponding author. Tel: +86-577-55579453, E-mail: zqy80@163.com

网络出版时间: 2013-08-26 14:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130826.1437.001.html>

ADSCs. The promotion of SDF-1 on PaCa cells depended on the concentration of SDF-1; AMD3100 significantly downregulated these growth-promoting effects of ADSCs on PaCa cells. ADSCs could promote the proliferation and invasion of PaCa cells, which might involve the SDF-1/CXCR4 axis.

Key words adipose tissue-derived stem cells; pancreatic cancer; proliferation; invasion; SDF-1

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类来源于中胚层的多能干细胞,它们主要存在于结缔组织和器官间质中,在体外能快速扩增,能表达或分泌多种细胞因子。很多研究显示, MSCs作为肿瘤微环境的组分之一,可通过一系列细胞因子与肿瘤细胞互相作用,影响肿瘤细胞增殖,调控机体免疫反应,参与肿瘤组织的构建和新生血管的形成,调节多种肿瘤的浸润与转移^[1-2]。

脂肪组织是围绕胰腺癌(pancreatic cancer, PaCa)的常见结缔组织,脂肪组织中含有大量脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)。本实验前期研究发现, ADSCs高表达SDF-1,而SDF-1/CXCR4轴在肿瘤细胞增殖侵袭中发挥重要作用。利用CXCR4的阻断剂AMD3100,本研究探讨ADSCs是否通过SDF-1/CXCR4轴对PaCa的细胞活性产生影响。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

经医学院伦理委员会批准及开腹手术患者的知情同意,术中取网膜脂肪组织2 mg,供分离ADSCs; L-DMEM培养基,购自Hyclone公司;小牛血清购自Gibco公司; IV型胶原酶、DNase I购自Sigma公司;人PaCa细胞株SW1990和PANC-1购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所; Transwell半透膜及6孔塑料培养板购自Millipore公司; 试剂SDF-1购自Sigma公司; CXCR4的阻断剂AMD3100、Matrigel购自美国B&D公司。

1.2 方法

1.2.1 ADSCs的分离、培养 在无菌条件下,从人腹腔内获取脂肪组织1~2 mg,充分剪碎后加入分离液2 mL(含1 mg/mL胶原酶)消化, 37 °C振荡摇晃1 h,然后以200 ×g离心5 min,沉积的细胞用含10% FBS的DMEM培养液制成均匀的细胞悬液,均匀接种于培养皿中, 37 °C、5% CO₂孵箱中培养,培养至皿底80%时传代,每2~3 d换液1次。采用第3-5代ADSCs,用流式细胞仪检测ADSCs相对特异细胞表面标志

CD29、CD90及CD45。

1.2.2 ADSCs向脂肪细胞分化 将分离的ADSCs用含10% FBS的DMEM(含0.5 mmol/L甲基噻吩、1.0 μmol/L地塞米松、350 nmol/L胰岛素)培养,于37 °C、5% CO₂孵箱中培养,每2~3 d换液1次,10 d左右于显微镜下观察细胞分化结果。并用油红O染色细胞内的脂肪滴,观察细胞的分化率。

1.2.3 细胞共培养方法的建立 根据孔径0.4 μm的transwell半透膜仅可以通过培养液而不能透过细胞的特点,在6孔塑料培养板上架起transwell半透膜,建立双层细胞共用培养液而不直接接触的培养体系。培养体系上层接种ADSCs 2×10⁵/孔,培养体系下层接种PaCa细胞2×10⁴/孔。另设单独培养的PaCa细胞作为对照。各组均采用37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱常规培养,培养液为含10%小牛血清L-DMEM。培养72 h后,每孔加入CCK-8溶液80 μL,继续培养2 h,用自动酶标仪于450 nm处检测每孔的吸光度(D)值,间接计算细胞增殖程度。每组设5个复孔,实验重复3次。

