

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.03.002

· 基础研究 ·

UC-MSC 经 PI3K/AKT 信号通路影响人肺腺癌 A549 细胞的凋亡和增殖

袁哲^a, 吴思梦^b, 王亚君^b, 王思亮^b, 朱喜科^b (中国医科大学附属盛京医院 a. 脐血库; b. 实验研究中心, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的:**探讨人脐带来源间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cell, UC-MSC)经 PI3K/AKT 信号通路对人肺腺癌 A549 细胞凋亡和增殖的影响及其作用机制。**方法:**采用酶消化法从人脐带组织中分离 UC-MSC 并进行体外培养,用流式细胞术鉴定所得到的 UC-MSC 的免疫表型。收集 UC-MSC 培养上清,建立 UC-MSC 条件培养基与肺腺癌 A549 细胞株的体外间接共培养体系。采用 CCK-8 法检测 A549 细胞增殖率,通过 Annexin V/PI 染色流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡率,通过 PI 染色法判断肿瘤细胞的细胞周期分布;qPCR 实验检测 CyclinD1、BAX、Bcl-2 等 PI3K/AKT 通路下游凋亡与增殖相关基因的转录水平;Wb 测定 PI3K/AKT 通路相关蛋白质表达水平。**结果:**人脐带组织分离培养 3 周后,可见纤维状细胞铺满培养瓶,平行排列或呈漩涡状生长。流式细胞术检测发现所得细胞表达 MSC 标志分子 CD73、CD90、CD105,不表达 CD45 和 HLA-DR。UC-MSC 条件培养基与肺腺癌 A549 细胞株在体外间接共培养后,与对照组比较,A549 细胞的增殖率明显降低、凋亡率明显升高,其细胞周期明显停滞在 G₁ 期(均 $P < 0.01$)。PI3K/AKT 信号通路相关分子 CyclinD1 和 Bcl-2 转录下调、BAX 的转录上调(均 $P < 0.01$);UC-MSC 条件培养基培养的 A549 细胞总 AKT 水平不变,p-AKT 蛋白表达呈剂量性依赖下降($P < 0.01$)。**结论:**UC-MSC 明显影响肺腺癌 A549 细胞的增殖和凋亡能力,细胞周期停滞在 G₁ 期,其主要作用机制是 UC-MSC 抑制 A549 细胞 PI3K/AKT 信号通路,为探索 UC-MSC 临床应用的安全性和有效性提供实验依据。

[关键词] 肺腺癌;间充质干细胞;A549 细胞;增殖;凋亡;PI3K/AKT 信号通路

[中图分类号] R734.2; R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)03-0260-06

UC-MSCs affects apoptosis and proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via PI3K/AKT signaling pathway

YUAN Zhe^a, WU Simeng^b, WANG Yajun^b, WANG Siliang^b, ZHU Xike^b (a. Cord Blood Bank; b. Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on apoptosis and proliferation of human lung adenocarcinoma A549 cells via PI3K/AKT signaling pathway, and to explore the mechanism. **Methods:** UC-MSCs were isolated from human umbilical cord tissues by enzyme digestion method and cultured *in vitro*. The immunophenotypes of the obtained MSCs were identified by flow cytometry. The culture supernatant of UC-MSCs was collected to establish an indirect *in vitro* co-culture system of UC-MSCs conditioned medium and lung adenocarcinoma A549 cell line. Proliferation of A549 cells was detected by CCK-8 assay; apoptosis of A549 cells was determined by Annexin V/PI double staining, and cell cycle distribution of tumor cells was determined by PI staining. The transcription levels of apoptosis and proliferation associated downstream genes in the PI3K/AKT pathway, such as CyclinD1, BAX and Bcl-2, were detected by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Moreover, Wb was utilized to detect the expression levels of PI3K/AKT pathway-related proteins. **Results:** The culture flask was filled with fibroblast-like cells, arranged in parallel, with spiral growth after three weeks of isolation and culture of human umbilical cord tissues. The flow cytometry results revealed that the MSC markers CD73, CD90 and CD105, but not CD45 and HLA-DR, were expressed on obtained cells. After indirect *in vitro* co-culture of UC-MSCs conditioned medium and lung adenocarcinoma A549 cells, the proliferation rate of A549 cells was significantly decreased; the apoptosis rate was significantly increased, and the cell cycle was obviously arrested at the G₁ phase as compared with the control group (all $P < 0.01$). The transcription levels of PI3K/AKT signaling pathway-related factors, CyclinD1 and Bcl-2 were down-regulated, and the transcription level of BAX was up-regulated (all $P < 0.01$). The total AKT was not

