

set of acutely decompensated heart failure patients and adds valuable prognostic information on top of hemoconcentration [J]. *Medicine*; Baltimore, 2016, 95(14): e3307

3 Batycka – Baran A, Flaig M, Molin S, *et al.* Etanercept – induced injection site reactions: potential pathomechanisms and clinical assessment [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2012, 11(6): 911 – 921

4 吴婵媛, 李梦涛, 曾小峰. 肿瘤坏死因子 α 抑制剂的免疫原性 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2009, 3(3): 210 – 215

5 王国华. 类风湿关节炎免疫发病机制研究进展 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(3): 309 – 311

6 姜宝法, 张源潮, 徐晓菲, 等. 山东沿海地区常见风湿病流行病学调查 [J]. *山东医科大学学报*, 2001, 39(3): 210 – 211

7 路晓燕, 李春, 赵金霞, 等. 2011年 ACR/EULAR 类风湿关节炎缓解标准与其他常用标准的比较 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2013, 45(2): 260 – 263

8 Taylor P, Gartemann J, Hsieh J, *et al.* A systematic review of serum biomarkers anti – cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor as tests for rheumatoid arthritis [J]. *Autoimmune Dis*, 2011, 2011: 815038

9 Kim JY, Cho SK, Han M, *et al.* The role of bone scintigraphy in the diagnosis of rheumatoid arthritis according to the 2010 ACR/EULAR Classification Criteria [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(2): 204 – 209

10 Fornal M, Wizner B, Cwynar M, *et al.* Association of red blood cell distribution width, inflammation markers and morphological as well as

rheological erythrocyte parameters with target organ damage in hypertension [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014, 56(4): 325 – 335

11 Lippi G, Sanchis – Gomar F, Danese E, *et al.* Association of red blood cell distribution width with plasma lipids in a general population of unselected outpatients [J]. *Kardiol Pol*, 2013, 71(9): 931 – 936

12 Zhang M, Zhang Y, Li C, *et al.* Association between red blood cell distribution and renal function in patients with untreated type 2 diabetes mellitus [J]. *Ren Fail*, 2015, 37(4): 659 – 663

13 Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group [J]. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 1968, 405: 5 – 37

14 Fraenkel PG. Understanding anemia of chronic disease [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015, 2015(1): 14 – 18

15 Liu Q, Dang AM, Chen BW, *et al.* The association of red blood cell distribution width with anemia and inflammation in patients with Takayasu arteritis [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 438: 205 – 209

16 Serdaroğlu M, Çakırbay H, Değer O, *et al.* The association of anti – CCP antibodies with disease activity in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 28(10): 965 – 970

17 Demircan F, Gözel N, Kiling F, *et al.* The impact of red blood cell distribution width and neutrophil/lymphocyte ratio on the diagnosis of major depressive disorder [J]. *Neurol Ther*, 2016, 5(1): 27 – 33

(收稿日期: 2017 – 08 – 12)

(修回日期: 2017 – 10 – 28)

D – 半乳糖诱导间充质干细胞衰老的研究

杨孟恺 易诚青

摘要 **目的** 利用 D – 半乳糖诱导建立间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 体外衰老模型, 并探讨其潜在机制。**方法** 以正常培养的 MSCs 做对照组, 以分别用 1、10、100g/L D – 半乳糖诱导的 MSCs 作为处理组, 培养 48h 后, 采用免疫蛋白印迹法 (Western blot) 检测细胞内 AKT 与 mTOR 蛋白磷酸化水平以及衰老相关蛋白 p16^{Ink4a} 的变化。同时使用 β – 半乳糖苷酶试剂盒检测 MSCs 中 β – 半乳糖苷酶 (SA – β – gal) 表达量的变化。最后用 AKT 抑制剂预处理 D – 半乳糖诱导组以明确 AKT/mTOR 信号通路在 MSCs 衰老中的作用。**结果** 与对照组相比, 10g/L D – 半乳糖作用 48h 后 MSCs 中 β – 半乳糖苷酶表达和衰老相关蛋白 p16^{Ink4a} 含量明显增加, 同时 p – AKT 与 p – mTOR 含量也较对照组增加, 加入 AKT 抑制剂后, 衰老组 β – 半乳糖苷酶表达和衰老相关蛋白 p16^{Ink4a} 含量皆有所下降。**结论** D – 半乳糖能成功诱导构建 MSCs 体外衰老模型, AKT/mTOR 信号通路参与了这一过程。

