

外源性 bFGF 抑制辐射诱导的 C17.2 神经干细胞凋亡的实验研究

周海红 刘运林 肖颂华 刘军 吕瑞妍 赵斌

【摘要】 目的 观察外源性碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对辐射诱导的 C17.2 神经干细胞(NSCs)凋亡的影响,探讨细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)在 bFGF 对辐射诱导的 C17.2 NSCs 凋亡的抑制效应中的作用。**方法** 以直线加速器照射 C17.2 NSCs 建立离体放射性损伤模型,MTT 法检测细胞活性,流式细胞仪检测不同浓度的外源性 bFGF 和 U0126 对细胞凋亡的影响。**结果** 外源性 bFGF 浓度为 0~100 ng/mL 时,细胞凋亡率可由(12.78±1.04)%降低至(4.83±0.31)%,组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$);加入 U0126 后细胞凋亡率为 (8.42±0.71)%,DMSO 对照组为 (4.71±0.42)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 外源性 bFGF 对辐射引起的 C17.2 NSCs 凋亡具有抑制作用,ERK1/2 参与该效应。

【关键词】 碱性成纤维细胞生长因子; 细胞外信号调节激酶 1/2; 细胞凋亡; 神经干细胞

【中图分类号】 R329.28 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)05-0464-04

Extracellular signal-regulated kinases1/2 is involved in the inhibition of radiation-induced apoptosis of C17.2 neural stem cells by exogenous basic fibroblast growth factor ZHOU Hai-hong*, LIU Yun-lin, XIAO Song-hua, LIU Jun, LU Rui-yan, ZHAO Bin*. *Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of exogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) on radiation-induced apoptosis of C17.2 neural stem cells (NSCs) and explore the role of ERK1/2 in this process. **Methods** C17.2 NSCs were subjected to irradiation exposure generated by a linear accelerator followed by treatment with different concentrations of bFGF 5 min after the exposure. The cell viability after the treatments was assessed using MTT assay, and the effects of exogenous bFGF and U0126 on radiation-induced apoptosis of the cells were analyzed with flow cytometry. **Results** The apoptotic rate of the irradiated cells decreased from (12.78±1.04)% to (4.83±0.31)% as the concentration of bFGF increased from 0 to 100 ng/mL. The apoptotic rates of the cells after treatment with U0126 and DMSO were (8.42±0.71)% and (4.71±0.42)%, respectively, showing a significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Exogenous bFGF offers protection of C17.2 NSCs against radiation-induced apoptosis, and extracellular signal-regulated kinases1/2 (ERK1/2) plays a role in this protective effect.

【Key words】 Basic fibroblast growth factor; Extracellular signal-regulated kinases1/2; Apoptosis; Neural stem cells

放射性脑损伤(brain radiation injuries, RIB)是颅面颈部肿瘤放射治疗后的常见并发症,目前临床仍缺乏有效的治疗手段。新近研究表明,辐射损伤神经前体细胞后继发的脑内修复功能障碍是 RIB 发生的重要原因之一^[1],然而目前有关离体的神经干

细胞(neural stem cells, NSCs)放射性损伤的研究尚鲜见报道。已有实验证实碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)对放射性损伤具有保护作用^[2,3],但其机理目前尚不清楚。深入研究 bFGF 对放射线诱导的 NSCs 凋亡的调控作用及其机制,对 RIB 的机制及治疗研究具有重要意义。本研究拟利用国际上公认的 C17.2 NSCs 建立离体放射性损伤模型,探讨外源性 bFGF 对辐射诱导的 C17.2 NSCs 凋亡的抑制作用及细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinases1/2, ERK1/2)在其中的作用。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.05.008

基金项目:国家自然科学基金(30870750);广东省医学科研基金(B2008044)

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院神经内科(周海红,赵斌);271000 山东省泰安市中心医院神经内科(刘运林);510120 广州,中山大学附属第二医院神经内科(肖颂华、刘军、吕瑞妍)

材料与方法

一、细胞来源

C17.2 NSCs 由哈佛医学院 Synder 教授惠赠, 本实验室保存。

二、试剂

DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司), 马血清(美国 Hyclone 公司), 胰蛋白酶(美国 Amresco 公司), DMSO (美国 Sigma 公司), 流式凋亡试剂盒(美国 BD PharMinger Biosciences 公司), MTT (美国 MBCHEM 公司), bFGF、抗 nestin 多克隆抗体、U0126、SABC 免疫细胞化学染色试剂盒(美国 Promega 公司)。