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81270430)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No.81270430)

[作者简介] 袁哲(1985-),女,硕士,技师,主要从事干细胞基础与临床治疗的研究,E-mail: yuan_zhe@163.com

[通信作者] 朱喜科(ZHU Xike, corresponding author),博士,研究员,硕士生导师,主要从事基因的表达遗传修饰及肿瘤细胞与分子生物学研究,E-mail: zhuxk@sj-hospital.org

changed, but p-AKT protein expression was decreased in a dose-dependent manner in A549 cells cultured in UC-MSCs conditioned medium ($P < 0.01$). **Conclusion:** UC-MSCs can affect the proliferation and the apoptosis of A549 cells, and arrest cells in G_1 phase. The main mechanism is that UC-MSCs can inhibit the PI3K/AKT signaling pathway in A549 cells, providing an experimental basis for exploring the safety and effectiveness of clinical application of UC-MSCs.

[Key words] lung adenocarcinoma; mesenchymal stem cell; A549 cell; proliferation; apoptosis; PI3K/AKT signal pathway

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(3): 260-265. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.002]

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均位于恶性肿瘤首位,疾病负担严重^[1]。有研究^[2]显示,肺癌患者的总体5年生存率仅17.9%。肺腺癌作为非小细胞肺癌的一种,是肺肿瘤中最常见的组织学类型,约占所有肺癌发生率的50%。由于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)经过修饰后可以作为肿瘤的基因治疗载体,近年来对于MSC与肿瘤的发生发展之间关系的研究越来越多。人脐带来源间充质干细胞(umbilical cord-derived mesenchymal stem cell, UC-MSC)相较骨髓来源的MSC具有质量稳定、对供者没有伤害、病毒感染率低等优点。然而,现有研究对MSC对于肿瘤的发生发展的作用仍有争议。PI3K/AKT信号通路是致癌基因与多种受体相联系的关键信号转导途径,在细胞的抗凋亡、增殖、化疗耐受中发挥相关作用。本课题研究体外培养UC-MSC对肺腺癌A549细胞的增殖和凋亡的影响,并探讨其主要作用机制,为探索UC-MSC临床应用的安全性和有效性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肺腺癌A549细胞株购自中国科学院细胞库,置于含有10%胎牛血清、1%青/链霉素双抗的RPMI 1640培养基中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。RPMI 1640细胞培养基购自美国Hyclone公司, MSC培养基添加剂购自加拿大STEMCELL Technologies有限公司,胎牛血清购自北京索莱宝科技有限公司, CCK-8法细胞增殖检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司, Annexin V-FITC/PI双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司, 2×Power Taq PCR MasterMix购自北京百泰克生物技术有限公司, 全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、p-AKT和AKT抗体、内参抗体β-actin、羊抗兔IgG-HRP均购自沈阳万类生物科技有限公司。

1.2 UC-MSC培养和鉴定

取产妇生产过程中废弃的脐带(中国医科大学附属盛京医院妇产科),用PBS反复冲洗脐带动静脉血管中残留的脐血。剖开脐带,剔去脐动脉和脐静脉,剥离出华通氏胶组织。用眼科剪刀将其剪

成约1 mm³的组织块。剪碎后的组织用0.1%的IV型胶原酶消化2 h,加入PBS中止。1 000×g离心10 min,洗涤2次后去上清。再加入0.25%的胰蛋白酶消化40 min,加入含10%FBS的DMEM/F12中止消化。1 000×g离心10 min,去上清。加入含1%青/链霉素和10% MSC培养基添加剂的DMEM/F12培养基,接种到培养瓶,在CO₂培养箱中进行培养。取汇合度达到80%~90%的UC-MSC,将培养瓶中的培养基倒掉,加入适量的PBS洗涤3次。倒掉PBS缓冲液后,加入含有10%FBS和1%青/链霉素的RPMI 1640完全培养基,10 ml/瓶。24 h后,收集细胞培养上清,1 000×g离心5 min,0.22 μm滤膜过滤,作为UC-MSC条件培养基,用于后续实验;装入冻存管,放于-80℃冰箱保存,1周内使用。取需要鉴定的UC-MSC并将其消化。用PBS洗涤后分装至流式检测管。分别加10 μl FITC荧光标记的抗体:CD45、CD73、CD90、CD105、HLA-DR。室温避光孵育30 min。加入PBS后,1 000×g离心5 min洗涤。加300 μl/管PBS重悬细胞,上机检测。

