

· 论 著 ·

DNA 损伤修复基因 XPC 缺失导致间充质干细胞早衰的初步研究

余瑾, 黄亚琴, 杨劲

陆军军医大学细胞生物学教研室, 重庆 400038

摘要: **目的** 观察着色性干皮病 C 组基因(XPC)缺失对间充质干细胞(MSCs)衰老的影响,并探讨其机制。**方法** 分离培养 XPC 敲除(XPC^{-/-})小鼠及野生型(WT)小鼠骨髓 MSCs,流式细胞仪检测培养细胞表面标志表达,CCK8 法检测细胞增殖情况,茜素红染色以及油红 O 染色观察成骨分化及成脂分化能力,衰老相关 β 半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色检测细胞衰老情况,实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测衰老相关基因 P16、P21 mRNA 表达情况。**结果** 分离培养的两组小鼠骨髓来源的 MSCs(mBMSCs)均高表达阳性表面抗原标志物 CD44、CD29,基本不表达阴性表面抗原标志物 CD11b、CD45,但均具有成骨及成脂分化能力。体外培养至 20 PD(群体倍增水平)时,XPC^{-/-}-mBMSCs 中衰老细胞比例(44.41 \pm 5.49)%,明显高于 WT mBMSCs 的(13.17 \pm 1.54)% ($P < 0.01$);与 WT mBMSCs 相比,XPC^{-/-}-mBMSCs 增殖能力明显下降(4 d 时 OD 值:0.18 \pm 0.04 vs 0.36 \pm 0.04, $P < 0.05$;5 d 时 OD 值:0.27 \pm 0.04 vs 0.56 \pm 0.05, $P < 0.01$);XPC^{-/-}-mBMSCs 中 P16 mRNA 相对表达量与 WT 细胞相比无明显差异($P > 0.05$),而 XPC^{-/-}-mBMSCs 中 P21 mRNA 相对表达量明显高于 WT 细胞(3.30 \pm 0.23 vs 1.00 \pm 0.09, $P < 0.01$);XPC 敲除组细胞生长缓慢,出现衰老表型,增殖能力明显下降,SA- β -gal 染色阳性率明显高于野生型细胞($P < 0.01$),衰老相关基因 P21 表达与野生型相比明显上调($P < 0.01$)。**结论** XPC 敲除促进 MSCs 衰老,其机制可能是由于 DNA 损伤累积引起的 P21/P53 信号通路的激活。

关键词: 着色性干皮病 C 组基因; 间充质干细胞; 脱氧核糖核酸损伤修复; 衰老

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)07-0865-05

A preliminary study on premature senescence of mesenchymal stem cells induced by deletion of DNA damage repair gene XPC in mice

YU Jin, HUANG Ya-qing, YANG Jin

Department of Cell Biology Teaching and Research, Army Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract: Objective To observe the effect of xeroderma pigmentosum group C (XPC) deletion on the senescence of mesenchymal stem cells (MSCs) and explore its mechanism. **Methods** Bone marrow-derived MSCs from XPC knockout (XPC^{-/-}) mice and wild-type (WT) mice were isolated and cultured in vitro. Flow cytometry was used to detect the expression of surface markers of cultured cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation. Alizarin red staining and oil red O staining were used to respectively observe the abilities of osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of MSCs. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining was used to detect cell senescence situation. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expressions of aging-related genes P16 and P21 mRNAs. **Results** Bone marrow-derived MSCs of mice(mBMSCs) in both two groups presented high expressions of positive surface markers CD44 and CD29 and basically had no expressions of negative surface markers CD11b and CD45, but they had the abilities of osteogenic differentiation and adipogenic differentiation. During being cultured to 20 PDs (population doubling level) in vitro, the proportion of senescent cells in XPC^{-/-}-mBMSCs was significantly higher than that in WT mBMSCs [(44.41 \pm 5.49)% vs (13.17 \pm 1.54)%, $P < 0.01$]. Compared with WT mBMSCs, the proliferation ability of XPC^{-/-}-mBMSCs decreased significantly (OD value at 4-day: 0.18 \pm 0.04 vs 0.36 \pm 0.04, $P < 0.05$; OD value at 5-day: 0.27 \pm 0.04 vs 0.56 \pm 0.05, $P < 0.01$). There was no significant difference in the relative expression level of P16 mRNA between XPC^{-/-}-mBMSCs and WT mBMSCs ($P > 0.05$), while the relative

