

间充质干细胞释放 Dkk-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 途径的实验研究*

乔玲 徐治立 谭旭 叶丽虹** 张晓东**

(南开大学生命科学学院教育部生物活性材料重点实验室, 天津 300071)

摘要 研究表明, 间充质干细胞具有向肿瘤细胞定向迁移并且抑制肿瘤细胞的特性, 然而其分子机理目前尚不清楚. 为了探讨间充质干细胞抑制肿瘤细胞作用的分子机制, 应用 BMMS-03 人间充质干细胞的条件培养液作用于 MCF-7 乳腺癌细胞, 通过软琼脂克隆形成实验、MTT 实验、免疫印迹和免疫荧光染色等技术观察细胞克隆形成、增殖和基因表达的变化. 结果显示: 在 BMMS-03 细胞条件培养液作用下, MCF-7 细胞的克隆形成和增殖受到了明显的抑制, β -catenin 及其下游靶蛋白 c-Myc、Bcl-2、PCNA 和 survivin 的表达被明显下调, MCF-7 细胞浆和细胞核内 β -catenin 的表达被明显抑制. BMMS-03 细胞中 Dkk-1 的表达水平与 MCF-7 细胞相比较高. 利用抗 Dkk-1 的抗体中和 BMMS-03 细胞条件培养液中的 Dkk-1 后, 可明显拮抗 BMMS-03 细胞条件培养液对 MCF-7 细胞中 β -catenin 及 c-Myc 表达的抑制作用, 基因转染使 MCF-7 细胞过表达 Dkk-1 后, MCF-7 细胞的 β -catenin 及 c-Myc 的表达明显下调. 同样经基因转染使 BMMS-03 细胞过表达 Dkk-1 后, 其条件培养液可进一步下调 MCF-7 细胞 β -catenin 及 c-Myc 的表达. 上述结果表明, 间充质干细胞 BMMS-03 对乳腺癌 MCF-7 细胞的恶性表型具有明显抑制作用, 其分子机制与间充质干细胞释放 Dkk-1 抑制乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 信号途径有关.

关键词 间充质干细胞, 乳腺癌细胞, Wnt/ β -catenin 途径, Dkk-1

学科分类号 Q279, R364.7

干细胞具有很好的应用前景, 干细胞移植在临床治疗肿瘤中正发挥着重要的作用, 然而其分子机理目前尚不清楚. 研究表明, 肿瘤细胞和干细胞具有相似的生长调控机制, 如 Wnt、BMP 和 Notch 等信号途径^[1~3]. Wnt 途径可影响细胞增殖、分化、凋亡以及粘附等多方面的功能, 在胚胎发育、干细胞的增殖分化以及肿瘤的发生发展中起重要作用^[4~6]. 当 Wnt 信号存在时, β -连环蛋白 (β -catenin) 的降解被抑制, 后者进入细胞核与 T 细胞因子 / 淋巴样增强因子 -1 (TCF/LEF-1) 形成复合体, 可特异地结合靶基因 c-Myc、PCNA、Bcl-2 和 survivin 等的启动子, 进而引起靶基因的表达^[7, 8]. Wnt 信号异常活跃可导致肿瘤的发生. Dickkopf (Dkk) 蛋白、分泌型卷曲蛋白相关蛋白 (sFRP) 和 Wnt 抑制因子 -1 (Wif1) 是 Wnt 途径的细胞外抑制因子^[9~12], 已有文献报道间充质干细胞能够分泌 Dkk-1 分子^[13]. 本研究对 Wnt 途径在间充质干细胞抑制肿瘤细胞中的作用进行了初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

进口胎牛血清、RPMI-1640、低糖的 DMEM (L-DMEM)、IMDM 和 OMEM 购自 Gibco 公司; 兔抗人 PCNA 多克隆抗体购自 Labvision 公司; 鼠抗人 Bcl-2、survivin 和 c-Myc 的单克隆抗体购自 Neomarkers 公司; 兔抗人 β -catenin 多克隆抗体、兔抗人 Dkk-1 多克隆抗体、鼠抗人 β -tubulin 单克隆抗体、Cy3 标记的羊抗兔荧光二抗、4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 和正常兔 IgG 购自 Sigma 公司; HRP 标记的二抗和 Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) detection kit 购自 Amersham pharmacia biotech 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 3-(4,5-dimethylthiazol-

*国家自然科学基金资助项目(30570698); 天津市科技发展计划应用基础研究重点项目(033801211).

