

## 研究论文

# 胰岛素生长因子-1(IGF-1)通过PI3K/Akt通路抑制骨髓间充质干细胞(BMSCs)凋亡

黎鑫 朱静\* 田杰 谭彬 崔向荣 向中平

(重庆医科大学附属儿童医院, 儿童发育与疾病研究教育部重点实验室, 儿童泌尿生殖发育与组织工程重点实验室, 重庆 400014)

**摘要** 该研究通过构建高表达胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的异常微环境模型探讨IGF-1对骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)凋亡的影响及可能的作用机制, 为BMSCs作为载体在靶向治疗肿瘤过程中的安全应用提供前期实验基础。取分离纯化的大鼠BMSCs, 用流式细胞术鉴定BMSCs表面标志, 将实验分为4组: BMSCs空白对照组、IGF-1刺激组、IGF-1+LY294002阻断剂组和IGF-1+MK2206阻断剂组。加药处理2周后, CCK-8法检测细胞增殖能力; Hoechst 33342染色观察细胞核形态及凋亡比例; 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞线粒体膜电位变化; RT-qPCR检测细胞Akt、Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA水平; Western blot检测细胞Akt、p-Akt、Bad、p-Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3、p-STAT3的蛋白水平。结果显示: IGF-1刺激组细胞与BMSCs空白对照组比较增殖率升高, 凋亡率减低; IGF-1刺激组Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA的表达均显著高于BMSCs空白对照组( $P < 0.05$ ); IGF-1刺激组p-Akt、Bad、p-Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3、p-STAT3的蛋白表达水平显著高于BMSCs空白对照组( $P < 0.05$ )。而阻断剂组细胞(IGF-1+LY294002阻断剂组、IGF-1+MK2206阻断剂组)与IGF-1刺激组比较增殖率均降低, 凋亡率增高, 相关分子mRNA和蛋白表达水平均明显降低。以上结果表明, IGF-1能通过活化PI3K/Akt通路, 激活下游增殖和凋亡相关分子, 从而促进BMSCs增殖, 抑制BMSCs凋亡。

**关键词** 骨髓间充质干细胞; IGF-1; p-Akt; 凋亡

## Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) Inhibits Apoptosis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) through PI3K/Akt Pathway

Li Xin, Zhu Jing\*, Tian Jie, Tan Bin, Cui Xiangrong, Xiang Zhongping

(The Children's Hospital Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Developmental Disease in Childhood and Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineering, Chongqing 400014, China)

**Abstract** This study investigated the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by constructing an abnormal microenvironment model with high expression

收稿日期: 2018-03-14 接受日期: 2018-06-05

国家自然科学基金(批准号: 81670270)和重庆市科委基金(批准号: cstc2016jcyjA0420、cstc2017shmsA130091)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63633340, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

Received: March 14, 2018 Accepted: June 5, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670270) and Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.cstc2016jcyjA0420, cstc2017shmsA130091)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63633340, E-mail: jingzhu@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-08-24 10:52:01

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180824.1051.010.html>

of IGF-1 and the possible mechanism, which provided a preliminary experimental basis for the safe application of BMSCs as a carrier for the targeted treatment of tumors. BMSCs were isolated and purified. The surface markers of BMSCs were identified by flow cytometry. The cells were divided into four groups: BMSCs blank control group, IGF-1 stimulation group, IGF-1+LY294002 blocker group and IGF-1+MK2206 blocker group. The morphological changes of the cells were observed under an inverted phase contrast microscope after 2 weeks of drug treatment. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The morphology and apoptotic ratio of nuclei were observed by Hoechst 33342 staining. The apoptosis and the mitochondria were detected by flow cytometry. The levels of *Akt*, *Bad*, *Bcl-xl*, *c-Myc* and *STAT3* were detected by RT-qPCR. The expressions of Akt, p-Akt, Bad, p-Bad, Bcl-xl, p-STAT3 protein levels were investigated by Western blot. The results showed that compared with blank control group, the proliferation rate of IGF-1 stimulated cells increased and the apoptosis rate decreased; the mRNA levels of *Bad*, *Bcl-xl*, *c-Myc*, *STAT3* and the protein expressions of p-Akt, Bad, p-Bad, Bcl-xl, c-Myc, STAT3 and p-STAT3 in BMSCs were significantly higher than that in BMSCs ( $P < 0.05$ ) control group ( $P < 0.05$ ). Compared with IGF-1 stimulated group, the proliferation rate and the apoptosis rate of the cells in the blocking group (IGF-1+LY294002 blocker group and IGF-1+MK2206 blocker group) were lower than those in the IGF-1 stimulated group, and the mRNA and protein expression levels of related molecules were significantly decreased. The results showed that IGF-1 can activate the PI3K/Akt pathway and activate the downstream proliferation and apoptosis-related molecules, thereby promoting the proliferation of BMSCs and inhibiting the apoptosis of BMSCs.

**Keywords** BMSCs; IGF-1; p-Akt; apoptosis

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因具有来源广泛、低免疫原性、肿瘤趋向性、易体外扩增等优点而被作为靶向治疗肿瘤的重要细胞工具,目前利用MSCs进行细胞治疗已经成为基础研究和临床研究的热点<sup>[1-3]</sup>。但关于MSCs临床应用的安全性还有待评估,多项独立研究发现,在将干细胞作为载体靶向治疗肿瘤的过程中,复杂的肿瘤微环境可能会使MSCs发生恶性转化<sup>[4-6]</sup>。本课题组前期实验证实,将大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)置于C6脑胶质瘤细胞微环境中培养后,肿瘤细胞旁分泌的IL-6和S100B等细胞因子可以引发其发生恶性转化<sup>[7-8]</sup>。胶质瘤微环境中存在高丰度的IGF-1,IGF-1是胰岛素样生长因子家族中的一员,通过与IGF-1R结合,激活下游相关信号通路,对细胞的分化、增殖、凋亡及肿瘤的发生发展起重要的调节作用。研究证实,血清IGF-1水平升高可增加乳腺癌、结直肠癌、肺癌、前列腺癌的风险,且大量的流行病学研究发现,血清中高浓度的IGF-1不仅与众多肿瘤的发生率呈正相关,还与肿瘤的转移、治疗、预后等密切相关<sup>[9-10]</sup>。PI3K/Akt信号通路是细胞内重要的信号传导途径,该通路过度激活后可调控细胞的增殖、凋亡、分化及自我更新等生理过程,促使肿瘤形成和转移<sup>[11]</sup>。有研究指出,

