

过钒酸钠不同时间给药对受照 NFS-60 细胞增殖的影响

汪源¹ 苑晓玲² 赵振虎² 善亚君² 陈家佩² 从玉文²

¹ (甘肃省辐射环境监测站 兰州 730030)

² (军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 为了解酪氨酸磷酸酶抑制剂过钒酸钠用于辐射损伤治疗的可行性,并探讨酪氨酸磷酸酶在造血细胞辐射损伤中的作用,应用四甲基氮唑蓝(MTT)法观察了过钒酸钠不同给药方式对不同剂量照射 NFS-60 细胞增殖的影响。结果显示,过钒酸钠可特异地促进照射细胞的增殖,其促增殖作用随着照射剂量的增加而显著;并因过钒酸钠给药方式的不同而各异。对于 3Gy 照射 NFS-60 细胞,过钒酸钠以照射后 24h 给药效果最好,照射前给药与照射后即刻给药差异不明显,而对于 5Gy 照射细胞,过钒酸钠的最佳给药时间为照射后 24 和 48h,照射前给药优于照射后即刻给药。酪氨酸磷酸酶可能参与造血细胞辐射损伤的进程,应用其抑制剂增强受体信号转导有望成为放射病治疗研究的新方向。

关键词 过钒酸钠, 辐射, 增殖, NFS-60 细胞
中图分类号 R818.2

造血细胞的增殖和分化,受造血因子调控。造血因子与造血细胞膜受体结合,引起受体二聚化,启动受体信号转导,实现造血因子的不同生理作用^[1]。目前认为,信号转导的本质是蛋白质的磷酸化和脱磷酸化,并受到蛋白质激酶及其磷酸酶的双重调控。其中,激酶使蛋白质磷酸化,增强信号转导;而磷酸酶使蛋白质脱磷酸化,下调信号转导。两者的自稳平衡使细胞处于恰当的增殖状态^[2]。现有实验结果显示,在造血细胞辐射损伤中,可能存在受体信号转导的下调,应用特异性抑制剂抑制细胞内磷酸酶活性,增强细胞内造血因子受体信号转导,可减轻辐射对造血细胞的损伤,促进受照射造血细胞增殖^[3,4]。

钒是人体微量元素之一,研究发现,过钒酸钠可特异地抑制细胞内酪氨酸磷酸酶活性^[5]。文献^[6]曾报道,应用过钒酸钠增强胰岛素受体信号转导,从而逆转糖尿病病人的胰岛素抵抗。然而,将过钒酸盐复合物用于造血辐射损伤治疗研究,还鲜有文献资料^[4]。

为了解过钒酸钠用于造血细胞辐射治疗的可行性,并探讨酪氨酸磷酸酶在造血细胞辐射损伤中的作用,本工作观察了过钒酸钠的不同给药方式对不同剂量照射的造血因子依赖细胞株 NFS-60 细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

NFS-60 细胞为小鼠源性的 G-CSF 依赖细胞株,本实验室保存。rhG-CSF 活性为 1×10^7 /mg,纯度 98%。以适当数量的细胞接种于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,加入 G-CSF 至终浓度为 10ng/mL,隔天换液一次,取指数生长期细胞用于实验。

1.2 酪氨酸磷酸酶抑制剂过钒酸钠的制备^[5]

分别配制 200μmol/L 的原钒酸钠和 H₂O₂ 溶液,过滤除菌,4℃保存。无菌条件下各吸取 40μL,加入 320μL RPMI 1640,22℃作用 15min,反应结束后加入 4μL 过氧化氢酶溶液(20mg/mL,Boehringer Mannheim 公司)灭活剩余的 H₂O₂。现配现用。

