

凝溶胶蛋白在 C57BL/6 小鼠急性放射肺损伤中的表达

吴昊昊 王洁 陈宇桦 陈树壮 俞家华 刘芬菊

(苏州大学医学部放射医学与防护学院 苏州大学放射医学及交叉学科研究院

江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 为研究小鼠辐射诱导肺损伤后凝溶胶蛋白(Gelsolin, GSN)在血浆和肺组织中的表达,分别采用4 Gy和20 Gy剂量的X射线对C57BL/6小鼠进行全身及胸部单次照射。且在照射后取不同时间点ELISA Kit检测小鼠血浆型Gelsolin(Plasma GSN, pGSN)蛋白含量和Western blot法检测小鼠肺组织胞浆型Gelsolin(Cytoplasmic GSN, cGSN)蛋白含量。同时,检测20 Gy X射线胸部照射后不同时间点小鼠右肺肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中的细胞总数和总蛋白的含量。结果表明,全身照射组小鼠在照射后24 h时,pGSN水平降低,而胸部照射组pGSN水平在24~48 h持续降低,下降速度慢于全身照射组,之后两组pGSN均逐渐上升。在照射后24 h时小鼠肺组织cGSN含量低于正常水平,照射后48 h时则高于正常水平,48~96 h持续下降。但在照射后96 h时全身照射组cGSN含量恢复到正常,胸部照射组仍高于正常水平。小鼠胸部照射后在24 h时,右肺BALF中细胞总数和总蛋白浓度显著高于正常水平,约达正常值的16倍,24~96 h持续下降,与肺组织cGSN含量变化存在一定程度的负相关。推测GSN可能促进急性放射肺损伤的修复。

关键词 凝溶胶蛋白, 急性放射, 肺损伤

中图分类号 TL71, R811.5

凝溶胶蛋白(Gelsolin, GSN)是凝溶胶蛋白超家族成员之一,广泛分布于低等真核生物到高等哺乳动物体内,是一种肌动蛋白(Actin)结合蛋白,分子量约为82~84 KD。目前发现GSN可以分为胞浆(Cytoplasmic GSN, cGSN)和血浆(plasma GSN, pGSN)两型,两型GSN均由同一个基因在不同转录起始位点转录编码而成。GSN本身是一种分泌型蛋白,在多种类型细胞均可以表达,存在胞浆并可分泌到胞外,骨骼肌是pGSN最初来源。GSN是目前已知效应最强的actin微丝切割蛋白,其活性受到 Ca^{2+} 浓度、细胞内pH值、磷酸磷脂酰肌醇等因素的调节,对actin微丝进行剪切、聚合和解聚,完成细胞质的凝胶态(Gel)和溶胶态(Sol)之间的相互转换。此外GSN还参与细胞形态、运动、分裂、胞吞等功能,在细胞凋亡、细胞活力、离子通道调节、某些信号转导等过程中发挥重要作用^[1-4]。

凝溶胶蛋白对肿瘤有正向和负向两种截然不同的作用,在多种肿瘤中表达明显降低,大量实验证

据亦提示GSN具有明显的肿瘤抑制作用^[5-7];而一些肿瘤中GSN蛋白却高表达,如肺小细胞肺癌、肿瘤侵袭性增加时等^[8-10]。大量文献报道^[11-16],机体受到严重创伤,如急性呼吸窘迫综合征、急性肝炎、脓毒症、放射损伤等,大量actin微丝释放进入血液,改变血液特征甚至阻塞小血管,对循环系统产生很大的毒性,pGSN被大量消耗而含量降低,下降水平与危重病人死亡率密切相关,而向机体补充外源性凝溶胶蛋白很有希望作为治疗危重患者的有效措施,缓解高危患者的病情。另有报道^[15],小鼠急性高氧肺损伤时,pGSN水平下降,BALF中中性粒细胞数上升,而注射重组凝溶胶蛋白可以使小鼠的肺充血水肿明显减轻,BALF中中性粒细胞数显著减少。Becker等^[13]发现GSN基因敲除小鼠肺血管通透性增加,并更容易发生肺缺血性损伤,表明GSN在维持肺血管屏障功能稳定性中发挥不可替代的作用。以上研究结果均提示GSN在肺损伤修复中发挥重要的作用。本研究通过观察小鼠在不同

