

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130724

果糖对电离辐射诱发 AHH-1 细胞凋亡的保护作用

王小彦¹, 董志¹, 路晓钦²

(1. 重庆医科大学药学院生化与分子药理研究室, 重庆 400016; 2. 重庆市第九人民医院药剂科, 重庆 400700)

【摘要】目的:观察果糖对淋巴细胞 AHH-1 辐射损伤保护作用。**方法:**照射前 12 h 给予不同浓度的腺嘌呤, 再经 4.0 Gy ⁶⁰Coγ 射线照射诱发细胞凋亡, 采用 MTS 法计算细胞存活率; Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率; RT-PCR 分析细胞 Caspase-9、Bax、Bcl-2 mRNA 表达的变化; Western blot 分析细胞 Caspase-9、Bax、Bcl-2 蛋白改变。**结果:**与正常组相比, 电离辐射后细胞存活率 78.0% 显著下降 ($P < 0.05$), 细胞照射前加入果糖其存活率随浓度的增加而升高 ($P < 0.05$), 细胞中 Caspase-9、Bax 的 mRNA 和蛋白表达明显减少, Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达明显增加, 凋亡的各项指标均明显改善。**结论:**果糖对电离辐射诱发的细胞凋亡有保护作用, 并对细胞凋亡的抑制呈剂量依赖正相关关系。

【关键词】淋巴细胞; 细胞凋亡; 电离辐射; 果糖**【中国图书分类法分类号】**R146**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-11-28

Radioprotective effects of fructose on irradiation induced apoptosis in AHH-1 cells

WANG Xiaoyan¹, DONG Zhi¹, LU Xiaoqin²

(1. Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Department of Pharmacology, the Ninth Hospital of Chongqing)

【Abstract】Objective: To investigate radioprotective effects of fructose on irradiated lymphocytoblast AHH-1 and to discover the possible mechanisms. **Methods:** Lymphocytoblasts were pretreated for 12 h before radiation with different concentrations of fructose and then were exposed to 4 Gy ⁶⁰Coγ ray radiation to induce cell apoptosis. Cell survival rate was counted by MTS assay and cell apoptosis rate was detected by Annexin V/PI. Changes in mRNA expressions of Caspase-9, Bax, Bcl-2 were investigated by RT-PCR and changes in protein expressions of Caspase-9, Bax, Bcl-2 were analyzed by Western blot. **Results:** Irradiation increased cell death and cell survival rate was 78% after irradiation, significantly lower compared with that before irradiation ($P < 0.05$). If fructose was added before irradiation, cell survival rate was increased in a concentration dependent manner after irradiation ($P < 0.05$). mRNA and proteins expressions of Caspase-9 and Bax were significantly decreased and mRNA expressions of Bcl-2 were increased; apoptosis related indexes were improved. **Conclusions:** Fructose exerts radioprotective effects on irradiation induced apoptosis in AHH-1 cells and its inhibition on cell apoptosis is in a concentration dependent manner.

【Key words】lymphocytoblast; cell apoptosis; irradiation; fructose

机体抗辐射作用主要与抗氧化, 调节骨髓组织糖代谢, 清除自由基, 提高免疫功能, 促进基因转录, 促进造血生长因子信号转导和造血细胞的生长分化, 调节造血微环境, 促进骨髓造血和辐射致骨髓损伤的修复等诸多方面密切相关^[1]。有研究报道果糖为细胞正常代谢所需, 可以调节糖酵解, 促进机体正常能量代谢以及增强机体抗氧化能力、免疫力, 并显著促进血红蛋白及血红细胞生成, 起补血活血作用^[2]。因此本实验采用 ⁶⁰Coγ 射线照射诱导

细胞凋亡, 用不同浓度果糖干预进行实验, 观察其是否能减轻辐射损伤作用, 并探讨果糖防辐射诱发细胞凋亡的调控机理。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂及仪器

果糖购自德国 Sigma 公司; 淋巴细胞 AHH-1 由军事医学科学院二所二室保存; RPMI1640 培养基、新生牛血清购自 Gibco BRL 公司; MTS 检测试剂盒、Caspase-Glo[®] 3/7 检测试剂盒购自 Promega 公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自宝赛生物技术有限公司; Trizol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司; 引物由英潍捷基(北京)贸易有限公司合成; 蛋

作者介绍: 王小彦, Email: zuoyoumingyan@sina.cn,

研究方向: 临床药理学。

通信作者: 董志, Email: zhidong073@hotmail.com。

白提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及 ECL 试剂购自普利莱生物公司;小鼠抗人 Bcl-2、Bax 和 Caspase-9 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,二抗山羊抗鼠、山羊抗兔购自北京博奥森公司;钴源(军事医学科学院放射与辐射医学研究所)。

