

⁶⁰Co γ射线照射对体外培养的心肌细胞活性及凋亡的影响

胡舜英¹, 蒋长盛¹, 陈国伟², 段海峰³, 王荣亮³, 吴 斌³, 郭子宽³, 王立生³

中图分类号: R811.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)02-0132-03

【摘要】 目的 研究⁶⁰Co γ射线照射对体外培养的心肌细胞活性及凋亡的影响。方法 体外培养新生大鼠心肌细胞, 分为对照组和照射组, 照射组细胞分别用⁶⁰Co γ射线 5Gy、10Gy、20Gy单剂量照射心肌细胞, 照射后 48h 检测细胞培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)浓度, 流式细胞仪检测⁶⁰Co γ射线照射对体外培养的心肌细胞凋亡的影响, 照射后 48h及 120h用结晶紫试验及 MTT试验检测照射后心肌细胞活性变化。结果 照射组 LDH 浓度明显高于未照射组, 且随照射剂量增加而升高。照射后 48h 凋亡细胞较对照组升高, 凋亡细胞比例与照射剂量呈正相关。结晶紫试验及 MTT试验均提示照射后 48h照射组心肌细胞活性与对照组无明显差异, 照射后 120h照射组活细胞活性明显低于对照组, 且与照射剂量相关。结论 ⁶⁰Co γ射线单剂量照射可直接损伤心肌细胞, 降低体外培养的心肌细胞活性, 促进心肌细胞凋亡。

【关键词】 γ射线; 心肌细胞; 细胞活性; 凋亡

Effects of Gamma-ray Radiation on Activity and Apoptosis of Rat Cardiomyocytes in Vitro HU Shun-ying, JIANG Chang-sheng, CHEN Guo-wei et al. *Department of Geriatrics 458 Hospital of PLA Guangzhou 510602 China.*

【Abstract】 Objective It is reported that radiation-induced myocardial degeneration in the rat is preceded by changes in capillary structure and function. The aim of the present study is to investigate direct effect of gamma ray radiation on activity and apoptosis of cultured rat cardiomyocytes in vitro. **Methods** The study was performed using primary cell cultures of cardiomyocytes isolated from hearts of newborn rats. After being cultured for 72h in vitro, cardiomyocytes were irradiated with single dose of 5Gy, 10Gy, 20Gy of gamma ray respectively. At 48h post-irradiation, the concentration of LDH in the supernatant of cell culture was tested using methods introduced by International Federation of clinical chemistry (IFCC), and apoptosis was determined with flow cytometry. The viability of myocytes was determined with crystal violet test and MTT test at 48h and 120h post-irradiation respectively. **Results** LDH concentration in the supernatant of cell culture of cardiomyocytes were increased significantly with the irradiation dose augment. Flow cytometry confirmed the induction of apoptosis in response to different gamma ray doses irradiation at 48h after irradiation. The viable cardiomyocytes irradiated by gamma ray were significantly declined at 120h after irradiation compared to un-irradiated cells, however there were no significant difference between two groups at 48h post-irradiation. Dose-effect relationship was demonstrated between cardiomyocyte apoptosis, viability and irradiation dose in the study. **Conclusion** The study demonstrates gamma ray radiation can cause direct damage to cultured cardiomyocytes, including inhibiting activity and inducing apoptosis of cardiomyocytes in vitro, which shows dose-effect relationship. The mechanism of gamma ray irradiation induced injury to cardiomyocytes should be investigated further.

【Key words】 Gamma ray; Cardiomyocyte; Cell Activity; Apoptosis

心肌细胞被认为是分化终末期细胞, 根据放射生物学理论, 对射线敏感性较低^[1,2]。在放射性心脏病机理的研究中, 倾向认为毛细血管内皮细胞是射线损伤的靶细胞, 心肌细胞的变性及心肌纤维化是继发于内皮细胞受损后心脏微循环障碍所致^[2~4]。γ射线是临床上肿瘤放射治疗的常用射线之一, 目前对于射线照射对心肌细胞的直接损伤的研究还较少。本研究用不同剂量的⁶⁰Co γ射线单剂量照射体外培养的心肌细胞, 观察⁶⁰Co γ射线对心肌细胞活性及凋亡的直接作用。

