

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00641

## 原花青素预处理对体外人源细胞辐射损伤的防护作用

高 福,李百龙,孙 顶,黄越承,倪 谨,崔建国,赵 芳,蔡建明\*

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:**探讨原花青素(PC)预处理对体外人淋巴母细胞 AHH-1 和肠腺上皮细胞 HIEC 电离辐射损伤的防护效果及可能的作用机制。**方法:**采用 CCK-8 法检测原花青素预处理对  $\gamma$  射线照射后 AHH-1、HIEC 细胞存活率的影响,Annexin-V/PI 染色和流式细胞术分析细胞凋亡及细胞周期的变化,蛋白质印迹法检测细胞 Bcl-2 蛋白表达变化。**结果:**PC 预处理的细胞辐照后存活率明显升高( $P<0.01$ ),4 Gy 照射用药组 AHH-1 细胞凋亡率(11.78%)显著低于单纯照射组(26.38%, $P<0.01$ ),8 Gy 照射用药组 HIEC 细胞凋亡率(5.32%)亦显著低于单纯照射组(12.45%, $P<0.01$ )。PC 预处理组 AHH-1、HIEC 细胞受照射后其 Bcl-2 蛋白表达下降受到抑制。**结论:**PC 预处理对细胞的辐射损伤具有较好的防护效果,可能与其促进受损细胞 Bcl-2 蛋白表达有关。

**[关键词]** 原花青素类;辐射损伤;淋巴母细胞;肠腺上皮细胞;Bcl-2 蛋白

**[中图分类号]** R 818.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0641-04

### Protective effects of proanthocyanidin on radiation-induced injury of human-derived cells

GAO Fu, LI Bai-long, SUN Ding, HUANG Yue-cheng, NI Jin, CUI Jian-guo, ZHAO Fang, CAI Jian-ming\*

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

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the protective effects of proanthocyanidin on radiation-induced injury of AHH-1 and HIEC cells, and to explore the possible molecular mechanism. **Methods:** CCK-8 assay was applied to examine the survival of AHH-1, HIEC cells after  $\gamma$ -ray irradiation with or without proanthocyanidin pretreatment. Annexin-V/PI staining and flow cytometry analysis were used to evaluate the apoptosis and cell cycle of AHH-1 and HIEC cells. The expression of Bcl-2 protein was analyzed by Western blotting assay. **Results:** Pretreatment with proanthocyanidin significantly increased the cell survival rate after radiation( $P<0.01$ ). The apoptosis rates of cells in the proanthocyanidin+radiation group were (11.78% at 4 Gy[AHH-1] and 5.32% at 8 Gy[HIEC], respectively) greatly lower than those of the single radiation group (26.38% at 4 Gy[AHH-1] and 12.45% at 8 Gy[HIEC], respectively,  $P<0.01$ ). Moreover, the inhibition of Bcl-2 protein expression in AHH-1, HIEC cells was attenuated in the proanthocyanidin+radiation group. **Conclusion:** Proanthocyanidin has satisfactory protective effect on radiation-induced cellular injury; the mechanism may be related to the attenuation of Bcl-2 protein inhibition.

**[KEY WORDS]** proanthocyanidins; radiation injuries; lymphoblast cell; HIEC cell; Bcl-2 protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 641-644]

Vijayalaxmi 等<sup>[1]</sup>研究认为,60%~70%的电离辐射诱发的组织损害都是由羟自由基引起。因此,辐射防护研究的重点是减少和阻断辐射的间接损伤,寻求具有清除自由基、抗氧化活性的物质。原花青素(proanthocyanidin, PC)是一类可从许多种植物中提取得到的多酚化合物的总称,其中从葡萄籽提取的原花青素得到了较多的关注。PC 主要是由儿茶素的单倍体、二聚体~十聚体等组合而成,其中又以低聚体生物活性最强,具有极强的抗氧化及清除

