

γ 射线诱导破骨细胞凋亡

李凌波 高建军 金慰芳 王洪复
(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 参照上海医科大学放射医学研究所七室建立的破骨细胞培养方法, 将分离的破骨细胞培养在玻片上, 利用 0.5、1、3、5 Gy ^{137}Cs γ 射线照射破骨细胞, 采用荧光染色方法观察辐射对破骨细胞形态的影响。结果表明: 破骨细胞对辐射敏感, 较低剂量即可引起破骨细胞凋亡, 其中 3 Gy 为诱导破骨细胞凋亡的最佳反应剂量, 此时破骨细胞凋亡比例最高, 可作为凋亡基因研究模型。为进一步探讨辐射所致骨质疾病的机理、预防、治疗提供实验依据。

关键词 破骨细胞, 凋亡, 荧光染色, 辐射

凋亡或称程序性细胞死亡, 是一种重要的生理调节性死亡方式, 在正常组织的损伤与修复, 内环境稳定的维持, 某些疾病的发生中发挥重要作用。细胞凋亡受许多因素的影响, 电离辐射即是其中之一。本文应用不同剂量 ^{137}Cs γ 射线照射体外破骨细胞 (OC), 观察辐射对破骨细胞细胞形态的改变和 ^{137}Cs γ 射线诱导破骨细胞凋亡的剂量变化规律, 为探讨代谢性骨病的病理机制和防治药物研究提供实验依据。

1 材料和 方法

1.1 材料

1) 实验动物 出生 3 天内的 Wistar 大鼠, 上海医科大学放射医学研究所实验动物房提供, 沪医准字号: 34。2) 主要试剂 199 培养基粉剂和胎牛血清 (GIBCO BRL USA); 荧光染料 (上海市肿瘤研究所提供)。3) 主要设备 二氧化碳培养箱 (Heraeus Germany), 倒置相差显微镜 (Olympus Japan), 荧光显微镜 (Olympus Japan), ^{137}Cs γ 射线照射装置 (Grammacell-40, Canada)。

1.2 破骨细胞分离培养^[1]

取 5 只新生大鼠的股骨、胫骨、肱骨, 清除黏附于骨表面的软组织与骨垢, 清洗干净后, 将骨质轻刮入 5~6 mL 培养液, 反复吹打, 取细胞悬液均匀加入预先置有玻片的 5 块 24 孔培养板 (0.5 mL/孔), 培养 30 min, 更换培养液, 继续培养。

1.3 射线照射方法

在二氧化碳培养箱 (37 °C, 5% CO_2 中培养 2 h, 待破骨细胞完全伸展, 形态清楚, 此时进行 ^{137}Cs γ 射线照射。照射剂量为 0.5、1、3、5 Gy, 剂量率 1 Gy/min, 同时设实验对照组。

1.4 凋亡破骨细胞检测

不同剂量 γ 射线照射后, 继续培养 2 h, 取出玻片, PBS 清洗, 荧光染色, 于荧光显微镜下观察细胞形态改变。根据细胞大小、形态、结构变化以及荧光染料与不同结构 DNA 结合所致颜色,

“九五”国家医学科技攻关资助项目 96-906-05-05, 和上海医科大学青年科学研究基金资助项目

收稿日期: 初稿 1998-07-10, 修回 1998-09-18

区分正常破骨细胞、凋亡破骨细胞和坏死破骨细胞；同时以此为标准计数并分类，每张玻片上的破骨细胞大约 80 OC，重复计数 2~3 次。

2 实验结果

2.1 凋亡破骨细胞形态观察

在荧光显微镜下，正常破骨细胞发绿色荧光，细胞完整，核、膜清楚。经 γ 射线作用后大部分破骨细胞体积缩小，核 DNA 降解，细胞染色橙红或淡红，表现为典型的细胞凋亡特征，而且还可观察到凋亡破骨细胞阶段性变化：核固缩、核边缘化、凋亡小体。另外在高剂量辐射组，出现大量体积涨大，核均匀裂解的破骨细胞——即坏死破骨细胞，此类细胞发淡红色荧光。见图 1。

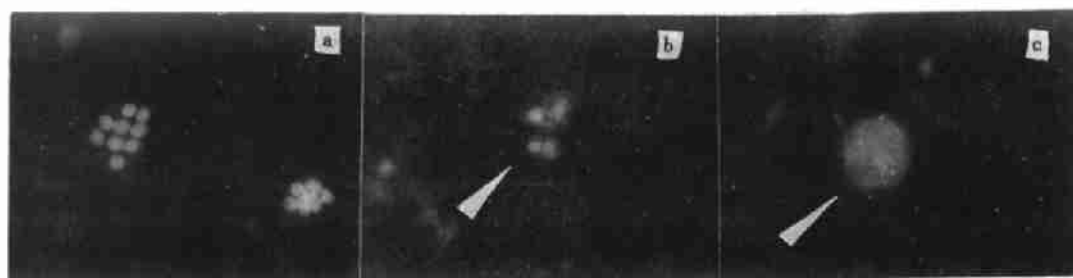


Fig.1 Fluorescence photomicrographs of isolated rat osteoclasts

(a) Normal osteoclast with intact nucleus. (b) Apoptotic osteoclast with nuclear fragmentation and chromatin condensation. (c) Necrotic osteoclast

