

辐射对小鼠骨髓基质细胞分泌血管内皮生长因子的影响

张增利

(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 为研究 γ 射线对小鼠骨髓基质细胞中血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelia growth factor, VEGF)的影响,使用不同剂量(0、2.5、5、10 Gy)的 γ 射线全身照射C57BL/6J小鼠。分别用逆转录多聚酶链反应(Reverse transfer polymerase chain reaction, RT-PCR)和酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法研究了照射后体外培养3、6、10 d的骨髓基质细胞中mRNA和培养上清中的VEGF水平。结果发现,对非照射组,随着骨髓基质细胞体外培养时间的延长,其VEGF在基因和蛋白水平都显著升高。受到5 Gy或10 Gy射线照射后,VEGF随时间变化的总趋势与非照射组相同。在各时间点照射组的VEGF基因表达均高于同时点的非照射组。照射组培养6 d上清液中VEGF含量高于同时点的非照射组;而在第10 d时,却显著低于同时点的非照射组。分析其原因是因为受到照射后培养10 d的骨髓基质细胞数已显著低于非照射同时点的细胞数,其培养上清中VEGF的减少与分泌VEGF的总细胞数减少有关。结果说明,5 Gy或10 Gy射线会引起骨髓基质细胞VEGF的表达增强。这一现象提示VEGF的表达升高可能是机体的一种代偿性反应,有利于机体造血的重建。辐射后,小鼠骨髓中VEGF的改变与骨髓基质的损伤、造血恢复的关系值得进一步研究。

关键词 辐射, 骨髓基质细胞, 血管内皮细胞生长因子

中图分类号 R818.74, R818.03, R551.3

血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelia growth factor, VEGF)在调节内皮细胞的功能、血管的发育、血管的发生以及血管的通透性方面具有重要的功能^[1,2]。一般认为,哺乳动物血管的发生、发育在出生后不久便停止。只有在受到损伤或有肿瘤发生的情况下才有新的血管生成。目前,就VEGF的功能在白血病发生及发展过程中的功能,正在进行深入的研究^[3-5]。骨髓中VEGF的生理功能、表达规律以及在受到辐射损伤后的变化,对于理解VEGF在造血功能中的作用及一些血液病的发生具有重要意义。本实验通过小鼠全身照射后,VEGF在体外培养的骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSC)中表达的变化,分析VEGF在辐射损伤后机体修复中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物辐射

使用C57BL/6J小鼠,雄性,体重(20±2)g,购自上海实验动物中心。应用¹³⁷Cs源对小鼠进行 γ 射线全身均匀照射,照射剂量率为0.8 Gy/min,总剂量分别为0、2.5、5.0、10 Gy。

1.2 骨髓细胞分离培养

小鼠辐射后2 h断颈处死,75%乙醇中浸泡1 min,无菌取双侧股骨、胫骨,用注射器吸取2 mL(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养液缓慢将骨髓冲进15 mL试管。经吸管反复吹打,分散骨髓细胞,细胞悬液经22号针头过滤制备骨髓单细胞悬液。

1.3 MTT法检测BMSC的增殖能力

将受到不同剂量照射小鼠的骨髓单细胞悬液以每孔 5×10^4 细胞接种于96孔培养板,常规培养,3 d换液一次。于接种后第3 d、第6 d和第10 d用四氮唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]法检测贴壁细胞吸光度。每组6个平行孔,取其平均值,观察不同剂量射线照射后, BMSC的增殖情况。

1.4 RT-PCR检测BMSC中VEGF的mRNA表达

将受到不同剂量照射小鼠的 10^7 骨髓单细胞悬液接种于 55 cm^2 的培养皿中,加DMEM培养液至10 mL。常规培养。3 d换液一次。于接种后第3 d、第6 d和第10 d用TRIZOL试剂盒提取贴壁细胞的

苏州大学医学发展基金(EE126509)资助

第一作者:张增利,男,1967年5月出生,2005年于苏州大学获博士学位,放射医学专业,研究方向:辐射对骨髓基质细胞的损伤,讲师

收稿日期:初稿 2005-07-25,修回 2005-10-09

总核酸 (Ribonucleic acid, RNA), 分光光度计测定其 A_{260}/A_{280} 比值。取 A_{260}/A_{280} 比值大于 1.7 的总 RNA 1 μg , 用 RT-PCR 一步法试剂盒 (QIAGEN,

Canada) 按说明书进行。引物序列、退火温度和 RT-PCR 循环数等见表 1。PCR 产物在 0.8% 琼脂糖中电泳, 紫外灯下观察拍照。

Table 1 The sequences of primers and parameters of PCR

Gene	Up-stream primer(5'-3')	Down-stream primer(5'-3')	Annealing temperature/°C	Cycles	Fragment /bp
VEGF	TTACTGCTGTACCTCCACC	ACAGGACGGCTTGAAGATG	55	30	189
GAPDH	CATGGAGAAGGCTGGGGCTC	CACTGACACGTTGGCAGTGG	59	30	496

