5-氟尿嘧啶通过下调Wnt/β-catenin信号通路 抑制骨髓基质细胞增殖

肖含先之 齐嵘嘉 汪子铃 肖名贺 程霄 王亚平 王璐* (重庆医科大学干细胞与组织工程实验室,组织学与胚胎学教研室,重庆400016)

摘要 该研究探讨了5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)抑制人骨髓基质细胞HS-5增殖的可能 机制,寻找改善化疗药物对骨髓基质细胞损伤的治疗靶点。实验分3组,对照组:常规培养; 5-FU组: 常规培养基础上加入25 μg/mL 5-FU; 氯化锂(LiCl)+5-FU组: 10 mmol/L LiCl预处理细胞, 6 h后加 入25 μg/mL 5-FU, 各组培养48 h。EdU检测HS-5细胞增殖,流式细胞术检测细胞周期, Western blot 检测β-catenin、Cyclin D1、C-myc蛋白表达, DCFH-DA荧光法检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平, Western blot检测缝隙连接蛋白Cx43表达。与对照组相比, 5-FU组HS-5细胞增殖 能力下降,细胞阻滞在G₀/G₁期,胞内ROS水平显著升高,β-catenin、Cyclin D1、C-myc、Cx43蛋白表 达下调。与5-FU组相比,LiCl+5-FU组HS-5细胞增殖能力回升,细胞G₁期阻滞减轻,胞内ROS水平 降低,β-catenin、Cyclin D1、C-myc、Cx43蛋白表达上调。5-FU可通过下调Wnt/β-catenin信号通路 抑制HS-5细胞增殖,其作用机制可能与5-FU诱导细胞发生氧化应激,下调细胞间隙连接蛋白Cx43 表达有关。

关键词 5-氟尿嘧啶; Wnt/β-catenin信号通路; 氯化锂; HS-5

5-Fluorouracil Inhibits Proliferation of Bone Marrow Stromal Cells via Down-Regulating Wnt/β-catenin Signaling Pathway

Xiao Hanxianzhi, Qi Rongjia, Wang Ziling, Xiao Minghe, Cheng Xiao, Wang Yaping, Wang Lu* (Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract This article was to explore the possible mechanism of 5-fluorouracil (5-FU) inhibiting the proliferation of human bone marrow stromal cells (HS-5), and to find a therapeutic target for improving the hematopoietic damage of chemotherapy drugs. HS-5 cells were divided into three groups. The control group was routinely cultured; the 5-FU group was treated by 5-FU on the concentration of 25 μ g/mL; the LiCl+5-FU group was pretreated with LiCl on the concentration of 10 mmol/L, and 25 μ g/mL 5-FU was added after 6 h, each group was cultured for 48 h. The proliferation of HS-5 cells was detected by EdU. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. The expressions of β -catenin, CyclinD1, and C-myc proteins were measured by Western blot. The levels of reactive oxygen species (ROS) in cells were detected by DCFH-DA fluorescence. The expression of Cx43

收稿日期: 2019-01-09 接受日期: 2019-03-20

国家自然科学基金(批准号: 81873103)和重庆市科学技术委员会基础与前沿研究项目(批准号: cstc2014jcyjA10001)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 13594272250, E-mail: luwang@cqmu.edu.cn

Received: January 9, 2019 Accepted: March 20, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81873103), the Foundation and Frontier Research Project of Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.estc2014jcyjA10001)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-13594272250, E-mail: luwang@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-17 10:45:24 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190717.1045.006.html

protein was measured by Western blot. Compared with the control group, the proliferative capacity of HS-5 cells decreased, the cell cycle was blocked, intracellular ROS level was significantly increased, and the expressions of β -catenin, CyclinD1, C-myc, and Cx43 proteins were down-regulated in the 5-FU group. Compared with the 5-FU group, the proliferation of HS-5 cells in the LiCl+5-FU group was increased, the cell cycle arrest was attenuated, intracellular ROS level was decreased, and the expressions of β -catenin, CyclinD1, C-myc and Cx43 proteins were up-regulated. 5-FU can inhibit the proliferation of HS-5 cells by the mechanism of down-regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway, which may lead to 5-FU-induced oxidative stress and down-regulation of Cx43 expression.