** 通讯联系人. Tel: 022-23506830

E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn, yelihong@nankai.edu.cn

收稿日期: 2007-03-14, 接受日期: 2007-05-25

2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 购自 Genview 公司; 其余为国产分析纯或优级纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养. 间充质干细胞 BMMS-03, 来源于人胎儿骨髓, 由本室建立^[14]; 人乳腺癌 MCF-7 细胞, 由本室储备. BMMS-03 细胞的培养条件: 含 10% 进口胎牛血清的 L-DMEM/IMDM 培养基 (1:1), 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 37℃, 5% 二氧化碳饱和湿度下贴壁培养, 传代用 0.125% 胰蛋白酶 (含 0.1% EDTA) 消化. MCF-7 细胞的培养条件: 含 10% 进口胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 100 U/ml 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 37℃, 5% 二氧化碳饱和湿度下培养, 传代用 0.25% 胰蛋白酶消化. 条件培养液处理 MCF-7 细胞的方法如下: 用含 10% 进口胎牛血清的 L-DMEM/IMDM 培养基 (1:1) 培养 BMMS-03 细胞, 细胞长满后取上层培养液, 过滤后取 10 ml, 与 90 ml 含 10% 进口胎牛血清 RPMI-1640 培养基混合, 培养 MCF-7 细胞, 条件培养液每作用 24 h 更新一次. 对照组为取 10 ml 含 10% 进口胎牛血清的 L-DMEM/IMDM 培养基 (1:1) 与 90 ml 含 10% 进口胎牛血清 RPMI-1640 培养基混合, 培养 MCF-7 细胞.

1.2.2 软琼脂克隆形成实验. 5.0% 的低熔点琼脂糖溶液高压灭菌后, 用 RPMI-1640 培养基稀释成 0.5% 的溶液, 每孔 800 μ l 加入 24 孔培养板的底层, 置于 4℃ 冷却凝固. 制备 MCF-7 细胞悬液, 并进行细胞计数. 配制 0.3% 的低熔点琼脂糖溶液, 内含 MCF-7 细胞 1×10^3 个 /ml, 实验组加入 10% 的 BMMS-03 细胞条件培养液, 每孔 800 μ l 加入 24 孔培养板上层. 冷却凝固, 继续培养 2 周, 其间补加 BMMS-03 细胞条件培养液. 在显微镜下观察克隆形成情况, 计数含 50 个以上细胞的克隆数.

1.2.3 MTT 分析. 制备 MCF-7 细胞悬液, 浓度为 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个 /ml, 取 100 μ l 置于 96 孔培养板内培养, 并加入 10% BMMS-03 细胞的条件培养液, 持续作用 4 天, 其间每 24 h 更换条件培养液. 加入 10 μ l 0.5% 的 MTT, 37℃ 温育 4 h. 弃去培养液, 加入 150 μ l 的二甲基亚砷 (DMSO) 温育 15 min, 在波长 570 nm 处测定每孔的吸光度值 (A)^[15].

1.2.4 免疫印迹分析. MCF-7 细胞用预冷的 PBS 洗 3 次, 加入适量细胞裂解液和蛋白酶抑制剂混合物裂解细胞, 4℃ 作用 30 min. 然后 4℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 测定蛋白质浓度, -70℃ 保

存. 样品进行 SDS-PAGE 分析后, 应用电转移法将蛋白质条带转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜. 分别加一抗, 室温下孵育 2 h. 洗膜后加 HRP 标记的二抗于室温下孵育 1 h, 通过化学发光法试剂 ECL 进行显影.

