

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

姚昔友 朱静* 田杰 谭彬 黎鑫

(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, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨了骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)在C6脑胶质瘤细胞模拟的肿瘤微环境中恶性转化的规避方法, 为BMSCs的安全应用提供参考依据。实验分为三组: BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养未处理组、间接共培养+DMSO处理组和间接共培养+TPCA1(3-thiophenecarboxamide,2-[(aminocarbonyl) amino]-5-(4-fluorophenyl) 1)处理组。显微镜下观察各组细胞的形态变化; Transwell实验检测各组细胞的迁移和侵袭能力; Real-time PCR检测各组细胞*STAT3*(signal transducers and activators of transcription 3)、*NF-κB*(nuclear factor-κB)/*p56*和*C-myc* mRNA水平; Western blot和免疫荧光检测各组细胞P-STAT3、NF-κB/p56和C-myc蛋白质水平。结果表明, 实验组中间接共培养+TPCA1处理组细胞的规整性明显比间接共培养未处理组好; 间接共培养+TPCA1处理组细胞迁移和侵袭能力明显低于未处理组; 间接共培养+TPCA1处理组细胞*STAT3*、NF-κB/p56和C-myc mRNA和蛋白质水平明显低于未处理组($P<0.05$)。该研究结果表明, TPCA1能改变处于C6脑胶质瘤细胞模拟的肿瘤微环境中的BMSCs的生物学特性。

关键词 骨髓间充质干细胞; C6脑胶质瘤细胞; 恶性转化; 生物学特性

The Study on the Changes of Biological Characteristics of BMSCs in the Tumor Microenvironment Simulated by C6 Glioma Treated by TPCA1

Yao Xiyu, Zhu Jing*, Tian Jie, Tan Bin, Li Xin

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

Abstract This study investigated the way of avoiding BMSCs (bone mesenchymal stem cells) being malignant transformation in the tumor microenvironment simulated by C6 glioma to offer the reference for safety application. Experiment group was divided into three groups, the BMSCs was co-cultured indirectly with C6 glioma, treated by DMSO and TPCA1 (3-thiophenecarboxamide,2-[(aminocarbonyl) amino]-5-(4-fluorophenyl) 1), respectively. The changes of the cell morphology of each group were observed under microscope. The ability of migration and invasion was tested by Transwell. The mRNA levels of *STAT3* (signal transducers and activators of transcription 3), *NF-κB* (nuclear factor-κB)/*p56* and *C-myc* were tested by Real-time PCR. The protein levels of P-STAT3, NF-κB/p56 and C-myc were measured by Western blot and immunofluorescence. The results shown that the cells treated by TPCA1 were more regular morphologically than untreated cells in experiment group. The

收稿日期: 2016-12-31 接受日期: 2017-05-04

国家自然科学基金(批准号: 81370267)和重庆市渝中区自然科学基金(批准号: 20130119)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63630445, Email: jingzhu@cqmu.edu.cn

Received: December 31, 2016 Accepted: May 4, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81370267) and the Natural Science Foundation of Yuzhong District of Chongqing (Grant No.20130119)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63630445, Email: jingzhu@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2017-05-27 15:50:31 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170527.1550.008.html>

ability of migration and invasion of the cells treated by TPCA1 group were lower than untreated group significantly. The mRNA and protein levels of STAT3, NF- κ B and C-myc of the cells treated by TPCA1 were lower than untreated group significantly ($P < 0.05$). The results confirmed that TPCA1 played a role in changing the biological characteristics of BMSCs in the tumor microenvironment simulated by C6 glioma.

Keywords BMSCs; C6 glioma cells; malignant transformation; biological characteristics

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)不仅具有自我更新和快速增殖能力,而且能向肿瘤靶向迁移,可用其携带各种治疗肿瘤的药物靶向治疗肿瘤。最近的研究表明, MSCs可以刺激机体免疫细胞,调动机体免疫力,联合药物杀伤肿瘤细胞^[1]。MSCs已经在许多恶性肿瘤(如神经母细胞瘤、乳腺癌、白血病等)中开展了临床研究与运用,但其安全性有待评估^[2]。国内外研究表明, MSCs在体内外长期培养具有恶性转化的风险^[3]。前期实验证实,大鼠BMSCs在C6脑胶质瘤细胞微环境中存在NF- κ B(nuclear factor- κ B)、STAT3(signal transducers and activators of transcription 3)信号通路的过度激活,其下游各种靶基因(如C-myc)表达也明显升高,将共培养后的细胞注入裸鼠体内发现明显成瘤^[4-5]。将大鼠BMSCs与C6脑胶质瘤间接共培养后,其与星形胶质细胞有关的GFAP(glial fibrillary acidic protein)、PTEN(phosphatase and tension homology deleted on chromosometen)基因表达明显上调,其与细胞周期有关的CyclinD1基因、与细胞凋亡有关的Bcl-x1基因表达明显上调^[6]。本研究针对BMSCs在肿瘤微环境中存在的瘤化风险寻找一种合适的规避途径,为BMSCs的安全应用提供参考。本研究证实,TPCA1(3-thiophenecarboxamide, 2-[(aminocarbonyl 1) amino]-5-(4-fluorophenyl) 1)作为一种新兴的抗癌药物,能抑制NF- κ B的高表达和STAT3信号通路的过度激活,进而改变肿瘤微环境中BMSCs的生物学特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)由重庆医科大学动物实验中心购买的SD大鼠进行原代细胞提取,经多次换液传代纯化而得。C6脑胶质瘤细胞系由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肿瘤研究室惠赠。