1 材料与方法

1.1 材料 新生 24h 内的 Wistar 大鼠乳鼠购自军事医学科学院实验动物中心。DMEM 培养基为美国 Sigma 公司产品。胰蛋白酶为美国 Amresco 公司产品。胎牛血清购自北京元亨圣马生物技术公司, Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。其他试剂为北京化学试剂公司产品。

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞培养 取新生 24h 内的 Wistar 大鼠乳鼠 20

只, 无菌条件下剪取心脏, 仔细剥离心房及大血管组织, 然后于预冷的 PBS 液中漂洗 3 次。用眼科小剪将组织剪成约 0.5mm³ 碎块, 加入 5 倍体积的 0.125% 胰蛋白酶溶液, 反复吹打消化 3~5min 静置, 待自然沉淀后弃去上清液。剩余沉淀再加入约 5 倍体积的 0.125% 胰蛋白酶溶液, 反复吹打消化 3~5min 静置, 取上清液, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中终止消化。剩余沉淀用同样条件及方法继续消化, 一般经 3~4 次消化即可将组织消化完毕。收集各次消化产物, 离心, 去上清, 沉淀重悬于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 接种于 75cm² 培养瓶, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 1h 轻轻吸出细胞悬液, 以 5×10⁵ ml 的密度接种于 35mm 培养皿及 96 孔培养板, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 72h 后, 用⁶⁰Co γ射线照射。

1.2.2 实验分组 未照射组(A组)、5Gy 照射组(B组)、10Gy 照射组(C组)、20Gy 照射组(D组)。

1.2.3 ⁶⁰Co γ射线照射参数 剂量 5Gy、10Gy、20Gy 照射率 510.4C Gy/h 在距离 2.5m。

1.2.4 乳酸脱氢酶(LDH)检测 用 24 孔培养板培养心肌细胞, 照射后 48h 吸取细胞培养上清, 用日立 7600 全自动生化分析仪, 采用 IFCC 推荐的方法检测培养液中 LDH 浓度。

1.2.5 MTT 实验 用 96 孔板培养细胞, 分别于照射后 48h、120h 后加入 MTT (终浓度 0.5mg/ml), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4h 加入 DMSO 100μl 震荡 5min 酶联仪 (购自 BIO-RAD

基金项目: 国际原子能机构 (IAEA) 资助项目 (13305/R1) 及国家自然科学基金资助项目 (30400182)

作者单位: 1 广州中国人民解放军第 458 医院内 4 科, 广东 广州 510602 2 广州中山大学第一附属医院内科; 3 军事医学科学院放射医学研究所

作者简介: 胡舜英, 女, 博士研究生, 主要从事心血管疾病的研究。

公司) 570nm 处测 OD 值。

1.2.6 结晶紫实验 用 96 孔板培养细胞, 分别于照射后 48h、120h 后行结晶紫实验, 吸去各孔中培养液, PBS 洗 2 次; 1% 戊二醛固定, 15min; 用蒸馏水冲洗, 甩净干燥后加结晶紫, 30min; 弃染色液, 蒸馏水冲洗, 晾干后加 1% 曲拉通, 振荡 5min; 酶联仪 (购自 BD-RAD 公司) 570nm 处测 OD 值。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (购自北京宝赛生物技术有限公司), 操作步骤按试剂盒说明进行。用胰酶消化细胞, 调整待测细胞的浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml。取 1ml 细胞, 1000rpm, 4℃ 离心 10min 弃上清。加入 1ml 冷的 PBS 轻轻震荡使细胞悬浮。1000rpm, 4℃ 离心 10min 弃上清。重复洗涤两次。将细胞重悬于 200μl Binding Buffer 加入 10μl Annexin V-FITC 和 5μl PI 轻轻混匀, 避光室温反应 15min 或 4℃ 反应 30min。加入 300μl Binding Buffer 在 1h 内上机检测。检测结果判断: Annexin V-FITC⁻、PI⁻ 为正常活细胞, Annexin V-FITC⁺、PI⁻ 为凋亡细胞, Annexin V-FITC⁺、PI⁺ 为坏死细胞。

1.2.8 统计学分析 采用 SPSS10.0 统计软件, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 培养液中 LDH 浓度 照射组 (B、C、D 组) 的 LDH 浓度均明显高于照射组 (A 组) ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 且随照射剂量增高, LDH 浓度增高 (图 1)。

