

# 小鼠脾细胞中低剂量辐射诱导产物及其生物学活性

沈伟 苏燎原

(苏州医学院放射生物学教研室 苏州 215007)

**摘要** 采用不同的低剂量辐射(LDR)剂量、LDR诱导产物用量、照射方式、照射后蛋白提取时间为处理因素,观测诱导产物生物学活性的变化。结果表明,用此提取液刺激后,小鼠脾脏细胞转化明显增高。经不同处理因素作用后同位素掺入游离小鼠脾细胞的每分钟衰变数(DPM)值有明显改变。实验证实,经5—15cGy LDR后2—16h都可从小鼠脾脏细胞中提取得到LDR诱导产物,诱导产物具有生物学活性,可刺激脾脏细胞转化,但是,其活性受到多种因素的影响。进一步的分析表明,此诱导产物提取液的有效成分很可能为LDR诱导的新生蛋白质。

**关键词** 低剂量辐射,诱导产物,生物学活性

**中图分类号** R 811.5

自 Luckey(1982)<sup>[1]</sup>提出低剂量辐射(low dose radiation, 低剂量辐射(LDR);指0.2Gy以下的低线性能量传递(LET)辐射)可诱导生物体的“兴奋效应”(Hormesis)以来,国内外学者对此开展了广泛而系统的研究。结果发现,这种现象普遍存在。对其机制的研究发现,无论在细胞增殖、分化、细胞间信息传递中还是在基因表达调控及损伤组织的修复中,新生蛋白是一个关键因素,本实验直接提取这些低剂量辐射诱导产物并对其生物学活性进行了初步研究。

## 1 材料和 方法

### 1.1 实验动物

雄性健康昆明小鼠,体重20—24g,由苏州医学院实验动物中心提供。

### 1.2 低剂量辐射装置

镭<sup>226</sup>(<sup>226</sup>Ra)置于温箱底部,源活度为 $5.84 \times 10^8$  Bq,距源垂直上方16cm为照射区域,实测剂量率为1.0cGy/h。

### 1.3 主要实验仪器

超声波粉碎仪(cps-1A,上海),台式高速冷冻离心机(cs-15R, Beckman, USA),低压层析系统(LKB, Pharmacia Co, Sweden),低本底液闪仪(Wallac 1415, Pharmacia Co, Sweden)。

### 1.4 主要试剂

RPMI 1640培养基(GIBCO, USA),PMSF(华美生物工程公司,上海),小牛血清(四季青生物工程材料研究所,杭州),<sup>3</sup>H-TdR、<sup>3</sup>H-Tyrosine(中国科学院上海原子核研究所),<sup>14</sup>C-UR、<sup>14</sup>C-TdR(中国医学科学院放射医学研究所,天津)。

### 1.5 实验方法

1.5.1 LDR诱导产物的诱生和提取 小鼠随机分成非照射组和照射组,分别在20—24℃

第一作者:沈伟,男,1963年出生,1986年毕业于南通医学院,副主任医师,眼科专业  
收稿日期:初稿 2000-02-17, 修回 2000-08-28

条件下接受 0cGy 和 10cGy  $\gamma$  射线照射,照射后 2h 颈椎脱臼致死小鼠,在无菌条件下取出脾脏,剪破包膜后取出脾脏组织细胞,吹打后用 4 号注射针过滤成单细胞悬液(RPMI 1640),离心 10min(2000r/min, 850g),弃上清液,加 0.01mol PBS 2mL,脾脏细胞计数后加蒸馏水 5mL,吹打、静置 2min 以溶解红细胞,再次离心,条件同前,弃上清液,按每  $6 \times 10^7$  脾细胞 2mL 裂解液比例加入 4℃裂解液<sup>[2]</sup>(50m mol/L Tris-HCl, 150m mol/L NaCl, 0.02%NaN<sub>3</sub>, 0.1%SDS, PMSF 100 $\mu$ g/mL),在冰浴下超声破碎脾脏细胞 1min 45s(超声能量、时间在预实验时予以确定,以镜检脾细胞核恰好完全破裂为度),破碎液在高速冷冻离心机离心 40min(12000g, 4℃),上清液即为小鼠脾脏细胞 LDR 诱导产物提取液,放入冰箱 4℃冷藏待用。

