论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0866-03

三羟异黄酮对小鼠辐射损伤后造血功能的影响

周 永,糜漫天,朱俊东,郎海滨 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨三羟异黄酮(genistein, GEN)对辐射损伤造血功能的影响。**方法** 6.0 Gy γ射线一次全身照射BALB/c雄性小鼠复制出造血损伤模型。照射前24 h给予GEN灌胃(160 mg/kg体质量),分别观察照射后1、3、7、14、21、30 d不同时相点小鼠血清对粒单系集落形成单位(colony-forming unit-granulocyte/macrophage, CFU-GM)和红系集落形成单位(colony forming unit-erythroid, CFU-E)的支持或抑制活性。**结果** 辐射前24 h给予GEN,辐射后该组小鼠血清造血刺激活性显著增加,使正常小鼠骨髓有核细胞CFU-GM、CFU-E形成数量明显增多,而且对CFU-GM的刺激活性较CFU-E强。同时,该组小鼠照后血清对CFU-GM、CFU-E的抑制活性明显降低,但对CFU-E和CFU-GM的抑制活性差异不明显。**结论** 提高辐射损伤后小鼠血清刺激活性可能是GEN防护放射性造血损伤、促进受损造血系统重建的分子机制之一。

关键词: 三羟异黄酮;辐射损伤;血清

中图法分类号: R551;R818.74;R977.12 **文献标识码:** A

Effect of genistein on hematopoiesis in irradiated mice

ZHOU Yong, MI Man-tian, ZHU Jun-dong, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of genistein on the hematopoiesis in irradiated mice. **Methods** Adult male BALB/c mice were administered orally with genistein (160 mg/kg) 24 h before whole body exposure to gamma irradiation at a sublethal dose of 6.0 Gy. On day 1, 3, 7, 14, 21 and 30 after irradiation injury, the hematopoiesis-stimulating and hematopoiesis-suppressing activities of the serum were determined by CFU-E and CFU-GM culture *in vitro*, respectively. **Results** The hematopoiesis-stimulating activities of serum enhanced distinctly in all irradiated groups. With genistein administration 24 h before irradiation, the hematopoiesis-stimulating activities of serum became enhanced, resulting in the increase of numbers of CFU-GM and CFU-E, as compared to those in only irradiated mice, and stimulating activities on CFU-GM were more enhanced than that on CFU-E. The hematopoiesis-suppressing activities of serum were decreased in genistein pretreated mice, but showed no significant difference between CFU-GM and CFU-E. **Conclusion** Enhancing hematopoiesis-stimulating activity of serum in the irradiated mice may be one of the important mechanisms of genistein against irradiation-induced hematopoietic syndrome and accelerating restoration of hematopoiesis.

Key words: genistein; radiation injury; serum

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。射线在杀伤骨髓造血细胞的同时也损伤骨髓微环境,而且损伤后骨髓造血细胞的重建也是在造血微环境恢复的基础上进行的。三羟异黄酮(genistein, GEN)是大豆中的重要营养成分,也是具有多种生理活性的天然植物雌激素[1-3]。我室以往的研究报道,GEN不仅可抑制多种肿瘤细胞的生长,还可防护放射性造血损伤,即其不仅可提高辐射损伤小鼠的存活率,还可促进小鼠辐射受损的造血系统恢复和重建[4],但具体的作用机制尚不清楚。本实验主要从GEN对辐射损伤小鼠血清造血活性的变化探讨其防护放射性造血损伤的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由本校实验动物中心提供的BALB/c雄性小鼠400只,

基金项目:国家自然科学基金(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,讲师,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:2006-09-15;修回日期:2006-11-10

6～8周龄，体质量 20～24 g，采用随机数字表法分为 3 组（正常组 80 只，其余两组各 160 只）：①正常对照组（normal control，N）。②GEN＋辐射损伤组（GEN＋R）：辐射前 24 h，GEN（购于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 体重给予灌胃，每只约 0.1 ml。③辐射对照组（Oil＋R）：辐射前 24 h，0.1 ml 食用色拉油灌胃。各组小鼠装在弧形有机玻璃盒内，^{60}Coγ 射线一次性全身照射复制放射性造血损伤模型，吸收剂量为 6.0 Gy，吸收剂量率为 98.68 cGy/min。

1.2　小鼠血清制备

辐射后 1、3、7、14、21 d 和 30 d 分别活杀小鼠 10 只，股动脉放血，常规方法分离血清，置 －20 ℃冰箱保存待用。

1.3　测定方法

实验均重复 3 次。

粒系刺激活性培养体系（CFU-GM）：马血清 25%，骨髓有核细胞 1×10^5/ml，10% 不同时间收集的正常或照射小鼠血清，2.7% 的甲基纤维素（终浓度 0.9%），充分混匀后分装于 24 孔培养板中，1 ml/孔，37 ℃、5% CO_2 孵箱中，7 d 后低倍镜计数 CFU-GM 集落，以大于 50 个细胞组成的细胞团作为 1 个集落。

