

^{60}Co γ 射线照射对培养小鼠骨髓基质细胞 IL-6 表达的影响及机制研究

朱波¹ 罗成基² 魏永江² 郭朝华² 邹仲敏² 高京生²

¹(第三军医大学新桥医院全军肿瘤中心 重庆 400037)

²(第三军医大学防原医学教研室, 全军复合伤研究所 重庆 400038)

摘要 观察了 ^{60}Co γ 射线照射对培养小鼠骨髓基质细胞(BMSCs)的白细胞介素-6(IL-6) mRNA 及蛋白表达的影响。采用 Dexter 方法体外培养小鼠 BMSCs, 8.0Gy ^{60}Co γ 射线照射后用放射免疫法测定培养上清液中 IL-6 的浓度, 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的方法检测 IL-6 的 mRNA 表达, 同时与 NF- κ B 抑制剂 PDTC 或地塞米松预处理的 BMSCs 相比较。结果表明, 培养小鼠 BMSCs 在正常情况下低表达 IL-6, 辐射后 2h 时其 mRNA 水平表达升高, 4h 时达峰值, 之后开始下降; 其蛋白表达在 2h 时开始升高, 8-12h 时达峰值, 24h 时基本恢复至正常水平; 而 BMSCs 在受照射前 2h 用 PDTC 或地塞米松预处理后, 辐射并不引起 IL-6 mRNA 表达的改变。结果显示, ^{60}Co γ 射线照射能够激活培养小鼠 BMSCs 细胞 IL-6 基因的转录, 使细胞分泌 IL-6 增多, 其机制可能与照射引起的 NF- κ B 活化有关。

关键词 照射, 骨髓基质细胞, 白细胞介素-6, NF- κ B

中图分类号 R146

辐射损伤是核爆炸和核事故的主要伤类, 在临床的肿瘤放疗中也是不可避免的。辐射不但引起骨髓造血实质细胞的损伤, 而且损伤骨髓微环境。骨髓造血微环境在结构上分为基质细胞和细胞外基质, 其中骨髓基质细胞是骨髓造血微环境的核心^[1]。辐射损伤骨髓基质细胞不但引起细胞的死亡和成集落能力的下降, 而且引起某些基因表达的改变。白细胞介素-6(IL-6)是骨髓基质细胞所分泌细胞因子中的一种, 它是参与造血、免疫反应、炎症反应和急性期反应的多潜能细胞因子, 在复杂的细胞因子网络调节宿主防御机制中起着中心作用^[2]。本工作以体外培养小鼠骨髓基质细胞为研究对象, 以 8.0Gy γ 射线照射为放射损伤模型, 观察 γ 射线照射对 IL-6 mRNA 及其蛋白表达的影响, 同时初步探讨辐射后骨髓基质细胞 IL-6 表达改变的可能机理。

1 材料和方法

1.1 材料

6-8w 健康昆明种小鼠购于第三军医大学实验动物中心, 体重在 18-22g, 雌雄随机; ^{60}Co γ 源由第三军医大学防原医学教研室提供; 新生小牛血清及马血清购自北京放射医学研究所; 小鼠 IL-6 放射免疫试剂盒购自北京亚辉试剂公司; mRNA 提取试剂采用 Boehringer Mannheim 公司提供的 Tripure Isolation Regent, PCR 引物由上海 Sagon 合成, 所有 RT-PCR 试剂均购自上海生工, PCR 扩增仪用 PTC-200; NF- κ B 抑制剂 PDTC (pyrrolidined-

全军“九五”指令性攻关项目(P6L045)资助

第一作者: 朱波, 男, 1974 年出生, 1997 年毕业于第三军医大学军医系, 住院医师, 肿瘤学博士研究生

收稿日期: 初稿 2000-11-02, 修回 2001-02-13

ithiocarbamate)及地塞米松(DM)购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓基质细胞的分离及培养 参考文献[3]方法,将小鼠颈椎脱臼处死后,置75%酒精浸泡消毒,无菌条件下取双侧股骨,剔除肌肉,剪断股骨头,用 RPMI 1640 培养液冲出股骨内骨髓细胞,依次用7号针头和5号针头把细胞吹打成单细胞悬液,加入 RPMI 1640 (内含10%小牛血清、10%马血清、100U/mL青霉素、100U/mL链霉素)内,37℃,5%CO₂培养,第21天收集细胞。PDTC及DM的浓度分别为100μmol/L和10μmol/L^[3]。

