

局部辐照大鼠血清对成骨细胞增殖分化的影响

周轶 邹琼 丁巧灵 高建军 金慰芳 徐小雅

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 SD大鼠胫骨部位30 Gy照射2周和12周后处死,取血离心得血清;酶消化法分离培养新生SD大鼠头盖骨成骨细胞。采用MTT和PNPP法观察不同血清对成骨细胞增殖和分化的影响;用流式细胞仪观察成骨细胞周期变化;用Realtime PCR方法观察成骨细胞CyclinD、CyclinE、p21和p53的表达。结果显示:辐照2周和12周的大鼠血清抑制成骨细胞增殖,对成骨细胞ALP的表达无明显影响;辐照2周和12周的大鼠血清增加G1期成骨细胞比例,减少S期和G2期细胞比例;辐照2周大鼠血清抑制成骨细胞CyclinD和CyclinE的表达;12周大鼠血清促进成骨细胞p21和p53的表达,抑制成骨细胞CyclinE的表达。局部辐照大鼠血清通过抑制成骨细胞CyclinD和CyclinE表达,上调p21和p53的表达持续阻滞细胞于G1期抑制成骨细胞增殖。

关键词 电离辐射,大鼠血清,成骨细胞,增殖和分化

中图分类号 TL71, R818.74

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.050201

电离辐射的直接损伤作用已经众所周知。近来研究发现电离辐射的间接损伤效应亦存在,表现为非照射部位的损伤,即电离辐射的远端效应(Abscopal effect),远端效应的发生机制目前尚不清楚^[1]。细胞周期蛋白(Cyclin)是与细胞周期同步周期性浓度升降的蛋白质,包括周期蛋白A、B、D、E、G和H,它们与关键的蛋白质激酶——细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-dependent kinases, CDKs)结合,并调节它们的活性,从而推动和协调细胞周期的进行^[2]。p53-p21-CDK通路在细胞周期调控和修复过程中至关重要,p53能上调p21基因的表达,p21蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制剂,能够阻滞细胞周期^[3]。本文通过辐照大鼠血清观察其对成骨细胞的增殖分化的影响并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

二氧化碳培养箱,环流热空气消毒箱购自德国 Heraeus 公司;倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司;Mx3000P 实时定量 PCR 系统购自美国 Stratagene 公司;酶标仪 Elx800 购自美国 Bio-Tek 公司;流式细胞仪 Gallios 购自美国 BECKMAN

COULTER 公司;培养瓶/板/皿购自英国 Corning 公司;MEM 培养液和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;PNPP 购自美国 Amresco 公司;二甲基噻唑二苯基四唑盐酐购自上海思吉生物制品有限公司;细胞周期检测试剂盒购自碧云天;TRIZOL 试剂,M-MLV RT Kits 试剂盒,Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 实验动物

SD 雄性大鼠(复旦大学实验动物部)24只,体重为(300±20)g,随机分成对照组和照射组,每组12只大鼠,于照射前12h禁食,自由进水。氯胺酮(0.2 mL·100 g⁻¹)麻醉后,取仰卧位,四肢及头部固定于支架,胫骨部位标记定位,照射范围1 cm×1 cm,其余部位用铅板屏蔽(铅板厚4 cm),于¹³⁷Cs γ-射线辐照装置(复旦大学放射医学研究所,剂量率0.83 Gy·min⁻¹)进行照射30 Gy;对照组氯胺酮麻醉后不进行照射。照后2周和12周乌拉坦麻醉,颈动脉取血,分离血清,56℃水浴灭活,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,分装后于-20℃低温保存备用。

