

$^{60}\text{Co}\gamma$ 线体外照射对大鼠肺巨噬细胞膜的损伤

胡连平 龚诒芬 吴德昌

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京)

摘要 本文报告 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线体外照射大鼠肺巨噬细胞(Alveolar Macrophage 简称 AM)对胞浆膜和溶酶体膜的损伤效应。

大鼠 AM 在体外经 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射 0-500 Gy 后, 培养 24 h, 以上清液中乳酸脱氢酶(LDH)和 β -葡萄糖苷酶(β -glu)活性占全部酶活性的%变化, 定量表达膜损伤的程度。实验结果表明, AM 接受 0、100、200、300、400 和 500 Gy 后 24 h 内上清液中 LDH 和 β -glu 活性占全部酶活性的%随剂量增大而增高, 上清液中 LDH 活性%分别为 35.7、41.0、45.8、48.1、49.8 和 51.3%; 上清液中 β -glu 活性%分别为 7.0、9.7、11.5、12.7、14.5 和 15.3%, 说明辐射引起 AM 胞浆膜和溶酶体膜损伤与剂量的依赖关系。

用扫描电镜和透射电镜均观察到 AM 胞浆膜和溶酶体膜受损的形态学证据。

本文还就反映 AM 膜受损的指标, 辐射致膜损伤的时相性以及膜损伤的意义进行了扼要的讨论。

关键词 肺巨噬细胞, 乳酸脱氢酶, β -葡萄糖苷酶, 酶漏出, 辐射致膜损伤

前言

巨噬细胞(Macrophage 简称 M ϕ)是一类重要的免疫活性细胞。它的许多生物功能都需要膜的介导, 如吞噬异物^[1]、杀伤肿瘤细胞^[2~4]、触发分泌活性物质^[5]。等肺巨噬细胞(Alveolar Macrophage 简称 AM)在肺损伤的防御机制中起重要作用。已知吸入有害物质如二氧化硅对 AM 膜有明显的损伤作用, 其损伤在诱发肺纤维化和肺肿瘤方面可能起重要作用^[6~7]。细胞是对辐射敏感的靶部位, 但辐射对 AM 膜的损伤报道很少。

本文以 AM 培养上清液中胞浆和溶酶体标志酶活性变化和电镜观察膜的形态变化为指标, 观察辐射所致胞浆膜和溶酶体膜的损伤, 为进一步分析辐射致 AM 细胞毒效应的变化机理提供依据。

材料与 方法

(1) 动物 实验选用 wistar 雄性大鼠日龄 50~90 天。

(2) 试剂 0.02% EDTA · PBS, 0.2% Triton x-100 细胞破碎液; β -葡萄糖苷酶底物: 对硝基酚葡萄糖(Sigma 产品), 用时以无菌生理盐水配制, 浓度为 3.5 mg/ml; 乳酸脱氢酶底物: 乳酸钠, 用时以甘氨酸缓冲液配制; 氧化型辅酶 I (Sigma 公司产品), 用生理盐水配成 5 mg/ml 的浓度, 冰箱保存, 可用 6 周; 二氧化硅系中国医学科学院卫生研究所制备的标准样品, 5 μm 以下的粒子占 95% 以上; 卡介苗(BCG), 用时以无菌生理盐水将原浆(75 mg/ml)稀释 5 倍, 在 56°C 热灭活 30 分钟, 在 4°C 冰箱保存备用; 培养体系系含 10% 新生牛血清的 TC-199 完全培养液; DPH(1.6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene, Sigma 公司产品)溶于四氢呋喃, 配成 1×10^{-3} mol/L 的贮备液。

(3) 方法 大鼠经 BCG 激活后 9 天活杀, 灌洗全肺, 取出 AM, 在体外用 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射 0~500 Gy 后, 培养 24 小时, 分别测定上清液和细胞内乳酸脱氢酶(LDH)和 β -葡萄糖苷酶

(β -glu)活性, 以上清液中酶性占全部酶活性(上清液与细胞内酶活性之和)%分别表示胞浆膜和溶酶体膜损伤的程度。还用扫描电镜和透射电镜观察了AM胞浆膜和溶酶体膜的形态变化。此外, 还观察了二氧化硅对AM膜的损伤。