1.2.4 PaCa细胞侵袭能力的测定 孔径8 μm的transwell小室用50% Matrigel胶15 μL包被上室面,室温风干。小室上层接种加入4×10⁵ PaCa细胞及250 μL ADSCs培养液,下层加入600 μL含15% FBS的DMEM。对照组上层接种4×10⁵ PaCa细胞及250 μL DMEM而非ADSCs培养液,培养48 h后弃去小室上层液体,上室面细胞用棉签拭去。下室面细胞用4%多聚甲醛固定后结晶紫染色,显微镜(200×)下计数细胞,分别计数5个不同视野,取均值。

1.2.5 细胞培养液中SDF-1浓度的ELISA测定 采用37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱常规培养72 h后,收集各组细胞的培养液,经离心去除杂质后,保存于-80 °C的冰箱中,ELISA法根据试剂盒操作手册测定各组细胞培养液中的SDF-1浓度。

1.2.6 SDF-1及CXCR4的qRT-PCR测定 用Trizol提取细胞总RNA,各组分别取1 μg RNA用逆转录试剂盒逆转录为cDNA,后各取2 μL cDNA加入引物扩增目的片段。所用引物序列如下:人SDF-1上游: 5'-gct ttg agt

gac tgg gtt-3', 下游: 5'-gtg gca aga tga tgg ttt-3', 产物大小124 bp; 人CXCR4上游: 5'-gaa gct gtt ggc tga aaa gg-3', 下游: 5'-gag tcg atg ctg atc cca at-3', 产物大小345 bp; 人 β -actin上游: 5'-act ctt cca gcc ttc ctt c-3', 下游: 5'-tgt cac ctt cac cgt tcc-3', 产物大小516 bp。PCR循环条件如下: 热启动后, 94 °C变性30 s; 54 °C退火30 s; 72 °C延伸60 s; 30-35个循环。

1.2.7 不同浓度SDF-1对细胞增殖的影响 将PaCa细胞以 5×10^3 /孔接种于96孔板中, DMEM培养液含10% FBS, 按不同浓度分别向各孔中加入SDF-1(终浓度分别为0, 0.5, 1, 10, 100 ng/mL), 每个浓度设5个复孔。培养72 h后, 每孔加入CCK-8溶液80 μ L, 继续培养2 h, 用自动酶标仪于490 nm处检测每孔的吸光度(D)值, 间接计算细胞增殖程度。另外我们设计PaCa细胞经指示浓度的CXCR4的阻断剂AMD3100(100 ng/mL)预处理6 h后, 培养液中加入SDF-1并使终浓度为1 ng/mL。继续培养72 h, 使用CCK-8试剂盒间接计算细胞增殖程度。

1.2.8 AMD3100对ADSCs与PaCa细胞共培养的影响 将PaCa细胞以 5×10^3 /孔接种于96孔板中, DMEM培养液含10% FBS, 各组培养液中加入AMD3100使终浓度为100 ng/mL, 共培养72 h后, 收集各组PaCa细胞, 使用CCK-8试剂盒间接计算细胞增殖程度。

