

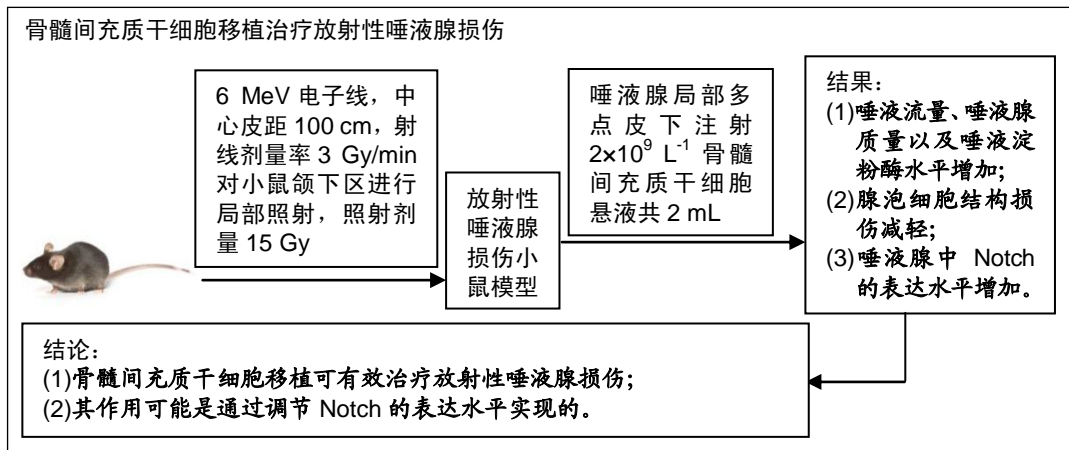
骨髓间充质干细胞调节Notch表达可有效治疗放射性唾液腺损伤

罗孟亚男, 赵娜, 耿楠楠, 王武峰(海南医学院第二附属医院放疗科, 海南省海口市 570311)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1786

ORCID: 0000-0002-0311-3364(罗孟亚男)

文章快速阅读:



罗孟亚男, 女, 1986 年生, 主治医师, 2013 年贵州医科大学毕业, 硕士, 主要从事放射肿瘤治疗学方面的研究。

通讯作者: 王武峰, 硕士, 主治医师, 海南医学院第二附属医院放疗科, 海南省海口市 570311

文献标识码:A

稿件接受: 2019-03-23



文题释义:

放射性损伤: 超过人体耐受剂量的电离辐射作用于机体后引起的全身性疾病。人体大面积接受高剂量照射可致急性放射病, 长期接触超允许量射线, 则发生慢性放射病。放射能不透过组织扩散, 主要损害单个细胞, 造成细胞缺失、抵抗力降低、血细胞减少等; 间接影响可致肿瘤、白血病、细菌性疾病复发、贫血和溃疡。

唾液淀粉酶: 是由唾液腺以及口腔壁上小黏液腺分泌的一种水解酶, 可作用于可溶性淀粉、直链淀粉、糖原等 α -1, 4-葡聚糖。

摘要

背景: 胆碱能受体激动剂可促进放射性唾液腺损伤患者残存唾液细胞的分泌, 但长期用药存在严重的不良反应且对严重放射性唾液腺损伤的治疗效果有限。骨髓间充质干细胞是一种具有多向分化潜能和几乎无限增殖能力的细胞, 具备治疗放射性唾液腺损伤的潜力。

目的: 探索骨髓间充质干细胞修复放射性唾液腺损伤的效果和机制。

方法: ①从小鼠骨髓中提取骨髓间充质干细胞, 采用 3D 共培养系统, 将其与第 2 代唾液腺腺泡细胞共培养 24 h; ②取 150 只 C57 小鼠, 随机等分为正常对照组、放射性唾液腺损伤组以及骨髓间充质干细胞组, 后 2 组通过电子直线加速器以 15 Gy 照射剂量建立放射性唾液腺损伤小鼠模型。照射后 1 周, 骨髓间充质干细胞组于唾液腺局部多点皮下注射 $2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 骨髓间充质干细胞悬液, 另 2 组注射等量生理盐水。

结果与结论: 经共培养 24 h 后, 骨髓间充质干细胞可以向唾液腺腺泡细胞分化, 类似多角形, 并表达 α -淀粉酶。与正常对照组相比, 放射性唾液腺损伤组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平明显减少, 腺泡细胞结构出现明显损伤, 唾液腺中 Notch 的表达水平降低; 而与放射性唾液腺损伤组相比, 骨髓间充质干细胞组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平明显恢复, 腺泡细胞结构损伤减轻, 唾液腺中 Notch 的表达水平恢复。说明骨髓间充质干细胞移植可有效治疗放射性唾液腺损伤, 且其作用可能是通过调节 Notch 的表达水平实现的。

