

CNIC-00314

SMC-0033

CN9000977

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

^{60}Co γ 射线对小鼠巨噬细胞和淋巴细胞胞浆微管的影响

THE EFFECTS OF ^{60}Co γ -RAY IRRADIATION

ON CYTOPLASMIC MICROTUBULES OF

MOUSE MACROPHAGES AND

LYMPHOCYTES

(In Chinese)



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre

CNIC-00314

SMC-0033

**^{60}Co γ 射线对小鼠巨噬细胞和淋巴细胞
胞浆微管的影响**

THE EFFECTS OF ^{60}Co γ -RAY IRRADIATION ON
CYTOPLASMIC MICROTUBULES OF MOUSE
MACROPHAGES AND LYMPHOCYTES

(In Chinese)

李倩倩 茅子均 殷志伟 胡玉敏

(苏州医学院)

中国核情报中心
原子能出版社

北京·1989.5

摘 要

本实验采用间接免疫荧光技术,观察了小鼠腹腔巨噬细胞和肠系膜淋巴结细胞胞浆微管经 ^{60}Co γ 射线照射后的变化及分布特点;同时还对此变化进行了动态观察、研究;并在透射及扫描电镜下观察了 ^{60}Co γ 射线对胞浆内微管、中心粒和表面微绒毛的影响。实验结果表明:(1)辐照对巨噬、淋巴细胞内胞浆微管的分布及荧光染色模式有明显影响,并且与辐照剂量有关;(2)经一定时间后,由辐照所致的胞浆微管变化可以完全恢复;(3)透射电镜下可见辐照后胞浆微管、中心粒基本消逝,扫描电镜下可见经辐照后细胞表面突起或微绒毛发生明显变化。

关键词 辐射效应 淋巴细胞 巨噬细胞 微管

**THE EFFECTS OF ^{60}Co γ -RAY IRRADIATION
ON CYTOPLASMIC MICROTUBULES
OF MOUSE MACROPHAGES AND
LYMPHOCYTES**

Li Qianqian Mao Zijun Yin Zhiwei Hu Yumin
(Suzhou Medical College)

ABSTRACT

The effects of ^{60}Co γ -ray irradiation on cytoplasmic microtubules of mouse macrophages and lymphocytes were investigated by immunofluorescence microscopy and scanning electron microscope. The results indicated: (1) microtubule organization of the irradiated cells remarkably differed from that of the control since the doses over 4Gy; (2) 144 hours after irradiation the alterations of microtubules have been shown to be basically "repaired"; (3) the cytoplasmic microtubules and centrioles disappeared under transmission electron microscope, the membranes irradiated and microvilli showed changes under scanning electron microscope too. From these observations and those of other workers who studied the radiation effect on extracted microtubule proteins *in vitro*, the authors support that ^{60}Co γ -ray irradiation can inhibit cytoplasmic microtubule assembling.

前 言

微管是一种细胞器,它对于巨噬、淋巴细胞的吞噬,免疫识别,表面受体运动都有重要影响。目前,国外以完整细胞为模型研究辐射对胞浆微管的影响的工作尚不多,国内尚未见报道,但鉴于胞浆微管与免疫机能的关系密切,因而以完整细胞为模式研究辐射对免疫相关细胞,如巨噬细胞、淋巴细胞胞浆微管的影响,对于辐射免疫病理的研究具有理论与实践意义。

材 料 与 方 法

1. 管蛋白的提纯及其抗体制备

采用新鲜猪脑为原料,根据聚合-解聚双循环法^[1],得到粗制品,再经DEAE-Sephadex A50纯化。以纯种新西兰兔为免疫动物,采用常规免疫法^[2],所得抗血清经饱和硫酸铵反复盐析,得到较纯的抗体免疫球蛋白。

2. 间接免疫荧光法

实验所用细胞为小鼠腹腔收集的巨噬细胞和悬浮的小鼠肠系膜淋巴结细胞,细胞浓度为 2×10^6 /mL,洗涤缓冲液为加1mM EDTA, pH 7.2的PBS;细胞在室温下用3.7%甲醛、0.1% Triton-X 100 PBS固定,3~5分钟后洗去多余固定液,加管蛋白抗体,37°C下孵育30分钟,再洗涤3遍后加荧光标记的羊抗兔IgG抗体(上海生物制品厂产品),37°C孵育30分钟,洗涤三次后制片,并加入防淬灭甘油后进行观察拍照。

