

· 原 著 ·

放射线照射的肺成纤维细胞对人脐带间充质干细胞中经典 Wnt/ β -catenin 通路的影响

张春阳^{1,2}, 祝 艳², 冯华松², 陈旭昕²

1. 解放军医学院研究生队, 北京 100853

2. 海军总医院呼吸内科, 北京 100048

[摘要] **目的:** 体外研究放射线照射后的人肺成纤维细胞(HLFs)对人脐带间充质干细胞(HUMSCs)中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法:** 实验细胞分为共培养组和单纯 HUMSCs 组, 共培养组为 5Gy X 射线照射后的 HLFs 通过 Transwell 系统与 HUMSCs 共培养。细胞培养 3d 后, 蛋白质印迹法检测 HUMSCs 中 GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、FRAT1 和胞核内 β -catenin 蛋白表达, 酶联免疫吸附试验检测细胞培养上清液中 WISP-1 蛋白表达。**结果:** 共培养组 HUMSCs 中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 相对比值(0.15 ± 0.05)和 FRAT1 表达水平(0.48 ± 0.07)较单纯 HUMSCs 组(0.55 ± 0.05 和 1.16 ± 0.13)明显下降, 共培养组 HUMSCs 胞核内 β -catenin (0.50 ± 0.07)也较单纯 HUMSCs 组(2.39 ± 0.15)明显下降; 共培养组 HUMSCs 培养上清液中 WISP-1 蛋白表达 [(602.23 ± 161.47) ng/mL] 较单纯 HUMSCs 组 [(977.77 ± 110.56) ng/mL] 明显下降, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论:** 放射线照射后的 HLFs 对 HUMSCs 中经典 Wnt/ β -catenin 通路具有抑制作用。

[关键词] 成纤维细胞; 间质干细胞/生理学; 脐带; 放射性肺炎; Wnt 蛋白质类/生物合成; β 连环素/生物合成; 胞间信号肽类和蛋白质类; 信号传导

[中图分类号] R146; Q691.4 **[文献标志码]** A

Effect of irradiated human lung fibroblasts on activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in mesenchymal stem cells

ZHANG Chun-yang^{1,2}, ZHU Yan², FENG Hua-song², CHEN Xu-xin² (1. Graduate Student Team of Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

Corresponding author: FENG Hua-song, E-mail: fenghs99@163.com

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of irradiated human lung fibroblasts (HLFs) on the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs). **Methods:** HUMSCs were cultured alone (single

收稿日期: 2014-11-17 接受日期: 2015-03-05

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81300050)

第一作者: 张春阳(1979-), 男, 博士研究生, 主治医师, 从事肺间质病研究; E-mail: springsun27cn@163.com

通讯作者: 冯华松(1960-), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事肺癌和肺结节病研究; E-mail: fenghs99@163.com

group) or co-cultured with HLFs exposed to 5Gy X-rays (co-culture group). The protein levels of GSK-3 β , p-GSK-3 β , FRAT1 and β -catenin in HUMSCs were examined by Western blotting 3 days after culture or co-culture. WISP-1 protein levels in conditioned medium were examined by ELISA. **Results:** The levels of p-GSK3 β /GSK3 β (0.15 ± 0.05), FRAT1 (0.48 ± 0.07) and β -catenin (0.50 ± 0.07) in co-cultured HUMSCs significantly decreased compared to those in single group (0.55 ± 0.05 , 1.16 ± 0.13 and 2.39 ± 0.15 , all $P < 0.05$). The supernatant level of WISP-1 in co-culture group was significantly decreased [(602.23 ± 161.47) ng/mL], compared to the single group [(977.77 ± 110.56) ng/mL, $P < 0.05$]. **Conclusion:** Irradiated HLFs attenuate the activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in HUMSCs in vitro.

[**Key words**] Fibroblasts; Mesenchymal stem cells/physiology; Umbilical cord; Radiation pneumonitis; Wnt proteins/biosynthesis; Beta-catenin/biosynthesis; Intercellular signaling peptides and proteins; Signal transduction

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2015,44(2):162-166.]

