

# 当归多糖对肺癌微环境中骨髓间充质干细胞增殖及TAFs相关分子表达的影响

武有明<sup>1</sup> 张 齐<sup>1</sup> 刘永琦<sup>1,2\*</sup> 何建新<sup>1</sup> 伍志伟<sup>1,2</sup> 高卓越<sup>1</sup>  
苏 韞<sup>1</sup> 骆亚莉<sup>1</sup> 张利英<sup>1</sup> 周妮娜<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>甘肃中医药大学, 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 兰州 730000;

<sup>2</sup>敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 兰州 730000)

**摘要** 该文探讨了当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)对肺癌微环境中骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖及肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)相关分子表达的影响。采用CCK-8法筛选ASP作用于BMSCs、肺癌Lewis(Lewis lung cancer, LLC)细胞的最佳有效浓度; 利用Transwell小室建立BMSCs和LLC细胞的共培养体系并以ASP最佳浓度干预共培养体系, 分为BMSCs组、LLC组、BMSCs与LLC共培养组(Co-BMSCs组)和ASP-Co-BMSCs组; 通过倒置相差显微镜观察细胞的形态, 生长曲线检测细胞的增殖能力, 流式细胞术检测各组细胞周期, Western blot技术检测各组BMSCs TAFs标记分子 $\alpha$ -SMA、FAP蛋白质的表达。结果显示, 与对照组相比, ASP 50  $\mu$ g/mL促进BMSCs细胞增殖( $P<0.01$ ), 而对LLC细胞增殖则有明显抑制作用( $P<0.01$ ); 与BMSCs组相比, Co-BMSCs组细胞生长速度显著增加( $P<0.01$ ), Co-BMSCs组细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例降低, S期比例升高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 与Co-BMSCs组相比, ASP-Co-BMSCs组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例升高, S期比例降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 蛋白印迹结果表明, 与BMSCs组相比, Co-BMSCs组 $\alpha$ -SMA、FAP蛋白质表达均明显升高, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 与Co-BMSCs组相比, ASP-Co-BMSCs组 $\alpha$ -SMA、FAP蛋白质表达均下降( $P<0.01$ )。结果表明, 当归多糖可抑制肺癌LLC共培养微环境中BMSCs的异常增殖及TAFs相关分子表达。

**关键词** 骨髓间充质干细胞; 肿瘤微环境; 当归多糖; 肿瘤相关成纤维细胞

## Effects of *Angelica sinensis* Polysaccharide on Proliferation and Expression of Tumor-associated Fibroblasts Related Molecule of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Lung Cancer Microenvironment

Wu Youming<sup>1</sup>, Zhang Qi<sup>1</sup>, Liu Yongqi<sup>1,2\*</sup>, He Jianxin<sup>1</sup>, Wu Zhiwei<sup>1,2</sup>, Gao Zhuoyue<sup>1</sup>,

Su Yun<sup>1</sup>, Luo Yali<sup>1</sup>, Zhang Liying<sup>1</sup>, Zhou Nina<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation at Provincial and Ministerial Level, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** This work was aimed at investigating effects of *Angelica sinensis* polysaccharide (ASP) on proliferation and expression of TAFs related molecules of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in the lung

收稿日期: 2015-04-01 接受日期: 2015-08-07

甘肃省杰出青年基金项目(批准号: 1308RJDA008)和国家自然科学基金(批准号: 81360588)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0931-8765344, E-mail: liuyongqi73@163.com

Received: April 1, 2015 Accepted: August 7, 2015

This work was supported by the Outstanding Youth Foundation of Gansu Province (Grant No.1308RJDA008) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81360588)

\*Corresponding author. Tel: +86-931-8765344, E-mail: liuyongqi73@163.com

网络出版时间: 2015-09-09 16:19:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150909.1619.006.html>

cancer microenvironment. The optimal concentration of ASP on the effect of Lewis lung cancer (LLC) and BMSCs was selected by CCK-8. After establishing the co-culture system of LLC and BMSCs by transwell chambers, we intervened it by the effective concentration of ASP. The study contained BMSCs, LLC, Co-BMSCs and ASP-Co-BMSCs group. The morphology of cells was observed by phase-contrast microscopy. The proliferation capability of cells was tested by CCK-8. The cell cycle was tested by flow cytometry. The protein expressions of biomarkers of TAFs- $\alpha$ -SMA and FAP of each group was detected by Western blot. Our results indicated that ASP (50  $\mu$ g/mL) promoted BMSCs proliferation while had an obvious inhibitory effect on LLC proliferation ( $P<0.01$ ). Compared with BMSCs group, the growth rate of Co-BMSCs increased significantly ( $P<0.01$ ), the ratio of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of Co-BMSCs group was reduced with an increase in S phase ( $P<0.05$ ). Compared with Co-BMSCs group, the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of ASP-Co-BMSCs group was increased, and the proportion of cells in S phase was significantly decreased ( $P<0.05$ ). In the results of Western blot, the protein expression of  $\alpha$ -SMA and FAP in Co-BMSCs group raised obviously compared with that in BMSCs group ( $P<0.01$ ). Compared with Co-BMSCs group, the expression of  $\alpha$ -SMA and FAP protein decreased in the group of Co-BMSCs intervened with ASP ( $P<0.01$ ). Our results suggested that ASP could inhibit the proliferation of BMSCs in lewis lung cancer microenvironment and expression of TAFs related molecule.

