论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410064

单宁酸对电离辐射所致巨核细胞损伤的保护作用

吴苏南,许 杨,陈石磊,申明强,陈 芳,陈 默,张 舟,王 崧,粟永萍,程天民,王军平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米医药工程技术研究中心)

[摘要] **目的** 研究单宁酸(tannic acid,TA)对电离辐射所致巨核细胞损伤的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 体外培养巨核细胞株M07e,经0、0.5、1、2.5、5、10 μg/mL单宁酸预处理后给予10 Gy ^{60}Co γ射线照射,继续培养不同时间,采用MTT法、荧光酶标仪检测法和流式细胞术检测技术分别检测细胞存活率、活性氧(ROS)水平、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)和凋亡率变化。给予BALB/c小鼠5 Gy ^{60}Co γ射线全身一次性照射,复制急性放射损伤实验动物模型,设置生理盐水对照组和TA灌胃预处理组,通过尾静脉外周血常规检测和骨髓病理切片观察,分析血小板水平和骨髓巨核细胞数目变化情况。**结果** TA能够剂量依赖性地提高受照巨核细胞的存活率;与单纯辐照组相比,TA预处理可以显著降低细胞内总ROS水平($P<0.01$)、提高细胞线粒体膜电位($P<0.05$)和降低细胞凋亡率($P<0.05$)。动物实验结果显示,TA预处理能够显著抑制辐射损伤引起的骨髓巨核细胞数量减少,照后第7、12、15、19天时TA处理组血小板水平显著高于对照组($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** TA对电离辐射所致巨核细胞损伤具有显著保护作用,其作用机制可能与其突出的抗氧化应激活性有关。

[关键词] 单宁酸;巨核细胞;血小板;辐射损伤
[中图法分类号] R331.14; R339.57; R914.4 [文献标志码] A

Tannic acid protects megakaryocytes against ionizing radiation *via* its anti-oxidative activity

Wu Sunan, Xu Yang, Chen Shilei, Shen Mingqiang, Chen Fang, Chen Mo, Zhang Zhou, Wang Song, Su Yongping, Cheng Tianmin, Wang Junping (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Military Preventive Medicine, Third Military medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of tannic acid (TA) on megakaryocytes against ionizing radiation and investigate its underlying mechanism. **Methods** Human megakaryoblast M07e cells were pretreated with TA at concentrations of 0, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μg/mL before receiving 10 Gy γ-ray irradiation. The cell viability, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP) and apoptotic rate of the cells were detected after irradiation. Subsequently, BALB/c mice with or without TA treatment were irradiated with ^{60}Co γ at a dose of 5 Gy, and the blood platelet count and number of megakaryocytes in bone marrow were determined at appointed time points. **Results** TA dose-dependently improved the survival rate of M07e cells after irradiation. Compared with control group, TA significantly reduced the intracellular ROS levels ($P<0.05$), improved MMP ($P<0.05$) and decreased the apoptotic rate ($P<0.05$) in M07e cells after irradiation. *In vivo*, TA pretreatment resulted in a significant increase in the number of megakaryocytes in bone marrow in BALB/c mice after irradiation. Meanwhile, the blood platelet counts in TA treated mice were much higher than those in the control group, especially at days 7, 12,

[基金项目] 全军后勤科研"十二五"计划课题重点项目(BWS11J009);新药创制科技重大专项(2013ZX09J13101-03B)
[通信作者] 王军平,电话:(023)68752283,E-mail:wangjunping@tmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1333.006.html(2014-12-08)

15, and 19 after irradiation ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** TA has a protective effect on megakaryocytes against ionizing irradiation, possibly *via* its inhibition on radiation-induced oxidative stress.

[**Key words**] tannic acid; megakaryocyte; platelet; radiation injury

Supported by the Key Project of "Twelfth Five-year Plan" for Logistic Science Research of PLA (BWS11J009) and the Major Special Project of Science and Technology for Major New Drugs Innovation and Development (2013ZX09J13101-03B). Corresponding author: Wang Junping, Tel: 86-23-68752283, E-mail: wangjunping@tmmu.edu.cn

电离辐射可引起骨髓造血功能障碍,导致血小板等全血细胞减少,其中血小板减少会导致机体出血和凝血功能障碍,严重者甚至危及生命。血小板由巨核细胞产生,有效保护电离辐射对巨核细胞损伤的影响,对于减轻血小板的损伤至关重要。目前临床上针对因电离辐射导致的血小板减少症还缺乏有效的防治方法和特效药物。