IGF-1能够通过PI3K/Akt信号通路促进肿瘤基质中细胞的增殖并且抑制凋亡的发生<sup>[11]</sup>。鉴于此,本实验将探究BMSCs在IGF-1作用下凋亡相关生物学特性变化及其可能的分子机制,为干细胞的安全应用提供实验基础及理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)用SPF级SD大鼠进行原代分离培养,SD大鼠购自重庆医科大学动物实验中心。本研究已通过重庆医科大学医学研究伦理委员会批准。

1.1.2 主要仪器 二氧化碳孵育箱、生物安全柜、低温高速离心机、-80 °C冰箱购自Thermo公司;PCR仪、蛋白电泳仪、蛋白电转仪、凝胶图像分析仪均购自Bio-Rad公司;倒置相差显微镜购自Nikon Ti-S公司;酶标仪购自BioTek公司;全自动细胞计数仪购自Count-Star公司;流式细胞仪购自Becton Dickinson公司;移液枪购自Eppendorf公司;超纯水制备仪购自Millipore公司;电子分析天平购自Sartorius公司;4 °C/8 °C冰箱购自海尔公司。

1.1.3 主要试剂 IGF-1购自ProSpec公司;LY294002和MK2206购自Selleck公司;DMEM/F12培养基、胎

牛血清、胰蛋白酶购自Gibco公司; RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术公司; 逆转录试剂盒购自TaKaRa公司; 全蛋白提取试剂盒、细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; ECL化学发光试剂盒购自Millipore公司; SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、Hoechst 33342活细胞染色液购自碧云天生物技术公司; CCK-8液购自ATGene公司; 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 抗体Akt1、p-Akt、p-STAT3、STAT3、c-Myc、Bcl-x1、Bad、p-Bad购自Abcam公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 分离培养原代BMSCs** 取健康雄性SD大鼠(55~65 g), 10%水合氯醛4 mL/kg腹腔注射麻醉, 用酒精浸泡SD大鼠15 min, 去皮、去毛, 完整取下大鼠双下肢。在生物安全柜中钝性分离肌肉组织, 从膝关节断离股骨和胫腓骨。用无菌注射器吸取含10%胎牛血清的完全培养基反复冲洗骨髓腔, 将冲洗液以1 000 r/min离心重悬5 min, 接种于T25培养瓶中, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养48 h后首次换液, 之后则每天换液, 待细胞贴壁生长至融合度为80%~90%时以1:2传代培养。

**1.2.2 BMSCs鉴定** 将第三代BMSCs(P3)培养至融合度60%~70%时消化重悬, 然后分别加入CD29、CD73、CD90、CD34、CD45抗体, 4 °C孵育30 min, 流式细胞术上机检测并分析细胞阳性率。

**1.2.3 药物毒性实验** 将对数生长期的BMSCs消化重悬, 向96孔板中加入100 μL细胞悬液(3×10<sup>4</sup>/mL), 5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养12 h后加入不同浓度的抑制剂(PI3K抑制剂LY294002: 0、1、5、10、20、40、60 μmol/L; Akt磷酸化抑制剂MK2206: 0、0.1、0.5、1、2、5、10 μmol/L)。每个浓度设5个复孔, 继续培养24 h后吸弃培养基并加入10% CCK-8工作液100 μL, 培养箱中孵育2 h后用酶标仪读取波长450 nm下的D值并计算细胞相对存活率, 取细胞相对存活率大于85%的药物浓度用于后续实验。细胞相对存活率%=(实验组D值-空白孔D值)/(对照组D值-空白孔D值)×100%。

**1.2.4 细胞培养与分组** 前期实验检测出C6脑胶质瘤细胞培养基中IGF-1浓度约为300 ng/mL, 故本实验用300 ng/mL的IGF-1来刺激BMSCs。细胞分成4组: 未加IGF-1的BMSCs空白对照组、加IGF-1刺激组、加IGF-1和阻断剂LY294002组、加IGF-1和阻断

剂MK2206组。2~3天换一次液, 换液时加药, 均置于相同条件下培养2周。

**1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖能力** 取培养2周后的各组细胞3×10<sup>4</sup>/mL, 接种于96孔板, 每孔100 μL, 每组5个复孔, 各组细胞每天均继续换液加药, 连续监测5天。每24 h吸弃培养基并加入10% CCK-8工作液100 μL, 培养箱中孵育2 h后用酶标仪读取各组细胞波长450 nm下的D值。将各测试孔D值减去空白孔D值, 绘制出各组细胞连续5天的细胞活力曲线。

**1.2.6 Hoechst 33342染色观察细胞核形态及凋亡比例** 将培养13天后的各组细胞以1×10<sup>5</sup>/mL接种于12孔板, 每孔1 mL, 每组3个复孔, 继续加药培养, 待细胞融合度70%~80%时(约1天), 加入10 μL Hoechst 33342活细胞染色液(100×), 37 °C孵育15 min, PBS洗涤2~3次, 用荧光显微镜观察各组细胞核的形态并统计凋亡比例。每组细胞随机选取9个视野(3×3个副孔)计数, 凋亡百分率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

**1.2.7 细胞线粒体膜电位检测** 将培养2周后的各组细胞(细胞融合度为80%~90%)用胰酶消化下来, PBS漂洗2次, 加入0.2% JC-1工作液500 μL, 5% CO<sub>2</sub>、37 °C孵育20 min, 离心重悬后用流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位变化, 分析细胞凋亡率。

**1.2.8 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡** 将培养2周后的各组细胞用不含EDTA的胰酶消化下来, PBS漂洗2次, 500 μL buffer重悬, 加入5 μL FITC标记的Annexin V混匀, 加5 μL PI, 室温避光反应15 min, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况(具体步骤参照试剂盒说明书)。

**1.2.9 RT-qPCR检测各组细胞Akt、Bad、Bcl-x1、c-Myc、STAT3的mRNA水平** 按照RNA提取试剂盒说明书上的步骤提取各组细胞RNA, 反转录成cDNA(42 °C 15 min, 85 °C 5 s), 以其为模板进行PCR扩增(预变性95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共40个循环)。目的基因的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 序列见表1<sup>[6,8]</sup>。以β-actin为内参, 空白对照组的mRNA表达量设为1, 计算各组mRNA的相对表达量, 实验重复3次。

**1.2.10 Western blot检测各组细胞Akt、p-Akt、Bad、p-Bad、Bcl-x1、c-Myc、STAT3、p-STAT3的蛋白水平** 按照蛋白提取试剂盒说明书提取各组细胞总蛋白, BCA法蛋白定量后加入SDS上样缓冲液, 煮沸3~5 min使其充分变性。采用不连续凝胶电泳后湿

