

骨髓间充质干细胞促进肺癌转移的机制

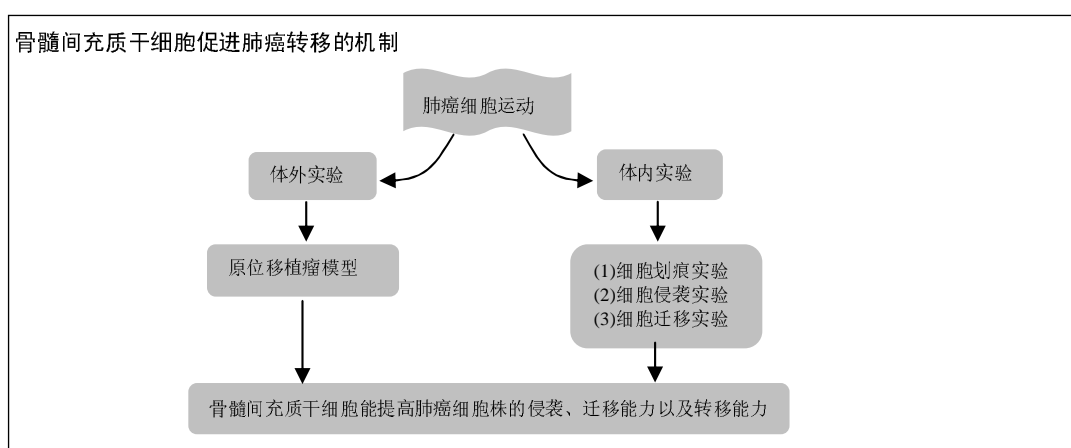
郑天亮¹, 赵松¹, 郭海周¹, 崔广晖¹, 林大维²(¹郑州大学第一附属医院胸外一科, 河南省郑州市 450052; ²郑州大学医学院, 河南省郑州市 450001)

引用本文: 郑天亮, 赵松, 郭海周, 崔广晖, 林大维. 骨髓间充质干细胞促进肺癌转移的机制[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2783-2788.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.19.007

ORCID: 0000-0003-0401-2132(郑天亮)

文章快速阅读:



郑天亮, 男, 1986年生, 河南省信阳市人, 汉族, 2012年华中科技大学同济医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事胸部肿瘤的综合治疗研究。

中图分类号: R394.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)19-02783-06

稿件接受: 2016-03-21

http://www.crter.org

文题释义:

细胞划痕实验: 是测定肿瘤细胞运动特性的方法之一。在体外培养的单层细胞上, 划痕致伤, 然后在加入药物等实验条件下观察其对肿瘤细胞迁移的影响。

细胞侵袭实验: 人工重构基底膜材料 Matrigel 是从小鼠 EHS 肉瘤中提取的基质成分, 含有层粘连蛋白、IV型胶原、接触蛋白和肝素硫酸多糖, 能在培养基中重建形成膜结构, 这种膜结构与天然基底膜结构极为相似。滤膜孔被 Matrigel 覆盖, 细胞不能自由穿过, 必须分泌水解酶, 并通过变形运动才能穿过这种铺有 Matrigel 的滤膜, 这与体内情况较为相似。

摘要

背景: 从目前研究来看, 间充质干细胞对肿瘤细胞的增殖、转移具备促进或抑制作用存在较大的争议。

目的: 探讨骨髓间充质干细胞促进肺癌转移的机制。

方法: 采用全骨髓直接贴壁法获得原代大鼠骨髓间充质干细胞, 差速贴壁结合消化控制法纯化细胞。培养肺癌细胞株, 采用划痕实验、细胞侵袭实验及迁移实验观察骨髓间充质干细胞对肺癌细胞迁移、侵袭、转移能力的影响, 建立大鼠肺癌原位肿瘤模型, 左侧肺接种骨髓间充质干细胞, 移植后 14 d 观察肺组织病理改变。

