

人外周血白细胞黏附分子的辐射效应研究

李海军 程赢 乐晨 闵锐

【摘要】目的 研究外周血白细胞表面黏附分子的表达及其介导的细胞黏附能力变化与辐射剂量的关系。**方法** 人外周血细胞经不同剂量照射后不同时间用流式细胞仪双色标记分析不同白细胞表面不同黏附分子表达, 特异底物包被微孔板法和结晶紫染色分析检测单核细胞对不同底物的黏附能力。**结果** 单核细胞表面 CD11b 和粒细胞表面 CD29 表达下降与辐射剂量间存在良好量效关系, 照射后单核细胞对底物 β 1-整合素和胶原蛋白 I 的黏附能力改变与辐射剂量间存在一定量效关系。**结论** 外周血白细胞表面黏附分子表达及功能改变展现出的与辐射剂量间的良好关系, 为进一步深入研究将其作为评估生物受照剂量指标的可能打下基础。

【关键词】 剂量效应关系, 辐射; 白细胞; 细胞黏附分子; 细胞黏附

Research on effects of ionizing radiation of human peripheral blood white cell adhesive molecules

LI Hai-jun, CHENG Ying, LE Chen, MIN Rui

(Department of Radiation Medicine in Navy Medicine Faculty, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To investigate the links between expression and function of adhesive molecule on the surface of irradiated peripheral blood white cells. **Methods** Heparinized human peripheral blood was exposed to γ rays with different dose. At the different post-radiation time adhesive molecule expression on cellular surface was determined by double fluorescence labeling antibodies which were against adhesive molecule and special mark of granulocyte or mononuclear cell respectively with flow cytometry, and cellular adhesive ability to different matrixes mediated by adhesive molecule was estimated by commercializing enzyme-linked immunosorbent assay kit and crystalviolet dying. **Results** A decline pattern of CD11b on surface of mononuclear cells and CD29 on surface of granulocyte with irradiation dose increase was found. The changes of adhesive ability of mononuclear cells to substance of β 1-integrin and collagen-I was well related with irradiation dose. **Conclusion** Good relationship shown by the changes of adhesive molecule expression and adhesive ability mediated by the molecules on the surface of peripheral blood white cells with radiation dose was primary base of further research on indicting exposure dose by biomarker.

【Key words】 Dose-response relationship, radiation; Leukocyte; Cell adhesion molecule; Cell adhesion

细胞黏附分子泛指一类调节细胞与细胞间、细胞与细胞外基质间相互结合和起黏附作用的膜表面糖蛋白, 其广泛存在于白细胞、内皮细胞及上皮细胞中。有文献报道, 不同组织细胞受电离辐射(包括肿瘤放射治疗)后一定时间内, 某些细胞黏附分子表达发生不同程度的改变, 其改变程度与辐射剂量和照后分析时间有关^[1,2]。目前, 这类现象只在受到照射的上皮细胞和内皮细胞上发现, 而受射线

照射后人外周血白细胞表面黏附分子及其介导的细胞黏附功能是否发生变化、与辐射剂量的关系如何等尚不十分了解。本研究报告人外周血离体受不同剂量 γ 射线照射后不同时间, 白细胞表面黏附分子及黏附分子介导的细胞特异黏附功能改变, 探讨其与辐射剂量的关系。

1 材料与方法

1.1 血细胞照射

无菌采集人外周静脉血 20 ml 后, 用肝素抗凝 (50 U/ml), 分成 4 组, 分别接受 0、2、4 和 6 Gy

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370444)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学海军医学系放射医学教研室

通讯作者: 闵锐 (E-mail: minrui021@hotmail.com)

γ 射线照射, 剂量率为 47.3 cGy/min (^{60}Co 放射治疗仪, 上海医用核子仪器厂)。照后全血细胞加入等体积含 10% 小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司) 的 RPMI-1640 培养液 (美国 Invitrogen 生命技术公司, GIBCO), 置于 37 °C、95% 空气、5% CO_2 培养箱中待分析。

