

文章编号: 1005-8982(2015)36-0026-05

·论著·

## 肿瘤坏死因子相关凋亡配体转染骨髓干细胞后 对 U251 胶质瘤细胞的体外靶向抗癌作用

李伟<sup>1</sup>,王道奎<sup>2</sup>,王增武<sup>2</sup>,宋仁兴<sup>2</sup>

(1.潍坊医学院 山东 潍坊 261053;2.山东省潍坊市人民医院 神经外科,山东 潍坊 261041)

**摘要:**目的 探究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)体外转染骨髓干细胞(BMSCs)后对 U251 胶质瘤细胞生长及凋亡的作用。方法 利用 Transwells 小室研究骨髓干细胞的肿瘤迁徙性。将携带 TRAIL 的质粒体外转染人骨髓干细胞,采用 PCR 及 Western blot 检测转染后 BMSCs 中目的基因的表达强度。将转染的 BMSCs 与 U251 细胞体外共培养,采用流式细胞仪检测转染后的 BMSCs 诱导 U251 细胞的凋亡情况。结果 BMSCs 具备向肿瘤细胞的迁徙性。转染后的骨髓干细胞表达、分泌 TRAIL,且干细胞凋亡情况无变化。将转染后的 BMSCs 与 U251 细胞共同培养,可明显提高 U251 细胞的凋亡率,BMSCs TRAIL+U251 组 U251 细胞凋亡率明显高于对照组( $P < 0.05$ )。结论 在体外实验中,利用 BMSCs 肿瘤迁徙的特异性,将 BMSCs 作为基因载体,可提高 TRAIL 对 U251 胶质瘤细胞的靶向抑癌作用。

**关键词:** 肿瘤坏死因子相关凋亡配体;U251 胶质瘤细胞;基因治疗

中图分类号: R739.41

文献标识码: A

## *In vitro* targeted antitumor effects of bone marrow stem cells transfected by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against U251 glioma cells

Wei LI<sup>1</sup>, Dao-kui WANG<sup>2</sup>, Zeng-wu WANG<sup>2</sup>, Ren-xing SONG<sup>2</sup>

(1. Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, P.R. China; 2. Department of Neurosurgery, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261041, P.R. China)

**Abstract:** [Objective] To study the targeted antitumor effects of bone marrow stem cells (BMSCs) transfected by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) against glioma *in vitro*. [Methods] The migration capacity of BMSCs toward glioma was investigated using Transwells inserts. The *in vitro* expression of target gene in transfected BMSCs was detected by PCR and Western blot. The apoptosis of U251 cells was analyzed by flow cytometry after the co-culture with the transfected BMSCs. [Results] First, BMSCs had the capacity of mobilizing toward tumor cells. Second, although the BMSCs expressed and secreted TRAIL, their apoptosis was unchanged. Third, the apoptosis rate of U251 cells increased significantly after the co-culture with the transfected BMSCs ( $P < 0.05$ ). [Conclusions] Using BMSCs as gene vectors, the targeted antitumor effects of TRAIL against U251 glioma cells can be increased by the specific mobility of BMSCs towards tumor *in vitro*.

**Key words:** TRAIL; U251 cell; gene therapy; BMSC

脑胶质瘤为颅内最常见的恶性肿瘤,死亡率居颅内肿瘤的首位,呈浸润侵袭性生长,术后极易复发,5年生存率不到20%。TNF相关的凋亡诱导配体

(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)属于TNFSF中的成员之一,可与膜受体结合诱导细胞发生凋亡,且对正常的组织和细胞

