DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.001
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1005-04

论著

^{60}Coγ射线对体外培养成骨细胞作用的实验研究

李建福,程天民,冉新泽,林 远 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究放射性骨损伤的发病机制,探讨骨折合并射线损伤愈合能力下降的原因。方法 将体外培养的成骨细胞用^{60}Coγ射线一次性照射3、6、9、12 Gy,以建立体外培养成骨细胞受射线作用的实验模型;同时,观察成骨细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性改变,骨形态发生蛋白(BMP)和转化生长因子β_1(TGF-β_1)的胞质内表达量,以及细胞内钙离子的含量。结果 成骨细胞受射线照射后,其ALP活性明显降低,且与照射剂量呈明显量效关系,3Gy组抑制率为31.59%,而12Gy组则为84.95%;BMP、TGF-β_1的表达量下降,但与照射剂量无明显量效关系;胞质内钙含量亦降低,但受照各组间的抑制率无明显统计学差异。结论 射线对成骨细胞具有直接损害作用,放射性骨损伤的重要方面就是射线对成骨细胞的主要功能酶ALP活性的损害,抑制BMP、TGF-β_1等生长因子的合成,且干扰细胞内第二信使钙离子,从而致骨组织的再生重建机能下降。

关键词:射线;细胞培养;成骨细胞
中图法分类号:R322.71;R329.24;R817.1 文献标识码:A

Effect of ^{60}Coγ-ray irradiation on *in vitro* cultured osteoblasts

LI Jian-fu, CHENG Tian-min, RAN Xin-ze, LIN Yuan (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the pathogenesis of irradiation induced bone injury and the cause of the reduction of bone regenerative capacity in fracture of bone combined with irradiation injury. Methods The cultured osteoblasts were irradiated with ^{60}Coγ-ray at 3, 6, 9 and 12 Gy respectively to establish the irradiated model. The changes in ALP activity, content of intracellular calcium, and expressions of BMP and TGF-β_1 were investigated. Results All the above mentioned indices were significantly decreased after irradiation. There was a close relationship between the enhanced impairment of ALP activity and the increase of irradiation dosages. Conclusion The radiation injury of the osteoblasts is mainly due to the impairment of ALP activity, inhibition of synthesis of growth factors such as BMP and TGF-β *etc*, and interference of calcium as second messenger. Thus, the regeneration and reconstruction capacity of the bone is decreased.

Key words: radioactive ray; osteoblast; cell culture

由射线引起骨损害已有较多文献报道,但关于放射性骨损伤及其伤后愈合能力下降的机制目前尚不很清楚。本研究以^{60}Coγ射线照射体外培养的成骨细胞,建立体外成骨细胞受射线作用的实验模型,研究射线对单一成骨细胞功能的作用,有利于说明射线对骨损伤及其修复的影响,为进一步阐明放射性骨损伤及其伤后愈合能力下降的机制提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 胎兔颅骨成骨样细胞分离培养

取胎龄28 d的成熟胎兔颅骨组织,参照鄂征[1]方法进行细胞培养。细胞传至第3代后,取生长良好细胞,均匀接种于有盖玻片的24孔培养板中,备用。

1.2 细胞的生物学及遗传学特征鉴定

1.2.1 活细胞动态观察 逐日在倒置显微镜下观察细胞生长、形态变化及骨结节形成情况。

1.2.2 Giemsa染色 参照鄂征[1]方法进行Giemsa染色,观察细胞的形态结构特征。

1.2.3 钙染色 待培养瓶(或板)中出现圆形或卵圆形结节后,用2%核固红染液染色。

1.2.4 碱性磷酸酶(Alkaline phosphotase, ALP)染色 细胞培养至3,5,7 d时,采用改良Gomori钙钴法染色。阳性细胞计数方法为随机计数3张染片,每张随机计数500个细胞,计算出ALP阳性细胞百分率。

1.2.5 骨形态发生蛋白(Bone morphogenic protein, BMP)免疫细胞化学染色 采用S-P法显示细胞内BMP存在部位及表达量。

1.2.6 染色体染色 参照鄂征[1]方法进行细胞分裂中期相染色体染色,观察染色体数目,大小及形态。染色体计数方法为随机抽取3张玻片,每张随机计数100个细胞的染色体数目,计算出其平均数。

1.3 照射方法

用^{60}Coγ射线一次性照射3、6、9及12 Gy(照射量率0.49 Gy/min),共4组,于接种后第4天照射,照射时对照组的培养板同时带入照射准备室,不进行照射。