1.3 CCK-8法检测A549细胞增殖能力

取对数生长期的A549细胞,将细胞密度调整至 1.5×10^4 /孔,并种植细胞到96孔板。24 h后取出96孔板,并吸出旧培养基。分别向种有A549细胞的孔中加入对照组培养基和UC-MSC条件培养基100 μl/孔,放入培养箱中继续培养,分别在24、48和72 h后取出96孔板,吸去孔中旧培养基,加入新鲜RPMI 1640培养基100 μl/孔。向每孔中加入10 μl的CCK-8试剂,37℃孵育1.5 h。酶标仪检测450 nm波长处每孔的光密度(D)值。细胞增殖率(%)=(实验组D值-空白孔D值)/(对照组D值-空白孔D值)×100%。实验重复3次。

1.4 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测A549细胞凋亡率

分别将A549细胞在对照组培养基和UC-MSC条件培养基中培养24 h。将细胞消化后,1 000×g离心5 min,去上清。加入1×结合缓冲液400 μl重悬细胞。加入5 μl Annexin V-FITC混匀,室温避光15 min。加入10 μl PI混匀,冰浴避光5 min。30 min内使用流式细胞仪进行检测。实验重复3次。

1.5 PI染色流式细胞术检测A549细胞周期

收集分别使用对照组和UC-MSC条件培养基

处理 24 h 的 A549 细胞。PBS 洗涤去上清, 加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 70% 乙醇溶液固定 2 h。染色前用 PBS $1\ 000\times g$ 离心 5 min, 洗去固定液。加 100 μl RNase A 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中水浴 30 min。再加入 400 μl PI 混匀, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min 后, 上流式仪检测, 检测结果使用 Modfit LT 3.2 软件分析。实验重复 3 次。

1.6 qPCR 检测 A549 细胞增殖、凋亡相关基因表达

分别收集使用对照组培养基和 UC-MSC 条件培养基处理 24 h 的 A549 细胞, 采用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 逆转录后在 qPCR 仪器上进行扩增反应。BAX 的上游引物为 5'-GAGAGGTCTTTTCC-GAGTGGC-3', 下游引物为 5'-ACAGGGCCTT-GAGCAC CAGT-3'; Bcl-2 的上游引物为 5'-ATT-GATGGGATCGTTGCCTTATG-3', 下游引物为 5'-CCAA TTCCTTTCGGATCTTTATTTTC-3'; CyclinD1 的上游引物为 5'-GAACACGGCTCACGCTTAC-3', 下游引物为 5'-CGATACACACAACATCCAGG-3'; β -actin 的上游引物为 5'-CTTAGTTGCGTTACAC CCTTTCTTG-3', 下游引物为 5'-CTGTCACCTT CACCGTTCCAGTTT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析实验数据。实验重复 3 次。

1.7 Wb 检测 PI3K/AKT 通路相关蛋白的表达

分别收集使用对照组培养基、50% 条件培养基或完全 UC-MSC 条件培养基处理 24 h 的 A549 细胞。提取蛋白质并测定浓度。取 40 μg /孔蛋白质进行 SDS-PAGE。电泳完成后, 将蛋白质转印到 PVDF 膜上, 室温封闭 1.5 h。将 1:500 一抗加入封闭好的 PVDF 膜, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗涤后, 加入 1:5 000 的二抗工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。TBST 洗涤后, ECL 底物发光。加入剥脱液剥脱抗体, 把 PVDF 膜浸到用 TBST 缓冲液配制的 5% (M/V) 脱脂奶粉溶液中, 室温摇动 1 h 封闭。将 1:1 000 的内参抗体加入封闭好的 PVDF 膜, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。重复孵育二抗及 ECL 底物发光。检测各组肿瘤细胞中总 AKT 蛋白和 p-AKT 蛋白的相对表达量, 并计算 p-AKT 蛋白与总 AKT 蛋白的比值。扫描胶片, 条带的灰度值使用凝胶图象处理软件系统 (Gel-Pro-Analyzer) 进行分析。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件和 GraphPad Prism 5.0 作图软件, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UC-MSC 的细胞形态

