

CN9200571

CNIC-00483

SMC-0057

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

^{60}Co γ 射线对小鼠腹腔巨噬细胞
和人外周血单核细胞骨架系统的影响

THE EFFECTS OF ^{60}Co γ -RAY IRRADIATION ON
THE CYTOSKELETON OF MOUSE PERITONEAL
MACROPHAGES AND HUMAN PERIPHERAL
BLOOD MONOCYTES IN VITRO



(In Chinese)

原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre

CNIC-00483

SMC-0057

^{60}Co γ 射线对小鼠腹腔巨噬细胞 和人外周血单核细胞骨架系统的影响*

陈晓梅^{..} 郭玉华 殷志伟 茅子均^{...^{..}}

(苏州医学院)

摘 要

采用选择性抽提方法结合整装细胞电镜技术(whole mount cell EM)及扫描电镜技术,对单核、巨噬细胞的骨架系统进行了观察;并应用抗肌动蛋白(Anti-actin)抗体和抗 α -管蛋白(Anti- α tubulin)单抗结合胶体金免疫电镜技术分别对其微丝、微管进行了定性研究。在此基础上,对不同剂量 ^{60}Co γ 射线照射前后单核、巨噬细胞骨架系统的辐射效应进行了观察,发现照射后细胞骨架系统发生了显著的改变。同时,对照观察了秋水仙素、松胞素B对其骨架系统的影响,发现它们之间存在着一些类似之处。因此,我们认为 ^{60}Co γ 射线引起的细胞骨架系统改变可能与微管、微丝的聚合障碍有关。

• 国家自然科学基金资助项目

• • 硕士研究生

• • • 导师

**THE EFFECTS OF ^{60}Co γ -RAY IRRADIATION ON
THE CYTOSKELETON OF MOUSE PERITONEAL
MACROPHAGES AND HUMAN PERIPHERAL
BLOOD MONOCYTES IN VITRO**

(In Chinese)

Chen Xiaomei Guo Yuhua

Yin Zhiwei Mao Zijun

(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

ABSTRACT

The whole mount cell electron microscopy in combination with selective extraction method for preparing cytoskeletal framework was applied. Cytoskeleton prepared by Triton X-100 treatment of mouse peritoneal macrophages and human peripheral blood monocytes appeared in electron microscopy as a highly organized and interconnected three-dimensional matrix of different fibrous elements. Since such cytoskeletons are open membrane-free system, individual fibrous organizations can be identified by specific antibodies. An indirect immunogold procedure using monoclonal anti-tubulin or anti-actin antibodies was applied to visualize tubulin-or actin-containing structures. The three-dimensional visualization of Triton X-100 resistant cytoskeletons had been used to demonstrate that different doses of ^{60}Co γ -ray caused a distinctive and reproducible alterations of the cytoskeletons of intact mouse peritoneal macrophages and human peripheral blood monocytes in vitro. The results showed that there were some similar alterations with those caused by cytochalasin B and by colchicine. From these observations and other workers' studies, It's likely that ^{60}Co γ -ray irradiation may inhibit cytoplasmic microtubule and microfilament assembling.

前 言

一切真核细胞中都存在着相似的、极其复杂的网络系统即细胞骨架系统(cytoskeletal system)。就目前所知,细胞骨架包括:微管(microtubules,直径:20~25 nm)、微丝(microfilaments,直径:5~7 nm)、中间纤维(intermediate filaments,直径:7~11 nm)及微梁(microtrabeculae,直径:3~4 nm)。细胞骨架具有复杂的功能,对保持细胞的形态、细胞的运动、物质运输、内吞外排、免疫行为、细胞增殖分裂以及信息传递等方面起着极其广泛而重要的作用。另外,细胞骨架还与细胞的许多病理过程密切相关。

单核、巨噬细胞是一类重要的免疫细胞,它的许多生理功能如吞噬、免疫识别、表面受体的运动等都与胞浆骨架有密切关系。近来,Ladyman 报道:当巨噬细胞摄取了放射性核素后,可导致巨噬细胞的上述功能障碍,并认为是电离辐射对细胞骨架的影响所致^[1]。本文应用选择性抽提方法结合整装细胞电镜技术(whole mount cell EM)及 Anti-actin、Anti- α tubulin——胶体金免疫电镜标记技术对 IcR 小鼠腹腔巨噬细胞和正常人外周血单核细胞骨架系统进行了观察和研究,在此基础上,对不同剂量⁶⁰Co γ 射线体外照射的单核、巨噬细胞骨架系统的辐射效应进行了研究,并同时对照观察了松胞素 B 和秋水仙素对其骨架系统的影响。

1 材料与方 法

1.1 肌动蛋白抗体的制备和鉴定

1.1.1 肌动蛋白的制备和鉴定

参照 Ebashi 的方法^[2],从新鲜鸡肫中获得较纯的肌动蛋白,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测得其分子量为 42 000 Da(见照片 1)。用磷钨酸负染法在电镜下可见 F-肌动蛋白呈清晰的纤维结构(见照片 2)。

