DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.019
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
660 2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)07-0660-04

辐射对培养小鼠骨髓基质细胞核因子-κB的影响

朱 波[1],罗成基[1],郭朝华[1],程晓明[2],邹仲敏[1],周进明[1] (第三军医大学:[1]预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038;[2]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨辐射对培养小鼠骨髓基质细胞内核因子-κB(NF-κB)的影响。方法 采用免疫组化法及凝胶电泳迁移率实验。结果 免疫组化方法显示正常骨髓基质细胞核的周围表达低水平的NF-κB,8.0 Gy ^{60}Co辐射损伤后1 h即见其表达较正常显著升高并出现明显的核移位,4 h达高峰,6 h有所回落,8 h恢复正常;凝胶电泳迁移率实验发现正常骨髓基质细胞内存在低水平活性NF-κB,8.0 Gy ^{60}Co辐射损伤后1 h即见其活性明显升高,4 h达高峰,8 h恢复正常。结论 8.0 Gy辐射损伤后培养骨髓基质细胞内NF-κB的表达升高并激活,这可能与骨髓微环境内基质细胞的抗辐射能力及造血功能的恢复有关。

关键词:辐射;骨髓造血微环境;NF-κB
中图法分类号:R392.2;R818.74 文献标识码:A

Effects of radiation on nuclear factor-kappa B in bone marrow stromal cells

ZHU Bo, LUO Cheng-ji, GUO Chao-hua, CHENG Xiao-ming, ZHOU Zhong-min, ZHOU Jin-ming (Institute of Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of the microenvironment of bone marrow hematopiesis after exposure to gamma radiation. Methods Immunohistochemistry and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were used. Results The expression of nuclear factor-kappa B (NFκB) protein in the bone marrow stromal cells (BMSCs) was elevated after exposure to 8 Gy gamma rays radiation determined with immunohistochemistry. The activity of NFκB in the BMSCs was significantly increased after irradiation determined with EMSA and it reached the peak 4 hours after irradiation. Conclusion Our findings suggest that nuclear factor-kappa B in the BMSCs is involved in the protection of BMSCs and in the recovery of hematopoiesis after exposure to radiation.

Key words: radiation; gamma rays; bone marrow; hematopoiesis; microenvironment; nuclear factor-kappa B

辐射损伤常见于战时核爆炸及平时的核事故,也是恶性血液病、实体瘤患者接受放疗过程中不可避免的损伤。骨髓是辐射损伤的敏感靶器官之一,射线主要损伤骨髓内的造血细胞,同时对骨髓造血微环境也有一定程度的损伤[1]。细胞核因子-κB(Nuclear factor kappa B, NF-κB)是细胞中一个重要的转录因子,它调控的基因编码急性时相蛋白、细胞因子和细胞粘附分子等。如与造血相关的细胞因子IL-6、粒巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、TNF-α等均受NF-κB编码调控[2]。此外,最近的研究表明,NF-κB能够抑制由辐射诱导的细胞凋亡[3]。本实验拟通过观察辐射损伤后培养的小鼠骨髓基质细胞内NF-κB活性的改变来探讨上述机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源及分组

正常健康昆明种小鼠购于本校实验动物中心,重量在18~22 g,雌雄不限。设置正常对照及损伤组,每组15只,共30只。

1.2 骨髓基质细胞的分离及培养[4]

各观察组小鼠颈椎脱臼后,置75%酒精浸泡消毒,无菌条件下取双侧股骨,剔除肌肉剪断股骨头,用RPMI 1640培养液冲出股骨内骨髓,依次用7号针头和5号针头把细胞吹打成单细

作者简介:朱 波(1974—),男,江苏省常熟市人,硕士研究生,助教,主要从事辐射损伤骨髓基质细胞机制方面的研究。电话:(023)68752278

收稿日期:1999-12-05;修回日期:2000-03-07

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

胞悬液, 加入 RPMI 1640(10%小牛血清、10%马血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素)内, 37 ℃, 5%CO_2 培养, 第 21 天收集细胞。用作免疫组化的细胞预先在 24 孔培养板内加入盖玻片。

1.3　细胞辐照

培养第 21 天细胞用本室钴源辐照, 剂量率为 1.07 Gy/min 总剂量为 8.0 Gy。

1.4　免疫组织化学 S-P 染色[5]

