DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.001
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0713-04

论著

角质细胞生长因子对肠上皮细胞辐射损伤的防护作用

王小华,周 舟,朱光旭,楼淑芬,冉新泽,程天民,余争平 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨角质细胞生长因子(KGF)的辐射防护作用与机制,为应用KGF防护肠道辐射损伤提供实验依据。方法 应用正常及不同剂量γ射线损伤的肠上皮细胞(IEC-6),通过在培养体系中加入不同剂量的KGF后检测细胞增殖活性的变化以及凋亡细胞百分率,作为KGF辐射防护效应和细胞辐射敏感性变化的指标。结果 正常培养的IEC-6细胞,KGF呈剂量依赖型促细胞增殖作用;10 Gy照射后KGF促细胞增殖作用显著减弱。KGF预处理能显著降低IEC-6细胞辐射敏感性,其IP_{50}(50%增殖抑制照射量)从对照(15.3±0.6) Gy降至(12.2±0.4) Gy。结论 KGF具有促肠上皮细胞增殖作用,其辐射防护作用表现为降低细胞辐射敏感性,抑制辐射诱导的细胞凋亡可能是其作用机制之一。

关键词:KGF;辐射;IEC-6;细胞增殖活性;细胞凋亡
中图法分类号:R322.45;R852.7 文献标识码:A

Protective effect of keratinocyte growth factor on intestinal epithelial cell line No. 6 after irradiation

WANG Xiao-hua, ZHOU Zhou, ZHU Guang-xu, LOU Shu-fen, RAN Xin-ze, CHENG Tian-ming, YU Zheng-ping (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study radioprotective effect and the mechanism of keratinocyte growth factor (KGF) on irradiation-induced intestinal epithelial cell line No. 6 (IEC-6) in order to found a basis for KGF clinical application. Methods KGF was added to the culture medium of IEC-6 pre-and post-exposured to various doses of irradiation. Cell proliferation and percentage of apoptic cells were determined to indicate the radioprotective effect and cell radiation sensitivity of KGF. Results KGF exerted dose-depended effect on the proliferation of normal cultured IEC-6 and the effect was significantly alleviated on that of the radiated IEC-6. The pre-administration of KGF reduced the IEC-6 radiation sensitivity significantly and 50% inhibition dose of irradiation for cell proliferation (IP_{50}) was decreased from (15.3±0.6)Gy in non-KGF-treated group to (12.2±0.4)Gy in KGF-treated group. Conclusion KGF possesses the effect of improving the proliferation of IEC-6 and its radioprotective effect might be due to the decrease of cell radiation sensitivity and the inhibition of the apoptosis of radiation-reduced cells.

Key words: keratinocyte growth factor; irradiation; intestinal epithelial cell line No. 6; cell proliferation; apoptosis

肠上皮细胞是构成肠粘膜屏障的主要细胞成份,它具有增殖代谢旺盛、更新周期短等生理特点,对电离辐射极为敏感,是射线损伤的重要靶细胞之一[1]。辐射致肠道损伤,常见于核爆炸、核事故中受大剂量射线照射,更是临床腹部肿瘤放疗过程中最为常见的并发症之一。探讨电离辐射致肠上皮细胞损伤与修复的机制,寻找辐射致肠道损伤的防治措施,是放射生物学领域十分重要的课题。

近年来研究证明,角质细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)具有促进上皮细胞的增殖与分化并对电离辐射损伤具有防护作用。在美国,KGF是少数

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770239)
作者简介:王小华(1972—),男,重庆市忠县人,硕士研究生,医师,主要从事电离辐射的信号传导与防护方面的研究。电话:(023)68752009
收稿日期:2000-01-17;修回日期:2000-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

几个经FDA批准进入Ⅱ期临床实验的生长因子之一，并有希望成为新类型辐射损伤防护剂应用于临床[2]。本研究以体外培养的大鼠空肠上皮细胞株(IEC-6细胞)为模型，着重研究了KGF对IEC-6细胞辐射损伤的防护效应。旨在为临床应用KGF作为辐射损伤保护作用的细胞生长因子提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