1.2.5 免疫荧光染色. 将 MCF-7 细胞接种在盖玻片上, 用含有 10% BMMS-03 条件培养液的 RPMI-1640 培养液 (对照组不加 BMMS-03 条件培养液) 作用 4 天后, 用 -20℃ 预冷的无水甲醇于 4℃ 固定 15 min, 然后用 PBS 洗细胞, 5 min $\times$ 2 次. 滴加正常羊血清, 室温封闭 20 min. 加入兔抗人 β -catenin 抗体 (1:100, 空白对照组不加兔抗人 β -catenin 抗体), 室温孵育 2 h. PBS 洗细胞, 5 min $\times$ 3 次. 滴加 Cy3 标记的羊抗兔荧光二抗, 室温孵育 1 h. PBS 洗细胞, 5 min $\times$ 3 次. 用 DAPI (1:10 000) 对细胞核进行染色, 室温孵育 1 h, PBS 洗细胞, 5 min $\times$ 3 次. 吸干多余的液体, 置于荧光显微镜下观察结果^[16].

1.2.6 抗体中和实验. 在 BMMS-03 细胞条件培养液中加入兔抗人 Dkk-1 抗体, 终浓度达 100 μ g/L, 4℃ 温育过夜, 用于中和 Dkk-1. 对照组为在 BMMS-03 条件培养液中加入正常兔 IgG, 终浓度达 100 μ g/L. 将处理后的条件培养液作用 MCF-7 细胞, 持续作用 4 天, 应用免疫印迹分析检测 β -catenin 及其靶基因 c-Myc 的表达, 方法同前.

1.2.7 基因转染. 将 BMMS-03 或 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中 24 h 后, 在细胞生长覆盖率达到 70% 时进行基因转染. pcDNA3.1(-)-Dkk-1 质粒由 Dr. Hearing 教授惠赠^[17], 以空载体 pcDNA3.1(-) 为对照. 首先将质粒和 Lipofectamine 2000 分别加入到 600 μ l 的 MEM 中, 室温静置 15 min, 将二者混匀后 37℃ 静置 20 min. 将质粒 /lipofectamine 2000/MEM 混合液与细胞在 37℃ 共同孵育 6 h, 然后换无抗生素的完全培养基继续培养 48 h 后, 收集条件培养液并裂解细胞, 进行免疫印迹分析, 方法同前.

1.2.8 统计学分析. 实验数据采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 输入 SPSS 13.0 统计软件, 采用学生 *t* 检验进行统计分析.

2 结 果

2.1 BMMS-03 条件培养液对 MCF-7 细胞克隆形成的影响

MCF-7 细胞在 BMMS-03 条件培养液的作用

下, 培养 2 周, 镜下观察 MCF-7 细胞的克隆形成情况. 与对照组相比, 经间充质干细胞条件培养液作用后的 MCF-7 细胞, 所形成克隆的大小明显受

到抑制, 克隆的数目明显减少(图 1, $n = 5$, $**P < 0.01$, Student's t 检验).

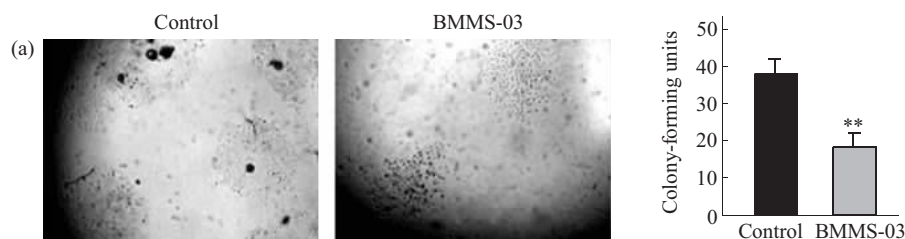


Fig. 1 Colony-forming assay of MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03

Control: MCF-7 without treatment of BMMS-03 conditioned media; BMMS-03: MCF-7 cells treated with 10% BMMS-03 conditioned media.

2.2 BMMS-03 条件培养液对 MCF-7 细胞增殖的影响

MCF-7 细胞经 10% BMMS-03 细胞条件培养液处理 4 天后, 细胞增殖受到明显抑制, 与对照组相比有显著差别(图 2, $**P < 0.01$, Student's t 检验).