3. 荧光亮度分级法

在间接免疫荧光法标记下的单核细胞,根据其荧光强度,染色清晰度,依靠反复实验,观察,将不同强度的荧光进行分级,便于观察比较和记录结果,见表1。

表1 荧光强度分级标准

记录符号	—	+	++	+++	++++
结果判断	阴性	弱阳性	低度阳性	中度阳性	高度阳性
荧光亮度	无	隐约可见	清楚可见	较明亮	很明亮

4. 电镜观察

电镜所用细胞同于间接免疫荧光法。透射电镜观察所用细胞,37°C下,4%戊二醛固定2小时后再经常规处理制成超薄切片观察;扫描电镜所用细胞,在37°C下加在敷有支持膜的铜网上用4%戊二醛固定1小时,采用CO₂临界点干燥,喷金后进行观察。

5. ⁶⁰Co γ射线辐射效应

采用苏州医学院辐照场⁶⁰Co源,将细胞浓度调整到 2×10^6 /mL后,进行⁶⁰Co γ射线照射,阴性对照者(不照射对照组)带至辐照场但不进行照射。间接免疫荧光法观察的标本所用剂量率为1Gy/min,总剂量分为:0Gy, 1Gy, 4Gy, 8Gy, 16Gy几组,分别于照射后0.5~1h间进行免疫荧光标记,观察辐射后即刻的胞浆微管变化;动态观察动物采用一次

性、整体照射,剂量率为1Gy/min,总剂量为8Gy,分别于辐照后24h、72h、144h处死动物取巢细胞进行实验;电镜观察者采用3Gy一个剂量作为实验组。

6. 统计方法

本实验采用随机化区组实验设计,数据采用 t 检验进行显著性检验,对于原始数据中的百分率资料先进行百分率与概率单位的转换后再进行统计处理。

结 果

1. 管蛋白及其抗体的鉴定

所得到的管蛋白液在含有甘油、 Mg^{++} 、GTP、EDTA的溶液中 $37^{\circ}C$ 下解有30分钟后,在电镜下可见到清晰的微管结构,呈单根的管状结构,直径约24nm,符合文献报道,见图1。

所制备的抗血清与所提纯的管蛋白抗原在免疫双扩散实验中,当抗体稀释到1:16时仍可见免疫沉淀线,见图2。

为排除非特异性免疫荧光标记,做了各种阳性、阴性及空白实验,将免疫前血清代替抗管蛋白抗体时,荧光标记为完全阴性;当不加抗管蛋白抗体,直接加羊抗兔荧光抗体时,荧光阳性细胞率低于5%,此为非特异性荧光染色,实验用不同滴度的抗体进行了多次重复实验,选择一最佳滴度作为工作浓度,在此滴度下,非特异荧光干扰最小,细胞特异荧光染色清晰度最高,在所选定的工作浓度下进行了多次重复实验,所得结果基本近似,且和上海细胞生物所已通过鉴定的管蛋白抗体所示的细胞荧光模式相比基本相同,因此,确实所制备的抗体为抗管蛋白抗体。

2. 小鼠巨噬、淋巴细胞正常状态下的微管荧光染色模式

经甲醛PBS固定的巨噬、淋巴细胞经间接免疫荧光标记后,在荧光镜下可见到单核细胞特有的染色模式,其主要有三种形式:(1)胞膜下荧光:至少70~80%的巨噬、淋巴细胞具有明亮而清晰的胞膜下荧光,有的呈连续而纤细的环状,有的呈不连续的“C”形,有的则表现为间断斑点所组成的荧光环,环的粗细不一,环所示的界限与光镜下细胞轮廓基本一致,此结构是所有间接免疫荧光标记的微管结构中最清晰、最明亮、出现率最高的一种结构,巨噬细胞与淋巴细胞相比此结构似更清晰。(2)胞体中央区荧光:在巨噬和淋巴细胞内还可见在胞体中央或近中央区有荧光染色,此区清晰度、明亮度、阳性率均不如胞膜下荧光,此区特点为立体感强,在某些细胞与胞核形态相一致。(3)荧光纤维:在成纤维细胞有交错成网的微管纤维网,而在单核细胞中此种纤维不常见到,只有在铺展较好的、体积较大的巨噬细胞爬片中可以见到一或几根较粗的纤维,此纤维由胞体中央伸向胞周立于胞膜下,巨噬细胞含此纤维的细胞数似多于淋巴细胞,见图3。

