

# 辐射诱导 IEC-6 细胞 GSK3 $\beta$ 信号转导途径的激活 与细胞凋亡的关系研究

周舟 张蕾 邓朝晖 余晓东 张广斌 余争平

(第三军医大学劳动卫生学教研室 重庆 400038)

**摘要** 探讨了辐射诱导 IEC-6 细胞 GSK3 $\beta$  信号转导途径的激活与细胞凋亡的关系, 以及调控 GSK3 $\beta$  信号转导途径对  $\gamma$  辐射诱导 IEC-6 细胞凋亡的保护作用。分别用 RT-PCR 检测 GSK3 $\beta$  和 caspase-3 mRNA 表达, Western-blot 法检测 GSK3 $\beta$  蛋白质磷酸化水平, 放射活性法检测 GSK-3 $\beta$  蛋白酶活性, caspase-3 分光法检测 caspase-3 酶活性, Hoechst 33342 荧光染色法检测细胞凋亡, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段化。发现 6Gy  $\gamma$  射线照射可导致 IEC-6 细胞 GSK3 $\beta$  基因表达上调, 蛋白磷酸化水平降低, 激酶活性增高; 同时可使 GSK3 $\beta$  介导的下游蛋白激酶 caspase-3 基因表达上调及酶活性增强; GSK3 $\beta$  和 caspase-3 特异性抑制剂预处理 IEC-6 细胞可使  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞凋亡细胞百分率降低, 染色体 DNA 片段化消失。研究结果表明  $\gamma$  辐射可通过激活 GSK3 $\beta$  从而进一步激活细胞凋亡相关蛋白激酶分子 caspase-3, 最终导致 IEC-6 细胞凋亡。抑制 GSK3 $\beta$  和 caspase-3 激活可减轻 6Gy  $\gamma$  辐射导致的 IEC-6 细胞凋亡, 实验证实了 GSK3 $\beta$  与 caspase-3 在  $\gamma$  辐射致肠上皮 IEC-6 细胞株损伤过程中的重要作用。

**关键词**  $\gamma$  辐射, IEC-6 细胞, GSK3 $\beta$ , Caspase-3, 细胞凋亡

**中图分类号** R811, R146

肠道粘膜上皮细胞层是由肠隐窝干细胞不断增殖、分化形成, 电离辐射可以通过杀伤肠道粘膜上皮细胞和隐窝干细胞从而破坏肠道的吸收和屏障功能。因此, 保护肠上皮细胞是拮抗  $\gamma$  辐射致肠道损伤的一个重要途径。

糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (Glycogen synthase Kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ) 近年来被发现在细胞的生长、分化、突变、细胞凋亡和信号传导等生命活动中具有重要的调控作用<sup>[1,2]</sup>。GSK-3 $\beta$  广泛地表达于机体的各种组织和细胞中, 肽链结构中富含丝氨酸/苏氨酸残基, 其 Ser9 残基被磷酸化后其活性被抑制<sup>[3]</sup>。研究表明, 在多种正常组织细胞以及多数类型的肿瘤细胞中, GSK-3 $\beta$  的激活可以进一步激活细胞凋亡的相关蛋白激酶半胱氨酸特异的天门冬氨酸蛋白酶 (Cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues, caspase) 家族的 caspase-3, 造成核蛋白的分解与 DNA 链的剪切断裂, 从而诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>, 但  $\gamma$  辐射造成的肠上皮细胞损伤过程中是否有 GSK-3 $\beta$  偶联的信号转导分子的参与及调控机制尚未见研究报道。

本研究旨在观察电离辐射对 GSK-3 $\beta$  和下游介导的与细胞凋亡相关的蛋白分子 caspase-3 基因、蛋白质磷酸化水平和酶活性的影响, 探讨 GSK3 $\beta$  偶联的信号转导通路在  $\gamma$  辐射诱导肠上皮 IEC-6 (Intestinal epithelial cell-6, IEC-6) 细胞凋亡过程中的作用以及调控 GSK3 $\beta$  信号转导途径对  $\gamma$  辐射诱导 IEC-6 细胞凋亡的保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养及 $\gamma$ 射线照射