**Keywords** bone marrow mesenchymal stem cells; tumor microenvironment; *Angelica sinensis* polysaccharide; tumor associated fibroblasts

近年来, 肺癌的发病率及死亡率呈逐年快速增高的趋势, 已经成为威胁人类健康的重大疾病之一<sup>[1]</sup>。基于骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有肿瘤靶向趋向性的特征, 使其直接移植或利用其作为载体介导TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)应用于肿瘤的治疗实验获得了明显疗效<sup>[2-3]</sup>, 开启了肿瘤基于细胞生物治疗新的途径。近期研究表明, 肿瘤微环境可诱发MSCs分化为肿瘤相关成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts, TAFs)<sup>[4]</sup>。TAFs与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[5]</sup>, 因此, BMSCs安全性问题如何进一步明确并加以有效预防, 已成为推广其临床应用的关键问题。甘肃产当归(如岷归等)品质优良, 当归多糖(*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP)为其主要成分之一。本研究通过BMSCs与肺癌Lewis(Lewis lung cancer, LLC)细胞的共培养, 并采用ASP干预, 研究ASP对肺癌微环境中BMSCs增殖及TAFs相关分子表达的影响, 为促进ASP联合BMSCs防治肺癌提供理论与实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器及试剂 全自动细胞荧光计数分析仪购自美国Cellometer公司, 流式细胞仪购自美国Becton Dickinson公司, 酶标仪购自美国Bio-Rad公

司, 倒置相差显微镜购自日本Olympus公司, 二氧化碳培养箱购自日本三洋电机公司, 凝胶成像分析系统购自美国Bio-Rad公司, Transwell小室购自美国Corning公司, 胎牛血清购自Wisent公司, DMEM/F12培养基购自Hyclone公司, 0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公司, CCK-8试剂盒购自Biosharp公司, 当归多糖购自上海源叶生物公司, PI购自美国Sigma公司, RIPA裂解液购自北京普利莱基因技术有限公司, BCA蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司, 兔抗人 $\alpha$ -SMA多克隆抗体、兔抗人FAP多克隆抗体、兔抗人GAPDH多克隆抗体购自Immunolay公司, 辣根酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 甘氨酸购自索莱宝公司, 30%丙烯酰胺购自MDBio公司。

1.1.2 BMSCs的培养 小鼠BMSCs细胞株购自广州赛业生物科技有限公司(编号: MUBMX-01001)。BMSCs培养体系为含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM/F12培养基, 将其置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中培养。每2~3 d换液1次, 待细胞汇合度达80%后, 0.25%胰蛋白酶对其消化传代, 第5代细胞用于实验。

1.1.3 LLC细胞培养 LLC(Lewis lung cancer)细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心(Catalog Number: TCM7)。LLC细胞培养体系为含10%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL

链霉素的DMEM/F12培养基, 将其置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中培养。每2~3 d换液1次, 待细胞汇合度达70%后, 0.25%胰蛋白酶对其消化传代, 第5代细胞用于实验。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞增殖与毒性实验(CCK-8法)筛选ASP最佳有效浓度** 选取对数生长期的BMSCs、LLC细胞, 将其分别接种于96孔板(2×10<sup>3</sup>/孔), 移至细胞培养箱中培养至细胞贴壁。依次加入浓度为12.5, 50, 100, 200 μg/mL ASP药液100 μL, 对照孔加入等体积的DMEM/F12完全培养基, 每组设3个复孔; 不接种细胞的空白组为调零孔。原条件下继续培养, 分别于24, 48, 72, 96 h进行CCK-8法检测。于各时间点终止培养后, 每孔加入10 μL CCK-8溶液, 孵育培养箱中继续培养4 h, 终止培养后直接在450 nm波长处检测各组细胞的吸光度 $D$ 值。重复3次实验, 并按公式计算增殖率。以时间为横坐标, 增殖率为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。细胞增殖率=(药物组 $D$ 值-调零组 $D$ 值)/(对照组 $D$ 值-调零组 $D$ 值)×100%