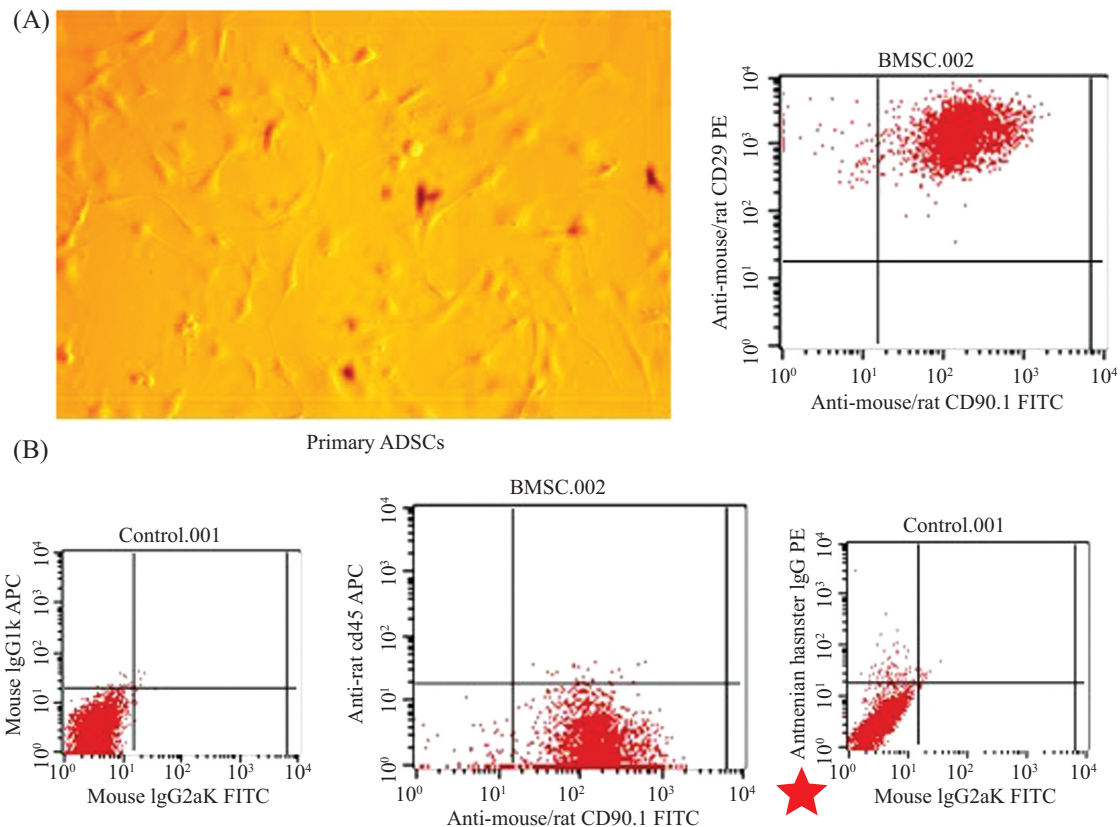
1.3 统计学处理

实验数据资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组间用单因素方差分析, 利用SPSS 16.0进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs的分离、培养和鉴定

取人网膜脂肪组织1~2 mg, 可以分离消化出(1~2) $\times 10^6$ ADSCs。经台盼蓝染色可确定细胞的存活率为95%以上。培养4~6 h后即可见部分细胞贴壁, 呈短棒形。48 h后可见细胞呈梭形生长。5~6 d后细胞生长迅速, 当细胞生长至80%汇合时, 即可传代培养。流式细胞仪显示人ADSCs表面标记CD45/



A: 培养5天的原代ADSCs表型(100 $\times$); B: ADSCs特异细胞表面标志(CD29、CD90及CD45)的表达。

A: the phenotype of ADSCs (on the 5th day, 100 $\times$); B: the expression of CD45, CD73 and CD90 in isolated ADSCs.

图1 ADSCs表型(第5天)及流式细胞仪检测干细胞标记物

Fig.1 The phenotype of ADSCs (the 5th day) and several ADSCs markers were confirmed by flow cytometric analysis

CD90/CD29阳性细胞率分别约为: $1.12\% \pm 0.35\%$ 、 $95.51\% \pm 4.42\%$ 、 $97.86\% \pm 2.13\%$ (图1)。

2.2 ADSCs向脂肪细胞分化

ADSCs在条件培养基上培养10天后, 显微镜下观察绝大多数ADSCs已分化成脂肪细胞, 油红O染色可见脂肪细胞内脂滴被染成红色(图2)。

2.3 ADSCs促进了PaCa细胞的增殖与侵袭

共培养72 h后, 与单独培养的PaCa细胞比较, ADSCs+PaCa细胞组PaCa细胞增殖程度、侵袭能力均明显提高(SW1990细胞, $P < 0.05$; PANC-1细胞, $P < 0.05$)(SW1990细胞, $P < 0.05$; PANC-1细胞, $P < 0.05$), 差别均具有统计学意义(图3)。

