

电离辐射对体外培养肾小管上皮细胞 1 α 羟化酶表达的影响

许莹莹 金慰芳 王洪复

(复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室 上海 200032)

摘要 研究电离辐射对体外培养肾小管上皮细胞 1 α 羟化酶表达的影响。采用实时荧光定量 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Real-time Q-PCR) 技术与透射电镜等方法, 观察 3 Gy、5 Gy 和 10 Gy ¹³⁷Cs γ 射线单次照射 (剂量率为 0.85 Gy/min) 体外培养肾小管上皮细胞后 1 α 羟化酶 mRNA 表达水平及细胞线粒体形态的改变, 并与不受照 (0 Gy) 组比较。结果表明, 低剂量 (3 Gy) γ 射线照射 24 h 后即出现肾小管上皮细胞 1 α 羟化酶 mRNA 表达水平的明显降低 ($p < 0.05$), 且随受照剂量的增加下降幅度增大; 电镜观察显示受照后肾小管上皮细胞线粒体呈现肿胀、基质变薄、电子密度减低、嵴断裂、数量减少与排列紊乱等变化。

关键词 电离辐射, 肾小管上皮细胞, 1 α 羟化酶, 维生素 D₃

中国分类号 R818.74, R361.3, R331, R811.5

肾是辐射较敏感组织, 在腹部肿瘤放射治疗中, 大剂量电离辐射可引起肾明显的辐射损伤效应, 进而引起骨量丢失、骨折、骨折愈合延迟等继发性骨损伤效应^[1]。其发生的病理机制和防治措施尚缺乏深入研究。肾与骨代谢关系密切, 是调节骨代谢的重要内分泌器官, 除通过钙、磷重吸收影响骨矿盐沉积外, 主要通过其肾小管上皮细胞线粒体内 1 α 羟化酶合成 1, 25 (OH)₂D₃ (活性 D-激素) 来调节骨重建、影响骨代谢。本研究体外直接观察 γ 射线对肾小管上皮细胞 1 α 羟化酶表达水平及细胞线粒体形态的影响, 拟阐明肾辐射损伤诱发骨损伤的 D-激素合成障碍机制。

1 材料和方法

1.1 主要设备及试剂

¹³⁷Cs γ 射线照射装置 (γ Cell 40, 加拿大); Rotor-Gene 3000 Real time PCR 仪 (Corbett Research); PHILIPS CM-120 透射电镜 (Japan); RPMI1640 培养基干粉 (GIBCO BRL U.S.A.); MMLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 聚合酶 (Promega); dNTP 混合液、DNA Ladder、SYBR Green 等 (华美生物工程公司)。

1.2 肾小管上皮细胞分离培养

1 月龄 SD 大鼠, 试验前 12 h 禁食, 自由进水。

氯氨酮 (1 mg/kg) 麻醉, 无菌取肾, 去包膜, 将肾纵行切开, 剪刀剔除肾髓质, 制备 1 mm³ 皮质小块, 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 冲洗 3 遍, 置 80 目筛网上轻轻研磨, 100 目筛网上过滤, 收集网上物, 1000 r/min 离心 10 min, 沉淀物加 0.25% 胰酶 3 mL, 37 °C 水浴消化 20 min, 加入等量含血清 RPMI1640 终止消化, 1500 r/min 离心 10 min, 沉淀用 RPMI1640 培养液 (含 5% FCS, 并添加胰岛素 5 μ g/mL, 转铁蛋白 5 μ g/mL, 亚硒酸钠 5 ng/mL, 氢化可的松 36 ng/mL, 三碘甲腺原氨酸 4 pg/mL, 表皮生长因子 10 ng/mL) 稀释至 1 \times 10⁴/mL, 接种于培养瓶内, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞长至 80% 汇合 (5—6 d) 时用于实验。此方法分离的肾小管上皮细胞纯度 >90%^[2]。