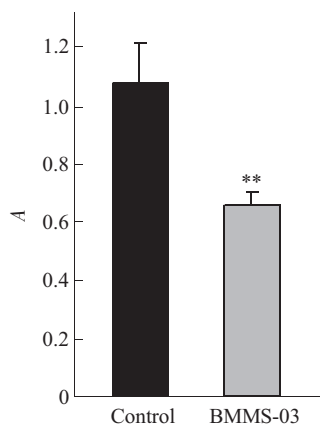


Fig. 2 The proliferation of MCF-7 cells in presence of conditioned media from BMMS-03 measured by MTT assay

Control: The proliferation of MCF-7 cells without conditioned media; BMMS-03: The proliferation of MCF-7 cells in the presence of conditioned media from BMMS-03 stem cell cultures ($**P < 0.01$ vs control).

2.3 BMMS-03 细胞条件培养液对 MCF-7 细胞 Wnt 途径的影响

2.3.1 条件培养液对 MCF-7 细胞的 Wnt 途径的关键蛋白 β -catenin 及靶基因表达的影响. 经 BMMS-03 条件培养液作用 4 天后, MCF-7 细胞中

β -catenin、Bcl-2、c-Myc、PCNA 和 survivin 的表达受到明显抑制(图 3).

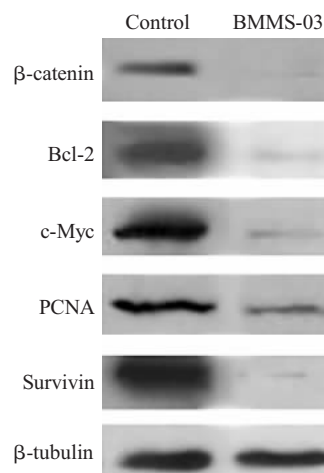


Fig. 3 Expression levels of β -catenin, Bcl-2, c-Myc, PCNA and survivin in MCF-7 in presence of BMMS-03 conditioned media by Western blot analysis

Control: MCF-7 cells without conditioned media; BMMS-03: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 stem cell cultures.

2.3.2 免疫荧光方法检测 β -catenin 的表达及细胞定位. 应用 BMMS-03 细胞条件培养液作用 MCF-7 细胞 4 天后, 通过免疫荧光方法检测 β -catenin 的表达和细胞定位的变化. 结果显示: 对照组 MCF-7 细胞质和细胞核中均有 β -catenin 的表达, 当 MCF-7 细胞受到 BMMS-03 细胞条件培养液作用后, 其细胞浆及细胞核内的 β -catenin 表达水平明显减少(图 4).

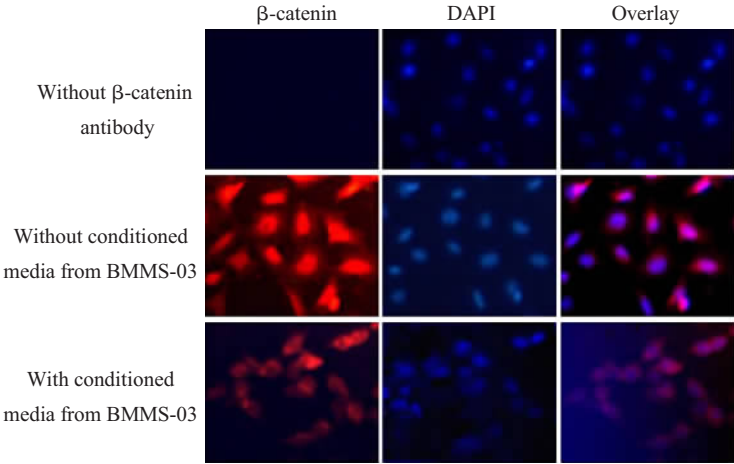


Fig. 4 Identification of β -catenin in MCF-7 cells by immunofluorescence staining

2.4 Dkk-1 对 MCF-7 细胞 β -catenin 和 c-Myc 表达的影响

2.4.1 乳腺癌细胞 MCF-7 和间充质干细胞 BMMS-03 中 Dkk-1 表达水平的比较. 我们用免疫印迹方法比较了乳腺癌细胞 MCF-7 和间充质干细胞 BMMS-03 的 Dkk-1 表达情况, 结果发现 BMMS-03 细胞的 Dkk-1 水平显著高于 MCF-7 细胞

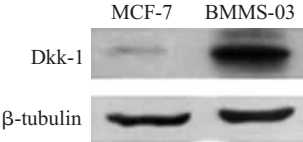


Fig. 5 Expression levels of Dkk-1 in MCF-7 and BMMS-03 cells by Western blot analysis (图 5).

