

KGF 对 IEC-6 的辐射防护作用与抑制 JNK/SAPK 的激活研究

王小华¹, 刘叔芳¹, 黄映雪¹, 刘明树¹, 江伟¹, 周舟², 余争平² (1. 重庆市公安局渝中区分局物证鉴定所 400013; 2. 第三军医大学劳动卫生学教研室, 重庆 400038)

【摘要】 目的 利用离体培养肠上皮细胞(IEC-6)观察角质细胞生长因子(KGF)的辐射防护作用, 并从 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)/应激活化蛋白激酶(SAPK)细胞信号传导途径的变化来探讨其作用的分子机制。**方法** 离体培养 IEC-6 分别经过 KGF 不同处理, 接受剂量率为 0.589 Gy/min, ⁶⁰Co γ 射线一次性照射, 进行细胞增殖活性、蛋白磷酸激酶活性和 JNK/SAPK 蛋白磷酸检测。**结果** KGF (10 ng/mL)预处理 IEC-6 24 h 可显著地降低细胞辐射敏感性, 增高辐射抗性; KGF1 预处理抑制辐射诱导 JNK/SAPK (thr183/thr185)磷酸化激活。**结论** 抑制 JNK/SAPK 分子的激活是 KGF 对小肠上皮辐射防护作用重要环节。

【关键词】 角质细胞生长因子; 肠上皮细胞; 辐射; c-Jun 氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.026 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0931-02

Radioprotective effects of keratinocyte growth factor on IEC-6 cells and reduces the radiation-induced activation of JNK/SAPK WANG Xiao-hua¹, LIU Shu-fang¹, HUANG Ying-xue¹, LIU Ming-shu¹, JIANG Wei¹, ZHOU Zhou², YU Zheng-ping² (1. Institute of Evidence Identification, Yuzhong Branch, Bureau of Chongqing Public Security, Chongqing 400013, China; 2. Teaching and Research Section of Labor Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To observe the radioprotective effect of keratinocyte growth factor (KGF) by using the intestinal epithelial cell (IEC-6) in vitro and to investigate the molecular mechanism of its action from the change JNK/SAPK cellular signal transduction pathway. **Methods** The in vitro cultured IEC-6 was differentially treated by KGF and received the once radiation of the dose rate of 0.589 Gy/min ⁶⁰Co γ ray. The detections of cellular proliferation activity, protein phosphokinase activity and JNK/SAPK protein phosphoric acid were performed. **Results** The KGF(10 ng/mL) pretreatment of IEC-6 for 24 h could significantly reduce the cellular radiation sensitivity and increased the radiation resistance; the KGF1 pretreatment inhibited the radiation-induced JNK/SAPK (thr183/thr185) phosphorylation activation. **Conclusion** Suppressing the activation of JNK/SAPK molecule could be an important link of KGF radioprotective effect on intestinal epithelium.

【Key words】 keratinocyte growth factor; intestinal epithelial cell; radiation; JNK/SAPK

肠黏膜屏障主要是由增殖代谢旺盛的肠上皮细胞组成, 对射线极为敏感, 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^[2-3]。角质细胞生长因子(KGF)便是新近出现的具有防治肠道辐射损伤潜能的新型生长因子之一^[4-5]。KGF 具有广泛的生物学活性: 如促进上皮细胞增殖与分化; 促进皮肤创面的愈合等。蛋白酪氨酸激酶(PTK)是一组能催化底物蛋白酪氨酸残基磷酸化的酶蛋白, 它们通过介导跨膜信号传导, 对于细胞生长、凋亡调控具有关键作用^[6-7]。本研究利用离体培养的肠上皮细胞(IEC-6)模型, 应用 KGF 作为拮抗 IEC-6 辐射损伤的主要干预措施, 研究 KGF 的辐射防护作用, 并从参与细胞损伤、诱导细胞凋亡的 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)又被称为应激活化蛋白激酶(SAPK)细胞信号传导分子的变化来探讨 KGF 作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 ⁶⁰Co γ 源购自中国核工, CO₂ 培养箱购自美国 Naurie 公司, 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司, 酶标仪购自 Bio-Tek FL600FA 公司, 垂直电泳槽及电泳仪和蛋白转印槽购自美国 Bio-Rad 公司, PVDF 膜购自 Roche 公司;

DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, Western blot 化学发光底物购自 Pierce 公司, Phospho-JNK/SAPK (thr183/thr185) 抗体和抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体 IgG1 购自 Santa 公司; IEC-6 由第三军医大学防原教研室冉新泽教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 IEC-6 培养及辐照 IEC-6 贴壁生长于 25 cm 的培养瓶, 培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清, 50 U/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素)中, 置于含 5% CO₂, 湿度为 95%, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 待生长到铺满瓶底的 70% 时用于实验。培养细胞用 ⁶⁰Co γ 射线一次性照射, 剂量率为 0.589 Gy/min, 样品距源 1.0 m, 照射剂量分别为 2、4、6、8、10、12、16 Gy。

1.2.2 细胞增殖活性测定 IEC-6 用 0.125% 胰酶消化后, 接种在 96 孔细胞培养板上, 置 CO₂ 培养箱内孵育, 经不同实验处理的细胞在加入 MTT 溶液 20 μ L 后继续培养 4 h, 然后弃培养上清液, 各孔加入 150 μ L 的二甲基亚砜(DMSO), 室温振荡 10 min, HT-7000plus 多孔读数仪 490 nm 处读取光密度值, 以 DMEM 培养液作空白对照。

