

射线诱导在体造血细胞凋亡的量时效关系的研究

邹仲敏* 陈兆珍** 罗成基* 李才安** 郭朝华* 王延江* 施炎*

(*第三军医大学防原医学教研室 **中心实验室 重庆 400038)

射线对骨髓造血组织的损伤是伤后造血功能抑制、出血、感染,以及免疫功能抑制和发生血液病的根本原因。骨髓型放射病是目前可能救治的最严重的放射病,一直是放射损伤防治的研究重点。由于骨髓造血细胞的异质性和造血调控的复杂性,研究射线对造血功能的损伤多以离体实验为主。凋亡概念的提出为研究放射损伤开拓了一个新领域。放射损伤作为一个确定的诱发凋亡的方法,它的效应是肯定的^[1]。由于缺乏射线诱导在体造血细胞凋亡的研究,尚不能确定离体实验的结果对于在体损伤的应用价值。本实验观察了在体射线损伤后,骨髓造血细胞凋亡的量效和时效关系。

材料和方法

1. 动物及分组

雄性健康昆明种小鼠,体重 20—25g,随机分为对照组和射线损伤组。用⁶⁰Co γ 射线单次全身照射致射线损伤,照射剂量分为 4、6、8 和 10 Gy,照射剂量率为 0.67Gy/min,每个剂量组分别于照后 4、8、12、24 和 48 小时五个时相点取材(n=6—10)。照后小鼠饮食条件如常。

2. 骨髓单个核细胞的分离

颈椎脱臼处死小鼠,经 75%酒精浸泡消毒后,分离双侧股骨,用适量 HBSS 冲洗之,所得骨髓冲洗液依次过 7#、5# 和 4# 针头即成单细胞悬液。用比重为 1.085 的 Percoll 细胞分离液(Pharmacia)梯度离心得到骨髓单个核细胞。

3. 流式细胞仪检测细胞凋亡

骨髓单个核细胞用 -20℃ 预冷的 75%乙醇固定, -20℃ 放置 >4 小时。用 HBSS 洗去乙醇,加入适量破膜液(PBS(pH7.4), 0.1% Triton X-100, 10mmol/L EDTA)。4℃ 过夜后,用 HBSS 洗,按 HBSS:磷酸盐-枸橼酸缓冲液(192 mmol/L 磷酸氢二钠, 4mmol/L 枸橼酸, pH 7.8)=1:0.5 重悬细胞,室温放置 5', 离心,向沉淀中加入 1ml 染色液(HBSS 含 10u/ml RNase 和

20 μ g/ml 碘化丙啶), 37℃ 消化 30 分钟,冰浴终止酶作用,流式细胞仪(Becton-Dickinson, USA)检测,激发光 488nm,接收光 >620nm,结果用 Lysis I 程序分析。DNA 含量和光散射用道数(channel)表示。

4. 骨髓单个核细胞 DNA 电泳

取 5×10^5 个骨髓单个核细胞,加入 20 μ l 消化液(50 mmol/L Tris · Cl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 0.5mg/ml 蛋白酶 K), 50℃ 水浴 1h, 加入 10 μ l RNase (0.5mg/ml), 37℃ 消化 1h, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳,电泳条件为 60V \times 3h, 以 100bp DNA 梯度(GibcoBRL)为标准参照物。

5. 数据统计分析

用本校数学教研室提供的统计程序包中的 MANOVA 程序进行双因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为统计学意义显著。

结 果

1. 骨髓造血细胞凋亡的量时效关系

在流式细胞仪的 DNA 含量直方图上,凋亡细胞出现在 G₀ 峰之前,称为亚 G₀ 峰,它反映凋亡的发生率(图 1)。我们发现正常骨髓细胞发生凋亡的几率是 6.85%。用双因素方差分析进行统计学处理,显示在本实验条件下,射线诱导的骨髓细胞凋亡的发生率受照射剂量和照后时间的影响均非常显著($P < 0.001$)。且两因素的交互作用非常显著($P < 0.001$)。从剂量上看,照后 4 小时,各剂量诱导的凋亡发生率明显高于对照组,而且各剂量间有明显差异($P < 0.05$),以 8 Gy 为最高,10Gy 反而明显降低;照后 8 小时的情况与 4 小时相似,但 6 和 8Gy 间已无明显差异;照后 12 小时,各剂量诱导的凋亡发生率虽明显高于对照组,但各剂量间已相近;照后 24 小时,4 和 8Gy 诱导的凋亡发生率已明显减低;照后 48 小时 4 和 6Gy 诱导的凋亡发生率仍高于对照组,而 8 和 10Gy 已与对

