文章编号:1000-5404(2005)18-1817-03

论著

# 辐射损伤对巨核细胞造血调控因子 IL-6 和 TNF-α 的影响

韩 京,冉新泽,粟永萍,李启明,郑怀恩 (第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

**提 要: 目的** 探讨辐射损伤对巨核细胞调控因子 IL-6 和 TNF-α 表达的影响。**方法** 用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测辐射后 Dami 细胞 IL-6、TNF-α 表达水平的变化。**结果** 辐射损伤 3、5、10 Gy 后,IL-6 的 mRNA 水平和蛋白水平表达均显著低于对照组($P<0.05$),其变化趋势是随照射剂量增加而表达逐渐降低。TNF-α 在 mRNA 水平变化无显著性差异,但在蛋白水平表达则显示,3 个剂量组均显著高于对照组($P<0.05$),并随剂量增加表达逐渐升高。**结论** 不同剂量放射损伤所致造血功能障碍与巨核细胞调控因子 IL-6 和 TNF-α 的异常表达有关。

**关键词**: 辐射;巨核细胞;IL-6;TNF-α
**中图法分类号**: R331.1;R392.11;R818.023 **文献标识码**: A

# Effects of irradiation on expression of IL-6 and TNF-α in Dami cells

HAN Jing, RAN Xin-ze, SU Yong-ping, LI Qi-ming, ZHENG Huai-en (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To analyse the expression of IL-6, TNF-α in Dami cells after exposure to $^{60}$Co γ-radiation. **Methods** Dami cells irradiated with $^{60}$Co γ-rays were usded to analyze the IL-6 and the TNF-α expression by RT-PCR and Western blotting in 24 h after irradiation. Normal Dami cells were used as control. **Results** The expression of IL-6 in Dami cells after irradiation at the dose of 3 Gy, 5 Gy, and 10 Gy was lower than that in normal Dami cells ($P<0.05$). The protein expression of TNF-α in Dami cells after irradiation was higher than that in normal Dami cells ($P<0.05$). The expression of IL-6 and TNF-α showed a direct correlation with the dose. **Conclusion** γ-radiation inhibits IL-6 expression but promotes TNF-α expression, suggesting that the abnormal expression of IL-6 and TNF-α in Dami cells is involved in the injury of hemopoiesis by γ-radiation.

**Key words**: irradiation; megakaryocyte; IL-6; TNF-α

辐射损伤及其复合伤后,造血系统功能受到严重障碍,极大地影响其预后与转归。近年研究表明,白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)可参与骨髓巨核细胞的增殖、分化和凋亡,在造血调控中起重要作用[1~4],但其调控机制仍需深入研究。本实验采用来源于巨核细胞白血病病人的 Dami 细胞株(Dami),用 $^{60}$Co γ 射线不同剂量照射,观测照射后 IL-6 和 TNF-α 基因表达水平的变化,为进一步探讨辐射损伤引致造血功能障碍的发生机制提供实验依据。

**基金项目**:国家自然科学基金重点资助项目(30230360)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30230360)
**作者简介**:韩 京(1981-),女,山东省济南市人,硕士研究生,主要从事辐射损伤及其复合伤的造血调控方面的研究。电话:(023)68771724,E-mail:hanjing8107@yahoo.com.cn
**通讯作者**:粟永萍,电话:(023)68752009
**收稿日期**:2005-05-30;**修回日期**:2005-06-28

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及培养条件

Dami 细胞株(上海细胞生物研究所)表达巨核细胞表面标志,如 GpⅡb/Ⅲa,GpⅠb 和 vw 因子。细胞培养体系为含 10% 小牛血清(天津 TBD)的 RPMI1640 培养液(Gibco),放置37 ℃、5% $CO_2$ 饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.2 实验分组

实验设正常对照与辐射实验两组。对照组为正常 Dami 细胞,不做任何处理;实验组用 $^{60}$Co γ 射线分别将 Dami 细胞一次性均匀照射 3、5、10 Gy,并继续培养 24 h 后收集细胞进行处理。

