

# 肺癌微环境对骨髓间充质干细胞自发衰老的抑制作用及其调控机制

高卓越<sup>1</sup> 何建新<sup>1</sup> 刘永琦<sup>1,2\*</sup> 卢志伟<sup>1</sup> 伍志伟<sup>1,2</sup> 骆亚莉<sup>1</sup> 张利英<sup>1</sup> 苏 韞<sup>1</sup> 薛 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** 该文探讨了肺癌微环境对骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)自发衰老的影响及其机制研究。采用Transwell小室建立BM-MSCs与肺腺癌细胞A549非接触共培养体系, 通过观察细胞形态学、细胞增殖和细胞衰老等变化以探讨肺腺癌微环境对BM-MSCs自发衰老的影响。利用qPCR技术检测细胞衰老相关端粒酶mRNA水平变化, Western blot技术寻找影响BM-MSCs自发衰老的胞内信号通路。结果显示, 共培养7 d后, 随着传代代次的增加, 共培养组骨髓间充质干细胞(Co-MSCs)细胞形态逐渐由成纤维样漩涡状生长分化为纺锤样集落状生长, 细胞增殖速度逐渐增快。同时, 与BM-MSCs相比, Co-MSCs没有出现明显的衰老特征, Co-MSCs内端粒酶活性始终处于较低水平, 统计学差异显著( $P < 0.01$ )。Western blot结果显示, 随着传代代次的增加, BM-MSCs的信号转导及转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)及其磷酸化水平始终处于较低水平, 而Co-MSCs的较高, 且有逐渐上升的趋势, 具有显著差异( $P < 0.05$ )。结果表明, 肺腺癌微环境诱导Co-MSCs向着永生化细胞方向分化, 有助于Co-MSCs逃脱衰老, 而这可能通过STAT3信号通路的持续活化来调控。

**关键词** 骨髓间充质干细胞; 肺癌微环境; 衰老; 端粒酶; STAT3

## The Inhibitory Effect of Lung Cancer Microenvironment on Self Senescence of BM-MSCs and Its Mechanism

Gao Zhuoyue<sup>1</sup>, He Jianxin<sup>1</sup>, Liu Yongqi<sup>1,2\*</sup>, Lu Zhiwei<sup>1</sup>, Wu Zhiwei<sup>1</sup>, Luo Yali<sup>1</sup>, Zhang Liying<sup>1</sup>, Su Yun<sup>1</sup>, Xue Na<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 exploring the inhibition and regulating mechanism of lung cancer microenvironment on self senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs). It was set up Transwell system in which BM-MSCs were co-cultured with A549 in an indirect way, to study the influence of lung cancer microenvironment on self senescence of BM-MSCs by cell morphology, cell proliferation assay and cell senescence dyeing experiment. Meanwhile, it was also studied the regulating mechanism of lung cancer microenvironment on BM-MSCs senescence by detecting telomerase mRNA level with qPCR and searching relating signaling pathways with Western blot technology, respectively. Our results of 7-days co-cultured indicated that, morphology of

收稿日期: 2015-08-15 接受日期: 2015-11-02

甘肃省杰出青年基金(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: August 15, 2015 Accepted: November 2, 2015

This work was supported by Gansu Province Funds for Distinguished Young Scientists (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: 2015-12-28 10:18:24 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151228.1018.002.html>

co-cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells (Co-MSCs) greatly turned to spindle-like shape from fibroblast-like shape. Meanwhile, the whirlpool-like spreading were replaced by colony-like spreading of Co-MSCs. Proliferation of Co-MSCs was increased as cells passaging. Meanwhile, senescence character in Co-MSCs was decreased compared with that in BM-MSCs as cells passaging. Further study showed that telomerase mRNA level in Co-MSCs was in lower, compared with that in BM-MSCs. It was significant difference statistically ( $P < 0.01$ ). The result of Western blot analysis showed that, as cells were passaged, the STAT3 protein and its phosphorylation levels in BM-MSCs were always lower than that in Co-MSCs, and Co-MSCs shown that higher gradually. It was significant difference statistically ( $P < 0.05$ ). Our results suggested that lung cancer microenvironment could induce BM-MSCs differentiate towards immortal cells to help BM-MSCs escape from senescence. The underlying mechanism could be involved in the activation of STAT3 in Co-MSCs.

