

辐射后 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的研究

从玉文 陈家佩 邵源 王金惠 苑晓玲 赵振虎 柳晓兰

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 为深化造血细胞辐射损伤分子机制的认识,应用受体放射分析法观察不同剂量照射的 NFS-60 细胞照射后不同时间粒细胞集落刺激因子(G-CSF)受体特性的变化。结果表明, NFS-60 细胞照射后 30min G-CSF 受体的 K_d 值和 B_{max} 值随着照射剂量的增大而增加,其中 K_d 值增加更为显著;照射后 24h, 1Gy 照射细胞的 K_d 值及 B_{max} 值已有恢复, 3、5Gy 照射细胞的 K_d 值未见下降,其 B_{max} 值反而较照射后 30min 增加更为显著。提示照射后 G-CSF 受体 K_d 值的增加可能是造血细胞辐射损伤的原因之一。

关键词 辐射, G-CSF, 受体, 造血细胞

中图分类号 R818.2

前期的研究工作发现^[1],造血细胞受照射后造血因子的增殖反应性是降低的,表现为造血因子半数有效剂量(ED₅₀)的增加及造血细胞最大增殖幅度的降低。因本工作研究用的细胞株均为造血因子依赖细胞株,造血因子启动的受体信号转导是这些细胞增殖的基础,辐射后造血细胞对造血因子的增殖反应性减低,提示在细胞辐射损伤中可能伴有受体信号转导的障碍。已知受体是细胞因子发挥作用的起点,细胞因子与受体结合形成高亲和力受体复合物是受体信号转导启动的关键^[2]。因此,为深化造血细胞辐射损伤的机制研究,观察了照射对 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 NFS-60 细胞为 G-CSF 依赖的小鼠源性的髓系白血病细胞株,常规条件培养,取指数生长期细胞用于实验。

1.2 主要仪器和试剂

WIZARD 1470 自动 γ 计数器,检测效率 80%。rhG-CSF 活性为 1×10^7 U/mg,纯度为 98%,本所陈惠鹏教授惠赠。 $Na^{125}I$ 购于美国 Amersham 公司。

2 方法

2.1 氯胺-T 双相¹²⁵I 标法

按文献^[3]操作并略有改进。在 200 μ L 标记管中依次加入 G-CSF 2 μ g, $Na^{125}I$ 1.85 $\times 10^7$ Bq,用 100mmol/L PB(pH 7.4) 补至 100 μ L。取 1mol/L NaCl 浸泡过的大小约 2mm² 的干滤纸片一张,在其一面加 20mg/mL 的氯胺-T 10-15 μ L,并紧贴在盖玻片上,然后把盖玻片

国家自然科学基金(37800032)资助

第一作者:从玉文,男,1967年3月出生,1998年毕业于军事医学科学院,博士,放射医学专业,副研究员

收稿日期:初稿 2002-01-21, 修回 2002-04-15

倒放在标记管上,每 10min 换滤纸片 1 次,共换 4—5 次。反应结束后加 15mg/mL 的硫代硫酸钠 5 μ L 终止反应。反应液加入 Sephadex G25 分离柱(1cm \times 20cm),用含 2g/L Tween20 的 20 mmol/L PBS 洗脱,根据洗脱曲线计算标记率。

2.2 ^{125}I -G-CSF 的最大结合能力检测

用培养液洗涤 NFS-60 细胞 3 次,细胞计数,适当调整细胞浓度,在 96 孔板中每孔加入 ^{125}I -G-CSF 40000/每分钟和适量的细胞,使细胞浓度分别为 1.5—4.0 $\times 10^7$ /mL,总体积为 100 μ L,对照孔加入和相应实验孔相等的细胞数及 50—100 倍未标记 G-CSF。4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡 96 孔板 12h,离心洗涤细胞,测游离 ^{125}I 及结合 ^{125}I /每分钟值,相应的实验孔与对照孔结合 ^{125}I /每分钟值的差即为特异结合值(B)。以细胞数的倒数为横坐标,以特异性结合/每分钟值的倒数为纵坐标,作回归直线,将纵坐标截距值的倒数除以反应体系中总的/每分钟值即为 ^{125}I -G-CSF 的最大结合能力。

2.3 自身替代实验^[4]