转法转膜10 h, 电压为14 V, 5%脱脂牛奶封闭2 h, 加一抗4 °C摇床孵育过夜(一抗稀释倍数: Akt为1:5 000; p-Akt、Bad、p-Bad为1:1 000; c-Myc、p-STAT3为1:6 000; STAT3为1:2 000; Bcl-xl为1:500;  $\beta$ -actin为1:8 000), TBST洗膜后加入相应二抗(HRP标记山羊抗小鼠IgG 1:6 000、HRP标记山羊抗兔IgG 1:4 000), 室温孵育1 h, TBST清洗后ECL暗室显影, 在凝胶成像系统上拍照并分析。以 $\beta$ -actin为内参, 将空白对照组蛋白表达量设为1, 计算各组蛋白相对表达量, 实验重复3次。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0进行统计学分析, 计量资料用“均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )”表示, 各组之间比较采用单因素

方差分析, 组间两样本均数之间的比较采用LSD-*t*检验。两独立样本均数之间的比较采用*t*检验,  $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志物

BMSCs经多次传代培养后, 逐渐纯化, 细胞呈扁平长梭形, 分布均匀, 排列有序, 呈成纤维样细胞生长。经流式细胞术检测发现, 第三代BMSCs CD29的表达率为99.8%, CD73的表达率为98.3%, CD90的表达率为97.6%, CD34和CD45以及空白对照均不表达(图1)。以上结果表明, 经SD大鼠提取的原代BMSCs

表1 RT-qPCR引物序列  
Table 1 RT-qPCR primer sequence

靶基因	上游引物	下游引物
Target gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Akt1</i>	5'-TTT ATT GGC TAC AAG GAA CG-3'	5'-CAG CGG ATG ATG AAG GTC-3'
<i>Bad</i>	5'-CCT GGG GAG CAT CGT TCA G-3'	5'-GGT ACG AAC TGT GGC GAC TC-3'
<i>Bcl-xl</i>	5'-TGA CCA CCT AGA GCC TTG GA-3'	5'-TGC CAG GAG ACC AAA AAG GG-3'
<i>STAT3</i>	5'-GTG TTT CAT AAC CTC TTG GGC G-3'	5'-GCA GGA ACT GCT TGA TTC TTC G-3'
<i>c-Myc</i>	5'-TGG AAC GTC AGA GGA GAA ACG A-3'	5'-CTT GAA CGG ACA GGA TGT AGG C-3'
<i><math>\beta</math>-actin</i>	5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3'	5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'

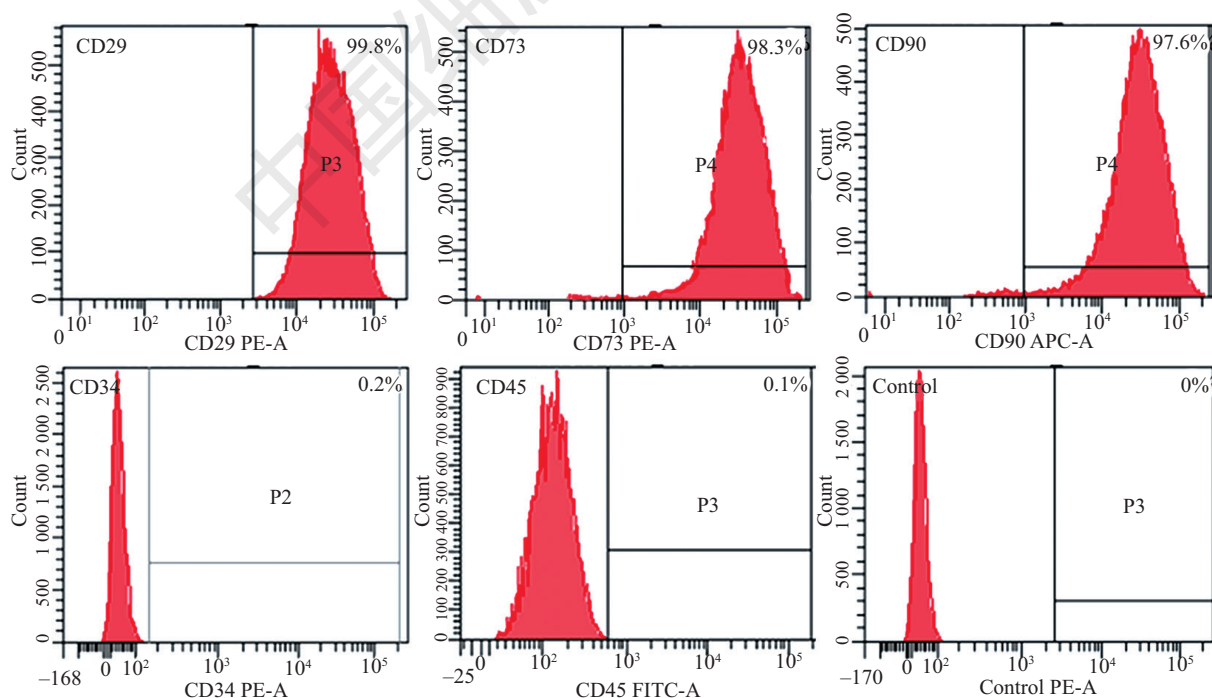


图1 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志物

Fig.1 Identification of surface markers of BMSCs by flow cytometry

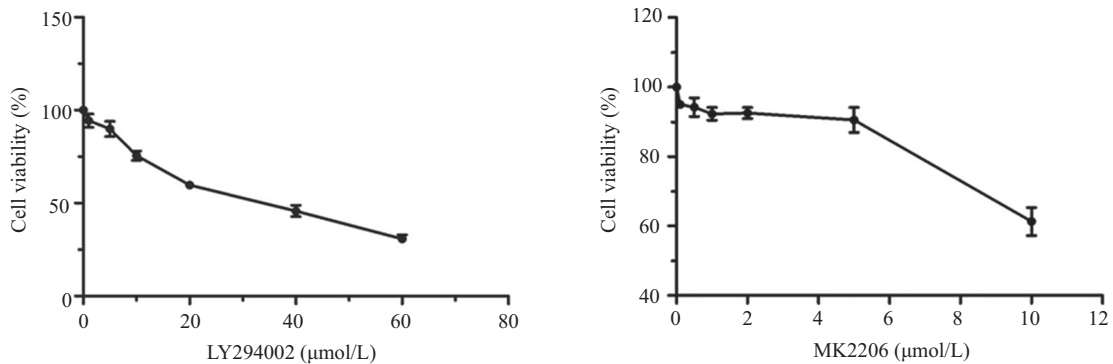


图2 CCK-8法检测各浓度抑制剂作用的细胞活力变化

Fig.2 Cell viability rate of different inhibitor treatment detected by CCK-8 assay