三、C17.2 NSCs 的培养及鉴定

C17.2 NSCs 培养选用 DMEM/F12 培养液, 加入 10%胎牛血清和 5%马血清, 置于 CO₂ 培养箱(37℃, 5%CO₂)中常规培养, 细胞贴壁生长, 按 1:3 或 1:4 传代。免疫细胞化学染色方法(SABC 法)检测 NSCs 中 nestin 表达。

四、MTT 法检测对 bFGF C17.2 NSCs 活性的影响

分 4 组进行实验, A 组为 0 ng/mL bFGF 组; B 组为 25 ng/mL bFGF 组; C 组为 50 ng/mL bFGF 组; D 组为 100 ng/mL bFGF 组。bFGF 浓度设计参考相关文献 [4]。以 1×10⁴ 个/mL 密度接种 C17.2 NSCs 悬液至 96 孔板, 每孔加细胞悬液 200 μL, 按上述 4 组设计浓度分别加入 bFGF 后, 每组设 8 个复孔, 常规培养 1~2 d; 每孔加 MTT 20 μL, 继续孵育 4 h; 弃去培养液, 每孔加 DMSO 各 150 μL, 振荡 10 min, 充分溶解结晶物, 用酶标仪测波长为 492 nm 时的各孔吸光度值(A 值)并进行统计分析。

五、流式细胞术检测 bFGF 对辐射诱导的 C17.2 NSCs 凋亡的抑制作用

按照上述分组, 细胞悬液接种在可拆卸 6 孔培养板中培养 24 h 后, 以直线加速器进行总量为 8 Gy 外照射, 剂量率为 300 cGy/min。放射后 5 min 各组按设计浓度加入 bFGF, 继续培养, 倒置显微镜观察形态, 24 h 后胰酶消化, 按流式凋亡试剂盒说明, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 每次计数 10⁵ 个细胞计算细胞凋亡率。

六、阻滞 ERK1/2 通路对 C17.2 NSCs 的影响

bFGF 浓度根据前步实验结果选择 100 ng/mL 加入培养基。分 2 组进行实验: U0126 组为 NSCs+bFGF+U0126 (U0126 为 ERK1/2 信号通路的

特异性阻断剂), DMSO 组为 NSCs+bFGF+DMSO (以 DMSO 为溶剂, 浓度 10 μmol/L)。细胞悬液接种于 6 孔板培养 24 h 后, 两组分别按设计加溶于 DMSO 的 U0126 和相应等量 DMSO 培养基, 1 h 后按照方法五中步骤进行照射, 照射后 5 min 加入 100 ng/mL 的 bFGF, 培养 24 h, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

七、统计学方法

结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS12.0 软件包进行处理, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 检验, 两组比较采用 *t* 检验, *P*≤0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、C17.2 NSCs 的培养及鉴定

C17.2 NSCs 接种后 3~5 d 即能长满培养瓶。细胞形态不规则, 多呈三角形或多角形, 核大且圆, 细胞边界不清, 与邻近细胞相互接触, 交织成网状(图 1); nestin 免疫细胞化学染色示约 95% NSCs 呈 nestin 抗原阳性, 连续传 7 代后仍有 90% 的细胞呈 nestin 阳性(图 2)。

二、MTT 法检测细胞活性

MTT 比色法结果显示, 随 bFGF 浓度升高, C17.2 NSCs 增殖比明显增加, 各组之间两两比较差异均有统计学意义(*P* 均 <0.05)(表 1)。

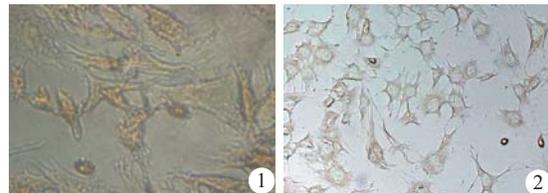


图 1 镜下 C17.2 NSCs(x200) 图 2 C17.2 NSCs nestin 染色(免疫细胞化学染色, x100)

Fig.1 Morphology of C17.2 NSCs under optical microscope (x200)

Fig.2 Nestin staining of C17.2 NSCs(immunocytochemical staining, x100)

表 1 bFGF 对 C17.2 NSCs 增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of bFGF on the proliferation of C17.2 NSCs (Mean±SD)

组别	样本数	A 值	增殖比(%)
A组	8	0.718±0.006	100
B组	8	0.804±0.019 ^a	112
C组	8	1.063±0.056 ^{ab}	148
D组	8	1.372±0.071 ^{abc}	191
F值		323.250	
P值		0.000	