该实验用于测定标记 G-CSF 的放射性比活度力,用培养基洗涤细胞 3 次,调整细胞浓度为 2.5 $\times 10^7$ /mL。同时进行两套饱和实验操作:

a. 在 96 孔板中每孔加细胞悬液 80 μ L,递增加入 ^{125}I 标 G-CSF 5000—200000/每分钟,用培养基补至 100 μ L,对照孔加入和相应实验孔相等的细胞数及 50—100 倍未标记 G-CSF。

b. 在 96 孔板中每孔加细胞悬液 80 μ L, ^{125}I 标 G-CSF 2000—3000/每分钟,递增加入未标记的 G-CSF,对照孔同样加入 50—100 倍的未标记的 G-CSF。

a、b 两板放 4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡 12h。应用自己改制的离心管洗涤细胞,分别检测游离 ^{125}I 及结合 ^{125}I /每分钟值,计算后者与前者的比 B/F 值及特异结合值。按文献[4]要求在同一坐标内作曲线图。在两条曲线 B/F 值相同范围选择数个点,测出相应的/每分钟值及 G-CSF 数量。以 G-CSF 量为横坐标,/每分钟值为纵坐标,作图并作直线回归,其斜率即为特异性放射比活度。

2.4 受体放射分析法

用培养基洗涤细胞 3 次,调整活细胞浓度为 2.5 $\times 10^7$ /mL。在 96 孔板中每孔加细胞悬液 80 μ L,递增加入 ^{125}I -G-CSF 5000—200000/每分钟,用培养基补至 100 μ L,对照孔加入和相应实验孔相等的细胞数及 50—100 倍未标记 G-CSF。4 $^{\circ}\text{C}$ 轻度振荡 96 孔板 12h。结合反应结束后离心洗涤细胞,分别检测游离 ^{125}I 及结合 ^{125}I /每分钟值,计算相应的 B/F 值及 B 值。绘制 Scatchard 图,计算 B_{max} 值及 Kd 值,每组结果重复 2—4 次。

2.5 照射条件

本所⁶⁰Co γ 射线照射源 1 次照射,剂量为 1、3、5Gy,剂量率为 1.15—1.23Gy/min。

2.6 统计分析

应用 SAS6:03 软件包,采用 ANOVA 一元方差分析及 DUNCANN 两两比较法对结果进行统计分析。

3 结果

3.1 G-CSF 同位素碘标记及特异性放射比活度检测

应用氯胺-T 法标记 G-CSF,标记率为 21.7%。在 ^{125}I -G-CSF 加入量不变的条件下,观察细胞数量对特异性结合 ^{125}I 的影响,并以特异性结合/每分钟值的倒数对细胞数量的倒数作图 1。从中计算出 ^{125}I -G-CSF 和 NFS-60 细胞的受体的最大结合能力为 63.3%。根据

自身替代实验的理论推导设计实验,在两种竞争结合反应体系中,以 B/F 值对加入到两种反应体系中的¹²⁵I-G-CSF 的/每分钟值及 G-CSF 的数量作图 2A,在两图的 B/F 相同区选取数点,计算出相应的¹²⁵I-G-CSF /每分钟值及 G-CSF 的数量,以¹²⁵I-G-CSF 的/每分钟值对 G-CSF 数量(ng)作图 2B,从中计算出¹²⁵I-G-CSF 的放射比活度为 1.27×10⁵/每分钟/ng。

