

黄芪多糖对炎性微环境中BMSCs的IL-6R、TNFR及肿瘤相关基因表达的影响

骆亚莉^{1,2,3} 张利英^{2,3} 李程豪² 张艳辉² 刘永琦^{2*} 安方玉^{2,3} 冯彩琴² 李研²

(¹甘肃中医药大学, 基础医学院病理教研室, 兰州 730000; ²甘肃中医药大学, 重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 兰州 730000; ³甘肃中医药大学, 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 兰州 730000)

摘要 该文旨在观察黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)对IL-6和TNF- α 所致炎性微环境中骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)白介素-6受体(IL-6 receptor, IL-6R)、肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)表达的影响, 探讨IL-6和TNF- α 导致BMSCs炎性损伤的可能物质基础。首先运用100 ng/mL IL-6和50 ng/mL TNF- α 建立炎性微环境。设立对照组(control组)、模型组(D组)和50 μ g/mL黄芪多糖干预组(H组)。之后, 应用ELISA法检测sIL-6R的表达水平。免疫荧光法检测IL-6R、gp130、TNFR I、TNFR II的表达水平。Western blot技术检测抑癌基因P53、PTEN和原癌基因Ras、C-myc的蛋白表达水平。检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中的sIL-6R含量降低, 模型组细胞IL-6R、gp130、TNFR I、TNFR II、Ras、C-myc表达均升高, P53、PTEN表达均降低。与模型组比较, 黄芪多糖组细胞上清液sIL-6R含量升高, 细胞IL-6R、gp130、TNFR I、TNFR II、Ras、C-myc表达均下降, 而P53、PTEN表达均升高。结果提示, 黄芪多糖能够减弱炎性微环境对刺激BMSCs表达IL-6R、TNFR的影响作用, 并且维护肿瘤相关基因表达的相对稳定性。

关键词 黄芪多糖; IL-6; TNF- α ; 炎性微环境; 骨髓间充质干细胞; IL-6R; TNFR

Effects of Astragalus Polysaccharides on Expression of IL-6R, TNFR and Tumor Related Genes of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Inflammatory Microenvironment

Luo Yali^{1,2,3}, Zhang Liying^{2,3}, Li Chenghao², Zhang Yanhui², Liu Yongqi^{2*}, An Fangyu^{2,3}, Feng Caiqin², Li Yan²

(¹Department of Pathology, Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

²Provincial-Level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; ³Key Laboratory of Dunhuang Medicine, Ministry of Education, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Abstract The purpose of this study is to observe the expression of IL-6R and TNFR of bone marrow mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironment induced by IL-6 and TNF- α , and to investigate the effect of astragalus polysaccharide on IL-6R and TNFR expression in order to explore the possible mechanism of IL-6 and TNF- α on inflammatory injury of BMSCs. The inflammatory microenvironment was established by using 100 ng/mL IL-6 and 50 ng/mL TNF- α . BMSCs were divided into control group, model group (D group) and 50 μ g/mL APS intervention group (H group). The expression level of sIL-6R in the supernatant was determined

收稿日期: 2018-03-04

接受日期: 2018-09-13

国家自然科学基金(批准号: 81760804、81360588)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0931-5161250, E-mail: liuyongqi73@163.com

Received: March 4, 2018

Accepted: September 13, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81760804, 81360588)

*Corresponding author. Tel: +86-931-5161250, E-mail: liuyongqi73@163.com

网络出版时间: 2018-10-26 11:18:47

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1118.024.html>

by ELISA. The levels of IL-6R, GP-130, TNFR I and TNFR II were detected by immunofluorescence methods. Western blot was used to detect the expression level of P53, PTEN and Ras and C-myc. Results showed that compared with the control group, the content of sIL-6R in the supernatant decreased, and the levels of IL-6R, GP 130, TNFR I and TNFR II increased in model group. Compared with the model group, the interposition of APS increased the content of sIL-6R and decreased the expression of IL-6R, GP 130, TNFR I and TNFR II. Compared with the control group, the expression of Ras, C-myc protein increased and that of P53 and PTEN decreased in model group. After the intervention of APS, the expression of Ras, C-myc protein decreased, while P53 and PTEN protein increased. Collectively, the present study demonstrates that APS could not only decrease the influence of BMSCs on IL-6R and TNFR in inflammatory microenvironment, but also maintain the expression level of tumor related genes stability.

Keywords astragalus polysaccharide; IL-6; TNF- α ; inflammatory microenvironment; BMSCs; IL-6R; TNFR

研究认为,慢性炎症促使细胞的恶性转化甚至肿瘤发生^[1]。目前有越来越多的学者注意到,炎症因子作为炎性微环境的重要组分,与干细胞发生恶性转化关联密切。本课题组前期研究观察显示,肿瘤炎性微环境可诱导骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖速度加快,细胞周期发生改变,遗传稳定性下降。部分BMSCs向肿瘤相关成纤维细胞(tumor associated fibroblasts, TAFs)方向分化,发生恶性转化的趋向明显。虽然致炎因子IL-10、TGF- β 、IL4、IFN- γ 和TNF- α 等能够增强间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对于退行性疾病、炎症及自身免疫性疾病的疗效^[2],但是关于IL-6等在干细胞的恶性转化和肿瘤演进方面发挥的重要作用日益被重视^[3]。本课题组前期研究显示,IL-6和TNF- α 模拟建立的炎性微环境导致MSCs生物学稳定性下降。基于中医“精气互化”理论,运用黄芪多糖进行干预肿瘤炎性微环境中的BMSCs,发现黄芪多糖可发挥维护BMSCs遗传稳定性的作用^[4]。目前,关于BMSCs上是否存在炎症因子IL-6以及TNF- α 发挥作用的物质基础——IL-6R和TNFR报道较少,关于受体的表达水平是否变化的研究也鲜见。本实验通过观察IL-6R及TNFR的表达水平,希望能进一步探索IL-6以及TNF- α 模拟的炎性微环境导致BMSCs遗传稳定性下降的可能作用靶点或途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 BMSCs细胞株购自美国ScienCell公司。

1.1.2 药品与试剂 间充质干细胞基础培养基(MSCM)购自美国ScienCell公司。人IL-6、人TNF- α 均购自Peprotech公司。兔抗人PTEN多克隆抗体、兔抗人P53多克隆抗体、兔抗人Ras多克隆抗体、兔抗人C-myc多克隆抗体均购自Immuno Way公司。山羊抗兔二抗多克隆抗体、山羊抗鼠二抗多克隆抗体、兔抗人TNFR I多克隆抗体、小鼠抗人TNFR II多克隆抗体、小鼠抗人IL-6R多克隆抗体均购自美国Abcam公司。兔抗人GP130多克隆抗体购自美国GeneTex公司。兔抗人GAPDH多克隆抗体购自杭州贤至生物科技有限公司。SuperBlock[®] Blocking Buffer(SB245271)购自美国Thermo公司。黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)购自上海源叶生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器和设备 IMARK酶标仪购自美国Bio-Rad公司。Mini Protean Tetra Cell Mini Trans blot Cell蛋白核酸凝胶电泳转印系统购自美国Bio-Rad公司。PowerPac电泳仪购自德国Eppendorf公司。ChemiDoc-610凝胶成像分析系统购自美国UVP公司。超净工作台购自上海苏坤实业有限公司。SKYJH-1112二氧化碳培养箱购自美国Thermo公司。