关键词:

骨髓间充质干细胞; 细胞移植; 唾液腺; 放射性损伤; 腺泡细胞; 唾液淀粉酶; Notch; 干细胞

中图分类号: R459.9; R394.2

Bone marrow mesenchymal stem cells can effectively treat radiation-induced salivary gland injury by regulating Notch expression

Luo-Meng Yanan, Zhao Na, Ji Nannan, Wang Wufeng (Department of Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, Hainan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Cholinergic receptor agonists can promote the secretion of residual salivary cells in patients with radiation-induced salivary gland injury. However, there are serious adverse reactions associated with its long-term use and limited therapeutic effects on severely radioactive salivary gland damage. Bone marrow mesenchymal stem cells are a kind of cells with multipotential differentiation potential and almost unlimited proliferative capacity, which have the potential to treat radiation-induced salivary gland injury.

Luo-Meng Yanan, Master, Attending physician, Department of Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, Hainan Province, China

Corresponding author: Wang Wufeng, Master, Attending physician, Department of Radiotherapy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570311, Hainan Province, China

OBJECTIVE: To explore the mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells repairing radiation-induced salivary gland injury.

METHODS: Bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from mouse bone marrow, and co-cultured with the second-generation salivary gland acinar cells for 24 hours by a 3D co-culture system. One hundred and fifty C57 mice were randomly divided into normal control group, radiation-induced salivary gland injury group and bone marrow mesenchymal stem cells+radiation-induced salivary gland injury group (stem cell treatment group). A mouse model of radiation-induced salivary gland injury was made by an electron linear accelerator (15 Gy). One week after irradiation, the mice in the stem cell treatment group were subcutaneously injected with 2×10^6 /L bone marrow mesenchymal stem cell suspension at multiple points of the salivary gland, and those in the other two groups were injected with the same amount of saline.

RESULTS AND CONCLUSION: After 24 hours of co-culture, bone marrow mesenchymal stem cells differentiated into salivary gland acinar cells, with a polygon-like shape and expressed α -amylase. Compared with the normal control group, the salivary flow, salivary gland mass, and salivary amylase level were significantly decreased, acinar cell structure was markedly damaged, and the Notch expression level in the salivary gland was decreased in the radiation-induced salivary gland injury group. Compared with the radiation-induced salivary gland injury group, the above indexes in the bone marrow mesenchymal stem cells+radiation-induced salivary gland injury group were significantly restored. These findings indicate that bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can effectively treat radiation-induced salivary gland injury, and its effect may be achieved by regulating the Notch expression level in the salivary gland.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; cell transplantation; salivary gland; radioactive injury; acinar cells; salivary amylase; Notch; stem cells

0 引言 Introduction

鼻咽癌是在中国华南地区高发的肿瘤, 其中海南省的发病率高达3.44/10万。目前放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段, 放疗后5年生存率大于70%。但鼻咽癌患者放疗后常出现放射性唾液腺损伤导致的唾液分泌减少等不良反应, 同时其他接受放疗的长期生存头颈肿瘤患者放射性唾液腺损伤的发生率高达64%^[1]。放射性唾液腺损伤患者通常继发吞咽困难、味觉丧失、发音困难、口腔念珠菌感染、龋齿、继发营养不良等问题^[2-4], 这不仅严重影响患者生存质量, 而且可能会中断放射治疗过程, 影响放射治疗效果。治疗放射性唾液腺损伤对于提高长期生存的鼻咽癌等头颈肿瘤放疗患者的生存质量有重要意义。

目前对于放射治疗导致唾液腺损伤的保护, 临床上主要集中在放疗前行下颌腺转位以避开放射野^[5]、优化治疗计划以控制唾液腺剂量(如利用三维适形放疗、调强放疗等)以及应用胆碱能受体激动剂。其中下颌腺转位会增加治疗性损伤并延长治疗时间; 行三维适形放疗和调强放疗治疗后, 仍有29%–44%的肿瘤局部晚期患者出现二度以上的口干^[6-8]。对于已发生的放疗致唾液腺损伤, 毛果芸香碱等胆碱能受体激动剂可促进患者残存唾液细胞的分泌, 但需长期服药, 而胆碱能受体激动剂存在严重的不良反应且对严重放射性唾液腺损伤的治疗效果有限^[9]。骨髓间充质干细胞是一种具有多向分化潜能和几乎无限增殖能力的细胞, 可在体内外被诱导分化为多种类型的细胞^[10], 目前有研究将其应用于放射性唾液腺损伤中。黄晓明等^[11]利用共培养系统将分离纯化的间充质干细胞与腺泡细胞共培养, 可诱导其定向诱导分化为腺泡细胞。Lim等^[12-14]对放射性唾液腺损伤小鼠尾静脉注射间充质干细胞后, 小鼠的唾液分泌量明显提高。