原代 UC-MSC 培养 2~3 周后, 贴壁细胞可达 80%~90%。显微镜下可观察到培养至第 3 代的 UC-MSC 呈长梭形, 形态均匀。融合后, 细胞呈旋涡状或单极放射状生长 (图 1)。

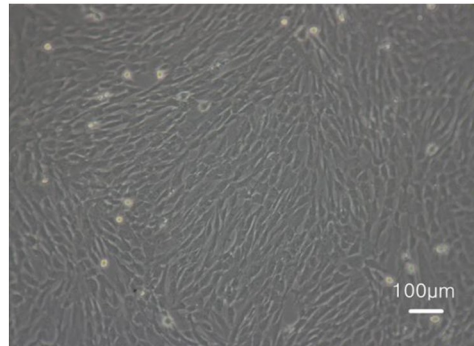


图 1 UC-MSC 的形态 ($\times 100$)

Fig.1 Morphology of UC-MSCs ($\times 100$)

2.2 人脐带分离培养的细胞符合典型的 UC-MSC 表型特征

流式细胞术检测结果 (图 2) 显示, UC-MSC 高表达 CD73、CD90、CD105, 不表达白细胞共同抗原 CD45 和 MHC-II 类分子 HLA-DR, 表明从人脐带分离培养得来的细胞符合典型的 UC-MSC 表型特征。

2.3 UC-MSC 培养上清抑制 A549 细胞增殖能力

分别使用对照组培养基和 UC-MSC 条件培养基处理 A549 细胞 24、48 和 72 h 后, CCK-8 法检测结果 (图 3) 显示, UC-MSC 组 A549 细胞增殖率均明显降低 ($P<0.01$)。

2.4 UC-MSC 培养上清促进 A549 细胞凋亡

Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术法检测 (图 4) 结果, 显示使用 UC-MSC 条件培养基处理 A549 细胞 24 h 后, A549 细胞凋亡率较对照组明显提高 [$(6.31\pm 1.00)\%$ vs $(3.74\pm 0.61)\%$, $P<0.01$], 表明 UC-MSC 条件培养基能够明显促进细胞的凋亡。

2.5 UC-MSC 培养上清阻滞 A549 细胞于 G1 期

流式细胞术检测结果 (图 5) 显示, 与对照组比较 A549 细胞 G1 期比例明显上升 ($P<0.01$), S 期和 G2 期比例明显下降 ($P<0.01$)。

2.6 UC-MSC 调节 A549 细胞内 CyclinD1、Bcl-2 和 BAX mRNA 的表达水平

qPCR 实验检测结果 (图 6) 显示, 与对照组比较, UC-MSC 组 A549 细胞中 BAX mRNA 的相对表达量明显提高, CyclinD1、Bcl-2 mRNA 的相对表达量明显下降 (均 $P<0.01$)。