**Keywords** bone marrow-derived mesenchymal stem cells; lung cancer microenvironment; senescence; telomerase; STAT3

骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)具有自我更新及多向分化潜能,同时其组织分布广泛,免疫原性较低,且易于体外分离、培养、扩增,近年来已成为创伤修复及自身免疫疾病治疗的理想细胞<sup>[1-3]</sup>。此外,近期研究显示, BM-MSCs具有向肿瘤组织和炎症部位的趋化能力,使得其有可能成为携带靶向药物治疗肿瘤的理想载体<sup>[4]</sup>。然而,越来越多的研究显示,迁移至肿瘤组织周围的BM-MSCs会在肿瘤微环境的影响下发生可诱导的转化,从而出现细胞形态、增殖率、衰老及凋亡、体内成瘤及转移能力等方面的改变<sup>[5-6]</sup>。有研究报道,无限增殖、不衰老是肿瘤细胞的重要特征<sup>[7-10]</sup>。也有研究显示,肿瘤发生相关信号通路IL-6(interleukin-6)/STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)的激活在促进癌细胞增殖和抑制细胞衰老过程中发挥着积极的作用<sup>[11-15]</sup>。我们前期已证实,肺癌微环境可迅速诱导共培养骨髓间充质干细胞(co-cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells, Co-MSCs)出现细胞形态改变及提高增殖能力<sup>[16]</sup>。然而,肺癌微环境对Co-MSCs衰老的影响以及作用机制目前还不清楚。本研究通过建立人骨髓间充质干细胞与肺腺癌细胞A549非接触共培养模型,发现肺癌微环境能抑制Co-MSCs的自发衰老。进一步的研究显示,该抑制作用是通过调控Co-MSCs内衰老相关端粒酶活性及STAT3信号通路来实现的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 BM-MSCs细胞株购自Cyagen Bio-

sciences Inc.(Catalog number: HUXMA-01001; Registration number: 08795844465781); A549细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库(Catalog number: TCHu150)。

1.1.2 试剂及仪器 Transwell小室购自美国Corning公司; DMEM/F-12购自美国Hyclone公司; 胎牛血清购自美国Hyclone公司; 0.25%胰蛋白酶(Trypsin)购自美国Hyclone公司; 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝公司; 二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝公司; 衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal)染色液购自上海碧云天生物技术有限公司; 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pY(705)-STAT3、STAT3、 $\beta$ -actin多克隆抗体购自Cell Signaling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; 总RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 逆转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; 引物合成购自上海生工生物工程技术有限公司。

全自动细胞荧光计数分析仪购自美国Cello-meter公司; 凝胶成像分析系统购自美国Bio-Rad公司; 倒置相差显微镜购自日本Olympus公司; 酶联免疫检测仪购自美国Bio-Rad公司; 细胞培养箱购自日本三洋电机公司。

### 1.2 方法

1.2.1 BM-MSCs的培养 BM-MSCs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/F-12培养液,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的细胞培养箱中培养,每3 d换液1次。待贴壁细胞达到80%~90%融合后,用0.25%胰蛋白酶于37 °C消化,然后以1:3的比例传代。

1.2.2 A549细胞的培养 A549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培养液,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的细胞培养箱中培养,每3 d换液1次。待贴壁细胞达到80%~90%融合后,用0.25%胰蛋白酶于37 °C消化,然后以1:3的比例传代。

1.2.3 共培养体系的建立及分组 采用具有PET膜的Transwell悬挂式培养小室结合6孔板进行非接触共培养。取对数生长期的细胞,用0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,计数、调整细胞密度后接种。实验组将BM-MSCs接种于Transwell共培养系统的下室,再将Transwell的上室置于孔中,在Transwell小室内接种A549,上下室的培养液相互通融,从而建立起BM-MSCs与A549的共培养体系;对照组BM-MSCs单独接种于下层。分别培养了7 d后,终止共培养,收集细胞移到培养瓶中继续培养,再分别将传代至第1代(passage 1, P1)、第3代(passage 3, P3)、第7代(passage 7, P7)的细胞用于实验。

1.2.4 细胞形态学观察 倒置相差显微镜下分别观察各组细胞P1、P3及P7代第3 d的细胞形态变化,并分别拍照记录。

1.2.5 MTT法测定细胞生长率 收集对数生长期的各组细胞,用0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,并调整浓度为 $1 \times 10^4$ /mL,接种于96孔培养板,每孔200  $\mu$ L,每组细胞6个重复。在37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养,于固定时间给每孔加入20  $\mu$ L MTT(5 mg/mL),于培养箱中继续孵育4 h,弃去液体,于沉淀内加入150  $\mu$ L DMSO,脱色摇床震荡10 min。用酶联免疫检测仪于490 nm波长处测定各孔吸光度(D)值。以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.6 衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal)染色 取P1、P3和P7代培养的BM-MSCs制备细胞爬片,经PBS洗涤后, $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液室温固定15 min,再次PBS洗涤3次,每次3 min,弃PBS。在新配置SA- $\beta$ -Gal染液(10  $\mu$ L/mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色液A, 10  $\mu$ L/mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色液B, 930  $\mu$ L/mL  $\beta$ -半乳糖苷酶染色液C, 50  $\mu$ L/mL X-Gal溶液)中染色,37 °C孵育过夜。PBS洗涤后倒置显微镜下观察照相。