1.3 Real-time Q-PCR 法检测细胞内 1 α 羟化酶 (CYP27B1) mRNA 表达

1.3.1 总 RNA 抽提 取 4 瓶 80% 汇合的肾小管上皮细胞, 分别接受 0 Gy、3 Gy、5 Gy 和 10 Gy ¹³⁷Cs γ 射线单次照射, 照射后 24 h, 每孔加 TRIzol 1 mL 抽提细胞总 RNA。抽提的所有用具均经焦碳酸二乙脂液 (0.1% DEPC) 处理清洁, 严格按 RNA 抽取方法操作^[3]。

1.3.2 逆转录 将上述处理好的 RNA 试管放置于

第一作者: 许莹莹, 女, 1980 年 5 月出生, 2003 年毕业于泰山医学院, 临床医学专业, 现为复旦大学放射医学研究所读研究生

通讯联系人: 金慰芳

收稿日期: 初稿 2005-07-04, 修回 2005-09-16

70 的水浴箱变性 5 min,取出后迅速置于冰盆中冰浴。按如下条件进行逆转录反应:20 μL 反应体系 (RNA 5 μL , oligo(dT)引物 2 μL , $5\times\text{RT}$ 缓冲液 4 μL , dNTP 混合液 4 μL , RNA 酶抑制剂 1 μL , MMLV 反转录酶 1 μL , ddH₂O 3 μL), 37 水浴 60min, 95 维持 5min。产物 cDNA 存放于 -20 保存备用。

1.3.3 Real-time Q-PCR 反应 将上一步骤的产物 cDNA, 在如下条件下进行扩增:25 μL 反应体系 (10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , MgCl₂ 溶液 3 μL , dNTP 混合液 3 μL , Taq 聚合酶 3units, Sybergreen 终浓度 0.25 \times , 上下游引物各 0.5 μL , cDNA 1 μL 加 ddH₂O 至 25 μL)。所用引物序列如下:

1α 羟化酶 (CYP27B1): 上游 5'-ATGGTGAA-GAATGGCAGAGG-3', 下游 5'-CATTGCCATGGT-CAAGAGTG-3', 退火温度 58, 产物 326bp。内参基因 (β -actin): 上游 5'-CCTGTACGCCAACA-CAGTGC-3' 下游 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3', 退火温度 57, 产物 211bp。

1.3.4 标准曲线的制备 PCR 扩增时, 存在一个产物的对数增长期。以循环数为横坐标, 荧光值为纵坐标, 形成一个“S”状的扩增曲线, 它与阈值相交的点所对应的循环数为临界循环数, 也称为 CT 值。用一系列已知拷贝数的模板进行扩增得到的 CT 值, 与其对应的起始拷贝数的自然对数作图, 制作标准曲线。

1.3.5 数据分析 根据标准曲线, 各样品目的基因和管家基因的浓度结果直接由仪器产生, 每个样品的目的基因浓度除以其管家基因浓度, 即可得该样品目的基因校正后的相对含量。

1.4 透射电镜

取 4 瓶 80% 汇合的肾小管上皮细胞, 分别接受 0Gy、3Gy、5Gy 和 10Gy 的 ¹³⁷Cs γ 射线单次照射, 照射后 24h, 2.5% 戊二醛原位固定, 常规电镜包埋、切片, 在透射电镜下观察细胞内线粒体的形态学改变并摄影。

1.5 统计学处理

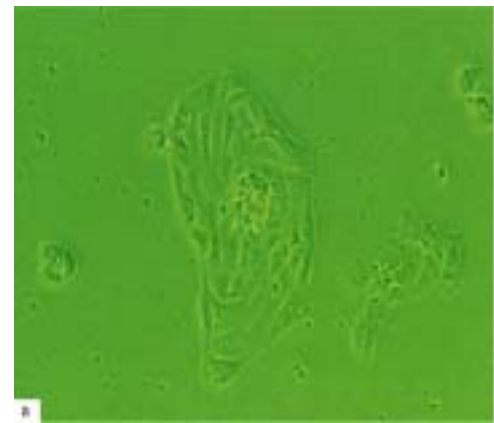
结果以 Mean \pm s 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