1.2 实验方法

依据文献研究及本课题组前期研究成果,本实验筛选黄芪多糖作用于BMSCs的最佳浓度为50 $\mu\text{g/mL}$,建立炎性微环境的IL-6和TNF- α 最佳浓度分别为100 ng/mL和50 ng/mL^[5-7]。取第3代状态良好的BMSCs细胞,使用MSCM培养基调整成细胞浓度为 1×10^4 个/mL的单细胞悬液,每孔2 mL接种于6孔板内。

1.2.1 分组 对照组(control组):正常BMSCs细胞。模型组(D组):以100 ng/mL IL-6和50 ng/mL TNF- α

联合干预BMSCs细胞。黄芪多糖干预组(H组): 以50 $\mu\text{g/mL}$ APS干预IL-6 100 ng/mL +TNF- α 50 ng/mL 组。各组分别连续诱导7天, 每72 h换液1次, 同时添加IL-6、TNF- α 和APS以维持其最佳浓度。7天之后, 细胞融合达80%~90%时将细胞进行传代培养。如此连续传6代细胞(约42天)。收集细胞, 进行后续的检测。

1.2.2 ELISA法检测 sIL-6R的表达水平按照说明书操作方法, 稀释标准品。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μL , 然后再加待测样品10 μL , 同时设空白孔。用封板膜封板后置37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。稀释洗涤液备用。小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置30 s后弃去, 如此重复5次, 拍干。每孔加入酶标试剂50 μL , 空白孔除外。37 $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。按前述方法洗涤。37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色15 min后每孔加终止液50 μL , 终止反应。以空白孔调零, 450 nm波长依序测量各孔的吸光度(D)值(在加终止液后15 min以内进行), 通过标准曲线计算样品中sIL-6R含量。

1.2.3 免疫荧光法检测IL-6R、gp130、TNFR I、TNFR II的表达水平在超净台中取出12孔细胞培养板, 将提前用氢氧化钠和75%酒精处理过的盖玻片放在火上烘烤至干燥, 然后放入12孔板中。在每孔中加入1 mL含10%胎牛血清的干细胞培养液。将细胞消化、吹散并接种于12孔板中, 汇合度控制在20%左右, 进行培养。待细胞汇合度达到40%~50%时, 进行固定细胞操作。弃培养液, 用PBS缓冲液润洗细胞1次, 弃PBS液, 在每个孔中加入1 mL 4%多聚甲醛, 室温固定20 min。弃多聚甲醛, 再加入1 mL甲醇继续固定5 min。弃甲醇, 加入1 mL免疫荧光用blocking buffer, 室温封闭10 min。弃封闭液, 加入1 mL一抗(1:1 000)的blocking buffer, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 脱色摇床慢摇过夜。弃抗体缓冲液, 加入1 mL PBS缓冲液, 于脱色摇床慢摇5 min, 弃PBS液, 洗3遍。弃PBS液, 加入1 mL含荧光二抗(1:500)的blocking buffer, 于室温在脱色摇床慢摇1 h, 避光。弃抗体缓冲液, 用PBS液润洗细胞5遍, 每遍5 min, 于室温在脱色摇床上进行, 避光。取出载玻片, 滴加含DAPI染料的封片液VECTASHIELD, 将12孔板中的盖玻片取出, 倒扣于封片液上, 直接观察。

1.2.4 Western blot技术检测抑癌基因P53、PTEN和原癌基因Ras、C-myc的蛋白表达水平^[8]准备玻璃板, 配置12%分离胶。加入TEMED后, 立即摇晃

均匀进行灌胶。配置5%浓缩胶。加入TEMED后, 立即轻轻摇匀, 并迅速将其灌入分离胶上方, 避免产生气泡。立即将梳子垂直插入浓缩胶。待胶凝固, 加入电泳液。按照测定出的各组蛋白浓度, 分别计算每孔30 μg 蛋白量的上样体积。用微量进样器垂直向梳孔内加入各组蛋白样品, 并将Marker加入到两侧的孔内。设置电泳模式P1: 电压为恒压80 V, 电泳0.5 h。待溴酚兰跑至浓缩胶与分离胶分界部位时切换P2模式: 恒压100 V, 继续电泳1 h左右直至溴酚蓝大约跑至玻璃板下沿即可终止。采用90 V的恒压进行转膜, 转膜2 h。将转好蛋白的PVDF膜标记好, 置于5%的牛奶封闭液中, 摇床上封闭2 h。之后, 用新鲜配制的TBST稀释不同的一抗抗体, 将膜各自放入相应的抗体孵育槽内。水平摇床上孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第2天, TBST洗膜3次, 每次5 min。用封闭液按抗体稀释比例将对应种属的二抗进行稀释。水平摇床室温孵育2 h。显色, 采用凝胶成像仪(Bio-Rad)采集信号并摄取凝胶图像。用Image J软件计算各条带的光密度值, 以GAPDH作为内参, 结果以蛋白条带与GAPDH条带灰度值的比值表示。

1.2.5 统计方法数据分析均采用SPSS 19.0软件进行统计分析。计量资料均表示为均数 $\pm$ 标准差, 采用单因素方差分析组间显著性差异, 用LSD分析组间两两比较, 若方差不齐时用Dunnett's法分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞上清液中sIL-6R的含量

与对照组比较, D组细胞上清液中的sIL-6R含量明显降低($P<0.01$)。黄芪多糖干预之后, sIL-6R含量升高($P<0.05$)(表1和图1)。

2.2 IL-6R、gp130的表达水平

免疫荧光观察检测结果显示, 对照组细胞IL-6R有少量表达。与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$)IL-6R表达不同程度增强。与模型组比较, 黄芪多糖干预组IL-6R表达减弱($P<0.05$)(图2、表2和图3)。

免疫荧光观察检测结果显示, 对照组细胞gp130有少量表达。与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$)gp130表达不同程度增强。与模型组比较, 黄芪多糖干预组gp130表达明显减弱($P<0.01$)(图4、表3和图5)。

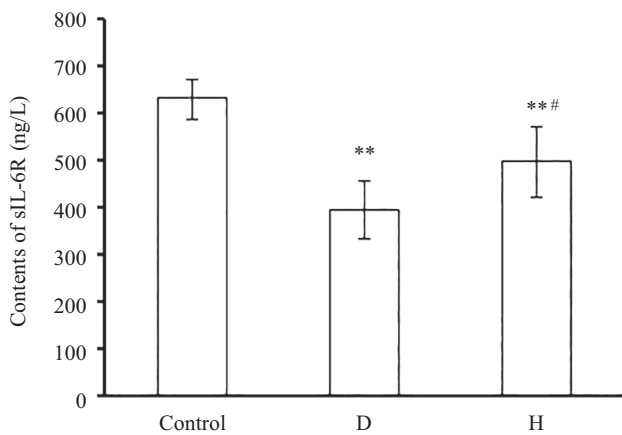
表1 细胞上清液中sIL-6R的含量

Table 1 The contents of sIL-6R in supernatant

组别 Group	sIL-6R含量(ng/L) Contents of sIL-6R (ng/L)
Control	630.94±41.80
D	394.37±62.58**
H	498.13±75.22** [#]

