

脂肪来源干细胞移植干预兔骨骼肌放射性纤维化的实验研究

孙威 倪新初 孙苏平 蔡雷铭 于静萍 王坚 聂斌 孙志强 倪昕晔 曹秀峰

【摘要】 目的 观察脂肪来源干细胞(adipose-derive stem cells, ASCs)植入放射损伤骨骼肌后的纤维化程度改变,探讨 ASCs 对兔骨骼肌放射性纤维化的影响。方法 64 只新西兰兔单侧臀部予 9 MeV 电子线单次照射 80 Gy 后,采用随机数字表法分为 ASCs 组和 PBS 组,每组 32 只,照射 24 h 后照射侧分别肌肉注射 1 ml 含 5×10^7 ASCs 的 PBS 悬液和 1 ml PBS 缓冲液,未照射一侧作为各组的正常对照。分别于照射后 1、4、8 和 26 周,收集各组 8 只实验动物肌肉标本,计算 Masson 染色切片胶原纤维面积占总面积的比值,利用免疫组织化学及 Western blot 法检测骨骼肌中 TGF- β 1 蛋白的表达。结果 ASCs 植入骨骼肌后能在放射损伤部位迁移。ASCs 组及 PBS 组纤维化程度随照射后时间延长而加重,ASCs 组胶原纤维面积占总面积的比值较 PBS 组在照射后 4、8 和 26 周显著降低($t=4.62、5.99$ 和 $10.48, P < 0.05$)。ASCs 组骨骼肌组织 TGF- β 1 的 IOD 值较 PBS 组在照射后 4、8 和 26 周显著降低($t=3.79、16.45$ 和 $15.17, P < 0.05$)。Western blot 检测 ASCs 组 TGF- β 1 蛋白的表达水平较 PBS 组低。结论 ASCs 移植能抑制放射损伤骨骼肌组织 TGF- β 1 的表达减轻放射性纤维化。

【关键词】 脂肪来源干细胞; 骨骼肌; 放射性纤维化; TGF- β 1; 兔模型

Effects of adipose-derived stem cell transplantation on radiation-induced skeletal muscle fibrosis in rabbits Sun Wei*, Ni Xinchu, Sun Suping, Cai Leiming, Yu Jingping, Wang Jian, Nie Bin, Sun Zhiqiang, Ni Xinye, Cao Xiufeng. * Department of Radiotherapy, The Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China

Corresponding author: Ni Xinchu, Email: nixinchu@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of adipose-derived stem cell (ASC) transplantation on radiation-induced skeletal muscle fibrosis in New Zealand rabbits. **Methods** Totally 64 rabbits were irradiated at unilateral hip with a single dose of 80 Gy of 9 MeV electrons generated from a linear accelerator and then were randomly divided into ASCs group and PBS group with 32 rabbits in each group. The non-irradiated side with normal skeletal muscle was used as control. At 24 h after irradiation, 1 ml PBS containing 5×10^7 ASCs labeled with CM-Dil or 1 ml PBS was injected into the skeletal muscle in the irradiated side of these two groups, respectively. At 1, 4, 8 and 26 weeks after irradiation, the skeletal muscles of 8 rabbits in each group were collected. Masson staining was used to evaluate the level of skeletal muscle fibrosis. The expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in the skeletal muscle tissues was evaluated by immunohistochemical method (IHC) and Western blot. **Results** The fluorescence tracing method showed that ASCs could migrate in the injured muscle and fibrosis was more serious in the PBS group. The proportion of the area of collagen fibers to the total area in sections of ASCs group was lower than that of PBS groups at 4, 8 and 26 weeks after irradiation ($t=4.62, 5.99, 10.48, P < 0.05$). The expression level of TGF- β 1 protein in the ASCs group was significantly lower than that in the PBS groups at 4, 8 and 26 weeks after irradiation ($t=3.79, 16.45, 15.17, P < 0.05$). **Conclusions** ASC transplantation could alleviate radiation fibrosis by down-regulating the level of TGF- β 1 protein in the irradiated skeletal muscle.

