

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.003

· 基础研究 ·

MCP-1/CCR2 轴促进脐带间充质干细胞向肺癌组织归巢

宋新苗¹, 颜次慧¹, 吕梦果¹, 于文文¹, 张新伟^{1,2}, 任秀宝^{1,2} (1. 天津医科大学肿瘤医院 免疫室, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室, 天津 300060; 2. 天津医科大学肿瘤医院 生物治疗科, 天津 300060)

[摘要] **目的:** 探讨单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)/趋化因子(C-C 模式)受体 2[chemokine (C-C motif) receptor 2, CCR2]轴在人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)向肺癌归巢中的作用。**方法:** 采用组织块培养法从健康新生儿脐带组织中分离 HUMSCs 并鉴定, 构建 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型。体外应用 Transwell 趋化实验、体内应用 IVIS Xenogen 动物活体成像系统检测 HUMSCs 是否向肺癌归巢, ELISA 法检测肺癌细胞 A549 培养上清中 MCP-1 分泌水平, 转染 shRNA 敲低肺癌细胞内 MCP-1 的表达和用抑制剂 RS504393 抑制 HUMSCs 细胞表面的 MCP-1 受体 CCR2 后, 体内外检测 HUMSCs 向肺癌归巢能力的改变。**结果:** 成功分离得到 HUMSCs 并完成鉴定, 成功建立 BALB/c 裸鼠皮下肺癌移植瘤模型。HUMSCs 在体内外均能向肺癌归巢($P < 0.01$), 肺癌细胞高表达 MCP-1。成功构建稳定低表达 MCP-1 的肺癌 A549 细胞系, 与对照组相比, shRNA1 和 shRNA2 敲低组趋化 HUMSCs 的数目明显减少[(80.0 ± 33.0), (94.0 ± 16.0) vs (167.0 ± 41.0)个, 均 $P < 0.05$], 抑制 HUMSCs 细胞表面 MCP-1 受体 CCR2 后, 体内外均显著抑制 HUMSCs 向肺癌的趋化能力($P < 0.05$)。**结论:** MCP-1/CCR2 轴促进 HUMSCs 向肺癌归巢。

[关键词] 间充质干细胞; 单核细胞趋化蛋白-1; 趋化因子(C-C 模式)受体 2; 肺癌; 归巢

[中图分类号] R734.2; R730.23

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0017-07

MCP-1/CCR2 axis promotes the homing of human umbilical cord mesenchymal stem cells to lung cancer tissues

SONG Xinmiao¹, YAN Cihui¹, LYU Mengguo¹, YU Wenwen¹, ZHANG Xinwei^{1,2}, REN Xiubao^{1,2} (1. Department of Immunology, Cancer Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy of Tianjin City, National Clinical Research Center of Cancer, Tianjin 300060, China; 2. Department of Biotherapy, Cancer Hospital affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/(chemokine [C-C motif] receptor 2, CCR2) axis in human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs) homing to lung cancer. **Methods:** "Tissue explant" method was used to isolate and identify HUMSCs from umbilical cord of healthy newborns. Subcutaneous lung cancer xenograft model was established in nude BALB/c mice. Transwell migration assay *in vitro* and IVIS Xenogen living imaging system *in vivo* were applied respectively to investigate the capability of HUMSCs homing to lung cancer. ELISA was utilized to detect the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in lung cancer A549 cell culture supernatant. After knocking down the MCP-1 expression in lung cancer cells by transfecting shRNA and blocking MCP-1 receptor CCR2 on the surface of HUMSCs by inhibitor RS504393, the migration ability of HUMSCs was determined *in vitro* and *in vivo*. **Results:** HUMSCs were successfully isolated and identified. Subcutaneous lung cancer xenograft model was

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2012CB9333004); 国家科技支撑计划资助项目(No. 2015BAI12B12); 国家自然科学基金资助项目(No. 81401887); 天津市科委应用基础基金资助项目(No. 14JCQNJC11500, No. 11JCYBJC13200); 天津医科大学科学基金资助项目(No. 2012KYM03)。Project supported by the National Basic Research Program of China(973 Program)(No. 2012CB9333004), the National Key Technology R & D Program(No. 2015BAI12B12), the National Natural Science Foundation of China(No. 81401887), Applied Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Tianjin City(No. 14JCQNJC11500, No. 11JCYBJC13200), and the Science Foundation of Tianjin Medical University(No. 2012KYM03)

[作者简介] 宋新苗(1989-), 女, 河北省迁安市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗的研究, E-mail: xinmiaosong@126.com

[通信作者] 张新伟(ZHANG Xinwei, corresponding author), E-mail: zhangxinwei@tjmuch.com

successfully established in nude BALB/c mice. HUMSCs migrated to lung cancer both *in vivo* and *in vitro* ($P < 0.01$). Lung cancer cells highly expressed MCP-1. Lung cancer A549 cell line with stable low expression of MCP-1 was successfully constructed, compared with control group, number of migrating HUMSCs significantly decreased in shRNA1 and shRNA2 knock down groups ($[80.0 \pm 33.0]$, $[94.0 \pm 16.0]$ vs $[167.0 \pm 41.0]$, $P < 0.05$). Inhibition of CCR2 (receptor of MCP-1) on HUMSCs greatly suppressed the tropism of HUMSCs to lung cancer *in vivo* and *in vitro* ($P < 0.05$).