1.4 观察指标

1.4.1 形态学观察 照射后每天在倒置相差显微镜(OLYMPUS,日本)下动态观察成骨细胞形态改变并摄像。

1.4.2 碱性磷酸酶活性测定 于照射后7 d检测ALPase活性。参照李德华[2]方法,用Beckman CX-7(美国)全自动生化分析仪检测出ALPase活性。各样本均重复3次,ALP活性以U/L表示。

1.4.3 BMP免疫细胞化学染色观察 于照射后7 d,采用S-P法进行,苏木精复染。BMP单克隆抗体由第四军医大学杨连甲教授惠赠;S-P药盒由迈新生物技术开发公司提供,BMP抗体工作效价1∶120。

1.4.4 转化生长因子-β_1(TGF-β_1)免疫细胞化学染色 方法同

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:李建福(1963-),男,山西省大同市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事创伤修复的基础与临床研究,发表论文20篇。电话:(023)68752278
收稿日期:2002-02-27;修回日期:2002-05-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4.3 TGF-β_1 单克隆抗体为 Promage 公司产品，工作效价 1∶300。

1.4.5 图像分析 选择染色效果良好的盖玻片采用 TECBIAS-6 803 图像分析仪分别测量 BMP 及 TGF-β_1 阳性细胞的平均灰度（将灰度分为 256 灰级，“0”代表最黑，“255”代表最亮[3]，即灰度值越低，表达量越高，反之亦然）。

1.4.6 成骨细胞内游离 Ca^{2+} 含量测定 照射后 7 d，取出盖玻片，1640 无血清培养基反复冲洗后，滴加 Fluo-3/Am（Molecular probe. Inc 提供），37 ℃下孵育 40～60 min，1640 液冲洗后置激光共聚焦显微镜（TCS-NT 165 211，德国）下观察；并随机选 5 个观察点，计算出 Ca^{2+} 在成骨细胞胞质内的荧光强度（间接测定 Ca^{2+} 含量）。

1.5 统计学处理

实验收集到的数据均采用第四军医大学“SPLM”统计程序包在计算机上作单因素方差分析，均数间两两比较用 t 检验。

2 结果

2.1 原代分离培养的成骨细胞生物学和遗传学鉴定

2.1.1 活细胞生长动态观察 原代分离培养的胎兔颅骨成骨样细胞贴壁时间长短不一，一般在 4～48 h，绝大多数细胞贴壁。细胞形态差异较大，有鳞片形、多角形、星形、梭形及小圆形，细胞胞质透明，可见大小不一的深色颗粒，散布于核周，核圆居中或偏向一侧；细胞周围有半透明晕，细胞突起多呈星状，细胞间借胞突呈拱形连接。随着培养时间的延长及荡洗换液次数的增加，鳞片形、多角形及星形细胞数量比例逐渐增加，7 d 后细胞呈现聚集生长，14 d 后细胞呈结节样生长，21 d 左右结节中心出现钙化点，钙化点及结节周围细胞大多呈同心圆排列。

2.1.2 Giemsa 染色观察 原代培养的细胞呈多形性，胞质呈浅蓝色、内有多数深染的颗粒，也可见许多空泡，胞体有树枝状分叉突起，细胞的胞突与胞突之间呈拱型连接，胞核为淡红色，居中或偏向一侧，核仁呈圆形，有时可见染色体的核分裂象存在。

2.1.3 钙染色观察 原代分离培养的细胞 14 d 左右呈结节样生长。到 21 d 左右，钙化中心呈鲜红色的骨样组织结构，其周围可见大量的细胞呈同心圆排列。

2.1.4 ALPase 染色观察 原代培养的成骨细胞胞质内含有灰黑色沉淀，见图 1，且细胞的阳性率随着培养时间的延长略有升高。4 d 阳性率为 65.3%，7 d 的阳性率为 71.7%。



图 1 原代分离培养胎兔颅骨成骨细胞群 ALP 染色阳性，胞质内见灰黑色沉淀 （改良钙钴法×200）

Fig 1 Positive staining of ALP in the primarily cultured osteoblasts Greyish black precipitates were found in cytoplasm (Modified Gomori stain×200)