expression level of XPC^{-/-} P21 mRNA was significantly higher than that of WT mBMSCs (3.30 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.09 , $P < 0.01$). mBMSCs in XPC^{-/-} mice grew slowly and appeared aging phenotype, and their proliferation ability decreased significantly. The positive rate of SA- β -gal staining of XPC^{-/-} mBMSCs was significantly higher than that of WT mBMSCs ($P < 0.01$). The aging-related gene P21 expression in XPC^{-/-} mBMSCs was significantly up-regulated compared with WT mBMSCs ($P < 0.01$). **Conclusion** XPC deletion promotes senescence of MSCs possibly through the activation of P21 / P53 signaling pathway caused by DNA damage accumulation.

Key words: Xeroderma pigmentosum group C; Mesenchymal stem cells; Deoxyribonucleic acid damage repair; Senescence

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有多向分化潜能的成体干细胞,可分化产生骨、软骨、肌肉、肌腱、脂肪、血管内皮等细胞类型,在干细胞靶向治疗以及组织工程研究中有着良好的应用前景。然而, MSCs 经长期体外培养容易自发性出现细胞核型紊乱、细胞衰老、分化潜能下降的现象,极少数细胞可突破生长阻滞,重获自我更新能力而转化为恶性肿瘤,严重影响其在临床治疗中的安全性^[1-3]。因此,深入研究 MSCs 自稳维护机制,对其临床应用极为重要。

目前认为细胞衰老的重要原因之一是长期 DNA 损伤积累引起的细胞基因组不稳定^[4]。然而, DNA 损伤应答是否是直接决定细胞命运的生长停滞、细胞凋亡或逃脱而发展成癌细胞的关键点? 相关研究仍然缺乏。着色性干皮病 C 组基因(xeroderma pigmentosum group C, XPC)是参与 DNA 损伤早期修复的重要分子,在细胞周期阻滞、细胞凋亡、肿瘤发生等方面有重要作用^[5],鉴于 XPC 在 DNA 损伤应答中的重要作用及其缺失与肿瘤发生、发展的关系,本研究从表型及分子机制两方面初步观察了 XPC 缺失对小鼠骨髓 MSCs 衰老的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物 XPC 基因敲除(XPC^{-/-})小鼠购自美国 Jackson 实验室,饲养于陆军军医大学实验动物中心 SPF 级动物饲养室。 α -MEM 培养基(Hyclone),胎牛血清(Gibico),荧光二抗(FITC)(Invitrogen),小鼠骨髓 MSCs 成脂诱导分化培养基(赛业),小鼠骨髓 MSCs 成骨诱导分化培养基(赛业),小鼠 MSCs 鉴定试剂盒(R&D systems),cDNA 逆转录试剂盒(Bio-rad),荧光定量检测试剂(Bio-rad),衰老相关 β -半乳糖苷酶检测试剂盒(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 细胞培养及表面标志检测 取 6~8 周龄野生型(WT)及 XPC^{-/-}小鼠,脱颈椎法处死小鼠后,将其全部浸泡入 75%乙醇中,消毒 5 min 后取出,剪开腹部皮肤,于髌关节处分离股骨及胫骨,去除骨

组织上的肌肉及结缔组织,将骨组织于含 400 \times 青链霉素的 PBS 溶液中漂洗两次,于骨中段剪开,注射器吸取完全培养基于断端深入骨髓腔内冲洗,收集冲液至离心管中,1 000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入新鲜培养基,重悬细胞,接种于培养皿中,1 只小鼠的细胞可接种于 1 个直径 10 cm 的培养皿。接种 2 d 后进行首次换液。接种 1 周后,细胞生长达到 80% 融合,胰蛋白酶消化进行传代,此时记为第 1 代,以后每次传代时计数,按照公式:群体倍增水平(population doubling, PD)以细胞增殖代数 $[\lg(\text{细胞数}/\text{接种数})/\lg 2]$ 计算。流式细胞术检测两种小鼠骨髓 MSCs 表面标志。