红系刺激活性培养体系（CFU-E）：10^{-4} mol/L β-巯基乙醇 0.2 ml，3% L-谷氨酰胺 0.03 ml，马血清 0.7 ml，骨髓有核细胞终浓度 2.5×10^5/ml，2.7% 甲基纤维素 0.7 ml 以及 10% 不同时间收集的正常或照射小鼠血清共 2 ml。将体系用灭菌 1 ml 注射器混匀后，分别加入 96 孔培养板内，0.2 ml/孔，37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度培养箱内培养 7 d 后倒置显微镜下观察并计数集落，由 8 个以上细胞组成的暗黄或桔红色集落即为 1 个 CFU-E。

抑制活性的检测：即加入外源性刺激因子（CFU-E 和 CFU-GM 培养体系中分别加入 5 U/ml EPO 和 10 U/ml GM-CSF）条件下，培养体系中分别加入 10% 照射后和正常小鼠血清。

1.4　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　放射损伤后血清造血刺激活性

以正常小鼠血清作为对照组，照射后不同时相点的血清为实验组，在不加外源性刺激因子条件下观察血清对 CFU-E 和 CFU-GM 的刺激活性。结果：正常血清含有一定的造血刺激活性，以 10% 正常小鼠血清作为刺激因子来源可分别生成（39.33 ± 6.04）～（50.26 ± 3.78）个 CFU-GM/10^5 骨髓有核细胞，（17.89 ± 4.16）～（25.18 ± 5.37）个 CFU-E/（2.5×10^5）骨髓有核细胞。辐射后血清造血刺激活性增强，促粒、红系祖细胞集落形成能力增强，CFU-GM、CFU-E 形成增多，特别是照后 7～14 d，此后逐渐降低恢复至正常。与 Oil＋R 组比较，GEN＋R 组不同时相点血清的造血刺激活性明显提高，特别是照后 7、14、21 d，GM-CFU 形成分别提高 38.27%、45.44% 和 32.03%（$P<0.05$）；照后 7 d 和 14 d，CFU-E 形成分别提高 18.07% 和 18.46%（$P<0.05$）。提示，辐射前 24 h 给予 GEN，辐射后小鼠血清造血刺激活性明显增强，且对粒系祖细胞的刺激活性较红系强。表 1 中各值为不同时相点实验组集落数与正常对照组的百分比。

表 1　照射后小鼠血清对粒系、红系祖细胞集落培养的刺激作用（%）

组别	粒系						红系					
	照后 1 d	照后 3 d	照后 7 d	照后 14 d	照后 21 d	照后 30 d	照后 1 d	照后 3 d	照后 7 d	照后 14 d	照后 21 d	照后 30 d
Oil＋R	113.71	126.63	152.54	141.04	128.07	101.32	123.72	133.86	165.61	150.55	131.07	105.54
GEN＋R	128.55	149.99	190.81[a]	186.48[a]	160.10[a]	119.25	130.47	145.07	183.68[a]	169.01[a]	143.42	114.90

a：$P<0.05$，与 Oil＋R 组比较

2.2　放射损伤后血清的抑制活性

以只加入外源性刺激因子的正常血清培养组为对照组可形成（90.42 ± 6.43）～（105.33 ± 6.78）个 CFU-GM/10^5 骨髓有核细胞，（39.25 ± 4.04）～（48.67 ± 4.51）个 CFU-E/（2.5×10^5）骨髓有核细胞，以加入刺激因子的照射后不同时相点的血清作为实验组。结果：正常小鼠血清对粒系、红系祖细胞集落形成的抑制活性较弱，而照射后血清抑制活性增强，CFU-GM 和 CFU-E 形成数量不同程度的减少，特别是照后第 3 天。与 Oil＋R组比较，GEN＋R 组血清的抑制活性均较低，即各时相点形成的集落数均较多，特别是照后 7 d 和 14 d，CFU-GM 形成数较 Oil＋R 组分别增加 16.92% 和 17.39%（$P<0.05$）；照后 7、14、21 d，CFU-E 形成数较 Oil＋R 组分别增加 16.49%、16.74% 和 16.61%（$P<0.05$）。提示，辐射前 24h 给予 GEN，辐射后小鼠血清中抑制造血的因子较少，对红系和粒系祖细胞增殖的抑制活性差异不明显。表 2 中各值为不同时相点实验组集落数与对照组的百分比。