2.1.5 BMP-McAb 免疫细胞化学染色 胎兔颅骨组织中显示所培养的成骨细胞呈强阳性表达，细胞阳性率随着时间延长逐渐升高，4 d 阳性率为 64.3%，7 d 的阳性率为 72.3%。

2.1.6 染色体染色观察 染色体核分裂中期相显示，染色体形态结构正常，缺失短臂的情况少见。其染色体多数为 44，符合二倍体细胞遗传学特征。

2.2 射线照射后成骨细胞的变化

2.2.1 形态学改变 受照组细胞胞体增大，胞质呈均质状，折光性差，胞核肿胀，出现程度随照射剂量增加而加重，在 9～12 Gy 组，尚可见较多细胞碎片，尤以 12 Gy 组为甚。而对照组细胞排列密集，胞质丰富，呈不规则的多角形。

2.2.2 ALPase 活性改变 受照射组成骨细胞 ALPase 呈不同程度的下降，见表 1。

表 1 $^{60}Co\gamma$ 射线对成骨细胞 ALP 活性的影响

Tab 1 Changes of ALP activity in the cultured osteoblasts irradiated with $^{60}Co\gamma$-ray

Group	n	$\bar{x}\pm s$ (U/L)
Control	6	1.33±0.19
3Gy	6	0.91±0.08 *
6Gy	6	0.78±0.09 *△
9Gy	6	0.51±0.13 *
12Gy	6	0.20±0.09 *

*：$P<0.01$ *vs* Control；△：$P>0.05$ *vs* 3 Gy

2.2.3 BMP、TGF β_1 免疫细胞化学染色 成骨细胞胞质内呈棕黄色颗粒着色，胞核不着色；苏木精复染后，胞核呈紫蓝着色。对照组 BMP 及 TGF β_1 染色呈强阳性反应，而受照组呈明显减弱，见图 2，3。图像分析结果，见表 2。

表 2 BMP、TGFβ 免疫细胞化学染色图像分析结果

Tab 2 Image analysis of immunocytochemical staining for BMP and TGF-β_1

Group	n	$\bar{x}\pm s$	
		BMP	TGF β_1
Control	4	108.395±10.017	122.466±3.352
3Gy	4	146.884±7.846 *	136.484±6.910
6Gy	4	150.473±5.525 *	142.635±3.604
9Gy	4	147.692±3.513 *	151.826±7.936 *
12Gy	4	148.007±3.707 *	152.894±4.649 *

*：$P<0.05$ *vs* Control



图 2 6 Gy 照射组成骨细胞胞质内 TGF-β_1 呈弱阳性表达 （S-P×200）

Fig 2 Weakly positive expression of TGF-β_1 protein in cytoplasm of the cultured osteoblasts in 6Gy group （S-P×200）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　9 Gy 照射组成骨细胞胞质内 BMP 呈弱阳性表达　(S-P×200)

Fig 3　Weakly positive expression of BMP in cytoplasma of cultured osteoblasts in 9 Gy group　(S-P× 200)

2.2.4　胞质内 Ca^{2+} 含量测定　成骨细胞受照后其胞质内 Ca^{2+} 含量均明显降低, 见图 4, 图像分析结果, 见表 3。

表 3　$^{60}Co\gamma$ 射线对成骨细胞胞质内 Ca^{2+} 含量的影响

Tab 3　Effect of $^{60}Co\gamma$-ray on calcium contents in the ccultured osteoblasts

Group	n	$\bar{x}\pm s$
Control	5	203.179±37.867
3Gy	5	48.191±30.705 *
6Gy	5	37.849±53.931 *
9Gy	5	42.080±20.820 *
12Gy	5	49.433±21.725 *

*: $P<0.01$ *vs* Control

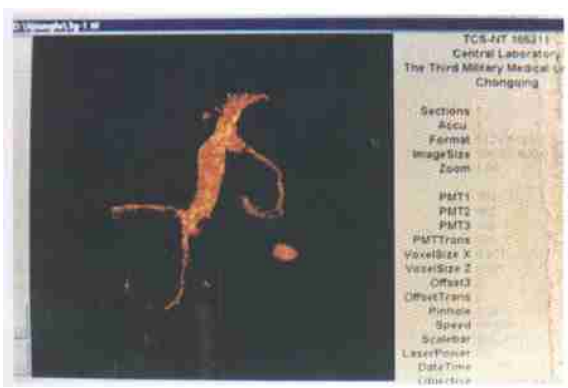


图 4　原代分离培养胎兔颅骨成骨细胞 3Gy 照射后胞质内 Ca^{2+} 荧光强度较对照组减弱

Fig 4　Fluorescence intensity of Ca^{2+} in cytoplasma of cultured osteoblasts irradiated with $^{60}Co\gamma$ ray at 3 Gy irradiation

