

电离辐射对小鼠骨髓造血细胞 周期进程的影响 *

马淑梅 付士波 鞠桂芝

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用流式细胞术 (FCM) 观察了 X 射线全身照射后小鼠骨髓造血细胞周期进程的时程变化和剂量效应关系, 为探讨电离辐射对小鼠骨髓细胞周期进程的影响。结果显示, 2Gy X 射线全身照射后 12h 骨髓细胞出现 G_1 期细胞百分数升高 ($p < 0.05$), 4h S 期细胞百分数下降 ($p < 0.05$), G_2+M 期细胞百分数于照后 4h 和 12h 升高 ($p < 0.05$)。量效研究显示, 0.5~6Gy 照射后 12h G_1 期细胞百分数高于对照组, 其中 1、2、4、6Gy 照射组有统计学差异 ($p < 0.05 \sim p < 0.01$), S 期细胞百分数呈剂量依赖性下降 ($p < 0.01 \sim p < 0.001$), G_2+M 细胞百分数呈剂量依赖性增加 ($p < 0.05 \sim p < 0.001$)。提示 2Gy X 射线全身照射后可诱导造血细胞出现 G_1 、 G_2 期阻滞, 抑制 DNA 合成, 并且这些变化在 0.5~6Gy 范围内呈剂量依赖性关系。

关键词 电离辐射, 细胞周期, 骨髓造血细胞

中图分类号 R811, R332.2, R329.2⁺⁸

造血系统的辐射效应在电离辐射损伤中具有重要的意义, 文献 [1] 对骨髓辐射损伤后的病理改变已有诸多描述, 但尚未见到辐射诱导骨髓造血细胞周期进程改变的报道。本实验通过观察 X 射线全身照射后, 小鼠骨髓造血细胞周期进程的时程和量效变化, 从细胞水平进一步探讨电离辐射影响细胞周期进程的基本规律, 并将为设计合理的肿瘤治疗方案提供实验依据。

1 材 料 和 方 法

1.1 动物和分组

雄性健康昆明小鼠, 体重 $20 \pm 2g$, 购自白求恩医科大学实验动物学部, 随机分组后进行假照射 (对照) 和照射。作时程研究时, 照射组于 2Gy 照射后 2、4、8、12、24、48、72h 断头处死小鼠; 作量效研究时, 分别给予 0.5、1、2、4、6Gy 照射后 12h 断头处死小鼠, 取 3 只动物的股骨制备一份细胞悬液样品, 每组 5 个样品。

1.2 照射条件

用 Philips X 射线深部治疗机进行全身照射, 电压 200kV, 电流 10mA, 过滤板为 0.5mm Cu 和 1.0mm Al。靶皮距 212cm, 剂量率 0.287Gy/min, 剂量分别为 0.5、1、2、4、6Gy。

1.3 细胞周期检测

采用美国 (Becton-Dickinson) 公司生产的 FACSscan 流式细胞仪, 调细胞浓度 $1 \times 10^7/mL$,

* 国家自然科学基金资助 (39770193)

收稿日期: 初稿 1999-09-07, 修回 1999-10-26

每份样品取细胞悬液 100μL(1×10⁶ 细胞), PBS 洗涤 2 次, 加入 RNase (0.1mg/mL)100μL, 37℃ 反应 30min, PBS 洗 2 次, 加 PI(0.05mg/mL 含 0.03% Triton X-100)0.5mL, 4℃ 避光反应 30min, 进行 FCM 检测。细胞周期变化数据用 Cellfit 软件分析。

1.4 统计分析

实验结果采用两两比较 Student's *t* 检验。

2 结 果

2.1 2Gy X 射线全身照射后小鼠骨髓造血细胞周期进程的时程变化

由表 1 可见, 2Gy X 射线照射后 G₁ 期细胞百分数在 12h 明显增高 (*p* < 0.05), S 期细胞百分数在 4h 明显降低 (*p* < 0.05), G₂+M 期细胞百分数在 4h 和 12h 明显增多 (*p* < 0.05), 其余各时间点与对照组相比未见显著差异。

Tab.1 Changes in cell cycle of hemopoietic cell at different time intervals
after whole-body irradiation with 2Gy X-rays in mice