1.2.7 qPCR检测hTERT表达量 分别提取BM-MSCs和Co-MSCs总RNA,经逆转录获cDNA。hTERT引物分别为: 5'-AAA AAA TGG GGA AGC ATG CCA

AGC TCT CGC T-3', 5'-CCA AAT CCG TGA CAT AAA AGA AAG ACC TGA-3'; 内参照GAPDH引物分别为: 5'-GAA ATC CAA AAT CAA GTG GGG CGA TGC T-3', 5'-TTT TAC CCA TGA CGA ACA TGG GGG CAT CA-3'。qPCR反应条件为: 95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 55 °C 40 s, 共40个循环,用qPCR软件分析结果。

1.2.8 Western blot检测pY(705)-STAT3 细胞共培养7 d后终止,各组细胞分别加入蛋白裂解缓冲液提取总蛋白,BCA法定量,以40  $\mu$ g/孔上样,进行10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转至PVDF膜,依次5%脱脂奶粉封闭,洗膜,分别加入兔抗pY(705)-STAT3、STAT3、 $\beta$ -actin(1:400)多克隆抗体,4 °C孵育过夜,洗膜,加入辣根酶标记的羊抗兔IgG(1:2 000)室温孵育2 h;ECL化学发光法显色,凝胶成像系统采集图像,Quantity One 4.31软件分析处理, $\beta$ -actin作为内参进行蛋白质半定量分析。

### 1.3 统计学分析

应用SPSS 21.0统计软件进行分析。计量资料结果采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

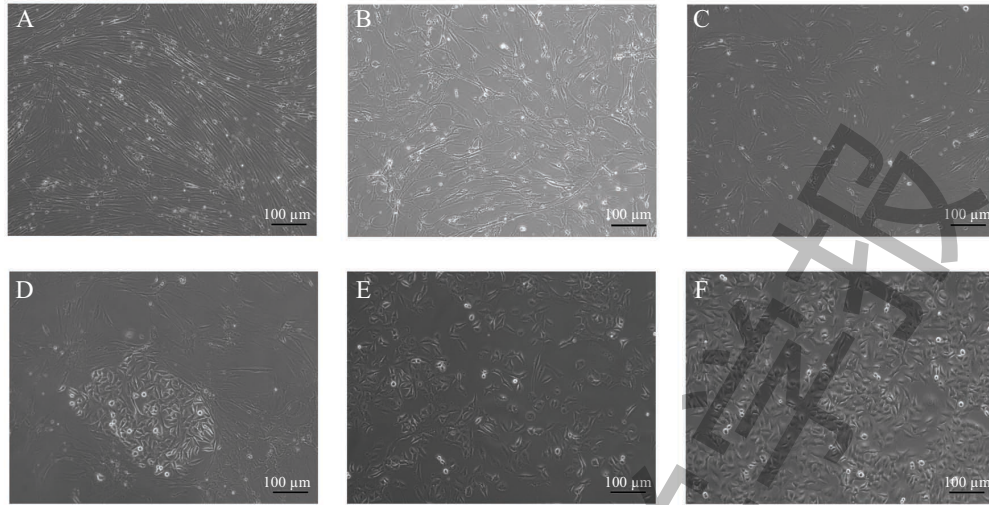
## 2 结果

### 2.1 肺癌微环境对BM-MSCs形态学的影响

倒置相差显微镜下观察结果显示,用BM-MSCs非专用培养基DMEM/F12培养液培养的BM-MSCs P1代细胞边界清晰,形态均一,呈成纤维样旋涡状贴壁均匀生长,遮光性较强;P3代细胞开始变长,边界略微模糊,形态不规则,遮光性减弱;P7代细胞进一步被拉长,无遮光性(图1)。与A549细胞共培养7 d的Co-MSCs用MSCs非专用培养基DMEM/F12培养液传代培养,P1代部分细胞出现形态改变,从成纤维样变为椭圆多边形,同时有集落生长的趋势;Co-MSCs P3代出现形态改变的细胞数量增多,且呈明显集落生长态势;Co-MSCs P7代细胞已几乎全部变为椭圆多边形,集落生长,细胞增殖旺盛(图1)。