单宁酸(tannic acid,TA),又名鞣酸,学名3,4,5-三羟基苯甲酸,是一种广泛存在于茶叶、葡萄籽、柿子等植物中的多酚羟基化合物[1-2]。近年研究发现其具有抗肿瘤、抗氧化、抗微生物、抗辐射的作用[3-4],但具体作用机制和作用靶点并不明确。本研究拟通过体外和体内实验,研究单宁酸对电离辐射诱导巨核细胞损伤的保护作用,并探讨其相关作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

单宁酸购自Sigma公司,rhGM-CSF(粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子)购自北京北医联合药业有限公司,胎牛血清、RPMI1640培养基购自美国Gibco公司,MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、罗丹明123荧光染料、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒等均购自江苏碧云天生物技术有限公司。人巨核细胞株M07e细胞由本室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 常规方法复苏M07e细胞,采用RPMI1640培养基+10%胎牛血清+10 ng/mL rhGM-CSF,在5% CO_2、100%湿度、37 ℃条件下进行培养,每2~3天换液传代1次。

1.2.2 细胞辐照模型建立 常规培养M07e细胞,取对数生长期细胞,用1%胎牛血清RPMI1640培养液重悬,细胞分组后分别加入不同浓度TA(0、0.5、1、2.5、5、10 μg/mL),随后立即采用10 Gy ^{60}Co γ射线照射处理。

1.2.3 细胞存活率检测 收集辐照后的细胞进行计数,按照5×10^4/mL转接至96孔板中,每孔100 μL。分别设置未照射组、单纯照射组和TA 10 μg/mL给药组,作用24 h后,通过MTT法检测细胞存活率的情况。重复试验3次。细胞存活率=(实验组D_{570}-空白组D_{570})/(对照组D_{570}-空白组D_{570})×100%。

1.2.4 细胞活性氧(ROS)水平检测 对辐照前不同浓度TA组的细胞提前30 min孵育荧光探针DCFH-DA,并用抗氧化剂NAC 10 mmol/L作阳性对照,辐照后用荧光酶标仪立即测量荧光强度,其荧光强度和细胞总ROS水平呈正相关。重复实验3次。

1.2.5 细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)检测 将辐照后6h的细胞按1∶1 000加入罗丹明123荧光染料10 μmol/L孵育,在5% CO_2、100%湿度、37 ℃条件下孵育10 min,RPMI1640培养液洗涤重悬细胞2次,流式细胞术检测其荧光强度,其荧光强度和MMP值呈正相关。重复实验3次。

1.2.6 动物模型的建立及分组给药 健康雌性BALB/c小鼠24只(由大坪医院实验动物中心提供),体质量18~20 g,8周龄。采用5 Gy ^{60}Co γ射线全身一次性均匀照射,复制急性放射损伤实验动物模型[5]。小鼠分为3组:未处理对照组、单纯照射组、TA灌胃预处理组。TA给药浓度为300 mg·kg^{-1}·d^{-1},单纯照射组给予等量生理盐水,照前给药2 d,每天1次。

1.2.7 血小板计数 照后第0、4、7、12、15、19天取尾静脉血检测外周血血常规,统计分析各组血小板数量情况。

1.2.8 骨髓病理切片 于辐照后第15天每组随机抽取3只小鼠颈脱臼法处死,分离股骨立即置于4%多聚甲醛液中固定,石蜡包埋切片后常规HE染色,倒置显微镜下选取15个不同视野计数各组巨核细胞数量。

1.3 统计学分析

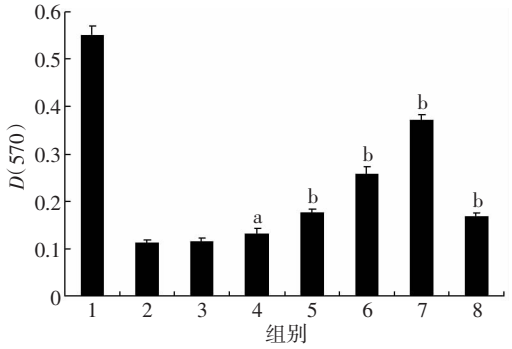
数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 细胞存活率检测

