

脐带间充质干细胞通过IL-6/STAT3信号通路 促进骨肉瘤细胞增殖和迁移

胡文龙^{1,2,3} 殷嫦嫦^{1*} 吴平平² 邬亚华¹ 王丽丽¹ 柯秀梅¹

(¹九江学院基础医学院, 九江市转化医学重点实验室, 九江 332000; ²南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006;
³南昌大学第二附属医院骨科, 南昌 330006)

摘要 为了探讨IL-6(interleukin-6, IL-6)/STAT3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路对骨肉瘤细胞增殖和迁移的作用, 该研究采用ELISA检测人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)和Saos-2细胞白介素-6的表达量。Western blot检测Saos-2细胞STAT3、p-STAT3蛋白质的表达水平。RT-PCR检测*PCNA*、*CyclinD1*、*Survivin*、*STAT3*基因的转录水平。细胞计数法和CCK-8法检测Saos-2细胞的增殖能力。划痕实验和Transwell实验检测Saos-2细胞的迁移能力。结果显示, hUC-MSCs IL-6表达量明显高于Saos-2细胞; hUC-MSCs的条件培养基(conditioned medium, CM)和IL-6均能激活STAT3, IL-6中和抗体则明显削弱了hUC-MSCs-CM的激活作用; 用IL-6中和抗体或AG490抑制STAT3的活性后, Saos-2细胞的增殖相关基因*PCNA*、*CyclinD1*、*Survivin*的mRNA表达水平明显下调, 其增殖和迁移能力明显下降。以上表明, 脐带间充质干细胞能分泌IL-6激活, STAT3信号通路促进骨肉瘤细胞的体外增殖和迁移。

关键词 脐带间充质干细胞; 骨肉瘤; 白介素6; STAT3; 增殖; 迁移

hUC-MSCs Promote the Proliferation and Migration of Osteosarcoma Cells through IL-6/STAT3 Signaling

Hu Wenlong^{1,2,3}, Yin Changchang^{1*}, Wu Pingping², Wu Yahua¹, Wang Lili¹, Ke Xiumei¹

(¹Jiujiang Key Laboratory of Translational Medicine, Basic Medical College, Jiujiang University, Jiujiang 332000, China;
²Medicine Graduate School, Nanchang University, Nanchang 330006, China;
³Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract This work was aimed to study the effects of IL-6/STAT3 signaling on the proliferation and migration of osteosarcoma cells. The expressions of interleukin-6 (IL-6) in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) and Saos-2 cells were assayed by ELISA. The protein levels of STAT3 and p-STAT3 in extracts from Saos-2 cells were determined by Western blot. RT-PCR was used to determine the transcription levels of *PCNA*, *CyclinD1*, *Survivin* and *STAT3* genes. The proliferation of Saos-2 cells was measured by cytometry and CCK-8 assay, and migration potential by wound-healing assay and Transwell assay. The results demonstrated that the expression of IL-6 in hUC-MSCs was obviously higher than that in Saos-2 cells. STAT3 was activated by conditioned medium from hUC-MSCs (hUC-MSCs-CM) and IL-6 and the activation could be

收稿日期: 2015-09-01 接受日期: 2015-12-15

江西省科技计划项目(批准号: 20142BBG70018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0792-8570078, E-mail: yinchangchang112@163.com

Received: September 1, 2015 Accepted: December 15, 2015

This work was supported by the Foundation of the Science and Technology Planning Project of Jiangxi Province (Grant No.20142BBG70018)

*Corresponding author. Tel: +86-792-8570078, E-mail: yinchangchang112@163.com

网络出版时间: 2016-01-08 14:54:16 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160108.1454.008.html>

attenuated by a neutralization antibody against IL-6. The inhibition of STAT3 in Saos-2 cells by IL-6 neutralizing antibody or AG490 down-regulated the levels of mRNAs of *PCNA*, *CyclinD1* and *Survivin* proliferation related genes related to proliferation, decreased cell proliferation and migration. The results proved that STAT3 activation by IL-6 from hUC-MSCs might promote the proliferation and migration of osteosarcoma cells *in vitro*.

Keywords umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; osteosarcoma; interleukin-6; STAT3; proliferation; migration

间充质干细胞是一类具有多向分化潜能的非造血干细胞, 能被诱导分化为多种组织细胞, 成为组织工程良好的种子细胞。同时, 其肿瘤趋化性和低免疫原性也为肿瘤的治疗打开了新视野。大量研究表明, 间充质干细胞可作为载体工具携带抗肿瘤因子用于多种恶性肿瘤的治疗^[1-3]。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)是间充质干细胞的新生代表, 与成体间充质干细胞相比, 不仅具有更强的自我更新能力^[4], 而且具有更强的免疫抑制作用^[5]及更高的转染效率^[6], 已成为干细胞抗肿瘤的研究热点。hUC-MSCs能分泌多种细胞因子^[7], 参与调控肿瘤的增殖、转移及血管生成等生物学行为, 其中, 白介素-6(interleukin-6, IL-6)可能是最重要的炎性因子之一^[8]。在多种恶性肿瘤患者血清及肿瘤标本中IL-6的表达水平明显升高, 研究表明, IL-6能上调增殖及抗凋亡相关基因的表达, 直接促进肿瘤细胞增殖^[9]。IL-6信号是由其特异性 α 受体(IL-6R)、 β 受体(gp130)所介导的。gp130是所有IL-6家族成员的共同受体, 激活后能产生多种细胞内信号级联反应, 其中最主要的是酪氨酸蛋白激酶2(janus kinase 2, JAK2)/信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路^[10]。