IEC-6 细胞株源于大鼠空肠上皮细胞, 用含 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 5%CO<sub>2</sub>、95% 空气、37℃ 条件下培养, 将指数生长期的 3 $\times$ 10<sup>6</sup> cell/5mL 的细胞接受 6Gy <sup>60</sup>Co  $\gamma$  辐射, 分别在辐照后 5、30、60、120 min 进行各项实验。

### 1.2 试剂

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, USA); 抗磷酸化 Ser9 位点 GSK3 $\beta$  单克隆抗体 (Santa Cruz, USA);

国家自然科学基金 (30300072) 资助

第一作者: 周舟, 女, 1975 年 1 月出生, 2005 年于第三军医大学获博士学位, 讲师, 主要从事辐射生物学研究  
通讯联系人: 余争平

收稿日期: 初稿 2005-11-15, 修回 2006-01-17

Caspase-3 Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA) 等。

### 1.3 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) 法检测 GSK3 $\beta$ 和 caspase-3 mRNA 表达

用 Tripure 提取 IEC-6 细胞总 RNA; 取样本总 RNA 5.0 $\mu$ g 逆转录制备 cDNA; 引物序列为: GSK3 $\beta$  引物: 上游 5'-CCTTAACCTGGTGCTGGACT-3', 下游 5'-AGCTCTGGTGCCCTGTAGTA-3'; Caspase-3 引物: 上游 5'-TCTTCAGAGGCGACTACTGC-3', 下游 5'-TCCGGTTAACACGAGTGAGG-3';  $\beta$ -actin 引物: 上游 5'-CATTGTCACCAACTGGGAGG-3', 下游 5'-CATAGCTCTTCTCCAGGGAG-3'。GSK3 $\beta$  和 caspase-3 PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C $\times$ 30s, 58 $^{\circ}$ C $\times$ 30s, 72 $^{\circ}$ C $\times$ 1min, 共进行 38 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物电泳凝胶置于 Gel Doc 2000 图像分析系统中进行灰度分析, 用目的基因 PCR 产物扫描值/对应的  $\beta$ -actin 表达产物扫描值比值表示基因表达水平。

### 1.4 Western-blot 法检测 GSK3 $\beta$ 蛋白质磷酸化水平

提取照射后 IEC-6 细胞胞浆蛋白, Lowry 法测蛋白质含量, 用抗磷酸化 Ser9 位点 GSK3  $\beta$  单克隆抗体 (1:1000) 进行免疫印迹。二胺基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 显色, 将显色清晰条带的聚偏二氟乙烯 (Polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜置 Gel Doc2000 凝胶扫描系统上分析, 以样本扫描值/对照扫描值的比值进行统计分析。

### 1.5 GSK-3 $\beta$ 蛋白酶活性的检测<sup>[5]</sup>

提取照射后 IEC-6 细胞胞浆蛋白, 测蛋白质含量。每样本取 8.5 $\mu$ g 蛋白, 加入含有 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 的缓冲液和终浓度为 0.75mg/mL 的特异性底物糖原合成酶底物肽 (Glycogen synthase substrate peptide, GS), 反应 1h 后, 煮沸终止反应, 将反应物转至 P81 磷酸纤维素纸上, 检测其放射活性。进行放射活性计数后, 以样本/对照的比值进行统计分析。

### 1.6 Caspase-3 酶活性的检测

提取照射后的 IEC-6 细胞胞浆蛋白, 测量蛋白含量后用分光法测定 caspase-3 活性, 具体操作步骤

按 Sigma-Aldrich 公司 caspase-3 Assay Kit 中的操作说明书进行, 结果光密度值以样本/对照的比值进行统计分析。

### 1.7 细胞凋亡百分率检测

采用 Hoechst 33342 荧光染色法检测细胞凋亡<sup>[6]</sup>。制备好的细胞悬液加入终浓度为 5 $\mu$ g/mL 的 Hoechst 33342 荧光染料, 混匀, 避光静置 30min 后, 荧光显微镜下观察, 在每个样本中计数 500 个细胞内所含凋亡细胞数, 计算凋亡细胞百分率。