2.4.2 Dkk-1 抗体中和实验. 经 Dkk-1 抗体中和后的条件培养液作用 MCF-7 细胞 4 天, 免疫印迹检测结果显示: 在 BMMS-03 细胞条件培养液作用下, MCF-7 细胞的 β -catenin 和 c-Myc 的表达受到抑制; 应用 Dkk-1 抗体中和该条件培养液后, 这种抑制作用减弱 (图 6), 表明 Dkk-1 是 β -catenin 的上游抑制因子, 间充质干细胞分泌的 Dkk-1 分子抑制了肿瘤细胞的 Wnt 途径.

2.4.3 基因转染 Dkk-1 对 MCF-7 细胞的作用. 将 pcDNA3.1(-)-Dkk-1 质粒转染 MCF-7 细胞后, 免疫印迹检测显示 MCF-7 细胞中 Dkk-1 表达水平明显增加 (图 7a), β -catenin 和 c-Myc 的表达受到抑制 (图 7b).

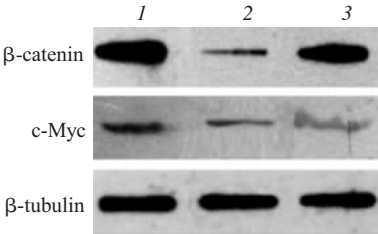


Fig. 6 Antibody against Dkk-1 abolished the inhibitory effects of conditioned media from BMMS-03 on the MCF-7 cells

1: MCF-7 cells without conditioned media; 2: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 containing normal rabbit IgG; 3: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 after neutralization of Dkk-1 activity by the rabbit anti-human Dkk-1 antibody.

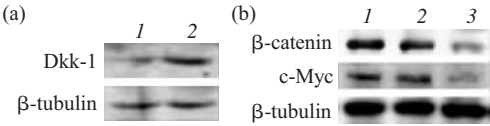


Fig. 7 Effect of overexpression of Dkk-1 on β -catenin and c-Myc in MCF-7 cells transiently transfected with pcDNA3.1 (-) -Dkk-1 by Western blot analysis

(a) Overexpression of Dkk-1 in MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1 (-)-Dkk-1 by Western blot analysis. 1: MCF-7 cells transfected with empty vector of pcDNA3.1 (-); 2: MCF-7 cells transiently transfected with pcDNA3.1(-)-Dkk-1. (b) downregulation of β -catenin and c-Myc in MCF-7 cells transiently transfected with pcDNA3.1 (-)-Dkk-1 by Western blot analysis. 1: MCF-7 cells without transfection; 2: MCF-7 cells transfected with empty vector of pcDNA3.1 (-); 3: MCF-7 cells transiently transfected with pcDNA3.1(-)-Dkk-1.

将 pcDNA3.1(-)-Dkk-1 质粒转染 BMMS-03 细胞后, BMMS-03 细胞的形态和生长情况未见明显改变. 免疫印迹检测显示, BMMS-03 细胞中 Dkk-1 表达水平明显增加 (图 8a). 取过表达 Dkk-1 的 BMMS-03 细胞条件培养液作用于 MCF-7 细胞, 结果显示 β -catenin 和 c-Myc 的表达水平 (图 8b) 以及细胞增殖能力受到更进一步的抑制 (图 9).