2.4 ADSCs培养液中SDF-1含量高

ELISA法分别测定ADSCs及PaCa细胞培养液中的SDF-1含量, 发现ADSCs培养液中SDF-1含量较

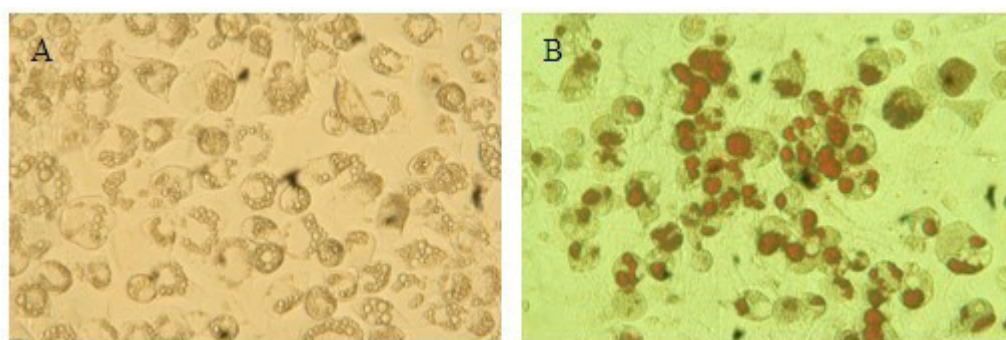
高(1110.8 ± 91.5 pg/mL), 而PaCa细胞培养液中SDF-1含量极低, 甚至难以检测, 差别具有统计学意义($P < 0.01$)(图4)。

2.5 ADSCs、PaCa细胞中SDF-1及CXCR4 mRNA的表达

通过qRT-PCR检测培养细胞中SDF-1及CXCR4 mRNA的表达, 与PaCa细胞比较, 发现ADSCs高表达SDF-1 mRNA($P < 0.01$), 而低表达CXCR4 mRNA($P < 0.01$), 差别均具有统计学意义(图5)。

2.6 不同浓度SDF-1对细胞增殖的影响

SDF-1能促进PaCa细胞的增殖, 并呈浓度依赖性(图6)。CXCR4拮抗剂AMD3100能够抑制SDF-1导致的PaCa细胞增殖(SW1990细胞, $P < 0.05$; PANC-1细胞, $P < 0.05$), 但在缺乏SDF-1的情况下, AMD3100不能够抑制SDF-1导致的PaCa细胞增殖(图6)。

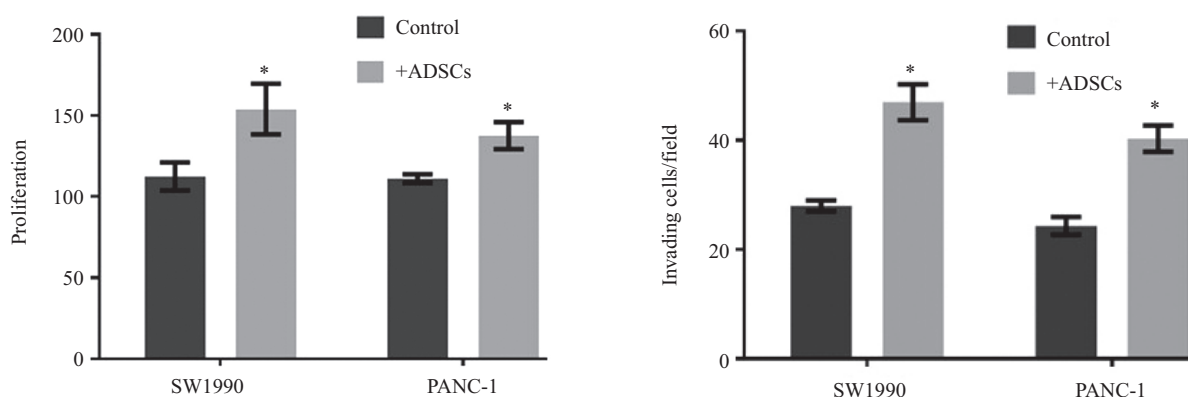


A: 脂肪细胞胞浆内可见脂滴(100 $\times$); B: 脂肪细胞胞浆内脂滴可被油红O染色(100 $\times$)。

A: the fat droplets were observed in the cytoplasm of adipocytes (100 $\times$); B: the fat droplets were stained with Oil red O (100 $\times$).