基金项目: 国家自然科学基金(31270897、30870585)、江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)、江苏省大学生实践创新性实验计划(SG31512911)、苏州大学大学生创新性实验计划(5731506911)资助

第一作者: 吴昊昊,男,1991年1月出生,现为苏州大学医学部放射医学与防护学院在读本科生,Email: 539821250@qq.com

通讯作者: 刘芬菊, Email: fangsh@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2013-04-08, 修回: 2013-05-02

方式不同剂量照射后, 血浆 pGSN 和肺组织 cGSN 的表达, 以及胸部大剂量照射小鼠造成急性肺损伤时, 肺损伤程度与肺组织 cGSN 含量之间的关系, 推测 pGSN 和 cGSN 在辐射诱导肺损伤修复中的作用。

1 实验材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 雄性, 体重 (22–24 g), 由中国科学院上海实验动物中心购买, 小鼠购入后自由进食 (辐照灭菌) 及进水 (高压灭菌) 饲养 2 d 后, 进行实验。

1.1.2 照射分组 动物分为 4 Gy 急性全身照射组 (20 只小鼠), 20 Gy 急性胸部照射组 (20 只小鼠) 和未照射组 (8 只小鼠)。照射后动物于洁净恒温 (25±1)°C 饲养室饲养。

1.1.3 照射条件 苏州大学第一附属人民医院 X 射线照射装置, 西门子 PRIMUS-M 型加速器, 6MV, X 射线, 剂量率为 2 Gy·min⁻¹。照射剂量分别为一次性全身均匀照射 4 Gy, 及局部胸部照射 20 Gy。

1.1.4 主要仪器和试剂 酶标仪 (Thermo MULTISKAN MK3); 光学显微镜; 电动组织匀浆机; Mouse gelsolin ELISA kit (上海源叶生物科技有限公司); RIPA 细胞裂解液、PMSF、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究); GSN 一抗 (SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY, INC); β -actin 一抗、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗 (碧云天生物技术研究);

1.2 方法

1.2.1 小鼠血浆中 pGSN 水平检测 C57BL/6 小鼠随机分为: ①4 Gy 急性全身照射组, 小鼠受照射后 24 h (5 只)、48 h (5 只)、72 h (5 只)、96 h (5 只) 时眼球取血, 肝素抗凝, 5000 r·min⁻¹×10 min 离心, 收集上清液血浆。②20 Gy 急性胸部照射组, 小鼠受照射后 24 h (5 只)、48 h (5 只)、72 h (5 只) 和 96 h (5 只) 时眼球取血, 肝素抗凝, 5 000 r·min⁻¹×10 min 离心, 收集上清液血浆。③正常对照组 (8 只小鼠), 不照射后小鼠眼球取血, 后续步骤同照射组。所有收集血浆应用 gelsolin ELISA Kit 检测血浆 pGSN 含量, 检测步骤按试剂盒说明书。

1.2.2 Western blot 法检测肺组织 cGSN 含量 4 Gy 急性全身照射组和 20 Gy 急性胸部照射组小鼠照射后, 处死小鼠, 取左肺肺组织, 加入适量含有 PMSF 的裂解液, 用组织匀浆机匀浆后, 离心取上清液。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量 (操作按说明进行)。定量后按蛋白: 5X Protein loading Buffer = 4:1 比例混合, 100°C 煮沸 5 min。蛋白样品经 SDS-PAGE (10%分离胶、4%浓缩胶) 电泳分离后, 电转移至 NC 膜, 5%牛奶封闭 2 h, 膜与 β -actin 及 GSN 一抗 4°C 孵育过夜后, TBST 洗涤 5 遍, HRP 标记二抗分别室温孵育 2 h, TBST 洗涤 5 遍, 应用 ECL 化学发光试剂盒于暗室中曝光。X 光片洗涤干燥后扫描拍照。