1.2.2 细胞辐照 培养第21天细胞用本室⁶⁰Co γ源辐照,吸收剂量率为1.07 Gy/min,总吸收剂量为8.0Gy。

1.2.3 IL-6的放射免疫测定 分别于0、1、2、4、8、12、24h时相点在24孔培养板取细胞培养上清液2mL,每个时相点取6管,-20℃保存待测。本实验采用平衡法,以B/T计算NBS、S₀结合百分率,以B/B₀计算标准及待测样品结合百分率,由自动γ计数器根据预先编制程序,直接给出有关参数、标准曲线及样品浓度。

1.2.4 BMSCs总RNA提取 根据BM公司提供的方法进行,即Tripure裂解细胞后用氯仿抽提,异丙醇沉淀RNA,75%乙醇洗涤。提取的RNA溶于经焦磷酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理的水中,-20℃保存待用。提取的RNA其OD_{260/280}在1.8-2.0之间,说明总RNA纯度较高。同时,经1.2%甲醛变性凝胶电泳分析显示18S和28S两条带完整,表明RNA无明显降解。

1.2.5 逆转录反应(Reverse Transcription Reaction, RT) 反应体系中加入总RNA 4μg, Oligo d(T)₁₈ 0.5μg, 10mmol/L dNTP 2μL, RNase抑制剂 20u, 逆转录酶 1μL。逆转录完毕后70℃变性10min,冰上冷却后于-70℃冰箱保存备用。以上所有步骤中使用的器材均经过DEPC处理,操作过程中注意防止DNA污染。

1.2.6 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR) 引物序列如下:β-actin:sense 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3', antisense 5'-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG-3'; IL-6:sense 5'-GAG GAG ACT TCA CAG AGG ATA C-3', antisense 5'-GAC TCT GGC TTT GTC TTT CTT G-3'。β-actin和IL-6目的片段长度分别为764bp和329bp。PCR反应体系内含cDNA 2.0μL, 10×Buffer 5.0μL, dNTPmixture 2.0μL, 25mmol/L MgCl₂ 3.0μL, IL-6 sense primer 1.5μL, IL-6 antisense primer 1.5μL, β-actin sense primer 1.0μL, β-actin antisense primer 1.0μL, 去离子无菌水 32μL。煮沸15min,冰上置5min,加Taq酶1μL,95℃变性后开始循环:60S→58℃退火60S→72℃延伸60S,共35个循环,最后72℃延伸10min后电泳、摄影。每项实验重复3次以上。

2 结果

2.1 培养小鼠骨髓基质细胞光镜观察

培养小鼠骨髓基质细胞第1天以圆形细胞为主,细胞开始贴壁;第2天有少数细胞伸出长的胞浆;第4天开始形成小丛,第6天有成纤维细胞组成的集落,成纤维细胞集落大小变异较大,由6-100个细胞组成;第10天则由几百个细胞组成(见图1)。在本实验中培养的骨髓基质细胞与文献[1]报道的相一致。

2.2 ⁶⁰Co γ射线照射对小鼠BMSCs分泌IL-6的影响

正常培养小鼠骨髓基质细胞培养上清中IL-6含量较低,8.0Gy γ射线照射后2h其IL-6

6 含量与正常组比较显著升高 ($p < 0.05$), 8—12h 达高峰 ($p < 0.01$), 24h 后开始下降, 此时与正常组比较无显著差异 ($p > 0.05$) (见图 2)。

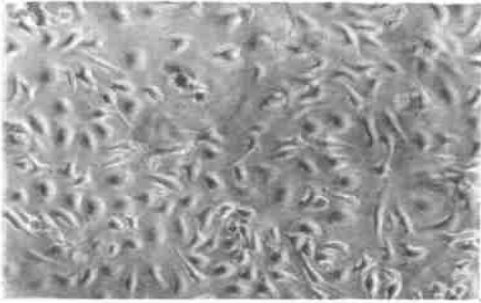


Fig. 1 Normal mouse cultured bone marrow stromal cells $\times 200$

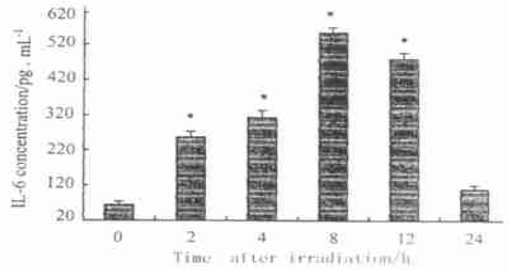


Fig. 2 Concentration of IL-6 in the supernatant of BMSC culture after 8.0 Gy radiation