1.1.2 主要试剂 TPCA1购自MedChem Eexpress公

司。DMEM/F12培养基和胎牛血清购自Gibco公司。胰蛋白酶购自Sigma公司。RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。逆转录试剂盒购自TaKaRa公司。全蛋白提取试剂盒和ECL化学发光试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。引物购自生工生物工程(上海)有限公司。抗体P-STAT3、NF- κ B/p56、I κ B(nuclear factor- κ B inhibitor alpha)、C-myc购自Abcam公司。Transwell小室购自Corning公司。

1.2 分组

将实验分为三组:阳性对照组(C6脑胶质瘤细胞单独培养组)、空白对照组(BMSCs单独培养组)和实验组(BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养组)。实验组又分为三个亚组,分别为:间接共培养未处理组、间接共培养+DMSO处理组和间接共培养+TPCA1处理组。

1.3 方法

1.3.1 大鼠骨髓间充质干细胞原代细胞提取 用酒精浸泡SD大鼠双下肢进行消毒灭菌,去皮后取下肢股骨与胫骨进行钝性分离肌肉组织,用DMEM/F12培养基冲洗骨髓腔,将冲洗液以1 000 r/min离心10 min后重悬,48 h后首次换液,72 h后第二次换液,当细胞汇合度为80%时传代。

1.3.2 BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养 C6脑胶质瘤细胞的培养液经0.45 μ m滤器过滤后与含有10%胎牛血清的完全培养基按1:1配比后培养BMSCs,每天均需换液,按时传代,共培养7 d。

1.3.3 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志 将消化下来的BMSCs用PBS清洗两遍,孵育相应抗体用流式细胞仪检测。

1.3.4 细胞形态观察 用倒置相差显微镜观察各组细胞生长状态与形态变化。

1.3.5 Transwell检测细胞的迁移能力 饥饿处理细胞12 h, Transwell上室加入200 μ L浓度为 1×10^5 /mL的无血清细胞悬液,下室加入500 μ L含20% FBS的

培养基, 培养24 h后轻轻擦去上室细胞, 甲醇固定, 结晶紫染色, PBS清洗, 显微镜下观察计数。

1.3.6 Transwell检测细胞的侵袭能力 基质胶与无血清培养基按1:8稀释制成混合液, Transwell上室加入50 μL 混合液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱进行基质包被。然后在上室加入200 μL 浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的无血清细胞悬液, 下室加入500 μL 含20% FBS的培养基, 培养24 h后轻轻擦去上室细胞, 甲醇固定, 结晶紫染色, 显微镜下观察计数。

1.3.7 Real-time PCR检测各组细胞STAT3、NF- κB /p56、C-myc mRNA水平 参照RNA提取试剂盒提取细胞RNA, 然后逆转录为cDNA, 采用Real-time PCR仪检测相关基因表达。目的基因的引物序列见表1, 选 β -actin为内参, 结果以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

1.3.8 Western blot检测P-STAT3、NF- κB /p56、I κB 、C-myc蛋白质水平 采用全蛋白质提取试剂盒提取蛋白质, 采用不连续凝胶电泳后湿转法转膜, 用牛奶封闭后加一抗(P-STAT3 1:2 000、NF- κB /p56 1:1 000、I κB 1:2 000、C-myc 1:1 500、 β -actin 1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 加二抗(HRP标记山羊抗兔IgG 1:3 000、HRP标记山羊抗鼠IgG 1:6 000), ECL系统化学发光显色。

1.3.9 免疫荧光检测P-STAT3、NF- κB /p56、I κB 、C-myc蛋白质水平 细胞铺板后融合度为60%时采用多聚甲醛固定, 经0.5% Triton-X作用后用牛血清蛋白BSA封闭, 加一抗孵育过夜, 复温30 min后去一抗加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光后孵育1 h, DAPI染色后封片, 荧光显微镜观察并拍照。