Keywords 5-FU; Wnt/β-catenin signaling pathway; LiCl; HS-5

化疗作为治疗恶性肿瘤最主要的措施之一,可 导致骨髓细胞群稳态失衡,构成骨髓基本组分的造 血细胞和骨髓基质细胞均会受到不同程度的影响[1]。 通常短暂急性骨髓抑制与造血祖细胞损伤有关,而 长期骨髓抑制的潜在危害则与骨髓基质细胞损伤、 造血干细胞应激性损伤有关^[2-3]。Wnt/β-catenin信号 通路参与骨髓基质细胞增殖、间充质干细胞成骨成 脂分化、氧化应激调控^[4-5]。研究发现, Wnt/β-catenin 信号通路广泛影响骨髓基质细胞功能,并通过基质 依赖的方式调控造血干细胞自我更新^[6]。LiCl作为 Wnt/β-catenin信号通路的激活剂可激发通路关键效 应蛋白β-catenin核转位, 与淋巴细胞增强因子/T细胞 因子(LEF/TCF)结合形成转录复合物,激活下游靶基 因,从而调控细胞一系列生理活动^[7]。我们课题组^[8] 前期实验表明,化疗药物5-氟尿嘧啶(5-FU)可导致骨 髓基质细胞氧化损伤、分泌生物活性物质改变,诱 发造血细胞氧化应激性早衰,而5-FU损伤骨髓基质 细胞的分子机制目前尚不清楚。本实验建立5-FU作 用人骨髓基质细胞HS-5的体外模型,探讨化疗药物 5-FU是否通过Wnt通路影响骨髓基质细胞增殖,以 及该过程中可能存在的协同机制,旨在为缓解骨髓 基质细胞的化疗损伤提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓基质细胞株HS-5由本实验室冻存。

1.2 试剂及仪器

5-FU购自Sigma公司; LiCl(纯度>95%)购自天 津市大茂化学试剂厂; DMEM-高糖购自Gibco公司; 0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公司; 胎牛血清购自 MRC公司; CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所; EdU试剂盒购自锐博生物科技有限公司; ROS试剂 盒购自碧云天生物技术有限公司; β-catenin、Cyclin D1、C-myc、Cx43、β-actin、Lamin B单克隆抗体 购自Cell Signaling Technology公司。

CO₂细胞培养箱购自美国Sanyo公司; 酶标仪购 自瑞士TECAN公司; 倒置显微镜购自日本NIKON公 司; 荧光显微镜购自日本NIKON公司。

1.3 细胞培养及分组

调整HS-5细胞密度为2.5×10⁶细胞/mL种植于直径100 mm的细胞培养皿中,以内含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM高糖培养基,于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱内培养。 当细胞生长融合率达到80%~90%,使用0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞按1:3传代培养。

实验分3组: 对照组(常规培养); 5-FU组(常规培 养基础上加入25 μg/mL 5-FU); LiCl+5-FU组(常规培 养基础上加入浓度为10 mmol/L的LiCl预处理细胞, 6 h后加入25 μg/mL 5-FU)。

1.4 CCK-8检测5-FU对HS-5细胞的抑制作用

取对数生长期的HS-5细胞以5×10³细胞/孔种植 于96孔板中,每组设3个复孔,置于37 °C、5% CO₂饱 和湿度培养箱中培养。待细胞贴壁之后,分别加入 12.5、25、50、100 μg/mL 5-FU培养24、48、72 h,加 入20 μL CCK-8工作液,37 °C孵育3 h后,酶标仪450 nm 波长下检测每孔吸光度。抑制率=[(对照组D值-实验 组D值)/(对照组D值-空白组D值)]×100%。

1.5 Western blot检测β-catenin、Cyclin D1、C-myc、 Cx43蛋白表达

收集HS-5细胞于1.5 mL EP管中,每管加入200 μL 蛋白裂解液,12 000 r/min、4 °C离心10 min,收集上清 液。BCA法测蛋白浓度,分装后备用。SDS-PAGE电 泳,PVDF膜转膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,β-catenin、 Cyclin D1、Cx43、C-myc抗体(均为1:1 000),4 °C孵育 过夜。次日TBST洗膜3次,每次10 min。羊抗兔或兔 抗小鼠HRP标记二抗(1:10 000)室温孵育2 h,TBST洗 膜3次,每次10 min。ECL化学发光凝胶成像,Image Lab 5.2.1软件进行半定量分析。目的蛋白相对表达 量以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值比值表示。

