

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.008

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.008>

人经血来源间充质干细胞对小鼠A549肺癌化疗效果的影响研究

丁浩, 王剑, 贾方平, 易晶

(江苏大学附属人民医院呼吸内科, 江苏 镇江 212004)

[摘要] 目的: 探讨人经血来源间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MenSCs)对小鼠A549肺癌化疗效果的影响。方法: 取20只BALB/C裸小鼠建立肺癌模型, 随机分为实验组和对照组各10只; 对照组仅给予化疗干预, 实验组则于化疗期间将某机构赠予的MenSCs经DiI荧光标记后于鼠尾静脉(3×10^5 /只)进行注射。肺癌造模后14 d, 两组小鼠均断颈椎处死并收集其肿瘤, 比较两组小鼠瘤体体积、瘤体质量、抑瘤率及双肺湿重、肿瘤转移率、肿瘤转移个数、抑制转移率差异。结果: 20只BALB/C裸小鼠均进行统计, 无脱落报告。20只小鼠接瘤后第7天在右前肢腋下均可触及瘤体长出, 两组小鼠瘤体生长曲线比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。两组小鼠的平均瘤体体积和平均瘤体质量比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 抑瘤率为8.4%。实验组小鼠双肺湿重、肿瘤转移率及肿瘤转移个数均显著低于对照组小鼠, 差异有显著性($P < 0.05$); 抑制转移率为71.8%。结论: MenSCs协同化疗在抑制小鼠肺癌肿瘤转移方面有一定效果。

[关键词] 间充质干细胞; 肺癌; 小鼠; 化疗效果

Influence of human blood derived mesenchymal stem cells on chemotherapy in mice with A549 lung cancer

DING Hao, WANG Jian, JIA Fangping, YI Jing

(Department of Respiration Medicine, Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212004, China)

Abstract **Objective:** To investigate the influence of human blood derived mesenchymal stem cells (MenSCs) on the effects of chemotherapy in mice with A549 lung cancer. **Methods:** Twenty BALB/C nude mice were taken for establishing lung cancer model, and were randomized into experimental group and control group with 10 mice in each group. The control group only received chemotherapy intervention. The experimental group was treated with tail vein injection of DiI fluorescent labeled MenSCs given by an institution (3×10^5 /mouse). After 14 days modeling of lung cancer, mice in the two groups were killed by breaking the cervical spine and the tumors were collected. The tumor volume, tumor mass, tumor inhibition rate, double lung wet weight, tumor metastasis rate,

收稿日期 (Date of reception): 2016-08-29

通信作者 (Corresponding author): 王剑, Email: 706713396@qq.com

基金项目 (Foundation item): 江苏省自然科学基金 (BK2012705); 镇江市社会发展项目 (SH2013045); 江苏科技大学临床医学发展基金 (JLY2010006)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2012705), the Social Development Fund of Zhenjiang City (SH2013045) and Jiangsu University Clinical Medicine Science and Technology Development Fund (JLY2010006), P. R. China.

number of tumor metastasis and metastasis inhibition rate were compared between the two groups. **Results:** In this experiment, 20 BALB/C nude mice were statistically analyzed, and there was no report about cases lost to follow up. On the 7th day after inoculated tumor, there were tumors in 20 mice under the right fore limb armpit. There was no significant difference in tumor growth curve between the two groups ($P>0.05$). There was no significant difference in the average tumor volume and average tumor weight between the two groups ($P>0.05$); the tumor inhibition rate was 8.4%. The double lung wet weight, tumor metastasis rate and the number of tumor metastasis in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$); the inhibition rate was 71.8%. **Conclusion:** MenSCs combined with chemotherapy have certain effects in inhibiting pulmonary tumor metastasis.