Notch信号通路是一种广泛调节细胞分化与组织发育的信号通路。有研究显示Notch可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[15-16]。Oldershaw等^[17]认为Notch激活是启动软骨细胞分化的关键。因此, 在间充质干细胞的分化命运决定中, Notch可能也起着重要的调节作用。实验首先从小鼠骨髓中提取骨髓间充质干细胞, 采用3D共培养系统将其与第2代唾液腺腺泡细胞共培养24 h, 观察骨髓间充质干细胞向浆液性腺泡细胞分化的能力, 然后通过建立放射性唾

液腺损伤小鼠模型, 探索骨髓间充质干细胞修复放射性唾液腺损伤的效果, 初步探讨Notch信号通路在其中的作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年5月至2017年7月在海南医学院第二附属医院实验室完成。

1.3 材料

实验动物: ①1 d龄C57小鼠2只; ②SPF级雄性C57小鼠150只, 鼠龄6周, 体质量约20 g, 均由海南医学院动物实验中心提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

实验用试剂及仪器: DMEM/F12培养基(Hyclon公司); Percoll细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清(Gibco公司); 胰岛素、转铁蛋白、氢化可的松、上皮生长因子(Sigma公司); 兔抗Notch单克隆抗体(Abcam公司); 3D共培养系统(美国Coming Inc公司); 电子直线加速器(德国西门子公司); 透射电镜(日本电子公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的提取 取新生C57小鼠1只, 过量氯胺醇麻醉处死, 取股骨骨髓4.0–5.0 mL, 以DMEM/F12培养基混匀, 加入等体积Percoll细胞分离液, 3 000 r/min离心30 min, 取中间层, PBS洗涤, 去上清, 加入含体积分数10%胎牛血清、10 000 U/L青霉素和100 g/L链霉素的DMEM/F12培养基, 37 °C、体积分数5%CO₂、饱和湿度培养3 d, 全量换液, 此后每2 d或3 d换液1次^[18], 当细胞融合至80%–90%时按1:2的比例传代。

取第2代骨髓间充质干细胞, 0.25%胰蛋白酶消化两三分钟, 调整细胞浓度为 1×10^9 L⁻¹, 于流式管中加入100 μ L细胞悬液, 将CD29、CD44、CD45、CD34单克隆抗体加入到流式管中, 鼠同型对照抗体作为参照, 轻轻混匀, 4 °C避光孵育30 min, 流式细胞仪进行检测分析。

1.4.2 唾液腺腺泡细胞的提取 摘除上述新生C57小鼠双侧颌下腺, 眼科剪去除包膜、脂肪、血管及结缔组织并清洗3次, 剪碎至1 mm³块状, 加入1:1混合的2.5 g/L胰蛋白酶、1 g/L胶原酶消化液, 37 °C下消化3–5次, 每次20 min, 加胎牛血清终止消化, 过不锈钢网筛过滤后, 1 500 r/min

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	新生 C57 小鼠股骨骨髓
原代培养方法:	密度梯度离心法
基础培养基:	DMEM/F12 培养基
添加材料:	体积分数 10%胎牛血清、10 000 U/L 青霉素和 100 g/L 链霉素
细胞传代:	当细胞融合至 80%–90%时按 1:2 的比例传代
细胞鉴定:	用流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面标记, 细胞高表达 CD29 和 CD44, 极低表达 CD34 和 CD45
伦理学批准:	实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规

离心5 min, 去上清, 以腺泡细胞培养基(含体积分数5%胎牛血清、5.0 mg/L胰岛素、5.0 mg/L转铁蛋白、0.4 mg/L氢化可的松、0.1 mg/L上皮生长因子、10 U/L青霉素、0.1 g/L链霉素以及2.8 mmol/L Ca^{2+} 的DMEM/F12培养基)制成细胞悬液。差速黏附法分离纯化, 每3 d换液1次, 待细胞融合90%后传代培养^[19]。

1.4.3 骨髓间充质干细胞的诱导分化 采用3D共培养系统进行诱导分化, 容易分上下2层, 中间由0.4 μ m半透明膜相隔。取第2代唾液腺腺泡细胞和第2代骨髓间充质干细胞共培养, 将骨髓间充质干细胞以每孔 1×10^4 密度接种于下层, 贴壁24 h后, 将唾液腺腺泡细胞以每孔 4×10^4 密度接种于上层, 两种细胞均使用腺泡细胞培养基培养^[20]。共培养24 h, 采用免疫荧光染色检测骨髓间充质干细胞中 α -淀粉酶的表达情况, 取下层细胞, PBS冲洗3次, 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min, PBS冲洗, 用含0.5%牛血清白蛋白、0.1%Triton X-100的PBS室温孵育30 min, 以阻断非特异性反应, 加入抗 α -淀粉酶单克隆抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS冲洗, 加TRITC标记的羊抗鼠IgG, 室温避光孵育5 h, PBS冲洗, 封固, 免疫荧光显微镜观察。

