

致死剂量辐射诱导小鼠骨髓细胞 凋亡特征的研究

彭瑞云 王德文 熊呈琦 高亚兵 汪宝珍 李延平 杨 红 崔玉芳

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 经 ^{60}Co γ 射线以不同剂量全身照射 213 只 LACA 小鼠, 于照射后 4 周内分批活杀, 将骨髓标本分别进行 H.E 染色、半薄及超薄切片, 并通过原位末端标记和 DNA 凝胶电泳观察其生化特征。结果表明: 照射后 6h, 各剂量组小鼠骨髓造血细胞出现凋亡明显增多, 且照射剂量越大, 凋亡细胞越多。凋亡的细胞形态上表现为染色质浓缩、边移, 呈半月型、环状或不规则状, 核碎片及凋亡小体形成, 电泳下可见 DNA 梯状图谱。在 2.5~7.0Gy 照射范围内, 凋亡是辐射诱导造血细胞死亡的主要方式。

关键词 骨髓, 辐射, 凋亡, 原位末端标记, DNA 凝胶电泳

骨髓是辐射高度敏感的组织, 一旦引起骨髓辐射损伤, 往往引起贫血、出血和感染而危及生命。因此, 自从伦琴射线被发现以来, 已有大量的研究资料说明骨髓的辐射损伤效应, 然迄今辐射诱导的骨髓细胞凋亡的特征研究并不多见, 尤其是在原位研究更未见报道。本文采用光镜、电镜、原位末端标记和 DNA 凝胶电泳等手段, 研究 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后小鼠骨髓造血细胞凋亡的特征及意义, 为其进一步诊断和防治提供理论基础。

1 材料与 方法

1.1 实验动物分组与照射方法

LACA 小鼠 213 只, 体重 16~20g, 随机分为对照组 (23 只) 和 2.5(48 只)、4.0(48 只)、5.5(46 只)、7.0(49 只)Gy 组, 动物采用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次照射, 剂量率为 $1.35 \times 10^{-2} \text{C} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2 病理检查

动物于照射后 6h~28d 分批活杀, 取腰段脊柱骨髓入 Helly's 液固定, 石蜡包埋制片, H.E 染色, 光镜观察。

1.3 电镜标本

将上述各时间点活杀动物的右股骨骨髓入 3% 戊二醛及 1% 锇酸固定, 乙醇丙酮逐级脱水, 环氧树脂 812 包埋, 制作 $0.5\mu\text{m}$ 半薄切片, H.E 染色, 光镜观察并定位后制作 20 nm 超薄切片^[1], 硝酸铅和醋酸铀双染, 电镜观察。

1.4 原位末端标记

1.4.1 试剂 细胞凋亡检测试剂盒 (含标记缓冲液, TdT, Bio-dUTP, 封闭液等), 购自华美生物

全军医药卫生科研青年基金和国家博士学位论文经费资助

收稿日期: 初稿 1999-01-20, 修回 1999-03-31

公司;碱性磷酸酶标记的抗生蛋白链菌素 (AP-SA), 美国 Zymed 公司产品; 坚固红及缓冲液, 购自本院生物制剂发展中心。

1.4.2 实验步骤 参考 Gavrieli 等^[2]的方法并进行改进。简言之, 切片或涂片水化后入蛋白酶 K 消化, 充分水洗后, 滴加 Bio-dUTP 和 TdT, 于 37 °C 标记 1h; 加封闭液封闭 10min 后用 AP-SA(1:1000) 和坚固红显色, 苏木素复染核, 甘油明胶封片。

1.5 骨髓有核细胞 DNA 提取和凝胶电泳

参考 Radford 等^[3]方法进行并加以改进。将冻存骨髓细胞离心去红细胞后加细胞裂解液 (10mmol/L Tris-HCl pH7.4, 10mmol/L EDTA pH8.0, 1%SDS, 150mmol/L NaCl, 250 μ g/mL 蛋白酶 K), 55 °C 水浴轻摇 3h, 等体积酚和氯仿抽提 2 次, 加 2.5 倍体积乙醇及 0.2mol/L NaCl 沉淀 DNA, 75% 乙醇洗后加 50 μ g/mL RNase A 的 TE buffer(10mmol/L Tris, 10mmol/L EDTA, pH7.5) 溶解。取 2 μ g DNA 入 25mL 1.5% 琼脂糖 (溶于 TBE buffer), 含 0.5 μ g/mL EB 下电泳 90min, Marker 为 Hind III /EcoR I λ DNA。

1.6 定量方法和统计学处理

在骨髓半薄切片上, 采用英国剑桥公司生产的 Cambridge Quantimet 970 型图像分析仪, 在 10 $\times$ 40 光镜视野下, 对凋亡细胞的数密度 (凋亡的骨髓细胞的数量 / 视野面积) 和面密度 (凋亡的骨髓细胞的面积 / 视野面积) 进行检测。采用 *t* 检验。