Keywords mesenchymal stem cells (MenSCs); lung cancer; mice; effects of chemotherapy

随着人们生活结构的改变和环境污染的加重,肺癌在我国的发病率呈逐年递增趋势,现已成为威胁人民生命健康安全的常见恶性肿瘤,受到临床和社会的广泛关注。目前治疗肺癌的途径较多,手术依旧是根除病灶、促进患者病情转归的最佳手段,但受发病隐匿性等因素影响,仅不足20%的肺癌患者具备手术治疗价值^[1],另80%患者确诊时已经丧失手术机会,需通过其他途径获得理想的治疗效果。基因治疗作为当前最具革命性的一种医疗技术,能通过外源基因的有效转运达到治疗目的^[2],但部分学者^[3]认为过度导入外源基因可能影响机体的正常细胞功能,对患者造成伤害。故当前越来越多研究者将寻找具有靶向性的载体运输外源基因作为研究重点,试图以此高效、准确地灭杀癌细胞,获得良好的治疗效果。人经血来源间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MenSCs)是一种从女性经血中分离获得的新型间充质干细胞,有取材简便、易得的优势。国内外部分研究^[4]已经证实, MenSCs对肝损伤、肺纤维化等多种疾病的损伤部位均表现出趋向性特点,联合对症治疗措施可提高疗效,改善受试者预后质量。对此,本研究将MenSCs对小鼠A549肺癌化疗效果的影响作为重点探究对象,选取20只BALB/C裸鼠建立肺癌模型,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 动物

本次实验使用的20只健康雄性BALB/C裸鼠均购于南京君科生物工程有限公司(货号: J006),为

无特定病原体级(specific pathogen free, SPF)实验动物,鼠龄3周,体质量18~22 g;所有小鼠均饲养于独立通风笼盒屏障系统中,恒温20~22 °C恒湿(50%~60%),每5只1盒,予以标准饲料饲养,小鼠自由摄取食和水,予以12 h循环照明。实验过程对动物的处置均符合《关于善待实验动物的指导性意见(2006版)》^[5]中动物伦理学相关要求及规范。将20只小鼠随机分为实验组和对照组各10只,入组前均适应性饲养1周。

1.2 方法

1.2.1 动物建模^[6]

复苏A549细胞并将其接种于任意一只非入组的健康雄性BALB/C裸小鼠右前肢腋下;待瘤体生长致特定体积(2 cm × 2 cm × 1 cm)后断颈椎处死该小鼠,无菌环境下完整剥离其右前肢腋下瘤体,完全剔除表面结缔组织和坏死组织;将处理后的瘤体剪碎置入匀浆器,研磨瘤体组织为细胞悬液;100目滤器过滤后加入生理盐水,使浓度为 1×10^7 /mL;分别于入组的20只BALB/C裸鼠右前肢腋下接种0.2 mL制备的细胞悬液。

1.2.2 化学治疗

此次实验的20只小鼠均于成功建模后第7天接受化疗干预:注射用盐酸多柔比星(阿霉素, Actavis Italy S.p.A), 2 mg/kg剂量腹腔注射给药,连续使用3 d。

1.2.3 干细胞治疗

实验组的10只小鼠均于化疗期间(成功建模后第7, 12天)将某机构赠予的MenSCs细胞悬液经DiI荧光标记后于鼠尾静脉(3×10^5 /只)进行注射。对照组小鼠略过此步骤。

1.3 观察指标

肺癌造模后 14 d, 两组小鼠均断颈椎处死并收集其肿瘤, 比较两组瘤体体积[游标卡尺直接测量瘤体直径, 体积(V)公式: $V(\text{cm}^3)=(4/3)\pi r^3$, 其中 π 为圆周率, r 为瘤体半径]、瘤体质量(电子秤精确称量)、抑瘤率[抑瘤率=(对照组平均瘤体质量-实验组平均瘤体质量)/对照组平均瘤体质量 $\times 100\%$]、双肺湿重(电子秤精确称量)、肿瘤转移率[肿瘤转移率=出现肿瘤转移情况的小鼠只数/该组受试小鼠总只数]、肿瘤转移个数和抑制转移率[抑制转移率=(对照组平均转移数-实验组平均转移数)/对照组平均转移数 $\times 100\%$]差异。

1.4 统计学处理

将文中相关数据输入至统计学软件SPSS19.0 中进行分析, 计数资料采用(%)表示, 行 χ^2 检验; 计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 提示有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