自由基活性,其在体内的抗氧化活性是维生素 C 的 20 倍、维生素 E 的 50 倍<sup>[2]</sup>。目前国内外关于其辐射防护作用的研究很少。因此,本研究初步考察了 PC 对细胞电离辐射损伤的防护作用,为后续研究奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 PC 购自 Sigma 公司, COULTER EPICS FC500 型流式细胞仪(Beckman

**[收稿日期]** 2009-01-20 **[接受日期]** 2009-03-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30470415,30800284)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30470415,30800284)。

**[作者简介]** 高 福,博士,讲师。E-mail:gaofu\_2002@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871101, E-mail:cjm882003@yahoo.com.cn

Coulter, USA)。

1.2 细胞培养 人淋巴母细胞 AHH-1 由军事医学科学院周平坤教授惠赠,肠腺上皮细胞 HIEC 由第四军医大学防原医学教研室郭国祯教授惠赠。AHH-1 和 HIEC 细胞培养体系均为 DMEM 培养基 (Gibco), 含 10% 胎牛血清 (hyclone)、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。

1.3 γ 射线照射 采用<sup>60</sup>Co 放射治疗机 (上海医用核子仪器厂 Fyc-50H) 照射细胞, 受照射细胞距放射源 75 cm, 照射剂量率 0.43 cGy/min, 照射剂量根据实验设计而定。

1.4 细胞分组 将对数生长期 AHH-1 和 HIEC 细胞分为对照组、单纯照射组、单纯用药组和照射+PC 组。对照组细胞不予照射和 PC 处理, 单纯用药组仅给予 100 mg/L PC 处理; 单纯照射组和照射+PC 组给予不同剂量 1、2、4、6、8 Gy 的 γ 射线照射, 照射+PC 组细胞照射前 2 h 给予 100 mg/L PC 共孵育。经不同处理后的细胞继续孵育 48 h, 进行细胞凋亡、细胞周期和存活率的检测。

1.5 细胞活力测定 采用 Cell Counting Kit-8 试剂盒 (CCK-8, 日本同仁化学研究所), 取一定数量指数生长期的 AHH-1、HIEC 细胞接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔。按上述处理细胞后, 分别培养至规定时间后, 加 CCK-8 10 μl, 继续孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处光密度 (D) 值 (630 nm 为参照波长), 重复实验 3 次。按公式计算细胞存活率 (%): 细胞存活率 = (处理组 D 值 - 空白组 D 值) / (阴性对照组 D 值 - 空白组 D 值) × 100%。

1.6 细胞周期与凋亡检测 收集处理后的 AHH-1、HIEC 细胞, 用冷的 PBS 洗 1 次, 离心后弃上清, 用 70% 的冰乙醇固定后过夜。测试前弃去冰乙醇, 并用冷的 PBS 洗 1 次, 离心后去上清, 加入 10% Triton 10 μl 破膜后, 加入 500 μl PI 染液, 室温下孵育 30 min 后, 将标本用流式细胞仪进行周期分析。细胞凋亡的测定按照凋亡试剂盒说明, 加入 Annexin V 和 PI 工作液于每 100 μl 细胞悬液。将细胞在室温下孵育 15 min 后, 加入 400 μl Annexin 结合缓冲液, 在冰上轻轻地混匀, 立即用流式细胞仪分析, 在 530 nm 处和 575 nm 处检测荧光强度。每批实验取 4 个培养孔的细胞进行检测。

1.7 Bcl-2 蛋白表达量检测 分别抽提各组细胞总蛋白, 以 β-actin 为内参, 进行蛋白质印迹法分析: 总蛋白 100℃ 高温变性后进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 凝胶湿式电转移法转膜, 100 V 电压条件下电转

移 10 min; 丽春红染色, 漂洗; 放置于 15% 脱脂奶粉悬浊液中, 室温平摇 2.5 h 进行封闭; 与 β-actin、Bcl-2 人单抗 IgG (1:500) 室温孵育 2 h 后漂洗, 与羊抗人 IgG (1:1000) 室温下孵育 1.5 h, 漂洗后 ECL 显像。

