

# 电离辐射对大鼠类成骨细胞的影响

王剑宁<sup>1</sup>, 曾融生<sup>1</sup>, 杨国平<sup>2</sup>

(中山医科大学口腔医学院 1. 颌面外科, 2. 检验科, 广东 广州 510055)

**摘要:**【目的】探讨不同剂量电离辐射后大鼠类成骨细胞生物学性状的变化。【方法】成骨细胞通过酶消化法从SD大鼠鼠鼠颅骨中获取传代, 将第2代细胞分别进行0、1、4、6、9 Gy的 $\gamma$ 线辐射, 检测成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌量。【结果】细胞增殖、功能和分化受 $\gamma$ 线电离辐射抑制的程度不同, 1 Gy时增殖即受到抑制, 骨钙素分泌量在4 Gy时才受到显著地抑制, 而碱性磷酸酶活性值甚至在6 Gy下抑制作用才有意义。【结论】电离辐射后, 成骨细胞的增殖、功能和分化均受到抑制, 但各指标对电离辐射的敏感性不同。

**关键词:** 成骨细胞; 辐射; 电离; 细胞分化; 碱性磷酸酶; 骨钙素

**中图分类号:** R359.15      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-257X(2002)02-0097-02

**The Effects of Radiation on the Rat Osteoblast-like Cells *in Vitro*** WANG Jian-ning, ZENG Rong-sheng, YANG Guo-ping. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510055, China)

**Abstract:** 【Objective】 To compare the effects of radiation of 5 different doses on the rat osteoblast-like cells (ROB) and to study the critical size of radiation in which proliferation, physiological function and differentiation of the ROB were damaged. 【Methods】 The kind of ROB used in the present study was isolated from the calvariae of neonatal (one-day-old) SD rats by sequential enzymatic digestion. The third passage of the cell was used for all the experiments. Cells were irradiated with  $\gamma$ -ray from a <sup>60</sup>Co source at the experimental doses of 0, 1, 4, 6 and 9 Gy. The medium was changed immediately after irradiation. 6 days after radiation (9 days in culture), the relative cell number, alkaline phosphatase activity and the amount of bone Gla protein were measured. 【Results】 Radiation inhibited the ROB. However, the effects of radiation on the ROB differed from the three indicators. 1 Gy could restrain proliferation of the cells, and 4 Gy physiological function, but only when the dose was increased to 6 Gy was the effect on the differentiation significant. 【Conclusion】 The proliferation, physiological function and differentiation of the ROB are different in terms of their sensitivity to the ionizing radiation. The critical size of the radiation on ROB is uncertain, depending on the different indexes.

**Key words:** osteoblast; radiation; ionizing; cell differentiation; alkaline phosphatase; osteocalcin

颌骨电离辐射损伤多见于头颈部肿瘤的放疗。根据不同报道, 颌骨放射性骨髓炎的发病率高达5%到22%(平均10%到15%)<sup>[1]</sup>。虽然有采取保守治疗的研究报道<sup>[2]</sup>, 但这类疾病大部分还是导致进行性的骨质破坏, 最终仍需要骨切除和重建, 因而严重影响肿瘤患者治疗后的生存质量。正常骨组织在放疗中对辐射的反应日益引起人们的重视。成骨细胞是骨形成细胞, 它在骨基质的形成和骨重建、骨愈合中有重要的意义, 因而有必要利用体外培养, 阐明辐射对成骨细胞的直接效应。辐射会引起细胞结构的一系列的变化, 并最终导致细胞生物学性状的改变。由于细胞生物学性状的多样性, 不同剂量的电离辐射对各种性状的效应很可能存在差异。目前, 不同细胞生物学性状对电离辐射的敏感性尚未见有报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠类成骨细胞的培养

大鼠类成骨细胞 (rat's osteoblast-like cells, ROB) 由新生(1日龄)SD大鼠颅骨以分次酶消化法获取<sup>[3]</sup>。共消化6次, 其中第4次到第6次的细胞置入含100 mL/L的胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司)的RPMI1640(GibcoBRL公司)培养液中培养, 每3天换液1次。达到细胞融合状态后, 进行传代, 第2代细胞用于实验<sup>[4]</sup>。

ROB细胞以 $1.6 \times 10^7/L$ 的密度植于96孔板(Corning公司)中常规培养, 每孔100  $\mu$ L。培养第3天, 分别以1、4、6和9 Gy剂量的<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线照射; 不接受照射的为对照组(0 Gy)。照射后立即更换培养液, 并继续培养至第6天, 然后进行各项指

收稿日期: 2001-03-29

基金项目: 广东省重点科技攻关基金资助项目(9622044-05)

作者简介: 王剑宁(1973-), 男, 广东湛江人, 硕士, 助教。

标的检测。

## 1.2 指标检测

1.2.1 相对细胞数的检测 对细胞增殖的检测采用 MTT 法<sup>[5]</sup>。每组细胞检测 10 个培养孔。检测时每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C, 继续孵育 4 h 后终止培养。吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砷。用酶联免疫检测仪 (波长 570 nm) 测得吸光度  $A$ 。