**1.2.2 共培养体系建立及分组** 参考文献[9]的方法, 采用Transwell悬挂式非接触共培养, 将第5代的BMSCs种植于Transwell 6孔板内(5×10<sup>3</sup>/孔), LLC细胞种植于Transwell上层(5×10<sup>4</sup>/孔), 作为模型组(Co-BMSCs); Co-BMSCs基础上, 下层再加入终浓度为50 μg/mL ASP作为实验组(ASP-Co-BMSCs); 另以第5代BMSCs、LLC单独接种于6孔板作为对照组。置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中培养, 每天观察各组细胞的形态变化并照相记录。共培养7 d。7 d后, 收集各组细胞于培养瓶内继续培养、扩增, 并进行后续试验。

**1.2.3 CCK-8法绘制各组细胞生长曲线** 收集对数期的各组细胞, 胰蛋白酶消化后用DMEM/F12完全培养基配成浓度约为2×10<sup>4</sup>/mL的单细胞悬液, 将其接种于96孔板, 每孔加入100 μL的悬液, 补完全培养基100 μL, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C、饱和湿度的培养箱中继续培养, 每隔48 h换液1次。接种后第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d分别进行CCK-8法检测各组细胞吸光值。每孔加入10 μL CCK-8溶液, 继续培养4 h。终止培养, 酶标仪450 nm波长处检测各组吸光度 $D$ 值。重复3次实验, 取平均值, 以时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线图。

**1.2.4 流式细胞术(FCM)检测细胞周期变化** 0.25%胰蛋白酶消化收集各组细胞, 细胞计数并将每组细

胞密度调整至2×10<sup>6</sup>/mL; 移至1.5 mL离心管内, PBS缓冲液洗涤1~2次, 1 000 r/min离心3 min; 弃上清, 加入预冷的70%乙醇, 轻轻吹打混匀后, 4 °C过夜固定; 将固定好的细胞1 000 r/min离心5 min; 弃上清, 加入预冷的500 μL PBS, 重悬细胞; 50 μg/mL的PI染液(含50 μg/mL的RNase), 室温避光孵育30 min, 流式细胞仪检测, 计算G<sub>1</sub>期及S期细胞比例。重复实验3次。

**1.2.5 Western blot技术检测TAFs标记分子α-SMA、FAP蛋白质的表达** 收集各组细胞, 用预冷PBS洗涤3次后, 将细胞重悬于裂解液中, 冰浴30 min, 使细胞充分裂解。4 °C, 12 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 进行蛋白质定量。各组取等量蛋白质, 经5%、12% SDS-PAGE分离后, 转膜至PVDF膜上, 封闭后, 与一抗结合, 4 °C摇床过夜; TBST洗涤后与二抗结合反应, 同上洗涤。用ECL发光显色后, 在凝胶成像系统上曝光检测, 采用Quantity One 4.6.2软件对图像进行光密度分析, 以GAPDH作为内参照, 结果将目的蛋白质条带与内参GAPDH条带的比值作为参照。重复实验3次。

**1.2.6 统计学分析** 应用SPSS 21.0统计软件分析。结果采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间均数的比较采用One-Way ANOVA; 两组间的比较采用Student's  $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度ASP对BMSCs和LLC细胞增殖的影响

**2.1.1 不同浓度ASP对BMSCs增殖的影响** 由图1可知, 与对照组相比, 50 μg/mL ASP作用BMSCs 72~96 h, 能明显促进BMSCs增殖( $P < 0.01$ ); 100 μg/mL和200 μg/mL ASP可抑制BMSCs增殖( $P < 0.01$ )。

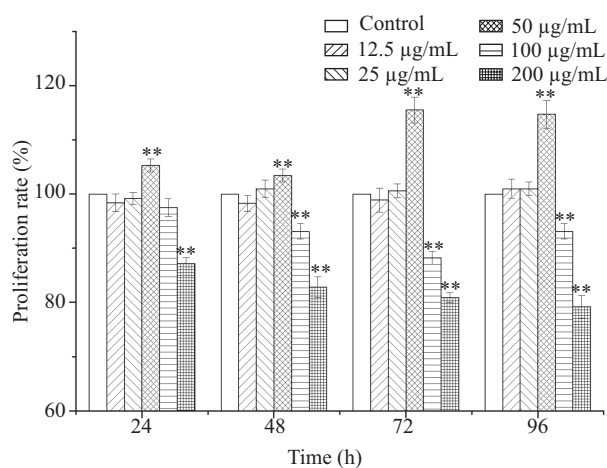
**2.1.2 不同浓度ASP对LLC增殖的影响** 由图2可知, 与对照组相比, 25 μg/mL ASP作用于LLC细胞48 h, 对LLC细胞的增殖有促进作用, 且随着时间延长, 增殖作用越明显( $P < 0.01$ ); 50 μg/mL、100 μg/mL ASP作用于LLC细胞48 h, 对LLC细胞的增殖有明显抑制作用( $P < 0.01$ ); 100 μg/mL和200 μg/mL ASP作用LLC细胞48 h后, 对LLC细胞的增殖有抑制作用。