取贴壁达90%的第2代骨髓间充质干细胞, 吸弃培养液, PBS洗3次, 加入0.5% CM-Dil标记液, 于37 $^{\circ}$ C, 体积分数为5%CO₂培养箱孵育20 min, 吸弃标记液, 加入DMEM/F12完全培养液孵育24 h, PBS洗3次, 将细胞浓度调整为 2×10^9 L⁻¹备用。

1.4.4 放射性唾液腺损伤小鼠模型的建立及细胞移植 取150只6周龄C57小鼠, 随机分为正常对照组、放射性唾液腺损伤组以及骨髓间充质干细胞组, 每组50只。放射性唾液腺损伤组以及骨髓间充质干细胞组以2%戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠, 电子直线加速器以6 MeV电子线, 中心皮距100 cm, 射线剂量率3 Gy/min对小鼠颌下区进行局部照射, 照射剂量15 Gy, 照射面积约为3.5 cm \times 1.8 cm, 深度为皮下1.0–1.2 cm, 以铅板保护小鼠其他部位^[21], 照射后1周小鼠唾液流量为正常小鼠唾液流量的35.4%, 唾液量明显减少, 说明损伤唾液腺模型建立良好。照射后1周, 骨髓间充质干细胞组于唾液腺局部多点皮下注射 2×10^9 L⁻¹细胞悬液共2 mL^[22-23], 另2组注射等量生理盐水。

1.4.5 唾液腺功能测定 造模后2个月, 以50 mg/kg匹罗卡品腹腔注射麻醉小鼠, 取侧卧位, 从小鼠口腔一侧采集唾液30 min, 计算唾液流量, 用生化仪测量唾液淀粉酶水平。

1.4.6 唾液腺形态及结构的观察 造模后2个月, 过量戊巴比妥钠麻醉处死小鼠, 取部分唾液腺, 电子天平测量质量, 然后将唾液腺制成2 mm厚切片, 1%四氧化锇固定, 丙酮脱水, 醋酸铀和硝酸铅双重染色, 透射电镜观察唾液腺的超微结构变化。

1.4.7 免疫荧光染色检测唾液腺内移植细胞的分布情况 取部分唾液腺, 制备新鲜冰冻切片, 切片约5 μ m, 在荧光显微镜下观察冰冻切片CM-Dil染色阳性细胞分布情况。

1.4.8 Western blot检测唾液腺中Notch的表达水平 取部分唾液腺, 加入组织裂解液, 提取总蛋白并测定浓度, 提取的蛋白与5 \times SDS上样缓冲液按1:5稀释比例混匀后, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 然后加入Notch一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育1 h, TBST洗膜后加ECL显色, 在凝胶成像仪下进行观察。以 β -actin作为内参计算Notch蛋白的相对表达值。

1.5 主要观察指标 ①各组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平; ②各组小鼠唾液腺的超微结构; ③唾液腺中Notch的表达水平。

1.6 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以SPSS 23.0(美国IBM公司)进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析及LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的形态以及分化 原代骨髓间充质干细胞培养7 d左右, 细胞可达80%左右融合, 传代后细胞呈短梭形, 分布较均匀, 见图1A。用流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞表面标记, 细胞高表达CD29和CD44, 极低表达CD34和CD45, 见图2。经共培养24 h后, 向唾液腺腺泡细胞分化, 类似多角形, 并表达 α -淀粉酶, 见图1B, C。

2.2 骨髓间充质干细胞移植可恢复放射性唾液腺损伤小鼠模型唾液腺结构与功能 与正常对照组相比, 放射性唾液腺损伤组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平明显减少($P < 0.05$); 而与放射性唾液腺损伤组相比, 骨髓间充质干细胞组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平有所恢复($P < 0.05$), 但仍低于正常对照组($P < 0.05$), 见图3。

正常对照组小鼠唾液腺中腺泡细胞结构正常, 线粒体、内质网等细胞器结构完整, 染色质形态正常, 存在大量酶原颗粒。放射性唾液腺损伤组腺泡细胞发生水肿, 胞质消失, 细胞核固缩, 酶原颗粒明显减少。而经骨髓间充质干细胞移植治疗小鼠损伤程度明显减轻, 见图4。

2.3 移植骨髓间充质干细胞在放射性唾液腺损伤小鼠模型唾液腺的分布 免疫荧光染色可见, 移植的骨髓间充质干细胞逐步向唾液腺内部扩散, 呈现点状分布, 见图5。

2.4 骨髓间充质干细胞移植可增加放射性唾液腺损伤小鼠模型唾液腺中Notch的表达水平 与正常对照组相比, 放

射性唾液腺损伤组小鼠唾液腺中Notch的表达水平降低($P < 0.05$); 而与放射性唾液腺损伤组相比, 骨髓间充质干细胞组小鼠唾液腺中Notch的表达水平增加($P < 0.05$), 见图6。