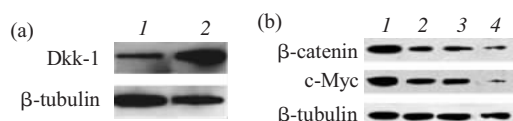


Fig. 8 Effect of conditioned media from BMMS-03 cells transiently transfected with pcDNA3.1 (-) -Dkk-1 on β -catenin and c-Myc in MCF-7 cells by Western blot analysis

(a) Overexpression of Dkk-1 in BMMS-03 cells transfected with pcDNA3.1 (-)-Dkk-1 by Western blot analysis. 1: BMMS-03 cells transfected with empty vector of pcDNA3.1 (-); 2: BMMS-03 cells transiently transfected with pcDNA3.1(-)-Dkk-1. (b) Downregulation of β -catenin and c-Myc in MCF-7 cells became stronger by conditioned media from BMMS-03 cells transiently transfected with pcDNA3.1 (-)-Dkk-1 by Western blot analysis. 1: MCF-7 cells without conditioned media as control; 2: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03; 3: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 transfected with pcDNA3.1 (-); 4: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 after transient transfection of pcDNA3.1(-)-Dkk-1.

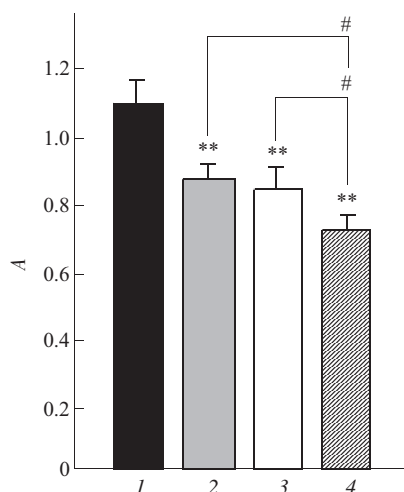


Fig. 9 Effect of conditioned media from BMMS-03 transfected with pcDNA3.1 (-) -Dkk-1 on proliferation of MCF-7 cells by MTT assay

1: MCF-7 cells without treatment; 2: MCF-7 cells treated with conditioned media derived from BMMS-03 cells; 3: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 transfected with pcDNA3.1(-); 4: MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 after transient transfection of pcDNA3.1(-)-Dkk-1. (** $P < 0.01$ vs control, # $P < 0.05$ BMMS-03+ pcDNA3.1(-)-Dkk-1 vs BMMS-03).

3 讨 论

将干细胞应用于肿瘤治疗具有广泛的前景. 临床上将造血干细胞输入肿瘤病人的血液后发现肿瘤体积变小, 但其分子机制不清^[17, 18]. 已有文献报道, 间充质干细胞具有直接抑制肿瘤细胞的作用^[19]. 本研究中我们首先应用软琼脂克隆形成实验和 MTT 实验, 初步证实 BMMS-03 间充质干细胞的条件培养液具有抑制 MCF-7 乳腺癌细胞的作用. 为了进一步阐明其分子机制, 我们探讨了间充质干细胞在生长代谢过程中分泌的可溶性细胞调控因子对肿瘤细胞的抑制作用. 越来越多的证据表明, Wnt 信号通路不仅在干细胞的增殖和自我更新中起至关重要的作用, 而且与肿瘤的发生发展密切相关. Wnt 蛋白为分泌型糖蛋白, 以自分泌和旁分泌方式发挥其生物学效应. Wnt 蛋白与膜受体卷曲蛋白 Fz 和辅助受体低密度脂蛋白 LRP5/6 受体家族结合, 启动 Wnt 途径. 我们收集 BMMS-03 细胞条件培养液作用于 MCF-7 细胞, 导致了 MCF-7 细胞中 β -catenin 的表达下调. Wnt 途径的生理效应主要是通过其关键蛋白 β -catenin 的胞内堆积, 随即进入核内激活靶基因的表达来实现的. 免疫印迹结果证实, β -catenin 的靶基因 c-Myc、Bcl-2、PCNA 和 survivin 的表达也受到了抑制. 我们运用免疫荧光染色技术检测了经 BMMS-03 细胞条件培养液作用后 MCF-7 细胞 β -catenin 的表达水平, 以及在细胞质和细胞核中分布情况的变化. 结果显示, 经 BMMS-03 细胞条件培养液作用后, MCF-7 细胞的细胞浆和细胞核内的 β -catenin 明显减少. 因此, 上述结果表明在 BMMS-03 细胞条件培养液作用下, MCF-7 细胞内活跃的 Wnt/ β -catenin 途径受到了抑制.

