

# CD133<sup>+</sup> U87 人脑胶质瘤干细胞放射敏感性和DNA双链断裂损伤修复的实验研究

李平 宗天舟 季晓芹 陆雪官

**【摘要】目的** 探讨 CD133<sup>+</sup> U87 人脑胶质瘤干细胞放射敏感性及 DNA 双链断裂损伤修复的情况。**方法** 选择人脑胶质瘤 U87 细胞系, 采用免疫流式分选技术分选出 CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞; 采用克隆形成实验研究细胞的放射敏感性; 采用中性单细胞凝胶电泳实验检测 4 Gy X 射线垂直照射后不同时间点的 DNA 双链断裂; 采用间接免疫荧光技术检测不同时间点磷酸化组蛋白 H2AX( $\gamma$ -H2AX)荧光灶、Rad51(一种同源重组修复蛋白)荧光灶的表达。**结果** 假照射条件下, CD133<sup>+</sup>细胞克隆的形成率明显高于 CD133<sup>-</sup>细胞 ( $t=3.66$ ,  $P<0.01$ ); CD133<sup>+</sup>细胞经 4 Gy 照射后的克隆形成率无明显变化( $t=0.71$ ,  $P>0.05$ ), 而 CD133<sup>-</sup>细胞经 4 Gy 照射后的克隆形成率下降( $t=2.91$ ,  $P<0.05$ )。4 Gy 照射后 0.5 h, CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞间尾力矩差异无统计学意义( $t=1.44$ ,  $P>0.05$ ), 照射后 6、24 h, CD133<sup>+</sup>细胞尾力矩下降程度大于 CD133<sup>-</sup>细胞 ( $t=5.31$  和  $8.09$ ,  $P<0.01$ ); 照射后 0.5、6 h, CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞间  $\gamma$ -H2AX 灶的表达率差异均无统计学意义( $t=0.12$  和  $0.99$ ,  $P>0.05$ ), 照射后 24 h, CD133<sup>+</sup>细胞的  $\gamma$ -H2AX 灶的表达率下降程度大于 CD133<sup>-</sup>细胞( $t=4.99$ ,  $P<0.01$ ); 照射后 0.5 h, CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞间 Rad51 灶的表达率差异无统计学意义( $t=1.12$ ,  $P>0.05$ ), 照射后 6、24 h, CD133<sup>-</sup>细胞的 Rad51 灶的表达率与 CD133<sup>+</sup>细胞相比明显下降( $t=22.88$  和  $12.43$ ,  $P<0.01$ ), 而 CD133<sup>+</sup>细胞无明显变化。**结论** CD133<sup>+</sup> U87 人脑胶质瘤干细胞具有放射抵抗性, 可能与其照射后 DNA 双链的断裂修复能力较高有关。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 干细胞; 辐射耐受性; DNA 修复; 组蛋白类; Rad51 重组酶

**CD133 positive U87 glioma stem cell radiosensitivity and DNA double-strand break repair** LI Ping, ZONG Tian-zhou, JI Xiao-qin, LU Xue-guan. Department of Radiation Oncology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China

Corresponding author: LU Xue-guan, Email: luxueguanok@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the radiosensitivity and DNA double-strand break repair of CD133<sup>+</sup> U87 glioma stem cell. **Methods** CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells were isolated from glioma U87 cell lines by flow cytometry sorter system. After irradiated vertically by 4 Gy X-rays, the radiosensitivity of cells was determined by clonogenic assay. The radiation-induced DNA double-strand break repair of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells was determined by the neutral comet assay, and the expression of phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX) and Rad51 foci were measured by immunofluorescence. **Results** The clone forming rate of CD133<sup>+</sup> cells was higher than CD133<sup>-</sup> cells ( $t=3.66$ ,  $P<0.01$ ) with no radiation. The clone forming rate of CD133<sup>+</sup> cells irradiated by 4 Gy X-rays has no significant changes compared to that of the non-irradiation cells( $t=0.71$ ,  $P>0.05$ ), but for CD133<sup>-</sup> cells, it decreased compared to non-irradiation cells( $t=2.91$ ,  $P<0.05$ ). The tailmoment between CD133<sup>+</sup> cells and CD133<sup>-</sup> cells had no difference at 0.5 h after irradiation ( $t=1.44$ ,  $P>0.05$ ); the tailmoment of CD133<sup>+</sup> cells was lower than CD133<sup>-</sup> cells at 6 and 24 h after irradiation, respectively( $t=5.31$  and  $8.09$ ,  $P<0.01$ ). There was no significant difference in the expression of  $\gamma$ -H2AX foci between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells at 0.5 and 6 h after irradiation( $t=0.12$  and  $0.99$ ,  $P>0.05$ ),  $\gamma$ -H2AX foci of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.03.007

基金项目: 2011 年江苏省“科教兴卫”医学重点人才项目 (NO.144); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者单位: 215004, 苏州大学附属第二医院放疗科