3 讨论 Discussion

放疗是鼻咽癌的主要治疗手段之一, 在照射过程中, 腮腺、颌下腺等唾液腺不可避免会受到较高剂量的照射, 导致其出现不可逆性功能丧失, 主要表现为唾液分泌功能减退, 引起口干舌燥、龋齿、营养障碍等并发症, 严重降低了患者的生活质量。唾液分泌减少从放疗早期即开始出现, 此后贯穿于患者的整个生命中^[24]。因此, 早期采取有效措施加以干预具有重要的临床意义。

唾液腺细胞是一种终末分化的上皮细胞, 体外增殖、传代能力差。随着人们对于干细胞的认识和研究的不断深入, Okumura等^[25]实验中报道了唾液腺干细胞的存在, 并且有分化成内胚层细胞的潜力。然而在病理因素的影响下, 唾液腺干细胞大量增殖后容易异常分化, 出现成瘤的现象。如果唾液腺功能丧失者将无法取得干细胞。因此, 一些学者将成体干细胞用于治疗唾液腺损伤^[23]。骨髓间充质干细胞具有较强的分裂增生能力, 且免疫原性低和免疫调节能力强^[26], 实验取第2代唾液腺腺泡细胞和第2代骨髓间充质干细胞共培养24 h, 观察到骨髓间充质干细胞形态以及排列发生了转变, 并表达唾液腺腺泡细胞的特异性标志物 α -淀粉酶, 说明骨髓间充质干细胞能够向唾液腺腺泡细胞分化, 提示骨髓间充质干细胞在治疗唾液腺损伤疾病方面可能具有重要的应用价值。

为探讨放射性唾液腺损伤的分子机制, 首先是要成功建立放射性唾液腺损伤模型。下颌下腺是三大唾液腺之一, 主要功能是分泌唾液, 据统计下颌下腺在刺激状态下分泌的唾液量占总唾液量的20%~30%, 在静息状态下可占72%, 这对唾液的相关功能极为重要^[27]。由于国内外研究采用动物种类、大小、射线种类等不同, 建模方法也各异, 针对C57小鼠, 大多采用X射线15~18 Gy不同剂量损伤唾液腺^[28-31], 以15 Gy剂量应用较多, 该研究首先通过预实验使用直线加速器电子线15 Gy一次性照射, 观察小鼠唾液量显著减少, 腺体受损明显, 当剂量增加到21 Gy照射后, 小鼠唾液腺损伤严重。因此, 实验通过使用一次性15 Gy剂量射线照射小鼠颌下区, 建立小鼠放射性唾液腺损伤模型。

该研究通过构建小鼠放射性唾液腺损伤模型, 研究骨髓间充质干细胞是否对于放射性唾液腺损伤具有防治作用。唾液量、唾液淀粉酶水平是衡量唾液腺分泌功能的一个重要指标。通过结果发现小鼠在造模后2个月, 放射性唾液腺损伤组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平明显减少; 而骨髓间充质干细胞组小鼠唾液流量、唾液腺质量以及唾液淀粉酶水平有所恢复, 可见骨髓间充质干细胞对放射性唾液腺损伤有一定治疗作用。通过透射电镜观察超微结构可见放射性唾液腺损伤组腺泡细胞发生水肿, 胞质消失, 细胞核固缩, 酶原颗粒明显减少。而经骨髓间充质干细胞移植治疗小鼠损伤程度明显减轻, 唾液腺细胞结构基本完整。免疫荧光染色可见, 移植的骨髓间充

质干细胞逐步向唾液腺内部扩散, 呈现点状分布, 推测骨髓间充质干细胞可在体内大量增殖并可能向唾液腺细胞转化, 这在很大程度上促进了唾液腺功能和结构的恢复, 另外骨髓间充质干细胞还可能分泌大量细胞因子促进机体细胞的自我更新, 有待于进一步研究。