正常时,根据上述荧光强度分级标准进行分级,大多数细胞亮度为“+++”级或“++++”,细胞内微管结构以膜下荧光亮度最高,也较清晰。

3. ^{60}Co γ 射线对巨噬、淋巴细胞胞浆微管的影响

辐照后细胞用台盼兰染色测定其活力在93%以上,不同剂量照射后荧光染色模式或多或少都有所改变,并且这种变化程度与辐射总剂量有关,从整体照射的结果看,辐射所致的胞浆变化经一定时间后可基本恢复正常。

(1) 不同照射剂量值的实验观察

1Gy组与正常组比较胞膜下荧光阳性率和胞体中央区荧光阳性率的变化与正常对照组相比无统计学意义 ($P>0.05$)。4Gy组胞膜下荧光、胞体中央区荧光阳性率均有明显下降。与正常组比较差异有高度显著性意义 ($P<0.01$)。8Gy组则表现为胞膜下荧光、胞体中央区荧光阳性率进一步下降,胞内有大量细点状弥散性分布的荧光,其亮度超过了胞膜下荧光,均匀地分布于整个细胞内。16Gy组,细胞膜下及胞体中央区荧光基本消逝,胞内只留下浅浅的、分布于整个胞体的荧光。

经 ^{60}Co γ 射线辐照后的细胞荧光亮度也有明显变化,主要表现为:随辐照剂量的增加,荧光强度下降,“+++”到“++++”级亮度的细胞百分率明显下降,而“+”、“-”和“-”细胞的百分率增加,此变化与胞膜下、胞体中央区荧光阳性率改变一致,见表2~表5。

表2 小鼠腹腔巨噬细胞辐照后的变化

辐照量 (Gy)	胞膜下荧光阳性率 (%)		胞体中央区荧光阳性率 (%)	
	样本数	$\bar{X} \pm SD$	样本数	$\bar{X} \pm SD$
0	30	83 \pm 1.8	30	28 \pm 4.0
1	14	77.6 \pm 2.1	14	25 \pm 3.0
4	17	66.1 \pm 3.6	17	16 \pm 4.0
8	18	48.6 \pm 3.1	18	8 \pm 3.0
16	15	31.4 \pm 3.0	15	2 \pm 1.0

•除0Gy与1Gy组外,其他各组间比较均有非常显著性意义 ($P<0.01$)

表3 小鼠肠系膜淋巴结细胞辐照后的变化

辐照量 (Gy)	胞膜下荧光阳性率 (%)		胞体中央区荧光阳性率 (%)	
	样本数	$\bar{X} \pm SD$	样本数	$\bar{X} \pm SD$
0	22	81.5 \pm 2.3	22	25.1 \pm 2.3
4	12	79.5 \pm 4.6	12	12.3 \pm 3.0
8	15	59.0 \pm 5.6	15	6.5 \pm 3.0
16	13	27.2 \pm 4.2	13	21 \pm 1.5

各组间比较均有非常显著性意义 ($P<0.01$)

表4 ^{60}Co γ 线辐照后巨噬细胞荧光强度的变化

辐照量 (Gy)	样本数	++++	+++	++	+	-
0	30	70%	10%	5%	10%	5%
1	14	65%	70%	10%	10%	5%
4	17	13%	57%	10%	15%	5%
8	18	0	7%	45%	3%	45%
16	13	0	0	5%	30%	65%

表5 ^{60}Co γ 线辐照后淋巴细胞荧光强度的变化

剂量 (Gy)	样本数	++++	+++	++	+	-
0	22	89%	8%	2%	5%	5%
4	12	15%	70%	5%	5%	5%
8	15	0	10%	20%	20%	50%
16	13	0	0	5%	30%	65%

从表2、3中看出：(1) 随辐照剂量的加大，胞膜下、胞体中央区荧光阳性率逐渐下降；(2) 根据统计处理可见，1Gy组与正常对照组比较差别无显著性意义，从4Gy组开始，变化才具有统计学意义。