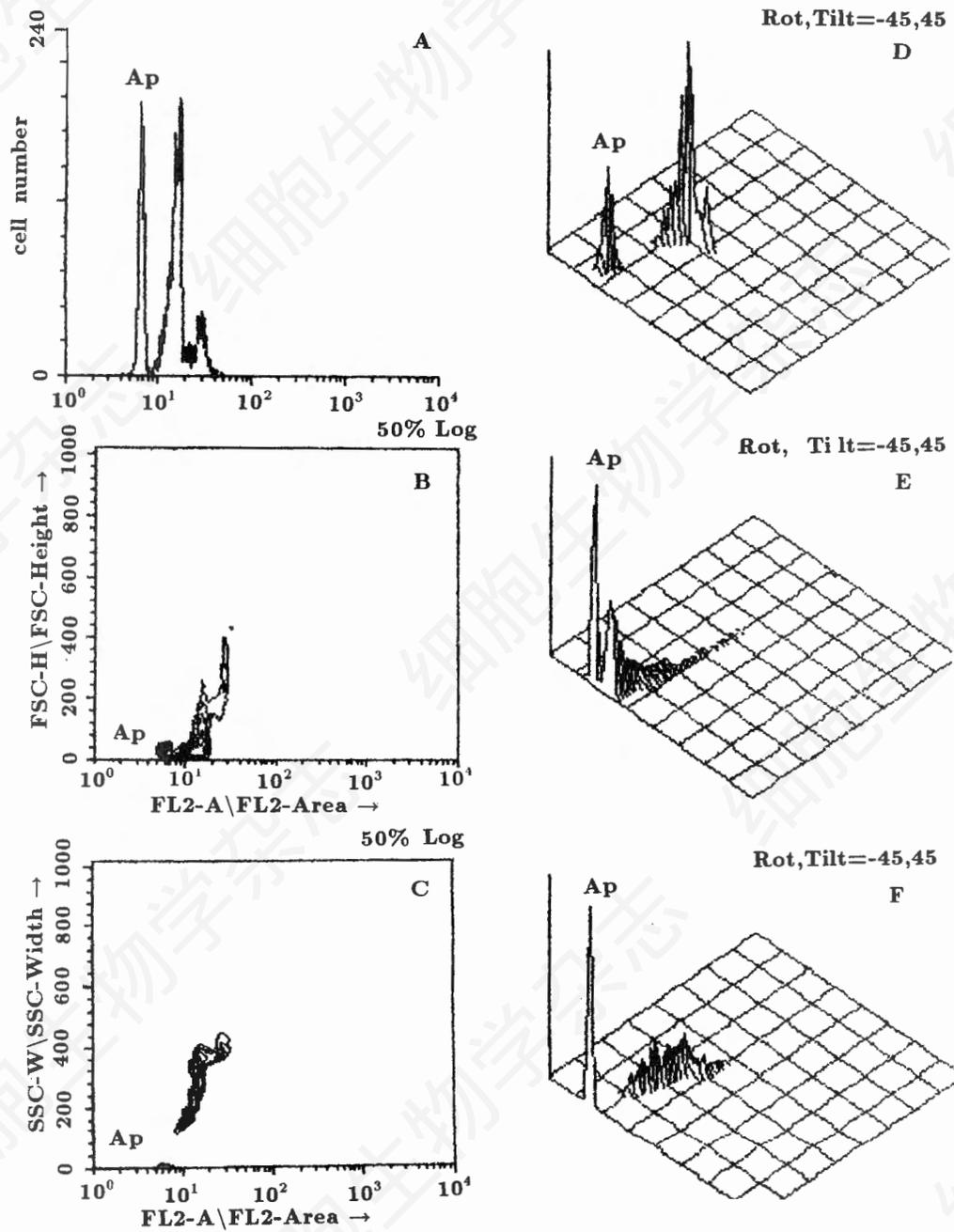


图 1 8Gy 射线照射后 8 小时骨髓细胞的流式细胞仪检测结果

- A. DNA 含量直方图；
- B. 以 DNA 含量和前向光散射 (FSC) 为坐标的等高图；
- C. 以 DNA 含量和侧向光散射 (SSC) 为坐标等高图；
- D、E 和 F 分别是 A、B 和 C 图相应的三维图。Ap 代表凋亡细胞。

照组相差无几。从时相上看,细胞凋亡发生率的峰值随照射剂量的增大而前移。4、6、8和10Gy射线损伤之后,细胞凋亡的峰值分别出现在照后12、8、4和4小时。总的看来,6和8Gy的射线损伤已使骨髓细胞凋亡的发生率达峰值水平(表1)。

2. 凋亡骨髓细胞的流式细胞仪光散射特性

在通过流式细胞仪时,细胞吸收光线并产生两个方向的散射,即前向光散射(FSC)和侧向光散射(SSC)。这两个光栅特性是反映细胞物理性质的参数,FSC反映细胞的大小,SSC代表细胞的颗粒密度。将FSC或SSC分别与细胞DNA含量(PI荧光)结合,或FSC与SSC结合所得结果相同(图1)。从流式细胞仪的SSC和FSC来看,凋亡细胞的大小和颗粒密度明显小于正常细胞,但凋亡细胞的FSC与正常细胞有重叠,而SSC则可作为区分正常造血细胞和凋亡细胞的辅助指标。