STAT3信号通路参与调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移等一系列生物学行为^[11], STAT3的持续活化能促进肿瘤的形成和发展, 还与癌症的化疗药物抵抗密切相关^[12]。Ryu等^[13]研究表明, STAT3的活化水平与骨肉瘤患者的预后直接相关, p-STAT3水平越高, 患者预后越差。至今为止, 并未见国内外有hUC-MSCs与骨肉瘤的关系的相关研究报道, hUC-MSCs分泌的IL-6能否影响骨肉瘤细胞的生物学行为以及JAK2/STAT3信号通路在hUC-MSCs与骨肉瘤细胞相互作用的过程中发挥的具体作用均不清楚。因此, 本研究旨在阐明hUC-MSCs对骨肉瘤细胞体外增殖和迁移的作用及IL-6依赖的JAK2/STAT3信号通路

在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

5份脐带标本由九江市妇幼保健院产科提供, 产妇及胎儿身体未见异常, 营养状况良好。产妇及家属对本实验均知情同意, 并经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清、 α -MEM培养基、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液购自Gibco公司。重组人白介素-6(recombinant human interleukin-6, rhIL-6)购自Peprotech公司。AG490购自Selleckchem公司。0.1%结晶紫染色液购自索莱宝科技有限公司。兔抗人STAT3抗体、兔抗人p-STAT3抗体购自Cell Signaling Technology公司。兔抗人GAPDH抗体购自Abcam公司。辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗、高灵敏度化学发光检测试剂盒、HiFi-MMLV cDNA逆转录试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自经科化学科技有限公司。IL-6酶联免疫吸附测定试剂盒购自伊莱瑞特生物科技有限公司。引物由生工生物工程上海股份有限公司合成。GREENspin细胞RNA快速提取试剂盒购自庄盟国际生物基因科技有限公司。2 \times Taq Master Mix购自欣百诺生物科技有限公司。塑料培养皿、25 cm²塑料培养瓶、6孔板、96孔板及Transwell 24孔板均购自Corning公司。倒置相差显微镜购自Nikon公司。酶标仪购自BioTek公司。

1.3 方法

1.3.1 hUC-MSCs的分离培养及鉴定 采用组织块贴壁法分离培养hUC-MSCs。使用含10% FBS的 α -MEM完全培养基贴壁培养hUC-MSCs, 细胞汇合度达80%~90%后, 按1:3传代。倒置相差显微镜观察细胞形态及贴壁能力。细胞传代至第5代, 流式细胞仪检测hUCMSCs CD19、CD29、CD90及CD105蛋

白质水平。

1.3.2 hUC-MSCs条件培养基(conditioned medium, CM)的制备 重悬第5代hUC-MSCs, 调整细胞密度为 5×10^5 /mL, 取3 mL细胞悬液接种于T25培养瓶内, 待细胞完全贴壁后更换完全培养基为无血清 α -MEM, 培养24 h后收集培养基, 3 000 r/min离心20 min, 0.22 μ m过滤, -80°C 冻存备用。

1.3.3 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 同以上方法收集Saos-2细胞及hUC-MSCs培养液上清, 按照IL-6 ELISA检测试剂盒操作说明测定Saos-2细胞和hUC-MSCs的IL-6表达量。

1.3.4 总RNA提取及RT-PCR 取Saos-2细胞以 1×10^5 /孔接种于6孔板内, 按培养条件随机分为6组。(1)对照组: 加入完全培养基培养; (2)IL-6组: 加入含20 μ g/L rhIL-6的完全培养基培养; (3)CM组: 加入含40% hUC-MSCs-CM的完全培养基培养; (4)CM+anti-IL-6组: 加入含20 mg/L IL-6中和抗体和40% hUC-MSCs-CM的完全培养基培养; (5)CM+AG490组: 加入含50 μ mol/L AG490和40% hUC-MSCs-CM的完全培养基培养; (6)AG490组: 加入含50 μ mol/L AG490的完全培养基培养。24 h后, 提取各组细胞总RNA, 逆转录为cDNA后进行PCR扩增, 1%琼脂糖凝胶电泳检测目的基因条带。总RNA的提取、逆转录、PCR反应均按试剂盒说明操作。内参为 β -actin, 目的基因包括: *PCNA*、*CyclinD1*、*Survivin*和*STAT3*, 引物序列及产物大小见表1。

