

电离辐射致中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞凋亡的研究

陆肇红 赵经涌 朱明清 时夕金 王春蕾
(苏州大学放射医学与公共卫生学院 苏州 215007)

摘要 为研究 X 射线致中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞凋亡, 探讨电离辐射的生殖毒性机理, 用 2—20Gy X 射线照射 CHO 细胞株, 通过荧光显微镜、Annexin V/PI 双染色法结合流式细胞仪, 检测和观察细胞凋亡及其形态学改变。结果表明, X 射线照射后 24、48、72h 均出现细胞凋亡, 并随照射剂量增加凋亡细胞数亦增加。但照射后 48h 和 72h 细胞凋亡更为明显 ($p < 0.05$)。凋亡的 CHO 细胞在荧光显微镜下, 观察到细胞核内染色质的不规则聚集、核固缩和周边化, 有的呈月牙形, 甚至出现凋亡小体等一系列凋亡细胞形态特征。结果显示: 电离辐射引起生殖细胞严重的 DNA 损伤, 因无法修复继而导致细胞凋亡。

关键词 电离辐射, 中国仓鼠卵巢细胞, 细胞凋亡

中图分类号 R811.5, R339, R321

自 Kerr 等^[1]提出“细胞凋亡”这一概念以来, 广大学者对细胞凋亡的研究已有较多报道^[2-4]。在放射生物学领域, 有关辐射致癌与凋亡关系的研究较多, 而辐射致生殖细胞凋亡研究相对较少。生殖细胞对电离辐射具有较高的敏感性, 电离辐射引起不孕症、生殖系统肿瘤和遗传效应等可能都与生殖细胞凋亡有关^[5-7]。通过 X 射线对中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞凋亡的研究, 以阐明电离辐射在生殖细胞凋亡发生中的作用, 以期为进一步探讨环境有害因素的生殖毒性机理、辐射所致遗传效应提供实验依据。

1 实验材料和方法

1.1 试剂和设备

RPMI1640 培养基, 美国 GIBCO 产品; RNA 酶, 上海华美生物工程公司产品; 荧光素-Annexin V, 德国 Boehringer Mannheim 公司产品; TritonX-100, 上海华美生物工程公司产品; 碘化丙啶 (PI), Sino-American Biotec 公司产品; 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞株, 苏州大学医学院微生物教研室提供。X 射线照射源, 飞利浦 SL-18 型加速器 (荷兰); EPIC-XL 型流式细胞仪, Coulter (USA); 荧光显微镜, Olympus (Japan)。

1.2 细胞株培养

将 CHO 细胞株直接种于含 10% 小牛血清的

RPMI1640 培养基中, 37 °C 传代培养, 待细胞数达到 1×10^7 左右时, 进行有关指标测定。

1.3 照射条件及照射方法

将分装于各培养瓶的 CHO 细胞培养 12h 后, 置于 X 射线源下照射。照射条件: 源能量 6MV, 照射野为 10cm×10cm, 下垫 1.5cm 组织补偿块, 源皮距 100cm, 剂量率为 175 cGy min^{-1} , 照射剂量分别为 2、8、16、20Gy。照射后 24、48、72h 取样进行剂量效应、时相效应关系研究和形态学观察。

1.4 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡

分别取不同照射剂量、不同时相培养的 CHO 细胞, 制备平行样本 5 个, 测定前用 0.25% 胰酶 + EDTA 消化, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后去除上清液, 加入已配好的含有荧光素结合的 Annexin V 及 PI 的染液, 4°C 下避光反应 15min, 流式细胞仪检测分析。根据统计 10^4 细胞中出现被荧光素染上的细胞数目, 来反映 X 射线所致 CHO 细胞凋亡。

1.5 荧光染色^[8]

取未照射及 X 射线照射的 CHO 细胞, 测定前用 0.25% 胰酶 + EDTA 消化, PBS 洗涤后去除上清液, 1mL PBS 重悬细胞, 取 95μL 细胞悬液加 5μL 0.5% PI 染液 (含 0.1% TritonX-100 及 1% RNA 酶), 室温下避光染色 30 min 后涂片, 置荧光显微