1.2.2 MSCs 多向分化能力检测 细胞成骨分化能力:接种细胞融合度为 30%~40%,成骨诱导分化完全培养基培养,每隔 3 天换液 1 次,诱导 21 d 后,将细胞以 PBS 漂洗 1 次,2% 甲醛固定 20 min, PBS 漂洗,茜素红染色 20 min,蒸馏水洗后镜下观察染色情况。细胞成脂分化能力:培养细胞至融合,换用成脂诱导分化培养基进行培养,每隔 2 天换液 1 次,连续培养 7~14 d 后,将细胞用 PBS 漂洗 10 min,4% 中性甲醛室温固定 10 min,60% 异丙醇作用 5 min,油红 O 避光染色 15 min,60% 异丙醇分色 10 min,苏木素复染,镜下观察染色情况。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力 按每孔 1 000 个细胞量接种细胞至 96 孔板,每块 96 孔板设 5 个复孔,同时铺 5 块板,铺板后每隔 24 h 取出 1 块板,去除培养基后,每孔加入 100 μ l 培养基,10 μ l CCK-8 溶液,并设置培养基空白对照孔。在细胞培养箱内继续孵育 4 h,酶标仪 450 nm 测定吸光度(OD 值)。

1.2.4 衰老相关 β 半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)实验 将细胞接种至 24 孔板中,孔板内预置有多聚赖氨酸处理的 10 mm \times 10 mm 规格盖玻片,培养 24 h 后,取出细胞爬片,用 PBS 漂洗,固定液室温固定 15 min, PBS 漂洗 3 遍,加入染色工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜,苏木素复染 10 min, PBS 漂洗 2 次;显微镜下观察并照相,选取随机视野,计数 100 个细胞,统计染色阳性细胞百分比。

1.2.5 实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)

检测 P16、P21 mRNA 表达情况 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。逆转录采用百乐公司 iscript cDNA Synthesis 试剂盒。Real-time PCR 反应采用百乐公司 qPCR 试剂盒,每个反应体系含 mRNA $1\text{ }\mu\text{g}$, $5\times\text{iScript reaction mix } 4\text{ }\mu\text{l}$, iScript reverse transcriptase $1\text{ }\mu\text{l}$, 加无核酸酶纯水至 $20\text{ }\mu\text{l}$ 体积。P16 上游引物: $5'\text{-CTC AAC GCC GAA GGG GCT GG-3'}$, 下游引物: $5'\text{-CCG CGC GCT GAA TCC TCA CA-3'}$ 128bp; P21 上游引物: $5'\text{-TTG TCG CTG TCT TGC ACT CTG GT-3'}$, 下游引物: $5'\text{-AGA CCA ATC TGC GCT TGG AGT GAT-3'}$ 139 bp; 内参为 GAPDH, 上游引物: $5'\text{-ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG-3'}$, 下游引物: $5'\text{-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TC-3'}$ 200 bp。反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C } 3\text{ min}$, $95\text{ }^{\circ}\text{C } 10\text{ s}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C } 30\text{ s}$, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算各检测因子 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理分析。连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 并绘制条形图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