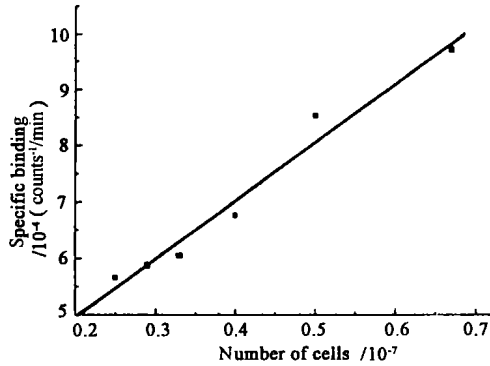


Fig. 1 Determination of the maximal binding capacity of ¹²⁵I-G-CSF

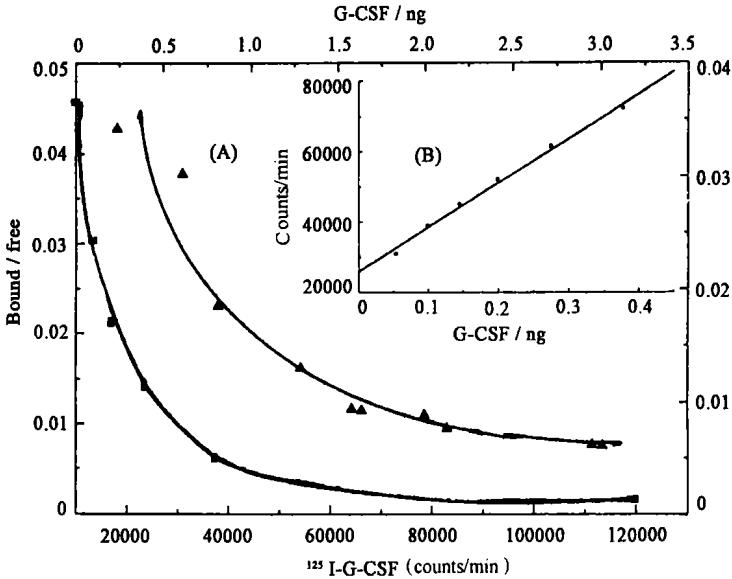


Fig. 2 Determination of specific-radioactivity of ¹²⁵I-G-CSF

- (A) ▲. B/F ratios plotted against total radioactivity of ¹²⁵I-G-CSF in the G-CSF added,
- . B/F ratios plotted against the amount of G-CSF added,
- (B) Specific-radioactivity calculation of ¹²⁵I-G-CSF

3.2 照射后 30min NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的变化

应用受体放射分析法观察了辐射后 NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的变化。图 3A 为 NFS-60 细胞照射后 30min 与¹²⁵I-G-CSF 结合的饱和曲线。图 3(A)中看出随着照射剂量的增加,饱和曲线趋于上移,以 3、5Gy 照射细胞最为明显,说明照射可引起细胞结合¹²⁵I-G-CSF 量的增加。对每条曲线均进行 Scatchard 作图(图 3B),从中计算出 Kd 值及 B_{max} 值,结果见表 1。在照射后 30min,可以看出随着照射剂量的增加,Kd 值及 B_{max} 值均升高,其中以 Kd 值增加更为显著,如 5Gy 照射细胞组的 Kd 值可达对照细胞组的 1.8 倍,而 B_{max} 则是对照细胞的 1.4 倍。

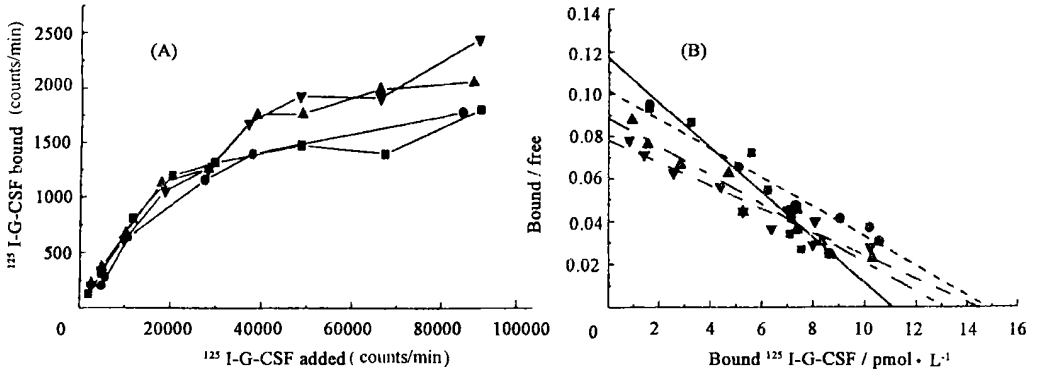


Fig. 3 Scatchard analysis of I^{125} -G-CSF binding to NFS-60 cells 30 minutes after irradiation
 (A) Equilibrium binding of I^{125} -G-CSF to irradiated NFS-60 cells,
 (B) Scatchard analysis of the same data, as in A,
 ■. Control, ○. 1Gy, ▲. 3Gy, ▼. 5 Gy

