

γ 射线对体外培养骨细胞的作用观察

高建军 高林峰 金慰芳 王洪复 魏道林
李凌波 高艳虹 周 轶

(复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室 上海 200032)

摘要 采用 ^{137}Cs γ 射线(剂量率为 $1\text{Gy}/\text{min}$)单次照射的方法,研究了电离辐射对体外培养成骨细胞形态、增殖能力、ALP 活性、矿化能力和骨钙素 mRNA 水平以及破骨细胞形态和凋亡率的影响。结果表明,低剂量电离辐射可影响成骨细胞功能,促进破骨细胞凋亡发生,表现为成骨细胞增殖率、ALP 活性和骨钙素 mRNA 水平不同程度下降和矿化结节形成能力的双相变化($0.5\text{--}1\text{Gy}$ 的促进作用和 6Gy 的抑制作用);破骨细胞凋亡率增加等。

关键词 辐射, 成骨细胞, 破骨细胞

中图分类号 R81, Q2

随着射线在临床诊断、治疗和科研中应用的增加以及放射性核素扩散的危险性增加,电离辐射对骨代谢的影响已引起重视。骨质疏松症与其脆性骨折是放射线对骨损伤的主要远后效应,对受害者的健康和生活质量造成严重危害。然而,有关电离辐射对骨损伤的细胞分子机制尚不清楚,防治措施也甚缺乏。本工作研究 γ 射线外照射对体外培养成骨细胞和破骨细胞形态和功能的影响,以加深对电离辐射骨损伤效应的病理机制的认识。

1 材料和方法

1.1 仪器设备

^{137}Cs 放射源, Gamma Cell 40, 加拿大。

1.2 细胞分离和培养

1 日龄 SD 大鼠头盖骨分步酶消化法^[1](0.25% 胰蛋白酶+ 0.1% 胶原酶)获得成骨细胞,于 10% NBS 的 MEM 中常规培养 4—5d,汇合后传代。取第 2 继代细胞分别接种于 25cm^3 的培养瓶($5\times 10^4/\text{mL}$)、12 孔板($1\times 10^4/\text{cm}^2$)和 6 孔板($5\times 10^3/\text{cm}^2$)中;1 日龄 SD 大鼠四肢长骨机械法获得破骨细胞^[2],接种于玻片($1\times 10^2/\text{cm}^2$)20min 贴附后, Tc199 培养液洗去未贴壁细胞,于含 5% FCS 和 10% NCS 的 Tc199 中培养。

1.3 照射剂量和方式

^{137}Cs γ 射线(剂量率为 $1\text{Gy}/\text{min}$)照射第 2 继代培养成骨细胞,于传代后第 3 天(指数增殖期)接受单次照射 3、6、9、2Gy,换液后继续培养观察。分离的破骨细胞在玻片上培养 2h 后,单次照射 0.5、1、3、Gy。对照组(0Gy)细胞带入准备室。

1.4 观察指标

1.4.1 成骨细胞形态 观察培养瓶中活体成骨细胞的形态、细胞表面和超微结构改变(电

国家教委博士点基金(9936)资助

第一作者:高建军,男,1969 年 5 月出生,1997 年毕业于上海医科大学,从事放射医学、老年医学研究工作,获医学硕士学位,助理研究员

收稿日期:初稿 2001—04—24, 修回 2001—07—13

镜)。增殖能力 成骨细胞以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于培养板,培养不同时间后用 MTT 法^[3]测试各组细胞的增殖率,并计算增殖抑制率。碱性磷酸酶活性 受照射细胞与对照射细胞培养至汇合,经 Triton X-100 破膜后用对硝基苯磷酸盐(PNPP)法^[1]测定 ALP 活性。矿化结节形成数

