

低剂量辐射后小鼠骨髓白血病细胞凋亡的观察

李广宙, 于明明, 李现军, 刘志翔

中图分类号: R818 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)03-0257-03

**【摘要】** 目的 观察低剂量辐射(LDR)后不同时间小鼠骨髓白血病细胞凋亡的变化,探讨全身低剂量辐射辅助治疗白血病的理论依据。方法 将小鼠粒单白血病细胞系 WEHI-3 尾静脉接种于 BALB/c 小鼠建立白血病动物模型。将 60 只成功建立的粒单白血病模型小鼠,对半分为对照组和实验组。对照组小鼠不进行照射,实验组小鼠同时给予 75mGy 的 LDR。于 LDR 后 1d、2d、3d、5d 和 10d 分别处死实验组及对照组 6 只小鼠,取其骨髓,通过荧光显微镜、电镜观测骨髓白血病细胞的凋亡情况。结果 实验组小鼠 LDR 后第 2d、3d 骨髓白血病细胞凋亡率最高,5d 和 10d 次之,与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )。结论 LDR 可使白血病小鼠骨髓肿瘤细胞凋亡率增加,其作用机制明显不同于大剂量射线治疗对肿瘤细胞的杀伤,可能与 LDR 增加白血病小鼠免疫兴奋效应,促进某些细胞因子分泌有关。

**【关键词】** 低剂量辐射; 小鼠; 白血病; 细胞凋亡  
Apoptosis of Bone Marrow Leukemia Cells in Mice after Low Dose Radiation at Different Time Li Guang-zhou Yu Ming-ming Li Xian-Sep et al Department of Nuclear Medicine Weifang Medical College Affiliated Hospital Weifang 261031 China

**【Abstract】 Objective** To investigate the apoptosis of bone marrow leukemia cell in mice after low dose radiation (LDR) at different time and the experimental basis for LDR auxiliary therapy on leukemia. **Methods** WEHI-3 cells were injected into BALB/c mice through tail veins to make an experimental mice model of myelomonocytic leukemia. 60 leukemia mice models were divided half-and-half. 30 mice models in experimental group were irradiated with LDR of 75mGy at the same time while the others 30 in the control group were not. 6 mice models with LDR and 6 mice models without LDR would be killed at the time the 1<sup>st</sup> day, the 2<sup>nd</sup> day, the 3<sup>rd</sup> day, the 5<sup>th</sup> day and the 10<sup>th</sup> day after LDR in order to extract bone marrow samples. The apoptosis percentage of leukemia cells in bone marrow was examined. **Results** The apoptosis percentage of leukemia cells in experimental group was increasing after LDR and went to top on the 2<sup>nd</sup> day and the 3<sup>rd</sup> day. The apoptosis percentage of leukemia cells was remarkably different between experimental and control group. all  $P < 0.05$ . **Conclusion** LDR could significantly increase the apoptosis percentage of bone marrow leukemia cells in mice. Its mechanism is remarkably different in kill and wound of big dose radiation to tumour cells. It is probably related to of the increase immune exciting response as to promote some cytokine secretion in leukemia mice.

**【Key words】** Low Dose Radiation; Mice; Leukemia; Apoptosis

低剂量辐射(LDR)的抗肿瘤作用日益受到众多学者的关注,研究表明低剂量辐射对荷人小细胞肺癌裸小鼠的肿瘤细胞有一定的促凋亡作用;低剂量辐射可增强大剂量辐射促肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[1-3]</sup>。本研究旨在通过观察 LDR 对白血病小鼠骨髓肿瘤细胞凋亡的影响,探索全身低剂量辐射对白血病的辅助治疗价值。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立 小鼠粒单白血病细胞系 WEHI-3 由协和医科大学细胞中心提供,将体外培养扩增的细胞悬液 0.5 ml (含 WEHI-3 细胞  $1 \times 10^6$ ),尾静脉注射接种于 8 周龄成年 BALB/c 小鼠(编号:鲁动质字 200001002 号)体内。接种后密切观察小鼠生活习性的变化,于第 15 天、20 天、25 天和 28 天经尾静脉取外周血进行白细胞计数及分类,血涂片瑞氏染色 OLYMPUS U-SPT 光学显微镜观察。

1.2 分组及处理方法 将 60 只成功建立的粒单白血病模型小鼠,对半分为实验组和对照组。对照组小鼠不予 LDR 实验组小鼠同时给予总剂量 75mGy 的 LDR,密切观察小鼠生活习性的变化,于 LDR 后 1d、2d、3d、5d 和 10d 分别处死 6 只实验组及

相应数量的对照组小鼠,取其骨髓并行骨髓涂片。照射使用 WDVE-6A100 型直线加速器,靶皮距 100cm,剂量率 12.5 mGy/min,总剂量 75mGy 将小鼠置于加速器照射野内一次性全身照射。