1.8 统计学处理 所得实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 PC 对 γ 射线照射细胞存活率的影响 终质量浓度为 100 mg/L 的 PC 预处理可以提高不同照射剂量组 AHH-1 和 HIEC 细胞的存活率; 以 1、2、4、6、8 Gy 剂量照射 AHH-1 和 HIEC 细胞, 用药后存活率与其相应的单纯照射组相比显著提高 ( $P < 0.01$ , 图 1), 而上述浓度的 PC 对未照射组细胞的存活率没有明显影响。

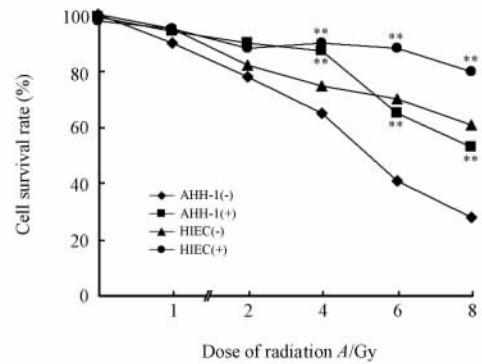


图 1 不同照射剂量 AHH-1、HIEC 给药组和对照组细胞存活率

Fig 1 Survival rates of AHH-1 and HIEC cells after different doses of radiation with or without PC pretreatment

AHH-1(-), HIEC(-): Cells only received radiation; AHH-1(+), HIEC(+): Cells received radiation + 100 mg/L PC pretreatment. \*\*  $P < 0.01$  vs AHH-1(-) or HIEC(-) group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 PC 对受照细胞的细胞周期和凋亡的影响 选择 4 Gy 和 8 Gy 分别照射 AHH-1 和 HIEC 细胞, 并分析 100 mg/L PC 对照射诱发的细胞周期和凋亡变化。结果发现 PC 预处理可以降低辐射诱导的 AHH-1 和 HIEC 细胞凋亡, 4 Gy 照射用药组 AHH-1 细胞凋亡率 (11.78%) 显著低于未用药的单纯照射组 (26.38%), 8 Gy 照射用药组 HIEC 细胞凋亡率 (5.32%) 显著低于未用药的单纯照射组 (12.45%), 且相差显著 ( $P < 0.01$ )。而辐射诱发的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞在照射用药组得到明显的缓解, AHH-1 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例从单纯照射组的 32.40% 下降到照射用药组的 15.41%, 而 HIEC G<sub>2</sub>/M 期细胞比例

则从单纯照射组 67.60% 下降到照射给药组的 38.07%, 同时伴随 S 期细胞比例上升 ( $P < 0.01$ )。单

纯用药组的细胞周期比例与对照组相比均无明显差异。具体数据见表 1。

表 1 PC 预处理对受照细胞 AHH-1、HIEC 的细胞周期和凋亡的影响

Tab 1 Influence of PC on cell cycle and apoptosis rate of AHH-1 and HIEC cells after radiation

Group	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	Apoptotic cells
(%; n=5, $\bar{x} \pm s$ )				
AHH-1				
Control	42.73 ± 2.59	42.78 ± 1.48	14.49 ± 1.02	5.56 ± 0.39
100 mg/L PC	43.96 ± 3.25	42.47 ± 2.63	13.57 ± 1.66	4.93 ± 0.48
γ ray (4 Gy)	48.09 ± 4.98	19.51 ± 1.86	32.40 ± 3.49	26.38 ± 1.74
γ ray(4 Gy) + 100 mg/L PC	35.85 ± 3.46	48.74 ± 2.93**	15.41 ± 1.89**	11.78 ± 1.65**
HIEC				
Control	43.73 ± 3.56	41.89 ± 4.73	14.38 ± 2.88	4.56 ± 0.79
100 mg/L PC	42.65 ± 4.26	39.72 ± 3.58	17.63 ± 1.93	5.06 ± 0.68
γ ray (8 Gy)	18.34 ± 1.50	14.06 ± 2.48	67.60 ± 4.11	12.45 ± 0.38
γ ray(8 Gy) + 100 mg/L PC	16.22 ± 1.84	45.71 ± 3.41**	38.07 ± 5.79**	5.32 ± 0.35**

