

低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠细胞凋亡的影响

郭剑平¹ 张华屏² 安全¹ 魏锦萍¹ 周晋源¹ 杨仲田¹

¹ (中国辐射防护研究院 太原 030006)

² (山西医科大学分子教研室 太原 030001)

摘要 从细胞凋亡角度探讨低聚壳聚糖提高辐射损伤动物存活率的机理。小鼠受到5 Gy γ 射线照射后,检测骨髓淋巴细胞凋亡数、脾脏细胞凋亡相关基因和P53蛋白的变化。流式细胞仪检测细胞凋亡,RT-PCR技术检测凋亡基因,Western方法检测蛋白表达。与单纯照射组相比,低聚壳聚糖提高受照小鼠的存活率,降低骨髓淋巴细胞的凋亡细胞数量;下调凋亡相关基因Bax、caspas-3,上调Bcl-2, Bcl-2/Bax比值升高;抑制P53蛋白表达。低聚壳聚糖可能通过抑制P53蛋白表达,影响凋亡相关基因表达,从而抑制凋亡细胞的产生,有效提高受照小鼠存活率。

关键词 低聚壳聚糖, 辐射, 细胞凋亡, 存活率

中图分类号 R818, R818.7, R818.74, Q691.5

随着核能的不断开发和利用,人类将面临各种人为辐射源的影响。核能的应用一方面给人类带来益处,如诊疗疾病,核能发电;另一方面,也可能造成人身伤害和经济损失,乃至社会的恐慌,如切尔诺贝利核事故、福岛核泄漏等事故的发生。理想的抗辐射药物虽可以将辐射造成的损害降低,但其研制却是一个世界性难题。经国内外众多机构几十年的努力,虽然发现了一些有效药物,但作为实用尚存在许多不足之处。如何研制高效低毒的辐射防护药物仍是目前辐射生物学面临的难题之一。

低聚壳聚糖由于其本身独特的多糖分子结构,阳离子食用纤维,以及同生物体极好的相容性等特点,在抗肿瘤、提高机体免疫功能及吸附毒素作用等方面报道虽较多^[1-3],但国内对低聚壳聚糖在抗辐射作用方面研究却较少。本实验对低聚壳聚糖在辐射损伤防护方面进行了初步研究,也为辐射防护药物的研制和开发提供了重要的科学依据。

1 实验材料和方法

1.1 低聚壳聚糖

实验所用低聚壳聚糖是以食品级大分子壳聚糖为原料,敏化剂协同作用,经辐照降解氧化后制备

而成。分子量<2 kD,分散系数1.21。灌胃前用蒸馏水配制成溶液。

1.2 实验动物

选用6周,雄性,清洁级SX1近交系小鼠,由山西省肿瘤研究所动物实验室提供[许可证号:SCXK(晋)2007-001]。

1.3 仪器和试剂

1.3.1 仪器 BD FACS Aria 型流式细胞仪,贝克曼公司;转印槽/伯乐转膜仪, BIO-RAD, Trana-Blot; 化学发光检测系统, BIO-RAD; 化学发光荧光成像系统, Chemi Doc XRS。

1.3.2 试剂 凋亡试剂盒(Annexin V-FITC):凯基公司,国产; beta-actin 抗体, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology; P53 抗体:sc-73566, Santa Cruz Biotechnology。

1.4 实验方法

1.4.1 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠30 d存活率的影响 实验小鼠按给药浓度随机分5组,10只/组,口服灌胃,浓度为0(单纯照射组)、200、300、400和500 mg/kg,每天给药1次,连续14 d,给药第7天对小鼠进行全身照射,照射剂量:7 Gy,剂量率

第一作者:郭剑平,女,1970年9月出生,2001年于中国辐射防护研究院获得放射医学硕士学位,副研究员,主要从事辐射防护与生物效应研究工作

Email: gjp0322@163.com

收稿日期:初稿 2011-07-18, 修回 2011-09-08

70 cGy /min, 中国辐射防护研究院钴源房 ^{60}Co γ 源, 活度 $1.2\times 10^{15}\text{q}$, 距放射源中心距离为 2.5 m。