结果显示随着TA浓度的增加,光密度值也随之增加,呈浓度依赖性关系。与单纯照射组比较,TA在浓度1 μg/mL组光密度值即升高($P<0.05$),在10 μg/mL浓度时升高最明显($P<0.01$),细胞存活率

从单纯照射组(20.0±4.3)%升高到TA 10 μg/mL组的[(67.6±4.7)%,$P<0.01$],提示TA能够显著提高细胞受辐照后的存活率(图1)。

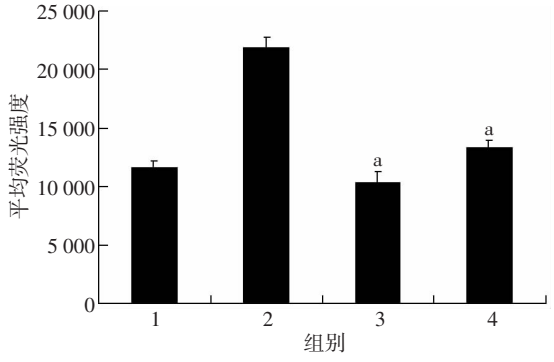


1:未处理对照组;2:单纯照射组;3:TA 0.5 μg/mL;4:TA 1 μg/mL;5:TA 2.5 μg/mL;6:TA 5 μg/mL;7:TA 10 μg/mL;8:TA 20 μg/mL a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与单纯照射组比较

图1 MTT法检测电离辐射作用下M07e细胞存活率变化

2.2 细胞ROS水平检测

采用荧光探针DCFH-DA标记细胞,检测细胞总ROS水平。结果显示平均荧光强度值从单纯照射组的(21 865.0±895.5)下降到TA 10 μg/mL组的[(10 313.5±983.2),$P<0.01$],与阳性对照抗氧化剂NAC 10 mmol/L作用相似,提示TA具有显著降低巨核细胞辐照ROS水平、抑制氧化应激反应的作用(图2)。

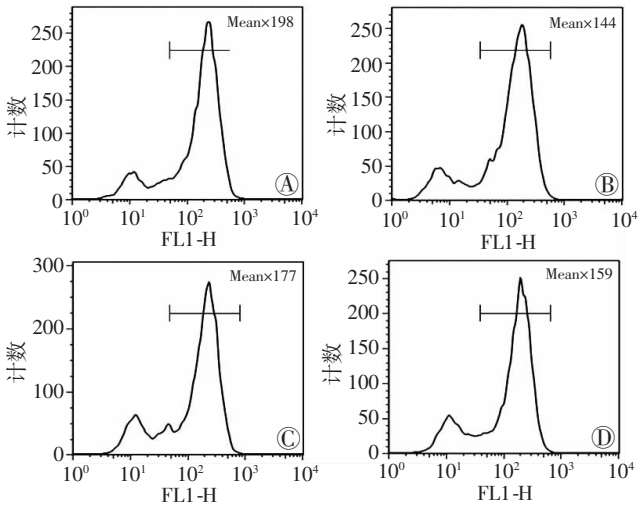


1:未处理对照组;2:单纯照射组;3:TA 10μg/mL组;4:阳性对照组NAC 10mmol/L组 a:$P<0.01$,与单纯照射组比较

图2 荧光酶标仪检测M07e细胞总ROS水平

2.3 细胞线粒体MMP检测

荧光强度可直接反应MMP电位值,采用罗丹明123标记细胞进行流式细胞仪检测,结果显示照后6 h TA给药组平均荧光强度(174.3±7.4)显著高于单纯照射组[(142.3±9.6),$P<0.05$],低于未处理对照组(192.7±8.5),结果与阳性对照NAC组类似(图3)。



A:未处理对照组;B:单纯照射组;C:TA 10 μg/mL;D:阳性对照NAC组

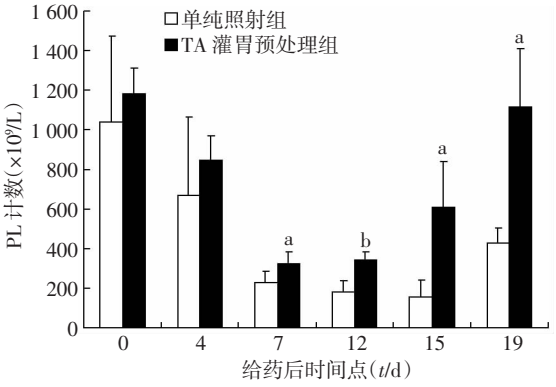
图3 流式细胞术检测M07e细胞线粒体膜电位变化

2.4 细胞凋亡检测

细胞经过分组辐照处理后12 h检测细胞凋亡率,结果分别为未处理对照组(12.3±1.0)%、单纯照射组(30.3±2.8)%、TA 10 μg/mL组(19.8±1.4)%。与单纯照射组比较,TA处理组凋亡率显著降低,具有统计学差异($P<0.05$)。结果表明10 μg/mL TA能够减少电离辐射诱导的M07e巨核细胞凋亡(图4)。