1.6 CCK-8检测LiCl对HS-5细胞增殖能力的影响

取对数生长期的HS-5细胞以5×10³细胞/孔种植 于96孔板中,每组设3个复孔,置于37°C、5% CO₂饱 和湿度培养箱中培养。待细胞贴壁后,分别加入0、 5、10、20、40 mmol/L LiCl培养24、48、72 h后,加 入20 μL CCK-8工作液,37°C继续孵育3 h后,酶标仪 于450 nm波长下测量每孔吸光度。存活率=[(实验组 D值-空白组D值)/(对照组D值-空白组D值)]×100%。

1.7 EdU检测HS-5细胞增殖能力

调整HS-5细胞密度为5×10³细胞/孔种植于96 孔板,待细胞贴壁后按1.3所示方法加药处理,48 h 后每孔加入200 μL EdU溶液孵育24 h, PBS洗3次, 每次5 min。4%多聚甲醛室温固定30 min后, PBS洗 3次,每次5 min。加入渗透剂0.5% Triton X-100脱 色摇床通透20 min,于Apollo染色反应液中避光孵 育30 min, PBS洗1次, 5 min, Hoechst33342避光染色 30 min,荧光显微镜下观察细胞增殖能力。随机计 数200个细胞,计算阳性细胞百分比。

1.8 流式细胞术检测HS-5细胞周期

细胞分组培养48 h, PBS清洗后分别收集于1.5 mL EP管中,每管不少于1×10⁶个细胞,2000 r/min离心5 min 后弃上清。每管逐滴加入500 μL 75%冰乙醇,4 °C固 定至少5 h后送流式细胞术检测。

1.9 DCFH-DA荧光检测HS-5细胞活性氧含量

调整细胞密度为2×10⁵细胞/孔种植于6孔板中, 分组培养48 h, 无血清培养基清洗3次, 加入2'7'-二 氯荧光黄双乙酸盐(2'7'-dichlorofluorescin diacetate, DCFH-DA)探针, 37 °C孵育20~30 min后, 无血清培 养基清洗3次, 置于荧光显微镜下观察并拍照。使用 ImageJ软件分析单位面积下平均光密度值。

1.10 统计学分析

本实验结果采用SPSS 20.0统计学软件进行 One-Way ANOVA方差分析。P<0.05时具有统计学 意义,所有数据采用均值±标准差(x±s)表示。

2 结果

2.1 5-FU抑制HS-5细胞生长

CCK-8检测结果表明,分别使用0、12.5、25、 50、100μg/mL不同浓度的5-FU作用HS-5细胞,随着 5-FU浓度升高和处理时间的延长,细胞抑制率明显 增加。25μg/mL的5-FU作用HS-5细胞48~72h,可抑 制半数左右HS-5细胞增殖,提示化疗药物5-FU对人 骨髓基质细胞有损伤作用(图1)。

2.2 5-FU下调HS-5细胞Wnt通路相关蛋白表达

文献证实,骨髓基质细胞内Wnt/β-catenin信号 通路的激活对维持造血干细胞自我更新和重建造血 有重要作用,本实验探讨化疗药物5-FU对骨髓基质 细胞的生长抑制作用是否与Wnt/β-catenin通路改变 有关。β-catenin是Wnt通路的关键信号蛋白,Western blot结果显示,与对照组相比,5-FU作用后骨髓基 质细胞β-catenin下调,同时β-catenin的下游靶蛋白 Cyclin D1、C-myc表达也降低(图2),提示5-FU抑制 HS-5细胞生长可能与下调Wnt/β-catenin信号通路有 关。

2.3 Wnt通路激动剂拮抗5-FU对HS-5细胞的增 殖抑制作用

为了进一步证实5-FU通过Wnt/β-catenin信号通路发挥作用,实验观察通路激动剂LiCl对5-FU作用后HS-5细胞损伤的逆转作用。不同浓度LiCl单独作用HS-5细胞,5、10和20 mmol/L LiCl均有明显促进增殖作用(图3和图4),后续实验选用10 mmol/L LiCl



图1 5-FU抑制HS-5细胞生长 Fig.1 Inhibitory effects of 5-FU on HS-5 cell growth



A: Wnt通路相关蛋白表达的Western blot; B、C: 蛋白半定量分析。*P<0.05, 与对照组组比较; *P<0.05, 与5-FU组比较。 A: Western blot of the related proteins expression of Wnt signaling pathway; B,C: semi-quantitative analysis. *P<0.05 compared with the control group, *P<0.05 compared with the 5-FU group.



