

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1850-03

半叶马尾藻多糖对 $[^{60}\text{Co}]\gamma$ 射线损伤小鼠骨髓细胞的影响*

孟庆勇¹, 刘志辉¹, 徐美奕¹, 郑辉²¹ 广东医学院分析中心同位素室, 广东 湛江 524023; ² 暨南大学医学院生理教研室, 广东 广州 510632

[摘要] 目的: 探讨半叶马尾藻多糖(SHP)拮抗辐射损伤小鼠造血系统的机制。方法: 流式细胞术检测小鼠骨髓细胞周期和 Western blotting 测定细胞周期相关蛋白质 CDK₄ 的表达。结果: $[^{60}\text{Co}]\gamma$ 射线(5 Gy)导致小鼠骨髓细胞 G₀/G₁ 期阻滞, 而 S 期和 G₂/M 期细胞百分率下降。SHP(10-40 mg/kg)可以减轻小鼠骨髓细胞 G₀/G₁ 期阻滞, 增加 S 期和 G₂/M 期细胞百分率, 表现为 SHP 加照射组小鼠 G₀/G₁ 期骨髓细胞百分率明显低于单纯照射组, S 期和 G₂/M 期骨髓细胞百分率显著高于单纯照射组。小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白质表达照射组明显低于正常对照组, SHP 加照射组小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白质表达显著高于单纯照射组。结论: SHP 拮抗 $[^{60}\text{Co}]\gamma$ 射线损伤小鼠骨髓细胞的机制与其调节骨髓细胞周期和增加 CDK₄ 蛋白质表达密切相关。

[关键词] 半叶马尾藻多糖; 骨髓细胞; 细胞周期; 蛋白质 CDK₄; 辐射损伤

[KEY WORDS] Sargassum hemiphyllum polysaccharides; Bone marrow cells; Cell cycle; Protein CDK₄; Radiation injuries

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

海藻多糖是从海藻中提取的植物多糖, 有广泛的药理作用。不仅可以抗肿瘤、抗病毒和调节免疫功能, 而且能够抗辐射和促进辐射损伤机体造血功能的恢复。125 mg/kg 螺旋藻多糖给小鼠腹腔注射 5 d, 结果发现给螺旋藻多糖的小鼠 CFU-S、CFU-GM 及骨髓有核细胞数均显著高于照射对照组, 说明海藻多糖对辐射损伤小鼠造血系统有保护和促进恢复的作用^[1]。为了探讨海藻多糖对辐射损伤机体造血系统的保护机制, 本实验采用广东湛江硇洲岛野生半叶马尾藻提取多糖, 观察半叶马尾藻多糖对小鼠骨髓细胞周期进程和 CDK₄ 蛋白质表达的影响。

材 料 和 方 法

1 实验动物

昆明小鼠, 雄性, 6-8 周龄, 体重(20±2)g, 由广东医学院实验动物中心提供。

2 半叶马尾藻多糖[Sargassum hemiphyllum (Turner) C. Ag. polysaccharides, SHP]来源

由本实验室提取, 使用前用生理盐水配制, 并经 0.45 μm 微孔滤膜除菌。

3 试剂

RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司), 碘化丙锭(propidium iodide, PI, 美国 Sigma 公司), 牛血清白蛋白、叠氮钠、Leupeptin 均为美国 Sigma 公司产品, 考马斯亮蓝 G-250(德国 Fluka 公司), 丙烯酰胺和四甲基乙二胺(tetramethyl ethylenediamine, TEMED)为美国 Promega 公司生产, 过硫酸铵、甘氨酸、丽春红 S、aprotinin 和苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfo-

nyl fluoride, PMSF)均为美国 Amresco 公司产品, NP-40(德国 Fluka 公司), 十二烷基硫酸钠(美国 Biomol 公司), CDK₄ 兔 IgG 多抗(美国 Santa Cruz 公司)等。

4 仪器

Epics-XL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司), 3000 型电泳仪、SW-CJ-1D 型净化工作台(苏州净化设备厂), CK2 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), TC2323 型 CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司), 1.0R 型高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司), AEG-220 型电子天平(日本 Shimadzu 公司), Theratron 780C 型 $[^{60}\text{Co}]$ 治疗机(加拿大 Theratronics 公司)等。

5 照射条件

$[^{60}\text{Co}]\gamma$ 射线一次性全身均匀照射, 照射距离为 80 cm, 剂量率为 0.673 Gy·min⁻¹, 吸收剂量为 5 Gy。