1.3 成骨细胞分离培养

新生(<24 h)的SD大鼠于70%酒精中浸泡消毒

基金资助:国家自然科学基金(81102071)和复旦大学青年教师科研能力提升项目(20520133100)资助

第一作者:周轶,女,1976年10月出生,2003年毕业于上海电视大学,目前为复旦大学放射医学研究所实验师

通讯作者:徐小雅,硕士,实验师,E-mail: xiaoyaxu@fudan.edu.cn

收稿日期:收稿 2014-05-26;修回 2014-07-07

10 min, 机械取下头盖骨, 置 PBS 内清除结缔组织后剪成 1 mm^2 大小, 0.25% Trypsin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预消化 20 min, 弃消化液, 再将骨片置 0.1% Collagenase II 振荡消化 $1\text{ h} \times 2$ 次, 合并 2 次消化液, $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 细胞沉淀用 10% FBS-MEM 重悬, 计数后接种于培养瓶, 置 5% CO_2 培养箱中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养。

1.4 辐照大鼠血清对成骨细胞增殖和分化的影响

取第二继代成骨细胞, 以 $1 \times 10^3 \cdot \text{孔}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔培养板, 次日起换含有 10% 辐照大鼠血清的 MEM 培养液, 每组 8 孔, 每孔 0.2 mL, 培养 3 d 后用 PBS 清洗, 每孔加入无血清 MEM 培养液 100 μL 及 MTT 10 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 4 h, 加入 20% 的 SDS 100 μL , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h, 经酶标仪 570 nm 波长测吸光度(A), 结果以 A_{570} 表示成骨细胞 MTT 结果。另一培养板培养 3 d 后用 PBS 清洗, 每孔加入 $50\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEA 100 μL , $3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNPP 50 μL $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 加入 $0.2\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 50 μL 终止反应, 在酶标仪 405 nm 波长测 A, 结果以 A_{405} 表示成骨细胞 ALP 变化。

1.5 成骨细胞周期检测

取第二继代成骨细胞以 $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 的密度接种于 35 mm 培养皿, 待细胞半汇合后更换含 2% FBS 的 MEM 培养液, 24 h 后更换 10% 辐照血清 MEM 培养 3 d 后 PBS 清洗, 0.25% 胰酶消化收集细胞, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, PBS 清洗 2 次, 预冷 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) 70% 无水乙醇固定细胞, 置于冰上 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, PBS 清洗 2 次。按试剂盒方法: 缓冲液 500 μL + PI 25 μL + RNase 10 μL , 加入每个样品后轻微吹打, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 流式细胞仪进行周期检测。

1.6 成骨细胞相关基因的表达

取第二继代成骨细胞, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔培养板, 待 80% 汇合时更换含 10% 辐照大鼠血清的 MEM 培养液, 24 h 后弃培养液, 每皿细胞均加入 TRIZOL 0.5 mL, 氯仿异丙醇法提取 RNA, DEPC 水溶解, 紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 计算 RNA 溶液浓度和纯度。按试剂盒方法进行逆转录和 Realtime PCR。引物序列, p21: forward 5'-CTGAGAGGCCTGAAGACTCC-3',

reverse 5'-CTCTTGCAGAAGACCAATCG-3' (115bp, XM006256128.1); p53: forward 5'-GCTTCGAGATGTTCCGAGAG-3', reverse 5'-TTTTATGGCGGGACGTAGAC-3' (135bp, XM006246595.1); CyclinD: forward 5'-TGGAGCCCCTGAAGAAGAG-3', reverse 5'-AAGTGCGTTGTGCGGTAGC-3' (424bp, NM171992.4); CyclinE: forward 5'-CTGGCTGAATGTTTATGTCC-3', reverse 5'-TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC-3' (386bp, NM001100821.1); GAPDH: forward 5'-AAACCCATCACCATCTTCCA 3', reverse 5'-GTGGTTCACACCCATCACAA 3' (198bp, DQ403053)。产物经融解曲线单峰验证, 于 T 阶段采集信号获得 C_t 值, 计算各测试基因与内参基因 GAPDH 比值作相对分析。

1.7 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的差异用 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 局部辐照大鼠血清抑制成骨细胞增殖

大鼠胫骨辐照后, 其血清抑制成骨细胞增殖。与对照组相比, 辐照 2 周血清组降低 24.8% ($p < 0.001$), 辐照 12 周血清组降低 22.8% ($p < 0.001$) (图 1); 辐照后血清对成骨细胞碱性磷酸酶表达无统计学差异 (图 2)。