** $P<0.01$, 与control组比较; [#] $P<0.05$, 与D组比较。

** $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.05$ compared with D group.



** $P<0.01$, 与对照组比较; [#] $P<0.05$, 与模型组比较.

** $P<0.01$ compared with control group; [#] $P<0.05$ compared with D group.

图1 细胞上清液中sIL-6R的含量比较

Fig.1 Comparison of the contents of sIL-6R in supernatant

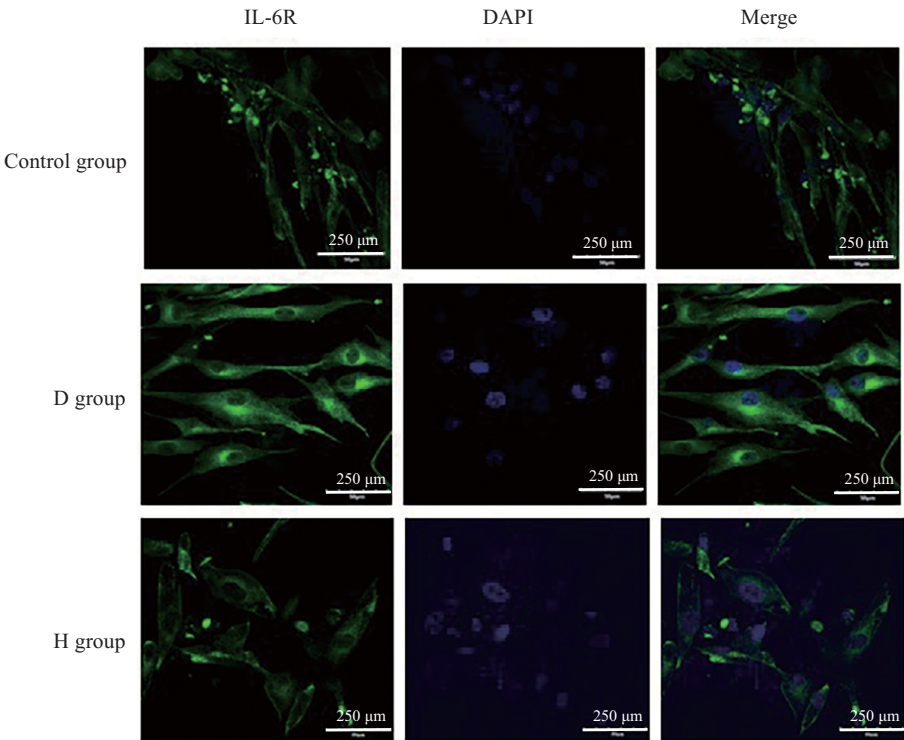


图2 黄芪多糖对BMSCs的IL-6R表达的影响

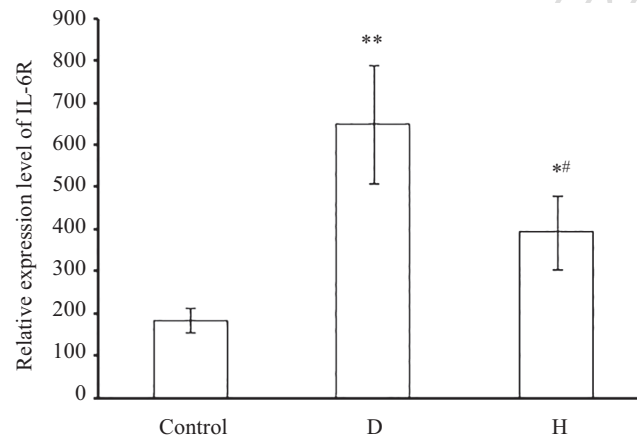
Fig.2 Effects of APS on expression level of IL-6R of BMSCs

表2 IL-6R相对表达水平的比较

Table 2 Comparison of relative expression level of IL-6R

组别 Group	IL-6R相对表达水平 Relative expression level of IL-6R
Control	183.68±28.68
D	649.40±139.74**
H	392.61±86.442*#

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与D组比较。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with D group.



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与D组比较。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with D group.

图3 IL-6R相对表达水平的比较

Fig.3 Comparison of relative expression level of IL-6R

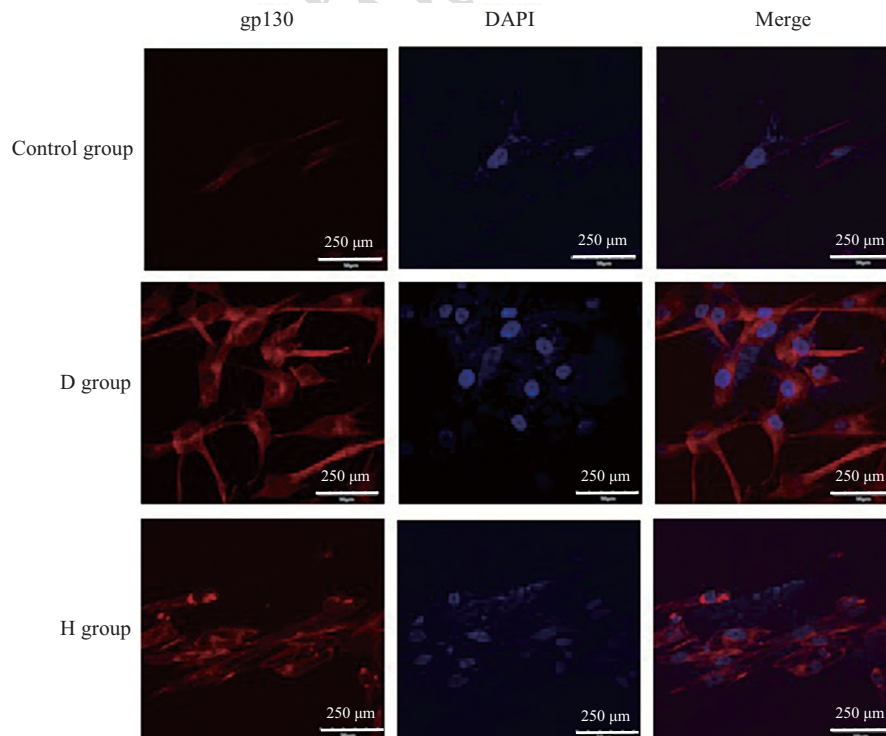


图4 黄芪多糖对BMSCs的gp130表达的影响

Fig.4 Effects of APS on expression level of gp130 of BMSCs

2.3 TNFR I、TNFR II的表达水平

免疫荧光观察检测结果显示, 对照组细胞有TNFR I表达。与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖组($P<0.05$) TNFR I表达不同程度增强。与模型组比较, 黄芪多糖组TNFR I表达减弱($P<0.05$)(图6、表4和图7)。

