

[文章编号] 1000-4718(2008)01-0128-04

川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓中 LFA-1、ICAM-1 表达影响的研究*

吴宁¹, 胡德蓉¹, 齐洁琳¹, 周登锋¹, 步兵¹, 张锡芹¹, 孙汉英^{2△}

(¹山东省肿瘤防治研究院内一科, 山东 济南 250117;

²华中科技大学同济医学院附属同济医院血液科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨川芎嗪对急性放射损伤小鼠骨髓中 LFA-1、ICAM-1 表达水平的影响及其促进骨髓造血重建的机制。方法: 正常 24 只清洁级昆明小鼠随机分为 3 组: 正常组、生理盐水组和川芎嗪组。正常组未作任何处理, 将生理盐水组和川芎嗪组小鼠用 6.0 Gy [⁶⁰Co]γ 射线 1 次性全身均匀照射, 吸收剂量率为 0.56 Gy/min。照射后即分别喂饲相同剂量的生理盐水(0.2 mL/只, 每天 2 次)和川芎嗪(2 mg/只, 每天 2 次), 直至处死为止。在照射后第 7、14、21 d 处死小鼠, 制备骨髓细胞悬液, 培养基质细胞, 用 RT-PCR、Western blotting 方法检测骨髓基质细胞 ICAM-1 mRNA 及其蛋白表达水平, 用流式细胞仪检测骨髓单个核细胞表面 LFA-1 表达水平。结果: 6.0 Gy [⁶⁰Co]γ 射线照射后, 川芎嗪组骨髓单个核细胞表面 LFA-1 表达水平均显著高于生理盐水组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 骨髓基质细胞 ICAM-1 mRNA 及其蛋白表达水平均明显低于生理盐水组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 川芎嗪加快辐射后骨髓单个核细胞表面 LFA-1 的表达, 降低骨髓基质细胞 ICAM-1 的表达, 从而改善骨髓微环境, 促进造血重建。

[关键词] 川芎嗪; 辐射损伤; 淋巴细胞功能相关抗原 1; 胞间黏附分子 1; 骨髓

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effect of ligustrazine on expression of LFA-1 and ICAM-1 in bone marrow of radiation injured mice

WU Ning¹, HU De-rong¹, QI Jie-lin¹, ZHOU Deng-feng¹, BU Bing¹, ZHANG Xi-qin¹, SUN Han-ying²

(¹Department of Radiation Oncology, Shandong Tumor Hospital and Institute, Jinan 250117, China; ²Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. Hanying sun@hotmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of ligustrazine on the expression of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bone marrow and on the mechanism of hematopoietic reconstitution in radiation injured mice. **METHODS:** The 24 mice (clean class) were randomly divided into 3 groups: normal group, radiation injured group and ligustrazine group. After irradiation by 6.0Gy [⁶⁰Co] γ-ray, the radiation injured animals were given normal saline (0.2 mL, twice a day) through gastric tube, while the ligustrazine group was given ligustrazine through gastric tube (0.2 mL, twice a day). The mice in normal group received no treatment. At the 7 th, 14th, 21 st day after irradiation, the femur were taken and the bone marrow mononuclear cells (BMNCs) suspension were made to culture bone marrow stromal cells (BMSCs). The mRNA and protein expressions of ICAM in BMSCs were assayed by RT-PCR and Western blotting. The expression levels of LFA-1 in BMNCs were evaluated by flow cytometry analysis. **RESULTS:** In ligustrazine group the expression levels of LFA-1 at the 7 th, 14 th and 21 st days after irradiation were higher than those in radiation injured group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). However, the expression level of ICAM-1 was lower

[收稿日期] 2006-04-27 [修回日期] 2006-10-16

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870926)

△通讯作者 Tel:027-83662829; E-mail: Hanying sun@hotmail.com

than that in the compared group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Ligustrazine can increase the LFA-1 expression level of BMNCs, decrease the ICAM-1 expression level in BMSCs, indicating that ligustrazine promotes the recovery of hematopoietic cells in bone marrow, then improves the bone marrow microenvironment and enhances hematopoietic reconstitution.

