

· 论著 ·

五倍子酸对⁶⁰Co-γ射线辐照人肠上皮细胞的防护效应研究

孙会娟^{1,2}, 赵 涛² (1. 陕西渭南职业技术学院护理学院 陕西 渭南 714000; 2. 空军军医大学军事预防医学系辐射防护医学教研室, 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 陕西省自由基生物学与医学重点实验室 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 研究中药五倍子的有效成分五倍子酸(GA)对电离辐射诱导人肠上皮细胞(HIEC)损伤的防护作用及机制初探。**方法** 以4 Gy ⁶⁰Co-γ射线辐照 HIEC 细胞,建立细胞辐射损伤模型,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法观察不同浓度 GA 分别作用 12、24、48 h 后的细胞毒作用,以及 GA 对受照 HIEC 增殖能力的影响;平板克隆实验,观察 GA 对受照 HIEC 克隆形成能力的作用。酶联免疫吸附法(ELISA)检测 GA 对受照 HIEC 的超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)活力的影响;Western-Blot 法检测 GA 对受照 HIEC 的 G1/S-特异性周期蛋白 Cyclin D1 和细胞周期素依赖性激酶 CDK4 的表达的影响,以探讨 GA 对受照 HIEC 防护作用机制。**结果** 研究显示:① GA 作用 12 h,可以促进 HIEC 细胞的生长($P<0.05$),但随着作用时间的延长以及 GA 浓度的增加,GA 对 HIEC 细胞的生长表现出一定的毒性作用。② 4Gy 的 ⁶⁰Co-γ 射线照射下,1、10、20 μmol/L 的 GA 预处理能显著促进 HIEC 的细胞克隆形成率升高($P<0.05$)。③ 相同实验条件下,1、20 μmol/L 的 GA 预处理能显著升高受照 HIEC 的细胞增殖力($P<0.05$)。④ 同样实验条件下,1、10、20 μmol/L 的 GA 预处理能显著升高 HIEC 的细胞 SOD 活力($P<0.05$);10 μmol/L 的 GA 预处理能显著升高 GSH 活力($P<0.05$);1 μmol/L 的 GA 预处理能显著升高细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)和周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)的水平($P<0.05$)。**结论** 本实验条件下 GA 能一定程度上减轻⁶⁰Co-γ射线所致 HIEC 损伤,其作用机制可能与 GA 降低 γ 射线引起的脂质过氧化并减轻细胞周期阻滞有关。

[关键词] 五倍子酸;辐射防护;脂质过氧化;细胞周期蛋白 D1;周期蛋白依赖性激酶 4

[中图分类号] R81 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)04-0299-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.04.003

Protective effects of Gallic acid on ionizing irradiated HIEC cells

SUN Huijuan^{1,2}, ZHAO Tao² (1. Department of Nursing, Weinan Vocational & Technical College, Weinan 714000, China ; 2. Department of Radiation Protective Medicine, Ministry of Education Key Lab of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Shaanxi Provincial Key Laboratory of Free Radical Biology and Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and primary mechanism of Gallic acid on ⁶⁰Co-γ ray induced Human Intestinal Epithelial cell (HIEC) damage. **Methods** HIEC in the exponential phase were inoculated in petri dishes and were randomly divided into sham exposure group and exposure group. The exposure group was exposed to 4Gy ⁶⁰Co-γ ray. CCK-8 method was used to detect cell proliferation ability. Clone formation method was used to observe the effects on clone formation ability, ELISA assay was used to evaluate the resistance effects on the lipid oxidation reaction, and Western-Blot test was used to observe the effects of GA on cycle protein Cyclin D1 and CDK4 in irradiated HIEC cells. **Results** 1. GA can promote the growth of HIEC cells 12h after GA treatment ($P<0.05$). But GA has a toxic effect on the HIEC growth 24h and 48h after the treatment. 2. Compared with 4Gy ⁶⁰Co-γ ray irradiation exposure group, GA(1, 10, 20 μmol/L) can increase the proliferation rate of HIEC cell significantly ($P<0.05$). 3. Compared with 4Gy ⁶⁰Co-γ ray irradiation exposure group, pretreatment with GA(1, 20 μmol/L) increased the clone formation rates of HIEC cell significantly ($P<0.05$). 4. Compared with 4Gy ⁶⁰Co-γ ray irradiation exposure group, SOD activity of GA(1, 10, 20 μmol/L) treatment group increased significantly ($P<0.05$). GSH activity of 10 μmol/L GA treatment group increased significantly ($P<0.05$). 5. The expression level of cell cycle protein Cyclin D1 and CDK4 in GA (1 μmol/L) treatment group were significantly increased compare with γ ray irradiation exposure group. **Conclusion** GA has protective effect on ⁶⁰Co-γ ray irradiated HIEC cells. The mechanism may be related to the GA's capability as antioxidant, scavenging free radicals, regulating cell cycle and inhibiting cell apoptosis.