(4) 激活方法 给大鼠经尾静脉注射BCG, 剂量为3.7 mg/200 g体重, 七天后加强1次, 2天后活杀取肺。

(5) 洗肺方法 在无茵条件下, 用0.02%EDTA·PBS灌洗全肺, 每次10 ml, 根据所需要的细胞数, 酌情灌洗5或10次。

(6) 照射方法 ^{60}Co 源强度为 $2.6 \times 10^{15}\text{Bq}$, 在距源0.5米处的剂量率为59.71~55.38 Gy/min。AM悬浮于EDTA·PBS液中, 在15~25℃条件下受照射, 全部样品照毕约20~30 min。

(7) 酶活性测定 取经照射和未照射的细胞悬液离心, 细胞块用TC-199培养液稀释成 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液, 取1 ml接种到35 mm的平皿内, 在37℃温箱内温育2小时, 待细胞贴壁后弃上清, 用Hanks氏液洗2次, 再加入TC-199培养液2 ml, 置于37℃5% CO_2 的温箱内温育24 h, 取上清液离心(1000 r/min, 5 min), 此上清液为测定由AM中漏出的酶的样品, 沉渣和贴壁的细胞用0.2%的Triton 2 ml处理30 min以破碎细胞, 此破碎液作为测AM内酶活性的样品。每测定管取0.5 ml(相当于 5×10^5 个AM), 分别测定LDH活性^[8]和 β -glu的活性^[9]。其结果用国际单位(IU)即经酶作用后每分钟转化底物所生成的产物的 μmol 表示膜的损伤程度。

结 果

1. AM膜损伤的定量表达

以AM培养上清液中酶活性高低表达 ^{60}Co - γ 线损伤细胞膜的程度, 需要明确两个前提, (1) 经24 h培养LDH和 β -glu的活性有无变化; (2) ^{60}Co - γ 线照射对这两种酶活性本身是否有影响。

为了观察培养期间酶活性的变化, 将AM破碎、离心、制成含酶的无细胞悬液, 经24 h培养, 分别测定培养前后LDH和 β -glu活性(mIU/ml)。这两种酶的活性无变化。

培养前LDH = 29.0 ± 1.1 , 24 h培养后LDH = 28.1 ± 0.8

培养前 β -glu = 2.5 ± 0.04 , 24 h培养后 β -glu = 2.5 ± 0.05

n = 3

Tab 1. Effect of irradiation on the total enzyme activity of non-activated AM(mIU/ 1×10^6 cells)

Enzymes	Dose (Gy)					
	0	100	200	300	400	500
LDH	65.78 ± 22.06	65.78 ± 23.44	65.23 ± 16.55	63.02 ± 19.31	62.47 ± 17.93	62.06 ± 16.55
β -glu	3.89 ± 1.56	3.72 ± 1.42	3.83 ± 1.42	3.88 ± 1.42	3.93 ± 1.56	3.93 ± 1.16

n = 12

$\bar{x} \pm \text{SD}$

comparison with control $P > 0.05$

Tab 2. Effect of irradiation on the total enzyme activity of activated AM (mIU/ 1×10^6 cells)

Enzymes	Dose (Gy)					
	0	100	200	300	400	500
LDH	92.81 ± 5.52	87.71 ± 5.52	86.33 ± 8.27	88.95 ± 2.76	86.33 ± 8.27	84.95 ± 12.41
β -glu	3.75 ± 0.13	3.70 ± 0.12	3.49 ± 0.19	3.49 ± 0.26	3.34 ± 0.36	3.50 ± 0.26

n = 9

$\bar{x} \pm \text{SD}$

comparison with control $P > 0.05$

为证实 ^{60}Co - γ 线照射对 LDH 和 β -glu 活性的影响, 观察 AM 在体外接受 0—500 Gy 的剂量, 再经 24 h 培养, 测上清液与细胞内酶活性的总和(见表 1、2)。结果表明, 激活和非激活的 AM 两种酶活性不受照射剂量影响。由此看出, 在本实验的剂量范围内, 照射不影响 LDH 和 β -glu 的活性。

2. 辐射对胞浆膜和溶酶体膜的影响

经上述实验证实, AM 培养上清液中 LDH 和 β -glu 活性占全部酶活性%的变化可以反映胞浆膜和溶酶体膜受损的程度。本实验以它作为指标, 观察 AM 体外照射 0~500 Gy 后膜的损伤。图 1、2 和图 3、4 分别表示了激活与非激活的 AM 受照后, 上清液中 LDH 和 β -glu 活性占全部酶活性%随照射剂量的变化。