1.4 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, $P < 0.05$ 为差异具显著统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态学变化

细胞培养与处理7 d后, 空白对照组BMSCs贴壁生长, 贴壁性好, 长梭形, 排列规整, 集落旋涡状排列, 折光性不好。BMSCs经共培养后细胞形态产生变化, 细胞生长杂乱, 排列紊乱, 如图1箭头所示。DMSO处理的BMSCs经共培养后细胞形态与非处理共培养组相比无明显差异。TPCA1处理的BMSCs经共培养后细胞形态与空白对照组无差异(图1)。

2.2 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志物

提取的BMSCs经传代换液不断纯化, 分离纯化后的BMSCs CD90的表达率占99.8%, CD29的表达率占92.5%, CD34和CD45均不表达(图2)。

2.3 Transwell检测细胞的迁移能力

间接共培养7 d后, 共培养组BMSCs细胞穿膜数为 370.667 ± 8.083 , 共培养+TPCA1处理组BMSCs细胞穿膜数为 108.667 ± 12.220 , 经过TPCA1处理的细胞迁移能力明显低于未经处理的细胞(图3)。

2.4 Transwell检测细胞的侵袭能力

间接共培养7 d后, 共培养组BMSCs细胞穿膜数为 333.333 ± 6.110 , 共培养+TPCA1处理组BMSCs细胞穿膜数为 38.667 ± 4.160 , 经过TPCA1处理的细胞侵袭能力明显低于未经处理的细胞(图4)。

2.5 Real-time PCR检测各组细胞STAT3、NF- κB /p56、C-myc的mRNA水平

间接共培养7 d后, 未经处理的细胞STAT3、NF- κB /p56、C-myc mRNA的相对水平与空白对照组相比显著增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2), 与阳性对照组相比无差异。间接共培养7 d后经TPCA1处理的细胞的STAT3、NF- κB /p56、C-myc mRNA的相对水平与未处理的共培养组细胞相比显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与空白对照组相比无差异(表2)。

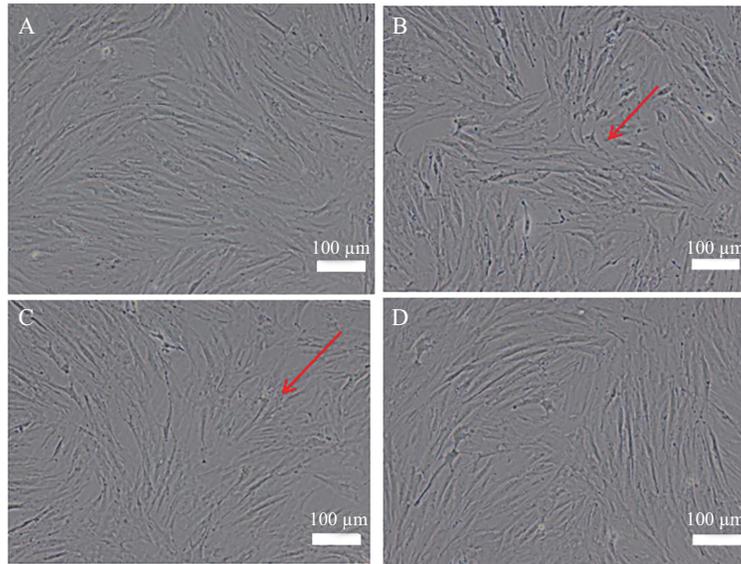
表1 Real-time PCR引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequence

靶基因 Target gene	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
STAT3	5'-GTG TTT CAT AAC CTC TTG GGC G-3'	5'-GCA GGA ACT GCT TGA TTC TTC G-3'
NF- κB /p56	5'-ACC TGG AGC AAG CCA TTA GCC-3'	5'-CGG ACC GCA TTC AAG TCA TAG T-3'
C-myc	5'-TGG AAC GTC AGA GGA GAA ACG A-3'	5'-CTT GAA CGG ACA GGA TGT AGG C-3'
β -actin	5'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3'	5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3'

2.6 Western blot检测各组细胞P-STAT3、NF- κ B/p56、I κ B、C-myc蛋白质水平

间接共培养7 d后, 未经处理的细胞P-STAT3、NF- κ B/p56、I κ B、C-myc蛋白质水平明显高于空

白对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 间接共培养7 d后, 经过TPCA1处理的细胞的P-STAT3、NF- κ B/p56、I κ B、C-myc蛋白质水平与未经处理的细胞相比, 表达明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(图5)。



A: 空白对照组(BMSCs单独培养组); B: BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养组; C: 间接共培养+DMSO处理组; D: 间接共培养+TPCA1处理组。

A: blank control group (BMSCs group); B: BMSCs indirect co-cultured with C6 glioma cells group; C: indirect co-cultured+DMSO group; D: indirect co-cultured+TPCA1 group.