1.5.2 LDR 诱导产物生物活性检测 用<sup>3</sup>H-TdR、<sup>14</sup>C-UR、<sup>3</sup>H-Tyrosine 掺入自然转化的离体小鼠脾脏细胞,观察淋巴细胞转化时脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)及蛋白质的合成能力以反映 LDR 诱导产物对脾细胞转化的刺激作用,方法如下:取小鼠新鲜脾脏,制成 RPMI 1640 单细胞悬液,用培养瓶培养细胞。实验分成 2 组,1 组为自然转化组,另 1 组为 LDR 诱导产物提取液刺激组。各培养瓶装含 10%小牛血清之 RPMI 1640 培养基 2mL,脾细胞悬液 0.2mL(脾细胞  $2 \times 10^6$  个),<sup>3</sup>H-TdR 20 $\mu$ L(浓度为  $22.2 \times 10^5$ Bq/mL),或<sup>14</sup>C-UR 20 $\mu$ L(浓度  $18.5 \times 10^5$ Bq/mL),或<sup>3</sup>H-Tyrosine 20 $\mu$ L(浓度  $22.2 \times 10^5$ Bq/mL)。1、2 组分别加入 0.01mol PBS、LDR 诱导产物提取液 0.1mL。在 37℃温箱培养 6h 后,每个样本加 4mL 蒸馏水以破坏红细胞,将脾淋巴细胞抽滤在 49 型玻璃纤维滤膜上,再依次用生理盐水洗涤,5%三氯醋酸固定,无水乙醇漂白,滤膜置于红外线灯下干燥后放入 Optiphase Hisafe 闪烁液 3mL 中,用低本底液体闪烁仪测 DPM(Disintegration per minute,每分钟衰变数)。

1.5.3 影响 LDR 诱导产物生物活性的几个因素 (1) 不同剂量 LDR 对诱导产物生物活性的影响:小鼠随机分成 4 组,分别予以 0、5、10、15 cGy 辐射剂量照射,照射后 2h 处死小鼠制备 LDR 诱导产物提取液。相对应脾细胞培养分对照组及 0、5、10、15 cGy LDR 诱导产物刺激组共 5 组,用<sup>14</sup>C-TdR 20 $\mu$ L(浓度  $3.7 \times 10^5$ Bq/mL)掺入离体小鼠脾脏细胞,观察 LDR 诱导产物对脾细胞转化的刺激作用。用液体闪烁仪测 DPM。(2) LDR 诱导产物用量对其生物活性的影响:用 10cGy 照射后 2h 制备的 LDR 诱导产物提取液作为刺激因子,培养分成 6 组,各组分别加 LDR 诱导产物提取液 0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4mL,体积缺少部分用 0.01mol PBS 补足,用<sup>14</sup>C-TdR 掺入离体小鼠脾脏细胞,测 DPM。(3) 全身照射后不同时间提取的 LDR 诱导产物对其生物活性的影响:培养分成 5 组,分别加入 0.01mol PBS、10cGy  $\gamma$  射线照射后 2、4、8、16h 制备的 LDR 诱导产物提取液 0.1mL。用<sup>3</sup>H-TdR 掺入离体小鼠脾脏细胞,测 DPM。(4) 不同的照射方式对 LDR 诱导产物生物活性的影响:全身照射的 LDR 诱导产物提取液制备同前(10cGy, 2h);离体照射的小鼠脾脏细胞 LDR 诱导产物提取液制备。制新鲜小鼠脾脏细胞单细胞悬液,加入含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基 16mL,放入<sup>226</sup>Ra 低剂量辐射装置,37℃,予以 10cGy(剂量率 1cGy/h)照射,照射后 2h,以 850g 离心 10min,弃上清液,以后操作同上所述。培养分 2 组,分别加入全身和离体照射后制备的 LDR 诱导产物 0.1mL。用<sup>3</sup>H-TdR 掺入自然转化的离体小鼠脾脏细胞测 DPM。

## 2 结 果

(1) LDR 诱导产物生物活性检测结果见表 1,由表 1 可见,LDR 诱导产物对离体小鼠脾细胞转化有明显的刺激作用,诱导产物提取液刺激组 DNA、RNA 及蛋白质合成均明显增加。