1.2.2 碱性磷酸酶活性检测 去除培养液, 每孔各加入 0.05 mL/L 的 Triton-X 100, 于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中放置 12 h 后, 使用超声震荡将细胞物理法裂解。吸取细胞裂解液, 利用碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (慈城生化试剂厂) 在酶联免疫检测仪上, 采用速率法 (波长 410 nm, 高速震荡 5 min, 检测 11 次, 1 次/min) 测吸光度变化值  $\Delta A$ 。

1.2.3 骨钙素分泌量检测 采用放射免疫法检

测, 按照骨钙素放射免疫试剂盒 (北京东免东雅生物技术研究所提供) 说明步骤操作。检测骨钙素 (bone Gla protein, BGP) 标准品获得 BGP RIA 标准曲线, 将样品的放射性核数计数率 ( $\text{min}^{-1}$ ) 转换成 BGP 量 ( $\mu\text{g/L}$ )。

## 1.3 统计学方法

利用 SPSS 统计软件对所获得的数据进行统计分析, 采用方差分析法。

## 2 结果

不同剂量的  $\gamma$  线辐射对 ROB 的增殖、功能和分化的影响, 见表 1。我们用相对细胞数  $A$  值反映细胞增殖情况, 并转化为增殖率。细胞增殖率  $R = (A - A_0) / A_0 \times 100\%$ 。其中,  $A$  为辐射后的吸光度,  $A_0$  为细胞植入培养孔贴壁后的吸光度。经检测,  $A_0 = 0.1148$ 。

表 1 不同剂量辐射对各项指标的影响

Table 1 Effects of various indicators after radiation at different doses

Dose/Gy	$A_{\text{MTT}}$	$A_{\text{ALP}} / (\Delta A \cdot \text{min}^{-1})$	$C_{\text{BGP}} / (\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$R / \%$
0	0.68 ± 0.02	0.0096 ± 0.0013	0.52 ± 0.01	489.1
1	0.62 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.0070 ± 0.0044	0.49 ± 0.05	437.5
4	0.47 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.0070 ± 0.0015	0.34 ± 0.03 <sup>1)</sup>	312.8
6	0.47 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.0053 ± 0.0008 <sup>1)</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>1)</sup>	309.4
9	0.33 ± 0.00 <sup>1)</sup>	0.0005 ± 0.0002 <sup>1)</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>1)</sup>	186.7

1) Compared with the control group without exposure to radiation,  $P < 0.01$

辐射后, ROB 细胞的增殖受到了抑制。随着辐射剂量的增大增殖率下降。而且, 在辐射剂量达 1 Gy 时, 增殖抑制效应有显著意义。我们以 ALP 活性值及 BGP 分泌量作为细胞的功能和分化的指标<sup>[6]</sup>, 它们对辐射的反应与细胞增殖情况相似, 即在辐射的作用下, 这两个指标都下降了, 但与对照组比较表明, 导致这两个指标降低有意义的辐射剂量并不相同, 它们分别为 6 Gy 和 4 Gy。

## 3 讨论

### 3.1 电离辐射对 ROB 增殖、功能和分化的一致性

本研究表明,  $\gamma$  射线电离辐射对 ROB 的增殖、功能和分化都具有很强的抑制作用, 并且呈剂量依赖性。导致 ROB 细胞呈显著性抑制的辐射剂量, 各研究的报道有所不同<sup>[4, 7~9]</sup>。一般认为, 采用不同的成骨细胞系, 对辐射剂量的效应关系不相同; 另外, 体外培养的 OB 与活体组织中的 OB 细胞所

处的环境不同, 在成骨细胞培养时无其它细胞和骨组织多种成分的制约, 因此较低剂量的辐射即可表现出生物学效应。

### 3.2 不同生物学性状对辐射反应的剂量差异

在辐射剂量的界值上, 增殖与功能 (ALP 活性) 和分化情况 (BGP 分泌量) 存在着差异。与不受辐射的对照组相比较, ROB 在 1 Gy 辐射下增殖就受到了明显地抑制, BGP 分泌量在 4 Gy 时才受到显著地抑制, 而 ALP 值直至 6 Gy 抑制作用才有意义。这种界值的差别说明 ROB 的生物学特性对辐射的敏感性存在着差异, 反映出增殖、功能和分化三者之间的机制的不同。其中增殖性敏感性最强, 其次是 ROB 的分化和功能。当 ROB 受到辐射时, 首先会导致增殖性死亡 (增殖抑制), 此时细胞并未处于真实的死亡状态, 仍保持一定的功能, 并能进行分化。只有当辐射剂量高达一定程度, 才会抑制 ROB 的功能和分化。

(下转第 102 页 to page 102)