关键词 D – 半乳糖 信号通路 间充质干细胞 衰老

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.07.008

Study on D – galactose – induced Senescence of Mesenchymal Stem Cells. Yang Mengkai, Yi Chengqing. Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Abstract Objective To establish the aging model of mesenchymal stem cells (MSCs) induced by D – galactose (D – gal) and in-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81371979)

作者单位: 200080 上海交通大学附属第一人民医院骨科

通讯作者: 易诚青, 电子信箱: ycq3000@sjtu.edu.cn

investigate its underlying mechanism. **Methods** The MSCs were divided into control group and D-gal treatment group. Control group was normal cultured MSCs. D-gal treatment group was the control group treated with different concentrations of D-gal (1, 10, 100g/L). All of them were treated for 48h. The expression of p16^{Ink4a} protein, p-AKT, and p-mTOR were detected by Western blot. At the same time, the SA-β-galactose (SA-β-gal) staining was used to examine the senescence-associated changes. At last, AKT inhibitor was added in the D-gal treatment group to clarify the role of AKT/mTOR signaling pathway in MSCs aging. **Results** Compared with the control group, the quantity of SA-β-gal positive cells and the expression of p16^{Ink4a} in MSCs were significantly increased in 10g/L D-gal treatment group. Meanwhile the expression of p-AKT and p-mTOR also increased compared with the control group. After adding in AKT inhibitor, the quantity of SA-β-gal positive cells in D-gal treatment group and the expression of p16^{Ink4a} were decreased, too. **Conclusion** D-gal can successfully establish the aging MSCs model in vitro and AKT/mTOR signaling pathway is involved in this process.

Key words D-galactose; Signaling pathway; Mesenchymal stem cells; Senescence

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 由于具备易获取性, 低免疫原性以及自我更新和多向分化的能力, 所以被广泛应用于组织工程和再生医学领域。迄今为止, 人们已经从骨髓、脐带血、滑膜、胎盘等组织中成功培养出了 MSCs^[1]。并且 MSCs 能分化成多种细胞系, 如骨、软骨、脂肪等^[2]。但是有研究者发现, MSCs 的功能会随着年龄增长而下降^[3]。比如骨髓间充质干细胞的数量会随着年龄增加而减少, 同时出现成骨分化能力减弱, 细胞增殖抑制的现象^[4]。正是干细胞的衰老造成这一现象, 影响了 MSCs 的治疗效果, 限制了其在临床上的广泛应用。目前, MSCs 衰老的机制还未研究清楚, 仍没有很好的办法延缓 MSCs 衰老。细胞端粒酶的减少, 细胞微环境中过量的活性氧累积, 甚至细胞内信号通路的改变都会造成 MSCs 衰老^[5-8], 所以细胞衰老是个复杂的过程。故能建立合适的 MSCs 体外衰老模型, 对研究 MSCs 衰老发生的机制以及治疗因 MSCs 衰老引起的临床疾病都有重要意义。

D-半乳糖是一种还原性乙醛糖, 因为具有价格实惠, 方便易行等优点, 已经被广泛应用于诱导各种动物衰老模型的建立, 普遍认为它能够通过诱导动物体内糖代谢紊乱, 增强体内细胞氧化应激水平, 导致细胞损伤难以自我修复, 最终成功建立衰老模型^[9,10]。但是, D-半乳糖在 MSCs 中的应用还比较少, 尤其是在 MSCs 的体外衰老模型中, 并且其诱导 MSCs 衰老的具体作用机制尚不明确。所以本实验主要探讨 D-半乳糖如何诱导建立 MSCs 体外衰老模型, 以及明确其潜在的作用机制。

材料与方 法

1. 主要材料和试剂: α-MEM 培养基、PBS 购自美国 Hyclone 公司; 澳洲胎牛血清、PS (青霉素 + 链霉素)、胰蛋白酶-EDTA 购自美国 Gibco 公司; D-半

乳糖购自美国 Sigma 公司; p16^{Ink4a} 抗体, GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司; AKT 抑制剂, mTOR 抑制剂购自美国 MCE 公司; Western 蛋白裂解液、Western 封闭液、SDS-PAGE 电泳液、Western 转膜液、Western 一抗稀释液、Western 二抗稀释液、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、衰老染色试剂盒、CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