6 主要试剂组成

①蛋白质提取细胞裂解液: Tris-HCl(50 mmol/L), NaCl(150 mmol/L), NaN₃(0.02%), SDS(0.1%), PMSF(100 mg/L), aprotinin(2 mg/L), leupeptin(1 mg/L), NP-40(1%)。②电转移缓冲液: 甘氨酸(39 mmol/L), Tris(48 mmol/L), SDS(0.037%), 甲醇(20%)。③TBS: Tris-HCl(50 mmol/L), NaCl(150 mmol/L)等。

7 分组处理

按随机区组法将小鼠随机分为正常对照组(A组), 照射对照组(B组)和 3 个不同浓度 SHP 加照射组(C、D、E组), 每组 9 只。A 组和 B 组小鼠每天每只注射 0.5 mL 生理盐水, ip × 7 d; C、D、E 组分别注射 10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg 的 SHP, ip × 7 d; 除 A 组外, 其余各组第 8 d 均 1 次性给予

[收稿日期] 2004-10-29 [修回日期] 2005-04-12

* [基金项目] 广东省湛江市科技重点攻关项目资助(No. 9945)

[⁶⁰Co] γ 射线全身照射,照射后 24 h 断头处死小鼠取骨髓细胞。

8 骨髓细胞周期检测

参考文献^[2]。将 70% 冷乙醇固定的单个骨髓有核细胞以 1 000 r/min 离心 5 min,弃乙醇,用 PBS 洗细胞 2 次。用震荡器震散细胞,加入 1 mL PI 染液(50 mg/L),混匀,15 min 后上机测定。

9 Western blotting 检测细胞周期相关蛋白 CDK₄^[3]

9.1 样品制备 取冰冻标本,称取 50 mg,立即置入含有预冷的 0.1 mL 蛋白提取细胞裂解液的玻璃匀浆器中,在冰上使其充分匀浆。放置于冰上 60 min,10 000 r/min,4 °C 离心 10 min,收集上清。吸取 10 μL 上清液,用 CBB G-250 比色法测定蛋白浓度,余加入等体积 2 × SDS 胶 loading buffer, -20 °C 保存。

9.2 电泳 临加样前将样品煮沸 3 min,每孔加入 50 μg。恒压电泳 150 V,90 min 至溴酚蓝到达分离胶底部时,关掉电源,小心剥离凝胶。

9.3 转膜 按凝胶-NC 膜-滤纸的顺序,剪好 1 张 NC 膜和 6 张新华滤纸,用电转移缓冲液浸泡滤纸、凝胶、海绵 30 min。将电转移装置的黑色多孔塑料夹放在最底层,在依次放置海绵、3 层滤纸、凝胶、NC 膜、3 层滤纸、海绵、无色多孔塑料夹,赶走气泡,合拢夹子放入电转移槽中。按凝胶侧阴极,NC 膜侧阳极连接好电极,加上电转移缓冲液,于 4 °C 冰柜中进行电转移。恒流 300 mA,电转移约 2 h。

9.4 封闭及抗原抗体反应 取出转移好的 NC 膜,切一角做标记,放入 1 平皿中。用丽春红 S 染色液染色 5 min,观察电转移效果。蛋白带出现后用蒸馏水漂洗,换水数次,直至 NC 膜无色为止。用 Blotto 封闭 NC 膜上的非特异性免疫球蛋白结合位点,在平缓摇动的摇床上室温封闭 1 h。封闭结束后,将膜转移至可加热封接的塑料袋中,按 0.1 mL/cm² 的量加入 1:500 稀释的 CDK₄ 抗体,封口后,在平缓摇动的摇床上室温反应 2 h。剪开塑料袋,将 NC 膜放入平皿中,用 TBS 洗 3 × 5 min。洗涤后,将 NC 膜放入另一新的可加热封接的塑料袋中,按 0.1 mL/cm² 的量加入辣根过氧化物酶标记 II 抗(1:5 000),封口后,与平缓摇动的摇床上室温反应 45 min。取出 NC 膜,TBS 洗 3 × 5 min,再用 TBS 洗 1-5 min。

9.5 显色与图像分析 于暗室中,将 ECL 试剂的 A、B 液在一个 Eppendorf 管中等量混合,按 0.125 mL/cm² 的量加于 NC 膜上,室温反应 1-5 min(视情况而定)。取出 NC 膜,滤干,夹于暗盒中。剪取适当大小的 X 光片覆盖于膜上(两者间用透明胶纸隔开),曝光适当时间后,取出 X 光片。放入显影液中 3 min,自来水冲洗,再放入定影液中定影 2 min。取出 X 光片,自来水冲洗,凉干,再翻拍成照片永久保存。图像经扫描仪扫描后,用 BandsCan 4.3 图像分析软件进行吸光度积分值分析。每个图像均重复分析 3 次,取平均值。