结果与结论: ①划痕后肺癌细胞迁移速率较大, 随着时间的不断延长, 划痕处愈合; ②加入骨髓间充质干细胞后肺癌细胞迁移数增多; ③加入骨髓间充质干细胞后肺癌细胞穿透 Matrigel 的能力增强; ④肺癌组织周围存在明显的纤维结缔组织, 且与周围组织边界清楚, 肿瘤细胞核大; 转移病灶组织出现明显的浸润, 坏死比较明显, 肿瘤细胞核大; ⑤结果提示, 骨髓间充质干细胞能提高肺癌细胞株的侵袭、迁移以及转移能力。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 肺癌转移; 骨髓间充质干细胞; 细胞划痕实验; 侵袭实验; 迁移实验; 国家自然科学基金

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 肺肿瘤; 细胞系; 肿瘤; 肿瘤转移; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(82541044)

Zheng Tian-liang, M.D.,
Attending physician, First
Department of Thoracic
Surgery, First Affiliated
Hospital of Zhengzhou
University, Zhengzhou
450052, Henan Province,
China

Mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells in promoting lung cancer metastasis

Zheng Tian-liang¹, Zhao Song¹, Guo Hai-zhou¹, Cui Guang-hui¹, Lin Da-wei² (¹First Department of Thoracic Surgery, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; ²Medical School of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: So far the positive or negative effects of mesenchymal stem cells on tumor growth and metastasis are under discussion.

OBJECTIVE: To explore the mechanism of bone marrow mesenchymal cells in promoting lung cancer metastasis.

METHODS: Primary rat bone marrow mesenchymal stem cells were obtained by direct adherence method of the whole bone marrow, and differential adherence combined with digestion control method was performed to purify cells. Lung cancer cell lines were cultured, and the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on the migration, invasion and metastasis of lung cancer cells were observed by scratch test, cell invasion and migration assays. Orthotopic lung cancer models were established in rats and bone marrow mesenchymal stem cells were seeded onto the left lung of rats. Then, pathological changes of lung tissues were observed at 14 days after transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: After the scratch test, the migration rate of lung cancer cells became higher, and the scratches healed with time. And after cell transplantation, the number of migrated lung cancer cells increased, as well as the ability of lung cancer cells penetrating the Matrigel was strengthened. Besides, fibrous connective tissues could be found around the lung cancer tissues, and necrosis with distinct boundary and large tumor nuclei; the metastatic tissues showed obvious infiltration and necrosis with large tumor nuclei. These results suggest that bone marrow mesenchymal stem cells can promote the invasion, migration and metastasis of lung cancer cell lines.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Lung Neoplasms; Cell Line, Tumor; Neoplasm Metastasis; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 82541044

Cite this article: Zheng TL, Zhao S, Guo HZ, Cui GH, Lin DW. Mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells in promoting lung cancer metastasis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(19):2783-2788.

0 引言 Introduction

相关数据显示,非小细胞肺癌患者发病后5年存活率低于15%,10年存活率低于7%,多数患者一旦确诊已经是晚期,错过了最佳治疗时机^[1-3]。因此,对于非小细胞肺癌进行早期诊断,并采取积极有效的干预措施阻止肺癌进展是提高患者生存率的关键所在^[4-5]。目前,对于肺癌的转移机制尚不完全知晓,涉及肿瘤细胞间的同质性黏附能力、蛋白酶溶解破坏基底膜以及细胞外基质、细胞骨架重构导致细胞的运动、迁移能力增强等^[6-7]。

数据结果显示:肺癌根治性切除后3年复发率为40.0%~50.0%,5年复发率为60.0%~70.0%。因此,肺癌的诊治困难、预后较差,对居民健康构成了严重的威胁^[8-9]。

骨髓源性干细胞类型较多,主要包括造血干细胞、间充质干细胞以及多能成体祖细胞^[10]。间充质干细胞属于一类特殊的细胞,能够在体外贴壁培养并扩增,并且在特定的条件下分化为脂肪细胞、成骨细胞以及软骨细胞,静脉注射间充质干细胞能向肿瘤组织归巢并可整合