1.1.2 抗肌动蛋白抗体的制备和鉴定

采用纯种健康的新西兰兔为免疫动物,体重为 1.8~1.9 kg,事先检查自发抗体为阴性。取 F-肌动蛋白加 SDS(SDS 终浓度为 1%)煮沸 2min 后作为抗原备用。常规免疫动物,免疫方法为背部、脚掌皮下多点注射,剂量为每只兔 0.75mg/次,一般经 3~4 次免疫后,即可获得阳性血清。经 50%,33%,33%饱和硫酸铵盐析后,得到较纯的 IgG 抗体。加 1:10 000 叠氮钠,-20°C 保存。采用间接免疫荧光法测其效价。本工作所使用的抗血清在稀释至 1:16 时,仍可染出胞质中微丝结构。

1.2 药品与试剂

(1)抗 α -管蛋白单抗(Monoclonal anti- α tubulin)为小鼠抗 α -管蛋白单克隆抗体,IgG(英国 Amersham)。

(2)胶体金标记的羊抗兔 IgG(金颗粒直径:10 nm),胶体金标记的羊抗鼠 IgG(金颗粒直径:10 nm)(中国军事医学科学院、基础医学研究所)。

(3)Triton X-100(Rohm Haas,进口分装)。

(4)松胞素 B(Cytochalasin B,简称 CB,美国 Sigma),用二甲亚砜(DMSO)配制贮存液(200 μ g/mL),0~4°C 避光保存,临用时再用培养液稀释至所需的浓度。

(5)秋水仙素(Colchicine,Fluk 进口分装),先配成一定浓度(150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的贮存液,临用时再以培养液稀释到最终使用浓度。

(6)细胞骨架缓冲液(简称CSK):10 mmol/L PIPES(pH 6.8),100 mmol/L KCl,300 mmol/L 蔗糖,3 mmol/L MgCl_2 ,1 mmol/L EGTA,1.2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride。

1.3 细胞培养

1.3.1 细胞收集方法

(1)小鼠腹腔巨噬细胞的收集:实验所用小鼠为1cR近交系小鼠,用引颈法杀死小鼠,在无菌条件下,用PBS液反复冲洗腹腔,即得细胞悬液,用PBS洗3次,根据巨噬细胞爬片的特点收集巨噬细胞。

(2)人外周血单核细胞的收集:取正常人(苏州市中心血库)外周静脉血,肝素抗凝(20 u/mL),将抗凝血用pH 7.4的无钙镁Hanks'液1:1稀释,缓慢加至淋巴细胞分离液上(上海试剂二厂,比重:1.077 \pm 0.02)以2500 r/min作密度梯度离心20 min,吸出交界面富含淋巴单核细胞层,用Hanks'液洗3次,加入RPMI1640培养液培养3~4 h(37 $^{\circ}\text{C}$),根据单核细胞贴壁生长的特点收集单核细胞。

1.3.2 培养方法^[3]

将镍网夹在浓度为1.2%的Formvan膜与窄条盖玻片之间,喷碳、消毒后置于培养瓶中,培养液为RPMI1640加15%小牛血清,待细胞平铺于镍网上后,即可供实验用。

1.4 照射条件

将上述培养好的细胞以0~16Gy(剂量率分别为:1 Gy/min和2 Gy/min)作 ^{60}Co γ 射线体外照射。

1.5 药物处理

将生长在镍网上的细胞分别以每mL含4 μg 、8 μg 松胞素B的培养液或每mL含1.5 μg 、7.5 μg 、15 μg 秋水仙素的培养液在37 $^{\circ}\text{C}$ 下处理1 h。

1.6 细胞抽提^[4]

将培养于镍网上的正常细胞和分别经不同照射剂量及不同剂量药物处理后的细胞,先用CSK液洗1次,然后用含0.5% Triton X-100的CSK液处理6 min。细胞的膜结构和可溶性蛋白被溶解,细胞骨架与核结构完整保存。

1.7 电镜样品的制备

1.7.1 透射电镜样品的制备

将经抽提后的样本,以2.5%戊二醛(用CSK配制)室温固定30 min,1% OsO_4 后固定,2%的磷酸双氧水水溶液染色1 h,逐级乙醇脱水,乙腈干燥后,样品在N-600型透射电镜下观察,加速电压为100kV。

1.7.2 扫描电镜样品的制备

将细胞直接培养于玻片上,按上述步骤抽提、固定、脱水、乙腈干燥,喷金后在S-570型扫描电镜下观察。

1.7.3 胶体金-免疫电镜样品的制备

(1)抗肌动蛋白抗体-胶体金标记:细胞经抽提后,先用2.5%的戊二醛室温固定10 min,用PBS(pH 7.2,含1% BSA)洗3次,与正常兔血清(1:20)孵育20 min(37 $^{\circ}\text{C}$),然后将镍