正常大鼠空肠上皮细胞株(Intestinal epithelium cell line No.6, IEC-6)由本所从美国引进。

1.2 主要试剂

DMEM培养基(美国Sigma公司产品)按产品说明书配制，培养液每升另加Hepes 10 ml，青霉素 1×10^5 U，链霉素 100 mg，$NaHCO_3$ 3.7 g，灭活胎牛血清 100 ml，临用前无菌加入L-谷氨酰胺200 mmol/L。KGF(美国Sigma公司产品)以DMEM培养基稀释成200 ng/ml浓度，分装－70℃条件贮存。MTT(美国Sigma公司产品)以0.1 mol/L PBS(pH 7.4)无菌配成5 mg/ml，4℃冰箱保存2周内备用。其他试剂均为北方同正公司产品。

1.3 主要设备及器材

二氧化碳培养箱(美国Queue 2721型)，倒置相差显微镜(日本Olympus公司)，HT-7000 plus多孔读数仪(美国Perkin Elmer公司)。

1.4 细胞培养及辐照

IEC-6细胞的培养方法见文献[3]，细胞传5代后用于实验。培养细胞用 ^{60}Co γ射线一次性照射，照射剂量率为0.589 Gy/min，样品距源1.0 m，照射时间随实验所需剂量确定。

1.5 细胞增殖活性测定

用MTT比色法测定细胞增殖活性。处于指数生长期的IEC-6细胞用0.125%胰酶消化后，接种在96孔细胞培养板上，置CO_2培养箱内孵育，经不同实验处理的细胞在加入MTT溶液20 μl后继续培养4 h，然后弃培养上清，各孔加入150 μl的二甲基亚砜(DMSO)，室温振荡10 min，HT-7000 plus多孔读数仪490 nm处读取光密度值，以DMEM培养液作空白对照。

1.6 细胞凋亡检测

10 000个培养的IEC-6细胞在不同处理后，按Dive等[4]报道的方法用FACscan流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)检测细胞正向光散射与侧向光散射的变化，凋亡细胞的光反射信号由正向散射向侧向散射飘移，其变化强度为凋亡细胞的百分率变化。

1.7 实验分组

研究共分3组，每组实验均重复3次。①KGF对正常IEC-6细胞增殖活性影响的量效关系：将IEC-6细胞按 2×10^5 细胞/孔，接种于96孔培养板，在0～100 ng/ml范围内分别加入不同剂量的KGF，在加入KGF后1、2、4 d检测细胞增殖活性；②KGF对受照IEC-6细胞增殖活性影响的量效关系：将IEC-6细胞按 2×10^5 细胞/孔，接种于96孔培养板，用 ^{60}Co γ射线10 Gy照射，受照后30 min加入不同剂量的KGF继续培养，在加入KGF后1、2、4 d分别检测细胞增殖活性；③KGF预处理对不同剂量射线辐照的防护作用：将IEC-6细胞按 2×10^5 细胞/孔，接种于96孔培养板，以10 ng/ml KGF预处理24 h后，分别受不同剂量 ^{60}Co γ射线照射，受照后继续培养，于受照后2 d检测细胞增殖活性。上述3组实验中每次实验均平行重复至少3孔。

1.8 统计学分析

对不同剂量KGF处理后不同时间点细胞增殖活性的变化作双因素方差分析(Two-way ANOVA)，组内与组间差别作Student's t 检验；用非线性最小二乘法作曲线拟合，计算细胞增殖活性抑制50%时受照剂量值(50% Inhibition dose of irradiation for cell proliferation, ID_{50})，上述统计学分析均用Minitab 10统计软件(美国Minitab Inc公司)完成。

2 结果

2.1 KGF对正常培养的IEC-6细胞增殖活性的影响

KGF对IEC-6细胞显示出显著的促增殖作用，结果见表1。双因素方差分析表明，不同剂量的KGF处理与处理后不同时间对细胞增殖活性影响表现为交互作用显著($P<0.01$)；KGF处理对IEC-6细胞呈剂量依赖型促增殖作用，但随处理时间的延长逐渐减弱，表现在第1天KGF依赖浓度为0.1 ng/ml即显示促增殖作用，而在第4天，KGF浓度达到10 ng/ml时才表现出显著的促增殖效应，KGF浓度增加了100倍。这是否与细胞本身的老化致增殖活性降低有关仍有待进一步阐明。