免疫荧光观察检测结果显示, 对照组细胞TNFR II有少量表达。与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$) TNFR II表达不同程度增强。与模型组比较, 黄芪多糖干预组TNFR II表达明显减弱($P<0.01$)(图8、表5和图9)。

2.4 肿瘤相关基因P53、PTEN、C-myc、Ras的蛋白表达水平

Western blot结果显示, 与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$) P53表达不同程度降低。与模型组比较, 黄芪多糖干预组P53表达水平明显升高($P<0.01$)(图10和图11)。与对照组比较, 模型组、黄芪多糖干预组PTEN表达均明显降低($P<0.01$)。与模型组比较, 黄芪多糖干预组PTEN表

达升高($P<0.05$)(图10和图11)。

Western blot结果显示, 与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$) C-myc表达不同程度升高。与模型组比较, 黄芪多糖干预组C-myc表达降低($P<0.05$)(图10和图12)。与对照组比较, 模型组($P<0.01$)、黄芪多糖干预组($P<0.05$) Ras表达不同程度升高。与模型组比较, 黄芪多糖干预组Ras表达明显降低($P<0.01$)(图10和图12)。

3 讨论

IL-6作为多效性前炎症细胞因子, 在多种炎症疾病中高表达。目前研究认为, 肿瘤微环境可激活IL-6/JAK/STAT3信号通路导致BMSCs发生恶变^[9], 该信号通路可能在MSCs的恶性转化及永生化过程中发挥关键作用, 其机制与IL-6R/gp130的过表达及激活有关^[7,10]。TNF- α 是由单核细胞、巨噬细胞或淋巴细胞等分泌的多功能细胞因子, 在细胞生长、细胞分化、炎症反应、免疫调节等方面起重要作用。TNF/NF- κ B所引起的炎症对于正常细胞的恶性转化

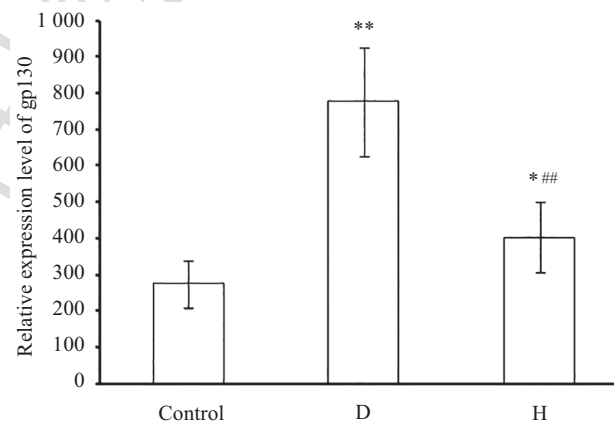
表3 gp130相对表达水平的比较

Table 3 Comparison of relative expression level of gp130

组别	gp130相对表达水平
Group	Relative expression level of gp130
Control	274.84±64.82
D	777.24±150.49**
H	402.61±96.54*##

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; ## $P<0.01$, 与D组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; ## $P<0.01$ compared with D group.



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; ## $P<0.01$, 与D组比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; ## $P<0.01$ compared with D group.

图5 gp130表达水平的比较

Fig.5 Comparison of relative expression level of gp130

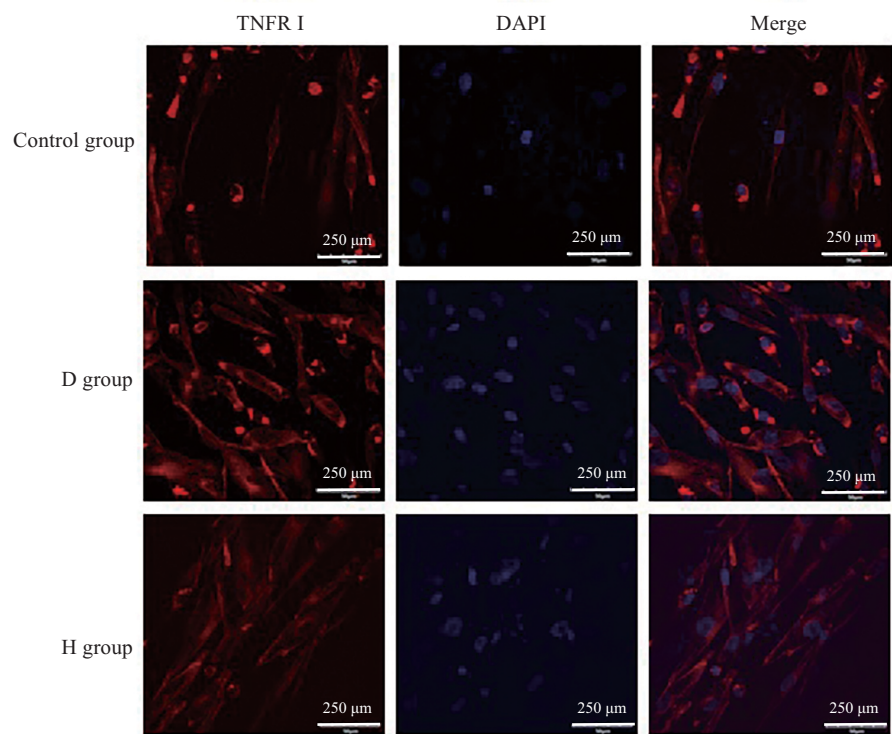
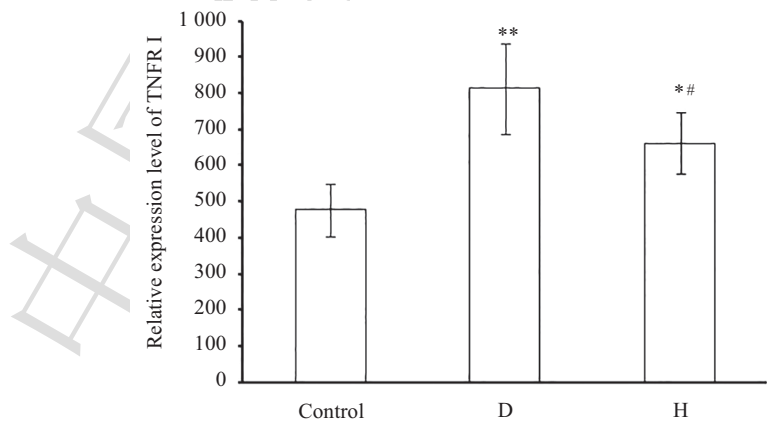


图6 黄芪多糖对BMSCs的TNFR I表达的影响
Fig.6 Effects of APS on expression level of TNFR I of BMSCs

表4 TNFR I相对表达水平的比较
Table 4 Comparison of relative expression level of TNFR I

组别 Group	TNFR I相对表达水平 Relative expression level of TNFR I
Control	476.30±72.29
D	813.98±126.11**
H	612.61±98.76*#

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与D组比较。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with D group.



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; # $P<0.05$, 与D组比较。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with D group.