纯度较高, 满足后续实验基本要求。

## 2.2 抑制剂LY94002、MK2206最佳工作浓度

为验证IGF-1是通过激活PI3K/Akt信号通路影响BMSCs的增殖和凋亡, 分别选择特异性PI3K抑制剂LY294002和Akt磷酸化抑制剂MK2206来处理细胞。通过CCK-8法检测各浓度抑制剂作用24 h后的细胞活力的变化。结果显示, 当LY294002工作浓度为5 μmol/L时, 细胞相对存活率大于85%, 该浓度能够同时保证细胞活力和抑制作用, 故后续实验使用的LY294002浓度为5 μmol/L; 用相同方法处理细胞, MK2206的最佳工作浓度为5 μmol/L(图2)。

## 2.3 CCK-8法检测IGF-1对BMSCs增殖能力的影响

通过增殖实验发现, 从加药第3天开始, IGF-1刺激组细胞与空白对照组细胞相比, 细胞的增殖能力

明显增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3); 加阻断剂组的两组细胞与IGF-1刺激组相比, 增殖能力均降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图3)。

## 2.4 Hoechst 33342活细胞染色液检测细胞凋亡

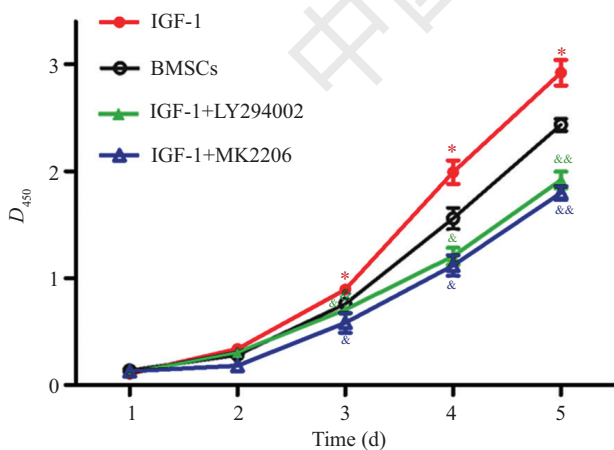
荧光显微镜下观察发现, 正常细胞核均匀染色, 边缘光滑, 呈蓝色; 凋亡细胞核致密浓染, 核固缩, 荧光较强, 呈亮蓝色, 可见凋亡小体(如图4箭头所示)。各组细胞凋亡率分别为空白对照组( $5.36 \pm 0.71\%$ )、IGF-1刺激组( $0.97 \pm 0.06\%$ )、IGF-1+LY294002阻断剂组( $9.80 \pm 0.75\%$ )、IGF-1+MK2206阻断剂组( $8.50 \pm 0.63\%$ )、IGF-1刺激组较空白对照组凋亡率明显减低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ); 加抑制剂组较IGF-1刺激组明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 2.5 JC-1检测细胞线粒体膜电位变化

JC-1是一种广泛用于检测线粒体膜电位变化的理想荧光探针。在线粒体膜电位较高时, 产生红色荧光; 在线粒体膜电位较低时, 产生绿色荧光。线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件。因此, 可以用JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变作为细胞凋亡早期的检测指标。结果显示, IGF-1刺激组同空白对照组相比, 细胞内线粒体膜电位增高, 细胞凋亡率明显减低( $P < 0.01$ ); 而加阻断剂组同IGF-1刺激组相比, 细胞内线粒体膜电位降低, 细胞凋亡率明显增加( $P < 0.01$ )(表2)。

## 2.6 Annexin VFITC/PI双染法检测各组细胞凋亡能力

用流式细胞术测定各组细胞凋亡情况。结果显示, 空白对照组的细胞的凋亡率为( $10.87 \pm 1.30\%$ )、IGF-1刺激组细胞的凋亡率为( $5.63 \pm 0.83\%$ )、IGF-

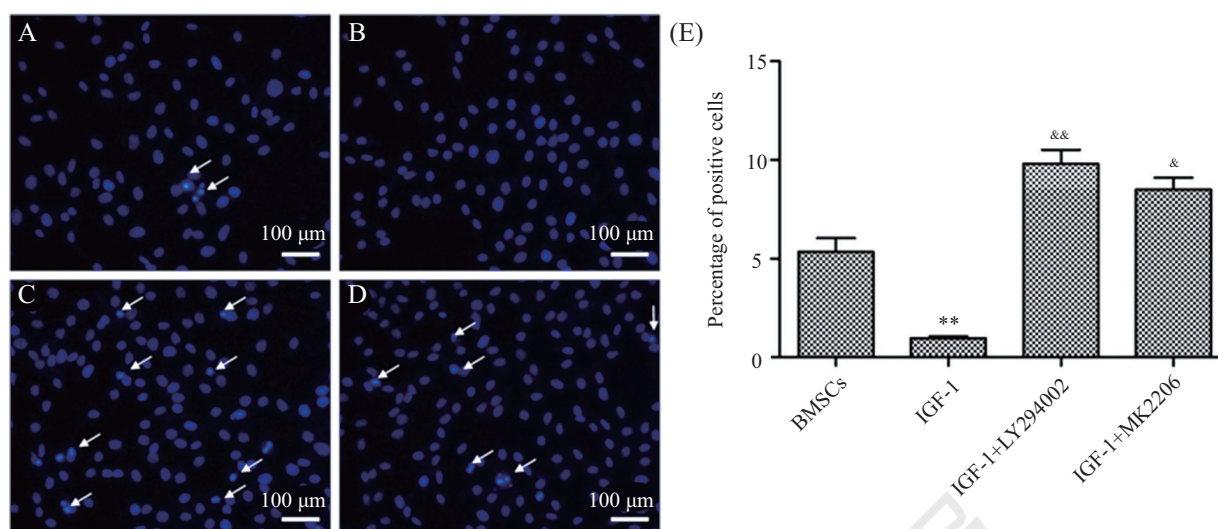


\* $P < 0.05$ , 与BMSCs空白对照组相比较; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , 与IGF-1刺激组相比较。

\* $P < 0.05$  vs BMSCs blank control group; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$  vs IGF-1 stimulated group.