1.2 细胞黏附分子表达检测

不同剂量照射后各时间点 (照后立即、6、12、24 h) 取抗凝全血 200 μl , 320 \times g 离心 5 min 去血浆, 混悬细胞沉淀, 分别加入 5 μl 抗不同黏附分子的荧光标记抗体 CD11a-异硫氰酸荧光素、CD11b-藻红蛋白、CD18-异硫氰酸荧光素、CD29-藻红蛋白、CD49d-藻红蛋白、CD54-异硫氰酸荧光素 (以上抗体均购自美国 Becton Dickinson Pharmingen 公司), 单核细胞标志抗体 CD14-藻红蛋白、CD14-吡啶二碳菁和粒细胞标志抗体 CD13-藻红蛋白、CD13-吡啶二碳菁 (中国晶美生物工程有限公司) 双染, 室温避光孵育 20 min 后加入红细胞裂解液 (Becton Dickinson), 4 °C 孵育 15 min, 离心, 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 细胞沉淀用 0.3 ml 磷酸缓冲液重悬, 每份样本检测 50 000 个细胞, 流式细胞仪分别分析表达 CD11a、CD11b、CD18、CD29、CD49d 和 CD54 不同黏附分子的单核细胞、粒细胞阳性细胞数, 确定每种黏附分子表达的相对强度。

1.3 细胞黏附分析

血样加入 10 ml Dextran T500 (瑞典 Pharmacia 公司) 室温静置 25 min 沉淀红细胞, 取上清, 用含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液洗涤 3 次, 淋巴细胞分离液 (上海华精生物高科技有限公司) 用 580 \times g 离心, 20 min, 分离得到单核细胞 (Ficoll 离心法), 细胞用含 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液洗 2 次, 同样用磷酸缓冲液重悬细胞, 镜下计数细胞, 调节终细胞数至 $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ 。取 150 μl 细胞悬液分别加入由整合素包被的微孔板 (酶联免疫分析试剂盒, 美国 Chemicon 公司) 和由胶原蛋白 IV (Sigma 公司)、胶原蛋白 I (美国 Sigma 公司)、免疫球蛋白 G (美国 Biovision 公司)、健康人混合血清不同底物包被的 96 孔板中, 两复孔。前者按试剂盒操作说明书操作, 后者微孔板置 37 °C、95% 空气、5% CO_2 培养箱中 3 h 取出, 吸弃未黏附的细胞, 磷酸缓冲液洗 2 次, 用新鲜配制的 0.75% 结晶紫 (含结晶紫 0.075 g、氯化钠 0.025 g、无水乙醇

5 ml、纯甲醛 0.175 ml, 定容至 10 ml) 染色 10 min, 双蒸水洗 3 次, 置 37 °C 烘干 1 h 或室温避光过夜。加入纯甲醇 75 $\mu\text{l}/$ 孔, 摇床 5 min, 上微孔板读数仪 550 nm 处测光密度值。

1.4 数据处理

采用单因素方差分析对数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 黏附分子表达与辐射剂量关系

利用双色荧光标记分别检测粒细胞和单核细胞表面多种黏附分子表达, 4 次重复实验的结果表明, 在不同照后时间, 粒细胞、单核细胞表面黏附分子的表达随照射剂量发生不同改变, 在某些时间点, 黏附分子的表达与辐射剂量有较好的效应关系, 如照后 6 h 粒细胞表面 CD11b 的表达随照射剂量的增加而增加 (图 1); 而单核细胞 CD11b 的表达则随照射剂量增加而下降, 如照后 6 h, 2 Gy 时 CD11b 下降 11.6%、4 Gy 时下降 10.3%、6 Gy 时下降 21.4% (图 2)。