1.3 照射条件

X 射线一次均匀照射,照射剂量 1、3、5Gy,剂量率为 170 cGy/min。

1.4 增殖指数曲线的绘制

将待测细胞用 RPMI 1640 培养液洗涤 3 次,台

国家自然科学基金(39800032)资助

第一作者:汪源,女,1971年2月出生,1993年毕业于青岛建筑工程学院环境工程专业,现为甘肃省辐射环境监测站工程师,学士

通讯联系人:从玉文

收稿日期:初稿 2003-07-03,修回 2003-09-02

盼蓝染色计数活细胞,用上述完全培养基调整细胞浓度为 $1.25 \times 10^5/\text{mL}$,每孔 $80\mu\text{L}$ 加入 96 孔板中;抑制剂两倍或三倍递减稀释后,每孔加入 $10\mu\text{L}$,每组做 4 个复孔, 37°C 孵育 30min,抑制剂与细胞充分作用后,每孔加入 5ng/mL G-CSF $10\mu\text{L}$, 37°C 培养 48h,加 MTT (50mg/mL) $20\mu\text{L}$,继续培养 4h,吸弃上清 $80\mu\text{L}$,加入 $200\mu\text{L}$ DMSO,振荡助溶,在 MODEL 450 酶联仪 (BIO-RAD) 上测 492nm 波长的 OD 值,以抑制剂浓度为横坐标,以加入抑制剂的细胞 OD 值是未加抑制剂细胞的比值即增殖指数为纵坐标绘图。

1.5 统计分析

应用 SARS6:03 软件包,采用 ANOVA 一元方差分析及 DUNCANN 两两比较法对结果进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同浓度的过钒酸钠对辐射后 NFS-60 细胞增殖的影响

NFS-60 细胞为小鼠源性的造血因子依赖细胞株,是研究 G-CSF 受体信号转导的常用靶细胞。从图 1 中可见,过钒酸钠对未照射 NFS-60 细胞的促增殖作用不明显,仅在过钒酸钠浓度为 $20\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖指数有明显的升高 ($p<0.05$),增加过钒酸钠浓度,细胞增殖指数明显降低;但对于 3Gy 照射的 NFS-60 细胞,当照射后 30 min 加入过钒酸钠,浓度为 $0.625\text{—}20\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖指数显著升高 ($p<0.01$),最大增殖指数可达 1.6 倍。说明过钒酸钠可相对特异地促进受照造血细胞的增殖。

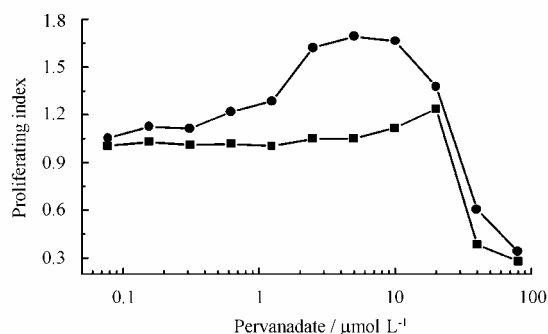


Fig.1 The effect of different doses of pervanadate on the proliferation of 3Gy irradiated NFS-60cells given after irradiation
 ■ Pervanadate given to unirradiated NSF-60cells
 ● Pervanadate given to 3Gy irradiated NFS-60cells after irradiation

2.2 过钒酸钠对不同剂量照射的 NFS-60 细胞增殖的影响

图 2 显示过钒酸钠于照射后 30min 给药对不同剂量照射的 NFS-60 细胞增殖的影响。结果显示,未照射和 1Gy 照射细胞递增加入过钒酸钠后,增殖指数没有显著升高,但发现一定剂量的过钒酸钠可明显促进 3Gy 和 5Gy 照射的 NFS-60 细胞的增殖 ($p<0.01$),最大增殖指数分别达到 1.3 和 1.5 倍。表明 NFS-60 细胞受照射剂量越大,过钒酸钠的促增殖效果越明显。