(2) LDR 辐射剂量对诱导产物生物活性的影响见表 2。由表 2 可见,在 5—15cGy 范围

内, LDR 都可诱导小鼠脾脏细胞产生辐射诱导产物, 并且都具有生物活性, 在实验剂量范围内随剂量增加, 诱导产物活性也增加。经  $Q$  检验, 除  $0\text{cGy}$  组与对照组,  $10\text{cGy}$  组与  $15\text{cGy}$  组外其余各组间 DPM 值均具显著性差异。

**Tab.1 Stimulative effects of LDR induced product on mice spleen cells**

	DNA	RNA	Protein
Control	70226.32±3814.87	7426.32±458.80	6487.35±384.44
10cGy	85687.10±3765.12	11827.25±823.76	7473.00±459.25
$T$	7.07	11.43	4.02
$P$	<0.01	<0.01	<0.01

$\bar{x} \pm s, n=6$

**Tab.2 Influence of radioactive dose on biological activity of LDR induced product**

Group	DPM	Percentage	$F$	$P$
Control	2398.73±309.40	100.00		
0cGy	2584.53±263.64	107.75		
5cGy	3093.07±315.40	128.95	17.61	<0.01
10cGy	3668.20±482.43	152.92		
15cGy	4032.60±571.52	168.11		

$\bar{x} \pm s, n=6$

(3) LDR 诱导产物用量对其生物活性的影响见表 3。经  $Q$  检验, 除  $0.05\text{mL}$  组与对照组,  $0.1\text{mL}$  组与  $0.2\text{mL}$  组,  $0.3\text{mL}$  组与  $0.4\text{mL}$  组外其余各组间 DPM 值均具显著性差异。

**Tab.3 Influence of quantity of LDR induced product on its biological activity**

Group	DPM	Percentage	$F$	$P$
Control	2022.87±263.52	100.00		
0.05mL	2136.00±282.48	105.59		
0.1mL	2569.20±207.37	127.01	33.32	<0.01
0.2mL	2835.27±285.54	140.16		
0.3mL	3277.27±291.67	162.01		
0.4mL	3561.00±216.63	176.04		

$\bar{x} \pm s, n=6$

(4) 辐射后不同时间提取的 LDR 诱导产物对其生物活性的影响见表 4, 由表 4 可见, LDR 照射后 2、4、8、16h 后小鼠脾脏细胞均存在 LDR 诱导产物, 其提取液均对离体小鼠脾脏细胞的转化产生明显的刺激效应。经  $Q$  检验, 除与对照组相比外, 其余各组间 DPM 值均无显著性差异。

**Tab.4 Influence of LDR induced product at different time after exposure to radiation on its biological activity**

Group	DPM	Percentage	$F$	$P$
Control	38239.08±5839.10	100.00		
2h	48692.60±7136.01	127.34		
4h	51954.93±7510.16	135.87	4.55	<0.01
8h	52737.05±7438.10	137.91		
16h	53190.40±7772.21	139.10		

$\bar{x} \pm s, n=6$

(5) 整体照射和离体照射 LDR 诱导产物刺激后, DPM 分别为  $52783.63 \pm 2234.28$  及

55282.35±6105.36 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ), 显著性检验  $t=0.94$ ,  $p>0.05$ , 即整体和离体 LDR 照射后小鼠脾脏细胞都能产生 LDR 诱导产物, 都具有生物学活性且两者在统计学上无显著性差异。

### 3 讨论

正如 Wolff 等<sup>[3]</sup>报道 LDR 可诱导淋巴细胞合成蛋白分子与 DNA 发生特异结合, 从照射后 1h 开始, 6h 达高峰。文献<sup>[4]</sup>报道, 小鼠经 7.5cGy 全身照射后 4h 用平板双向电泳发现, 脾细胞内出现多个新增蛋白点, 其中有的具有生物学活性。同样有学者在小鼠胸腺细胞中发现有 LDR 诱导的新生蛋白点<sup>[5]</sup>。我们曾在文献<sup>[6]</sup>的实验中证实小剂量照射的淋巴细胞外液能诱导其亚群细胞发生 DNA 合成的适应性反应, 本次实验则证实 10cGy LDR 照射后 2h 小鼠脾细胞中即可出现具有生物活性的 LDR 诱导产物, 并制备了 LDR 诱导产物之提取物。