第一作者: 陆肇红, 女, 1960 年 10 月出生, 1983 年毕业于南京铁道医学院预防医学专业, 现在苏州大学放射医学与公共卫生学院, 讲师

收稿日期: 初稿 2004-01-13, 修回 2004-03-10

镜下观察。

1.6 统计方法

试验数据用 $P \pm Sp$ 表示, 按两项分布进行统计分析。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 X 射线诱发 CHO 细胞凋亡的结果

2.1.1 X 射线诱发 CHO 细胞凋亡的剂量效应关系见表 1。结果表明, 照射后 48h 各剂量组细胞凋亡率均高于未照射组, 并且随着照射剂量的增大, 凋亡率亦随之明显增多。当照射剂量为 20Gy 时, 凋亡细胞率不再增加。照射剂量在 0—20Gy 范围内拟合的细胞凋亡率 ($Y, \%$) 与照射剂量 (D, Gy) 的关系符合两项分布, 其函数: $Y=1.9519+1.0482D-0.019D^2$ ($R^2=0.9711D$), 经方差分析 $p<0.05$ 。

Table.1 The rate of CHO cell apoptosis 48h after exposure to X-ray (%)

Irradiated Dose/Gy	Rate($P \pm Sp$)
0	2.34 $\pm$ 0.151
2	3.85 $\pm$ 0.192 ⁽¹⁾
8	8.15 $\pm$ 0.274 ⁽¹⁾
16	15.39 $\pm$ 0.361 ⁽¹⁾
20	14.50 $\pm$ 0.352 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p<0.01$, vs control, $n=5$

2.1.2 不同剂量 X 射线照射后不同时相诱导 CHO

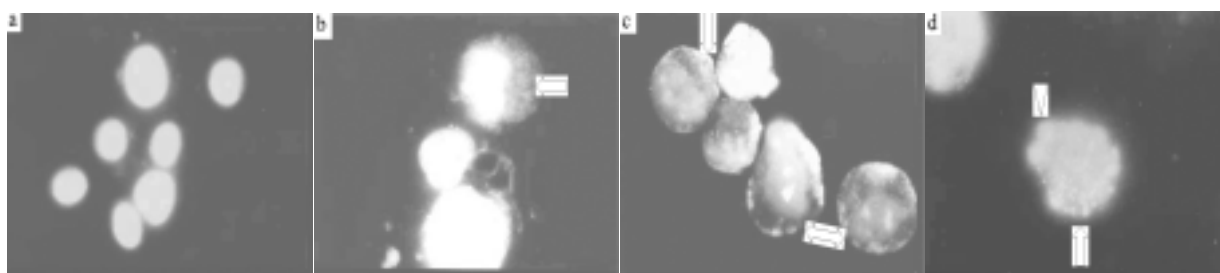


Fig.2 Morphological change of CHO cell apoptosis after exposure to X-rays (fluorescent microscope: 1000 $\times$)
a: CHO cell, Normal control; b-c: CHO cell, 24h after 16Gy exposure to X-rays: b, the irregular agglomerate of chromatin, c, periphery distribution of nuclei, c, crescent-moon-like cell. d, CHO cell, 48h after 16Gy exposure to X-rays, $\uparrow$, pycnosis of nuclei, $\triangle$, small apoptosis body

3 讨论

愈来愈多的研究表明, 人类成熟生殖细胞中, 不仅是精子而且也包括卵子的数量和质量趋于下降, 这可能与环境因素的作用有关^[9-12]。由于环境因素对生殖细胞的作用不仅涉及细胞本身遗传特性

细胞凋亡变化 为了观察电离辐射诱导 CHO 细胞凋亡与时间的关系, 分别在 X 射线照射后 24h、48h、72h 进行凋亡测定, 结果见图 1。由图 1 可以看出, X 射线照射后不管是 24h, 还是 48h 或 72h 均出现细胞凋亡, 而且随着照射剂量增加, 细胞凋亡率亦增加。但照射后 48h 和 72h 细胞凋亡更为明显 ($p<0.05$)。照射后的 3 个时相中, 细胞凋亡峰值均出现在照射剂量为 16Gy。