综上所述, 不同浓度ASP分别作用于BMSCs和LLC细胞后, 发现50 μg/mL ASP对BMSCs的增殖具有促进作用, 而对LLC细胞的增殖具有抑制作用。本实验依据可促进BMSCs增殖且抑制LLC增殖的最小药物浓度为最佳药物浓度, 故选用50 μg/mL ASP

作为最佳浓度用于干预共培养实验,以排除药物毒性的影响。

## 2.2 细胞形态学观察

倒置相差显微镜下观察, BMSCs组细胞为成纤维细胞样,梭形且形态均一,排列有序,呈漩涡状生长(图3A); LLC组细胞为半贴壁细胞,贴壁的细胞为梭形,呈团簇状生长(图3B); Co-BMSCs组细胞呈不规则多角形、细长,呈团簇状生长(图3C); ASP-Co-MSCs组细胞大部分细胞呈梭形,偶见团状生长(图3D)。



\*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs control group.

图1 不同浓度ASP对BMSCs增殖的影响

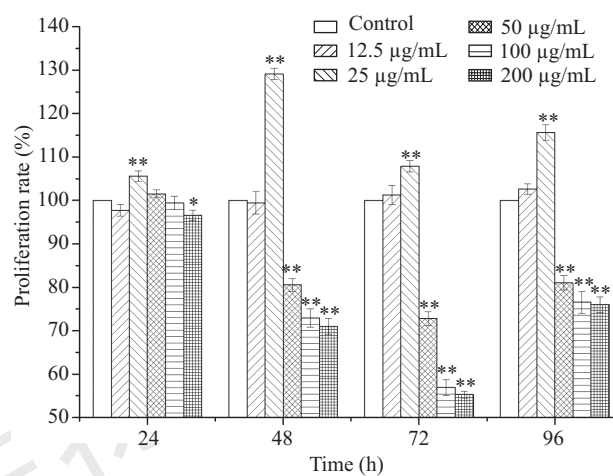
Fig.1 Effect of different concentrations of ASP on the proliferation of BMSCs

## 2.3 CCK-8法绘制各组细胞生长曲线

由表1及图4可知,与BMSCs组比较, Co-BMSCs组在第3, 4, 5, 6, 7 d细胞生长速度显著增快( $P < 0.01$ );与Co-BMSCs组比较, ASP-Co-MSCs组在第5, 6, 7 d细胞生长速度缓慢( $P < 0.01$ )。

## 2.4 FCM检测BMSCs细胞周期的变化

由图5及表2可知, Co-BMSCs组处于 $G_0/G_1$ 期的细胞比例均低于BMSCs组, S期细胞比例增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 而ASP-Co-BMSCs组处于

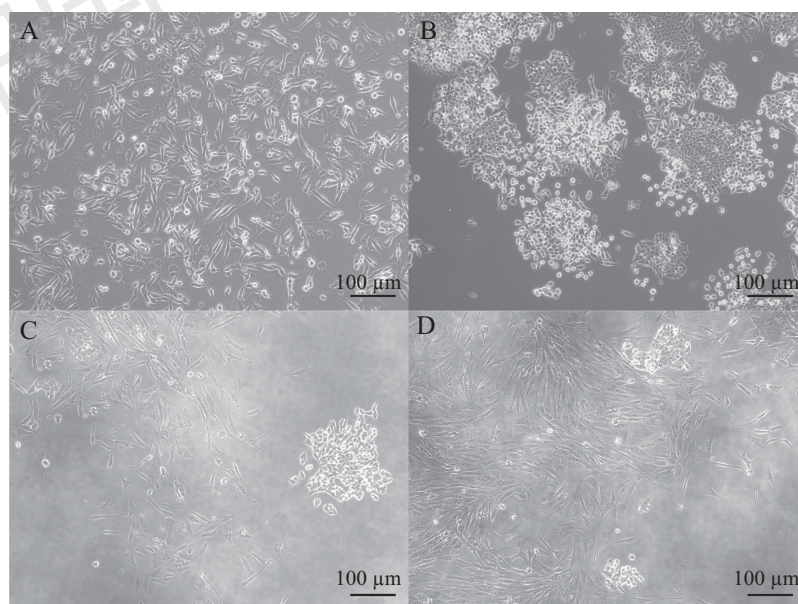


\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图2 不同浓度ASP对LLC增殖的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of ASP on the proliferation of LLC



A: BMSCs组; B: LLC组; C: Co-BMSCs组; D: ASP-Co-BMSCs组。

A: BMSCs group; B: LLC group; C: Co-BMSCs group; D: ASP-Co-BMSCs group.