2.3 正常及 8.0 Gy γ 射线照射后培养小鼠骨髓基质细胞内 IL-6 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示, 正常培养小鼠 BMSCs 内表达 IL-6 mRNA, 经 8.0 Gy γ 射线照射后 2h 其表达较正常升高, 4—8h 达高峰, 12h 接近正常 (见图 3)。经 PDTC 或 DM 预处理 2h 后照射, 其 4h 时 IL-6 mRNA 表达与正常无显著差异 (见图 4)。该实验重复 3 次, 其结果基本相同。

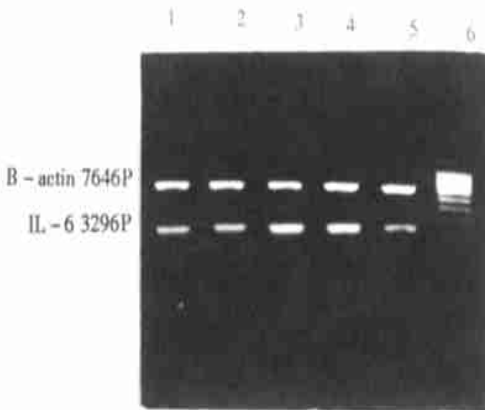


Fig. 3 Result of 1.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products
No. 1—5, products of test groups at 0, 2, 4, 8, 12h, after irradiation; No. 6, marker



Fig. 4 Result of 1.5% agarose gel electrophoresis of RT-PCR products.
No. 1, normal; No. 2, 4h after irradiation; No. 3, 4h after radiation + PDTC pretreatment; No. 4, 4h after radiation + DM pretreatment; No. 5, marker.

3 讨论

在全球范围内, 随着和平利用核能项目的逐年增长, 由此而造成的意外核事故屡有发生。同时, 放射治疗是继化疗、手术治疗后又一被广泛应用的恶性肿瘤治疗方法, 放射治疗时, γ 射线在杀死肿瘤细胞的同时也会对机体正常细胞造成一定程度的损伤。另外, 全身照射是骨髓移植前预处理的重要方案之一^[4]。目前, 对于轻度及少量重度放射病的临床救治已获得成功, 而对极重度放射病均以失败告终。8.0 Gy γ 射线辐射损伤通常能造成机体极重度放射病, 也被作为骨髓移植前放射预处理的模型之一。这些就是本实验模型选择的依据。

骨髓基质细胞持续稳定地分泌各种细胞因子, 包括正负调控因子, 是维持正常造血调控所

必需的。造血功能障碍是辐射损伤的最基本病理变化。造血基质细胞的辐射损伤是造血功能障碍的机理之一^[5]。研究发现, γ 射线照射后小鼠骨髓基质细胞 VCAM-1、Fn 等在蛋白和 mRNA 水平上表达都有降低。但对受照射体外培养的骨髓基质细胞分泌细胞因子的情况未见报道。

IL-6 由 T、B 淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞等产生,同时也是骨髓基质细胞分泌细胞因子的一种。它是参与造血、炎症反应、免疫反应和急性期反应的多潜能细胞因子,在复杂的细胞因子网络调节宿主防御机制中起着中心作用。在本研究中,受 8.0Gy γ 射线照射后培养小鼠骨髓基质细胞 IL-6 在蛋白和 mRNA 水平均见明显改变。在急性应激期内,IL-6 的表达在转录和翻译水平明显升高。在早期生成分泌增多的 IL-6 可以促进骨髓腔内残留的原始干细胞增殖、分化,并动员入外周血以抵抗辐射引起的体内血细胞的减少,这是对机体的一种保护作用;另外,郝思国等^[6]应用成纤维细胞体外集落形成法发现,IL-6 可显著的促进骨髓基质细胞的生长。因而 IL-6 对促进放疗或(和)化疗后及骨髓移植后造血微环境的恢复和重建具有重要的作用。然而,分泌增多的 IL-6 可以趋化中性粒细胞并延缓其凋亡^[7]。骨髓腔局部增多的中性粒细胞可以清除因射线照射所引起死亡的造血细胞和基质细胞,但也有可能与后期辐射引起的骨髓纤维化有关; γ 射线照射引起的 IL-6 的表达升高后,造血干细胞被迫提高增殖速率,加速干、祖细胞和骨髓前体细胞的分裂、分化和成熟。在当时这些反应可以满足机体对血细胞生成的需求。但是造血干细胞处于较高或异常的细胞增殖活动,缺乏必需的体整修复时间的后果可能是:①造血干细胞增殖功能减退,即造血干细胞老化;②无效造血增加,即造血干、祖细胞及幼稚细胞增生活跃而外周血细胞没有相应增多;③造血干细胞的 DNA 损伤未能正确修复或未及时修复,导致基因突变形成,成为白血病发生的潜在因素。