(2) 动态观察 ^{60}Co γ 线对巨噬、淋巴细胞的微管的影响

此实验的目的是为了观察 ^{60}Co γ 线对细胞微管影响的时相变化特点。采用8Gy一次性整体照射(剂量率1Gy/min)，分别于受照后24h、72h、144h处死动物，收集细胞，用间接免疫荧光法标记细胞，进行实验观察。实验结果表明： ^{60}Co γ 线所致细胞内微管的变化至少可维持72h，但在受照后144h，变化基本消逝，胞膜下荧光的细胞阳性率及胞体中央区荧光阳性率的变化与正常对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)，荧光亮度也与正常对照组相似，见表6、7。

表6 8Gy ^{60}Co γ 线辐照后巨噬细胞的变化

时 间 (小时)	实验组别	胞膜荧光阳性率 (%)		胞体中央区荧光阳性率 (%)	
		样本数	$\bar{X} \pm SD$	样本数	$\bar{X} \pm SD$
	对照	20	81 ± 1.3	20	27 ± 2.0
24	实验	11	57 ± 1.0	11	9 ± 1.1
72	实验	12	64 ± 1.0	12	20 ± 1.5
144	实验	14	79 ± 2.1	14	26 ± 1.0

• 除对照组与144小时组外各组间比较差别均有非常显著性意义 ($P<0.01$)

表7 8Gy ^{60}Co γ 线辐照后淋巴细胞的变化

时 间 (小时)	实验组别	胞膜荧光阳性率 (%)		胞体中央区荧光阳性率 (%)	
		样本数	$\bar{X} \pm SD$	样本数	$\bar{X} \pm SD$
	对照	28	84 ± 3.1	28	27 ± 3.0
24	实验	12	61 ± 2.5	12	14 ± 1.5
72	实验	12	64 ± 3.0	12	19 ± 2.0
144	实验	14	80 ± 2.7	14	25 ± 3.0

• 除对照组与144h外各组间比较差别均有非常显著性意义 ($P<0.01$)

从实验结果看，第24h的变化最明显，主要表现为胞膜下、胞体中央区荧光阳性率下

察, 72h组上述变化不如24h组明显, 二者间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 但72h组与正常对照组相比差异仍有高度显著性意义 ($P < 0.01$), 说明第72h组组内微管损伤尚未恢复, 第144h组, 各项数值与正常对照相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

4. 电镜下观察 ^{60}Co γ 线对巨噬细胞、淋巴细胞胞浆微管的影响

在透射电镜下, 正常的巨噬细胞或淋巴细胞内偶见单根或多根微管存在, 在有的细胞内尚可见到典型的中心粒结构, 内织网, 高尔基氏体位于核周, 保持在相对稳定的位置上, 见图4。

经8Gy照射后, 仔细观察了10个以上的细胞, 胞浆内均未见到微管及中心粒; 内织网呈现长而曲折的形态, 堆积在胞膜附近, 见图5。

在扫描电镜下, 正常时80%以上的巨噬细胞、淋巴细胞均可见到表面微绒毛。巨噬细胞微绒毛多呈齿状突, 遍布于整个细胞; 淋巴细胞微绒毛呈小指状突, 分布于整个细胞表面, 长度一致, 见图6、7。

经8Gy照射后, 具有表面微绒毛的巨噬细胞的数量似乎无明显改变, 形态却有变化, 由原来的齿状突变为扁而宽大的被层状突起, 形似花瓣; 淋巴细胞则表现为严重的微绒毛融合, 形成许多不规整的瘤状突起, 突起又相互融合、重叠, 完全失去正常外观, 见图8、9。

讨 论

按聚合—解聚双循环法, 从猪脑中提纯的管蛋白经鉴定其具有聚合活性, 用其制备的抗原清用于间接免疫荧光标记效果良好。

根据本实验的各种结果提示: ^{60}Co γ 射线对巨噬细胞、淋巴细胞胞浆微管具有明显影响。关于辐射是如何影响微管形成的, 已有人作了报道, 认为电离辐射主要是通过氧化了管蛋白分子上的巯基^[1], 而巯基对于管蛋白聚合成微管是必需的, 在低剂量照射时, 如1Gy辐照量时, 由于电离氧化的作用力较弱, 管蛋白分子上被氧化的巯基数较少, 此时可由胞内的还原系统, 主要是谷胱苷肽系统将已被氧化的巯基还原, 使其恢复正常功能, 故在此剂量下不表现为微管形成的抑制, 此点与本实验中得到的结果相符。当辐照剂量不断加大, 电离辐射的氧化作用也随之加大, 管蛋白上被氧化的巯基数也增加, 此时胞内还原系统不完全能或不能将被氧化的巯基进行还原, 从而表现为微管形成的抑制, 如在8Gy和16Gy组所见到的胞膜下荧光消逝, 胞内出现弥散分布的荧光, 这主要是由胞内大量失去聚合作用的管蛋白堆积所致, 而原来整齐排列于胞膜下的微管数量大大减少, 从而造成胞膜下荧光亮度减弱直至消逝。