### 1.8 DNA 片段化检测

DNA 片段化用琼脂糖凝胶电泳作定性分析<sup>[7]</sup>。提取 IEC-6 细胞 DNA, 用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测 DNA 片段化。

### 1.9 统计分析

实验数据采用 Microsoft Excel 软件进行方差齐性检验和 *t* 检验,  $p < 0.05$  为相差显著。

## 2 结果

### 2.1 $\gamma$ 照射对 IEC-6 细胞 GSK3 $\beta$ mRNA 表达和蛋白磷酸化水平的影响

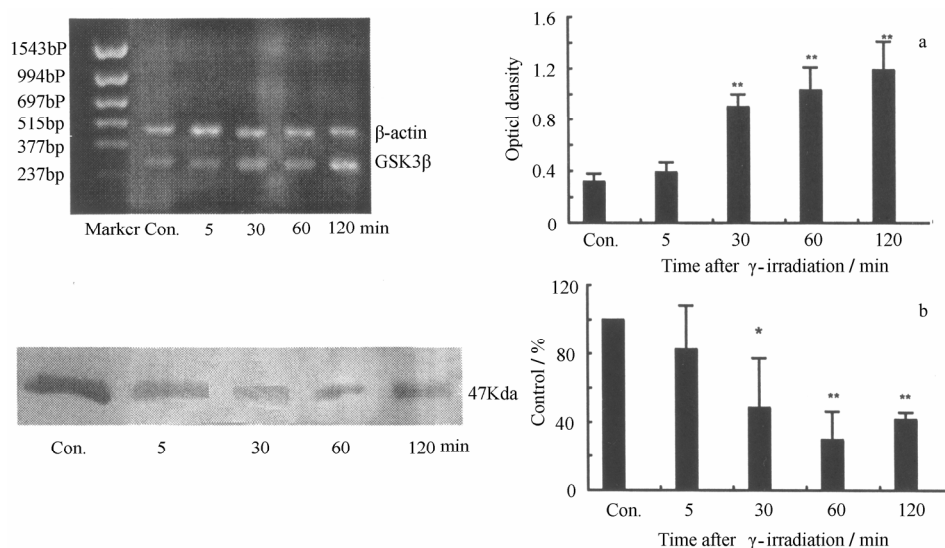
照射后 30 min, IEC-6 细胞 GSK3  $\beta$  mRNA 表达开始增高, 60、120min GSK3  $\beta$  mRNA 表达均明显高于对照组 (见图 1a); 照射后 30min, IEC-6 细胞 GSK3  $\beta$  蛋白磷酸化水平开始降低, 60、120min GSK3  $\beta$  蛋白磷酸化水平明显低于对照组水平 (见图 1b)。

### 2.2 $\gamma$ 照射对 IEC-6 细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响

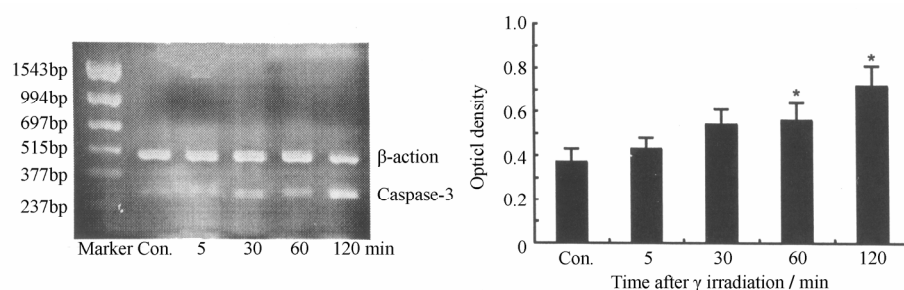
图 2 结果表明, caspase-3 mRNA 在 6Gy  $\gamma$  射线照射后 60、120 min 高于对照组。