3. 骨髓造血细胞 DNA 电泳结果

射线损伤后,骨髓细胞的DNA电泳出现了凋亡特异的梯型带。与100bp的DNA标准物比较,骨髓细胞DNA电泳的梯型带间距约为180-200bp。定性地看,8小时时相点的梯型带比24小时的明显,提示凋亡细胞所占比例的差异(图2)。

讨 论

目前对射线诱导造血细胞凋亡的研究主要采用细胞株,得出一些共性的结论^[2,3]:射线诱导的凋亡发生率有一个平台,平台值和细胞凋

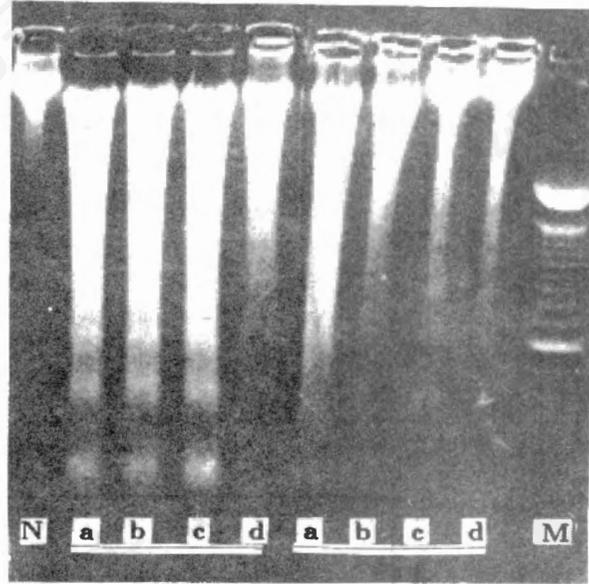


图2 骨髓细胞DNA电泳结果

N、a、b、c和d分别代表对照组、4、6、8和10Gy射线照射组,Marker(M)为100bp梯级。

亡达平台值的时间因细胞株和照射剂量而异;小剂量射线照射诱导细胞凋亡,而大剂量射线照射则使细胞发生坏死,各细胞系的具体剂量值不同。但是离体实验远不能反映在体造血细胞的不均一性和生活环境的复杂性对细胞凋亡的影响,在体和离体的淋巴细胞其射线敏感性的明显差异就是一个很典型的例子^[3]。