[Key words] gallic acid; radiation protection; lipid oxidation reaction; Cyclin D1; CDK4

[基金项目] 全军重点科研项目(BWS14J033)

[作者简介] 孙会娟, 硕士, 讲师, 研究方向: 辐射生物学, Email: 1540952325@qq.com

[通讯作者] 赵 涛, 博士, 硕士生导师, 副教授, 研究方向: 辐射生物学, Email: zhaotao@fmmu.edu.cn

现今,电离辐射在医药卫生、国防安全、工业加工等众多领域已被广泛应用,而人类在享受电离辐射带来益处的同时也承受着它对健康造成的威胁^[1]。目前为止,现有辐射防护剂仍未能攻克毒副作用大、价格昂贵等难题,因而无法推广应用。中药五倍子的主要有效成分五倍子酸(gallic acid, GA),具有抑菌、抗氧化、抗肿瘤、抗突变等生物活性作用^[2]。研究表明,GA能选择性抑制肿瘤细胞增殖,而对正常细胞无杀伤作用,此特点决定了其作为辐射防护剂研究的可行性^[3]。本研究通过观察GA对⁶⁰Co- γ 射线辐照人肠上皮细胞(HIEC)的防护效应及其作用机制,旨在探寻更加安全、经济、高效的新型辐射防护药物,以丰富辐射防护药物家族。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

GA(纯度98%,空军军医大学药物化学教研室提供);RPMI1640培养基、胎牛血清(FBS)(山东四季青生物技术公司);胰岛素(辽宁天生物制药股份有限公司);磷酸缓冲盐(PBS)(美国Solarbio Amresco公司);姬姆萨(Giemsa)染液(本实验室自制);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)(南京建成生物公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白质检测试剂盒(武汉Thermo公司);RIPA裂解液(南京碧云天生物公司);Cyclin D1蛋白、CDK4蛋白(武汉Amresco公司); β -肌动蛋白(β -actin)(CST公司)。

1.2 主要仪器

⁶⁰Co- γ 射线(空军军医大学钴源辐照中心);低温离心机(Heraeus公司);二氧化碳孵育箱(日本池本理化工业株式会社);酶联免疫检测仪(美国Bio-RAD Model680);荧光显微镜(日本Nikon公司);Power PacTMHC高电流电泳仪、Mini-PROTEAN[®]电泳槽、Mini Trans-Blot[®]转印槽(美国Bio-RAD)。

2 方法

2.1 GA配制

精确称取GA 34.024 mg,溶于10 ml反渗透水,混匀,用0.22 μ m滤器过滤,制成20 mmol/L母液,置4 $^{\circ}$ C冰箱储存备用。实验前用RPMI完全培养液,稀释成不同浓度的GA溶液。

2.2 细胞培养及分组

HIEC细胞培养于含10% FBS、1%双抗的RPMI培养基(0.25 U/ml胰岛素),置37 $^{\circ}$ C、5%的CO₂孵育箱中培养,48 h更换培养基,待细胞长至指数生长期进行实验。

将HIEC细胞分为3组,分组如下。①空白对照组:细胞不接受辐照和未经药物处理;②单纯辐照组:细胞接受4 Gy ⁶⁰Co- γ 射线照射;③GA+辐照组:不同浓度GA作用细胞6 h后再接受4 Gy ⁶⁰Co- γ 射线照射。

2.3 GA对HIEC细胞增殖力的影响

取指数生长期的HIEC细胞,接种于3个96孔培养板上,0.8 $\times 10^4$ /孔,至细胞贴壁后设空白对照组、GA不同浓度处理组,每组设6个复孔。GA浓度为0.1、1、10、20、40、60、80、100、200 μ mol/L,分别继续培养12、24、48 h后,弃掉培养基,加入含10% CCK-8的培养基继续培养3 h后,用酶联免疫检测仪测定吸光度(OD),测定细胞在450 nm波长处的吸光度,计算细胞增殖率。

细胞增殖率=(实验组细胞OD平均值-空白对照组细胞OD平均值)/空白对照组细胞OD平均值^[4]

