

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00648

苯甲酸雌二醇对辐射诱导小鼠骨髓造血细胞凋亡的影响

李百龙,蔡建明*,崔建国,项莺松,高福,杨如俊,黄越承

第二军医大学海军医学系放射医学教研室,上海 200433

[摘要] 目的:观察苯甲酸雌二醇对 γ 射线诱导小鼠骨髓造血细胞凋亡的影响,以探讨其抗放射作用机制。方法:昆明种小鼠,随机分为正常组、单纯照射组和用药照射组3组,每组各15只。单纯照射组小鼠用 γ 射线照射4.0 Gy;用药照射组于照射前10 d每只小鼠肌内注射0.1 mg苯甲酸雌二醇,同时用 γ 射线照射4.0 Gy;正常对照组不作任何处理。采用DNA琼脂糖凝胶电泳检测骨髓造血细胞DNA裂解片段,采用流式细胞术观察各组小鼠照射后4 h、8 h、12 h骨髓造血细胞凋亡、Fas和Bcl-2表达的变化情况。结果: γ 射线照后8 h,骨髓造血细胞DNA裂解片段增加,出现了典型DNA“梯状”条带,而用药照射组和正常对照组均未见明显“梯状”条带。照射后4 h、8 h、12 h,用药照射组骨髓造血细胞凋亡率均明显低于单纯照射组($P < 0.01$);Fas表达较正常对照组略有增加,并未出现单纯照射组所呈现典型的高峰期,与单纯照射组比较显著降低($P < 0.01$);Bcl-2表达不降反而升高,与单纯照射组相比差异显著($P < 0.01$)。结论:苯甲酸雌二醇可能是通过下调Fas和上调Bcl-2的表达抑制了 γ 射线诱导的小鼠骨髓造血细胞凋亡。

[关键词] 雌二醇;造血细胞;细胞凋亡;辐射损伤;Fas;Bcl-2

[中图分类号] R 818.83 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0648-03

Effects of estradiol on radiation-induced apoptosis of bone marrow hematopoietic cells in mice

LI Bai-long, CAI Jian-ming*, CUI Jian-guo, XIANG Ying-song, GAO Fu, YANG Ru-jun, HUANG Yue-cheng

Department of Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of estradiol on ^{60}Co γ -ray induced apoptosis of bone marrow hematopoietic cells of mice, and to discuss the related anti-irradiation mechanism. **Methods:** KM mice were randomly divided into 3 groups (15 mice/each group): control group (without radiation), pure radiation group and estradiol + radiation group (ER group). The pure radiation group was irradiated by 4.0 Gy γ -ray at a dose rate of 1.15 Gy/min; the ER group was administered with 0.1 mg estradiol (IM) at 10 days before 4.0 Gy γ -ray radiation; and the control group received no special treatment. The apoptotic DNA segments of bone marrow hematopoietic cells were analyzed by DNA agarose gel electrophoresis; flow cytometry was used to examine the apoptosis rate of cells and expression of Fas and Bcl-2 at 4 h, 8 h, and 12 h after irradiation. **Results:** Eight hours after radiation, the apoptotic DNA segments were obviously increased and apoptotic DNA ladder appeared, which was not seen in the other 2 groups. The apoptosis rate of bone marrow hematopoietic cells in ER group was significantly lower than that in the pure radiation group at 4, 8, and 12 h after irradiation ($P < 0.01$). Fas expression was only slightly elevated in the ER group than in the control group, but was markedly lower than that in pure radiation group ($P < 0.01$), and showed no typical crest-time; Bcl-2 expression was significantly higher in the ER group than in the pure radiation group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Estradiol can decrease the apoptosis of mice bone marrow hematopoietic cells induced by γ -ray, probably through down-regulation of Fas and up-regulation of Bcl-2 expression.