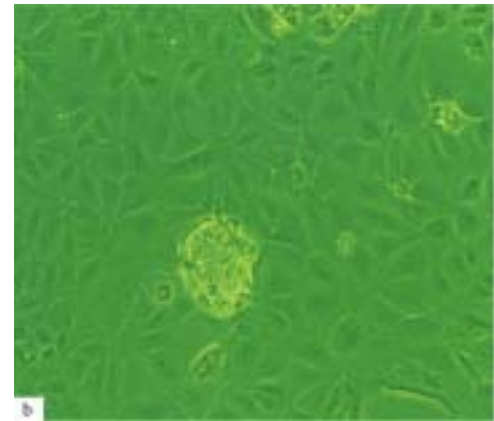
2.1 原代培养肾小管上皮细胞的形态

倒置相差显微镜下可见, 体外培养的原代肾小管上皮细胞长势良好, 第 3d 即形成明显集落, 第

5d 铺满瓶底。细胞形态以长梭形、多边形为主, 胞核大, 呈圆形, 核仁明显。(见图 1)。



a. The 3rd day of incubation, $\times 100$



b. The 5th day of incubation, $\times 100$

Fig.1 Reversed phase differential micrography of the primary renal tubular epithelial cells

2.2 电离辐射对肾小管上皮细胞 1α 羟化酶 (CYP27B1) mRNA 表达水平的影响

γ 射线照射后 24h, 肾小管上皮细胞内 1α 羟化酶 mRNA 表达水平明显下降, 且随剂量增加降幅增大。经内参校正后的结果表明, 与 0Gy 组相比, 3Gy、5Gy 和 10Gy 组 1α 羟化酶 mRNA 表达水平下降幅度分别达 32.9%、42.4% 和 66.1%。(见图 2)。

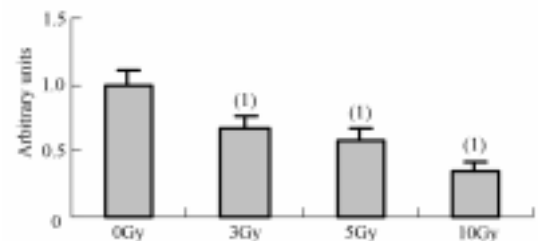


Fig.2 Expression of 1α -hydroxylase mRNA in renal tubular epithelial cells after the irradiation. After reverse transcription of total RNA, cDNA was amplified by real-time Q-PCR and detected with SYBR fluorescence chemistry. Values were normalized to β -actin expression and expressed relative to data from the control group (0 Gy). (†) $p < 0.05$, compared with the 0 Gy group

2.3 电离辐射对肾小管上皮细胞线粒体形态的影响

正常肾小管上皮细胞内线粒体丰富、嵴长而密，照射后呈现明显损伤改变，且随剂量增加病变加重。3 Gy γ 射线照射 24 h 后，偶见线粒体呈现空泡状或

S 形改变，5 Gy 时线粒体轻度肿胀、电子密度减低，细胞内可见自噬体。当剂量达 10 Gy 时，细胞损伤加重，胞内自噬体增多，线粒体明显水肿，电子密度降低，嵴稀疏、断裂且排列紊乱（见图 3）。