### 2.2 肺癌微环境对BM-MSCs增殖能力的影响

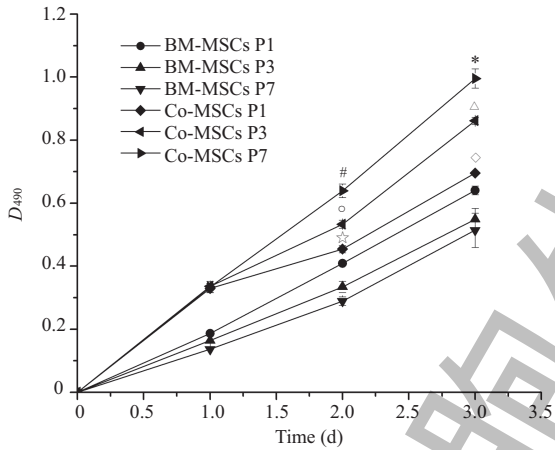
MTT结果显示,随着细胞传代次数的增加,BM-MSCs组P1、P3和P7代的增殖能力逐渐下降,而Co-MSCs组P1、P3和P7代的增殖能力逐渐上升(图2),两组细胞同样代数之间的增殖能力有统计学差异



A: BM-MSCs第1代; B: BM-MSCs第3代; C: BM-MSCs第7代; D: Co-MSCs第1代; E: Co-MSCs第3代; F: Co-MSCs第7代。  
A: BM-MSCs P1; B: BM-MSCs P3; C: BM-MSCs P7; D: Co-MSCs P1; E: Co-MSCs P3; F: Co-MSCs P7.

图1 各组细胞形态观察

Fig.1 Observation of cells morphology in each groups



\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P7与BM-MSCs P7生长3 d比较;  $\triangle P < 0.05$ , Co-MSCs P3与BM-MSCs P3生长3 d比较;  $\diamond P < 0.05$ , Co-MSCs与BM-MSCs P1生长3 d比较; # $P < 0.05$ , Co-MSCs与BM-MSCs的P7生长2 d比较;  $\circ P < 0.05$ , Co-MSCs与BM-MSCs P3生长2 d比较; \* $P < 0.05$ , Co-MSCs P1与BM-MSCs P1生长2 d比较;  $n = 3$ 。

\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P7 compared with BM-MSCs P7 at day 3;  $\triangle P < 0.05$ , Co-MSCs P3 compared with BM-MSCs P3 at day 3;  $\diamond P < 0.05$ , Co-MSCs P1 compared with BM-MSCs P1 at day 3; # $P < 0.05$ , Co-MSCs P7 compared with BM-MSCs P7 at day 2;  $\circ P < 0.05$ , Co-MSCs P3 compared with BM-MSCs P3 at day 2; \* $P < 0.05$ , Co-MSCs P1 compared with BM-MSCs P1 at day 2.  $n = 3$ 。

图2 各组细胞生长曲线变化

Fig.2 The change of cell growth curves in each groups

表1 Co-MSCs与BM-MSCs各代细胞传代所需天数比较( $\bar{x} \pm s$ )( $n = 3$ )

Table 1 Comparison of passing times (d) between Co-MSCs and BM-MSCs ( $\bar{x} \pm s$ ) ( $n = 3$ )

组别 Groups	第1代 P1	第3代 P3	第7代 P7
BM-MSCs	7.33±0.15	7.77±0.21	9.70±0.10
Co-MSCs	5.80±0.10*	5.53±0.06 <sup>○</sup>	4.93±0.15 <sup>●</sup>

\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P1与BM-MSCs P1比较;  $\circ P < 0.05$ , Co-MSCs P3与BM-MSCs P3比较;  $\bullet P < 0.05$ , Co-MSCs P7与BM-MSCs P7比较。

\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P1 compared with BM-MSCs P1;  $\circ P < 0.05$ , Co-MSCs P3 compared with BM-MSCs P3;  $\bullet P < 0.05$ , Co-MSCs P7 compared with BM-MSCs P7.

