

国内尚无专门针对 ARC 动物造模研究, 我们采用 X 射线辐照仪对小鼠膀胱区进行照射, 试图摸索出构建 ARC 最佳照射剂量。本研究中, 我们照射剂量分别设定 10、20 和 30 Gy, 结果发现, 当剂量达到 20 Gy 及以上时, 小鼠在排尿行为上出现符合放射性膀胱损伤的症状改变, 排尿次数明显增加; 且膀胱新生血管增多, 提示射线损伤易导致膀胱出血; 光镜下, 可见膀胱黏膜缺失, 坏死脱落, 黏膜下层可见组织水肿及出血。然而, 射线剂量增大, 另一方面也会造成小鼠死亡率明显增加。因此, 本研究小组认为, 采用 X 射线辐照仪单次盆腔局部照射 20 Gy 既可诱发小鼠 ARC, 符合我们造模成功标准, 又可保证小鼠存活率, 可视为放射性膀胱损伤模型的造模成功剂量。

综上所述, 本研究采用的造模方法可为建立小鼠 ARC 模型提供参考, 有助于节省动物资源, 减少实验耗材, 为今后进一步开展研究奠定实验基础。

参考文献

- [1] Turner A C, Powers S A, Odom M R, et al. Impact of prostatic radiation therapy on bladder contractility and innervations [J]. *Neurourol Urodyn*, 2021, 40 (6): 1470-1478.
- [2] Rapariz-González M, Castro-Díaz D, Mejía-Rendón D. Evaluation of the impact of the urinary symptoms on quality of life of patients with painful bladder syndrome/chronic pelvic pain and radiation cystitis: EURCIS study [J]. *Actas Urol Esp*, 2014, 38 (4): 224-231.
- [3] Chen H, Vandorpe D H, Xie X, et al. Disruption of Cav1.2-mediated signaling is a pathway for ketamine-induced pathology

- [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 4328.
- [4] 医学名词审定委员会, 放射医学与防护名词审定委员会. 放射医学与防护名词 [M]. 北京: 科学出版社, 2014: 187.
- [5] Helissey C, Cavallero S, Brossard C, et al. Chronic inflammation and radiation-induced cystitis: molecular background and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 10 (1): 21.
- [6] Brossard C, Lefranc A C, Simon J M, et al. Understanding molecular mechanisms and identifying key processes in chronic radiation cystitis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1836.
- [7] Oscarsson N, Ny L, Mölne J, et al. Hyperbaric oxygen treatment reverses radiation induced pro-fibrotic and oxidative stress responses in a rat model [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 103 (2): 248-255.
- [8] Zwaans B, Carabulea A L, Bartolone S N, et al. Voiding defects in acute radiation cystitis driven by urothelial barrier defect through loss of E-cadherin, ZO-1 and Uroplakin III [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 19277.
- [9] Rajaganapathy B R, Janicki J J, Levanovich P, et al. Intravesical liposomal tacrolimus protects against radiation cystitis induced by 3-beam targeted bladder radiation [J]. *J Urol*, 2015, 194 (2): 578-584.
- [10] Zwaans B M, Chancellor M B, Lamb L E. Modeling and treatment of radiation cystitis [J]. *Urology*, 2016, 88 (2): 14-21.
- [11] 扈婷婷, 蔡宏懿. 大鼠急性放射性直肠炎模型的建立 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24 (7): 584-587.
- [12] 马雪梅, 王晓茜, 鲍文华, 等. 大鼠放射性肺损伤模型的建立与探讨 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37 (11): 1385-1388.