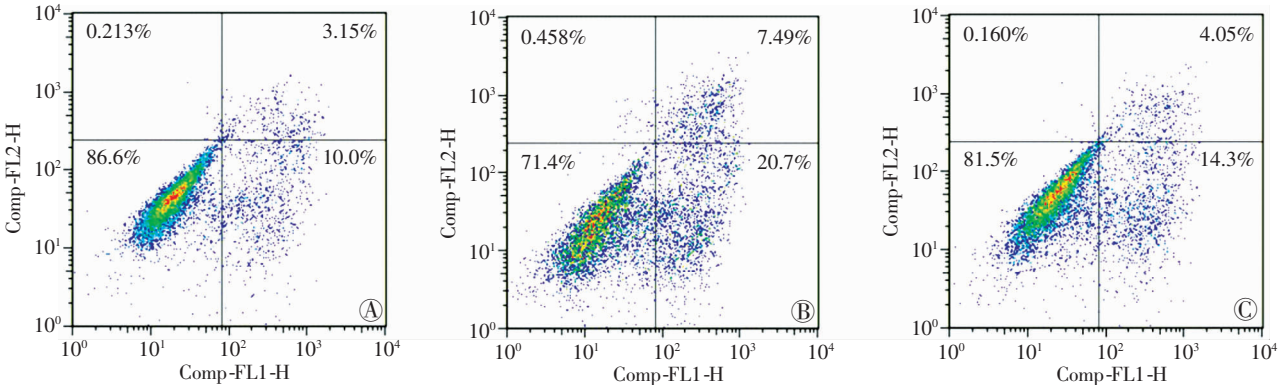
2.5 小鼠尾静脉血血小板计数

经5 Gy ^{60}Co γ射线全身一次性均匀照射后血小板迅速降低,单纯照射组在第15天左右时血小板降至最低值(155.4±85.8)×10^9/L,而TA灌胃预处理组血小板最低值在第7天左右,数值为(321.6±63.0)×10^9/L,之后就开始缓慢恢复,到第19天时基本恢复到0 d时的正常水平。在第7、12、15、19天,TA灌胃预处理组血小板数量显著高于单纯照射组($P<0.05$,$P<0.01$),提示TA能够显著提高辐照小鼠血小板最低值水平并缩短血小板处于低谷值时间(图5)。



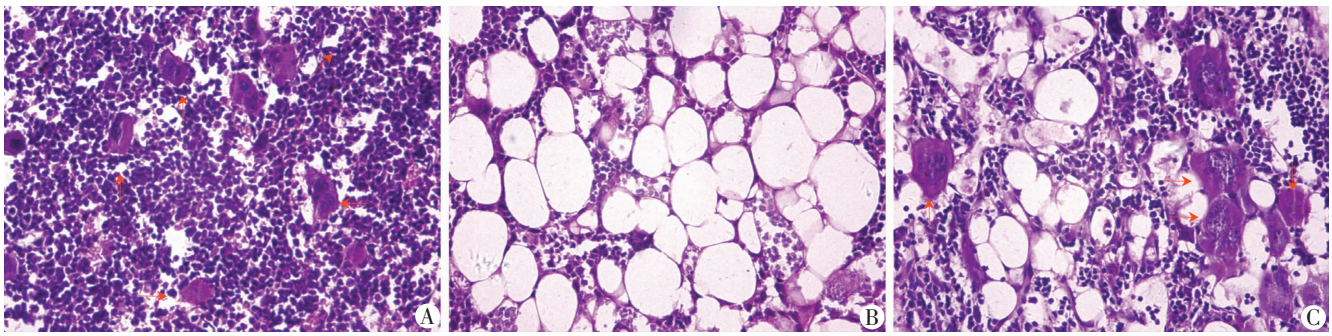
a:$P<0.05$;b:$P<0.01$,与单纯照射组比较

图5 各组小鼠辐射损伤后血小板变化情况



A:未处理对照组;B:单纯照射组;C:TA 10 μg/mL 组

图 4　流式细胞术 Annexin V/PI 双染色法检测电离辐射诱导 M07e 细胞凋亡情况



A:未处理对照组;B:单纯照射组;C:TA 灌胃预处理组　↑:示巨核细胞

图 6　各组小鼠股骨骨髓切片结果　(HE ×400)