入肿瘤组织中,且与肿瘤基质的形成关系密切^[11-12]。国际间充质及组织干细胞委员会在2006年对来源骨髓间充质干细胞提出3条最低标准:①在标准培养下,分离获得的细胞必须具备对塑料底物的黏附性;②经流式细胞仪检测,骨髓间充质干细胞能表达CD105、CD73及CD90,且阳性率≥95%;③经体外诱导骨髓间充质干细胞必须能向成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化。相关研究表明,间充质干细胞的作用并非统一,间充质干细胞对于肺癌的转移存在双向性,其在卡波氏肉瘤中能抑制肿瘤的生长,而在胶质瘤、结肠癌等疾病中,其能促进肿瘤的生长和转移^[13-14]。因此,研究骨髓间充质干细胞在肺癌转移中的机制能为肺癌治疗提供新的思路^[15-16]。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 于2014年12月至2016年1月在郑州大学第一附属医院完成。

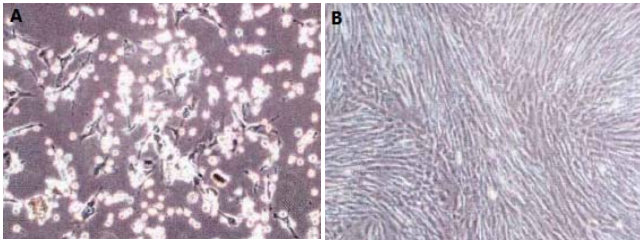


图1 骨髓间充质干细胞形态($\times 100$)

Figure 1 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 100$)

图注: 图中A为培养24 h后细胞部分贴壁生长, 多数细胞为椭圆形、纺锤形或多角形; B为传代后细胞为梭形, 细胞呈现均匀分布生长, 且细胞排列具备一定的方向性。

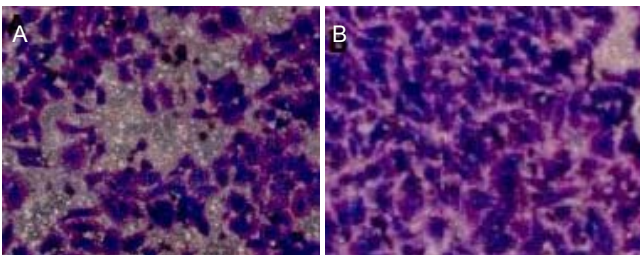


图2 细胞侵袭实验结果($\times 200$)

Figure 2 Results of cell invasion assay ($\times 200$)

图注: 图中A为未加入骨髓间充质干细胞的对照组; B为加入骨髓间充质干细胞后肺癌细胞迁移数增多。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 38只SD大鼠(2只用于细胞培养, 36只用于动物造模), 2-7周龄, 雌雄不限, SPF级, 体重为0.14-0.38 kg, 平均(0.38 ± 0.18) kg, 由郑州大学第一附属医院动物实验中心提供, 严格遵守相关标准进行饲养, 合格证号为SCXK(豫)2008-0004。实验过程中对SD大鼠的处理符合《关于善待实验动物的指导性意见》中相关规则^[17-18]。

1.3.2 主要仪器和试剂 胎牛血清(美国BECKMAN COULTER公司), L-DMEM细胞培养液(美国FORMA公司), 离心机(法国Jouan BR4), 倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司), 青霉素及链霉素(华北制药), 含EDTA的胰酶消化液(上海蓝季科技), 常规手术器械(上海医疗器械厂), 流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司), Cpn TW-183菌液(美国Sigma公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的制备方法 ①全骨髓贴壁培养法: 将2只SD大鼠处死, 在体积分数为75%乙醇中浸泡15 min, 取出胫骨和股骨, 将胫骨和股骨两端剪断, 充分暴露骨髓腔, 采用无菌注射器吸取含体积分数为10%胎牛血清的培养基反复冲洗骨髓腔, 制作成单细胞悬液, 调

表1 第3, 5, 8代骨髓间充质干细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s, \times 10^6$)
Table 1 Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells at passages 3, 5, 8

代数	第3天	第7天	第10天
第3代	5.0 ± 0.4	22.3 ± 0.7	22.3 ± 0.8
第5代	5.1 ± 0.5	21.2 ± 0.6	21.8 ± 0.7
第8代	5.1 ± 0.6	19.8 ± 0.5	21.2 ± 0.6