• 基础研究 •

可溶性 Jagged1/Fc 对大鼠骨骺干细胞 Notch 信号通路的影响研究

福建省福州市第二医院小儿骨科 (福州 350007) 林 然 吴新武 黄 健 陈顺有¹

【摘 要】 目的 探究可溶性 Jagged1/Fc 对鼠骨骺干细胞 Notch 信号通路的激活及生物学特性的影响。**方法** 将 2 周内 SP 大鼠离体培养获取大鼠骨骺干细胞, 设置不同浓度 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$) 的 Jagged1/Fc 对第 3 代骨骺干细胞进行干预诱导, 体外培养, 在倒置显微镜下观察细胞生长情况, 记录细胞贴壁情况及时间、细胞形态变化及增殖情况, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 及使用 Western 印迹检测 Jagged1/Fc 对骨骺干细胞增殖分化影响。**结果** 经可溶性 Jagged1/Fc 干预诱导后, 与对照组比较, 实验组与对照组细胞形态变化基本类似, 但浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Jagged1/Fc 实验组细胞增殖速度显著加快, 贴壁所需的时间较对照组缩短 ($P < 0.05$)。Collagen II 蛋白表达明显增多, 胶原蛋白 X 表达明显减少。**结论** 单个 Jagged1/Fc 配体可激活 Notch 信号通路, 促进骨骺干细胞增殖的最适浓度是 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

【关键词】 大鼠; 骨骺干细胞; Notch 信号通路; Jagged1/Fc

【中图分类号】 R68 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2022)05-0130-04

Effect of soluble Jagged1/Fc on Notch signaling pathway in rat epiphyseal stem cells LIN Ran, WU Xinwu, HUANG Jian, CHEN Shunyou. *Department of Pediatric Orthopaedics, Fuzhou Second Hospital, Fuzhou, Fujian*

基金项目: 福州市科技计划项目“骨骺干细胞 Notch 信号激活下复合藻酸盐水凝胶支架修复生长板损伤的实验研究”(2019-SZ-19); 福建省科技创新平台项目“福建省创伤骨科急救与康复临床医学研究中心”(2020Y2014)

¹ 通信作者

350007, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of soluble Jagged1/Fc on the activation and biological characteristics of Notch signaling pathway in rat epiphyseal stem cells. **Methods** SP rats within 2 weeks-old were cultured in vitro to obtain rat epiphyseal stem cells. Jagged1/Fc with different concentrations (0.5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ and 2 $\mu\text{g/mL}$) was set to intervene and induce the third generation epiphyseal stem cells. They were cultured in vitro. The cell growth, cell adhesion and time, cell morphological changes and proliferation were observed under inverted microscope, the cell proliferation activity was detected by CCK-8 method, and the effect of Jagged1/Fc on the proliferation and differentiation of epiphyseal stem cells was detected by Western blot. **Results** After the intervention and induction of soluble Jagged1/Fc, the morphological changes of cells in the experimental group were basically similar to those in the control group, but the proliferation rate of cells in the experimental group with jagged1/Fc at the concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ was significantly faster and the time required for adhesion was shorter than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of collagen II protein increased significantly and the expression of collagen X decreased significantly. **Conclusion** Single Jagged1/Fc ligand can activate Notch signaling pathway, and the optimal concentration to promote the proliferation of epiphyseal stem cells is 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

【Key words】 rats; epiphyseal stem cells; Notch signaling pathway; Jagged1/Fc

儿童生长板损伤后修复过程中形成的骨桥常继发生长停滞。这种生长停滞对生长中的儿童的骨骼发育造成了严重的问题,包括发育迟缓或畸形。虽然有不少相关研究,但治疗的结果尚不确定^[1-2]。存在于骺板软骨细胞层中的骨骺干细胞,具有控制生长期动物肢体生长、定向分化、修复生长板损伤的作用。Notch 信号对成骨细胞分化至关重要,有研究表明配体与 Notch 结合可促进骨骺干细胞增殖,抑制 Notch 信号系统时,骨骺干细胞进行分化^[3],但单个 Notch 配体的具体作用尚不清楚。本研究旨在分析 Notch 的配体 Jagged1/Fc 对骨骺干细胞的作用,探讨 Jagged1/Fc 对大鼠骨骺干细胞 Notch 信号通路的影响,为下一步构建生长板可再生材料,应用于修复生长板损伤的临床研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与实验动物: 1) 材料:胎牛血清 FBS (Gibco, USA); DMEM 低糖培养基 (PBS, Hyclone, USA); CCK8 试剂 (上海碧云天生物技术有限公司); 胰蛋白酶 (Gibco, USA); II 型胶原酶 (Sigma, USA); 磷酸盐缓冲液 (PBS, Hyclone, USA); 200 目尼龙过滤网 (Tiangen Biotech, 中国), 主要仪器: SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州安泰仪器设备有限公司); HERA cell CO₂ 培养箱 (德国 Kendro Laboratory Products); ELX808 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司)。2) 实验动物: 2 周龄清洁级 SP 大鼠, 不限雌雄, 由福建中医药大学动物房提供, 动物许可证号为 SYXK (闽) 2014-0005。

