

辐射对骨髓间充质干细胞增殖分化及相关基因表达的影响

徐小雅 金慰芳 高建军 周轶 盛辉

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 为观察大鼠局部大剂量辐射后,骨髓间充质干细胞增殖分化及相关基因的表达,以 ^{137}Cs γ 射线对大鼠股骨头部位局部照射,吸收剂量为30 Gy,剂量率为0.83 Gy/min,照后两周取股骨头进行骨髓间充质干细胞(BMSCs)培养,四甲基氮唑盐比色法(MTT)绘制生长曲线及进行集落计数,RT-PCR检测Cbf- $\alpha 1$, PPAR- γ , VEGF-a和KDR的表达。骨髓间充质干细胞大剂量辐射后细胞增殖能力明显降低,集落形成数目减少;Cbf- $\alpha 1$, PPAR- γ , VEGF-a和KDR的表达均降低,其中Cbf- $\alpha 1$, PPAR- γ , VEGF-a表达降低幅度分别达18.98%, 9.46%和57.34%,与对照组相比差异显著($p < 0.05$)。故体外大剂量局部辐射明显损伤骨髓间充质干细胞,使其增殖分化及相关基因的表达降低。

关键词 辐射,骨髓间充质干细胞,核结合因子1,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ,血管内皮生长因子

中图分类号 R818.74, R818.03, R551.3

早在1867年,德国病理学家Cohnheim在研究伤口愈合过程时,就提出骨髓中存在BMSCs, BMSCs是一类来源于骨髓单个核细胞群,具有多向分化潜能的组织干细胞,体外不同培养条件下BMSCs还可分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌细胞,内皮细胞等^[1-2]。因此, BMSCs在机体损伤修复中发挥重要作用,但是BMSCs损伤后是否还具有分化潜能目前的研究结果并不明确。本研究采用大剂量体外局部照射方法,观察照射后BMSCs的增殖分化及相关基因表达,为临床放疗BMSCs损伤的防范和治疗提供基础性研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠20只,体重(400±20)g,于照射前12h禁食,自由进水。氯胺酮(0.2 mL/100g)麻醉后,取仰卧位,四肢及头部固定于支架,股骨头部位体外标记定位,照射范围1 cm×1 cm,其余部位用铅板屏蔽(铅板厚4 cm),于 ^{137}Cs γ 辐照装置(剂量率0.83 Gy/min)进行照射;对照组氯胺酮麻醉后不进行照射。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM-LG (GIBCO USA),胎牛血清(FBS GIBCO USA),二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)

(上海思吉生物制品有限公司),十二烷基硫酸钠(SDS)(上海思吉生物制品有限公司),TRIZOL试剂(Invitrogen Life Technologies),Rever Tra Ace- α (TOYOBO),PCR扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司), ^{137}Cs γ 辐照装置(Gamma cell 40, Canada),二氧化碳培养箱(Heraeus, Germany),倒置相差显微镜(Olympus, Japan),酶标仪(Bio-Tek Elx800 USA),PCR-sytem 2700 (Applied Biosystems)。

1.3 辐射后BMSCs增殖及集落形成的测定

辐照后2周对照组和30 Gy组动物分别用22%乌来糖麻醉,无菌条件下取双侧股骨放入PBS,机械分离肌肉血管等结缔组织,PBS多次冲洗,股骨两端断口,注射器将骨髓冲入L-DMEM培养液中,将细胞悬液直接接种培养瓶,3 d后半换液,待细胞80%汇合后以0.25%胰酶消化传代,取2代细胞100/cm²各接种6个小皿,1周后观察BMSCs集落形成能力;以 2×10^3 /200 μL 接种于5块96孔培养板,加一般培养液(L-DMEM+10%FBS)。3 d换液一次,从第2天每隔48h取出一块板用MTT法测试,以时间 t 为横坐标,吸光度 A (570 nm)为纵坐标,绘制生长曲线。