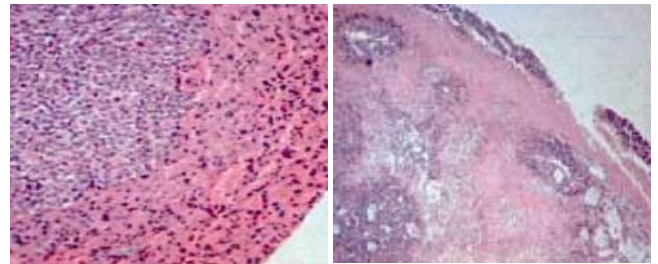


图3 SD大鼠肺组织苏木精-伊红染色结果($\times 100$)

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of Sprague-Dawley rat lung tissues ($\times 100$)

图注: 肺癌组织周围存在明显的纤维结缔组织, 且与周围组织边界清楚, 肿瘤细胞核大; 转移病灶组织出现明显的浸润, 坏死比较明显, 肿瘤细胞核大。

整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 接种于培养皿中, 在 37°C 、体积分数为5% CO_2 培养箱中进行培养。②骨髓间充质干细胞的体外扩增: 原代细胞培养24, 48 h后各换液1次, 去除不贴壁细胞, 连续培养3 d, 观察出现集落样生长的细胞, 加入0.25%胰蛋白酶消化, 倒置显微镜下观察细胞单层收缩突起出现空隙时, 加入完全培养基终止消化, 用吸管吹打瓶壁细胞成细胞悬液, 以1 000 r/min速度离心5 min, 弃上清, 加新的培养液于离心管中, 吹打成单细胞悬液, 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度传代培养, 每3 d换液1次, 贴壁融合80%-90%, 胰酶消化, 并根据1:3比例进行传代^[19-20]。

1.4.2 肺癌细胞株培养 肺癌细胞株购买于中国科学院上海细胞所, 细胞复苏后放置在含体积分数为10%胎牛血清的完全培养液中, 在 37°C 、体积分数为5% CO_2 饱和湿度培养箱培养, 隔天换液1次。

1.4.3 细胞划痕实验 采用Maker笔在6孔板背后均匀划横线, 每隔0.5-1.0 cm间距划一道, 横穿过孔, 在孔中加入 5×10^5 个肺癌细胞, 待细胞贴壁生长后, 采用200 μL 枪头垂直于6孔板背后的横线划痕, 加入骨髓间充质细胞培养液, 放入 37°C 、体积分数为5% CO_2 培养箱培养, 观察0, 24, 48 h后划痕愈合程度^[21-22]。

1.4.4 细胞侵袭实验 将Mateigel放入冰上或4℃过夜,使之成为液体状态。由于室温下基质胶容易凝成固态,使用时需要对24孔板、枪头放置在-20℃进行预冷。使用预冷过的无血清DMEM稀释Mateigel,取60 μL稀释胶加入24孔板的Tranwell小室中孵育1 h。利用胰酶消化法消化肺癌细胞,细胞计数,加入无血清DMEM调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,平铺于每个Tranwell小室内。对照组加入含体积分数为10%胎牛血清的H-DMEM培养基,实验组在含体积分数为10%胎牛血清的H-DMEM培养基中加入骨髓间充质干细胞,培养24 h,固定,染色计数^[21-24]。

1.4.5 细胞迁移实验 将Tranwell小室内放入24孔板内,不进行任何处理。利用胰酶消化法消化肺癌细胞,细胞计数,用无血清DMEM调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,每个Tranwell小室内均匀铺200 μL,其余步骤见侵袭实验^[25-27]。

1.4.6 SD大鼠肺癌模型建立及细胞移植 36只SD大鼠禁食12 h,术前肌肉注射0.5 g阿托品,尾部注射3.6%水合氯醛进行全身麻醉,待麻醉生效后仰卧位固定于实验台上,轻拉舌,压迫舌腹部暴露喉头,于解剖显微镜直视下插入塑料套管针,向大鼠气管内注入100 μL Cpn TW-183菌液(含有 $1 \times 10^9 \text{ IFU/L}$),注入完毕后即将大鼠直立、旋转并轻轻按压胸部,保证菌液分布在肺部两侧,每周1次,持续2个月,建立SD大鼠肺癌模型,造模成功后选取左侧肺接种骨髓间充质干细胞 3×10^6 /只。