预处理观察通路激活对5-FU损伤HS-5细胞的保护 作用。细胞增殖EdU检测结果显示,5-FU组荧光细 胞阳性率明显低于对照组;而LiCl预处理后,与5-FU 组相比,LiCl+5-FU组EdU荧光细胞阳性率显著上升 (图5)。细胞周期流式细胞术检测结果显示与对照 组相比,5-FU作用后G₀/G₁期的细胞比例显著性增 高、S期细胞比例降低,细胞发生G₁期周期阻滞。而 与5-FU组相比较,LiCl+5-FU组G₀/G₁期细胞比例显 著降低、S期细胞比例增高(图6)。Western blot结果 显示,LiCl可显著减轻5-FU对Wnt通路的下调作用, 使β-catenin、Cyclin D1、C-myc蛋白表达回升(图2)。 以上结果表明,一定剂量的Wnt通路激动剂LiCl可部 分缓解5-FU所致HS-5细胞周期阻滞,促进细胞增殖, 进一步反向证实5-FU抑制HS-5细胞生长与Wnt通路 下调有关。

2.4 LiCl延缓5-FU诱导HS-5细胞氧化应激

与对照组相比, 5-FU组HS-5细胞内ROS含量显 著上升。LiCl预处理可减少5-FU造成的HS-5细胞胞 内ROS蓄积(图7)。结果提示, 5-FU损伤HS-5细胞导 致氧化应激; 而Wnt通路激活可增强HS-5细胞抵抗 氧化应激能力。

2.5 5-FU下调HS-5细胞Cx43蛋白表达

Western blot结果表示,与对照组相比,5-FU组 Cx43蛋白表达降低。与5-FU组相比,LiCl+5-FU组



A~E: 0、5、10、20、40 mmol/L LiCl作用HS-5细胞48 h, 倒置显微镜下观察。 A-E: HS-5 cells were treated by 0, 5, 10, 20, 40 mmol/L LiCl for 48 h, observed under inverted microscope. 图3 倒置显微镜观察LiCl对HS-5细胞数量的影响

Fig.3 Effects of LiCl on the number of HS-5 cells observed under inverted microscope



*P<0.05, 与对照组比较。

*P < 0.05 compared with the control group.





A: EdU标记增殖细胞; B:EdU阳性细胞比率。*P<0.05, 与对照组组比较; *P<0.05, 与5-FU组比较。 A: the EdU labeled proliferative cells; B: the percentage of EdU positive cells. *P < 0.05 compared with the control group; *P < 0.05 compared with the 5-FU group.



A: HS-5细胞流式细胞周期; B: 细胞周期比例分布。*P<0.05, 与对照组组比较; *P<0.05, 与5-FU组比较。

A: flow cytometry graphs of cell cycle analysis of HS-5 cells; B: the ratio of cell cycle distribution of HS-5 cells. *P<0.05 compared with the control group; #P<0.05 compared with the 5-FU group.

> 图6 HS-5细胞细胞周期 Fig.6 The cell cycle of HS-5 cells

(

 G_0/G_1

S

 G_2/M



A: 荧光显微镜观察内源性ROS, 标尺=40 μm; B: ROS平均荧光强度分析。*P<0.05, 与对照组组比较; *P<0.05, 与5-FU组比较。 A: intercellular ROS detected by fluorescence microscopy, scalebars=40 μm; B: the mean fluorescence intensity of ROS. *P<0.05 compared with the control group; *P<0.05 compared with the 5-FU group.





A: Cx43蛋白的Western blot; B: Cx43蛋白半定量分析。**P*<0.05, 与对照组组比较; **P*<0.05, 与5-FU组比较。 A: Western blot of Cx43 protein; B: semi-quantitative analysis of Cx43 protein. **P*<0.05 compared with the control group, **P*<0.05 compared with the 5-FU group.