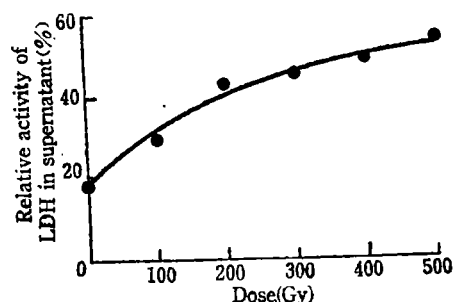


Fig 1. Effect of irradiation on cytoplasmic membrane of AM

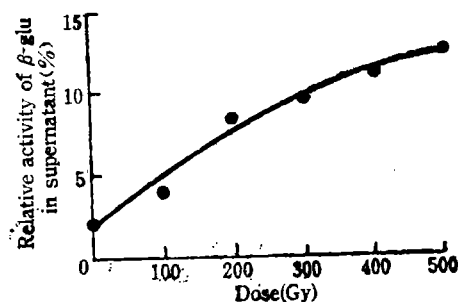


Fig 2. Effect of irradiation on lysosomal membrane of AM

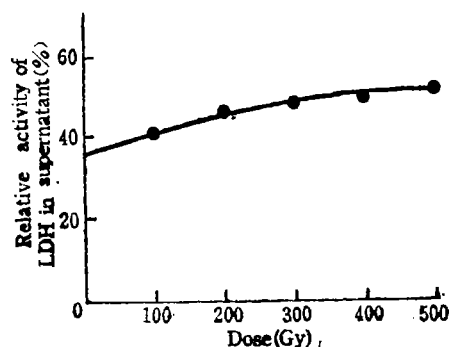


Fig 3. Effect of irradiation on cytoplasmic membrane of BCG-activated AM

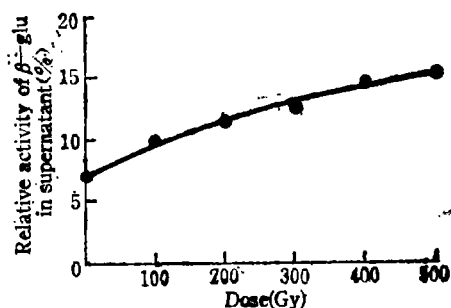


Fig 4. Effect of irradiation on lysosomal membrane of BCG-activated AM

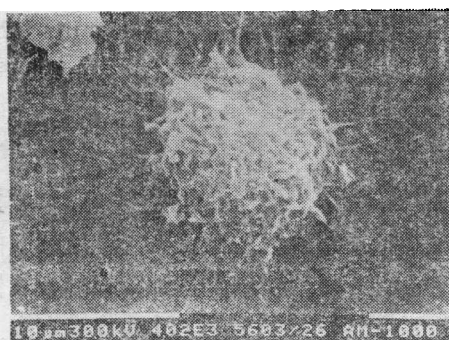


Fig 5 a. Picture of control AM under scanning electron microscope

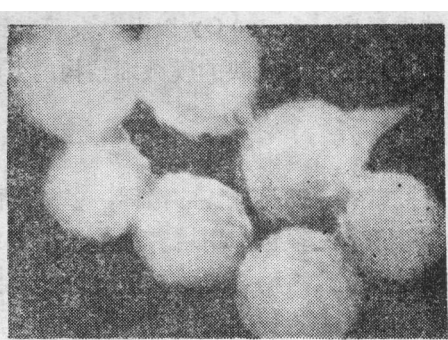


Fig 5 b. Picture of 100 Gy AM under scanning electron microscope

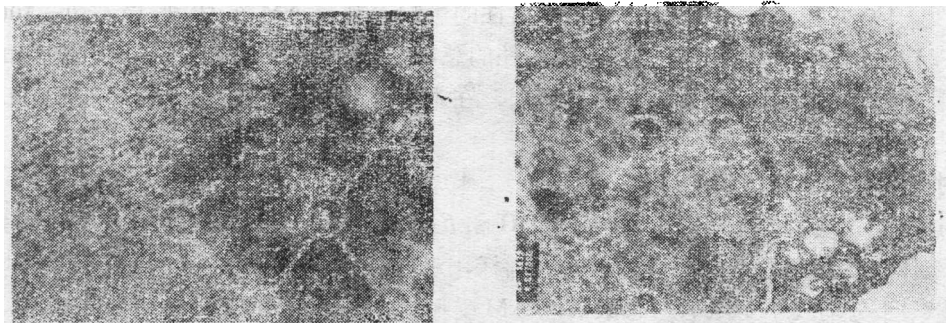


Fig 6a. Picture of control AM under transmission electron microscope

Fig 6b. Picture of 100 Gy AM under transmission electron microscope

Tab 3. Effect of irradiation on the membrane fluidity of AM

	Dose (Gy)			
	0	100	300	500
polarization	0.201 ± 0.008	0.203 ± 0.002	0.206 ± 0.001	0.205 ± 0.001
n = 3	comparison with $P > 0.05$			

由图 1、2、3、4 可见, ① 上清液中 LDH 和 β -glu 的活性%随剂量的增加而增高, β -glu 的变化似更明显; ② 照射剂量在 200 Gy 以内上清液中两种酶活性所占%随剂量变化的幅度较大, 200—500 Gy 间变化的幅度较小; ③ AM 激活状态不同受照后的变化大致相似。