[KEY WORDS] estradiol; hematopoietic cell; apoptosis; radiation injuries; Fas; Bcl-2

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 648-650]

雌激素作为一种抗放射药物,已被许多学者所肯定^[1]。我室曾对苯甲酸雌二醇辐射防护作用的抗辐射效价,用药时间与剂量的有效范围以及药物代谢等方面进行了比较系统的观察,证明苯甲酸雌二

醇在照射前预防使用,能有效地减轻放射损伤。其主要特点是保护造血细胞,促进白细胞提前回升,从而使机体增加抗感染能力,较快地渡过极期进入恢复期^[2-5]。以往研究业已证明,苯甲酸雌二醇可保护

[收稿日期] 2008-01-14 **[接受日期]** 2008-05-21

[作者简介] 李百龙,硕士,讲师。E-mail:libailong2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070341, E-mail:CJM882003@yahoo.com.cn

小鼠胸腺细胞、脾细胞免于 γ 射线损伤,此结果与凋亡有关^[6]。目前有关苯甲酸雌二醇抗放射作用的分子机制仍不十分清楚。本实验通过观察苯甲酸雌二醇对由辐射诱导小鼠骨髓造血细胞凋亡的影响,凋亡基因Fas和Bcl-2的表达变化,以探讨苯甲酸雌二醇抗放射作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 动物和分组 昆明种小鼠,雄性,体质量(20±2)g,本校实验动物中心提供。随机分为正常组、单纯照射组和用药照射组3组,每组各15只。正常对照组不作任何处理。另2组采用⁶⁰Co γ 射线(小鼠与辐射源距离为2.5m),单次全身照射4Gy,剂量率1.15Gy/min,此外,用药照射组于照射前10d每只小鼠左后肢肌内注射0.1mg(5mg/kg体质量)苯甲酸雌二醇(上海第九制药厂,批号:050521)。

1.2 骨髓细胞制备 用颈椎脱位法将小鼠处死,取小鼠双侧股骨,用PBS冲出骨髓,过4号针头,制成单细胞悬液,经淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,调适量密度备用。

1.3 DNA裂解片段的测定 取骨髓单个核细胞(1.0×10^7 /ml)与1.5%的低熔点琼脂糖1:1混合,制成胶块,在0.25mol/L EDTA、0.01mol/L Tris-HCl、1.0% SDS、0.5 μ g/ml蛋白酶K、pH 8.0的裂解液中50℃裂解24h,用TE溶液清洗后进行琼脂糖凝胶电泳。电泳条件:电压0.7V/cm、0.5 \times TBE缓冲液(pH 8.0)、1.0%琼脂糖凝胶(内含0.05 μ g/ml EB),10~15℃电泳12~24h,紫外线灯下观察并拍照。

1.4 流式细胞术检测凋亡细胞 取单个核骨髓细胞100 μ l(1×10^6 /ml),加5 μ l Annexin V-FITC和2 μ l PI,室温避光放置15min,加0.4ml PBS悬浮细胞,用流式细胞仪(美国Coulter公司,EPICS-XL型)测细胞荧光,计算凋亡细胞的百分率。Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒为美国BD公司产品。

1.5 流式细胞术检测Fas、Bcl-2的表达 Fas检测:每份样品取细胞悬液100 μ l(1×10^6 /ml),PE标记鼠抗CD95(美国BD公司)直标法染色,4℃反应45min,以PE标记非特异鼠抗IgG作为阴性对照,流式细胞仪检测。Bcl-2检测:取细胞悬液100 μ l(1×10^6 /ml),2%的多聚甲醛固定20min后,FITC标记鼠抗Bcl-2蛋白单克隆抗体(美国BD公司)直标法染色,以FITC标记非特异鼠抗IgG作为阴性对照,流式细胞仪检测。

1.6 统计学处理 采用SPSS统计软件包对实验数据进行单因素方差分析和 t 检验。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 DNA琼脂糖凝胶电泳结果 ⁶⁰Co γ 射线4Gy照射后8h,单纯照射组骨髓造血细胞DNA裂解片段增加,出现了典型DNA“梯状”条带,而用药照射组未见明显“梯状”条带。见图1。