图8 HS-5细胞Cx43蛋白表达 Fig.8 The protein expression of Cx43 in HS-5 cells

Cx43蛋白表达上升(图8)。该结果提示, 5-FU影响 HS-5细胞功能, 而Wnt通路激活可保护损伤细胞的 细胞间连接。

3 讨论

骨髓是造血干/祖细胞定居、增殖、分化的"龛", 基质细胞通过产生各种细胞因子、细胞外基质和黏 附分子调控邻近的造血干/祖细胞。实验证实在损伤 因素作用下,造血干细胞和骨髓基质细胞群体均有 内源性活性氧蓄积,而基质细胞更甚,因为基质细胞 氧代谢更活跃,且造血干细胞胞内活性氧会通过缝 隙连接细胞间通讯Cx43转移至基质^[9-10]。大量蓄积 的内源性活性氧可引起骨髓基质细胞产生DNA损伤 反应,激活P53-P21和P38-P16信号通路,诱发细胞凋 亡或衰老^[11-12]。基质损伤可严重影响血发生:年轻的 造血干细胞移植到衰老骨髓龛出现归巢能力削弱, 分化潜能下降。致死剂量辐射的衰老骨髓基质上造 血干/祖细胞数量减少,淋巴细胞发生受阻^[13-14]。文 献报道,5-FU、阿霉素、依托泊苷、甲氨蝶呤等化 疗药物可引起骨髓骨小梁减少、髓内脂肪化和造血 抑制^[15-16]。本课题组^[8]既往实验证明,化疗药物5-FU 可导致骨髓基质细胞氧化损伤、细胞衰老或凋亡, 最终引起造血细胞应激性衰老,但5-FU损伤骨髓基 质细胞的分子机制目前尚不甚清楚。

Wnt/β-catenin信号通路是一条进化上高度保守 的信号通路,该通路在发育过程中起关键作用,参 与细胞增殖、分化、凋亡和定位控制等过程^[4]。利 用基因过表达/敲除技术发现,Wnt信号通路不仅直 接参与造血干细胞的调控,还广泛影响骨髓基质细 胞功能。加入Wnt3a条件培养液的骨髓基质细胞与 正常造血细胞共培养或转染β-catenin的骨髓基质细 胞与5-FU标记骨髓细胞共培养,均发现Lin⁻Sca-1⁺ c-kit⁺造血干细胞数量增多,移植重建能力增强;而 直接调控造血细胞内β-catenin表达缺失却并不影响 造血重建^[6,17]。以上实验结果提示,Wnt/β-catenin信 号通过基质依赖的方式调控造血干细胞的自我更新 与重建。有文献报道,该通路可通过抑制间充质干 细胞衰老的方式调控细胞增殖^[18]。稳态和应激状态 下信号通路发挥的作用可能是不同的,本文着重探 讨化疗药物5-FU是否会通过Wnt/β-catenin通路影响 骨髓基质细胞功能。

Wnt通路激活后,β-catenin核转位与TCF/LEF结 合,可通过下游靶基因*C-myc*等调控细胞增殖。LiCl 作为Wnt/β-catenin信号通路的激动剂通过抑制GSK-3β使得β-catenin在胞质中积累,继而进入细胞核与 转录因子结合,激活下游靶基因的转录^[19]。既往研 究表明,LiCl通过适度激活Wnt通路可影响神经细 胞和成肌细胞的增殖^[20-21]。与之相似,本研究发现, 5-FU作用后HS-5增殖受抑制,细胞周期发生G₁期阻 滞,其机理与通路关键蛋白β-catenin下调,继而细胞 周期蛋白Cyclin D1、增殖调控蛋白C-myc下调相关。 而LiCl激活Wnt/β-catenin通路后,细胞增殖相关蛋白 Cyclin D1、C-myc表达增强,拮抗了5-FU对HS-5细 胞增殖抑制的作用。