1.4 辐射后BMSCs相关基因表达的测定

BMSCs汇合后,弃培养液,每瓶细胞均加入

上海市卫生局资助(08GWZX0602)、上海市卫生局青年科研基金(054y27)资助

第一作者:徐小雅,女,1980年8月出生,2007年获复旦大学放射医学研究所硕士学位,放射医学专业

收稿日期:初稿2008-07-03,修回2008-09-03

TRIZOL 1 mL, 氯仿异丙醇法提取 RNA, DEPC 水溶解, 紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 计算 RNA 溶液浓度和纯度, 按试剂盒方

法进行 RT-PCR, 引物序列见表 1。电泳结果在凝胶成像分析系统中读取各基因条带的光密度值, 并计算各基因与内参基因光强度比值。

Table 1 The sequences of primers and parameters of PCR

Gene	Up-stream primer (5' -3')	Down-stream primer (5' -3')	Annealing temperature / °C	Fragment / bp
GAPDH	GTTCCGATGCCCCGAGGATCT	GCATTGCGGTGCACGATGGA	61	491
Cbf- α 1	CTCCAACCCACGAATGCACTA	GCGTCAACACCATCATTCTGG	61	327
PPAR- γ	TGCGTCCCCGCCTTATTATT	CCAAACCTGATGGCATTGTGA	58	489
VEGF-a	TGCTGCAATGATGAAGCCCT	TACACGTCTGCGGATCTTGGA	58	301
KDR	CAACCATTGGTGAGACCATCG	CCTTCATTGGCCCCGCTTAA	56	552

1.5 统计方法

实验数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的差异用 SPSS11.0 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐射对 BMSCs 培养及集落形成的影响

细胞悬液接种 3 d 后, 见部分细胞贴壁呈梭形, 仍有大量小圆细胞悬浮 (见图 1)。

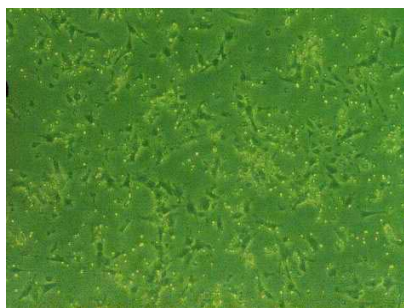


Fig.1 BMSCs were cultured after 3 days (40 $\times$)

培养 10 d 左右, 对照组细胞 80 % 汇合, 而照射组细胞培养 11~12 d 才能 80 % 汇合 (见图 2)。

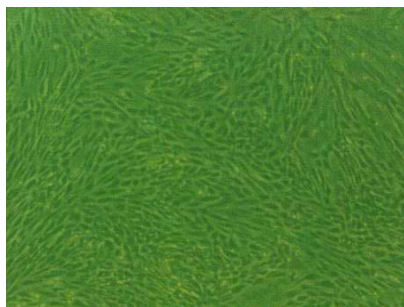


Fig.2 BMSCs were cultured after 10 days (40 $\times$)

传代细胞培养 4 d, 细胞集落逐渐形成, 培养 7 d 左右对照组 BMSCs 形成的集落较大, 数量较多, 照射组 BMSCs 形成的集落较小, 数量少, BMSCs 集落形成率为 10 %, 较对照组 21 % 明显下降, 下降幅度达 50.5 % ($p < 0.001$) (见图 3、图 4 和表 2)。

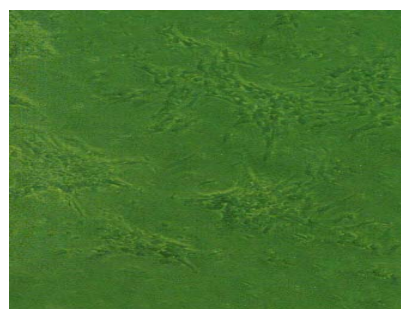


Fig.3 The colonies in irradiated group (40 $\times$)