1.5 ELISA 法测定 BMSC 培养上清中 VEGF 含量

受到不同剂量辐射小鼠的骨髓单细胞悬液接种于 24 孔板, 常规培养 3、6、10 d 后, 吸去培养液, 用 37°C 无菌磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 清洗培养板 3 次, 再加入 2 mL 无血清 DMEM 培养液, 常规条件培养 48 h, 取上清液, 离心, 用 ELISA 法 [试剂盒购自瑞迪公司 (Reach and Development)] 按说明书测定 BMSC 培养上清中 VEGF 含量。每组 5 个平行孔, 取其平均值。

1.6 统计分析

各组数据以均数 \pm 标准差表示。用 10.0 SPSS 软

件对各剂量组之间的差异进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 辐射对 BMSC 增殖的影响

小鼠经 2.5 Gy γ 射线辐射后, 体外培养不同时间的骨髓基质细胞 (Bone marrow stromal cells, BMSC) 增殖能力与非照射组相比没有统计学差别。而 5 Gy 和 10 Gy 组 BMSC 的增殖能力在培养的第 6 d 和第 10 d 明显低于非照射组, 尤其是 10 Gy 组 BMSC 培养 10 d 的细胞数, 与非照射组具有非常显著的差别 ($p < 0.01$, 见图 1)。

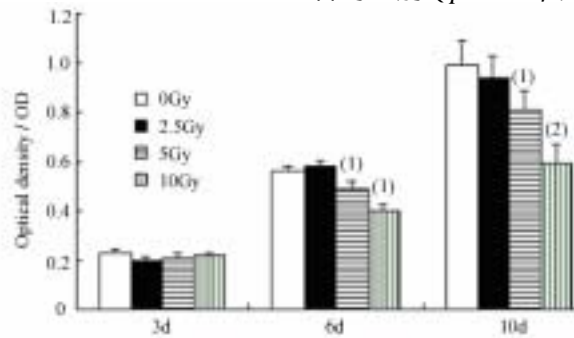


Fig.1 Relative proliferation rates of BMSC in the irradiated mice, Compared with the control group ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$

2.2 10 Gy 射线辐射对 BMSC 中 VEGF 的 mRNA 表达的影响

与同时间点未照射组相比, 小鼠经 5、10 Gy

γ 射线辐射后, 其 BMSC 中 VEGF 的 mRNA 表达上调, 而且随着培养时间的延长上调更加明显 (见图 2)。

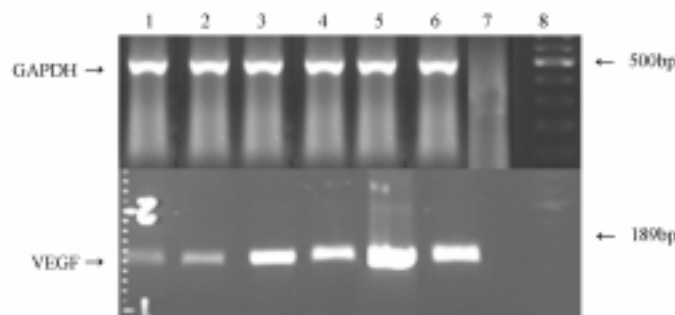


Fig.2 The expression of VEGF mRNA of BMSC in the irradiated mice. Lane 1, 3 and 5: Cultured 6 d BMSC of mice irradiated with 0, 5 and 10 Gy, respectively. Lane 2, 4 and 6: Cultured 10 d BMSC of mice irradiated with 0, 5 and 10 Gy, respectively. Lane 7 negative control; Lane 8, marker

2.3 辐射对 BMSC 培养上清中 VEGF 含量的影响

小鼠经不同剂量 γ 射线辐照后,分离的 BMSC 随着体外培养时间的延长,其上清中 VEGF 含量呈上升趋势。当小鼠受到 2.5Gy 射线辐射后,分离的 BMSC 在培养后 6d 和 10d 时,其上清中 VEGF 含量与同时间点的非照射组没有明显变化。而 5Gy 和 10Gy 组的 BMSC 在培养的第 6d 时,其上清中的 VEGF 含量显著高于同时间点的非照射组。但培养至第 10d 时,却又明显低于非照射组(见图 3)。

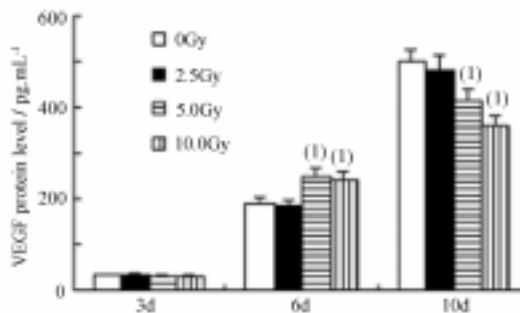


Fig.3 VEGF protein level secreted by BMSC in the irradiated mice, Compared with the control group, ^(†) $p < 0.05$