上式中实验组为各GA浓度组。

2.4 GA对受照HIEC细胞克隆形成力的影响

取指数生长期的HIEC细胞,以4 $\times 10^2$ /孔接种于6孔板内,细胞贴壁后设置空白对照组、辐照组和GA+辐照组。GA+辐照组细胞在照前分别给予终浓度为1、10、20 μ mol/L的GA共培养,6 h后接受4 Gy的⁶⁰Co- γ 射线照射,照后1 h内弃掉旧培养液,加新鲜培养液3 ml/孔,继续培养至照后11 d或显微镜下可见50个以上细胞组成的克隆时终止培养,PBS冲洗,甲醇固定20 min,0.8% Giemsa染色3 h,清洗晾干后显微镜下进行克隆计数^[3,5]。

克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$;

克隆增殖率=[(处理组细胞克隆形成率-空白对照组克隆形成率)/空白对照组克隆形成率] $\times 100\%$ ^[5]

上式中处理组为各GA浓度组。本实验辐射条件选取4 Gy的⁶⁰Co- γ 射线照射,剂量率为99 cGy/min,该暴露参数是依据前期预实验结果而定^[3,5]。

2.5 GA对受照HIEC细胞增殖力的影响

取指数生长期HIEC细胞,种植于96孔培养板上,0.3 $\times 10^4$ /孔,贴壁后按实验“2.4”项方法分组并进行GA预处理。细胞经4 Gy⁶⁰Co- γ 射线照射后1 h内弃掉旧培养液,加入新鲜培养液2 ml/孔,继续培养72 h,用CCK-8法检测细胞活力,计算细胞增殖率计算方法同实验“2.3”项。

2.6 GA对受照HIEC细胞脂质过氧化能力的影响

接种指数生长期的HIEC细胞于10 cm培养皿上(1.5 $\times 10^5$ /ml,4 ml/孔),待细胞贴壁后按上述

分组及处理。4 Gy⁶⁰Co-γ 射线照射后 1 h 内弃掉旧液,加入新鲜培养液 4 ml/孔,继续培养 48 h 后收集上清液,冰上裂解 15 min,4℃ 离心(12 000 g × 15 min),根据试剂盒说明,检测脂质过氧化指标 SOD、MDA 和 GSH 的活力^[6]。

2.7 GA 对受照 HIEC 细胞周期相关蛋白表达的影响

HIEC 细胞生长至指数生长期,按上述分组及处理后,用 Western-Blot 法检测细胞中凋亡相关蛋白 Cyclin D1 和 CDK4 的表达。具体操作方法:用 100~200 μl 的 RIPA 细胞裂解液冰上裂解 20 min,4℃ 离心(12 000 g × 15 min),取上清液用 BCA 蛋白试剂盒进行 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白定量。用 10% SDS/PAGE 凝胶进行蛋白质电泳,电泳后用 PVDF 膜转印,封闭 1 h,再与 TBST 稀释的一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗分别孵育 1~2 h。后用高敏化学发光液孵育,Bio-Rad 化学发光仪扫描条带。样本中蛋白表达量用 Quantity One-4.6.2 (Bio-Rad, Hercules,CA)软件进行半定量分析处理^[7]。

2.8 数据统计与分析

所有实验至少重复 3 次,用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm S$ 表示。组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 GA 对 HIEC 细胞的毒性实验

图 1 表明:随作用时间的延长,GA 对 HIEC 细胞表现出一定的毒性作用,但在 12 h 内 GA(0.1、1、10、20、40) μmol/L 与对照组相比,对 HIEC 细胞增殖作用显著,且 0.1、1、10 μmol/L 的 GA 作用更为显著($P < 0.05$),本结果为进一步实验筛选出最佳的给药时间和药物浓度范围。