目前已广泛开展运用外源性间充质干细胞治疗放射性肺炎、放射性肺纤维化的研究。研究发现外源性间充质干细胞可向受损部位归巢并向肺泡上皮细胞分化^[1-2],但肺损伤局部微环境会左右输注的外源性间充质干细胞归巢和分化^[3-4],从而影响了治疗。其具体的机制不完全清楚。有研究表明经典 Wnt (wingless-type MMTV integration site family)/ β -catenin 通路参与了间充质干细胞的归巢及分化^[5]。Wnt/ β -catenin 信号通路在细胞的增殖及分化过程中有重要作用。在缺少活化的 Wnt 配体时, β -catenin 被位于结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)和轴蛋白(axin)复合体上的糖原合成激酶 3- β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β) 磷酸化,在细胞浆内降解。当有 Wnt 配体存在时,膜受体(FZD)或共同受体低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP5/6)与配体结合,诱导通路活化。在细胞浆内,GSK-3 β 被磷酸化,使其磷酸化 β -catenin 作用减弱,因此 β -catenin 在胞浆中聚集增多,向细胞核内转移。在核内, β -catenin 与 T 细胞因子/淋巴样增强因子(TCF/LEF)结合,诱导下游的靶基因转录,如 Wnt1 诱导信号通路蛋白(Wnt1 inducible signaling pathway protein 1, WISP-1)等,在信号通路活化时表达升高^[6-7]。而磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β) 是反映经典 Wnt/ β -catenin 信号通路活动性的敏感指标^[8]。

为探讨外源性间充质干细胞在放射线照射后

肺组织中趋化、归巢以及分化所受影响的可能机制,本研究拟通过 transwell 非接触共培养系统,观察放射线照射后的人肺成纤维细胞(human lung fibroblasts, HLFs)对人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs)中经典 Wnt/ β -catenin 通路的影响,以初步探讨肺损伤微环境对外源性间充质干细胞影响的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

HLFs 由解放军医学院陈洁博士惠赠。HUMSCs 源于人脐带,经海军总医院伦理委员会批准,孕妇及家属签署知情同意后,留取健康孕妇剖宫产后脐带,经组织块法贴壁培养^[9],实验采用第 3 代细胞。HUMSCs 已进行分化及免疫表型鉴定^[9]。

1.2 试剂

DMEM-F12 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;Transwell 小室(孔径 0.4 μ m)6 孔板购自美国 Corning 公司;p-GSK-3 β (Ser9) 兔单克隆抗体、GSK-3 β 兔单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;FRAT1 (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas-1) 兔单克隆抗体、GAPDH 兔单克隆抗体、Histone H3 兔多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; β -catenin 兔单克隆抗体购

自美国 Epitomics 公司;HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体、总蛋白及细胞核蛋白提取试剂盒均购自北京普利莱生物技术公司;WISP-1 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自上海朗顿生物技术有限公司。

1.3 HUMSCs 细胞培养和处理

取 HUMSCs 对数生长期细胞,以 2×10^5 /孔密度接种于 6 孔板,细胞分为共培养组、单纯 HUMSCs 组,每组设 6 个复孔。采用含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳饱和湿度条件下培养。HLFs 以 1.5×10^5 /孔密度接种于 Transwell 上室,12h 后观察,细胞完全贴壁后经无菌密封,于直线加速器(5Gy、530mV、源距 1m、照射野 20cm \times 10cm)进行 X 线照射。照射后,将接种 HLFs 的 transwell 上室与 HUMSCs 共培养,而单纯 HUMSCs 组不与 HLFs 共培养。各组培养液体系均调整至 2mL,之后转移至培养箱培养。培养 3 天后,提取 HUMSCs 蛋白并留取培养上清液。