网移至抗肌动蛋白抗体(1:8)的液滴上,37°C 孵育 1h, PBS 洗 3 次,以正常羊血清封闭 1 次(方法同前),TBS(pH 8.2,含 1%BSA)洗 3 次,与胶体金标记的羊抗兔 IgG 抗体孵育 45 min (37°C),双蒸水洗,采用常规方法固定、染色、脱水、乙醇干燥,电镜观察。

(2)抗 α -管蛋白单抗-胶体金标记:抽提后的细胞用 2.5%戊二醛固定 10min,用含 NaBH₄(0.5mg/mL)的 CSK 处理 10min^[5], PBS(pH7.2,含 1%BSA)洗 3 次后,与抗 α -管蛋白单抗孵育 1h(37°C)。二抗(胶体金标记的羊抗鼠 IgG)标记方法同前。常规固定、染色、脱水、干燥,电镜观察。

1.8 实验设计和统计方法

本实验采用完全随机设计、方差分析进行配伍资料统计。为达到统计资料的需求,本文将原始百分率数据先行平方根反正弦函数变换,然后再进行统计处理。

2 结 果

2.1 健康 IcR 小鼠腹腔巨噬细胞和正常人外周血单核细胞的细胞骨架系统

将整装细胞电镜技术与选择性抽提相结合,可在常规电镜下清晰地观察到整个细胞的细胞骨架系统,经 Triton X-100 抽提后的整装单核、巨噬细胞铺展良好,细胞质中的可溶性蛋白及膜性结构均被抽提,胞质中可见一十分精细、复杂的骨架网络。由于单核、巨噬细胞处于不同活动状态而呈现不同外形,故其骨架系统并不都呈一种状态。典型的单核、巨噬细胞骨架系统(见照片 3,4)在细胞中部有一电子致密的团块,为细胞核及部分核周结构,其中骨架难以分辨;细胞质中骨架十分丰富,清晰完整,不同直径的纤维交织成密集而复杂的网络,遍布整个胞质。在胞质中可见许多粗细不一的呈长束状的纤维平行排列(直径约 0.1 μ m),一端与细胞核相连,一端直至细胞周缘,终止于细胞表面。在这些纤维束之间可见许多纤细的纤维呈单根走行,互相交织相连成网,在细胞周缘常可见一些不规则的束状纤维与细胞膜平行走向,并可见到许多细而短的纤维密集交织分布于质膜下,这些纤维大部分直接与细胞表面相连。应用抗肌动蛋白抗体-胶体金免疫标记,在电镜下可见胞质中分布的许多纤维束和其间单根走行的纤维上有许多金颗粒排布(见照片 5,6),此乃为微丝束和微丝。用抗 α -管蛋白单抗-胶体金免疫标记,可见由细胞核发出的许多平行排列的纤维束及纤维上有大量金颗粒排布,说明这些纤维束和纤维为微管束和微管(见照片 7)。

2.2 ⁶⁰Co γ 射线照射对单核、巨噬细胞骨架系统的影响

2.2.1 ⁶⁰Co γ 射线照射对 IcR 近交系小鼠腹腔巨噬细胞骨架系统的影响

检测受不同剂量照射后的小鼠腹腔巨噬细胞的存活率均为 95%以上。照射后的细胞骨架系统发生了明显的改变,胞质中央部骨架首先出现断裂,较正常稀疏,骨架不完整,出现一些空缺(见照片 8)。随着照射剂量和剂量率的加大,细胞周缘骨架愈益减少、稀疏,细胞边缘出现一些辐射状的突起,胞质中可以看到许多大小不一的空缺(见照片 9),许多细胞出现收缩,伸展性差,出现不同程度的团缩。由于细胞伸展不良和部分团缩,细胞厚度增加,以致电子束无法穿透,在电镜下呈一黑色的电子致密团块,仅在细胞周边较薄的区域仍可见一些不完整的细胞骨架纤维网。在照射剂量较大时,许多细胞出现明显的团缩、变形(见照片 10)。

仔细观察细胞骨架的各种形态,每例样本观察 1~2 张镍网,每例计数 200 个细胞,计算出各种形态的百分率(见表 1)。

表1 不同剂量⁶⁰Co γ射线体外照射对IcR小鼠腹腔

巨噬细胞骨架的影响

(剂量率: 2 Gy/min)

观察指标, %	照射剂量, Gy				
	0	2	4	8	16
伸展良好	84.51±5.84	65.10±18.68**	17.91±10.03**	5.66±4.71**	4.93±6.22**
半展	11.12±5.50	22.81±7.37**	22.68±6.35**	12.00±7.11	9.51±6.66
团缩	4.37±3.72	12.11±13.65	59.41±13.19**	82.25±10.96**	85.57±11.32**

n=10 $\bar{x} \pm SD$ **P<0.01

观察指标标准如下:

伸展良好——在电镜下整个细胞铺展良好,核居中,胞浆中细胞骨架清晰完整,呈致密的网络,核:胞浆<1:2。

团缩——细胞出现明显的收缩,胞壁增厚,50%以上的胞浆由于细胞团缩在电镜下呈黑色的电子致密区,与细胞核连成一体,其中的骨架无法分辨,仅在细胞周边可看到一些不完整的细胞骨架。细胞变圆,并出现各种异形,有时整个细胞缩成一黑色电子致密团块。

半展——介于两者之间的过度形式。

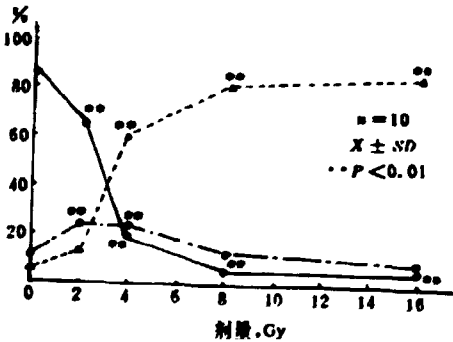


图1 不同剂量⁶⁰Co γ射线体外照射对小鼠腹腔巨噬细胞骨架的影响(剂量率: 2 Gy/min)

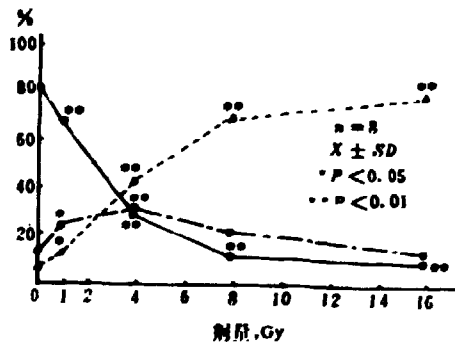


图2 ⁶⁰Co γ射线体外照射对人体外周血单核细胞骨架的影响(剂量率: 1 Gy/min)

如表1、图1所示,随着照射剂量的加大,细胞出现明显的伸展不良和团缩。在2Gy时,伸展良好的细胞百分率已显著下降,出现了一定程度的伸展不良,许多细胞呈半展状态。从4 Gy开始,细胞伸展严重不良,并随剂量加大而加重(除8Gy组与16Gy组间外,其余各组间均有显著差异),大多数细胞出现不同程度的团缩和异形变,团缩细胞的百分率随照射剂量的增加而增加(4 Gy与8Gy、4Gy与16Gy组间均有显著差异,但8Gy与16Gy组间无差异)。

2.2.2 ⁶⁰Co γ射线对正常人外周血单核细胞骨架的影响

正常人外周血单核细胞经不同剂量⁶⁰Co γ射线照射后,检测其细胞存活率为95%以上,受照射后的单核细胞骨架系统发生了明显的改变,其变化与受照射的IcR小鼠腹腔巨噬细胞骨架改变类似。胸质中骨架断裂稀疏、减少,出现许多大小不一的空缺(见照片11)。随着

照射剂量和剂量率的增加细胞骨架损伤加重,细胞出现收缩和不同程度的伸展不良及团缩,有些细胞甚至缩成团块或各种异形,完全丧失了正常细胞形态(见照片 12)。

表 2 不同剂量⁶⁰Co γ射线体外照射对正常人外周血单核细胞骨架的影响(剂量率:1Gy/min)

观察指标, %	照射剂量, Gy				
	0	1	4	8	16
伸展良好	80.63±6.43	62.79±13.32**	28.19±10.79**	11.26±6.17**	9.39±6.48**
半 展	13.46±3.33	23.78±6.76*	29.62±14.12**	20.60±8.43	12.90±3.52
团 缩	5.91±4.52	13.43±9.15*	42.20±11.57**	68.06±6.96**	77.63±7.59**

n = 8 X ± SD *P < 0.05 **P < 0.01

由表 2、图 2 可以看到,在剂量率为 1 Gy/min 时,从 1 Gy/min 组开始伸展良好细胞的百分率已明显下降,部分细胞出现伸展不良和不同程度的团缩,随着剂量的增加,这种变化加剧。在 1~8 Gy 范围内,各照射剂量组间均有显著差异(P < 0.01),8 Gy 与 16 Gy 组间也有差异(P < 0.05)。

表 3 不同剂量⁶⁰Co γ射线体外照射对正常人外周血单核细胞骨架的影响(剂量率:2Gy/min)

观察指标, %	照射剂量, Gy			
	0	4	8	16
伸展良好	85.29±7.44	10.17±8.03**	7.44±6.22**	2.50±2.03**
半 展	8.43±3.79	23.48±18.01	13.06±9.21	10.71±7.03
团 缩	6.28±6.51	66.35±23.36**	79.50±14.08**	86.78±8.99**

n = 5 X ± SD **P < 0.01

表 3、图 3 为剂量率为 2 Gy/min 时不同剂量⁶⁰Co γ射线体外照射对单核细胞骨架的影响。可以看到,在提高剂量率时(1 Gy/min → 2 Gy/min)细胞骨架的辐射损伤效应加重。从 4 Gy 开始,细胞骨架已出现了极其明显的改变,但随着剂量的进一步增加,细胞骨架的辐射损伤效应未见明显增强(各照射剂量组间均无差异)。