\*\*  $P < 0.01$  vs single radiation group(γ ray)

2.3 PC 对细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 受到 4 Gy 照射的 AHH-1 和 HIEC 细胞内 Bcl-2 蛋白表达明显下降, 而终浓度为 100 mg/L 的 PC 预处理可以抑制 Bcl-2 表达下降 (图 2)。

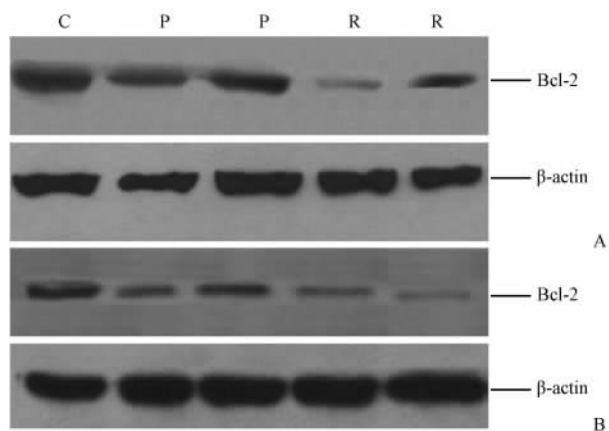


图 2 各组 AHH-1(A)、HIEC(B) 细胞 Bcl-2 蛋白的表达

Fig 2 Expression of Bcl-2 in AHH-1(A) and HIEC cells(B) after 4 Gy radiation with or without PC pretreatment

C: Control group; R: Cells only received radiation (single radiation group); P: Cells received radiation + 100 mg/L PC pretreatment

### 3 讨论

细胞、器官和组织水平的研究<sup>[3]</sup>均已证明自由基清除剂对辐射防护有较明显疗效。目前常见的自由基清除剂主要有硝基氧、氨基磷汀、甾族化合物、抗氧化酶类、维生素 C、维生素 E、2,6-叔丁基对甲酚等。已有的辐射防护剂中剂量减低系数 (DRF) 值大的, 对机体毒副作用也比较大, 极大地限制了其应用

范围<sup>[4]</sup>。而对机体毒副作用小的药物, 其 DRF 值也比较小<sup>[5]</sup>。PC 作为一种植物提取成分易溶于溶剂, 机体吸收度高, 在国外已经应用于食品、药品、美容保健品等领域, 具有高效、低毒、高生物利用率等特点, 加之具有极强的清除自由基活性, 符合作为理想辐射防护剂的必要条件<sup>[6]</sup>。

本研究表明, 单纯用药组的细胞生存率、凋亡率和细胞周期与对照组相比都没有改变, 提示 PC 本身对细胞不具有毒副作用。研究还表明 PC 预处理可以提高不同照射剂量组 AHH-1 和 HIEC 细胞的存活率; 4 Gy 以上受照射 AHH-1 和 HIEC 细胞, 用药后存活率与其相应的单纯照射组相比显著提高。这提示 PC 具有抗辐射损伤作用。PC 具有清除自由基、抗辐射损伤活性与本身结构有密切关系, PC 所含多个邻、间位的酚羟基使之具有清除自由基的能力, 同时具有多电子的羟基部分, 8 个酚羟基均与双键共轭, 是氢原子的稳定供体<sup>[7]</sup>。清除自由基的能力研究<sup>[8-9]</sup>表明 PC 各单体均对氧自由基有很强的抑制作用。采用化学发光法和细胞色素 C 还原法, 比较 PC 与维生素 C、维生素 E 丁二酸酯 (VeS) 清除自由基能力, 结果发现 100 mg/L PC 对氧自由基的抑制率为 78%~81%, 而维生素 C 仅为 12%~19%, VeS 为 36%~44%。

实验结果还显示 PC 也能显著减少辐射诱导的细胞凋亡, 终浓度为 100 mg/L 的 PC 用药组受照 4 Gy 以上的 AHH-1 细胞和 HIEC 细胞凋亡率低于未用药的单纯照射组, 相差非常显著。细胞的辐射损伤和细胞凋亡与辐射所致的 G<sub>2</sub> 阻滞密切相关<sup>[10]</sup>。本研究发现, PC 能够减轻辐射诱导的细胞 G<sub>2</sub> 期阻