无毒性作用<sup>[1]</sup>。

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有很强的分化能力,在合适的条件下可以分化成骨、软骨、脂肪组织等多种组织细胞<sup>[2-4]</sup>。BMSCs 的这一特点及其靶向迁徙的能力<sup>[5]</sup>使它在基因治疗中具有了独特的价值。BMSCs 可作为理想的分子载体,通过外源治疗基因 TRAIL 修饰后的 BMSCs 可以向受损组织趋化及发挥修复作用。由此可知, BMSCs 经过肿瘤杀伤基因修饰后有可能携带治疗性物质靶向杀伤肿瘤细胞。本实验将 TRAIL 的选择性杀伤细胞作用与 BMSCs 的肿瘤细胞迁徙性相结合,探究 TRAIL 转染骨髓干细胞后靶向治疗脑胶质瘤的潜在价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 细胞和主要试剂 人骨髓间充质干细胞购于美国 Millipore 公司, U251 胶质瘤细胞株购自南京凯基生物公司,血清和 DMEM 培养基均购于美国 Millipore 公司, RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 逆转录-聚合酶链反应) 试剂盒, 美国 BIO-RAD 公司, Trizol 试剂, Invitrogen 公司, 质粒提取盒, 天根生化科技有限公司, 转染试剂 (Trans IT-2020), Invitrogen 公司, 流式试剂, 美国 BD 公司, 一抗、二抗, 英国 Abcam 公司, 质粒由加拿大 UBC 大学实验室提供。

1.1.2 细胞培养与传代 取出 BMSC(U251) 冷冻保存细胞于 37℃ 水浴锅中迅速复苏, 将细胞液移于离心管中离心、收集细胞, 再加入含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的完全培养基, 充分吹打悬浮细胞, 移于培养瓶中, 置于 37℃、5% 二氧化碳孵育箱培养, 待细胞长到 80%~90% 时, 用 0.25% 胰酶消化、收集细胞, 进行传代培养。

### 1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 向肿瘤细胞迁徙的体外实验 利用 8 μm 孔径的 Transwells 小室进行 BMSCs 迁徙实验。将 1 × 10<sup>5</sup> 个/ml BMSCs 置于上室, U251 胶质瘤细胞置于下室, 然后置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中 24 h, 取下滤膜, 用 PBS 冲洗 2 遍, 并用细胞铲刮除黏附的细胞, 甲醛固定 30 min, 风干后用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 随机选取 5 个视野在显微镜下观察、计数。

1.2.2 质粒的扩增与提取 质粒属于绿色荧光蛋白

的分泌型 TRAIL 真核表达质粒, 内含有目的基因 TRAIL 以及抗 AMP (ampicillin, 氨苄青霉素) 片段, 置于 -20℃ 保存备用。取质粒与感受态细胞 (由实验室提供) 冰上解冻, 将两者混匀后于 42℃ 水浴 90 s, 加入 LB 培养基 (Luria-Bertani 培养基), 摇床振荡复苏细胞; 在选择性培养板 (AMP) 上涂板, 过夜培养。挑取单菌落加入含 AMP 的 LB 培养基中振荡培养, 待 LB 变浑, 采用高纯度质粒小提中量试剂盒 (tiangen) 进行提取, 具体参照试剂盒说明书, 提取的质粒置于 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 质粒转染 BMSC 细胞 待细胞达 80% 左右时进行转染, 转染前细胞用无双抗培养基培养 24 h。将含 TRAIL 的质粒溶于 Opti-MEM 培养基中混匀, 另取转染试剂 Trans IT-2020 溶于 Opti-MEM 培养基混匀, 将两溶液吹打混匀后立即加入细胞中, 并边加边摇, 置于 37℃、5% 二氧化碳孵育箱中培养, 6 h 后换成完全培养基。培养 24~48 h 后于显微镜下观察。

1.2.4 质粒转染的 BMSCs 中目的基因的表达 应用 PCR 检测 TRAIL 基因的表达情况, 培养 24 h 后收集各组 BMSC 细胞, 用 PBS (phosphate balanced solution, 磷酸缓冲液) 冲洗 3 次, 加入 Trizol 裂解细胞, 严格按照说明书提取总 RNA (ribonucleic acid, 核糖核酸)。引物序列通过 Olig 6 软件设计, 由宝生物公司合成。扩增 TRAIL 基因编码序列的引物: 正向 5'-TGACTGTGGCTGTGACTTA-3'; 反向 5'-ACTCCCAGGTTTCTATCTT-3'。β-actin 的正向 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; 反向 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。PCR 扩增条件: 共 30 个循环, 每个循环包括 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s。同时扩增管家基因 β-actin 作为对照验证。每孔加 5 μl 样品, 并在一侧加入 5 μl 的 2 000 Marker, 进行琼脂糖凝胶电泳, 20 min 后获取图片, 并对数据进行分析。