2. 细胞培养: 将骨髓 MSCs 接种于 175cm² 培养瓶中 (89% α-MEM 培养基, 10% 胎牛血清, 1% 双抗), 并置于 37℃、含体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 隔 3 天换 1 次液。细胞密度约 90% 时用 0.25% 胰蛋白酶消化, 并重悬于 6cm 培养皿里开始试验。

3. D-半乳糖处理、AKT 抑制剂处理、mTOR 抑制剂处理: D-半乳糖处理: 为排除复制性衰老的影响, 当细胞密度达到 60% 时即分别加入 1、10、100g/L D-半乳糖 (在培养基中稀释), 共孵育 48h。确定 10g/L D-半乳糖为实验浓度后, 再分别孵育 0、6、12、24、48h, 提取蛋白液, 以进一步明确 D-半乳糖的作用。AKT 抑制剂处理: 使用终浓度 5μmol/L 的 MK-2206 预处理细胞 2h, 再加入终浓度 10g/L D-半乳糖共孵育 48h, 以明确 AKT 抑制剂的作用。mTOR 抑制剂处理: 使用终浓度 50nmol/L 的雷帕霉素预处理细胞 2h, 再加入终浓度 10g/L D-半乳糖共孵育 48h, 以明确 AKT 抑制剂的作用。

4. CCK-8 试剂盒检测抑制剂对细胞增殖的影响: 在 96 孔板中加入 100μl 细胞悬液, 提前处理 24h, 然后分别加入 5μmol/L 的 AKT 抑制剂与 50nmol/L 的 mTOR 抑制剂作用 12、24、48h, 到达预定时间后每孔加入 10μl 配置好的 CCK-8 溶液, 作用 1.5h 后在酶标仪下测定吸光度。

5. β -半乳糖苷酶染色: β -半乳糖苷酶染色法是一种对衰老细胞染色测的方法,主要是染细胞中的衰老相关- β -半乳糖苷酶。最后在普通光学显微镜下即可检测到细胞衰老情况。待细胞用药物处理完成后,清除细胞培养液,PBS洗一遍,加入1ml固定液,室温下固定15min。清除细胞固定液,PBS洗3遍。每组加入1ml工作液后置入37℃温箱孵育过夜。12h后去除染色液,PBS再洗3遍后,将6孔板倒置显微镜下拍照。随机选取6个视野,统计衰老细胞的比例。

6. Western blot法检测细胞中的蛋白变化:将培养皿置于冰上,吸出培养基,PBS洗1遍,加入蛋白裂解液后提取各处理组细胞总蛋白,使用BCA试剂盒测定蛋白浓度,将蛋白进行电泳、转膜,牛奶封闭1h,置于一抗中4℃过夜,最后室温下二抗孵育2h,利用ECL发光试剂显影成像。以GAPDH为内参半定量衰老相关蛋白p16的变化,以及AKT/mTOR通路蛋白的变化。

7. 统计学方法:采用GraphPad prism 5绘制柱状图,采用SPSS 21.0统计学软件对数据进行统计分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间数据差异比较,多组间采用LSD法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. D-半乳糖诱导MSCs衰老:首先分别加入1、10、100g/L的D-半乳糖与MSCs共孵育48h,48h后在显微镜下发现100g/L D半乳糖组MSCs出现不少凋亡细胞,10g/L组MSCs形态出现宽厚肥大的衰老变化,1g/L组和对照组相比细胞形态变化不明显。与先前的研究相符合^[11]。遂选择10g/L浓度的D-半乳糖进行后续实验。已有研究证明p16^{INK4a}蛋白含量增加意味着细胞增殖抑制,因此p16可以用作细胞衰老的标志物^[12]。用蛋白裂解液分别提取对照组,1g/L D-半乳糖组,10g/L D-半乳糖组,100g/L各组细胞的蛋白,检测每组蛋白的p16^{INK4a}蛋白表达情况,发现10g/L D和100g/L半乳糖组p16含量较对照组明显增多(图1),差异有统计学意义($P < 0.05$)。D-半乳糖诱导MSCs衰老具有浓度依赖性,接着选择浓度为10g/L D-半乳糖分别处理MSCs 6、12、24、48h后提取蛋白,利用Western blot法分析发现p16的含量表达随D-半乳糖作用时间增加而增加,具有时间依赖性(图2),差异有统计学意义($P < 0.05$)。