1.3.5 Western blot检测STAT3磷酸化水平 Saos-2细胞接种于培养瓶内, 汇合度达80%时按上述方法分组, 更换相应培养基。30 min后, 提取各组细胞总蛋

白, BCA法检测蛋白质浓度。采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质(每孔30~50 μ g), 转膜、封闭, 一抗 4°C 孵育过夜, 二抗室温孵育2 h, 化学发光后X-光胶片曝光, 扫描条带进行灰度分析。内参为GAPDH, 目的蛋白包括STAT3和p-STAT3。

1.3.6 细胞计数法和CCK-8法检测各组细胞增殖情况 细胞计数法: 取Saos-2细胞按 1×10^4 /孔接种于6孔板, 随机分为6组, 同1.3.4的方法分组, 每孔加入2 mL相关培养基, 每组设置4个复孔, 分别于相应时间点对各组细胞进行计数。CCK-8法: 取Saos-2细胞按1 000/孔接种于96孔板, 随机分为6组, 按上述方法分组, 每组设置4个复孔, 每孔加入200 μ L相应培养基。分别于第6 d和第9 d各取1块板, 每孔加入10 μ L CCK-8试剂后于 37°C 孵育2 h, 酶标仪测定其450 nm波长处吸光度(D)值。

1.3.7 Transwell迁移实验 取Saos-2细胞接种于6孔板内, 待细胞汇合度达80%时按上述方法随机分组, 更换相应培养基培养48 h后, 常规消化细胞, 以无血清 α -MEM重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL。上室每孔加入100 μ L细胞悬液, 各组下室均加入600 μ L含10% FBS的 α -MEM完全培养基, 37°C 培养12 h。1%结晶紫染色液浸染上室下壁细胞, 显微镜下随机选取5个高倍镜视野进行细胞计数。

1.3.8 划痕实验 取Saos-2细胞接种于6孔板内, 待细胞汇合度达80%时, 按上述方法随机分为6组, 用200 μ L枪头在每孔细胞中央划一横线, 更换相应培养基培养, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 24 h后于倒置相差显微镜下观察细胞迁移情况并拍照。

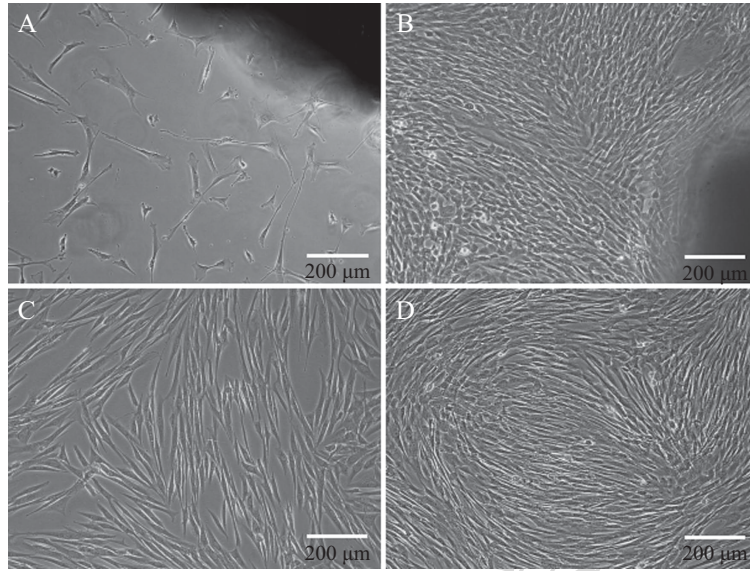
1.4 统计学分析

所有实验均最少重复3次, 数据采用均数 \pm 标准

表1 引物序列和产物长度

Table 1 Sequence of primers and product length

基因 Genes	引物序列 Sequences of primers	产物长度 Product length
<i>β-actin</i>	Forward: 5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC-3' Reverse: 5'-TGG AAG GTG GAC AGC GAG G-3'	443 bp
<i>PCNA</i>	Forward: 5'-CGG TTA GAA GGG GTT A-3' Reverse: 5'-GAC GGT CTC GGT GTG T-3'	360 bp
<i>CyclinD1</i>	Forward: 5'-GTGCTGCGAAGTGGAAACC-3' Reverse: 5'-ATC CAG GTG GCG ACG ATC T-3'	174 bp
<i>Survivin</i>	Forward: 5'-AGG ACC ACC GCA TCT CTA CAT-3' Reverse: 5'-AAG TCT GGC TCG TTC TCA GTG-3'	118 bp
<i>STAT3</i>	Forward: 5'-CCT GAA GCT GAC CCA GGT AG-3' Reverse: 5'-TTC CAA ACT GCA TCA ATG AAT C-3'	133 bp



A: 原代hUC-MSCs培养6 d; B: 原代hUC-MSCs培养14 d; C: 第1代hUC-MSCs培养2 d; D: 第5代hUC-MSCs培养3 d。

A: hUC-MSCs at primary cultured for 6 days; B: hUC-MSCs at primary cultured for 14 days; C: hUC-MSCs at passage 1 cultured for 2 days; D: hUC-MSCs at passage 5 cultured for 3 days.