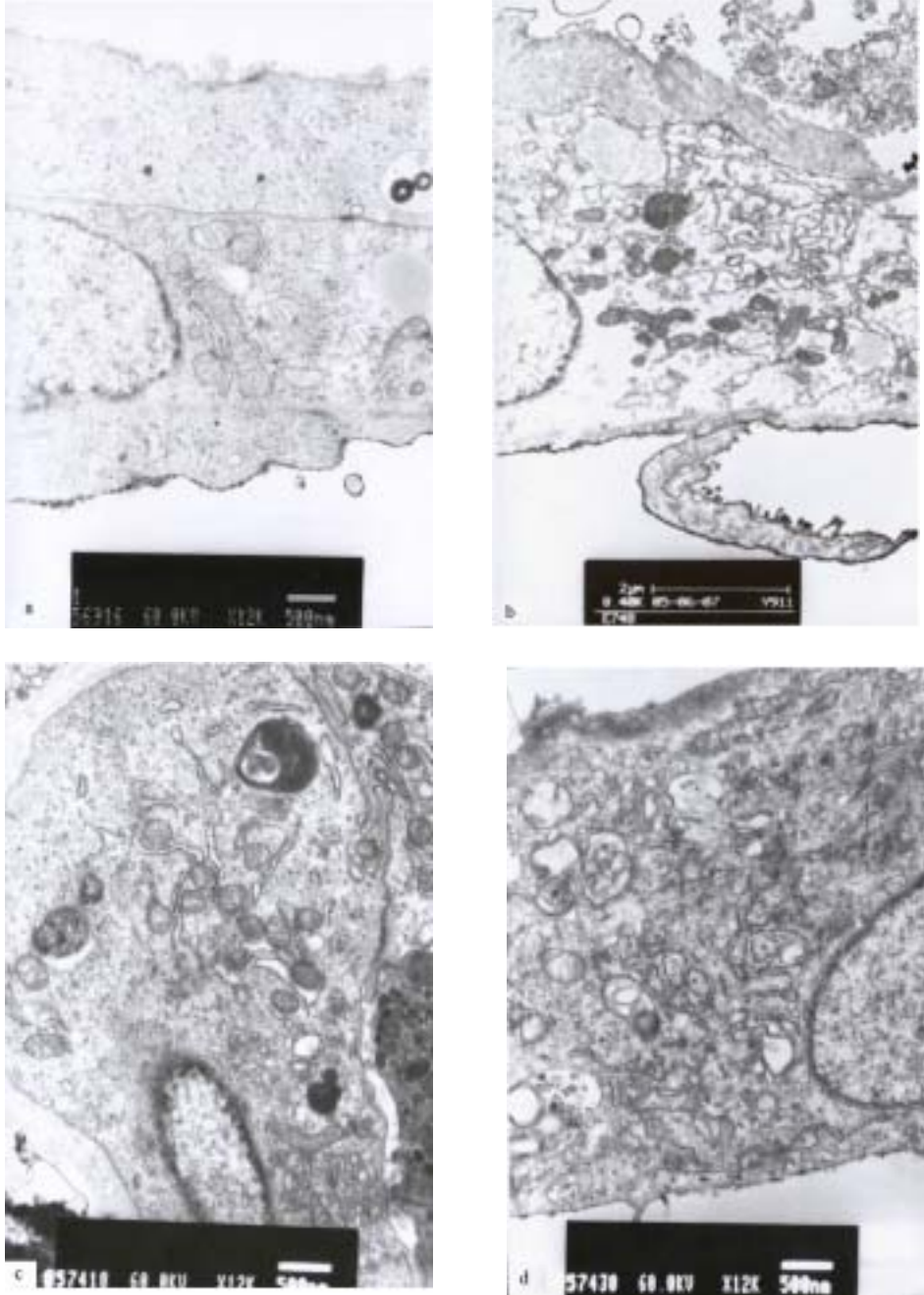


Fig.3 Mitochondria ultrastructure changes after the irradiation a. 0Gy group(Control): Plentiful mitochondria in cells with longer and denser cristae; b. Vacuolar or 'S-like' alteration in the mitochondria could be seen occasionally; c. 5Gy group: The mitochondria swelled lightly and the electron density decreased, without autophagosome in cells, too; d. 10Gy group: The mitochondria were obviously edema and arrangement of the cristae decreased, broken and disordered, with much more autophagosome in cells

