

精脒含量对浓缩铀诱发 PC12 细胞凋亡的影响

古桂雄¹ 朱寿彭² 王六一² 杨淑琴² 朱玲俐¹

¹ (苏州大学附属儿童医院 苏州 215003)

² (苏州大学放射医学研究所 苏州 215006)

摘要 研究 PC12 细胞内精脒含量在浓缩铀诱导细胞凋亡中的作用。在 PC12 细胞中加入浓缩铀 DMEM/F12 工作液, 计算 PC12 细胞的内照射吸收剂量, 运用丹磺酰氯薄层分析技术测定细胞内游离精脒含量。结果表明, 随着浓缩铀内照射时间的延长, 细胞增殖活性迅速下降, DNA 链断裂明显增多, 放射性核素迅速渗入细胞核中, AO/EB 染色可见凋亡细胞, 同时细胞内游离精脒随内照射时程的延长而显著减少。表明浓缩铀可致 PC12 细胞的凋亡, 细胞内游离精脒的含量可能与细胞活性有一定作用。

关键词 精脒, 浓缩铀, PC12 细胞, 凋亡

中图分类号 R114

辐射诱发的细胞凋亡过程, 涉及基因的活化、转录、蛋白质修饰、酶的激活及离子浓度改变等。大剂量照射引起的细胞坏死是一个被动过程, 而引发细胞凋亡的剂量远远低于细胞快速死亡所需的剂量^[1]。但是多胺在辐射诱发细胞凋亡的过程中, 诱发组织细胞的损伤作用的机理报道甚少。随着核科学技术的迅速发展, 放射性核素的应用越来越广泛, 各种辐射在工业、医疗等方面的应用不断深入^[2]。因此, 放射性核素所产生的危害, 日益引起人们的关注。本研究探讨了浓缩铀诱发 PC12 细胞凋亡与细胞内精脒含量的关系及影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 PC12 细胞株(来源于肾上腺嗜铬细胞瘤), 由我院细胞免疫中心室长期冻存及传代培养。PC12 细胞株在 DMEM/F12 全培养液中培养。实验取对数生长期细胞, 用吸管吹打细胞脱落后, 用 Hanks 液洗涤两次, 再用全培养液调至实验所需细胞浓度备用。

1.2 试剂

1.2.1 浓缩铀原液 浓缩铀 ²³⁵U 丰度为 18.9%, 浓度为 60mg/mL, 由核工业总公司某厂提供; MTT(Sigma, USA); ³H-TdR (中国科学院上海原子核研究所生产, 批号 9912); 标准精脒: Sigma 公司出品。

国家自然科学基金(39470389)资助

第一作者:古桂雄,男,1954年6月出生,2000年6月毕业于苏州大学放射医学系,医学博士,主任医师

收稿日期:初稿 2001-12-28,修回 2002-04-01

1.3 细胞照射

PC12 细胞用全培养液调至细胞浓度为 1×10^5 /mL, 在无菌 96 孔培养板每孔内加 100 μ L 细胞悬液。置于 5%CO₂ 培养箱内 37℃ 培养 24h。然后每孔中加入 50 μ L 用 DMEM / F12 全培养液稀释的浓缩铀工作液 (50.4Bq/100 μ L, 浓缩铀的终浓度为 16.8Bq/100 μ L; 对照组每孔加入 50 μ L DMEM/F12 全培养液。将 96 孔培养板置于 5%CO₂ 培养箱内培养, 经不同时间(3、6、12、24、48h)分别收集培养标本进行细胞实验。

1.4 细胞增殖抑制实验

采用 MTT 比色法, 抑制率(%)=[(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值]×100。

1.5 细胞形态学观察(荧光染色法)^[3]

收获的细胞调制成 1×10^6 /mL 的细胞悬液, 用 AO/EB(100 μ g/mL)作荧光染色^[3], 在荧光显微镜下观察细胞形态变化。每个剂量组观察 200 个细胞(上、下、左、中、右视野各 40 个), 分别计数正常细胞数(核染色质结构正常, 着均匀的绿色), 凋亡细胞数(核染色质呈致密斑块或碎片状), 坏死细胞数(核膜完整, 染色质染均匀的红色), 并计算各组百分率。