图1 倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化

Fig.1 Morphology of cells under inverted microscope

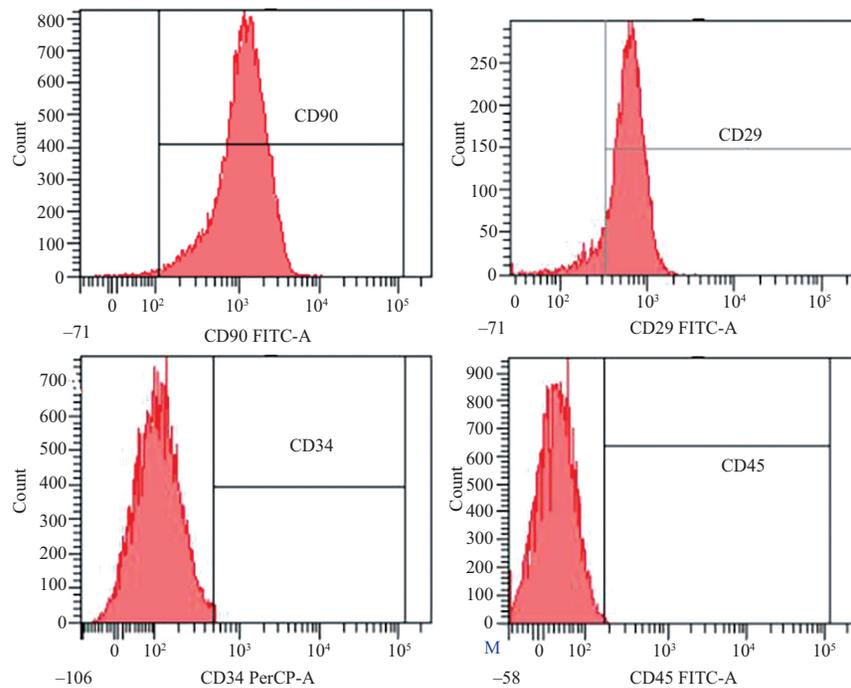
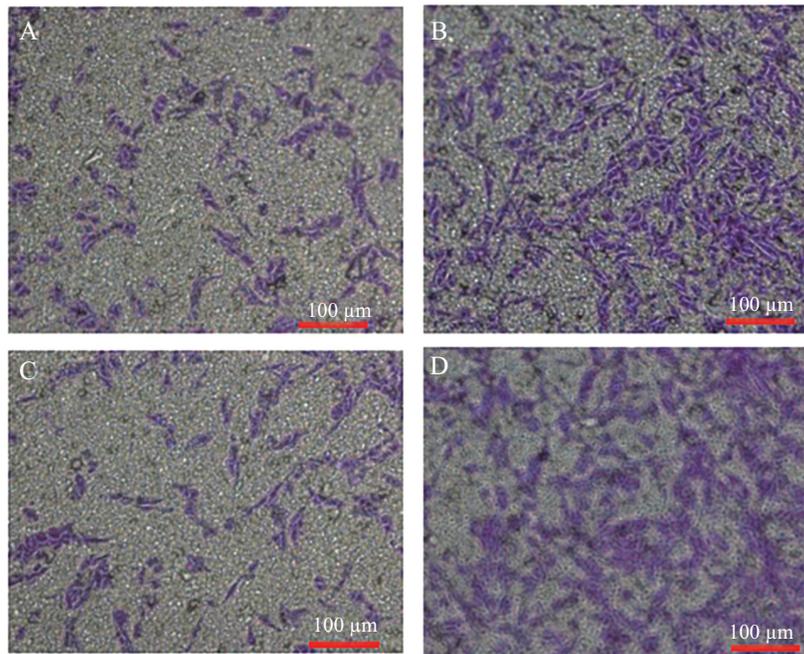