通信作者: 陆雪官 (Email: luxueguanok@yahoo.com.cn)

CD133<sup>+</sup> cells was significantly decreased compared to CD133<sup>-</sup> cells at 24 h after irradiation ( $t=4.99, P<0.01$ ). For Rad 51 foci, there was no difference between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells at 0.5 h after irradiation ( $t=1.12, P>0.05$ ). The expression of Rad 51 foci of CD133<sup>-</sup> cells was decreased compared to that of CD133<sup>+</sup> cells at 6 and 24 h after irradiation, respectively ( $t=22.88$  and  $12.43, P<0.01$ ). And the expression of Rad51 foci of CD133<sup>+</sup> cells had no significant changes at 6-24 h after irradiation. **Conclusions** Glioma stem cells is more radioresistive than glioma non-stem cells. The probable mechanism is that the DNA double-strand break repair capacity of glioma stem cells is more powerful than non-stem cells.

**【Key words】** Glioma; Stem cells; Radiation tolerance; DNA repair; Histones; Rad51 recombinase

脑胶质瘤在治疗上主要采用手术加术后放射治疗,而部分不能手术或者拒绝手术的患者,单纯放疗可能是唯一的治疗方法。但是目前的治疗效果令人不甚满意,治疗失败的主要原因为局部肿瘤未控和复发。有研究表明,脑胶质瘤是干细胞疾病,干细胞的放射抵抗可能是治疗失败的根源<sup>[1-2]</sup>。因此,研究脑胶质瘤干细胞的放射敏感性及其可能的原因显得尤为重要。为此,本研究选用人脑胶质瘤细胞系 U87,采用免疫流式分选技术,分选出人脑胶质瘤干细胞,在研究放射敏感性的基础上进一步研究 DNA 双链断裂的损伤修复。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

人脑胶质瘤细胞系 U87 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, U87 细胞常规培养于 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清)中,置于 5%CO<sub>2</sub> 孵箱 37℃ 孵育。DMEM 培养基培养传代至所需数量,收集 U87 细胞,加入含 20 ng/μl 重组人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、20 ng/μl 重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、20 ng/μl B27 添加剂的 DMEM/F12 无血清培养液(bFGF、EGF 购自美国 Invitrogen 公司, B27 购自美国 Gibco 公司)中继续培养 1 周,获取 CD133<sup>+</sup>细胞富集的悬浮肿瘤细胞球。

### 1.2 流式细胞仪分选 CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞

收集 CD133<sup>+</sup>细胞富集的肿瘤细胞球,用 0.25%胰酶消化吹打成单细胞悬液,然后标上 AC133 抗体(德国 Miltenyi Biotec 公司),以藻红蛋白标记的鼠抗人免疫球蛋白 G1(德国 Miltenyi Biotec 公司)作为对照标记。经美国 Beckman Coulter 流式细胞仪分选,收集 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞。

### 1.3 细胞照射及克隆形成实验

将分选后的 CD133<sup>+</sup>细胞加入干细胞培养液中

培养 24 h, CD133<sup>-</sup>细胞加入含血清的 DMEM 培养液中培养 24 h,随后收集细胞,制备成单细胞悬液并调整至一定浓度后接种于经 0.1%多聚左旋赖氨酸(美国 Sigma 公司)预处理的 6 孔培养板中。待细胞完全贴壁后,用德国西门子公司 Primus 直线加速器 6 MV X 射线垂直照射。源靶距 100 cm,吸收剂量率 2 Gy/min,每组细胞分别以假照射(0 Gy)和 4 Gy 剂量照射。照射后置于 5%CO<sub>2</sub> 孵箱 37℃ 培养 12 d 后终止培养。用磷酸盐缓冲液冲洗培养板 2 遍,1 ml 甲醇固定 10 min,0.1%姬姆萨液 100 μl 染色 15 min。用清水冲去多余染料,待自然干燥后计数每孔中形成的克隆数(≥50 个细胞为计数克隆的标准)。克隆形成率(%)=细胞克隆数/接种细胞数×100%。

### 1.4 中性单细胞凝胶电泳

将分选后的 CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞培养 24 h,再按 1.3 节中的方法进行照射。分别于照射后 0.5、6、24 h 进行中性单细胞凝胶电泳实验,并以假照射条件下的细胞作为对照。中性单细胞凝胶电泳实验参照张军宁等<sup>[3]</sup>的方法并进行调整,具体操作方法如下:①将正常熔点琼脂糖(0.9%)100 μl 均匀铺在磨砂载玻片上,然后将 100 μl 约含 1000 个细胞的低熔点琼脂糖(0.8%)均匀铺在其上面;②将玻片浸入新配的中性裂解液(2 mol/L NaCl, 30 mmol/L 乙二胺四乙酸, 10 mmol/L Tris, 1%肌氨酸钠, 1% Triton X-100, 10%二甲基亚砷, pH 8.2~8.5; NaCl、乙二胺四乙酸、二甲基亚砷购自上海恒信化学试剂有限公司, Tris、肌氨酸钠、Triton X-100 购自北京索来宝公司)中,于 4℃ 裂解 2 h;③取出玻片,用磷酸盐缓冲液浸没漂洗 3 次;④将玻片置于 0.5%TBE 电泳缓冲液(2 mmol/L 乙二胺四乙酸, 90 mmol/L Tris, 90 mmol/L 硼酸, pH 8.2~8.5; 硼酸购自上海恒信化学试剂有限公司)中解旋 30 min 后,在电压 30 V、电流 18 mA 的条件下电泳