2 实验结果

2.1 骨髓组织学变化

正常小鼠骨髓造血细胞丰富, 增殖活跃。各剂量组动物骨髓均出现明显损伤及损伤后重建现象, 且在 2.5~7.0Gy 剂量范围内, 剂量越大, 损伤越重, 出现时间越早且恢复越慢。其主要病理改变为造血细胞发生凋亡, 数目减少; 血管扩张、充血及出血, 并见骨髓造血细胞再生及恢复。

2.2 超微结构改变及定量分析

各照射组动物在照射后 6h, 骨髓中凋亡的造血细胞均明显增多, 且照射剂量越大, 凋亡的细胞越多。凋亡的细胞形态多样, 将其过程分为早期、中期及晚期 3 个阶段: 早期见核染色质浓缩、聚集, 在核内形成不规则的染色质团块, 并聚集在核膜下, 呈环状、半月形、条索状, 多数呈不规则状; 中期见进一步浓缩聚集的染色质团块, 大小不一, 多呈圆形或椭圆形, 周围有核膜包绕; 晚期见核碎片被细胞膜性结构包绕, 连同局部细胞器一起形成凋亡小体。凋亡小体圆形或椭圆形, 大小不一, 可游离于细胞之间, 亦可被邻近细胞吞噬。照射后 1d, 各剂量组动物骨髓中凋亡的造血细胞明显较照射后 6h 为少, 但仍较正常为多。照射 3d 后基本不见凋亡的造血细胞。由上述病理改变可见, 各组动物在照射后 6h, 骨髓造血细胞均发生明显凋亡。为定量地说明辐射诱导各组动物骨髓中造血细胞凋亡的改变及其与剂量之间的关系, 我们对凋亡细胞的数密度 (反应凋亡细胞数的多少) 及面密度 (反应凋亡细胞面积的大小) 进行了测定, 结果见表 1。

Tab.1 Quantitative results for apoptosis of hemopoietic cells in mouse bone marrow

(6h after radiation) ($\bar{x} \pm s$)

Radiation dose/Gy	Number density/ $\times 10^2 \text{mm}^{-2}$	Area density/ %
0	1.54 ± 0.59	2.16 ± 0.94
2.5	$11.74 \pm 2.91^{(1)}$	$9.76 \pm 1.36^{(1)}$
4.0	$18.82 \pm 5.32^{(1)}$	$12.60 \pm 1.24^{(1)}$
5.5	$27.44 \pm 11.40^{(1)}$	$15.60 \pm 2.45^{(1)}$
7.0	$57.72 \pm 14.98^{(1)}$	$25.04 \pm 7.15^{(1)}$

⁽¹⁾ $p < 0.01$

2.3 原位末端标记检测凋亡细胞结果

正常小鼠骨髓造血细胞中凋亡细胞偶见,核为红色。各剂量组小鼠骨髓在照射后 6h,胞核红色的造血细胞明显增多,呈散在或小局灶状分布(见图 1),且核红染的造血细胞呈剂量相关性,即剂量越大,核红染的造血细胞越多。5.5Gy 照射后 1d,核红染的细胞仍可见到。但与照射后 6h 比,其数目明显减少。照射后 10~15d,骨髓造血细胞处于恢复较早期,未见有核红染的造血细胞。

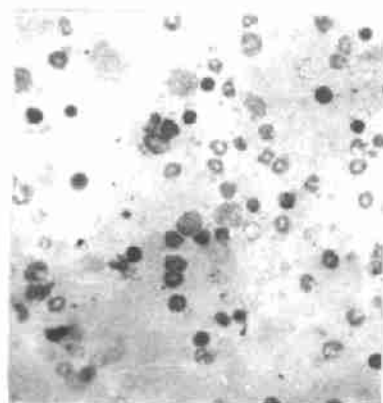


Fig.1 Mouse bone marrow at 6h after 5.5Gy irradiation

Apoptotic cells obviously increased. In situ terminal labeling $\times 400$

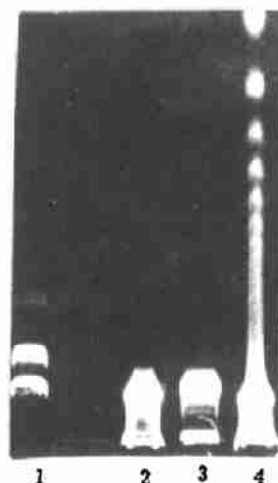


Fig.2 DNA on a 1.5% agarose gel electrophoresis for bone marrow cells

1. DNA marker, 2 and 3. controls, 4. DNA ladder formation in 5.5Gy group at 6 h after radiation

2.4 DNA 凝胶电泳

Marker (Hind III + EcoR I λ DNA) 在 1.5% 的琼脂糖中电泳可见 10 条带,其分子量分别为: 947、1375、1584、1904、2027、3530、4268、4973、5148、21227。正常小鼠骨髓 DNA 见基因组 DNA 大片段,未见有梯状片段形成。5.5Gy 照射后 6h,小鼠骨髓细胞 DNA 电泳见 DNA 梯 (Ladder) 形成(见图 2)。