1.6 细胞 DNA 链断裂程度检测

用 JAM 法^[4]检测凋亡细胞的 DNA 链断裂程度,

计算公式为:

DNA 链断裂程度(%)=[(对照组计数率(每分钟)-实验组计数率(每分钟)/对照组计数率(每分钟))×100。

1.7 放射性核素细胞内定位观察^[5]

收集核素作用不同时间的实验细胞,离心洗涤去除游离的核素后,取10μL细胞悬液置于载玻片一侧边缘上,随即将细胞悬液制成均匀的薄层涂片。在室温干燥后,用无水甲醇固定。按本室的先前方法进行放射自显影。

1.8 细胞内精脒含量的测定

用DMEM/F12全培养液将PC12细胞调至细胞浓度为 5×10^6 /mL,在24孔培养板每孔中加1mL细胞悬液。将24孔培养板置于5%CO₂培养箱内37℃培养24h。每孔中加入0.5mL用DMEM/F12全培养液稀释的浓缩铀工作液(50.4Bq/100μL),使实验孔的浓缩铀的终浓度为16.8Bq/100μL;对照组每孔加入0.5mLDMEM/F12全培养液。将24孔培养板置于5%CO₂培养箱内培养,经不同时间(3,6,24h)分别收集培养细胞弃去培养液,用2mL PBS洗涤3次,去除游离核素及培养液。对照组和实验组细胞加入0.5mL三蒸水,置入-70℃冰箱低温冻融破细胞膜。在上述细胞液样品中加入等体积的10%磺柳酸混匀,静置1h后,2000r/m离心10min,吸取上清液即为无蛋白滤液。按丹磺酰氯薄层分析技术^[6]测定细胞内游离精脒含量。精脒含量(μg/L)=(样品DNS-精脒荧光强度/标准DNS-精脒荧光强度)×标准精脒浓度(μg)×(1/样品实用体积(mL))。

1.9 统计分析

以上各种测定结果形式建立数据库,用POMS统计软件包在IBM/PC微机分别进行方差齐性检验及t检验。

2 结果

2.1 浓缩铀对PC12细胞增殖的抑制作用(见表1)

结果表明浓缩铀作用PC12细胞3h后细胞存活率有明显下降。细胞增殖抑制率随着时间的延长而加大,并有显著的剂量效应关系。ID₅₀(Medium Inhibitory dose)为4.655mGy。以核素作用后的细胞累积吸收剂量为X,细胞抑制率为Y,其回归方程为

$$Y=38.796+2.407X \quad (r=0.763, p<0.01)$$

2.2 核素在PC12细胞中的放射自显影定位观察

运用微观放射自显影技术观察了浓缩铀在细胞内的行径定位动态,图1显示浓缩铀在3h内可迅速通过PC12细胞膜进入细胞核内。

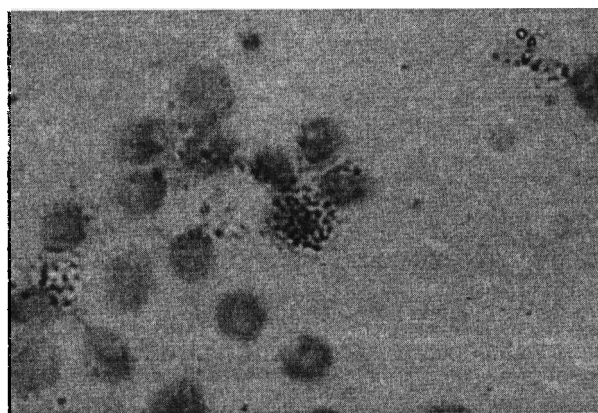


Fig.1 The autoradiography of PC12 cells incubated for 3h with ²³⁵U. The tracks of ²³⁵U showed that the radionuclide was in the nuclei mainly.