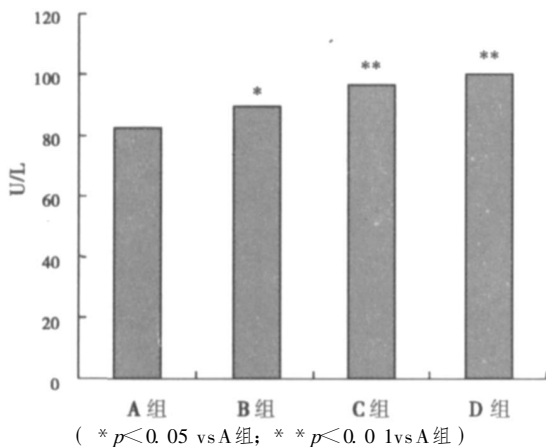


图 1 心肌细胞照射后 48h 培养液中 LDH 浓度

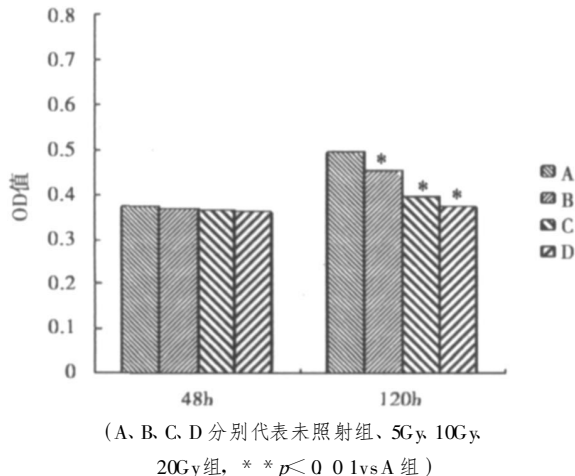


图 2 心肌细胞照射后结晶紫实验检测细胞活性

2.2 结晶紫法检测结果 分别在照射后 48h、120h 用结晶紫染色法检测活细胞数, 照射后 48h 未照射组和各照射组吸光度值 (OD) 差异无显著性 ($P > 0.05$), 照射后 120h 照射组与未照

射组 OD 值差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 细胞活性降低与照射剂量间呈量效关系 (图 2)。

2.3 MTT 法检测结果 分别在照射后 48h、120h 用结晶紫染色法检测活细胞数, 得到的结果与结晶紫法相似, 照射后 48h 未照射组和各照射组光密度值 (OD) 差异无显著性 ($P > 0.05$), 照射后 120h 照射组与未照射组 OD 值差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 细胞活性降低与照射剂量呈正相关 (图 3)。

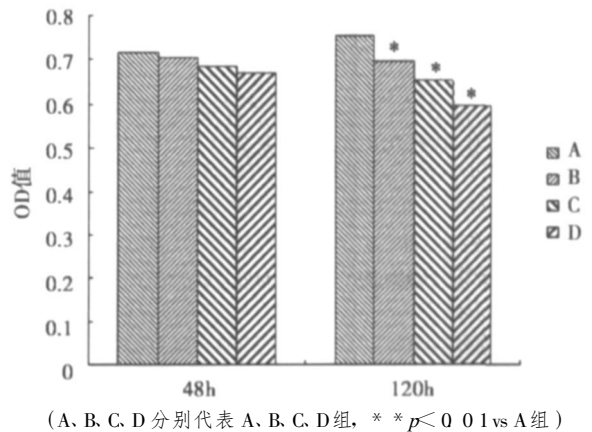


图 3 心肌细胞照射后 MTT 实验检测细胞活性

2.4 细胞凋亡检测 心肌细胞照射后 48h 流式细胞仪细胞凋亡, 显示随照射剂量增加, 细胞凋亡增多。统计学分析结果显示照射组 (B、C、D) 细胞凋亡率较未照射组 (A 组) 细胞凋亡率均增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (见图 4)。