图2 流式细胞术鉴定BMSCs表面标志物

Fig.2 Surface markers of BMSCs tested by flow cytometry

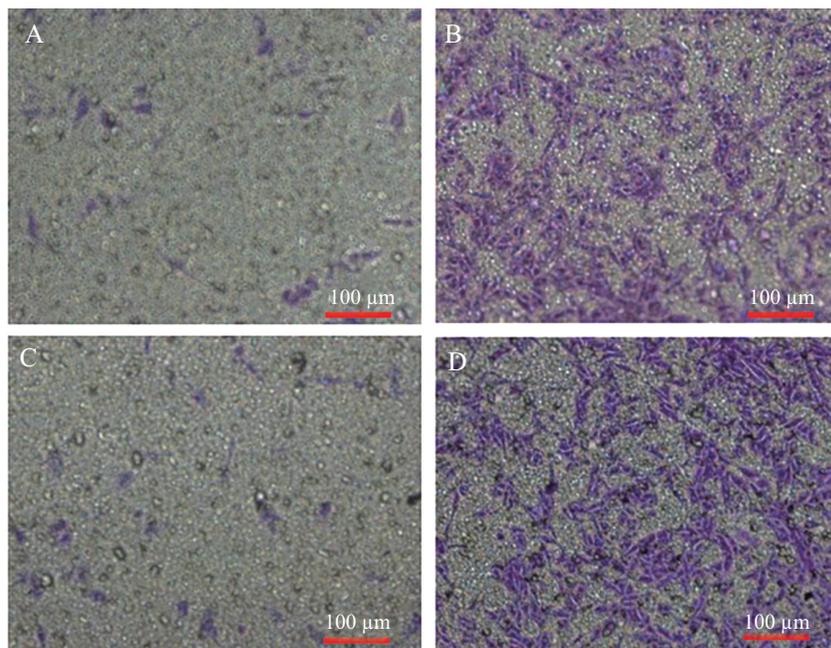


A: 空白对照组(BMSCs单独培养组); B: BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养未处理组; C: 间接共培养+TPCA1处理组; D: 间接共培养+DMSO处理组。

A: blank control group (BMSCs group); B: BMSCs indirect co-cultured with C6 glioma cells group; C: indirect co-cultured+TPCA1 group; D: indirect co-cultured+DMSO group.

图3 Transwell检测细胞的迁移能力

Fig.3 The migration of BMSCs tested by Transwell



A: 空白对照组(BMSCs单独培养组); B: BMSCs与C6脑胶质瘤细胞间接共培养未处理组; C: 间接共培养+TPCA1处理组; D: 间接共培养+DMSO处理组。

A: blank control group (BMSCs group); B: BMSCs indirect co-cultured with C6 glioma cells group; C: indirect co-cultured+TPCA1 group; D: indirect co-cultured+DMSO group.

图4 Tanswell检测细胞的侵袭能力

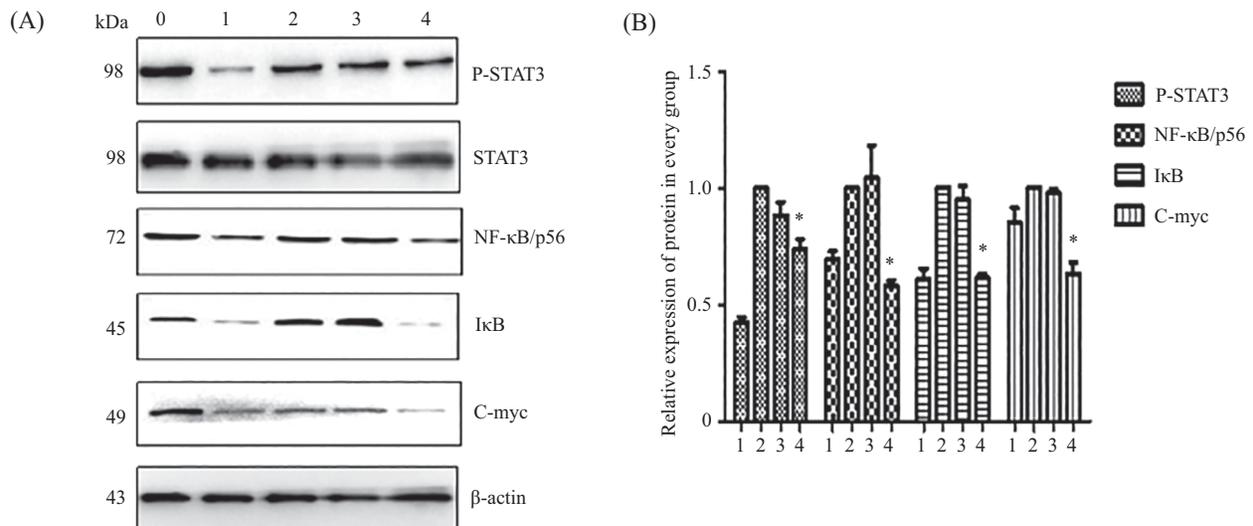
Fig.4 The sinvasion ability of BMSCs tested by Transwell