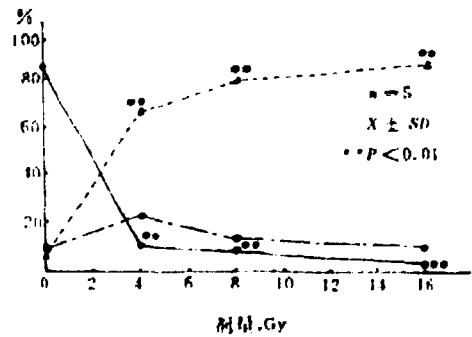


图 3 ⁶⁰Co γ射线体外照射对人体外周血单核细胞骨架的影响(剂量率:2 Gy/min)

2.3.3 单核、巨噬细胞骨架的辐射效应与松胞素 B、秋水仙素对其骨架影响的比较

松胞素 B 是一种能强烈地、特异地作用于微丝的药物^[3],细胞经 4 μg/mL CB 作用 1 小时后,即出现一定程度的伸展不良和向心性收缩,细胞周边细密的纤维网络消失,骨架纤维出现异常排列,胞质中部分骨架纤维出现断裂,并可以看到一些不定形团块。这些团块大小不一,多与纤维相连,在一些部位可以辨别出这些团块是由纤维状结构聚集而成的。在胞质

中还可看到一些骨架空缺处。随着CB剂量的增大(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 37°C作用1小时),可见胞质中的不定形团块也消失,出现许多大小不一的骨架空缺区,骨架明显减少、稀疏,许多细胞出现团缩、异形变(见照片13,14,15)。

表4 CB对KcR小鼠腹腔巨噬细胞骨架的影响

观察指标, %	CB剂量, $\mu\text{g}/\text{mL}$		
	0	4	8
伸展良好	82.69 \pm 2.44	52.64 \pm 14.26**	30.99 \pm 8.98**
半展	12.53 \pm 3.93	14.47 \pm 2.39	13.27 \pm 9.23
团缩	4.78 \pm 3.78	32.90 \pm 13.10**	55.74 \pm 9.13**

n = 5 $\bar{X} \pm \text{SD}$ **P < 0.01

表5 CB对正常人外周血单核细胞骨架的影响

观察指标, %	CB剂量, $\mu\text{g}/\text{mL}$		
	0	4	8
伸展良好	87.03 \pm 3.21	52.70 \pm 17.38**	19.56 \pm 3.49**
半展	11.36 \pm 2.86	13.92 \pm 5.47	18.51 \pm 4.04
团缩	1.60 \pm 0.85	33.39 \pm 14.26**	61.92 \pm 3.60**

n = 5 $\bar{X} \pm \text{SD}$ **P < 0.01

秋水仙素可特异性地抑制管蛋白的聚集,经秋水仙素作用后,细胞出现伸展不良,胞质中骨架不完整,比例也比较不规则,在细胞周边可以看到一些辐射状的突起(见照片16),细胞出现不同程度的团缩、伸展不良和异形变,胞质中骨架相对稀疏(见照片16,17)。

表6 秋水仙素对KcR小鼠腹腔巨噬细胞骨架的影响

观察指标, %	秋水仙素剂量, $\mu\text{g}/\text{mL}$			
	0	1.5	7.5	15
伸展良好	82.69 \pm 2.44	43.87 \pm 10.63**	29.01 \pm 7.84**	15.49 \pm 6.28**
半展	12.53 \pm 3.93	14.72 \pm 9.89	12.79 \pm 4.89	14.76 \pm 4.60
团缩	4.78 \pm 3.78	41.42 \pm 5.81**	58.20 \pm 5.35**	69.75 \pm 6.93**

n = 5 $\bar{X} \pm \text{SD}$ **P < 0.01

表7 秋水仙素对正常人外周血单核细胞骨架的影响

观察指标, %	秋水仙素剂量, $\mu\text{g}/\text{mL}$			
	0	1.5	7.5	15
伸展良好	87.03 \pm 3.21	52.37 \pm 8.41**	21.97 \pm 4.25**	18.06 \pm 5.29**
半展	11.36 \pm 2.86	16.96 \pm 7.00	18.61 \pm 7.35	18.35 \pm 8.43
团缩	1.60 \pm 0.85	30.67 \pm 7.43**	59.42 \pm 9.80**	63.59 \pm 9.93**

n = 5 $\bar{Y} \pm \text{SD}$ **P < 0.01

比较 ^{60}Co γ 射线照射后单核、巨噬细胞骨架系统的改变与CB、秋水仙素对单核、巨噬细胞骨架的影响,可以看到它们之间有许多类似之处,如细胞骨架断裂、稀疏、排列异常,细胞出现不同程度的伸展不良、团缩和异形变等。这提示 ^{60}Co γ 射线照射引起的单核、巨噬细胞