### 1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

引物由上海生工合成:β-actin:5′-GGCATGGGTCAGAAGGATTCC-3′、5′-ATGTCACGCACGATTTCCCGC-3′ (500 bp);IL-6:5′-GTGAAAGCAGCAAAGAGGC-3′、5′-CATTTGTGGTTGGGTCAGG-3′ (240 bp);TNF-α:5′-CCTGGTATGAGCCCATCTATC-3′、5′-CGAAGTGGTCTTGTTGC-3′ (330 bp)。总 RNA 提取参照 Trizol 提取说明书,用紫外微量分光光度计定量。cDNA 合成及 PCR

均按 TAKARA 公司试剂及说明书进行。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪(Gel Doc1000,Bio-Rad)分析。

### 1.4 免疫印迹(Western blotting)

细胞总蛋白提取按《分子克隆实验指南》第 2 版方法进行,用等体积 2×SDS 加样缓冲液变性蛋白质,煮沸后以 30 μg 蛋白质/泳道等量上样,10% SDS-PAG 电泳分离不同分子量蛋白质,在 4 ℃转移到硝酸纤维素膜。一抗为 IL-6,TNF-α 羊多克隆抗体(Santcruz 公司,工作浓度为 1∶1 000),二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗 IgG(武汉博士德公司,工作浓度为 1∶200),并以 β-actin 作为内对照。

### 1.5 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件作方差分析。

## 2 结果

### 2.1 IL-6 和 TNF-α 在 mRNA 水平的表达变化

表 1 可见,对照组和实验组 Dami 细胞均有 IL-6 和 TNF-α 表达,但放射损伤后,IL-6 的 mRNA 表达显著降低,且随剂量增加而表达逐渐降低;至 10 Gy 时,IL-6 表达水平显著低于对照组($P<0.01$)。在 TNF-α 的 mRNA 表达方面,无论对照组或各辐射组,组间均无显著性差异($P>0.05$)。

**表 1 Dami 细胞照射后 IL-6 和 TNF-α 的 mRNA 表达变化[$(\bar{x} \pm s)$%]**

**Tab 1 The mRNA expression of IL-6 and TNF-α in Dami cells after irradiation[$(\bar{x} \pm s)$%]**

| Group | Dose (Gy) | mRNA expression | |
|---|---|---|---|
| | | IL-6 | TNF-α |
| Control | 0 | 59.78 ± 6.03 | 62.35 ± 5.07 |
| Irradiation | 3 | 43.56 ± 3.06 * | 62.32 ± 6.01 |
| | 5 | 34.42 ± 3.23 * | 64.38 ± 5.47 |
| | 10 | 23.53 ± 1.35 ** | 65.83 ± 5.72 |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

### 2.2 IL-6 和 TNF-α 在蛋白水平的表达变化

放射损伤后,IL-6 蛋白表达均显著低于对照组,其变化趋势与 IL-6 的 mRNA 表达结果一致(表 2),各实验组与对照组间均有显著性差异($P<0.05$)。10 Gy 照射时,IL-6 表达显著低于对照组($P<0.01$),也低于较小剂量照射的 3 Gy 和 5 Gy 组($P<0.05$)。但对 TNF-α 的蛋白表达变化,各实验组均显著高于对照组($P<0.05$),10 Gy 时差异更加显著($P<0.01$)。同时可见,10 Gy 组还与 3 Gy 组有显著性差异($P<0.05$),5 Gy 组也显著高于 3 Gy 组($P<0.05$)。

**表 2 Dami 细胞照射后 IL-6 和 TNF-α 的蛋白表达变化[$(\bar{x} \pm s)$%]**

**Tab 2 The protein expression of IL-6 and TNF-α in Dami cells after irradiation[$(\bar{x} \pm s)$%]**

| Group | Dose (Gy) | Protein expression | |
|---|---|---|---|
| | | IL-6 | TNF-α |
| Control | 0 | 326.26 ± 15.13 | 60.64 ± 10.23 |
| Irradiation | 3 | 267.53 ± 14.43 * | 124.85 ± 13.77 * |
| | 5 | 218.13 ± 14.56 * | 201.22 ± 12.56 **# |
| | 10 | 158.73 ± 18.26 **#Δ | 220.12 ± 12.28 **# |