### 2.3 $\gamma$ 辐射对 IEC-6 细胞 GSK3 $\beta$ 、caspase-3 酶活性的影响

$\gamma$  射线照射 IEC-6 细胞后 30min, GSK3  $\beta$  酶活性就开始增高, 60、120min 均明显高于对照组。caspase-3 酶活性变化趋势与 caspase-3 mRNA 一致, 在辐射后 60min、120min 明显高于对照组 (见表 1)。



**Fig.1** Changes of GSK3  $\beta$  mRNA expression(a) and phosphorylation(b) in IEC-6 cells after 6Gy  $\gamma$ -irradiation (Typical result of three independent experiments)



**Fig.2** Changes of caspase-3 mRNA expression in IEC-6 cells after 6Gy  $\gamma$ -irradiation (Typical result of three independent experiments)

**Table 1** Changes of GSK3  $\beta$  and caspase-3 enzymes activity in IEC-6 cells after  $\gamma$ -irradiation

( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Contol / %	Control	Time after 6Gy $\gamma$ -irradiation/min			
		5	30	60	120
GSK3 $\beta$	100	135 $\pm$ 25.2	194 $\pm$ 27.6 <sup>(1)</sup>	276 $\pm$ 34.7 <sup>(2)</sup>	302 $\pm$ 38.2 <sup>(2)</sup>
Caspase-3	100	127 $\pm$ 17.4	153 $\pm$ 29.2	213 $\pm$ 26.8 <sup>(1)</sup>	286 $\pm$ 31.5 <sup>(2)</sup>

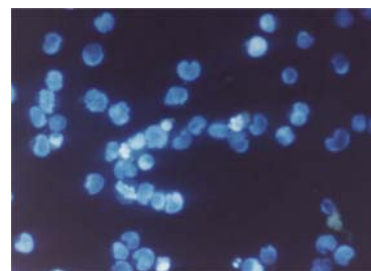
<sup>(1)</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>  $p < 0.01$  vs control

#### 2.4 抑制 GSK3 $\beta$ 和 caspase-3 激活对 $\gamma$ 辐射诱导 IEC-6 细胞凋亡细胞百分率的影响

应用荧光染料 Hoechst 33342 染色, 正常 IEC-6 细胞呈均一的淡染, 未见异常核。  $\gamma$  射线照射 IEC-6 细胞后 12h 呈现典型的凋亡形态学变化, 镜下可见典型的核固缩、核碎裂、胞膜外突小泡形成 (bubbling) 等多种凋亡形态学特征(见图 3)。

应用 GSK3  $\beta$  特异性抑制剂氯化锂 LiCl 20mmol 和 caspase-3 特异性抑制剂 z-DEVD. fmk 100 $\mu$ mol 分别预处理培养的 IEC-6 细胞 30min, 然后将处理后的 IEC-6 细胞进行 6Gy  $\gamma$  射线照射, 照后 12h 后检测 IEC-6 细胞凋亡百分率。结果表明 LiCl 预处理 +  $\gamma$  射线照射组与单纯  $\gamma$  辐射后 12h 组相比凋亡细胞百分率明显降低, 与对照组水平接近; caspase-3 特

异性抑制剂预处理 +  $\gamma$  射线照射组也可降低凋亡细胞百分率, 但其效应没有抑制 GSK3  $\beta$  活性拮抗凋亡的效应明显, 其凋亡细胞百分率仍高于对照组(见表 2)。上述结果提示抑制 GSK3  $\beta$  和 caspase-3 的激活均可拮抗  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞损伤。



**Fig.3** Nuclear condensation and debris in apoptotic IEC-6 cells 12h after 6Gy  $\gamma$ -irradiation (Hoechst 33342 staining  $\times 200$ )

**Table 2** Percentage of apoptotic IEC-6 cells in different pretreatments after  $\gamma$ -irradiation ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