应用 Western blot 法检测相关蛋白的表达水平, β-actin 作为内参。培养 48 h 后收集各组细胞蛋白产物, 取 50 μl 样本与 5 × SDS-PAGE 缓冲液混合, 电泳后经转膜仪将样本转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 经漂洗、封闭、一抗 (抗 TRAIL) 孵育、二抗孵育, 检测结果并通过 Image J2X 软件扫描图像及定量分析。

1.2.5 流式细胞仪检测 U251 细胞的凋亡率 各实验组细胞处理 48 h 后, 收集培养基到新的离心管中, 加 PBS 冲洗 3 次, 将冲洗液吸取到相应离心管中

(避免丢失悬浮的凋亡细胞影响实验结果)。用 0.25%胰酶消化、收集细胞到相应的离心管,1 000 r/min,离心 5 min。用预冷的 PBS 冲洗 3 次,然后用 1 × bind buffer 将细胞配成(1-5) × 10<sup>4</sup>/ml 的细胞悬液,取 100 μl 加入新的 EP 管中,每管加 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI(propidium iodide),暗环境培养 15 min 后加入 400 μl 1 × bind buffer,立即用流式细胞仪检测,1 h 内完成,并分析实验结果(实验需设置 3 组质控样本)。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用配对资料 *t* 检验,各组数据均符合正态分布,转染后的 BMSCs 细胞对 U251 细胞的增殖抑制率及凋亡率比较,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 向 U251 细胞的迁徙能力

应用 Transwell 法验证 BMSCs 向肿瘤细胞的迁徙能力,BMSCs 与 U251 细胞共培养 48 h 后,随机选取 5 个视野在显微镜下观察、计数,可见 U251 细胞培养液可刺激更多的 BMSCs 发生迁徙,与生理盐水及培养基比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)(见图 1)。荧光显微镜下发现,BMSCs 主要聚集于 U251 细胞周围,而在无 U251 细胞的培养基周围仅散在少量 BMSCs(见图 2)。由此可证明,BMSCs 向肿瘤细胞迁徙的特异性。

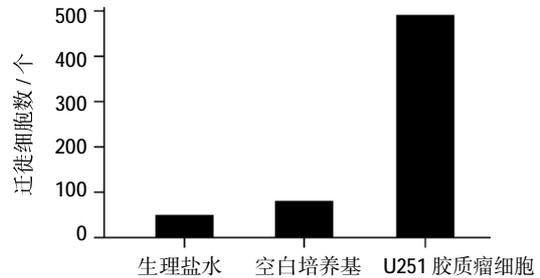
### 2.2 RT-PCR 及 Western blot 检测目的基因表达

通过 PR-PCR 扩增,将扩增的目的基因分别加样进行琼脂糖电泳,经 20 min 后观察结果并成像(见图 3)。结果显示条带随培养时间的延长依次由淡变亮,表明 TRAIL 在 BMSCs 内成功表达。应用 Western blot 法检测转染组与未转染组目的基因的表达情况,可见转染组的 TRAIL 表达与 PCR 结果有相同效果,随着培养时间的延长表达量相继增加,β-actin 在不同细胞的表达量无差异。见图 4。

### 2.3 流式细胞仪检测 U251 细胞的凋亡率

采用 Annexin V/PI 双染色法进行检测各组 U251 细胞的凋亡情况并记录数据,U251 细胞的凋亡率取右下象限(见图 5),即 Annexin V-FITC(+)/PI(-),由表 1 可见转染组诱导 U251 细胞的凋亡率与空白组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),而未转染组与空白组比较差异不明显(*P* > 0.05)。TRAIL 对