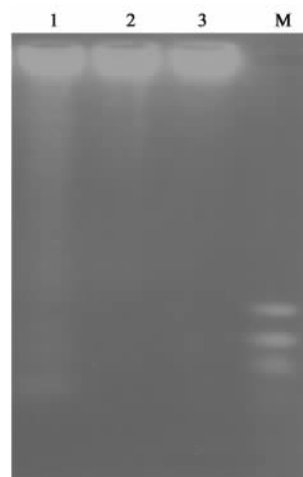


图1 4Gy照射后各组骨髓造血细胞DNA琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 Electrophoresis of genomic DNA obtained from bone marrow hematopoietic cells of mice

1: Radiation group; 2: Estradiol + radiation group; 3: Control group; M: PGEM-7zf(+)/haeIII marker

2.2 小鼠骨髓造血细胞凋亡率的变化 正常组小鼠骨髓细胞凋亡率为(5.71±1.26)%,照射后4~12h,用药照射组和单纯照射组骨髓造血细胞凋亡率均明显升高,特别是单纯照射组在照射后8h达到高峰,但用药照射组骨髓造血细胞凋亡率与同时时间段的单纯照射组相比明显降低,检测结果经统计学处理均具有显著性差异($P < 0.01$),见表1。

2.3 Fas、Bcl-2的表达 正常组小鼠骨髓造血细胞Fas和Bcl-2的表达分别为(14.12±1.52)%和(10.32±1.12)%。单纯照射组骨髓造血细胞Fas的表达显著增加,照后4h达到高峰而后下降;而用药照射组Fas的表达在照射后略有增加,但并没有出现典型的高峰期,与单纯照射组比较Fas的表达显著降低($P < 0.01$),见表1。单纯照射组骨髓造血细胞Bcl-2表达呈现明显下降趋势,而用药照射组Bcl-2表达不降反而升高,与单纯照射组相比差异显著($P < 0.01$),见表1。

表 1 各组小鼠骨髓造血细胞凋亡率以及 Fas 和 Bcl-2 蛋白的表达

Tab 1 Change of apoptosis rates and expression of Fas and Bcl-2 in estradiol+radiation and radiation groups

(n=15, $\bar{x} \pm s$, %)

| Index | Group | Time after radiation t/h | | |
|----------------|---------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| | | 4 | 8 | 12 |
| Apoptosis rate | Radiation | 18.45±1.14 | 35.09±1.61 | 23.77±3.62 |
| | Estradiol+radiation | 10.14±2.78** | 14.98±2.98** | 13.12±3.56** |
| Fas | Radiation | 45.65±3.56 | 36.36±2.46 | 30.96±2.18 |
| | Estradiol+radiation | 16.64±2.78** | 15.78±3.56** | 15.36±2.18** |
| Bcl-2 | Radiation | 6.45±2.34 | 5.54±1.36 | 5.23±1.16 |
| | Estradiol+radiation | 14.41±0.44** | 16.14±0.36** | 16.63±0.46** |

** P<0.01 vs radiation group

3 讨论

本实验通过在照射前 10 d 对小鼠注射苯甲酸雌二醇,发现受照小鼠骨髓造血细胞的凋亡率明显下降。照射后 8 h,凝胶电泳显示 DNA 片段明显减少,未出现典型条带,这一结果与凋亡率仅在 20% 以上才能在琼脂糖凝胶电泳上显示条带也是一致的^[7]。上述研究表明苯甲酸雌二醇可抑制受照小鼠骨髓造血细胞凋亡,减轻造血细胞损伤并维持细胞抗辐射损伤能力。