图3 各组细胞的增殖能力变化

Fig.3 Cell proliferation rates of different groups



A: 空白对照组(BMSCs单独培养组), 白色箭头表示凋亡细胞; B: IGF-1刺激组; C: IGF-1+LY294002阻断剂组; D: IGF-1+MK2206阻断剂组; E: 各组细胞凋亡率量化图, \*\* $P < 0.01$ , 与空白对照组比较;  $\&P < 0.05$ ,  $\&\&P < 0.01$ , 与IGF-1刺激组比较。

A: blank control group (BMSCs group), white arrows indicated apoptotic cells; B: IGF-1 stimulated group; C: IGF-1+LY294002 block group; D: IGF-1+MK2206 block group; E: quantification of apoptosis rate in each group. \*\* $P < 0.01$  vs BMSCs group;  $\&P < 0.05$ ,  $\&\&P < 0.01$  vs IGF-1 stimulated group.

图4 各组细胞的凋亡情况

Fig.4 Cell apoptosis rates of different groups

表2 流式细胞术检测各组细胞线粒体膜电位变化

Table 2 Change of mitochondrial membrane potential in BMSCs detected by FCM

组别	凋亡率(%)	P值
Groups	Apoptosis rate (%)	P value
Blank control group	(25.97%±3.75)%	
IGF-1 stimulate group	(10.47%±3.15)%**	0.005
IGF-1+LY294002 block group	(49.77%±5.61)% $\&\&$	0.004
IGF-1+MK2206 block group	(43.13%±2.60)% $\&\&$	0.003

\*\* $P < 0.01$ , 与空白对照组比较;  $\&\&P < 0.01$ , 与IGF-1刺激组比较。

\*\* $P < 0.01$  vs blank control group;  $\&\&P < 0.01$  vs IGF-1 stimulated group.

1+LY294002组细胞的凋亡率为(11.08±1.58)%, IGF-1+MK2206组细胞凋亡率为(11.53±1.53)%。IGF-1刺激组与空白对照组相比, 细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ ) (图5)。阻断剂组(LY294002、MK2206)与IGF-1刺激组相比, 细胞凋亡率增高( $P < 0.01$ )(图5)。

### 2.7 RT-qPCR检测各组细胞Akt、Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA水平

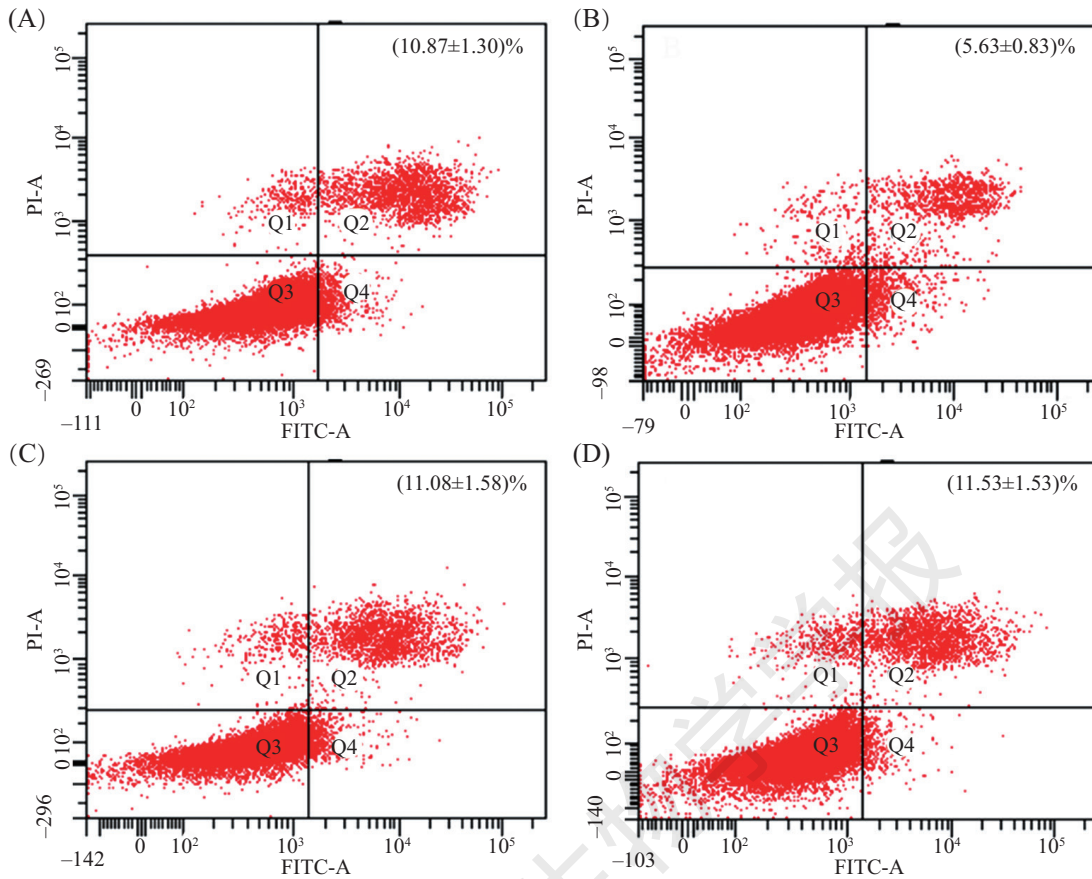
IGF-1刺激组细胞Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA的相对表达量与空白对照组相比明显增高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); IGF-1+LY294002组和IGF-1+MK2206组细胞Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA的相对表达量与IGF-1刺激组相比显著降低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图6)。各组细胞Akt表达无明显差异。

### 2.8 Western blot检测各组细胞Akt、p-Akt、p-Bad、Bad、Bcl-xl、c-Myc、p-STAT3、STAT3的蛋白水平

IGF-1刺激组细胞p-Akt、p-Bad、Bad、Bcl-xl、c-Myc、p-STAT3、STAT3等蛋白相对表达量均明显高于空白对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。PI3K抑制剂LY294002和Akt抑制剂MK2206均能阻断因IGF-1刺激引发的Akt和下游凋亡相关蛋白的上调, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )(图7和图8)。