Conclusion: MCP-1/CCR2 axis promoted the migration of HUMSCs to lung cancer.

[**Key words**] mesenchymal stem cell; monocyte chemoattractant protein-1; chemokine (C-C motif) receptor 2; lung cancer; homing

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 17-23. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.003]

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)为一群异质性的非造血干细胞,广泛分布于全身多种组织,具有高度自我更新能力与多向分化潜能^[1]。脐带组织来源的MSCs(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)除具有传统骨髓来源的MSCs(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMMSCs)的分离方便、低免疫原性以及容易进行基因改造等特点外,还具有使用不涉及伦理学问题、方便进行大批量分离、能在体外较长时间内保持干性和无致瘤性等优点^[2-4]。MSCs具有归巢特性,可迁移至损伤组织。肿瘤微环境与损伤组织周围的环境相似,被认为是“永不愈合的创伤”,其持续产生的炎症介质可能在MSCs归巢中居重要地位。MSCs的归巢机制复杂,趋化因子、黏附分子及生长因子等均参与其中。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是CC类细胞趋化因子,在炎症发生过程巨噬细胞的招募以及活化中发挥着重要作用。包括肺癌^[5]在内的多种肿瘤细胞能够分泌MCP-1。有研究^[6]发现,MCP-1是促使BMMSCs向大鼠脑缺血部位归巢的重要因素,但目前有关HUMSCs向肿瘤归巢的机制尚不完全清楚。本研究旨在探讨MCP-1/趋化因子(C-C模体)受体2[chemokine(C-C motif)receptor 2, CCR2]轴在HUMSCs向肺癌归巢中的作用,为临床应用以HUMSCs作为载体的肿瘤靶向治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂与动物

人肺腺癌细胞A549株和表达SV40大T抗原的永生化人胚肾细胞293T株由天津医科大学肿瘤医院免疫室保存、提供。A549细胞常规培养于含10%胎牛血清的1640培养液中,293T株细胞常规培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养液中。

细胞培养所用胎牛血清(FBS)购自美国HyClone公司,RPMI 1640、DMEM/F12、IMDM购自美

国Gibco公司,Lipofectamine™2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司,MCP-1 ELISA试剂盒购自中国达科为生物技术有限公司,MCP-1 shRNA慢病毒表达载体购自中国吉凯基因有限公司,Western blotting所用鼠抗人MCP-1单克隆抗体、鼠抗人 β -actin单克隆抗体和HRP标记的兔抗鼠单克隆抗体均购自美国Abcam公司,总RNA提取试剂TRIzol购自日本TaRaKa公司,CCR2抑制剂RS504393购自美国Abcam公司,质粒提取试剂盒购自中国天根生化科技有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司。

4~5周龄雌性BALB/c裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物合格证号:SCXK(京)2012-0001],饲养于SPF洁净级的空调室内[许可证号:SYXK(津)2012-0005],颗粒饲料喂养,自由饮水。

1.2 HUMSCs的分离培养及鉴定

本实验使用的HUMSCs来源于健康新生儿脐带,分离培养参照参考文献[7]的方法进行,细胞培养于含10%胎牛血清DMEM/F12培养基中,取处于对数生长期第3~5代细胞用于实验。

取第4代生长状态良好的细胞,用含0.125%胰酶和0.01% EDTA的细胞消化液消化细胞,制成单细胞悬液,PBS清洗细胞3次,取 2×10^6 个细胞放于2个流式管中,一管分别加入荧光标记的CD73、CD90、CD105和CD166抗体,另一管加入荧光标记的HLA-DR、CD14、CD19、CD34和CD45流式抗体,混匀4℃避光孵育30 min。加入2 ml PBS,1 000 \times g离心5 min,弃上清,用1 ml PBS重悬细胞,流式细胞仪检测HUMSCs表面标志物的表达。