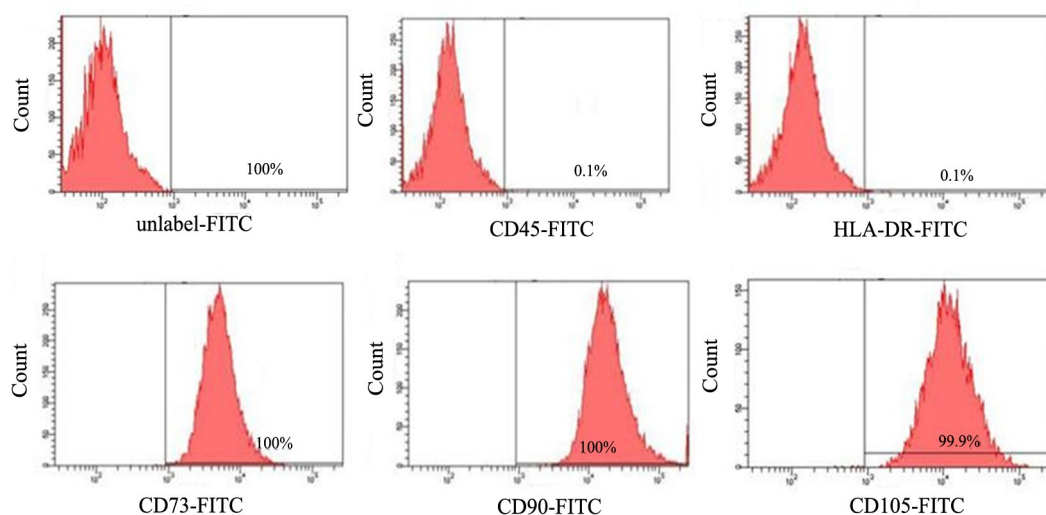
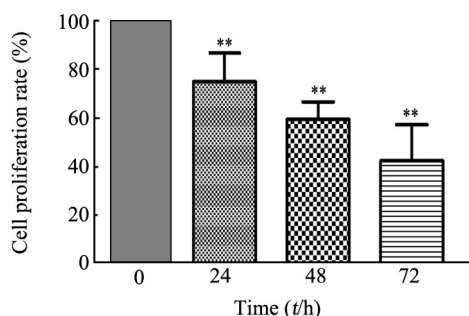


图2 UC-MSC的免疫表型鉴定

Fig.2 Immunophenotype identification of UC-MSCs



** $P < 0.01$ vs 0 h group

图3 UC-MSC条件培养基对A549细胞增殖能力的影响

Fig.3 Effect of UC-MSCs conditioned medium on proliferation of A549 cells

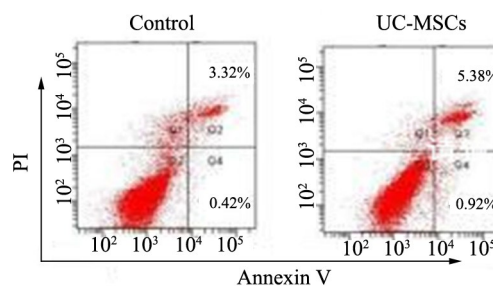
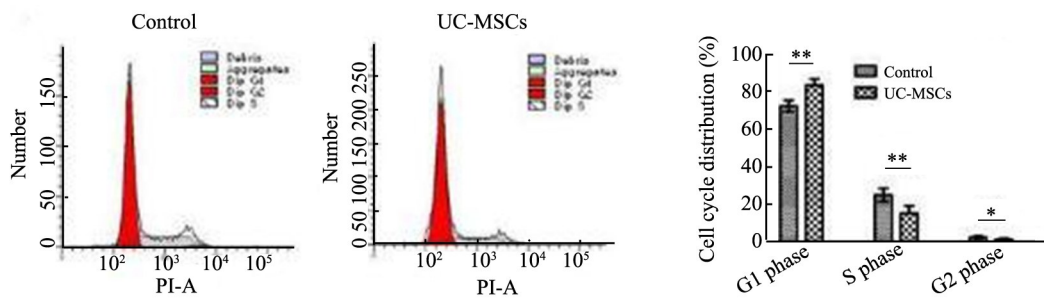


图4 UC-MSC条件培养基对A549细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of UC-MSCs conditioned medium on the apoptosis of A549 cells



** $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 UC-MSC条件培养基对A549细胞周期的影响

Fig.5 Effect of UC-MSCs conditioned medium on the cell cycle distribution of A549 cells

2.7 UC-MSC培养上清降低A549细胞内p-AKT蛋白的表达水平

Wb检测结果(图7)显示,50%条件培养基组和UC-MSC组的p-AKT/总AKT比值与对照组相比均明显下降,且呈现剂量依赖性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

1991年CAPAN首次在骨髓基质细胞中发现造血干细胞的造血过程,发现了来自中胚层发育的早期细胞,也就是骨髓MSC。如今,对MSC的研究和应用已经不再局限于人骨髓来源,而是延伸到小鼠^[1]、兔^[4]、羊^[5]等不同种属中和牙髓^[6]、滑膜^[7]、羊水^[8]等不同组织来源中。有研究^[9-10]证实,不同来源的

