

• 研究简报 •

# GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞的 增殖及细胞周期的影响

郭德煌 董 波 文耕云 罗庆良 毛秉智

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

**摘要** 以临床上常用的细胞因子 GM-CSF 刺激受辐射的人髓性白血病细胞株 KG-1, 观察细胞的增殖情况及周期变化。结果显示: GM-CSF 刺激受辐射 KG-1 细胞的增殖, 并且能促进细胞跳出  $G_0/G_1$  阻滞, 对 S 期似有促进作用及增加  $G_2/M$  期。对未受照射的 KG-1 细胞, GM-CSF 刺激效应不如受照射细胞。

**关键词** 辐射, KG-1, GM-CSF, 细胞周期

**中图分类号** Q691.5, Q253

急性放射病和核事故病人的救护及放射治疗后对正常组织的防护是放射医学和放射生物学的重要研究内容。机体受到辐射后一个明显的变化是造血细胞的凋亡和坏死, 正确地运用细胞因子挽救造血细胞的凋亡就意味着挽救机体的生命。细胞受到辐射后, 对细胞因子的反应性显著降低<sup>[1]</sup>, 不同的细胞对细胞因子的应答千差万别, 并且同一细胞因子对不同细胞亦有不同效应, 如 IL-6 能促进肝细胞的增殖, 但却抑制某些骨髓瘤细胞的增殖<sup>[2]</sup>, 即便是同一细胞因子和同一细胞株, 因作用时相的不同还会得出截然不同的结果, 体现出细胞因子运用的时控性。细胞因子的效应除体现在细胞学方面的改变外, 亦对细胞周期有影响。特别是当细胞处于外界因素如辐射的作用导致细胞周期阻滞时, 更能显示出细胞因子的效应。本实验选择了临床上最常用的细胞因子粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 细胞系则选 KG-1 粒系母细胞, 与其它常见肿瘤细胞系最大的不同在于 KG-1 是 P53 野生型, 与 CD34<sup>+</sup> 及其它正常细胞类似。阐明 GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞的生物学效应, 除了揭示细胞因子对受辐射细胞的作用机理外, 也对细胞因子的临床运用具有指导作用。

## 1 材 料 与 方 法

### 1.1 细胞

KG-1 为粒系母细胞, P53 野生型, GM-CSF 非依赖株。

### 1.2 主要试剂

GM-CSF, 由瑞士 SANDOZ 公司生产。1640 培养基, 为美国 Gibco 公司产品。小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所生产。噻唑兰(MTT), FLUCK 公司生产。碘化丙啶(PI), Sigma 公司生产, 配法如下: PI10mg, Triton-100 1mL, 生理盐水 99mL。RNA 酶 A, Sigma 生产, 配成 1mg/mL 的水溶液。

### 1.3 主要仪器

酶联仪, 芬兰产 Flow Titertek, MKII 型。流式细胞仪, FACSCalibur 型, 美国 BD 公司生产。

收稿日期: 初稿 1999-07-03, 修回 1999-10-05

## 1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 细胞培养于 50mL 培养瓶, 用含 15% 小牛血清的 1640 培养液, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度为 100% 的条件下常规培养, 细胞长至指数生长期时离心收集细胞。

1.4.2 照射 KG-1 细胞用 <sup>60</sup>Co γ 射线照射, 照射剂量分别为 4、8、12Gy, 照射剂量率为 1.32Gy/min。

1.4.3 MTT 比色法测定细胞增殖 将 MTT 用生理盐水配成 5mg/mL。用含 15% 小牛血清的培养液稀释已离心洗涤的细胞, 调整细胞浓度为  $2 \times 10^5$ /mL。在 96 孔板上, 每孔加细胞 100μL, 另加 100μL 用培养液配好的倍比稀释的 GM-CSF 100μL, 分别培养 24、48、72h, 加入 2μL MTT, 4h 后进行离心, 弃上清, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 100μL, 振荡 10min, 测 OD 492nm 值。

1.4.4 流式细胞仪检测细胞周期 取指数生长期细胞  $10^6$ , 离心, 分成照射组 and 对照组, 每一组又分成加 GM-CSF 组和不加 GM-CSF 组。GM-CSF 的刺激浓度为 200ng/mL, 照射剂量分别为 4、8、12Gy。检测时相分别为照射后或加 GM-CSF 后 6、12、24、36、48h。细胞经 PBS 洗两遍, 70% 乙醇固定过夜, 离心吸净乙醇, PBS 洗一遍, 加 RNase A 200μL 混匀, 37℃ 孵育 30min, 加 PI 溶液 800μL 混匀, 4℃ 避光保存 30min, 上机检测。

## 2 结果

### 2.1 GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞的增殖作用

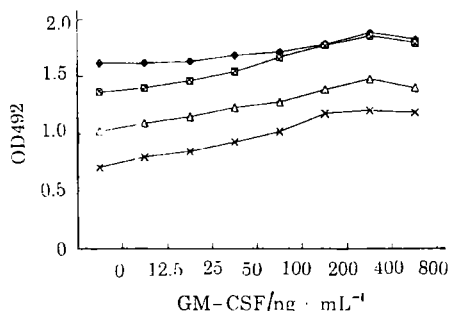


Fig.1 Effects on cell proliferation of irradiated KG-1 cells stimulated by GM-CSF