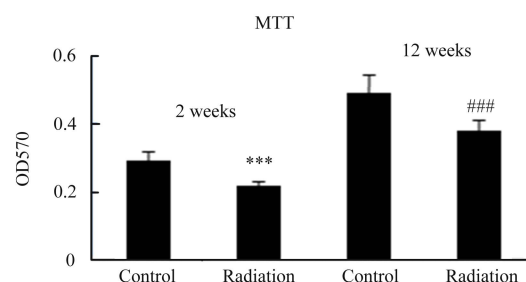


图 1 辐照后血清对成骨细胞增殖的影响
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=8$, *** $p < 0.001$, 辐照 2 周组与对照 2 周组比较, ### $p < 0.001$, 辐照 12 周组与对照 12 周组比较

Fig.1 Effects of irradiated serum on the osteoblast proliferation
Data are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=8$; *** $p < 0.001$, radiation (2 weeks) compared with control (2 weeks), ### $p < 0.001$, radiation (12 weeks) compared with control (12 weeks)

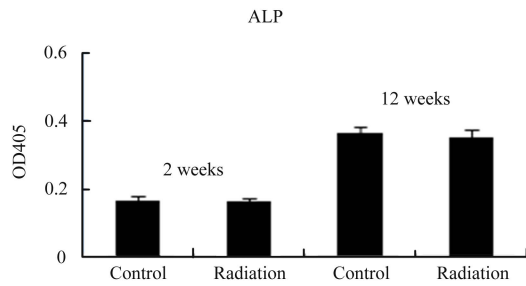


图2 辐照后血清对成骨细胞 ALP 表达的影响
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=8$

Fig.2 Effects of the radiated serum on the expression of ALP of osteoblast. Data are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=8$

2.2 辐照大鼠血清对成骨细胞周期影响

辐照大鼠血清影响成骨细胞各期细胞数量, G1

期成骨细胞增加, S 期和 G2 期成骨细胞减少。辐照 2 周大鼠血清作用于成骨细胞后, G1 期细胞较对照组的 80.41% 上升为 89.42% ($p<0.001$), S 期和 G2 期细胞则较对照组的 13.36% 和 6.23% 降低为 5.46% ($p<0.001$) 和 5.11% ($p<0.05$), G1 期与 S 期的细胞比值较对照组的 6.05 倍上升至 16.51 倍 ($p<0.001$), S 期和 G2 期的细胞比值较对照组的 2.16 下降至 1.07 ($p<0.001$)。辐照 12 周大鼠血清作用于成骨细胞后, G1 期细胞较对照组的 80.79% 上升为 89.23% ($p<0.001$), S 期和 G2 期细胞则较对照组的 12.73% 和 6.49% 降低为 5.05% ($p<0.001$) 和 5.72% ($p<0.05$), G1 期与 S 期的细胞比值较对照组的 6.37 倍上升至 17.68 倍 ($p<0.001$), S 期和 G2 期的细胞比值较对照组的 1.97 下降至 0.89 ($p<0.001$) (图 3, 表 1)。