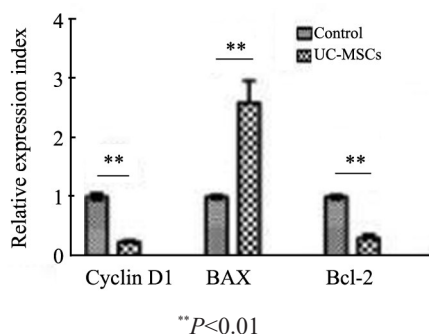
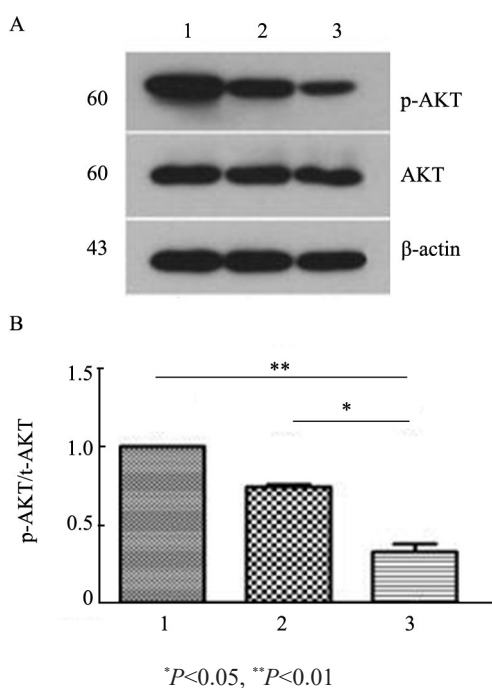


图6 UC-MSC 培养上清对 A549 细胞中 CyclinD1、Bcl-2 和 BAX mRNA 表达水平的影响

Fig.6 Effects of UC-MSCs culture supernatant on mRNA expressions of Cyclin D1, Bcl-2 and BAX in A549 cells



A: Detection of p-AKT and total AKT protein expression levels by Wb; B: Ratio of p-AKT to total AKT; 1: Control group; 2: 50% UC-MSCs supernatant group; 3: UC-MSCs group

图7 UC-MSC 培养上清对 A549 细胞中 AKT、P-AKT 蛋白表达水平及比值的影响

Fig.7 Effect of UC-MSCs supernatant on the protein expressions of AKT and P-AKT and their ratio in A549 cells

MSC 其表面标志、免疫表型、生物学功能如增殖和迁移等均存在差异。这些差异也将直接影响 MSC 在再生医学、细胞治疗和作为基因载体的肿瘤治疗方面的临床应用。而 UC-MSC 相较其他来源的 MSC 在肿瘤治疗方面具有独特的优势。由于 MSC 经过修饰后可以作为肿瘤的基因治疗载体,近年来对于 MSC 与肿瘤的发生发展之间的关系的研究越来越多,但研究结果并不一致。LIU 等^[11]研究显示,乳腺肿瘤干细胞与 MSC 来自同一个细胞层次, MSC 表达

的乙醛脱氢酶通过涉及 IL-6 和 CXCL7 的信号通路调节着乳腺肿瘤干细胞。有研究者^[12]将人 MSC 与 MDA-MB-231 细胞共培养后的杂交细胞筛选出来,发现杂交瘤细胞的形成有助于增加肿瘤的异质性和提高的肿瘤转移能力。与此同时,也有研究发现 MSC 可以抑制肿瘤的生长,如 ZHANG 等^[13]发现骨髓 MSC 能够通过 NF- κ B 信号通路抑制黑色素瘤 A375 细胞的增殖和肿瘤发生。OHTA 等^[14]研究发现,大鼠和人的 UC-MSC 都能通过抑癌基因 FST 发挥肿瘤杀伤作用,且大鼠 UC-MSC 作用强于人 UC-MSC 的作用。GAZDIC 等^[15]研究发现,肺癌患者 MSC 会削弱 DC 细胞呈递和激活 CD8⁺ T 细胞的能力,并且降低肺癌小鼠体内 NK 细胞数,显著削弱 NK 细胞对肺癌细胞的细胞毒性。YUAN 等^[16]研究发现,UC-MSC 通过激活细胞凋亡和抑制 Wnt 信号通路,可以抑制体外培养的人肺癌和肝癌细胞的恶性生物学行为。CHAI 等^[17]研究证明,UC-MSC 通过抑制肺癌 H1299 细胞表达多种关键激酶(AKT、PI3K、STAT3 和 mTOR),从而抑制肺癌细胞侵袭和诱导凋亡。而 DONG 等^[18]的实验结果则表明,人 UC-MSC 来源的胞外小泡可能将 miR-410 转移至 LUAD 细胞以抑制 PTEN 蛋白的表达,进而有助于 LUAD 细胞生长。对于以上不同的实验结果,笔者认为造成实验结果出现差异的原因可能是 MSC 组织来源不同、作用的肿瘤细胞类型不同、实验模型不同、肿瘤细胞与间充质细胞数量比例不同等。

PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要的信号转导通路之一,在抑制细胞凋亡、调节细胞周期、促进细胞侵袭和转移的行为上发挥着重要的作用。PI3K/AKT 信号通路在非小细胞肺癌中的激活会导致疾病更有侵袭性,且预后也更差^[19-20]。AKT 作为 PI3K 下游的直接靶蛋白,其磷酸化激活在介导肿瘤发生发展的信号转导过程中起到重要作用。对于存在于肺腺癌中的 PI3K/AKT 通路,现有研究多数集中于抑制剂、miRNA 等对其所调控表型的影响。有研究^[21]证实, Melittin 可以诱导 A549 细胞凋亡和细胞周期阻滞及抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活。有研究^[14]显示, A549 细胞中 miR-126 的上调会降低靶基因 PIK3R2 的表达,进而影响 PTEN/PI3K/AKT 信号通路,抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭的能力。

本研究建立了 UC-MSC 酶消化法的分离培养体系,为研究和应用提供可靠的细胞来源。本研究发现,UC-MSC 可以在体外非直接接触的条件下,通过周期阻滞和诱导凋亡的作用抑制 A549 细胞的增殖。为了进一步研究人 UC-MSC 抑制肺腺癌增殖的机制,本研究使用了实时 qPCR 和 Wb 检测了添加实验

因素后,肿瘤细胞中PI3K/AKT信号通路下游基因及通路中分子表达的变化。本研究发现,UC-MSC条件培养基可以抑制CyclinD1和Bcl-2 mRNA的表达,增加BAX mRNA的表达。CyclinD1表达降低会造成细胞周期阻滞于G1期,而Bcl-2表达的降低和BAX表达的增加则会促进细胞的凋亡,结果与本实验UC-MSC抑制A549细胞增殖的结论相一致。同时,UC-MSC条件培养基可以抑制AKT蛋白的激活,且这种抑制作用呈现剂量依赖性,推测其可以在非直接接触的条件下,抑制PI3K/AKT信号通路的激活,这也可能是UC-MSC在体外抑制A549细胞增殖的机制之一。