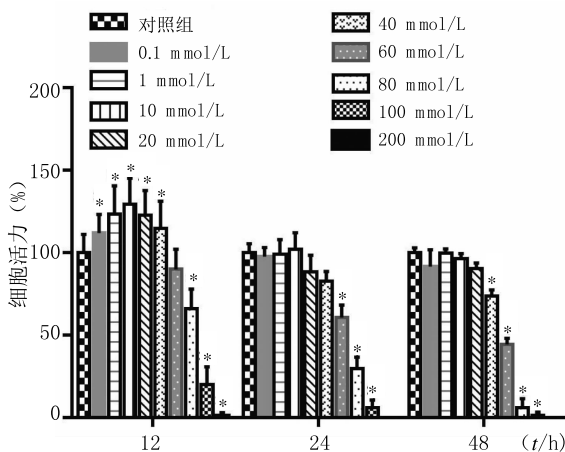


图 1 不同浓度 GA 对 HIEC 细胞活力的影响
* $P < 0.05$,与空白对照组比较

3.2 GA 对受照 HIEC 细胞克隆形成力的影响

如图 2 所示,细胞经 4 Gy⁶⁰Co-γ 射线照射后,各辐照组克隆形成能力均显著下降($P < 0.05$)。而照前 6 h 给予 GA 预处理能显著改善 HIEC 细胞的克隆形成力。实验结果显示:1、10、20 μmol/L 的 GA 预处理可使 HIEC 细胞的克隆形成力分别由 7.2% 上升到 22.7%、22.1% 和 15.7%,其中 1 μmol/L 的 GA 预处理组效果优于(10、20) μmol/L 的 GA 预处理组。实验表明,GA 能减轻辐照所致 HIEC 细胞克隆形成能力下降的程度。

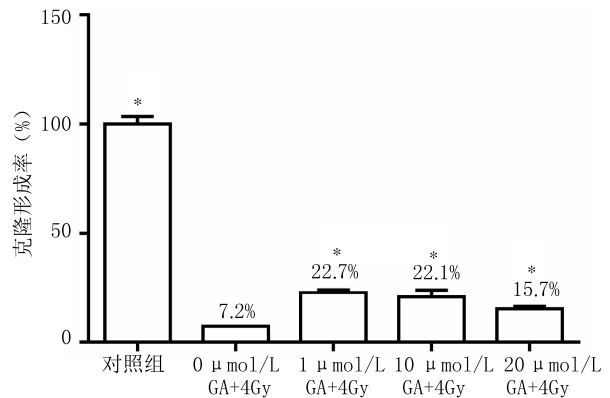


图 2 不同浓度 GA 对辐射损伤 HIEC 细胞克隆形成能力的影响
* $P < 0.05$,与对照组比较

3.3 GA 对受照 HIEC 细胞增殖力的影响

结果如图 3,本实验条件下,辐照组 HIEC 细胞活力显著下降,而照前 6 h 给予一定程度 GA 预处理能显著提高 HIEC 细胞的增殖能力,其中以(1、20) μmol/L 的 GA 预处理组作用效果最显著($P < 0.05$)。实验表明,GA 可以提高受照 HIEC 细胞的增殖能力。

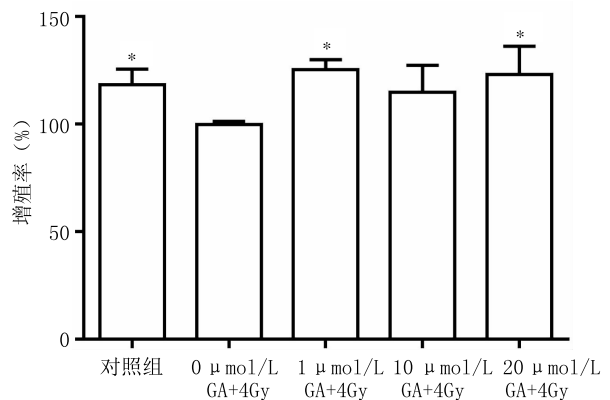


图 3 不同浓度 GA 对辐射损伤 HIEC 细胞活力的影响
* $P < 0.05$,与辐照组比较

3.4 GA 对受照 HIEC 细胞脂质过氧化能力的影响

实验结果见表 1,与空白对照组相比 4 Gy 的

^{60}Co - γ 射线辐照能显著降低 HIEC 细胞外代谢物中 SOD、GSH 的含量 ($P < 0.05$), 而给予 GA 预处理能显著减轻 SOD、GSH 下降的程度 ($P < 0.05$), 且以 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 GA 预处理组作用最显著。而

$10 \mu\text{mol/L}$ 的 GA 预处理与辐照组相比, 并未显著降低 MDA 水平 ($P > 0.05$)。说明本实验条件下, GA 能减轻辐照所致 SOD、GSH 下降的程度, 但对降低辐照后 HIEC 细胞的 MDA 水平并未有明显意义。