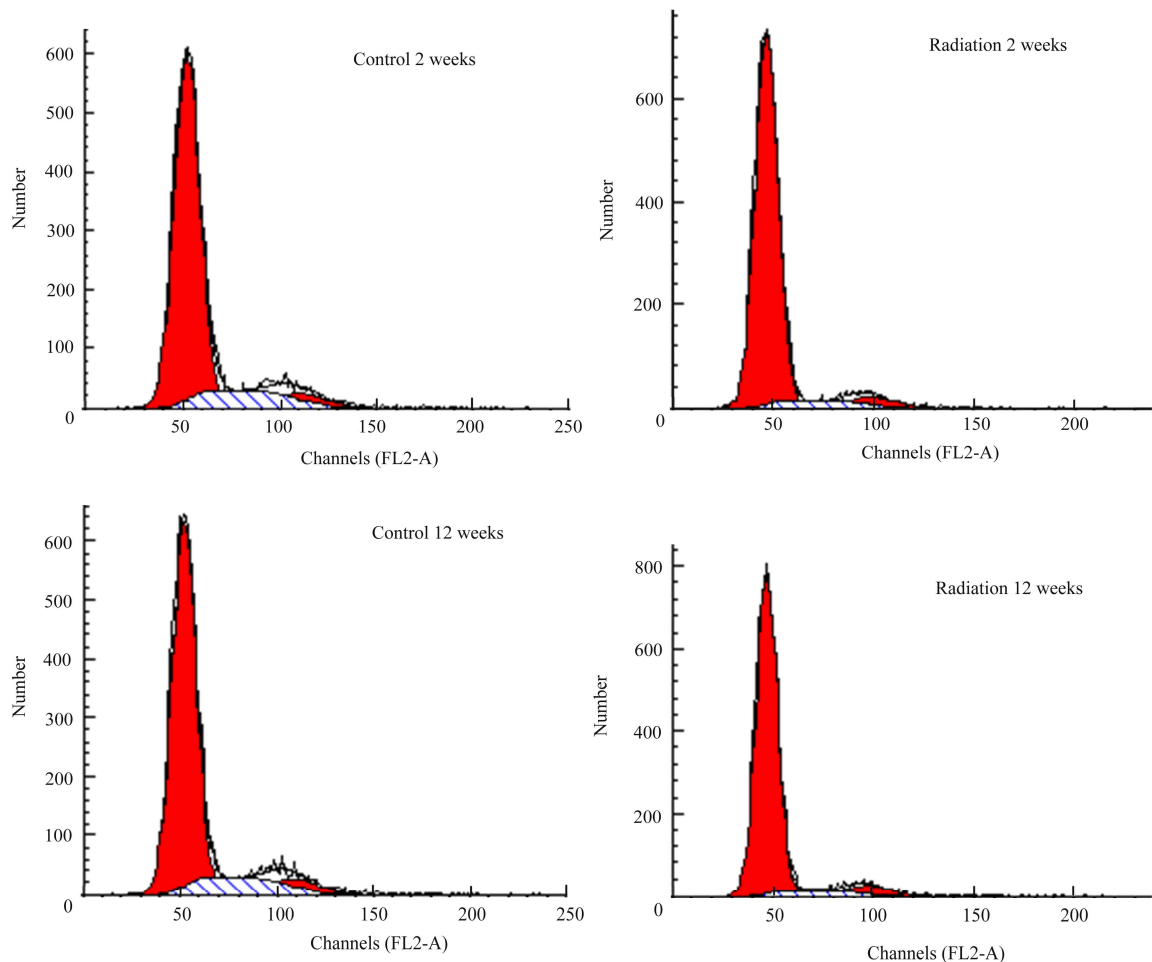


图3 成骨细胞周期流式分析图

Fig.3 Flow cytometric analysis diagram of the cell cycle of osteoblast

表 1 辐照血清对成骨细胞周期的影响
Table 1 Effects of irradiated serum on the cell cycle of osteoblast

($\bar{x} \pm s$)

	G2 / %	G1 / %	S / %	G1/S	S/G2
Control(2weeks)	6.23 $\pm$ 0.55	80.41 $\pm$ 1.53	13.36 $\pm$ 0.99	6.05 $\pm$ 0.46	2.16 $\pm$ 0.3
Radiation(2weeks)	5.11 $\pm$ 0.57*	89.42 $\pm$ 1.48***	5.46 $\pm$ 0.54***	16.51 $\pm$ 1.64***	1.07 $\pm$ 0.09***
Control(12weeks)	6.49 $\pm$ 0.43	80.79 $\pm$ 0.66	12.73 $\pm$ 0.91	6.37 $\pm$ 0.43	1.97 $\pm$ 0.23
Radiation(2weeks)	5.72 $\pm$ 0.34#	89.23 $\pm$ 1.25###	5.05 $\pm$ 0.12###	17.68 $\pm$ 0.62###	0.89 $\pm$ 0.06###