2.2 破骨细胞凋亡发生率

根据荧光染色方法，计数不同辐射剂量条件下凋亡破骨细胞发生率，并对实验数据进行统计分析，结果见表 1。

Tab.1 Relationship between the percentage of apoptotic osteoclasts and radiation dose ($\bar{x} \pm s$)

| Dose/Gy | Apoptotic OC/% | Necrotic OC/% | Normal/% |
|---------|----------------|---------------|----------|
| Control | 2 | 0 | 98 |
| 0.5 | 26 | 7 | 67 |
| 1 | 48 | 8 | 44 |
| 3 | 84 | 6 | 10 |
| 5 | 66 | 30 | 4 |

从表 1 可见，0.5 Gy 照射即引起破骨细胞凋亡率大量增加，说明 OC 对辐射具有一定的敏感性；另一方面 OC 的死亡率（凋亡率 + 坏死率）随着辐射剂量的增加而增高，但凋亡率并不与其同步：在 0.5~3 Gy 范围内，凋亡率与辐射剂量成线性关系；辐射剂量继续增加，凋亡率反而下降，坏死率增加，由此可见低剂量辐射引起 OC 凋亡，高剂量则引起坏死，其中 3 Gy 为诱导 OC 凋亡的最佳剂量，此时凋亡 OC 的百分率最高，与对照比较有显著差异 ($p < 0.05$)。

3 讨论分析

DNA 是储存生物遗传信息的重要大分子，也是辐射损伤效应的主要靶分子，损伤的 DNA 可

活化细胞内 DNA 修复机制进行修复;也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^[2]。目前放射治疗仍是治疗恶性肿瘤的主要手段之一,通过对肿瘤细胞和正常组织细胞的研究,凋亡是辐射诱导细胞死亡的一种重要方式^[3,4]。随着射线在临床诊断、治疗中应用的增加,辐射对骨代谢的影响也日益引起重视。上海医科大学放射医学研究所曾报道用 50Gy X 射线局部照射大鼠卵巢,对骨质代谢有明显影响^[5];临床上也可见由于放射治疗肿瘤患者而导致骨质疏松而骨折。破骨细胞是骨重建过程中直接负责骨吸收的主要细胞,生理状态下的破骨细胞凋亡对维持正常骨代谢具有重要意义,异常的凋亡则与骨质疏松的发病机制密切相关^[6];本研究对 ^{137}Cs γ 射线诱导破骨细胞凋亡的规律进行了探讨,结果表明:在一定剂量 γ 射线作用后,破骨细胞呈现核断裂、染色质边聚、膜包裹的凋亡小体形成等凋亡细胞的形态特征;而且破骨细胞凋亡与 γ 射线呈剂量效应关系:在 0.5~3 Gy 范围内,破骨细胞凋亡率随剂量的增加而增高,剂量进一步增加,凋亡生成呈下降趋势。其作用机制不明,可能一方面是由于较强的辐射直接破坏基因转录或破坏膜的完整性,使细胞发生坏死;另一方面也可能与照射剂量启动凋亡信号的最适值相关,详细机理尚待进一步探讨。了解核辐射对破骨细胞的影响,可为进一步探讨由于临床肿瘤化疗引起的骨质代谢疾病的预防和治疗提供新思路。另外,本研究表明 3 Gy 为诱导破骨细胞凋亡的最佳剂量,该结果可作为进一步研究破骨细胞凋亡分子机理模型。

参 考 文 献

- 1 YU Mingxiang, JIN Weifang, WANG Hongfu. Chin J Osteoporosis(in Chinese), 1997, 3(3):3~5
- 2 Zhen S W, Vaughan A T M. Radiat Res, 1995, 141(2):170~175
- 3 Stephens L C, Ang K K. Radiat Res, 1991, 127(3):308~316
- 4 Herveldt K, Philippe J, Thierens H *et al.* Int J Radiat Biol, 1997, 71(4):429~433
- 5 JIN Weifang, WANG Hongfu, ZHANG Haijun. J Radiat Res Radiat Process(in Chinese), 1996, 14(4):239~24
- 6 Roodman G D. Endocr Rev, 1996, 17(4):308~331

APOPTOSIS OF OSTEOCLASTS INDUCED BY ^{137}Cs γ -IRRADIATION

LI Lingbo GAO Jianjun JIN Weifang WANG Hongfu

(*Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

ABSTRACT According to the method established previously, the osteoclasts were released and then settled on to glass slides. The numbers of apoptotic osteoclasts after in vitro γ -irradiation (0.5, 1, 3, 5 Gy) were measured by fluorescence staining assay. The results are that control samples and samples irradiated at 0.5 Gy could be distinguished in a statistically significant way. This suggests that osteoclasts are sensitive to irradiation and low doses can induce apoptosis. Furthermore, the percentage of apoptotic cells at 3 Gy reached the peak, this could be provided as a model for studying the molecular mechanism of apoptosis.

KEYWORDS Osteoclasts, Apoptosis, Fluorescence staining assay, Radiation

The project was supported by the "Ninth Five" Medical Science Foundation of China (96-906-05-05) and by Foundation of Shanghai Science Research