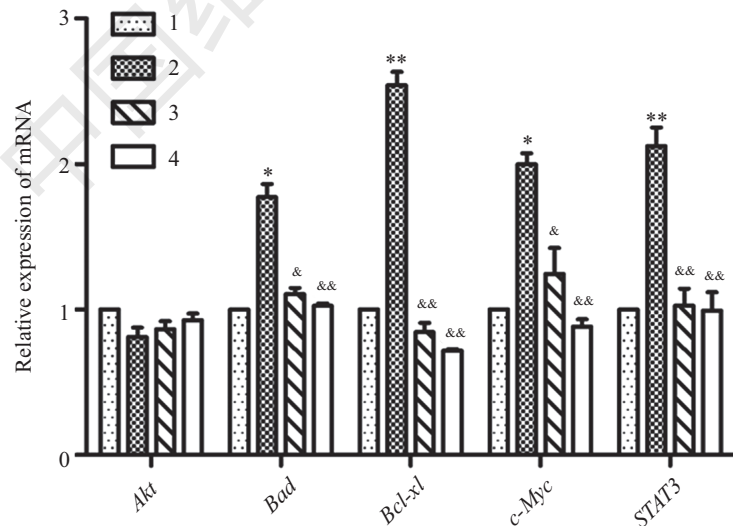
## 3 讨论

间充质干细胞(MSCs)是一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的种子细胞<sup>[12]</sup>, 具有来源广泛、易于体外扩增培养、低免疫原性和损伤组织趋



A: 空白对照组(BMSCs单独培养组); B: IGF-1刺激组; C: IGF-1+LY294002阻断剂组; D: IGF-1+MK2206阻断剂组。  
 A: blank control group (BMSCs group); B: IGF-1 stimulated group; C: IGF-1+LY294002 block group; D: IGF-1+MK2206 block group.

图5 流式细胞术检测IGF-1对骨髓间充质干细胞凋亡的影响  
 Fig.5 Effect of IGF-1 on apoptosis in BMSCs detected by FCM

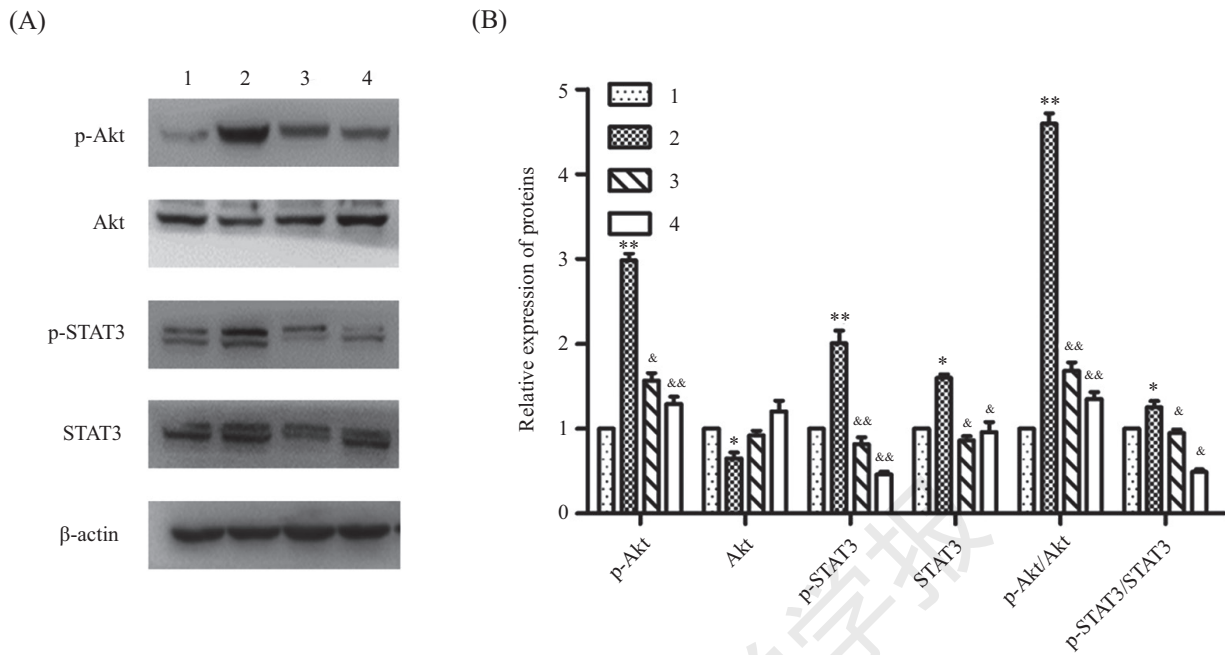


1: BMSCs空白对照组; 2: IGF-1刺激组; 3: IGF-1+LY294002阻断剂组; 4: IGF-1+MK2206阻断剂组: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与1组相比较; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , 与2组相比较。

1: blank control group (BMSCs group); 2: IGF-1 stimulated group; 3: IGF-1+LY294002 block group; 4: IGF-1+MK2206 block group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs group 1; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$  vs group 2.

图6 RT-qPCR检测各组细胞Akt、Bad、Bcl-xl、c-Myc、STAT3的mRNA水平

Fig.6 The mRNA levels of Akt, Bad, Bcl-xl, c-Myc and STAT3 in each group tested by RT-qPCR

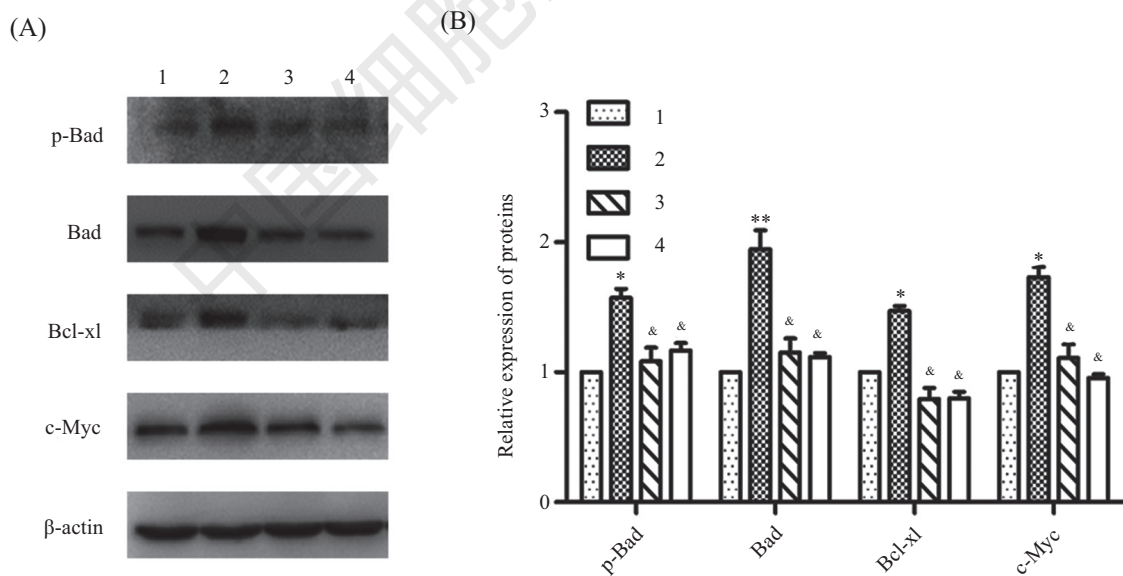


A: Western blot检测各组细胞蛋白表达; B: A图蛋白表达水平量化图。1: BMSCs空白对照组; 2: IGF1刺激组; 3: IGF1+LY294002阻断剂组; 4: IGF1+MK2206阻断剂组; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与1组相比较; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , 与2组相比较。

