

# 不同剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞 周期进程的影响

叶 飞 刘树铮

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

**摘要** 采用流式细胞术研究了 X 射线全身照射后小鼠脾细胞周期的进程及其剂量效应关系。结果表明,75mGy X 射线全身照射后 12~72h 脾细胞周期各时相细胞数目发生明显变化, $G_0/G_1$  期细胞数低于假照组,S 期细胞数增多,说明其 DNA 合成能力增强,至 7d 时回复至假照组水平;2.0Gy 全身照射后 8h 时脾细胞出现明显的  $G_2$  阻滞,12h 时  $G_2$  阻滞和 DNA 合成抑制达最高点,72h 其细胞周期进程则明显加快,至 7d 时回复至假照组水平。不同剂量全身照射后 24h 的结果表明,在低剂量范围内(50~200mGy),50、75mGy 照后脾细胞的 DNA 合成能力增强,尤以 75mGy 更明显,而 100、200mGy 照后开始出现  $G_1$  阻滞;高剂量(0.5~4.0Gy)照后则出现明显的 DNA 合成抑制以及  $G_1$  和  $G_2$  阻滞。

**关键词** 全身照射,脾细胞,细胞周期, $G_1$  阻滞, $G_2$  阻滞

中高剂量电离辐射对生长的真核细胞的一个普遍效应是导致分裂延迟,这早已被放射生物学界所公认。但有关低剂量电离辐射对细胞周期的影响报道甚少。我室以往实验资料揭示低剂量电离辐射可促进小鼠胸腺细胞的 DNA 合成和增殖<sup>[1]</sup>。本文采用流式细胞术(FCM)对不同剂量 X 射线全身照射后小鼠脾细胞周期进程的变化进行较系统研究,以期为进一步探索低剂量辐射兴奋效应的作用机制提供理论依据。

## 1 材 料 与 方 法

### 1.1 实验动物

雄性昆明系小鼠,白求恩医科大学实验动物部提供,体重  $20 \pm 2g$ 。

### 1.2 照射条件及动物处理

用 Philips 深部 X 射线治疗机进行全身照射,电压 200kV,电流 10mA,滤片 0.5mmCu+1.0mmAl。时间进程实验采用 75mGy(剂量率 12.5mGy/min)和 2.0Gy(剂量率 0.288Gy/min)照射,设假照组和照射组,每组  $n=5$ ,照射后 4~72h 及 7d 断头处死,取脾制备单细胞悬液;剂量效应关系实验,设 50~200mGy(剂量率 12.5mGy/min);0.5~4.0Gy(剂量率 0.288Gy/min)照射组和假照组,每组  $n=5$ ,照射后 24h 断头处死,取脾制备单细胞悬液。上述制备的样品均以每份样品  $3 \times 10^6$  细胞固定于 70%冷乙醇中,4℃ 保存备检。

### 1.3 脾细胞周期检测

参照常规方法<sup>[2]</sup>,将上述固定样品用 0.01mol/LPBS 洗两次,加 0.1mg/mL RNase 溶液 100 $\mu$ L,

国家自然科学基金资助课题(编号 39570188)

收稿日期:初稿 1998-05-04,修回 1998-07-03

37℃水浴30min, PBS洗2次, 再加入PI染液(0.05g/L, 含0.03% TritonX-100)0.5mL, 4℃避光30min后, 用B-D公司FACSscan流式细胞仪检测, 采用Cellfit软件收集细胞并分析结果。

#### 1.4 显著性检验方法

*t* 检验。

## 2 检验结果

### 2.1 时间进程

表1为75mGy和2.0Gy照射后不同时间小鼠脾细胞周期各时相细胞百分数的变化。与假照组相比, 75mGy照射后4~8h脾细胞周期各时相细胞数未见明显改变, 12~72h时G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数明显减少( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ), S期细胞数增多( $p < 0.001$ ), G<sub>2</sub>+M期细胞数无明显变化, 7d时其各周期时相细胞数与假照组基本一致。2.0Gy照射后8~48h脾细胞的S期细胞数发生不同程度的减少, 而G<sub>2</sub>+M期细胞数明显增加( $p < 0.001$ ), 其中12h时达最高点; 而72h时G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数明显减少( $p < 0.001$ ), S期细胞数显著增多( $p < 0.001$ ); 7d时各时相细胞数与假照组基本一致。

Tab.1 Time course of changes in cell cycle progression of splenocytes after irradiation with 75mGy and 2.0Gy X-rays