综上所述,体外培养UC-MSC可明显影响肺腺癌A549细胞的增殖和凋亡能力,使A549细胞周期停滞在G1期,其主要时通过UC-MSC抑制A549细胞PI3K/AKT信号通路实现的,为探索UC-MSC临床应用的安全性和有效性提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 陈万青,左婷婷,郑荣寿,等. 2013年中国肺癌发病与死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(10): 795-800. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2017.10.01.
- [2] EBERLE A, JANSEN L, CASTRO F, et al. Lung cancer survival in Germany: a population-based analysis of 132,612 lung cancer patients[J]. Lung Cancer, 2015, 90(3): 528-533. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.10.007.
- [3] GORSKAYA Y F, DZHARULLAEVA A S, ONSINA D S, et al. Counts of MSC in the bone marrow of young and old CBA mice after a single exposure to osteogenic stimuli (curettage, BMP-2 injection) or antigens (S. typhimurium, antigenic complex) and in heterotopic bone marrow transplants[J]. Bull Exp Biol Med, 2017, 163(1): 1-5. DOI: 10.1007/s10517-017-3805-z.
- [4] SASAKI T, AKAGI R, AKATSU Y, et al. The effect of systemic administration of G-CSF on a full-thickness cartilage defect in a rabbit model MSC proliferation as presumed mechanism: G-CSF for cartilage repair[J]. Bone Joint Res, 2017, 6(3): 123-131. DOI: 10.1302/2046-3758.63.
- [5] RABBANI S, SOLEIMANI M, SAHEBJAM M, et al. Effects of endothelial and mesenchymal stem cells on improving myocardial function in a sheep animal model[J]. J Tehran Heart Cent, 2017, 12(2): 65-71.
- [6] TSAI A I, HONG H H, LIN W R, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human deciduous teeth pulp[J/OL]. Biomed Res Int, 2017, 2017(9): 2851906[2019-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28377925>. DOI: 10.1155/2017/2851906.
- [7] OZEKI N, MUNETA T, KOGA H, et al. Not single but periodic injections of synovial mesenchymal stem cells maintain viable cells in knees and inhibit osteoarthritis progression in rats[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(6): 1061-1070. DOI: 10.1016/j.joca.2015.12.018.
- [8] MARKMEE R, AUNGSUCHAWAN S, NARAKORNSAK S, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid to cardiomyocyte-like cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 6068-6076. DOI: 10.3892/mmr.2017.7333.
- [9] TANTRAWATPAN C, MANOCHANTR S, KHEOLAMAI P, et al. Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells[J]. J Med Assoc Thai, 2013, 96(9): 1208-1217.
- [10] TEOTIA P K, HUSSEIN K E, PARK K M, et al. Mouse adipose tissue-derived adult stem cells expressed osteogenic specific transcripts of osteocalcin and parathyroid hormone receptor during osteogenesis[J]. Transplant Proc, 2013, 45(8): 3102-3107. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.08.017.
- [11] LIU S, GINESTIER C, OU S J, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks[J]. Cancer Res, 2011, 71(2): 614-624. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0538.
- [12] MELZER C, OHEJ V D, HASS R. Enhanced metastatic capacity of breast cancer cells after interaction and hybrid formation with mesenchymal stroma/stem cells (MSC)[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1):2. DOI: 10.1186/s12964-018-0215-4.
- [13] ZHANG J, HOU L, ZHAO D, et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on melanoma cells[J]. Clin Transl Oncol, 2017, 19(11): 1-17. DOI: 10.1007/s12094-017-1677-3.
- [14] OHTA N, ISHIGURO S, KAWABATA A, et al. Human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells suppress the growth of breast cancer by expression of tumor suppressor genes[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(5): e0123756[2019-01-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25942583>. DOI: 10.1371/journal.pone.0123756.
- [15] GAZDIC M, SIMOVIC M B, JOVICIC N, et al. Mesenchymal stem cells promote metastasis of lung cancer cells by downregulating systemic antitumor immune response[J/OL]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 6294717[2019-01-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5534320/>. DOI: 10.1155/2017/6294717.
- [16] YUAN Y, ZHOU C, CHEN X, et al. Suppression of tumor cell proliferation and migration by human umbilical cord mesenchymal stem cells: a possible role for apoptosis and Wnt signaling[J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 8536-8544. DOI: 10.3892/ol.2018.8368.
- [17] CHAI L, BAI L, LI L, et al. Biological functions of lung cancer cells are suppressed in co-culture with mesenchymal stem cells isolated from umbilical cord[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 1076-1080. DOI: 10.3892/etm.2017.5456.
- [18] DONG L, PU Y, ZHANG L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote lung adenocarcinoma growth by transferring miR-410[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2):218-222. DOI: 10.1038/s41419-018-0323-5.
- [19] HEAVEY S, O'BYRNE K J, GATELY K. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 40(3): 445-456. DOI: 10.1016/j.ctrv.2013.08.006.
- [20] 李晨露,夏芳芳,章阿敏,等. 金纳米星负载二氢卟吩e6对肺癌A549细胞的光动力效应[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(4): 394-400. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.04.013.
- [21] 夏凡,王仪民,王辉. P53通过促进miR-145的表达抑制肺腺癌A549细胞的干细胞特性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(1): 58-63. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.012.

[收稿日期] 2018-12-06

[修回日期] 2019-02-01

[本文编辑] 王映红