

PDGF 蛋白表达量在大鼠的疾病模型组和病症组显著升高,表明炎症的发生程度与该蛋白的表达水平呈现正相关。本研究结果与该实验存在一定的一致性。本实验结果显示,给药后,与模型组大鼠相比较,其关节腔面完整,关节腔内炎性物质显著减少,毛细血管和绒毛减少,纤维增多变为瘢痕,滑膜组织显著增加、变厚;活络通痹丸高剂量组大鼠关节腔内肉芽组织老化,胶原增生。且中剂量组的大鼠改善效果更好,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

因此对患有类风湿性关节炎关节炎的大鼠,实施活络通痹丸,可以对大鼠的相关蛋白酶进行下调,从而起到保护大鼠关节的作用,具有一定的临床价值。

[参考文献]

(1) 郑宝林,李婷,刘奔流,等.通痹1号方对实验性类风湿

关节炎大鼠血清 IL-18 与 VEGF 水平的影响 (J).海南医学,2018,29(3):297-299.  
(2) 范伏元,贺选玲,赵四林.通痹汤治疗类风湿性关节炎的实验研究 (J).湖南中医学院学报,2016,26(1):22-25.  
(3) 包东桥,徐斌,林超,等.基于 NF- $\kappa$ B、RANK 探讨七味通痹口服液对类风湿关节炎大鼠的影响 (J).南京中医药大学学报,2018,33(3):26-29.  
(4) 陶黎,刘梅洁,薛欣,等.益肾通痹丸对肾虚胶原诱导性关节炎大鼠踝关节骨质破坏的影响 (J).中医杂志,2018,59(5):420-426.  
(5) 邢洁,姜萍.和痹方对类风湿关节炎大鼠  $\alpha 7nAChR$ , STAT3 蛋白表达及 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 表达的影响 (J).中华中医药杂志,2018,33(2):730-733.  
(6) 苏杉,王蓉.秦艽不同配伍对风寒湿痹类风湿关节炎模型大鼠关节保护作用及其机制 (J).中国临床药理学杂志,2018,34(21):2542-2545.

(文章编号) 1007-0893(2020)24-0003-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2020.24.002

# 辐射干预后 C6 胶质瘤干细胞 wnt5a 阳性表达的实验研究

丁银秀<sup>1,2</sup> 刘平<sup>2</sup> 程莹莹<sup>2</sup> 刘印明<sup>2</sup> 冯利强<sup>2</sup>

(1.宁夏回族自治区医学科学研究所,宁夏 银川 750000; 2.宁夏医科大学基础医学院,宁夏 银川 750006)

[摘要] 目的:探讨 C6 胶质瘤干细胞 (C6 GSCs) 的辐射干预后 wnt5a 分子阳性表达的情况。方法: BrdU 掺入实验明确细胞增殖情况;共聚焦显微镜观察 wnt5a 的细胞定位;蛋白电泳测定 wnt5a 蛋白表达水平。结果:条件培养基的作用下,C6 GSCs 数量达到 98% 以上;辐射干预后,0.3 Gy 组促进了 C6 GSCs 的增殖和分化能力;3.0 Gy 组细胞的增殖和分化能力下降;wnt5a 在细胞核、胞浆和突起上均有表达,0.3 Gy 组与对照组比较,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );蛋白电泳灰度统计分析上述结果一致。结论:一定范围内的低剂量电离辐射刺激对 C6 GSCs 的增殖、分化具有促进作用,且 wnt5a 分子在 C6 GSCs 上呈阳性表达,提示 wnt 分子可能参与介导 C6 GSCs 电离辐射的刺激效应。

[关键词] C6 胶质瘤干细胞;BrdU 掺入实验;低剂量电离辐射技术

[中图分类号] R 739 [文献标识码] A

## Experimental Study on the Positive Expression of wnt5a in C6 Glioma Stem Cells after Radiation Intervention

DING Yin-xiu<sup>1,2</sup>, LIU ping<sup>2</sup>, CHENG Ying-ying<sup>2</sup>, LIU Yin-ming<sup>2</sup>, FENG Li-qiang<sup>2</sup>