图1 hUC-MSCs形态学观察

Fig.1 Morphology observation of hUC-MSCs

差表示, 采用SPSS 19.0统计软件进行数据分析。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用Scheffe检验, 计数资料采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

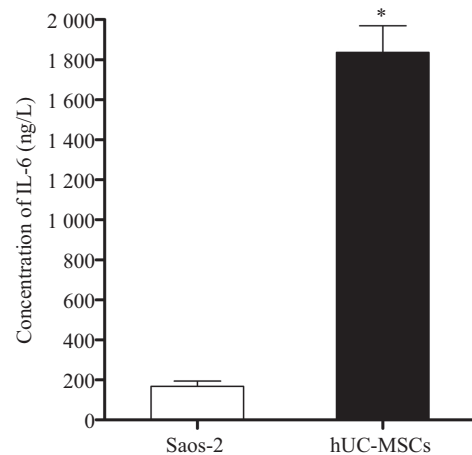
2 结果

2.1 hUC-MSCs的生物学特性

脐带组织原代培养10~14 d后, 镜下可见较多成纤维样细胞呈放射状生长, 传代后细胞形态均一, 均呈长梭形或纺锤形, 旋涡状分布(图1)。前期流式细胞术表型鉴定, 细胞高表达CD29、CD90、CD105(>95%), 极低表达CD19(0.1%), 符合间充质干细胞鉴定标准。

2.2 IL-6和hUC-MSCs-CM对Saos-2细胞STAT3和p-STAT3蛋白质表达的影响

20 $\mu\text{g/L}$ rhIL-6及40% hUC-MSC-CM分别作用于Saos-2细胞30 min后, p-STAT3表达明显升高。由于IL-6是STAT3的主要激活物质, 通过ELISA检测发现, hUC-MSCs-CM中浓度可达(1 804.8 \pm 152.2) ng/L, 而同样数量的Saos-2细胞分泌的IL-6浓度仅为(170.1 \pm 22.5) ng/L(图2)。在CM中加入IL-6中和抗体阻断IL-6的作用后, p-STAT3表达下降, STAT3的活性受到抑制, 但仍高于对照组。AG490为JAK2抑制剂, 其显著抑制了Saos-2细胞STAT3的活化, 同时也削弱了CM对



1.5 \times 10⁶ hUC-MSCs和Saos-2细胞在3 mL无血清DMEM中培养24 h后, ELISA检测细胞上清液IL-6水平。n=4, * $P < 0.05$, 与Saos-2细胞组比较。

1.5 \times 10⁶ hUC-MSCs and Saos-2 cells were grown in 3 mL serum-free DMEM for 24 h, and the IL-6 level in the supernatant was measured by ELISA. n=4, * $P < 0.05$ vs Saos-2 cell group.

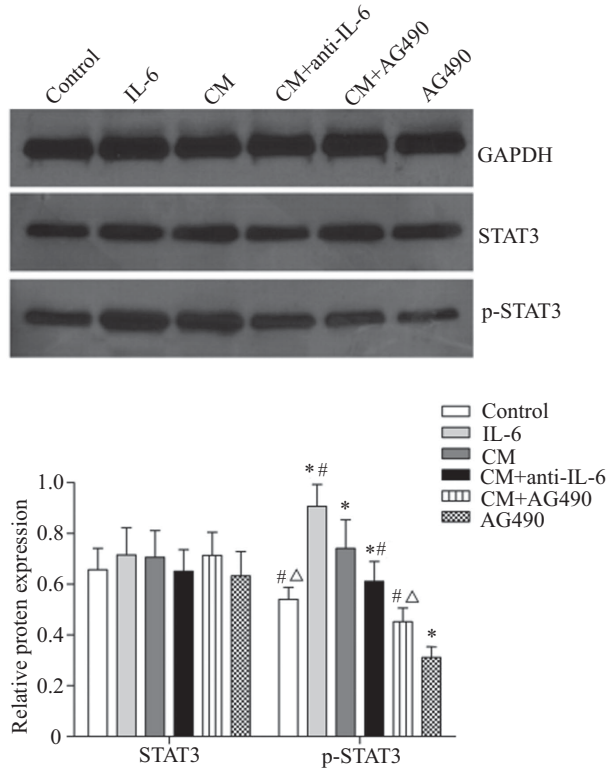
图2 ELISA检测Saos-2细胞和hUC-MSCs中IL-6的表达量

Fig.2 The expressions of IL-6 in Saos-2 and hUC-MSCs detected by ELISA

STAT3的激活作用, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞STAT3的蛋白质水平无明显差异(图3)。