与 A 组比较, ^a*P*<0.05; 与 B 组比较, ^b*P*<0.05; 与 C 组比较, ^c*P*<0.05

三、bFGF 抑制辐射诱导的 C17.2 NSCs 凋亡

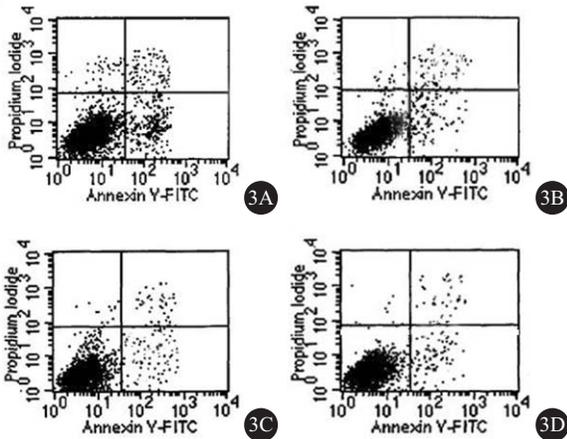
放射后 4~6 h 即可观察到各组细胞开始出现不同程度的胞体粗糙,透明度下降,说明开始凋亡。流式细胞仪检测 (PI 及 FITC-AnnexinV 标记) 结果显示:各组凋亡率表现出 A 组 <B 组 <C 组 <D 组的规律,且各组间比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05) (表 2,图 3)。

表 2 bFGF 抑制辐射诱导 C17.2 NSCs 凋亡($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab.2 Effect of bFGF on radiation-induced apoptosis of C17.2 NSCs (Mean±SD, %)

组别	样本数	凋亡率(%)
A组	8	12.78±1.04
B组	8	11.25±0.89 ^a
C组	8	5.12±0.56 ^{ab}
D组	8	4.83±0.31 ^{abc}
F值		237.190
P值		0.000

与 A 组比较, ^a P <0.05; 与 B 组比较, ^b P <0.05; 与 C 组比较, ^c P <0.05



3A:A 组;3B:B 组;3C:C 组;3D:D 组

图 3 流式细胞仪检测 bFGF 抑制辐射诱导 C17.2 NSCs 凋亡

Fig.3 Effect of bFGF on radiation-induced apoptosis of C17.2 NSCs analyzed by flow cytometry

四、阻滞 ERK1/2 通路后 bFGF 对辐射诱导后 C17.2 NSCs 的影响

流式细胞仪检测(PI 及 FITC-AnnexinV 标记)结果显示,加入 ERK1/2 通路的特异性阻断剂 U0126 (10 μmol/L) 后,细胞的凋亡率明显较 DMSO 组增高,差异有统计学意义(P <0.05)。(表 3,图 4)

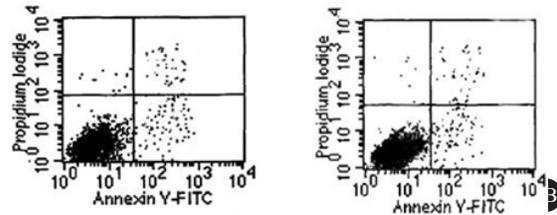
讨 论

bFGF 作为一种潜在的、未完全证实的神经营养因子,其生物学效应在神经系统主要表现为对神经元和神经胶质具有很强的促增殖活性^[5]。1997 年

表 3 阻滞 ERK1/2 通路后 bFGF 对辐射诱导后 C17.2 NSCs 的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab.3 Effect of bFGF on radiation-induced apoptosis of C17.2 NSCs treated with U0126 (Mean±SD, %)

组别	样本数	凋亡率(%)
U0126组	8	8.42±0.71
DMSO组	8	4.71±0.42
t值		12.721
P值		0.000



4A:U0126 组;4B:DMSO 组

图 4 流式细胞仪检测阻滞 ERK1/2 通路后 bFGF 抑制辐射诱导 C17.2 NSCs 凋亡

Fig.4 Flow cytometric analysis of the effect of bFGF on radiation-induced apoptosis of C17.2 NSCs treated with U0126

有研究者证实,bFGF 对 X 线诱导的星形胶质细胞损伤具有保护作用^[6]。2002 年 Nieder 等^[2]报道了 bFGF 对放射性脊髓损伤具有保护作用,国内亦有报道应用中成药诱导 bFGF 及其受体表达上调从而促进放射性脊髓损伤的修复^[7]。