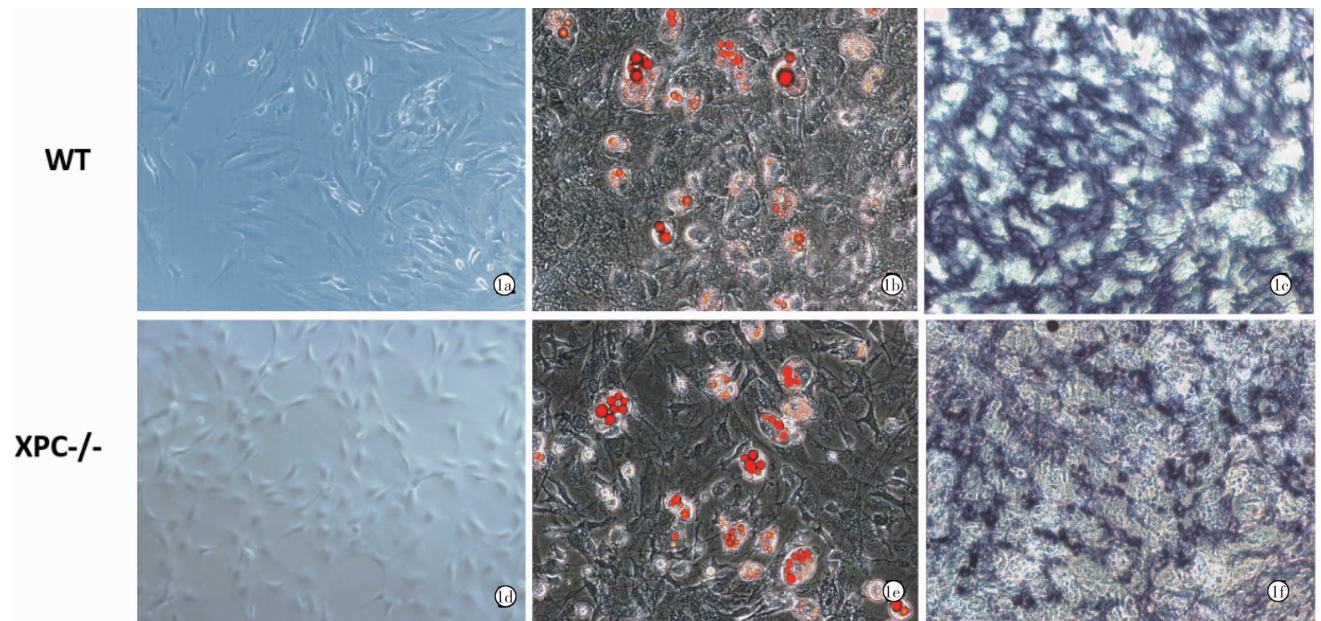
2.1 mBMSCs 的体外培养 全骨髓法培养 WT 小鼠及 XPC-/- 小鼠骨髓间充质干细胞(mice bone marrow derived mesenchymal stem cells, mBMSCs), 接种 2 d 后首次换液, 去除未贴壁细胞, 培养 1 周左右, 细胞可达

到 80% 融合, 此时进行传代。此后每次传代时根据细胞数目计算细胞 PD。贴壁细胞呈典型的成纤维细胞状, 融合时呈旋涡状生长, 倍增时间为 48 h 左右。经成骨及成脂分化诱导后, 茜素红及油红 O 染色显示, 细胞具有成骨及成脂分化能力。见图 1。

2.2 流式细胞技术检测 mBMSCs 表面标志 选取 8 PD 左右细胞, 采用流式细胞技术检测 mBMSCs 表面标志表达情况。结果显示, WT mBMSCs 和 XPC-/- mBMSCs 均高表达阳性标志 CD44、CD29; 基本不表达阴性标志 CD11b、CD45。见图 2。

2.3 两种 mBMSCs 增殖和细胞衰老情况 长期培养 WT 及 XPC-/- mBMSCs, 镜下观察细胞形态(图 3a、3c), XPC-/- 细胞在培养 20 PD 左右即出现典型的衰老表型, 细胞变大扁平, 胞质颗粒及空泡增多, 增殖速度减慢, 而 WT 细胞形态无明显变化, 倍增 50 PD 左右才出现增殖减慢的现象。通过 SA- β -gal 染色法检测细胞衰老情况(图 3b、3d), 结果显示(图 3e)体外培养 20 PD 后 XPC-/- mBMSCs 中衰老细胞比例为 $(44.41 \pm 5.49)\%$, 明显高于 WT mBMSCs $(13.17 \pm 1.54)\%$ ($P < 0.01$)。采用 CCK8 检测细胞增殖能力, 结果显示(图 3f)与 WT mBMSCs 相比, XPC-/- mBMSCs 增殖能力明显下降(4 d OD 值: 0.18 ± 0.04 vs 0.36 ± 0.04 , $P < 0.05$; 5 d OD 值: 0.27 ± 0.04 vs 0.56 ± 0.05 , $P < 0.01$)。

2.4 两种 mBMSCs P16 及 P21 mRNA 表达情况 细胞衰老相关的信号通路主要有两条, 分别为 P16/RB 信号通路和 P21/P53 信号通路。为了探究是何种通



注: 1a、1d: 相差显微镜下 WT 及 XPC-/- mBMSCs 形态; 1b、1e: 成脂诱导后, 油红 O 染色观察成脂情况; 1c、1f: 成骨分化诱导后, 茜素红染色观察成骨情况。