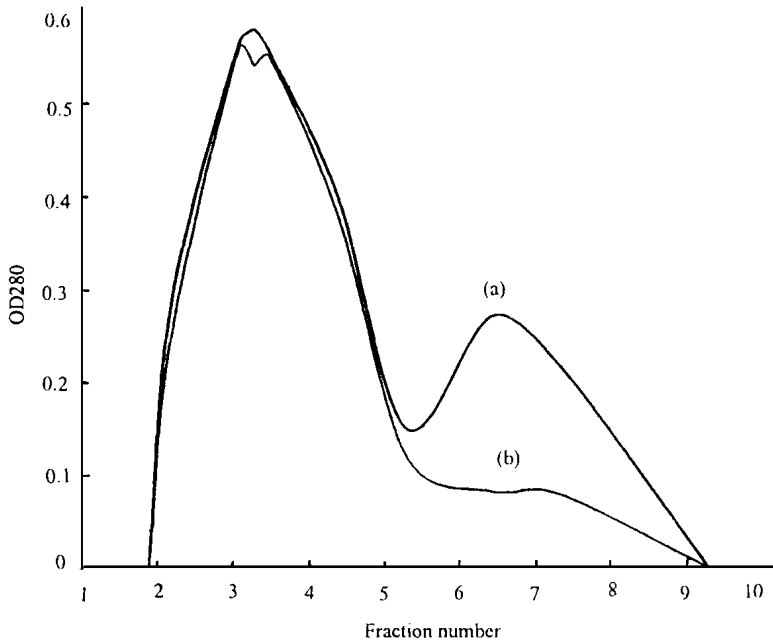
我们用<sup>3</sup>H-TdR 掺入 DNA、<sup>14</sup>C-UR 掺入 RNA、<sup>3</sup>H-Tyrosine 掺入蛋白质检测 LDR 诱导产物提取液对自然转化的小鼠脾脏细胞的刺激作用。物质代谢是转化的基础, 用同位素标记物示踪测定脾淋巴细胞转化分裂过程中 3 种大分子合成代谢的变化, 可以从本质上反映淋巴细胞转化的能力。结果发现, 诱导产物提取液对小鼠脾脏细胞的转化有明显的刺激作用 ( $p<0.01$ ), 脾细胞 DNA、RNA 及蛋白质的合成较对照组分别提高 22.01%、59.26% 及 15.19%, 本研究结果以 RNA 增高幅度为最, 可能与细胞培养时间较短即与大部分细胞所处的细胞周期时相有关。

在影响 LDR 诱导产物生物活性因素的实验中证实, 5—15cGy 均可诱导小鼠脾脏细胞产生有生物活性的诱导产物且其生物活性随 LDR 剂量的增加而增加, 与通常用以观察 LDR 适应反应的 D<sub>1</sub> 情况不同, 未经照射的脾细胞提取液(即 0cGy 组)虽然对同种异体脾细胞转化也有一定的刺激作用但在统计学上无显著性。本实验还观察了 10cGy 诱导的产物提取液用量与效应的关系, 发现提取液在 0.1—0.4mL 范围内随用量增加其生物刺激效应也增大。同样本实验还证实, 辐射后 2—16h 均可从小鼠脾脏细胞提取得到有生物活性的 LDR 诱导产物, 但辐射后不同时间提取产物的活性在统计学上无显著性差异。

本实验 LDR 作用于离体的小鼠脾脏细胞也诱生了 LDR 诱导产物与刘树铮等<sup>[7]</sup>的实验结果(LDR 免疫刺激效应是通过整体调节功能实现的)有所不同。本实验在相同 LDR 剂量(10cGy)体外诱导的新产物生物学活性与整体辐射诱导的 LDR 诱导产物相比, 对脾细胞转化的刺激作用在统计学上无显著性差异。