表1 KGF对正常IEC-6细胞增殖活性的影响($n=9$, $\bar{x}\pm s$, D_{490})

Tab 1 Effects of KGF on the proliferation of normal IEC-6 cells($n=9$, $\bar{x}\pm s$, D_{490})

Dose(ng/ml)	Cell proliferation after KGF treatment (d)		
	1	2	4
0(Control)	0.111±0.007	0.149±0.014	0.247±0.018
0.01	0.118±0.016	0.151±0.050	0.240±0.017
0.1	0.129±0.010*	0.169±0.014	0.266±0.008
1	0.136±0.011**	0.174±0.012*	0.269±0.004
10	0.141±0.014**	0.191±0.007**	0.284±0.001*
100	0.144±0.015**	0.207±0.005**	0.304±0.013*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2 KGF对受照IEC-6细胞增殖活性的影响

培养的IEC-6细胞受 ^{60}Co γ射线10 Gy照射后30 min，在培养体系中加入不同剂量的KGF，观察KGF对辐射损伤的IEC-6细胞是否仍有促增殖作用。结果发现受照细胞仅在第1天KGF浓度为10 ng/ml时表现为显著的促增殖作用；而在其它检测时间点以及不同剂量组均未能观察到促增殖效应，双因素方差分析也未显示交互作用，见表2。这些结果表明，在受照的IEC-6细胞，KGF促增殖作用较之在正常细胞显著地减弱，提示KGF作为治疗药物促进辐射损伤细胞的修复，其效果可能不

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

佳。上述对比研究结果还提示, KGF 的促细胞增殖效应, 依赖于细胞本身结构的功能代谢是否正常。

表 2　KGF 对受照 IEC-6 细胞增殖活性的影响($n=9$, $\bar{x}\pm s$, D_{490})

Tab 2　Effects of KGF on proliferation of 10 Gy irradiated IEC-6 cells ($n=9$, $\bar{x}\pm s$, D_{490})

Dose(ng/ml)	Cell proliferation after KGF treatment (d)		
	1	2	4
0(Control)	0.128±0.005	0.086±0.006	0.068±0.009
0.01	0.124±0.012	0.084±0.012	0.064±0.001
0.1	0.134±0.010	0.090±0.008	0.071±0.004
1	0.137±0.008	0.089±0.007	0.074±0.010
10	0.149±0.007*	0.099±0.009	0.079±0.014
100	0.148±0.020	0.100±0.016	0.077±0.007

*: $P<0.05$ *vs* control

2.3　KGF 预处理的辐射效应

为了证实 KGF 是否有防护辐射损伤效应, 我们将培养的 IEC-6 细胞用 KGF 10 ng/ml 预处理 24 h,, 然后以不同剂量的射线辐照, 照后 2 d 测定细胞增殖活性。结果发现, KGF 预处理有显著的辐射损伤防护作用, 尤其是在受到较大剂量辐照(剂量大于 4 Gy)时这一作用尤为显著, 见图 1。在受辐照剂量 20 Gy 范围内, KGF 预处理组的 IP_{50} 值为(15.3±0.6)Gy, 而对照组 IP_{50} 值为(12.2±0.4)Gy, 两组相比差别非常显著($P<0.01$)。这一结果清晰地提示, KGF 预处理可降低 IEC-6 细胞的辐射敏感性。

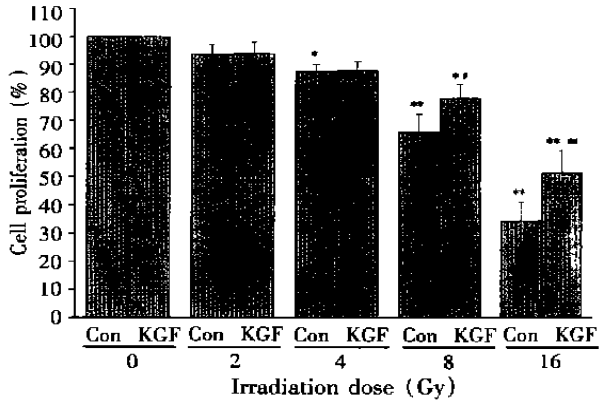


图 1　KGF(10 ng/ml)预处理 IEC-6 细胞后的辐射效应

Fig 1　Effects of pretreatment with KGF (10 ng/ml) on cell proliferation following different dose of γ irradiation in IEC-6 cells　*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 0 Gy; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