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, *vs* 3 Gy group; Δ: $P<0.05$, *vs* 5 Gy group

## 3 讨论

巨核细胞系统造血是一个复杂的细胞生物学过程,涉及到多能干细胞向巨核细胞系的分化,巨核系祖细胞本身的分化和成熟,以及血小板的成熟和释放等,因而研究巨核细胞的增殖、分化及其调控具有重要意义,但由于巨核细胞在骨髓中所占比例很小(0.03%)[5],分离纯化较为困难,且不易在体外长期培养;因而我们选用了来源于巨核细胞白血病病人的 Dami 细胞株作为替代细胞。经实验检测,Dami 细胞株具有巨核细胞和血小板的生物学特征,是目前体外研究巨核细胞生长发育及其调控的理想模型。

正常生理条件下,血细胞的增殖、分化与凋亡过程可能由正、负两大类调控因子组成的网络在起调控作用。根据造血因子对造血调控作用的不同,可分为刺激造血的正调节因子和抑制造血的负调节因子。已有研究表明,IL-6 为正调控因子,能促进细胞增殖、抑制细胞凋亡;同时又是一种具有多种生物学效应的细胞因子,主要参与机体的造血调控、炎症反应和细胞免疫等过程,机体内 T、B 淋巴细胞及单核细胞等均能产生有效的 IL-6[6]。此外,IL-6 是巨核细胞系造血和生产血小板的一个关键因子,有促进巨核前体细胞集落形成的作用,可刺激巨核细胞 DNA 蛋白的合成,并有促进巨核细胞增殖成熟和血小板释放的作用[7]。本实验结果显示,放射损伤后 IL-6 在 mRNA 水平和蛋白水平表达均显著低于对照组($P<0.05$),且随着照射剂量的增加表达逐渐降低。尤其在 10 Gy 时,差异非常显著($P<0.01$)。这进一步表明辐射损伤可使 Dami 细胞受损,影响其正调控因子 IL-6 的表达,而 IL-6 表达水平又与照射剂量密切相关,随着 IL-6 表达水平的逐渐下调,Dami 细胞的增殖作用受到明显抑制。

TNF-α 主要是由激活的单核巨噬细胞分泌产生的一种细胞因子,是一个重要的促炎症因子和免疫调节因子。在正常情况下,TNF-α 具有抗肿瘤、抗感染和促进组织修复等重要作用,对机体有利[7~9]。但在某些病理情况下则可引起正常细胞过度凋亡而产生病理改变。近年来的研究表明,TNF-α 不仅对肿瘤细胞有细胞毒性和生长抑制作用,且能介导 IL-6 的产生,参与机体的病理生理过程[10,11]。TNF-α 作为造血祖细胞的负性调控因子,能抑制造血细胞增殖,诱导细胞凋亡。本实验结果显示,辐射损伤后的 TNF-α 在蛋白水平,实验组高于对照组,且随着照射剂量的增加,TNF-α 表达也逐渐增高,尤其在 10 Gy 照射后,差异非常显著($P<0.01$)。这也进一步说明辐射导致 Dami 细胞受损,促进了负调控因子 TNF-α 表达;并随着 TNF-α 表达水平的逐渐上调,提示 TNF-α 诱导 Dami 细胞发

生凋亡的作用逐渐增强。而 TNF-α 的 mRNA 水平表达虽无统计学差异，但存在增高的趋势，可能与 TNF-α 的表达受转录后调控有关，如蛋白的稳定性、核转位、DNA 结合活性及转录激活活性的调节等。此外，TNF-α 的转录和表达受其基因多态性位点的影响；这些多态性位点主要出现在其启动子上游的相关区域，如 Warzocha 等[12]研究发现，位于基因启动子区域内转录起始位点上游第 308 位点存在腺嘌呤核苷酸 A 时称为 TNF2，而 TNF2 可影响 TNF-α 启动子的活性，从而影响 TNF-α 的产量[13]。

在本研究中，观测到不同剂量 γ 射线对巨核细胞调控因子 IL-6 和 TNF-α 的表达存在剂量效应关系，进一步说明辐射损伤引致造血功能障碍与巨核细胞调控因子 IL-6 和 TNF-α 异常表达有关，并为造血功能障碍的临床分子靶标治疗提供了依据。

**参考文献：**


[1] Li K, Li C K, Chuen C K, *et al*. Preclinical *ex vivo* expansion of G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells: effects of serum-free media, cytokine combinations and chemotherapy[J]. Eur J Haematol, 2005, 74(2): 128 - 135.