1.4 蛋白质印迹法检测 HUMSCs 核中 β -catenin 和细胞中 p-GSK-3 β 、GSK-3 β 及 FRAT1 蛋白表达

根据蛋白提取试剂盒说明,提取 HUMSCs 总蛋白及核蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。样本于 100 $^{\circ}$ C 变性 5min,在 15 道双垂直电泳槽内每孔加入 40 μ g 蛋白质,经 10% SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,50mL 脱脂牛奶封闭 2h,杂交一抗(1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后加入二抗(1:1000 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。洗膜后加入增强化学发光剂,置于 X 射线摄影暗盒内曝光显影,根据同时进行电泳的蛋白分子量标志物判断各目的条带位置。结果采用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件对条带灰度进行分析。

1.5 ELISA 法检测细胞上清液中 WISP-1 水平

细胞上清液中 WISP-1 水平的检测根据 ELISA 试剂盒操作说明书进行,用酶标仪在波长 450nm 处测吸光度值,参照标准曲线计算其浓度值,每个样本重复 3 次。

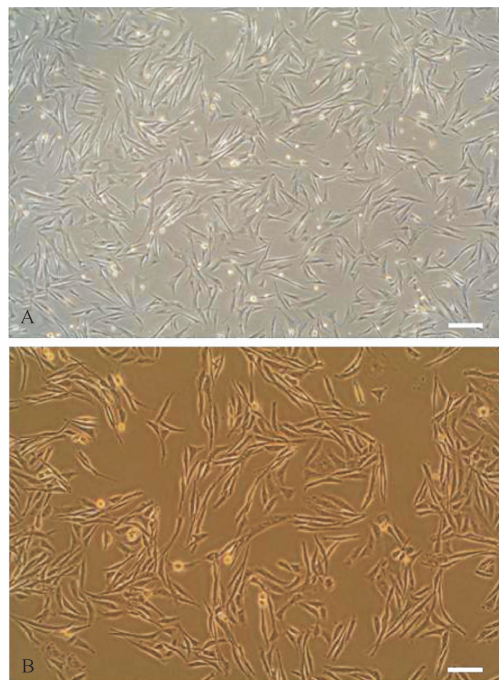
1.6 统计学处理

采用 CHISS 统计软件进行分析,数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HLFs 和 HUMSCs 形态学观察

倒置显微镜下观察可见正常 HLFs 形态呈梭形、三角形或不规则形(图 1A);培养至第 3 代第 3 天的 HUMSCs 呈梭形或多角形(图 1B)。



A. 正常 HLFs 形态呈梭形、三角形或不规则形;B. 正常第 3 代第 3 天 HUMSCs 形态呈梭形或多角形(标尺 = 100 μ m)。

图 1 正常 HLFs 和 HUMSCs 形态学观察

Fig. 1 The modality of normal HLFs and HUMSCs

2.2 两组 HUMSCs 细胞核蛋白 β -catenin 表达比较

HUMSCs 细胞核中 GAPDH 未见表达,而 Histone H3 可见表达(图 2A),说明 HUMSCs 细胞核蛋白提取成功。共培养组 β -catenin 表达水平明显低于单纯 HUMSCs 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2A、表 1。说明放射线照射后的 HLFs 可降低 HUMSCs 胞核中 β -catenin 的表达。

2.3 两组 HUMSCs 中 p-GSK-3 β 、GSK-3 β 和 FRAT1 蛋白的表达比较

共培养组 HUMSCs 中 p-GSK-3 β /GSK-3 β 和 FRAT1 蛋白表达明显低于单纯 HUMSCs 组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2B、表 1。说明放射线照射后的 HLFs 可降低 HUMSCs 中 p-GSK-3 β 和 FRAT1 的表达。

2.4 两组细胞上清液中 WISP-1 表达比较

共培养组和单纯 HUMSCs 组细胞上清液中

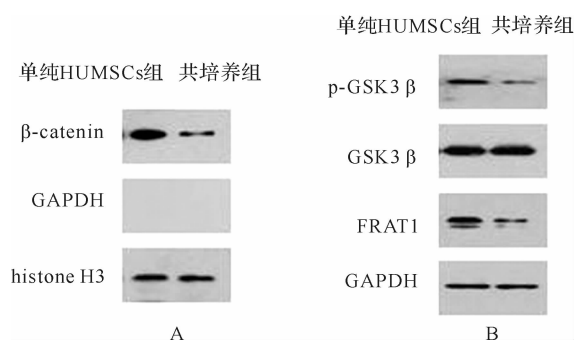


图2 蛋白质印迹法检测 HUMSCs 中 β -catenin、p-GSK-3 β 、GSK-3 β 和 FRAT1 蛋白表达的结果

Fig. 2 The levels of β -catenin, p-GSK-3 β , GSK-3 β and FRAT1 protein in HUMSCs were detected by Western blotting