在各时相点挑取玻片, 用 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, 加 4%多聚甲醛 50μl 固定 40 min, 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, 3%过氧化氢室温下 10 min, 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, 5%山羊血清 37 ℃置 30 min, 吸弃血清, 加 1∶100 稀释的 P65(Santa cruz 美国)37 ℃ 3 h, 4 ℃过夜, 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, 加生物素标记的二抗(Ig/Bio 1∶20)(SP-Kit, 北京中山公司), 37 ℃ 2 h, 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, 加 HRP/SP(1∶200)复合物 37 ℃ 2 h, 0.1 mol PBS 漂洗 3 次, DAB 法显色 5 min, 脱水、透明、DPX 封片, 免疫组化对照: 用血清稀释液代替一抗, 其余步骤同前。

1.5　核蛋白的提取

核蛋白的提取按 Zhou[6] 报道的方法加以改良, 细胞经 PBS 洗涤后, 悬浮在缓冲液 A 400 ml 中(10 mmol/L Hepes, pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.2% NP-40, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PBSF, 1 mg/L Leupeptin、antipain、aprotinin 和 pepstatin), 混匀后冰置 15 min, 加入 10%NP-40 25 μl, 剧烈震荡 15 s, 13 000× g、离心 10 s, 吸弃上清, 加入 50 μl 缓冲液 C (20 mmol/L Hepes, pH 7.9, 420 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1.5 mmol/L MgCl, 25% Glycerol, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mg/L Leupeptin、antipain、aprotinin 和 pepstatin)中, 冰置 30 min, 剧烈震荡 15 s, 4 ℃、12 500× g 离心 10 min, 取上清, 以考马斯量蓝法测定提取液蛋白浓度, 并将其置于－70 ℃待用。

1.6　凝胶电泳迁移率实验(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

将 5 μg 核蛋白加入至 15 μl 的结合反应缓冲液中[HEPES、NaCl、EDTA、甘油、BSA 和 2.5 μg/ml poly(dI/dC)], 冰上作用 20 min。探针用具有与 NF-κB 转录因子结合位点的双链寡核苷酸, 其序列为: 5′-TCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3′。探针经末端标记法用 γ^{32}P-ATP(Amershan)标记后, 测放射性核素每分钟闪烁计数值。用 TE 稀释后取 1 μl 探针加入反应液中与核蛋白孵育 30 min, 反应产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳恒压电泳 3 h, 真空加热干燥后, －70°C 用 X 线射片放射自显影 3 h, 即与特异性 DNA 结合的 NF-κB 转录因子的复合物。相同实验重复 3 次。

1.7　凝胶电泳迁移率竞争抑制实验

在凝胶电泳率实验中设两组竞争性对照, 一组为特异性竞争抑制实验, 即在反应体系中加入 200 倍未标记的特异性 NF-κB探针, 另一组为非特异性竞争抑制实验, 即在反应体系中加入 200 倍非特异性的未标记探针, 非特异性未标记探针为 GATA3 寡核苷酸探针, 其序列为: 5′-TGCTAACAATCAGATAGAGG-3′, 5′-CCTCTATCTGATTGTTAGCA-3′; 室温下置 10 min 后加入标记探针。以后步骤同凝胶电泳迁移率实验。

2　结果

2.1　NF-κB 免疫组化染色结果

正常培养骨髓基质细胞 NF-κB 蛋白主要位于细胞浆内细胞核的周围, 免疫组化阳性反应较弱。8.0 Gy 辐射后 1～2 h 即见其表达升高并向核内转位。4 h 在核内明显聚集, 6 h 表达开始下降, 8 h 恢复至正常, 见图 1、2。

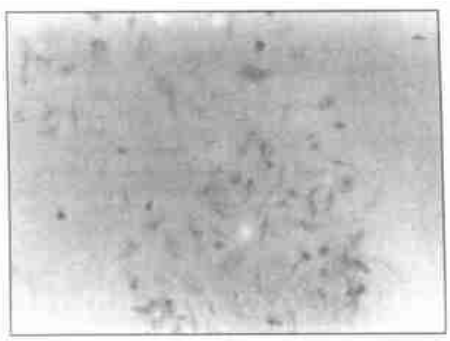


图 1　正常培养小鼠骨髓基质细胞 **NF-κB** 蛋白免疫组织化学 (S-P× 200)