1.2 实验方法

1.2.1 AHH-1 细胞培养 将细胞培养于 RPMI1640(含 10% FBS,100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素),37 ℃、5%CO₂ 孵育,2~3 d 换液,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTS 法检测细胞存活率 将处于对数生长期的细胞,按(1~2)×10⁵ 个/ml 接种至 96 孔板中,每孔 200 μl,置 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度孵育箱中培养。照射前 12 h 加入不同浓度果糖,每组设 5 个复孔,4.0 Gy ⁶⁰Coγ 射线 1 次性照射,同时设置正常组(A);照射组(B);照射果糖 0.001 μmol/L(C₁);照射果糖 0.010 μmol/L(C₂);照射果糖 0.100 μmol/L(C₃)。照射后 24 h 加入 MTS,加入 MTS 4 h 酶标仪测 A_{490nm} 值。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测 取对数生长期细胞,按 5×10⁵ 个/ml 接种于培养瓶中,照射前 12 h 加入果糖,每组设 3 个复孔。4.0 Gy ⁶⁰Coγ 射线照射后终止干预,细胞于 37 ℃、5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 6 h。每组收集 1×10⁶ 个细胞,1 000 r/min 离心,用 PBS 清洗 2 次,将细胞重悬于 200 μl Binding Buffer,加入 10 μl Annexin V-FITC 混匀,避光室温反应 15 min,再加入 300 μl Binding Buffer 及 5 μl PI,1 h 内流式细胞仪检测。

1.2.4 Caspase-3/7 活性测定 将处于对数生长期的细胞,按 5×10⁵ 个/ml 接种至白色不透明 96 孔板中,每孔 100 μl,按 1.2.3 项分组干预细胞,终止干预后 6 h 加入 Caspase-Glo[®] 3/7 工作液,100 μl/孔,室温下避光孵育 1 h,酶标仪检测荧光强度。凋亡系数=实验组荧光强度/对照组荧光强度。

1.2.5 RT-PCR 检测果糖对 AHH-1 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-9 mRNA 表达影响 取对数生长期细胞,按 1.2.3 项分组干预细胞,终止干预后 6 h,按 Trizol 法提取 RNA,并进行含量和纯度测定。RT-PCR 基因引物序列分别为:Caspase-9 上游 5'-CAGTGGGCTCACTCTGAAGACC-3'和下游 5'-ACGC-GTTACTGGCATTGAGG-3'(544 bp),Bax 上游 5'-ACAC-TGT TAAGCATGTGCCG-3'和下游 5'-GCCCATGATGTTCTG-3'(354 bp),Bcl-2 上游 5'-ACACTGTTAAGCATGTGCCG-3'和下游 5'-CCAGCTCATCTCACCTCACA-3'(318 bp),GADPH 上游 5'-TCATTGACCTCAACTACATG-3'和下游 5'-CAAA-GTTGTCATGGATGACC-3'(500 bp)。按试剂盒说明书进行 RT-PCR 操作,PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像电泳分析系统扫描并拍照。以 GAPDH 为内参,采用 IMAGEJ 图像分析软件对各电泳条带进行灰度扫描,分别计算各电泳条带的灰度值(D)各基因的表达值分别采用各电泳条带的灰度值与内参 GAPDH 灰度值的比值(p)表示。

1.2.6 Western blot 检测果糖对 AHH-1 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-9 蛋白表达影响 取对数生长期细胞,按 1.2.3 项分组干预细胞,终止干预后 6 h 提取蛋白,调整蛋白浓度后变性,12% SDS-PAGE 分离蛋白,转膜后 5%脱脂牛奶封闭 2 h,一抗[Bcl-2(1:400);Bax(1:400);Caspase-9(1:400)] 4 ℃孵育

过夜,TBST 洗膜,二抗山羊抗兔(1:1 000);山羊抗小鼠(1:1 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 发光剂显影,Quantity One 软件 ChemiDOCXRS 成像系统采集图像,计算各组 Bcl-2/β-actin、Bax/β-actin、Caspase-9/β-actin 的灰度比值。

1.3 统计学处理

采用 Excel 2003 建立数据库,录入实验数据所有计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 *t* 检验;相关性分析用 Pearson 相关性分析。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 果糖对经 ⁶⁰Coγ 射线照射 AHH-1 细胞活力的影响