3. 辐射对 AM 膜损伤的形态观察

用扫描电镜和透射电镜观察对照和照射的 AM 的形态变化。由图 5a 看出对照的 AM 表面皱折多, 伪足伸展, 显示胞浆膜正常的图象, 而图 5b 为受 100 Gy 照射的 AM, 表面皱折变少, 变浅、有的已消失, 伪足缩回, 细胞变圆; 图 6a 和 6b 为透射电镜的照片, 对照组细胞溶酶体结构完整, 单位膜清晰可见, 而照射 100 Gy 的 AM 溶酶体膜破裂, 有的还见到溶酶体内电子密度高的物质流入胞浆。从形态上为辐射所致的损伤提供了直接的证据。

4. 辐射对 AM 膜流动性的影响

正常膜是液态脂质镶嵌模型, 膜中蛋白质和磷脂都处于流动状态, 有害物质作用于膜, 使膜分子结构改变, 导致膜流动性的变化, 进而影响膜的生物功能。利用荧光探针 DPH 测定膜的流动性, 观察辐射对膜的损伤, 以便在更深的层次上阐明辐射所致膜损伤的特点。由于 AM 贴壁的特性, 脱贴壁方法对膜结构有损伤, 本实验仅观察了照后 90 分钟 AM 在 EDTA·PBS 悬浮状态时膜的流动性变化(表 3)。

由表 3 结果看出, 在 500 Gy 以内, 未观察到膜流动性的变化。这提示在照后 90 min, AM 膜尚未发生由膜流动性所反映的膜微细结构的变化。

讨 论

以往报道的研究膜损伤的指标, 多采用酶的组织化学染色法^[10,11], 这种方法简单、直观, 但难于定量。本文报告了用培养上清液中亚细胞器内的标志酶活性%的变化, 定量反映膜的损伤程度, 在辐射所致的膜损伤效应观察时, 得到了有规律的结果。为了确定这种指标的代表性, 还用已知对 AM 膜有损伤的二氧化硅 0、50、100 和 200 μ g 与 AM 共同培养 24 h, 也观察到上清液中两种酶活性所占的%与所加的二氧化硅的剂量有明显的依赖关系。

M ϕ 内含有丰富的溶酶体酶, 过去多采用酸性磷酸酶(ACP)作为标志酶, 但它漏到细胞外很

易失活。Schneder^[12]研究了溶酶体酶在培养条件下的稳定性。腹腔 M Φ 经 3 天培养, 上清液内 β -glu 活性不变, 而 ACP 活性明显下降。本文也报告了 β -glu 稳定性的结果, 说明以 β -glu 作为溶酶体标志酶, 能较好地反映溶酶体膜的损伤程度。

本文观察到照后 24 h 胞浆膜、溶酶体膜发生了明显的损伤效应, 而在照后 90 min 并未观察到膜流动性的变化, 这是否与辐射所致膜损伤的时相性变化有关? 以后又补充照后立即观察(约 1 h 后)上清液中两种酶活性的实验(见表 4)。