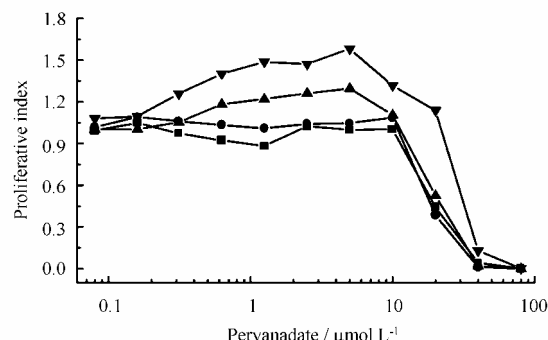


Fig.2 The effect of pervanadate on the proliferation of irradiated NFS-60cells given 30minutes after irradiation
 ■ Unirradiated NFS-60cells
 ● 1Gy irradiated NFS-60cells
 ▲ 3Gy irradiated NFS-60cells
 ▼ 5Gy irradiated NFS-60cells

2.3 过钒酸钠照前及照后给药对 NFS-60 细胞增殖的影响

为了解过钒酸钠最佳给药条件,图 3 比较了过钒酸钠照前或照后 30 min 给药对受照后 NFS-60 细胞增殖的影响。

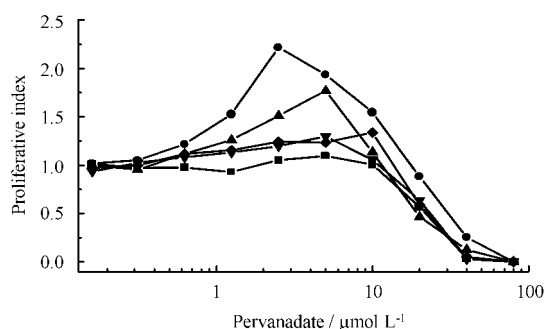


Fig.3 The effect of pervanadate on the proliferation of NFS-60 cells given before or after irradiation
 ■ Pervanadate given to unirradiated NSF-60cells
 ● Pervanadate given to 5Gy irradiated NFS-60cells before irradiation
 ▲ Pervanadate given to 5Gy irradiated NFS-60cells after irradiation
 ▼ Pervanadate given to 3Gy irradiated NFS-60cells before irradiation
 ◆ Pervanadate given to 3Gy irradiated NFS-60cells after irradiation

胞增殖的影响。结果发现,一定浓度的过钒酸钠(1—10 $\mu\text{mol/L}$)可明显增加 3Gy 和 5Gy 照射细胞的增殖,其中对于 5Gy 照射细胞,照射前给药明显优于照射后给药,而对于 3Gy 照射细胞,照射前、照射后给药对细胞增殖没有明显的差异。说明过钒酸钠照前或照射后给药均有抗辐射损伤作用。

2.4 过钒酸钠照射后不同时间给药对 NFS-60 细胞增殖的影响

为进一步了解过钒酸钠对照射细胞作用的给药时间效应,观察了过钒酸钠照射后 24—96h 给药对受照射 NFS-60 细胞增殖的影响。图 4 显示 NFS-60 细胞照射后 24h 加入过钒酸钠后细胞增殖指数曲线的变化。在 1—20 $\mu\text{mol/L}$ 的过钒酸钠的作用下,3、5Gy 照射细胞的增殖指数同未照射细胞相比均有明显升高,尤以 3Gy 照射细胞的变化较显著。从增殖指数升高幅度看,照射后 24h 给药对照射细胞的促增殖作用优于照射后即刻给药。图 5 显示过钒酸钠照射后 48h 给药,发现 3Gy 照射细胞增殖指数较照射

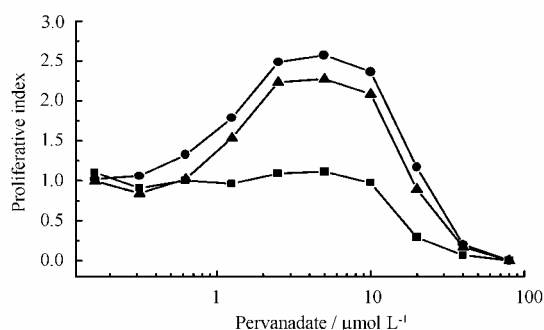


Fig.4 The effect of pervanadate on the proliferation of irradiated NFS-60cells given 24hours after irradiation
■ Unirradiated NFS-60cells
● 3Gy irradiated NFS-60cells
▲ 5Gy irradiated NFS-60cells