仅见弱阳性的 NF-κB 存在于细胞浆内细胞核的周围

Fig 1　Expression of NF-κB assayed by SP-stained immunohistochemistry in normal murine bone marrow stromal cells (S-P× 200)

Weak positive of NF-κB protein exist in the cytoplasm

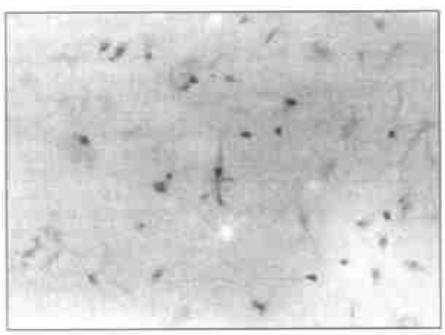


图 2　正常培养小鼠骨髓基质细胞经 **8.0 Gy** 辐射后 **4 h NF-κB** 蛋白免疫组织化学 (S-P× 200)

可见强阳性染色存在于细胞核内

Fig 2　Expression of NF-κB assayed by SP-stained immunohistochemistry in irradiated murine bone marrow stromal cells at 4 hours after radiation (S-P× 200)

Intensive positive of NF-κB protein exist in the nucleus

2.2　凝胶电泳迁移率实验检测 NF-κB 活性结果

8.0 Gy 辐射后小鼠脾脏 T 细胞内 NF-κB 活性在 1～2 h 即见明显高于正常对照, 4 h 达到高峰, 6 h 开始下降, 8 h 恢复正

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

常。100 倍、200 倍未标记的 NF-κB 寡核苷酸探针能阻断蛋白阻滞，200 倍的 GATA 未标记探针对蛋白阻滞实验无显著影响，见图 3、4。

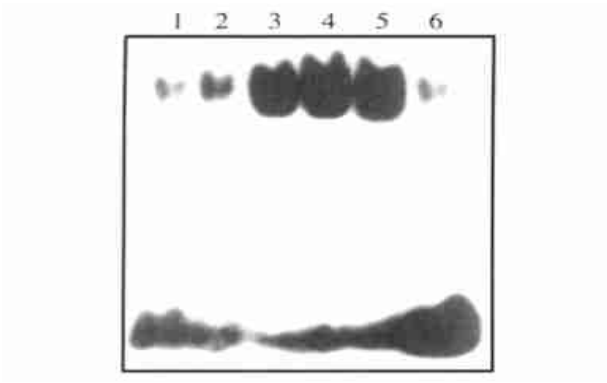


图 3 凝胶电泳迁移率法检测正常和辐射后各时相点 NF-κB 活性结果

条带 1：正常对照；条带 2～6：辐射后 1、2、4、6、8 h

Fig 3 Activities of NF-κB detected by electrophoretic mobility shift assay in normal and irradiated cultured murine bone marrow stromal cells (BMSCs) in

Lane 1: Normal BMSCs; Lane 2～6: 1、2、4、6、8 h after exposure to radiation

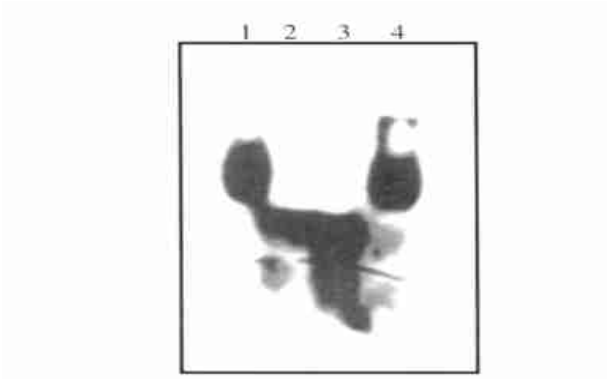


图 4 凝胶电泳迁移率的特异性竞争抑制实验和非特异性竞争抑制实验

条带 1：辐射后 4 h；条带 2：辐射后 4 h＋100 倍未标记的 NF-κB 寡核苷酸探针；条带 3：辐射后 4 h＋200 倍未标记的 NF-κB 寡核苷酸探针；条带 4：辐射后 4 h＋200 倍未标记的 GATA-3 寡核苷酸探针

