

# 维生素 D 保护 $\gamma$ 射线引起的骨髓基质细胞凋亡

张增利

(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215123)

**摘要** 本实验利用骨髓基质细胞 (Bone marrow stromal cell, BMSC) 克隆形成法、流式细胞仪分析 BMSC 凋亡、Western-blot 分析 BMSC 内 caspase-3 蛋白表达研究维生素 D 对  $\gamma$  射线引起的 BMSC 损伤的保护作用。小鼠在 6Gy 的  $\gamma$  射线照射前 48h 每天皮下注射 0.0625 $\mu$ g 的 1,25 二羟基维生素 D。结果发现, 照射引起小鼠骨髓成纤维细胞集落形成单位 (CFU-F) 数显著减少。维生素 D 处理使照射后小鼠的 CFU-F 与对照组在同一水平。照射使 BMSC 凋亡率及其 caspase-3 蛋白的表达显著上升, 而维生素 D 处理可以显著改善这种效果。这些资料说明维生素 D 具有保护照射引起的 BMSC 凋亡的作用。

**关键词**  $\gamma$  射线, 骨髓基质细胞, 维生素 D, 凋亡

**中图分类号** R 818.74, R818.03, R551.3

骨与造血是两个功能完全不同的系统。但两者在发育过程中又是密不可分的。在成年机体内, 两者之间的相互调节关系尚不清楚<sup>[1,2]</sup>。众所周知, 维生素 D 在骨发育中具有不可缺少的作用。因此, 维生素 D 与造血的关系逐渐引起了人们的重视<sup>[3,4]</sup>。造血功能障碍是放射损伤时最典型的病理变化。造血功能障碍涉及造血干、祖细胞和造血微环境的损伤。骨髓基质细胞是造血微环境的重要组分。在生理条件下, 维生素 D 对骨髓基质细胞的分化和增殖具有调节作用<sup>[5]</sup>。本实验研究在  $\gamma$  射线损伤后, 维生素 D 对受损骨髓基质细胞的保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

实验动物分为照射组、照射+维生素 D 组和对照组, 每组 10 只 C57BL/6J 小鼠, 雄性, 体重 (20 $\pm$ 2) g。前两组  $^{60}\text{Co}$  全身照射 6.0Gy。照射+维生素 D 组在照射前 48h, 每天每只小鼠皮下注射 0.0625 $\mu$ g 的 1,25 二羟基维生素 D, 直到照射后的第 2 天为止。共注射 3d。对照组无任何处理。

### 1.2 骨髓细胞分离:

小鼠照射后 1d 断颈处死, 75% 乙醇中浸泡 1min, 无菌取双侧股骨、胫骨, 用注射器吸取

2mL (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 培养液缓慢将骨髓冲进 15mL 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 成纤维细胞集落形成单位 (CFU-F) 培养及计数

$10^7$  骨髓单细胞悬液接种于 55cm<sup>2</sup> 的培养皿中, 加 DMEM 培养液至 10mL。常规培养。3d 换液 1 次。第 12d 终止培养, PBS 洗涤, 固定细胞, 倒置显微镜下计数, 50 个左右梭形细胞的集落为 1 个 CFU-F。

### 1.4 流式细胞仪分析细胞凋亡

用 PBS 洗涤骨髓单细胞悬液。按 Annexin-V/PI 试剂盒 (Pharmingen 公司) 说明书进行操作。Annexin-V / PI 双染色在流式细胞仪上检测凋亡细胞。

### 1.5 Western-blot 检测细胞内 caspase-3 蛋白表达

用 PBS 洗涤骨髓单细胞悬液, 离心。用裂解液裂解细胞, 分离蛋白质, 蛋白定量。取 20 $\mu$ g 变性后的蛋白质进行 SDS-PAGE 垂直凝胶电泳, 电转移至 PVDF, 5% 的牛奶封闭 2h, 加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 再加相应二抗, 室温孵育, 最后加增强化学发

国家自然科学基金 (30570883)、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: 照射对骨髓基质细胞的损伤, 副教授

收稿日期: 初稿 2006-07-12, 修回 2006-09-06

光 (Enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂, 在暗室中将膜贴在 X 光胶片下曝光 30s—1min、定影, 直至显影出电泳带。运用图像分析仪对结果进行图像分析, 计算条带的积分吸光度, 以 Actin 水平作为对照。

## 1.6 统计分析

各组数据以均数±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 维生素 D 对照射引起的 CFU-F 减少的影响

照射组小鼠的 CFU-F 为  $131.5 \pm 16.5$ , 与对照组 ( $182.5 \pm 18$ ) 相比显著下降 ( $p < 0.01$ ); 维生素 D 处理组小鼠骨髓 CFU-F 上升到  $180.5 \pm 20.5$ , 与对照组比较无显著差别 (见图 1)。