30 min; ⑤取出玻片用 2 μg/ml 的溴化乙锭 100 μl 染色, 在荧光显微镜下随机摄取彗星图像。

1.5 间接免疫荧光法检测磷酸化组蛋白 H2AX (phosphorylated histone H2AX, γ-H2AX) 荧光灶和 Rad 51(一种同源重组修复蛋白) 荧光灶

将分选后的 CD133<sup>+</sup>、CD133<sup>-</sup>细胞爬片培养 24 h, 再按 1.3 节中的方法进行照射。分别于照射后 0.5、6、24 h 进行以下处理, 并以假照射条件下的细胞作为对照。具体步骤如下: ①多聚甲醛固定 10 min 后, 用 0.5% TritonX-100 4 °C 通透 30 min; ②用含 10% 羊血清封闭液室温封闭 1 h; ③用 γ-H2AX 一抗(美国 Upstate Biotechnology 公司)以 1:500 的比例或 Rad51 一抗(英国 Abcam 公司)以 1:200 的比例 4 °C 孵育过夜; ④加入 1:500 稀释的羊抗小鼠二抗 Alexa Fluor 633(美国 Invitrogen 公司)或 1:1000 稀释的羊抗小鼠二抗 Alexa Fluor 488 (美国 Invitrogen 公司)室温避光孵育 1 h; ⑤用碘化丙啶(美国 Invitrogen 公司)避光常温染核 10 min; ⑥用抗荧光淬灭封片液封片。以上各步骤完成后均用磷酸盐缓冲液漂洗 3 次。用德国 Leica 激光共聚焦显微镜随机扫描各组 γ-H2AX 或 Rad51 荧光灶。每个实验重复 3 遍, 取平均值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所有实验结果均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞分选

本实验中, 由于 U87 单细胞悬液中加入藻红蛋白标记的 CD133 抗体, 经过流式细胞仪分选后, 得到细胞膜表面有 CD133 表达的细胞(CD133<sup>+</sup>细胞)和无 CD133 表达的细胞(CD133<sup>-</sup>细胞), 见图 1。

2.2 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞放射敏感性的比较

U87 细胞系在假照射条件下, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞的克隆形成率分别为 5.33% 和 1.50%, 前者显著高于后者 (*t* = 3.66, *P* < 0.01); 4 Gy 照射后, CD133<sup>+</sup>细胞的克隆形成率为 4.50%, 与假照射组相比差异无统计学意义(*t* = 0.71, *P* > 0.05), CD133<sup>-</sup>细胞的克隆形成率为 0.33%, 与假照射组相比明显下降(*t* = 2.91, *P* < 0.05)。实验结果表明, CD133<sup>+</sup>细胞

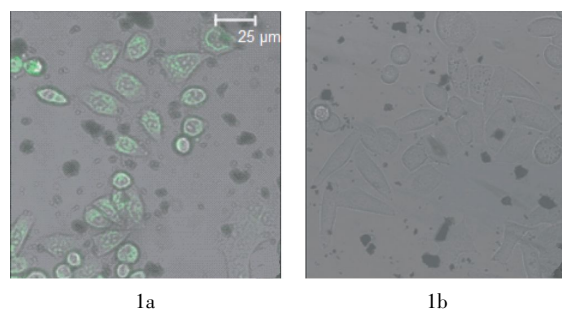


图 1 采用流式细胞仪分选 CD133<sup>+</sup>及 CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤 U87 细胞 (藻红蛋白染色, ×400) 图中, 1a: CD133<sup>+</sup>细胞(有绿色荧光); 1b: CD133<sup>-</sup>细胞(无绿色荧光)。

