

γ 射线诱导肠上皮细胞氧化损伤在其凋亡中的作用

贾莉^{1a}, 那晓琳^{1a}, 于佳^{1a}, 孙闯², 王彦军³, 高虹^{1b}

摘要: [目的] 探索 γ 射线诱导肠上皮细胞氧化损伤在其凋亡中的作用, 为进一步阐明其凋亡机制提供科学依据。

[方法] 选择成年健康大鼠为研究对象, 分离并培养大鼠小肠上皮细胞, 在室温下以0、1、6、12、18 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射24 h, 照射完毕继续培养, 收集后采用相应的试剂盒检测细胞凋亡情况以及活性氧、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶的水平。[结果] 6、12、18 Gy剂量组肠上皮细胞凋亡率分别为7.03%、14.87%和27.95%, 均高于对照组($P<0.05$), 且随着照射剂量的增加而升高。与对照组相比: 6、12、18 Gy剂量组细胞内活性氧含量分别增加了38.13%、102.53%、215.08%, 呈现升高的趋势; 谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶含量分别下降了10.26%、55.77%、71.09%和18.32%、32.92%、60.99%, 均呈现逐渐降低的趋势; 1、6、12、18 Gy剂量组细胞内超氧化物歧化酶含量分别下降了20.18%、42.46%、59.04%、75.71%, 呈现降低的趋势; 过氧化氢酶含量分别下降了20.75%、48.19%、60.33%、71.15%, 呈现逐渐下降的趋势; 差异均有统计学意义($P<0.05$)。[结论] γ 射线照射可以启动组织细胞的脂质过氧化反应, 破坏小肠上皮细胞抗氧化系统, 导致活性氧堆积, 细胞处于氧化应激状态, 细胞受损, 凋亡率增高。

关键词: γ 射线; 活性氧; 肠上皮细胞; 凋亡; 放射性损伤

Role of Oxidative Damage Induced by Gamma Irradiation in Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells
JIA Li^{1a}, NA Xiao-lin^{1a}, YU Jia^{1a}, SUN Chuang², WANG Yan-jun³, GAO Hong^{1b} (1.a.Environmental Health Department b.Sanitary Microorganisms Department, School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150081, China; 2.Harbin Center for Disease Control and Prevention, Harbin, Heilongjiang 150081, China; 3.Center for Disease Control and Prevention of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150081, China). Address correspondence to GAO Hong, E-mail: gaohong9602@163.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the effect of oxidative damage induced by gamma irradiation on the apoptosis of intestinal epithelial cells, and provide a scientific basis for further clarifying relevant mechanism. [Methods] Adult healthy rats were used to isolate and culture small intestinal epithelial cells and exposed under 0, 1, 6, 12, and 18 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ irradiation for 24 h. Apoptosis rate, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), and glutathione peroxidase (GSH-px) were detected using corresponding kits. [Results] The apoptosis rates of intestinal epithelial cells in the 6, 12, and 18 Gy groups were 7.03%, 14.87%, and 27.95%, respectively, higher than that in the control group ($P<0.05$) and increasing with higher irradiation doses. Compared with the control group, the levels of ROS in intestinal epithelial cells of the 6, 12, and 18 Gy groups increased by 38.13%, 102.53%, and 215.08%, respectively, displaying a rising trend. The levels of GSH (by 10.26%, 55.77%, and 71.09%) and GSH-px (by 18.32%, 32.92%, and 60.99%) decreased with the increase of gamma ray dose. The levels of SOD in intestinal epithelial cells of the 1, 6, 12, and 18 Gy groups decreased by 20.18%, 42.46%, 59.04%, and 75.71%, and the levels of CAT decreased by 20.75%, 48.19%, 60.33%, and 71.15%, respectively, with statistical differences ($P<0.05$). [Conclusion] Gamma ray irradiation can initiate lipid peroxidation of tissues and cells, damage the antioxidant systems of intestinal epithelial cells, and accumulate ROS, which leads to cell oxidative stress, injury, and elevated apoptosis rate.