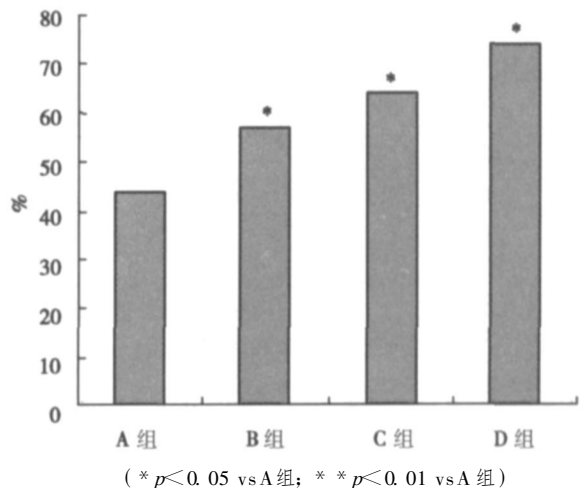


图 4 流式细胞仪检测心肌细胞照射后 48h 凋亡率变化

3 讨论

根据放射生物学的理论, 在接受辐射后, 分裂期细胞的放射损伤明显。心肌细胞属于不分裂细胞 (postmitotic), 射线对其的直接损伤作用不明显^[2]。在放射性心脏病机理的研究中, 倾向认为毛细血管内皮细胞是射线损伤的靶细胞, 心肌细胞的变性及心肌纤维化是继发于内皮细胞受损后心脏微循环障碍所致^[2-3], 目前对于 γ 射线照射对心肌细胞的直接损伤及防治还鲜见报道。在本研究中, 用胰蛋白酶消化分离新生大鼠心脏获得体外培养心肌细胞的模型是稳定可靠的, 细胞存活率及纯度均可达 95% 以上^[4]。体外培养 72h 后, 分别用 ⁶⁰Co γ 射线 5Gy、10Gy、20Gy 单剂量照射体外培养的心肌细胞, 然后分别检测培养液中 LDH 浓度、结晶紫染色、MTT 法和 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒等方法观察心肌细胞的损伤、细胞活性及细胞凋亡比率变化。

LDH系胞质酶,正常情况下不能透过细胞膜,但当细胞受到损伤时,细胞膜通透性增强,LDH会从细胞质内漏出,细胞质内LDH减少,培养液中LDH增多,测定培养液中LDH浓度可反映心肌细胞的损伤情况。结晶紫实验的原理是结晶紫染色可通过细胞的特定摄生法而选择性地被细胞核吸收,死亡的细胞几乎不吸收结晶紫染料,而被核(DNA)吸收的结晶紫又可为有机溶媒提取,通过测定提取液的光密度值(OD),就可测定活细胞的数量^[7]。MTT法亦可通过所测细胞的OD值不同反映活细胞数的变化。本研究中,照射后48h流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示不同剂量的⁶⁰Co γ 射线照射均可促进细胞凋亡,而且随着照射剂量的增加,细胞凋亡增加。照射后48h的心肌细胞的培养上清中的LDH浓度较未照射组明显升高,与照射剂量呈量效关系,说明⁶⁰Co γ 射线照射可对心肌细胞造成一定程度的损伤。结晶紫染色与MTT法得到的结果相类似,照射后48h各组细胞OD值间无明显差异,照射后120h照射组细胞的OD较为照射组明显降低,与照射剂量相关,亦说明⁶⁰Co γ 射线对体外培养的心肌细胞有毒性作用,照射后48h各组间OD值无明显差异考虑与在细胞的损伤早期结晶紫染色及MTT法不够敏感有关,在照射后48h时细胞活性下降,早期凋亡细胞增多,但仍可摄取结晶紫及MTT,故各组细胞所测OD值差异不明显,在照射后120h,细胞功能进一步受损,结晶紫及MTT摄取能力下降,导致OD值较为照射组明显下降。

上述结果均提示⁶⁰Co γ 射线照射体外培养的心肌细胞对其有直接损伤作用,降低细胞活性,促进凋亡细胞。根据放射生物学的理论,心肌细胞属于终末分化细胞,对辐射敏感性较低。本研究的实验结果则提示⁶⁰Co γ 射线照射可直接损伤体外培养的心肌细胞,促进细胞凋亡。体外培养的心肌细胞的放射损伤机理目前尚不明确。有报道心肌细胞放射损伤可致线粒体结构破坏,功能受损,导致能量代谢障碍^[8]。在本研究中