2.3 IL-6和STAT3对Saos-2细胞增殖相关基因表达的影响

RT-PCR检测发现, CM组增殖相关基因PCNA、CyclinD1、Survivin表达水平均明显上调, IL-6中

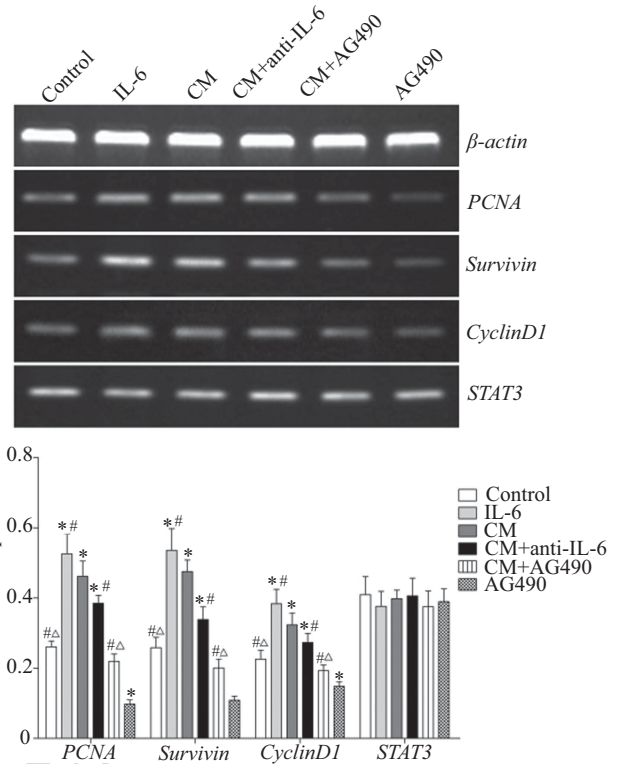


Western blot检测各组Saos-2细胞培养30 min后STAT3和p-STAT3的蛋白质水平。n=3, *P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与CM组比较; ΔP<0.05, 与AG490组比较。

The expressions of STAT3 and p-STAT3 protein in the different groups of Saos-2 cells cultured for 30 min were analyzed by Western blot. n=3, *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs CM group; ΔP<0.05 vs AG490 group.

图3 IL-6和hUC-MSCs-CM对Saos-2细胞STAT3和p-STAT3蛋白质表达的影响

Fig.3 Effects of IL-6 and hUC-MSCs-CM on the expressions of STAT3 and p-STAT3 protein in Saos-2 cells

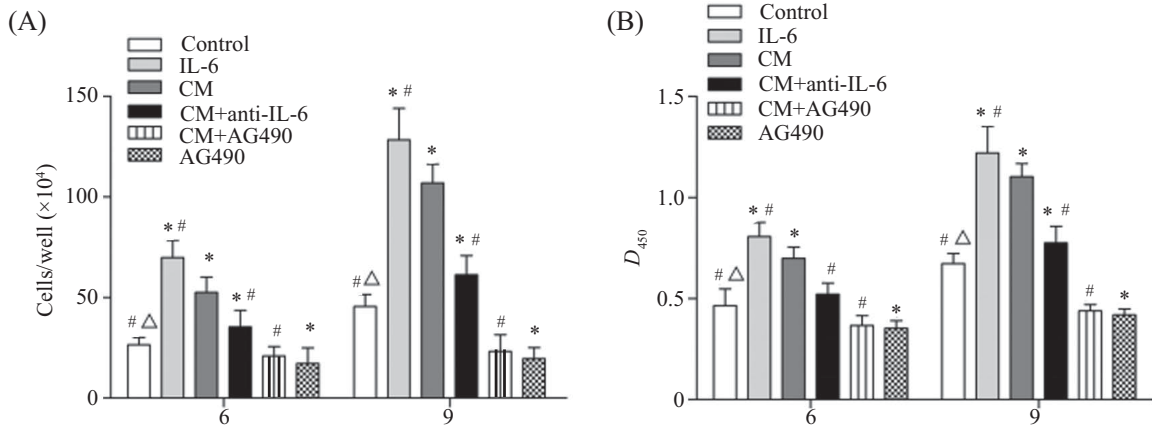


各组Saos-2细胞培养24 h后, 提取总RNA。RT-PCR检测PCNA、CyclinD1、Survivin和STAT3 mRNA的表达水平。n=3, *P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与CM组比较; ΔP<0.05, 与AG490组比较。

Total RNA was extracted from different groups of Saos-2 cells cultured for 24 h, and the expressions of PCNA, CyclinD1, Survivin and STAT3 mRNA were detected by RT-PCR. n=3, *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs CM group; ΔP<0.05 vs AG490 group.

图4 IL-6和STAT3对Saos-2细胞增殖相关基因表达的影响

Fig.4 Effects of IL-6 and STAT3 on the expressions of proliferation related genes in Saos-2 cells