2.6　骨髓切片 HE 染色情况

照后第 15 天取小鼠股骨做骨髓切片,结果显示单纯照射组骨髓有核细胞明显减少,仅有少数造血细胞呈散在性分布,有大量的脂肪空泡,基本不见巨核细胞。TA 灌胃预处理组骨髓有核细胞显著增多,呈片状分布,并可见大量巨核细胞(图 6)。倒置显微镜下计数 15 个不同视野巨核细胞数目,结果表明:尽管 TA 灌胃预处理组巨核细胞数目(19.7 ±9.6)较未正常对照组(40.7 ±2.3)显著减少,但却明显高于单纯照射组(3.7 ±2.5),具有统计学差异($P<0.05$)。

3　讨论

TA 存在于多种植物中[6],在我国资源非常丰富,约 70% 以上的中草药及多种树木及果实中均含有此类鞣质化合物,其有效、安全、低价的特点引起了人们的广泛关注。近年来,有研究发现 TA 对小鼠辐射损伤具有明显的整体保护作用[7],但其作用靶点和分子机制尚不清楚。本研究以骨髓巨核细胞为观察对象,结合体外、体内实验深入探讨了 TA 对辐射诱导巨核细胞损伤和血小板减少的保护作用及其机制。

血小板由骨髓巨核细胞经增殖、分化、迁移、成熟和产板所产生,巨核细胞的数量和质量直接决定了血小板的数量[8]。当受到电离辐射作用后,全血细胞均会受到损伤,其中巨核细胞会出现凋亡和死亡从而导致血小板的减少[9],如果能够在辐照前将巨核细胞进行防辐射处理,对于血小板的提前恢复或许具有积极的意义。本实验结果发现,在体外当给予 TA 预处理后,巨核细胞的存活率较单纯照射组显著升高;在动物实验中,TA 预处理组骨髓中巨核细胞数量和外周血小板水平较生理盐水对照组显著升高,均提示 TA 对电离诱导的巨核细胞损伤和血小板减少具有明确的保护作用。

巨核细胞在从造血干/祖细胞分化开始到增殖、迁移、成熟、凋亡产板的过程要受细胞内 ROS 的调节[10],而细胞在受到辐照时表现出的氧化应激主要体现在产生高水平的 ROS。ROS 作为细胞凋亡作用中的第二信使,早已被研究证实在过度升高的情况下会导致细胞凋亡,造成数量减少[11]。以往,人们在研究单宁酸抗氧化作用的过程中发现葡萄籽中的单宁酸对羟自由基和超氧阴离子自由基具有较强的清除能力[12]。人们发现以 TA 作为主要成分的红酒多酚具有升高血清一氧化氮(NO)和超氧化物歧化酶(SOD)水平而发挥清除细胞内 ROS 的活性[13-14]。我们的实验结果也证实,TA 与 ROS 清除剂 NAC 一样能够显著降低辐照后巨核细胞内的 ROS 水平,表现出突出的抗氧化应激作用,这可能是 TA 保护巨核细胞电离辐射损

伤的一个主要原因。

线粒体呼吸链酶系产生的ROS主要是指O_2的单电子还原产物,超氧阴离子(O_2^-·)及其衍生的HO_2·、H_2O_2、OH· 和单线态氧$^1O_2$等,是细胞内ROS生成的最主要途径,超出其他所有酶活性的总和[15]。细胞内ROS生成和MMP具有依赖关系已通过实验得到证实[16-17]。Yan等[18]在研究细胞凋亡时发现过量生成的ROS伴随着MMP水平的下降。目前认为通过线粒体途径引起细胞凋亡的机制为:各种凋亡诱导因素引起原本处于关闭状态的线粒体体内外膜之间的通透性转换孔(PTP)开放,MMP降低发生去极化,与细胞凋亡相关的启动子从线粒体内释放,从而促使细胞凋亡发生。罗丹明123荧光染料能进入线粒体内,其荧光强度与MMP呈正相关,间接反映了MMP的电位值。本实验结果提示,电离辐射通过氧化应激使细胞内过度产生ROS,ROS水平升高显著会降低MMP,从而启动了细胞凋亡途径。与单纯照射可以引起MMP显著降低相比,TA预处理则能够使巨核细胞MMP在辐照后依然保持较高的水平,进一步表明TA可以通过抑制ROS而维持线粒体膜的完整性。凋亡检测结果也证实TA可以在一定程度上减少辐射诱导的巨核细胞凋亡,至于其发挥作用的相关信号通路还有待进一步阐明。