我们对 LDR 诱导产物提取液(10cGy, 2h)进行了蛋白检测, 结果发现, 经 Sephadex G-100 凝胶滤过(Pharmacia LKB 低压层析系统, pH 7.2, 10min/组分)后照射组出现了新增的第 2 次洗脱峰(见图 1)。对凝胶滤过后分部收集的第七级分进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(凝胶浓度 6%), 测得新增蛋白分子量约为 76.9—110.0 KD(多次实验所测, 有波动)。进一步用 Folin-酚试剂法测定了 6 次小鼠脾脏细胞 LDR 诱导产物提取液的蛋白含量, 结果显示, 0、10cGy  $\gamma$  射线照射后小鼠脾脏细胞蛋白提取液蛋白含量( $\bar{x} \pm s$ )分别为 3066.67±468.81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 3686.67±652.22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 即新增蛋白含量为 613.33±213.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 约占总蛋白含量的 16.63%。我们认为 LDR 诱导产物的有效成分可能就是 LDR 诱导的新增蛋白质。LDR 诱导蛋白可能为 LDR 诱导的修复蛋白, 也可能为 LDR 所激活的酶类或诱生的酶类, 这些酶参与了淋巴细胞的转化增殖过程。文献<sup>[5]</sup>认为这些蛋白可能是具有刺激作用的细胞因子和参与细胞信息传递过程的转录调节因子, 具体的作用机制还需进一步研究探讨。另外, 本实验所

制备的诱导产物提取液成份尚比较复杂,有待进一步纯化。



**Fig. 1** Sephadex G-100 filtration of extracts of mouse splenocytes  
pH 7.2 0.01mol/L PBS elution, 10 min and 2.5mL per fraction  
(a) Radiation, (b) Non-radiation

需要指出的是我们发现诱导产物的生物活性很容易受化学物质、时间等因素的影响,所以在检测及影响其生物活性的实验中制备诱导产物提取液时,我们以 0.01mol PBS 代替细胞裂解液(保留 PMSF,文中所报道诱导蛋白产量即以这种方式取得,较用细胞裂解液所得诱导产物产量略低),以几乎是纯物理的方法取得诱导产物,尽可能地保持其生物活性。本研究未发现良好的 LDR 诱导产物生物活性保存方法,保存方式仅为 4℃ 冷藏。对这一重要的问题,需进一步研究解决。

## 参 考 文 献

- 1 Luckey T D. Health Phys, 1982, **43**:771-776
- 2 Sambrook J, Fritsch E T, Maniatis T. Molecular Cloning—A Laboratory Manual. 2nd ed. Beijing: Science Publishing Company, 1996. 872
- 3 Wolff S. Chin. Med. J, 1994, **107**:425-430
- 4 刘树铮,李修义. 低水平辐射及有关因子生物效应国际研讨会论文汇编(中国·长春,)1993, 71-72  
LIU S Z, LI X K. Proc ISBELLES, 1993, 71-72
- 5 陈沙力,孟庆勇,刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1996, **16**(3):161-163  
CHEN S L, MENG Q Y, LIU S Z. Chin J Radiol Med Prot, 1996, **16**(3):161-163
- 6 孙问蓉,苏燎原,刘芬菊等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1997, **15**(2):114-118  
KONG X R, SU L Y, LIU F J *et al.* J Radia Res Radiat Proces, 1997, **15**(2):114-118
- 7 刘树铮,刘伟宏,蔡露等. 中华放射医学与防护杂志, 1989, **9**(4):247-250

LIU Z, LIU W H, CAI L *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 1989, 9(4):247-250

## LOW DOSE RADIATION INDUCED PRODUCTS IN MOUSE SPLEEN AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

SHEN Wei SU Liaoyuan

(*Department of Medical Radiobiology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007*)

**ABSTRACT** Low dose radiation (LDR) induced products were extracted from mouse spleen and its biological activity was preliminarily detected. The mouse spleen cells were sonicated and the induced products in the lysate were obtained with centrifugation. The method of radioactive isotope incorporation was used and the DPM as an index for evaluating the biological activity of the induced products. To investigate the possible influences of variant factors on the activity of the products, tests were carried out under different conditions; different time for extraction, different radiation doses, different volumes of extracted products for stimulation, and different radiation modes. Results showed that the transformation ability of mouse spleen cells was significantly enhanced after stimulation of these cells with LDR-induced products. And the above-mentioned changes in experimental conditions could influence the activity of the induced products to different extents. It was indicated from this study that the active LDR-induced products could be extracted 2-16h after irradiation with a dose range from 5 to 15cGy, and the effective composition of the induced products maybe belonged to newly synthesized protein.

**KEYWORDS** Low dose radiation, Induced products, Biological activity

**CLC** R811.5