文献^[3]认为,8.0Gy γ 射线照射能够引起 BMSCs 内 NF- κ B 激活且使其向细胞核内移位。由于 IL-6 在高度保守的 5'端(IL-6 启动子高度保守区内)有核因子 κ B 结合部位,因此可以推测: γ 射线照射引起的 IL-6 基因表达的升高可能与其激活 NF- κ B 有关。本研究中我们用两种 NF- κ B 抑制剂预处理细胞,结果发现:当 NF- κ B 信号通路被阻断后,照射并不能引起 IL-6 基因表达的变化。从而验证了上述假说。

致谢 衷心感谢余争平教授在实验设计及论文撰写方面给予的大力指导。

参 考 文 献

- 1 Dexter T M. *J Cell Physiol*, 1982, **1**(3):87-90
- 2 Kishimoto T. *Blood*, 1989, **74**(1):1-10
- 3 朱波,罗成基,郭朝华等. 第三军医大学学报, 2000, **22**(7):660-663
ZHU B, LUO C J, GUO C H *et al*. *Acta Acad Med Mil Tertiae*, 2000, **22**(7):660-663
- 4 By E, Holler H J, Kolb *et al*. *Blood*, 1995, **86**:890-899
- 5 罗成基,郭朝华,周燕红. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, **13**(3):181-183
LUO C J, GUO Z H, ZHOU Y H *et al*. *J Radiat Res Radiat Process*, 1995, **13**(3):181-183
- 6 郝思国,杨吉成,邹正辉等. 安徽医科大学学报, 1998, **33**(6):425-427
HAO S G, YANG J C, ZOU Z H *et al*. *Acta Univ Med Anhui*, 1998, **33**(6):425-427
- 7 Walter L, Ernest E M, Moore M D *et al*. *Arch Surg*, 1996, **131**:24-29

EFFECT OF γ RAY IRRADIATION ON THE EXPRESSION OF INTERLEUKIN-6 GENE IN THE CULTURED BONE MARROW STROMAL CELLS AND ITS MECHANISMS

ZHU Bo¹ LUO Chengji² WEI Yongjiang² GUO Chaohua² ZOU Zhongmin² GAO Jingsheng²

¹(Cancer Center of PLA, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037)

²(Institute of Combined Injury, The Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT The aim of this study was to investigate the effect of radiation on the expression of interleukin-6 in the bone marrow stromal cells (BMSCs) and to discuss the mechanisms by which the expression of interleukin-6 increased. The BMSCs from normal Kunming mice were cultured in vitro with the method of Dexter. The expression of interleukin-6 on the levels of protein and mRNA were detected by the uses of radio-immunity assay (RIA) and the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. PDTC and dexamethasone, two different inhibitors of nuclear factor-kappa B, were used as controls. The result of RIA showed that the expression of interleukin-6 were distinctly increased at 1 hour, with its peak at 4 hours post irradiation in the supernatant of culture of murine BMSCs when the BMSCs were irradiated by 8.0 Gy ⁶⁰Co γ rays. The results of RT-PCR showed that the expression of IL-6 mRNA reached its peak at 8 hours. After adding NF-kappa B inhibitor in the supernatant before radiation, there was no difference between control group and radiation group in detecting the mRNA of IL-6 using RT-PCR. This study suggested that the transcription and expression of IL-6 were activated by ionizing radiation, which might be due to the reason that ionizing radiation could activate NF-kappa B.

KEYWORDS Ionizing radiation, Bone marrow stromal cells, Interleukin-6, NF-kappa B

CLC R146