● 0 Gy, □ 4 Gy, △ 8 Gy, × 12 Gy

而有所下降的趋势。对照组曲线变化较平稳, 对 GM-CSF 反应不如实验组, 仅在 400ng/mL 处与前一浓度比较有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

### 2.2 GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞周期的影响

KG-1 细胞经 8Gy 照射后, 分成对照组与实验组, 实验组加入终浓度为 200ng/mL 的 GM-CSF, 分别培养 6、12、24、36h, 流式细胞仪检测细胞周期, 结果见图 2 和图 3。

图 2 表示受辐射 KG-1 细胞随着照射后时间的延长逐渐跳出 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 周期阻滞, 处理组加了 GM-CSF 比对照组更早跳出周期阻滞, 在照射后的 24h 有显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 在照射后 36h, GM-CSF 的作用更加明显, 与对照组同时相比,  $p < 0.01$ 。图 3 示意 GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞 S 期的影响。由图可见, 尽管处理组与对照组同一时相比无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 但从自身对照来看, 对照组 S 期各时相点之间仅在 36h 与 24h 之间有显著性差异 ( $p < 0.05$ ),

将 KG-1 细胞调整浓度为  $2 \times 10^5$ /mL, 分别照射 0、4、8 和 12Gy。照射后把细胞加到 96 孔板, 分别以不同浓度的 GM-CSF 进行刺激, 48h 后用 MTT 法测细胞的 OD 值, 观察细胞因子对受辐射细胞增殖的作用, 结果见图 1。

从图 1 中可看出, 随着 γ 射线照射剂量的增大, 细胞增殖明显减少。对于同一照射剂量的实验组, 随着 GM-CSF 浓度加大, 细胞增殖逐渐增多, 并且后一种浓度点较前一种浓度点的 OD 值有显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 但当 GM-CSF 浓度大于 400ng/mL (12Gy 组大于 200ng/mL) 时, 细胞增殖未见增加, 反

而处理组 12h 与 6h、24h 与 12h 及 36h 与 24h 比皆有显著性差异。

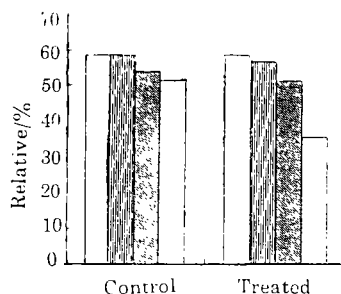


Fig. 2 Effects on the G0/G1 phase of irradiate KG-1 cells stimulated by GM-CSF

□ 6h, ▨ 12h, ▤ 24h, □ 36h

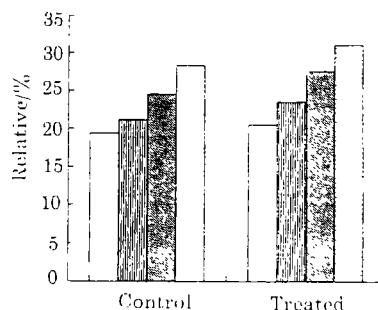


Fig. 3 Effects on S phase of irradiated KG-1 cells stimulated by GM-CSF

□ 6h, ▨ 12h, ▤ 24h, □ 36h

### 3 讨 论

细胞表面没有细胞因子受体,就不会对细胞因子产生应答,即使细胞表面有相应细胞因子的受体,亦不能确保能对该细胞因子产生应答<sup>[3]</sup>,还要看细胞因子与相应受体结合后能否启动或调节与增殖分化相关的基因,这些相关的基因对增殖起促进或抑制作用就决定了细胞因子作用的效应是促进细胞的增殖或抑制细胞增殖。

文献<sup>[3]</sup>报道 KG-1 细胞表面有  $100 \pm 20$  个 GM-CSF 受体。实验结果显示,在低浓度时 GM-CSF 对 KG-1 的刺激作用不明显,可能是由于 KG-1 细胞有自分泌生长因子的能力,并不需要依靠外源性生长因子,并且细胞培养液组分之一的小牛血清中亦含有生长因子。所以外源性低浓度的 GM-CSF 的刺激作用就被掩盖,当随着 GM-CSF 浓度增加,外源性 GM-CSF 的作用逐渐显示出来。但当 GM-CSF 高到一定浓度时,KG-1 细胞表面所有的 GM-CSF 的受体都被饱和后,GM-CSF 浓度继续增高就显示不出刺激增殖的作用。从实验结果看,当 GM-CSF 浓度继续增高超过  $400 \text{ ng/mL}$  时,KG-1 细胞增殖并不增加,反而有抑制细胞增殖的趋势。GM-CSF 对受辐射 KG-1 细胞的刺激增殖作用与未受照射的对照组细胞的作用不同,这说明在正常情况下,KG-1 细胞的增殖并不需要 GM-CSF,当细胞受到外界因素如  $\gamma$  射线等的作用后,出现了细胞增殖抑制和细胞周期阻滞时,在这种情况下运用细胞因子 GM-CSF 能促使细胞跳出周期阻滞而进入有丝分裂期,从而促进细胞增殖。