Tab.1 Effect of different doses of enriched uranium on the proliferation of PC12 cells

($\bar{x} \pm s, n=9$)

Time/h	Contral group		Irradiation group		t	Inhibition rate/%
	Dose	OD ₅₇₀	Dose	OD ₅₇₀		
3	0	0.399±0.036	1.3	0.306±0.079	2.403 ⁽¹⁾	23.40
6	0	0.442±0.075	2.6	0.249±0.018	7.484 ⁽²⁾	43.72
12	0	0.683±0.075	5.2	0.206±0.037	17.128 ⁽²⁾	69.92
24	0	0.490±0.087	10.4	0.132±0.014	12.157 ⁽²⁾	73.02
48	0	0.923±0.057	20.8	0.176±0.042	31.638 ⁽²⁾	80.99

⁽¹⁾p<0.05, ⁽²⁾p<0.01 vs irradiation group

2.3 浓缩铀诱发 PC12 细胞的 DNA 链断裂量的变化 (见表 2)

JAM 法研究表明, 浓缩铀诱发 PC12 细胞 DNA 链断裂, 核素作用 3h 后, DNA 链断裂量明显增多, 随着时间延长细胞累积吸收剂量增多, DNA 链断裂量进一步增多, 并有显著的剂量效应关系($r=0.868$, $p<0.01$)

2.4 浓缩铀对 PC12 细胞内精脘含量的影响 (见表 3)

应用丹磺酰氯标记精脘, 薄层分析测定 PC12 细胞内的精脘含量, 结果表明浓缩铀作用 PC12 细胞 3h 后, 精脘含量已有显著减少, 随着时间延长, 细胞内精脘与细胞的浓缩铀累积吸收剂量呈显著负相关($r=-0.771$, $p<0.01$)。

Tab.2 Effect of different doses of enriched uranium on the DNA breaks in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Time/h	Group control/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Group irradiation/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	<i>t</i>	Breaks/%
3	2355±57	1589±48	17.88 ⁽¹⁾	32.53
6	2517±74	1363±18	26.23 ⁽¹⁾	45.82
12	3064±502	851±18	7.63 ⁽¹⁾	71.72
24	6785±294	322±16	38.00 ⁽¹⁾	95.25
48	11668±1489	51±19	13.51 ⁽¹⁾	99.57

⁽¹⁾ $p<0.01$ vs group irradiation

Tab.3 Effect of different doses of enriched uranium spermidine level ($\mu\text{g}/10^6\text{cell}$) in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Time/h	Group control	Irradiation group	<i>t</i>
3	309.890±6.755	144.438±19.979	13.588 ⁽¹⁾
6	370.104±14.683	105.660±4.432	29.863 ⁽¹⁾
12	397.416±10.376	85.336±10.204	36.495 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p<0.01$ vs group irradiation

3 讨论

多胺是生物体内广泛存在的一类多价阳离子脂肪胺, 对核酸、蛋白质合成及细胞增殖有着重要作用。从细胞 G_1 期到 M 期间, 细胞内腐胺、精脘、精胺等多胺逐渐升高, 并且在细胞增殖迅速时, 无论是生理或病理状况, 多胺含量均升高。多胺与细胞生长和细胞周期有密切关系。多胺缺乏时, 细胞出现 G_1 期抑制, 在形态学方面可观察到 DNA 断裂和细胞凋亡的发生^[7]。在生理条件下, 多胺带 2—3 个正电荷, 可以与多价阴离子生物大分子 DNA、RNA 和磷酸脂等相互作用。多胺的阳离子特性与 Mg^{2+} 不同, 更容易与多价阴离子结合。体外实验表明, 多胺与 DNA、RNA 的磷酸基团结合后, 可以稳定它们的空间结构。

细胞凋亡是受基因调控的主动过程, 是细胞接受某种信号或受到某些因素刺激后一种主动的由相关基因相互作用的细胞消亡。许多信号转导与多胺生物合成途径有关, 即与细胞内多胺含量有关。多胺与 DNA 的直接结合, 以及与 DNA-蛋白质相互作用的能力, 在细胞增殖中有重要的作用^[8]。本研究采用 MTT 法表明浓缩铀能抑制 PC12 细胞的活性, 作用 3h 即可出现抑制效应, 随着时间延长, 其作用明显增强。细胞存活率与细胞累积吸收剂量呈现明显的剂量效应线性关系。

放射性核素所致的生物学损伤效应, 不仅取决于组织吸收能量的多少, 还取决于辐射的 LET 及剂量率。以 α 辐射的 RBE 值最大, 本实验 PC12 细胞 ID_{50} 为 4.655mGy, 同时放射自显影示踪表明浓缩铀照射