观察不同处理组 30 d 小鼠存活情况, 统计 30 d 存活率、平均存活天数, 计算保护指数^[4]。

$$\text{保护指数}=[(ab+30c)/n]/[(a'b'+30c')/n']$$

式中, a 、 a' 分别为给药组和对照组的死亡大鼠平均存活天数; b 、 b' 分别为给药组和对照组的大鼠死亡数; c 、 c' 分别为给药组和对照组大鼠的 30 d 存活只数; n 、 n' 分别为给药组和对照组大鼠总数。保护指数 ≥ 1.2 为有保护作用。

1.4.2 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠骨髓淋巴细胞凋亡的影响 实验小鼠随机分为正常对照组、单纯照射组、低聚壳聚糖组 (300 mg/kg) 3 个实验组, 6 只/组。连续灌胃低聚壳聚糖 14 d, 每天 1 次。正常对照组和单纯照射组灌胃蒸馏水。给药第 14 d 除正常对照组外其余组小鼠均接受 ^{60}Co γ 射线全身照射。照射条件: 5 Gy 照射, 剂量率 33 cGy/min, ^{60}Co γ 源, 中国辐射防护研究院附属医院放疗科远距离治疗机, 活度 $4.1\times 10^{13}\text{q}$, 小鼠在 3 cm $\times$ 3 cm $\times$ 8 cm 的有机玻璃盒内, 距放射源中心距离为 80 cm, 照射误差 1%。照射后第 6、12、24 和 48 h 取出两大腿股骨, 用注射器吸取 4 mL 等渗 PBS 液冲出骨髓细胞, 细胞混匀后, 用 400 目的网膜过滤, 1500 r/min 离心 10 min, 重悬于 2 mL PBS 液制成单细胞悬液。用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞, 洗两遍, 将细胞浓度调至 $10^5/\text{mL}$ 左右, 按试剂盒方法染色, 用流式细胞仪检测^[5,6]。

1.4.3 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠脾组织细胞凋亡相关基因表达变化的影响 实验小鼠每组 10 只, 处理同 1.4.2。照射后 6 h, 摘取动物脾脏, 每个脾组织分别进行 RT-PCR 方法检测 Bax、Bcl-2、Caspase-3, 步骤如下: 总 RNA 提取- Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) (聚合酶链反应)-琼脂糖凝胶电泳。elDoc2000 型凝胶成像系统观察结果, 产物带的密度用凝胶扫描系统分析记录结果, 以 GAPDH 为参照, Photoshop7.0 分析条带。各基因 RT-PCR 试验条件见表 1。

1.4.4 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠脾组织细胞 P53 蛋白影响 使用 1.4.3 小鼠脾脏, 用 Western blot 方法检测 P53 蛋白, 操作步骤如下:

蛋白样品制备: 分别取各个动物的脾组织 100mg,

加入蛋白裂解液 1 mL, 匀浆, 10 000 g 离心 5 min, 取上清加入等体积的 2 $\times$ SDS buffer, 煮沸 5min, 迅速冰浴, 10 000 g 离心 5 min, 取上清用于后面实验。SDS-PAGE: 分离胶 12%, 浓缩胶 5%, 浓缩胶恒压 80 V, 电泳 45 min; 分离胶恒压 120 V, 3 h。转膜: 甲醇浸泡 2 min, 蒸馏水 1 min, 转入 PVDF 膜活化, 半干转移仪进行转膜: 恒流 100 mA, 1 min。封闭: 5%BSA 溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。一抗孵育: 小鼠来源 beta-actin 抗体和小鼠来源的 P53 抗体, 以 1 : 1 000 稀释; 兔来源的 Anti-Gadd45 抗体, 以 1 : 200 稀释; 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。二抗孵育: 抗鼠二抗, 抗兔二抗, 都以 1 : 10 000 稀释; 室温 2 h。ECL 底物化学发光显色, 扫描。所得条带用 Bandscan4.3 分析软件进行分析, 测出抗体在各组中的含量。