3 讨 论

细胞凋亡是细胞死亡的一种形式,是基因控制下的细胞自杀活动。在此过程中,有基因转录和蛋白质合成,是机体对外界刺激进行主动应答的过程。它可见于胚胎发育、正常组织代谢及某些病理情况。如物理、化学、生物等因素均可导致细胞凋亡发生^[4]。

凋亡作为细胞死亡的一种方式,与细胞死亡的另一种方式即坏死在许多方面有本质的不同,就形态方面而言:凋亡主要是细胞核的改变,表现为核染色质浓缩、边移、呈半月型、环形等,进一步发展可见核碎裂、凋亡小体形成,而坏死则是细胞膜通透性发生改变引起的细胞肿胀,细胞器及核溶解^[5]。细胞凋亡的重要生化特征为细胞核内 DNA 降解, DNA 片段形成^[6],并可通过琼脂糖凝胶电泳、原位末端标记法、流式细胞仪等手段检出,且细胞发生凋亡时,有 RNA 转录和新的蛋白合成,而坏死细胞则无。

Kerr 等^[7]首次命名了细胞凋亡的概念,但当时并未引起人们的重视。近 20 年,尤其是近 5 年来,对细胞凋亡出现新的研究热点,以期能诱导或控制细胞凋亡,使人们延年益寿或达到治疗疾病的目的。已有学者报道,辐射可导致细胞凋亡,由于骨髓是辐射高度敏感的组织,对其造血细胞的研究亦有一些报道^[3],但大都采用细胞培养技术或将骨髓细胞制成单细胞悬液后涂片等进行观察。至今,在国内外同类文献中,尚未见将骨髓组织制成切片原位观察辐射后造血细胞凋亡的变化规律,其定量研究更未见报道。

我们采用骨髓组织半薄切片、超薄切片、原位末端标记技术、琼脂糖凝胶电泳及图像分析定量技术,从形态及生化特征上证实了一定剂量(2.5~7.0Gy) γ 射线照射后诱导骨髓造血细胞凋亡的变化,定量说明了辐射诱导骨髓造血细胞凋亡的过程及与剂量之间的关系,并将细胞凋亡的过程分为早期、中期及晚期 3 个阶段,描述了其形态特征。由此认为:辐射对骨髓造血细胞的损伤,其效应靶主要为细胞核,引起造血细胞凋亡。

关于辐射介导骨髓造血细胞凋亡机制,目前尚未完全阐明。一般认为,辐射可引起效应细胞的内源性核酸酶激活。该酶激活,可将 DNA 在核小体连接部剪切,结果形成特征性片段,琼脂糖凝胶电泳时游动最快的一条区带约 180bp^[8],相当于一个核小体中 DNA 的长度,而后的区带依次为此值的整倍数。当 DNA 被切割断裂后,细胞核染色质浓缩、聚集和边移,核碎裂成大小不等的碎片,细胞凋亡,其中有许多基因参与,其详尽机制正在研究之中。

参 考 文 献

- 1 上海第一医学院病理解剖教研室. 病理检验技术. 上海:上海科学技术出版社, 1978
- 2 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-sasson S A. J Cell Biol, 1992, 19(3):493~497
- 3 Radford I R, Murphy T K, Radley J M *et al.* Int J Radiat Biol, 1994, 65(2):217~223
- 4 Majno G and Joris I. Am J Pathol, 1995, 146:3~10
- 5 Farber E. Mod Pathol, 1994, 7:605~609
- 6 Collins R J, Harmon B V, Gobe G C *et al.* Int J Radiat Biol, 1992; 61:451~454
- 7 Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Br J Cancer, 1972; 26:239~244
- 8 Arend M J, Morris R G, Wyllie A H. Am J Pathol, 1990; 136:593~597

STUDIES ON THE CHARACTERISTICS AND SIGNIFICANCE OF HEMATOPOIETIC CELLS APOPTOSIS IN IRRADIATION MOUSE BONE MARROW

PENG Ruiyun WANG Dewen XIONG Chengqi GAO Yabing WANG Baozhen

LI Yanping YANG Hong CUI Yufang

(*Beijing Institute of Radiation Medicine Beijing 100850*)

ABSTRACT 213 LACA mice were irradiated respectively with dose of 2.5, 4.0, 5.5 and 7.0 Gy γ -rays and sacrificed within 4 weeks after radiation. By means of light and electron microscopy, in situ terminal labeling and biochemical analysis apoptotic hematopoietic cells apoptosis were investigated in irradiated mouse bone marrow. The results showed: Much more apoptotic cells were found in each irradiated group bone marrow at 6 h after radiation. Furthermore, the higher radiation dose was, the more apoptotic cells were. The characteristics of apoptotic cells were the chromatin condensation and margination, just as half-moon, ring-like or irregular shapes. The nucleus may be break up and became apoptotic bodies. There was DNA degradation of apoptotic cells detected by in situ terminal labeling and DNA ladder formation in agarose gel electrophoresis. Conclusion: At the range of 2.5 to 7.0Gy irradiation, apoptosis is the main pathway for radiation-induced hematopoietic cells death.

KEYWORDS Bone marrow, Radiation, Apoptosis, In situ terminal labeling, DNA agarose gel electrophoresis