3 讨论

VEGF 是一种多功能的细胞因子,它可以诱导内皮细胞分化、调节微血管内皮细胞的通透性、抑制造血细胞凋亡及动员骨髓造血干细胞进入血循环。目前,尚不清楚 VEGF 含量的变化在骨髓生理功能中的确切机制。有关骨髓基质中 VEGF 含量变化的报道及辐射对其影响报道较少。本文发现骨髓基质细胞在培养初期,其分泌的 VEGF 较低。随着体外培养时间的延长,其培养上清中的 VEGF 含量呈上升趋势。这种现象可能与细胞培养过程中的增殖和分化有关。

5Gy 和 10Gy 射线辐射后,骨髓基质细胞在第 6d 时,其培养上清中的 VEGF 含量显著高于相同时间点的非受照组,而在第 10d 时,却又显著低于相同时间点的非受照组。这符合细胞因子在受照后先升高后降低的规律。但奇怪的是小鼠受到辐射后,VEGF 基因 mRNA 的表达却呈逐渐增高趋势。这一现象可以认为,在本实验条件下,骨髓基质细胞受到 5Gy 和 10Gy 射线辐射后,其 VEGF 基因的 mRNA 的表达与 VEGF 的蛋白合成随着时间的延长是呈增加趋势的。培养 10d 的骨髓基质细胞上清中

VEGF 含量的降低是因为合成、分泌 VEGF 的细胞总数显著减少造成的,每个细胞中 VEGF 的基因表达和蛋白合成是在增加。

VEGF 是目前发现的最强的促血管形成因子。已用于严重肢体缺血及伤口反复不愈的治疗。有学者发现,VEGF 对骨髓源性的血管内皮细胞有很强的动员作用^[6]。而血管内皮细胞在血液的发生中起着重要作用。其它学者也发现 VEGF 有抑制电离辐射引起的细胞凋亡的作用^[7],及 VEGF 通过内部的自分泌环路调节造血干细胞的存活^[8]。因此,小鼠受到辐射后,VEGF 表达的上调,可能与造血恢复有关。骨髓受到射线照射后,其各类造血细胞受到损伤的同时,其内皮细胞的功能及微血管系统也受到损伤,后者在造血重建过程中起着重要作用。Avecill 等^[9]曾发现骨髓内血管的重建与血液系统的重建是同步进行的。这进一步说明小鼠受照后,VEGF 的表达升高可能是机体的一种代偿性反应,有利于机体造血的重建。

本文报道了辐射后,骨髓基质细胞分泌的 VEGF 在基因水平和蛋白水平不一致的现象,并对其原因进行了分析。其它的细胞因子在受到辐射后是否也出现这种现象值得进一步研究。

参考文献

- 1 Klagsbrum M, D'Amore P A. Cytokine Growth Factor Rev, 1996, 7(3): 258-270
- 2 Ferrara N, Davis-Smyth T. Endocrinol Rev, 1997, 18(1): 4-25
- 3 De Bont E S, Rosati S, Jacobs S, *et al.* Br J Haematol, 2001, 113(2): 296-304
- 4 Verstovsek S, Estey E, Manshouri T, *et al.* Br J Haematol, 2002, 118(1): 151-156
- 5 Schneider P, Vasse M, Legrand E, *et al.* Br J Haematol, 2003, 122(1): 163-164
- 6 Young P P, Hofling A A, Sands M S. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18): 11951-11956
- 7 Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, *et al.* Cancer Res, 1995, 55(23): 5687-5692
- 8 Gerber H P, Malik A K, Solar GP, *et al.* Nature, 2002, 417(6892): 954-958
- 9 Avecilla S T, Hattori K, Heissig B, *et al.* Nat Med, 2004, 10(1): 64-71

Radiation effect on the expression of VEGF in murine bone marrow stromal cells

ZHANG Zengli

(Department radiation medical school, Soochow University Suzhou, 215123)

ABSTRACT In order to investigate radiation effect on the expression of VEGF in murine bone marrow stromal cells, C57BL/6J mice were irradiated to 0, 2.5, 5 and 10 Gy by whole body irradiation with ^{137}Cs γ -ray. After the bone marrow stromal cells were ex-vivo cultured for 3, 6 or 10 d, the mRNA and protein of VEGF in BMSCs were analyzed by RT-PCR and ELISA, respectively. Both of the two indices were up-regulated with the cultural time in the control group (without irradiation). In the 5 and 10 Gy group, the expressions of VEGF mRNA in BMSCs increased significantly with the cultural time. Interestingly, in the 5 and 10-Gy group, VEGF concentration in BMSCs cultural media increased on 6 d and reduced significantly on 10 d after the ex-vivo culture. This is because that total cell numbers of the 10d group had been reduced significantly in comparison to the control group of the same cultural time. These results indicated the expressions of VEGF in BMSCs at mRNA and protein levels increased in each cell after 5 and 10 Gy radiation. Up-regulated VEGF might benefit for hematopoietic reconstitution. The association among expression of VEGF, hematopoietic microenvironment and hematopoietic reconstitution deserve further study.

KEYWORDS Radiation, Bone marrow stromal cells (BMSC), Vascular endothelia growth factor (VEGF)

CLC R818.74, R818.03, R551.3