Table 1 Experimental condition of gene in the assay of RT-PCR

Gene	Up and down gene	Amplification condition
Gapdh	Up:tgaacgggaagctcactgg Down:tccaccacctgtgtctgga	94 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		58 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		72 $^{\circ}\text{C}$ 20"
Bax	Up:tcgacaggatgattgctgac Down:gatcagctcgggcacttttag	94 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		56 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		72 $^{\circ}\text{C}$ 20"
Bcl-2	Up:aggagcaggtgcctacaaga Down:gcatttccaccactgtct	94 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		56 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		72 $^{\circ}\text{C}$ 20"
Caspase 3	Up:gggcctgttgaactgaaaaa Down:ccgtccttgaattctcca	94 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		54 $^{\circ}\text{C}$ 20"
		72 $^{\circ}\text{C}$ 20"

1.5 统计分析

用 χ^2 检验对 30 d 存活率差别的显著性进行检验, 用 t 检验对两样本均数差别的显著性进行检验。

2 结果

2.1 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠 30 d 存活率实验

照前给予不同浓度低聚壳聚糖, 对受 7 Gy 照射小鼠 30 d 活存率、平均活存时间和保护指数结果在表 2 列出。

Table 2 Influence of survival at different dose of oligo-chitosan on irradiated mice
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

	Drug dose/mg.kg ⁻¹				
	0	200	300	400	500
30 days survival rate/%	10	30*	40*	30*	20*
Average survival time/day	11.5	20.3*	20.7*	19.1*	16.7*
Protection index	—	1.74	1.83	1.68	1.45

Note: vs. Irradiation group, * $p<0.01$.

从表2结果可见,各给药组的存活率分别比单纯照射组提高20%、30%、20%、10%,平均存活天数与单纯照射组存在统计学差异($p<0.01$),保护指数分别为1.74、1.83、1.68、1.45,其中300 mg/kg组在各组中的30 d存活率、平均存活天数和保护指数最高(保护指数 ≥ 1.2 为有效)。

2.2 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠骨髓淋巴细胞凋亡的影响随时间变化规律

低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠骨髓淋巴细胞凋亡的影响见表3。

Table 3 The effect of marrow apoptosis of oligo-chitosan irradiated at 5 Gy irradiation on different time after irradiation in mice
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Time after irradiation / h	Control group	Irradiation group	Oligo-chitosan+irradiation group
6		32.85 $\pm$ 10.76	20.36 $\pm$ 2.53*
12	16.81 $\pm$ 5.70	30.05 $\pm$ 2.23	23.38 $\pm$ 8.71*
24		14.49 $\pm$ 2.10	14.22 $\pm$ 1.07
48		14.73 $\pm$ 1.50	14.08 $\pm$ 3.51

Note: * vs. Irradiation group, $p<0.01$.

照后6—12 h小鼠骨髓淋巴细胞凋亡数发生值最高,24 h有所下降,这与文献[7]报道一致。而低聚壳聚糖组的凋亡细胞发生值较单纯照射组有所下降,以6—12 h变化较大,且与对应的单纯照射组相比差异非常显著($p<0.01$)。

2.3 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠脾组织细胞凋亡相关基因表达变化影响

低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠照后6 h脾组织细胞凋亡基因Bax、Bcl-2、Caspase-3及Bcl-2/Bax的变化见表4。结果显示,小鼠受到照射后,凋亡基因Bax、Bcl-2、Caspase-3表达变化不同。单纯照射组相关凋亡基因与正常对照组相比,Bax上调,

Bcl-2下调,Caspase-3上调,Bcl-2/Bax比值降低,且低于1;低聚壳聚糖组凋亡相关基因与单纯照射组相比,Caspase-3下调,Bax下调,Bcl-2上调,Bcl-2/Bax比值提高,并高于1,且与单纯照射组有统计学差异。

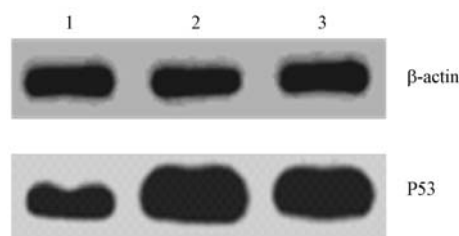
Table 4 The effects of oligo-chitosan on apoptosis related gene in mice spleen
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Gene	Group		
	Control group	Irradiation group	Oligo-chitosan+irradiation group
Bax	0.45 $\pm$ 0.14	0.68 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.05
Bcl-2	0.85 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.16	0.86 $\pm$ 0.06*
Caspase-3	0.31 $\pm$ 0.19	0.97 $\pm$ 0.12	0.27 $\pm$ 0.06*
Bcl-2/Bax	2.09 $\pm$ 0.92	0.71 $\pm$ 0.23	1.46 $\pm$ 0.12*

Note: * vs. Irradiation group, $p<0.05$.