取第4代生长状态良好的细胞,制成单细胞悬液,取 1×10^5 个细胞接种6孔板。另取 1×10^6 个细胞于15 ml离心管中,PBS清洗3次,最后一次离心后,弃掉上清,缓慢轻轻加入1 ml成软骨诱导液,勿使细胞悬起,稍拧开盖子置于5% CO₂的37℃孵箱中培养。次日,6孔板中细胞贴壁,弃掉旧培养

基,加入 2 ml 成脂或成骨诱导液,放入孵箱继续培养。每 3 天更换诱导液。成脂和成骨诱导液均由含 10% 胎牛血清的 IMDM 配制,成脂诱导液内含 1×10^{-6} mol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、10 μ g/ml 胰岛素和 60 μ mol/L 吡哆美辛。成骨诱导液内含 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、0.2 mmol/L 维生素 C、10 mmol/L β -磷酸甘油。成软骨诱导液由 DMEM 配制,内含 1×10^{-7} mol/L 地塞米松、0.17 mmol/L 维生素 C、10 mg/L 胰岛素、5.5 mg/L 转铁蛋白、5 μ g/L 亚硒酸钠、1 mmol/L 丙酮酸钠、1.25 mg/ml BSA、0.35 mmol/L 脯氨酸。分化诱导试剂均购自美国 Sigma 公司。诱导结束后经染色鉴定诱导结果。实验重复 3 次。

1.3 ELISA 检测 A549 细胞培养上清中 MCP-1 水平

取生长状态良好的 A549 细胞,制成单细胞悬液,接种 24 孔板, 4×10^4 个/孔,分别于 24、48 和 72 h 取细胞培养上清, $3\ 000 \times g$ 、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清,适量体积分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。待样本收集完毕,按照 MCP-1 ELISA 试剂盒说明书操作,检测上清中 MCP-1 的浓度。实验重复 3 次。

1.4 Transwell 趋化实验检测不同条件下 HUMSCs 的趋化能力

利用 293T 细胞按标准操作程序包装 MCP-1 特异性的慢病毒颗粒,感染 A549 细胞,获得稳定低表达 MCP-1 的 A549 细胞系。

24 孔板中放入 600 μ l 野生型或敲低 MCP-1 表达后的 A549 细胞 48 h 培养上清,将 Transwell 小室 (8 μ m) 轻轻放入 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 孵箱中预平衡 1 h,在上室中加入 200 μ l 重悬于含 0.1% BSA 的 DMEM/F12 或经 150、600 nmol/L CCR2 抑制剂 (RS504393) 预处理 0.5 h 的 HUMSCs 细胞 2×10^4 个。5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 孵箱中孵育 5 h 后无水乙醇固定,结晶紫染色,倒置显微镜随机取 5 个视野,细胞计数。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 法检测 A549 细胞中敲低 MCP-1 的效果

弃培养基,冷 PBS 清洗野生型和 MCP-1 敲低后的 A549 细胞 2 次,加入细胞裂解液 RIPA,冰上裂解 15 min,细胞刮收集细胞裂解液,4 $^{\circ}$ C、 $12\ 000 \times g$ 离心 10 min,取上清,BCA 测定蛋白浓度后,行 SDS-PAGE 分离蛋白,电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭,一抗(鼠抗人 MCP-1 单克隆抗体,鼠抗人 β -actin 单克隆抗体)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,PBST 洗膜,加入二抗(HRP 标记的兔抗鼠单克隆抗体)室温孵育 2 h,PBST 洗膜后 ECL 显影。利用 Image J 软件做灰度

扫描后以 MCP-1 与 β -actin 灰度的比值代表 MCP-1 相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 Real-time PCR 检测 A549 细胞中的敲低 MCP-1 效果

用 TRIzol 法提取野生型和敲低 MCP-1 后的 A549 细胞总 RNA,并测定 RNA 纯度和浓度。利用 PrimeScriptTM RT Master Mix 逆转录试剂盒逆转录 RNA 生成 cDNA。反应条件为:37 $^{\circ}$ C、15 min;85 $^{\circ}$ C、15 s。反应完成后按照标准操作步骤在 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行定量检测,反应条件为:95 $^{\circ}$ C、5 s;60 $^{\circ}$ C、34 s;40 个循环。选取 *actin* 作为内参,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法从基因水平测定 MCP-1 表达。实验重复 3 次。

1.7 裸鼠肺癌皮下移植瘤模型的建立

A549 细胞经常规消化,获得单细胞悬液,PBS 清洗 3 次,调整细胞密度至 2.5×10^7 个/ml,细胞放于冰上,小鼠右侧腋下皮下注射 200 μ l 细胞悬液 (5×10^6 个)。定期观察小鼠生长状态,称量小鼠体质量,待肿瘤生长至 200 ~ 300 mm³ 时进行后续实验。肿瘤体积计算公式为 $V(\text{mm}^3) = 0.5ab^2$ (a 为长径,b 为短径)。