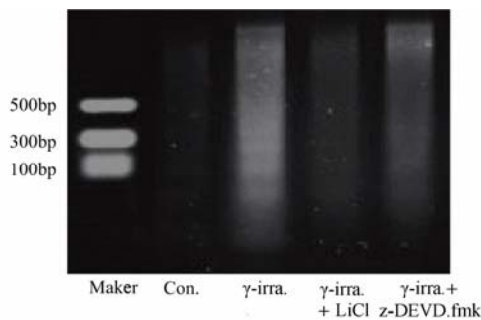
Treatment	Apoptosis / %
Control	4.8 $\pm$ 0.3
$\gamma$ -irradiation	33.6 $\pm$ 8.3 <sup>(2)</sup>
LiCl	3.8 $\pm$ 0.5
$\gamma$ -irradiation + LiCl	8.4 $\pm$ 5.1 <sup>(4)</sup>
z-DEVD.fmk	4.2 $\pm$ 0.7
$\gamma$ -irradiation + z-DEVD.fmk	17.2 $\pm$ 5.2 <sup>(1)(4)</sup>

<sup>(1)</sup>  $p < 0.05$ , <sup>(2)</sup>  $p < 0.01$  vs control; <sup>(3)</sup>  $p < 0.05$ ,

<sup>(4)</sup>  $p < 0.01$  vs  $\gamma$ -irradiation

## 2.5 抑制 GSK3 $\beta$ 和 caspase-3 激活对 $\gamma$ 辐照诱导 IEC-6 细胞 DNA 片段化的影响

用 GSK3  $\beta$  和 caspase-3 抑制剂预处理 IEC-6 细胞, 再进行  $\gamma$  射线照射后 12h 检测 DNA 片段化, 结果表明两种抑制剂均可拮抗  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞 DNA 片段化, 但 caspase-3 抑制剂的抑制效果不如 GSK3 $\beta$  抑制剂的抑制效果显著 (见图 4)。



**Fig.4** Effects of different pretreatments on DNA fragmentation induced by 6Gy  $\gamma$ -irradiation in cultured IEC-6 cells. (Typical result of three independent experiments)

## 3 讨论

GSK3  $\beta$  在信号转导过程中的作用引起越来越广泛的关注, 它不仅具有通过激活糖原合成酶调节细胞糖代谢从而调控细胞能量代谢过程的作用, 更重要的是在细胞的生长、分化、突变、细胞凋亡和信号转导等生命活动中也具有重要的调控作用。GSK3  $\beta$  磷酸化是调控 GSK3  $\beta$  功能状态的最主要机制, GSK3  $\beta$  上游的蛋白激酶可通过 PKB/Akt 途径, 激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K), PI3K 作用于 PIP<sub>2</sub> (4,5-二磷酸磷脂酰肌醇) 使之磷酸化生成 PIP<sub>3</sub> (3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇), PIP<sub>3</sub> 与磷脂酰肌醇依赖的激酶 PDK 和整合素连接激酶 ILK 结合形成有活性的复合物并作用于下游 Akt, 使其丝氨酸 473 位点和苏氨酸 308 位点被磷酸化并被激活, 活化的 Akt 可磷酸化 GSK3  $\beta$  丝氨酸 9 位点抑制 GSK3  $\beta$  活性<sup>[7]</sup>。由于 GSK-3  $\beta$

在调控细胞生命活动过程中的重要作用逐渐被揭示, 研究 GSK-3  $\beta$  偶联的信号转导及调控机制可能为进一步阐明  $\gamma$  辐射致肠上皮细胞损伤的分子机理与寻找有效的防护措施提供新的实验依据。

本研究所用抗 GSK3  $\beta$  磷酸化丝氨酸 9 位点单克隆抗体, 特异地检测 GSK3  $\beta$  肽链结构中 Ser 9 磷酸化状态, western blot 检测的 GSK3  $\beta$  蛋白分子杂交条带为 Ser 9 磷酸化的 GSK3  $\beta$ , 而对被去磷酸化激活的 GSK3  $\beta$  不能结合。本研究发现 6Gy  $\gamma$  辐射可上调 IEC-6 细胞 GSK3  $\beta$  基因表达, 使其蛋白磷酸化水平降低, GSK3  $\beta$  激酶活性增强, 表明  $\gamma$  辐射解除了 GSK3  $\beta$  磷酸化对其活性的抑制, 使 GSK3  $\beta$  活性增强。