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.03.003

基金项目:江苏省“333”人才工程资助项目;常州市“831工程”科研项目;常州市医学卫生创新人才资助项目(2-14);常州市卫生局指导性科技项目(WZ201018)

作者单位:213003 南京医科大学附属常州市第二人民医院放疗科(孙威、倪新初、孙苏平、于静萍、王坚、聂斌、孙志强、倪昕晔),病理科(蔡雷铭);南京医科大学附属南京第一医院肿瘤外科(曹秀峰)

通信作者:倪新初,Email:nixinchu@163.com

【Key words】 Adipose-derived stem cells; Skeletal muscle; Radiation fibrosis; TGF- β 1; Rabbit model

脂肪来源于干细胞(ASCs)是由 Zuk 等^[1]首次从脂肪抽吸物中分离得到的一种起源于中胚层的间质干细胞,具有自我更新与多向分化的潜能,并可作为组织工程学的种子细胞参与皮肤放射损伤的修复^[2]。组织器官的纤维化是放射治疗最常见的损伤结果之一,其组织学改变包括成纤维细胞的过度增生和胶原纤维的沉积^[3]。目前,国内外对于放射性纤维化的治疗以抗炎、高压氧舱、抗氧化剂等方法为主^[4],少有见利用 ASCs 治疗骨骼肌放射性纤维化的报道。本研究通过骨骼肌放射损伤组织的 ASCs 局部移植治疗,分析 ASCs 移植对兔骨骼肌放射性纤维化的影响,为骨骼肌放射性损伤的修复寻找可能的途径。

材料与方 法

1. 实验动物及主要试剂:选用南京市青龙山实验动物公司提供的健康新西兰白兔[许可证号 SCXK(苏)2007-0008,合格证号 0004282],雌雄各半。实验动物置于恒温、恒湿的动物房内分笼饲养,每日光照 12 h。实验中对动物的处置符合动物伦理学标准。荧光标记抗体 CD 90-FITC/IgG-FITC 购自美国 Abcam 公司;荧光标记抗体 IgG-RBITC/CD 34-RBITC/CD 31-FITC 及 Rabbit Anti-TGF β 1 购自北京博奥森公司;CM-Dil 活细胞染色剂购自美国 Invitrogen 公司;EliVision plus 试剂盒、DAB Kit 购自福州迈新公司;全蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、CL 检测试剂盒、Western blot 检测试剂盒、Bradford 蛋白含量检测试剂盒购自南京凯基公司。

2. ASCs 的分离和培养:取 26 周龄新西兰兔,体重(3 000 \pm 500)g,经戊巴比妥钠麻醉后固定,切取腹股沟及颈背部皮下脂肪,用含有 100 U/ml 青霉素及链霉素的 PBS 液冲洗数次后充分剪碎,加入等体积 0.1% 的 I 型胶原酶,37 $^{\circ}$ C 恒温条件下消化 90 min,过滤,离心半径 10 cm,1 500 r/min 离心 10 min,取上清,用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司)重悬细胞并计数,以 2×10^5 /ml 的密度将细胞接种于培养瓶。24 h 后首次换液,以后每 2~3 天换液 1 次。待贴壁细胞生长达 80%~90% 融合时用 0.25% 胰蛋白酶消化后以 1:3 传代。

3. ASCs 的鉴定、标记和扩增:取第 3 代处于对数

生长期的细胞,消化后制备细胞密度为 1×10^6 /ml 的细胞悬液,利用与兔组织存在交叉反应的抗体进行 CD31、CD34、CD90 检测,所有单抗均设 IgG 同型对照。取第 2 代细胞,经消化、离心后利用 PBS 缓冲液重悬细胞,按照 CM-Dil 染色试剂说明书进行染色。标记后的 ASCs 置于避光环境下继续培养。

4. 动物分组及照射方式:选取 64 只 8 周龄新西兰兔,雌雄不限,体重(1 500 \pm 250)g,采用随机数字表法随机分为 ASCs 组和 PBS 组,每组 32 只。参照文献^[5]建立骨骼肌放射性损伤的模型,两组动物均经腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后俯卧位固定,采用德国 SIEMENS 直线加速器 9 MeV 电子线对单侧臀部进行 1 次性 80 Gy 照射,源皮距 100 cm,剂量率 300 cGy/min,最大剂量深度约为 2 cm,未照射一侧作为各组的正常对照。