[**KEY WORDS**] Ligustrazine; Radiation injuries; Lymphocyte function-associated antigen-1; Intercellular adhesion molecule-1; Bone marrow

周银励等^[1]研究表明,活血化瘀中药川芎嗪可以改善骨髓微环境,提高基质细胞黏附功能,促进HS/PC增生。因此,我们通过监测急性放射损伤小鼠骨髓造血组织中黏附分子淋巴细胞功能相关抗原-1(lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达水平,探讨LFA-1、ICAM-1在骨髓微循环修复过程中的作用及川芎嗪在此过程中对骨髓造血细胞中LFA-1、ICAM-1表达水平的影响,以进一步阐明川芎嗪促进急性放射损伤后骨髓造血重建的机制。

材 料 和 方 法

1 实验动物

清洁级昆明小鼠(H-2^d, MLS^b)8-10周龄,18-22g,雌雄兼用(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。每只于照射前3d到照射后14d以200U/d的剂量喂庆大霉素水清洁肠道。

2 药物

盐酸川芎嗪注射液20g/L(无锡市第七制药厂,批号030822)。

3 试剂和仪器

大鼠抗小鼠LFA-1 IgG单抗及FITC-兔抗大鼠IgG抗体(BD)。兔抗小鼠ICAM-1 IgG多抗(Santa Cruz)。NBT/BCIP染色试剂盒(武汉中健公司),PCR引物(上海生物工程公司合成);Trizol、PCR kit、DL2000 marker(TaKaRa);DEPC、RNaseA、PI(Promega),流式细胞仪(BD)。

4 分组及处理

昆明小鼠24只,随机分为3组。正常组8只,未作任何处理;生理盐水对照组及川芎嗪组各8只,总剂量为6.0Gy [⁶⁰Co]γ射线全身均匀照射,剂量率为0.56 Gy/min;照射后,川芎嗪组每只小鼠立即喂饲盐酸川芎嗪2mg,每天2次;生理盐水组每只小鼠同时喂饲生理盐水0.2mL,每天2次。以上2组均用

药至处死为止。

5 骨髓单个核细胞计数(BMNCs)

于照射后7、14、21d颈椎脱臼法处死小鼠,称重,浸入75%乙醇中3min,之后取双侧股骨,用RPMI-1640从骨髓腔冲洗出单个核细胞,按白细胞计数方法,计数单个核细胞。

6 骨髓单个核细胞表面LFA-1的表达水平

将上述各组分离的BMNCs悬液,计数并取出 5×10^5 个细胞,按常规方法制备流式细胞样品,标记抗即大鼠抗小鼠LFA-1 IgG单抗,4℃孵育30min后离心弃上清,经冷PBS洗2次后,加入FITC-兔抗大鼠IgG单抗(1:250稀释度),4℃避光孵育30min后离心弃上清,经冷PBS洗2次后,加入500μL 1%多聚甲醛固定,4℃避光静置固定,6h内上样。

7 骨髓基质细胞培养

分别于照射后7、14、21d处死小鼠,参照Dexter等^[2]方法进行骨髓基质细胞培养。

8 Western blotting分析骨髓基质细胞ICAM-1蛋白表达

分离、收集BMNCs后,加入5倍体积的细胞裂解液并混匀,冰上裂解20min,离心吸上清即为细胞总蛋白。蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳和转移按说明书进行。兔抗小鼠ICAM-1 IgG多抗(1:500稀释)4℃孵育过夜,辣根酶标记山羊抗兔IgG单抗(1:4000稀释II抗),37℃孵育1h,PBS洗膜,NBT/BCIP显色。对Western blotting的特异性条带进行灰度扫描,以积分吸光度×面积(mm²)表示条带的信号强弱,以此对目的蛋白表达水平进行半定量比较。数据以各组条带积分吸光度×面积/未处理组条带积分吸光度×面积表示。

9 RT-PCR方法检测骨髓基质细胞ICAM-1 mRNA水平的表达

采用GeneFisher 1.3软件设计引物序列,ICAM-1:上游引物5'-CTGGTGACATGCAGGCACCTCC-3';下游引物5'-CTCCCGTTTCAGCTCCTTCTCC

- 3'。β - actin: 上游引物 5' - GGACCTCT-GAGAGCTTCACGCCAGTGA - 3'; 下游引物 5' - GCCAGAGAATGTTGCTGAGGAGGTGGG - 3'。按 Trizol 试剂盒说明提取骨髓基质细胞总 RNA 并测定纯度。预变性 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 72 °C 30 s。ICAM - 1 55 °C 30 s, 共 30 个循环, 循环后延伸 72 °C 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像分析系统对 DNA 条带扫描, 以目的基因扫描密度值/β - actin 基因扫描密度值的百分数(%) 作为目的基因 mRNA 的相对表达量。ICAM - 1 扩增产物大小为 348 bp, β - actin 为 283 bp。