图7 TNFR I表达水平的比较
Fig.7 Comparison of relative expression level of TNFR I

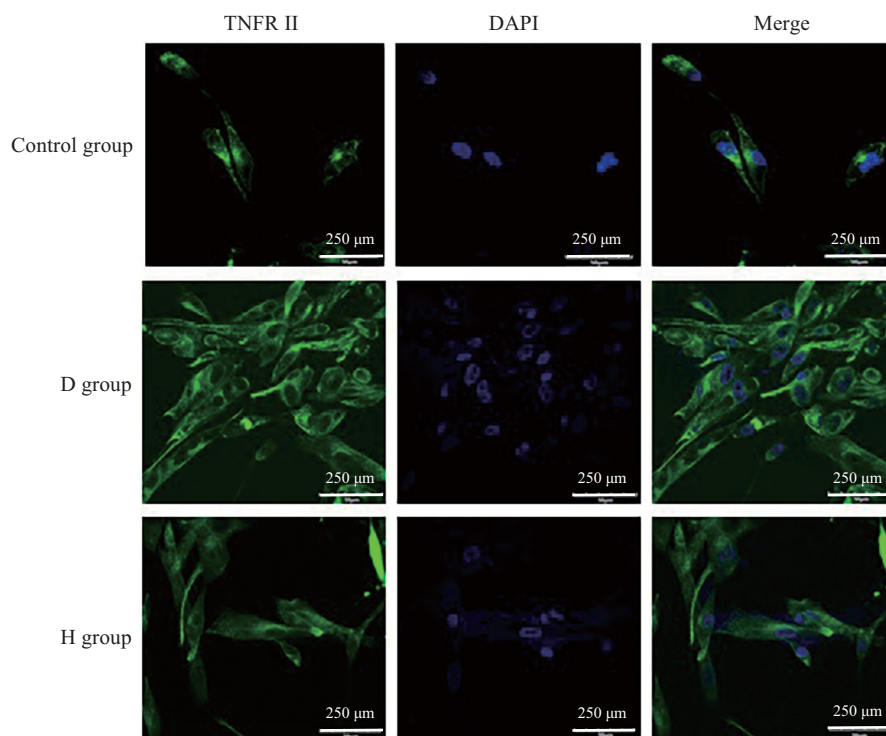


图8 黄芪多糖对BMSCs的TNFR II表达的影响

Fig.8 Effects of APS on expression level of TNFR II of BMSCs

表5 TNFR II相对表达水平的比较

Table 5 Comparison of relative expression level of TNFR II

组别 Group	TNFR II相对表达水平 Relative expression level of TNFR II
Control	314.01±93.82
D	823.75±130.02**
H	435.27±115.38***

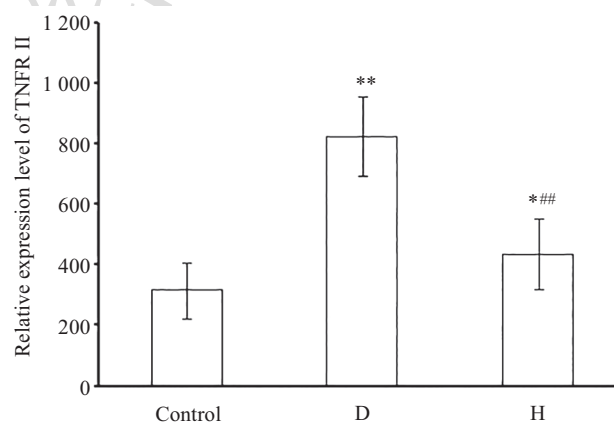
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; *** $P<0.01$, 与D组比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; *** $P<0.01$ compared with D group.* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与control组比较; *** $P<0.01$, 与D组比较。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group; *** $P<0.01$ compared with D group.

图9 TNFR II表达水平的比较

Fig.9 Comparison of relative expression level of TNFR II

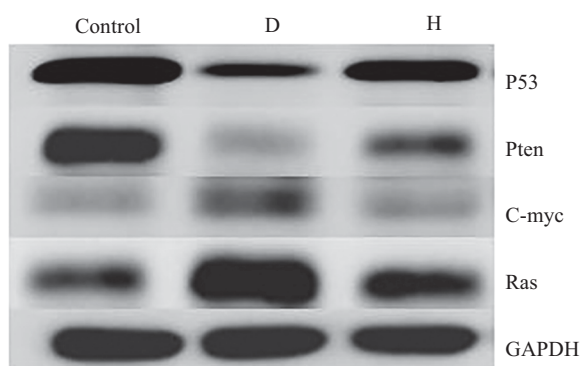
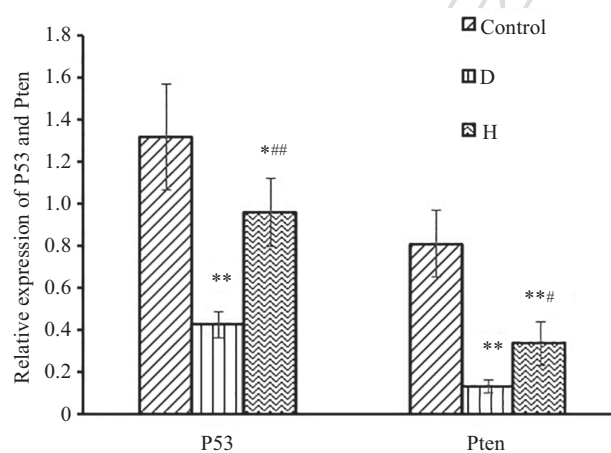


图10 黄芪多糖对BMSCs的P53、PTEN、C-myc、Ras表达的影响

Fig.10 Effects of APS on expression levels of P53, PTEN, C-myc and Ras

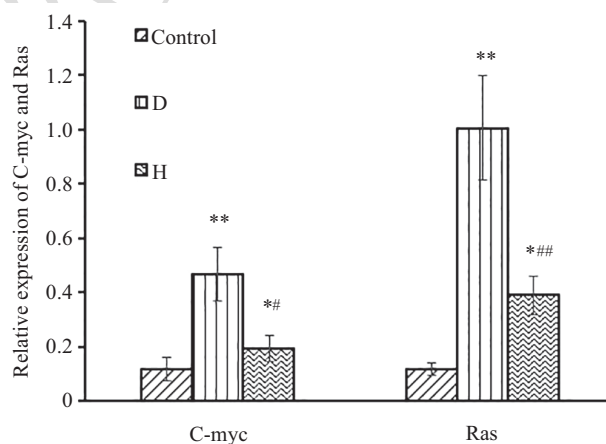


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与control组比较; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与D组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ compared with D group.

图11 抑癌基因P53、PTEN的蛋白表达水平表达

Fig.11 Comparison of relative protein expression levels of P53 and PTEN genes



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与control组比较; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与D组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ compared with D group.