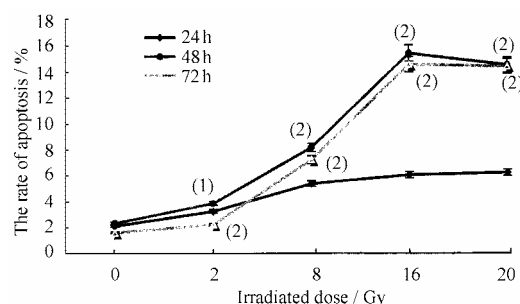


Fig.1 Rate of CHO cell apoptosis in different time-points after exposure to X-ray $n=5$, ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$

2.2 荧光显微镜观察细胞凋亡

经 PI 染色的各类细胞形态见图 2。正常细胞形态是: 核呈均匀红色荧光(见图 2a)。而 X 射线照射 (16Gy) 的 CHO 细胞均出现了一系列凋亡细胞形态特征: X 射线照射后 24h 的凋亡细胞核内染色质发生不规则聚集、核固缩和周边化, 有的呈月牙形(见图 2b、2c); X 射线照射后 48h 的凋亡细胞核染色质已呈致密颗粒或团块状, 甚至看到核内凝集的染色质突出到核外, 形成凋亡小体(见图 2d)。

的稳定, 而且还可能涉及种属是否能够正常继续繁衍。因此与体细胞相比, 研究包括电离辐射在内的环境有害因素对生殖细胞凋亡的作用很有价值。

作为环境因素之一的电离辐射, 其所致的细胞

凋亡通常依据细胞死亡发生的时间和增殖与否，分为增殖死亡与间期死亡。就辐射引起DNA损伤反应的机制来看，目前更多的学者认为^[13]，电离辐射所致细胞死亡的主要形式不是细胞的被动性死亡，而是主动性反应，即细胞凋亡。细胞凋亡是细胞针对所处环境因素的特定改变而产生的应答，它与细胞增殖一样，在机体中承担着重要细胞数量的调控作用。

目前国内研究诱发生殖细胞凋亡的照射剂量大都在低剂量范围，主要研究生殖细胞凋亡的刺激效应。而本研究中诱发CHO细胞凋亡的剂量范围采用的是亚致死剂量，研究的是CHO细胞DNA损伤后所发生的后续反应。结果表明，CHO细胞所发生的凋亡与X射线照射剂量有关，随着照射剂量的增大，其产生的凋亡细胞数亦随之明显增多($p < 0.01$)，照射后48—72h更为明显($p < 0.05$)，并且在照射后3个时相中细胞凋亡峰均出现在16Gy，但当剂量增大至20Gy时，凋亡数反而下降，这种现象与童新等研究胸腺细胞凋亡现象相一致^[14]，提示X射线诱发的CHO细胞凋亡与作用的刺激强度有关。当细胞DNA损伤比较严重时，可能DNA因无法自行修复，而启动凋亡程序。不过当照射剂量接近致死剂量时，可能因直接引起细胞坏死，而使细胞凋亡数相对减少。

众所周知，细胞凋亡有别与细胞坏死。它是受特殊基因活化及其所表达的小分子调控的一种程序化死亡过程。在这个过程中细胞发生一系列变化，其中细胞膜磷脂酰脂的不对称性丢失，即细胞膜内层的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidyl serine, PS)暴露是其变化之一。而这种膜改变先于细胞DNA裂解和细胞形态的变化。本研究检测的CHO凋亡细胞膜PS外移，是细胞发生凋亡时的一种早期普遍事件，并且发生在与细胞凋亡相关其它事件之前，它使凋亡细胞呈现“食我”状态，从而有利于吞噬细胞识别和吞噬，避免了类似细胞坏死样引起的炎症反应，保护了机体免受濒死细胞内容物的损害，这种所谓利他性死亡保证了整个机体的正常状态。因此，X射线诱发CHO细胞凋亡，实际上是生物体对DNA损伤所作出的积极有效的反应。