图3 各组细胞形态

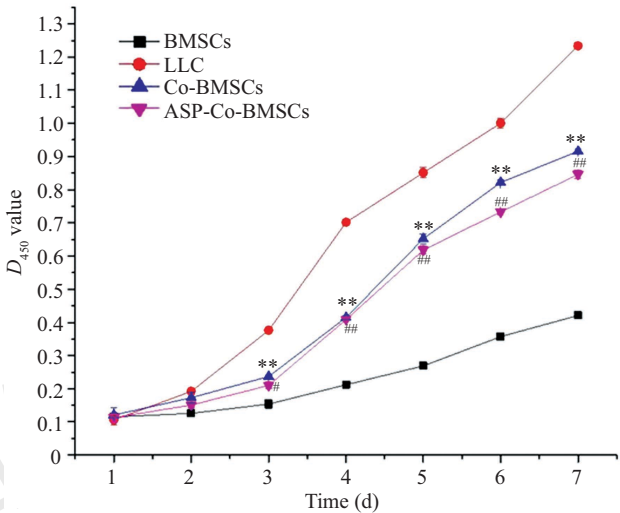
Fig.3 The morphology of cells in each group

表1 各组细胞吸光度值( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 1 The absorbance value of each group ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

| 时间/组别<br>Time/Groups | $D_{450}$   |             |               |               |
|----------------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
|                      | BMSCs       | LLC         | Co-BMSCs      | ASP-Co-BMSCs  |
| 1 d                  | 0.115±0.003 | 0.106±0.015 | 0.121±0.021   | 0.113±0.001   |
| 2 d                  | 0.126±0.007 | 0.192±0.010 | 0.173±0.017   | 0.151±0.009   |
| 3 d                  | 0.154±0.013 | 0.376±0.007 | 0.237±0.003** | 0.210±0.010▲  |
| 4 d                  | 0.212±0.011 | 0.702±0.002 | 0.415±0.006** | 0.409±0.002   |
| 5 d                  | 0.269±0.009 | 0.851±0.016 | 0.652±0.014** | 0.618±0.012▲▲ |
| 6 d                  | 0.357±0.006 | 1.001±0.015 | 0.822±0.006** | 0.733±0.009▲▲ |
| 7 d                  | 0.421±0.005 | 1.234±0.009 | 0.916±0.008** | 0.846±0.012▲▲ |

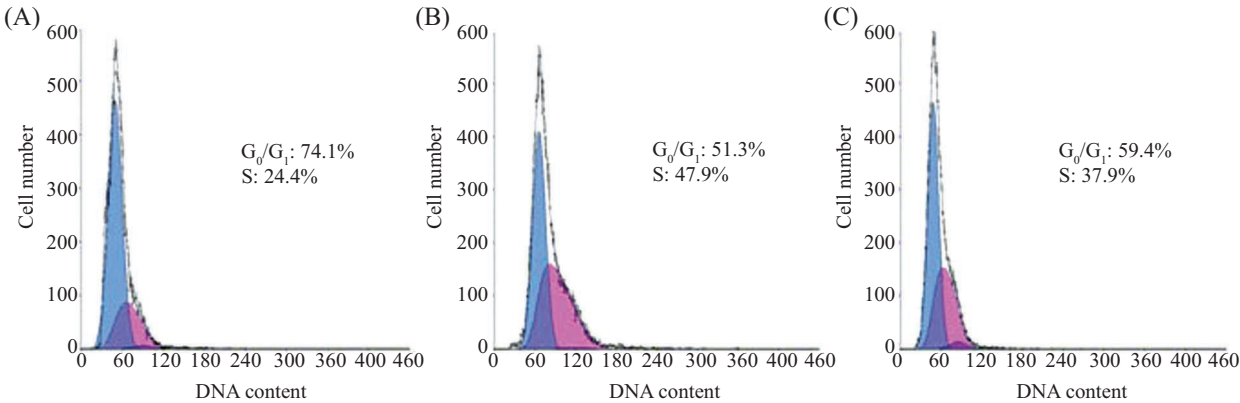
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , Co-BMSCs与BMSCs组比较; ▲ $P<0.05$ , ▲▲ $P<0.01$ , ASP-Co-BMSCs与Co-BMSCs组比较。  
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  Co-BMSC compared with BMSCs group; \*\* $P<0.01$  Co-BMSCs vs BMSCs group; ▲ $P<0.05$ , ▲▲ $P<0.01$  ASP-Co-BMSCs compared with Co-BMSCs group.