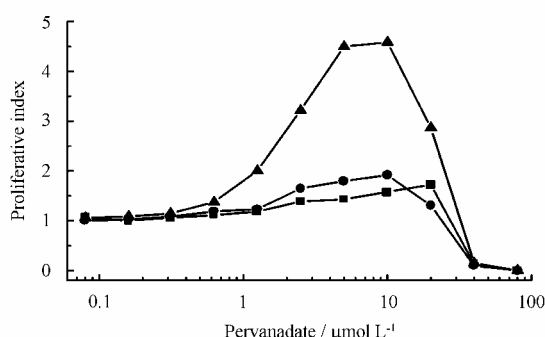


Fig.5 The effect of pervanadate on the proliferation of irradiated NFS-60cells given 48 hours after irradiation
■ Unirradiated NFS-60cells
● 3Gy irradiated NFS-60cells
▲ 5Gy irradiated NFS-60cells

后 24h 已有明显降低,接近对照组细胞水平;5Gy 照射细胞的增殖指数曲线较对照组显著升高,增加幅度明显高于照射后 24h 及照射后 30min 给药组。从图 6 看出,照射后 96h 加入过钒酸钠细胞,3Gy 和 5Gy 照射细胞的增殖指数升高幅度较前已有显著降低,其增殖指数曲线仅略高于同批实验的未照射对照细胞组。

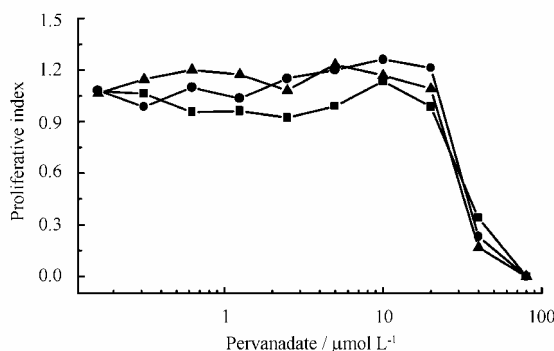


Fig.6 The effect of pervanadate given 96hours after irradiation on the proliferation of irradiated NFS-60cells
■ Unirradiated NFS-60cells
● 3Gy irradiated NFS-60cells
▲ 5Gy irradiated NFS-60cells

3 讨论

造血辐射损伤是肿瘤放射治疗的常见并发症,由此引起的外周血细胞减少而导致的感染和出血是放疗病人死亡的主要原因之一。造血因子是目前治疗辐射造血损伤最有效的药物之一,但发现有些造血因子对某些肿瘤细胞有促增殖作用。因而,存在造血因子在改善造血辐射损伤的同时增加了肿瘤复发的可能性^[7]。对造血因子在肿瘤放疗中的应用应保持谨慎态度。

钒是体内的微量元素之一。过钒酸钠和原钒酸钠均是特异的蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂。过钒酸钠是原钒酸钠和过氧化氢反应生成的一种不稳定的络合物,可透过细胞膜,非可逆地抑制酪氨酸磷酸酶活性。文献[8]中以过钒酸钠为母核曾合成了几十种结构稳定的过钒酸盐复合物,均有不同程度的酪氨酸磷酸酶抑制活性,其中有些过钒酸钠复合物已用于糖尿病及肿瘤的实验治疗,并显示一定的疗效。过钒酸钠是目前发现的作用较强的酪氨酸磷酸酶特异性抑制剂,在一定条件下可模仿细胞因子的作用,加强受体信号转导,促进细胞增殖^[9]。但过钒酸钠对照射细胞的作用是否具有特异性,目前尚无文献资料。