Notch信号通路广泛存在于动物和人体, 可通过相邻细胞之间的相互作用调节细胞、组织、器官的分化和发育。Notch信号通路由Notch受体、Notch配体(DSL蛋白)、CSL DNA结合蛋白、其他的效应物和Notch的调节分子等组成^[32-34]。Notch信号转导通路可直接接受临近细胞的信号并传到细胞核, 激活相关转录因子的表达, 能够参与胚胎发育、细胞发育、维持干细胞的自我更新、调节血管生成等^[35]。研究发现, 发育早期细胞Notch及其配体表达的细微差别在发育过程中被逐渐放大, 从而可决定细胞的不同分化方向^[36-38]。Notch信号通路也存在于骨髓间充质干细胞的分化过程中, 并对其分化命运决定起重要的调节作用^[39-40]。实验中骨髓间充质干细胞组小鼠唾液腺Notch的表达水平较放射性唾液腺损伤组增高, 表明骨髓间充质干细胞可以作用于Notch信号通路, 进而促进唾液腺功能恢复, 这为研究骨髓间充质干细胞治疗放射性唾液腺损伤提供了实验依据, 但同时实验也有一些不足之处, 例如Notch有4个Notch同源基(Notch1-4)和5个配体(Jagged 1/2; Delta1/2/3), 骨髓间充质干细胞是作用于哪一型还不清楚。另外, 骨髓间充质干细胞是否可以通过其他信号通路来提高损伤唾液腺的修复能力该研究没有涉及, 这些问题将在今后的研究中进一步的阐释。

综上所述, 移植骨髓间充质干细胞治疗放射性唾液腺损伤小鼠模型, 可有效增加唾液流量和唾液腺质量, 改善唾液腺中损伤腺泡细胞的超微结构, 并增加唾液腺中Notch表达水平, 结果提示骨髓间充质干细胞移植可有效改善放射性唾液腺损伤, 且Notch在这一过程中发挥重要的作用。

作者贡献: 实验设计为王武峰, 实验实施为王武峰、罗孟亚男、赵娜和戴楠楠, 实验评估为王武峰和罗孟亚男, 资料收集为赵娜和戴楠楠。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经海南医学院第二附属医院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过海南医学院第二附属医院统计学专家审核。

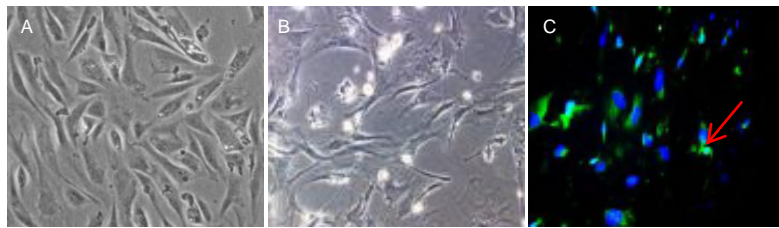
文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同