注: $n=6$, * $p<0.05$, *** $p<0.001$, 辐照 2 周组与对照 2 周组比较, # $p<0.05$, ### $p<0.001$, 辐照 12 周组与对照 12 周组比较。
Note: $n=6$; * $p<0.05$, *** $p<0.001$, radiation (2 weeks) compared with control (2 weeks), # $p<0.05$, ### $p<0.001$, radiation (12 weeks) compared with control (12 weeks)

2.3 辐照大鼠血清对成骨细胞 CyclinD 和 CyclinE 表达的影响

辐照 2 周血清抑制成骨细胞 CyclinD 的表达较对照组下调 13.3%($p<0.05$), 12 周血清组较对照组下调 9.8%($p>0.01$) (图 4); 辐照大鼠血清抑制成骨细胞 CyclinE 的表达, 辐照 2 周血清组较对照组下调 29.8%($p<0.05$), 辐照 12 周血清组较对照组下调 24.01%($p<0.05$) (图 5)。

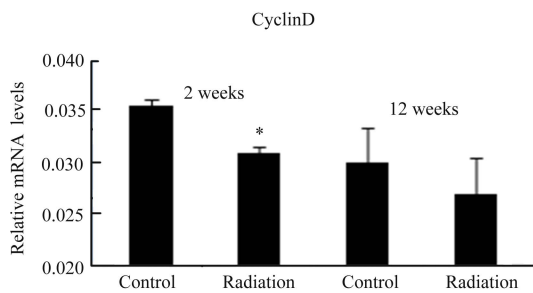


图 4 CyclinD 的 mRNA 表达
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=4$, * $p<0.05$, 辐照 2 周组与对照 2 周组比较

Fig.4 The relative mRNA expression of CyclinD
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; * $p<0.05$, radiation (2 weeks) compared with control (2 weeks)

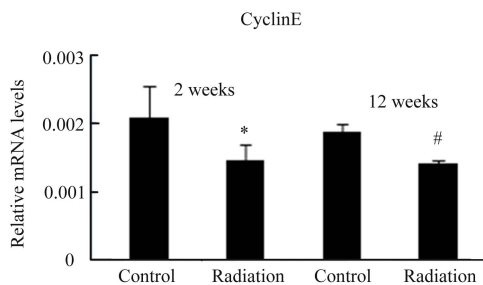


图 5 CyclinE 的 mRNA 表达
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=4$, * $p<0.05$, 辐照 2 周组与对照 2 周组比较, # $p<0.05$, 辐照 12 周组与对照 12 周组比较

Fig.5 The relative mRNA expression of CyclinE
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; * $p<0.05$, radiation (2 weeks) compared with control (2 weeks), # $p<0.05$, radiation (12 weeks) compared with control (12 weeks)

2.4 辐照大鼠血清对成骨细胞 p21 和 p53 表达的影响

辐照大鼠血清对成骨细胞 p21 和 p53 的表达有时间差异性, 辐照 2 周血清组 p21 和 p53 的表达较对照组下降 8.4%和 12.5%, 但无统计学差异; 辐照 12 周血清组 p21 和 p53 表达增加, 较对照组分别上调 33.1%($p<0.05$)和 112.9%($p<0.01$), 与对照组比较有统计学差异 (图 6 和图 7)。

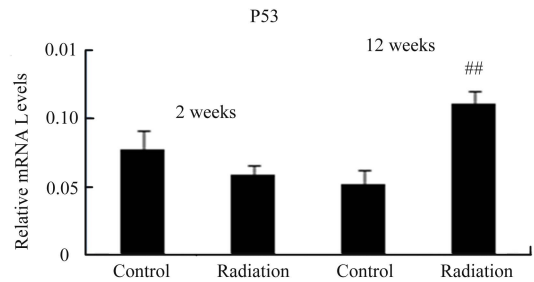


图 6 P53 的 mRNA 表达
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=4$, ## $p<0.01$, 辐照 12 周组与对照 12 周组比较

Fig.6 The relative mRNA expression of P53
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ## $p<0.01$, radiation (12 weeks) compared with control (12 weeks)