受照射细胞与对照射细胞诱导培养(抗坏血酸 $50\text{ug}/\text{mL}$, β -甘油磷酸钠 10mmol)14d,原位固定,茜素红(ARS)染色,低倍光镜下计数矿化结节形成数^[4]。骨钙素水平 受照射细胞与对照射细胞经诱导培养(抗坏血酸 $50\text{ug}/\text{mL}$ β -甘油磷酸钠 10mmol)14d,一步法抽提总 RNA,以 β -actin 为内参照进行 RT-PCR 扩增(BGP 引物序列:PF=5'-agcgactctgagtctgacaaa-3',PR=5'-aacgggtggtgcatagatgcg-3'; β -actin 引物序列:PF=5'-atgggtcagaaggactcctac-3',PR=5'-acgctcggtcaggatcttcat-3),2%琼脂糖凝胶电泳后,应用 GDS8000 凝胶成像分析系统进行半定量分析。

1.4.2 破骨细胞形态 观察活体破骨细胞的形态和超微结构改变。凋亡率 照射后经不同时间培养,取出玻片,PBS 清洗,荧光染色 2min,于荧光显微镜下观察破骨细胞形态。依据橙红色荧光、体积缩小和核裂解或边缘化等特征,作凋亡破骨细胞分类计数。

2 结果

2.1 成骨细胞形态学改变

受照射组成骨细胞体积增大,胞浆呈均质化,折光性减弱。取培养 3d 的成骨细胞,超微结构表现为核肿胀,细胞表面塌陷,溶酶体(髓样小体)增多,程度与剂量有关(见图 1、图 2)。

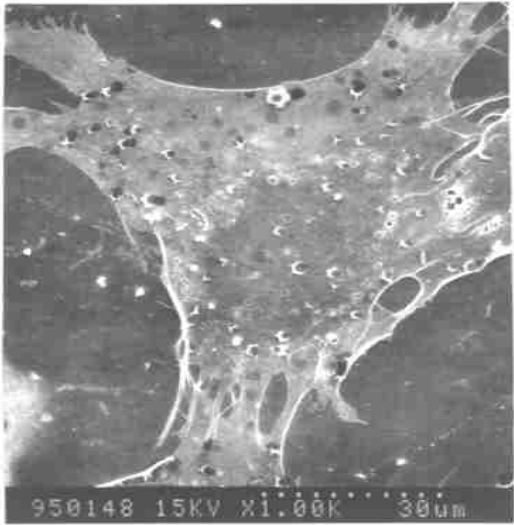


Fig.1 A scanning electron micrograph of a rat osteoblast after 6Gy irradiation shows enlargement cell body, caved surface and fewer microvillus