[2] Marta R, Goette N, Lev P, *et al*. Increased levels of plasma interleukin-6 soluble receptor in patients with essential thrombocythemia[J]. Haematologica, 2004, 89(6): 657 - 663.

[3] Crist S A, Elzey B D, Ludwig A T, *et al*. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in megakaryocytes and platelets [J]. Exp Hematol, 2004, 32(11): 1073 - 1081.

[4] Lu L, Wang L S, Cooper R J, *et al*. Suppressive effects of TNF-alpha, TGF-beta1, and chemokines on megakaryocytic colony formation in CD34$^+$ cells derived from umbilical cord blood compared with mobilized peripheral blood and bone marrow[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(2): 195 - 204.

[5] 宋玉华. 骨髓巨核细胞[A]. 见：陈文杰　主编. 血液分子细胞生物学[M]. 北京：中国中医药科技出版社, 1993. 368 - 387.

[6] Schulte Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes[J]. J Neuroimmunol, 2005, 160(1-2): 204 - 209.

[7] Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, *et al*. *In vitro* and *in vivo* megakaryocyte differentiation of fresh and *ex-vivo* expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution[J]. Haematologica, 2003, 88(4): 379 - 387.

[8] Wessler S, Muenzner P, Meyer T F, *et al*. The anti-inflammatory compound curcumin inhibits Neisseria gonorrhoeae-induced NF-kappaB signaling, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and attenuates adhesion in late infection[J]. Biol Chem, 2005, 386(5): 481 - 490.

[9] Robertshaw H J, Brennan F M. Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNFalpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli *in vitro*[J]. Br J Anaesth, 2005, 94(2): 222 - 228.

[10] Yap G S, Sher A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, toxoplasma gondii[J]. J Exp Med, 1999, 189(7): 1083 - 1092.

[11] Avecilla S T, Hattori K, Heissig B, *et al*. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis[J]. Nat Med, 2004, 10(1): 64 - 71.

[12] Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, *et al*. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome[J]. Blood, 1998, 91(10): 3574 - 3581.

[13] Allen R D. Polymorphism of human TNFα promoter--random variation or functional diversity[J]. Mol Immunol, 1999, 36 (15-16): 1017 - 1027.


（编辑　张大春）


## 《中华创伤杂志》征订启事

《中华创伤杂志》是国内惟一能全面、系统地反映我国创伤医学成果和发展动向的高级医学专业学术期刊，较充分地反映我国创伤医学领域临床救治和基础研究所取得的重要进展和重大成就。本刊主要栏目有专家论坛、述评、论著、经验交流、新技术、病例报道、综述、讲座等。本刊以从事创伤医学和相关学科的各级临床医师和研究人员为读者对象。

国家科技部中国科技信息研究所信息中心、中国科学院文献情报中心等单位均将本刊收录并列为核心期刊，其影响因子和总被引频次均居国内医学期刊、尤其是外科类期刊的前列，本刊被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)等著名检索系统收录。

本刊页码为 80 页；定价 14.8 元/册，全年共计 177.6 元。国内订阅：全国各地邮局，邮发代号 78-83。编辑部办理邮购。

真诚希望您能赐予我刊高质量的文章。敬请您对杂志提出宝贵的意见，以便使它更贴近您的需要。同时，也希望您随时订阅《中华创伤杂志》。

地　址：重庆市渝中区大坪长江支路 10 号　邮　编：400042

电　话：(023)68757458，13638301490　　传　真：(023)68818654

网　址：http://zhcs.chinajournal.net.cn，http://www.cmaph.com.cn