(1. Ningxia Hui Autonomous Region Institute of Medical Sciences, Ningxia Yinchuan 750000; 2. School of Basic Medicine of Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750006)

[Abstract] Objective To investigate the positive expression of wnt5a molecules after radiation intervention of C6 glioma stem cells (C6 GSCs). Methods BrdU incorporation experiment to clarify the cell proliferation; confocal microscopy to observe the cell location of wnt5a; protein electrophoresis to determine the level of wnt5a protein expression. Results Under the effect

[收稿日期] 2020-09-22

[基金项目] 国家自然科学基金地区项目资助课题 (31760279, 81360062); 宁夏自然科学基金项目资助课题 (2018AAC03207)

[作者简介] 丁银秀,女,副教授,主要研究方向是干细胞定向诱导分化与神经精神疾病调控机制。

of conditioned medium, the number of C6 GSCs reached more than 98%; after radiation intervention, the 0.3 Gy group promoted the proliferation and differentiation of C6 GSCs; the 3.0 Gy group decreased the proliferation and differentiation; wnt5a was found in the nucleus, cytoplasm and There are expressions on the protrusions, and the difference between the 0.3 Gy group and the Con group is statistically significant ( $P < 0.05$ ); the gray-scale statistical analysis of protein electrophoresis is consistent with the above results. **Conclusion** A certain range of low-dose ionizing radiation stimulation can promote the proliferation and differentiation of C6 GSCs, and wnt5a molecules are positively expressed on C6 GSCs, suggesting that wnt molecules may be involved in mediating the stimulation effects of C6 GSCs ionizing radiation.

**(Key Words)** C6 glioma stem cells; BrdU incorporation experiment; Low-dose ionizing radiation

脑胶质瘤是神经系统常见的颅内原发性肿瘤，其恶性程度高，预后差易复发，是当前困扰临床医生的难题。研究表明，脑胶质瘤中存在的胶质瘤干细胞，对脑胶质瘤的发生发展、肿瘤侵袭及放疗抑制等产生深刻的影响<sup>[1]</sup>。有研究证实，应用低剂量电离辐射技术，严格把控照射剂量的范围，就能够发挥照射的最大保护反应<sup>[2]</sup>。本项目以 C6 胶质瘤干细胞 (glioma stem cells, C6 GSCs) 为研究对象，观察辐射干预后 C6 GSCs 上 wnt5a 在辐射前后的变化情况，为揭示低剂量放射技术防治脑胶质瘤的调控机制，提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C6 大鼠胶质瘤细胞系购于中国科学院上海细胞库。DMEM/F12 (1:1) 培养基, Accutase, B27 购自 Gibco 公司, bFGF 和 EGF 购自 Peprtech 公司; wnt5a, BrdU 掺入试剂和 hoechst 购自 Sigma 公司。β-actin 以及 HRP 辣根过氧化物酶二抗购自中杉生物试剂公司。其他试剂均为市购。

### 1.2 方法

1.2.1 C6 GSCs 的分离培养及鉴定 将 C6 胶质瘤细胞系，加入条件培养基 DMEM/F12，制成单细胞悬液，接种第 3 天半量换液，镜下观察 C6 GSCs 的生长，第 6 天开始传代。将第三代的 C6 GSCs，加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  BrdU，继续培养 24~48 h。接种后孵育 2~4 h，经多聚甲醛固定，浓 HCl 和硼酸缓冲液抗原变性修复反应，入相应抗体，进行免疫荧光染色。

1.2.2 低剂量电离辐射干预实验 细胞混匀后分组，在专业的放疗人员的操作指导下，应用直线加速器 MD7745 进行等距离，等中心照射。照射后维持该效应 48 h，将细胞爬片分化，观察细胞的生长情况。

1.2.3 免疫荧光染色 电离辐射干预 48 h 后，将细胞球爬片分化 24 h。经多聚甲醛室温固定加入兔抗 wnt5a，4 °C 过夜；入相应的荧光二抗，避光孵育 2~4 h，封片并采图。