图2 ADSCs分化成的脂肪细胞表型及油红O染色(条件培养基上培养10天)

Fig.2 ADSCs differentiated into adipocytes, and the fat droplets in the cytoplasm of adipocytes were stained by Oil red O (cultured in condition medium for 10 days)

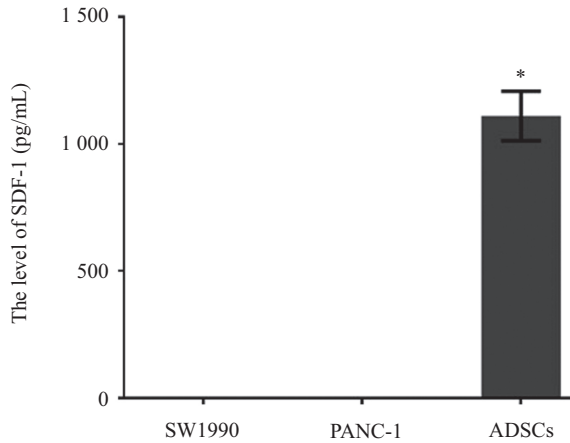


* $P < 0.05$, 与对照组比较。共培养72 h后, ADSCs+PaCa细胞组与单独PaCa细胞组比较, PaCa细胞的增殖程度与侵袭能力均明显提高。

* $P < 0.05$ compared to control group. After co-cultured with ADSCs for 72 h, the proliferation and invasion of SW1990 and PANC-1 cells were significantly increased compared to the PaCa cells cultured alone.

图3 各组细胞增殖及侵袭能力比较

Fig.3 The comparison of proliferation and invasion of PaCa cells in different groups

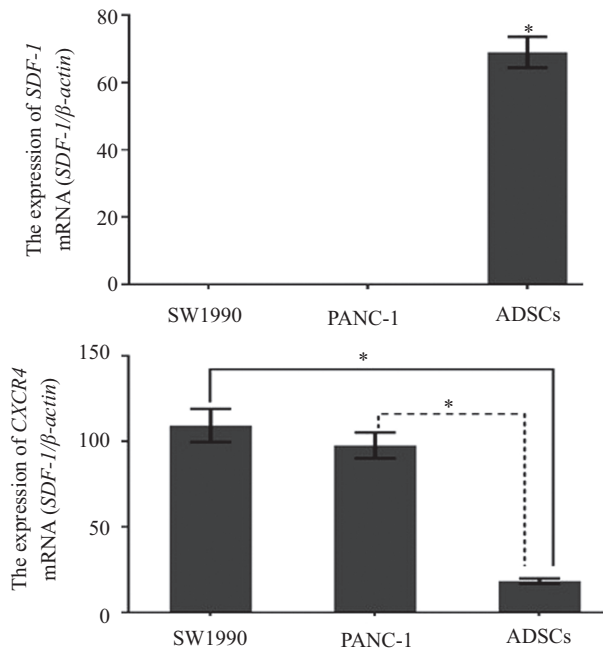


* $P < 0.01$, 与PaCa细胞(SW1990、PANC-1)比较。与PaCa细胞比较, ADSCs培养液中SDF-1含量明显较高。

* $P < 0.01$ compared to PaCa cells (SW1990 and PANC-1). Compared to the PaCa cells, the SDF-1 concentration in ADSCs supernatant was significantly higher.