( $P < 0.05$ )。

此外, 我们还对BM-MSCs与Co-MSCs从P1传至P7代所需时间进行了比较。结果显示, 随着传代次数的增加, BM-MSCs传代所需时间增加, 而Co-MSCs传代所需时间缩短, 两组相同代数细胞之间相比有统计学差异( $P < 0.05$ )(表1)。

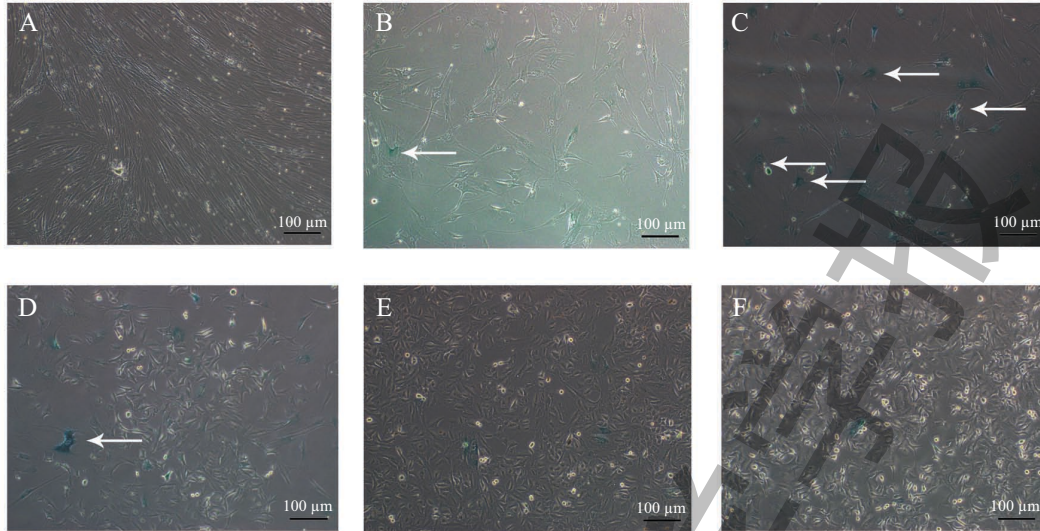
### 2.3 肺癌微环境对BM-MSCs自发衰老的影响

细胞衰老染色结果显示, 随着传代次数的增加, BM-MSCs组P1、P3和P7代的衰老细胞的数量逐渐增多, 而Co-MSCs组P1、P3和P7代的衰老细胞数量始终维持在较低水平(图3), 两组细胞同样代数之间有统计学差异( $P < 0.01$ )(图4)。

### 2.4 BM-MSCs衰老及凋亡相关的基因及蛋白质表达水平变化

qPCR结果显示, BM-MSCs不同代数细胞内端粒酶mRNA水平始终处于较高水平, 而Co-MSCs不同代数细胞内端粒酶mRNA水平均处于较低水平, 两组细胞同样代数之间有统计学差异( $P < 0.01$ )(图5)。

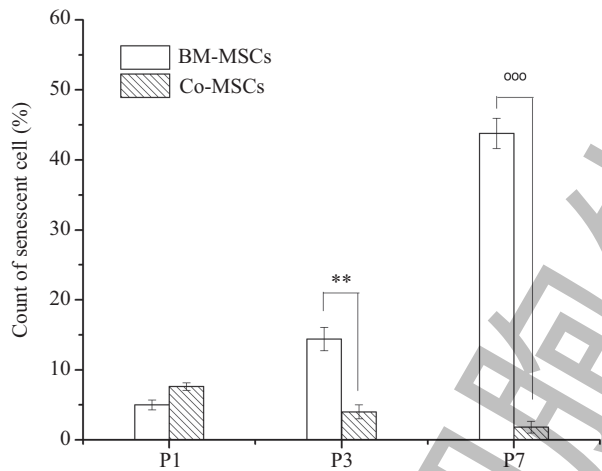
Western blot结果显示, 随着传代次数的增加,



A: BM-MSCs P1代; B: BM-MSCs P3代; C: BM-MSCs P7代; D: Co-MSCs P1代; E: Co-MSCs P3代; F: Co-MSCs P7代。白色箭头指示衰老细胞。  
A: BM-MSCs P1; B: BM-MSCs P3; C: BM-MSCs P7; D: Co-MSCs P1; E: Co-MSCs P3; F: Co-MSCs P7. White arrows point to senescence cells.