表 1 GA 对辐射损伤 HIEC 细胞 SOD、MDA 和 GSH 活性的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性 (pg/ml)	MDA 含量 (nmol/m)	GSH 含量 (ng/L)
空白对照组	78.24 ± 4.71*	3.80 ± 0.14	47.67 ± 2.07*
辐照组 (4 Gy)	61.65 ± 6.86 [#]	3.19 ± 0.07	40.72 ± 0.89 [#]
1 $\mu\text{mol/L}$ GA+4 Gy 组	78.04 ± 0.92*	4.02 ± 0.24	38.69 ± 0.81 [#]
10 $\mu\text{mol/L}$ GA+4 Gy 组	108.82 ± 2.75**	3.13 ± 0.07	57.60 ± 3.34 ^{#*}
20 $\mu\text{mol/L}$ GA+4 Gy 组	85.88 ± 1.57*	3.82 ± 0.07	35.15 ± 1.15 [#]

* $P < 0.05$, 与辐照组比较; [#] $P < 0.05$, 与对照组比较

3.5 GA 对受照 HIEC 细胞周期相关蛋白和激酶表达的影响

本实验用 Western-Blot 法检测了 GA 对受照细胞 Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的表达。结果如图 4 A、4 B、4 C 显示: 与空白对照组相比, 辐照引起 Cyclin D1 和 CDK4 水平下降, 照前给药 $1 \mu\text{mol/L}$ 的 GA 预处理能显著减轻 Cyclin D1 和 CDK4 水平下降的程度 ($P < 0.05$), 与辐照组相比 (10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 GA 预处理组能一定程度上抑制 Cyclin D1 和 CDK4 水平下降, 但差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 GA 可以推动辐照所致 HIEC 细胞由 G1 期进入 S 期, 而促进照后细胞增殖^[8]。

4 讨论

电离辐射诱导的损害主要表现为 DNA 分子损伤、细胞凋亡、氧化应激、染色体畸变和细胞周期改变等方面, 而对细胞膜的损害主要表现为辐射产物羟基和过氧自由基引起的细胞膜脂质过氧化反应^[1,3]。辐射防护剂的使用能一定程度减轻辐照所致脂质过氧化反应和细胞周期阻滞, 而起到辐射保护作用。

细胞毒性实验结果显示: GA 对 HIEC 细胞的细胞毒性作用体现在时效性和量效性两个方面。时效性表现为随 GA 作用时间的延长, GA 对 HIEC 细胞的毒性作用增加, 具体表现为: 12 h 内低剂量组的 GA 可促进 HIEC 细胞的增殖率, 无细胞毒性作用; 作用后 24 h 和 48 h, 不同浓度 GA 组细胞的增殖率均低于正常对照组, 且时间越长, 毒性越大。量效性表现为: 在不同时间点 (辐照后 12、24、48 h) 随着 GA 浓度的增加, 其细胞毒性作用增加; 但在辐照后 12 h 组, $0.1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ GA 对 HIEC 细胞增