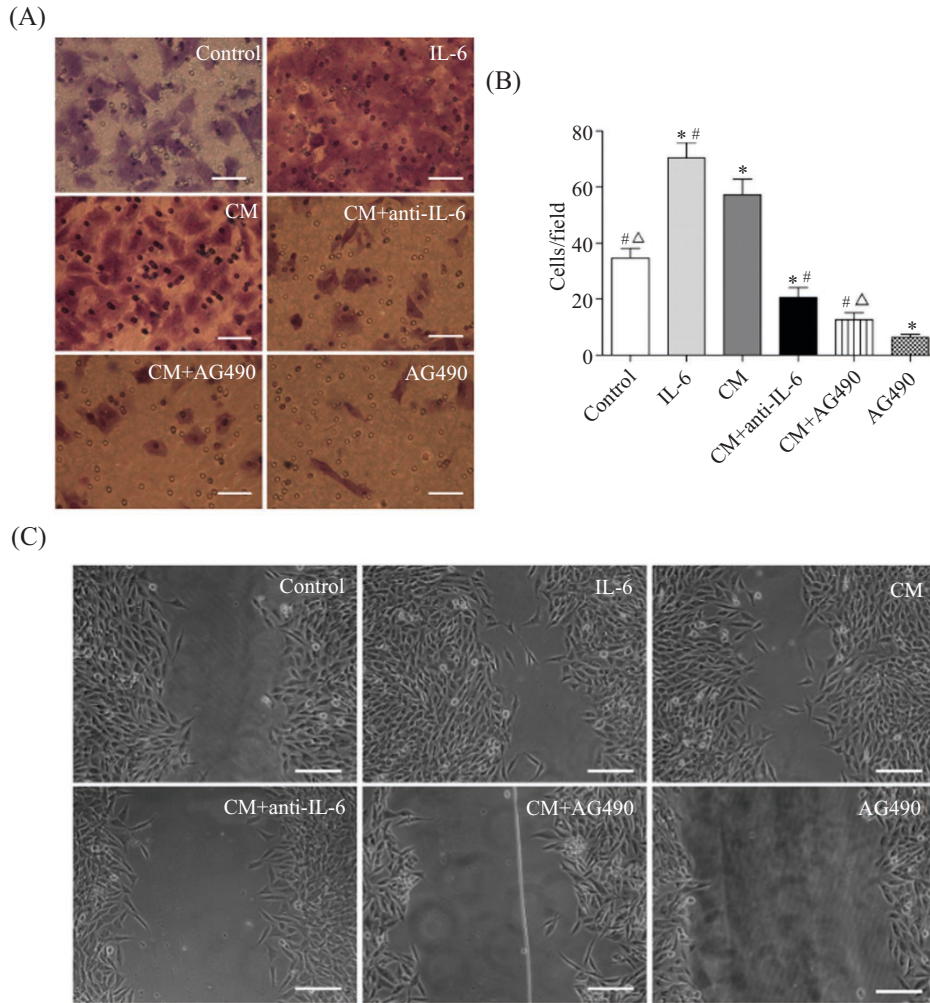


细胞计数法(A)和CCK-8法(B)分别于第6 d和第9 d检测各组Saos-2细胞增殖情况。n=4, *P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与CM组比较; ΔP<0.05, 与AG490组比较。

The proliferation of Saos-2 cells in different groups were measured at 6 d and 9 d with cytometry (A) and CCK-8 assay (B). n=4, *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs CM group; ΔP<0.05 vs AG490 group.

图5 IL-6和STAT3对Saos-2细胞增殖的影响

Fig.5 Effects of IL-6 and STAT3 on the proliferation of Saos-2 cells



A: 各组Saos-2细胞培养24 h后, 用完全培养基重悬, 接种于Transwell板上室, 培养12 h后进行细胞固定、染色和计数(标尺=50 μ m); B: 穿过Transwell小室的细胞数统计; C: 细胞划痕实验(标尺=200 μ m)。n=5, *P<0.05, 与对照组比较; #P<0.05, 与CM组比较; Δ P<0.05, 与AG490组比较。
A: Saos-2 cells in different groups were cultured for 24 h, then cells were suspended in complete medium and plated onto upper chamber of a transwell plate for 12 h. Cells migrated to the undersurface were fixed, stained and counted (Scale bars=50 μ m). B: the number of migratory cells. C: wound-healing assay (Scale bars=200 μ m). n=5, *P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs CM group; Δ P<0.05 vs AG490 group.

图6 IL-6和STAT3对Saos-2细胞迁移的影响

Fig.6 Effects of IL-6 and STAT3 on the migration of Saos-2 cells

和抗体可明显减弱CM的促增殖基因表达作用, 但CM+anti-IL-6组各基因转录水平仍高于对照组。在CM中加入AG490抑制了STAT3的活性后(图3), Saos-2细胞的PCNA、CyclinD1、Survivin的mRNA水平明显下降, 且低于对照组的水平。rhIL-6对各增殖相关基因均具有显著的上调作用, 差异均有统计学意义(P<0.05)。STAT3基因的转录水平在各处理因素作用24 h后, 未见明显变化(图4)。

2.4 IL-6和STAT3对Saos-2细胞增殖的影响

细胞计数实验及CCK-8实验显示, 外源性IL-6及hUC-MSCs-CM均能显著促进Saos-2细胞增殖, 而CM+anti-IL-6组细胞数量及D值明显低于CM组。AG490明显延缓了Saos-2细胞的增殖, 即使是CM存

