基础研究 文章编号：0253-3626（2011）08-0913-04

当归多糖对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞细胞周期及细胞凋亡的影响

张 雁[1]，芮永军[1]，糜菁熠[1]，吴 宏[2]

（1. 无锡市第九人民医院、无锡手外科医院实验中心，无锡 214062；2. 重庆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨当归多糖（Angelica polysaccharides，APS）对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞（Bone marrow mononuclear cells，BMNCs）细胞周期及细胞凋亡的影响，旨在阐明 APS 防护辐射性造血损伤的分子机制。方法：BALB/c 小鼠随机分为 3 组：正常对照组、生理盐水（NS）组和 APS 组。NS 组和 APS 组小鼠全身均匀照射 X 射线，照射后腹腔注射给药 NS 和 8 mg/kg APS，0.2 ml/（次·d），连续 6 d，第 7 天计数外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNCs；RT-PCR 方法检测小鼠 BMNCs 凋亡相关基因 p53mRNA 的表达水平；流式细胞术检测小鼠 BMNCs 的细胞周期和凋亡率。结果：照射后第 7 天 APS 组外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNCs 计数明显高于 NS 组；BMNCs 的 p53mRNA 的表达水平、G_0/G_1 期细胞比例和凋亡率较 NS 组明显下降。结论：APS 能通过降低放射损伤小鼠 BMNCs p53mRNA 的表达水平，改善 BMNCs 细胞周期紊乱，抑制细胞凋亡，促进造血恢复。

【关键词】当归多糖；小鼠；放射损伤；细胞周期；凋亡

【中国图书分类法分类号】R146 【文献标志码】A 【收稿时间】2011-03-01

Effects of angelica polysaccharides on the cell cycle and cell apoptosis in bone marrow mononuclear cells of radiation injured mice

ZHANG Yan[1], RUI Yong-jun[1], MI Jing-yi[1], WU Hong[2]

(1. Laboratory of Hand Surgery, the Ninth People's Hospital of Wuxi; 2. Department of Histology and Embryology, College of Basic Medcine, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of angelica polysaccharides (APS) on the cell cycle and cell apoptosis rate in bone marrow mononuclear cells (BMNCs) of radiation injured mice, so as to illuminate the molecular mechanism of APS sheltering radiation injured haematogenesis. *Methods*: The injured mice were divided into 3 groups: normal control group, normal saline group, and APS group. Normal saline group and APS group were given NS or APS for 6 days continuously after the establishment of radiation injured mice model by X ray. Techniques of peripheral blood cells and BMNCs count were made. p53mRNA in murine BMNCs were assayed by RT-PCR. The cell cycle and cell apoptosis in BMNCs were detected by FCM (flow cytometry) on the 7th day. *Results*: Compare with those in NS group, the numbers of the peripheral leukocytes, erythrocytes, platelets and BMNCs in APS group increased significantly, while the expression of p53mRNA, the percentage of G_0/G_1 phases, and cell apoptosis rate obviously decreased. *Conclusion*: APS can decrease the the expression of p53mRNA, improve the chaos of cell cycle, suppress cell apoptosis in radiation injured mice, which can help the recovery of hematopoietic function in mice.

【Key words】angelica polysaccharides (APS); mice; radiation injury; cell cycle; apoptosis

既往研究表明当归多糖（Angelica polysaccharides，APS）是当归“活血化瘀”或调控血细胞发生的有效成分之一[1,2]，它既能促进造血干/祖细胞（Hematopoietic stem/progenitor cell，HSPC）增殖[3]，又能显著提高辐射损伤小鼠外周血象，促进造血功能恢复[4,5]。故有可能作为一种潜在的辐射防护剂，在肿瘤放疗时辅助使用。但其确切的保护机制尚不明确。骨髓单个核细胞（Bone marrow mononuclear cells，BMNCs）是含有造血干/祖细胞、有核血细胞和基质细胞等成分的复杂群体，而其中的 HSPC 具有自我更新和分化潜能，BMNCs 还能释放某些细胞因子促进神经和血管再生，且对射线有较强的辐射敏感性[6]。本研究通过检测小鼠 BMNCs 的 p53mRNA 表达水平、细胞周期和凋亡率，为进一步探讨 APS 促进放射损伤小鼠骨髓造血重建的分子机制提供新的思路。