近年来,随着生物化学和分子生物学的长足发展,对细胞周期有了较为深入的认识。细胞周期的调控可分为外源性调控和内源性调控<sup>[4]</sup>。细胞周期有两个主要的调控点,一是  $G_1/S$  调控点,控制细胞从  $G_1$  期进入 S 期,另一调控点处于  $G_2/M$  调控点,决定细胞是否进入有丝分裂相。辐射导致的细胞周期阻滞与 P53 蛋白有关, P53 促进 P21 表达, P21 与增殖细胞核抗原、周期蛋白和周期蛋白依赖激酶形成异源四聚体复合物,该四聚体有无活性取决于 P21 的含量,受辐射细胞 P21 含量增高,四聚体的活性受到抑制,从而使细胞阻滞于  $G_1$  期<sup>[5]</sup>。从本实验结果看,KG-1 细胞受辐射后随着时间延长,阻滞于  $G_0/G_1$  期细胞逐渐减少,用 GM-CSF 刺激后能促进细胞跳出  $G_0/G_1$  阻滞,但与对照组比较 S 期的增加不明显,并非从  $G_0/G_1$  双跳出的所有细胞都进入了 S 期,而有相当一部分细胞阻滞于  $G_2/M$  期(具体数据未列出)。这一点与实验前的预期结果不相符。因 KG-1 是 P53 野生型细胞,受  $\gamma$  射线照射后通过 P53-P21-周期蛋白及其激酶四聚体途径使细胞周期阻止于  $G_0/G_1$ 。但实际结果却有

很大一部分细胞阻止于  $G_2/M$  期。对此可有以下三点解释：第一，以哺乳动物细胞周期时间 16h 推算<sup>[6]</sup>，照射后随时间延长  $G_2/M$  期增高可能不是照射直接引起  $G_2/M$  期增多，而是由于阻滞于  $G_0/G_1$  期的细胞经过一个停滞时间后进入  $G_2/M$  期所致；第二，最近有资料表明，P53 本身亦可对  $G_2$  期阻滞有作用<sup>[7]</sup>，辐射促使 P53 增高，P53 可能使  $G_2$  阻滞，确有文献报道从早期骨髓性分化的细胞如 KG-1、TF-1 或 HEL 细胞受到柔红霉素和米托恩醌等作用后阻滞于  $G_2/M$  期<sup>[8]</sup>；第三，KG-1 细胞在长期的传代过程中出现了 P53 突变。总之，辐射导致的周期阻滞是多方面的，而细胞因子本身又是一把双刃剑，对受辐射细胞是否有保护或挽救作用，取决于某一细胞因子及具体的细胞系及细胞因子应用的时机，并没有统一可套用的公式。

### 参 考 文 献

- 1 Cong Y W, Chen J P, Shao Y *et al.* 45th Annual Meeting of Radiation Research Society, Providence Rhode Island, USA, 1997, 21-25
- 2 Minami M, Inoue M, Wei S, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93(9):3963-3965
- 3 Park L S, Waldron P E, Friend D *et al.* Blood 1989, 74(1):56-65
- 4 Zhou T C, Wang H X, Xue Y N *et al.* Life Sci (in Chinese), 1992, 4(5):10-12
- 5 Xia S X Edit. Radiation Biology (in Chinese), Beijing Military Medical Science Press, 1988, 172
- 6 Wang K R, Xue S B, Liu H T *et al.* Cell Biology (in Chinese), Beijing Normal University Press, 1998, 436
- 7 Hworlg A, Musche R. Radiat Res, 1998, 150(suppl.); S52-59
- 8 Jaffrezou J P, Betaaieb A, Leavade T *et al.* Leukimia and Lymphoma, 1998, 29(5/6):453-463

## EFFECTS ON PROLIFERATION AND CELL CYCLE OF IRRADIATED KG-1 CELLS STIMULATED BY GM-CSF

GUO Dehuang DONG Bo WEN Gengyun LUO Qingliang MAO Bingzhi

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

**ABSTRACT** In order to explore the variety of cell proliferation and cell cycle after exposure to ionizing radiation, the responses of irradiated KG-1 cells of the human myeloid leukemia stimulated by GM-CSF, the most common used cytokine in clinic, were investigated. The results showed that GM-CSF enhance KG-1 cells proliferation, reduce  $G_0/G_1$  block, increase S phase and  $G_2/M$  phase. The stimulation effects of the GM-CSF is more effective in irradiated group than in control group.

**KEYWORDS** Radiation, KG-1 cell, GM-CSF, Cell cycle

**CLC** Q691.5, Q253