作为 Wnt 信号途径的负调控因子, Dkk-1 通过与辅助受体 LRP5/6 发生相互作用, 进而抑制 Wnt 途径^[20]. 有文献报道, 间充质干细胞具有向细胞外分泌 Dkk-1 因子的能力^[21]. 实验中我们采用间充质干细胞条件培养液作用于肿瘤细胞, 发现 MCF-7 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号途径受到了抑制, 根据这一结果进行推理, 我们提出间充质干细胞对肿瘤发挥抑制作用的有效因子可能与 Dkk-1 有关. 为了证实这一假设, 我们首先应用免疫印迹方法比较了 MCF-7 细胞和 BMMS-03 细胞中 Dkk-1 的表达水平, 结果显示后者 Dkk-1 的表达水平较高, 为证实 Dkk-1 是抑制肿瘤细胞的有效因子提供了依据. 为了进一步阐明间充质干细胞条件培养液中 Dkk-1 的

作用,一方面我们采用了抗体中和实验,结果显示条件培养液被 Dkk-1 抗体中和后明显减弱对 MCF-7 细胞中 β -catenin 和 c-Myc 表达的抑制作用,另一方面,我们应用基因转染技术使 BMMS-03 细胞过表达 Dkk-1,发现其条件培养液可进一步加强对 MCF-7 细胞中 β -catenin 和 c-Myc 表达的抑制作用和对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。此外,应用基因转染技术使 MCF-7 细胞过表达 Dkk-1,同样明显抑制 MCF-7 细胞中 β -catenin 和 c-Myc 的表达。综上所述,间充质干细胞高水平表达 Dkk-1 是抑制肿瘤细胞恶性表型的基础,分泌到条件培养液中的 Dkk-1 抑制了 MCF-7 细胞中 Wnt/ β -catenin 信号途径,从而导致肿瘤细胞增殖能力减弱。

本研究结果表明,间充质干细胞具有抑制肿瘤细胞恶性表型的作用,其分子机制与间充质干细胞高表达并释放 Dkk-1,进而有效地抑制肿瘤细胞中 Wnt/ β -catenin 信号途径有关。这一结果为临床上应用干细胞治疗肿瘤奠定了理论基础并提供了新的实验依据。尽管 Dkk-1 是抑制肿瘤细胞增殖的生物活性因子,但是我们认为,这只是间充质干细胞抑制肿瘤细胞的原因之一,其详细的分子机理有待于进一步研究。目前有关文献报道,间充质干细胞对肿瘤细胞恶性表型的影响具有抑制或促进两种完全不同的结果,其分子机制目前尚不清楚。本研究结果显示,间充质干细胞对肿瘤细胞具有抑制作用,与 Khakoo 等报道的结果相一致^[19]。然而,有关间充质干细胞对肿瘤细胞恶性表型具有促进作用的报道,我们推测可能在研究与各自应用的不同肿瘤细胞类型有关。