4.0 Gy ⁶⁰Coγ 射线一次性照射细胞后,细胞活力较照射前正常细胞活力明显降低($P<0.05$,表 1),照射组细胞存活率(78.0±4.0)%,与正常组(96.3±0.5)%比较减少,差异有统计学意义($P<0.05$,图 1)。照射前 12 h 分别加入不同浓度果糖干预照射细胞,与照射组比较,发现果糖能不同程度提高照射后细胞活力($P<0.05$,表 1),细胞存活率也升高分别为(83.1±2.2)%,(89.2±0.6)%,(91.3±1.1)%,具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。并发现这种作用可能在 0.001 μmol/L 以上开始显示,随着药物浓度的增加细胞活力也随之增强,具有浓度-效应依赖关系。

表 1 果糖对经 ⁶⁰Coγ 射线照射后 AHH-1 细胞活力的影响
($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of fructose on cell viability of AHH-1 cells after ⁶⁰Coγ ray irradiation ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	A _{490nm} 值	F 值	P 值
正常组	1.05 ± 0.01		0.000
照射组	0.65 ± 0.03		
照射果糖 (μmol/L)	0.001 0.72 ± 0.01	330.774	0.000
	0.010 0.87 ± 0.01		0.000
	0.100 0.99 ± 0.03		0.000
	1.000 0.64 ± 0.02		0.813

2.2 果糖对照射后细胞 Caspase-3/7 酶活性的影响

AHH-1 细胞照射后引起 Caspase-3/7 活性增高,果糖干预后 Caspase-3/7 活性降低($P<0.05$,表 2),并且这种效应呈剂量依赖的关系。

表 2 果糖对照射后 AHH-1 细胞 Caspase-3/7 酶活性影响
($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of fructose on level of Caspase-3/7 enzymatic activity in radiation-treated AHH-1 cells ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度值	F 值	P 值
正常组	120 709.67 ± 2 305.79		0.000
照射组	137 101.33 ± 2 466.42		0.000
照射果糖 (μmol/L)	0.001 129 342.00 ± 403.73	67.147	
	0.010 121 742.66 ± 478.13		0.000
	0.100 118 394.00 ± 1 199.59		0.000

2.3 果糖对 Caspase-9、Bax、Bcl-2 mRNA 和蛋白在照射后细胞组织中的表达变化影响

AHH-1 细胞照射后 6 h 于 RT-PCR、Western blot 检测发现,照射组与正常组比较,Caspase-9 与 Bax mRNA 和蛋白的表达上调,Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达下调($P<0.05$,图 2、

3,表 3);0.001~0.100 $\mu\text{mol/L}$ 果糖干预组 Caspase-9、Bax mRNA 和蛋白的表达下调,Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达上调,较照射组差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2、3,表 3)。本实验观察到果糖能促进 Bcl-2 基因的表达,抑制 Caspase-9 和 Bax 基因的表达且具有浓度依赖性。

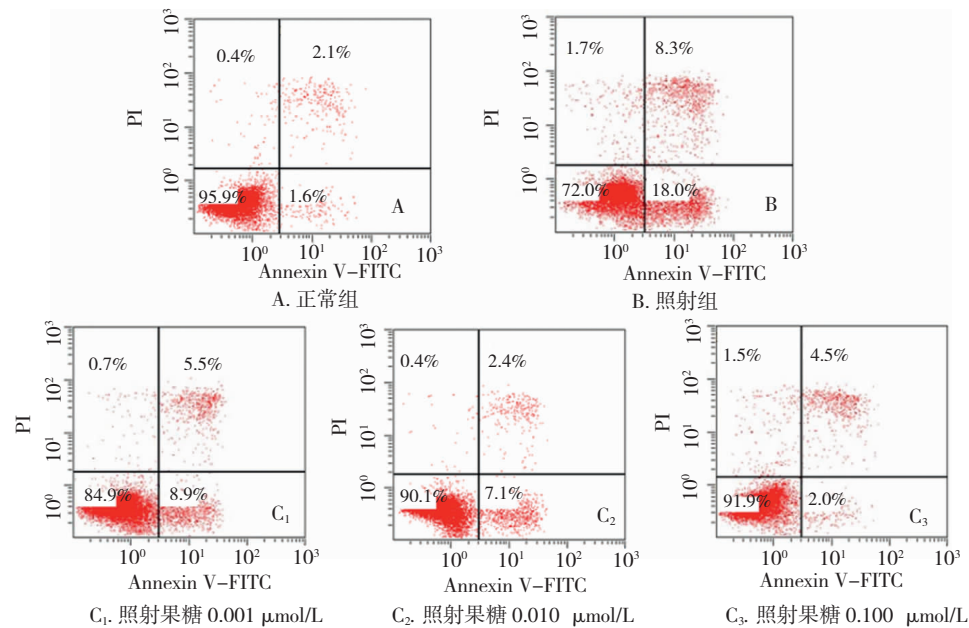
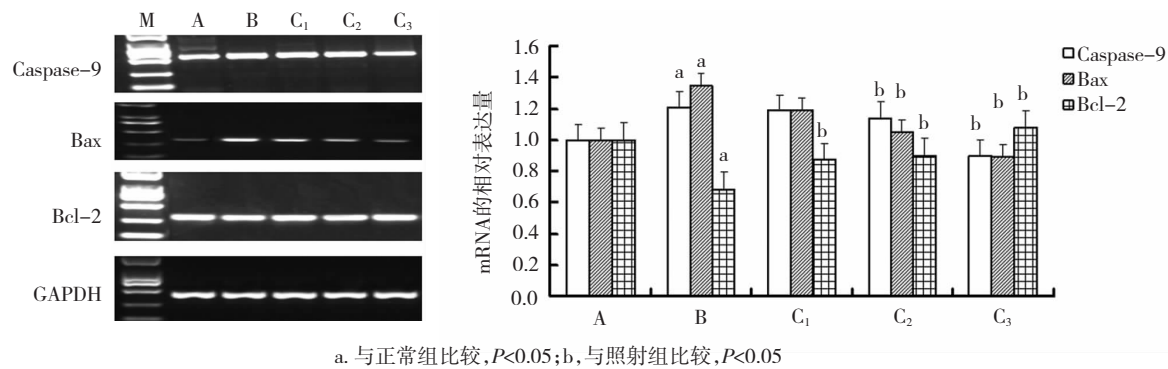