图 1 体外培养 WT 及 XPC-/- 两种 mBMSC 的形态及特性

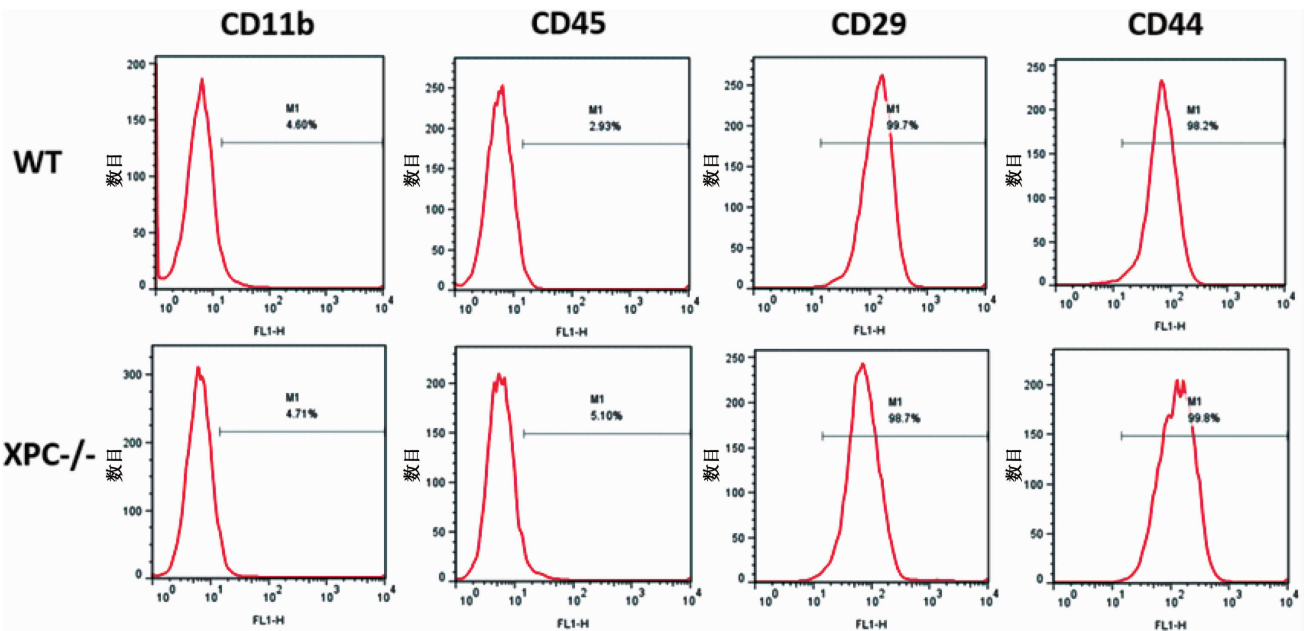
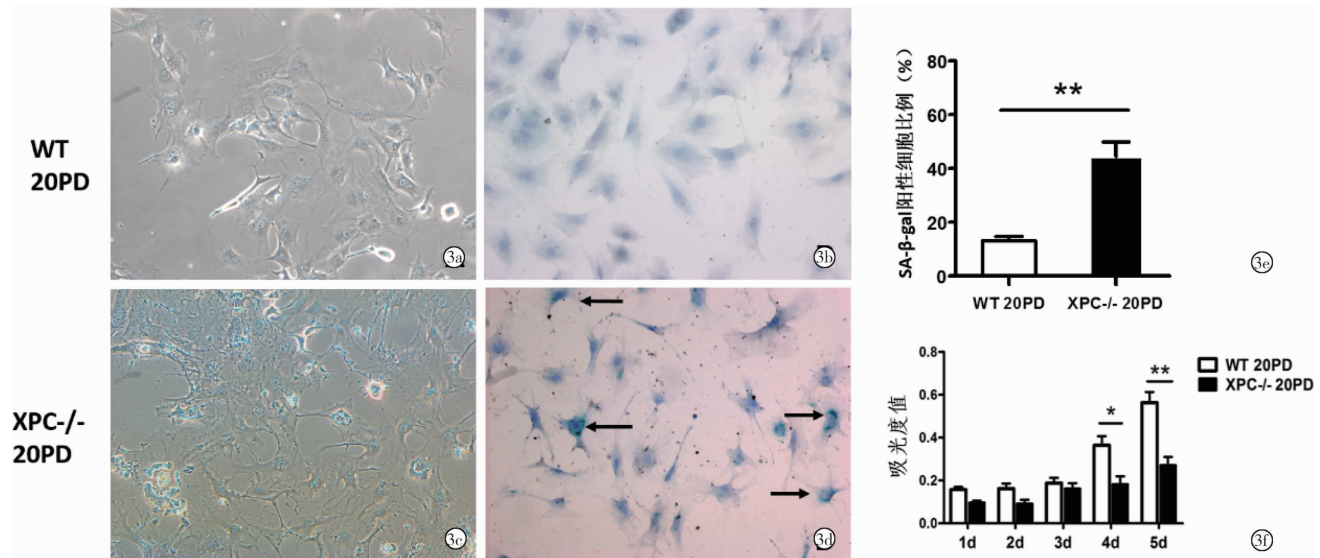
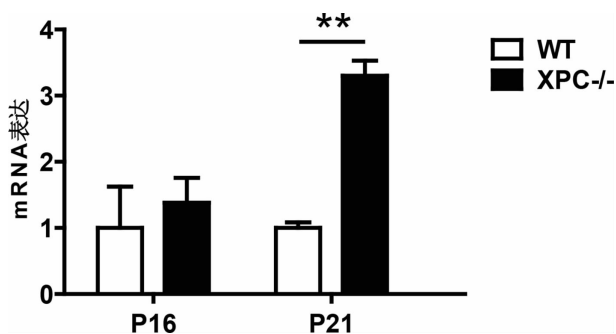


