文章编号:1000-5404(2005)06-0471-03

论著

三羟异黄酮对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞的保护作用

周 永[1],糜漫天[1],杨镇洲[2] (第三军医大学:[1]预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所肿瘤中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨三羟异黄酮(genistein, GEN)对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)的保护作用。**方法** 成年雄性小鼠辐射前24 h给予GEN,6.0 Gy γ射线辐射后观察BMSCs的形态变化、成纤维细胞集落(CFU-F)形成数量、BMSCs层对正常小鼠骨髓细胞(BMCs)的粘附能力以及血管细胞粘附分子(VCAM-1)、纤维连接素(Fn)和层粘素(Ln)等细胞粘附分子的变化。**结果** GEN处理组辐射后BMSCs虽然形态上与单纯辐射损伤组在光镜下无差异,但其CFU-F形成数量、对正常BMCs的粘附能力以及VCAM-1、Fn和Ln等细胞粘附分子的表达均较单纯辐射损伤组高而且恢复较快。**结论** GEN可减小辐射对小鼠BMSCs的损伤,促进受损BMSCs增殖、粘附功能恢复,改善骨髓造血微环境,有利于辐射损伤小鼠造血重建,具有辐射防护作用。

关键词: 三羟异黄酮;辐射损伤;骨髓基质细胞;细胞粘附分子
中图法分类号: R322.71; R818.74; R977.12 **文献标识码:** A

Radioprotective potential of genistein on murine bone marrow stromal cells

ZHOU Yong[1], MI Man-tian[1], YANG Zhen-zhou[2] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Chongqing 400038, [2]Oncology Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the radioprotective effect of genistein (GEN) on murine bone marrow stromal cells (BMSCs). **Methods** Adult male mice were administered orally with GEN at 24 h prior to 6.0 Gy gamma irradiation. The number of CFU-F, the adherent capability of bone marrow cells (BMCs) to BMSCs adherence layer, and the expressions of cell adhesion molecules including vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), fibronectin (Fn), and laminin (Ln) on BMSCs cultured *in vitro* were detected, respectively. **Results** The number of CFU-F, the adherent capability, the expressions of VCAM-1, Fn, and Ln on BMSCs cultured *in vitro* in GEN-pretreated mice were higher and recovered more rapidly than those in mice without GEN-pretreatment. Light microscopy revealed that there was no significant difference in morphology of BMSCs in both groups after irradiation injury. **Conclusion** These observations suggest that radioprotective properties associated with GEN are largely a consequence of the reduction of damage, the induction of cell proliferation, and the promotion of adherent capability recovery in recipient mice. These changes may ultimately ameliorate bone marrow microenvironment and therefore accelerate the rebuilding of hematopoietic system after irradiation injury.

Key words: genistein; irradiation injury; bone marrow stromal cell; cell adhesion molecule

雌激素是研究较多的一类的辐射防护剂,由于毒副作用大,特别是对生殖系统的雌活性大大制约了其在临床上的应用。三羟异黄酮(genistein, GEN)是大豆中非常重要的营养成分,是一类重要的天然雌激素,具有抗氧化、抑制酪氨酸蛋白激酶活性、模拟和拮抗雌激素作用等多种生理活性[1,2],对多种肿瘤(如乳腺癌、前列腺癌等)[3,4]和一些慢性病(如骨质疏松和心血管疾病等)[5,6]有防治作用。近年来有报道,GEN具有辐射防护作用,对放射性造血损伤的重建有促进作用,且对生殖系统无明显雌活性[7~10],但具体的分子机制尚不清楚。骨髓微环境是造血干/祖细胞定居、增殖、分化、发育和成熟的场所。骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是造血微环境的重要组成部分,造血微环境的异常是造血功能障碍的重要影响因素。放射性造血功能障碍是射线对造血实质细胞和造血微环境共同损伤的结果。本实验主要研究GEN对辐射损伤小鼠BMSCs的保护作用,初步探讨其辐射防护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

本校实验动物中心繁殖的昆明种健康雄性小鼠300只,体

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100046)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100046)
作者简介:周 永(1972-),女,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291
通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2004-12-27;修回日期:2005-01-15

质量 23～26 g，随机分为 3 组，每组 100 只：①正常对照组（Control）；②辐射损伤对照组（R）；③GEN + 辐射损伤组（GEN + R）。给药方式：辐射前 24 h，GEN（西安交大保赛生物技术股份有限公司，纯度≥98%）以食用色拉油作为溶剂，按 160 mg/kg 给予灌胃，每只约 0.1 ml。小鼠装在弧形有机玻璃盒内，以 ^{60}Co γ 射线一次性全身照射，吸收剂量为 6.0 Gy，吸收剂量率为 98.68×10^{-2} Gy/min。取辐射后 1、3、7、14 d 和 21 d 小鼠骨髓细胞（bone marrow cells，BMCs）进行体外培养，分别对培养 14 d 和 28 d 的 BMSCs 进行检测。实验重复 3 次，每次实验均设正常对照组。