2.2 射线对成骨细胞 ALP 活性的影响

经单次照射的成骨细胞,ALP 活性呈不同程度下降(见表 1)。照射剂量 6—12Gy 时,抑制率约为 28%。

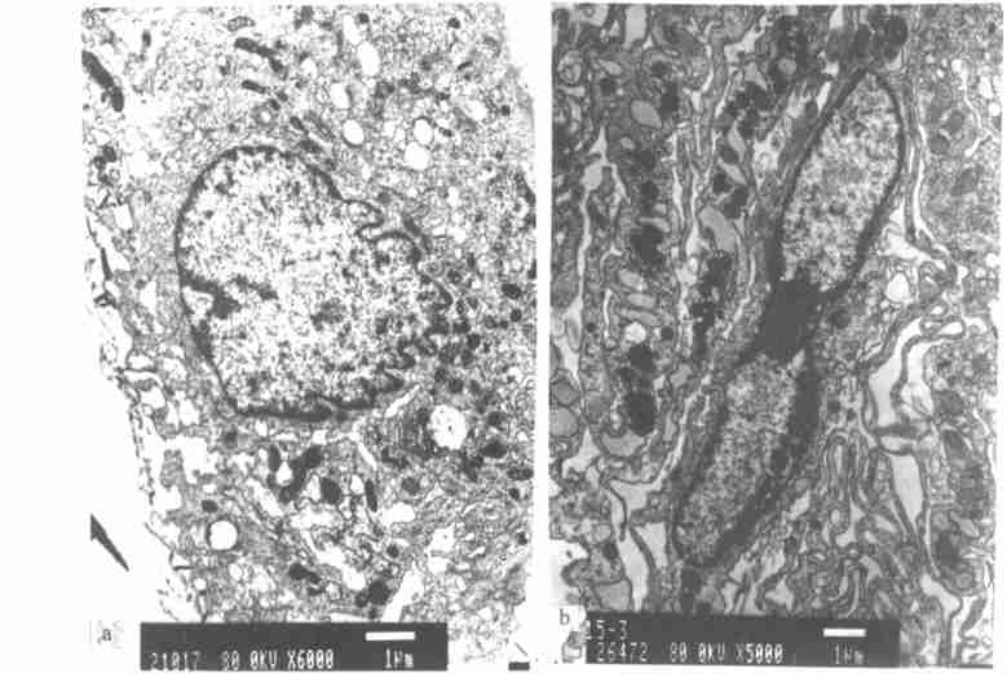


Fig. 2 Transmission electron micrographs of osteoblasts with 0.5 and 6Gy irradiation show and increase in multivesicular body (My) and melanin body (Mh) with dose

Tab. 1 Alkaline phosphatase activity of rat calvaria-derived osteoblasts

Dose/Gy ⁽³⁾	ALP U ·mg protein ⁻¹ (¹)	Inhibitory rate/%
0	0.174±0.034	
3	0.143±0.037	18
6	0.126±0.01(²)	28
9	0.125±0.028	28
12	0.129±0.012(²)	26

(¹)Mean±s, n=4, (²)p<0.05 vs sham-irradiation, (³)Irradiation was taken at 3rd days and ALP activity was measured at 7th day after seeding in 1×10⁴/cm²

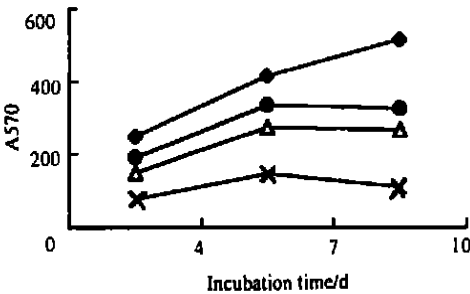


Fig. 3 Proliferation rate of osteoblasts at different incubation time after irradiation n=5, Irradiation was taken at 3rd days after seeding in 5 × 10³/cm²
◆ Sham, ● 3Gy, △ 6Gy, × 9Gy

2.3 射线对成骨细胞增殖率的影响

单次受照射后各组成骨细胞的增殖率明显下降 ($p<0.01$), 并与受照射剂量呈负相关 ($r=-0.978$)。3Gy 组 4d 的 A570 值减低 24%, 抑制作用在增殖早期(4d)和晚期(10d)表现明显(见图 3)。

2.4 射线对成骨细胞矿化功能的影响

单次 γ 射线外照射对体外培养成骨细胞矿化功能的影响与受照射剂量有关(见表 2)。培养 14d 体外形成矿化结节计数表明,0.5Gy 和 1Gy 照射对成骨细胞矿化结节形成能力有刺激作用,结节数较对照组分别增加 91.75%和 79.41%($p<0.001$);2、3Gy 照射组的矿化结节数接近对照水平;6Gy 照射对矿化结节

形成呈明显抑制作用,较对照组下降 67%($p<0.001$)。

Tab.2 Mineralized nodules formed by osteoblasts in vitro

Dose/Gy ⁽³⁾	Nodule number ⁽¹⁾	Change/%
Sham-irradiation	194.25±35.0	
0.5	372.25±34.1 ⁽²⁾	+91.75
1	348.50±14.2 ⁽²⁾	+79.41
2	197.75±14.2	+1.85
3	200±7.9	+3.15
6	64±5.0 ⁽²⁾	-67.13