骨髓间充质干细胞移植后14 d处死大鼠,解剖肺部组织,用体积分数为10%的中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色^[28-29],观察肺组织病理改变。

1.5 主要观察指标 采用细胞划痕实验、细胞侵袭实验及迁移实验观察骨髓间充质干细胞对肺癌细胞侵袭、迁移、转移能力的影响。

1.6 统计学分析 采用SPSS 18.0处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加体内实验36只SD大鼠,均进入结果分析,中途无脱落。

2.2 骨髓间充质干细胞形态 培养24 h后细胞部分贴壁生长,多数细胞为椭圆形、纺锤形或多角形。传代后细胞为梭形,体积较原代细胞大,细胞呈现均匀分布生长,且细胞排列具备一定的方向性,见图1。

2.3 第3, 5, 8代骨髓间充质干细胞生长曲线 总体生长呈现上升趋势,但是随着骨髓间充质干细胞代数的不断增加其生长能力出现下降,见表1。

2.4 细胞划痕实验结果 划痕后肺癌细胞迁移速率较大,随着时间的不断延长,划痕处愈合。

2.5 细胞侵袭实验结果 对照组每个100倍视野内迁移到下室的平均细胞数为 212.36 ± 28.91 ,显著低于实验组(489.683 ± 33.44)。由此看出:骨髓间充质干细胞作用下能促进肺癌转移,见图2。

2.6 细胞迁移实验结果 培养36 h后检测肺癌细胞穿透Matrigel的能力,结果显示:对照组平均每个视野侵袭到Transwell小室内的细胞数为(10.24 ± 1.88)个,显著低于实验组(69.8 ± 6.04)个。由此看出:在骨髓间充质干细胞的作用下能促进肺癌转移。

2.7 SD大鼠肺组织苏木精-伊红染色 在肺部取原位癌组织以及转移病灶组织进行苏木精-伊红染色,结果显示:肺癌组织周围存在明显的纤维结缔组织,且与周围组织边界清楚,肿瘤细胞核大;转移病灶组织出现明显的浸润,坏死比较明显,肿瘤细胞核大,见图3。

3 讨论 Discussion

原发性肺癌是目前全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,多数患者一旦确诊已经是中晚期,从而错过了最佳手术治疗时机^[30-31]。目前,临床上对于肺癌治疗方法相对较多,如手术、化疗、放疗以及生物治疗等,这些方法虽然能改善患者症状,但是死亡率依旧很高。肺癌转移则是肺癌患者治疗预后不良的主要原因之一,对于该疾病的发病机制尚不完全清楚^[32-33]。因此,研究肺癌的转移机制并采取积极有效的措施进行干预具有重要的意义。

“细胞融合”于19世纪被提出,它是指两个或多个细胞在自然或人工作作用下,通过浆膜的合并成为一个细胞过程,并且该过程中伴或不伴有细胞核膜的合并,它是胚胎发育过程中最为重要的一个生理现象^[34-35]。研究显示,机体在创伤、肿瘤等病理下,融合机制将会被全部激活,促进肿瘤的发生、发展^[36]。众所周知,慢性炎症与肿瘤的发生、发展关系密切,许多慢性炎症最终能演变为恶性肿瘤,部分学者甚至将肿瘤称为“永不愈合的炎症”。肺癌的转移与肿瘤的微环境关系密切。骨髓间充质干细胞在炎症、创伤以及肿瘤等病态作用下定向趋化、迁移^[37-38]。实验成功制备出骨髓间充质干细胞,传代后细胞为梭形,呈漩涡状,且排列具备一定的方向