的放射敏感性显著低于 CD133<sup>-</sup>细胞。

2.3 辐射对 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞 DNA 的损伤

采用中性单细胞凝胶电泳实验初步研究分选后的干细胞及非干细胞在 0 Gy 和 4 Gy 照射后 0.5、6、24 h 的 DNA 双链断裂情况。DNA 双链断裂水平通过尾力矩表示。实验中发现, 假照射条件下, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞的 DNA 双链断裂程度差异无统计学意义(*t* = 1.67, *P* > 0.05); 4 Gy 照射后 0.5 h, 两种细胞的 DNA 双链断裂程度均明显增加, 但损伤程度差异无统计学意义(*t* = 1.44, *P* > 0.05); 4 Gy 照射后 6、24 h, CD133<sup>+</sup>细胞的 DNA 双链断裂程度与 CD133<sup>-</sup>细胞相比均有下降(*t* = 5.31 和 8.09, *P* < 0.01), 其中, CD133<sup>-</sup>细胞在照射后 24 h 的 DNA 双链断裂程度接近假照射时水平(*t* = 1.56, *P* > 0.05), 而 CD133<sup>+</sup>细胞的 DNA 双链断裂程度进一步减小, 至 24 h 时已经远远低于假照射时的水平(*t* = 16.28, *P* < 0.01)。实验结果表明, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞在 4 Gy 照射后的 DNA 损伤均有一定程度的修复, 而前者的修复能力远远高于后者(表 1, 图 2)。

表 1 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤 U87 细胞在 4 Gy X 射线照射后不同时间 DNA 尾力矩的测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

细胞	样本数	假照射	照后 0.5 h	照后 6 h	照后 24 h
CD133 <sup>-</sup>	150	1.52±0.14	5.36±0.26	2.31±0.14	1.91±0.22
CD133 <sup>+</sup>	150	1.26±0.07	4.99±0.04	1.23±0.15	0.17±0.02

实验中进一步采用 γ-H2AX 作为辐射后 DNA 双链断裂损伤的观察指标。实验结果发现, 假照射条件下, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞均有 γ-H2AX 灶的低水平表达 (*t* = 0.28, *P* > 0.05); 4 Gy 照射后 0.5 h, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞的 γ-H2AX 灶表达水平显著上升(*t* = 16.37 和 12.48, *P* < 0.01), 而两者间差异无

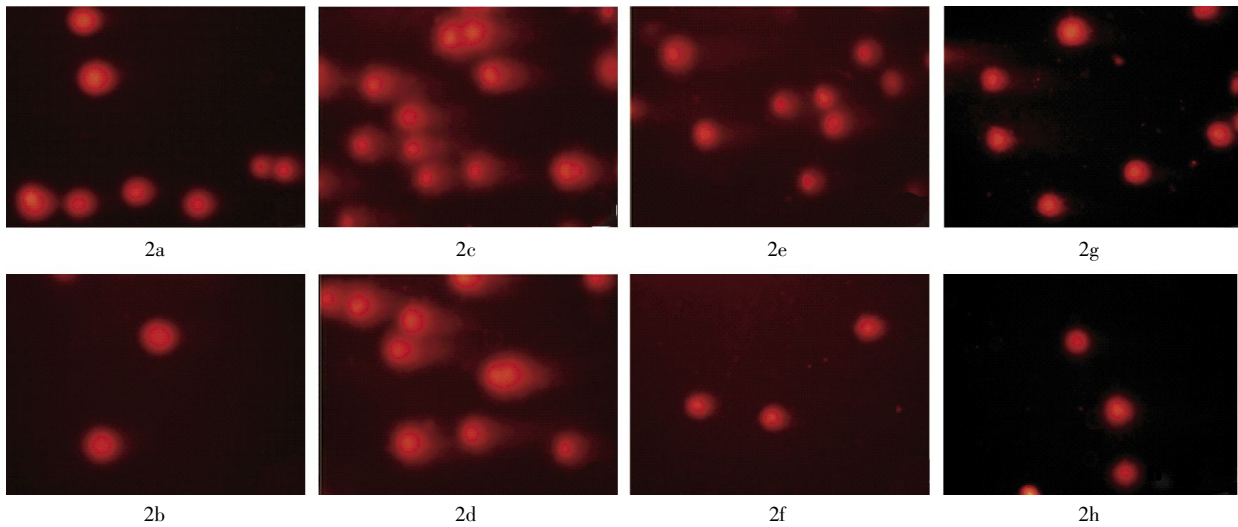


图2 CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤U87细胞经4 Gy X射线照射前后的彗星图像(溴化乙锭染色, ×400)图中, 2a: CD133<sup>+</sup>细胞照射前; 2b: CD133<sup>-</sup>细胞照射前; 2c: CD133<sup>+</sup>细胞照射后0.5 h; 2d: CD133<sup>-</sup>细胞照射后0.5 h; 2e: CD133<sup>+</sup>细胞照射后6 h; 2f: CD133<sup>-</sup>细胞照射后6 h; 2g: CD133<sup>+</sup>细胞照射后24 h; 2h: CD133<sup>-</sup>细胞照射后24 h。