1.2.3 小鼠右肺肺泡灌注液 (BALF) 中总蛋白浓度和细胞总数含量检测 20 Gy 急性胸部照射组小鼠受照后, 处死小鼠, 打开胸腔, 分离左右支气管, 结扎左支气管, 用 0.5 mL PBS (加蛋白酶抑制剂) 对右肺进行肺泡灌洗, 重复三次, 收集肺泡灌洗液并在酶标仪下测量 BALF 总蛋白浓度和和光学显微镜下计算 BALF 细胞总数含量。

1.2.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计分析软件, 计量资料采用平均值±单次测量标准差表示。两组之间比较采用完全随机设计两独立样本 *t* 检验, 多组之间比较应用方差分析。*p*<0.05 为差异显著, 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 小鼠血浆 pGSN 蛋白含量

C57BL/6 小鼠 4 Gy 全身照射后 24 h 时, pGSN 水平降低, 照射后 24–96 h pGSN 水平逐渐上升。而小鼠 20 Gy 胸部照射后, pGSN 水平在照射后 24–48 h 持续下降, 下降速度较 4 Gy 全身照射慢, 48–96 h pGSN 水平逐渐上升。同时该两组小鼠在照射后 96 h 时, pGSN 水平均未升高至正常水平 (见图 1)。

2.2 小鼠肺组织 cGSN 蛋白的相对含量

4 Gy 全身照射小鼠在照射后 24 h 时, 肺组织 cGSN 含量低于正常水平, 在照射后 48 h 时则高于正常水平, 48–96 h 持续下降, 照射后 96 h 时蛋白含量恢复至正常水平 (见图 2a 及图 3)。20 Gy 胸部照射小鼠在照射后 24 h 时, 肺组织 cGSN 含量明显

低于正常水平，在照射后 48 h 时则明显高于正常水平，48–96 h 持续下降，但在照射后 96 h 未恢复至正常水平（见图 2b 及图 3）。

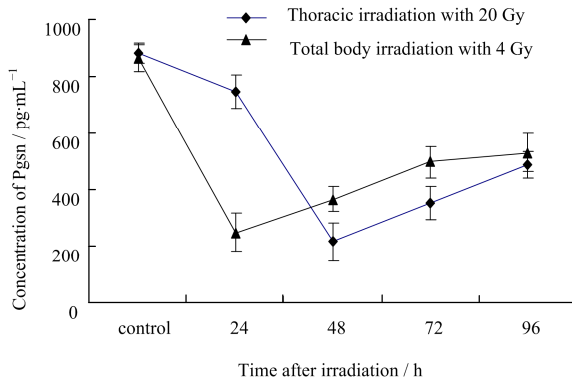


图 1 不同剂量 X 射线照射后 C57BL/6 小鼠血浆中 pGSN 含量

Fig.1 Change in concentration of plasma gelsolin in irradiated C57BL/6 mice

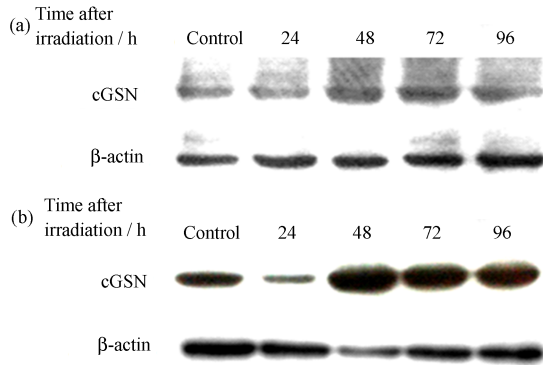


图 2 X 射线胸部照射后 C57BL/6 小鼠肺组织 cGSN 的含量: (a)4 Gy, (b)20 Gy

Fig.2 Change in cGSN concentration in lung tissue of thoracic irradiated mice with 4 Gy(a) and 20 Gy(b)