\*\* $P<0.01$ , Co-BMSCs组与BMSCs组比较; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ASP-Co-BMSCs与Co-BMSCs组比较。  
\*\* $P<0.01$ , Co-BMSCs group vs BMSCs group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  ASP-Co-BMSCs group vs Co-BMSCs group.

图4 各组细胞生长曲线

Fig.4 The cell growth curve of each group



A: BMSCs组; B: Co-BMSCs组; C: ASP-Co-BMSCs组。  
A: BMSCs group; B: Co-BMSCs group; C: ASP-Co-BMSCs group.

图5 各组细胞周期

Fig.5 The cell cycle of each group

表2 ASP对肺癌微环境中BMSCs细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )Table 2 The effect of ASP on cell cycle of BMSCs in lung cancer microenvironment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

| 组别<br>Groups | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | S期<br>S phase |
|--------------|--------------------------------|---------------|
| BMSCs        | 74.1%±1.2%                     | 24.4%±1.3%    |
| Co-BMSCs     | 51.3%±5.6%*                    | 47.9%±3.4%*   |
| ASP-Co-BMSCs | 59.4%±1.1%▲                    | 37.9%±2.1%▲   |

\* $P<0.05$ , Co-BMSCs与BMSCs组比较; ▲ $P<0.05$ , ASP-Co-BMSCs与Co-BMSCs组比较。

\* $P<0.05$  Co-BMSC compared with BMSCs group; ▲ $P<0.05$  ASP-Co-BMSCs vs Co-BMSCs group.

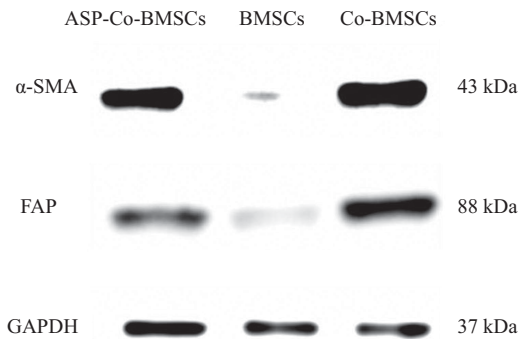


图6 Western blot检测各组细胞TAFs标记分子α-SMA、FAP蛋白质的表达

Fig.6 Protein expression of α-SMA and FAP of TAFs's biomarkers determined by Western blot

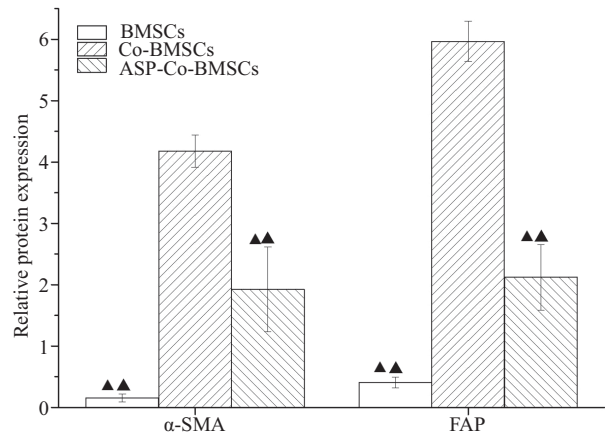
G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞比例高于Co-BMSCs组, S期细胞比例降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

## 2.5 Western blot检测BMSCs细胞TAFs标记分子α-SMA、FAP蛋白质的表达

由图6和图7可知, 与BMSCs组比较, Co-BMSCs组α-SMA、FAP蛋白质表达量明显增加, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ); 与Co-BMSCs组比较, ASP-Co-BMSCs组α-SMA、FAP蛋白表达下降, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

## 3 讨论

肿瘤被称为“难以痊愈的炎症”, 美国科学院院士Weinberg等<sup>[6]</sup>将炎症列为“肿瘤的十大特征”之一。BMSCs是一类具有自我更新及多向分化潜能的干细胞, 易于体外分离、扩增, 具有向组织损伤、炎症部位很好的靶向迁移能力; 具有易导入外源基因及低免疫源性等优点, 在肿瘤治疗、组织修复等领域具有广阔的潜能。课题组前期研究表明, 化学因素可引起BMSCs DNA损伤<sup>[7-8]</sup>。此外, 干细胞生存的微环境成分的改变可诱发MSCs发生增殖异常、形



▲▲ $P<0.01$ , 与Co-BMSCs组比较。

▲▲ $P<0.01$  vs Co-BMSCs group.