新近研究表明, 热应激、电离辐照、电磁辐射和抑制 DNA 复制的抗肿瘤药物预处理都可以激活胞浆中的 GSK-3  $\beta$ , 激活的 GSK-3  $\beta$  进一步激活细胞凋亡的相关蛋白激酶 caspase 家族的 caspase-3、caspase-9, 造成核蛋白的分解与 DNA 链的剪切断裂, 从而诱导细胞凋亡, 这一过程是新近发现的不依赖 TNF- $\alpha$  受体死亡信号传导途径的激活而独立存在的一条诱导细胞凋亡的新途径<sup>[8,9]</sup>, 因此本研究进一步探讨了  $\gamma$  辐射诱导 GSK3  $\beta$  的激活与 caspase-3 变化的关系, 研究发现 caspase-3 mRNA 表达在  $\gamma$  辐射后较正常状态明显增高, 激酶活性分析结果表明 caspase-3 的活性增高变化过程与 mRNA 的表达上调的变化过程一致。因此, caspase-3 的激活可能是  $\gamma$  辐射致 IEC-6 细胞凋亡的重要途径之一。

本研究中应用 GSK3  $\beta$  特异性抑制剂可以阻断  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞凋亡, 提示调控 GSK3  $\beta$  的活性可能是拮抗  $\gamma$  辐射致肠上皮细胞损伤的重要靶点之一。Ling 等<sup>[10]</sup>在 SH-SY5Y 细胞株中观察到特异性抑制 GSK3  $\beta$  可以阻断 Thapsigargin 诱导的细胞凋亡; Somerville 等<sup>[11]</sup>发现在红系祖细胞的分化过程中, 生长因子的剥夺可以诱导凋亡, 而用 GSK3  $\beta$  的选择性抑制剂可以拮抗这一效应; Robert 等<sup>[12]</sup>在 A7r5 和 COS-7 细胞 (两个鼠源性血管内皮细胞株) 中都观察到特异性抑制 GSK3  $\beta$  的激活可以拮抗缺氧和葡萄糖剥夺诱导的凋亡。本实验中, 我们在 IEC-6 细胞获得的实验结果与上述结果相一致, 提示 GSK3  $\beta$  可能有望作为拮抗多种细胞损伤的共同靶点。

以 caspase-3 为靶点寻找对多种疾病与损伤的防治措施的研究, 是临床肿瘤治疗、缺血性心脑血管疾病治疗等方向的热点, 也是药物研发的新靶点。Hiroyuki 等<sup>[13]</sup>在左冠状动脉夹闭造成心肌缺血梗死的大鼠模型上观察到缺血后立即给予 caspase-3 的特异抑制剂 z-DEVD.fmk 可以减小缺血梗死区的面积, 并使心肌 TUNEL 染色阳性的凋亡心肌细胞数显著减少。在本研究中我们应用 caspase-3 特异性抑制剂 z-DEVD.fmk 预处理 IEC-6 细胞, 可以显著

地阻断  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞凋亡, 但并不能完全阻断  $\gamma$  辐射诱导的 IEC-6 细胞凋亡。对这一现象的解释可能存在两方面的原因: (1)  $\gamma$  辐射诱导 IEC-6 细胞凋亡可能还存在除 caspase-3 之外其它效应分子, 而本实验中并未检测其它效应分子的活性, 例如是否存在 caspase-7 的激活, 尚未进行研究; (2) GSK3  $\beta$  激活后与其它信号转导通路存在交叉激活, 单纯抑制 caspase-3 的激活, 不能阻断其它通路激活对诱导凋亡的贡献, 因此仅能部份地阻断 IEC-6 细胞凋亡。

本研究表明  $\gamma$  辐射可以激活 GSK3  $\beta$ , 进一步激活凋亡相关蛋白激酶 caspase-3, 造成 IEC-6 细胞凋亡, 应用 GSK3  $\beta$  和 caspase-3 特异性抑制剂预处理, 可以减轻  $\gamma$  辐射导致的 IEC-6 细胞凋亡, 实验提示了 GSK3  $\beta$  与 caspase-3 在  $\gamma$  辐射致肠上皮损伤过程中的重要作用, 并为临床寻找防治放疗和  $\gamma$  辐射致肠道损伤的措施提供了新的实验证据。