A: protein expression in each group tested by Western blot; B: quantification of protein expression for figure A; 1: blank control group (BMSCs group); 2: IGF-1 stimulated group; 3: IGF-1+LY294002 block group; 4: IGF-1+MK2206 block group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs group 1; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$  vs group 2.

图7 Western blot检测各组细胞p-Akt、Akt、p-STAT3和STAT3蛋白质水平

Fig.7 The protein expression of p-Akt, Akt, p-STAT3 and STAT3 tested by Western blot



A: Western blot检测各组细胞蛋白表达; B: A图蛋白表达水平量化图。1: BMSCs空白对照组; 2: IGF-1刺激组; 3: IGF-1+LY294002阻断剂组; 4: IGF-1+MK2206阻断剂组; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与1组相比较; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$ , 与2组相比较。

A: protein expression in each group tested by Western blot; B: quantification of protein expression for figure A; 1: blank control group (BMSCs group); 2: IGF-1 stimulated group; 3: IGF-1+LY294002 block group; 4: IGF-1+MK2206 block group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs group 1; & $P < 0.05$ , && $P < 0.01$  vs group 2.

图8 Western blot检测各组细胞p-Bad、Bad、Bcl-xl和c-Myc蛋白质水平

Fig.8 The protein expression of p-Bad, Bad, Bcl-xl and c-Myc tested by Western blot



向性等优点,因此在组织工程和临床治疗上有重大的研究与应用价值。近年来,在利用MSCs作为载体靶向治疗脑胶质瘤的研究中开展了大量实验并取得了较大的进展<sup>[13-14]</sup>,但BMSCs临床应用的安全性还有待评估。肿瘤微环境主要包括肿瘤细胞和基质细胞,其可分泌大量生长因子如胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子、血小板源性生长因子等,这些生长因子发挥着及其复杂的作用<sup>[15]</sup>。将干细胞作为载体靶向治疗肿瘤的过程中,复杂的肿瘤微环境可能会导致BMSCs的恶性转变,为干细胞的安全应用带来潜在风险<sup>[4-5]</sup>。

IGF-1是胰岛素样生长因子家族中的一员,通过与IGF-1R结合,对组织细胞的分化、增殖、凋亡及肿瘤的发生发展起重要的调节作用。目前,大量流行病学研究发现,血液循环中高水平的IGF-1与肺癌、乳腺癌、结肠癌及前列腺癌等众多恶性肿瘤发生率呈明显的正相关<sup>[9-10]</sup>。前期实验检测到C6脑胶质瘤细胞培养基中IGF-1呈高表达,但关于IGF-1是否具有促进BMSCs恶性转化作用,目前尚未见报道。本实验通过在BMSCs培养液中加入适宜浓度的IGF-1,探讨处于该异常微环境中的BMSCs是否存在增殖和凋亡等肿瘤相关生物学特性的变化,而PI3K/Akt信号通路是IGF-1调控细胞增殖、凋亡等生理过程的经典途径,所以为了验证PI3K/Akt信号通路是IGF-1影响BMSCs的主要途径,本实验通过加入PI3K特异性抑制剂LY294002和Akt磷酸化抑制剂MK2206,检测细胞凋亡相关生物学特性变化,进一步验证IGF-1影响BMSCs的具体机制,为BMSCs的安全应用提供实验基础。

本实验结果发现,经IGF-1作用2周后的BMSCs细胞Hoechst 33342染色和流式检测凋亡细胞比例均明显降低,表明经IGF-1作用后的BMSCs凋亡受到了抑制。细胞凋亡是机体清除多余、变异或恶化细胞的一种主动、程序化死亡的过程,是机体维持内环境稳定的重要生理机制。任何调控因子异常引起的细胞凋亡减少,都可引发机体疾病,甚至诱发肿瘤。哺乳动物细胞内细胞凋亡主要有外源性死亡受体途径和内源性线粒体凋亡途径,线粒体通过释放大量的促凋亡蛋白在调节凋亡通路中起中枢作用<sup>[16]</sup>。线粒体膜电位下降主要是由线粒体内膜通透性增加和质子泵障碍导致的,是细胞凋亡的早期表现。本实验中经IGF-1作用后的BMSCs线粒体膜电位下

降的细胞比例明显下降,表明细胞早期凋亡受到抑制。而经PI3K特异性抑制剂LY294002和Akt磷酸化抑制剂MK2206作用的BMSCs细胞同IGF-1刺激组细胞相比,凋亡细胞比例均明显升高,线粒体膜电位下降的细胞比例均明显升高,提示IGF-1可能是通过PI3K/Akt信号通路抑制BMSCs细胞凋亡。

基因表达及蛋白水平检测提示,经IGF-1刺激后的BMSCs细胞中的Akt磷酸化表达增高,其所调控的下游抗凋亡基因*Bcl-xl*表达水平明显增高,促凋亡基因*Bad*磷酸化表达增加,表明经IGF-1作用后的BMSCs存在Akt、*Bcl-xl*和*Bad*的异常激活和高表达。PI3K/Akt信号通路是细胞内重要的信号传导途径,该通路过度激活后可调控细胞的增殖、凋亡、分化、自我更新等生理过程,促使肿瘤形成和转移<sup>[17]</sup>。PI3K能够活化Akt,提高Akt磷酸化表达水平,进而调控相关靶蛋白发挥生物学效应<sup>[18-19]</sup>。*Bcl-xl*和*Bad*是*Bcl-2*家族的重要成员,在调节细胞凋亡和延长细胞寿命方面起着至关重要的作用。而Akt能磷酸化*Bad*,一方面有利于解离的*Bcl-2*和*Bcl-xl*发挥抗凋亡作用,另一方面抑制*Bad*的促凋亡作用<sup>[20]</sup>。而经PI3K特异性抑制剂LY294002和Akt磷酸化抑制剂MK2206作用的BMSCs细胞同IGF-1刺激组细胞相比,凋亡相关基因表达和蛋白水平均明显升高,提示IGF-1可能是通过PI3K/Akt信号通路抑制BMSCs凋亡。