1.2.3 实验分组 实验共分两组, KGF 预处理组(10 ng/mL

KGF 培养 24 h)和对照组,每组实验均重复 3 次。

1.2.4 免疫沉淀-Western blotting 每毫升细胞裂解液加入 20 μ L 蛋白-A 琼脂糖 4 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,离心,以抗 JNK/SAPK 抗体细胞裂解液中 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加 30 μ L 蛋白-A 琼脂糖在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。2 500 r/min 离心 5 min 收集沉淀,SDS 电泳加样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 2 min 使蛋白变性,3 000 r/min 离心去除蛋白 A-琼脂糖,转移上清液至另一离心管中。等体积细胞裂解液和等体积 2 $\times$ SDS 加样缓冲液,煮沸 3 min,进行 SDS-PAGE 电泳分析,电泳结束时将蛋白转于 PVDF 膜上;封闭液封闭 PVDF 膜后,加入适量抗 JNK/SAPK 抗体(抗体以含 1% BSA 的 PBS 稀释,工作浓度为 1:500~1:800)中温育 2 h 后与辣根过氧化物酶标记的 IgG 显色,拍摄照片成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 KGF 对 IEC-6 的辐射防护作用 KGF 10 ng/mL 预处理 24 h 可明显降低细胞辐射敏感性、增高辐射抗性。在受照剂量 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,差异有统计学意义($P<0.01$);KGF 的辐射防护效应随辐射剂量增大而增强,在受照剂量达到 8 与 16 Gy 时,KGF 预处理组细胞增殖活性分别为 $(84.2\pm 5.2)\%$ 、 $(65.7\pm 6.1)\%$,对照组分别为 $(64.3\pm 4.8)\%$ 、 $(39.7\pm 3.9)\%$,KGF 预处理组明显高于对照组($P<0.05$)。

2.2 KGF 预处理抑制了电离辐射对 JNK/SAPK 的激活 同对照组相比,16 Gy 辐照可明显诱导 IEC-6 JNK/SAPK 的蛋白质磷酸化激活;单独的 KGF 预处理对 IEC-6 JNK/SAPK 的蛋白质磷酸化激活无影响;KGF 预处理可以抑制 16 Gy 辐照诱导 JNK/SAPK(thr183/thr185)的激活。

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,Paul 等^[8]报道 KGF 具有减少放疗中上皮细胞的不良反应。本实验证实 KGF 预处理能明显降低 IEC-6 对辐射损伤的敏感性即提高其辐射抗性,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。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不良反应具有重要应用价值。

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。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^[9]。JNK/SAPK 信号通路可被应激刺激(如紫外线、热休克、高渗刺激及蛋白合成抑制剂等)、细胞因子、生长因子(EGF)及某些 G 蛋白耦联的受体激活^[10-11]。外界刺激可通过 Ras 依赖或非 Ras 依赖的 2 条途径激活 JNK,小分子 G 蛋白 Ras 超家族的成员之一 Rho 可能也是 JNK 激活的上游信号,Rho 蛋白 Rac 及 cdc42 的作用可能是与 p21 激活的丝/苏氨酸激酶 PAK 结合,使其自身磷酸化而被激活,而活化的 PAK 进一步使 JNK 激活。JNK/SAPK 接受上游信号被激活后,可以进一步使核内的转录因子 c-Jun 氨基末

端 63 及 73 位的丝氨酸残基磷酸化,进而激活 c-Jun 而增强其转录活性^[10-11]。但本研究显示,电离辐射也可以诱导 JNK/SAPK 的氨基末端 183 及 185 位酪氨酸残基磷酸化激活,其中 KGF 预处理可抑制电离辐射诱导 JNK/SAPK 的激活。抑制 JNK/SAPK(thr183/thr185)途径的激活是 KGF 对 IEC-6 辐射防护作用的重要环节。

参考文献

- [1] Sanchita PG, Shilpa K, Michael WP, et al. Amelioration of radiation-induced hematopoietic and gastrointestinal damage by Ex-RAD[®] in mice[J]. J Radiat Res, 2012, 53(4): 526-536.
- [2] Christopher DP, Matthew AC. Microbial influences on the small intestinal response to radiation injury[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2010, 26(2): 88-94.
- [3] Shihara H, Tanaka I, Yakumaru H, et al. Pharmaceutical drugs supporting regeneration of small-intestinal mucosa severely damaged by ionizing radiation in mice[J]. J Radiat Res, 2013, 54(6): 1057-1064.
- [4] Deborah C, Ana PC, Fuminori H, et al. Radioprotectors and Mitigators of Radiation-Induced Normal Tissue Injury[J]. Oncologist, 2010, 15(4): 360-371.
- [5] Tetsushi Y, Yoko M, Kiyoko K, et al. Keratinocyte growth factor stimulates growth of MIA PaCa-2 cells through extracellular signal-regulated kinase phosphorylation [J]. Oncol Lett, 2012, 3(2): 307-310.
- [6] Stephen LC, Amrita KC, John BT, et al. Radiation metabolomics and its potential in biodosimetry[J]. Int J Radiat Biol, 2011, 87(8): 802-823.
- [7] Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response[J]. Genes Cancer, 2013, 4(9/10): 401-408.
- [8] Paul WF, Lawrence J, Daniel FM, et al. Palifermin for the protection and regeneration of epithelial tissues following injury: new findings in basic research and pre-clinical models[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(9): 1065-1087.
- [9] Choi KS, Kundu JK, Chun KS, et al. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets[J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 559(1): 38-45.
- [10] Yoshino H, Chiba K, Saitoh T, et al. Ionizing radiation affects the expression of Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytic cells through c-Jun N-terminal kinase activation[J]. J Radiat Res, 2014, 55(5): 876-884.
- [11] Staples CJ, Owens DM, Maier JV, et al. Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(34): 25928-25940.