此外, 在微管的加长过程中尚需一些蛋白酶的参与, 而辐射对这些酶可能也具有一定的损伤作用而抑制微管形成。

从动态观察的资料看, 在辐照后24h, 72h内胞浆微管的分布、形态均有改变, 与正常未照射组相比差异均有高度显著性意义, 说明辐射所致的胞浆微管变化直到辐照后的72h尚未得到修复。这种现象可能与下列因素有关: (1) 辐照后管蛋白半寿期缩短, 使其易于被破坏, 从而造成胞浆中管蛋白总量减少。(2) 管蛋白合成受抑制。有资料证明: 管蛋白合成的自身调节可以由胞内游离的管蛋白水平而决定, 当胞内管蛋白水平降低时, 合成增加, 反之, 合成受抑制。这种调节对于原先游离管蛋白较少的细胞来说, 就越敏感^[4], 而巨噬细

胞，淋巴细胞正是属于这类细胞。当细胞受照射后，因管蛋白分子上巯基遭氧化，使管蛋白不能聚合成微管，从而使胞浆中游离管蛋白水平增加，因此出现管蛋白合成受抑，使受辐照后细胞内新合成的管蛋白减少，这样就造成了微管形成受抑，从而使胞内微管分布、结构的变化在一段时间内得以维持。

从辐照后144h的细胞观察结果看，无论是从微管相关的一些数据指标或是形态上，都已基本或大部分恢复正常，说明辐照所致微管损伤在144h后可基本修复。

从透射电镜的观察看，辐照后主要表现为微管和中心粒消逝，内织网由于失去正常时微管的分隔、固定作用而表现为内织网结构松散、曲折、膨大并且飘移，堆积于胞核下。

扫描电镜下见到，8Gy辐照后，巨噬细胞和淋巴细胞主要表现为表面微绒毛的变化，前者主要是突起增宽、融合；后者主要为严重的微绒毛融合和巨大的突起。正常时，细胞表面微绒毛形态的维持主要受细胞骨架的控制，在微丝和微管间有许多连接，当细胞受辐照后，微管形成受抑，这种连接点被破坏，从而造成细胞骨架对微绒毛的控制作用丧失，使微绒毛失去正常的形态。

本实验用间接免疫荧光法及电镜的手段研究 ^{60}Co γ 射线对巨噬、淋巴细胞胞浆微管的影响，并对此变化作了动态观察。根据本实验结果，可得以下几个结论：

- (1) ^{60}Co γ 射线对胞浆微管具有抑制作用，此作用与辐射剂量有关。
- (2) ^{60}Co γ 射线所致的胞浆微管改变可在144h后得到基本恢复。
- (3) 从电镜结果看， ^{60}Co γ 射线对巨噬、淋巴细胞表面微绒毛也具有明显的损伤作用，并可引起胞浆细胞器的异常变化。
- (4) 根据本实验结果推测，抗氧化剂可能对于辐射所致的胞浆微管损伤具有保护作用。

参 考 文 献

- [1] Kyoto KK: Nature 236: 152, 1973
- [2] 上海第二医科大学: 免疫学技术, p123-128, 1985
- [3] Vera G and Trajkovic D: Int J Radiat Biol, 46: 435, 1984
- [4] Caren JM et al: J Cell Biol, 101: 1763, 1985