统计学意义( $t=0.12$ ,  $P>0.05$ ), 且在照射后6 h两种细胞的 $\gamma$ -H2AX灶的表达仍维持在较高的水平, 但两者间差异仍无统计学意义( $t=0.99$ ,  $P>0.05$ ); 照射后24 h, 两种细胞的 $\gamma$ -H2AX灶的表达水平明显下降( $t=8.64$ 和 $5.02$ ,  $P<0.01$ ), 且CD133<sup>+</sup>细胞的下降程度明显大于CD133<sup>-</sup>细胞( $t=4.99$ ,  $P<0.01$ )。这种结果可能与CD133<sup>+</sup>细胞的修复能力远高于CD133<sup>-</sup>细胞有关(表2, 图3)。

#### 2.4 辐射后CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞DNA损伤的修复

同源重组是哺乳动物DNA双链断裂重要的修复方式, Rad51荧光灶被认为是同源重组修复的标志<sup>[4]</sup>。本研究中CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞在假照射时的Rad51灶表达率差异无统计学意义( $t=2.41$ ,  $P>0.05$ ); 4 Gy照射后0.5 h内就能检测到Rad51灶的高表达( $t=36.65$ 和 $32.80$ ,  $P<0.01$ ), 而这两种细胞之间的表达率差异无统计学意义( $t=1.12$ ,  $P>$

$0.05$ ); 照射后6 h, CD133<sup>+</sup>细胞Rad51灶的表达率与照射后0.5 h相比仍维持在较高水平( $t=1.91$ ,  $P>0.05$ ), 而CD133<sup>-</sup>细胞则下降( $t=20.64$ ,  $P<0.01$ ), 两种细胞之间的表达率差异有统计学意义( $t=22.88$ ,  $P<0.01$ ); 照射后24 h, CD133<sup>+</sup>细胞Rad51灶的表达率与CD133<sup>-</sup>细胞相比差异有统计学意义( $t=12.43$ ,  $P<0.01$ ), 而CD133<sup>+</sup>细胞的Rad51灶的表达率与照射后6 h相比无明显变化( $t=0.47$ ,  $P>0.05$ ), 即照射后6~24 h, CD133<sup>+</sup>细胞的Rad51灶的表达率未见明显变化, CD133<sup>-</sup>细胞的Rad51灶的表达率与照射后6 h相比继续降低( $t=2.86$ ,  $P<0.05$ )。这一结果表明CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>细胞在辐照初期均有修复, 但随着时间的增加, CD133<sup>+</sup>细胞在24 h内仍能保持在较高的修复水平, 而CD133<sup>-</sup>细胞的修复能力持续下降(表3, 图4)。

表2 CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤U87细胞在4 Gy X射线照射后不同时间 $\gamma$ -H2AX灶的表达率( $\bar{x}\pm s$ )

细胞	样本数	假照射	照后0.5 h	照后6 h	照后24 h
CD133 <sup>+</sup>	100	11.76±2.78	74.09±2.60	60.52±9.30	41.39±2.75
CD133 <sup>-</sup>	100	10.39±3.99	74.59±3.25	70.36±3.48	56.82±1.42

注: 表中,  $\gamma$ -H2AX: 磷酸化组蛋白H2AX。

表3 CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤U87细胞在4 Gy X射线照射后不同时间Rad51灶的表达率( $\bar{x}\pm s$ )

细胞	样本数	假照射	照后0.5 h	照后6 h	照后24 h
CD133 <sup>+</sup>	100	24.48±0.43	72.72±2.98	69.54±1.11	68.29±2.43
CD133 <sup>-</sup>	100	22.56±0.67	68.61±2.13	37.93±0.83	33.14±1.46