5. ASCs 移植及标本取材:照射后 24 h,ASCs 组照射部位局部肌肉注射 1 ml 含 5×10^7 经 CM-Dil 标记的 ASCs 的 PBS 悬液;PBS 组照射部位局部肌肉注射 1 ml PBS。各组局部照射后 1、4、8 和 26 周,各处死 8 只实验动物,取照射区域皮下约 2 cm 处肌肉组织 3 块,分别进行冰冻切片,观察 ASCs 植入骨骼肌后的分布及迁移情况,用 10% 中性甲醛固定,常规包埋、切片,进行 Masson 染色及 IHC 染色和置于液氮中保存,以行 Western blot 检测。

6. Masson 染色图像采集:每张 Masson 染色切片在高倍镜下($\times 200$)选取 5 个视野,使用 Image-Pro plus 6.0 软件圈出 Masson 染色呈绿色的胶原纤维,测量胶原纤维面积及各视野中总细胞面积,计算各切片中胶原纤维占视野总面积的百分比。

7. IHC 染色及图像采集:切片经过组织固定、脱蜡、水化、抗原修复后利用 3% H₂O₂ 消除内源性超氧化物歧化酶,加山羊血清封闭抗原后滴加兔抗 TGF- β 1,37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 2 h 后 PBS 浸洗 3 次,滴加通用型 IgG 抗体-Fab 段-HRP 多聚体进行一抗二抗反应,加 DAB 溶液进行显色后苏木精复染,利用乙醇脱水后中性树脂封固。同时以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以胞质染成棕黄色作为阳性判定标准。每张切片在高倍镜下($\times 200$)选取 5 个视野,使用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件行积分光密度(integral optical density, IOD)测量^[6],评估 TGF- β 1 的表达情况。

8. Western blot 测定肌组织 TGF-β1 蛋白表达: 取液氮中保存的肌肉组织约 200 mg 制备组织匀浆后按照蛋白抽提试剂盒说明书进行蛋白提取, SDS-PAGE 电泳分离出目的条带并转膜, 利用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h 后加入 Rabbit Anti-TGFβ1, 4℃ 孵育过夜, TBST 清洗后加入相应二抗, 室温下孵育 1.5 h, TBST 漂洗 3 次后用 ECL 法进行显影。

9. 统计学处理: 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验结果采用 SPSS 16.0 统计学软件包进行分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ASCs 形态学观察: 光镜下可见 ASCs 为梭形贴壁细胞, 呈成纤维状, 细胞核饱满居中(图 1A); 进行 CM-Dil 标记后, 细胞置于激发波长为 553 nm 的荧光显微镜下观察, 可见细胞膜及胞质均呈现均匀红色荧光, 荧光形状与细胞形状基本一致, 细胞核未染色(图 1B)。

2. ASCs 细胞表面抗原检测: ASCs 特异性抗原 CD90 呈高表达, 阳性率 93.1%, 内皮细胞特异性抗

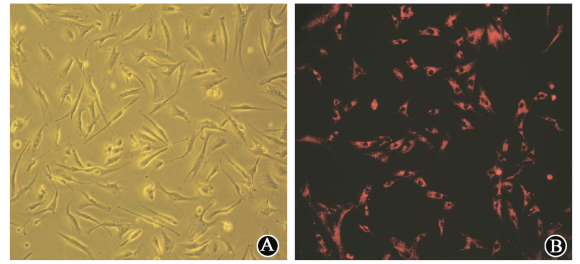


图 1 ASCs 细胞形态 A. 倒置相差显微镜下观察 ASCs 形态 未染色 $\times 100$; B. 荧光显微镜下 CM-Dil 标记后的 ASCs 形态 CM-Dil 染色 $\times 100$