		Time after irradiation						
		4h	8h	12h	24h	48h	72h	7d
(G <sub>0</sub> :G <sub>1</sub> )/%	sham-irradiation	81.18	82.40	86.40	85.60	81.36	81.14	81.54
		±0.69 <sup>(1)</sup>	±0.67	±0.51	±0.82	±0.84	±0.69	±0.38
	75mGy	80.74	82.26	83.14	84.26	76.90	75.76	81.20
		±0.59	±1.44	±0.42 <sup>(3)</sup>	±0.83 <sup>(2)</sup>	±0.95 <sup>(3)</sup>	±0.80 <sup>(3)</sup>	±0.57
	2.0Gy	80.76	81.66	81.94	84.04	81.84	68.50	81.00
		±1.09	±0.55	±0.38 <sup>(3)</sup>	±1.43	±0.86	±0.43 <sup>(3)</sup>	±0.97
S/%	sham-irradiation	11.28	10.06	6.82	7.34	10.98	11.94	10.08
		±0.49	±0.75	±0.56	±0.65	±0.95	±0.91	±0.78
	75mGy	11.72	9.86	9.90	9.44	15.74	17.36	10.96
		±0.97	±1.46	±0.33 <sup>(3)</sup>	±0.54 <sup>(3)</sup>	±0.73 <sup>(3)</sup>	±0.80 <sup>(3)</sup>	±0.56
	2.0Gy	11.82	9.06	6.94	7.26	8.34	24.54	10.54
		±1.26	±0.66	±0.32	±1.60	±0.56	±0.60 <sup>(3)</sup>	±0.90
(G <sub>2</sub> +M)/%	sham-irradiation	7.52	7.52	6.76	6.88	7.64	6.88	8.38
		±0.54	±0.26	±0.26	±0.19	±0.33	±0.66	±0.58
	75mGy	7.58	7.88	6.98	6.28	7.40	6.92	7.84
		±0.48	0.44	±0.53	±0.96	±0.37	±0.49	±0.58
	2.0Gy	7.42	9.30	11.12	8.70	9.82	6.96	8.42
		±0.48	±0.21 <sup>(3)</sup>	±0.65 <sup>(3)</sup>	±0.46 <sup>(3)</sup>	±0.63 <sup>(3)</sup>	±0.44	±0.23

<sup>(1)</sup>  $\chi \pm s$ ,  $n=5$ , <sup>(2)</sup>  $p < 0.05$ , <sup>(3)</sup>  $p < 0.001$  vs sham irradiation

### 2.2 剂量效应关系

表2和3分别给出不同剂量照射后24h脾细胞周期各时相细胞百分数相对于假照组的变化。由表2可见, 50和75mGy照射后脾细胞的S期细胞数有不同程度增加, 尤以75mGy照射后显著( $p < 0.05$ ), 100和200mGy照射后其G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数明显增多( $p < 0.001$ ), S期细胞数显著减少( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )。由表3可以看出, 0.5~4.0Gy照射后脾细胞的S期细胞数明显减少( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期和G<sub>2</sub>+M期细胞数增多( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )。

Tab. 2 Changes in cell cycle progression of splenocytes 24h after irradiation with low doses

Doses/mGy	(G <sub>0</sub> :G <sub>1</sub> )/%	S/%	(G <sub>2</sub> +M)/%
sham - irradiation	83.86±0.32 <sup>(1)</sup>	7.10±0.42	9.02±0.51
50	83.72±0.26	7.50±0.58	8.82±0.39
75	82.76±0.91 <sup>(2)</sup>	8.06±0.74 <sup>(2)</sup>	9.32±0.40
100	86.10±0.85 <sup>(4)</sup>	5.72±0.75 <sup>(3)</sup>	8.20±0.52 <sup>(2)</sup>
200	85.82±0.33 <sup>(4)</sup>	5.60±0.37 <sup>(4)</sup>	8.58±0.61

<sup>(1)</sup>  $\chi^2$  test,  $n=5$ , <sup>(2)</sup>  $p<0.05$ , <sup>(3)</sup>  $p<0.01$ , <sup>(4)</sup>  $p<0.001$ , vs sham - irradiation

Tab. 3 Changes in cell cycle progression of splenocytes 24h after irradiation with high doses

Doses/Gy	(G <sub>0</sub> :G <sub>1</sub> )/%	S/%	(G <sub>2</sub> +M)/%
sham - irradiation	82.74±0.96 <sup>(1)</sup>	9.24±0.64	8.02±0.66
0.5	85.02±0.39 <sup>(4)</sup>	6.44±0.50 <sup>(4)</sup>	8.52±0.43
1.0	82.42±0.56	8.36±0.31 <sup>(2)</sup>	9.20±0.38 <sup>(3)</sup>
2.0	84.04±0.78 <sup>(2)</sup>	7.52±0.94 <sup>(3)</sup>	8.42±0.62
4.0	82.72±0.46	7.84±0.58 <sup>(3)</sup>	9.48±0.26 <sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup>  $\chi^2$  test,  $n=5$ , <sup>(2)</sup>  $p<0.05$ , <sup>(3)</sup>  $p<0.01$ , <sup>(4)</sup>  $p<0.001$  vs sham - irradiation

### 3 讨 论

以往实验资料表明,小鼠受 75mGy X 线全身照射后胸腺细胞的 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 双阴性细胞的百分率增高,TCR/CD<sub>3</sub> 表达上调,同时 S 期细胞百分率增高,引起免疫功能上调<sup>[3]</sup>。为进一步探讨低剂量辐射增强免疫功能的机理,本实验采用 FCM 较系统地研究了不同剂量全身照射对小鼠脾细胞周期进程的影响。