1.2 方法:

1.2.1 骨骺干细胞的取材、分离培养及鉴定: 取 2 周龄内 SD 大鼠断颈处死, 75% 酒精浸泡 5 min, 无菌条件下取双侧下肢, 彻底清除附着其上的肌肉组织, 提取培养细胞, 采用 40% 与 50% 浓度梯度的 Percoll 细胞分离液, 分离纯化骨骺干细胞。

1.2.2 分组和干预: 将传代培养所得第 3 代并鉴定成功后的骨骺干细胞悬液, 以每孔以 1×10^4 个细胞接种于 24 孔培养板上, 随机分成对照组和实验组。在实验组中各加入调配好的 Jagged1/Fc (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$), 对照组中加入等量无药 PBS 缓冲液。在之后的 5 d, 每间隔 24 h, 分别从对照组和实验组中各取 3 孔, 用 0.25% 胰蛋白酶

进行充分消化, 并在倒置显微镜下观察并计数。在倒置显微镜下观察培养细胞生长情况、记录细胞贴壁情况及时间、细胞形态变化及增殖情况。取均数绘制生长曲线图。

1.2.3 CCK-8 法检测骨骺干细胞增殖情况: 将诱导后的传代细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔 1×10^4 个细胞。分别在加入药液后于第 12、24、36 h 时间点, 用 CCK-8 检测实验组和对照组骨骺干细胞的存活和增殖变化情况。在酶标检测仪上以调零孔调零, 在光波 = 490 nm 时测定各孔的吸光度值 (A 值)。以时间为横轴, 吸光度值 (A) 为纵轴绘制生长曲线。

1.2.4 Western blot 印迹检测: 用蛋白抽提试剂盒, 抽提上述培养细胞中的蛋白, 用 BCA 蛋白检测试剂盒测定其浓度。按每个样品总蛋白 20 μg 加样, 电泳, 转膜过夜, 封闭 2 h, 加入一抗抗胶原 (1 : 1 000), Anti-collagen II (1 : 1 000), Anti-collagen X (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 水平摇动 24 h, TBS-T (10 mmol/L Tris-HCl + 100 mmol/L NaCl + 0.1% Tween20) 洗膜 3 次, 结合二抗 (1 : 500), 室温孵育 1 h, TBS-T 洗膜 3 次, ECL 试剂显色曝光。

1.3 统计学分析: 应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 法检测 Jagged1/Fc 对骨骺干细胞增殖活性的影响: 对照组和实验组的骨骺干细胞增殖活性, 在第 12、24、36 h 时间点, 实验组 (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 较对照组及另外两个实验组增殖活性显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而对照组、实验组 (1 $\mu\text{g/mL}$)、实验组 (2 $\mu\text{g/mL}$) 比较, 则差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 Jagged1/Fc 对骨骺干细胞增殖活性的影响吸光度值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	12 h	24 h	36 h
对照组	3	0.600 \pm 0.006	0.816 \pm 0.008	1.357 \pm 0.022
实验组				
0.5 $\mu\text{g/mL}$	3	0.667 \pm 0.011	0.881 \pm 0.004	1.543 \pm 0.014
1 $\mu\text{g/mL}$	3	0.584 \pm 0.004	0.794 \pm 0.004	1.403 \pm 0.006
2 $\mu\text{g/mL}$	3	0.588 \pm 0.002	0.796 \pm 0.006	1.383 \pm 0.004