10 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SAS10.0 统计软件进行方差分析。

结 果

1 骨髓单个核细胞表面 LFA - 1 表达水平分析

流式细胞仪检测到正常组有 LFA - 1 表达, 照射后第 14、21 d 川芎嗪组和生理盐水组骨髓单个核细胞表面 LFA - 1 的荧光强度高于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且川芎嗪组在照射后不同时点 LFA - 1 的表达均明显高于生理盐水组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见图 1。

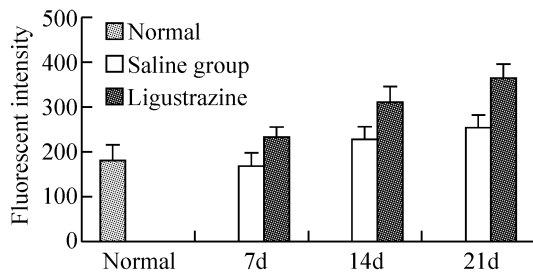


Fig 1 Expression of LFA - 1 in BMNCs in mice.

图 1 骨髓单个核细胞表面 LFA - 1 表达

2 骨髓基质细胞 ICAM - 1 蛋白表达水平分析

在照射后第 7、14、21 d 川芎嗪组骨髓基质细胞 ICAM - 1 蛋白的表达均显著低于生理盐水组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 2 组在第 7、14 d ICAM - 1 蛋白的表达均高于正常组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 至第 21 d, 川芎嗪组 ICAM - 1 蛋白的表达已接近正常组 ($P > 0.05$), 而生理盐水组仍未恢复正常, 见图 2。

3 骨髓基质细胞 ICAM - 1 mRNA 表达水平分析

分别于照射后第 7、14、21 d 取 BMNCs 培养骨髓基质细胞, 待其长满培养孔底时提取 RNA 进行 RT

- PCR 分析, 图 3 为 RT - PCR 产物电泳结果 (扩增产物为 348 bp 小鼠 bFGF 特异条带, 内参大小为 283 bp)。在照射后第 7、14、21 d 川芎嗪组 ICAM - 1 mRNA 的表达均显著低于生理盐水组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 2 组在第 7、14 d ICAM - 1 mRNA 的表达均高于正常组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 至第 21 d, 川芎嗪组 ICAM - 1 mRNA 的表达已基本接近正常组 ($P > 0.05$), 而生理盐水组仍未恢复正常。



Lane 1: normal; Lane 2, 4, 6: normal saline group (day7, 14, 21); Lane 3, 5, 7: ligustrazine group (day7, 14, 21).

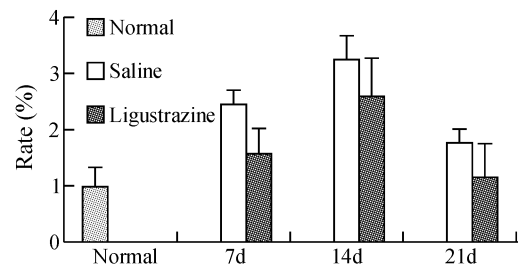
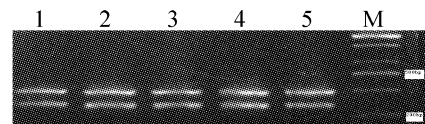
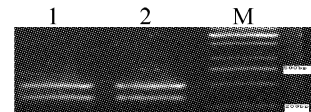


Fig 2 Expression of ICAM - 1 of BMSCs in mice.

图 2 骨髓基质细胞 ICAM - 1 蛋白表达



Lane 1: normal; Lane 2, 4: normal saline group (day7, 14); Lane 3, 5: ligustrazine group (day7, 14); M: marker (DL1500).



Lane 1: normal saline group (day21). Lane 2: ligustrazine group (day21). M: Marker (DL1500).

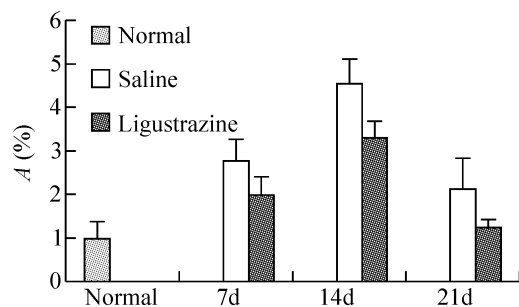


Fig 3 Expression of ICAM - 1 mRNA of BMSCs in mice.