3　讨论

3.1　射线对体外成骨细胞作用的模型

目前, 文献记载研究成骨细胞体外成骨作用的细胞模型有以下 4 种: ①原代分离及传代培养的成骨样细胞群; ②从正常组织细胞克隆传代的成骨样细胞株; ③从肿瘤组织细胞中克隆筛选建立的细胞株; ④利用转基因技术建立的"不死细胞系"。Dare[4] 分别应用新生小鼠颅骨分离培养成骨细胞及克隆传代的 MC3T3-E_1 细胞株观察 X 线对其作用后认为: 射线对成骨细胞作用应依不同的成骨细胞模型而发生的变化各不相同, 甚至出现相反的结果。本实验分离培养的成骨细胞群, 7 d 开始呈现聚集样生长, 14 d 出现骨样结节, 21 d 形成钙化的骨样组织, 这与以往的研究结果一致。ALPase 是成骨细胞的主要活性酶, 可作为确定成骨细胞的生化和组织化学标记物。本实验成骨细胞 ALPase 染色呈强阳性反应, 并随培养时间的延长其阳性细胞率亦增高; BMP 主要由成骨细胞合成及分泌, 因此成骨细胞合成 BMP 的能力以及成骨细胞内 BMP 含量的多少, 在一定程度上可以反映成骨细胞的生物学功能与成骨能力。本实验所培养的成骨细胞 BMP 呈阳性反应, 且阳性细胞率随培养时间的延长逐渐增高, 其结果与 ALPase 染色具有相似性。此外, 染色体中期相染色发现, 细胞染色体的总数为 44 条, 未发现染色体缺失、缺臂, 在分离培养过程中细胞染色体形态数目保持了相对恒定, 说明其细胞遗传学性状稳定。

总之, 我们分离培养的细胞群具有成骨细胞所固有的生物学特性, 成骨代谢过程与体内的过程有很好的相似性, 能充分满足放射性骨损伤体外成骨细胞研究模型的条件。

3.2　射线对成骨细胞的损伤及其机制

成骨细胞是骨组织的主要功能细胞, 因此研究射线对骨组织的损伤作用, 就必需首先从成骨细胞入手, 观察其辐射效应。

ALPase 是成骨细胞的主要功能活性酶、参与骨基质的成熟钙化过程的调节。本实验发现, 成骨细胞受射线照射后, ALPase 的活性明显下降, 3Gy 组抑制率为 31.59%, 而 12Gy 组则为 84.95%, 与金慰芳[5] 结果相近。结果提示: 射线对成骨细胞的损伤是抑制了成骨细胞的主要功能酶 ALPase 活性, 且与剂量呈正相关。诚如 Dare 所述[4], 射线不仅影响体外培养成骨细胞的生长, 而且抑制其 ALPase 活性, 更强烈抑制新生小鼠颅骨分离培养的成骨细胞的骨样结节的形成, 因此骨基质的成熟钙化受抑制, 进一步影响了骨的再生愈合能力及质量。

钙离子(Ca^{2+})和 cAMP 作为细胞内的第二信使是细胞接受生物活性物质或外界刺激而引起一系列生物学效应的桥梁。本研究观察到成骨细胞受射线照射后胞质内的 Ca^{2+} 含量明显降低, 但受照各组间的抑制率无明显统计学差异。结果提示: 射线对骨组织的损伤, 很可能与抑制成骨细胞的第二信使 Ca^{2+} 有密切关系, 此外在成骨过程中, 成骨细胞参与提供 Ca^{2+}, 故成骨过程的钙化受到影响, 进而影响成骨的速度及质量。

骨折愈合除了成骨细胞外, 尚需更多物质的参与, 其中 BMP 及 TGFβ_1 尤为重要[6~8]。它们从形态发生和

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

促进再生两个方面促使骨折修复[9]。成骨细胞可以合成、贮存及释放BMP及TGF-β，其含量的高低可反映成骨细胞的骨形成能力。本研究从蛋白质水平发现射线照射的成骨细胞胞质中BMP、TGF-β_1的表达量均明显降低，但受照各组间抑制率无明显差异。实验结果提示：^{60}Coγ射线致骨组织的损伤引起骨的再生机能及重建率下降，其实质是射线对成骨细胞合成、分泌内源性BMP及修复细胞(成骨细胞)自身产生的TGF-β的抑制作用。

本研究结果表明，射线对体外成骨细胞的作用，最突出地表现为主要功能酶ALPase的活性受抑，即ALPase对射线的敏感性最高，并与照射剂量呈正相关的量效关系；而BMP、TGF-β_1及Ca^{2+}虽有一定的降低，但与受照射剂量未见量效关系。