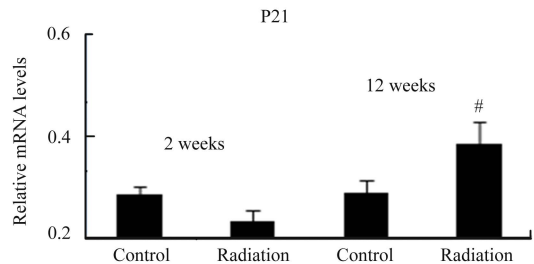


图 7 P21 的 mRNA 表达
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=4$, # $p<0.05$, 辐照 12 周组与对照 12 周组比较

Fig.7 The relative mRNA expression of P21
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; # $p<0.05$, radiation (12 weeks) compared with control (12 weeks)

3 讨论

放射性骨损伤(Radiation bone injuries)是临床恶性肿瘤放射治疗中受照人员常见的并发症之一。以往的研究认为是射线对骨组织相关细胞和骨微环境的直接损伤效应导致了放射性骨损伤的发生,但最近一些研究发现腹部恶性肿瘤放疗后出现了远端非照射部位骨组织的损伤。Kristensen 等^[4-5]研究表明子宫癌病人放疗后盆骨疼痛及腰椎痛的发病率明显上升, Jia 等^[6-7]研究也发现小鼠腹部照射后会导致非照射的胫骨和股骨骨量丢失,可致骨质量快速恶化。这种先前未受关注的放疗副反应,即电离辐射对骨骼的损伤效应也表现为远端效应(Abscopal effect)。放射性骨损伤远端效应表明射线对骨的损伤不能简单归因于受照骨骼对辐射能量的直接吸收,必然存在其它因素的影响。考虑到血液的全身流动性,局部辐照后是不是有物质释放入血随血循环至远处造成骨损伤,为此我们取局部辐照大鼠的血清作用于正常成骨细胞观察对其影响。胫骨局部辐照 2 周后其血清抑制成骨细胞增殖,较对照组下降 24.8%($p<0.001$), 12 周后辐照大鼠血清依然抑制成骨细胞增殖,较对照组下降 22.8%($p<0.001$);辐照大鼠血清对成骨细胞碱性磷酸酶表达无明显影响。实验结果表明辐照大鼠血清主要影响成骨细胞增殖且随时间延长其增殖抑制效应无明显改善。

进一步的流式细胞周期分析表明,辐照血清使 G1 期成骨细胞增加, S 期和 G2 期成骨细胞减少,阻滞成骨细胞于 G1 期从而抑制细胞增殖。细胞增殖是细胞最基本的生理活动,细胞增殖受抑制归根到底是影响了细胞周期的运行。细胞周期的顺利运行依赖于细胞周期蛋白(Cyclin),细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)以及各种激酶抑制剂的正确表达和调控。Cyclin D 在细胞周期中首先被合成, Cyclin D 的功能主要是促进细胞增殖。Cyclin E 在 Cyclin D 之后出现,于 G1/S 转化过程中表达,在 G1 晚期发挥正调控细胞周期的作用。在 G1-S 期, CyclinE 与 CDK2 结合,促进细胞通过 G1/S 限制点而进入 S 期^[8-9]。本实验中辐照 2 周血清抑制成骨细胞 CyclinD 和 CyclinE 的表达,分别较对照组下调 13.3%($p<0.05$)和 29.8%($p<0.05$),辐照 12 周血清主要抑制 CyclinE 的表达,较对照组下调 24.01%($p<0.05$)。实验结果表明辐照血清通过抑制细胞 CyclinD 和 CyclinE 的表达,主要是下调 CyclinE 的