2.4　KGF 预处理抑制辐射诱导的细胞凋亡

用 KGF 10 ng/ml 预处理 IEC-6 细胞 24 h, 然后 γ 射线 10 Gy 辐照, 照后 24 h 检测凋亡细胞百分率。结果显示, KGF 预处理可显著地阻抑 10 Gy 辐照诱导的细胞凋亡, 见图 2。

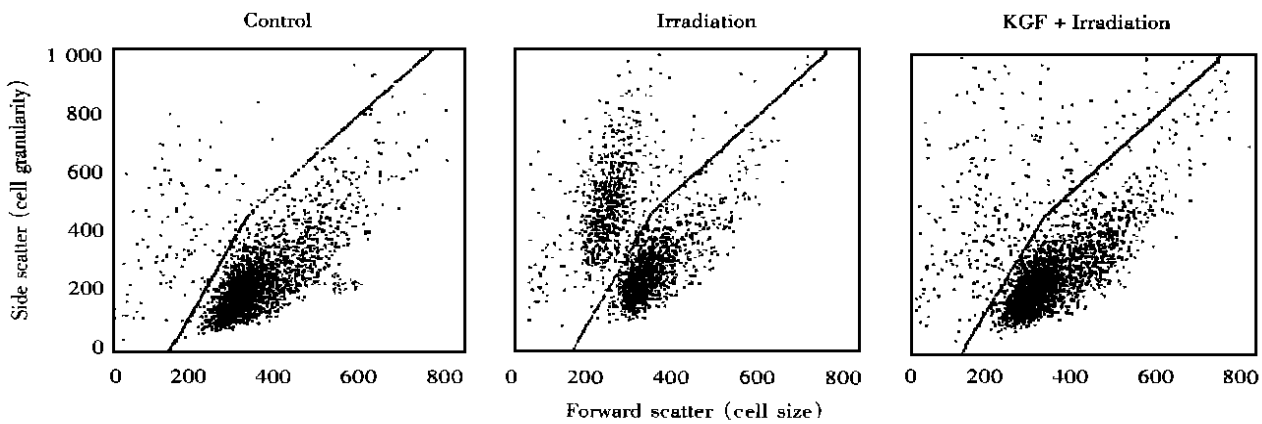


图 2　KGF 预处理抑制辐射诱导的细胞凋亡

Fig 2　Inhibition of γ irradiation induced apoptosis in IEC-6 cells by KGF pretreatment

3　讨论

KGF 是由间质细胞分泌的具有肝素结合特性的成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)家族中的一员, 又称为 FGF-7。KGF 的特异性靶效应细胞是上皮细胞。近年来大量研究证实, KGF 具有广泛的生物学活性。如 KGF 可促进上皮细胞增殖与分化[5]; 促进皮肤创面的愈合[6]; 维持细胞骨架的稳定等[7]。另外 KGF 在辐射损伤防护效应方面国外也有报道, 如 KGF 可提高小肠粘膜受到射线照射隐窝的存活率[8]; 对呼吸道上皮细胞受到射线照射和药物引起的粘膜炎具有保护效应[9]。KGF 能否作为辐射损伤防护剂正受到广泛关注。

本实验证实 KGF 对正常 IEC-6 细胞具有促细胞增

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

殖的作用,这一结果与文献报道的KGF在其它类型上皮细胞的生物学作用相一致;我们的研究进一步显示受10 Gy照射的IEC-6细胞,培养体系中加入KGF并未能显示出期待的促细胞增殖效应,说明KGF的促细胞增殖作用有赖于细胞处于正常生理状态,对已受辐射损伤的细胞,未能显示出促修复作用;提示KGF用于辐射肠道损伤中,其治疗效果仍取决于损伤程度的轻重,在仍残留部份隐窝干细胞的条件下,KGF仍有作为辐射防护剂促肠粘膜组织损伤修复的潜能;我们的实验还发现,KGF预处理能显著地降低IEC-6细胞对辐射损伤的敏感性即提高其辐射抗性,这一作用在受到大剂量辐照时更为显著。这表明,在腹部肿瘤放疗中预防性地应用KGF可能对减轻肠道辐射损伤的毒副作用具有重要应用价值。有人认为KGF促呼吸道上皮细胞增殖作用的潜在临床意义在于可以数倍地提高胸、肺部肿瘤放疗剂量[9]。基于本实验体外培养细胞所获得的结果,我们认为应用KGF即使不能促进损伤的修复,若能预防性地减轻辐射致组织损伤,也不失为有应用前景的新型辐射防护剂。