1.2.4 Western Blot 蛋白分析 辐射干预后爬片分化 24 h 的细胞，收集总蛋白。进行蛋白电泳，经转膜，封闭，加入一抗、二抗。凝胶成像仪采集图像，进行条带灰度分析。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表

示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用  $\chi^2$  检验， $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察及增殖鉴定

条件培养基的作用下，C6 GSCs 呈悬浮的细胞球生长。接种初期 C6 GSCs 悬浮于液体中，胞体大小均一，折光性强。12 h 后细胞聚集成球，并不断增大；6 d 左右，进行细胞传代。99% 的细胞可消化为单细胞，细胞活性良好。

将 C6 GSCs 的细胞球进行 BrdU 免疫荧光染色，结果发现呈 BrdU 强阳性；且 C6 GSCs 增殖速度快，干细胞的数量较多，可达到 98% 以上，见封三图 1。

### 2.2 辐射干预后细胞的生长情况

爬片分化 2~4 h 完全贴壁，自细胞球的边缘伸出许多细小的突起，随培养时间的延长，细胞向远处迁移和分化。在 5% 低血清条件培养基的作用下，0.3 Gy 剂量的辐射刺激促进了 C6 GSCs 的增殖、迁移和分化能力；当辐射剂量达到 3.0 Gy 时，C6 GSCs 增殖、聚球能力受抑制，细胞迁移和分化能力均下降。

### 2.3 辐射干预后 wnt5a 的阳性表达

免疫荧光结果显示，辐射干预后，wnt5a 在细胞核、胞浆和突起上均有表达。0.3 Gy 组 wnt5a 阳性表达细胞数量增多，荧光强度表达增强，3.0 Gy 组 wnt5a 阳性表达细胞数量减少，荧光强度表达降低，见封三图 2。

### 2.4 辐射干预后 wnt5a 蛋白水平

蛋白分析结果发现，0.3 Gy 组辐射刺激后 wnt5a 蛋白灰度值增加，当辐射剂量增大至 3.0 Gy 时，wnt5a 蛋白灰度值降低。0.3 Gy 组与对照组比较，差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )，见图 3。

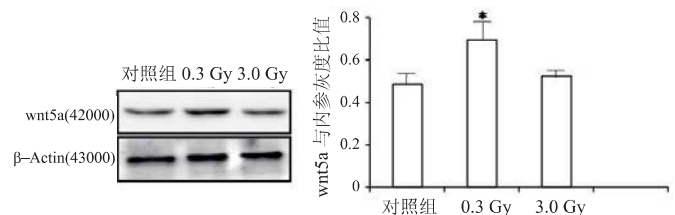


图 3 辐射干预后 C6 GSCs 分化后 Western Blot 蛋白条带及其灰度比值分析

### 3 讨论

辐射研究证明, 较低剂量辐射可以引起干细胞的增殖、分化受抑制, 甚至诱导细胞凋亡<sup>[3-4]</sup>。通过分析低剂量电离辐射反应的量效关系, 研究发现干细胞对低剂量辐射刺激较为敏感, 0.3 Gy 照射剂量出现最大的保护性反应, 大于 0.5 Gy 剂量则不能诱导出保护性反应<sup>[4-5]</sup>。研究证实, 低剂量电离辐射刺激干细胞在 0.01 ~ 0.1 Gy 低剂量照射范围内, 单次 0.01 Gy 连续 4 次, 或 1 次 0.1 Gy 照射可产生刺激干细胞的增殖作用<sup>[2]</sup>。本研究表明, 在 0 ~ 1.0 Gy 照射剂量范围内, C6 GSCs 则更能耐受辐射刺激, 1 次 0.3 Gy 照射剂量可诱导出保护性反应, 接近 1.0 Gy 剂量则不能诱导出保护性反应。提示较低剂量电离辐射可能具有促进肿瘤干细胞增殖和分化的作用, 与上述研究结果是一致的。