滞,使受照细胞处于 G<sub>2</sub>/M 的比例显著下降,一定程度上缓解了辐射引起的细胞 G<sub>2</sub> 期阻滞作用。Bcl-2 是重要的抗凋亡基因之一,其高表达可阻遏细胞凋亡,延长细胞寿命,促进细胞生存。辐射能够导致 Bcl-2 表达降低,是辐照细胞凋亡增加的原因之一<sup>[11]</sup>。本研究结果也证实了这一点,单纯照射组细胞 Bcl-2 表达明显下调,细胞凋亡与正常对照组相比明显升高。而照射+PC 组细胞 Bcl-2 表达明显高于单纯照射组细胞,表明 PC 可以抑制辐射诱导的 Bcl-2 表达下调,从而发挥 Bcl-2 的抗凋亡作用,相应的照射+PC 组的细胞凋亡发生率明显低于单纯照射组。

总之,本研究提示 PC 对细胞的毒副作用甚微,而对辐射损伤具有较明显的预防作用,可以降低辐射诱导的细胞凋亡,PC 抗凋亡作用机制与抑制 Bcl-2 表达下调有关。这些实验结果为寻找高效、低毒、辐射防护先导化合物的研究提供了新的思路,值得进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Vijayalaxmi, Reiter R J, Tan D X, Herman T S, Thomas C R Jr. Melatonin as a radioprotective agent: a review[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 59: 639-653.  
 [2] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, Ray S D, Sen C K, Preuss H G. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 957: 260-270.  
 [3] Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2007, 48: 263-272.

[4] Rolleman E J, Forrer F, Deckers J, de Groot H, Valkema R, de Jong M, et al. Anaphylactoid reaction from amifostine[J]. Radiother Oncol, 2007, 82: 110-111.  
 [5] Prabhakar K R, Veerapur V P, Parihar K V, Priyadarsini K I, Rao B S, Unnikrishnan M K. Evaluation and optimization of radioprotective activity of *Coronopus didymus* Linn. in gamma-irradiated mice[J]. Int J Radiat Biol, 2006, 82: 525-536.  
 [6] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40: 599-607.  
 [7] Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Alcaraz M, Redondo A, Ortuño A, et al. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced *in vivo* by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 1738-1745.  
 [8] Sanoner P, Guyot S, Marnet N, Molle D, Drilleau J P. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica* sp.) [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 4847-4853.  
 [9] Silva P, Laranjinha J A, de Freitas V A. Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66: 947-954.  
 [10] Khodarev N N, Kataoka Y, Murley J S, Weichselbaum R R, Grdina D J. Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells(HMEC)[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, 60: 553-563.  
 [11] Rieber M, Rieber M S. Sensitization to radiation-induced DNA damage accelerates loss of bcl-2 and increases apoptosis and autophagy[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7: 1561-1566.

[本文编辑] 尹 茶

· 更正启事 ·

关于《RNA 干扰靶向抑制 PI3K p85 $\alpha$  蛋白对大肠癌细胞侵袭与转移的影响》的更正启事

本人在《第二军医大学学报》2009 年第 30 卷第 5 期(第 496~499 页)发表了一篇题为《RNA 干扰靶向抑制 PI3K p85 $\alpha$  蛋白对大肠癌细胞侵袭与转移的影响》的文章,图 2 为“PI3K p85 $\alpha$  蛋白表达降低对细胞划痕愈合能力的影响”,因其中线条图纵坐标的标目为“Mean cure rate(%)”,故该线条图的纵坐标标值“0, 2, 0. 4, 0. 6, 0. 8, 1. 0, 1. 2”应为“20, 40, 60, 80, 100, 120”。

因本人的粗心大意导致文中插图的差错,给读者阅读带来了不便,在此谨向广大读者致歉,在今后的学习和工作中我会进一步严格要求自己,避免类似问题的发生。

孙 嫣

2009-06-05