性,细胞表面 CD90 以及 CD105 为阳性表达,CD45 以及 CD34 为阴性表达。由于骨髓间充质干细胞具备可融合性、高迁移活性以及间质细胞特性,使得骨髓间充质干细胞能与肺癌细胞相互融合,从而促进肺癌的转移^[39]。肺癌转移属于一个多步骤、复杂的过程。在整个过程中涉及肿瘤细胞的局部侵袭、远端转移。在局部侵袭中,肿瘤细胞必须具备水解基底膜、间质结缔组织能力,才能保证细胞穿过细胞外基质进入定植区域^[40]。从细胞侵袭实验以及迁移实验结果均可以看出骨髓间充质干细胞在一定条件下能促进肺癌的转移。

综上所述,采用全骨髓直接贴壁法能获得成熟的骨髓间充质干细胞,其能提高肺癌细胞株的侵袭、迁移以及转移能力。

作者贡献: 实验设计为郑天亮,实验实施为赵松,实验评估为郭海周、崔广晖,资料收集为林大维。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Osaka M, Honmou O, Murakami T, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res.* 2010;1343: 226-235.
- [2] 甄国华,顾乃兵,张珍祥,等. 骨髓间充质干细胞移植对木瓜蛋白酶和^[60Co]照射所致大鼠肺气肿的作用[J]. 中国病理生理杂志,2008,24(8):1529-1533.
- [3] 黄坤,吴晓梅,王欣燕,等. 骨髓间充质干细胞向肺泡细胞转化的实验研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2011,10(6): 572-576.
- [4] Kaplamadzhiev DB, Hisha H, Adachi Y, et al. Bone marrow-derived stromal cells can express neuronal markers by DHA/GPR40 signaling. *Biosci Trends.* 2010; 4(3):119-129.
- [5] Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, et al. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2009;216(1):56-65.
- [6] Erakat MS, Chuang SK, Shanti RM, et al. Interval between injury and lingual nerve repair as a prognostic factor for success using type I collagen conduit. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(5):833-838.
- [7] 周晓光,刘秀香,刘任红,等. 高氧暴露早产大鼠肺泡上皮细胞损伤与细胞外基质变化的动态研究[J]. 中国新生儿科杂志,2008,23(4):215-218.
- [8] 中华医学会重症病学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断与治疗指南(2006)[J]. 中华急诊医学杂志,2007, 16(4):343-349.
- [9] 刘涛,任成山. 炎症介质在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版, 2013, 6(3):265-269.
- [10] 施卉,任成山. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征基础及临床研究进展[J/CD]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2013, 6(4): 350-355.
- [11] Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis.* 2012; 46(3):635-645.
- [12] Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, et al. Topical implantation of mesenchymal stem cells has beneficial effects on healing of experimental colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(2):523-531.
- [13] Sueblinvong V, Weiss DJ. Cell therapy approaches for lung diseases: current status. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(3):268-273.
- [14] Wang L, Seshareddy K, Weiss ML, et al. Effect of initial seeding density on human umbilical cord mesenchymal stromal cells for fibrocartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(5):1009-1017.
- [15] 华静,冯华松,王庆,等. 海水淹溺致大鼠急性肺损伤模型的建立[J]. 现代生物医学进展,2013,13(27):5242-5246.
- [16] 张红霞,王蒙蒙,李惠萍,等. 白藜芦醇对博来霉素诱导小鼠肺损伤的保护作用[J]. 第二军医大学学报,2013,34(12): 1287-1290.
- [17] 张祺嘉钰,王国全,余林中,等. 两种内毒素经支气管给药致急性肺损伤模型再评价研究[J]. 中药药理与临床,2012, 28(5):226-229.
- [18] 杨文,覃山羽,姜海行,等. 骨髓间充质干细胞体外调控肝星状细胞死亡受体5的表达[J]. 中国组织工程研究,2012, 16(27):4947-4952.