此次实验中的 20 只 BALB/C 裸小鼠均进入结果分析环节, 无脱落报告。

2.2 两组小鼠瘤体生长情况比较

20 只实验小鼠接瘤后第 7 天在右前肢腋下均可触及瘤体长出, 两组小鼠瘤体生长曲线比较, 差异无显著性($P > 0.05$)(图 1)。

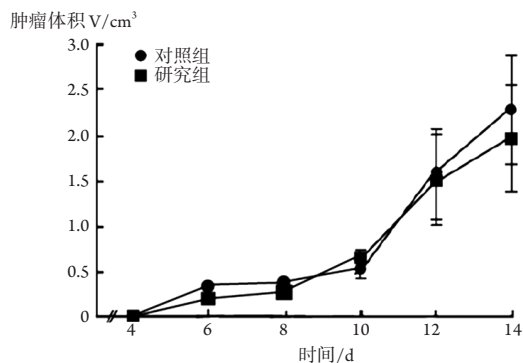


图 1 两组小鼠瘤体生长曲线图

Figure 1 Growth chart of mice tumors in two groups

2.3 两组小鼠瘤体体积及瘤体质量比较

肺癌造模后 14 d, 两组小鼠均断颈椎处死并收集测量其肿瘤体积和瘤体质量, 结果表明: 两组小鼠的平均瘤体体积和平均瘤体质量比较, 差异均无显著性(P 均 > 0.05); 抑瘤率为 8.4% (表 1)。

表 1 两组小鼠瘤体体积及瘤体质量比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of tumor volume and tumor mass between two groups ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 瘤体体积/ cm^3 | 瘤体质量/g |
|-----|-----|---------------------|-----------------|
| 实验组 | 10 | 1.95 ± 0.56 | 4.14 ± 1.03 |
| 对照组 | 10 | 2.11 ± 0.58 | 4.52 ± 1.10 |
| t | | 0.628 | 0.797 |
| P | | 0.538 | 0.436 |

2.4 两组小鼠双肺湿重、肿瘤转移率及肿瘤转移个数比较

实验组小鼠双肺湿重、肿瘤转移率及肿瘤转移个数均显著低于对照组小鼠, 差异有显著性($P < 0.05$); 抑制转移率为 71.8% (表 2)。未发生肿瘤转移的小鼠双肺表面光滑、红润, 有弹性, 而发生肿瘤转移的小鼠双肺表面则可见鱼肉样转移灶, 颜色暗红(图 2)。

表 2 两组小鼠双肺湿重量、肿瘤转移率及肿瘤转移个数比较

Table 2 Comparison of wet weight of bilateral lung, tumor metastasis rate and number of tumor metastases between two groups

| 组别 | n | 双肺湿重/g | 肿瘤转移率/% | 肿瘤转移个数/个 |
|-----|-----|-----------------|---------|-----------------|
| 实验组 | 10 | 0.24 ± 0.03 | 20.0 | 1.09 ± 0.37 |
| 对照组 | 10 | 0.28 ± 0.02 | 70.0 | 3.86 ± 0.68 |
| t | | 3.508 | 5.051 | 11.315 |
| P | | 0.003 | 0.025 | < 0.001 |