本实验以射线在体损伤的小鼠为模型,旨在确定离体实验结果对在体条件下的应用价值。从本实验的时效关系来看,照后24h细胞凋亡发生率有所下降,48h时已趋于对照水平。也就是说,我们只看到了峰值(peak),而不是高台

表1 射线诱导骨髓细胞凋亡的量时效关系

Dose	凋 亡 发 生 率 (%)				
	4h	8h	12h	24h	48h
4Gy	9.53±1.43	13.86±2.08*	19.07±2.86*	10.20±1.53*	11.77±1.77*
6Gy	16.58±2.49**	30.53±4.58**	17.69±2.65*	16.23±2.43*	10.85±1.63*
8Gy	28.17±4.23**	28.76±4.31**	19.32±2.90*	10.87±1.63*	5.48±0.78
10Gy	19.93±2.99**	12.50±1.88*	17.15±2.57*	16.40±2.46*	7.12±1.07

对照组凋亡发生率为6.85%,*与对照组比,#与4Gy组比,P<0.05。

(plateau)。这与离体实验所见的细胞凋亡发生率持续上升趋势或维持在高台水平等表现不同,我们认为,此差异乃在体清除机制的作用所致。在形态学观察到照后24小时细胞碎片已基本被清除,每见细胞碎片,甚至有的整个细胞被吞噬(待发表),说明此时吞噬活动非常活跃。因此,针对在体条件下射线诱导造血细胞凋亡的研究十分必要。

迄今为止,检测凋亡细胞的方法主要有形态学观察、DNA电泳、流式细胞仪和原位标记DNA断端^[4]。细胞凋亡时其DNA自发降解,形成小片段DNA,细胞经破膜处理后,小片段DNA从细胞内流失,导致细胞内DNA含量降低,在流式细胞仪上显示特异的亚G₀峰(又称Ap峰)。正常骨髓造血细胞有低水平的凋亡,说明凋亡可能对正常造血功能有调节作用。双因素方差分析结果显示射线诱导的骨髓造血细胞凋亡,与照射剂量和照后时间均显著相关,而且两因素的交互作用非常显著。可见,在骨髓型放射病早期,细胞凋亡是骨髓造血细胞死亡的一个重要途径。受照6Gy时,细胞凋亡的发生率已达量高水平,受照10Gy时细胞凋亡的发生率反而有所下降,该现象与淋巴细胞的离体实验所见相似^[3,5]。这可能是由于大剂量射线对细胞的杀伤作用导致细胞坏死。大剂量照射后,骨髓有核细胞数降低较快,而凋亡的发生率却较低,也提示细胞的坏死增加。形态学观察中发现,坏死是与凋亡同时存在的细胞死亡形式,照射剂量增大,坏死细胞也增加,支持上述观点。

凋亡细胞的内源性核酸酶被激活,并特异性地在核小体间连接部位降解DNA,形成以核小体为基本单位的寡聚体,电泳结果呈180—200bp间隔的特征性梯型带(ladder pattern)。坏死细胞的DNA降解是随机的,无梯型带形成。近来一个新观点认为细胞凋亡的早期特征可能是DNA降解为大的片段,其范围在20至 ≥ 700 kbp,成为寡聚核小体的前体。由于它发生于不伴有DNA在核小体间降解的细胞凋亡过程,故有的学者提出DNA降解为大片段可能

是一个较DNA梯型带更为可信的生化特征^[6]。20—30和200—245kbp分别与染色质环(loop)和染色质花结(rosette)相对应, ≥ 700 kbp片段代表一个未确认的高级结构。尽管如此,凋亡细胞DNA电泳所见的梯型带仍是作为确认凋亡的一个常规指标。本实验观察到了凋亡细胞DNA降解所形成的梯型带,与流式细胞仪的结果相互印证。

放射生物学常用细胞存活曲线来研究细胞的辐射敏感性,该曲线的“肩部”代表射线损伤后,细胞的自我修复能力。有实验证实在射线敏感细胞的急性剂量率存活曲线的肩部,射线诱导的凋亡有明显作用^[7]。我们的实验结果表明,4—8Gy射线照射后,细胞凋亡的发生率随照射剂量而增加,支持上述观点。