⁽¹⁾Mean±s, $n=6$, ⁽²⁾ $p<0.001$ vs sham-irradiation, ⁽³⁾Irradiation was taken and nodes was at 3rd day counted at 14th day after seeding in $1\times10^4/\text{cm}^2$

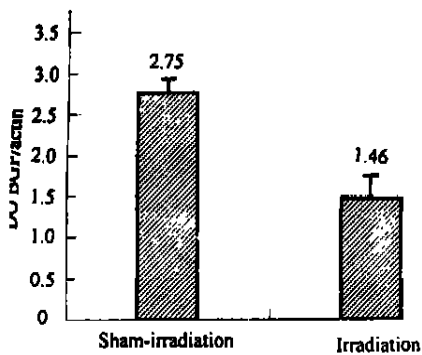


Fig.4 Change of osteocalcin expression in osteoblasts after 6Gy-irradiation ⁽¹⁾ $n=3$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs Control, ⁽³⁾Irradiation was taken at 3rd day and the total RNA was extracted at 14th day after seeding in $1\times10^4/\text{cm}^2$
□ Control, ▨ Irradiation

2.5 射线对成骨细胞骨钙素 mRNA 水平的影响

单次照射体外培养成骨细胞可抑制其骨钙素 mRNA 水平,取培养 14d 成骨细胞 RT-PCT 结果表明,6Gy 组与对照组比较 BGP 表达水平下降 47%(见图 4)。

2.6 破骨细胞形态改变

照射后短时间(2-4h),破骨细胞体积缩小,核染色质固缩致密,边缘化。在 5Gy 剂量组,出现许多涨大空泡、核均匀裂解等坏死改变(见图 5,图 6)。

2.7 射线对破骨细胞凋亡的诱导作用

辐射对破骨细胞凋亡的诱导作用呈现出时间和剂量的相关性(见表 3)。3Gy 照射后 2h 凋亡明显增加近 3 倍,在 6h 内随培养时间的延长而增加。高剂量可直接引起破骨细胞坏死改变。

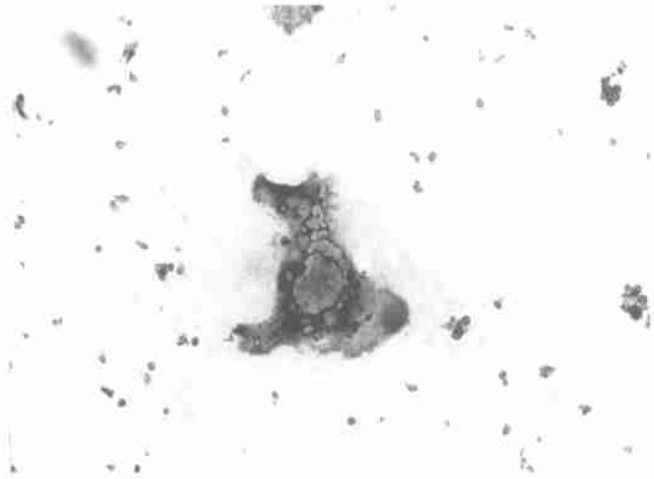


Fig.5 Cytochemical staining for TRAP in rat osteoclasts after 3Gy irradiation shows abundant swelling vacuole and disappearance of pseudopods 100×

Tab.3 The changes of apoptotic and necrotic osteoclasts after irradiation n=4

Dose/Gy ⁽³⁾	Apoptotic osteoclast / % ⁽¹⁾				Necrotic osteoclast / % ⁽²⁾	
	2h	4h	6h	8h	12h	6h
0	3.92	8.11	12.96	20.44		0
0.5	5.15	15.01	27.85	32.4	48.11	0
1	4.99	22.33	44.87	53.34	59.84	0.1
3	12.3	41.47	84.3	89.16	93.15	0.6
5	16.4	50.36	61.98	54.7	42.9	10

⁽¹⁾Apoptotic osteoclast number/total osteoclasts number
⁽²⁾Necrotic osteoclast number/total osteoclasts number
⁽³⁾Irradiation was taken at 2 hours after seeding on glass