Key Words: gamma ray; reactive oxygen species; intestinal epithelial cell; apoptosis; radiation injury

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15517

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(编号: 12531337)

[作者简介] 贾莉(1979—), 女, 博士, 副教授; 研究方向: 环境化合物毒性; E-mail: jiali1013@163.com

[通信作者] 高虹, E-mail: gaohong9602@163.com

[作者单位] 1.哈尔滨医科大学公共卫生学院 a.环境卫生学教研室 b.卫生微生物教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2.哈尔滨市疾病预防控制中心, 黑龙江 哈尔滨 150081; 3.黑龙江省疾病预防控制中心, 黑龙江 哈尔滨 150081

放射治疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一, 治疗过程中放射线会损伤正常器官和组织。肠是对辐射敏感的靶器官之一, 尤其是小肠隐窝干细胞对辐射高度敏感^[1]。辐射损伤后, 肠道黏膜屏障功能减弱甚至消失, 肠道细菌及细胞分解产物进入血循环后引起的菌血症和毒血症是重要致死因素。国内外研究发现, 在照射 γ 射线24 h后, 基因表达的改变涉及到多种分子

功能、细胞组分及生物学过程的改变,主要包括细胞凋亡、信号通路、细胞周期及DNA损伤与修复相关基因的改变^[2-5]。研究显示,选择不同受照剂量及在照后不同时间点,通过观察离体组织细胞基因表达谱的变化,研究人员发现了一些有意义的差异基因和信号通路^[6]。另外有研究发现,辐射诱导细胞凋亡过程中,其诱导的生物分子损伤与自由基生成密切相关^[7]。然而,对动物小肠细胞进行 γ 射线离体照射是否可引起细胞氧化损伤,以及其在肠细胞凋亡中所起的作用,目前尚无报道。因此本研究以离体大鼠小肠上皮细胞为实验材料,检测照射后24h后细胞凋亡和氧化损伤情况,探索其在凋亡中的作用,为进一步阐明其机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

无菌超净工作台/SF-100CZ(深圳市云峰净化技术有限公司,中国),CO₂培养箱/Midi40(赛默飞世尔科技实验室,美国),荧光倒置显微镜/Leica DMI3000(徕卡显微系统上海贸易有限公司,中国),酶标仪/FlexStation 3(美谷分子仪器上海有限公司,中国),液氮罐(河南天驰仪器设备有限公司,中国),超纯水器/Mili-Q(Milipore,美国),低温超速离心机/MIKRO 220R(HETTICH,德国),-80℃冰箱/705型(赛默飞世尔科技实验室,美国),流式细胞仪/FACSCalibur(BD,美国)。

大鼠小肠上皮细胞、DMEM培养基(赛默飞世尔科技实验室,美国),10%(体积分数)灭活小牛血清(上海基免实业有限公司,中国),100 μ g/mL的青、链霉素(上海亨代劳商贸有限公司,中国),活性氧(ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术研究所,中国),Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司,中国),谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(南京建成生物有限公司,中国)。

1.2 实验方法与步骤

大鼠小肠上皮细胞的分离、培养及鉴定参照王莉等^[8]建立的方法。将获得的肠上皮细胞37℃培养于DMEM培养基,加10%(体积分数)灭活小牛血清和100 μ g/mL的青、链霉素,细胞60%融合时,换液,室温下以0(对照)、1、6、12、18 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射24h,照射完毕继续培养,收集以备检测各项指标。

采用Annexin V试剂盒检测细胞凋亡。细胞经罗丹明123染色后采用流式细胞术检测ROS的产生。采用试剂盒检测细胞内GSH、GSH-Px、SOD、CAT的水平或活性,每个指标分别检测6次,取平均值。