3h 即已进入 PC12 细胞内, 均匀分布在细胞核中。研究表明浓缩铀照射诱发 PC12 细胞损伤更敏感, 与 PC12 细胞的突起伸张、体表面积增大等特性有关。

电离辐射可通过间接作用, 在细胞内产生, 生成自由基, 而自由基是造成 DNA 损伤的主要因素, 在多胺代谢中, 过氧化物离子的产生可介导细胞死亡^[8]。本实验结果表明, 电离辐射对生物组织的损伤作用主要是 DNA 的直接损伤, 电离辐射可活化细胞的凋亡机制, 使无法修复的细胞经凋亡途径而死亡。

多胺具有多价阳离子特性, 具有多效生物学功能, 细胞内的多胺含量的下降在凋亡中有着重要作用^[9]。用流式细胞仪测定表明, 单次剂量辐照 10Gy, 若多胺耗竭后, 其凋亡率可明显增加 65%^[10]。紫外线照射后, 缺乏多胺的细胞可明显激活激酶的活力诱导凋亡^[11]。多胺缺乏会诱导核因子- κ B 的激活, 从而促进凋亡^[12]。本研究表明: PC12 细胞随着细胞累积吸收剂量增加, 其凋亡和死亡细胞增加, 而细胞胞游离精胺减少, 可能会诱发细胞凋亡。

参考文献

- 1 Nomura T, Kinuta M, Hongyo T *et al.* J Radiat Res, 1992, 33(S): 109-123
- 2 Sgouros G, Ballangrud A M, Jurcic J G *et al.* J Nucl Med,

- 1999, 40(11):1935-1946
- 3 陈丽娟, 盛瑞兰, 汪承亚等. 中华血液学杂志, 1998, 19(1): 41-42
CHEN L J, SHENG R L, WANG C Y *et al.* Chin J Hematol 1998, 19(1): 41-42
- 4 Matzinger P. J Immunol Method, 1991, 145(1):185-192
- 5 朱寿彭. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(1):7-9
ZHU S P. Chin J Radio Medici Protect. 1992, 12(1):7-9
- 6 黄美英, 蒋莹. 氨基酸杂志, 1993, 15(2):40-42
HUANG M Y, JIANG Y. J Amino Acid, 1993, 15(2):40-42
- 7 Li l, Rao J N, Bass BL *et al.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 283(5):G992-1004
- 8 Thomas T, Thomas T J. [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(2):244-258
- 9 Nitta T, Igarashi K, Yamashita A *et al.* Exp cell Res, 2001, 265(1):174-183
- 10 Bock J M, Pickart M A, Pink J J *et al.* Radiat Res, 1999, 52(6):604-610
- 11 Hill I R, Garnett M C, Bignotti F *et al.* Anal Biochem, 2001, 291(1):62-68
- 12 Trubiani O, Pieri C, Rapino M *et al.* Cell Prolif, 1999, 32(2-3)119-129

EFFECT OF SPERMIDINE IN PC12 CELLS ON THE CELL APOPTOSIS INDUCED BY ENRICHED URANIUM

GU Guixiong¹ ZHU Shoupeng² WANG Liuyi² YANG Shuqin² ZHU Lingli¹

¹(Children's Hospital, Soochow University, Suzhou 215003)

²(Children's Hospital, Soochow University, Suzhou 215006)

ABSTRACT This is a study on injurious effects of cellular spermidine to PC12 cells irradiated by enriched uranium. PC12 cells were cultured in DMEM/F12 medium with enriched uranium, and the exposure doses were calculated. The contents of free spermidine PC12 cells were examined with Densly-cholrade reaction and thin-layer chromatography. Viability of the cells treated with enriched uranium reduced rapidly and DNA strand break increased significantly with increasing time of the irradiation. Autoradiographic tracks showed that the radionuclide located in the nucleus predominantly. The content of free spermidine in PC12 cells could markedly decrease as the irradiation time increased. The results suggested that PC12 cells exposed to enriched uranium were apoptotic and the free spermidne in cells might play some role in this process.

KEYWORDS Spermidine, Enriched uranium, PC12 cells, Apoptosis

CLC R114