Fas (APO-1,CD95)又称死亡受体,是一种传递细胞凋亡信号的 I 型跨膜蛋白,Fas 与 FasL 结合可诱导 Fas⁺ 细胞凋亡,故 Fas/FasL 系统是启动细胞凋亡的一条重要途径^[8-9]。Bcl-2 是一种能够特异地抑制细胞凋亡,从而延长细胞生命的所谓存活基因,其高表达能够阻抑细胞的凋亡^[10]。在造血过程中,随着造血细胞发育成熟,Fas 表达逐渐增加,Bcl-2 表达逐渐减少,表明二者在造血过程中发挥着积极作用。造血细胞对辐射极为敏感,辐射导致造血细胞凋亡是引起辐射损伤的一个重要方面,而在这一过程中 Fas 和 Bcl-2 起重要作用^[11-12]。在本实验中也观察到小鼠经 γ 射线照后,骨髓造血细胞 Fas 表达明显升高,在 4 h 达到高峰;Bcl-2 的表达却明显降低。而小鼠经苯甲酸雌二醇预处理后,Fas 的表达在照射后虽略有增加,但并没有出现典型的高峰期,与单纯照射组同时时间段比较 Fas 的表达显著降低;Bcl-2 的表达不降反而升高。上述结果表明,辐射后小鼠骨髓造血细胞的发生与 Fas 和 Bcl-2 有关,而苯甲酸雌二醇正是通过抑制 Fas 表达的上调和 Bcl-2 表达的下调作用,而使细胞凋亡显著减少。

辐射所致细胞凋亡机制十分复杂,是多因素作用的结果。凋亡的发生同膜蛋白结构与功能改变,细胞信号转导机制中信使分子变化,细胞中某些特

异蛋白合成、mRNA 的表达及凋亡相关基因的调控和协同作用均有着十分密切的关系^[13]。由于苯甲酸雌二醇具有广泛的生理-药理作用,是否还调控着其他凋亡途径,值得进一步深入探讨。

[参考文献]

- [1] Fried W. Effect of estrogens on hematopoietic stem cells and on hematopoiesis of mice[J]. J Lab Clin Med,1974,83:807-812.
- [2] 张明华,丁振海,姜洪志,杨如俊,陈顶市,赵芳,等.狗极重度急性放射病的临床表现和实验治疗[J].第二军医大学学报,1982,3:50-55.
- [3] 张明华,丁振海,杨如俊,麦智广,曹炳炎,陈顶市,等.雌二醇合并千金藤素治疗狗急性放射病的疗效观察[J].第二军医大学学报,1982,3:56-59.
- [4] 张明华,宁廷选,薛锋,丁振海,姜洪志,杨如俊,等.造血干细胞辐射损伤和修复的研究Ⅳ.苯甲酸雌二醇对小鼠造血干细胞辐射损伤和修复的影响[J].第二军医大学学报,1985,6:84-87.
- [5] 刘本傲,叶根耀.上海“6.25”Co⁶⁰源辐射事故病人诊断与救治文集[M].北京:北京科学技术出版社,1994:327-331.
- [6] 吴玮,杨如俊,孔宪涛,张玲珍,李百龙,蔡建明.苯甲酸雌二醇对辐射诱导免疫细胞凋亡的影响[J].中华放射医学与防护杂志,2000,20:98-101.
- [7] Otsuki Y, Li Z L, Shibata M A. Apoptotic detection methods—from morphology to gene [J]. Progr Histochem Cytochem, 2003,38:275-340.
- [8] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[J]. Science,1995,267:1449-1456.
- [9] Pearl-Yafe M, Stein J, Yolu E S, Farkas D L, Shirwan H, Yaniv I, et al. Fas transduces dual apoptotic and trophic signals in hematopoietic progenitors[J]. Stem Cells,2007,25:3194-3203.
- [10] Narayan S, Chandra J, Sharma M, Naithani R, Sharma S. Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Hematology,2007,12:39-43.
- [11] 邹仲敏,孙慧勤,罗成基.6Gy 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,1998,18:390-392.
- [12] 常保萍,邓昊,张海深,王亚丽,任萍,赵变锋,等. Fas、Bcl-2 在放射损伤小鼠骨髓细胞的表达及意义和川芎嗪对其影响的研究[J].中国免疫学杂志,2007,23:465-470.
- [13] Zhou L, Yuan R, Sergio L. Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis[J]. Front Biosci,2003,8:d9-d19.

[本文编辑] 曹静