1.8 IVIS Xenogen 动物活体成像系统检测 HUMSCs 的肺癌归巢能力

按标准操作程序包装编码萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, Fluc) 报告基因的慢病毒颗粒,感染 HUMSCs,使其稳定表达 fLuc (MSC. Fluc)。 1×10^3 、 1×10^4 和 1×10^5 个 MSC. Fluc 分别加入 96 孔板,并设培养基空白对照。每孔加入终浓度为 150 μ g/ml 的 D-荧光素 (D-luciferin),30 s 后在成像系统上检测荧光强度。

待 A549 皮下移植瘤长至 200 ~ 300 mm³ 时,收集 MSC. Fluc,冷 PBS 洗 2 次,调整细胞密度至 2.5×10^6 个/ml,经尾静脉注射 200 μ l 细胞悬液 (5×10^5 个),同时设 PBS 空白对照组。注射后 24 h,小鼠按 150 μ g/g 腹腔注射 D-荧光素,乙醚麻醉,10 min 后活体成像系统检测 MSC. Fluc 体内生物荧光信号。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数的比较采用单因素方差分析 (LSD 法或 Dunnett post hoc 法),以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUMSCs 的成功分离与鉴定

组织块法培养脐带组织 2 周后,倒置显微镜下

观察显示,组织块周围可见贴壁细胞散在分布,细胞呈长梭形,单核(图1A)。分化诱导液诱导4周后,成脂诱导细胞经油红O染色后可见脂滴形成(图1B),成骨诱导细胞经茜素红染色后可见骨质沉积,成软骨诱导细胞经石蜡切片后甲苯胺蓝染色,发现有软骨形成(图1D)。流式细胞仪检测结果(图1C)显示,分离所得细胞几乎全部表达CD73、CD90、

CD105和CD166,不表达HLA-DR、CD14、CD19、CD34和CD45。以上结果均符合2006年国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)^[8]宣布的应用于基础和临床前研究的MSCs必须满足的3个基本条件,证明分离得到的贴壁细胞为间充质干细胞。

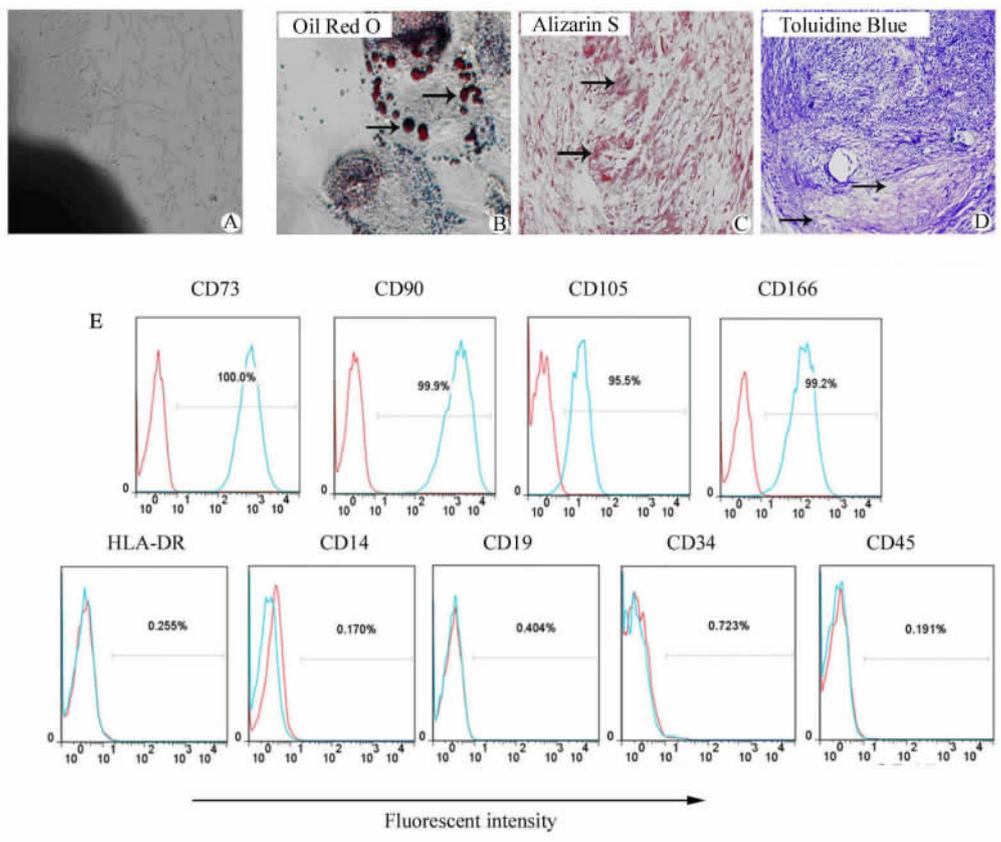


图1 人脐带间充质干细胞的分离与鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of human umbilical cord mesenchymal stem cells