原 CD31 和造血干细胞特异性抗原 CD34 呈低表达, 阳性率分别为 0.3% 和 0.2%。

3. CM-Dil 标记示踪 ASCs: 正常对照组及 PBS 组骨骼肌冰冻切片中均未见荧光; ASCs 组中见 CM-Dil 标记的 ASCs 呈红色荧光, 随时间延长, 标记的 ASCs 从针道向四周迁移, 荧光强度逐渐减弱(图 2)。

4. 骨骼肌中胶原纤维含量的变化: Masson 染色中肌细胞胞质呈红色, 胶原纤维呈蓝绿色。正常对照组肌纤维排列整齐、无明显肌细胞萎缩, 肌细胞

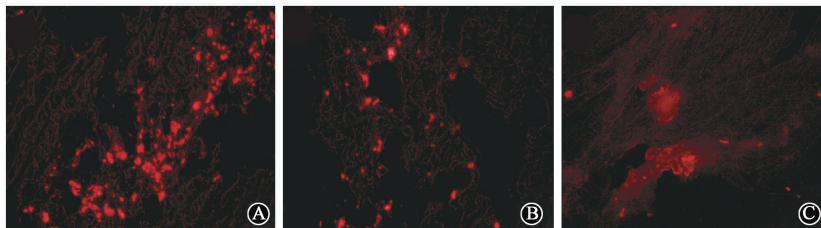


图 2 ASCs 组骨骼肌 ASCs 的分布、迁移 CM-Dil 染色 $\times 200$ A. 1 周时, ASCs 沿针道分布于骨骼肌中; B. 4 周时, ASCs 在骨骼肌中弥散分布; C. 8 周时, ASCs 分布较前弥散, 荧光强度衰减

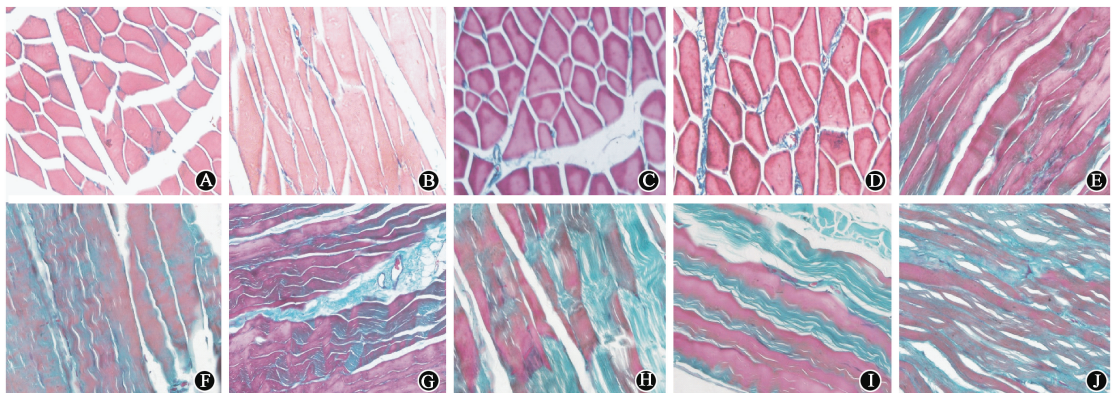


图 3 各组骨骼肌组织照射后不同时间纤维化程度的变化 Masson 染色 $\times 200$ A、B 分别为正常对照组横切面及纵切面; 1 周时 ASCs 组(C)和 PBS 组(D)肌细胞稍肿胀, 肌细胞间见少许胶原纤维增生; 4 周时 ASCs 组(E)与 PBS 组(F)相比骨骼肌细胞肿胀不明显, 肌细胞间增生的胶原纤维较 PBS 组少; 8 周时 ASCs 组(G)与 PBS 组(H)比较, 骨骼肌细胞变性、坏死, 胶原纤维增生明显减少; 26 周时 ASCs 组(I)较 PBS 组(J)肌细胞坏死明显减少, 增生的胶原纤维中见较多的残存骨骼肌细胞

间有少量胶原纤维。照射后 1 周, ASCs 组及 PBS 组中胶原纤维表达增加, 照射后 4、8 和 26 周, ASCs 组骨骼肌中胶原纤维占视野中总面积比例较 PBS 组降低, 差异有统计学意义 ($t = 4.615、5.994$ 和 $10.477, P < 0.05$, 图 3, 表 1)。