ROS是含有未配对电子的氧的自由基和活性 代谢物,在细胞信号转导和活性调控中起重要作 用。细胞内源性氧代谢的失调和外源性的刺激会 引起ROS水平上升, 激发的氧化应激对脂质、蛋白 质和DNA有潜在的损伤作用^[22]。研究证实, 电离辐 射和化疗会导致小鼠体内ROS蓄积,引起骨髓损伤, 从而诱导造血干细胞衰老[23]。Lento等[24]研究证实, Wnt/β-catenin信号缺失显著影响了放射性损伤后造 血干/祖细胞再生、骨髓恢复和造血重建,其机制与 β-catenin缺失小鼠抗氧化应激能力减弱,造血干细 胞抗辐射能力降低、胞内ROS蓄积、DNA双链断裂 有关,该实验表明Wnt通路拮抗氧化应激。本研究 发现, 5-FU处理HS-5细胞后, Wnt信号通路相关蛋白 表达下调的同时胞内ROS升高, 而LiCl预处理激活 通路后, HS-5细胞Wnt信号通路相关蛋白表达上调 的同时胞内ROS含量明显下降,同样印证了在化疗 损伤情况下HS-5细胞内Wnt通路调控与氧化应激有 关联作用。有趣的是,有研究表明,氧化应激本身会 影响Wnt通路:氧化应激DNA损伤过程中产生的效 应分子会通过抑制转录活性或参与翻译后修饰增强

泛素化降解等多种方式下调Wnt通路^[25]。氧化应激 可以促进β-catenin与转录因子FoxO结合,激活FoxO 核转位,调控与细胞凋亡、DNA损伤修复和抗氧化 酶有关的靶基因转录,从而构建以FoxO为中心的氧 化应激防线^[26-28]。关于5-FU下调Wnt通路与氧化应 激的关系我们将在后续工作中进一步研究。

Cx43作为间隙连接的一种连接蛋白,可通过运 输小分子物质在细胞生理活动中起着至关重要的作 用。造血微环境中的骨髓基质细胞、成骨细胞、内 皮细胞均表达Cx43, Cx43可将造血干/祖细胞内的 活性氧转移到微环境从而起到保护作用,其对造血 干细胞的功能维持、化疗后造血功能恢复起到重要 作用^[29-30]。值得一提的是, Cx43本身会受到造血微 环境氧化负荷的影响,氧化应激时Cx43表达下调^[9]。 本研究结果表明, 5-FU作用后, 伴随氧化应激HS-5 细胞的Cx43蛋白表达明显下降, 而LiCl预处理后细 胞氧化负荷减低的同时, HS-5细胞的Cx43蛋白表达 增强,提示5-FU引起的细胞氧化应激可影响细胞间 通讯, 而激活Wnt通路可以减轻化疗药物引起的氧 化应激,从而减轻药物对细胞间通讯的损伤。本实 验研究结果与DU等^[21]证实LiCl增强骨骼肌成肌细 胞Cx43表达的实验结果相吻合,该实验指出,LiCl增 强Cx43蛋白表达机制还可能与Cx43蛋白磷酸化修 饰有关。我们课题组^[8]既往研究结果表明、5-FU作 用后骨髓基质细胞分泌正向造血调控因子减少,与 造血细胞共培养可导致造血细胞发生应激性早衰, 该结果可能是由于, 5-FU下调Wnt通路诱导氧化应 激、细胞间通讯功能减弱,最终导致骨髓基质细胞 的功能异常。

综上所述, 5-FU可通过下调Wnt/β-catenin信 号通路抑制HS-5细胞的增殖,该实验为干预Wnt/ β-catenin信号通路从而减轻骨髓基质细胞的化疗损 伤提供了新的思路。

参考文献 (References)

- Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. Leuk Lymphoma 2001; 42(5): 863-70.
- 2 Wang Y, Probin V, Zhou D. Cancer therapy-induced residual bone marrow injury-Mechanisms of induction and implication for therapy. Curr Cancer Ther Rev 2006; 2(3): 271-9.
- 3 Sakai Y, Yamamori T, Yoshikawa Y, Bo T, Suzuki M, Yamamoto K, *et al.* NADPH oxidase 4 mediates ROS production in radiation-

induced senescent cells and promotes migration of inflammatory cells. Free Radic Res 2018; 52(1): 92-102.