KGF的辐射损伤防护作用机制尚不清楚。但有研究表明KGF在呼吸道上皮细胞具有促进DNA合成修复的作用[10];还有人[11]观察到KGF可上调细胞内谷胱甘肽过氧化酶的表达,此酶在氧应激反应中清除细胞内氧自由基过程中起重要作用,因而认为KGF可增强细胞抵抗氧自由基损伤的机制。我们的研究发现,KGF的辐射防护作用可能与抑制辐射诱导的细胞凋亡有关,其直接的证据是KGF预处理可显著地降低辐射诱导细胞凋亡的百分率。细胞凋亡是电离辐射致组织损伤的重要效应方式之一,尤其是低剂量受照时细胞死亡的主要方式是发生凋亡,这也是肿瘤放疗的生物学基础。已有大量研究证实,细胞凋亡的启动与调控是构成细胞辐射敏感性变化的重要因素。我们的实验结果进一步支持这一观点。关于KGF抑制细胞凋亡并下调细胞辐射敏感性的分子机制,我们正在从细胞增殖(丝裂原)信号传导途径的激活、凋亡相关基因表达调控等环节进行深入研究。

综上所述,本研究进一步证实了KGF促正常上皮细胞增殖的效应。并且本研究中关于:①KGF体外对已受放射损伤的肠上皮细胞不具促修复增殖的作用;②KGF预处理可下调肠上皮细胞辐射敏感性;③KGF预处理可抑制辐射诱导的肠上皮细胞凋亡,并可能是其降低辐射敏感性的重要因素的结果和观点;未见有类似的报道。

(致谢:本文关于细胞辐射敏感性与凋亡的关系受日本产业医科大学松冈雅人教授启发式讨论,特致谢。)

参考文献:

[1] Cheng T M, Luo C J, Su Y P, *et al*. Medical management and its pathological basis of radiation combined injury in nuclear accidents[J]. Int Rev Armed Forces Med Services, 1996, LXIX 4/5/6: 119—122.

[2] Danilenko D M. Preclinical and early clinical development of Keratinocyte growth factor[J]. Toxicol Pathol, 1999, 27(1): 64—71.

[3] 冉新泽, 粟永萍, 程天民, 等. 大鼠小肠上皮细胞培养体系的建立及其影响因素的探讨[J]. 中国现代医学杂志, 1997, 7(5): 8—11.

[4] Dive C, Gregory C D, Phipps D J, *et al*. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis by multiparameters flow cytometry [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1 133(3): 278—285.

[5] Finch P W, Rubin J S, Miki T, *et al*. Human KGF is FGF-related with of a paracrine effector of epithelial cell growth[J]. Science, 1989, 245(4 919): 752—755.

[6] Werner S, Peters K G, Longaker M T, *et al*. Large induction of Keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(15): 6 896—6 900.

[7] Savla U, Waters C M. Barrier function of airway epithe-lium: Effects of radiation and protection by Keratinocyte growth factor[J]. Radiat Res, 1998, 150(2): 195—203.

[8] Khan W B, Shui C, Ning S, *et al*. Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor[J]. Radiat Res, 1997, 148(3): 248—253.

[9] Farrell C L, Bready J V, Rex K L, *et al*. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and irradia-tion-induced gastrointestinal injury and mortality[J]. Cancer Res, 1998, 58(5): 933—939.

[10] Takeoka M, William F W, Haunani P, *et al*. KGF repair of radiation-induced DNA damage in alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol, 1997, 272(6 Pt 1): 1 147—1 180.

[11] Frank S, Munz B, Werners S. The human homologue of a bovine-none-Seleillum glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene[J]. Oncogene, 1997, 14(8): 915—921.

(编辑 汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net