作者介绍：张 雁（1982-），女，硕士，研究方向：造血干细胞生物学与中药药理学。

通信作者：吴 宏，女，教授，Email：wuhong6368@126.com。

基金项目：重庆市自然科学基金计划资助项目（编号：2007BB5284）。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

健康成年未交配 BALB/c 小鼠，清洁级，雌、雄各半，8~12 周龄，体重 18~22 g，由重庆医科大学实验动物中心提供。APS：重庆医科大学化学教研室分离、提取、纯化（纯度 950 mg/g 以上）。总 RNA 提取剂 RNAiso™Plus(TaKaRa 公司)、引物（上海生工公司）、逆转录和 PCR 试剂盒（TOYOBO 公司）等。所用设备包括：超净工作台、倒置显微镜、流式细胞仪、电泳仪、电泳槽、GelDoc2000 凝胶成像仪、PCR 仪等。

1.2 实验动物的分组及处理

BALB/c 小鼠随机分为 3 组，每组 30 只（12 只用于外周血和 BMNCs 计数，6 只用于 BMNCs 凋亡率检测，6 只用于 p53mRNA 检测，6 只用于细胞周期测定），共 90 只。正常对照组不作任何处理。NS 组和 APS 组 BALB/c 小鼠全身均匀照射 4.0 Gy X 射线[7]，吸收剂量率为 3.76 Gy/min，时间 1.25 min，焦点-鼠距 98 cm，面积 25 cm × 25 cm。照射后 3~4 h 内分别腹腔注射 NS 和 8 mg/kg APS，0.2 ml /（次·d）[8]，连续注射 6 d。各组分别于第 7 天取外周血后处死小鼠收集骨髓。

1.3 外周血 WBC、RBC、PLT 及 BMNCs 计数

照射后第 7 天取小鼠眼眶血后以颈椎脱臼法处死小鼠，用常规方法进行外周血 WBC、RBC、PLT 计数。并取其双侧股骨，剔除肌肉和结缔组织后，剪开股骨两头，用 RPMI1640 培养液冲出骨髓细胞，并经 4 号针头过滤制成单细胞悬液，采用 Ficoll-Hypague 密度梯度离心法获取 BMNCs：用骨髓单细胞悬液沿离心管壁缓缓加于淋巴细胞分离液上面，比例为 1:1，2 500 r/min，离心 20 min，沿试管壁周缘吸取白膜层细胞，收获 BMNCs 移入另一试管中，用 PBS 洗涤 2 次，制成 BMNCs 悬液，按白细胞计数方法进行 BMNCs 计数。

1.4 半定量 RT-PCR 检测 p53 mRNA 表达

取照射后第 7 天各组的 BMNCs 细胞 6×10^6 个，离心弃上清，1 ml PBS 洗涤 2 次，分别加入 1 ml RNAiso Plus 裂解液，反复吹打至裂解液中无明显沉淀。按 RNAiso Plus 试剂盒说明书操作，分别提取 2 组细胞总 RNA。紫外分光光度计测定总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值。取适量 RNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。10 μl 反应体系中总 RNA 2 μl，Oligo dT 0.5 μl，AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl，RNase Inhibitor 0.25 μl，DNTP Mixture 1 μl，10 × RT Buffer 1μl，$MgCl_2$ 2 μl，RNase Free dH_2O 2.75 μl。逆转录反应条件：42℃，30 min；99℃，5 min；5℃，5 min。反应产物 cDNA -20℃保存待 RT-PCR 反应。设计引物：p53F：5'-CACGTACTCTCCTCCCCT-CAA-3'；R：5'-GGCTCATAAGGTACCACCACG-3'，294 bp；GAPDHF：5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'，R：5'-GAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGT-3'，602 bp。以 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板，扩增 p53，GAPDH。配制 50 μl 反应体系：5 × Buffer 10 μl，Taq DNA 聚合酶 0.25 μl，目的基因上下游引物各 0.5 μl，内参上下游引物各 0.5 μl，cDNA 模板 10 μl，加灭菌蒸馏水至 50 μl。扩增条件：预变性 94℃ 2 min，1 个循环；变性 94℃ 30 s，退火：p53，GAPDH 56℃ 40 s，延伸 72℃40 s，35 个循环；延伸 72℃ 40 s，1 个循环。PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像分析系统对基因条带进行扫描成像，Quantity One 软件（Bio Rad）分析电泳图上每条基因条带光密度值，目标 mRNA 的表达量使用内参照 GAPDH 进行较正。