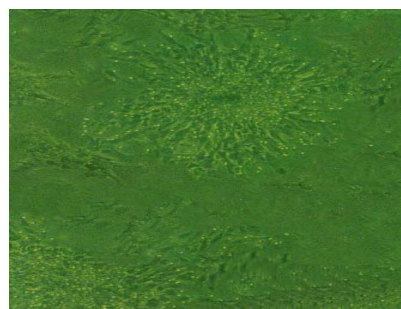


Fig.4 The colonies in normal group (40 $\times$)

Table 2 The ability of BMSCs after irradiation (%)

Group	Colony	Change compared to the control
Control	21 % $\pm$ 0.93	—
Irradiated	10 % $\pm$ 0.68 ⁽¹⁾	-50.5

Compared with the control group, ⁽¹⁾ $p < 0.001$

2.2 辐射对 BMSCs 增殖的影响

细胞培养 1~3 d, 对照组和照射组 BMSCs 的细胞增殖平缓, 无明显差异; 3~5 d, 对照组和照射组 BMSCs 增殖加速, 增殖趋势无明显改变; 5~7 d, 对照组和照射组 BMSCs 进入对数生长期, 照射组 BMSCs 增殖能力低于对照组; 7~9 d, 对照组和照射组 BMSCs 增殖减缓, 照射组 BMSCs 增殖能力依然低于对照组 (见图 5)。

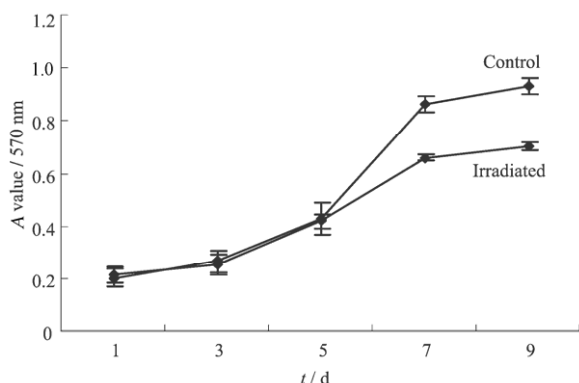


Fig.5 The growth curve of the control and the irradiated group

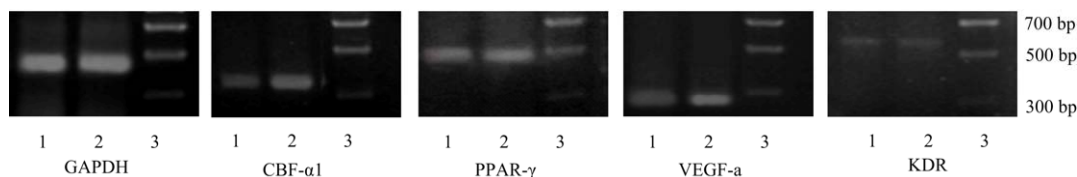


Fig.6 The expression of genes in the two groups
Lane1: Irradiated group; Lane2: Normal group; Lane3: DNA marker

3 讨论

骨髓包括不同发育阶段的血细胞 (造血干/祖细胞、形态上可识别的幼稚的血细胞和成熟的血细胞)、造血基质 (巨噬细胞、成纤维细胞、间充质细胞等) 以及脂肪细胞。同时骨髓也是辐射敏感组织之一, 一定剂量的中子和 γ 射线照射可引起造血细胞的凋亡和坏死^[3], 文献^[4]报道, 大剂量辐射可以抑制骨髓细胞增殖。射线在损伤造血细胞的同时对骨髓基质也有一定程度的损伤, 尤其是骨髓间充质干细胞 (BMSCs)。文献^[5]报道, 大剂量辐射加速骨髓间充质干细胞凋亡, 孙岚等^[6]也发现骨髓间充质干细胞经 60 Gy 照射后 VEGF 的表达大大下降。本研究发现照射组 BMSCs 体外培养生长缓慢, 形成的集落小, 数目少 (10 %), 与对照组 (21 %) 相比明显减少, 差异显著 ($p<0.001$), 表明大剂量辐射抑制了 BMSCs 集落形成能力; 生长曲线显示照射后 BMSCs 增殖周期无明显改变, 但细胞数量低于对照组, 据杨军等^[6]的观察, 50 Gy 以下的辐射并不会造成 BMSCs 凋亡加速, 因此辐射可能造成了 BMSCs 分裂增殖能力减弱, 进而导致 BMSCs