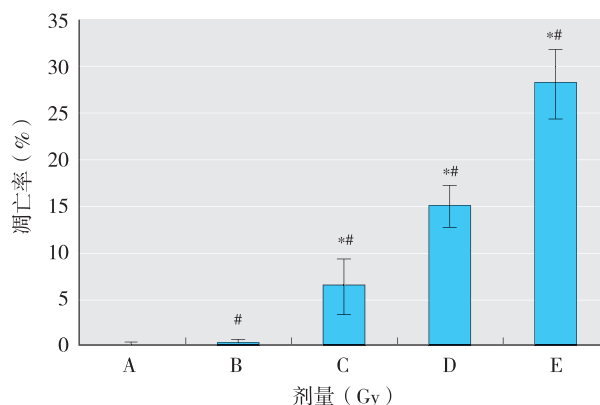
1.3 统计学分析

数据录入Excel 2007后经SPSS 18.0软件分析。计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析及Student-Newman-Keuls检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞凋亡

照射24h后,6、12、18 Gy剂量组肠上皮细胞凋亡率分别为7.03%,14.87%,27.95%。与阴性对照组相比,各剂量组细胞凋亡率升高($P<0.05$),且随着照射剂量的增加而升高。见图1。



[注]A.0 Gy; B.1 Gy; C.6 Gy; D.12 Gy; E.18 Gy; *:与对照组相比, $P<0.05$ ($F=19.69$, $P<0.0001$); #:1、6、12、18 Gy剂量组之间两两比较, $P<0.05$ 。

图1 不同剂量 γ 射线照射小肠上皮细胞24h后细胞凋亡情况

2.2 ROS、GSH、GSH-Px、SOD、CAT水平

γ 射线照射诱导肠上皮细胞后:与对照组相比,6、12、18 Gy剂量组细胞内ROS含量分别增加了38.13%,102.53%,215.08%,呈现升高的趋势;GSH、GSH-Px含量分别下降了10.26%,55.77%,71.09%和18.32%,32.92%,60.99%,均呈现逐渐降低的趋势;差异均有统计学意义($P<0.05$)。

与对照组相比,1、6、12、18 Gy剂量组细胞内SOD含量分别下降了20.18%,42.46%,59.04%,75.71%,呈现降低的趋势;CAT含量分别下降了20.75%,48.19%,60.33%,71.15%,呈现逐渐下降的趋势;差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 γ 射线照射小肠上皮细胞24h后细胞内各指标水平($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别(Gy)	ROS(U/mg蛋白)	GSH(mg/g蛋白)	GSH-Px(U/mg蛋白)	SOD(NU/mL)	CAT(U/L)
0	64.51 ± 7.81	256.45 ± 21.36	149.80 ± 5.41	87.23 ± 5.17	140.37 ± 4.18
1	68.27 ± 6.20 [#]	244.83 ± 17.71 [#]	130.63 ± 4.79 [#]	69.63 ± 4.48 [#]	111.25 ± 3.29 [#]
6	89.11 ± 10.31 ^{**}	230.15 ± 15.20 ^{**}	122.36 ± 5.98 ^{**}	50.19 ± 3.35 ^{**}	72.73 ± 4.71 ^{**}
12	130.65 ± 15.47 ^{**}	113.42 ± 9.60 ^{**}	100.49 ± 4.01 ^{**}	35.73 ± 3.05 ^{**}	55.68 ± 5.24 ^{**}
18	203.26 ± 19.86 ^{**}	74.14 ± 8.48 ^{**}	58.44 ± 4.13 ^{**}	21.19 ± 2.38 ^{**}	40.49 ± 4.04 ^{**}

[注]*: 与阴性对照组相比, $P < 0.05$ ($F_{ROS}=165.63$, $P < 0.0001$; $F_{GSH}=107.90$, $P < 0.0001$; $F_{GSH-Px}=91.37$, $P < 0.0001$; $F_{SOD}=52.75$, $P < 0.0001$; $F_{CAT}=174.36$, $P < 0.0001$); #: 1、6、12、18Gy剂量组之间两两比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

随着腹部肿瘤放射化疗技术的广泛应用,放射性肠损伤的发病率呈逐年上升趋势^[9]。细胞凋亡是辐射诱导肠上皮细胞损伤的主要途径^[10]。本研究显示,随着照射剂量的增加,细胞凋亡率呈现上升趋势,说明 γ 射线能够诱导肠上皮细胞凋亡。