5. IHC 测定骨骼肌组织中 TGF- β 1 变化: TGF- β 1 主要表达于骨骼肌细胞质内, 阳性表达呈棕黄色, 正常组织中 TGF- β 1 较少表达。照射后 1 周,

ASCs 组及 PBS 组 TGF- β 1 的 IOD 值较正常对照组升高, 照射后 4、8 和 26 周, ASCs 组肌肉组织中 TGF- β 1 的 IOD 值低于 PBS 组 ($t = 3.787、16.454$ 和 $15.171, P < 0.05$, 图 4, 表 2)。

6. ASCs 移植对放射损伤骨骼肌组织中 TGF- β 1 蛋白表达的影响: Western blot 检测结果显示, ASCs 组肌肉组织中 TGF- β 1 蛋白表达水平在 1、4、8 和 26 周较 PBS 组有降低趋势, 见图 5。

表 1 各组照射后不同时间骨骼肌组织中胶原纤维占总面积的比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	1 周	4 周	8 周	26 周
正常对照组	64	0.029 \pm 0.008	0.029 \pm 0.006	0.031 \pm 0.008	0.029 \pm 0.007
PBS 组	32	0.034 \pm 0.009	0.105 \pm 0.024	0.126 \pm 0.031	0.273 \pm 0.052
ASCs 组	32	0.034 \pm 0.009	0.078 \pm 0.017 ^a	0.082 \pm 0.019 ^a	0.144 \pm 0.030 ^a

注: ^a 与 PBS 组比较, $t = 4.615、5.994$ 和 $10.477, P < 0.05$

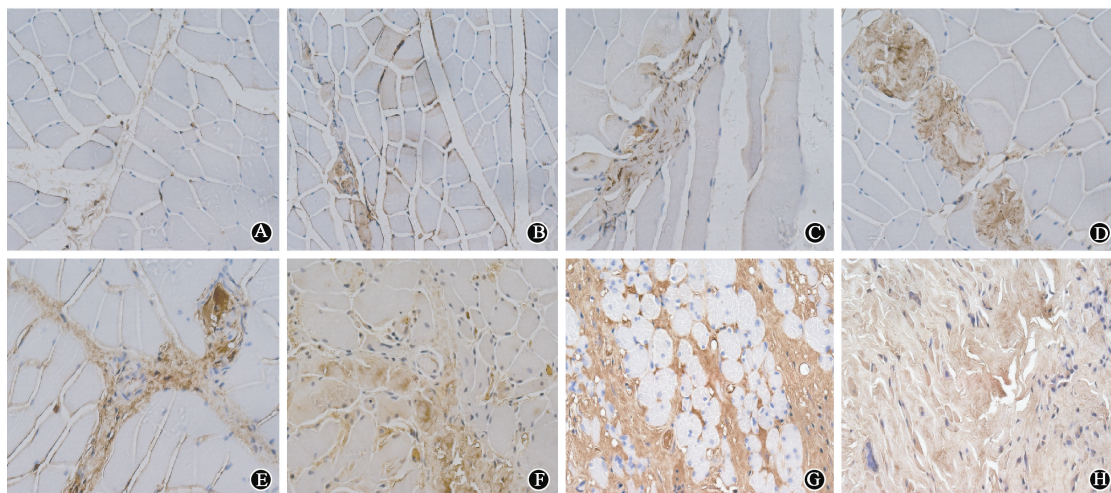


图 4 各组骨骼肌组织照射后不同时间 TGF- β 1 的变化 IHC 染色 $\times 200$ 1 周时 ASCs 组 (A) 与 PBS 组 (B) 肌组织中 TGF- β 1 无明显表达; ASCs 组 4 周 (C)、8 周 (E) 和 26 周 (G) TGF- β 1 表达逐渐增强, 但仍分别弱于同时时间点 PBS 组 4 周 (D)、8 周 (F) 和 26 周 (H) TGF- β 1 表达

表 2 各组骨骼肌组织照射后不同时间 TGF- β 1 的 IOD 值变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	1 周	4 周	8 周	26 周
正常对照组	64	356.96 \pm 61.76	353.06 \pm 66.38	352.88 \pm 72.16	363.21 \pm 57.18
PBS 组	32	1 059.09 \pm 117.77	2 202.94 \pm 192.68	3 738.95 \pm 315.15	5 848.20 \pm 427.84
ASCs 组	32	973.15 \pm 149.63	1 980.47 \pm 134.51 ^a	2 138.61 \pm 228.13 ^a	3 756.59 \pm 346.72 ^a