2.3 辐射对 BMSCs 相关基因表达的影响

辐射后, BMSCs 相关基因表达均下调; 照射组 BMSCs Cbfa1 强度表达为 50.45 %, 与对照组 62.42 %相比下降 18.98 %, 差异明显 ($p<0.05$); PPAR γ 强度表达为 56.09 %, 与对照组 62.29 %相比下降 9.46 %, 差异显著 ($p<0.05$); VEGF-A 和 KDR 的表达为 17.67 %和 50.63 %, 与对照组 41.67 %和 53.68 %相比下降 57.34 %和 5.56 %, VEGF-A 的下调幅度较大, 具有明显的差异 ($p<0.05$), KDR 下调无统计学意义 (见表 3 和图 6)。

Table 3 The gene expression of the BMSCs afrer irradiation / %

	Control	Irradiated	Damping / %
CBF- α 1	62.42 $\pm$ 2.208	50.45 $\pm$ 1.056 ⁽¹⁾	-18.98
PPAR- γ	62.29 $\pm$ 2.068	56.09 $\pm$ 2.65 ⁽¹⁾	-9.46
VEGF-a	41.67 $\pm$ 0.84	17.67 $\pm$ 1.083 ⁽¹⁾	-57.34
KDR	53.68 $\pm$ 1.139	50.63 $\pm$ 0.545	-5.56

Compared with the control group, ⁽¹⁾ $p<0.05$

汇合延迟, 集落形成数量减少。

很多研究表明, 体外不同培养条件下 BMSCs 还可分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞、肌细胞, 内皮细胞等^[2]。特异的细胞内环境和细胞外信号可调控 BMSCs 向成骨细胞, 内皮细胞或脂肪细胞分化, 表型特异的转录因子激活决定 BMSCs 的分化方向^[7]。表型特异转录因子【成骨细胞特异转录因子核结合因子 α 1 (Core binding factor alpha 1, Cbfa1) 和脂肪细胞特异转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ)】激活决定了细胞系的定型^[8,9]。Cbfa1 促进 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨桥素等多个表型基因的表达^[10], 其表达水平反应间充质干细胞向成骨细胞分化的活跃程度。PPAR- γ 在脂肪细胞分化早期表达, 是脂肪细胞分化过程中必需的关键转录因子, 激活后可促使骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化, 其表达水平反映脂肪细胞分化的活跃程度。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)又称血管通透因子(Vascular Permeability factor, VPF)或血管调理素(Vasculotropin),

是一组功能强大且能产生多种效应的细胞因子。目前公认的最具特异性且作用最强的内源性血管生成因子就是 VEGF-A, 但它必须与受体结合才能发挥其促血管生成作用。血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 有 VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/KDR, VEGFR-3/flt-4, 神经纤维网蛋白-1 (np-1) 和神经纤维网蛋白-2 (np-2), 其中 VEGFR-1 和 VEGFR-2 主要分布于血管内皮细胞, 由于 VEGFR-1 介导的信号传导中缺乏分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶相关途径, 其生物学活性主要表现为诱导内皮细胞迁移, 而无促内皮细胞分裂增殖作用。但 VEGFR-2/KDR 信号传导中存在完整的 MAP 激酶途径, 结果出现细胞形态学改变, 包括肌动蛋白的改组, 细胞膜皱缩, 趋化性和促有丝分裂能力显著改变。VEGF 和 VEGFR 促进血管新生, 在创伤修复, 肿瘤进展中发挥至关重要的作用。本实验发现照射后 BMSCs Cbfa1, PPAR- γ , VEGF-A 和 KDR 表达为 50.45 %, 56.09 %, 17.67 % 和 50.63 %, 与对照组 62.42 %, 62.29 %, 41.67 % 和 53.68 % 相比, 分别下降 18.98 % ($p < 0.05$), 9.46 % ($p < 0.05$), 57.34 % ($p < 0.05$) 和 5.56 % ($p > 0.05$), 表明辐射可能主要通过抑制 BMSCs Cbfa1 和 VEGF-A 的表达, 从而极大减少 BMSCs 向成骨细胞和内皮细胞前体分化, 因而骨形成功能和损伤修复功能下降。