3 讨论

VD_3 是骨代谢的重要调节激素之一，在维持体内钙平衡、促进骨基质矿化和调节骨转换中起重要作用。既调节破骨细胞分化发育、增强破骨细胞骨吸收活性，又可促进成骨细胞合成分泌碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, ALP）、I 型胶原（Collagen I, COL-I）、骨钙素（Bone gla protein, BGP）、转化生长因子- β （Transforming growth factor- β , TGF- β ）等骨形成因子，增加骨形成和类骨质矿化^[4-6]。 VD_3 缺乏或抵抗被认为是诱发骨质疏松症的危险因素之一，是骨质疏松症病理生理的重要机制。最近在 SAP-P/6 动物模型研究中还发现， VD_3 除调节成骨细胞和破骨细胞分化外，还可抑制骨髓基质细胞中过氧化物酶体增殖激活受体（Peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR） γ 2 分子表达，抑制其向脂肪细胞方向分化、促进向成骨细胞方向的分化，因而增加成骨前体细胞数量，进而预防骨质疏松的发生^[7,8]。

人体维生素 D 由食物中摄取（外源性）和皮肤合成（内源性）而获得，由食物吸收和皮肤光合作用转化的维生素 D 不具生物活性，须先经肝脏 25 羟化酶转化为 $25(OH)D_3$ ，然后主要在肾近曲小管上皮细胞线粒体膜内 1α 羟化酶催化下，转化为 VD_3 的主要活性形式 $1, 25(OH)_2D_3$ （D-激素）。肾小管上皮细胞线粒体在 $25(OH)D_3$ 转化为 $1, 25(OH)_2D_3$ 中起关键作用。 1α 羟化酶、25 羟化酶、连同 24 羟化酶构成体内 VD 代谢的三大主要酶，均属于细胞色素 P450（CYP）酶系，这些酶的组成与作用方式相同，电子传递链均由铁氧化还原蛋白还原酶（Ferredoxin reductase）、铁氧化还原蛋白（Ferredoxin）以及细胞色素 P450（CYP）构成，并由 CYP 决定酶的催化位点及特异性^[9-11]。其中 1α 羟化酶基础表达水平较低，且易受多种因素调节，是决定血清中 $1, 25(OH)_2D_3$ 浓度的关键酶，其活性受抑制将明显影响活性 D-激素的生成与生物学作用^[12]。

大剂量电离辐射可引起肾组织明显的病理改变和肾功能损伤，文献^[13-15]中已有不少报道。本体外实验发现，培养肾小管上皮细胞受 3 Gy γ 射线照射后 24 h，即出现细胞水肿、线粒体空泡样或 S 样改变，并随剂量增加细胞损伤加重，胞内可见自噬体，线粒体明显肿胀、基质变稀薄，电子密度降低，部分线粒体嵴断裂、减少、排列紊乱，表明肾小管上皮细胞线粒体对射线较为敏感，低剂量照射即可发生一系列病理性改变。线粒体的病理改变必将影

响表达在其膜内的 1α 羟化酶的活性，并且 Real-time Q-PCR 结果显示，射线照射后 24 h 肾小管上皮细胞 1α 羟化酶 mRNA 表达水平即明显下降，3 Gy γ 射线照射后 24 h， 1α 羟化酶 mRNA 的表达量较 0 Gy 组下降 32.9%，当照射剂量增至 10 Gy 时， 1α 羟化酶表达水平下降高达 66.1%，表明辐射导致肾小管上皮细胞线粒体明显病理改变的同时使 1α 羟化酶的活性明显下调。肾 1α 羟化酶活性下调可导致 D-激素合成障碍及对骨细胞的调控作用减弱，可能是电离辐射肾性骨损伤的病理机制之一。因此，肾的辐射防护和采取上调肾 1α 羟化酶表达与活性、提高肾合成活性 D-激素功能对防治电离辐射肾性骨损伤至关重要，目前尚未引起放射医学和临床放疗专家的重视。肾小管上皮细胞是一种具有内分泌功能的合成分泌型细胞，除合成活性型 VD_3 外，还合成分泌前列腺素、激肽释放酶以及 TGF- β 、IGF- β 、OPN 等细胞因子，这些因子是否也参与调节成骨细胞、破骨细胞功能，影响骨重建，肾辐射损伤后这些因子如何变化，以及对骨代谢有何影响，尚需进一步研究。