本研究发现一定浓度的过钒酸钠对未照射细胞仅有较弱的促增殖作用,随着照射剂量的增大,其促增殖作用明显增强,照射前和照射后给药均有效,

并因照后给药时间的不同,其促增殖程度也有明显的差异。其中,对于 3Gy 照射细胞,照射后 24h 给药效果最好,而对于 5Gy 照射细胞,以照射后 48h 给药最佳,至照射后 96h,细胞增殖明显活跃,过钒酸钠促增殖作用明显降低。本实验室以往的实验结果显示,NFS-60 细胞受照剂量越大,细胞增殖抑制程度越明显,恢复所需时间越长,如 3Gy 照射细胞,照射后 48h 细胞增殖才有恢复,而 5Gy 照射细胞所需恢复时间至照射后 96h。可见过钒酸钠的促增殖效果与细胞增殖抑制程度具有一定的相关性,造血细胞受照后增殖抑制越明显,过钒酸钠促增殖效果越显著^[10]。实验中发现,在不同批次实验中,未照射细胞对过钒酸钠的增殖反应略有差异,可能与不同时间选用的细胞增殖状态不同,造血细胞对造血因子的增殖反应性存在一定的差异造成的。过钒酸钠特异地抗造血辐射损伤作用可能与其特异地抑制造血细胞内酪氨酸磷酸酶活性,上调造血因子受体信号转导有关,其作用机制尚有待于深入研究。

参考文献

- 1 Geijsen N, Koenderman L, Coffey P J. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, **12** (1): 19-25
- 2 Qu C K. Biochim Biophys Acta, 2002, **1592** (3): 297-301
- 3 从玉文, 陈家佩, 邵源. 军事医学科学院院刊, 1999, **23** (2): 119-122
CONG Yuwen, CHEN Jiawei, SHAO Yuan. Bull Acad Mil Med Sci, 1999, **23** (2): 119-122
- 4 吴岚军, 赵卫红, 从玉文等. 军事医学科学院院刊, 1999, **23** (4): 252-255
WU Lanjun, ZHAO Weihong, CONG Yuwen *et al.* Bull Acad Mil Med Sci, 1999, **23** (4): 252-255
- 5 Pumiglia K M, Lau L F, Huang C K *et al.* Biochem J, 1992, **286** (Pt 2): 441-449
- 6 Shisheva A, Ikononov O, Shechter Y. Endocrinology, 1994, **134** (1): 507-510
- 7 Zhou M, Gu L, Holden J *et al.* Leukemia, 2000, **14** (3): 403-411
- 8 WANG W Q, SUN J P, ZHANG Z Y. Curr Top Med Chem, 2003, **3** (7): 739-748
- 9 Krady M M, Malviya A N, Dupont J L. FEBS Lett, 1998, **434** (3): 241-244
- 10 从玉文, 陈家佩, 邵源等. 辐射研究与工艺学报, 2002, **20** (4): 275-280
CONG Yuwen, CHEN Jiawei, SHAO Yuan *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2002, **20** (4): 275-280

The effects of pervanadate given at different times on the proliferation of irradiated NFS-60 cells

WANG Yuan¹ YUAN Xiaoling² ZHAO Zhenhu² SHAN Yajun² CHEN Jiawei² Cong Yuwen²

¹(Radiation Environmental Monitoring Station of Gansu Province, Lanzhou 730030)

²(Academic of Military Medical Science Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

ABSTRACT To comprehend the feasibility of the inhibitor of tyrosine phosphatase pervanadate using for therapy of radiation injury and inquire into the effects of tyrosine phosphatases on the radiation injury of hematopoietic cells, the effects of different times of administration on NFS-60 cells irradiated with different doses were observed. It was found that pervanadate could specifically enhance the proliferation of irradiated cells, such effects became obvious with the dose of irradiation increased and displayed time effects. For 3Gy irradiated NFS-60 cells, good results were achieved when pervanadate was administrated 24h after irradiation, there were no difference between before and 30 mins after irradiation, but for 5Gy irradiated cells, the best time administration is 24 and 48h after irradiation. Effects of pervanadate administrated before irradiation was better than that administrated 30min after irradiation. These results suggest that protein tyrosine phosphatase might involve in the course of radiation injury of hematopoietic cells. It is hoped that enhancing receptor signal transduction by PTP inhibitors will become a new way of therapy of acute radiation disease.

KEYWORDS Pervanadate, Radiation, Proliferation, NFS-60 cells

CLC R818.2