Time after irradiation/h	G ₀ /G ₁ /%	S/%	G ₂ +M/%
Sham-irradiation	61.64±2.76	33.52±2.99	4.84±0.50
2	57.56±6.93	37.68±6.28	4.78±0.96
4	57.38±6.78	28.90±3.94 ⁽¹⁾	5.80±0.72 ⁽¹⁾
8	63.36±4.58	31.34±3.72	5.28±1.08
12	65.12±1.72 ⁽¹⁾	29.16±1.32	5.72±0.61 ⁽¹⁾
24	63.36±2.96	32.22±3.29	4.42±0.68
48	61.18±3.29	34.98±3.39	3.82±0.36
72	47.80±4.32	48.26±5.04	3.92±0.82

$\bar{x} \pm s$, *n* = 5, ⁽¹⁾*p* < 0.05 vs Sham-irradiation

2.2 不同剂量 X 射线全身照射后小鼠骨髓造血细胞周期变化的剂量效应关系

由表 2 可见, 0.5~6.0Gy X 射线照射后 12h, G₁ 期细胞百分数均有增加, 1.0~6.0Gy 有统计学意义 (*p* < 0.05 ~ *p* < 0.01), S 期细胞百分数随剂量增加显著降低 (*p* < 0.01 ~ *p* < 0.001), 并且 4Gy 与 0.5Gy, 6Gy 与 0.5、1Gy 相比也有统计学差异, 而 G₂+M 期细胞百分数随剂量增加而明显增高 (*p* < 0.01 ~ *p* < 0.001), 且 4Gy 与 0.5、1、2Gy, 6Gy 与 0.5、1、2Gy 相比也有显著性差异。

Tab.2 Dose effects of cell cycle of hemopoietic cell 12h after whole-body
irradiation with different dose X-rays in mice

Dose/Gy	G ₀ /G ₁ /%	S/%	G ₂ +M/%
Sham-irradiation	61.04±3.70	34.82±3.77	4.14±0.47
0.5	65.14±4.61	29.46±4.85	5.40±0.95 ⁽¹⁾
1	67.16±3.82 ⁽¹⁾	27.20±3.26 ⁽²⁾	5.62±0.90 ⁽¹⁾
2	69.04±4.89 ⁽¹⁾	25.14±4.58 ⁽²⁾	5.80±0.54 ⁽³⁾
4	66.06±1.51 ⁽¹⁾	21.10±3.73 ^(3,5)	12.84±3.50 ^(3,1)
6	68.96±2.45 ⁽²⁾	21.74±2.59 ^(3,6)	9.30±0.91 ^(3,1)

$\bar{x} \pm s$, *n*=5, ⁽¹⁾*p* < 0.05 ⁽²⁾*p* < 0.01 ⁽³⁾*p* < 0.001 vs Sham-irradiation ⁽⁴⁾*p* < 0.01 vs 0.5 1. 2Gy Group ⁽⁵⁾*p* < 0.05 vs 0.5Gy Group ⁽⁶⁾*p* < 0.05 vs 0.5, 1Gy Groups

3 讨 论

造血系统对辐射非常敏感,在机体受照射早期即可累积损伤,X射线所致造血功能障碍是由于造血干细胞增殖能力的抑制或丧失,而且造血功能障碍贯穿于放射损伤的始终,具有明显的时相性^[1]。因此电离辐射对造血系统的作用一直为广大学者所关注,而文献[2~5]对骨髓辐射损伤的病理改变描述较多,对电离辐射影响造血细胞周期的报道较少,并且多局限于对离体细胞周期进程的研究。本实验采用流式细胞术,从整体水平探讨了电离辐射对造血细胞周期进程影响的时程量效变化,以期进一步揭示造血细胞辐射损伤规律。