表 2　照射后小鼠血清对粒系、红系祖细胞集落培养的抑制作用（%）

组别	粒系						红系					
	照后 1 d	照后 3 d	照后 7 d	照后 14 d	照后 21 d	照后 30 d	照后 1 d	照后 3 d	照后 7 d	照后 14 d	照后 21 d	照后 30 d
N	95.79	93.33	97.50	94.35	96.33	95.66	95.05	94.03	93.77	92.07	95.26	94.71
Oil＋R	53.00[b]	39.17[b]	54.98[b]	65.03[b]	79.27[b]	89.60	60.09[b]	45.32[b]	51.52[b]	58.51[b]	69.12[b]	87.41
GEN＋R	62.69[b]	50.51[b]	71.90[ab]	82.42[ab]	90.82	98.89	72.96[b]	51.08[b]	68.01[ab]	75.25[ab]	85.73[a]	96.07

a：$P<0.05$，与 Oil＋R 组比较；b：$P<0.05$，与 N 组比较

3 讨论

放射损伤导致机体造血功能的不同程度减退主要与射线对造血细胞、尤其是对造血干/祖细胞的直接杀伤和造血微环境的破坏有关。较早研究表明,照射动物血清中粒系造血刺激活性增强,表现为较正常动物血清更能刺激 CFU-GM 集落生成,且这种粒系造血刺激活性的增强与照射动物外周血 WBC 数量的减少呈相反趋势,即 WBC 进行性减少时,粒系造血刺激活性逐渐升高;进入放射病极期后,WBC 数进入最低水平阶段正是粒系造血刺激活性达高峰值时间。随着病情进入恢复期,WBC 数目趋增多时,粒系造血刺激活性逐渐降低至正常。进一步研究指出,照后小鼠、狗及人血清或血浆中都可见造血刺激活性的增强,不仅能支持 CFU-GM 集落生长,而且对 CFU-E、BFU-E 的集落形成也有刺激作用,提示其中含有 EPO、BPA、G-CSF、IL-3 或 GM-CSF 等集落刺激因子的增多。本实验显示,正常小鼠血清中含有一定的造血刺激活性。辐射后血清造血刺激活性明显升高,可使 CFU-GM、CFU-E 形成增多,特别是照后 7 ~ 14 d,此后逐渐降低恢复至正常。与 Oil + R 组比较,GEN + R 组血清的刺激活性明显升高,且对粒系祖细胞的刺激活性高于对红系。提示,预防性给予 GEN,有利于小鼠体内促造血的生长因子分泌,这可能与 GEN 促小鼠 T 淋巴细胞产生的 IL-2、IL-3 显著增高有关[5]也可能与 GEN 降低和减少射线对骨髓基质细胞的损伤有关[6]。另外,辐射后血清中造血刺激活性的升高还可能与照后造血细胞凋亡或坏死、对细胞因子的利用减少或因造血细胞减少所造成的反馈以及感染及内毒素的诱导而生成量相对增高有关。

既然在照射后机体内粒红系造血刺激活性在急性放射病的假愈期和极期趋于增高,为什么还阻挡不住血细胞的进行性下降;而外源性细胞因子的输注却能减轻造血损伤、提高血细胞水平呢? 除造血干/祖细胞丧失增殖能力的原因外,显然还有其他因素的影响。蒲晓允等[7]发现,6.0 Gy γ 射线全身照射后的小鼠血清对 CFU-E 和 CFU-GM 生长有抑制作用,且造血抑制活性的变化与动物外周血 WBC 数的变化趋势相似,但该血清灭活后其抑制造血活性明显降低;同时还发现,照射后血清中 TGF-β 在 1、3 d 显著升高,15 d 降低;TNF 在 1、3 d 降低,7、15 d 恢复至正常,该结果提示辐射后血细胞减少除与射线对细胞的直接损伤作用外,还与血清的造血抑制活性的改变有关[8]。本实验显示,正常小鼠血清抑制活性较弱,而照射后小鼠血清显示出较强的抑制活性,对粒红系祖细胞的增殖有明显的抑制作用,CFU-GM 和 CFU-E 的形成不同程度减少,特别是照后第 3 天。预防性的给予 GEN,照后小鼠血清抑制活性降低,即各时相点 CFU-GM 和 CFU-E 形成数均较辐射对照组多。以上提示,GEN 降低照后小鼠血清造血抑制因子水平可能也是其促进造血功能恢复的原因之一。对于 GEN 对照后小鼠血清活性影响的具体机制,我室将进一步研究。

综上所述,预防性的给予 GEN 可改变照射后小鼠血清造血活性,即提高血清刺激造血活性的同时降低其抑制造血活性,该作用可能是其增强受照机体造血系统的辐射抗性、加速受损造血系统重建的重要分子机制之一。

参考文献:

[1] 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.

[2] Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 777(1 - 2): 233 - 248.

[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] 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, 27(1): 21 - 24.

[5] Zhang R, Li Y, Wang W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein[J]. Nutr Cancer, 1997, 29(1): 24 - 28.

[6] 周 永, 糜漫天, 杨镇洲. 三羟异黄酮对辐射损伤小鼠骨髓基质细胞的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 471 - 473.

[7] 蒲晓允, 罗成基, 潘 静, 等. 放射损伤小鼠血清抑制造血机制研究[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(8): 571 - 573.

[8] 蒲晓允, 陈晓莉, 潘 静, 等. 放射损伤骨髓基质细胞造血负调因子表达及其对血细胞生成的影响[J]. 重庆医学, 2002, 31(12): 1185 - 1187.

(编辑 汪勤俭)