BMSCs 的凋亡作用见图 6。由表 2 可见转染的 TRAIL 对 BMSCs 无明显毒性作用(*P* > 0.05)。



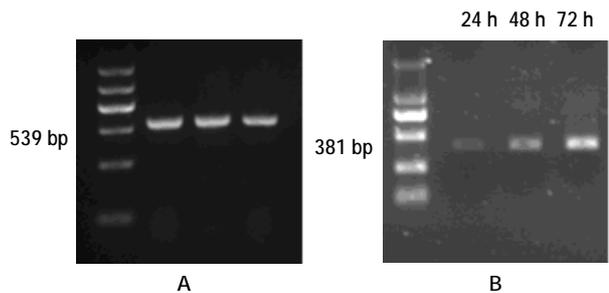
生理盐水及培养基仅诱导少量的 BMSCs 发生迁徙比较,U251 细胞培养液可刺激更多的 BMSCs 发生迁徙(*P* < 0.05)

图 1 BMSCs 向肿瘤细胞的迁徙能力



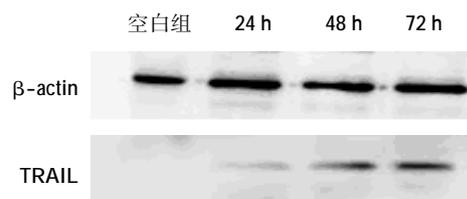
质粒属于绿色荧光蛋白的分泌型 TRAIL 真核表达质粒,转染后的 BMSCs 置于上室,U251 胶质瘤细胞置于下室,共培养 48 h 后,可见 BMSCs 透过 Transwell 小室,且主要聚集于 U251 细胞周围,而无 U251 细胞的地方较少

图 2 荧光显微镜下观察,BMSCs 透过 Transwell 小室向肿瘤细胞的迁徙能力 (× 200)



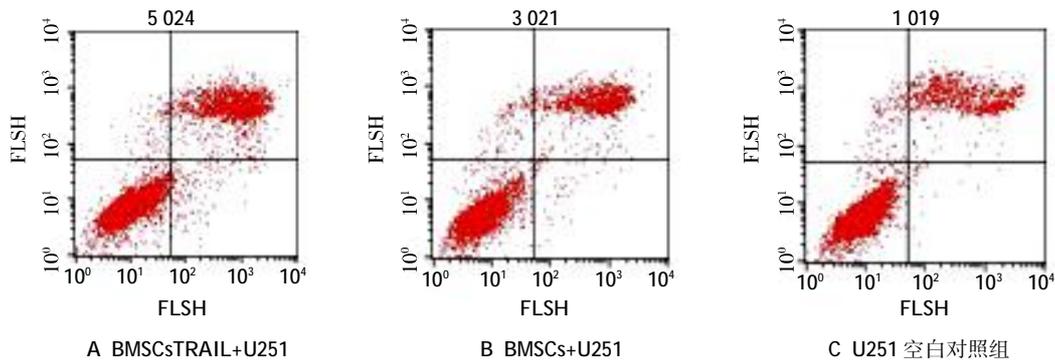
A: β-actin 组;B: TRAIL 组。TRAIL 组又分为 24、48 和 72 h 组。可见 TRAIL 条带的表达量随时间呈递增趋势

图 3 RT-PCR 检测转染后 TRAIL 基因的表达情况



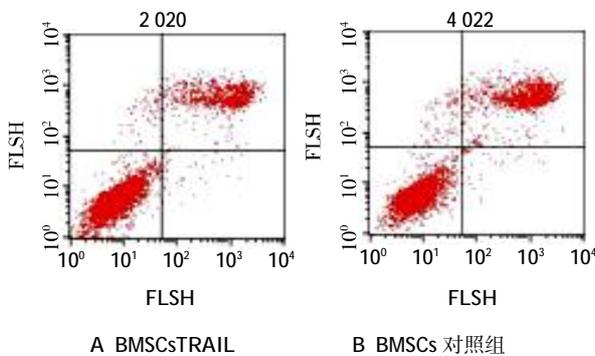
取未转染的 BMSCs 培养 48 h 后提取 TRAIL 表达蛋白产物行 Western blot 检测作为对照组;以转染后的 BMSCs 表达产物作为实验组,并依次分为 24、48 和 72 h 组,证明 TRAIL 的表达量随时间递增