表2 Real-time PCR检测各组细胞STAT3、NF-κB/p56、C-myc mRNA的相对水平

分组 Group	目的基因 Target gene		
	STAT3	NF-κB/p56	C-myc
Positive control group (C6 glioma cells group)	1.268±0.160	2.530±0.332	4.137±0.016
Blank control group (BMSCs group)	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
Indirect co-cultured group	1.287±0.080*	1.443±0.060*	2.520±0.146*
Indirect co-cultured group	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
Indirect co-cultured+DMSO group	0.960±0.111	0.975±0.086	0.954±0.126
Indirect co-cultured+TPCA1 group	0.667±0.158 [#]	0.638±0.135 [#]	0.750±0.016 [#]

* $P < 0.05$, 与空白对照组比较; [#] $P < 0.05$, 与间接共培养未处理组。

* $P < 0.05$ compared with the blank control group; [#] $P < 0.05$ compared with indirect co-cultured group.



A: Western blot检测各组细胞蛋白表达; B: A图蛋白表达水平统计的量化图。0: C6脑胶质瘤细胞单独培养组; 1: BMSCs单独培养组; 2: C6与BMSCs间接共培养未经处理组; 3: 共培养加DMSO组; 4: 共培养经TPCA1处理组; * $P < 0.05$, 与2组比较。

A: protein expression tested by Western blot; B: quantification of protein levels for figure A; 0: C6 glioma cells cultured group; 1: BMSCs cultured group; 2: BMSCs indirect co-cultured with C6 glioma cells group; 3: indirect co-cultured+DMSO group; 4: indirect co-cultured+TPCA1 group; * $P < 0.05$ vs 2 group.

图5 Western blot检测各组细胞P-STAT3、NF-κB/p56、IκB和C-myc蛋白质水平

Fig.5 The protein levels of P-STAT3, NF-κB/p56, IκB and C-myc tested by Western blot

2.7 免疫荧光检测各组细胞P-STAT3、NF-κB/p56、IκB、C-myc蛋白质水平

间接共培养7 d后, 经过TPCA1处理后细胞的P-STAT3、NF-κB/p56、IκB、C-myc蛋白质水平与未经处理的细胞相比, 表达明显降低(图6)。

3 讨论

随着肿瘤发病率的逐年增高, 治疗肿瘤的方法也在不断改进。从简单的手术治疗、化学治疗、放射治疗、中药治疗等到用载体携带化疗药物、细胞因子、溶瘤病毒等对肿瘤进行靶向治疗。载体也从

一般的病毒、脂质体、磁性纳米粒、微泡到间充质干细胞。由于间充质干细胞具有低免疫原性和肿瘤趋向性, 体外易于分离和培养, 也易于基因转染, 因此, 运用间充质干细胞作为载体靶向治疗肿瘤的研究成为热点。但研究表明, 间充质干细胞处于复杂的肿瘤微环境内会发生恶性转变, 其自身的很多生物学特性发生变化^[7], 所以, 间充质干细胞靶向治疗肿瘤的临床安全性问题亟待解决。前期研究表明, 骨髓间充质干细胞在C6脑胶质瘤微环境内会发生恶性转变^[7], 诸如增殖、衰老、迁移、侵袭的生物学特征发生改变, 这种改变被证实与STAT3与NF-κB