“Tissue explant” method was applied to isolate HUMSCs, newborns umbilical cord tissues were cultured for 2 weeks (A, ×100), After 4 d cultured in the osteoblast inducing conditional media, the 4th generation cells derived from newborns umbilical cord were stained with oil red O (B, ×400) and alizarin red (C, ×400), paraffin sections were made from the induced chondroblast masses and stained with toluidine blue (D, ×400), and then flow cytometry analyze the cell phenotype (E)

2.2 HUMSCs 在体内外均明显向肺癌归巢

体外 Transwell 实验结果(图2A)显示,与无血清培养基对照组相比,1 × 10⁵ 和 1 × 10⁶ 个 A549 细胞条件培养基组趋化 HUMSCs 的数目明显增多 [(95.0 ± 24.0)、(156.0 ± 20.0) vs (22.0 ± 4.0) 个, 均 P < 0.01]。为检测 HUMSCs 的体内归巢,本实验首先制备了 MSC-Fluc, 其在体外可稳定表达 Fluc (图2B)。MSC-Fluc 及 PBS 经尾静脉注射入荷瘤小鼠体内,活体成像检测结果显示,与 PBS 空白对照组相比, MSC-Fluc 组荷瘤小鼠肿瘤部位检测到明显

的荧光信号 [(1.54 ± 0.08) × 10⁶ vs (1.60 ± 0.03) × 10⁵ p/(sec · cm² · sr), P < 0.01], 证实 HUMSCs 在体内向肺癌组织定向迁移(图2C)。

2.3 敲低 A549 细胞 MCP-1 的表达显著抑制 HUMSCs 向 A549 细胞的趋化能力

ELISA 检测结果(图3A)表明,肺癌细胞 A549 高表达 MCP-1,随着培养时间的延长,A549 细胞培养上清中 MCP-1 的浓度呈上升趋势。Western blotting 验证结果(图3B)显示,与 NC 对照组相比,shRNA1 和 shRNA2 敲低组 MCP-1 蛋白的相对表达量明显降低 [(0.94 ±

0.05)、(0.70 ± 0.01) vs (1.50 ± 0.06), 均 $P < 0.05$]。Real-time PCR 检测结果显示(图 3C), 与 NC 对照组相比, 敲低组 MCP-1 基因的相对表达亦明显下降($P < 0.01$), 表明通过慢病毒感染方法成功获得稳定低表达

MCP-1 的 A549 细胞系。Transwell 结果(图 3D)显示, 与 NC 对照组相比, shRNA1 和 shRNA2 敲低组趋化 HUMSCs 的能力明显下降[(80.0 ± 33.0)、(94.0 ± 16.0) vs (167.0 ± 41.0), 均 $P < 0.05$]。