表达影响细胞通过 G1/S 限制点,从而使成骨细胞阻滞于 G1 期。p21 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CDK inhibitor, CKI)对细胞周期起负调控作用,通过竞争性地抑制 Cyclin 或 Cyclin-CDK 复合物,导致 Cyclin 生物学功能丧失,对细胞生长起负调控作用, p53 可上调 p21 的表达使细胞周期阻滞于 G1 期^[10]。本实验中我们观察到辐照 12 周血清促进成骨细胞 p53 和 p21 的表达,较对照组上调 33.1% ($p<0.05$)和 112.9% ($p<0.01$)。结果表明,辐照血清不仅通过下调成骨细胞周期蛋白 CyclinD 和 CyclinE 的表达,并且通过上调周期蛋白激酶抑制因子 p53 和 p21 的表达抑制 p53-p21-CDK 通路从而阻滞成骨细胞于 G1 期。

综上所述,辐照 2 周大鼠血清通过抑制 CyclinD 和 CyclinE 的表达阻滞成骨细胞于 G1 期,辐照 12 周时则通过抑制 CyclinE 的表达和促进 p53 和 p21 的表达阻滞成骨细胞于 G1 期,从而持续抑制成骨细胞增殖。

参考文献

- 1 Kaminski J M, Shinohara E, Summers J B, *et al.* The controversial abscopal effect [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2005, **31**(3): 159-172.
- 2 Inaqaki S, Umeda M. Cell-cycle control and plant development [J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2011, **291**: 227-261.
- 3 Kuribayashi K, El-Deiry W S. Regulation of programmed cell death by the p53 pathway [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, **615**: 201-221.
- 4 Onsrud M, Cvancarova M, Kristensen G B, *et al.* Long-term outcomes after pelvic radiation for early-stage endometrial cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2013, **31**(31): 3951-3956.
- 5 Vistad L, Cvancarova M, Kristensen G B, *et al.* A study of chronic pelvic pain after radiotherapy in survivors of locally advanced cervical cancer [J]. *Journal of Cancer Survivorship*, 2011, **5**(2): 208-216.
- 6 Jia D, Gaddy D, Suva L J, *et al.* Rapid loss of bone mass and strength in mice after abdominal irradiation [J]. *Radiation Research*, 2011, **176**(5): 624-635.
- 7 Jia D, Koonce N A, Halakatti R, *et al.* Repression of multiple myeloma growth and preservation of bone with combined radiotherapy and anti-angiogenic agent [J]. *Radiation Research*, 2010, **173**(6): 809-817.

- 8 Stamatakos M, Palla V, Karaikos I, *et al.* Cell cyclins: triggering elements of cancer or not [J]. World Journal of Surgical Oncology, 2010, **22**(8): 111-116.
- 9 Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKs in development and cancer: lessons from genetically modified mice [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, **1**(11): 1164-1188.
- 10 Mirzayans R, Andrais B, Scott A, *et al.* New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, **2**(12): 1703-1725

Effects of serum of local radiated rat on the proliferation and differentiation of osteoblast

ZHOU Yi ZOU Qiong DING Qiaoling GAO Jianjun JIN Weifang XU Xiaoya

(Institute of Radiation Medicine of Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT The tibia of rat was irradiated at the dose of 30 Gy, and then the rats were killed at 2 and 12 weeks after radiation to collect the serum; the osteoblast was cultured from cranium of fetal rat with enzymatic digestion method, and then the proliferation and differentiation of osteoblasts were detected by MTT and PNPP after 72 h, and the cell cycle of osteoblasts were detected by flow cytometry, meanwhile, the mRNA expression of cyclinD, cyclinE, p21 and p53 of the osteoblast were detected after 24 h. The results showed that the serum of the radiated rats inhibits the proliferation of osteoblast and increases the number of osteoblast in G1 phase, while decreases the number of osteoblast in S phase and G2 phase. Serum from the radiated rats 2 weeks later down-regulates the mRNA expression of CyclinD and CyclinE, meanwhile the serum from the radiated rats 12 weeks later up-regulates the mRNA expression of p21 and p53 and down-regulate the mRNA expression of CyclinE. The results suggest that the serum of the radiated rat inhibits the proliferation of osteoblast by down-regulating the expression of CyclinD and CyclinE and up-regulating the expression of p21 and p53 which retards osteoblasts in G1 phase.

KEYWORDS Ionizing radiation, Rat serum, Osteoblast, Proliferation and differentiation

CLC TL71, R818.74