本研究发现,经IGF-1刺激后的BMSCs细胞中*c-Myc*、*STAT3*和*p-STAT3*表达均明显升高。*STAT3*处于多条致癌信号通路的交汇点,被认为是一种原癌基因,多种肿瘤形成过程中广泛存在*STAT3*的异常激活<sup>[21]</sup>。*c-Myc*是参与调控细胞增殖、分化及凋亡的原癌基因。研究表明,*c-Myc*是人脑胶质瘤中最常发生改变且对其发生、发展起重要作用的癌基因之一<sup>[22]</sup>。细胞恶性增殖是肿瘤的生物学特征之一,其主要机制为生物周期紊乱引发癌细胞过度增殖和凋亡受阻,使癌细胞处于增殖期而不能进入静止期。细胞增殖实验发现,经IGF-1刺激后的BMSCs细胞*D*值明显升高,表明经IGF-1作用后的BMSCs增殖能力明显升高。而经PI3K特异性抑制剂LY294002和Akt磷酸化抑制剂MK2206作用的BMSCs细胞同IGF-1刺激组细胞相比,细胞增殖能力明显降低,*c-Myc*、*STAT3*和*p-STAT3*的表达均明显降低,提示IGF-1可能是通过PI3K/Akt信号通路促进BMSCs增殖和原癌基因(*c-Myc*和*STAT3*)的高表达。

综上所述, BMSCs在高表达IGF-1的异常微环境中培养后细胞凋亡能力降低, 增殖能力升高, 原癌基因表达升高, 而Akt磷酸化抑制剂和PI3K抑制剂均能逆转BMSCs因IGF-1刺激引发的增殖和凋亡相关生物学特性变化, 提示PI3K/Akt信号通路是IGF-1引发BMSCs转化过程中的关键信号转导通路之一。IGF-1在人类多种恶性肿瘤中存在异常表达, 且与疾病的发生发展密切相关。因此, 我们推测, 异常肿瘤微环境中高表达的IGF-1可能会引发BMSCs生物学特性的改变, 给BMSCs的安全应用带来潜在的风险, 且PI3K/Akt信号通路的异常激活是促使其变化的重要原因, 这为BMSCs的安全应用提供了前期实验评估的证据。

### 参考文献 (References)

- 1 Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy* 2016; 8(12): 1405-16.
- 2 Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011; 109(8): 923-40.
- 3 Mao X, Liu Y, Chen C, Shi S. Mesenchymal stem cells and their role in dental medicine. *Dent Clin North Am* 2017; 61(1): 161-72.
- 4 Rösland 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.
- 5 Pan Q, Fouraschen SM, de Ruiter PE, Dinjens WN, Kwekkeboom J, Tilanus HW, *et al.* Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239(1): 105-15.
- 6 姚昔友, 朱静, 田杰, 谭彬, 黎鑫. TPCA1对BMSCs在C6脑胶质瘤细胞模拟的肿瘤微环境中生物学特性变化的研究. *中国细胞生物学学报*(Yao Xiyou, Zhu Jing, Tian Jie, Tan Bin, Li Xin. Changes of biological characteristics of BMSCs in tumor microenvironment simulated by C6 glioma cells by TPCA1. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(7): 898-905.
- 7 汪玲, 朱静, 田杰, 谭彬, 燕莎. 脑胶质瘤微环境中人脐带间充质干细胞STAT3过度激活及生物学行为改变分析. *重庆医科大学学报*(Wang Ling, Zhu Jing, Tian Jie, Tan Bin, Yan Sha. Analysis of STAT3 overactivation and biological behavior in human umbilical cord mesenchymal stem cells in glioma microenvironment. *Journal of Medical University of Chongqing*) 2016; 41(1): 18-22.
- 8 Tan B, Shen L, Yang K, Huang D, Li X, Li Y, *et al.* C6 glioma-conditioned medium induces malignant transformation of mesenchymal stem cells: Possible role of S100B/RAGE pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 495(1): 78-85.
- 9 Rohrmann S, Linseisen J, Becker S, Allen N, Schlehofer B, Overvad K, *et al.* Concentrations of IGF-I and IGFBP-3 and brain tumor risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10): 2174-82.
- 10 Aslam MI, Hettmer S, Abraham J, Latocha D, Soundararajan A, Huang ET, *et al.* Dynamic and nuclear expression of PDGFR $\alpha$  and IGF-1R in alveolar Rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Res* 2013; 11(11): 1303-13.
- 11 Penninger JM, Kroemer G. Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 2003; 5(2): 97-9.
- 12 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- 13 Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, *et al.* Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines *in vitro*. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 109389.
- 14 Egea V, von BL, Schichor C, Berninger B, Popp T, Neth P, *et al.* TNF- $\alpha$  respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. *Cell Death Differ* 2011; 18(5): 853-63.
- 15 Naschberger E, Liebl A, Schellerer VS, Schutz M, Britzen-Laurent N, Kolbel P, *et al.* Matricellular protein SPARCL1 regulates tumor microenvironment-dependent endothelial cell heterogeneity in colorectal carcinoma. *J Clin Invest* 2016; 126(11): 4187-204.
- 16 Penninger JM, Kroemer G. Mitochondria, AIF and caspases-rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 2003; 5(2): 97-9.
- 17 Massihnia D, Galvano A, Fanale D, Perez A, Castiglia M, Incorvaia L, *et al.* Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway. *Oncotarget* 2016; 7(37): 60712-22.
- 18 Riquelme I, Tapia O, Leal P, Sandoval A, Varga MG, Letelier P, *et al.* miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Oncol (Dordr)* 2016; 39(1): 23-33.
- 19 Ren JG, Seth P, Clish CB, Lorkiewicz PK, Higashi RM, Lane AN, *et al.* Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling. *Sci Rep* 2014; 4: 5414.
- 20 Yip WK, Leong VC, Abdullah MA, Yusoff S, Seow HF. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 19(2): 319-28.
- 21 Sun B, Kawahara M, Ehata S, Nagamune T. AAG8 promotes carcinogenesis by activating STAT3. *Cell Signal* 2014; 26(9): 1863-9.
- 22 Gabay M, Li Y, Felsner DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; doi: 10.1101/cshperspect.a014241.