图 2 流式细胞术检测体外培养 WT 及 XPC-/- 两种 mBMSC 的表面标志



注:3a,3c:镜下观察 20PD 时 WT 和 XPC-/- mBMSCs 细胞形态($\times 200$);3b,3d:SA- β -gal 染色观察 20PD 时细胞衰老情况,苏木素复染,箭头示细胞核处蓝染的即 β -gal 染色阳性细胞($\times 200$);3e:SA- β -gal 染色阳性率比较;3f:选取 20PD mBMSCs 细胞,分别于接种后 1、2、3、4、5 d 进行 CCK8 检测,根据吸光度绘制增殖曲线,两种 mBMSCs 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 3 WT 及 XPC-/- 两种 mBMSCs 增殖和衰老情况



注:两种 mBMSCs 比较,** $P < 0.01$ 。

图 4 Real-time PCR 检测 20PD mBMSCs 中 P16、P21 mRNA 表达情况

细胞中 P16 及 P21 基因表达情况,结果显示,XPC-/- mBMSCs 中 P16 mRNA 相对表达量与 WT 细胞相比无明显差异($P > 0.05$);而 XPC-/- mBMSCs 中 P21 mRNA 相对表达量明显高于 WT 细胞(3.30 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.09 , $P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

在个体中,组织器官的稳态维持和创伤后再生应答都有赖于组织特异性的成体干细胞。由于成体干细胞具有较长的生存期,容易受到各种内源及外源性损伤的影响。随着损伤的积累,细胞不可避免出现基因组不稳定、细胞衰老等现象。DNA 损伤的积累会

路介导的 XPC 缺失出现 mBMSCs 早衰现象,本研究采用 Real-time PCR 检测扩增代数均为 20PD 的两组

导致干细胞衰老、功能丧失甚至凋亡,而 DNA 损伤检测点蛋白的缺失可导致基因组不稳定的干细胞突破凋亡屏障发生恶性转化^[6-9]。研究证实,老年个体的干细胞 DNA 损伤水平增高,其原因可能是长时间多次持续损伤的结果,也可能与 DNA 损伤应答能力的降低有关^[10]。现有研究显示, DNA 损伤应答在不同发育阶段细胞中存在差异,胚胎干细胞比其分化后代具有更强的 DNA 修复能力,且损伤细胞趋向于凋亡^[11]。随着干细胞衰老, DNA 损伤应答系统可能为了维护基因组的完整性和个体生存优先的模式,而降低其活性。这些 DNA 修复途径的转换引起衰老相关的功能障碍,是否为细胞应对细胞内生理学变化的一种策略还未知。