2.4 低聚壳聚糖对辐射损伤小鼠脾组织细胞 P53 蛋白的影响

由图1可见,单纯照射组的P53蛋白表达高于正常对照组,而低聚壳聚糖组P53蛋白表达较单纯照射组有明显降低。提示,低聚壳聚糖降低P53蛋白表达。

**Fig.1** The effects of oligo-chitosan on the expression of P53 protein in mice spleen

1: Control, 2: Irradiation, 3: Irradiation+oligo-chitosan

3 讨论

研究表明细胞凋亡是影响细胞辐射敏感性的重要事件,减少细胞凋亡,保持细胞存活是辐射损伤防治的重要措施之一。

P53在损伤细胞存活中起重要作用并因此被誉为“基因警察”。研究发现:大剂量电离辐射诱导细胞凋亡的过程中P53蛋白显著增加,说明P53参与辐射诱导的细胞凋亡。本实验单纯照射组P53蛋白增加,与上述研究一致,而低聚壳聚糖组P53蛋白表达降低,说明低聚壳聚糖对辐射所致的P53蛋白表达有抑制作用。P53诱导细胞凋亡的机制是通

过 Bax/Bcl-2 这一比值的转换而完成。

Bcl-2 和 Bax 是近年来发现的一对关系密切的凋亡基因,在细胞凋亡调控中起重要作用。Bcl-2 抑制细胞的凋亡,Bax 则促进细胞的凋亡。Bcl-2 基因是较强的抗凋亡作用基因,能够抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡。大剂量电离辐射照射后,它的抗凋亡作用受到抑制甚至失去了抑制细胞凋亡作用,结果使大量细胞出现凋亡。Bcl-2/Bax 比例对决定细胞命运起着关键的作用。当 Bax 二聚体形成时,便诱导细胞凋亡。而 Bcl-2 表达量上升,Bax 二聚体分开,与 Bcl-2 形成稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,则中和了 Bax 二聚体诱导细胞凋亡的作用。当 Bcl-2/Bax 比值 >1 时,细胞凋亡无明显增加;而 Bcl-2/Bax 比值 <1 时,细胞凋亡增加明显。本实验中低聚壳聚糖组促凋亡基因 Bax、Caspas-3 表达均下调,抑制凋亡基因 Bcl-2 表达上调,Bcl-2/Bax 比值 >1 ,而且与单纯照射组有统计学差异。表明低聚壳聚糖有抑制辐射损伤小鼠脾组织细胞动物凋亡的作用。

研究表明^[8],DNA 损伤使 P53 蛋白活力上升,P53 通过对 Bcl-2 和 Bax 表达的调节,降低细胞对凋亡刺激因素的耐力。由此可见,P53 能同时在 mRNA 水平激活 Bax 基因的表达和抑制 bcl-2 基因的表达。P53 诱导凋亡可能部分通过改变细胞内 Bax、Bcl-2 的比例。本实验中单纯照射组结果与以上结论相同。低聚壳聚糖抑制 P53 蛋白表达,通过诱导凋亡,在 mRNA 水平激活 Bcl-2 基因的表达和抑制 Bax 基因的表达,改变细胞内 Bcl-2、Bax 的比例,提高细胞对凋亡刺激因素的耐力,导致凋亡细胞的减少,抑制了 DNA 损伤对细胞的凋亡作用。

低聚壳聚糖提高存活率的影响因素很多,其中抑制细胞凋亡是有效因素之一。

4 结论

本实验在细胞、分子水平上探讨了低聚壳聚糖对受照小鼠造血器官和免疫器官细胞的凋亡数、凋亡相关基因及蛋白随时间的变化规律,表明低聚壳聚糖通过抑制 P53 蛋白表达升高,抑制细胞凋亡基因表达,促进淋巴细胞和免疫细胞的增殖,有助于防止骨髓造血细胞减少,促进免疫功能恢复,是有效提高存活率的因素之一。