1.5 流式细胞术（Flow cytometry，FCM）检测小鼠 BMNCs 的细胞周期

照射后第 7 天收集 BMNCs 单细胞悬液，70%冰乙醇固定过夜，PBS 洗涤 2 次，加入 100 μl 牛胰核糖核酸酶（1 mg/ml），37℃水浴孵育 30 min；加入碘化丙啶染色液（50 μg/ml）避光反应 30 min，流式细胞仪检测，Multicycle 软件（日本 PHENIX 公司）分析。

1.6 FCM 检测小鼠 BMNCs 的凋亡率

应用 Annexin V-FITC 与 PI 染色方法对 BMNCs 染色后，每份标本检测 6 000~10 000 个细胞。步骤如下：PBS 洗涤细胞 2 次，以 1 × binding buffer 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml；取 100 μl 样品，加入 5 μl Annexin V 和 5μl PI；轻微混匀细胞，25℃暗室孵育 15 min；每份样品加入 100 μl 1 × binding buffer；利用 FCM 双参数分析可区分凋亡细胞并计算出相应的百分率。

1.7 统计学方法

统计方法采用 K-W 检验（非参数秩和检验），组间比较用 Bonferroni 法调整检验水准，数据均经 SAS 10.1 统计分析软件系统进行分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 APS 对放射损伤小鼠外周血 WBC、RBC、PLT 和 BMNCs 的影响

照射后第 7 天 NS 组全血各系及 BMNCs 细胞数全面下降，与正常对照组比较有显著差异（$P<0.05$）。照射后第 7 天 APS 组小鼠外周血 WBC、RBC 和 PLT 及 BMNCs 与 NS 组相比下降幅度小（$P<0.05$），但与正常对照组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）（表 1）。

2.2 APS 对放射损伤小鼠 BMNCs p53mRNA 表达水平的影响

与正常对照组（0.593 3±0.019 4）相比，照射后第 7 天 NS 组（0.906 7 ± 0.034 5）BMNCs p53mRNA 显著增高，差异有统

表 1 APS 对放射损伤小鼠外周血细胞和 BMNCs 的影响（$n=12, \bar{x} \pm s$）

组别	WBC（$\times 10^9$ 个/L）	RBC（$\times 10^{12}$ 个/L）	PLT（$\times 10^9$ 个/L）	BMNC（$\times 10^6$/根股骨）
正常对照组	6.75 ± 0.47	10.04 ± 1.70	1189.33 ± 294.13	7.64 ± 0.75
NS组	0.78 ± 0.13*	7.23 ± 0.64*	231.58 ± 88.51*	0.62 ± 0.09*
APS组	1.41 ± 0.06*▲	8.59 ± 0.68*▲	588.00 ± 185.91*▲	0.98 ± 0.07*▲

注：与正常对照组比较，★，$P<0.05$；与 NS 组比较，▲，$P<0.05$

计学意义（$P<0.05$）。而 APS 组（0.696 9 ± 0.024 7）BMNCs p53 mRNA 较 NS 组下降（$P<0.05$），但仍高于正常对照组（$P<0.05$），见图 1、2。