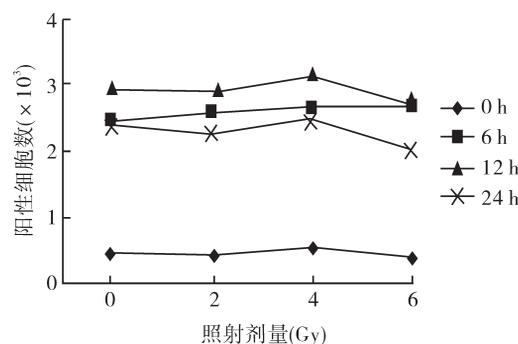


图 1 粒细胞表面 CD11b 表达与辐射剂量的关系

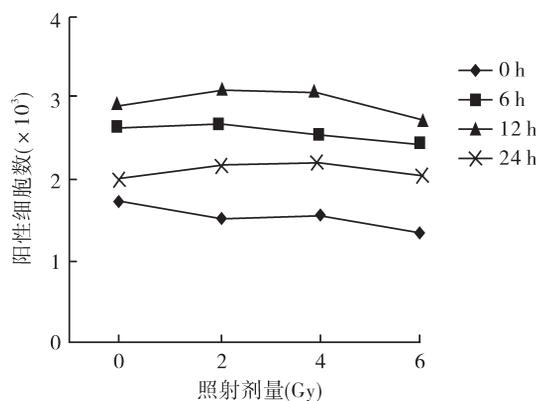


图 2 单核细胞表面 CD11b 表达与辐射剂量的关系

在不同照后时间, 单核细胞和粒细胞表面 CD29 的表达均表现为随照射剂量的增加而下降,

而且照射和未照射细胞在 37 °C 孵育一段时间后 CD29 表达阳性细胞数都有不同程度的增加 (图 3 和图 4)。

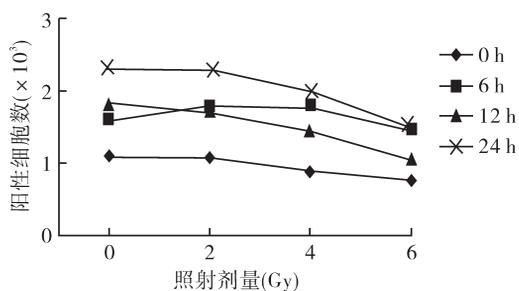


图 3 粒细胞表面 CD29 表达与辐射剂量的关系

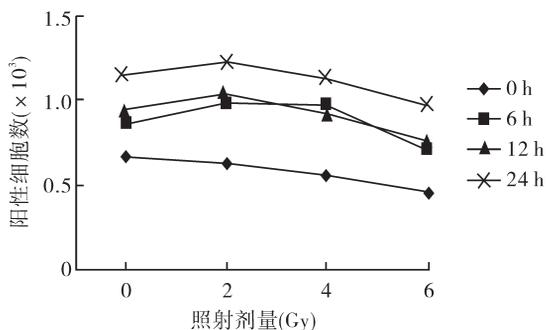


图 4 单核细胞表面 CD29 表达与辐射剂量的关系

细胞受不同剂量照射后不同时间其他黏附分子 (CD11a、CD18、CD54、CD49d 等) 的表达虽然也表现出一定的改变, 但数据分析表明无论是粒细胞还是单核细胞, 这些改变均无统计学意义。