1.3 骨髓涂片的荧光显微镜观察 处死小鼠取其骨髓涂片,使用碧云天 Hoechst 凋亡染色试剂盒(产品编号 C0003 生产日期 2004 年 9 月),具体步骤按其说明进行。德国产 LEICA DM IREZ 型荧光相差倒置显微镜观察,计数 200 个白血病细胞,计算凋亡细胞百分率。

1.4 骨髓标本的电镜观察 处死小鼠取其骨髓,用 3% 戊二醛固定 2h,1% 的锇酸后固定 1h,常规梯度脱水,EPON812 环氧树脂包埋,超薄切片,经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色后封片,日本产 H-7500 透射电镜观察。

1.5 统计方法 各组计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两两比较采用  $t$  检验。

2 结果

2.1 动物模型的观察 接种 WEHI-3 细胞后 BALB/c 小鼠外周血白细胞计数于 15d 开始升高,出现未成熟粒、单核细胞(见表 1)。

表 1 小鼠外周血白细胞计数及分类结果 (n=50)

检测指标	正常值	15d	20d	25d	28d
白细胞计数( $\times 10^9/L$ )	$8 \pm 2.04$	$19.2 \pm 1.7$	$51.5 \pm 1.9$	$69.1 \pm 3.6$	$98.5 \pm 3.4$
未成熟粒单核细胞(%)	$< 3.0$	$5.2 \pm 0.9$	$13.3 \pm 0.7$	$18.0 \pm 0.7$	$24.9 \pm 0.72$

基金项目: 山东省卫生厅科研基金资助(HZ153)  
作者单位: 潍坊医学院附属医院核医学科, 山东 潍坊 261031  
作者简介: 李广宙(1955~), 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤核医学。

接种后 20d~28d 发病,外周血中可以见到粒单白血病细胞,光镜下胞体较大,形态不规则,核染色质纤网状,可见凹陷折叠,胞浆天蓝色,可见紫红色嗜天青颗粒。小鼠发病后精神

萎靡,目光暗淡,步态不稳,行动迟缓,食量减少,腹部日渐膨隆。上述检测显示白血病模型已成功建立。白血病小鼠 LDR 后 2 天内活力明显增强,进食增多,活动量增加。

2.2 荧光显微镜观察 荧光显微镜下可见小鼠正常骨髓细胞核发出淡蓝色的荧光,发生凋亡的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,形状不规则(图 1)。小鼠骨髓白血病细胞凋亡百分率与对照组比较见表 2。由表 2 可见 LDR 后第 2 天、3 天小鼠骨髓白血病细胞凋亡百分率最高,5d 和 10d 次之,与对照组比较差异显著( $P$  均 $<0.05$ ),对照组间凋亡细胞百分率无明显差异( $P>0.05$ )。

2.3 电镜观察 电镜下实验组和对照组骨髓中均可见细胞核形状极不规则的白血病细胞,实验组电镜下多见发生凋亡的白血病细胞,可见核染色质边集现象和凋亡小体(图 2),对照组

少见。

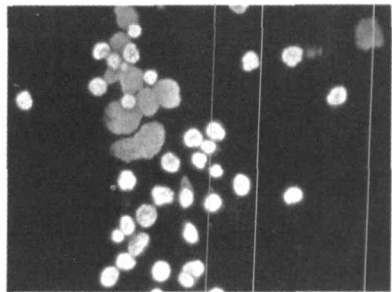


图 1 荧光显微镜下可见小鼠骨髓细胞的细胞核呈圆形类圆形,发生凋亡的细核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,形状不规则( $\times 1\,000$ 倍)

表 2 LDR 后不同时间骨髓白血病细胞凋亡率检测结果( $n=6$   $\bar{x}\pm s$ )

分组	1d	2d	3d	5d	10d
实验组	17.3 $\pm$ 2.4 <sup>1)</sup>	29.4 $\pm$ 3.6 <sup>2)</sup>	28.2 $\pm$ 3.1 <sup>2)</sup>	19.4 $\pm$ 2.9 <sup>1)</sup>	12.8 $\pm$ 2.1 <sup>1)</sup>
对照组	8.5 $\pm$ 2.0	7.9 $\pm$ 1.6	8.3 $\pm$ 1.8	9.2 $\pm$ 1.9	7.3 $\pm$ 1.7

注:1)与对照组比较  $P<0.05$  2)与对照组比较  $P<0.01$ 。

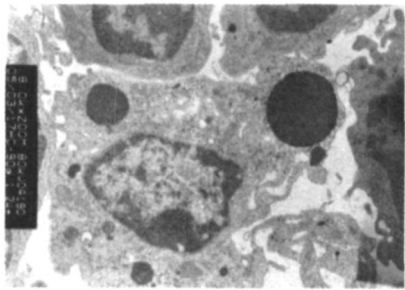


图 2 小鼠骨髓凋亡细胞电镜检测结果( $\times 8\,000$ 倍)