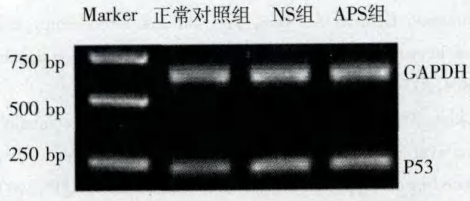


图 1　各组 BMNC P53 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图

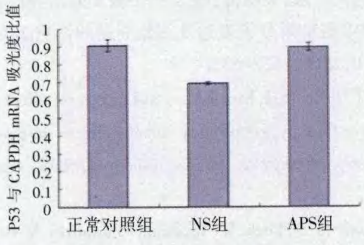


图 2　各组 BMNC P53 mRNA/GAPDH mRNA 光密度比值平均数柱状图

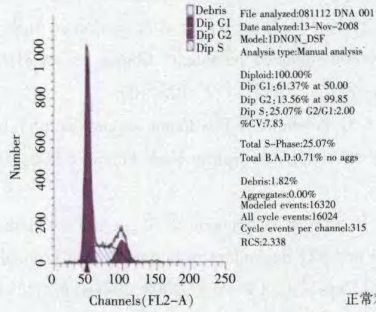
2.3　APS 对放射损伤小鼠 BMNCs 细胞周期的影响

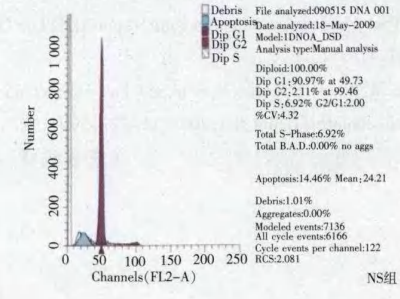
照射后第 7 天 NS 组 BMNCs 停滞于 G_0/G_1 期，S 期合成减少，与正常对照组比较差异显著（$P<0.05$）。APS 组 S 期合成活跃，与 NS 组比较差异显著（$P<0.05$），但较正常对照组仍有显著差异（$P<0.05$）（表 2、图 3）。

表 2　APS 对放射损伤小鼠骨髓 BMNCs 细胞周期的影响（$n=6, \bar{x} \pm s$）

组别	G_0/G_1 期（%）	G_2/M 期（%）	S 期（%）
正常组	63.96 ± 6.13	7.20 ± 1.64	32.02 ± 6.75
NS组	94.80 ± 1.51★	2.08 ± 1.44★	3.24 ± 0.93★
APS组	82.23 ± 3.14★▲	9.77 ± 3.24★▲	7.74 ± 2.34★▲

注：与正常对照组比较，★，$P<0.05$；与 NS 组比较，▲，$P<0.05$





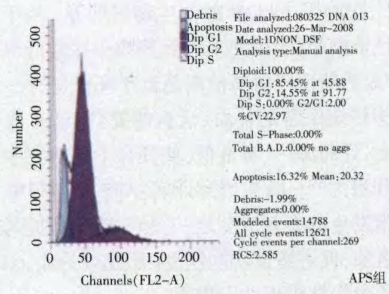


图 3　各组 BMNCs 细胞周期分析

2.4　APS 对放射损伤小鼠 BMNCs 凋亡率的影响

照射后第 7 天 NS 组 BMNCs 的凋亡率（19.69 ± 5.74）较正常对照组（5.49 ± 1.14）显著增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。而 APS 组 BMNCs 凋亡率（10.69 ± 2.47）较 NS 组显著下降（$P<0.05$），但仍高于正常对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图 4。