图 4 应用 Western blot 法检测转染后 TRAIL 的表达情况



A: 实验以 BMSCsTRAIL+U251 作为实验组;B: BMSCs+U251 作为阴性对照;C: 单纯 U251 细胞作为空白对照组。共同培养 48 h 后收集细胞于新的离心管,分别加入 Annexin V/PI 试剂后行流式细胞检测,可见 BMSCs TRAIL+U251 组 U251 细胞凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.05$ )

图 5 流式细胞仪检测共同培养 48 h 后 U251 细胞的凋亡率



A: 实验以 BMSCsTRAIL 作为实验组;B: 单纯 BMSCs 作为对照组。共同培养 48 h 后行流式细胞检测,可见两组 BMSCs 的细胞凋亡率比较 ( $P > 0.05$ ),证明 TRAIL 对 BMSCs 无影响

图 6 流式细胞仪检测 TRAIL 对 BMSCs 的促凋亡作用

表 1 流式细胞仪检测共同培养 48 h 后 U251 细胞的凋亡率 (% ,  $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	BMSCsTRAIL+U251	BMSCs+U251	空白对照组
凋亡率	2.98 000 ± 0.15 395 <sup>1)</sup>	0.81 330 ± 0.50 083 <sup>2)</sup>	0.39 670 ± 0.29 569

注:1)与 BMSCs+U251 组比较,  $P < 0.05$ ;2)与空白对照组比较,  $P > 0.05$

表 2 流式细胞仪检测转染 48 h 后 BMSCs 的凋亡率 (% ,  $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	BMSCs TRAIL	BMSCs 对照组	P 值
凋亡率	0.68 000 ± 0.15 395	0.67 670 ± 0.29 569	0.340

### 3 讨论

人脑胶质瘤是神经外科最常见恶性肿瘤,发病迅速,致死率高<sup>[6-7]</sup>,目前针对脑胶质瘤的治疗有放疗、化疗、手术治疗,但治愈率很低,术后极易复发<sup>[8]</sup>,5 年生存率也不足 20%。因此,对脑胶质瘤是治愈要探索新的治疗手段,众所周知,细胞的分化受到基因

的严密调节,能否选择一种方法在肿瘤细胞的生长分化过程中杀伤肿瘤细胞呢?许多专家已经证实肿瘤坏死因子和抑癌基因在调控细胞生长分化中至关重要<sup>[9]</sup>,所以,基因治疗脑胶质瘤可能成为根治胶质瘤的有效方法。

TRAIL 是肿瘤坏死因子家族的最新成员,可与肿瘤细胞膜上的 DR5 结合,再通过一系列级联反应组成 DR5-FADD-Caspase 8(DISC)死亡诱导信号复合体,激活 Caspase 8,诱导肿瘤细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>,而对正常细胞无影响<sup>[11]</sup>。另外,也有相关文献证明 TRAIL 联合放化疗可显著增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性,增加耐药性肿瘤的凋亡,因此,TRAIL 日益受到人们的重视,但是 TRAIL 在肿瘤治疗中的应用较为局限,原因有:①TRAIL 在血浆内的半衰期极短,大约小于 1 h<sup>[12]</sup>;②具备生物活性的 TRAIL 必须以三聚体的形式存在,故难以透过血脑屏障发挥作用;③应用腺病毒基因疗法体外能诱导数种人肿瘤细胞凋亡,但体内有引起宿主抗病毒免疫反应的可能。BMSCs 的肿瘤迁徙性已在许多文献中被证实,可能是肿瘤细胞分泌相关性因子,从而诱导 BMSCs 发生迁徙,BMSCs 的这一特性为靶向杀伤肿瘤细胞提供了理想的载体。BMSCs 可以向肿瘤组织趋化,定位于其间质中增殖、分化<sup>[13]</sup>,所以将目的基因转入骨髓干细胞,通过骨髓干细胞将治疗基因带入肿瘤组织,由于治疗基因的存在及分泌杀伤物质从而达到肿瘤的抑制作用。本实验主要是探究 TRAIL 基因作为目的基因转染骨髓干细胞后对 U251 胶质瘤细胞的体外靶向抗瘤作用。

