

## 维生素D对<sup>60</sup>Co辐射损伤小鼠的保护作用

王小慧 周正宇 李冰燕 聂继华 童建 张增利

(苏州大学放射医学公共卫生学院 苏州 215123)

**摘要** 为研究维生素D对基因组稳定性作用,观察维生素D对<sup>60</sup>Co辐射损伤小鼠外周血象、骨髓嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes, PCE)微核率和骨髓有核细胞(Bone marrow cells, BMC)细胞周期和凋亡的影响。使用<sup>60</sup>Co辐射制备损伤模型,维生素D制剂(阿法骨化醇胶丸)灌胃,观察外周血象、PCE微核率(Giemsa法)的变化,并用流式细胞仪分析BMC细胞周期和凋亡情况。结果显示,小鼠辐射后外周血白细胞、血小板数显著下降,骨髓造血损伤,染色体损伤,而维生素D能在一定程度上促进外周血象的恢复,抑制微核率的发生。流式细胞仪分析表明,辐射后24h,维生素D干预组,BMC的G0/G1期细胞比例较辐射损伤组明显减少,G2期和S期细胞较辐射组增多。这说明维生素D可能成为一个新的辐射防护剂。

**关键词** 维生素D, 辐射防护

**中图分类号** R818.74, R818.03, R551.3, R853.7

维生素D的体内活性产物骨化三醇不仅是钙稳态及骨矿代谢的关键性调控因子,同时它还作为类固醇超家族激素成员,调节更为广泛的生理功能。虽然维生素D被发现只有近100年的历史,但它早在5亿年前就已存在,且结构在进化过程中保持了高度的恒定,说明其对生命有重要意义。国外学者认为维生素D具有基因组稳定性作用。基因组的相对稳定对于防范发育异常、遗传疾病、肿瘤及其他遗传——环境相关的复杂疾病具有重要意义<sup>[1]</sup>。许多研究显示辐射能诱发基因组不稳定性<sup>[2]</sup>。本文研究旨在探讨维生素D的抗辐射作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

清洁级小鼠(雌雄各半),体重(20±2)g,由苏州大学实验动物中心提供。阿法骨化醇胶丸(口服经小肠吸收后在肝内经25羟化酶作用转化为1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)为南通华山药业有限公司制造,用食用油稀释成0.25 μg/mL。碘化丙啶(PI)、RNase A购自Sigma公司。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 动物分组与处理 取健康昆明种小鼠24只,

雌雄各半,随机分为3组,辐射损伤组(Irradiation)、维生素D保护组(Vitamin D)、空白对照组(Control),雌雄分笼喂养。维生素D保护组:每日清晨灌药一次,直至处死,剂量2 μg·kg<sup>-1</sup>体重,灌胃前1天晚禁食不禁水。空白对照组和辐射损伤组灌胃剂为生理盐水。除空白对照组外,辐射损伤组与维生素D保护组于灌胃第3天<sup>60</sup>Co γ射线一次性全身照射,动物吸收剂量为6 Gy/只,剂量率为1 Gy/min。于辐照后第2、9天各组取4只小鼠,采集样本测定指标。

1.2.2 血细胞计数 4%水合氯醛麻醉小鼠,心脏取血,血常规检验。

1.2.3 微核试验 参照参考文献[3]。解剖胸部,取胸骨,将骨髓挤于滴有1滴小牛血清的清洁载玻片上,混匀后推片,晾干,甲醇固定,Giemsa染液染色。油镜下观察,每样本计数1000个多染红细胞(Polychromatic erythrocytes, PCE),计算其中有微核的PCE数,即微核率(%)。

1.2.4 骨髓有核细胞(Bone marrow cells, BMC)细胞周期及凋亡检测 无菌条件下取出一侧股骨,剪开两端,用生理盐水冲出骨髓,针头过滤制成骨髓单细胞悬液。用低渗法去除红细胞,生理盐水洗2次,70%酒精固定,4℃存放。染色前去除固定液,生理盐水清洗1~2次,加入RnaseA (100 μg·mL<sup>-1</sup>),

国家自然科学基金(30570883)、苏州大学医学发展基金(EE126620)资助

第一作者:王小慧,女,1978年4月出生,2000年毕业于苏州大学,现为苏州大学放射医学公共卫生学院卫生毒理专业在读硕士研究生

通讯联系人:张增利

收稿日期:初稿 2007-09-04,修回 2007-10-25

PI( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 染色液,混匀,  $4^\circ\text{C}$  避光 30 min, 流式细胞仪进行细胞周期分析及凋亡检测。

### 1.3 统计学处理

各组数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 维生素D对 $^{60}\text{Co}$ 辐射小鼠外周血细胞的影响