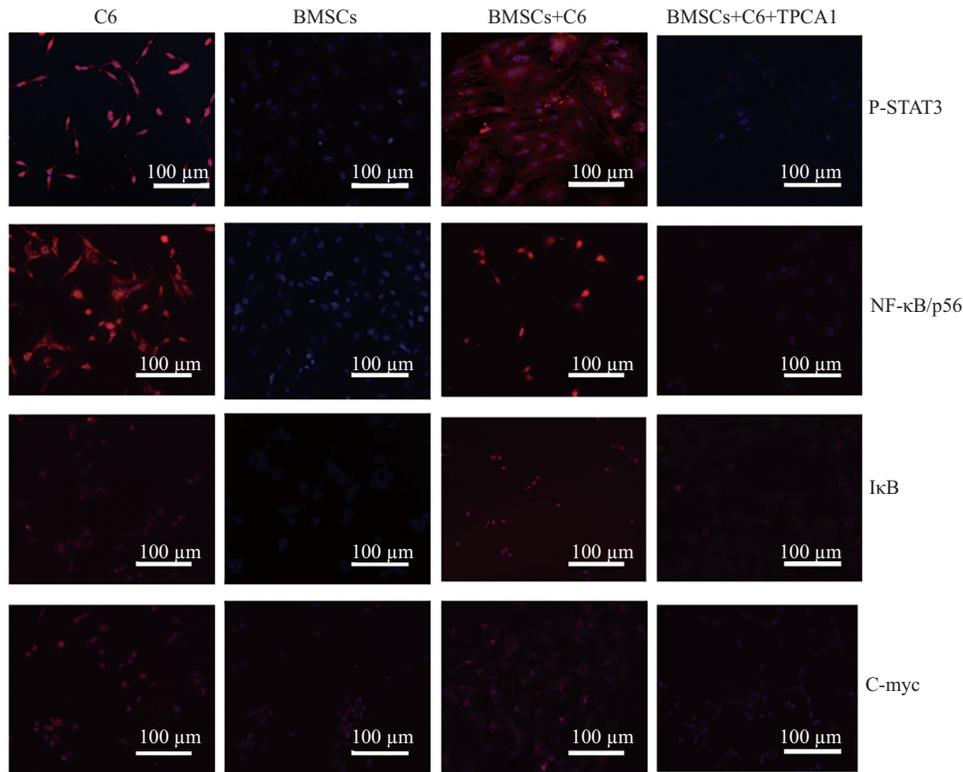


图6 免疫荧光检测蛋白质水平

Fig.6 The protein levels tested by immunofluorescence

的过表达与激活有关^[4-5]。此外,恶性转化的骨髓间充质注射到裸鼠皮下,也观察到明显的瘤体形成^[8]。因此,怎样规避间充质干细胞在复杂肿瘤微环境中恶性转化的问题成为了保证间充质干细胞靶向治疗肿瘤安全性的前提。

相关文献证实,很多肿瘤(如乳腺癌、肺癌、前列腺癌等)的发生都存在STAT3与NF- κ B的过表达与激活,激活的STAT3与NF- κ B调节下游基因(如C-myc、p53、Bcl-xl等)的转录和翻译^[9-13]。研究表明, TNF α (tumor necrosis factor α)与TNF α R结合可以激活NF- κ B的表达,激活的NF- κ B进入核内指导转录生成IL-6(interleukin-6)、VEGF(vascular endothelial growth factor)等细胞因子,生成的细胞因子以自分泌或者旁分泌的形式作用于细胞表面的IL-6R,进而使STAT3发生磷酸化入核指导转录与翻译^[13]。C-myc编码的p62在转录和细胞周期中起重要作用,其基因产物在细胞核内与DNA结合,调控着细胞的增殖与分化^[15]。本研究结果表明, BMSCs在肿瘤微环境内形态发生改变, BMSCs在C6模拟的肿瘤微环境内发生恶性转变,其STAT3与NF- κ B激活,下游细胞增殖基因C-myc表达上调。

抑制STAT3或NF- κ B激活的方法归结为四种:小干扰RNA、microRNA、多肽类和小分子化合物。小干扰RNA和microRNA可以作用于STAT3信号通路抑制细胞生长,诱导细胞凋亡,但其有会在体内快速排出,容易降解的缺点^[16-17]。多肽及多肽类似物虽然可以抑制STAT3信号通路,但其细胞通透性差,半衰期短^[18]。小分子化合物(如IL-6受体超级抑制剂Sant7、JAK激酶抑制剂AG490、Src激酶抑制剂Dastinib)可以抑制STAT3信号通路的激活,IKK(inhibitory kappa B kinase)抑制剂SC-514、蛋白酶体抑制剂Bortezomib、NF- κ B入核与DNA结合抑制剂SN-50、抗炎药物姜黄素和白藜芦醇可以抑制NF- κ B信号通路的激活。研究表明,TPCA1是一种IKK- β 特异性抑制剂,可以抑制TNF α 介导的NF- κ B的激活,也可以抑制STAT3的激活^[20]。TPCA1可以作为STAT3与NF- κ B激活的双重抑制剂已经在小细胞肺癌模型中得到证实^[20]。本研究用TPCA1处理BMSCs后,与BMSCs瘤变相关的指标STAT3、NF- κ B和C-myc基因和蛋白水平明显下调,细胞形态和迁移、侵袭实验从生物学特性变化说明其瘤变受到抑制。