已有研究表明,辐射诱导肠上皮细胞凋亡涉及p53、核因子 κ B(NF- κ B)、Toll样受体5(TLR5)配体及其信号通路等途径^[2]。由于肠上皮细胞凋亡是多因子共同作用的结果,在凋亡的进程中存在多因素的诱导或抑制作用。ROS可能是细胞凋亡发生过程中普遍存在的中间介质^[11]。研究发现辐射诱导生物分子损伤与自由基生成密切相关^[12], γ 射线是一种重要的电离辐射,它能导致机体中水分解产生自由基,引起脂质过氧化,即机体在射线的激发下可出现不同程度的氧化损伤。本研究中,经不同剂量 γ 射线照射后,肠上皮细胞内ROS含量随着照射剂量的增加而增加。辐射所产生的ROS可通过脂质过氧化作用造成生物膜中饱和和不饱和脂肪酸的比例失衡,膜结构的刚柔特性改变,膜的通透性增加等;自由基还对膜酶有损伤作用。体内过多的自由基通过攻击生物大分子及细胞造成机体在分子水平、细胞水平的各种损伤^[12]。

抗氧化酶是机体内重要的抗氧化物质,抗氧化酶可以清除自由基,对辐射损伤具有防护作用。细胞主要依赖酶类与非酶类的抗氧化防御系统来减轻辐射损伤^[13-14],其中包括SOD、CAT、GSH-Px。SOD对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,它能清除超氧阴离子 $O_2^{\cdot-}$,可以把有害的超氧自由基转化为过氧化氢。尽管过氧化氢仍是对机体有害的ROS,但体内活性极强的GSH-Px则能使过氧化氢迅速清除分解为完全无害的水。两者共同作用能有效地阻止细胞受过氧化的损伤。本实验研究结果发现,随着 γ 射线剂量的增加,细胞内SOD、GSH、GSH-Px、CAT含量均呈现逐渐降低的趋势($P < 0.05$)。提示 γ 射线照射可以

启动组织细胞的脂质过氧化反应,小肠上皮细胞抗氧化系统遭受破坏,ROS堆积,细胞处于氧化应激状态,细胞受损,凋亡率增高。本研究结果为 γ 射线照射所致放射损伤机制研究提供了一条新的途径。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1]李明,曹建平,张学光.放射性肠损伤发病机制研究进展[J].中华放射医学与防护杂志,2012,32(4):439-443.
- [2]王瑞娟,彭瑞云,高亚兵,等.PI3K/Akt通路在中子和 γ 线致大鼠肠上皮细胞损伤中的变化及IL-11的调控作用[J].中国体视学与图像分析,2014,19(2):196-203.
- [3]李小明,童新,宋天保,等. γ -射线诱导HL-60细胞凋亡的观察[J].西安医科大学学报,2000,21(5):399-401,444.
- [4]焦建峰,陈冠英,黄枚.rhTFAR19蛋白质对 γ 射线诱导MCF-7细胞周期及凋亡影响的初步研究[J].中华肿瘤杂志,2000,22(2):102-104.
- [5]Azimian H, Bahreyni-Toossi MT, Rezaei AR, et al. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation[J]. J Med Phys, 2015, 40(1):38-44.
- [6]梁欣,李文丽,海春旭,等. γ 射线照射引起氧化损伤促进衰老[J].癌变·畸变·突变,2010,22(5):335-338.
- [7]Qiu W, Leibowitz B, Zhang L, et al. Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis[J]. Oncogene, 2010, 29(11):1622-1632.
- [8]王莉,段相林.大鼠小肠上皮细胞的体外原代培养[J].军事医学科学院院刊,2004,28(1):61-63.
- [9]万芝清.胃、十二指肠放射性肠损伤的临床观察与实验研究[D].大连:大连医科大学,2013.
- [10]Anuranjani MB. Concerted action of Nrf2-ARE pathway, MRN complex, HMGB1 and inflammatory cytokines-implication in modification of radiation damage[J]. Redox Biol, 2014(2):831-846.