注: ^a 与 PBS 组比较, $t = 3.787、16.454$ 和 $15.171, P < 0.05$

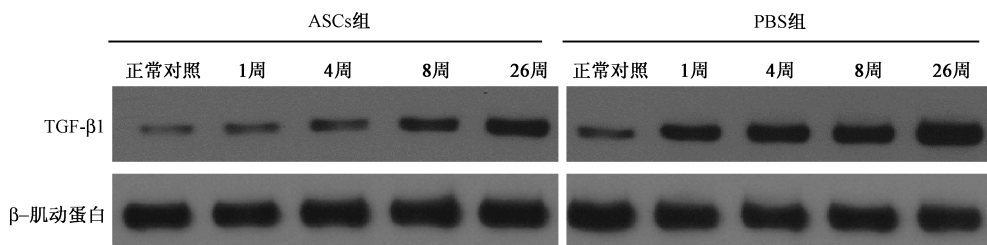


图 5 Western blot 检测照射后不同时间各组骨骼肌组织中 TGF- β 1 蛋白表达

讨 论

肿瘤患者接受放射治疗后可出现正常组织的放射损伤。骨骼肌放射损伤可导致患者出现张口困难^[7]、吞咽障碍甚至大便失禁等症状影响患者生活质量^[8-9]。Tedla 等^[8]给予患者喉部 60~66 Gy 照射后仅发现受照射组织中肌肉纤维含量减少,与未照射组相比胶原纤维含量未见明显改变。Hsu 等^[10]发现,给予鼠腓肠肌 80 Gy 照射发生骨骼肌放射性损伤,肌肉纤维之间胶原纤维增生明显。本研究中,单次照射 80 Gy 后随着时间的延长,ASCs 组及 PBS 组骨骼肌组织中胶原纤维不断增加,表明高剂量照射能导致骨骼肌发生放射性纤维化。

目前临床上常用的物理疗法和手术疗法治疗放射损伤均不理想^[4]。近年来随着组织工程学的发展,间质干细胞的应用为治疗放射性损伤提供新的思路。在一系列间质干细胞中,ASCs 具有组织来源丰富、易于取得、取材过程损伤较小、获取效率高、等优势^[11],正获得越来越多的关注。目前已证实,ASCs 移植对治疗肝硬化、特发性肺纤维化有一定的效果^[12-13],Kojima 等^[14]证实 ASCs 能减轻放射性唾液腺损伤,Akita 等^[2]研究表明 ASCs 能促进放射性皮肤损伤的修复。本研究成功提取兔 ASCs,并发现照射后 24 h ASCs 移植能减轻肌组织纤维化程度,表明早期给予 ASCs 干预能减轻骨骼肌放射性纤维化,减轻骨骼肌放射性损伤。

虽然放射性纤维化的机制尚不明确,但相关研究表明 TGF- β 1 在多种组织器官放射性纤维化过程中起到了关键作用^[15],在骨骼肌的纤维化级联反应中,TGF- β 1 能够下调肌原蛋白的表达、启动骨骼肌纤维化相关蛋白的形成^[16],此外,在促进大量细胞外基质沉积的同时诱导成纤维细胞向成肌纤维细胞分化,进一步增加胶原纤维和细胞外基质的生成,加重纤维化^[17]。多项研究表明,在接受照射的皮肤^[18]、咀嚼肌^[19]、肝脏^[20]等组织中均可检测到明显升高的 TGF- β 1 蛋白表达,并且升高程度与纤维化的程度相关^[20]。在本研究中,PBS 组受照射后骨骼肌组织中胶原纤维逐渐增加,肌组织中 TGF- β 1 蛋白表达随照射后时间的延长逐渐增强,提示高剂量照射后骨骼肌放射性纤维化与 TGF- β 1 升高相关。Yang 等^[21]研究发现,ASCs 能够通过降低受损心肌组织中 TGF- β 1 的表达保护受损心肌。本研究中,Western blot 结果示 1 周时,ASCs 组 TGF- β 1 的