由表 1 可以看出, 辐照后第 2、9 天辐射损伤组 WBC 与正常对照组比较, 均有显著下降, 第 9 天

相对更低, 呈下降趋势。而维生素 D 保护组 WBC 在辐射后 2、9 天虽然低于对照组 ( $P < 0.01$ ) 但明显高于辐射损伤组。辐照后 2、9 天辐照组 RBC 与正常组比较, 下降不明显, 略呈逐步下降趋势。维生素 D 保护组在辐射后 2、9 天 RBC 均高于损伤组, 尤以第 9 天最为明显。且维生素 D 保护组第 2、9 天 RBC 水平均比正常组略为高。

辐照后第 2、9 天, 辐射损伤组血小板值呈下降趋势, 尤其在第 9 天显著低于正常对照组, 而维生素 D 保护组第 2、9 天均高于辐照组。

**Table 1** Effects of vitamin D on white blood cell (WBC), red blood cell(RBC)and Platelet(PLT) of the irradiated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	WBC / $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$		RBC / $10^{12} \cdot \text{L}^{-1}$		PLT / $10^9 \cdot \text{L}^{-1}$	
	2d	9d	2d	9d	2d	9d
Vitamin D	$3.05 \pm 0.67^{*\circ}$	$2.5 \pm 0.07^{*\circ}$	$7.46 \pm 0.36$	$7.9 \pm 0.19^*$	$690 \pm 32.5$	$171.5 \pm 9.2^{*\circ}$
Irradiation	$2.66 \pm 0.53^{\circ}$	$1.33 \pm 0.06^{\circ}$	$6.79 \pm 0.80$	$6.57 \pm 0.95$	$526 \pm 22.5$	$134 \pm 7.1^{\circ}$
Control	$6.29 \pm 0.72$	$6.27 \pm 0.57$	$6.92 \pm 0.50$	$6.98 \pm 0.44$	$667 \pm 27.9$	$671 \pm 28.1$

Note:  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , vs irradiation;  $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^{\circ\circ}P < 0.01$ , vs control

### 2.2 维生素D对 $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ 射线所致骨髓嗜多染红细胞微核率的影响

由表 2 可见, 急性辐射损伤后 24 h, 辐射损伤组微核率明显高于对照组, 维生素 D 干预组 PCE 微核率虽然明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 但低于辐照组。

**Table 2** Effects of vitamin D on micronucleus rate of PCE in the mice 24h after irradiated ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Micronucleus rate of PCE / %
Vitamin D	$10.34 \pm 1.53^{*\circ}$
Irradiation	$13.67 \pm 1.15^{\circ}$
Control	$2.34 \pm 0.58$

Note:  $*P < 0.05$ , vs irradiation;  $^{\circ}P < 0.01$ , vs control

### 2.3 维生素D对 $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ 射线辐射后小鼠骨髓有核细胞周期及凋亡的影响

该结果显示, 辐照后第 2 天辐射损伤组与维生素 D 保护组 BMC 均表现为 G0/G1 期细胞比例增多, S 期细胞比例减少, 同时有细胞凋亡; 不同的是维生素 D 保护组的突出表现为 G2 期细胞增多, 与辐射损伤组比较, G1 期细胞减少, 而 G2 期细胞增多。

辐照后随着时间推移, 辐射损伤组 BMC 的 G0/G1 期细胞比例逐渐减少, S 期细胞逐渐增多。而维生素 D 保护组随着时间推移, S 期细胞逐渐增多, G2 期细胞逐渐减少。具体见表 3。

**Table 3** Effects of vitamin D on cycle of BMC in the irradiated mice ( $\bar{x} \pm s$ )

Time	Cell cycle / %			
	Vitamin D	Irradiation	Control	
2d	G0/G1	$79.4 \pm 1.56^{*\circ}$	$84.77 \pm 1.36^{**}$	$72.23 \pm 0.93$
	S	$7.05 \pm 1.77^*$	$6 \pm 0.36^{**}$	$18.1 \pm 1.51$
	G2/M	$13.5 \pm 0.14^{\circ}$	$9.23 \pm 1.0$	$8.63 \pm 1.31$
	APO	$17.7 \pm 0.57$	$18.27 \pm 2.15$	0
9d	G0/G1	$79.27 \pm 0.8$	$77.5 \pm 0.99$	$72.35 \pm 1.02$
	S	$11.47 \pm 0.96$	$14.57 \pm 0.74$	$18.3 \pm 0.97$
	G2/M	$9.27 \pm 1.42$	$8 \pm 0.62$	$8.49 \pm 0.89$
	APO	0	0	0

Note:  $**P < 0.01$ ,  $*P < 0.05$ , vs control;  $^{\circ}P < 0.01$ , vs irradiation

维生素 D 保护组与辐射损伤组在辐射后 24h, BMC 均有凋亡出现, 但没有统计学差异。至辐射后第 9 天, 没有凋亡出现。

## 3 讨论

本次整体实验, 是从外周血象、微核、骨髓细胞周期及凋亡 3 个方面来观察维生素 D 的基因组稳定作用。

外周血象可以大致反映出机体的整体状况, 由表 1 可以看出, 辐照组辐照后第 2、9 天 WBC、PLT 与正常对照组比较, 均有较大程度降低, 提示辐照后受损严重。辐照后第 9 天损伤组 WBC, PLT 降到极低, 说明损伤到了一个相对最严重的阶段。维生