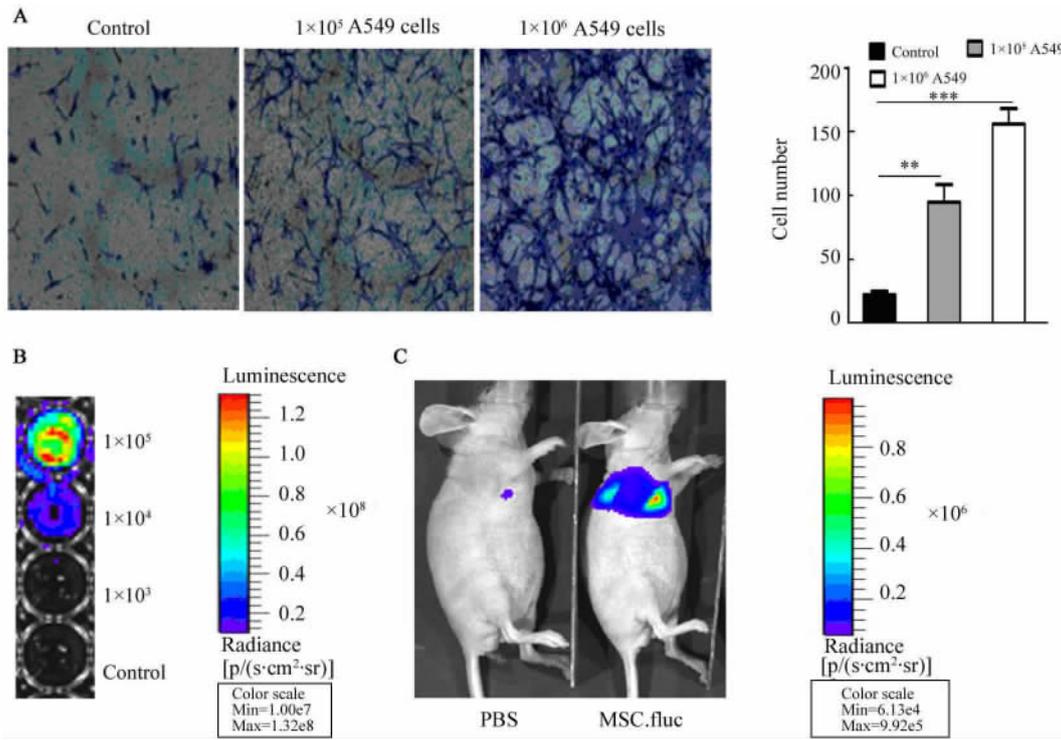


图 2 HUMSCs 向肺癌组织归巢

Fig. 2 Homing capacity of HUMSCs to lung cancer tissues

A: HUMSCs migrated to A549 condition medium *in vitro* (×100); B: MSC. fluc successfully expressed luciferase *in vitro*; C: The tropism of MSC. fluc to lung cancer tissues *in vivo*
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

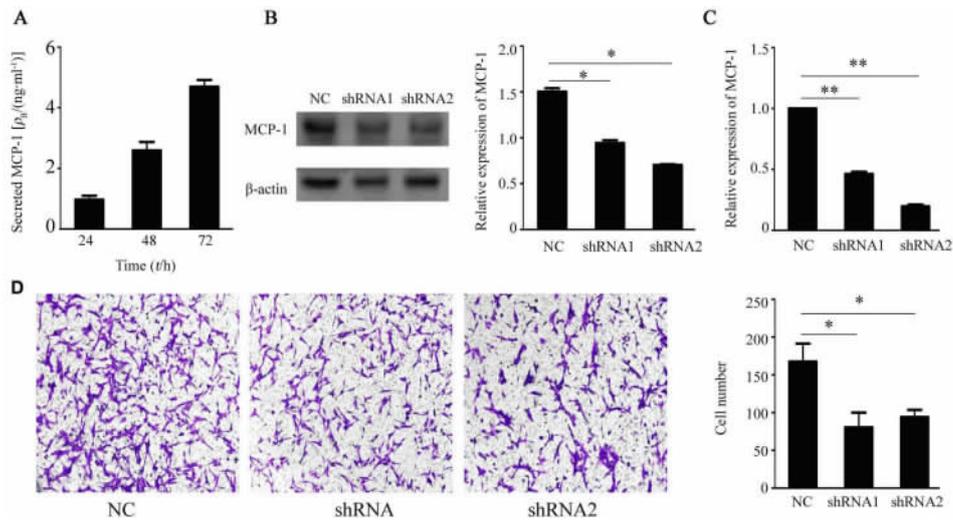


图 3 敲低 A549 细胞 MCP-1 表达抑制 HUMSCs 的迁移能力

Fig. 3 Migration abilities of HUMSCs were suppressed by knockdown of MCP-1 in A549 cells

A: MCP-1 concentration in A549 culture supernatant at different culture time detected by ELISA; B: Knockdown of MCP-1 in A549 cells by Western blotting; C: Knockdown of MCP-1 in A549 cells by Real-time PCR; D: Inhibited HUMSCs migration by knockdown of MCP-1(×100). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 抑制 HUMSCs 表面的 CCR2 表达显著减少 HUMSCs 向肺癌 A549 细胞的迁移

分别用 150、600 nmol/L 的 CCR2 抑制剂 RS504393 处理 HUMSCs, 以未处理的 HUMSCs 作为对照, 利用 Transwell 试验观察处理前后的变化。结果(图 4)显示, 与对照组相比, 150 和 600 nmol/L RS504393 处理组 HUMSCs 向肺癌细胞的趋化显著

减少[(98.0 ± 5.0)、(109.0 ± 3.0) vs (170.0 ± 15.0), 均 $P < 0.05$](图 4A)。将含 600 nmol/L RS504393 的 MSC. Fluc 经腹腔注射入荷瘤小鼠体内, 24 h 后, 活体成像的结果(图 4B)表明, HUMSCs 向肺癌组织的归巢能力明显下降[(1.54 ± 0.08) × 10⁶ vs (8.03 ± 0.51) × 10⁵ p/(sec · cm² · sr), $P < 0.05$)。