2.2 Jagged1/Fc 对骨髓干细胞生物学作用的影响: 在接种之后的 5 d, 每间隔 24 h 时间点用倒置显微镜分别观察实验组 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和对照组的细胞生长增殖情况 (图 1、图 2), 在 6~7 h 后对照组骨髓干细胞基本完成细胞贴壁, 细胞形态较饱满, 呈上皮样细胞排列生长, 散状分布生长, 细胞重叠生长很少见; 而实验组细胞增殖速度显著加快, 细胞贴壁所需完成时间在 5~6 h 左右。细胞增殖分裂前 5 d 尚未出现高峰, 显微镜下观察两组的细胞形态变化基本类似。两组骨髓干细胞生长曲线见图 3。

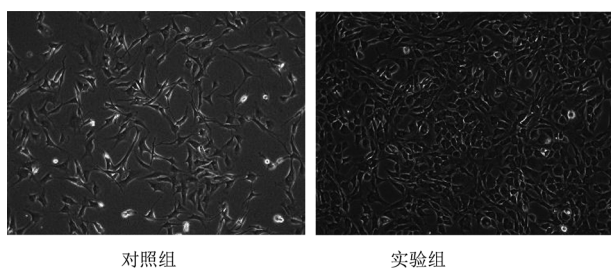


图 1 倒置显微镜下骨髓干细胞培养 3 d 后 ($\times 100$)

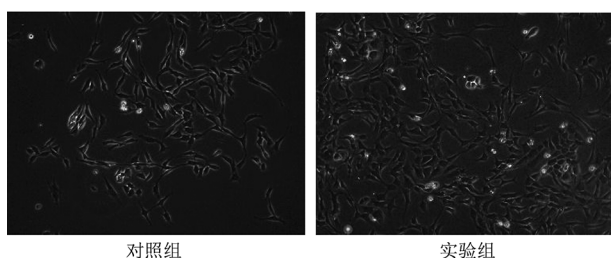


图 2 倒置显微镜下骨髓干细胞培养 5 d 后 ($\times 100$)

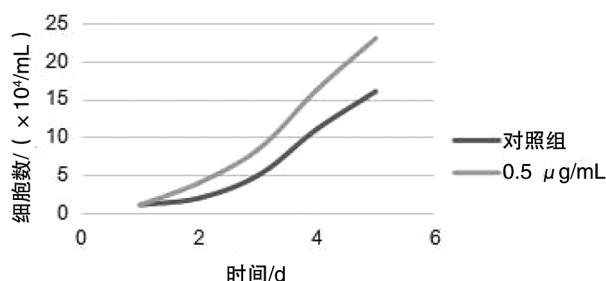
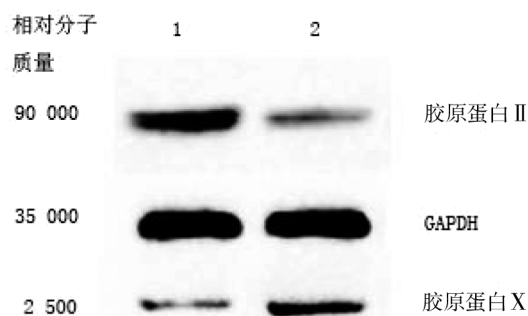


图 3 Jagged1/Fc 对骨髓干细胞生长曲线的影响

2.3 Western blot 印迹检测 Jagged1/Fc 对骨髓干细胞增殖分化影响: 与对照组相比, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Jagged1/Fc 能明显促进胶原 II 表达, 抑制胶原 X 的表达, 由此可知, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Jagged1/Fc 能够抑制骨髓干细胞分化, 促进骨髓干细胞的增殖 (图 4)。

3 讨论

Notch 信号是一种高度保守的途径, 主要通过抑制 MSC/成骨细胞祖细胞分化来调节骨系细胞, 维持 MSC/骨祖细胞库, 从而协调正常骨的形成^[4-8]。研究表明 Notch 信号通路在骨髓干细胞的增殖和分化中通过邻近细胞的相互作用来精确调控^[3], 并通过相关实验证实: 当 Notch 信号系统