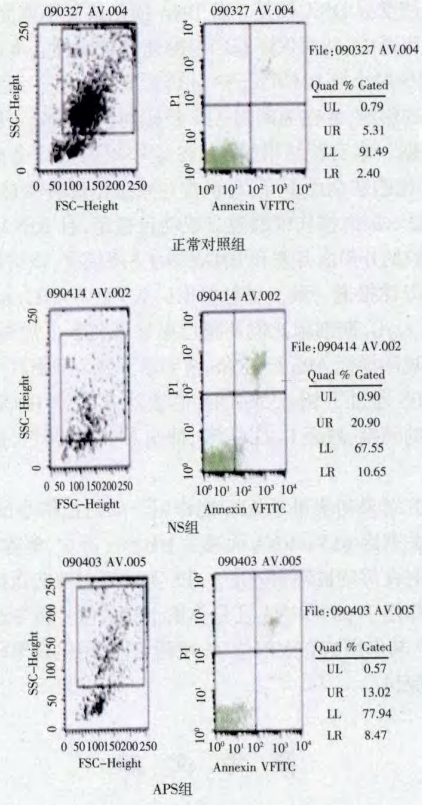


图 4　各组 BMNCs 凋亡率分析

3　讨　论

目前，放射治疗在肿瘤治疗中具有不可替代的重要作用[9]。但是放射治疗在杀伤肿瘤细胞的同时也会不同程度的抑制机体造血系统的功能，引起继发感染和出血等并发症[10]。因此，寻找疗效可靠的防治辐射作用的药物也是目前研究的热点之一。已知的一些具有防治辐射作用的药物主要有硫醇

类化合物[11]、细胞因子[12]、激素[13]、生物制剂等。由于这些药物毒性较大且价格昂贵，因此从天然药物中探索低毒、廉价、多靶点、高疗效的新型辐射防护剂是近年来研究的一个方向[14]。当归是祖国传统医学的补血、活血的要药，已有数千年的临床应用历史，且药源广、毒性低，使其在中药研究中显示出巨大的优势和潜力[15]。既往研究证实：APS 是当归中“补血”或促进血细胞发生的有效成分之一，APS 能显著提高辐射损伤小鼠外周血象，促进造血功能恢复。但迄今为止，APS 抗辐射损伤的分子生物学机理尚不清楚。

p53 是目前研究最多的肿瘤抑制基因之一，在维持基因组稳定性方面发挥关键性作用[16]。既往研究证实，p53 作为转录因子结合并参与许多细胞功能的调控，如细胞周期控制、DNA 修复、细胞分化等，同时 p53 也是电离辐射诱导动物细胞凋亡过程的主要调节成分之一[17,18]。p53 是目前公认的引起 G_0/G_1 期阻滞的核心分子，可与特异的 DNA 序列结合，调节与细胞周期阻滞和凋亡相关的基因的转录[19]，控制细胞周期进程，介导 G_0/G_1 期阻滞，而 G_0/G_1 期阻滞可提供充分的时间来促使受损 DNA 修复。若 DNA 损伤修复不能完成，就会诱发细胞凋亡，从而保证基因组的遗传稳定性。本研究通过观察 APS 对小鼠 BMNCs p53 mRNA 表达水平、细胞周期和凋亡率的影响，旨在为阐明 APS 抗辐射损伤的分子机制提供实验依据。本实验结果显示：NS 组小鼠照射后全血各系及 BMNCs 细胞数全面下降，与正常对照组相比有明显差异（$P<0.05$），提示放射损伤模型建立成功且稳定，且 APS 组可减少射线所致的外周血各系和 BMNCs 的下降幅度，该结果与其他研究者以往报道一致。辐射损伤后 NS 组 BMNCs p53mRNA 的表达、G_0/G_1 期细胞比例及凋亡率显著高于正常对照组，但以上各观测指标 APS 组较 NS 组明显下降。推测其可能的机制是 APS 通过下调 p53mRNA 的表达来加速 BMNCs 由 G_1 到 S 期的转换，减轻 G_0/G_1 阻滞，抑制 BMNCs 凋亡，促进造血恢复。

研究结果初步显示 APS 能作用于放射损伤小鼠 BMNCs 凋亡相关基因 p53 mRNA 而减少 BMNCs 凋亡、解除 G_0/G_1 阻滞而具有良好的抗辐射效应。APS 防护辐射性造血损伤机制是单独作用于 p53mRNA 还是作用于相关信号传导通路而发挥功能？其作用的有效部位、作用靶点、作用机理等研究还有待深入探讨。

参 考 文 献

[1] 张 雁，杜小丽，吴 宏，等.当归多糖对小鼠骨髓和外周血单个核细胞粘附分子表达及粘附功能的影响[J].第四军医大学学报，2009，30(23)：2753-2756.