Fig 4 Specific and non-specific competitive experiment

Lane 1: 4 h after radiation; Lane 2: 100 times unlabeled NF-κB oligonucleotide＋4 h after radiation; Lane 3: 200 times unlabeled NF-κB oligonucleotide＋4 h after radiation; Lane 4: 200 times unlabeled GATA-3 oligonucleotide＋4 h after radiation

3 讨论

骨髓基质细胞是造血微环境的重要组成成分，也是骨髓体内外产生造血活性所必须的结构基础[1]。它在骨髓中的作用主要有以下 3 方面：①为造血干细胞的生存提供不可缺少的物理支柱；②通过粘附分子作为桥梁与造血干、祖细胞形成“配体-整合蛋白-细胞骨架跨膜系统”，从而影响造血实质细胞的形态，调控基因表达，控制细胞的分化，决定细胞的运动；③通过产生和分泌多种细胞因子如 GM-CSF、G-CSF、M-CSF、IL-3、IL-6、TNF-α、TGF-β 和其他活性物质调控造血干、祖细胞的增殖、分化和发育。骨髓对辐射损伤是敏感器官之一，射线主要杀伤骨髓内的造血细胞，但对造血细胞存在的微环境也有一定程度的损伤。辐射不但可以杀死骨髓内的基质细胞或启动细胞的凋亡，而且引起存活细胞基因表达的改变。文献[7]报道：5.0 Gy 辐照后数小时内骨髓组织内 IL-1α、IL-6、GM-CSF、IL-8 和 TNF-α 在 mRNA 水平均见明显升高。骨髓组织内细胞因子的主要来源是骨髓内的基质细胞，由此我们不难推测辐射后骨髓组织内上述细胞因子的表达升高是由基质细胞内的基因表达的改变引起的。但辐射引起骨髓基质细胞内基因表达改变的具体机制目前仍不清楚。

NF-κB 是细胞中一个重要的转录因子，它调控的基因编码急性时相蛋白、细胞因子、免疫相关分子等，同时与抗凋亡基因的诱导表达有关。在未受刺激的细胞中，NF-κB 与抑制蛋白 IκB 形成复合体存在于胞浆内。在 TNF-α、LPS 和辐射等作用下 IκB 磷酸化并从 NF-κB 上解离下来，此时活化的 NF-κB 转移入核内启动基因的转录[8]。

8.0 Gy 辐射损伤是造成极重度放射病的剂量，同时也常被用于小鼠骨髓移植模型预处理。本实验通过免疫组化的方法发现辐射损伤后 NF-κB 有明显的核转位；同时用凝胶电泳迁移率实验证实辐射后 NF-κB 有较高水平的活化。两个实验得到一致的结果：辐射后培养骨髓基质细胞内 1～2 h 即见 NF-κB 有明显的激活、4 h 达高峰、6 h 开始下降、8 h 恢复正常。对于该实验结果我们作如下分析：辐射作为对机体的一种损伤因素杀死骨髓内的造血细胞、损伤骨髓微环境，包括基质细胞。骨髓基质细胞一方面要保护自身——修复 DNA 和/或抗凋亡，另一方面又要适应机体/周围环境的需要作出应激——动员、加快骨髓的造血功能。骨髓基质细胞通过激活 NF-κB 能达到上述的目的，其依据有如下两点：① 激活的 NF-κB 可以诱导 TRAF1 (TNFR-associated factor 1)、TRAF2、c-IAP1 (Inhibitor-of-apoptosis)、cIAP-2 等抑制凋亡相关基因的表达，这些基因的表达可以抑制凋亡通路中的 Caspase 的活化[3]，从