发现,照射后各组细胞的细胞周期未见明显差异,照射后48h细胞心肌细胞凋亡率增加,在照射后12h心肌细胞内质网和线粒体明显损伤(结果未在该文中显示),由此考虑,照射后线粒体及其他细胞器功能障碍受导致细胞功能障碍,细胞活力下降,细胞凋亡增多,但 γ 射线致心肌细胞损伤的机理仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 吴德昌.放射医学[M].北京:军事医学科学出版社,2001.
[2] Schultz-Hector S. Radiation-induced heart disease: review of experimental data on dose response and pathogenesis[J]. Int J Radiat Biol. 1992; 61(2): 149-160.
[3] Gaya AM, Ashford RF. Cardiac complications of radiation therapy[J]. Clin Oncol (R Coll Radio). 2005; 17(3): 153-159.
[4] Lauk S, Truett KR. Endothelial cell proliferation in the rat heart following local heart irradiation[J]. Int J Radiat Biol. 1990; 57(5): 1017-1030.
[5] Stewart JR, Fajardo LF, Gillette SM, et al. Radiation injury to the heart[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 31(5): 1205-1211.
[6] 杨晓宁,田宗文,黄焕斌,等.新生大鼠心肌细胞的体外培养[J].解剖学杂志,2005; 28(3): 361-362.
[7] 陈军,战洪生.结晶紫染色测定法在抗肿瘤药物筛选中的应用.癌症,1997; 16(3): 231-232.
[8] Cilliers GD, Harper B, Lochner A. Radiation induced changes in the ultrastructure and mechanical function of the rat heart[J]. Radiother Oncol. 1989; 16(4): 311-326.
(收稿日期:2007-01-15)

(上接第131页)

解体,但不涉及HCM共价键(肽键和二硫键等)的破裂,其一级结构HCMHC、HCMIC保持完好。盐酸胍变性剂存在时,变性的HCM保持溶解状态。为防止在溶液中加入乙醇时产生放热反应引起蛋白质变性,我们把乙醇进行了充分预冷,而且整个操作在4℃冰柜中进行。加入乙醇是为了使重链沉淀,再经离心将其分离出来。

3.4 HCMHC杂交瘤细胞的制备 为了使产生的杂交瘤细胞稳定,使用的SP2骨髓瘤细胞来自与被免疫动物同一个品系的BALB/C小鼠品系。一般认为,在最后一次加强免疫后第三日取脾进行融合为好。我们选用PEG作为融合剂。处于50%PEG浓度的的高渗环境中,细胞呈现交融和皱缩的状态,所以在用预温的无血清培养液稀释时,开始要缓慢,边加边轻轻地震荡,使细胞的渗透压与外环境逐步平衡,否则会由于突然处于低渗状态中,大量水分涌入细胞膜中而使细胞崩解。在融合过程中,必须选择合适的PEG分子质量、温度以及作用时间,以免影响融合效果。

4 结论

本实验取得了良好的结果,为下一步抗HCMHC单链可变区抗体及其放射性核素受体显像的研究打下了基础。

参与文献:

[1] Laroche-Traineau J, Clément-Sanchez G, Santarelli X, et al. Three-step purification of bacterially expressed human single-chain Fv antibodies for clinical applications[J]. J

Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000; 737(1-2): 107-117.
[2] Neddman MA, David JS, Baymond B, et al. Rapid infarct imaging with a technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: evaluation in a canine model of acute myocardial infarction. J Nucl Med. 1993; 34(2): 234-241.
[3] Mømer S, Richard B, Kazzam E, et al. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden[J]. J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(7): 841-849.
[4] 惠海鹏,李小鹰,刘秀华,等.腺相关病毒介导心肌肌浆网Ca²⁺-ATPase 2a基因转导治疗大鼠慢性心力衰竭[J].中华心血管病杂志,2006; 34(4): 357-362.
[5] Warren CM, Greaser ML. Method for cardiac myosin heavy chain separation by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis[J]. Anal Biochem. 2003; 320(1): 149-151.
[6] Piac S, Yu E, Mithun M J, et al. A simplified method for identification of human cardiac myosin heavy chain isoforms. Biotechnol Appl Biochem. 2003; 37(1): 27-30.
[7] 黄人健,彭宝珍,周国瑛,等.人心肌肌球蛋白轻链1与重链和肌动蛋白的结合[J].生物化学与生物物理学报,2000; 33(1): 41-45.
[8] Steve MH, Chia-Y, Krzysztof JG, et al. Simultaneous quantification of human cardiac α - and β -myosin heavy chain proteins by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Anal Chem. 2004; 76(6): 1683-1689.

(收稿日期:2007-04-02)