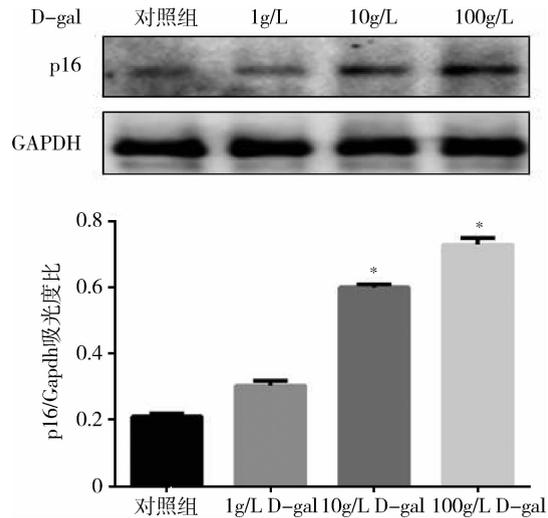


图1 不同浓度D-半乳糖处理下p16蛋白表达与对照组比较,* $P < 0.05$

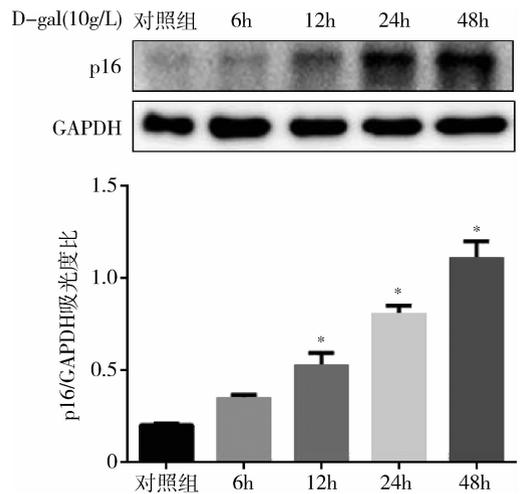


图2 D-半乳糖作用不同时间后p16蛋白表达与对照组比较,* $P < 0.05$

2. D-半乳糖诱导下AKT/mTOR通路蛋白的变化:随着D-半乳糖作用浓度的增加,Western blot法分析发现p-AKT与p-mTOR蛋白表达逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),AKT/mTOR通路激活(图3)。而随着10g/L D-半乳糖分别处理6、12、24、48h,p-AKT与p-mTOR蛋白表达随着时间延长也在不断增加,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。D-半乳糖对AKT/mTOR通路的影响既具有浓度依赖性,也具有时间依赖性。