图4 各组细胞培养液中SDF-1含量比较

Fig.4 The comparison of SDF-1 concentration in cell cultured supernatants



* $P < 0.01$, 与PaCa细胞(SW1990、PANC-1)比较。

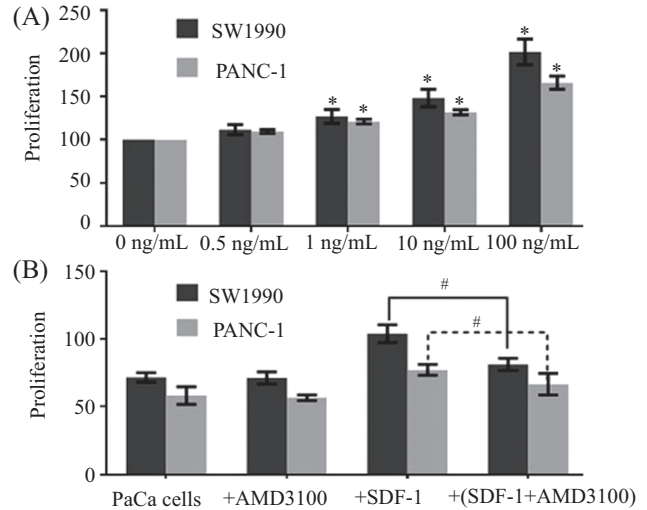
* $P < 0.01$ compared to PaCa cells (SW1990 and PANC-1).

图5 ADSCs、PaCa细胞中SDF-1及CXCR4 mRNA的qRT-PCR分析

Fig.5 The qRT-PCR analysis of SDF-1 and CXCR4 mRNA expression in PaCa cell lines and ADSCs

2.7 AMD3100降低了ADSCs对PaCa细胞的增殖作用

通过CCK-8法检测发现, 在培养液中加入

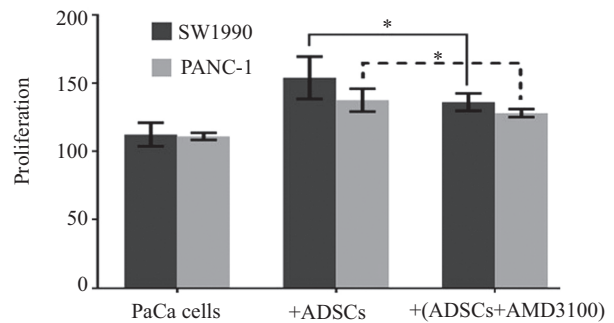


* $P < 0.05$, 与对照组(0 ng/mL)比较; # $P < 0.05$, 与PaCa细胞+SDF-1组比较。A: SDF-1呈浓度依赖性促进PaCa细胞的增殖; B: AMD3100部分抑制SDF-1介导的PaCa细胞增殖。

* $P < 0.05$ compared to control group (SDF-1 0 ng/mL); # $P < 0.05$ compared to PaCa cells+SDF-1. A: SDF-1 promoted the proliferation of PaCa cells in a dose-dependent manner. B: AMD3100 partially blocked SDF-1-mediated proliferation.

图6 SDF-1及AMD3100对PaCa细胞增殖的影响

Fig.6 The effect of SDF-1 and AMD3100 on the proliferation of PaCa cells



* $P < 0.05$, 与PaCa细胞+ADSCs组比较。

* $P < 0.05$ compared to PaCa cells+ADSCs.

图7 AMD3100(100 ng/mL)降低了ADSCs对PaCa细胞的增殖作用

Fig.7 AMD3100 (100 ng/mL) downregulated the effects of ADSCs on PaCa cell line proliferation

AMD3100的情况下, ADSCs对PaCa细胞的增殖作用明显降低(SW1990细胞, $P < 0.05$; PANC-1细胞, $P < 0.05$)(图7)。

3 讨论

胰腺癌(PaCa)是预后较差的消化系统恶性肿瘤之一^[3]。其治疗疗效较差是因为其癌细胞具有较

强的局部侵袭和远处转移能力, 约80%~85%患者在就诊时由于肿瘤已存在局部浸润和远处转移而失去手术机会^[4]。即使早期发现并进行积极治疗的患者5年生存率也仅为25%~30%^[5]。为了有更好的治疗效果和预后, 需要深入研究PaCa早期侵袭和转移的内在机制。