图 3 骨髓基质细胞 ICAM - 1 mRNA 表达

讨 论

骨髓是机体的主要造血器官。造血细胞和支持造血细胞生长和发育的骨髓微环境是构成骨髓的2大基本成分。高度增生和快速更新的造血细胞的生长发育依赖骨髓微环境的结构和功能的完整性。 γ 射线在杀伤骨髓造血细胞的同时,也损伤骨髓造血微环境,但发病机制尚不清楚^[3]。黏附分子是骨髓微环境的重要组成部分。骨髓基质细胞和造血细胞表面均表达多种黏附分子。

LFA-1是介导造血细胞与骨髓基质细胞黏附的重要黏附分子,参与造血细胞的生成、增殖和分化功能,在干细胞归巢时促使造血干细胞与骨髓基质的牢固黏附中起重要作用^[4]。正常情况下CD34⁺细胞表达一定量的LFA-1,而外周血干细胞归巢时CD34⁺细胞高表达LFA-1。

ICAM-1属于免疫球蛋白超家族。一方面,它作为LFA-1的配体在HS/PC回巢早期起着重要作用。另一方面,ICAM-1也是骨髓血管内皮细胞辐射诱导损伤的关键反应因子。

作为活血化瘀中药,川芎嗪可以抑制血小板的聚集,延长血栓形成时间。对放射损伤再生障碍性贫血小鼠,促进造血干、祖细胞增生,增加CD34抗原分子的表达^[1],在实验中,我们观察到急性放射损伤后第7d川芎嗪组和生理盐水组小鼠骨髓基质细胞中ICAM-1mRNA及其蛋白的表达趋势与文献报道^[5]相似,而在第14d、21d2组ICAM-1mRNA及其蛋白的表达量逐渐降低。我们推测这是骨髓微血管内皮细胞对辐射诱导损伤的一种代偿机制。在6.0Gy的⁶⁰Co γ 射线照射后,骨髓微血管受到辐射损伤,其内皮细胞表达和分泌的ICMA-1反应性增加。随着微血管的恢复,ICAM-1也随之反应性减少。与此同时,我们还观察到川芎嗪组ICAM-1mRNA及其蛋白的表达在各时段均低于同一时点生理盐水组,并且至第21d川芎嗪组ICAM-1mRNA及其蛋白的表达已基本恢复正常。这提示

川芎嗪可加速BMT后小鼠骨髓微血管的恢复,从而改善骨髓微环境促进造血。本研究还观察到急性放射损伤早期小鼠骨髓单个核细胞表面LFA-1表达水平显著增高,推断可能为受照射后骨髓内残存的、具有造血功能的造血细胞在内稳态被破坏后,迅速增强其黏附分子的表达,进而增加造血细胞增殖、分化能力,加速造血功能的恢复。急性放射损伤后第7、14、21d川芎嗪组小鼠骨髓单个核细胞LFA-1表达水平显著高于生理盐水组,提示照射后川芎嗪组造血祖细胞比生理盐水组恢复快,表明川芎嗪可能通过增强急性放射损伤小鼠骨髓造血祖细胞LFA-1的表达,加强造血细胞与基质细胞的黏附,从而有利于造血细胞的增殖和分化。骨髓造血细胞LFA-1、ICAM-1的表达变化可能在急性放射损伤后造血细胞的生成和调控、增殖和分化中起重要作用,且川芎嗪促进急性放射损伤后小鼠骨髓造血功能恢复的机制之一可能是通过增强骨髓造血细胞LFA-1、ICAM-1的表达水平来实现的。

[参 考 文 献]

- [1] 周银莉,刘文励,孙汉英,等. 川芎嗪对骨髓移植小鼠早期造血重建作用的研究[J]. 中华血液学杂志, 2002,23(4):207-208.
- [2] Dexter TM, Moore MAS, Sheridan APC. Maintenance of hematopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras *in vitro*[J]. J Exp Med, 1997, 145: 1612-1616.
- [3] 孟庆勇,刘志辉,徐美奕,等. 半叶尾藻多糖对⁶⁰Co γ 射线损伤小鼠骨髓细胞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006,22(9):1850-1851,1870.
- [4] 付丽,刘文励,孙汉英,等. 川芎嗪对骨髓移植后LFA-1和ICAM表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2004,12(2):174-178.
- [5] Yong K, Fahey A, Reeve L, et al. Cord blood progenitor cells have greater transendothelial migratory activity and increased responses to SDF-1 and MIP-3 beta compared with mobilized adult progenitor cells[J]. Br J Haematol, 1999, 107(2):441-449.