本实验结果表明,75mGy X 线照射后 12~72h 脾细胞的 DNA 合成能力明显增强,7d 时其周期各时相百分率与假照组的基本一致。但是,2.0Gy 照射后 8~48h 脾细胞发生 DNA 合成抑制和 G<sub>2</sub> 阻滞,其中 12h 达到最高点,而 72h 时其 DNA 合成能力显著增强,这说明电离辐射引起的脾细胞 DNA 合成能力抑制和 G<sub>2</sub> 阻滞已开始恢复,细胞从 G<sub>2</sub> 阻滞释放,大量细胞进入周期,至 7d 时达假照组水平。不同剂量全身照射后 24h 的结果表明,在低剂量范围内(50~200mGy),50 和 75mGy 照射后促使脾细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞进入 S 期, DNA 合成能力增强,然而当剂量大于 100mGy 后,开始出现 G<sub>1</sub> 阻滞。在高剂量范围内(0.5~4.0Gy),脾细胞出现明显的 DNA 合成抑制, G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 阻滞及有丝分裂延迟。剂量效应研究结果提示,在全身照射条件下脾细胞发生 G<sub>1</sub> 阻滞的阈剂量为 0.1Gy, 出现 G<sub>2</sub> 阻滞的阈剂量为 1.0Gy。

以上实验结果表明,0.1Gy 以内的低剂量与较高剂量全身照射所引起的小鼠脾细胞周期进程的变化截然相反,0.1Gy 以下的低剂量辐射引起明显的刺激效应,而较高剂量辐射导致显著的抑制效应。这与小鼠胸腺细胞辐射效应(将另文报道)是基本一致的。已知细胞周期进程受一些检查点(check point, 或译为关卡)的控制<sup>[4]</sup>和许多反馈机制的调节<sup>[5,6]</sup>。电离辐射引起细胞周期进程的变化,显然与照射后这些分子水平的改变有关,目前对高剂量离体照射条件下细胞周期进程的分子调控的改变了解较多<sup>[7]</sup>,但全身照射,特别是低剂量全身照射对细胞周期进程的分子调控影响尚未见报道。已知 G<sub>1</sub> 阻滞的发生机制与 p53 及其下游基因 WAF1 表达有关, wtp53 蛋白表达增高是 G<sub>1</sub> 阻滞发生的关键因素。我室以往的研究证实,2Gy 全身照射

使胸腺细胞 p53 表达显著升高,而 75mGy 全身照射则使其表达下调<sup>[8]</sup>。这可能是不同剂量全身照射对 G<sub>1</sub> 和 S 相变化截然不同的原因之一。离体照射 ML-1 细胞也证实 0.5Gy 以上的剂量引起 G<sub>1</sub> 阻滞的同时,p53 蛋白表达上升<sup>[9]</sup>。

**致谢** 白求恩医科大学放射生物学实验室付士波、刘建香同志协助实验

## 参 考 文 献

- 1 苏 旭,张迎春,刘树铮.白求恩医科大学学报,1996,22(6):580
- 2 LIU Shuzheng, ZHANG Yingchun, QI Jin. J Norman Bethune Univ Med Sci, 1992,18(5):405
- 3 刘树铮.低水平辐射兴奋效应.北京:科学出版社,1996.293~296
- 4 Hartwell L H, Weinert T A. Science, 1989, 246:629
- 5 Murray A W, Kirshner M W. Science, 1989, 246:614
- 6 Murray A W. Nature, 1992, 359:599
- 7 Mckenna W G, Maity A, Muschel R J. Radition Resarch, 1895~1995, Proc 10th ICRR, Wurzburg, Germany, Aug. 27~Sep. 1, 1995. 629~634
- 8 LIU Shuzheng, WAN Hong, CHEN Shali *et al.* J Norman Bethune Univ Med Sci, 1996, 22(6):559
- 9 Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D *et al.* Cancer Res, 1991, 51:6304

## EFFECTS OF WHOLE BODY IRRADIATION WITH X-RAYS ON CELL CYCLE PROGRESSION OF SPLENOCYTES IN MICE

YE Fei LIU Shuzheng

(MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

**ABSTRACT** The effect of whole body irradiation (WBI) with various doses on cell cycle progression of splenocytes in mice was investigated using flow cytometry. The results showed that DNA synthesis was stimulated within 12~72h after 75mGy irradiation, reaching the level of sham-irradiated group on day 7. Meanwhile, after WBI with 2.0Gy X-rays DNA synthesis was suppressed with significant G<sub>2</sub> block beginning from 8h, and retruned the level of sham-irradiated group on day 7. The study of dose-effect relationship showed that DNA synthesis was enhanced 24h after 50 and 75 mGy X-rays, and G<sub>1</sub> block occurred after WBI with 100 and 200mGy, but DNA synthesis was suppressed with G<sub>2</sub> block and cell division delay 24h after WBI with 0.5~4.0Gy.

**KEYWORDS** Whole body irradiation, Splenocytes, Cell cycle, G<sub>1</sub> block, G<sub>2</sub> block