Tab. 1 Changes in characters of G-CSF receptors of irradiated NFS-60 cells

Dose of radiation	30min after irradiation		24h after irradiation	
	Kd/pm \cdot L $^{-1}$	B $_{max}$ /pm \cdot L $^{-1}$ (10 $^{-6}$ cells)	Kd/pm \cdot L $^{-1}$	B $_{max}$ /pm \cdot L $^{-1}$ (10 $^{-6}$ cells)
Control/Gy	97.6 \pm 14.2	5.0 \pm 0.6	79.9 \pm 8.6	5.1 \pm 0.6
1	139.5 \pm 13.4	6.5 \pm 1.5	83.8 \pm 10.5	5.3 \pm 0.5
3	144.7 \pm 1.4	6.7 \pm 1.0	124.3 \pm 41.3	8.1 \pm 1.1 ⁽¹⁾
5	171.2 \pm 7.2 ⁽¹⁾	7.0 \pm 0.7	165.9 \pm 39.9 ⁽²⁾	11.8 \pm 2.3 ⁽²⁾

Compare with control, ⁽¹⁾*p* < 0.05, ⁽²⁾*p* < 0.01

3.3 照射后 24h NFS-60 细胞 G-CSF 受体特性的变化

图 4(A)为 NFS-60 细胞照射后 24h 与 125 I-G-CSF 结合的饱和曲线。图 4(A)中显示饱和曲线随着照射剂量的增加而上移,其上移幅度明显高于同剂量照射后 30min 组。图 4(B)是根据图 4(A)作的 Scatchard 分析。表 1 比较了 NFS-60 细胞照射后 24h G-CSF 受体的 Kd 值及 B $_{max}$ 值的变化。结果表明,随着照射剂量的增加,G-CSF 受体的 Kd 值及 B $_{max}$ 值均明显

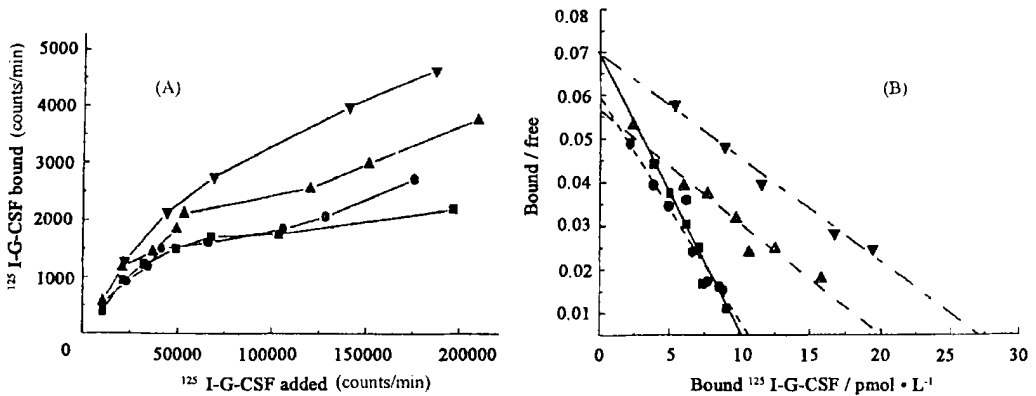


Fig. 4 Scatchard analysis of I^{125} -G-CSF binding to NFS-60 at 24h after irradiation
 (A) Equilibrium binding of I^{125} -G-CSF to irradiated NFS-60 cells
 (B) Scatchard analysis of the same data, as in A
 ■. Control, ○. 1Gy, ▲. 3Gy, ▼. 5Gy

升高,其中以 B_{\max} 值增加更显著,如 5Gy 照射细胞的 Kd 值是对照组的 2 倍,而 B_{\max} 值已达对照组的 2.3 倍。同照射后 30min 相比,1Gy 照射细胞的 Kd 值已有明显恢复,3、5Gy 照射细胞组 Kd 仍处于较高水平,其 B_{\max} 值较照后 30min 也有明显增加。