在的条件下也不能提高细胞的增殖能力, 差异均有统计学意义(P<0.05)(图5)。

2.5 IL-6和STAT3对Saos-2细胞迁移的影响

20 μ g/L rhIL-6和40% hUC-MSC-CM分别预处理Saos-2细胞24 h后, 细胞迁移能力明显增强(P<0.05); 于CM中加入IL-6中和抗体, 细胞迁移能力明显减弱, 并低于对照组(P<0.05); CM+AG490组穿过聚碳酸酯膜的细胞数量明显少于对照组及CM组(P<0.05)(图6A和图6B)。划痕实验显示, IL-6及hUC-MSC-CM均提高了Saos-2细胞的损伤愈合能力, 而CM中的IL-6被中和后, 细胞的愈合能力明显下降, 这与Transwell结果一致。当使用AG490抑制了Saos-2细胞的JAK2/STAT3信号通路后, 无论hUC-MSC-CM是否存在, 细

胞的愈合能力均严重受损(图6C)。

3 讨论

多种人类肿瘤的发生、发展均与IL-6的异常表达密切相关。Chang等^[14]认为, IL-6具有促进肿瘤细胞增殖、血管生成以及诱导肿瘤细胞发生上皮间质转化、促进髓系抑制性细胞的扩增和募集等一系列改变肿瘤细胞固有生物学特性和优化肿瘤外部生长环境的功能。本研究发现, hUC-MSCs能分泌大量的IL-6, 约为Saos-2细胞的10倍。因此, 当hUC-MSCs作为骨肉瘤基因治疗的载体细胞进入肿瘤微环境后, 其分泌的IL-6对骨肉瘤细胞的作用值得深究。进一步通过细胞计数、CCK-8法和Transwell迁移实验及划痕实验发现, hUC-MSCs-CM能促进Saos-2细胞的增殖和迁移, 而加入IL-6中和抗体后, 基本消除了这种促进作用甚至出现抑制作用, 表明hUC-MSCs能通过旁分泌途径促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移, IL-6在该过程中发挥了至关重要的作用。

JAK2/STAT3信号通路是IL-6发挥生物学效应的主要途径^[10], 也是肿瘤发生、发展的关键转录因子。STAT3的活化能刺激肿瘤细胞增殖、抗凋亡、缺氧反应、转移、血管生成多种相关基因的表达, 包括 *CyclinD1*、*Survivin*、*Cdc2*、*Bcl-2*、*HIF1 α* 、*Hsp90*、*VEGF*(vascular endothelial growth factor)等^[15]。最近的研究表明, STAT3能调节miR-200c的表达, 进而调控乳腺癌细胞多种转录因子的表达^[16]。然而, STAT3的活化与骨肉瘤细胞的具体作用关系仍不清楚。本研究发现, IL-6和hUC-MSCs-CM尽管不能增加Saos-2细胞的STAT3蛋白质水平, 但均能明显促进其磷酸化, 使STAT3活化。在hUC-MSCs-CM中加入IL-6中和抗体阻断IL-6的作用后, STAT3的磷酸化水平明显降低, 表明hUC-MSCs分泌的IL-6能激活Saos-2细胞的STAT3信号通路; 而CM+anti-IL-6组的p-STAT3水平仍高于Control组则说明hUC-MSCs-CM中可能存在着其他能激活STAT3的细胞因子。AG490能选择性地抑制JAK2, 从而显著地抑制多种肿瘤细胞STAT3的磷酸化, 而对Lck、Lyn、Btk、Syk、Src的活性没有影响^[17], 已成为国际上通用的JAK2/STAT3信号通路的阻滞剂^[18]。为了阐明STAT3信号通路与hUC-MSCs与骨肉瘤细胞相互作用的关系, 本研究采用AG490作为STAT3活化的抑制剂, 结果显示, 无论hUC-MSCs是否存在, AG490均

能够明显抑制Saos-2细胞STAT3的磷酸化。

大量研究表明, STAT3信号通路在骨肉瘤进展的多个层面均发挥着重要作用。Bid等^[19]研究发现, STAT3抑制剂LLL12显著抑制了骨肉瘤细胞血管内皮细胞生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及成纤维细胞生长因子-1(fibroblast growth factor-1, FGF-1)等因子的表达, 从而有效地抑制了体内外骨肉瘤的血管生成。Onimoe等^[20]利用LLL12抑制了STAT3的活性后, 导致了体外骨肉瘤细胞凋亡增加、细胞的贴壁和迁移能力明显受损, 并明显抑制了裸鼠体内骨肉瘤的生长。本研究发现, IL-6中和抗体明显削弱了hUC-MSCs-CM上调Saos-2细胞 *PCNA*、*CyclinD1*、*Survivin*基因表达的作用, 可见hUC-MSCs分泌的IL-6增加了Saos-2细胞增殖相关基因的转录水平。使用AG490抑制hUC-MSCs-CM中Saos-2细胞(CM+AG490组)STAT3的激活后, *PCNA*、*CyclinD1*、*Survivin*的转录水平呈现大幅下降, 表明hUC-MSCs分泌的IL-6能通过激活STAT3增加Saos-2细胞增殖相关基因的表达。尽管hUC-MSCs-CM中的IL-6被阻滞或STAT3活性被抑制, 但各增殖相关基因仍较对照组或AG490组表达高, 这表明, 可能存在着其他能通过JAK2/STAT3以外的信号通路促进增殖基因表达的细胞因子。进一步的实验发现, Saos-2细胞的增殖和迁移能力与STAT3的活化水平密切相关, rhIL-6和CM激活了STAT3并促进了Saos-2细胞的增殖和迁移; 而当IL-6被阻滞或STAT3的活性受到抑制后, Saos-2细胞的增殖和迁移能力明显下降, 可见IL-6介导的JAK2/STAT3信号通路在hUC-MSCs促进Saos-2细胞增殖和迁移的过程中发挥着十分重要的作用。然而, CM+AG490组细胞的增殖能力与AG490组细胞无明显差别($P>0.05$), 与增殖相关基因表达的趋势并不完全相同, 这表明, Saos-2细胞中存在其他的基因参与细胞增殖的调控。此外, CM+anti-IL6组Saos-2细胞的迁移能力明显低于对照组, 表明IL-6可能在hUC-MSCs促进骨肉瘤迁移的过程中发挥着主要作用。