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

而抑制辐射引起的骨髓基质细胞的凋亡。②骨髓基质细胞内活化的 NF-κB 可以调控其下游基因的表达，如细胞因子 G-CSF、GM-CSF、M-CSF、IL-6、TNF-α 等[9]，这些细胞因子可以促进骨髓内残留的造血干细胞增殖、分化及向外周血动员。从这两方面分析来看，辐射后 NF-κB 在骨髓基质细胞内的激活是机体对辐射损伤的一种保护性反应。但从炎症反应的角度来分析 NF-κB 在骨髓基质细胞内的激活则可能会参与辐射对骨髓微环境的继发性损伤，其原因主要是 NF-κB 能诱导骨髓基质细胞表达或分泌一些前炎症因子如 IL-8、TNF-α、IL-6、IL-1β 等，这些前炎症因子可以吸引中性粒细胞向骨髓微环境内趋化或抑制其凋亡[10]。中性粒细胞在参与炎症反应的同时也对骨髓微环境造成不同程度的损伤，这可能是辐射后骨髓微环境支持造血功能长期不能恢复和骨髓纤维化的原因之一。这方面的研究有待进一步深入研究。

参考文献：

[1] Dexter T M. Stromal cells associated hematopoiesis[J]. J Cell Physiol, 1982, 1(3): 87—90.
[2] Albert S, Baldwin Jr. The NF-κB and IκB proteins: new discoveries and insights[J]. Ann Rev Immunol, 1996, 14(4): 649—683.
[3] Cun Y W, Marty W M. NF-κB antiapoptosis: introduction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation[J]. Science, 1999, 281(5 383): 1 680—1 688.
[4] Deter T M, Moore M A S, Sheridan A P. Maintenance of hemopoietie stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras *in vivo*[J]. J Exp Med, 1977, 145(6): 1 612—1 616.
[5] 蔡文琴，王伯沄 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406—409.
[6] Zhou D H. Characterization of a silencer element in the human aromatase gene[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 353(2): 213—220.
[7] Chang C M, Limanni A, Baker W H, *et al*. Sublethal gamma irradiation increases IL-1α, IL-6, and TNF-α mRNA levels in murine hematopoietic tissues[J]. J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(9): 567—572.
[8] Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3—9.
[9] Dimitris T, Tom M. NF-κB: a lesson in family values[J]. Cell, 1995, 80(4): 529—532.
[10] Biffl W L, Moore E E, Barnett C C, *et al*. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis[J]. Arch Surg, 1996, 131(1): 24—29.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2000)07-0663-01

经验与短篇

小脑扁桃体下疝畸形合并空蝶鞍 1 例

A case of Arnold-Chiari malformation associated with primary empty sella turcica

陈立朝，邹咏文，许民辉，陈广鑫 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所神经外科，重庆 400042）

患者，男性，57 岁，因双下肢乏力 3 月收入我科，查体：$T_{6\sim10}$ 痛温觉减退，双下肢肌力Ⅳ级，双下肢腱反射亢进、巴氏征阳性、双侧踝阵挛阳性，其余无异常发现。头颅 MRI 提示：空蝶鞍。颈椎及胸椎 MRI 提示：小脑扁桃体小缘下疝至 C_2 上缘，枕大池消失，$T_{4\sim8}$ 脊髓中央管扩大。诊断为小脑扁桃体下疝畸形伴脊髓空洞症合并空蝶鞍。在全麻下行后颅凹减压及枕大池扩大成形术。术后半年患者上述症状消失，复查头颅 MRI 提示：空蝶鞍无明显变化。颈胸椎MRI提示：小脑扁桃体下缘回升至枕大孔上缘，枕大池形成，$T_{4\sim8}$ 脊髓空洞消失。

讨论

小脑扁桃体下疝畸形合并空蝶鞍国内文献未见报道。小脑扁桃体下疝畸形合并脊髓空洞症的发病机理存在许多观点，但对神经外科医生最具指导意义的理论当推 Gardner 的流体力学理论和 Williams 的颅内与椎管内压力分离理论[1,2]，典型的临床表现结合颅颈及颈胸 MRI[3]，不难作出诊断以手术治疗为主要手段，其目的是解除枕大孔及颈椎对小脑、脑干、脊髓、Ⅳ脑室及其他神经组织的压迫[4]。本例患者行后颅压减压及枕大

（下转 666 页）

作者简介：陈立朝（1972—），男，湖南省沅江市人，医师，主要从事脑外伤后继发性脑损害方面的研究。电话：(023)68757751

收稿日期：1999-10-05；修回日期：2000-01-19

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