4 讨论

受体放射分析法是研究受体特性的经典方法。受体解离常数(Kd)和受体最大结合容量(B_{\max})是了解受体特性的最重要的指标。Kd 值反映了受体亲和力的高低, B_{\max} 值表示受体的最大结合容量。NFS-60 细胞为小鼠源性的髓系白血病细胞株,具有肿瘤细胞所特有的无限增殖特性和骨髓造血细胞相似的造血因子依赖性。本实验观察到随着照射剂量的增大,G-CSF 受体的 Kd 值增加,受体亲和力下降。造血因子受体信号转导研究的最新进展揭示 G-CSF 与受体结合,引起受体同源二聚化,形成高亲和力受体复合物,激活 JAK2 等酪氨酸激酶,启动信号转导,实现 G-CSF 的多种生理作用^[2]。辐射后 G-CSF 受体亲和力下降可能影响了高亲和力受体复合物的形成,阻碍受体信号转导的启动,进而下调了 G-CSF 的促增殖、分化作用。研究发现,NFS-60 细胞辐射后对 G-CSF 的增殖反应性降低,表现为 NFS-60 细胞的最大增殖幅度的下降和 G-CSF ED₅₀ 值的增加,最大增殖幅度下降表明照射细胞即使给予足量造血因子刺激也不可能达到照前增殖水平,而 ED₅₀ 值升高提示若获得同等程度增殖水平,照射细胞所需造血因子的浓度明显高于未照射细胞。ED₅₀ 值增加以照射后 30min 最为明显,照射剂量越大,增加越显著;照射后 24h 1Gy 照射组 ED₅₀ 值已基本恢复,5Gy 照射组增加仍较显著。可以看出,照射后 ED₅₀ 增加的剂量时间效应同照射后 G-CSF 受体 Kd 值的变化具有相似性^[1]。由此推测,G-CSF 受体 Kd 值的增加可能是辐射后 NFS-60 细胞增殖能力下降的原因之一。

在照射后 30min 及照射后 24h 均发现随着照射剂量的增加 NFS-60 细胞 B_{\max} 值升高。其中,以照射后 24h 增加更显著,说明照射可引起 NFS-60 细胞 G-CSF 受体数量的增加。受体数量的增加可以弥补受体亲和力下降引起的信号传递的降低,可能是细胞对照射的一种适应反应。流式细胞仪检测结果显示 5Gy 照射 NFS-60 细胞照射后 30min 细胞周期同未照射细胞相比没有明显变化,照射后 24h 约有 80% 的细胞处于 G₂/M 期,细胞体积明显增大,每个细胞的 G-CSF 受体数量也可能因此而增加。

辐射引起受体亲和力降低原因尚不十分清楚,相关的文献也很少。Griffiths 等^[5]报道 γ 线单独或联合中子照射可引起猪空肠细胞血管活性肠肽(VIP)受体的亲和力下降,VIP 受体数量增加,与本文观察到的 G-CSF 受体的变化极其一致^[5];另一报道^[6]辐射可引起 EGF 受体亲和力降低,但没发现受体数量的变化。有关辐射对受体特性影响的规律性认识还需要大量的实验研究,而进一步阐明受体亲和力的下降与造血细胞辐射损伤的相关性可能为辐射损伤机制研提供新的资料。

参 考 文 献

- 1 从玉文,陈家佩,邵源. 军事医学科学院院刊, 1999, 23(2):119-122
CONG Y W, CHEN J P, SHAO Y. Bull Acad Mil Med Sci, 1999, 23(2):119-122
- 2 Moutoussamy S, Kelly P A, Finidori J. Eur J Biochem, 1998, 255(1):1-11
- 3 Tejedor F, Ballesta J P G. Analytical Biochemistry, 1982, 127(1):143-149
- 4 Calvo J C, Radicella J P, Charreau F H. J Biochem, 1983, 212(2):259-264

- 5 Griffiths N M, Frankis A, Dublineau I *et al.* Int J Biol, 1996, **70**(3):361-370
6 Matsuo T, Ohtsuru A, Ito M *et al.* Cancer Lett, 1995, **89**(2):153-159

STUDIES ON THE CHARACTERISTIC OF G-CSF RECEPTORS OF IRRADIATED NFS-60 CELLS

CONG Yuwen CHEN Jiapei SHAO Yuan WANG Jinhui

YUAN Xiaoling ZHAO Zhenhu LIU Xiaolan

(Academy of Military Medical Science Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

ABSTRACT To deepen the cognition of the molecular mechanism of radiation injury of hematopoietic cells. Using receptor ligand binding assay the changes of the characteristic of G-CSF receptors of NFS-60 cells were observed after irradiation. The Kd and Bmax of G-CSF receptor of NFS-60 cells were elevated with the radiation dose increasing in 30min after irradiation, and the Kd was increased more markedly. 30min after irradiation, the Kd and Bmax recovered for 1Gy irradiated cells; but even 24h after irradiation, the Kd(s) and Bmax(s) for 3Gy and 5Gy-irradiated cells did not decrease markedly and the Bmax(s) were even larger than those 30h after irradiation. The increase of Kd of G-CSF receptor after irradiation might be one of the reasons for radiation injury of hematopoietic cells.

KEYWORDS Radiation, G-CSF, Receptor, Hematopoietic cells

CLC R818.2