1.2 BMSCs 培养

在各个时相点取 20 只小鼠双侧股骨制备 BMCs，按常规方法培养 BMSCs。

1.3 成纤维细胞集落形成单位（CFU-F）的培养

BMCs 以含 10% 新生小牛血清、10% 马血清、青链霉素各 100 U/ml、1×10^{-6} mol/L 氢化考的松和 IMDM 培养液制备成 1×10^6/ml，混匀后接种于 24 孔板，每孔 2 ml，每组重复 6 个孔，37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养，每周半量换液，第 14 天于倒置显微镜下计数，由 40 个以上细胞组成的集落为 1 个 CFU-F。

1.4 BMSCs 贴壁层粘附能力测定

将上述骨髓 CFU-F 继续培养，第 28 天基质细胞层形成后，用 PBS 液轻轻冲洗 2 次，去除悬浮细胞后，各孔加入细胞浓度为 5×10^5/ml 的含 20% 小牛血清的正常小鼠 BMCs 1 ml，37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育 2 h，用 IMDM 培养液轻轻冲洗 2 次，收集并计数未粘附的 BMCs，按照下列公式计算 BMSCs 对正常 BMCs 的粘附能力。

$$\text{粘附能力} = \left(1 - \frac{\text{未粘附细胞数}}{5 \times 10^5}\right) \times 100\%。$$

1.5 流式细胞仪检测 BMSCs 粘附分子的表达

BMSCs 培养 28 d 后，收集各组细胞，台盼蓝染色判定 BMSCs 的成活率为 95% 以上。采用间接免疫荧光法，在各样本管中分别加入一抗（VCAM-1、Fn 和 Ln 等单抗）；阴性对照用 PBS 代替一抗，4 ℃过夜离心弃上清，PBS 洗 3 次。分别加 FITC 标记的二抗，37 ℃孵育 30 min，离心弃上清，PBS 洗 3 次，FCM 分析并计算各指标的荧光强度变化。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 辐射损伤后 BMSCs 形态观察

光镜下，正常小鼠 BMSCs 呈梭形、多角形，胞浆丰富，胞体较大且伸展，伪足明显；胞核居中或偏位，呈圆形或椭圆形，核仁单个或两个以上；细胞贴壁快，呈漩涡状或平行样生长，21 d 长满培养瓶。辐射受损 BMSCs 形态不规则，胞体较短小，排列散乱，胞浆呈撕裂状，胞核不清楚；细胞增殖能力明显受抑，贴壁能力大大降低；随着培养时间的延长，在光镜下可看见一些结构模糊的变性细胞。特别是辐射后第 3 天，骨髓中有核细胞较少，细胞极少贴壁；辐射后第 7 天，细胞形态、贴壁能力才逐渐开始恢复，培养 28 d 后细胞融合仍然较差。R 组与 GEN + R 组的细胞形态差异不明显。

2.2 GEN 对辐射损伤后 CFU-F 数量的影响

从表 1 可知，辐射后各时相点 CFU-F 形成数量均少于正常组，且恢复缓慢，直至辐射后 21 d，CFU-F 形成数量仍低于正常组，仅为正常的 35% 左右（$P < 0.05$）。与 R 组比较，GEN + R 组 BMSCs 贴壁能力较强且恢复较快。除辐射后第 3、7 天外，GEN + R 组 CFU-F 数量高于 R 组（$P < 0.05$）。

表 1 小鼠股骨骨髓体外培养 14 d CFU-F 的变化（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Changes of murine bone marrow CFU-F cultured *in vitro* for 14 d（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Group	Post-irradiation days				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Control	112 ± 21	109 ± 31	119 ± 19	125 ± 33	117 ± 27
R	23 ± 7[a]	7 ± 1[a]	q16 ± 6[a]	24 ± 5[a]	37 ± 15[a]
GEN + R	30 ± 11[ab]	8 ± 2[a]	18 ± 5[a]	33 ± 9[ab]	49 ± 19[ab]

a：$P < 0.05$，*vs* control group；b：$P < 0.05$，*vs* group R

2.3 GEN 对辐射损伤后 BMSCs 层粘附能力的影响

从表 2 可知，辐射后各组 BMSCs 贴壁层对正常小鼠 BMCs 粘附能力在各时相点均低于正常（$P < 0.05$），特别是辐射后第 3 天，细胞层粘附能力最低，7 d 后才逐渐开始恢复，但恢复较慢，直至辐射后 21 d，其粘附能力仅为正常的 60% 左右。除辐射后 3 d 外，GEN + R 组 BMSCs 贴壁层的粘附能力均较 R 组强（$P < 0.05$）。