时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Wijers OB, Levendag PC, Braaksma MM, et al. Patients with head and neck cancer cured by radiation therapy: a survey of the dry mouth syndrome in long-term survivors. *Head Neck*. 2002;24(8):737-747.
- [2] Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, et al. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):199-212.
- [3] Fang FM, Liu YT, Tang Y, et al. Quality of life as a survival predictor for patients with advanced head and neck carcinoma treated with radiotherapy. *Cancer*. 2004;100(2):425-432.
- [4] Porter SR, Fedele S, Habbab KM. Xerostomia in head and neck malignancy. *Oral Oncol*. 2010;46(6):460-463.
- [5] Seikaly H, Jha N, McGaw T, et al. Submandibular gland transfer: a new method of preventing radiation-induced xerostomia. *Laryngoscope*. 2001;111(2):347-352.
- [6] Setton J, Caria N, Romanyshyn J, et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of oropharyngeal cancer: an update of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;82(1):291-298.
- [7] Lee N, Harris J, Garden AS, et al. Intensity-modulated radiation therapy with or without chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma: radiation therapy oncology group phase II trial 0225. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3684-3690.
- [8] Van Gestel D, Van Den Weyngaert D, Schrijvers D, et al. Intensity-modulated radiotherapy in patients with head and neck cancer: a European single-centre experience. *Br J Radiol*. 2011;84(1000):367-374.
- [9] Markitziu A. Treatment for post-irradiation xerostomia. *N Engl J Med*. 1994;330(2):142.
- [10] Oliveri RS. Epigenetic dedifferentiation of somatic cells into pluripotency: cellular alchemy in the age of regenerative medicine. *Regen Med*. 2007;2(5):795-816.
- [11] 黄晓明,罗小宁,郑亿庆,等.共培养系统下骨髓间充质干细胞分化为颌下腺腺泡细胞的实验研究[J].解放军医学杂志, 2009,34(5):562-565.
- [12] Lim JY, Yi T, Choi JS, et al. Intraglandular transplantation of bone marrow-derived clonal mesenchymal stem cells for amelioration of post-irradiation salivary gland damage. *Oral Oncol*. 2013;49(2):136-143.
- [13] Kojima T, Kanemaru S, Hirano S, et al. Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells. *Laryngoscope*. 2011;121(9):1864-1869.
- [14] Lin CY, Chang FH, Chen CY, et al. Cell therapy for salivary gland regeneration. *J Dent Res*. 2011;90(3):341-346.
- [15] Hoffmann A, Gross G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2001;11(1-3):23-45.
- [16] Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, et al. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res*. 2002;17(2):231-239.
- [17] Oldershaw RA, Tew SR, Russell AM, et al. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis. *Stem Cells*. 2008;26(3):666-674.
- [18] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308(22):2369-2379.
- [19] Abok K, Brunk U, Jung B, et al. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1984;45(4):443-460.
- [20] Leisten I, Kramann R, Ventura Ferreira MS, et al. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. *Biomaterials*. 2012;33(6):1736-1747.
- [21] 王涛,刘东.单次大剂量与多次小剂量放射线构建小鼠放射性唾液腺损伤模型效果比较[J].山东医药,2017,57(41):44-46.
- [22] 韩庆宾.人羊膜上皮细胞修复放射性损伤小鼠唾液腺的实验研究[D].遵义:遵义医学院,2012.
- [23] 王涛,强艳丽.脂肪干细胞对小鼠放射性唾液腺损伤的治疗作用[J].山东医药,2017,57(33):32-34.
- [24] Bhide SA, Ahmed M, Newbold K, et al. The role of intensity modulated radiotherapy in advanced oral cavity carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2012;8 Suppl 1:S67-71.
- [25] Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, et al. Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology*. 2003;38(1):104-113.
- [26] Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L, et al. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*. 2008;3(4):531-546.
- [27] Eisbruch A, Rhodus N, Rosenthal D, et al. How should we measure and report radiotherapy-induced xerostomia. *Semin Radiat Oncol*. 2003;13(3):226-234.
- [28] 王金凤,孙新臣,康亚辉,等.自由基清除剂Tempol对小鼠放射性下颌腺损伤防护机制的研究[J].中华放射医学与防护杂志, 2014,34(3):176-179.
- [29] 张珺晔.去铁胺对放疗后小鼠唾液腺功能改善的实验研究[D].上海:上海交通大学医学院,2013.
- [30] Fang D, Hu S, Liu Y, et al. Identification of the active components in Bone Marrow Soup: a mitigator against irradiation-injury to salivary glands. *Sci Rep*. 2015;5:16017.
- [31] Li Z, Wang Y, Xing H, et al. Protective efficacy of intravenous transplantation of adipose-derived stem cells for the prevention of radiation-induced salivary gland damage. *Arch Oral Biol*. 2015;60(10):1488-1496.
- [32] Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. *Regen Med*. 2008;3(4):531-546.
- [33] Brahmi M, Bally O, Eberst L, et al. Therapeutic targeting of Notch signaling in cancer. *Bull Cancer*. 2017;104(10):883-891.
- [34] Li L, Tang P, Li S, et al. Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol*. 2017;34(10):180.
- [35] Baeten JT, Lilly B. Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Adv Pharmacol*. 2017;78:351-382.
- [36] Reddy BV, Rauskolb C, Irvine KD, et al. Influence of fat-hippo and notch signaling on the proliferation and differentiation of Drosophila optic neuroepithelia. *Development*. 2010;137(14):2397-2408.
- [37] Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1235-1294.
- [38] Xu LL, Fu HX, Zhang JM, et al. Impaired Function of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells from Immune Thrombocytopenia Patients in Inducing Regulatory Dendritic Cell Differentiation Through the Notch-1/Jagged-1 Signaling Pathway. *Stem Cells Dev*. 2017;26(22):1648-1661.
- [39] 牛萍,赵月强,黄星原,等.骨髓间充质干细胞体外增殖及分化过程中Notch信号的表达变化[J].基础医学与临床, 2011,31(11):1205-1209.
- [40] Wang C, Inzana JA, Mirando AJ, et al. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1471-1481.



图注: 图中 A 为骨髓间充质干细胞诱导前, 呈梭形; B 为骨髓间充质干细胞诱导后, 类似唾液腺腺泡细胞样细胞; C 为骨髓间充质干细胞诱导后, 可表达 α -淀粉酶(红色箭头)。
图 1 骨髓间充质干细胞诱导前后的形态特征($\times 100$)
Figure 1 Morphological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells before and after induction ($\times 100$)