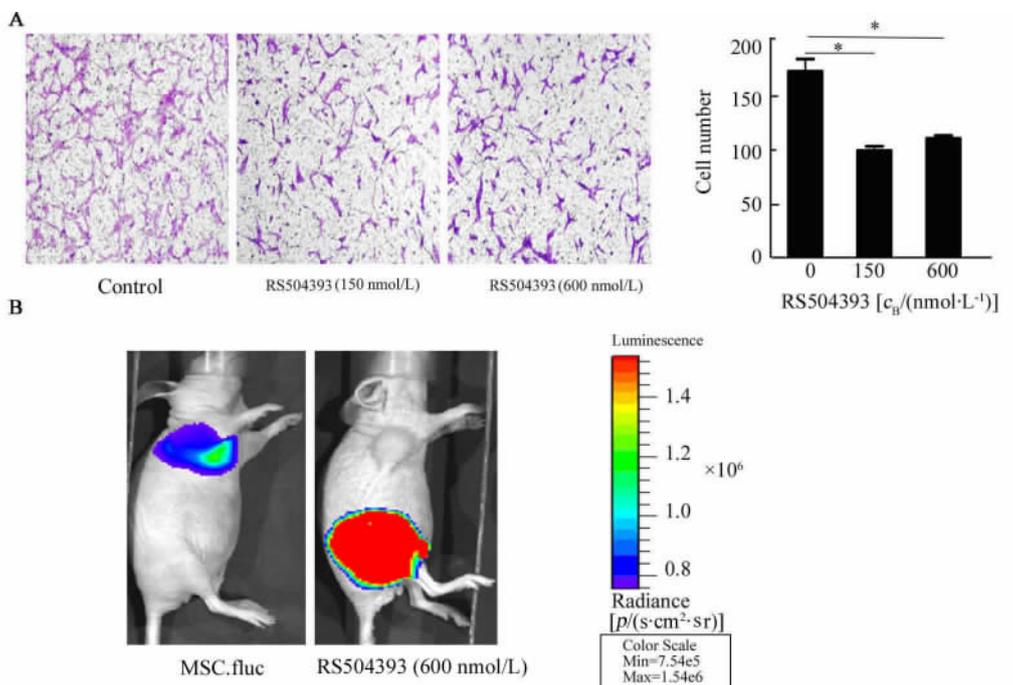


图 4 抑制 CCR2 显著减少 HUMSCs 向肺癌组织归巢

Fig. 4 Homing of HUMSCs to lung cancer tissues greatly inhibited by blockade of CCR2

A: Decreased migration of HUMSCs with inhibition of CCR2 *in vitro* (× 100);

B: Suppressed tropism of HUMSCs with blockade of CCR2 *in vivo*

* $P < 0.05$

3 讨论

肺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一。尽管检测方法和治疗方案不断改善与进步, 但肺癌的病死率仍居恶性肿瘤之首, 因此亟需寻找针对肺癌治疗的新策略。近年来基因靶向治疗已成为肺癌研究的热点。HUMSCs 因其具有归巢特性、取材方便、易扩增、无伦理学问题和多向分化等优点已成为临床靶向治疗最具希望的运输载体之一。研究 HUMSCs 的归巢机制, 使其高效归巢可为 HUMSCs 应用于临床奠定坚实基础。

HUMSCs 的归巢机制复杂, 有众多因素参与。实验研究^[9]表明, 巨噬细胞炎性蛋白 1a (macrophage inflammatory protein-1a, MIP-1a) 可以诱发小鼠

BMMSCs 的迁移。Yu 等^[10]研究发现, 基质细胞衍生因子 1/趋化因子受体 CXC4 轴在 MSC 归巢中发挥重要作用。Li 等^[11]研究证明, 血小板衍生因子 AA (PDGF-AA) 通过 BMP-Smad1/5/8-Twist1/Atf4 轴促进 MSC 的趋化迁移。此外, 胎盘生长因子、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子等均与 MSC 的归巢有关^[12-13]。

本研究发现, MCP-1 与其特异性受体 CCR2 组成的 MCP-1/CCR2 轴在 HUMSCs 靶向肺癌趋化过程中扮演着至关重要的角色。1989 年, Yoshimura 等^[14]首次从神经胶质瘤细胞株的培养上清中得到 MCP-1。多种细胞能够分泌 MCP-1, 包括正常组织细胞、白细胞及许多肿瘤细胞等。本研究通过 ELISA 检测发现, 肺癌细胞 A549 高表达 MCP-1。