表 2 小鼠 BMSCs 贴壁层对正常骨髓细胞的粘附能力（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 The adhesive rate of bone marrow cells to the adherence layer of stromal cells cultured *in vitro*（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Group	Post-irradiation days				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Control	73.1 ± 7.1	69.4 ± 5.7	75.5 ± 3.2	73.4 ± 4.6	70.9 ± 7.3
R	25.3 ± 8.1[a]	17.6 ± 3.3[a]	18.2 ± 5.7[a]	30.4 ± 2.4[a]	40.8 ± 5.2[a]
GEN + R	32.1 ± 7.7[ab]	16.5 ± 6.1[a]	20.2 ± 2.1[ab]	39.6 ± 4.1[ab]	50.1 ± 4.7[ab]

a：$P < 0.05$，*vs* control group；b：$P < 0.05$，*vs* group R

2.4 GEN 对辐射损伤后 BMSCs 表达粘附分子的影响

从表 3～5 可知，辐射后各时相点 BMSCs 表达 VCAM-1、Fn 和 Ln 的能力进行性降低（$P < 0.05$）。除表达 VCAM-1 于辐射后第 7 天逐渐开始恢复外，Fn、Ln 的表达于辐射后第 14 天才逐渐开始恢复，且恢复较慢，直至辐射后 21 d 仍然未恢复正常，仅分别为正常的 50%、48% 和 65% 左右。与 R 组比较，GEN + R 组 VCAM-1 和 Ln 的表达于辐射后 14、21 d 高于 R 组，Fn 的表达于辐射后 7、21 d 高于 R 组（$P < 0.05$）。

表 3 小鼠 BMSCs 表达 VCAM-1 的变化（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 3 Expressions of VCAM-1 on murine bone marrow stromal cells cultured *in vitro*（$n = 20$，$\bar{x} \pm s$）

Group	Post-irradiation days				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Control	35.75 ± 1.21	33.22 ± 1.12	38.57 ± 2.71	35.64 ± 2.05	36.33 ± 1.62
R	12.41 ± 1.31[a]	8.44 ± 0.79[a]	10.78 ± 0.33[a]	11.17 ± 0.52[a]	16.15 ± 1.11[a]
GEN + R	13.55 ± 0.95[a]	7.87 ± 0.49[a]	11.56 ± 1.01[a]	15.89 ± 0.85[ab]	21.37 ± 0.74[ab]

a：$P < 0.05$，*vs* control group；b：$P < 0.05$，*vs* group R

表 4　小鼠 BMSCs 表达 Fibronectin 的变化（$n=20$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4　Expressions of fibronectin on murine bone marrow stromal cells cultured *in vitro* ($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Post-irradiation days				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Control	47.65±2.87	49.32±1.99	44.56±2.04	46.81±3.11	48.58±1.97
R	18.33±1.02[a]	11.27±0.87[a]	7.59±0.41[a]	15.61±1.22[a]	21.77±0.82[a]
GEN+R	17.15±0.65[a]	10.74±1.01[a]	9.38±0.79[ab]	16.14±0.93[a]	29.53±1.49[ab]

a：$P<0.05$，*vs* control group；b：$P<0.05$，*vs* group R

表 5　小鼠 BMSCs 表达 Laminin 的变化（$n=20$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 5　Expressions of laminin on murine bone marrow stromal cells cultured *in vitro* ($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Post-irradiation days				
	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
Control	25.17±1.39	28.42±1.45	27.86±2.09	26.39±1.93	27.44±1.25
R	18.15±1.31[a]	9.97±1.79[a]	8.78±1.33[a]	11.17±1.52[a]	16.15±1.11[a]
GEN+R	20.74±0.95[a]	10.12±1.49[a]	9.36±1.01[a]	15.89±0.85[ab]	20.43±1.74[ab]

a：$P<0.05$，*vs* control group；b：$P<0.05$，*vs* group R

3　讨论

造血微环境是支持和调节造血细胞生长发育的内环境，BMSCs 是造血微环境的重要组成部分，通过与造血细胞的紧密接触及分泌细胞外基质（extracellular matrix，ECM）等调控机体造血过程。造血干/祖细胞与 BMSCs 间的相互粘附，是造血干/祖细胞增殖和分化的前提条件，而这种粘附过程需要造血干/祖细胞和 BMSCs 表达的细胞粘附分子（cell adhesion molecule，CAMs）发生特异性识别。研究表明，CAMs 是一类能介导细胞与细胞、细胞与 ECM 粘附的糖蛋白，它们由细胞产生并定位于膜上或释放到 ECM 中，是造血干/祖细胞回髓定位和信息传递的分子学基础，其中 VCAM-1、Fn、Ln 等是非常重要的 CAMs 之一，当造血干/祖细胞或 BMSCs 的粘附功能一方或双方受损，都将导致骨髓造血功能障碍。国内外研究表明，放射性造血功能障碍是射线对造血实质细胞和造血微环境共同损伤的结果。BMSCs 具有较高的辐射敏感性，引起轻度骨髓型急性放射病的 γ 线照射剂量即可引起 BMSCs 增殖分化抑制、CFU-F 形成减少、粘附功能降低等缺陷，且恢复较慢。