Tab 4. Immediate damage effect of $^{60}\text{Co}\gamma$ -ray on the membrane of AM (mIU/ml)

Doac (Gy)	LDH	β -glu
0	13.10	0.14
100	14.62	0.19
500	13.93	0.14

由表内结果说明, 照后 1 h 内上清液中两种酶活性与对照组无明显差别。看来辐射所致膜的损伤是逐步显现出来的。这与 Wills^[13]观察到膜的辐射损伤效应在照后 20 h 表现得最明显的结果相符合。

细胞膜具有重要的生物功能, 是当前生物学领域研究中比较活跃的课题。Wilson^[14]在 70 年代就提出膜特性改变导致畸变的机理。Wallach^[15]曾就肿瘤病因提出了“肿瘤是一种膜病”的假说。许多自身防御的生物功能, 如杀伤肿瘤细胞、吞噬异物都需膜的介导。可见膜的损伤势必引起生物活性细胞的重要功能的变化。有关辐射致 AM 免疫功能的改变与膜受损之间的联系值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] S. Gorden. In "Phagocytosis-Past and Future" edited by L. K. Marfred and B. Liana, 287-293 (1982).
- [2] P. A. Campbell, C. J. Czuprynski, and J. L. Cook, J. Leukocyte Biol., 36, 293 (1984).
- [3] J. J. Rinehart, R. Vessella, P. Lange, M. E. Kaplan, and B. J. Gormus, J. Lab. Clin. Med., 93, 361 (1979).
- [4] M. I. C. Gyongyossy, A. Liabeuf and P. Golstein, Cell. Immunol., 45, 1(1979).
- [5] D. O. Adams, Ann. Rev. Immunol., 2, 283 (1984).
- [6] 徐英含, 中华病理学杂志, 7, 244 (1963).
- [7] I. J. Fidler, Cancer Res., 42, 469 (1982).
- [8] 福州部队总医院编, 临床医学检验, 上海科技出版社, 340-342, 1977.
- [9] L. S. Nerukar, In "Manual of macrophages methology" edited by B. H. Herbert, 229 (1981).
- [10] 洪涛编, 生物医学超微结构与电子显微镜技术, 北京, 科学出版社, 111~183, 1980.
- [11] A. A. Aikman, and E. D. Wills, Radiat. Res., 57, 403 (1974).
- [12] J. Schnyder, J. Exp. Med., 148, 435 (1978).
- [13] E. D. Wills and A. E. Wilkinson, Biochem. J., 99, 657 (1966).
- [14] J. G. Wilson In "Environment and Birth Defects" ed: J. G. Wilson, Academic press NY and London A Subsidiary of Horcourt Brace Javanovich Publisher, p. 83, 1973.
- [15] D. F. Wallach, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 61, 868 (1968).

(稿件收到日期: 1987 年 5 月 8 日)

DAMAGE OF MEMBRANE OF RAT ALVEOLAR MACROPHAGE BY IRRADIATION IN VITRO

Hu Lianping, Gong Yifen and Wu Dechang

(*Institute of Radiation Medicine, Beijing*)

ABSTRACT Damage of membrane of rat alveolar macrophage (AM) by ^{60}Co γ -ray irradiation was studied. AM, after irradiation with different doses, cultured in vitro for 24 hrs. The percentage of activities of lactate dehydrogenase (LDH) and β -glucuronidase (β -glu) in supernatant of AM culture were measured to reflect the degree of damage of membrane. It was found that relative percentages of LDH and β -glu activities in supernatant increased with the increase of dose. At dose of 0, 100, 200, 300, 400 and 500 Gy the figures were 37.5, 41.0, 45.8, 48.1, 49.8 and 51.3% for LDH and 7.0, 9.7, 11.5, 12.7, 14.5 and 15.3% for β -glu respectively. It indicated that the enzymes in the supernatant were released from the damaged cytoplasmic and lysosomal membrane of the cell. The more severe the damage of membrane, the higher the leakage of enzyme. Besides the morphology of AM was observed by scanning and transmission electromicroscopes. The morphological evidence of damaged membrane was found.

The quantitative expression of degree of damage of membrane and its significance were discussed.

KEY WORDS Alveolar macrophage, Lactate dehydrogenase, β -Glucuronidase, Leakage of enzyme, Damage of membrane