2.2 细胞黏附能力与辐射剂量的关系

3 次独立的底物包被外周血单核细胞黏附功能测定结果表明, 在照后 6 h, 细胞对 $\beta 1$ -整合素的黏附功能随照射剂量增加而增强 (图 5)。

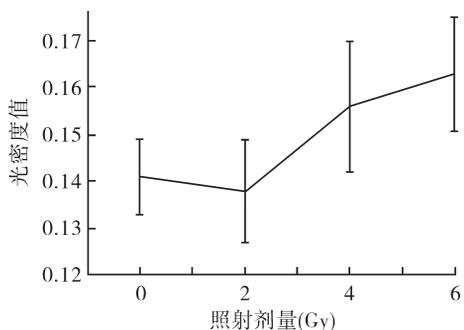


图 5 细胞对底物整合素的黏附能力

受照单个核细胞对胶原蛋白 IV、胶原蛋白 I、免疫球蛋白 G 和混合血清为底物的黏附能力在受照 2 Gy 后表现出增加, 但在 2 Gy 以上照射后细胞

黏附能力与受照 2 Gy 时的黏附能力增高比略有下降 (图 6)。

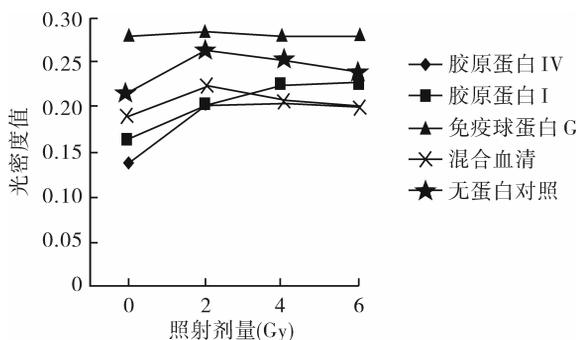


图 6 细胞对不同底物的黏附能力

3 讨论

急性和慢性辐射损伤伤员的分类诊断和治疗、电离辐射对健康的危害和辐射安全评估等都需要了解和确定受照射剂量, 现有的物理剂量计虽然在准确性和可靠性方面都大大提高, 基本上能满足职业条件下对个人和环境辐射剂量监测的需要, 但在突发放射性事故存在大量人群需要进行受照射剂量调查的情况下, 在一些个人或人群未能佩带适当的物理剂量计而其他的现场物理剂量记录又不能及时得到的事故情况下, 物理方法检测个体受照射剂量成为不可能。因此, 寻找更好的、能代替物理方法检测人员受照射剂量的生物学剂量的方法是放射医学研究的重要内容之一^[3]。

早在 1996 年, Hallahan 等^[4] 就发现小鼠肺局部照射后肺内皮细胞的 E-选择素及细胞间黏附分子 1 的表达量升高, 且这种表达具有时间和剂量效应关系: E-选择素表达的阈剂量是 1Gy, 在照射后 6 h 开始表达, 并且主要在大血管的内皮细胞中表达; 细胞间黏附分子 1 表达的阈剂量是 5 Gy, 但要在照后 24 h 才开始表达。Cordes 等^[5] 对体外培养的两种肺肿瘤细胞系 A549 及 SKMES1 进行研究, 当它们受到 2 Gy 及 6 Gy 的 X 射线照射后, $\beta 1$ -整合素的表达量均明显升高, 同时伴随着黏附能力的增强。Gaber 等^[6] 对小鼠脑细胞进行大剂量一次照射和多次照射发现, 当接受 20 Gy 的单一剂量照射后 2 h, 细胞间黏附分子 1 mRNA 表达升高 14 倍, 而细胞间黏附分子 1 蛋白的表达在照后 24 h 升高 2.77 倍; 分次照射达到总剂量 40 Gy (2 Gy/d), 细胞间黏附分子 1 mRNA 表达升高 3.55 倍。近年来

的研究也发现, 电离辐射能诱导细胞黏附分子及基质金属蛋白酶等细胞表面糖蛋白表达的改变^[7]。由于细胞黏附分子主要介导细胞-细胞间信号识别及黏附和迁移, 基质金属蛋白酶可以降解细胞外基质, 部分参与细胞黏附和迁移, 若电离辐射能诱导细胞黏附分子及基质金属蛋白酶表达改变, 应相应伴随着这些分子介导的细胞黏附和迁移功能的改变, 这一系列变化若与照射剂量和照后时间存在一定的剂量效应关系, 那么开展电离辐射诱导的黏附分子及功能的改变与剂量关系的研究很有可能发展成为一种新的生物剂量检测指标和方法。