图3 各组细胞衰老表型观察

Fig.3 Observation of cells senescence in each groups



\*\* $P < 0.01$ ;  $\circ\circ\circ P < 0.001$ ;  $n = 3$ 。

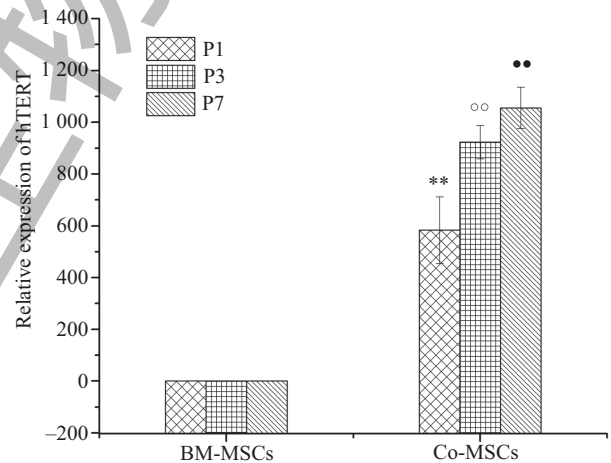
图4 各组衰老细胞计数

Fig.4 Count of senescent cells in each groups

BM-MSCs内STAT3蛋白质及其磷酸化水平始终处于较低水平, 而Co-MSCs较高, 且有逐渐上升的趋势(图6), 两组细胞P7代之间pY(705)-STAT3有统计学差异( $P < 0.05$ )(图7)。

### 3 讨论

我们的研究已发现, 不同培养条件对骨髓间充质干细胞的生长状态有较大影响<sup>[17]</sup>。已有文献报道显示, 人骨髓间充质干细胞在干细胞专用培养液的环境中可持续生长并传代, 而在普通细胞培养液中难以持续传代<sup>[18-19]</sup>。本研究使用普通细胞培养液DMEM/F12对BM-MSCs进行培养, 因此, 在P3代就



\*\* $P < 0.01$ , Co-MSCs P1与BM-MSCs P1比较;  $\circ\circ P < 0.01$ , Co-MSCs P3与BM-MSCs P3比较;  $\bullet\bullet P < 0.01$ , Co-MSCs P7与BM-MSCs P7比较。  $n = 3$ 。

\*\* $P < 0.01$ , Co-MSCs P1 compared with BM-MSCs P1;  $\circ\circ P < 0.01$ , Co-MSCs P3 compared with BM-MSCs P3;  $\bullet\bullet P < 0.01$ , Co-MSCs P7 compared with BM-MSCs P7.  $n = 3$ 。

图5 hTERT相对表达量检测

Fig.5 Detection of relative expression of hTERT

出现明显衰老的特征(图1和图3), 这与本研究中使用了DMEM/F12培养液有很大关系。

我们的研究结果显示, 肺腺癌微环境对人骨髓间充质干细胞的形态、生长、增殖均有影响<sup>[16]</sup>。同时还发现, 人骨髓间充质干细胞在肺腺癌微环境中的遗传稳定性发生改变<sup>[20]</sup>, 提示其有可能出现恶化。本研究也显示, 肺腺癌微环境中的Co-MSCs与正常BM-MSCs相比, 其同样代数的细胞增殖能力明显提

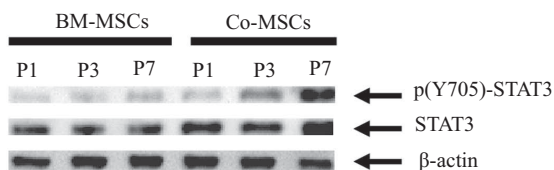
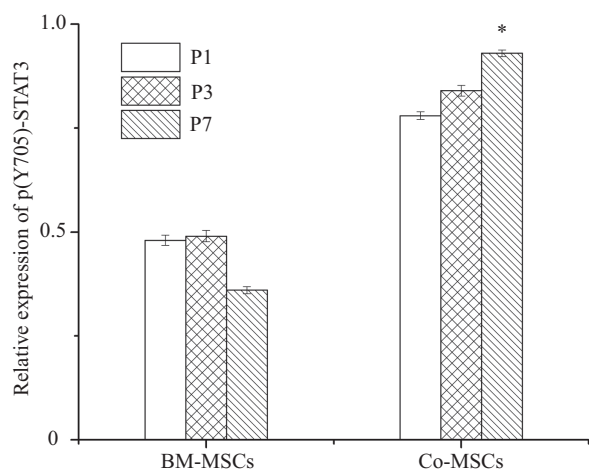


图6 Western blot检测各组细胞STAT3及其磷酸化水平  
Fig.6 STAT3 and its phosphorylation levels in each groups detected by Western blot



\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P7与BM-MSCs P7比较.  $n = 3$ .

\* $P < 0.05$ , Co-MSCs P7 compared with BM-MSCs P7.  $n = 3$ .