骨架系统的改变与微丝、微管的损伤有关。

2.2.4 应用扫描电镜观察⁶⁰Co γ射线对正常人外周血单核细胞骨架的影响

经 Triton X-100 抽提后的正常单核细胞在扫描电镜下可见胞质中许多粗细不一的纤维相互交织,形成复杂致密的立体网络(见照片 18)。这些纤维的直径普遍比透射电镜下观察到的粗,可能是由于喷镀金的缘故。经 8 Gy(剂量率 2 Gy/min)照射后的单核细胞骨架系统发生了显著的改变(见照片 19),其变化与同等剂量透射电镜下观察结果相似。

3 讨 论

应用整装电镜技术与选择性抽提相结合,能清晰、完整地观察到整个细胞骨架系统的立体网络结构。由于样本是完整细胞,故可对整个细胞的骨架系统形成整体的概念。扫描电镜像立体感强,结合应用透射电镜和扫描电镜能更好地显示细胞骨架的立体构型。胶体金免疫电镜技术用于精细结构的定位、定性极其有效。经 Triton X-100 抽提后的单核、巨噬细胞骨架系统是一无膜结构的开放系统,十分适合于免疫胶体金标记,本实验应用抗肌动蛋白抗体和抗 α-管蛋白单抗分别对单核、巨噬细胞中的微丝、微管进行了定性标记,取得了良好的效果。

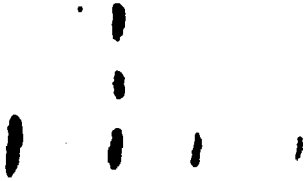
实验结果提示:⁶⁰Co γ射线照射后的 IcR 小鼠腹腔巨噬细胞和人外周血单核细胞的细胞骨架超微结构均发生了明显的改变,并随照射剂量的增加而加重。引起该变化的原因之一可能是电离辐射直接损伤了细胞骨架,引起骨架的破坏、断裂、塌陷,以致影响细胞形态的维持等许多骨架相关功能。

⁶⁰Co γ射线引起的单核、巨噬细胞骨架系统的改变与松胞素 B、秋水仙素所致的细胞骨架系统的变化存在着某些类似之处。松胞素 B、秋水仙素分别为特异性的微丝、微管抑制药物,其主要作用是抑制其聚合,从而破坏了微丝、微管网络。因此,我们认为⁶⁰Co γ射线引起的细胞骨架系统的改变可能与微丝、微管的聚合障碍有关,本室其他同志的工作也支持上述观点^[7,8]。

Ladyman 曾报道,X 射线可引起兔肺巨噬细胞骨架系统的改变,并认为在细胞骨架系统中微管对辐射最敏感,认为辐射引起的整个细胞骨架系统的改变可能是由于辐射损伤了敏感的微管系统而出现的相应变化^[1]。另外,有人报道分裂期细胞对辐射最敏感^[9],这也提示微管可能为辐射敏感成分。

微管的聚合与解聚是受到严格的时间性和空间性控制的。细胞内存在着启动微管聚集的微管组织中心(MTOC),电离辐射可直接破坏 MTOC,致使微管聚合障碍^[10]。电离辐射还可直接影响微管及管蛋白而使其聚合能力降低^[11]。关于电离辐射影响微管形成的机制,有人认为主要是氧化了管蛋白分子上的巯基^[12],而巯基是管蛋白聚合所必需的。在电离辐射过程中,胞浆中可产生大量自由基氧^[13],后者可引起管蛋白分子上巯基的氧化,同时大量的自由基氧也可引起细胞骨架其他成分的损伤。

总之,关于细胞骨架的辐射效应的机制是十分复杂、多因素的。电离辐射可直接影响骨架、骨架蛋白以及骨架形成中心,或通过影响某些控制骨架形成的代谢过程而间接引起骨架系统的改变。细胞骨架中各种骨架成分对辐射的敏感性也可能不尽相同,许多问题还有待进一步探讨。



照片 1 肌动蛋白分子量测定

上方为肌动蛋白,下方两排为低分子量标准蛋白,自右向左依次为:磷酸化酶 B (34 000),牛血清白蛋白(67 000),肌动蛋白(43 000),磷酸化酶 (30 000),烟草花叶病毒外壳蛋白(17 500)



照片 2 从鸡胸中提取的肌动蛋白,在一定条件下(0.1 mol/L KCl, 1 mmol/L $MgSO_4$)在体外聚集成 F-肌动蛋白, 2% 磷酸钨负染, $\times 15\ 000$