图12 原癌基因C-myc、Ras的蛋白表达水平比较

Fig.12 Comparison of relative protein expression levels of C-myc and Ras genes

以及维持肿瘤干细胞的表型至关重要^[11-12], TNF- α 和IFN- γ 可通过NF- κ B/SMAD7信号通路协同诱导MSCs发生缺陷, 促进肿瘤发生^[11]。炎症因子IL-6和TNF- α 能够通过与其相应受体的结合, 进而活化下游的信号转导通路, 影响MSCs的生物学稳定性。

IL-6受体由特异性受体结构链即IL-6R和信号传导链即gp130组成。IL-6的信号转导途径包括经典的信号转导途径和跨信号转导途径。在前者中, IL-6与细胞膜上的特异性结合受体IL-6R结合形成复合物。膜IL-6R主要表达在肝细胞、中性粒细胞、巨噬细胞及某些淋巴细胞表面。而后者因缺乏膜上的IL-6R, 所以通过可溶性IL-6受体(soluble IL-6R, sIL-6R)与IL-6进行结合形成复合物。不论是何种信号转导途径, 只有IL-6与IL-6R结合形成IL-6/IL-6R复合物后才能与gp130结合形成高亲和力复合物。gp130表达于所有细胞表面。结合之后, gp130同源二聚化^[13]。有文献报道显示, MSCs上存在IL-6受体^[14], 但相关的研究不多。本实验结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞上清液中的可溶性受体sIL-6R含量降低, 这可能与模型组细胞上清液中含有较高的炎症因子与sIL-6R处于结合状态有关。而对照组无炎症因子干预, sIL-6R处于未结合状态因而含量较高。炎症因子干预后, IL-6R、gp130的表达水平均增强, 提示在IL-6炎症微环境中MSCs的IL-6R、gp130发生过表达及激活, 与研究报道一致。因此, 在炎症微环境诱导MSCs发生生物学稳定性下降甚至恶性损伤的过程中, IL-6的干预效应可能是通过IL-6与IL-6R结合的模式, 进而与gp130结合启动下游的信号转导途径, 发挥调控的作用。在此过程中, 细胞上清液中的sIL-6R与细胞膜的IL-6R可能都发挥作用, 究竟是何种受体起主要作用或者是两者同时起作用, 暂未见相关报道, 这也是本课题组进一步的研究方向。

肿瘤坏死因子受体包括TNFR I和TNFR II。TNFR I在人体所有组织中表达, 是介导TNF信号转导的主要受体; TNFR II主要是存在于免疫细胞, 参与免疫细胞的免疫调节和炎症过程^[15]。两种受体可能介导不同的信号传导途径, 从而发挥不同的作用。张蓉蓉等^[9]发现, MSCs上同时存在TNFR I和TNFR II两种受体。TNF- α 可以促进MSCs增殖, 并刺激MSCs释放细胞因子^[16]。Teo等^[17]的研究报道显示, 在TNF- α 的刺激下, 人BMSCs黏附到内皮细胞, 进而促进MSCs的归巢作用, 参与治疗相应的组织损伤。

本实验结果显示, MSCs上同时存在TNFR I和 TNFR II两种受体, 这与报道结果一致。与对照组比较, 模型组细胞TNFR I和 TNFR II的表达水平均升高, 提示在炎症微环境诱导MSCs发生生物学稳定性下降甚至恶性损伤的过程中, TNFR I和 TNFR II都参与其中。TNF- α 的干预效应可能是通过分别与TNFR I和TNFR II结合的模式, 进而启动下游不同的信号转导途径, 发挥不同的调控作用。在此过程中, 二者可能都发挥作用, 究竟是何种受体起主要作用或者是两者同时起作用, 还有待进一步探索。作为炎症因子, IL-6和TNF- α 炎症信号通路在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用。结合文献及本课题组前期的研究结果发现, IL-6和TNF- α 模拟炎症微环境易于导致MSCs发生生物学稳定性下降甚至恶性转化^[7,11]。本实验对肿瘤相关的几种癌基因、抑癌基因的表达水平进行检测, 试图分析IL-6和TNF- α 与肿瘤相关基因表达变化的关联对于此过程的意义。

P53基因是人类癌症中最容易发生突变的基因, 其突变可促进细胞生长。P53对MSCs的增殖、定型、分化等发挥决定性的作用^[18]。通过激活P53蛋白, 能抑制胚胎干细胞关键转录因子, 调控干细胞分化, 从而维持干细胞生物学稳定性^[19]。缺失P53功能的MSCs, 干细胞正常调控功能将不复存在, 细胞不仅发生生长、增殖等生物学特性的明显改变, 且失去正常的分化能力, 细胞可能逆转分化方向, 促进其恶性转化, 这可能是促进恶性肿瘤发生发展的重要机制之一。近来研究表明, PTEN和P53之间存在密切联系, P53是PTEN转录的激活子, P53可直接结合在PTEN上游序列, 诱导PTEN表达水平升高^[20]。PTEN参与许多与肿瘤生成有关的细胞过程, 包括细胞增殖和存活的调节、细胞迁移和入侵、基因组稳定性、DNA损伤时细胞周期关卡诱导、干细胞自我更新等^[21]。研究发现, PTEN缺失会导致神经干细胞大量增殖^[22]。PTEN对PI3K/Akt的抑制作用可能与其阻碍干细胞增殖有关^[23]。PTEN基因的缺失和变异可导致其抑癌功能丧失。有研究报道显示, 在前列腺癌的发生发展中, IL-6可阻断P53介导的凋亡通路^[24]。TNF- α 通路中的关键基因NF- κ B可通过P65抑制共转录激活因子CBP/P300来下调PTEN的表达^[25]。本实验结果显示, 模型组P53、PTEN蛋白表达均降低, 提示炎症微环境中MSCs生物学稳定性的下降与抑癌基因的表达下调有关, 这一结果与文献报道一致^[26]。

原癌基因作为细胞基因组的正常组成部分,其数量、质量发生变化或功能异常均会导致细胞的增殖、分化失衡,促进肿瘤发生。C-myc是原癌基因myc编码的一种转录调节因子,在大多数的恶性肿瘤中都发现C-myc的异常表达^[27]。研究发现,C-myc能干扰干细胞分化,维持全能型造血干细胞^[28]和胚胎干细胞^[29]特性。在分化瞬间,C-myc的表达常常下降^[29],其下调表达也诱导细胞凋亡,该机制可能与抑癌基因P53相关^[30]。Ras基因是人类癌症中确定的第一个突变基因。当Ras基因发生突变时,会导致其下游的信号转导紊乱,持续刺激细胞增殖,凋亡减少,细胞间接触抑制减弱,细胞发生不可控制的增殖恶变^[31]。转染K-Ras基因的BMSCs在与肝细胞共同培养的条件下向肝癌细胞分化进而导致肿瘤的发生^[32]。研究报道显示,IL-6经过Ras/MEK/ERK通路能促进卵巢癌细胞的黏附和侵袭功能^[33]。IL-6能促进慢性粒细胞白血病CGL患者C-myc基因的表达^[34]。本实验结果显示,模型组细胞RAS、C-myc蛋白表达均升高,提示炎性微环境中MSCs生物学稳定性的下降与原癌基因的表达上调有关。

本实验肿瘤相关基因表达水平的检测结果提示,在炎性微环境中,BMSCs的原癌基因、抑癌基因的表达水平均发生改变,打破二者之间形成的增殖、分化、凋亡相对平衡的状态,可能导致BMSCs出现异常增殖、分化以及凋亡能力的下降,BMSCs生物学稳定性难以维持甚至发生恶性损伤,促进了肿瘤的发生发展。因此,炎性因子IL-6和TNF- α 诱导BMSCs生物学稳定性下降的机制可能与炎性信号通路调控原癌基因、抑癌基因的表达水平失衡相关。