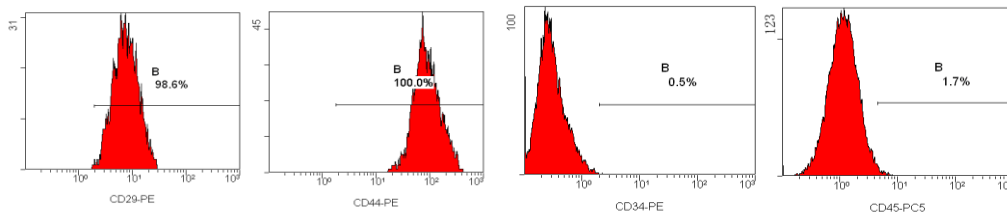
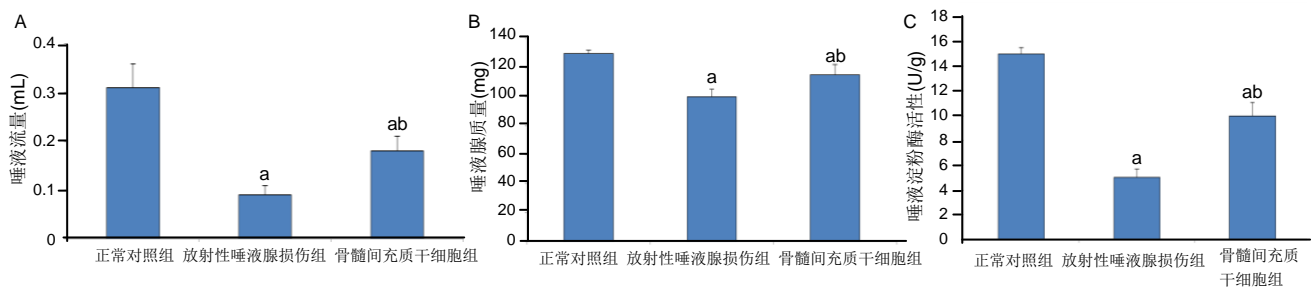
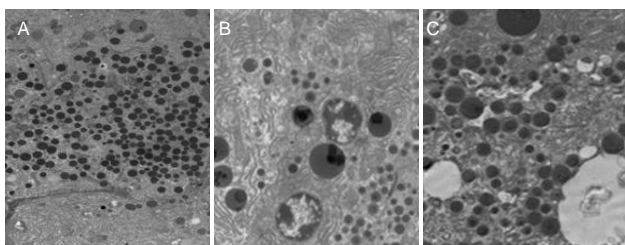


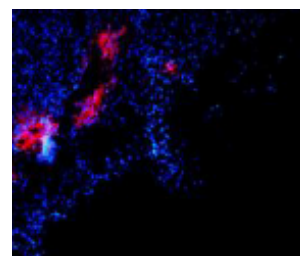
图 2 第 2 代骨髓间充质干细胞表面标志的表达
Figure 2 Surface markers of passage 2 bone marrow mesenchymal stem cells



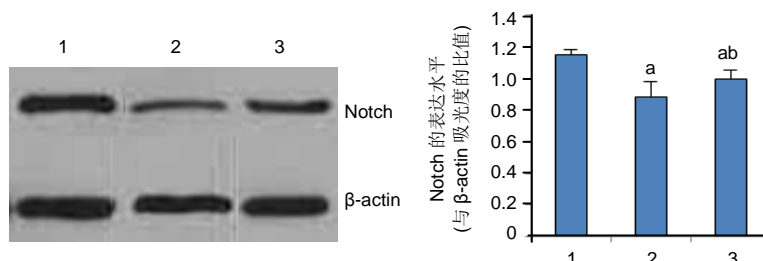
图注: 图中 A 为唾液流量; B 为唾液腺质量; C 为唾液淀粉酶水平。与正常对照组相比, $^a P < 0.05$; 与放射性唾液腺损伤组相比, $^b P < 0.05$ 。
图 3 骨髓间充质干细胞移植对放射性唾液腺损伤小鼠唾液腺结构与功能的影响
Figure 3 Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on the structure and function of the salivary gland in a mouse model of radiation-induced salivary gland injury



图注: 图中 A 为正常对照组, 腺泡细胞结构正常; B 为放射性唾液腺损伤组, 细胞发生水肿; C 为骨髓间充质干细胞组, 损伤较放射性唾液腺损伤组减轻。
图 4 骨髓间充质干细胞移植对放射性唾液腺损伤小鼠唾液腺超微结构的影响(透射电镜, $\times 5000$)
Figure 4 Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on the salivary gland ultrastructure in a mouse model of radiation-induced salivary gland injury (transmission electron microscope, $\times 5000$)



图注: 移植骨髓间充质干细胞逐步向唾液腺内部扩散, 呈现点状分布。
图 5 移植骨髓间充质干细胞在放射性唾液腺损伤小鼠唾液腺的分布(免疫荧光染色, $\times 100$)
Figure 5 Distribution of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells in the salivary gland of a mouse model of radiation-induced salivary gland injury (immunofluorescence staining, $\times 100$)



图注: 图中 1-3 分别为正常对照组、放射性唾液腺损伤组以及骨髓间充质干细胞组。与正常对照组相比, $^a P < 0.05$; 与放射性唾液腺损伤组相比, $^b P < 0.05$ 。
图 6 骨髓间充质干细胞移植对放射性唾液腺损伤小鼠模型唾液腺中 Notch 表达水平的影响
Figure 6 Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on the Notch expression in the salivary gland of a mouse model of radiation-induced salivary gland injury