本研究受上述研究结果的启发, 通过检测不同剂量照射后不同时间人外周血细胞黏附分子表达及介导的细胞黏附功能的变化, 探讨利用这些指标来评估生物体受照射剂量的可能性。初步的实验结果表明, 外周血受电离照射后不同时间, 不同白细胞表面不同黏附分子的表达变化与辐射剂量存在一定程度的相关性, 如照后 6 h 粒细胞 CD11b 表达在 2~6 Gy 范围随剂量增加而增加; 在照后不同时间, 粒细胞 CD29 的表达随照射剂量增加而下降; 在照后不同时间, 外周血单核细胞表达 CD11b 和 CD29 基本上随照射剂量增加而下降。细胞黏附功能实验表明, 单核细胞受照后对不同底物的黏附能力改变与受照剂量有关, 如对胶原蛋白 I 的黏附能力在 6 Gy 照射剂量范围内随照射剂量增加而增加, 对 β 1-整合素底物的黏附能力只在 2 Gy 以上照射组随照射剂量增加而增加, 而其他底物的黏附能力仅在 2 Gy 照射组增加。这些结果对于筛选具有指示生物受照剂量能力的指标提供了初步的并且总有用的信息。

由于本组报告的实验样本量较少, 实验批数不多, 实验过程中尚存在一些需要通过优化实验条件和改善实验操作技能来解决的问题, 如细胞黏附分析过程中的细胞染色和染色后的洗涤程序对实验结果的影响等, 文中提及的分析指标和分析方法能否最终用于指示生物受照剂量尚有很多深入细致和复杂的工作需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Quarumby S, Hunter RD, Kumar S. Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(5B): 3375-3381.
- [2] Van der Meeren A, Vandamme M, Squiban C, et al. Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice[J]. *Radiat Res*, 2003, 160(6): 637-646.
- [3] 闵锐. 电离辐射生物剂量研究现状[J]. *国外医学·放射医学核医学分册*, 2004, 28 (3): 121-127.
- [4] Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte to the vascular endothelium [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(22): 5150-5155.
- [5] Cordes N, Blaese MA, Meineke V, et al. Ionizing radiation induces up-regulation of functional beta1-integrin in human lung tumor cell lines in vitro[J]. *Int J Radiat Biol*, 2002, 78(5): 347-357.
- [6] Gaber MW, Sabek OM, Fukatsu K, et al. Differences in ICAM-1 and TNF- α expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain [J]. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79(5): 359-366.
- [7] Susskind H, Hymowitz MH, Lau YH, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lun and breast cancer are altered during chest radiotherapy[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 56(4): 1161-1169.

(收稿日期: 2008-01-28)

2008 年亚太地区肿瘤生物学和医学学术会议暨第三届 中国中青年肿瘤专家论坛即将召开

由中国抗癌协会肿瘤标志专业委员会主办, 中华医学会核医学分会、江苏省抗癌协会肿瘤标志专业委员会协办, 中华医学会南京分会、南京医科大学附属南京第一医院、江苏省肿瘤防治研究所、南京临床核医学中心承办的“2008 年亚太地区肿瘤生物学和医学学术会议暨第三届中国中青年肿瘤专家论坛”定于 2008 年 10 月 20 日—24 日在江苏省南京市召开。这是我国肿瘤生物学领域的一次重大盛会, 来自美国、欧洲、日本、韩国等国家的著名学者和我国在该领域做出卓越贡献的两院院士和专家将作精彩的大会报告和专题讲座。本届大会的召开已受到世界肿瘤生物学界及肿瘤临床工作者的广泛关注, 届时大会的与会代表将达到 600 人以上。详细信息可上网查询, 网址: <http://www.njcncm.com>