3. AKT抑制剂及mTOR抑制剂延缓D-半乳糖诱导的MSCs衰老:首先利用CCK-8验证了本次实验工作浓度的抑制剂对细胞增殖无明显影响(图5),然后先验证AKT抑制剂对MSCs衰老的影响,将细胞

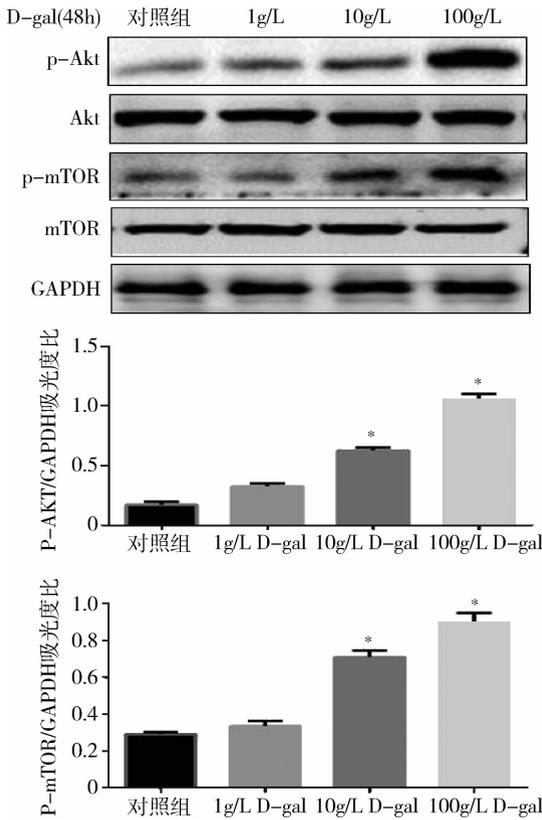


图3 不同浓度D-半乳糖处理下p-AKT与p-mTOR蛋白表达与对照组比较, * P < 0.05

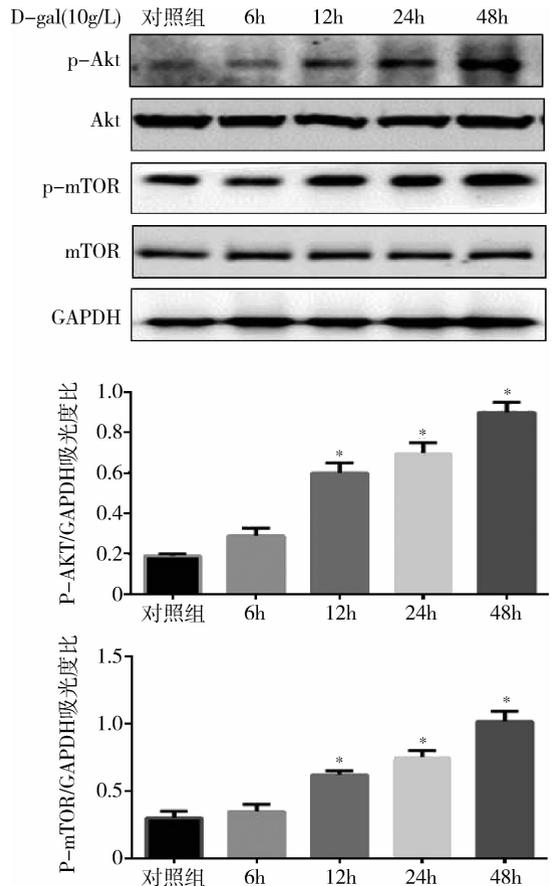


图4 D-半乳糖作用不同时间p-AKT与p-mTOR蛋白表达与对照组比较, * P < 0.05

分为3组,第1组正常MSCs组,第2组D-半乳糖组,第3组AKT抑制剂+D-半乳糖组,发现D-半乳糖组的衰老相关蛋白p16^{Ink4a}表达量较对照组明显增加,而经AKT抑制剂预处理后的第3组p16^{Ink4a}表达量较第2组下降(图6),差异有统计学意义(P < 0.05)。笔者利用β-半乳糖苷酶染色试剂盒对处理后的3组细胞进行检测,结果发现D-半乳糖组β-半乳糖苷酶染色后衰老细胞明显较对照组增多,而在AKT抑制剂的干预下衰老细胞数量下降(图7),差异有统计学意义(P < 0.05)。接着验证mTOR抑制剂对MSCs衰老的影响,将细胞分为3组,第1组正常MSCs组,第2组D-半乳糖组,第3组mTOR抑制剂+D-半乳糖组,发现所得结果与AKT抑制剂一致(图8、图9),进一步证明D-半乳糖能通过AKT/mTOR通路诱导MSCs衰老。

讨 论

目前, MSCs 因为其具有多向分化能力, 归巢性, 免疫调节作用等优点被大量用于组织工程和再生医学中。但是, 干细胞容易出现衰老现象, 影响它在临

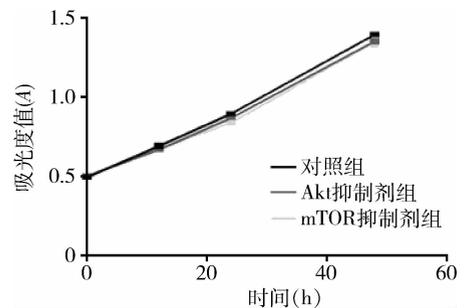


图5 抑制剂对细胞增殖无明显影响

床上的进一步应用。因此,为了解决MSCs衰老问题,需要弄清楚影响MSCs衰老的主要因素以及其中涉及的具体机制。然而老年MSCs提取不方便,而且数量不多且增殖能力较弱,体外稳定培养难度很大,影响MSCs衰老的研究进展^[13]。所以,构建稳定的MSCs体外衰老模型对研究MSCs衰老有重大意义。