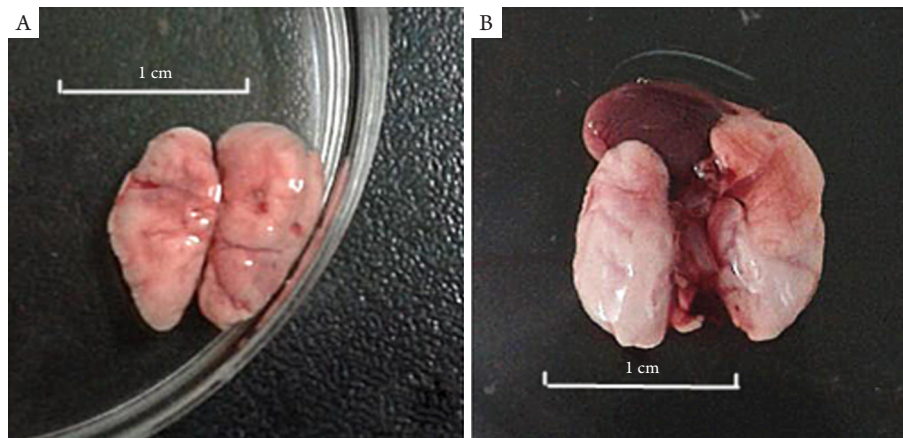


图 2 肺癌转移或未转移的小鼠双肺图片

Figure 2 Images of mice with lung cancer metastasis or without metastasis

(A) 肺癌未转移小鼠双肺; (B) 肺癌转移小鼠双肺。

(A) Bilateral lung without metastasis; (B) bilateral lung with lung cancer metastasis.

3 讨论

目前临床普遍认为外科手术是治疗肺癌最有效的途径之一^[7], 但由于该疗法对患者病情发展情况要求较为苛刻, 且仍存在术后局灶切除不彻底、易遗留微小转移灶引起肿瘤转移、复发等弊端, 故部分学者仍将寻求其他切实可行的治疗途径作为研究重点展开深入分析, 试图通过其他非手术治疗途径为丧失手术机会的患者获得理想的预后创造条件。

干细胞(stem cells, SC)是一种具有多向分化潜能的细胞总称。此前有研究^[8]证实, SC有迁移至炎症损伤、缺血损伤、肿瘤癌灶等位置的生理特点, 临床可将其作为运送药物或基因载体致病灶的有效手段用于治疗过程中, 以此提高药物灭杀肿瘤的效果, 以获得理想的疗效。阮光萍等^[9]学者认为, 从脂肪、脐带血、骨髓等人体组织中采集的间充质干细胞均对癌灶有一定趋向性作用。骨髓间充质干细胞有来源广泛、体外易培养的优势, 但采集过程容易增加捐献者的痛苦, 故捐献人数偏少, 且获得的SC数目有限^[10], 为其临床大规模推广应用带来较大局限性。脐带血虽不会为捐献者造成痛苦, 但受其采集途径的限制, 来源较为匮乏, 依旧束缚该间充质干细胞在临床的应用。MenSCs作为一种新型的间充质干细胞类型, 从女性的经血中分离而成, 同其他间充质干细胞一样具备可塑性、低致瘤性、低免疫原性的功能特性^[11], 且有取材来源充足、采集过程便捷无技术含量、体外易培养且扩增速度快、无伦理道德争议等优势^[12], 临床应用前景

广阔。目前, MenSCs已经广泛用于再生医学和细胞治疗领域的研究工作中, 并取得一定成果。Alcayaga-Miranda等^[13]指出, MenSCs在部分疾病中对损伤部位表现出明显的趋向性特点, 但未曾有研究就其对肺癌患者癌灶的趋向性特点展开研究, 也无报道针对MenSCs在肺癌临床治疗中的意义展开分析。

本研究重点就MenSCs对肺癌小鼠化疗效果的影响展开分析, 发现此间充质干细胞对肺癌的生长影响较小, 对照组小鼠和实验组小鼠成功造模后的14 d内, 瘤体生长曲线较为接近, 处死后测量其瘤体体积、称量其瘤体质量, 均未发现两组有显著差异, 抑瘤率仅为8.4%, 与李梅等^[14]学者报道的脐带间充质干细胞类似, 表明MenSCs对肺癌癌灶的生长影响较小, 几乎不具有抑制肿瘤生长的功效。但研究同样发现, 实验组小鼠的肿瘤转移率明显低于对照组小鼠, 仅为20%; 且该组小鼠双肺湿重、肿瘤转移个数均显著小于对照组小鼠, 表明化疗期间予以MenSCs干预, 能通过抑制癌灶转移的方式改善化疗效果、延长受试者生存时间, 达到促进其病情转归的目的。

本研究虽取得一定成果, 发现MenSCs可能有抑制肺癌肿瘤转移的作用, 且来源丰富、采集便利, 在肺癌的临床治疗中有较大的应用前景, 但由于MenSCs在肺癌治疗中的价值仍处于探究阶段, 目前临床鲜少有相关报道对本研究结果予以支持, 故难以评估结论的准确性和有效性, 可扩大样本量并尽可能排除相关干扰因素后将其作为后续研究课题予以深入探究, 以此获得更严