注: 表中, Rad51: 一种同源重组修复蛋白。

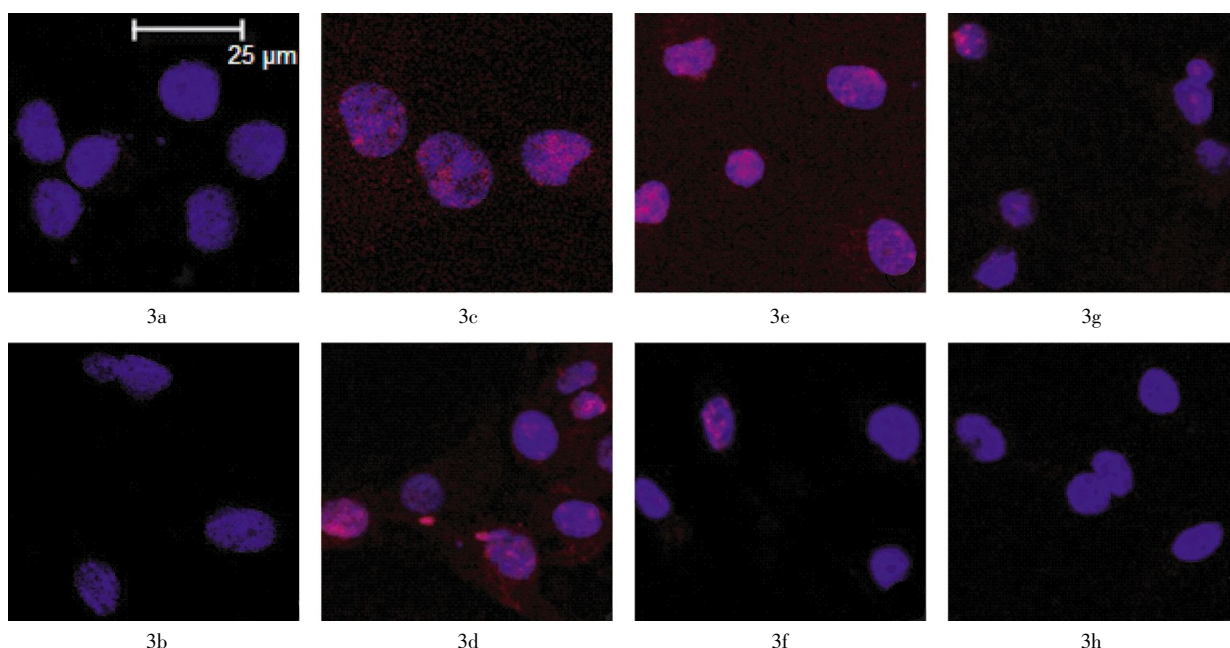


图3 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤 U87 细胞经 4 Gy X 射线照射前后磷酸化组蛋白 H2AX 荧光灶的表达情况 (蓝色为细胞核, 经 4',6-二脒基-2-苯基吡啶染色, 红色为磷酸化组蛋白 H2AX 荧光灶, 经羊抗小鼠二抗 Alexa Fluor 633 染色, ×800) 图中, 3a: CD133<sup>-</sup>细胞照射前; 3b: CD133<sup>+</sup>细胞照射前; 3c: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 0.5 h; 3d: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 0.5 h; 3e: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 6 h; 3f: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 6 h; 3g: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 24 h; 3h: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 24 h。

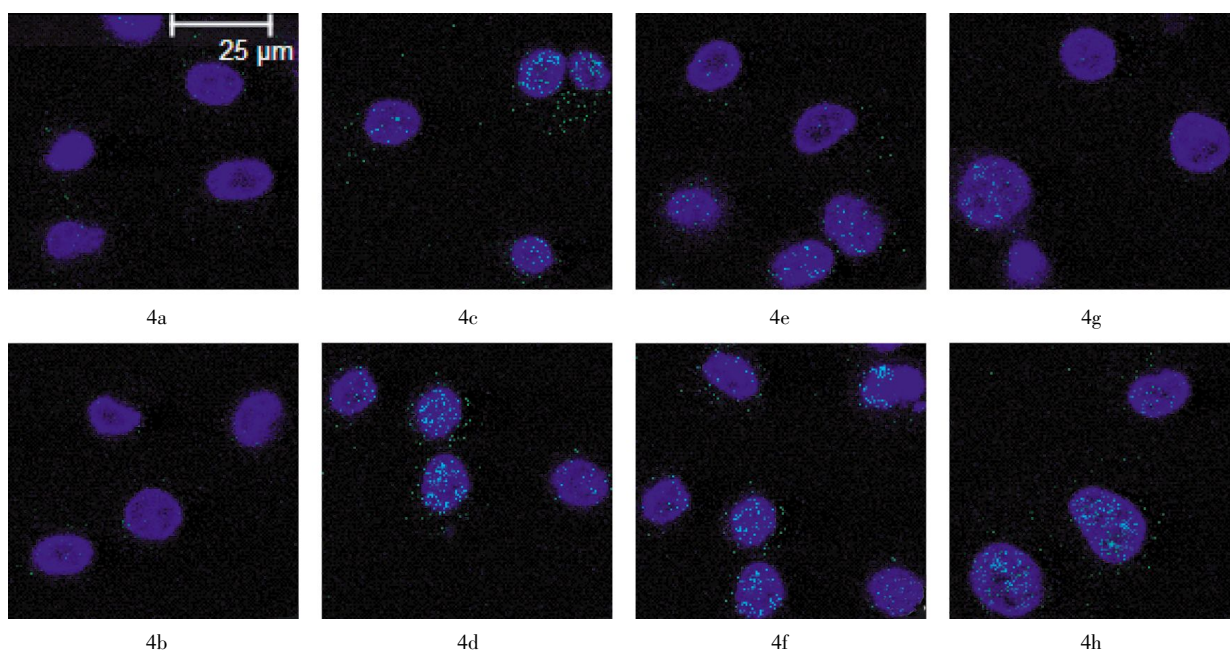


图4 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤 U87 细胞经 4 Gy X 射线照射前后 Rad51 (一种同源重组修复蛋白) 荧光灶的表达情况 (蓝色为细胞核, 经 4',6-二脒基-2-苯基吡啶染色, 绿色为 Rad51 荧光灶, 经羊抗小鼠二抗 Alexa Fluor 488 染色, ×800) 图中, 4a: CD133<sup>-</sup>细胞照射前; 4b: CD133<sup>+</sup>细胞照射前; 4c: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 0.5 h; 4d: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 0.5 h; 4e: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 6 h; 4f: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 6 h; 4g: CD133<sup>-</sup>细胞照射后 24 h; 4h: CD133<sup>+</sup>细胞照射后 24 h。