10 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析。

结 果

1 SHP 对小鼠骨髓细胞周期进程的影响

单纯照射组小鼠 G₀/G₁ 期骨髓细胞明显多于正常对照组,S 期和 G₂/M 期脾细胞明显少于正常对照组($P < 0.01$);SHP(10-40 mg/kg)加照射组小鼠 G₀/G₁ 期骨髓细胞明显少于单纯照射组,S 期和 G₂/M 期脾细胞明显多于单纯照射组($P < 0.01$);SHP 的剂量越高,细胞周期的变化越明显(表 1)。

表 1 SHP 对辐射损伤小鼠骨髓细胞周期进程的影响

Tab 1 Effect of SHP on the bone marrow cells of irradiation damage induced by [⁶⁰Co] γ-ray in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	SHP (mg/kg)	Dose of irradiation (Gy)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
A	0	0	71.7 ± 1.5	21.6 ± 1.9	6.7 ± 0.9
B	0	5	92.9 ± 1.0 ^{##}	4.3 ± 0.5 ^{##}	2.8 ± 0.6 ^{##}
C	10	5	88.6 ± 1.3 ^{**}	6.3 ± 0.7 ^{**}	5.1 ± 0.9 ^{**}
D	20	5	83.9 ± 1.5 ^{**}	8.7 ± 0.9 ^{**}	7.4 ± 1.0 ^{**}
E	40	5	77.6 ± 2.4 ^{**}	12.4 ± 1.6 ^{**}	10.1 ± 2.3 ^{**}

^{##} $P < 0.01$ vs A group; ^{**} $P < 0.01$ vs B group. A: control; B: irradiation control.

2 SHP 对辐射损伤小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白表达的影响

图 1 Western blotting 显示辐射损伤小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白条带显著变细,SHP(10-40 mg/kg)加照射组小鼠 CDK₄ 蛋白条带逐渐变粗。

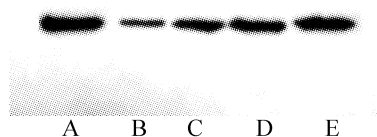


Fig 1 Effect of SHP on the expression of CDK₄ protein by Western blotting test in bone marrow cells of irradiated mice.

图 1 Western blotting 法检测 SHP 对辐射损伤小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白表达的影响

图像分析的结果与 Western blotting 条带粗细的结果一致(表 2)。

表 2 SHP 对辐射损伤小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白质表达的影响

Tab 2 Effect of SHP on the expression of CDK₄ protein in bone marrow cells of irradiated mice ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	SHP (mg/kg)	Dose of irradiation (Gy)	CDK ₄ (Value of gray)
A	0	0	227 181 ± 15 974
B	0	5	49 714 ± 5 743 ^{##}
C	10	5	91 465 ± 5 834 ^{**}
D	20	5	127 055 ± 7 355 ^{**}
E	40	5	168 266 ± 8 880 ^{**}

^{##} $P < 0.01$ vs A group; ^{**} $P < 0.01$ vs B group.

讨 论

抑制骨髓造血功能是放射治疗导致的严重并发症,如何
(下转第 1870 页)

讨 论

自 1972 年 Rubler 等^[1]首次提出糖尿病性心肌病后,逐渐引起了人们的广泛重视。然而,关于糖尿病性心肌病的确切发病机制尚未明了。此前所建立的动物模型多为 1 型糖尿病(1 次大剂量腹腔注射 STZ)所致的心肌病模型,此与临床上实际情况(2 型糖尿病比 1 型糖尿病更多见)不符。基于此,我们首先用高糖高脂饮食诱发动物胰岛素抵抗,然后,用小剂量 STZ 分次给实验动物腹腔注射,以期分次、少量、渐进破坏胰腺 β 细胞,这与临床上 2 型糖尿病发生发展经过更吻合^[2]。我们采用的 2 型糖尿病诊断标准为:在胰岛素抵抗基础上,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L^[3]。文献报道,STZ 诱导糖尿病大鼠心肌细胞超微结构的改变在 8 - 12 周^[4,5],心功能改变发生在 6 - 14 周^[6],这与我们的观察基本一致。2 型糖尿病心肌病评价主要通过心功能检测来完成,即等容舒张期左室内压力下降的最大速率($-dp/dt_{max}$) ≤ 5 250 mmHg,被认为糖尿病大鼠已发生心肌肥大,至此我们认为已初步建立了大鼠糖尿病心肌病模型,这说明糖尿病大鼠心肌病早期主要是心肌肥厚,仅存在舒张功能不全,这与人类 2 型糖尿病心肌病自然病程相吻合。实验组 1 和实验组 2 + dp/dt_{max} 与对照组相比没有显著差异。实验组 1 心脏重量、凋亡指数和 $-dp/dt_{max}$ 绝对值明显高于实验组 2,而死亡率却明显低于实验组 2,此说明实验组 1(高糖高脂饮食喂养 4 周造成胰岛素抵抗后,STZ 小剂量多次腹腔注射)与实验组 2(普通饲料喂养 4 周后,STZ 1 次大剂量腹腔注射)相比,第 1 组 STZ 注射 20 周后更能成功复制成 2 型糖尿病心肌病模型,STZ 小剂量多次