- 4 Petersen CP, Reddien PW. Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. Cell 2009; 139(6): 1056-68.
- 5 Georgiou KR, Hui S K, Xian CJ. Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy. Am J Stem Cells 2012; 1(3): 205-24.
- 6 Kim JA, Kang YJ, Park G, Kim M, Park YO, Kim H, et al. Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. Stem Cells 2009; 27(6): 1318-29.
- 7 Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. Science 2002; 296(5573): 1644-6.
- 8 Xiao H, Xiong L, Song X, Jin P, Chen L, Chen X, *et al.* Angelica sinensis polysaccharides ameliorate stress-induced premature senescence of hematopoietic cell via protecting bone marrow stromal cells from oxidative injuries caused by 5-fluorouracil. Int J Mol Sci 2017; 18(11): 2265-87.
- 9 Taniguchi Ishikawa E, Gonzalez-Nieto D, Ghiaur G, Dunn SK, Ficker AM, Murali B, *et al.* Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(23): 9071-6.
- 10 Ploemacher RE, Mayen AE, De Koning AE, Krenacs T, Rosendaal M. Hematopoiesis: gap junction intercellular communication is likely to be involved in regulation of stroma-dependent proliferation of hemopoietic stem cells. Hematology 2000; 5(2): 133-47.
- 11 Chen BP, Li M, Asaithamby, A new insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. Cancer Lett 2012; 327(1/2): 103-10.
- 12 Garinis GA, van der Horst GT, Vijg J, Hoeijmakers JH. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. Nat Cell Biol 2008; 10(11): 1241-7.
- 13 Shao L, Wang Y, Chang J, Luo Y, Meng A, Zhou D. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. Transl Cancer Res 2013; 2(5): 397-411.
- 14 Li F, Jin F, Freitas A, Szabo P, Weksler ME. Impaired regeneration of the peripheral B cell repertoire from bone marrow following lymphopenia in old mice. Eur J mmunol 2001; 31(2): 500-5.
- 15 Gardner RV, Lerner C, Astle CM, Harrison DE. Assessing permanent damage to primitive hematopoietic stem cells after chemotherapy using the competitive repopulation assay. Cancer Chemother Pharmacol 1993; 32(6): 450-4.
- 16 Schmidmaier R, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Evaluation of chemosensitivity of human bone marrow stromal cells: differences between common chemotherapeutic drugs. Anticancer Res 2006; 26(1A): 347-50.
- 17 Nemeth MJ, Mak KK, Yang Y, Bodine DM. beta-Catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for

long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. Stem Cells 2009; 27(5): 1109-19.

- 18 Jeoung JY, Nam HY, Kwak J, Jin HJ, Lee HJ, Lee BW, *et al*. A decline in Wnt3a signaling is necessary for mesenchymal stem cells to proceed to replicative senescence. Stem Cells Dev 2015; 24(8): 973-82.
- Jope RS. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. Trends Pharmacol Sci 2003; 24(9): 441-3.
- 20 Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS, *et al.* Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both *in vitro* and *in vivo.* J Neurochem 2004; 89(2): 324-36.
- 21 Du WJ, Li JK, Wang QY, Hou JB, Yu B. Lithium chloride regulates connexin43 in skeletal myoblasts *in vitro*: possible involvement in Wnt/beta-catenin signaling. Cell Commun Adhes 2008; 15(3): 261-71.
- 22 Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. Nature 2009; 461(7263): 537-41.
- 23 Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, Li H, Meng A, Zhou D. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. Free Radic Biol Med 2010; 48(2): 348-56.
- 24 Lento W, Ito T, Zhao C, Harris JR, Huang W, Jiang C, *et al.* Loss of beta-catenin triggers oxidative stress and impairs hematopoietic regeneration. Genes Dev 2014; 28(9): 995-1004.
- 25 Lin CL, Wang JY, Ko JY, Surendran K, Huang YT, Kuo YH, *et al*. Superoxide destabilization of beta-catenin augments apoptosis of high-glucose-stressed mesangial cells. Endocrinology 2008; 149(6): 2934-42.
- 26 Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. Stem Cells Dev 2015; 24(10): 1150-63.
- 27 Rached MT, Kode A, Xu L, Yoshikawa Y, Paik JH, Depinho RA, et al. FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. Cell Metab 2010; 11(2): 147-60.
- 28 Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. Science 2005; 308(5725): 1181-4.
- 29 Durig J, Rosenthal C, Halfmeyer K, Wiemann M, Novotny J, Bingmann D, *et al.* Intercellular communication between bone marrow stromal cells and CD34⁺ haematopoietic progenitor cells is mediated by connexin 43-type gap junctions. Br J Haematol 2000; 111(2): 416-25.
- 30 Cancelas JA, Koevoet WL, de Koning AE, Mayen AE, Rombouts EJ, Ploemacher RE. Connexin-43 gap junctions are involved in multiconnexin-expressing stromal support of hemopoietic progenitors and stem cells. Blood 2000; 96(2): 498-505.