综上所述, 大剂量辐射早期即可损伤骨髓, 致使 BMSCs 集落形成能力下降, 同时辐射抑制了 BMSCs 相关基因 Cbfa1, PPAR γ , VEGF-A 和 KDR 的表达, 使 BMSCs 向成骨细胞, 脂肪细胞以及内皮细胞的分化减少, 致使成骨细胞前体和内皮细胞前体减少, 导致骨形成能力减弱, 辐射区域微血管

生成减少, 密度降低, 骨损伤修复能力降低甚至终止, 至于损伤后的 BMSCs 在外界干预治疗下是否还具有分化潜能, 我们将作进一步的深入研究。

参考文献

- 1 Woodbury D, Schwarz E I, Proekop D J, *et al*. *Neurosci Res*, 2000, **61**(3): 364-370
- 2 Suzdaltseva Y G, Burunova V V, Vakhrushev I V, *et al*. *Bull Exp Biol Med*, 2008, **145**(2): 228-231
- 3 Cui YE, Zhang Y, Liu XL, *et al*. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2004, **20**(1): 39-41
- 4 鞠桂芝, 马淑梅, 傅士波, 等. *中国预防医学杂志*, 2002, **3**(2): 87-88
JU Guizhi, MA Shumei, FU Shibo, *et al*. *China Prev Med*, 2002, **3**(2): 87-88
- 5 杨军, 丁振华, 何佩, 等. *第一军医大学学报*, 2002, **22**(5): 406-408
YANG Jun, DING Zhenhua, HE Pei, *et al*. *J First Mil Med Univ*, 2002, **22**(5): 406-408
- 6 孙岚, 刘文励, 孙汉英. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, **24**(1): 10-12
SUN Lan, LIU Wenli, SUN Hanying. *Chin J Radiol Med Prot*, 2004, **24**(1): 10-12
- 7 Kirkland J L, Tchkonina T, Pirtskhalava T, *et al*. *Exp Gerontol*, 2002, **37**(6): 757-767
- 8 Karsenty G. *Endocrinology*, 2001, **142**(7): 231-233
- 9 Rosen E D, Spiegelman B M. *Biol Chem*, 2001, **276**(41): 331-334
- 10 Jiang D, Franceschi R T, Boules H, *et al*. *Biol Chem*, 2004, **297**(7): 329-337

Radiation effect on the generation and expression of bone marrow stromal cells

XU Xiaoya JIN Weifang GAO Jianjun ZHOU Tie SHENG Hui

(Radiology Institute of Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT In order to investigate focal flushing dose radiation effect on the generation, differentiation and gene expression of bone marrow stromal cells the femoral head of rats was irradiated at 30 Gy by ^{137}Cs γ -rays (dose rate: 0.83 Gy/min). Then the bone marrow stromal cells (BMSCs) was cultured. The ability of proliferation and colony formation was observed and the expression level of Cbf- α 1, PPAR- γ , VEGF-a and KDR was detected by RT-PCR technology in two weeks later. It has been found that after partly irradiated by ^{137}Cs γ -rays the proliferation and the number of colony of BMSCs in irradiated group decreases obviously meanwhile the expression level of Cbf- α 1, PPAR- γ and VEGF-a in irradiated BMSCs obviously decreases by 18.98 %, 9.46 %, 57.34 % and 5.56 % respectively compared to the normal BMSCs ($p < 0.05$). It shows that the focal great radiation could damage the BMSCs and depress the generation, differentiation and the expression of the related genes obviously.

KEYWORDS Radiation, Bone marrow stromal cells (BMSCs), Core binding factor alpha 1 (Cbfa1), Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ), Vascular endothelia growth factor (VEGF).

CLC R818.74, R818.03, R551.3