能的不同成分进行基因分析。

本文采用脂质体转染法,将 pcDNA3-bcl-2 质粒导入体外培养的 PC12 细胞,培养 48 h 后,用含有 G418 的完全培养基筛选,继续培养至 12 d 时用克隆环挑出 G418 抗性克隆,扩大培养进行鉴定。转染后的 PC12-bcl-2 细胞经 Western blot 检测发现有 26 ku 的蛋白表达,而 PC12 细胞中没有检测到该蛋白表达,原位免疫组化实验也证实了这点。脂质体转染法是基于带正电荷的脂质体可与带负电荷的哺乳动物 DNA 结合,在靠近细胞膜时与膜融合,从而将 DNA 释放到细胞浆中。实验发现该方法简单、稳定、重复性好。

pcDNA3-bcl-2 的成功构建,并通过脂质体转染 PC12 细胞获得了稳定有效表达 bcl-2 的细胞克隆,这样不仅能够研究 BCL-2 蛋白对神经元的作用,而且对探索神经元的生命调控具有重要意义,为进一步针对各类神经损害和神经退行性疾病的基因治疗工作奠定必要的实验基础。

参考文献:

[1] Tsujimoto Y, Croce C. Cloning of chromosome breakpoint of neo-

plastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation [J]. Science, 1984, 226(4687): 1097.

- [2] Chen D, Schneider G E, Martinou J C, *et al.* Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS [J]. Nature, 1997, 385(30): 434.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1995. 880~897.
- [4] Seto M, Jaeger U, Hockett R D, *et al.* Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma [J]. EMBO, 1988, 7(1): 123.
- [5] 蔡翔, 邱鹏新, 苏兴文, 等. 海洋蛭体 YC-1 抑制低钾诱导大鼠小脑颗粒神经元的凋亡 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 3(21): 161.
- [6] 黎明涛, 王文雅, 孙娟, 等. p38MAPK 抑制剂通过抑制 JNK 活性抑制培养的小脑颗粒细胞凋亡 [J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(3): 165.
- [7] Chen L, Ziegelhoffer P R, Yang N S, *et al.* In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(10): 4455.
- [8] Starikova A M, Chvanov M A, Pogorelaya N C, *et al.* Nifedipine-induced morphological differentiation of rat pheochromocytoma cells [J]. Neuroscience, 1998, 86(2): 611.

(编辑 刘清海)

(上接第 98 页 from page 98)

### 3.3 不同性状不同剂量反应的临床意义

有研究表明,在出现放射性骨坏死的区域,仍能见到细胞的形态,但细胞的数目、活力、形态等生物学性状与正常状态的细胞均有差异<sup>[10]</sup>。这说明此时细胞出现了辐射损伤,处于一种增殖状况受损的潜在的死亡状态。因此,在增殖能力丧失状态下即可发生骨坏死。

然而在临床上,虽然最终仍会出现骨髓炎,但放疗后患者可以长期处于无变化、症状轻微的稳定状态。对此,本研究认为,ROB 的功能和分化对辐射的敏感性较低,所以在细胞出现增殖性死亡的情况下,功能与分化的损伤仍可能较弱,这有可能使这种坏死延期发生,但由于缺乏细胞增殖与替换,坏死虽然延期但仍不可避免,且延期时间的长短取决于功能、分化损伤的程度。

参考文献:

[1] Epstein J B, Wong F L W, Stevenson-moore P, *et al.* Osteoradionecrosis: clinical experience and a proposal for classification [J]. J Oral Maxillofac Surg, 1987, 45(2): 104.

[2] 陈伟良, 陈小华, 林承光, 等. 高压氧预防颌骨放射性骨坏死

的病理学观察 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(4): 301.

- [3] Partidge N C, Alcorn D, Michelangeli V P, *et al.* Functional properties of hormonally responsive cultured normal and malignant rat osteoblastic cells [J]. Endocrinology, 1981, 108(1): 213.
- [4] Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, *et al.* Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells [J]. J Dent Res, 1997, 76(2): 658.
- [5] Moraes S, Sousa J P, Fernandes M H, *et al.* In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I retardation of tissue mineralization by metal [J]. Biomaterials, 1998, 19(1-3): 13.
- [6] Collin P, Nefussi J R, Wetterwald A, *et al.* Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture [J]. Calcif Tissue Int, 1992, 50(2): 175.
- [7] 金慰芳, 朱文菁, 王洪复, 等. <sup>137</sup>Cs $\gamma$  射线照射建立成骨细胞衰老模型的研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1996, 16(3): 164.
- [8] Matsumura S, Hiranuma H, Deguchi A, *et al.* Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X irradiation [J]. Radiat Res, 1998, 149(5): 463.
- [9] 张晓铀, 汪恭质, 丁柏, 等. 模拟失重和辐照对大鼠心肌细胞和成骨细胞的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 1998, 11(5): 313.
- [10] 孙勇刚, 孙开华, 王光和, 等. 颌骨及颌周软组织放射性损害的超微结构观察 [J]. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(31): 147.

(编辑 刘清海)