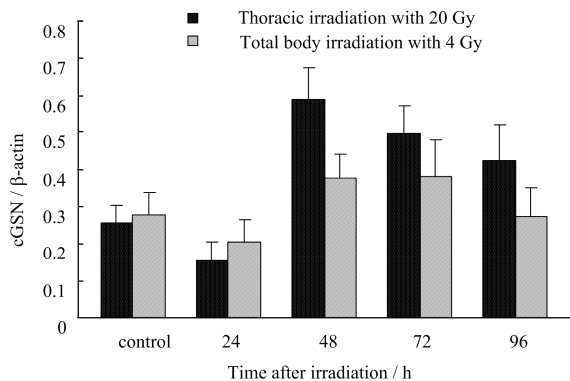


图 3 不同剂量 X 射线照射后 C57BL/6 小鼠肺组织 cGSN 的相对含量

Fig.3 Relative change in cGSN quantity in lung tissue of irradiated C57BL/6 mice

2.3 小鼠右肺 BALF 中细胞总数和总蛋白浓度

C57BL/6 小鼠 20 Gy 胸部照射组，右肺 BALF 中的细胞总数在照射后 24 h 时明显升高，24–96 h 持续下降，至照射后 96 h 时下降至正常水平（见图 4）。右肺 BALF 中总蛋白浓度与细胞总数变化基本相似，在照射后 24 h 时明显升高，约达到正常值的 16 倍，至照射后 48 h 进行性下降，72–96 h 逐渐趋于稳定，出现平台，但仍然高于正常水平（见图 5）。

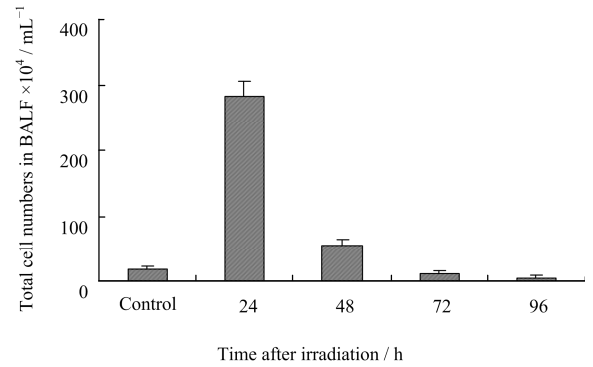


图 4 20 Gy X 射线胸部照射后 C57BL/6 小鼠右肺 BALF 中细胞总数

Fig.4 Change in total cell number in BALF of thoracic irradiated mice with 20 Gy

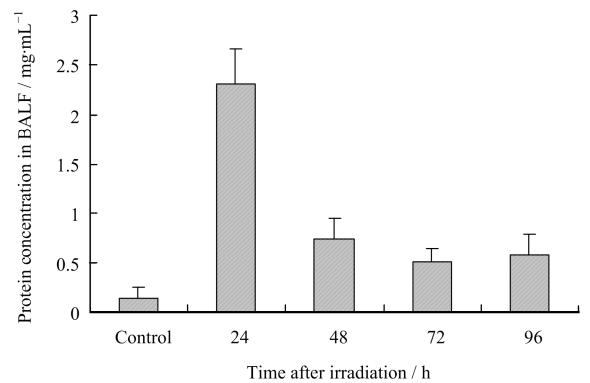


图 5 20 Gy X 射线胸部照射后 C57BL/6 小鼠右肺 BALF 中总蛋白浓度

Fig.5 Change in total protein concentration in BALF of thoracic irradiated mice with 20 Gy

3 讨论

大量文献报道^[4,11,12,14]，多种损伤及疾病等病理条件下，机体会产生大量骨架蛋白 actin 进入循环系统，异常增多的 actin 会堵塞微循环，pGSN 通过自身的大量的消耗，清除循环系统中毒性 actin，对机体发挥保护作用。因此辐射诱导机体损伤时，大量 actin 从受损细胞中释放进入循环系统和组织间隙，