照片 3 正常人外周血单核细胞的整装抽提样本, $\times 6\ 000$



照片 4 经整装抽提的 tetracycline 小鼠腹腔巨噬细胞胞膜已完全溶解,胞内可溶性蛋白也已除去,可见胞质中细胞骨架组织成复杂的网络, $\times 5\ 000$



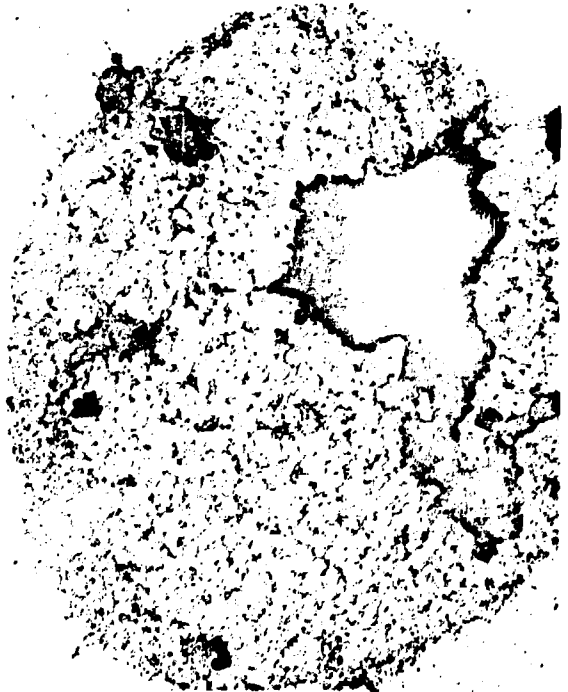
照片5 经 Triton X-100 抽提的 IcR 小鼠腹腔巨噬细胞
微丝被抗肌动蛋白-胶体金(颗粒:10 nm)标记,
×10 000



照片6 抗肌动蛋白-胶体金(颗粒:10 nm)免疫标记的
正常整装单核细胞抽提样本, ×20 000



照片7 抗 α 管蛋白单抗-胶体金(颗粒:10 nm)免疫标记的
正常整装单核细胞抽提样本,
×50 000



照片8 受4 Gy(剂量率:1 Gy/min)照射后的整装抽提
IcR 小鼠腹腔巨噬细胞
胞质中央骨架出现断裂、稀疏、空洞, ×5 000



照片9 受8 Gy(剂量率:2 Gy/min)照射后的IcR小鼠腹腔巨噬细胞的整装抽提样本,×8 000



照片10 受8 Gy(剂量率:2 Gy/min)照射后的IcR小鼠腹腔巨噬细胞整装抽提样本可见细胞出现了明显的团缩,×8 000



照片11 受4 Gy(剂量率:1 Gy/min)照射后的人外周血单核细胞的整装抽提样本,×9 000



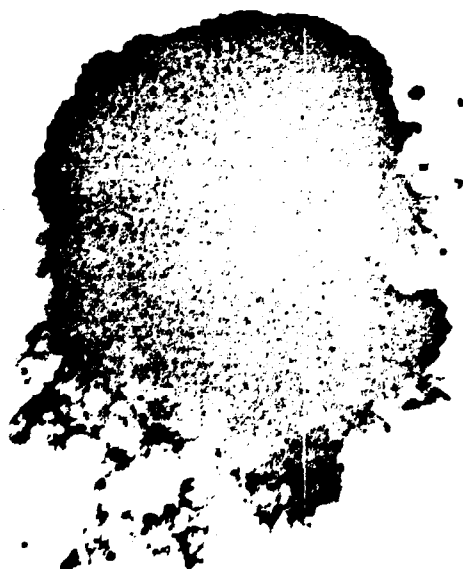
照片12 受4 Gy(剂量率:1 Gy/min)照射后的人外周血单核细胞的整装抽提样本,×8 000



照片 13 松胞素 B(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h)处理的正常人外周血单核细胞整装抽提样本, $\times 12\ 000$



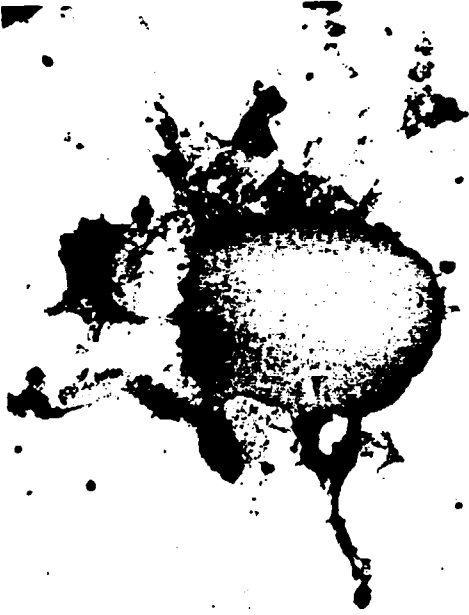
照片 14 松胞素 B(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h)处理的 ICR 小鼠腹腔巨噬细胞整装抽提样本, $\times 5\ 000$