### 3 讨论

众所周知,近 20 年来国内外学者的研究证明 LDR 能使机体的某些生物功能增强,即所谓的 LDR 对生物生命活动的兴奋效应<sup>[5]</sup>。LDR 兴奋效应涉及许多生物学现象,例如生长加速、体重增加、寿命延长、生育增多、修复功能上调、防卫机能增强、适应能力升高等。临床研究也发现 LDR 可导致患者机体抗肿瘤免疫反应增强,可减少肿瘤的生长、扩散及转移<sup>[6-7]</sup>。如坂本澄彦 1986 年应用于临床治疗恶性淋巴瘤,全身吸收剂量为 0.1~0.15 Gy 隔日照射 1 次。经 5 周全身照射,淋巴瘤局部或大块的情况还并用大剂量直接照射。结果 80% 患者癌灶消失,20% 局部消失,追踪 3 年,无复发。其疗效是由于提高了淋巴细胞自发增殖力,增加外周血的 CD<sup>+</sup> 细胞,抗氧化酶活力、吞噬细胞溶解细胞活力, NK 细胞活力, IL-2 分泌和氧化氮产物等的增强(或增多),增加了 DNA 修复能力,降低电离辐射诱发自由基等,从而显著的改善放疗或化疗肿瘤患者的预后<sup>[5]</sup>。在其他的临床研究中,低剂量全身照射用于低度恶性淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病的治疗,分割剂量为 0.1~0.25 Gy 每周 5 次,总剂量为 1.5~2.0 Gy 可诱导多数患者长期缓解,未观察到严重的副作用,疗效可与化疗相媲美<sup>[8]</sup>。这些初步的临床研究提示全身 LDR 有希望成为白血病、淋巴瘤及真性红细胞增多症等全身性疾患治疗的新途径。

近年来,吉林大学谭业辉等人<sup>[9]</sup>的动物实验证实 LDR 具有抗淋巴细胞白血病的作用,可使荷瘤小鼠白血病细胞生长受抑制,延缓白血病小鼠病情进展,生存期延长。本实验研究通过荧光显微观察发现 75mGy 的 LDR 可以有效的提高小鼠骨髓白血病细胞凋亡率,其作用机制明显不同于大剂量射线治疗对肿瘤细胞的杀伤,通过电镜亚细胞结构的观察也进一步证明了这一点,可能与 LDR 增加小鼠免疫兴奋效应,促进某些细胞因子分泌有关<sup>[10]</sup>。然而, LDR 抗肿瘤作用的机制是一个相当复杂的问题,其表现涉及复杂的细胞间反应和天然及获得免疫间

的相互关系<sup>[10-12]</sup>,全身 LDR 能否真正用于临床治疗白血病,还有大量的问题亟待研究。

### 参考文献:

[1] 邵明柏,姜宏宇,王冠军.低剂量辐射对荷人小细胞肺癌(NCH-H446)裸小鼠移植瘤细胞凋亡的影响[J].中国老年学杂志,2005 25(3):297-299.

[2] 李修义,陈玉丙,夏凤琴,等.低剂量辐射对小鼠移植肿瘤生长和肿瘤诱生的影响[J].中国辐射卫生,1996 23(3):161-163.

[3] 冯乐平,夏春冬,苏士杰,等.低剂量辐射对荷瘤小鼠肿瘤抑制及对机体的保护作用[J].中国辐射卫生,1995 4(3):134-135.

[4] 于洪升,费从合,沈方臻,等.低剂量辐射对肿瘤细胞凋亡、细胞周期以及凋亡相关蛋白 bcl-2 的影响[J].中华放射医学与防护杂志,2003 23(3):171-173.

[5] 赵智慧,杨彦文,程亚梅,等.低剂量辐射兴奋效应及其生物临床意义[J].中国辐射卫生,2005 14(2):115-153.

[6] BERRINGTON A, DARBY S C, WEISS H A, et al. 100 years of observation on British radiologists' mortality from cancer and other causes 1897-1997[J]. Britain Journal of Radiology, 2001 74(882):507-519.

[7] 刘长安,杨光,邵玉霞,等.低剂量辐射兴奋效应及其潜在的临床应用价值[J].中华放射医学与防护杂志,2003 23(6):472-473.

[8] FEENEDEGEN E L. Significance of basic and clinical research in radiation medicine: challenges for the future[J]. BJR Suppl 2005 27:185-195.

[9] 谭业辉,王畅,王冠军.低剂量辐射对白血病模型小鼠治疗作用研究[J].吉林大学学报,2002 28(1):30-32.

[10] 李广宙,李显军,于明明.低剂量辐射对白血病小鼠血清 IL-2, TNF $\alpha$  及 SOD 的影响[J].中国辐射卫生,2007 16(1):20-21.

[11] MARIS M B, SHIZURU J A, GRENIX H, et al. Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose total-body irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors[J]. J Clin Oncol, 2006 24(3):444-453.

[12] TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate and adaptive immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2003 3:133-146.

(收稿日期:2007-03-05 修回日期:2007-07-02)