腹腔注射与 STZ 1 次大剂量腹腔注射相比(STZ 总量一样)更安全。大鼠 2 型糖尿病心肌病模型的成功建立,为进一步研究和防治人类自身 2 型糖尿病心肌病,提供研究手段和技术平台,具有重要的现实意义。

[参 考 文 献]

[1] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 1972, 30(6): 595 - 602.

[2] 郭啸华,刘志红,李恒,等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点[J]. *中国糖尿病杂志*, 2002, 10(5): 290 - 294.

[3] 于德民,吴锐,尹潍,等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 1995, 3(2): 105 - 109.

[4] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment [J]. *Am J Ana*, 1988, 182(3): 270 - 282.

[5] Fein FS, Komstein LB, Strobeck JE, et al. Altered myocardial mechanics in diabetic rats [J]. *Circ Res*, 1980, 47(6): 922 - 933.

[6] Tahilini AG, Vadlamudl RVS, McNell AJH. Prevention and reversal of altered myocardial function in diabetic rats by insulin treatment [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1983, 61(4): 516 - 523.

(上接第 1851 页)

减轻放疗过程中造血系统的损伤和促进造血功能的恢复是人们研究的重要课题。当归多糖有升高 5 Gy γ 射线损伤小鼠红细胞 C3b 受体花环率、外周血白细胞和血小板的作用,表现为当归多糖加照射组的小鼠红细胞 C3b 受体花环率、外周血白细胞和血小板显著高于照射对照组^[4]。不仅陆生植物多糖具有保护造血系统和抗辐射功能,从海洋植物海藻中提取的多糖也有类似的作用。小鼠在接受 2 Gy γ 射线照射前给予 20 - 40 mg/kg 的海藻多糖,结果发现小鼠骨髓有核细胞总数、DNA 含量明显高于照射对照组,嗜多色性红细胞微核率显著低于照射对照组,显示海藻多糖对小鼠骨髓造血系统有一定的保护作用^[5]。这种保护作用的机制尚未清楚,有学者认为海藻多糖对造血系统的保护作用与其促进造血干细胞和祖细胞的分裂繁殖有关。笔者的实验表明 SHP 可以缓解辐射损伤小鼠骨髓细胞的 G_0/G_1 期阻滞,提高 S 期和 G_2/M 期细胞的百分率(表 1)。提示 SHP 的抗辐射机制与其调节骨髓细胞周期进程密切相关。CDK₄ 是控制细胞 G_0/G_1 期稳定的关键蛋白质^[6],它可以使细胞周期蛋白依赖性激酶保持生物活性,从而减轻或避免 G_0/G_1 阻滞。图 1 和表 2 中显示 SHP 加照射组小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白质表达明显高于单纯照射组,表明 SHP 具有提高辐射损伤小鼠骨髓细胞 CDK₄ 蛋白质表达的功能,进一步说明海藻多糖的细胞周期进

程调节功能在预防辐射损伤机体造血系统方面起重要作用。

[参 考 文 献]

[1] 陈晓莉,蒲晓允,潘静,等. 螺旋藻多糖对骨髓造血干祖细胞增殖能力影响的实验研究[J]. *重庆医学*, 2002, 31(6): 454 - 455.

[2] 左连富主编. 流式细胞术与生物学[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1996. 68 - 385.

[3] 姜泊,张亚力,周殿元主编. 分子生物学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1996. 47 - 49, 56 - 59.

[4] 洪艳,刘煜敏,熊小红,等. 当归多糖对放射损伤小鼠红细胞免疫功能和造血功能的保护作用[J]. *医学临床研究*, 2002, 19(1): 31 - 32.

[5] 刘志辉,孟庆勇. 海藻多糖对小鼠骨髓放射性急性损伤的保护作用[J]. *广东医学院学报*, 2002, 20(6): 420 - 421.

[6] Acquet P, Buset J, Vankerkom J, et al. Mouse one - cell embryos undergoing a radiation - induced G_2 arrest may re - enter S - phase in the absence of cytokinesis [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2002, 80(7): 618 - 624.