图7 各组细胞TAFs标记分子α-SMA、FAP蛋白质相对表达值  
Fig.7 The relative value of the expression of α-SMA and FAP protein as TAFs's biomarkers in each group

态改变、侵袭能力增强及遗传稳定性的变化<sup>[9-11]</sup>。另有研究报道, BMSCs可分化为TAFs<sup>[4]</sup>。TAFs是指肿瘤间质中的成纤维细胞群, 作为肿瘤微生态环境中最主要的间质细胞之一, 与正常组织来源的成纤维细胞相比, 肿瘤组织来源的TAFs通过分泌多种生长因子、细胞因子、ECM(extracellular matrix)调控分子和合成ECM参与肿瘤的发生发展, 在肿瘤的生长、侵袭与转移过程中发挥重要的调控作用<sup>[12-13]</sup>。如TAFs所分泌的成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)在卵巢上皮细胞癌发生、发展中起重要作用<sup>[14]</sup>。研究发现, 肿瘤间质中FAP、HGF(hepatocyte growth factor)的表达与肿瘤直径、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目等呈正相关<sup>[15]</sup>。

当归含有挥发油、有机酸、多糖和黄酮等成分。研究证实, 当归多糖可通过多靶点效应发挥改善血液系统、抗肿瘤、预防各种理化因素诱导的细胞损伤及恶性转化等广泛的药理活性<sup>[16]</sup>, 如ASP能通过上调衰老相关基因 $p53$ 、 $p21$ 和 $Rb$ 表达及下调 $CDK4$ 和 $Cyclin E$ 表达来诱导人骨髓白血病干细胞衰老<sup>[17]</sup>。安静等<sup>[18]</sup>用ASP处理小鼠炎症相关性结肠癌, 结果显示, 当归多糖能降低肿瘤发生及抑制肿瘤发展的作用, 并且降低PCNA(proliferating cell nuclear antigen)、COX-2(cyclo-oxygenase 2)和iNOS(induced nitric oxide synthase)的表达。

本研究通过Transwell小室建立BMSCs与LLC细胞共培养体系, 结果显示, 共培养组BMSCs形态发生改变, 生长速度显著增快; 处于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期的细胞

比例降低, S期细胞比例增高。这与课题组前期结果相符合<sup>[9]</sup>。Western bolt法检测共培养组BMSCs TAFs标记分子 $\alpha$ -SMA、FAP蛋白质表达水平较正常BMSCs明显升高。上述结果说明, 肺癌微环境可诱导BMSCs向TAFs分化, 与文献报道一致<sup>[19]</sup>。与Co-BMSCs组比较, ASP-Co-BMSCs组在第3, 4, 5, 6, 7 d细胞生长速度明显降低; 处于G<sub>1</sub>期的细胞比例升高, S期细胞比例明显下降;  $\alpha$ -SMA、FAP蛋白质表达下降, 表明ASP有助于将机体的内环境及干细胞生存的微环境保持在一个相对的“稳态”阶段, 提高干细胞遗传稳定性作用。

机体内肿瘤微环境的组成成分相对复杂, 除了肿瘤细胞, 还有成纤维细胞、炎症细胞和内皮细胞等。就功能而言, 肿瘤微环境的存在不仅可为肿瘤细胞提供足够的养分, 同样可以帮助肿瘤细胞逃脱免疫细胞攻击。目前, 体外实验还无法完全模拟体内微环境, 有待进一步开展动物体内深入研究。