邢玉芝等^[14]首次利用D-半乳糖构建MSCs体外衰老模型,但D-半乳糖对细胞衰老相关蛋白的表

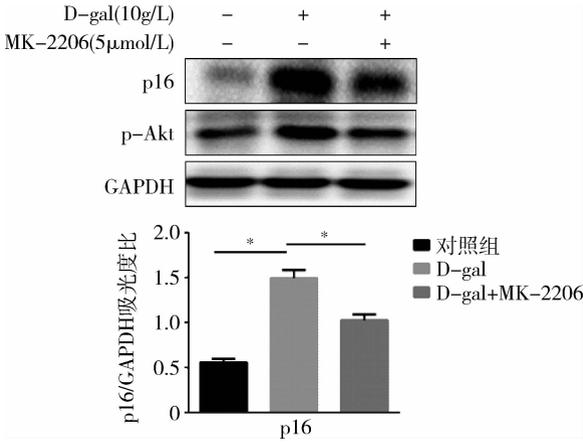


图 6 AKT 抑制剂减少 D - 半乳糖诱导的 p16 蛋白的表达
*P < 0.05

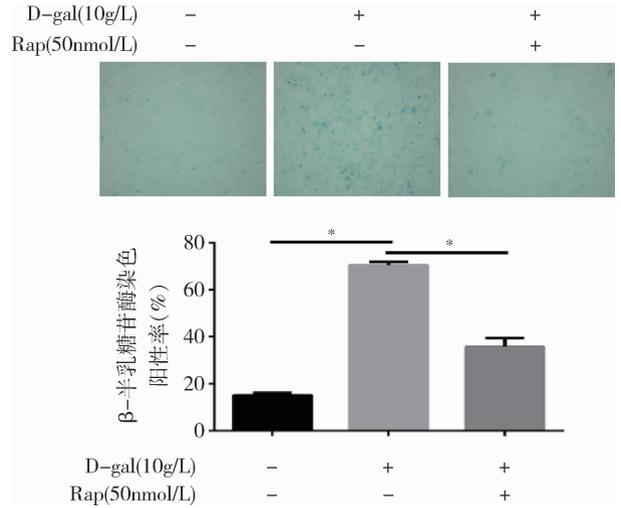


图 9 mTOR 抑制剂减少 D - 半乳糖诱导的衰老细胞数量
*P < 0.05

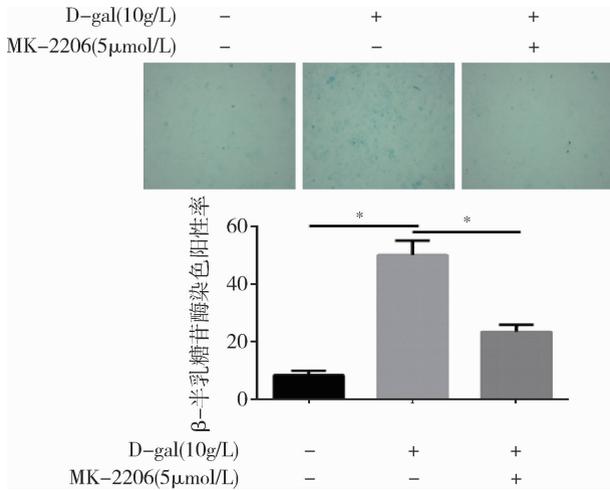


图 7 AKT 抑制剂减少 D - 半乳糖诱导的衰老细胞数量
*P < 0.05

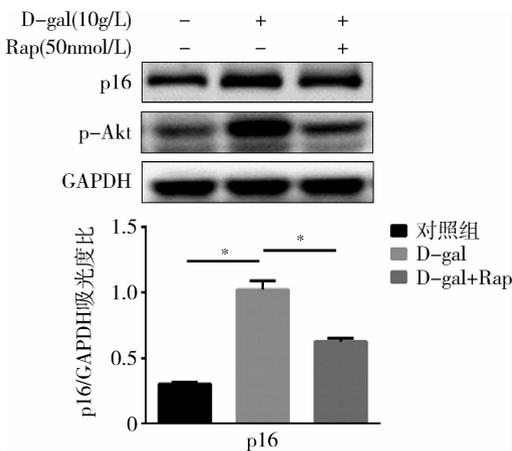


图 8 mTOR 抑制剂减少 D - 半乳糖诱导的 p16 蛋白的表达
*P < 0.05

达以及 D - 半乳糖的作用机制并不明确,而颜冰希等^[11]明确了 D - 半乳糖对 MSCs 衰老相关蛋白的表达及其存活能力的影响,并且进一步指出促进细胞内氧化应激水平升高可能是 D - 半乳糖诱导细胞衰老的作用机制。但是,D - 半乳糖除了促进氧化应激水平升高引起细胞衰老外,是否还影响某些信号通路呢,对这一问题的深入研究有助于理解 D - 半乳糖究竟是如何诱导 MSCs 衰老的。不少研究发现 AKT/mTOR 信号通路与细胞衰老有关,Maiese 等^[15]发现细胞内过量 ROS 的累积会激活 AKT/mTOR 信号通路,进而导致细胞衰老损伤。Dong 等^[16]发现 mTOR 磷酸化可以导致下游衰老相关蛋白 p16 表达增高。因此,本实验主要是想研究 D - 半乳糖诱导 MSCs 体外衰老模型是否与 AKT/mTOR 信号通路有关,从而进一步完善 D - 半乳糖构建 MSCs 体外衰老模型的理论基础,为后续研究干细胞衰老及其原理提供更有价值的实验数据。

以往研究发现,接触性抑制以及过度增殖皆可导致细胞发生复制性衰老^[17,18]。为排除这些因素干扰,当细胞生长密度达 60% 时,即加入 D - 半乳糖处理细胞。然后检测不同浓度 D - 半乳糖处理 MSCs 48h 后衰老相关蛋白含量变化,确定 D - 半乳糖致衰老作用的浓度依赖性。之后选择 10g/L D - 半乳糖分别处理 MSCs 6、12、24、48h,发现衰老相关蛋白含量逐渐增加,证明 D - 半乳糖的致衰老作用也具有时间依赖性,进一步明确了 D - 半乳糖能够诱导 MSCs 衰老,与先前的实验结果吻合^[11]。而本实验的主要目的是想验证 AKT/mTOR 通路是否参与 D - 半乳糖