综上所述, hUC-MSCs能促进Saos-2细胞的增殖和迁移, 两者之间存在着一个复杂的信号转导调控网络系统, IL-6介导的JAK2/STAT3信号通路在两者相互作用的过程中发挥着重要作用。hUC-MSCs通过分泌IL-6, 激活体外骨肉瘤细胞的STAT3信号通

路, 最终促进骨肉瘤细胞的增殖和迁移。本研究明确了hUC-MSCs的促瘤因素, 从而为hUC-MSCs的基因改造及其对骨肉瘤基因治疗提供了有价值的实验数据。然而, 敲除*IL-6*基因的hUC-MSCs对骨肉瘤细胞增殖和迁移产生影响仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Uchibori R, Tsukahara T, Ohmine K, Ozawa K. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. *Int J Hematol* 2014; 99(4): 377-82.
- 2 Bolontrade MF, Sganga L, Piaggio E, Viale DL, Sorrentino MA, Robinson A, *et al.* A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus. *Stem Cells Dev* 2012; 21(14): 2689-702.
- 3 Ryu CH, Park SH, Park SA, Kim SM, Lim JY, Jeong CH, *et al.* Gene therapy of intracranial glioma using interleukin 12-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Hum Gene Ther* 2011; 22(6): 733-43.
- 4 Petsa A, Gargani S, Felesakis A, Grigoriadis N, Grigoriadis I. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45(10): 573-6.
- 5 Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* 2010; 5(2): e9016.
- 6 Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007; 25(6): 1384-92.
- 7 Friedman R, Betancur M, Boissel L, Tuncer H, Cetrulo C, Klingemann H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: Adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13(12): 1477-86.
- 8 Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol* 2013; 33 Suppl 1: S79-S84.
- 9 Liu X, Wang J, Wang H, Yin G, Liu Y, Lei X, *et al.* REG3A accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 positive feedback loop. *Cancer Lett* 2015; 362(1): 45-60.
- 10 Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: Recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol* 2015; 34: 75-82.
- 11 Mali SB. Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2015; 51(6): 565-9.
- 12 Salas S, Jiguet-Jiglaire C, Campion L, Bartoli C, Frassinetti F, Deville J L, *et al.* Correlation between ERK1 and STAT3 expression and chemoresistance in patients with conventional osteosarcoma. *BMC Cancer* 2014; 14(606): 1-11.
- 13 Ryu K, Choy E, Yang C, Susa M, Hornicek FJ, Mankin H, *et al.* Activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) pathway in osteosarcoma cells and overexpression of phosphorylated-Stat3 correlates with poor prognosis. *J Orthop Res* 2010; 28(7): 971-8.
- 14 Chang Q, Daly L, Bromberg J. The IL-6 feed-forward loop: A driver of tumorigenesis. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 48-53.
- 15 Bournazou E, Bromberg J. Targeting the tumor micro-environment: JAK-STAT3 signaling. *JAKSTAT* 2013; 2(2): e23828.
- 16 Rokavec M, Wu W, Luo JL. IL6-mediated suppression of miR-200c directs constitutive activation of inflammatory signaling circuit driving transformation and tumorigenesis. *Mol Cell* 2012; 45(6): 777-89.
- 17 Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, *et al.* Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 1996; 379(6566): 645-8.
- 18 Teng Y, Ghoshal P, Ngoka L, Mei Y, Cowell JK. Critical role of the WASF3 gene in JAK2/STAT3 regulation of cancer cell motility. *Carcinogenesis* 2013; 34(9): 1994-9.
- 19 Bid HK, Oswald D, Li C, London CA, Lin J, Houghton PJ. Anti-angiogenic activity of a small molecule STAT3 inhibitor LLL12. *PLoS One* 2012; 7(4): e35513.
- 20 Onimoe GI, Liu A, Lin L, Wei CC, Schwartz EB, Bhasin D, *et al.* Small molecules, LLL12 and FLLL32, inhibit STAT3 and exhibit potent growth suppressive activity in osteosarcoma cells and tumor growth in mice. *Invest New Drugs* 2012; 30(3): 916-26.