图7 STAT3及其磷酸化水平分析

Fig.7 The analysis of STAT3 and its phosphorylation levels

高(图2); 且随着传代代次增加, Co-MSCs细胞的增殖能力逐渐升高, 而BM-MSCs的增殖能力逐渐下降(图2)。这些结果表明, 肺癌微环境诱导MSCs向着细胞活力更强, 甚至恶化的方向分化, 同时也提示Co-MSCs的衰老程度与BM-MSCs相比会有区别。

所有正常原代细胞, 包括BM-MSCs, 在体外都不能保持无限传代, 这是由于原代细胞在体外分裂过程中会逐渐衰老直至死亡<sup>[21]</sup>。与此相反, 癌细胞普遍具有无限增殖及不衰老的特点<sup>[22]</sup>。为了检测肺癌微环境中BM-MSCs是否逃脱了自发衰老的命运, 我们对胞内衰老相关标志物 $\beta$ -半乳糖苷酶进行染色观察<sup>[23]</sup>。结果显示, A549微环境中的BM-MSCs产生了类似肿瘤细胞不衰老的特点(图3和图4), 提示肺癌微环境诱导BM-MSCs分化的结果之一就是逃离衰老。这与之前Rosland等<sup>[23]</sup>发现的BM-MSCs自发恶化后的表型相一致。衰老被认为是细胞应对外界胁迫时作出的响应, 目前公认的介导细胞衰老的三种机制是: 染色体两端的端粒损耗、DNA损伤和INK4/ARF位点的活化<sup>[24-25]</sup>。其中, 最常见的是细胞分裂过程中端粒损耗引起的衰老。因此, 我们重点

检测了干细胞内与端粒损耗相关的端粒酶mRNA水平, 结果显示, BM-MSCs内端粒酶mRNA水平始终处于较高水平, 而Co-MSCs mRNA水平始终处于较低水平(图5), 提示肺癌微环境可能通过降低MSCs内端粒酶活性帮助其逃避衰老。

关于STAT3与细胞衰老的关系及其机制众说纷纭<sup>[26-27]</sup>。最近的研究显示, 组成型激活的STAT3能通过阻止细胞衰老帮助其永生, 从而使细胞产生恶变<sup>[28]</sup>。我们的研究已发现, 肺癌微环境能够明显增强BM-MSCs的增殖能力(图2)并促使大量细胞向S期过度<sup>[6]</sup>。因此, 我们有理由认为, 肺癌微环境在诱导BM-MSCs分化的过程中通过激活BM-MSCs内STAT3的活性来帮助BM-MSCs产生高增殖能力和低衰老特征。Western blot结果与我们的预期一致(图6和图7), 提示肺癌微环境中的BM-MSCs可通过活化STAT3信号通路来抑制自身的衰老。

干细胞的分化受细胞内外因素的精确调控。其中, 肿瘤微环境或BM-MSCs自身因素引起的BM-MSCs恶性分化是近年来的研究热点。有研究认为, 肿瘤细胞可通过分泌癌相关炎症因子激活BM-MSCs内癌症信号分子核转录因子- $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B), 从而促进BM-MSCs的恶性转化<sup>[29]</sup>。已有研究报道, 长期接触致癌化合物能促进BM-MSCs的恶性转化<sup>[5]</sup>, 甚至BM-MSCs本身就具有自发恶性转化的潜能<sup>[23]</sup>。我们前期已建立了稳定的肺癌细胞A549与BM-MSCs的共培养体系, 并发现BM-MSCs在该共培养体系中会发生明显的细胞形态改变, 同时伴随细胞增殖能力的提高<sup>[6]</sup>。在本研究中, 我们发现, 该共培养体系能够诱发Co-MSCs脱离衰老, 进一步的研究显示, Co-MSCs可通过调节端粒酶和STAT3的活性避免衰老(图5、图6和图7)。这证明, 本体系中的Co-MSCs已经具备了一定程度的恶化特征, 同时也提示, 临床上利用BM-MSCs治疗肿瘤存在一定的风险。关于本模型中Co-MSCs是否具有成瘤性, 还需通过后续的体内实验加以验证。

## 参考文献 (References)

- 1 Akiyama K, You YO, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, *et al*. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Res Ther* 2012; 3(5): 40.
- 2 Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, *et al*. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev*