在针对肿瘤的增殖、侵袭研究中, 趋化因子的作用是目前的研究热点。基质细胞源性因子SDF-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1, 又名CXCL12)是趋化因子蛋白家族的一个成员, 在细胞归巢、肿瘤转移、血管新生等方面有着多重作用^[6-7]。PaCa常发生局部浸润、淋巴结转移, 而在胰腺癌周围脂肪淋巴组织中存在大量ADSCs。本实验研究发现, ADSCs高表达SDF-1, 提示ADSCs可能与PaCa细胞的增殖、侵袭存在某种联系。

肿瘤的进展不仅与肿瘤细胞本身的生物学特征有关, 还与多种非肿瘤性基质细胞构成的微环境密切相关, 基质与肿瘤细胞相互作用从而促进肿瘤细胞的生存、增殖和侵袭^[8]。MSCs是构成肿瘤细胞微环境的成分之一。本研究显示, ADSCs可促进PaCa细胞的增殖、侵袭, 与ADSCs表达SDF-1、通过SDF-1/CXCR4轴发挥作用有关。CXCR4是SDF-1已知的唯一的趋化因子受体^[9]。趋化因子受体CXCR4通常在肿瘤细胞高度表达。SDF-1/CXCR4能促进肿瘤组织内血管的形成和肿瘤细胞的迁徙, 从而导致肿瘤的快速生长。阻断SDF-1/CXCR4的相互作用, 可以明显抑制肿瘤细胞的转移^[10-11]。这与本研究结果一致, CXCR4的阻断剂AMD3100可抑制PaCa细胞的增殖、侵袭。

当然, 肿瘤的增殖、侵袭过程是一个多步骤、多因素的复杂过程。本研究中发现通过AMD3100阻断SDF-1/CXCR4轴并不能完全抑制PaCa细胞增殖, 说明SDF-1/CXCR4轴只是胰腺癌细胞增殖转移过程中的其中一条通路而已。但这也足够提示我们, 积极研究肿瘤增殖、转移过程中的分子通路, 是将来研发防治肿瘤新药的一个重要方向。

总之, 本研究发现ADSCs可通过表达SDF-1而参

与PaCa细胞的增殖、侵袭, 这在一定程度上支持了恶性肿瘤手术时周围脂肪淋巴结清扫的必要性, 同时也提示干细胞移植治疗可能带来的促瘤性问题。

参考文献 (References)

- 1 Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higgashi Y, *et al.* Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(10): 2323-33.
- 2 Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, *et al.* The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 245-51.
- 3 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, *et al.* Cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 2006; 56(2): 106-30.
- 4 贾志凌, 张宏艳, 刘畅, 王莉, 柴丽娜, 张侠, 等. 血清肿瘤标志物联合检测在胰腺癌诊断中应用. *中华实用诊断与治疗杂志* (Jia Zhiling, Zhang Hongyan, Liu Chang, Wang Li, Chai Lina, Zhang Xia, *et al.* Combined detection of serum tumor markers CEA, CA19-9 and CK19 in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*) 2011; 25(2): 130-2.
- 5 许娟娟, 刘诗, 易粹琼. 胰腺癌的研究进展. *临床消化病杂志* (Xu Juanjuan, Liu Shi, Yi Cuiqiong. *Advances in the research of pancreatic cancer. Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*) 2012; 24(2): 117-20.
- 6 Shen X, Artinyan A, Jackson D, Thomas RM, Lowy AM, Kim J. Chemokine receptor CXCR4 enhances proliferation in pancreatic cancer cells through AKT and ERK dependent pathways. *Pancreas* 2010; 39(1): 81-7.
- 7 Wang Z, Ma Q, Liu Q, Yu H, Zhao L, Shen S, *et al.* Blockade of SDF-1/CXCR4 signaling inhibits pancreatic cancer progression *in vitro* via in activation of canonical Wnt pathway. *Br J Cancer* 2008; 99(10): 1695-703.
- 8 Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res* 2001; 264(1): 169-84.
- 9 Billadeau DD, Chatterjee S, Bramati P, Sreekumar R, Shah V, Hedin K, *et al.* Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells. *Int J Gastrointest Cancer* 2006; 37(4): 110-9.
- 10 Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H, *et al.* Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2005; 65(3): 967-71.
- 11 Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(1): 77-82.