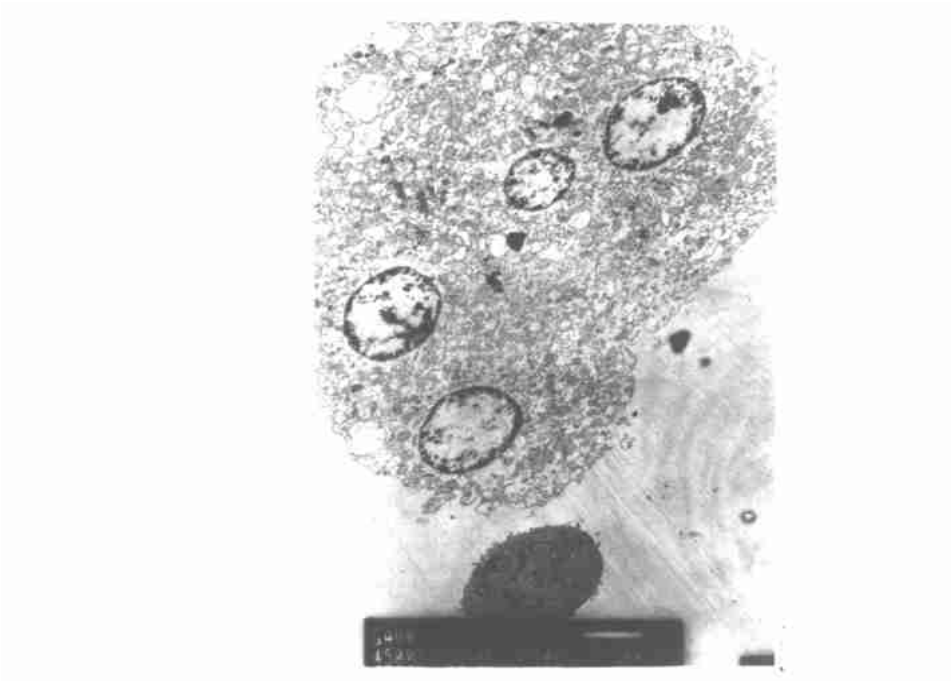


Fig.6 A transmission electron micrograph of a rat osteoclast after 5Gy irradiation shows destroyed structure and organelles

3 讨论

骨是代谢活跃的组织,其细胞、基质结构及其联络和调控机制十分精细复杂,并通过不断地进行骨重建(remodeling)维护骨的坚韧性和代谢的平衡。骨重建是骨质不断地被吸收和形成的过程,包括基本多细胞单元(basic multicellular units, BMU)的激活、吸收和形成等主要阶段。基本多细胞单元中的破骨细胞群(osteoclasts)负责骨吸收,成骨细胞群(osteoblasts)负责骨形成,并通过偶联机制相互调控。许多生理、病理和环境因素可影响骨细胞的生物学功能和骨的组织结构。如当骨吸收过分活跃或骨形成功能不良时,则造成骨量过度丢失,发生骨质疏松