- 2013; 9(1): 32-43.
- 3 Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 496218.
- 4 Gottschling S, Granzow M, Kuner R, Jauch A, Herpel E, Xu EC, *et al.* Mesenchymal stem cells in non-small cell lung cancer – different from others? Insights from comparative molecular and functional analyses. *Lung Cancer* 2013; 80(1): 19-29.
- 5 Tang Q, Chen Q, Lai X, Liu S, Chen Y, Zheng Z, *et al.* Malignant transformation potentials of human umbilical cord mesenchymal stem cells both spontaneously and via 3-methylcholanthrene induction. *PLoS One* 2013; 8(12): e81844.
- 6 Lucarelli E, Bellotti C, Mantelli M, Avanzini MA, Maccario R, Novara F, *et al.* *In vitro* biosafety profile evaluation of multipotent mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of sarcoma patients. *J Trans Med* 2014; 12: 95.
- 7 Adams PD, Jasper H, Rudolph KL. Aging-induced stem cell mutations as drivers for disease and cancer. *Cell Stem Cell* 2015; 16(6): 601-12.
- 8 Afanas'ev I. Mechanisms of superoxide signaling in epigenetic processes: Relation to aging and cancer. *Aging Dis* 2015; 6(3): 216-27.
- 9 Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, *et al.* Tumour-infiltrating Gr-1<sup>+</sup> myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* 2014; 515(7525): 134-7.
- 10 Serrano M. Cancer: Final act of senescence. *Nature* 2011; 479(7374): 481-2.
- 11 Liu CB, Wang R, Dong MW, Gao XR, Yu F. Expression of hepcidin at the choroid plexus in normal aging rats is associated with IL-6/Stat3 signaling pathway. *Sheng Li Xue Bao* 2014; 66(6): 639-46.
- 12 Li L, Wei W, Zhang Y, Tu G, Yang J, Xing Y. SirT1 and STAT3 protect retinal pigmented epithelium cells against oxidative stress. *Mol Med Rep* 2015; 12(2): 2231-8.
- 13 Park SJ, Shin EJ, Min SS, An J, Li Z, Hee Chung Y, *et al.* Inactivation of JAK2/STAT3 signaling axis and downregulation of M1 mAChR cause cognitive impairment in klotho mutant mice, a genetic model of aging. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(8): 1426-37.
- 14 Zhang L, Yang Z, Ma A, Qu Y, Xia S, Xu D, *et al.* Growth arrest and DNA damage 45G down-regulation contributes to Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 activation and cellular senescence evasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 59(1): 178-89.
- 15 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.
- 16 范萍, 刘永琦, 吴晓晶, 董介正, 颜春鲁, 张毅, 等. 不同条件下骨髓间充质干细胞分离培养及生物学特性研究. *细胞与分子免疫学杂志*(Fan Ping, Liu Yongqi, Wu Xiaojing, Dong Jiezheng, Yan Chunlu, Zhang Yi, *et al.* Study on culturing and biological characters of isolated bone marrow-derived mesenchymal stem cells in different condition. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2010; 26(4): 322-4.
- 17 赵霞, 路希敬, 刘国强, 徐敏, 邢健, 王棕, 等. 不同培养基培养人脐血间充质干细胞的差异. *中国组织工程研究*(Zhao Xia, Lu Xijing, Liu Guoqiang, Xu Min, Xing Jian, Wang Liang, *et al.* Differences of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultured in different media. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*) 2013; 17(19): 3449-54.
- 18 彭学武, 彭健. 间充质干细胞长期传代培养条件的研究. *中国细胞生物学报*(Peng Xuewu, Peng Jian. Research progress in culture condition of mesenchymal stem cells during long-term subculture. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(2): 271-7.
- 19 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腺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.
- 20 Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621.
- 21 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 22 Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, *et al.* Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 2009; 69(13): 5331-9.
- 23 Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130(2): 223-33.
- 24 Estrada JC, Torres Y, Benguria A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, *et al.* Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis* 2013; 4: e691.
- 25 Junk DJ, Bryson BL, Jackson MW. HiJAK'd Signaling; the STAT3 paradox in senescence and cancer progression. *Cancers (Basel)* 2014; 6(2): 741-55.
- 26 Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAKSTAT* 2013; 2(4): e25763.
- 27 Orecchia V, Regis G, Tassone B, Valenti C, Avalle L, Saoncella S, *et al.* Constitutive STAT3 activation in epidermal keratinocytes enhances cell clonogenicity and favours spontaneous immortalization by opposing differentiation and senescence checkpoints. *Exp Dermatol* 2015; 24(1): 29-34.
- 28 Wang L, Zhao Y, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu C, *et al.* IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells* 2013; 31(7): 1383-95.