关于体外成骨细胞受射线作用的剂量范围，过去认为骨是射线的非敏感组织，Dare[4]报道4Gy方能使新生鼠颅骨分离培养的成骨细胞及MC3T3-E_1细胞株发生改变，而Matsumura[9]则称成骨细胞株MC3T3-E_1的最高耐受量为10Gy。本实验剂量范围为3～12Gy，3Gy组即出现了细胞的改变，而12Gy组虽ALPase活性、BMP、TGF-β_1及Ca^{2+}含量均明显低于正常对照组，但并非不表达。因此，对体外成骨细胞辐射损伤的剂量范围尚待进一步研究。

综上所述，射线对成骨细胞具有直接损害作用，最主要的是抑制ALPase的活性。

参考文献：

[1] 鄂 征 主编. 组织培养和分子细胞技术[M]. 北京：人民卫生出版社，1987. 139－167.
[2] 李德华，刘宝林，吴军正，等. 体外培养的成骨细胞中碱性磷酸酶活性的检测方法探讨[J]. 实用口腔医学杂志，1997，1(4)：21－23.
[3] 徐根兴. 定量细胞学和细胞化学技术[M]. 吉林：吉林科学技术出版社，1993. 25－37.
[4] Dare A，Hachisa R，Yamagachi A，*et al*. Effects of ionizing irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells[J]. J Dent，Res，1997，76(2)：658－664.
[5] 金慰芳，朱文菁，王洪复，等. ^{137}Cs γ射线建立成骨细胞衰老模型的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志，1996，16(3)：164－166.
[6] 胡蕴玉. 骨诱导及骨愈合分子生物学研究进展[J]. 中华骨科杂志，1997，17(1)：17－19.
[7] 谭祖健，李起鸿，许建中，等. BMP诱导成骨过程中胶原生成及TGF-β_1的促进作用[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：521－523.
[8] 唐康来，杨 柳，许建中，等. TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用及BMP蛋白表达影响的研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：547－549.
[9] Matsumura S，Hiranuma H，Deguchi A，*et al*. Changes in phenotypic expression of osteoblasts often X irradiation[J]. Radiat Res，1998，149(5)：463－471.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)09-1008-01

彩色多普勒超声诊断颈总动脉中段假性动脉瘤并瘤内血栓形成1例

Diagnosis of a case of false aneurysm with trombosis formation in middle common carotid artery by color Dopple ultrasounic

杨庆刚，曹立萍，米亚非 (解放军第107医院特检科，烟台 264002)

患者，男性，17岁，因右颈部包块两月余就诊。外科查体于右颈部触及一大小约5.0 cm×4.0 cm的包块，质硬，有搏动感，既往颈部有外伤史。用7.5 MHz探头行右颈部多切面扫查，示：右颈总动脉中段前方探及一大小约4.0 cm×4.1 cm×2.8 cm的类圆形略强回声团块，边界清晰，内部呈"葱皮样"改变，其后方可见一1.4 cm×1.8 cm的不规则液性暗区，此暗区与右颈总动脉中段相通，交通口位于左前壁。暗区内显示"云雾状"回声，呈"旋涡状"运动。彩色多普勒血流显像：于收缩期显示一束红色血流自颈总动脉中段通道射入液性暗区内，暗区内血流缓慢，红蓝相间；舒张期见淡蓝色血流自破口返回颈总动脉内。交通口彩色血流束宽度约0.6～0.8 cm，此处测得高速动脉血流(收缩期峰值流速V_{max}=2.9 m/s)。右颈总动脉上下段未见异常。B超提示：右侧颈总动脉中段假性动脉瘤并瘤内血栓形成。颈总动脉假性动脉极为少见[1]，其破口直径一般为1～3 mm，彩色多普勒可确诊。本例破口较大且合并大量血栓形成，尤为罕见。

关键词：超声检验；多普勒彩色；动脉瘤，假；血栓形成
中图法分类号：R445.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 段云支，袁丽君. 彩色多普勒超声诊断假性动脉瘤[J]. 中国医学影像学杂志，2001，9(2)：147－148.

(编辑 张大春)

作者简介：杨庆刚(1961－)，男，山东省济南市人，主治医师，主要从事正常前列腺彩色及频谱多普勒方面的研究。电话：(0535)6848574

收稿日期：2002-06-25；修回日期：2002-08-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net