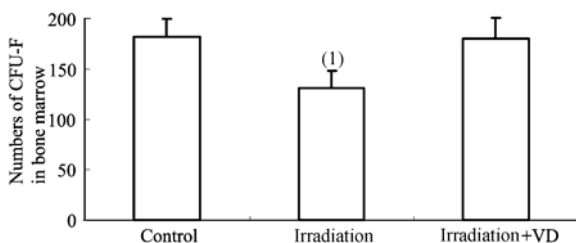


Fig.1 Numbers of CFU-F in cultured bone marrow 1 day after irradiation <sup>(1)</sup> $p < 0.01$ , Compared with control

### 2.2 维生素 D 对照射引起的骨髓基质细胞凋亡的影响

实验发现对照组的 BMSC 自发凋亡率为  $(3.3 \pm 0.4)\%$ ; 照射组为  $(10 \pm 1.9)\%$ ; 维生素 D 处理组为  $(5.1 \pm 0.52)\%$ 。3 组之间比较有显著性差别 ( $p < 0.01$ ) (见图 2)。

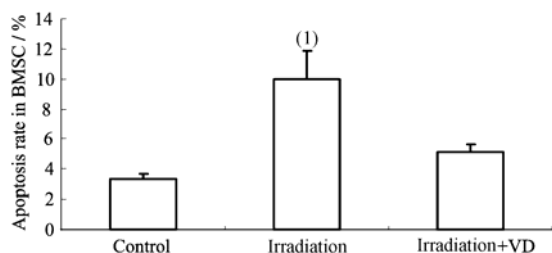


Fig.2 Apoptosis rate in cultured BMSC 1 day after irradiation <sup>(1)</sup> $p < 0.01$ , Compared with control

### 2.3 维生素 D 对照射引起的骨髓基质细胞内 caspase-3 活性的影响

对照组小鼠 caspase-3 表达较弱, 其相对于 actin 的表达量为:  $0.019 \pm 0.002$ 。照射引起其表达显著上

升 ( $0.089 \pm 0.01$ ,  $p < 0.01$ ); 照射前后给予维生素 D 处理使其表达显著下降 ( $0.025 \pm 0.03$ ), 但仍高于对照组水平 ( $p < 0.05$ ), (见图 3)。

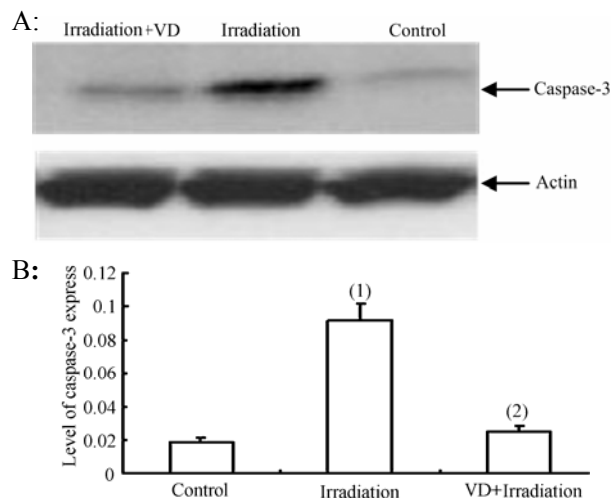


Fig.3 A: Western Blot analysis of caspase-3 expressions in cultured BMSC 1 day after irradiation. B: Levels of caspase-3 relative expression in BMSC 1 day after irradiation. <sup>(1)</sup> $p < 0.01$ , Compared with control; <sup>(2)</sup> $p < 0.05$ , Compared with control

## 3 讨论

维生素 D 的非经典作用越来越受到人们的重视。体内足量的维生素 D 可以减少多种癌症的发生<sup>[6]</sup>。它还可以保护受到射线照射的皮肤角质细胞发生凋亡<sup>[7]</sup>。因此, 一些学者认为维生素 D 具有基因组稳定性作用<sup>[8]</sup>。