参考文献

- 章莹. 几丁质应用于肿瘤治疗研究现状[J]. 国外医学肿瘤学分册, 1996, **23**(6): 346-347
- ZHANG Ying. Study and research of chitin in tumor therapy. Foreign Medical Sciences (Cancer Section), 1996, **23**(6): 346-347
- 赵海霞, 牟大可. 甲壳素/壳聚糖及其衍生物的应用研究进展[J]. 山东医药, 2004, **44**(17): 59-60
- ZHAO Haixia, MOU Dake. Exploratory development research of chitin/chitosan and its derivivate [J]. Shandong Medical Journal, 2004, **44**(17): 59-60
- 蒋挺大, 壳聚糖. 北京: 化学工业出版社, 2007: 219-221
- JIANG Tingda. Chitosan. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 219-221
- 王月英, 周则卫, 沈秀, 等. E838 对 IRM_2 和 ICR 小鼠的辐射防护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2004, **14**(6): 332-335
- WANG Yueying, ZHOU Zewei, SHEN Xiu, et al. Radiation-protective effect of E838 on IRM-2 and ICR mice. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2004, **14**(6): 332-335
- 蒋晓红, 王民生, 王湘苏, 等. 职业接触射线者外周血有核细胞 DNA 损伤的研究[J]. 职业卫生与应急救援, 1998, **16**(1): 9-10
- JIANG Xiaohong, WANG Minsheng, WANG Xiangsu, et al. Research of peripheral blood nucleated cell DNA impaired on vocational contactor of ray [J]. Occupational Health and Emergency Rescue, 1998, **16**(1): 9-10
- Yuki H, Fujimura M, Yamakawa Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins as early pre-dictors of prognosis after irradiation therapy in stage IIIb uter-ine cervical cancer [J]. Jpn J Cancer Res, 2000, **91**(1): 127-134
- 邹仲敏, 孙慧勤, 罗成基. 6 Gy γ 射线照射诱导骨髓造血细胞凋亡[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1998, **6**(18): 390-391
- ZHOU Zhongmin, SUN Huiqin, LUO Chengji. 6 Gy γ -irradiation induces apoptosis of bone marrow hematopoietic cells [J]. Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection, 1998, **6**(18): 390-391
- 邹仲敏. P53 蛋白调节射线所致细胞凋亡[J]. 国外医学-放射医学核医学分册, 1996, **20**(2): 88-91
- ZHOU Zhongmin. P53 Protein regulated apoptosis caused ray. Foreign Medical Sciences (Section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 1996, **20**(2): 88-91

Effects of oligo-chitosan on apoptosis of irradiated mice

GUO Jianping¹ ZHANG Huaping² AN Quan¹
WEI Jinping¹ ZHOU Jinyuan¹ YANG Zhongtian¹
¹(China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China)
²(Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT In order to study the mechanism of oligo-chitosan boosting survival rate with irradiated mice, the apoptosis number of borrow leukomo-nocyte cell, apoptosis related gene and P53 protein expression of the mice after 5 Gy γ -rays irradiation was investigated respectively. The cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Apoptosis related gene was determined by Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Western blot assay was used to examine the expression of P53. Compared with the control group, the results show that oligo-chitosan can either increase the survival rate or decrease the number of apoptosis and apoptosis related gene of Bax caspas-3, while Bcl-2 and Bcl-2/Bax ratio increase and the expression of P53 is restrained. It can be deduced that oligo-chitosan will influence the apoptosis related gene because of refraining the expression of P53 and led to shutdown the number of apoptosis, which then improve the survival rate of irradiated mice effectively.

KEYWORDS Oligo-chitosan, Radiation, Apoptosis, Survival rate

CLC R818, R818.7, R818.74, Q691.5

修改说明

尊敬的编辑您好,

本人于 2011 年 12 月刊登在贵刊第 29 卷第 6 期上的稿件《氯代有机污染物辐照脱氯的研究进展》发现一处错误, 现说明如下: 在 322 页 2.1 节第三行, 氯酚降解的效率改为 2-CP> 3-CP> 4-CP。

彭云霞

2011-12-19

此致

敬礼!

建议改成:

更正: 本刊 29 卷 322 页 2.1 节第 3 行, 原文 3-CP> 4-CP>2-CP, 改为 2-CP> 3-CP> 4-CP。