### 3 讨论

近年来的研究认为, 脑胶质瘤中存在极少量的

一些细胞, 它们在脑胶质瘤的发生、发展中起着决定性的作用, 即脑胶质瘤干细胞<sup>[1]</sup>。Singh 等<sup>[9]</sup>通过体外培养发现, 移植 100 个 CD133<sup>+</sup>胶质瘤细胞即

能形成肿瘤,而移植  $1 \times 10^6$  个 CD133<sup>-</sup>细胞却不能形成肿瘤,只是在注射部位形成胶质瘢痕。这提示 CD133<sup>+</sup>胶质瘤细胞可能是肿瘤干细胞。目前对脑胶质瘤干细胞放射敏感性的研究更多的是基于 CD133<sup>+</sup>细胞富集的干细胞球,但是其中的 CD133<sup>+</sup>细胞也只占很少一部分。因此,采用免疫流式分选技术分选出 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞进行研究则更有意义。

在实验放射肿瘤学中,克隆形成分析法被认为是离体检测细胞内在放射敏感性的“金标准”。本实验中首先采用克隆形成法研究分选后细胞的放射敏感性,结果发现 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞经 4 Gy 照射后,前者的克隆形成率无明显变化,而后者则显著下降,且在照射前 CD133<sup>+</sup>细胞的克隆形成率就明显高于 CD133<sup>-</sup>细胞,表明 CD133<sup>+</sup>细胞有着明显的辐射抗性,这也与 Bao 等<sup>[2]</sup>报道的结果相同。

辐射作用的主要生物靶分子是 DNA,辐射所致 DNA 双链断裂难以修复,是最常见的细胞致死性损伤方式<sup>[6]</sup>。因此, DNA 双链断裂损伤以及其后的修复程度最终决定了细胞是否能够成活。有研究发现, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>脑胶质瘤细胞亚群在受到相同剂量的照射后所产生的 DNA 损伤程度相同,但 CD133<sup>+</sup>脑胶质瘤细胞亚群的 DNA 损伤后的修复效率更高<sup>[2]</sup>。采用 Olive 等<sup>[7]</sup>建立的中性微凝胶电泳技术在检测 DNA 双链断裂的实验中发现, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞在假照射时的 DNA 双链断裂程度并没有不同,4 Gy 照射后两种细胞 DNA 的损伤程度也无明显差别。但在照射后 24 h, CD133<sup>+</sup>细胞的 DNA 损伤程度与 CD133<sup>-</sup>细胞相比明显减少,甚至低于假照射时的 DNA 损伤水平。该结果表明 CD133<sup>+</sup>细胞的修复程度远高于 CD133<sup>-</sup>细胞。

DNA 损伤后会产生一系列的损伤应答反应,其中,效应器 H2AX 的迅速磷酸化被认为是 DNA 双链断裂修复过程中最早且最具有决定性的事件<sup>[8-9]</sup>。研究发现,  $\gamma$ -H2AX 能够被快速诱导,其特异性荧光抗体能够在 DNA 双链断裂周围形成灶,  $\gamma$ -H2AX 灶和 DNA 双链断裂在数量上具有一一对应的关系<sup>[10]</sup>。因此,  $\gamma$ -H2AX 也被认为是 DNA 双链断裂的标志。通过间接免疫荧光技术观察照射后不同时间点  $\gamma$ -H2AX 灶的变化情况,可以判断肿瘤干细胞及非干细胞受到照射后 DNA 双链断裂的损伤及修复情况。本实验中发现 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞经 4 Gy 照射后

0.5 h,  $\gamma$ -H2AX 荧光灶的表达率基本相同,照射后 24 h,两种细胞  $\gamma$ -H2AX 灶的表达率均有下降,且 CD133<sup>+</sup>细胞  $\gamma$ -H2AX 灶的表达率下降程度明显大于 CD133<sup>-</sup>细胞,这与以上中性单细胞凝胶电泳的结果一致。