参 考 文 献

- 1 Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 2005, **434** (7035): 843~850
- 2 Varga A C, Wrana J L. The disparate role of BMP in stem cell biology. *Oncogene*, 2005, **24** (37): 5713~5721
- 3 Androutsellis-Theotokis A, Leker R P, Soldner F, *et al.* Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, 2006, **442** (7104): 823~826
- 4 Gaspar C, Fodde R. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*, 2004, **48** (5~6): 377~386
- 5 Chen G, Shukeir N, Potti A, *et al.* Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*, 2004, **101** (6): 1345~1356
- 6 Moon R T, Kohn A D, De Ferrari G V, *et al.* WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 2004, **5** (9): 691~701
- 7 Joubert A, Bianchi P, Maritz C, *et al.* Influence of prostaglandin A2 on Bax, Bcl-2 and PCNA expression in MCF-7 cells. *Biomed Res*, 2006, **27** (4): 157~162
- 8 Muncan V, Sansom O J, Tertoolen L, *et al.* Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol*, 2006, **26** (22): 8418~8426
- 9 Byun T, Karimi M, Marsh J L, *et al.* Expression of secreted Wnt antagonists in gastrointestinal tissues: potential role in stem cell homeostasis. *J Clin Pathol*, 2005, **58** (5): 515~519
- 10 Mao B, Wu W, Li Y, *et al.* LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 2001, **411** (6835): 321~325
- 11 Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, *et al.* Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol*, 2004, **165** (2): 275~285
- 12 Yaccoby S, Ling W, Zhan F, *et al.* Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth *in vivo*. *Blood*, 2007, **109** (5): 2106~2111
- 13 Etheridge S L, Spencer G J, Heath D J, *et al.* Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2004, **22** (5): 849~860
- 14 张晓东,徐治立,叶丽虹,等.人胎儿骨髓间充质干细胞的分离及生物学鉴定.南开大学学报(自然科学版),2006,**39**(1):107~110
- 15 Zhang X D, Xu Z L, Ye L H, *et al.* *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, 2006, **39** (1): 107~110
- 16 Chua C W, Lee D T, Ling M T, *et al.* FTY720, a fungus metabolite, inhibits *in vivo* growth of androgen-independent prostate cancer. *Int J Cancer*, 2005, **117** (6): 1039~1048
- 17 Kaiser M J, Tiegs G, Neuhuber W L. Close apposition of dynorphin-positive nerve fibres to lymphocytes in the liver suggests opioidergic neuroimmunomodulation. *Histochem Cell Biol*, 2003, **120** (3): 213~221
- 17 Fagioli F, Berger M, Brach del Prever A, *et al.* Regression of metastatic osteosarcoma following non-myeloablative stem cell transplantation. A case report. *Haematologica*, 2003, **88** (5): ERC16
- 18 Omuro Y, Matsumoto G, Sasaki T, *et al.* Regression of an unresectable pancreatic tumor following nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2003, **31** (10): 943~945
- 19 Khakoo A Y, Pati S, Anderson S A, *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, 2006, **203** (5): 1235~1247
- 20 Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene*, 2000, **19**(14): 1843~1848

Investigation of Inhibition of Wnt/ β -catenin Pathway in Breast Cancer Cells Mediated by Dkk-1 Released From Human Mesenchymal Stem Cells*

QIAO Ling, XU Zhi-Li, TAN Xu, YE Li-Hong**, ZHANG Xiao-Dong**

(Key Laboratory of Bioactive Material of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Growing evidences show that mesenchymal stem cells (MSCs) home to tumorigenesis and inhibit tumor cells, however, the molecular mechanisms underlying are unclear. The human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from human fetal bone marrow in 4 months were established without immortalization, designated BMMS-03 cells. In order to clarify the molecular mechanism underlying, the effect of conditioned media from hMSCs on human breast cancer MCF-7 cells was examined. The results showed that conditioned media from BMMS-03 cells were able to decrease the colony-forming units and proliferation of MCF-7 cells by colony-forming assay and MTT assay. Western blot analysis revealed that β -catenin and its target gene c-Myc, Bcl-2, PCNA and survivin were downregulated in MCF-7 cells treated with conditioned media from BMMS-03 cells. In addition, the treatment significantly reduced β -catenin nuclear assembly in MCF-7 cells by immunofluorescence staining. The finding demonstrated that the expression level of Dkk-1 in hMSCs was much higher than that in MCF-7 cells. Moreover, treatment with the antibody of rabbit against Dkk-1 abolished the inhibitory effects of conditioned media from BMMS-03 on the tumor cells. Conditioned media from BMMS-03 cells transiently transfected with pcDNA3.1(-)-Dkk-1 produced stronger downregulation of β -catenin and c-Myc expression in MCF-7 cells. The transfection with pcDNA3.1 (-)-Dkk-1 in MCF-7 cells resulted in the downregulation of β -catenin and c-Myc as well. The data suggest that hMSCs are able to decrease the malignant phenotype of tumor cells *in vitro*. Taken together, hMSCs may suppress tumor growth *via* Wnt/ β -catenin pathway, in which Dkk-1 released from the hMSCs is responsible for the depression.

Key words mesenchymal stem cells, breast cancer cells, Wnt/ β -catenin signaling pathway, Dkk-1

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570698), Tianjin Natural Science Foundation (033801211).

**Corresponding author . Tel: 86-22-23506830, E-mail: zhangxd@nankai.edu.cn, yelihong@nankai.edu.cn

Received: March 14, 2007 Accepted: May 25, 2007