[2] 吴 宏，胡 晶.当归多糖对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究[J].中草药，2006，37(12)：1835-1838.

[3] 郑 敏，王亚平.当归多糖对人髓系多造血祖细胞增殖分化的影响及其机理研究[J].解剖学杂志，2002，25(2)：105-108.

[4] 孙元琳，顾小红，李德远，等.当归多糖对亚急性辐射损伤小鼠的防护作用研究[J].食品科学，2007，28(2)：305-308.

[5] 孙元琳，顾小红，李德远，等.当归多糖对急性辐射损伤小鼠外周血淋巴细胞的保护作用[J].中华放射医学与防护杂志，2006，26(4)：369-370.

[6] Bastianutto C，Mian A，Symes J，et al.Local radiotherapy induces homing of hematopoietic stem cells to the irradiated bone marrow[J].Cancer Res，2007，67(21)：10112-10116.

[7] Stickney D R，Dowding C，Authier S，et al.5-androstenediol improves survival in clinically unsupported rhesus monkeys with radiation-induced myelosuppression[J].Int Immunopharmacol，2007，7(4)：500-505.

[8] 张 雁，吴 宏，关雪晶，等.当归多糖预防给药对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞粘附分子表达及细胞周期的影响[J].中国生物制品学杂志，2010，23(6)：627-632.

[9] Kwon J H，Bae SH，Kim J Y，et al.Long-term effect of stereotactic body radiation therapy for primary hepatocellular carcinoma ineligible for local ablation therapy or surgical resection[J].BMC Cancer，2010，10(1)：475.

[10] Mathews M S，Peck W W，Brant-Zawadzki M.Brown-Séquard syndrome secondary to spontaneous bleed from postradiation cavernous angiomas[J].AJNR Am J Neuroradiol，2008，29(10)：1989-1990.

[11] Yin Y，Qiu J，Yang L，et al.A new vapor generation system for mercury species based on the UV irradiation of mercaptoethanol used in the determination of total and methyl mercury in environmental and biological samples by atomic fluorescence spectrometry[J].Anal Bioanal Chem，2007，388(4)：831-836.

[12] Chen M F，Chen W C，Lai C H，et al.Predictive factors of radiation-induced skin toxicity in breast cancer patients[J].BMC Cancer，2010，10(1)：508.

[13] Chen B J，Deoliveira D，Spasojevic I，et al.Growth hormone mitigates against lethal irradiation and enhances hematologic and immune recovery in mice and nonhuman primates[J].PLoS One，2010，16，5(6)：11056.

[14] Lee T K，Johnke R M，Allison R R，et al.Radioprotective potential of ginseng[J].Mutagenesis，2005，20(4)：237-243.

[15] Zhong Y H，Han G，Zhou Y F，et al.Protection of Angelica sinensis against radiation-induced pulmonary fibrosis in mice[J].Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi，2007，41(2)：105-109.

[16] Joerger A C，Fersht A R.The tumor suppressor p53：from structures to drug discovery[J].Cold Spring Harb Perspect Biol，2010，2(6)：a000919.

[17] Wong S H，Shih R S，Schoene N W，et al.Zinc-induced G_2/M blockage is p53 and p21 dependent in normal human bronchial epithelial cells[J].Am J Physiol Cell Physiol.，2008，294(6)：C1342-1349.

[18] Nantajit D，Fan M，Duru N，et al.Cyclin B1/Cdk1 phosphorylation of mitochondrial p53 induces anti-apoptotic response[J].PLoS One，2010，23，5(8)：e12341.

[19] Mihara M，Erster S，Zaika A，et al.p53 has a direct apo ptogenic role at the mitoehondria[J].Mol Cel，2003，11：577-590.

（责任编辑：冉明会）