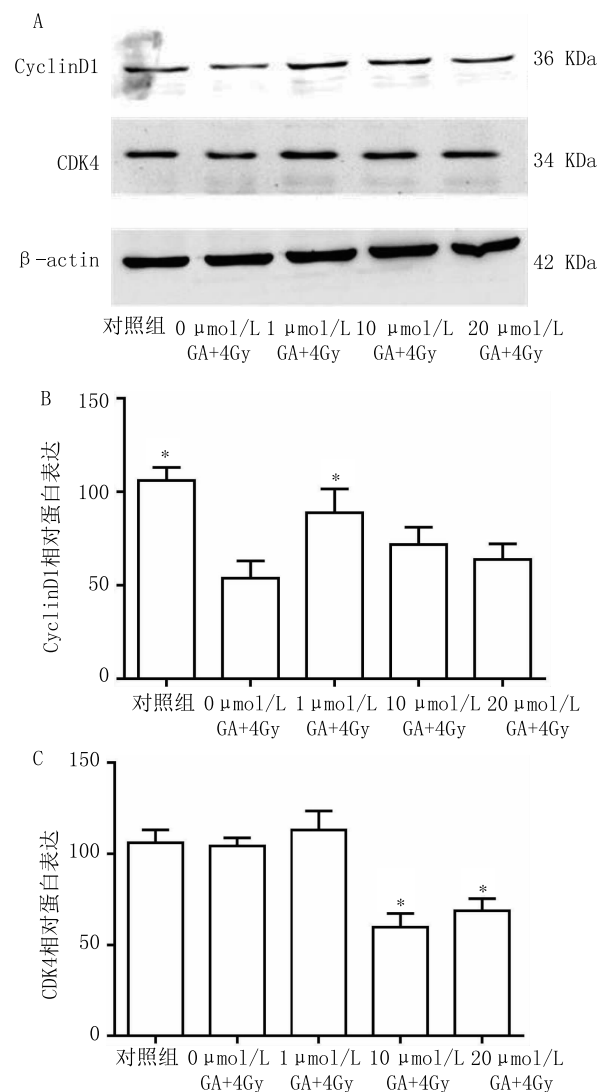


图 4 GA 对受照 HIEC 细胞周期蛋白 Cyclin D1、CDK4 的影响
* $P < 0.05$, 与辐照组比较

殖有促进作用, 无毒性作用, 且 1 、 10 、 $20 \mu\text{mol/L}$ GA 组与对照组相比, HIEC 细胞增殖率显著上升

($P < 0.05$)。

细胞克隆实验显示: $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线单照组的HIEC细胞的克隆形成能力降低,与正常组相比,差异有显著性($P < 0.05$)。细胞经GA提前6h预处理,能显著提高细胞的克隆形成力。与 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线单照组比较,GA(1、10、20 $\mu\text{mol/L}$)预处理组,HIEC细胞的克隆形成能力显著增加,有统计学差异($P < 0.05$)。而1 $\mu\text{mol/L}$ GA预处理组的细胞克隆形成能力增加效果最佳($P < 0.05$)。

细胞增殖实验结果显示:4 Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线照射条件下,照前6h给予不同浓度GA,能显著提高HIEC细胞的增殖力,其中以1、20 $\mu\text{mol/L}$ GA作用效果最显著。

与正常对照组相比,4 Gy的 γ -射线辐照可显著降低细胞内SOD、GSH的含量($P < 0.05$),而给予GA预处理,则能显著减轻细胞内SOD、GSH的下降($P < 0.05$),且以10 $\mu\text{mol/L}$ 的GA预处理组最显著。而与辐照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 的GA预处理组能减轻细胞内MDA水平的升高,但并无统计学差异($P > 0.05$)。说明GA可以降低电离辐射引起的细胞的氧化应激水平。

细胞周期是细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束的全过程,分为间期与分裂期两个阶段。细胞按照G1、S、G2、M、G1期的顺序周期性运转。Cyclin D1作为细胞周期蛋白依赖性激酶CDKs的调控者,与CDK4或CDK6结合并激活G1时期特有的周期蛋白依赖性激酶CDK4,G1期周期抑制蛋白(Rb)被磷酸化,磷酸化的Rb蛋白从其所结合的E2F转录因子上解离,E2F转录因子起始转录活细胞周期的基因,从而推动细胞周期由G1时期进入到S时期,进而促进细胞进行分裂。本研究证明,GA能减轻4 Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线暴露

细胞Cyclin D1和CDK4水平的降低,促进照后HIEC细胞增殖。

综合上述研究结果,我们发现:GA能减轻4 Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线诱导的HIEC细胞损伤,促进受照HIEC细胞增殖能力和克隆形成能力的恢复,其机制可能与GA能降低电离辐射引起的氧化损伤、抑制细胞凋亡、促进细胞周期相关蛋白Cyclin D1和CDK4表达有关。

本实验提供了一种较为理想的辐射防护候选药物,为进一步探究其防护作用及作为临床辐射防护药物应用奠定了一定基础。

【参考文献】

- [1] 郭娟,张琰君,安广洲,等. 丹参素对于电离辐射损伤小鼠的防护作用[J]. 时珍国医国药,2015,26(8):1811-1813.
- [2] 郑雪花,杨君,杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2017,37(1):94-98.
- [3] 孙会娟,张瑜,赵涛. 中药五味子及其活性成分的研究进展[J]. 基层医学论坛,2018,22(19):2728-2730.
- [4] 陈胜,刘珂,秦珊,等. CCK-8法检测蓝光和白光对ARPE-19细胞增殖的影响[J]. 国际眼科杂志,2018,18(08):1385-1388.
- [5] 胡雅梦,刘琅嬛,刘宝婵,等. 黄芪甲苷对肝细胞的辐射防护作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2015,12(33):1021-1026.
- [6] KARIMI-KHOUSANI O, HEIDARIAN E, AMINI S A. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats[J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(4): 830-835.
- [7] PERKINS C L, FANG G, KIM C N, et al. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(6):1645-1653.
- [8] 杨阳,陶仕英,牛建昭,等. 紫草素对宫颈癌SiHa细胞增殖周期的影响[J]. 环球中医药,2018,11(01):6-10.

[收稿日期] 2018-11-26 [修回日期] 2019-04-23

[本文编辑] 陈盛新