照射可以通过多种机理引起骨髓基质细胞克隆形成减少。这包括细胞死亡、凋亡、粘附分子表达减弱等。本实验发现小鼠受到 6Gy 的  $\gamma$  射线照射后 1d, 其 10% 的骨髓基质细胞发生凋亡。这说明凋亡在照射引起的骨髓基质细胞减少中起着一定作用。皮下注射维生素 D 组的小鼠骨髓基质细胞凋亡率只有 5.1%。这说明维生素 D 可以保护受照骨髓基质细胞发生凋亡。关于维生素 D 与细胞凋亡的关系, 从文献上分析有两种完全相反的报道。一是它可以引起一些肿瘤细胞的凋亡<sup>[9]</sup>; 另一类是它可以保护正常细胞在病理条件下发生凋亡<sup>[10]</sup>。目前尚不能解释维生素 D 影响凋亡发生的确切机理。维生素 D 可以影响骨髓基质细胞向成骨细胞的发育, 在骨髓基质的发育过程中也具有重要的作用。维生素 D 受体基因敲除小鼠的骨髓基质细胞出现异常<sup>[11]</sup>。这些资料都说明维生素 D 在骨髓基质发生中具有重要的作用。但在以前的文献中未发现维生素 D 可保护受照骨髓基质细胞发生凋亡的现象。

Caspase-3 是 caspase 家族的重要成员, 在细胞凋亡过程中起着关键的作用<sup>[12]</sup>。照射可以引起骨髓细胞内 Caspase-3 活性的升高<sup>[13,14]</sup>。本研究也发现照射引起骨髓基质细胞内 Caspase-3 活性升高。这可能与发生凋亡存在着一定的因果关系。维生素 D 抑制 Caspase-3 活性的升高, 可能是其抑制凋亡发生的机理之一。

目前, 骨髓移植和恶性肿瘤的治疗常常使病人受到较大剂量的照射。由照射造成的骨髓基质损伤是影响临床疗效的一个突出问题。维生素 D 的深入研究很可能为解决这一问题提供一个新的方向。

### 参考文献

- 1 Taichman R S. Blood. 2005, **105**(7): 2631-2639
- 2 Kuznetsov S A, Riminucci M, Ziran N, *et al.* J Cell Biol, 2004, **167**(6): 1113-1122
- 3 Yetgin S, Yalcin S S. Turk J Pediatr, 2004, **46**(2): 164-166
- 4 Bickford P C, Tan J, Shytle R D, *et al.* Stem Cells Dev. 2006, **15**(1): 118-123
- 5 Somjen D, Kaye A M, Ofer M, *et al.* J Endocrinol Invest, 2005, (10): 910-918
- 6 Garland C F, Garland F C, Gorham E D, *et al.* Am J Public Health. 2006, **96**(2):252-261
- 7 Diker-Cohen T, Koren R, Ravid A. Apoptosis, 2006, **11**(4): 519-534
- 8 Chatterjee M. Mutat Res, 2001, **475**(1-2): 69-87
- 9 Marchiani S, Bonaccorsi L, Ferruzzi P, *et al.* J Cancer Res Clin Oncol, 2006, **132**(6): 408-416
- 10 Duque G, El Abdaimi K, Henderson J E, *et al.* Bone. 2004, **35**(1):57-64
- 11 Panda D K, Miao D, Bolivar I, *et al.* J Biol Chem, 2004, **279**(16): 16754-16766
- 12 Janicke R U, Sprengart M L, Wati M R, *et al.* J Biol Chem, 1998, **273**(16): 9357-9360
- 13 高洋, 罗成基, 黎海蒂, 等. 第三军医大学学报, 2004, **26**(15): 1350-1353  
GAO Yang, LUO Chengji, LI Haidi, *et al.* Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2004, **26**(15): 1350-1353
- 14 刘继林, 冯全生, 黄国钧, 等. 中医杂志, 2004, **45**(6): 453-456  
LIU Jilin, FENG Quansheng, HUANG Guojun, *et al.* J Tradit Chin Med, 2004, **45**(6): 453-456

## Vitamin D-protected bone marrow stromal cell from apoptosis induced by $\gamma$ -irradiation

ZHANG Zengli

(Department of Radiation Medical School, Soochow University, Suzhou 215123)

**ABSTRACT** Radioprotective effect of vitamin D on bone marrow stromal cells (BMSCs) was studied. Mice were administrated subcutaneously with a daily dosage of 1,25 dihydroxyvitamin D for three days from 48h prior to 6.0Gy gamma-irradiation until they were sacrificed. The number of CFU-F, the apoptosis rate of bone marrow stromal cell, and the expressions of caspase-3 in BMSC were detected. The number of CFU-F significantly decreased after irradiation and vitamin D administration preserved the number of CFU-F in irradiated mice at same level as control. The apoptosis rate and relative level of caspase-3 in BMSC were significantly increased after irradiation and vitamin D administration ameliorated this effect. These data suggest that vitamin D can protect BMSC from apoptosis induced by irradiation.

**KEYWORDS**  $\gamma$ -Irradiation, Bone marrow stromal cell, Vitamin D, Apoptosis

**CLC** R 818.74, R818.03, R551.3