雌激素是一类重要的辐射防护剂，除雌二醇等天然雌激素外，人工合成的非甾体雌激素对放射性造血损伤均有一定的防护作用。早在 1943 年就有学者发现雌激素不仅可延长放射损伤小鼠的生存天数，还具有“升白”作用。尽管雌激素具有放射防护作用，但其对生殖系统的雌活性可导致严重的毒副作用，故应用受到很大的制约。GEN 是大豆中重要的非营养素成分之一，其结构与雌二醇非常相似，但雌活性仅为雌二醇的 $10^{-3}\sim10^{-2}$ 倍，是一种天然的植物雌激素，对人体无毒性。近年来有报道，GEN 可提高辐射损伤小鼠的 30 d 存活率，延长辐射损伤小鼠的平均存活天数，对生殖系统无明显雌活性[7~9]，具有辐射防护作用。我们以往研究发现，GEN 可减轻骨髓的放射性损伤，使辐射后小鼠外周血 WBC、骨髓有核细胞以及 CFU-S 下降幅度较单纯辐射损伤组小且恢复快[10]，但其分子作用机制尚不清楚。本实验观察了 GEN 对辐射损伤小鼠 BMNCs 的保护作用，并研究了其对 BMNCs 粘附能力以及相关 CAMs 表达的影响。结果显示，射线对 BMNCs 有明显的杀伤作用，使其 CFU-F 形成数量、粘附功能以及 CAMs 的表达显著降低；GEN 可减少射线对 BMNCs 的损伤并促进其增殖和分化，使骨髓细胞 CFU-F形成数量于辐射后 1、14、21 d 高于 R 组（$P<0.05$）；BMSCs 贴壁层粘附能力测定发现，除辐射后 3 d 外，GEN+R 组 BMSCs 贴壁层的粘附能力均较 R 组强（$P<0.05$）；进一步研究显示，GEN+R 组 VCAM-1 和 Ln 的表达于辐射后 14、21 d 高于 R 组，Fn 的表达于辐射后 7、21 d 高于 R 组（$P<0.05$）。提示，GEN 可通过减小辐射导致的 BMSCs 损伤、促进受损的 BMSCs 增殖分化和细胞粘附分子 VCAM-1、Ln、Fn 等的表达，改善 BMSCs 与造血实质细胞的粘附作用，进一步影响造血细胞的存活、定居、增殖、分化、发育和成熟，从而达到辅助机体造血重建的目的。该作用可能是 GEN 防护放射性造血损伤的重要作用机制之一，为其预防放射性造血系统损伤、改善骨髓微环境提供了理论依据。

参考文献：

[1] Power K A, Thompson L U. Ligand-induced regulation of ER alpha and ER beta is indicative of human breast cancer cell proliferation[J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 81(3): 209 - 221.

[2] Fang Y C, Chen B H, Huang R F, *et al*. Effect of genistein supplementation on tissue genistein and lipid peroxidation of serum, liver and low-density lipoprotein in hamsters[J]. J Nutr Biochem, 2004, 15(3): 142 - 148.

[3] Rao A, Coan A, Welsh J E, *et al*. Vitamin D receptor and p21/WAF1 are targets of genistein and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(6): 2143 - 2147.

[4] Jo E H, Hong H D, Ahn N C, *et al*. Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of licorice root (Glycyrrhiza uralensis Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(6): 1715 - 1719.

[5] Branca F. Dietary phyto-oestrogens and bone health[J]. Proc Nutr Soc, 2003, 62(4): 877 - 887.

[6] Mallis L M, Sarkahian A B, Harris H A, *et al*. Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phyto-estrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 796(1): 71 - 86.

[7] Landauer M R, Srinivasan V, Seed T M. Genistein treatment protects mice from ionizing radiation injury[J]. J Appl Toxicol, 2003, 23(6): 379 - 385.

[8] Foth D, Cline J M, Romer T. Effect of isoflavones on mammary gland and endomertrium of postmenopausal macaques[J]. Zentralbl Gynakol, 2000, 122(2): 96 - 102.

[9] Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, *et al*. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency[J]. Endocrinology, 1999, 140(4): 1893 - 1900.

[10] 周　永，糜漫天，杨镇洲. 三羟异黄酮对照射小鼠造血系统损伤的防护作用[J]. 中华放射医学与防护杂志，2005，25(1)：21 - 24.

（编辑　汪勤俭）