表1 HUMSCs 中 β -catenin、p-GSK/GSK、FRAT1 蛋白表达比较

Table 1 The relative levels of β -catenin, p-GSK/GSK and FRAT1 protein in HUMSCs

组别	$(\bar{x} \pm s)$		
	β -catenin	p-GSK/GSK	FRAT1
单纯 HUMSCs 组	2.39 \pm 0.15	0.55 \pm 0.05	1.16 \pm 0.13
共培养组	0.50 \pm 0.07	0.15 \pm 0.05	0.48 \pm 0.07
t 值	19.78	9.80	7.80
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

WISP-1 表达水平分别为 (602.23 \pm 161.47) ng/mL 和 (977.77 \pm 110.56) ng/mL, 差异有统计学意义 ($P=0.009$), 提示放射线照射后的 HLFs 可降低 HUMSCs 细胞上清液中 WISP-1 表达。

3 讨论

目前关于外源性间充质干细胞移植治疗肺损伤、肺纤维化研究中发现, 晚期输注间充质干细胞减轻肺纤维化效果不明显^[3,4]。间充质干细胞多存在于肺间质区域, 可向肌成纤维细胞分化而未能分化为肺泡上皮细胞, 其原因可能是肺内微环境的变化影响了间充质干细胞的趋化、归巢, 同时影响了其分化^[4]。而放射性肺炎、放射性肺纤维化均涉及大量细胞及细胞因子, 不同细胞与外源性间充质干细胞之间的相互作用、影响, 均有可能导致上述情况。而肺成纤维细胞是放射性肺损伤中重要的效应细胞, 在肺纤维化形成过程中有重要作用^[6]。放射线照射之后, 肺成纤维细胞可向肌成纤维细胞分化, 并合成和分泌大量参与肺损

伤和纤维化的细胞因子^[10]。因此本研究采用放射线照射后的 HLFs, 观察其对外源性 HUMSCs 的影响。

目前发现经典的 Wnt/ β -catenin 通路参与间充质干细胞分化的调控, β -catenin 在间充质干细胞分化时上调^[5,11]。在体外实验中, 活化的经典 Wnt/ β -catenin 通路可促进小鼠骨间充质干细胞向肺泡上皮细胞分化和向损伤组织趋化、迁移^[5]。Wnt3a 可活化该信号通路促进间充质干细胞迁移和创伤愈合, 而 Wnt3a 抗体可减弱间充质干细胞的迁移^[12]。同时发现, 与放射线照射后 HLFs 非接触共培养的 HUMSCs 的 p-GSK-3 β 、 β -catenin 和 WISP-1 蛋白表达水平均较正常的 HUMSCs 降低, 该结果提示: 放射线照射后的 HLFs 抑制了 HUMSCs 中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路。同时发现, 共培养的 HUMSCs 中 FRAT1 蛋白表达水平相对于单纯 HUMSCs 下降。作为经典 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化因子之一, FRAT1 蛋白可与 Axin 竞争结合 GSK3, 导致 GSK/Axin/APC 复合体解体, 形成 FRAT/GSK3 复合体, 抑制 β -catenin 的磷酸化和降解, 激活该通路下游的基因^[13]。这提示放射线照射后的 HLFs 有可能通过影响 HUMSCs 中 FRAT1 的表达, 抑制该信号通路。