本课题组已成功构建 pcDNA3.1(+)-bFGF 真核表达质粒和 RIB 动物模型,并证实转染 bFGF 后同样放射剂量下 C17.2 NSCs 凋亡率和坏死率均比未转染者低,并据此拟合出 C17.2 NSCs 放射后生存曲线^[8]。为深入研究 bFGF 对 NSCs 放射性损伤的保护作用机制,本研究采用更为简单的实验方法,即将 bFGF 加入辐射诱导后的 C17.2 NSCs 培养基中,此方法也更接近 bFGF 临床应用;以 MTT 法检测细胞活性结果显示,随 bFGF 浓度升高,C17.2 NSCs 增殖比明显增加,呈现剂量—效应关系,未显示细胞毒性,证实此法简单可靠;流式细胞仪检测结果显示,放射后 4~6 h 即可观察到各组细胞开始出现不同程度的胞体粗糙,透明度下降,说明开始凋亡;随着 bFGF 浓度增加细胞凋亡率明显降低,具有剂量—效应关系,与本课题组的前期研究结果一致。bFGF 浓度为 50 ng/mL 时已基本可以逆转辐射诱导的凋亡,浓度为 100 ng/mL 时对辐射诱导的 C17.2 NSCs 凋亡的抑制作用最为明显。

目前关于 bFGF 的信号转导途径的作用机制已研究得比较清楚,它们也是多种生长因子的共用信

号途径。但 bFGF 的效应细胞繁多,在不同类型的靶细胞中,其信号转导途径的诱导激活情况可能存在差异,最终也可能介导产生不同的生物学效应^[9]。本实验中,加入 ERK1/2 通路的特异性阻断剂 U0126 后,C17.2 NSCs 的凋亡率明显较 DMSO 组高,说明 ERK1/2 参与 bFGF 的抗凋亡作用,与 Gu 等^[10]在血管内皮细胞中进行的研究结果相似。

目前 ERK1/2 信号通路在神经系统损伤中的作用存在不同的观点^[11]。损伤刺激的性质、程度和持续时间不同,所诱导的 ERK1/2 激活的特点及发挥的作用也不同。尽管我们在离体实验中观察到 ERK1/2 参与外源性 bFGF 对抗辐射效应,但机体的 RIB 病理生理机制复杂,干扰因素多样,除 ERK1/2 之外尚可能存在其他信号通路的参与,值得进一步深入探讨。

参 考 文 献

[1] Michelin S, Maria P, Diana D, et al. Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain [J]. Neurotoxicology, 2004, 25(3): 387-398.

[2] Nieder C, Price RE, Rivera B, et al. Experimental data for administration of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) for prevention of radiation myelopathy[J]. Strahlenther Onkol, 2002, 178(3): 147-152.

[3] Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency [J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 321-327.

[4] Grothe C, Ninkkrah G. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration[J]. Anat Embryol (Berl), 2001, 204 (3): 171-177.

[5] Rieck P, Oliver L, Engelmann K, et al. The role of exogenous/endogenous basic fibroblast growth factor (FGF2) and transforming growth factor beta (TGF beta-1) on human corneal endothelial cells proliferation in vitro[J]. Exp Cell Res, 1995, 220 (1): 36-46.

[6] Noel F, Ijichi A, Chen JJ, et al. X-ray-mediated reduction in basic fibroblast growth factor expression in primary rat astrocyte cultures [J]. Radiat Res, 1997, 147(4): 484-489.

[7] 吴宁, 孙汉英, 刘文励, 等. 川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓碱性成纤维细胞生长因子及其受体表达水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(5): 439-441.

[8] 秦丽晨, 肖颂华, 周海红, 等. bFGF 基因转染对放射诱导的 C17.2 神经干细胞凋亡的抑制作用[J]. 中华神经医学杂志, 2008, 7 (2): 122-124.

[9] Lundin L, Ronnstrand L, Cross M, et al. Differential tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 and receptor proximal signal transduction in response to FGF-2 and heparin[J]. Exp Cell Res, 2003, 287(1): 190-198.

[10] Gu Q, Wang D, Wang X, et al. Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. II. The RAS/MAPK pathway and phosphorylation of BAD at serine 112[J]. Radiat Res, 2004, 161(6): 703-711.

[11] Angeliq W, Melanie HC, Michael AW. Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(23): 10145-10150.

(收稿日期:2008-12-24)

(本文编辑:卢丽玉)



· 广告目次 ·

疏血通注射液(牡丹江友搏药业有限责任公司)	封二
易达生(易达拉奉注射液)(吉林省博大制药有限责任公司)	前插页 1 正面
德巴金(杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司)	前插页 1 背面
天晴甘安(甘油果糖注射液)(南京正大天晴制药有限公司)	前插页 2 正面
养血清脑颗粒(天津天士力药业股份有限公司)	前插页 2 背面
入编《中文核心期刊要目总览》彩页	对中文目录 2
尼膜同(尼莫地平注射液)(拜耳医药保健公司)	对英文目录 1
美敦力(中国)有限公司	对英文目录 2
脑心通(西安步长制药公司)	对正文
脑震宁颗粒(山西安特生物制药有限公司)	封三
西比灵(西安杨森制药有限公司)	封底