引起血液粘稠、微血管阻塞等毒性反应。作为循环中 actin 清除系统重要成员之一, GSN 能够通过清除 actin 及结合炎症介质减轻炎症反应, 促进损伤机体的修复。本研究发现小鼠全身照射后 24 h 时, pGSN 水平下降, 而胸部照射组的 pGSN 水平在 24–48 h 持续降低, 之后两组 pGSN 均逐渐上升。观察到胸部照射组 pGSN 下降速度显著比全身照射慢, 可能因为, 4 Gy 全身照射后小鼠发生骨髓等造血系统的损伤, 肺损伤并不是主要原因, 而 20 Gy 胸部照射后小鼠发生急性肺损伤, 其主要损伤组织不同, 导致 pGSN 下降速度慢。随后 pGSN 水平均逐渐上升, 出现这种现象可能是由于机体急性放射损伤后 pGSN 的大量消耗, 细胞应激性分泌大量 GSN 进入血液, 促进机体修复。这两组小鼠在照射后 24 h 时, 肺组织 cGSN 含量均低于正常水平, 照射后 48 h 时则高于正常水平, 48–96 h 持续下降。但在照射后 96 h 时全身照射组 cGSN 含量恢复到正常水平, 胸部照射组仍高于正常水平。造成这种现象的原因可能为, 急性肺损伤时组织细胞 cGSN 高表达, 但由于分泌大量 GSN 进入微循环或与炎症因子、自由基等有毒物质结合而减轻肺损伤, 导致 cGSN 含量在照射后 24 h 时降低, 而当肺内有毒物质被大量清除后 cGSN 含量逐渐升高。另一方面 20 Gy 胸部照射组小鼠的肺损伤更严重, 该组小鼠肺组织 cGSN 含量变化亦更明显。

文献[13]报道, 相对于野生型小鼠, GSN 基因敲除小鼠的肺血管通透性更大, 更易发生缺血性损伤, 故 GSN 在维持肺血管屏障功能中发挥不可替代的作用。本研究中发现, C57BL/6 小鼠 20 Gy 胸部照射后 24 h 时, 右肺 BALF 中总蛋白浓度和细胞总数均明显高于正常水平, 约达正常值的 16 倍, 预示肺血管内皮细胞严重受损, 通透性明显增大, 血管里大量的蛋白和细胞进入肺泡内, 造成严重的肺损伤。照射后 24–96 h BALF 中总蛋白浓度和细胞总数持续下降, 甚至恢复到正常水平, 表明肺血管通透性降低, 肺损伤逐渐减轻。与小鼠 20 Gy 胸部照射后肺组织的 western blot 结果进行对比, cGSN 含量在照射后 24 h 时显著低于正常水平, 在照射后 48–96 h 之间均高于正常水平, 观察到 cGSN 含量与肺血管通透性有一定程度的负相关, 因此推测 cGSN 参与辐射诱导急性肺损伤的修复过程。

上述研究结果表明, 辐射诱导机体损伤时,

pGSN 通过清除循环系统中 actin, 改善放射损伤引起的循环障碍, 应激性刺激细胞分泌大量 GSN 进入循环系统, 保护机体。而辐射诱导的肺损伤时, pGSN 和 cGSN 两者可能协同促进肺损伤的修复: 一方面消耗循环系统中的 pGSN, 清除 actin 及具有生物活性的炎症介质; 另一方面通过肺组织 cGSN 的高表达, 改善肺血管屏障功能, 清除肺内有毒物质, 减轻肺损伤, 但 GSN 是否对急性放射肺损伤有确切的保护作用及其作用机制仍需进一步研究。