的致衰老过程,所以在检测衰老相关蛋白的同时也利用 Western blot 法检测细胞内 p - AKT 和 p - mTOR 蛋白含量变化,发现随着 D - 半乳糖浓度和作用时间增加,p - AKT 和 p - mTOR 含量变化趋势与衰老相关蛋白 p16^{Ink4a}一致,均较对照组增加,初步表明 D - 半乳糖激活了 MSCs 中的 AKT/mTOR 信号通路。为了确定 AKT/mTOR 通路在 D - 半乳糖诱导的 MSCs 衰老之间的关系,笔者想到在细胞中加入 MK - 2206 (一种 AKT 抑制剂)抑制 AKT/mTOR 信号通路,观察抑制 AKT/mTOR 通路后能否延缓 D - 半乳糖的致衰老作用。结果发现,加入 MK - 2206 处理后,原先的衰老相关蛋白 p16^{Ink4a}表达下降且 β - 半乳糖苷酶染色阳性率也出现一定程度下降,证明 AKT 抑制剂能够有效地延缓 D - 半乳糖的致衰老作用,进而说明 AKT/mTOR 信号通路参与了 D - 半乳糖诱导的 MSCs 体外衰老模型的建立。

综上所述,笔者的实验证明了 D - 半乳糖能够诱导 MSCs 衰老,并揭示了 AKT/mTOR 信号通路可能是 D - 半乳糖诱导 MSCs 衰老的机制,完善了利用 D - 半乳糖构建 MSCs 体外衰老模型的理论基础,为深入研究 MSCs 衰老提供了实验依据。

参考文献

- 1 Paniushin OV, Domaratskaia EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential [J]. Biol Bull, 2006, 33(1):6
- 2 Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow [J]. J Cell Biochem, 2006, 97(4):744
- 3 Huang C, Zhang GF, Han J, et al. Mechanism of age - related changes of bone marrow mesenchymal stem cells in senile osteoporosis [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2016, 30(2):565 - 569
- 4 Li C, Wei G, Gu Q, et al. Donor age and cell passage affect osteogenic ability of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 72(2):543 - 549
- 5 Fick LJ, Fick GH, Li Z, et al. Telomere length correlates with life