素 D 保护组表现出一个保护作用。表 1 中,辐照后 RBC 下降不明显,可能主要与 RBC 寿命较长,外周血短期损伤反应不明显有关。但维生素 D 保护组的 RBC 在辐照后 9 天比辐射损伤组高,同时,第 2、9 天 RBC 水平均比正常组还略高,也说明维生素 D 有保护性作用。整体看来,维生素 D 还是具有一定的保护和促进恢复的作用。

微核试验是一个可供检测基因组不稳定性生物学终点<sup>[4]</sup>。一般认为微核是细胞内染色体断裂或纺锤丝受影响而在细胞有丝分裂后期滞留在细胞核外的遗传物质。表 2 中急性辐射损伤后 24 h,维生素 D 干预组 PCE 微核率低于辐照组,这表明维生素 D 对辐射造成的染色体损伤有一定的保护作用。

辐射可导致骨髓造血损伤,所以骨髓损伤的恢复情况可直接反映出机体的状况。表 3 中,可以看到辐射诱导 BMC 出现凋亡,但维生素 D 保护组与辐射损伤组在辐照后 24 h BMC 凋亡情况上却没有差异,没有体现出维生素 D 抑制凋亡出现的作用。估计一方面是辐射剂量较大,另一方面可能维生素 D 的给药剂量还有待进一步确定。

从细胞周期的情况来看,辐射后小鼠骨髓细胞出现明显的 G1、G2 期阻滞,S 期缩短,这是机体对外界刺激的一种保护性反应,以提供充足的时间来促使受损伤的 DNA 修复,损伤严重者通过 G1 期永久性阻滞或凋亡而清除有损伤的 DNA 修复,从而降低了基因组的不稳定性,并减少随后的致癌的几率。维生素 D 保护组 G1 期较损伤组明显缩短,这体现了维生素 D 具有一定的保护作用。因为辐射引起的骨髓细胞周期阻滞主要是 G1 期阻滞,而维生素 D 可减轻辐射引起的 G1 期阻滞。同时,维

素 D 保护组 G2 期细胞增多,这也是维生素 D 保护作用的一个方面。最近的研究认为,G2 期阻滞对决定细胞敏感性更为重要,用染色体提前凝集 (Prematurely condensed chromosome, PCC) 法观察到哺乳动物细胞中有相当数量的 DNA 断裂在有丝分裂前得到修复<sup>[5]</sup>,在一些细胞中,使 G2 期阻滞缩短或被越过时,细胞凋亡明显增加,单独的 G1/S 检查点不起决定性作用。

本次实验结果初步表明,维生素 D 对辐射损伤具有一定的保护作用,但其保护作用的具体机制尚需进一步深入研究。

## 参考文献

- 1 Chatterjee M. Mutation research, 2001, **475**(1-2): 69-88
- 2 Morgan W F, Day J P, Kaplan M I, *et al.* Radiat Res, 1996, **146**(3): 247-258
- 3 曹佳主编. 微核试验: 原理、方法及其在人群监测和毒理评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 35-68  
CAO Jia. The micronucleus test: The principle, methods and the application in population monitoring and toxicological evaluation, Beijing: Military Medical Science Press, 2001, **475**: 69-88
- 4 Limoli C L, Ponnaiya B, Corcoran J J, *et al.* Advances in space research, 2000, **25**(10): 2107-2117
- 5 吴德昌主编. 放射医学. 北京: 军事医学科学出版社, 2001. 46-47  
WU Dechang. Radiation medicine. Beijing: Military Medical Science Press, 2001. 46-47

## Radioprotection of vitamin D on mice injured by irradiation

WANG Xiaohui ZHOU Zhengyu LI Bingyan NIE Jihua TONG Jian ZHANG Zengli

(School of Radiation medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT** To investigate the radioprotective effect of vitamin D against irradiation injury, the mice exposed to <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays at 6 Gy was treated with preparation of vitamin D(Alfacalcidol Soft Capsules). Cell cycle and apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM) following staining of cells with propidium iodide (PI). Peripheral blood cell counts were analyzed by autoanalyzer. It has been found that vitamin D significantly increases white blood cell (WBC) counts, decreases bone marrow PEC micronucleus rate. FCM analysis shows that compared with damaged group, G2 and S phases of bone marrow cells in vitamin D protection group increases significantly at 24 h after whole body irradiation, whereas G1 phase cells decrease at the same times. So vitamin D might be a new radioprotection agent and it should be deserved further study.

**KEYWORDS** Vitamin D, Radiation injury

**CLC** R818.74, R818.03, R551.3, R853.7