现代中医学者认为,MSCs是先天之精在细胞层次的存在形式^[35]。微环境是MSCs赖以生存的空间位置和相互关系,不仅为其提供赖以生存的物质基础,并与其增殖、迁移、归巢和分化等生命活动密切相关^[36]。长期存在的炎性微环境逐渐加重,破坏MSCs生物学稳定性,甚至导致其发生恶性转化。中医认为“精气互化”,“气”的运行不息是化生“精”的动力。补气促使BMSCs(先天之精)转化为五脏(心肌样细胞、神经元样细胞、内皮细胞等)之精气^[37]。黄芪具有补气升阳、扶正祛邪的功效,黄芪及其提取物具有抗肿瘤、抗突变、调节免疫等作用^[38],可通过调控TLR4/NF- κ B信号通路对抗TNF- α 等诱发的细胞损伤。目前已有较多研究发现,黄芪及其有效成分可诱导

BMSCs定向分化,保护细胞的遗传稳定性^[39]。在低氧、肿瘤等异常的干细胞微环境中,黄芪显示出维护干细胞生物学特性稳定的作用^[40]。本研究结果显示,与模型组比较,黄芪多糖干预之后BMSCs上清液中sIL-6R含量升高,而IL-6R、TNFR表达水平有所回降。这提示,黄芪多糖在炎性微环境中发挥维护BMSCs生物学稳定性的作用途径可能与调控BMSCs的IL-6R、TNFR表达水平有关。而且,黄芪多糖干预之后,Ras、C-myc蛋白表达均下降,而P53、PTEN蛋白表达均升高。这提示,黄芪多糖在炎性微环境中发挥维护BMSCs生物学稳定性的作用机制可能与其调控BMSCs的原癌基因、抑癌基因的表达水平有关。目前,关于中药及其有效成分对BMSCs的原癌基因、抑癌基因表达的相关研究还不多。

本课题组前期研究结果显示,黄芪多糖具有维护炎性微环境中BMSCs生物学稳定性的作用,但对其具体机制的研究不够深入。近年来,分子对接技术作为研究中药有效成分及其功能的重要手段,已展示出对于药效集团的作用靶点相关研究的显著优势。下一步本课题组拟应用分子对接、药物虚拟筛选等研究方法,对黄芪的有效成分进行筛选研究,以便于明确其发挥保护机制的靶点,深入探讨其作用机制。

参考文献 (References)

- 1 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74.
- 2 Pourgholaminejad A, Aghdami N, Baharvand H, Moazzeni SM. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells. *Cytokine* 2016; 9(85): 51-60.
- 3 Woolery KT, Kruk PA. Ovarian epithelial-stromal interactions: role of Interleukins 1 and 6. *Obstet Gynecol Int* 2011; 2011: 358493.
- 4 武有明, 张齐, 刘永琦, 何建新, 伍志伟, 高卓越, 等. 黄芪多糖对肺癌微环境中BMSCs增殖及TAFs分化的影响. *中药药理与临床* (Wu Youmin, Zhang Qi, Liu Yongqi, He Jianxin, Wu Zhiwei, Gao Zhuoyue, *et al.* Effects of astragalus polysaccharides on proliferation and expression of TAFs related molecule of bone marrow mesenchymal stem cells in the lung cancer microenvironment. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*) 2015; 31(6): 76-9.
- 5 周妮娜, 张利英, 刘永琦, 何建新, 张亚楠, 胡文涛, 等. 黄芪多糖对电离辐射诱发间充质干细胞基因DNA损伤的保护作用. *中国现代应用药学* (Zhou Nina, Zhang Liying Liu Yongqi, He Jianxin, Zhang Yanan, Hu Wentao, *et al.* Radioprotection of astragalus polysaccharide against genomic DNA damage of mesenchymal stem cell induced by ionizing radiation. *Chinese*