症。辐射后骨组织成分和形态发生的变化已引起学者关注。对成骨细胞和破骨细胞分化发育和功能表达的影响是电离辐射影响骨代谢的主要细胞基础,但其发生机制仍不清楚。

本研究采用体外培养技术,观察 γ 射线对成骨细胞的增殖率、ALP 活性、矿化结节数和 BGP 表达水平等定量功能指标的影响。结果表明,3Gy 以上剂量¹³⁷Cs γ 射线照射可明显抑制成骨细胞增殖($>24\%$)和 ALP 活性(28%),减低骨钙素表达(47%),加速成骨细胞功能退化。说明 γ 射线可能通过抑制成骨细胞增殖和分化引发受照机体骨形成功能不良,即骨转换负平衡,导致骨吸收陷窝不能及时和完全的修复,脆性增加,出现骨质疏松改变。值得一提的是射线对成骨细胞矿化结节数的影响呈双相变化,并与受照射剂量有关。0.5—1Gy 照射刺激成骨细胞矿化结节数的增加,而 6Gy 则表现为抑制。低剂量的刺激作用可能与其抑制细胞增殖、减轻过度增殖对细胞分化的负面作用,即“表型抑制”作用有关^[5]。而随着照射剂量的提高(2—3Gy),对细胞损伤加重,部分损失分化能力,引起矿化结节数适度下降,接近对照组水平。当剂量提高到 6Gy 时,由于核酸和细胞质膜受损严重,产生大量凋亡和坏死,细胞数目减少,矿化结节数也明显减少。

破骨细胞是骨转换的始动因素,并直接影响骨吸收进程^[6]。生理状态下凋亡对维持破骨细胞数量和骨吸收适度极为重要。促进破骨细胞凋亡是治疗骨质疏松措施之一。本实验观察到射线对破骨细胞凋亡的诱导作用(3Gy 作用后 2h 增加近 3 倍),表明其可能通过减少破骨细胞数而对骨吸收作用产生一定抑制作用。总之,辐射对骨代谢影响的机制极其复杂。值得注意的是 0.5Gy 低剂量射线对成骨细胞的促分化作用和对破骨细胞的促凋亡作用,提示其可能对骨代谢有调整作用,并可望成为骨代谢调节机制深入研究的干预模型。

参 考 文 献

- 1 金慰芳,朱文菁,王洪复. 中华放射医学与防护杂志,1996,16(3)164—166
JIN W F, ZHU W J, WANG H F. Chin J Radiol Med Prot, 1996, 16(3):164—166
- 2 李凌波,高建军,金慰芳等. 辐射研究与辐射工艺学报,1999,17(1) 45—47
LI L B, GAO J J, JIN W F *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1999, 17(1):45—47
- 3 朱文菁,金慰芳,张丽丽等. 上海医科大学学报,1995,22(4)254—257
ZHU W J, JIN W F, ZHANG L L *et al.* J Shanghai Med Univ, 1995, 22(4):254—257
- 4 王洪复,金慰芳,高建军. 中国骨质疏松杂志,1999,5(2)58—62
WANG H F, JIN W F, GAO J J. Chin J Osteoporosis, 1999, 5(2):58—62
- 5 Stein G S, Lian J B, Stein J L *et al.* Physiol Rev, 1996, 76(2):593—629
- 6 王洪复,高建军. 中国骨质疏松杂志,2000,6(3)76—77
WANG H F, GAO J J. Chin J Osteoporosis, 2000, 6(3)76—77

EFFECTS OF γ IRRADIATION ON BONE CELLS IN VITRO

GAO Jianjun GAO Linfeng JIN Weifang WANG Hongfu

WEI Daolin LI Lingbo GAO Yanhong ZHOU Yi

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

ABSTRACT To study the influence of radiation on osteoblasts and osteoclasts in vitro. ^{137}Cs γ rays was used to irradiate the rat calvaria — derived osteoblasts and femur — derived osteoclasts. The changes in morphology, proliferation rate, ALP activity, mineralized nodules forming capacity and osteocalcin mRNA levels of irradiated — osteoblasts and osteoclastic apoptosis rate were detected respectively. Degenerative changes in morphology was observed and the inhibitory effects on osteoblasts proliferation rate by radiation was correlated with dose and ALP activity was also decreased by 28%. The nodules numbers was increased by 91.75% in lower — dose (0.5 — 1Gy) and decreased by 67.13% in higher — dose (6Gy). Osteocalcin transcription levels were 1.46 in 6Gy and 2.75 in control. The osteoclastic apoptosis rate was increased with irradiation dose. Low — dosage γ irradiation may accelerate the aging process of osteoblasts and induce osteoclasts apoptosis in vitro.

KEYWORDS Radiation, Osteoblast, Osteoclast

CLC R81, Q2