DNA 双链断裂修复的主要方式包括核苷酸切除修复、碱基切除修复、错配修复、同源重组修复和非同源性末端连接。有研究表明,同源重组修复在人脑胶质瘤细胞 DNA 双链断裂的修复中起主导作用<sup>[11]</sup>, Rad51 灶被认为是同源重组修复的标志<sup>[4]</sup>。Rad51 灶是具有酶活力的亚核结构,电离辐射等引起 DNA 双链断裂修复过程中, Rad51 灶的形成是非常重要的步骤,在电离辐射等导致 DNA 损伤中有较高的水平<sup>[12]</sup>。Amy 等<sup>[6]</sup>检测了人脑胶质瘤 U87 细胞经 2 Gy 照射后 Rad51 灶的表达情况,结果发现照射后 1 h 内就能检测到 Rad51 灶的表达,1 h 后表达开始减少,并在 24 h 后回到假照射时水平。本实验发现, CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞经 4 Gy 照射后 0.5 h 即可检测到 Rad51 灶的表达,且两者的表达率差异无统计学意义;照射后 6、24 h, CD133<sup>+</sup>细胞 Rad51 灶的表达率仍维持在较高水平,变化不大,但在 U87 细胞中占较大比例的 CD133<sup>-</sup>细胞的 Rad51 灶的表达率明显下降,接近假照射时水平。由此看来,随着修复时间的延长, CD133<sup>-</sup>细胞的 Rad51 灶的表达率显著下降,而 CD133<sup>+</sup>细胞仍然维持在较高水平。这可能是由于 CD133<sup>+</sup>细胞经电离辐射后对 DNA 双链断裂修复的“保持能力”高于 CD133<sup>-</sup>细胞。

由此可见, CD133<sup>+</sup>细胞的放射敏感性低于 CD133<sup>-</sup>细胞,这种现象的原因可能是电离辐射后 CD133<sup>+</sup>细胞对 DNA 双链断裂的修复能力高于 CD133<sup>-</sup>细胞。

#### 参 考 文 献

- [1] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63 (18): 5821-5828.
- [2] Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 2006, 444(7120): 756-760.
- [3] 张军宁,朱寿彭,洪承皎.中性单细胞电泳检测肿瘤细胞放射敏感性. *中华放射医学与防护杂志*, 2003, 23(3): 166-168.
- [4] Tashiro S, Walter J, Shinohara A, et al. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol*, 2000,

- 150(2): 283-291.
- [ 5 ] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [ 6 ] McCord AM, Jamal M, Williams ES, et al. CD133<sup>+</sup> glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5145-5153.
- [ 7 ] Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res*, 1993, 136(1): 130-136.
- [ 8 ] Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, et al. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*, 2000, 10(15): 886-895.
- [ 9 ] Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 2002, 296(5569): 922-927.
- [ 10 ] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5858-5868.
- [ 11 ] Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, et al. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15402-15410.
- [ 12 ] Tarsounas M, Davies D, West SC. BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene*, 2003, 22(8): 1115-1123.
- (收稿日期: 2012-11-26)

(上接第 145 页)

提高受照小鼠的骨髓 DNA 含量和脾结节数、增大脾系数和胸腺系数、使血小板数得到一定的恢复。同时,从实验结果中可以看出,4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯的小剂量给药组对脏器系数和造血系统的影响都呈现出更好的效果,这提示我们,这两种化合物抗辐射作用的发挥可能与某种特定的机制相关联,而不是简单的剂量效应。另外,这两种化合物对骨髓中 DNA 含量的变化均产生了明显的增加效应,对骨髓有核细胞数和白细胞数也有一定的影响,但却并未观察到显著的变化趋势,这可能与实验设置的观察时间有一定关系,机体对辐射损伤的修复需要一个相对的周期,骨髓中 DNA 含量开始增加,表示细胞已经开始进行有丝分裂,机体已着手准备对损伤的修复,但在观察周期内还未影响到骨髓有核细胞数和白细胞数的增加,所以实验中骨髓有核细胞数和白细胞数的观察数据并未出现显著性差异。

综上所述,本实验结果表明,4-甲基苯丙烯酸丹皮酚酯和 4-氟苯丙烯酸丹皮酚酯均能使辐射损伤小鼠的造血功能和免疫功能得到一定程度的恢

复,表明这两种化合物对辐射损伤具有一定的保护作用,但其抗辐射作用与相关机制的阐明需要进一步地深入研究。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] 章灵华,肖培根,黄艺,等.丹皮酚的药理与临床研究进展. *中国中西医结合杂志*, 1996, 16(3): 187-190.
- [ 2 ] 戴敏,刘青云,顾承刚,等.丹皮酚对脂质过氧化反应及低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用. *中国中药杂志*, 2000, 25(10): 625-627.
- [ 3 ] Upasani CD, Balaraman R. Protective effect of Spirulina on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. *Phytother Res*, 2003, 17(4): 330-334.
- [ 4 ] Lee SC, Kwon YS, Son KH, et al. Antioxidative constituents from *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(7): 775-783.
- [ 5 ] 武继彪,隋在云,管华诗.丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中华中医药学刊*, 2008, 26(9): 1887-1888.
- [ 6 ] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展. *中成药*, 2004, 26(7): 579-582.
- [ 7 ] 应康,王玉珍.丹皮酚对小鼠淋巴细胞转化的影响. *包头医学院学报*, 2001, 17(2): 92-93.

(收稿日期: 2012-09-24)