参考文献

- 1 高林峰, 王洪复, 徐培康, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, 21(1): 63-68
GAO Linfeng, WANG Hongfu, XU Peikang, et al. J Radiat Res Radiat Process, 2003, 21(1): 63-68
- 2 喻陆, 廖立生. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1995, 16(6): 257-259
YU Lu, LIAO Lisheng. Clin Biochem Labo Med, Foreign Med Sci, 1995, 16(6): 257-259
- 3 武泽, 任平, 周蓉, 等. 中国计划生育学杂志 2005, 13(2): 104-106
WU Zhe, REN Ping, ZHOU Rong, et al. Chin J Family Plann, 2005, 13(2): 104-106
- 4 Municio M J, Traba M L. J Phys Biochem, 2004, 60(3): 219-224
- 5 Goltzman D, Miao D, Panda D K, et al. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 89-90(1-5): 485-489
- 6 Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, et al. Osteoporos Int, 1998, 8 (Suppl) 2: S13-19
- 7 Duque G, Macoritto M, Dion N, et al. Am J Phys Endocrinol Metab, 2005, 288(4): E723-730
- 8 Duque G, Macoritto M, Kremer R. Exp Gerontol, 2004, 39(3): 333-338
- 9 Omdahl J L, Morris H A, May B K. Annu Rev Nutr, 2002, 22(1): 139-166

- 10 Prosser D E, Jones G. Trends Biochem Sci, 2004, **29**(12): 664-673
- 11 Sakaki T, Kagawa N, Yamamoto K, *et al.* Front Biosci, 2005, **10**(1): 119-134
- 12 Fu G K, Lin D, Zhang M Y, *et al.* Mol Endocrinol, 1997, **11**(13): 1961-1970
- 13 Robbins M E, Bonsib S M, Soranson J A, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, **32**(4): 1071-1081
- 14 Gobe G, Schoch E, Leighton J. Kidney Int. 1999, **56**(4): 1305-1309
- 15 高林峰, 王洪复, 朱飞鹏. 中华放射医学与防护杂志, 2004, **24**(5): 430-432
- GAO Linfeng, WANG Hongfu, ZHU Feipeng. Chin J Radiol Med Prot, 2004, **24**(5): 430-432

Effects of ionizing radiation on the expression of 1α -hydroxylase in renal tubular epithelial cells

XU Yingying JIN Weifang WANG Hongfu

(Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032)

ABSTRACT The work was to study *in vitro* the effects of ionizing radiations on the expression of 1α -hydroxylase in renal tubular epithelial cells, which were exposed to 3 Gy, 5 Gy and 10 Gy by ^{137}Cs γ -rays. By using Real-time Q-PCR technology and transmission electron microscopy (TEM), changes in the 1α -hydroxylase mRNA level and the mitochondria ultrastructure after the irradiation were compared with the control (0 Gy) group. An obvious decrease in the 1α -hydroxylase mRNA expression was found after the 3 Gy irradiation, and the decreasing rate increased with the irradiation dose. The TEM results also showed that with the irradiated cells the mitochondria swelled obviously, the electron density decreased, and the cristae arrangement broke and disordered.

KEYWORDS Ionizing radiation, Renal tubular epithelial cells, 1α Hydroxylase, Vitamin D_3

CLC R818.74, R361.3, R331, R811.5