总之,通过本实验初步证实TA对辐射诱导的巨核细胞损伤和血小板减少具有显著保护作用,其作用机制可能与抗氧化应激能力有关。除了具有抗辐射保护作用,至于TA是否还存在促进巨核细胞增殖分化、迁移、产板等功能需要作进一步深入研究。TA作为植物中尤其是很多食物里存在的化学成分,在自然界广泛存在,可以推测其在抗辐射损伤方面具有很好的应用前景,值得进一步开发和研究。

参考文献:

[1] Kris-Etherton P M, Hecker K D, Bonanome A, *et al*. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer[J]. Am J Med, 2002, 113(Suppl 9B): 71S-88S.

[2] Lorrain B, Ky I, Pechamat L, *et al*. Evolution of analysis of polyhenols from grapes, wines, and extracts[J]. Molecules, 2013, 18(1): 1076-1100.

[3] Kim M H, Ha S Y, Oh M H, *et al*. Anti-oxidative and anti-proliferative activity on human prostate cancer cells lines of the phenolic compounds from Corylopsis coreana Uyeki[J]. Molecules, 2013, 18(5): 4876-4886.

[4] Larrosa M, Garcia-Conesa M T, Espin J C, *et al*. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health[J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(6): 513-539.

[5] 陈石磊, 陈芳, 许杨, 等. 重组胰岛素样生长因子-I促进辐射损伤小鼠血小板水平的恢复[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(22): 2340-2344.

[6] Chen S C, Chung K T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds[J]. Food Chem Toxicol, 2000, 38(1): 1-5.

[7] 秦绪军, 海春旭, 何伟, 等. 单宁对小鼠辐射损伤保护作用的研究[J]. 营养学报, 2004, 26(5): 344-347.

[8] Deutsch V R, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production[J]. Br J Haematol, 2006, 134(5): 453-466.

[9] Waselenko J K, MacVittie T J, Blakely W F, *et al*. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group[J]. Ann Intern Med, 2004, 140(12): 1037-1051.

[10] Shinohara A, Imai Y, Nakagawa M, *et al*. Intracellular reactive oxygen species mark and influence the megakaryocyte-erythrocyte progenitor fate of common myeloid progenitors[J]. Stem Cells, 2014, 32(2): 548-557.

[11] Dernbach E, Urbich C, Brandes R P, *et al*. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress[J]. Blood, 2004, 104(12): 3591-3597.

[12] 王川. 葡萄籽单宁的抗氧化性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(2): 184-187.

[13] Leikert J F, Rathel T R, Wohlfart P, *et al*. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells[J]. Circulation, 2002, 106(13): 1614-1617.

[14] Jia H, Liu J W, Ufur H, *et al*. The antihypertensive effect of ethyl acetate extract from red raspberry fruit in hypertensive rats[J]. Pharmacogn Mag, 2011, 7(25): 19-24.

[15] Skulachev V P. A biochemical approach to the problem of aging: "megaproject" on membrane-penetrating ions. The first results and prospects[J]. Biochemistry (Mosc), 2007, 72(12): 1385-1396.

[16] Ma W, Yuan L, Yu H, *et al*. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the brain of diet-induced obese rats but not in diet-resistant rats[J]. Life Sci, 2014, 110(2): 53-60.

[17] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 449-456.

[18] Yan C, Huang D, Zhang Y. The involvement of ROS overproduction and mitochondrial dysfunction in PBDE-47-induced apoptosis on Jurkat cells[J]. Exp Toxicol Pathol, 2011, 63(5): 413-417.

(**收稿**:2014-10-15;**修回**:2014-11-21)

(编辑 王 红)