MCP-1/CCR2 轴参与信号转导,参与病理状态下的炎症反应、血管生成和损伤修复。

有关 MCP-1 在 MSCs 归巢中的作用的研究较少,且存在争议。有研究^[9]表明,MCP-1 在 BMMSCs 的迁移过程中不起作用。但是,Guo 等^[15]研究证明,MCP-1 能够促进 BMMSCs 向扩张心肌部位迁移。Ryan 等^[16]通过体外迁移实验发现,MCP-1 在小鼠 BMMSCs 的迁移过程中发挥重要作用。目前,有关 MCP-1 在 HUMSCs 向肺癌组织趋化中的作用报道甚少。本研究利用 Transwell 趋化实验和动物活体成像技术发现 HUMSCs 在体内外均可向肺癌组织归巢 ($P < 0.01$)。敲低肺癌细胞 A549 的 MCP-1 表达后,HUMSCs 趋化 A549 细胞的数目明显减少 ($P < 0.05$);用抑制剂封闭 HUMSCs 表面 MCP-1 的受体 CCR2 后,体内外 HUMSCs 向肺癌组织的趋化能力均显著减弱 ($P < 0.05$),说明了 MCP-1/CCR2 轴能够促进 HUMSCs 向肺癌归巢。

综上,MCP-1/CCR2 轴参与 HUMSCs 向肺癌组织的趋化过程,并在其中发挥重要作用,本研究为临床应用以 HUMSCs 作为载体的肿瘤靶向治疗提供新的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] VAANANEN H K. Mesenchymal stem cells [J]. *Ann Med*, 2005, 37(7): 469-479. DOI: 10.1080/07853890500371957.
- [2] FONG C Y, SUBRAMANIAN A, BISWAS A, et al. Derivation efficiency, cell proliferation, freeze-thaw survival, stem-cell properties and differentiation of human Wharton's jelly stem cells [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 21(3): 391-401. DOI: 10.1016/j.rbmo.2010.04.010.
- [3] ROURA S, PUJAL J M, BAYES-GENIS A. Umbilical cord blood for cardiovascular cell therapy: from promise to fact [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1254: 66-70. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06515.x.
- [4] GAUTHAMAN K, FONG C Y, SUGANYA C A, et al. Extra-embryonic human Wharton's jelly stem cells do not induce tumorigenesis, unlike human embryonic stem cells [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(2): 235-246. DOI: 10.1016/j.rbmo.2011.10.007.
- [5] YOSHIMURA T, LIU M Y, CHEN X, et al. Crosstalk between tumor cells and macrophages in stroma renders tumor cells as the primary source of MCP-1/CCL2 in Lewis lung carcinoma [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 332. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00332.
- [6] WANG L, LI Y, CHEN J, et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(7): 831-836. PMID: 12135683.
- [7] MA L, FENG X Y, CUI B L, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells [J]. *Chin Med J*, 2005, 118(23): 1987-1993. PMID: 16336835.
- [8] DOMINICI M, Le BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- [9] TAKANO T, LI Y J, KUKITA A, et al. Mesenchymal stem cells markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *Lab Invest*, 2014, 94(3): 286-296. DOI: 10.1038/labinvest.2013.152.
- [10] YU Q, LIU L, LIN J, et al. SDF-1 alpha/CXCR4 Axis mediates the migration of mesenchymal stem cells to the Hypoxic-ischemic brain lesion in a rat model [J]. *Cell J*, 2015, 16(4): 440-447. PMID: 25685734.
- [11] LI A N, XIA X C, YEH J, et al. PDGF-AA promotes osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cell by down-regulating PDGFRalpha and derepressing BMP-Smad1/5/8 signaling [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e113785-e113785. DOI: 10.1371/journal.pone.0113785.
- [12] PARK S J, KIM K J, KIM W U, et al. Interaction of mesenchymal stem cells with fibroblast-like synoviocytes via cadherin-11 promotes angiogenesis by enhanced secretion of placental growth factor [J]. *J Immunol*, 2014, 192(7): 3003-3010. DOI: 10.4049/jimmunol.1302177.
- [13] TOMASONI S, LONGARETI L, ROTA C, et al. Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5): 772-780. DOI: 10.1089/scd.2012.0266.
- [14] YOSHIMURA T, ROBINSON E A, TANAKA S, et al. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants [J]. *J Exp Med*, 1989, 169(4): 1449-1459.
- [15] GUO J, ZHANG H, XIAO J, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the myocardial homing of mesenchymal stem cells in dilated cardiomyopathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 8164-8178. DOI: 10.3390/ijms14048164.
- [16] RYAN C M, BROWN J A, BOURKE E, et al. ROCK activity and the Gbetagamma complex mediate chemotactic migration of mouse bone marrow-derived stromal cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 136. DOI: 10.1186/s13287-015-0125-y.

[收稿日期] 2015-09-06

[修回日期] 2015-11-04

[本文编辑] 阮芳铭