表达低于 PBS 组,但 IHC 结果显示 1 周时两组未见明显差异,考虑与两种检测方法的灵敏度不同有关;4 周开始 Western blot 及 IHC 检测均发现 ASCs 组骨骼肌组织中 TGF- β 1 的表达明显低于 PBS 组,表明 ASCs 能降低放射损伤骨骼肌组织中 TGF- β 1 蛋白的表达,结合两组骨骼肌组织中胶原纤维的含量变化,提示 ASCs 可通过抑制组织中 TGF- β 1 的表达,减轻骨骼肌放射性纤维化。

综上所述,ASCs 局部移植能减轻骨骼肌组织放射性纤维化,这可能与 ASCs 抑制放射损伤骨骼肌组织中 TGF- β 1 的表达有关,具体机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13 (12):4279-4295.
- [2] Akita S, Akino K, Hirano A, et al. Noncultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury [J]. *Stem Cells Int*, 2010, 2010:532704.
- [3] Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis [J]. *Radiother Oncol*, 1995, 35 (2):83-90.
- [4] Delanian S, Lefaix JL. Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2007, 17 (2):99-107.
- [5] 孙威, 倪新初, 孙苏平. 高剂量照射兔骨骼肌放射损伤的超微病理研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2012, 32 (6):593-596.
- [6] Guo JH, Lou WH, Ji Y, et al. Effect of CCR7, CXCR4 and VEGF-C on the lymph node metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5 (5):1572-1578.
- [7] Gokhale AS, McLaughlin BT, Flickinger JC, et al. Clinical and dosimetric factors associated with a prolonged feeding tube requirement in patients treated with chemoradiotherapy (CRT) for head and neck cancers [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 (1):145-151.
- [8] Tedla M, Valach M, Carrau RL, et al. Impact of radiotherapy on laryngeal intrinsic muscles [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269 (3):953-958.
- [9] Smeenk RJ, Hoffmann AL, Hopman WP, et al. Dose-effect relationships for individual pelvic floor muscles and anorectal complaints after prostate radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 83 (2):636-644.
- [10] Hsu HY, Chai CY, Lee MS. Radiation-induced muscle damage in rats after fractionated high-dose irradiation [J]. *Radiat Res*, 1998, 149 (5):482-486.
- [11] Albersen M, Kendirci M, Van der Aa F, et al. Multipotent stromal cell therapy for cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction [J]. *J Sex Med*, 2012, 9 (2):385-403.
- [12] Seki A, Sakai Y, Komura T, et al. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model [J]. *Hepatology*, 2013, 58 (3):1133-1142.

- [13] Tzouveleakis A, Paspaliaris V, Koliakos G, et al. A prospective, non-randomized, no placebo-controlled, phase Ib clinical trial to study the safety of the adipose derived stromal cells-stromal vascular fraction in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2013, 11:171.
- [14] Kojima T, Kanemaru S, Hirano S, et al. Regeneration of radiation damaged salivary glands with adipose-derived stromal cells [J]. *Laryngoscope*, 2011, 121(9):1864-1869.
- [15] Pohlens D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF-beta1 and fibrosis in different organs-molecular pathway imprints [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(8):746-756.
- [16] Li Y, Foster W, Deasy BM, et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(3):1007-1019.
- [17] Smith CA, Stauber F, Waters C, et al. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats [J]. *J Appl Physiol*, 2007, 102(2):755-761.
- [18] Martin M, Lefaix JL, Pinton P, et al. Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation [J]. *Radiat Res*, 1993, 134(1):63-70.
- [19] 沈宗泽, 郑建金, 贾暮云, 等. 放射性咀嚼肌损伤模型软组织病理改变及转化生长因子 $\beta 1$ 的表达 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(15):2842-2846.
- [20] Anscher MS, Crocker IR, Jirtle RL. Transforming growth factor-beta 1 expression in irradiated liver [J]. *Radiat Res*, 1990, 122(1):77-85.
- [21] Yang JJ, Zhang HX, Zhao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells protect impaired cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury through hypoxia-induced paracrine mechanism [J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(6):505-514.