谨、完善的报道结果。

参考文献

- 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(8): 1982-1986.
YAO Xiaojun, LIU Lunxu. Epidemiology and treatment of lung cancer[J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(8): 1982-1986.
- 祁秋干, 周清华, 李印, 等. 人骨髓间充质干细胞表达外源性 IL-24 基因对肺癌细胞 A549 增殖的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(9): 11-16.
QI Qiugan, ZHOU Qinghua, LI Yin, et al. Effect of human bone marrow mesenchymal stem cells express exogenous IL-24 gene on proliferation of A549 lung cancer cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2014, 24(9): 11-16.
- 王月丽, 魏继楼, 程红蕾, 等. 外源基因转染细胞技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(7): 1382-1384, 1270.
WANG Yueli, WEI Jilou, CHENG Honglei, et al. Advances in Technology of Heterologous Genes Transfecting Cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(7): 1382-1384, 1270.
- Azedi F, Kazemnejad S, Zarnani AH, et al. Differentiation potential of menstrual blood- versus bone marrow-stem cells into glial-like cells[J]. Cell Biol Int, 2014, 38(5): 615-624.
- 史晓萍, 宗阿南, 陶钧, 等. 《关于善待实验动物的指导性意见》的研究[J]. 中国医科大学学报, 2007, 36(4): 493.
SHI Xiaoping, ZONG Anan, TAO Jun, et al. Study of instructive notions with respect to caring for laboratory animals[J]. Journal of China Medical University, 2007, 36(4): 493.
- 郑天亮, 赵松, 郭海周, 等. 人脐带间充质干细胞分离鉴定及移植后对肺癌小鼠化疗的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(23): 3457-3463.
ZHENG Tianliang, ZHAO Song, GUO Haizhou, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: isolation, identification and transplantation combined with chemotherapy for lung cancer in mice[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2016, 20(23): 3457-3463.
- Nykäinen A, Räsänen J, Salo J, et al. Thoracoscopic surgery of lung cancer[J]. Duodecim, 2014, 130(2): 145-151.
- Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. Nat Immunol. 2014, 15(11): 1009-1016.
- 阮光萍, 姚翔, 刘菊芬, 等. 人脐带间充质干细胞的作用: 细胞移植、免疫调节及充当基因治疗靶细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(41): 6714-6718.
RUAN Guangping, YAO Xiang, LIU Jufen, et al. Role of human umbilical cord mesenchymal stem cells: cell transplantation, immunoregulation and target cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2014, 18(41): 6714-6718.
- 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725.
LI Xiaofeng, ZHAO Jingmin, SU Wei, et al. Culture and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(10): 1721-1725.
- Lin J, Xiang D, Zhang JL, et al. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2011, 12(5): 372-380.
- 严琰, 东健洋, 桑运霞, 等. 经血源子宫内膜干细胞培养、鉴定及体外分化潜能的研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(7): 892-899.
YAN Yan, DONG Jianfeng, SANG Yunxia, et al. Study on the culture, identification and differentiation potential in vitro of hematogenous endometrial stem cells[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2014, 36(7): 892-899.
- Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Martin A, et al. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6: 199.
- 李梅, 武毅, 刘仁旺, 等. 间充质干细胞对非小细胞肺癌细胞增殖和侵袭能力的初步探讨[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(11): 674-679.
LI Mei, WU Yi, LIU Renwang, et al. Investigational Study of Mesenchymal Stem Cells on Lung Cancer Cell Proliferation and Invasion[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2015, 18(11): 674-679.

本文引用: 丁浩, 王剑, 贾方平, 易晶. 人经血来源间充质干细胞对小鼠 A549 肺癌化疗效果的影响研究[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(12): 1933-1937. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.008

Cite this article as: DING Hao, WANG Jian, JIA Fangping, YI Jing. Influence of human blood derived mesenchymal stem cells on chemotherapy in mice with A549 lung cancer[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(12): 1933-1937. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.12.008