- span of dog breeds [J]. Cell Rep, 2012, 2(6):1530 - 1536
- 6 Feng C, Zhang Y, Yang M, et al. Oxygen - sensing Nox4 generates genotoxic ROS to induce premature senescence of nucleus pulposus cells through MAPK and NF - κB pathways [J]. Oxidat Med Cell Longevity, 2017, 2017(1):7426458
- 7 Garcíavelázquez L, Arias C. The emerging role of Wnt signaling dysregulation in the understanding and modification of age - associated diseases [J]. Age Res Rev, 2017, 37:135 - 145
- 8 Lehmann M, Baarsma H A, K? nigshoff M. WNT signaling in lung aging and disease [J]. Ann Am Thora Soc, 2016, 13 (Supplement 5):S411
- 9 Li D. Advanced glycation in D - galactose induced mouse aging model. [J]. Mechanism Age De, 1999, 108(3):239
- 10 Hadzipetrushev N, Stojkovski V, Mitrov D, et al. D - galactose induced changes in enzymatic antioxidant status in rats of different ages [J]. Physiol Res, 2015, 64(1):61
- 11 颜冰希, 余姗姗, 冯晓, 等. D - 半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞衰老的影响 [J]. 浙江大学学报:医学版, 2013, 42(6):625 - 631
- 12 Collins CJ, Sedivy JM. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence [J]. Aging Cell, 2003, 2(3):145
- 13 Zhao Y, Jia Z, Huang S, et al. Age - related changes in nucleus pulposus mesenchymal stem cells: an in vitro study in rats [J]. Stem Cells International, 2017, 2017(5411):6761572
- 14 邢玉芝, 杨玲麟, 林洪, 等. D - 半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞拟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
- 15 Maiese K, Chong ZZ, Wang S, et al. Oxidant stress and signal transduction in the nervous system with the PI₃ - K, Akt, and mTOR cascade [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11):13830
- 16 Dong D, Cai GY, Ning YC, et al. Alleviation of senescence and epithelial - mesenchymal transition in aging kidney by short - term caloric restriction and caloric restriction mimetics via modulation of AMPK/mTOR signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(10):16109 - 16121
- 17 Ho JH, Chen YF, Ma WH, et al. Cell contact accelerates replicative senescence of human mesenchymal stem cells independent of telomere shortening and p53 activation: roles of Ras and oxidative stress [J]. Cell Transplant, 2011, 20(8):1209
- 18 Baker BM, Nathan AS, Gee AO, et al. The influence of an aligned nanofibrous topography on human mesenchymal stem cell fibrochondrogenesis [J]. Biomaterials, 2010, 31(24):6190

(收稿日期:2018 - 01 - 26)

(修回日期:2018 - 03 - 16)

(上接第 12 页)

- 8 Benzonana LL, Perry NJ, Watts HR, et al. Isoflurane, a commonly used volatile anesthetic, enhances renal cancer growth and malignant potential via the hypoxia - inducible factor cellular signaling pathway in vitro [J]. Anesthesiology, 2013, 119(3):593 - 605
- 9 Zhu M, Li M, Zhou Y, et al. Isoflurane enhances the malignant potential of glioblastoma stem cells by promoting their viability, mobility in vitro and migratory capacity in vivo [J]. Br J Anaesth, 2016, 116(6):870 - 877
- 10 Jun R, Gui - he Z, Xing - xing S, et al. Isoflurane enhances malignancy of head and neck squamous cell carcinoma cell lines: a preliminary study in vitro [J]. Oral Oncol, 2011, 47(5):329 - 333
- 11 Kawaraguchi Y, Horikawa YT, Murphy AN, et al. Volatile anesthetics protect cancer cells against tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand - induced apoptosis via caveolins [J]. An-

esthesiology, 2011, 115(3):499 - 508

- 12 Brokaw J, Katsaros D, Wiley A, et al. IGF - I in epithelial ovarian cancer and its role in disease progression [J]. Growth Factors, 2007, 25(5):346 - 354
- 13 Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases [J]. J Biochem, 2013, 153(1):13 - 19
- 14 Yang G, Rosen DG, Liu G, et al. CXCR2 promotes ovarian cancer growth through dysregulated cell cycle, diminished apoptosis, and enhanced angiogenesis [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(15):3875 - 3886
- 15 Liang H, Yang CX, Zhang B, et al. Sevoflurane attenuates platelets activation of patients undergoing lung cancer surgery and suppresses platelets - induced invasion of lung cancer cells [J]. J Clin Anesth, 2016, 35:304 - 312

(收稿日期:2017 - 10 - 18)

(修回日期:2017 - 10 - 20)