注: 1 表示 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Jagged1/Fc 实验组; 2 表示对照组。

图 4 Western blot 印迹检测胶原 II、胶原 X 和 GAPDH 表达

激活时, 骨髓干细胞进行增殖, 反之, 则进行分化。Jagged1 是哺乳动物细胞膜上 Notch 受体的主要配体之一, 与细胞受体 Notch 结合后, 可调节 Notch 信号通路^[9], 但其机制尚无定论, 鉴于从细胞因子水平, 在国内外尚无利用可溶性 Jagged1/Fc 对骨髓干细胞 Notch 信号通路的影响进行比较全面研究的报道。本研究的目的是在体外培养的骨髓干细胞中, 检测 Jagged1/Fc 能否激活 Notch 信号通路, 促进骨髓干细胞的增殖。

Jagged1 与细胞受体 Notch 结合后, 细胞增殖和表达胶原 II 明显增多, 骨髓干细胞增殖旺盛, 说明此时 Notch 信号通路激活^[3]。Maillard 等^[10]证明 Notch 与其配体结合后, 信号系统被激活, 干细胞处于增殖状态。Lawal 等^[11]在缺乏 Jagged1/Fc 的小鼠模型中发现成熟成骨细胞及骨小梁明显增加, 而利用甲状旁腺激素 (PTH) 治疗缺乏 Jagged1/Fc 的小鼠时发现骨髓干细胞层中细胞增殖明显增加, 间接证明配体 Jagged1 与细胞受体 Notch 结合后可激活此信号通路。本研究向体外培养的大鼠骨髓干细胞加入 Jagged1/Fc, 发现骨髓干细胞的增殖, 证明单个 Jagged1 配体可激活 Notch 信号通路。为确定其最适激活浓度, 本研究分别加入不同浓度的 Jagged1/Fc (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 发现不同浓度的 Jagged1/Fc 对骨髓干细胞的增殖作用不尽相同, 实验组 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 较对照组及另外两个实验组增殖活性显著提高。在倒置显微镜下观察到的细胞生长情况、细胞贴壁时间、细胞形态变化及增殖情况, 以及描绘了生长曲线图, 都说明 Jagged1/Fc 可促进骨髓干细胞的增殖, 其最适激活浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时, 通过 Western blot 印迹检测也证实了这点。

综上所述, 单个 Jagged1/Fc 配体可激活 Notch 信号通路, 促进骨髓干细胞增殖的最适浓度是 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 经 Jagged1/Fc 诱导培养的骨髓干细胞在细胞形态上保持骨髓干细胞的生物学特性, 这为今后进一步的骨髓干细胞体外构建可再生材料提供相关参考依据。

参考文献

- [1] Ianotti J P. Growth plate physiology and pathology [J]. Orthop Clin N Am, 1990, 21 (1): 1-17.
- [2] Joyce M E, Jingushi S, Scully S P, et al. Role of growth

- factors in fracture healing [J]. Prog Clin Biol Res, 1991 (365): 391-416.
- [3] 张衣北, 陈安民, 郭风劲, 等. Notch1 信号系统对骨髓干细胞增殖与分化调控作用的初步观察 [J]. 中华医学杂志, 2005, 85 (48): 3430-3434.
- [4] Zanotti S, Canalis E. Notch signaling in skeletal health and disease [J]. Eur J Endocrinol, 2013, 168 (6): 95-103.
- [5] Regan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling [J]. Curr Osteoporos Rep, 2013, 11 (2): 126-129.
- [6] Bai S, Kopan R, Zou W, et al. Notch1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (10): 6509-6518.
- [7] Dong Y F, Jesse A M, Kohn A, et al. RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development [J]. Development, 2010, 137 (9): 1461-1471.
- [8] Hilton M J, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation [J]. Nat Med, 2008, 14 (3): 306-314.
- [9] Weber J M, Forsythe S R, Christianson C A, et al. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells [J]. Bone, 2006, 39 (3): 485-493.
- [10] Maillard I, Fang T, Pear W S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway [J]. Annu Rev Immunol, 2005, 23 (1): 945-974.
- [11] Lawal R A, Zhou X, Batey K, et al. The Notch ligand Jagged1 regulates the osteoblastic lineage by maintaining the osteoprogenitor pool [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32 (6): 1320-1331.