#### 参考文献

- 1 Paris F, Fuks Z, Kang A, *et al.* Science, 2001, **293**(5528): 293-297
- 2 Bhat R V, Shanley J, Correll M P, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(20): 11074-11079
- 3 Hetman W, Cavanaugh J E, Kimelman D, *et al.* J Neurosci, 2000, **20**(7): 2567-2574
- 4 Bijur G N, Jope R S. J Biol Chem, 2001, **276**(40): 37436-37442
- 5 Sayas C L, Moreno-Flores M T, Avila J, *et al.* J Biol Chem, 1999, **274**(52): 37046-37052
- 6 大山依势, 王冰. 细胞凋亡的检测方法(日文). 东京: 医学书院出版社, 1999. 80-95  
Oyama Y, WANG Bing. Methods in determining cell apoptosis. Tokyo: Eigakusuen, 1999: 80-95
- 7 Genevieve C S, Diane L H, Maximilian L B, *et al.* Nature, 2003, **421**(6924): 753-756
- 8 Vincenzo D L. Nature, 2000, **406**(6792): 135-136
- 9 Stephen M. Schwartz Circulation, 1998, **97**(3): 227-229
- 10 Ling S, Patrizia D S, Richard S J. J Biol Chem, 2002, **277**(47): 44701-44708
- 11 Somervaille T C, Linch D C, Khwaja A. Blood, 2001, **98**(5): 1374-1381
- 12 Robert D L, Eileen Vesely, Frank C B. J Biol Chem, 2002, **277**(44): 41667-41673
- 13 Hiroyuki Y, Kazuei O, Kazuhira M, *et al.* Circulation, 1998, **97**(3): 276-281

### Effects on regulation of GSK3 $\beta$ coupled signaling transduction pathway in radiation-induced apoptosis of IEC-6 cells

ZHOU Zhou ZHANG Lei DENG Zhaohui YU Xiaodong ZHANG Guangbin YU Zhengping  
(Department of Occupational Health, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

**ABSTRACT** The work is to determine the effects of  $\gamma$ -irradiation on GSK3  $\beta$  coupled signaling transduction pathway in IEC-6 cells, and protect effects of regulation of GSK3  $\beta$  and caspase-3 activation on  $\gamma$ -irradiation induced IEC-6 cells injuries. The changes of GSK-3  $\beta$  and caspase-3 mRNA expression were determined by RT-PCR. The change of GSK-3  $\beta$  phosphorylation was determined by western blotting. The changes of GSK-3  $\beta$  enzymes activity were tested by radiation activity measurement. The changes of caspase-3 enzymes activity were assessed via a colorimetric assay with specific substrates. The IEC-6 cells apoptosis were determined by Hoechst 33342 staining and DNA ladder. The results show that 6Gy  $\gamma$ -irradiation increased apoptotic cell percentage in IEC-6 cells. Significant changes of GSK3  $\beta$  and downstream signal transduction molecular caspase-3 in mRNA expression, GSK3  $\beta$  protein dephosphorylation and protein enzymatic activation were observed after the irradiation. GSK3  $\beta$  and coupled signal transduction pathway may play an important role to promote IEC-6 cells apoptosis. Inhibition of GSK3  $\beta$  activation can provide protective effects against the irradiation induced IEC-6 cells apoptosis. Pretreatment with caspase-3 specific inhibitor has similar effects on IEC-6 cells, being characterized by decreasing apoptotic cell percentage and blockade of DNA fragmentation induced by the irradiation. GSK3  $\beta$  and coupled signal transduction pathway plays a very important role in the irradiation induced IEC-6 cells injuries. Antagonism of GSK3  $\beta$  and caspase-3 activation may be an important approach to protect intestinal epithelial function. These results are of clinical relevance in antagonism of the irradiation induced intestinal dysfunctions.

**KEYWORDS**  $\gamma$ -irradiation, IEC-6 cells, GSK3  $\beta$ , Caspase-3, Apoptosis

**CLC** R811, R146