- [19] 欧阳石,刘树人,程涛,等.自体骨髓间充质干细胞肝动脉移植治疗失代偿期肝硬化[J].中国组织工程研究,2013,17(36):6455-6461.
- [20] 陈双庆,王培军,李铭华,等.磁标记骨髓间充质干细胞对肝细胞癌的抑制作用[J].临床放射学杂志,2009,28(10):1454-1458.
- [21] 顾劲扬,施晓雷,袁献温,等.骨髓间充质干细胞诱导肝细胞耐受肝功能衰竭血清细胞毒性的研究[J].中华实验外科杂志,2014,31(2):308-311.
- [22] Ohno N, Kajiume T, Sera Y, et al. Short-term culture of umbilical cord blood-derived CD34 cells enhances engraftment into NOD/SCID mice through increased CXCR4 expression. *Stem Cells Dev.* 2009;18(8):1221-1226.
- [23] 易珍,孙水林,刘翠云,等.同种异体骨髓间充质干细胞对急性肝衰竭 HMGB1的影响[J].世界华人消化杂志,2012,20(16):1396-1401.
- [24] Ikeda H, Kume Y, Tejima K, et al. Rho-kinase inhibitor prevents hepatocyte damage in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(4):G911-917.
- [25] 王治洲,徐超,韩亚军,等.骨关节炎患者骨髓间充质干细胞的功能状态与病情进展[J].中国组织工程研究,2015,19(10):1495-1500.
- [26] Murphy JM, Dixon K, Beck S, et al. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(3):704-713.
- [27] Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R, et al. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2009;374(9698):1351-1363.
- [28] 张新红,段蕴铀,芮萌.海水淹溺型急性肺损伤兔血管内皮生长因子及其受体的表达[J].解放军医学杂志,2009,34(7): 819-822.
- [29] Xie C, Xie DY, Lin BL, et al. Interferon- β gene-modified human bone marrow mesenchymal stem cells attenuate hepatocellular carcinoma through inhibiting AKT/FOXO3a pathway. *Br J Cancer.* 2013;109(5):1198-1205.
- [30] 邢玉芝,杨玲麟,林洪,等.D2半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞衰老作用的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2006,20(4):475-479.
- [31] 潘越江,华平,熊利华,等.体外培养鼠骨髓间充质干细胞及其向心肌样细胞诱导分化实验研究[J].广西医学,2008,30(9):1291-1295.
- [32] 张艳红,谢焕松,夏树林,等.杜仲水/醇提取物对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J].中国老年学杂志,2010,11(30):3313-3314.
- [33] 陈伟才,罗军.杜仲叶提取物诱导羊骨髓间充质干细胞成骨及抑制其成脂肪分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(10):1960-1964.
- [34] 黎晖,周健洪,陈东风,等.龟板对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响[J].中药新药与临床药理,2005,16(3):159-161.
- [35] 侯秋科,吴静,易香华,等.龟板提取物上调维生素D受体表达促骨髓间充质干细胞向成骨分化[J].中草药,2010,41(4):607-612.
- [36] 阎丽珠.扶正祛邪汤配合化疗对中晚期非小细胞肺癌患者生存质量及机体免疫功能的影响[J].河北中医,2009,31(12):1836-1837.
- [37] 车曙华,罗超,刘瑛,等.康莱特注射液联合GP方案治疗晚期非小细胞肺癌的临床观察[J].肿瘤药学,2012,2(4):286-289.
- [38] Nguyen TTT, Tran TTH. Cost-Effectiveness Analysis of Bevacizumab in Combination with PC Regimen Versus PC Regimen in Non-Small Cell Lung Cancer Treatment. *Value in Health.* 2014;17(3): A87.
- [39] Hirsh V, Berger A, Binder G, et al. Cost Effectiveness of Nab-Paclitaxel Plus Carboplatin (nab-PC) Relative to Bevacizumab Plus Solvent-Based Paclitaxel and Carboplatin (B+sb-PC) in Elderly Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *International Journal of Radiation Oncology.* 2014;90(5): S61-S62.
- [40] Barlesi F, Scherpereel A, Gorbunova V, et al. Maintenance bevacizumab-pemetrexed after first-line cisplatin-pemetrexed-bevacizumab for advanced nonsquamous nonsmall-cell lung cancer: updated survival analysis of the AVAPERL (MO22089) randomized phase III trial. *Ann Oncol.* 2014;25(5): 1044-1052.