• 基础研究 •

shRNA 沉默 c-myc 基因对 MG-63 骨肉瘤细胞 c-myc/PD-L1 轴的影响

厦门大学附属福州第二医院骨科 (福州 300007) 林东泽

【摘要】 目的 探讨 c-myc 与程序性死亡受体 1 (PD-1) /细胞程序性死亡-配体 1 (PD-L1) 基因在骨肉瘤细胞中的作用机制。**方法** 构建 c-myc 基因的 shRNA 表达载体并转染到 c-myc/PD-L1 高表达的 MG-63 骨肉瘤细胞中, 采用 Real-time PCR 及 Western blot 法检测不同组细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 沉默 c-myc 基因后 MG-63 骨肉瘤细胞中的 PD-1 蛋白表达量显著下降, c-myc、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达量均呈现下降的趋势, 与阴性对照组和空白对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 c-myc 基因能够有效阻断 PD-1/PD-L1 信号通路。

【关键词】 c-myc; PD-L1; PD-1; 骨肉瘤

【中图分类号】 R3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)05-0133-03

骨肉瘤 (osteosarcoma) 是起源于骨的恶性肿瘤, 其发病率高、预后差、5 年生存率低, 给家庭、社会、国家带来了沉重的经济负担和精神伤害^[1]。c-myc (又称 myc) 是一个被广泛研究的原癌基因, 在人类所有肿瘤中, 30% 的患者存在 c-myc 基因过表达, 其编码的转录因子 c-myc 蛋白, 调控着数千个与细胞生长、增殖、分化以及代谢相关的基因^[2]。在许多肿瘤组织学中, c-myc 基因已被证明是肿瘤起始和维持所必需的, 有 c-myc 对整联素关联蛋白 (CD47) 和程序性死亡配体-1 (PD-L1) 表达的调节在 myc 驱动的肿瘤发生的起始和维持中具有直接作用^[3]。基于此, 本研究通过构建 c-myc 基因的 shRNA 表达载体并转染到 c-myc/PD-L1 高表达的 MG-63 骨肉瘤细胞中, 观察 MG-63 骨肉瘤细胞 c-myc、PD-1、PD-L1 mRNA 和蛋白的表达情况, 研究 c-myc 基因在骨肉瘤发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器: c-myc/PD-L1 高表达 MG-63 骨肉瘤细胞系 (福州市第二医院骨科研究所保存); pGenesil-1 质粒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; lipofectamine

TM2000 转染试剂盒、TRAP 活性染色试剂盒、DMEM 培养基 (美国 sigma 公司); 质粒纯化试剂盒 (上海玉博生物科技有限公司)、胎牛血清 (美国 Invitrogen 公司); 恒温细胞培养箱 (上海岛韩实业有限公司); Western blot 电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); Western blot 相关试剂 (美国 Amresco 公司); Real-time PCR 相关试剂 (大连宝生物有限公司); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国应用生物系统公司); Image pro Plus 7.0 图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 c-myc 基因的 shRNA 载体的构建及鉴定: 根据 c-myc (GenBank 编号 NM-002467) mRNA 序列中可能的干扰位点, 由华大基因公司设计合成 1 条 shRNA 片段, 5' 端开始为 19 个核苷酸的正义链, 中间以 9 bp 的茎环 UUCAAGACG 分割反向重复序列, 形成发夹环状结构, 命名为 pC-myc 质粒, 其目的基因序列为 C-myc: AAGCCACAGCATACATCCTGT。同时, 设计合成一段与人基因不同源的 shRNA 片段作为阴性对照 pHK 质粒, 经 Blast Search 检索