实验构建 TRAIL 的表达载体转染骨髓干细胞,转染成功后,通过 PCR 及 Western blot 检测转染后

TRAIL 的表达,由图 3、4 可知转染后的 TRAIL 基因在 BMSCs 中表达,且 TRAIL 的表达量随时间延长而增加。选择第 3 天的转染组与 U251 胶质瘤细胞共培养,并利用流式细胞仪检测 U251 细胞的凋亡率,发现实验组 U251 细胞的凋亡率明显增加, BMSCs 作为基因载体诱导肿瘤细胞凋亡,自身却不发生凋亡。由此推断, BMSCs 作为有效的基因载体, 不仅克服 TRAIL 基因在血浆中半衰期短的难题,而且 TRAIL 修饰后的 BMSCs 具备靶向抗瘤的作用,这为恶性胶质瘤的治疗提供了新的途径。

综上所述,在体外实验中利用 BMSCs 肿瘤迁徙的特异性,将 BMSCs 作为基因载体,可提高 TRAIL 对 U251 胶质瘤细胞的靶向抑瘤作用。但 U251 细胞仅属于脑胶质瘤细胞的一个细胞系,不能反映所有颅脑肿瘤的特性,对其他类型的脑瘤细胞仍需进一步的研究证实。

#### 参 考 文 献:

- [1] EHTESHAM M, KABOS P, GUTIERREZ MA, et al. Induction of glioblastoma apoptosis using neural stem cell mediated delivery of tumornecrosis factorrelated apoptosisinducing ligand[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(24): 7170-7174.
- [2] CARROLL SH, RAVID K. Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2013, 15: e1.
- [3] DI BERNARDO G, MESSINA G, CAPASSO S, et al. Sera of overweight people promote in vitro adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(1): 4.
- [4] CHIU LH, LAI WF, CHANG SF, et al. The effect of type II collagen on MSC osteogenic differentiation and bone defect repair[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(9): 2680-2691.
- [5] EDITH MJ, NATHALIE MD, EDWARD EL, et al. CD4<sup>+</sup> T-cell help controls CD8<sup>+</sup> T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death[J]. *Nature*, 2005, 434(7029): 88-93.
- [6] 苗旺, 刘晓东, 范益民, 等. 人脑胶质瘤中 RhoA 的表达及其临床意义[J/CD]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5(9): 2549-2553.
- [7] KREISL T, ZHANG W, ODIN Y, et al. A phase II trial of single-agent bevacizumab in patients with recurrent anaplastic glioma[J]. *Neuro Oncol*, 2011, 13(10): 1143-1150.
- [8] RAHMAN R, SMITH S, RAHMAN C, et al. Antiangiogenic therapy and mechanisms of tumor Resistance in malignant glioma [J]. *Oncol*, 2010, 11(4): 2510-2516.
- [9] ADACHI J, OHBAYASHI K, SUZUKI T, et al. Cell cycle arrest astrocytic differentiation resulting from PTEN expression in glioma cells[J]. *Neurosurg*, 1999, 91(5): 822-830.
- [10] BELLAIL AC, TSE MC, SONG JH, et al. DR5-medical DJSC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas[J]. *J cell Mol Med*, 2010, 14(6A): 1303-1317.
- [11] 张相华, 徐汉军, 张力, 等. 外源性 TRAIL 基因转染对胶质瘤 C6 细胞凋亡的实验研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(6): 512-515.
- [12] FESIK SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery[J]. *Neurochem*, 1999, 73: 2438-2357.
- [13] WANG H, CAO F, DE A, et al. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumorbearing mice by bioluminescence imaging[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7): 1548-1558.

(张西倩 编辑)