### 参考文献 (References)

- 1 姚晓军, 刘伦旭. 肺癌的流行病学及治疗现状. 现代肿瘤学 (Yao Xiaojun, Liu Lunxu. The epidemiology and treatment of lung cancer. Journal of Modern Oncology) 2014; 22(8): 1982-6.
- 2 Conrad C, Hüsemann Y, Niess H, von Lüttichau I, Huss R, Bauer C, *et al.* Linking transgene expression of engineered mesenchymal stem cells and angiopoietin-1-induced differentiation to target cancer angiogenesis. Ann Surg 2011; 253(3): 566-71.
- 3 Mueller LP, Luetzkendorf J, Widder M, Nerger K, Caysa H, Mueller T. TRAIL-transduced mesenchymal stromal cells (TRAIL-MS-C) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines *in vitro* and *in vivo*. Cancer Gene Ther 2011; 18(4): 229-39.
- 4 Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, Takashi S, *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. Cancer Cell 2011; 19(2): 257-72.
- 5 Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor micro-environment: A review of an essential relationship. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 63(4): 571-82.
- 6 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011; 144(5): 646-74.
- 7 She Y, Li Y, Liu Y, Asai G, Sun S, He J, *et al.* Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BMSCs. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2013; 45(12): 1011-20.
- 8 刘永琦, 窦娟娟, 达瑞, 蔡玲, 颜春鲁. CdCl<sub>2</sub>诱导大鼠BMSCs凋亡和DNA损伤的研究. 免疫学杂志 (Liu Yongqi, Dou Juanjuan, Da Rui, Cai Ling, Yan Chunlu. The BMSCs apoptosis and DNA damage induced by CdCl<sub>2</sub> in rat. Immunological Journal) 2012; 28(4): 305-7.
- 9 刘永琦, 王倩, 秦洁, 李屹, 舍雅莉, 李静雅. 肿瘤微环境对骨髓间充质干细胞形态、生长及增殖的影响. 中国细胞生物学学报 (Liu yongqi, Wang Qian, Qin Jie, Li Yi, She Yali, Li Jingya. The effect of tumor microenvironment to morphology, growth and proliferation of human mesenchymal stem cells-bone marrow. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(2): 180-7.
- 10 秦洁, 李屹, 刘永琦, 王倩, 舍雅莉, 骆亚莉. 骨髓间充质干细胞在肺癌微环境中的遗传稳定性及增殖能力. 基础医学与临床 (Qin Jie, Li Yi, Liu Yongqi, Wang Qian, She Yali, Luo Yali. Genetic stability and proliferation capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells in pulmonary adenocarcinoma microenvironment. Basic & Clinical Medicine) 2013; 33(9): 1112-7.
- 11 邵秉一, 于洋, 傅潇慧, 廖立, 金岩, 杨德琴. 雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中T淋巴细胞对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响及与TNF- $\alpha$ 的关系. 中国细胞生物学学报 (Shao Bingyi, Yu Yang, Fu Xiaohui, Liao Li, Jin Yan, Yang Deqin. Effect of T-lymphocytes on cell proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Cell Biology) 2014; 36(4): 476-82.
- 12 Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. Semin Cell Dev Biol 2010; 21(1): 33-9.
- 13 Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumor progression. Semin Cell Dev Biol 2010; 21(1): 19-25.
- 14 Lai D, Ma L, Wang F. Fibroblast activation protein regulates tumor-associated fibroblasts and epithelial ovarian cancer cells. Int J Oncol 2012; 41(2): 541-50.
- 15 周海英, 吴爱萍, 刘岩, 陈银苹, 郑素琴, 王文雅. 76例食管胃交界腺癌肿瘤相关成纤维细胞免疫组化观察. 重庆医学 (Zhou Haiying, Wu Aiping, Liu Yan, Chen Yinxin, Zheng Suqin, Wang Wenya. Effect of tumor-associated fibroblasts on the infiltration and metastasis of adenocarcinoma of esophagogastric junction. Chongqing Medicine) 2010; 39(3): 257-9.
- 16 陈曦, 曹蔚, 孙阳, 梅其炳. 当归多糖APS-bII的结构特征及体外抗肿瘤作用. 科学技术与工程 (Chen Xi, Cao Wei, Sun Yang, Mei Qibing. Physicochemical Properties and Antitumor Activities *in vitro* of *Angelica sinensis* Polysaccharide APS-bII. Science Technology and Engineering) 2010; 10(8): 1839-42.
- 17 贾道勇, 刘俊, 李成鹏, 李静, 张梦思, 张岩岩, 等. 当归多糖调控人白血病干细胞衰老的机制研究. 中国中药杂志 (Jia Daoyong, Liu Jun, Li Chengpeng, Li Jing, Zheng Mengsi, Zhang Yanyan, *et al.* Biological mechanisms of human-derived leukemia stem cells senescence regulated by *Angelica sinensis* polysaccharide. China Journal of Chinese Materia Medica) 2015; 40(1): 112-7.
- 18 安静, 赵博琛, 吴清, 兰颐, 陈岩岩, 刘娜, 等. 当归提取物配伍应用对小鼠结直肠癌的预防作用. 北京中医药大学学报 (An Jing, Zhao Bochen, Wu Qing, Lan Yi, Chen Yanyan, Liu Na, *et al.* Preventive effect of combined administration of extracts from Danggui (Radix Angelicae Sinensis) on colorectum cancer in mice. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine) 2014; 37(5): 309-13.
- 19 顾建美, 钱晖, 朱伟, 许文荣. 白血病细胞K562来源的外体对人脐带间充质干细胞作用的研究. 临床检验杂志 (Gu Jianmei, Qian Hui, Zhu Wei, Xu Wenrong. Effect of exosomes released from chronic myeloid leukemia K562 cells on human umbilical cord mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science) 2012; 30(7): 531-4.