摘 要

以4—10Gy射线在体损伤的小鼠为模型,应用DNA电泳和流式细胞术等方法证实细胞凋亡是射线损伤在体骨髓造血细胞的途径之一,发现射线诱导的造血细胞凋亡有明显的量效和时效关系。4、6、8和10Gy照射后,细胞凋亡发生率均表现为升高-降低过程,各剂量诱导的凋亡发生率峰值分别出现在照后12、8、4和4h,6和8Gy诱导的凋亡发生率已达最高水平,约为30%,10Gy诱导的凋亡反而要低。上述结果表明,诱导细胞凋亡是射线损伤骨髓造血细胞的一个重要途径,而且凋亡的发生率受照射剂量和照后时间的影响。因此,深入研究射线诱导的细胞凋亡,将有助于揭示射线损伤造血功能的机理。

关键词:放射损伤 造血细胞 凋亡 流式细胞术 小鼠

参 考 文 献

- [1] Szumiel I. 1994, *Int J Radiat Biol.*, 66: 329—341.
- [2] Radford IR, et al., 1995, *Int J Radiat Biol.*, 65: 217—227.
- [3] Payne CM, et al., 1992, *J Leukoc Biol.*, 52: 433—440.

- [4] Sgonc R, et al., 1994, *Allergy Immunol.*, 105: 327—332.
 [5] Palayoor ST, et al., 1995, *Radiat Res.*, 141: 235—241.

- [6] Bicknell GR, et al., 1994, *J Cell Science.*, 107: 2483—2489.
 [7] Ling CC, et al., 1994, *Radiother Oncol.* 32: 129—36.

IRRADIATION-INDUCED APOPTOSIS OF BONE MARROW HEMATOPOIETIC CELLS IN MICE; A STUDY OF TIME- AND DOSE-EFFECT RELATIONSHIPS IN VIVO

ZOU Zhong Min et al.

(Department of Radiation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT

By means of flow cytometry and DNA electrophoresis, in this experiment we investigate that in what extent apoptosis was taken by the radiation injured-bone marrow hematopoietic cells (BMHCs) of 4—10Gy γ -ray irradiated-mice. The significant time-and dose-effect relationships of radiation-induced apoptosis of BMHCs was found. The peak values of apoptosis induced by 6Gy and 8Gy radiation were about 30%, and by 4Gy and 10Gy radiation 20%. The time needed to reach the peak was shortened correspondingly when dose increased, shown as 12, 8, 4 and 4h for 4, 6, 8 and 10Gy irradiation respectively. The results demonstrate that apoptosis is an important cell death pathway taken by the radiation-injured BMHCs in vivo, so further investigation on the regulation of apoptosis would highlight the mechanism of radiation-induced hematopoiesis dysfunction.

Key Words: Radiation injury Hematopoietic cell Apoptosis Flow cytometry Mouse

影响反转录过程多种因素的探讨*

邢永娜 卢大儒 邱信芳 薛京伦

(复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

离体反转录系统的研究是分子生物学中一项重要的实验技术。这一技术的完善对 RT-PCR 检测的特异性、准确性,以及构建 cDNA 文库的完整性,5'-RACE、3'-RACE 的精确性都很关键。随着 RT-PCR 技术在发育学、肿瘤研究、表达调控研究中的应用及推广,这一技术得到广泛的应用。我们在研究这一系统中体会到反转录过程的特异性、准确性除了决定于合适的温度、酶的特异性、RNA 模板的完整与纯度、RNA 二级结构的破坏以及引物的特异性等因素。特别值得一提的是,巢式引物可以很有效地避免 5'-RACE、3'-RACE 产生假阳性带,这

一点对基因的差异表达的研究^[1]以及新基因的克隆^[2]具有实际意义。本文即探讨影响反转录过程的各种因素。

材料和方法

1. 材料

(1) DNA 引物 1) 反转录病毒载体 G1NaC-i'-IXR 上引物顺序^[3]CMVP; 5'-CGTTTAGTGAAC-CGTCAGATCGCC-3', 负链引物; i1M; 5'-ACTTAC-CAACCTGCGTGCTGGC-3', 正链引物; E2A; 5'-

* 国家“863”高技术发展计划和国家自然科学基金资助项目