图 1 果糖对经 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后 AHH-1 细胞凋亡的影响
Fig.1 Effects of fructose on apoptosis of AHH-1 cells after $^{60}\text{Co}\gamma$ ray irradiation



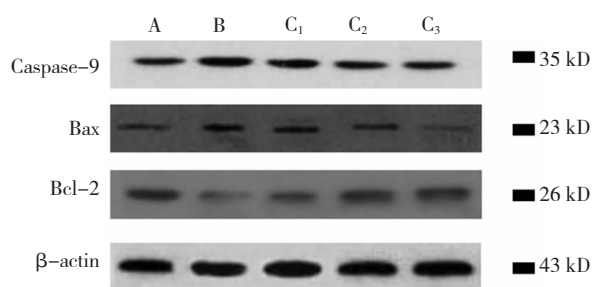
a. 与正常组比较, $P<0.05$; b. 与照射组比较, $P<0.05$
M. marker; A. 正常组; B. 照射组; C₁. 照射果糖 0.001 $\mu\text{mol/L}$; C₂. 照射果糖 0.010 $\mu\text{mol/L}$; C₃. 照射果糖 0.100 $\mu\text{mol/L}$

图 2 果糖对照射后 AHH-1 细胞中 Caspase-9、Bax、Bcl-2 mRNA 的表达影响

Fig.2 Effects of fructose on expressions of Caspase-9, Bax and Bcl-2 genes in radiation-treated AHH-1 cells

表 3 果糖对照射后 AHH-1 细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-9 的蛋白表达量影响及其比较

Tab.3 Effects of fructose on expressions of apoptosis-related proteins: Bcl-2, Bax and Caspase-9 in radiation-treated AHH-1 cells and their comparisons							
组别	例数 (n)	Caspase-9		Bax		Bcl-2	
		Caspase-9/ β -actin	P 值	Bax/ β -actin	P 值	Bcl-2/ β -actin	P 值
正常组	5	0.326 $\pm$ 0.021	0.000	0.250 $\pm$ 0.023	0.000	0.287 $\pm$ 0.018	0.000
照射组	5	0.566 $\pm$ 0.020		0.448 $\pm$ 0.035		0.120 $\pm$ 0.038	
照射果糖 ($\mu\text{mol/L}$)	0.001	0.485 $\pm$ 0.022	0.000	0.392 $\pm$ 0.022	0.002	0.199 $\pm$ 0.012	0.001
	0.010	0.395 $\pm$ 0.026	0.000	0.267 $\pm$ 0.030	0.000	0.248 $\pm$ 0.032	0.000
	0.100	0.303 $\pm$ 0.030	0.000	0.196 $\pm$ 0.014	0.000	0.268 $\pm$ 0.018	0.000
F 值		95.976		82.728		88.282	