细胞凋亡不仅其发生机理与细胞坏死完全不同，而且具有一系列特有的形态学特征，本实验观察到CHO细胞经历了凋亡时普遍存在的生化过程，即细胞核染色质异常聚集、颗粒化，最终形成凋亡小体。

细胞通过凋亡，主动清除潜在危险，以保持生

物体自身的遗传稳定。由于凋亡能使带有DNA损伤的细胞发生死亡，避免了已损伤的基因进入子代细胞，从而有利于机体防止遗传突变。这对于生殖细胞尤为重要。细胞凋亡是机体长期进化过程中形成的处理多余和有害细胞的一种机能。但从另一方面来讲，如果生殖细胞凋亡过多，也可能导致不孕等生殖系统性疾病。因此，对包括电离辐射等环境有害因素诱发生殖细胞凋亡的进一步研究，一方面将为进一步探讨环境有害因素的生殖毒性机制及辐射所致遗传效应提供实验依据，另一方面也可以通过建立剂量-效应关系，为制定环境有害因素的安全接触限量及法规提供科学资料。

参考文献

- 1 Kerr J, Wyllie A, Currie A. Br-J-Cancer, 1972, **26**(4): 239-257
- 2 Gewirtz D A. Breast Cancer Res Treat, 2000, **62**(3): 223-235
- 3 Peltenburg L T. Quarterly Journal of Nuclear Medicine, 2000, **44**(4): 355-364
- 4 Bertram J S. Mol Aspects Med, 2000, **21**(6): 167-223
- 5 Beumer T, Roepers-Gajadien H, Gademan I, et al. Cell Death Differ, 1998, **5**(8): 669-677
- 6 Hasegawa M, Zhang Y, Niibe H, et al. Radiat Res, 1998, **149**(3): 263-270
- 7 Turner T T, Miller D W. Biol Reprod, 1997, **57**(6): 1275-1284
- 8 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术, 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 342-351
SHEN Guanxin, ZHOU Rulin. The modern experimental technique in immunology. Wuhan: Hubei Science Technology Press, 1998. 342-351
- 9 欧玉清, 邢继强, 郑春梅, 等. 黑龙江医药科学, 2000, **23**(5): 4-5
OU Yuqing, XING Jiqiang, ZHENG Chunmei, et al. Heilongjiang Medicine and Pharmacy, 2000, **23**(5): 4-5
- 10 Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Biol Reprod, 2000, **63**(3): 805-810
- 11 Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Cell Prolif, 1996, **29**(1): 13-31
- 12 Evan G, Littlewood T. Science, 1998, **281**(5381): 1317-1322
- 13 Tauchi H, Sawada S. Int J Radiat Biol, 1994, **65**(4): 449-455
- 14 童新, 童燕, 张双喜, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1996, **14**(2): 111-115
TONG Xin, TONG Yan, ZHANG Shuangxi, et al. J Radiat Res Radiat Process, 1996, **14**(2): 111-115

The apoptosis of CHO cells induced by X-rays

LU Zhaohong ZHAO Jingyong ZHU Mingqing SHI Xijin WANG Chunlei

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215007)

ABSTRACT The work is to study the mechanism of toxic effects on reproductive system and apoptosis of Chinese hamster ovary (CHO) cells induced by X-rays. CHO cell was exposed to X-rays 2 to 20Gy, Apoptosis and morphological changes of the cells were observed by fluorescent microscopy and flow cytometry analyzer with double staining with Annexin V/ PI. The apoptosis could be observed at 24, 48 and 72h after the exposure, but it was more obvious 48 and 72 h after the exposure. Rate of the apoptosis increased along with radiation dose were elevated. Some morphological changes, such as irregular agglomerate of chromatin, pycnosis and periphery distribution of nuclei, crescent-moon-like cell, small apoptosis body, were observed. Radiation results DNA damage in the CHO cells, and the damage cannot be repaired, hence the induced cell apoptosis.

KEYWORDS Ionizing radiation, CHO cells, Apoptosis

CLC R811.5, R339, R321