Wnt/beta-catenin 信号通路是参与调控胶质瘤发生、发育的关键途径<sup>[6-7]</sup>。研究表明, wnt3a 分子激活 wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路, 可促进胶质瘤的发生发展<sup>[8]</sup>。与正常脑组织比较, 在胶质瘤组织中 wnt/ $\beta$ -catenin 表达上调, 且  $\beta$ -catenin 参与调控胶质瘤细胞的增殖及迁移<sup>[9]</sup>。研究证实 wnt/ $\beta$ -catenin 与多个信号通路交互作用, 抑制 U87 胶质瘤细胞的增殖和细胞凋亡<sup>[10]</sup>。另有研究表明, 在胃癌或肝癌组织及其肿瘤干细胞中, wnt 信号分子的高表达, 从而激活 wnt/beta-catenin 信号通路, 促进肿瘤干细胞的自我增殖能力和肿瘤侵袭<sup>[11-12]</sup>。本实验研究结果发现, 低剂量电离辐射刺激后, 0.3 Gy 组 C6 GSCs 上 wnt5a 分子的阳性表达上调。当剂量达到 3.0 Gy 时, C6 GSCs 上 wnt5a 的表达受抑制。提示 wnt/beta-catenin 信号通路可能参与调控肿瘤干细胞增殖和分化过程。但具体机制仍不明确。

综上所述, 一定剂量范围内的电离辐射刺激对肿瘤干细胞的增殖、迁移和分化具有促进作用, 其机制可能与 wnt 信号途径被激活有关。因此, 根据个体差异界定出辐射的剂量范围, 制定具体的辐射方案, 一次较大剂量的冲击治疗还是分期多次的小剂量治疗达到最佳的保护性反应, 以及更进一步地深入研究辐射敏感效应与 wnt 信号途径激活之间的关系, 都将成为今后的研究重点。

#### [参考文献]

(1) Shi Y, Guryanova OA, Zhou W, et al. Ibrutinib inactivates BMX-STAT3 in glioma stem cells to impair malignant growth

and radio-resistance (J). *Sci Transl Med*, 2018, 10(443): eaah6816.

- (2) Kang JO, Kim SK, Hong SE, et al. Low dose radiation overcomes diabetes-induced suppression of hippocampal neuronal cell proliferation in rats (J). *J Korean Med Sci*, 2006, 21(3): 500-505.
- (3) Wei LC, Ding YX, Liu YH, et al. Low-dose Radiation Stimulates Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling, Neural Stem Cell Proliferation and Neurogenesis of the Mouse Hippocampus in vitro and in vivo (J). *Curr Alzheimer Research*, 2012, 9(3): 278-289.
- (4) Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, et al. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation (J). *Cancer Res*, 2003, 63(14): 4021-4027.
- (5) Tapio S. Pathology and biology of radiation-induced cardiac disease (J). *J Radiat Res*, 2016, 57(5): 439-448.
- (6) Kierulf-Vieira KS, Sandberg CJ, Grieg Z, et al. Wnt inhibition is dysregulated in gliomas and its re-establishment inhibits proliferation and tumor sphere formation (J). *Experimental Cell Research*, 2016, 340(1): 53-61.
- (7) Amelie Griveau, Giorgio Seano, Samuel J, et al. A Glial Signature and Wnt7 Signaling Regulate Glioma-Vascular Interactions and Tumor Microenvironment (J). *Cancer Cell*, 2018, 33(5): 874-889.
- (8) Kaur N, Chettiar S, Rathod S, et al. Wnt3a mediated activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma (J). *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2013, 54(1): 44-57.
- (9) Leushacke M and Barker N. Lgr5 and Lgr6 as markers to study adult stem cell roles in self-renewal and cancer (J). *Oncogene*, 2012, 31(25): 3009-3022.
- (10) Gao LY, Chen B, Li JH, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway inhibits the proliferation and apoptosis of U87 glioma cells via different mechanisms (J). *PLoS ONE*, 2017, 12(8): e0181346.
- (11) Wang Y, He L, Ying D, et al. The long noncoding RNA Inc TCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling (J). *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4): 413-425.
- (12) Yong X, Tang B, Xiao YF, et al. Helicobacter pylori upregulates Nanog and Oct4 via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to promote cancer stem cell-like properties in human gastric cancer. *Cancer Lett*, 2016, 374(2): 292-303.