A. 正常组; B. 照射组; C₁. 照射果糖 0.001 μmol/L; C₂. 照射果糖 0.010 μmol/L; C₃. 照射果糖 0.100 μmol/L

图 3 果糖对照射后 AHH-1 细胞中 Bcl-2、Bax、Caspase-9 蛋白的表达影响

Fig.3 Effects of fructose on expressions of apoptosis-related proteins; Bcl-2, Bax and Caspase-9 in radiation-treated AHH-1 cells

3 讨论

射线对生物体产生的直接效应和通过电离离而产生的间接效应,使细胞细胞受损和死亡。近年来研究发现,细胞通过细胞修复、细胞周期阻滞或细胞凋亡的精密机制对 DNA 损伤作出反应。因此,辐射后细胞死亡的主要形式不是细胞被动性死亡,而是主动反应形式,即细胞凋亡^[3]。

⁶⁰Coγ 射线诱导的细胞凋亡可能是通过激活 Caspase、Bax,抑制 Bcl-2 的机制而发生的。Caspase 蛋白酶家族在细胞凋亡过程中扮演重要角色,为细胞凋亡信号的传导者及细胞凋亡的执行人。⁶⁰Coγ 射线照射损伤细胞 DNA,激发凋亡信号,首先触发 Caspase 启动者 Caspase-8 和 Caspase-9,通过 Caspase 的级联反应,激活下游 Caspase 执行者 Caspase-3/7^[4];Bcl-2 基因是凋亡抑制基因,通过多基因参与细胞凋亡调节,如 Bcl-2xl、E1B-19K 及 Mcl-1 等可以抑制细胞凋亡,而与此相反 Bcl-xs、Bax、Bak 及 AI 等具有与 Bax 类似的功能可以诱导细胞凋亡^[5],他们彼此之间大多数可以形成二聚体,进而形成一个复杂的基因调控网络。

近年来文献报道果糖能通过组织因子、肾素-血管紧张素系统,血管细胞黏附分子-1,细胞间黏附分子及糖化终末产物受体活化,促进造血功能;调节糖酵解,促进机体正常能量代谢以及增强机体抗氧化能力和免疫力;纠正脂肪酸 β 氧化功能紊乱;稳定

细胞膜,维持细胞内外渗透压平衡^[6]。实验研究已证实调节细胞因子,提升正向造血调控因子和免疫因子表达,抑制负向调控因子表达,促进造血调控相关的信号转导因子分泌,影响整个造血调控网络,与防辐射作用密切相关。

本实验运用 MTS 法显示:果糖能显著提高照射后 AHH-1 细胞存活率且呈剂量依赖性。流式细胞仪检测证实果糖可抑制照射后 AHH-1 细胞凋亡。通过 RT-PCR 和 Western blot 分析细胞 Caspase-9、Bax、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达的变化,说明果糖抑制凋亡的发生可能与促凋亡因子 Bax、Caspase-9 表达的降低和凋亡抑制因子 Bcl-2 表达的升高密切相关。

实验显示果糖可能对电离辐射诱发 AHH-1 细胞凋亡具有一定保护作用,但辐射损伤机制复杂且作用靶点多样化,通过果糖的研究仅仅只提供了抗辐射损伤作用机制及调控网络的线索,若要阐明果糖起辐射损伤的防治作用,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 高月,马增春.辐射损伤防治药物发展历史与展望[J].辐射防护通讯,2009,29(5):30-35.
- [2] Gao Y, Ma Z C. History and trends in the development of radioprotective agents[J]. Radiation Protection Bulletin, 2009, 29(5): 30-35.
- [3] Yi Y D, Chang I M. An overview of traditional Chinese herbal formulae and a proposal of a new code system for expressing the formula titles[J]. Altern Med, 2004, 1(2): 125-132.
- [4] Pavicic I, Trosic I. In vitro testing of cellular response to ultra high frequency electromagnetic field radiation[J]. Toxicol In Vitro, 2008, 22(5): 1344-1348.
- [5] Meyn R E, Milas L, Ang K K. The role of apoptosis in radiation oncology[J]. International Journal of Radiation Biology, 2009, 85(2): 107-115.
- [6] 李民英,陈龙华,陆小军,等. NAD⁺对受照射 L02 肝细胞株 bcl-2、bax、p53 蛋白表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(18): 3323-3326.
- [7] Li M Y, Chen L H, Lu X J, et al. Effect of NAD⁺ on Bcl-2, Bax and p53 protein expressions in L02 cells under irradiation[J]. The Journal of Practical Medicine, 2010, 26(18): 3323-3326.
- [8] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749-762.

(责任编辑:关蕴良)