参考文献

- 1 Yin H L, Stossel T P. Control of cytoplasmic actin-gel-sol transformation by Gelsolin, a Calcium dependent regulatory protein [J]. *Nature*, 1979, **281**(5732): 583–586
- 2 Philchenkov A A. Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions [J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2003, **68**(4): 365–376
- 3 GUO Huali, Pamela D. Arora, YU Chen, *et al.* Multifunctional roles of gelsolin in health and diseases [J]. *Med Res Rev*, 2012, **32**(5): 999–1025
- 4 Ilacci P, Mazzolai L, Gauci C, *et al.* A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin [J]. *Cell MolLife Sci*, 2004, **61**(19-20): 2614–2623
- 5 Tanaka H, Shirkoohi R, Nakagawa K, *et al.* siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells [J]. *Int J Cancer*, 2006, **118**(7): 1680–1691
- 6 Sagawa N, Fujita H, Banno Y, *et al.* Gelsolin suppresses tumorigenicity through inhibiting PKC activation in a human lung cancer cell line [J]. *Br J Cancer*, 2003, **88**: 606–612
- 7 Ni X G, Zhou L, Wang G Q, *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway mediates gelsolin protein downregulation in pancreatic cancer [J]. *Mol Med* 2008, **14**(9-10): 582–589
- 8 Shieh D B, Chen I W, Wei T Y, *et al.* Tissue expression of Gelsolin in oral carcinogenesis progression and its clinicopathological implications [J]. *Oral Oncol*, 2006, **42**(6): 599–606
- 9 Rao J, Seligson D, Visapaa H, *et al.* Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers

- gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma [J]. Cancer, 2002, **95**(6): 1247–1257
- 10 Liao C J, Hsu C Y, Tsai M H, *et al.* Overexpression of gelsolin in human cervical carcinoma and its clinicopathological significance [J]. Gynecol Oncol, 2011, **120**(1): 135–144
- 11 Lee P S, Waxman A B, Cotich K L, *et al.* Plasma gelsolin is a marker and therapeutic agent in animal sepsis [J]. Crit Care Med, 2007, **35**(3): 849–855
- 12 Lee P S, Sampath K, Karumanchi S A, *et al.* Plasma Gelsolin and Circulating Actin Correlate with Hemodialysis Mortality [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, **20**(5): 1140–1148
- 13 Becker P M, Kazi A A, Wadgaonkar R, *et al.* Pulmonary vascular permeability and ischemic injury in gelsolin-deficient mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, **28**(4): 478–484
- 14 Witke W, Sharpe A H, Hartwig J H, *et al.* Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin [J]. Cell, 1995, **81**(1): 41–51
- 15 Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides C C, *et al.* Recombinant Plasma Gelsolin Diminishes the Acute Inflammatory Response to Hyperoxia in Mice [J]. J Investig Med, 2002, **50**(1): 54–60
- 16 Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides C C, *et al.* Changes in plasma gelsolin concentration during acute oxidant lung injury in mice [J]. Lung, 2002, **180**(2): 91–104

Gelsolin expression of acute radiation lung injury in C57BL/6 mice

WU Haohao WANG Jie CHEN Yuhua CHEN Shuzhuang YU Jiahua LIU Fenju

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection School of radiation medicine and protection,
Jiangsu Provincial Research Institute of Radiation Medicine and Interdisciplinary,
Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the changes in plasma and cytoplasmic gelsolin during radiation-induced acute lung injury, C57BL/6 mice were randomly divided into two groups for irradiation: the total body irradiation with 4 Gy and the thoracic irradiation with 20 Gy. The plasma gelsolin (pGSN) levels were detected by ELISA Kit and the cytoplasmic gelsolin (cGSN) of the lung tissue were detected by western Blot. The total cell number and the protein concentration of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the right lung of thoracic irradiated mice with 20 Gy were detected. The results show that the pGSN levels in total body irradiated mice with 4 Gy decrease significantly at 24 h post-radiation. In contrast, the pGSN levels in thoracic irradiated mice with 20 Gy decline more slowly but decrease significantly at 48 h post-radiation. After that, the pGSN levels in both groups begin to recover slowly. The cGSN levels in lung tissue of both groups decrease at 24 h post-radiation, but increase significantly at 48 h post-radiation, then gradually recover. But the changes in cGSN levels of thoracic irradiated mice are more significant. The total cell number and the protein concentration of BALF in the right lung of mice treated by the thoracic irradiation with 20 Gy increase significantly at 24 h post-radiation, approximately 16 times of the control's, then decrease and gradually become stabilized. There is a negative correlation with the cGSN levels in lung tissue of thoracic irradiated mice with 20 Gy. pGSN and cGSN may play an important role in the process of repairing acute lung injury.

KEYWORDS Gelsolin, Actue radiation, Lung injury

CLC TL71, R811.5