本研究结果表明, 用TPCA1处理的骨髓间充质干细胞在C6模拟的肿瘤微环境内恶性转化受到明显抑制, 其相关信号通路的STAT3与NF- κ B受到抑制, 下游靶基因(如*C-myc*)也受到抑制。用TPCA1处理的骨髓间充质干细胞与阳性对照组相比, 各种瘤变指标均受到抑制, 这说明, 用TPCA1处理后的骨髓间充质干细胞在靶向治疗肿瘤的安全性上得到提升, 为其安全运用奠定了实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res* 2015; 2015: 394917.
- 2 Fritz V, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: An emerging tool for cancer targeting and therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008; 3(1): 32-42.
- 3 Wong RS. Mesenchymal stem cells: Angels or demons. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 459510.
- 4 崔向荣, 朱静, 田杰, 邓兵, 李娅莎, 白璐. STAT3过度表达和激活对骨髓间充质干细胞瘤样转化的作用. *中国生物制品学杂志*(Cui Xiangrong, Zhu Jing, Tian Jie, Deng Bing, Li Yasha, Bai Lu. STAT3 overexpression and activation of bone marrow mesenchymal stem cells into tumor like effect. *Journal of Chinese biology*) 2013; 34(3): 328-31.
- 5 燕莎, 朱静, 田杰, 张春敏, 谭彬, 崔建邦. C6胶质瘤微环境中大鼠BMSCs恶性转变与NF- κ B高表达的相关性. *基础医学与临床*(Yan Sha, Zhu Jing, Tian Jie, Zhang Chunmin, Tan Bin, Cui Jianbang. Correlation between rat BMSCs and malignant transformation of NF-kappa B high expression of C6 glioma microenvironment. *Basic and clinical medicine*) 2014; 33(11): 1497-502.
- 6 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 Lin, Zhu Jing, Tian Jie, Tan Bin, Lufthansa. Glioma microenvironment of human umbilical cord mesenchymal stem cells and biological behavior of excessive activation of STAT3 change analysis. *Journal of Medical University of Chongqing*) 2016; 41(1): 18-22.
- 7 张春敏, 朱静, 燕莎, 崔建邦. 骨髓间充质干细胞在C6脑胶质瘤细胞微环境中瘤性转化的生物学分析. *重庆医科大学学报*(Zhang Chunmin, Zhu Jing, Yan Sha, Cui Jianbang. Biological analysis of malignant transformation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in the tumor microenvironment simulated by C6 glioma. *Journal of Medical University of Chongqing*) 2014; 39(5): 591-6.
- 8 Cui X, 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.
- 9 Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer* 2016; 138(11): 2570-8.
- 10 Zhu T, Li LL, Xiao GF, Luo QZ, Liu QZ, Yao KT, *et al.* Berberine increases doxorubicin sensitivity by suppressing STAT3 in lung cancer. *Am J Chin Med* 2015; 43(7): 1487-502.
- 11 Hossain DM, Moreira D, Zhang Q, Hossain DM, Nechaev S, Li H, Kowolik CM, *et al.* TLR9 signaling through NF-kappaB/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6(19): 17302-13.
- 12 Kanzaki H, Mukhopadhyaya NK, Cui X, Ramanujan VK, Murali R. Trastuzumab-resistant luminal B breast cancer cells show casal-like cell growth features through NF-kappaB-activation. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2016; 35(1): 1-11.
- 13 Xia ZX, Li ZX, Zhang M, Sun LM, Zhang QF, Qiu XS. CARMA3 regulates the invasion, migration, and apoptosis of non-small cell lung cancer cells by activating NF-kappaB, CyrillcB and suppressing the P38 MAPK signaling pathway. *Exp Mol Pathol* 2016; 100(2): 353-60.
- 14 Kim SH, MacIntyre DA, Firmino Da Silva M, Blanks AM, Lee YS, Thornton S, *et al.* Oxytocin activates NF-kappaB-mediated inflammatory pathways in human gestational tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 403: 64-77.
- 15 Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. Myc function and regulation. *Annu J Rev Biochem* 1992; 61(2): 809.
- 16 Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, *et al.* Phosphotyrosyl peptides block StatS-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem* 2001; 276(48): 45443-55.
- 17 Turkson J1, Kim JS, Zhang S, Yuan J, Huang M, Glenn M, *et al.* Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(3): 261-9.
- 18 Bhasin D, Cisek K, Pandharkar T, Regan N, Li C, Pandit B, *et al.* Design, synthesis, and studies of small molecule STAT3 inhibitors. *Bioorga Med Chem Lett* 2008; 18(1): 391-5.
- 19 Carmona Arana JA, Seher A, Neumann M, Lang I, Siegmund D, Wajant H. TNF receptor-associated factor 1 is a major target of soluble TWEAK. *Front Immunol* 2014; 5: 63.
- 20 Nan J, Du Y, Chen X, Bai Q, Wang Y, Zhang X, *et al.* TPCA-1 is a direct dual inhibitor of STAT3 and NF-kappaB and regresses mutant EGFR-associated human non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther* 2014; 13(3): 617-27.