- Journal of Modern Applied Pharmacy) 2016; 33(2): 139-43.
- 6 骆亚莉, 刘永琦, 安方玉, 任春贞, 李玲, 李程豪, 等. 间充质干细胞恶性转化相关关键基因的生物信息学分析. 生命科学研究 (Luo Yali, Liu Yongqi, An Fangyu, Ren Chunzhen, Li Ling, Li Chenghao, *et al.* Bioinformatic analysis of related key genes in malignant transformation of mesenchymal stem cells. Life Science Research) 2017; 21(4): 329-36.
- 7 Cui XR, Liu J, Bai L, Tian J, Zhu J. Interleukin-6 induces malignant transformation of rat mesenchymal stem cells in association with enhanced signaling of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci* 2014; 105(1): 64-71.
- 8 Zhang YM, Zhang ZM, Guan QL, Liu YQ, Wu ZW, Li JT, *et al.* Co-culture with lung cancer A549 cells promotes the proliferation and migration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Exp Ther Med* 2017; 14(4): 2983-91.
- 9 Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Arsdale TV, Gascoyne RD, Berern K, *et al.* TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol* 1998; 152(6): 1549-61.
- 10 高卓越, 何建新, 刘永琦, 卢志伟, 伍志伟, 骆亚莉, 等. 肺癌微环境对骨髓间充质干细胞自衰老的抑制作用及其调控机制. 中国细胞生物学学报 (Gao Zhuoyue, He Jianxin, Liu Yongqi, Lu Zhiwei, Wu Zhiwei, Luo Yali, *et al.* The inhibitory effect of lung cancer microenvironment on self senescence of BM-MSCs and its mechanism. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(12): 1646-52.
- 11 Wang L, Zhao YH, Liu Y, Akiyama K, Chen C, Qu CY, *et al.* IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NF-kappaB signaling. *Stem cells* 2013; 31(7): 1383-95.
- 12 Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Seher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF-kappaB signalling. *Nat Commun* 2011; 18(2): 162-74.
- 13 侯小飞, 高方友. IL-6跨信号转导作用与其相关疾病的研究进展. 海南医学 (Hou Xiaofei, Gao Fangyou. Research progress of IL-6 trans-signaling and its related diseases. *Hainan Medical Journal*) 2016; 27(16): 2667-70.
- 14 李慧, 孙凌云. 间质干细胞的免疫调节及免疫治疗作用研究进展. 中华医学杂志 (Li Hui, Sun Lingyun. Advances in immunoregulation and immunotherapy of mesenchymal stem cells. *National Medical Journal of China*) 2006; 86(7): 501-3.
- 15 Landskron G, Fuente MD, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res* 2014; 2014: 149185.
- 16 Yi T, Lee DS, Jeon MS, Kwon SW, Song SU. Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene* 2012; 497(2): 131-9.
- 17 Teo GS, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, *et al.* Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor-alpha-activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells* 2012; 30(11): 2472-86.
- 18 张仁峰, 公蕾. P53基因与肿瘤治疗研究进展. 现代免疫学 (Zhang Renfeng, Gong Lei. Research progress of P53 gene and tumor therapy. *Modern Immunology*) 2016; 36(2): 150-5.
- 19 Liu WJ, Qi M, Konermann A, Zhang LQ, Jin F, Jin Y. The p53/miR-17/Smurf1 pathway mediates skeletal deformities in an age-related model via inhibiting the function of mesenchymal stem cells. *Aging* 2015; 7(3): 205-18.
- 20 Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; 8(2): 317-25.
- 21 Huang J, Kontos CD. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and survival by the tumor suppressor protein PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(5): 745-51.
- 22 Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, *et al.* Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the PTEN tumor suppressor gene *in vitro*. *Science* 2001; 294(5549): 2186-89.
- 23 崔晓萍, 陈建梅, 穆军山, 叶建新, 林敏, 王魁花, 等. PTEN通过拮抗PI3K/Akt信号通路抑制神经干细胞增殖. 西安交通大学学报(医学版) [Cui Xiaoping, Chen Jianmei, Mu Junshan, Ye Jianxin, Lin Min, Wang Kuihua, *et al.* PTEN inhibits the proliferation of neural stem cells via the antagonism of PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Science)*] 2016; 37(2): 239-45.
- 24 张小鹏, 张长城. IL-6在前列腺癌中的作用进展. 肿瘤防治研究 (Zhang Xiaopeng, Zhang Changcheng. Progress of IL-6 in prostate cancer. *Cancer Research on Prevention and Treatment*) 2008; 35(6): 450-2.
- 25 Park S, Zhao D, Hatanpaa KJ, Mickey BE, Saha D, Boothman DA, *et al.* RIP1 activates PI3K-Akt via a dual mechanism involving NF-KB-mediated inhibition of the mTOR-S6K-IRS1 negative feedback loop and down-regulation of PTEN. *Cancer Res* 2009; 69(10): 4107-11.
- 26 刘建平, 朱静, 田杰, 刘官信, 林建萍, 鲁荣. 体外模拟肿瘤微环境中致大鼠MSCs瘤化因子分析. 基础医学与临床 (Liu Jianping, Zhu Jing, Tian Jie, Liu Guanxin, Lin Jianping, Lu Rong. The analysis of the factors which induced rat mesenchymal stem cells tumorigenesis *in vitro* simulated tumor microenvironment. *Basic & Clinical Medicine*) 2012; 32(4): 375-80.
- 27 邹治铭, 郭华雄. C-myc在肿瘤中作用的研究进展. 现代医学 (Zou Zhiming, Guo Huaxiong. Research progress on the role of C-myc in tumor. *Modern Medical Journal*) 2016; 44(7): 1024-26.
- 28 Kishor Singh V, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of induction: induced pluripotent stem cells (iPSCs). *J Stem Cells* 2015; 10(1): 43-62.
- 29 Nie ZQ, Hu GQ, Wei G, Cui KR, Yamane A, Resch W, *et al.* C-myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 2012; 151(1): 68-79.
- 30 Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 2008; 27(50): 6462-72.
- 31 孙红, 郑媛婷, 李涛, 蔡卫民. K-Ras基因突变在胰腺癌诊断、进展和预后中的作用研究进展. 世界临床药物 (Sun Hong, Zheng Yuanling, Li Tao, Cai Weimin. Research progress on K-Ras mutation used in pancreatic cancer patient's diagnosis, progression and prognosis. *World Clinical Drugs*) 2015; 36(11): 775-9.
- 32 张刚庆, 方驰华, 高鹏, 郑权, 颜政, 向国安, 等. 转染癌基因的骨髓基质干细胞体外分化特征. 中国组织工程研究与临床康复 (Zhang Gangqing, Fang Chihua, Gao Peng, Zheng

- Quan, Yan Zheng, Xiang Guoan, *et al.* Characteristics of *in vitro* differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells transfected with oncogene. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2007; 11(3): 459-62.
- 33 王丹, 陈晓, 徐葳, 杨静, 郭小芹, 葛振华, 等. 自分泌IL-6经Ras/MEK/ERK、PI3K/Akt通路促进卵巢癌细胞黏附和侵袭功能的研究. 免疫学杂志(Wang Dan, Chen Xiao, Xu Wei, Yang Jing, Guo Xiaoqin, Ge Zhenhua, *et al.* Autocrine production of IL-6 promotes adhesion and invasion of ovarian cancer cells by Ras/MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. Immunological Journal) 2016; 32(4): 294-8.
- 34 陈汉春, 汤立军, 彭兴华, 罗志勇, 罗赛群, 谭文斌. IFN- α 联合IL-6对CGL患者骨髓细胞生长及生长-凋亡相关基因表达的影响. 中华血液学杂志(Chen Hanchun, Tang Lijun, Peng Xinghua, Luo Zhiyong, Luo Saiqun, Tan Wenbin. Effects of IFN- α combined with IL-6 on cell growth and related genes expression and apoptosis of bone marrow cells from CGL patients. Chinese Journal of Hematology) 2000; 21(7): 341-4.
- 35 黄中迪, 高建东. 中医肾精与干细胞关系辨识. 山东中医杂志(Huang Zhongdi, Gao Jiandong. Identification of relationship between kidney essence and stem cells. Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine) 2014; 33(12): 957-9.
- 36 张金生, 张宝霞, 朱慧芳, 张阳阳. 干细胞、微环境与活血化瘀. 中国组织工程研究(Zhang Jinsheng, Zhang Baoxia, Zhu Huifang, Zhang Yangyang. Insight into stem cells, microenvironment and methods for promoting blood circulation and removing stasis. Chinese Journal of Tissue Engineering Research) 2016; 20(23): 3484-90.
- 37 卞琴, 沈自尹, 王拥军. 骨髓间充质干细胞在中医理论中的归属. 中国中医基础医学杂志(Bian Qin, Shen Ziyin, Wang Yongjun. The attribution of bone mesenchymal stem cells in traditional Chinese medicine theory. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine) 2011; 17(7): 794-7.
- 38 孙政华, 邵晶, 郭玫. 黄芪化学成分及药理作用研究进展. 中医临床研究(Sun Zhenghua, Shao Jing, Guo Mei. A review on chemical components and pharmacological effects of Huangqi. Clinical Journal of Chinese Medicine) 2015; 7(25): 22-5.
- 39 王芳, 曾熙欣, 毛建文, 卢彬, 李卫民. 黄芪散含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞增殖和分化功能的影响. 中成药(Wang Fang, Zen Xuxin, Mao Jianwen, Lu Bin, Li Weimin. Effect of Astragalus powder serum on the proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Chinese Traditional Patent Medicine) 2017; 39(7): 1478-82.
- 40 伍志伟, 刘丹, 刘永琦, 薛娜, 颜春鲁, 苏韞. 黄芪多糖对低氧环境中BMSCs成脂分化的影响. 生物工程学报(Wu Zhiwei, Liu Dan, Liu Yongqi, Xue Na, Yan Chunlu, Su Yun. Effects of Astragalus polysaccharides on adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in low oxygen environment. Chin J Biotech. Chinese Journal of Biotechnology) 2017; 33(11): 1850-8.