XPC 蛋白不仅在核酸切除修复(NER)途径中作为最早的识别蛋白及修复限速蛋白,同时在 DNA 损伤检测点过程中发挥重要的早期信号作用,促进 DNA 损伤后 P53 介导的细胞凋亡和细胞周期阻滞^[12]。近年来大量的肿瘤研究均显示,包括 XPC 在内的许多 DNA 损伤应答重要分子缺陷往往与促进早衰及肿瘤发生的早期行为相关。其中, XPC 基因敲除小鼠呈现早衰表型,而且易发生多器官实体恶性肿瘤^[13]。本研究的结果提示, XPC 缺失明显促进 mBMSCs 衰老,细胞增殖速度明显减慢。DNA 损伤的积累被认为是细胞衰老的主要原因之一,而衰老细胞中 DNA 损伤应答分子表达普遍下调被认为是损伤积累的原因。本研究结果显示, XPC 缺失明显加速了这一过程。

已知主要有两个信号通路参与细胞衰老相关的调控, P21/P53 通路和 P16/RB 通路。p53 通路,及其效应蛋白 p21WAF1 和调控蛋白 HDM2, 已被广泛研究,并有了深入的认识^[14]。人类的 p16 基因(INK4a/MTS1/CDKN2)位于第 9 号染色体短臂 2 区 1-带(9p21),编码两个不同的肿瘤抑制基因蛋白:细胞周期依赖性激酶(p16INK4a)基因及其产物可变读框基因(alterative reading frame, ARF)蛋白。这些蛋白质都在衰老、细胞周期控制以及抑制肿瘤方面具有重要作用,而且往往在人类肿瘤组织中功能性失活。在人细胞中, P21/P53 通路和 P16/RB 都参与介导端粒缩短引起的衰老信号通路,但在小鼠细胞中,只有 P21/P53 通路参与^[15]。本研究结果显示,体外培养衰老的 XPC^{-/-} mBMSCs 表现为 P21 分子的表达上

调,但这是否意味着 XPC 可能通过维持端粒稳定参与 mBMSCs 的自稳调节,还有待后续更深入的研究。

参考文献

- [1] Dirks PB. Brain tumor stem cells: the cancer stem cell hypothesis writ large[J]. *Mol Oncol*, 2010, 4(5): 420-430.
- [2] Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5331-5339.
- [3] Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 371-379.
- [4] 李文瑞, 刘新光, 周中军. DNA 损伤与细胞衰老关系的研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(6): 576-578.
- [5] 徐志刚, 陈志文. XPC 基因功能变异与肿瘤发生[J]. *国外医学(肿瘤学分册)*, 2005, 32(8): 576-579.
- [6] Behrens A, van Deursen JM, Rudolph KL, et al. Impact of genomic damage and ageing on stem cell function[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(3): 201-207.
- [7] Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(9): 579-590.
- [8] Adams PD, Jasper H, Rudolph KL. Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(6): 601-612.
- [9] Rubio R, García-Castro J, Gutiérrez-Aranda I, et al. Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells in vitro and initiates leiomyosarcoma in vivo[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 4185-4194.
- [10] Li T, Zhou ZW, Ju Z, et al. DNA Damage Response in Hematopoietic Stem Cell Ageing[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2016, 14(3): 147-154.
- [11] Ciccica A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204.
- [12] Nemzow L, Lubin A, Zhang L, et al. XPC: Going where no DNA damage sensor has gone before[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2015, 36: 19-27.
- [13] Friedberg EC, Bond JP, Burns DK, et al. Defective nucleotide excision repair in xpc mutant mice and its association with cancer predisposition[J]. *Mutat Res*, 2000, 459(2): 99-108.
- [14] Ou HL, Schumacher B. DNA damage responses and p53 in the aging process[J]. *Blood*, 2018, 131(5): 488-495.
- [15] Smogorzewska A, de Lange T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells[J]. *EMBO J*, 2002, 21(16): 4338-4348.

收稿日期: 2018-02-12 修回日期: 2018-03-12 编辑: 石嘉莹