本实验首先研究了 2Gy X 射线全身照射后小鼠骨髓细胞周期进程的时程变化,结果发现,2Gy 照射后 4h 开始出现 G₂ 期阻滞,12h 出现 G₁、G₂ 期阻滞,S 期细胞百分数于 4h 下降。同时进行了量效研究,结果发现,0.5~6.0Gy 照射后 12h 出现 G₁、G₂ 期阻滞和 S 期的 DNA 合成能力抑制,呈明显的剂量依赖关系;组间比较中 4、6Gy 与 0.5、1、2Gy 的 S 期细胞和 G₂+M 期细胞差异显著,故高剂量范围内以 G₂ 期阻滞为主。这与 Kastan^[5] 报道的体外培养的细胞的周期变化相一致。已有资料表明,辐射诱导 G₁ 期阻滞的位置在 G₁ 期末,即超过这一限制点的细胞将继续进入 S 期^[3],在 DNA 损伤时,处于 S 期的细胞可继续进入 G₂/M 期,而 G₁ 期细胞不能进入 S 期,因为 S 期细胞在进入下一个 G₁ 期前已超过 p53 负调控生长的检查点^[5],S 期细胞百分数的降低可能是由于细胞被阻滞于 G₁、G₂ 期。多数学者认为 G₁ 期阻滞是机体对外界刺激的一种保护性反应,可提供充足的时间来促使受损伤 DNA 得以修复,损伤严重者通过 G₁ 期永久性阻滞或凋亡而清除有损伤 DNA 的细胞,从而降低了基因组的不稳定性,减少肿瘤的发生。同样全身或体外照射时,当剂量达 2Gy 以上时即可出现明显的 G₂ 期阻滞,照射后细胞周期进程停滞于 G₂ 时相,不进行分裂,因此 G₂ 相细胞堆积,经过一定时间后大量细胞同时进入下一个细胞周期,它可在 G₂ 期的多阶段保证受损的 DNA 得到修复的机会,而未修复的细胞则失去活力而被清除。总之,0.5~6Gy X 射线全身照射后小鼠骨髓造血细胞出现明显的剂量依赖性的 G₁、G₂ 阻滞,S 期合成能力降低,这是机体对外界刺激的一种保护性反应,可提供充足的时间清除有损伤 DNA 的细胞来保持基因组的稳定性,从而减少随后的致癌几率。另外,通过对整体条件下骨髓造血细胞辐射效应规律的揭示,为辐射损伤的防护及肿瘤的防治提供理论基础。

参 考 文 献

- 1 Liu S Z. Radiobiology (in Chinese). Beijing: Atomic Energy Press, 1998, 180~199
- 2 Kuerbitze S J, Puinkett B S, Walsh W V *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89:7491-7495
- 3 Gadbois D M, Crissman H A, Nastasi A *et al.* Radiat Res, 1996, 146:414-424
- 4 Lowe S W, Schmitt E M, Smith S W *et al.* Nature, 1993, 362:847-849
- 5 Kastan M B, Onyekwere O, Sidransky D *et al.* Cancer Res. 1991, 51:6304-6311

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON THE CELL CYCLE PROGRESSION OF BONE MARROW HEMATOPOITIC CELLS IN MICE

MA Shumei FU Shibo JU Guizhi

(The MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences,
Changchun 130021)

ABSTRACT The changes of cell cycle progression in mice bone marrow hemopoietic cell and the dose-effect relationship after X-ray whole body irradiation (WBI) were studied by flow cytometry (FCM). The data showed the elevation of the percentage of cells in G_1 phase 12h after irradiation ($p < 0.05$), the decrease of cells in S phase 4h ($p < 0.05$) and the increase of cells in G_2+M phase 4h and 12h after 2.0Gy WBI. 12h after 0.5~6.0Gy irradiation the percentage of cells in G_1 phase became higher than that of sham-irradiation, especially in 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0Gy groups ($p < 0.05 \sim p < 0.01$), both the decrease of S phase percentage ($p < 0.05 \sim p < 0.01$) and the increase of G_2+M phase ($p < 0.05 \sim P < 0.001$) were in a dose-dependent manner. Our results suggested that 2.0Gy X-ray WBI to mice might induce the arrest in G_1 and G_2 phase and the suppression of DNA synthesis, these changes were all in dose-dependent manner within 0.5~6.0 Gy.

KEYWORDS Ionizing irradiation, Cell cycle, Bone marrow hemopoietic cells

CLC R811, R332.2, R329.2+8