(下转第774页)

本研究结果中,脑、骨骼肌ETR-B mRNA表达量在中、高强度组出现标准差过大的现象,同时骨骼肌组织中ETR的水平有与脑组织中的变化不一致的表现,即脑组织中ETR mRNA相对含量变化具有规律性,而在骨骼肌中的表达却无明显的规律性,可能与以下因素有关:①后肢骨骼肌组织在振动实验过程中,除了受到血管痉挛而致的组织缺血缺氧、生化因子改变的影响之外,还受到振动的直接机械性损伤刺激;②骨骼肌ETR-A mRNA、ETR-B mRNA在对照组也有较大差异,可能是这两种受体振动实验后在各强度组变化规律不同的原因之一;③样本含量较小。确切的原因还需进一步研究。

综上,通过本研究,初步发现家兔接振后组织中ETR的变化以及这种变化在振动性血管损伤中的作用和机制;也为我们今后的研究提出了方向,即可以通过ETR的拮抗或阻断来防治振动性血管损伤。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Kohout J, Topolcan O, Bejcková H. The serum level of endothelin in patients with hand-arm vibration syndrome[J]. Cent Eur J Public Health, 1995, 3 Suppl: 43-44.
- [2] Palmer KT, Mason H. Serum endothelin concentrations in workers exposed to vibration[J]. Occup Environ Med, 1996, 53(2): 118-124.
- [3] 林立, 张春之, 聂继池, 等. 局部振动对家兔血浆内皮素浓度的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18(3): 137-139.
- [4] 曾晓立, 李召军, 赵广臣, 等. 振动对机体影响实验研究中动物接振方式的设计与评价[J]. 济宁医学院学报, 1995, 18(2): 18-19.
- [5] 林立, 张璟, 郭堂春. 煤矿掘进工手部循环功能与血管内皮活性物质的关系[J]. 环境与职业医学, 2010, 27(8): 460-463.
- [6] Krajnak KM, Waugh S, Johnson C, et al. The effects of impact vibration on peripheral blood vessels and nerves[J]. Ind Health, 2013, 51(6): 572-580.
- [7] Wehland M, Ma X, Braun M, et al. The impact of altered gravity and vibration on endothelial cells during a parabolic flight[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(2/3): 432-451.
- [8] 汤旭磊. 内皮素受体研究进展[J]. 兰州医学院学报, 2000, 26(1): 58-61.
- [9] Lüscher TF, Wenzel RR. Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications[J]. Agents Actions Suppl, 1995, 45: 237-253.
- [10] Leonard MG, Briyal S, Gulati A. Endothelin B receptor agonist, IRL-1620, reduces neurological damage following permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res, 2011, 1420: 48-58.
- [11] Kuc RE, Carlebur M, Maguire JJ, et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension[J]. Life Sci, 2014, 118(2): 391-396.
- [12] 林立, 张春之, 隋桂英, 等. 局部振动对家兔外周血中脂质过氧化物的影响[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(3): 218-220.
- [13] Zicha J, Dobešová Z, Kuneš J, et al. Chronic endothelin A receptor blockade attenuates contribution of sympathetic nervous system to salt hypertension development in adult but not in young Dahl rats[J]. Acta Physiol (Oxf), 2012, 205(1): 124-132.
- (收稿日期: 2015-12-15)
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)
-
- (上接第770页)
- [11] Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, et al. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways[J]. Front Oncol, 2012, 2: 88.
- [12] 张伟, 秦秀军, 许超琪, 等. γ 射线照后不同时间点人肝细胞基因差异表达谱的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(6): 416-420.
- [13] Bonnaud S, Niaudet C, Legoux F, et al. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis[J]. Cancer Res, 2010, 70(23): 9905-9915.
- [14] Fang YJ, Moore BJ, Bai Q, et al. Hydrogen peroxide enhances radiation-induced apoptosis and inhibition of melanoma cell proliferation[J]. Anticancer Res, 2013, 33(5): 1799-1807.
- (收稿日期: 2015-09-02)
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)