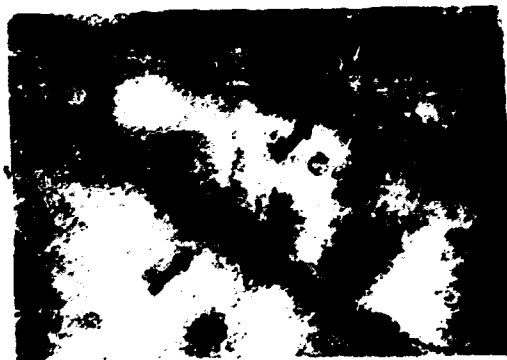


图1 管蛋白液体外聚合成微管的电镜照片， $\times 50\ 000$

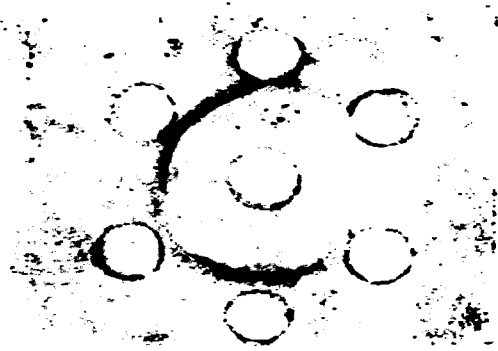


图2 管蛋白及其抗体在免疫双扩散中的电镜像
中央孔为抗原，周围孔为抗体（电镜倍数：16）

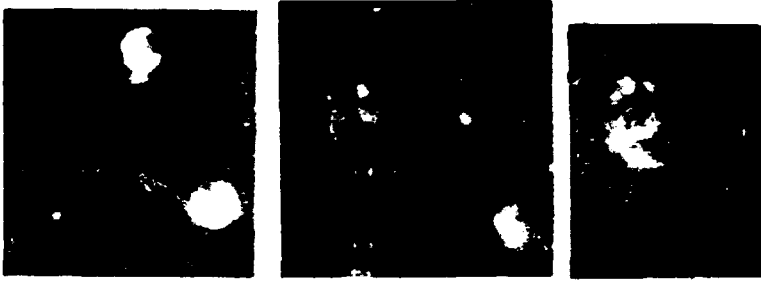


图3 正常时单核细胞膜下荧光 (a)；胞体中央区荧光 (b)；荧光纤维 (c)，×480



图4 正常单核细胞内可见中心体结构，
×30 000



图5 处理后，细胞内微管和中心体消逝，内织
网堆积在膜下，×30 000

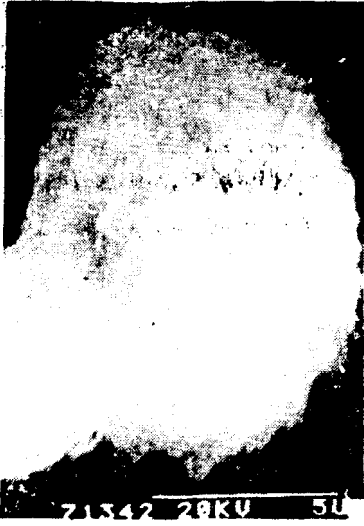


图6正常巨噬细胞扫描电镜下微绒毛形态

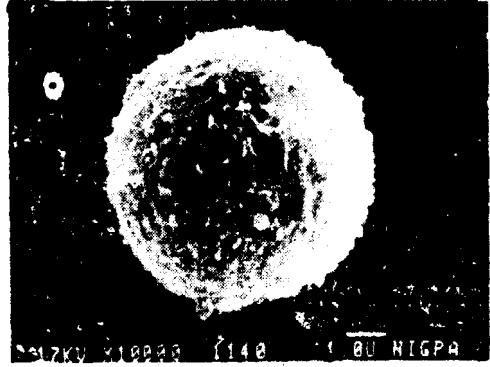


图7 正常淋巴细胞扫描电镜下微绒毛形态

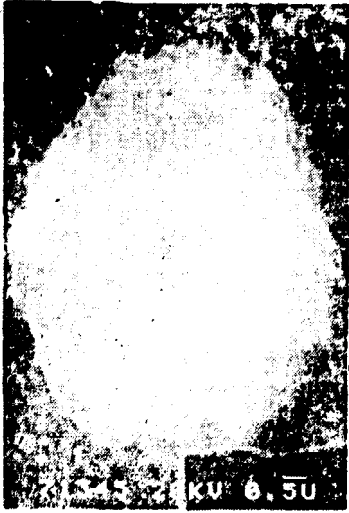


图8 辐照后，巨噬细胞表面微绒毛呈片层状



图9 辐照后，淋巴细胞表面微绒毛严重融合，出现瘤状突起

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



书号: 15175-00314

P.O.Box 2103

Beijing, China

China Nuclear Information Centre