上述结果可在一定程度解释以往研究中外源性间充质干细胞治疗放射性肺损伤效果欠佳的原因^[4]。当放射线照射后, 肺内成纤维细胞大量增殖, 输注的间充质干细胞中经典 Wnt/ β -catenin 信号通路受到抑制, 不但到达损伤部位的间充质干细胞数量下降, 同时其向受损细胞分化的能力也下降。目前间充质干细胞治疗肺损伤的机制仍不完全清楚, 肺损伤后局部微环境对外源性间充质干细胞影响的研究仍较少。如何改善肺损伤后局部微环境影响, 尽可能发挥间充质干细胞归巢以及修复受损组织的作用, 需要进一步深入研究。

但值得注意的是, 本研究仅采用了单一的 HLFs 观察其对间充质干细胞的影响。而放射性肺损伤的局部微环境还包含其他细胞, 如上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等, 需要考虑到多种细胞之间复杂的相互作用及影响, 才有可能较客观地解释其机制。我们将在今后深入开展这方面的研究。另一方面, 放射性肺损伤后肺内微环境随着时间的改变是不断变化的。在不同的阶段, 受

损的肺泡上皮细胞以及肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的分化和增殖对外源性间充质干细胞的影响如何,需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] XUE J, LI X, LU Y, et al. Gene-modified mesenchymal stem cells protect against radiation-induced lung injury [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2): 456-465.
- [2] ROJAS M, XU J, WOODS C R, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2):145-152.
- [3] 崔瑗,代华平,戴建武,等.骨髓间充质干细胞对博来霉素致大鼠肺纤维化形成的影响[J].*中华结核和呼吸杂志*, 2007, 30(9): 677-682.
CUI Ai, DAI Hua-ping, DAI Jian-wu, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2007, 30(9):677-682. (in Chinese)
- [4] YAN X, LIU Y, HAN Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1t mesenchymal stem cell in lung [J]. *Exp Hematol*, 2007, 35(9):1466-1475.
- [5] LIU A R, LIU L, CHEN S, et al. Activation of canonical wnt pathway promotes differentiation of mouse bone marrow-derived MSCs into type II alveolar epithelial cells, confers resistance to oxidative stress, and promotes their migration to injured lung tissue in vitro [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(6):1270-1283.
- [6] GURUNG A, UDDIN F, HILL R P, et al. Beta-catenin is a mediator of the response of fibroblasts to irradiation [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(1):248-255.
- [7] 徐思慧,宋春敬,孟海建,等.骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞过程中 Wnt 信号通路的作用研究[J].*生命科学研究*, 2014, 18(6):539-542.
XU Si-hui, SONG Chun-jing, MENG Hai-jian, et al. The role of Wnt signaling pathway in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) to cardiomyocytes [J]. *Life Science Research*, 2014, 18(6): 539-542. (in Chinese)
- [8] FORDE J E, DALE T C. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15):1930-1944.
- [9] GAO L R, ZHANG N K, DING Q A, et al. Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells and embryonic stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(10):1883-1900.
- [10] LI Y Y, LIN D J, GAO G X. Pathogenesis of radiation-induced lung injury [J]. *Int J Respir*, 2012, 21(10):784-788.
- [11] OKOYE U C, MALBON C C, WANG H Y. Wnt and Frizzled RNA expression in human mesenchymal and embryonic (H7) stem cells [J]. *J Mol Signal*, 2008, 3: 16. doi: 10.1186/1750-2187-3-16.
- [12] KASAI M, SATOH K, AKIYAMA T. Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs [J]. *Genes Cells*, 2005, 10(8):777-783.
- [13] VAN AMERONGEN R, BERNIS A. Re-evaluating the role of Frat in Wnt-signal transduction [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(8):1065-1072.

[本文编辑 沈敏 陈韶华]

— 消 息 —

2015 年中华医学会肿瘤学分会年会消息

为了更好地促进我国与国际肿瘤同行的学术交流,为致力于肿瘤临床及基础研究的医师提供一个良好的互动平台,2015年中华医学会肿瘤学分会年会暨第二届中华长城—东方肿瘤高峰论坛将于2015年6月25—28日在上海国际会议中心召开。本次学术年会的主题为“加强肿瘤规范治疗,推动转化医学研究”。

联系邮箱:tumorcongress@163.com

会议网站:http://www.cmacso.org/