(收稿日期:2014-04-04)

· 在国外发表的 SCI 论文介绍 ·

白藜芦醇抑制辐射诱导的 NLRP3 炎症蛋白复合体激活的机制研究

付岳 王彦 杜利清 徐畅 刘建香 刘强 樊飞跃 苏旭

研究发现,电离辐射会引起机体炎性因子 IL-1 β 升高,产生氧化应激反应,直接影响人的身体健康。IL-1 β 是炎症反应的中心介质,研究表明 IL-1 β 的分泌与炎症细胞中 NLRP3 (Nod-like receptor protein 3 inflammasome) 炎症复合体相关,一旦被危险信号激活,该复合体就会切割 proIL-1 β ,使之转化为成熟的细胞因子 IL-1 β 。目前关于 NLRP3 炎症复合体的调节机制所知较少,已确定的机制是 NLRP3 转录表达必须依赖于 NF- κ B 转录因子。Sirt1 (Ⅲ型组蛋白去乙酰化酶) 通过去乙酰化作用调节转录沉默、DNA 损伤反应等重要细胞活动。转录因子 NF- κ B 是其靶蛋白, Sirt1 可以通过对 NF- κ B 进行去乙酰化加工进而抑制 NLRP3 的表达,实现抗炎抗凋亡作用。有研究证实,源于葡萄提取物的多酚类天然活性成分白藜芦醇是 Sirt1 的天然激活剂,通过 Sirt1 途径,白藜芦醇对炎症性疾病表现出良好的治疗前景。付岳等的“Resveratrol inhibits ionising irradiation-induced inflammation in MSCs by activating SIRT1 and limiting NLRP-3 inflammasome activation”一文,研究了间充质干细胞在受到 γ 射线照射后,细胞分泌和表达炎性因子 IL-1 β 水平的变化与辐射诱导 NLRP3 炎症蛋白复合体激活的关系,并探讨了白藜芦醇抑制辐射诱导的 NLRP3 炎症蛋白复合体激活的作用机制。

本研究中,首先验证了 Sirt1 与 IL-1 β 之间的关系,探索 Sirt1 在辐射诱导的 IL-1 β 表达中的作用。在受照后,间充质干细胞中 IL-1 β 蛋白和 mRNA 水平显著升高;然而在受照前

预先给予 Sirt1 激活剂白藜芦醇后,可明显抑制辐射诱导的 IL-1 β 表达,并且呈剂量依赖性;同时,在用 siRNA 沉默 Sirt1 或者使用烟酰胺抑制了胞内 Sirt1 后,胞内 Sirt1 mRNA 水平降低,白藜芦醇的抗炎作用明显减弱,单独的 Sirt1 RNA 干扰对辐射诱导的 IL-1 β 的分泌没有显著的影响,提示 Sirt1 在辐射诱发而产生 IL-1 β 的过程中具有重要作用。为了进一步探讨 Sirt1 蛋白是否通过 NF- κ B 通路进而抑制辐射诱导的 IL-1 β 表达,应用 NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 发现,在抑制了核转录因子 NF- κ B 活性后,无论给予 Sirt1 激活剂白藜芦醇或抑制剂 NAM,辐射诱导产生的 IL-1 β 都明显下降,说明 NF- κ B 在辐射引起的炎症中起到了重要的作用, Sirt1 蛋白可以通过 NF- κ B 通路进而抑制辐射诱导的 IL-1 β 表达。另外,在进一步检测辐射引起的细胞内 IL-1 β 变化的同时,也检测了 NLRP3 蛋白和 mRNA 水平的变化,结果显示在受照后,细胞内的 NLRP3 蛋白表达和 mRNA 水平升高,说明辐射可以激活 NLRP3 蛋白复合体,而且在辐射引起 NLRP3 蛋白高表达的同时,IL-1 β 的分泌和表达水平都显著上升,并且趋势和 NLRP3 的变化是一致的,说明电离辐射通过 NLRP3 通路引起的 IL-1 β 的升高。该实验结果提示,在间充质干细胞中,白藜芦醇通过激活 Sirt1 抑制 NF- κ B 的转录活性进而抑制了 NLRP3 复合体的形成,从而发挥抗炎效果。

该论文发表于 International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(7):14105-14118。该刊 2013 年 SCI 影响因子为: 2.464。