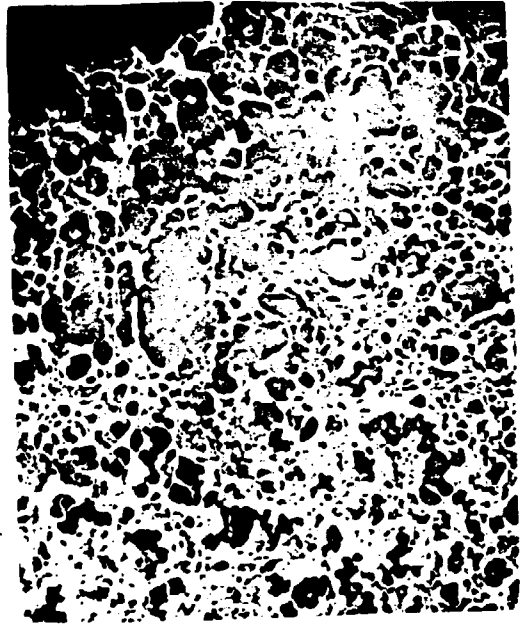
照片 15 松胞素 B(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h)处理的正常人外周血单核细胞整装抽提样本, $\times 12\ 000$



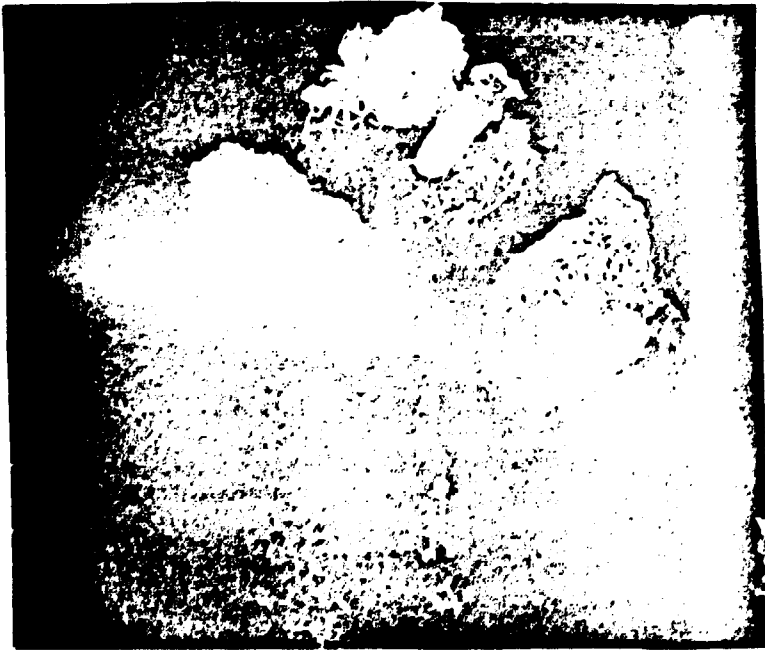
照片 16 秋水仙素(7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h)处理的正常人外周血单核细胞整装抽提样本, $\times 6\ 000$



照片 17 秋水仙素(7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h)处理的1cR小鼠腹腔巨噬细胞整装抽提样本, $\times 6\ 000$



照片 18 Triton X-100处理后的正常人外周血单核细胞扫描电镜观, $\times 15\ 000$



照片 19 受8 Gy(剂量率, 2 Gy/min)照射后的正常人外周血单核细胞整装抽提样本的扫描电镜观, $\times 10\ 000$

参考文献

- [1] Ladyman S. J. et al. The effects of X irradiation on the cytoskeleton of rat alveolar macrophage *in vitro*, *Radiat. Res.* 99, 25~35, 1984
- [2] Ebeahi S. et al. A new simple method of preparing actin from chicken gizzard, *J. Biochem* 97, 693~695, 1985
- [3] Woloszewicz JJ & Proter KR. *Practical Tissue Culture Applications*, Academic Press New York, 59~85, 1979
- [4] Fey E. G. et al. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold; Three-dimensional organization and protein composition, *J. Cell Biol.* 98, 1973~1984, 1984
- [5] Weber K. et al. Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1820~1824, 1978
- [6] Brich M. et al. The effects of cytochalasin B on the cytoplasmic contractile network revealed by whole-cell transmission electron microscopy, *Exp. Cell Res.* 131, 161, 1981
- [7] 李倩倩, 茅子均等. ^{60}Co - γ 射线对小鼠腹腔巨噬细胞和淋巴细胞胞微管的影响, 中国核科技报告, CNIC-00314, SMC-0033, 1989
- [8] 陆肇阳, 茅子均等. 电离辐射对细胞微丝的影响, 中国核科技报告 CNIC-00334, SMC-0037, 1989
- [9] Dubravsky N. et al. The effect of precooling on the radiation sensitivity of proliferating hair follicle, *Radiat. Res.* 65, 481~489, 1976
- [10] Sato C. et al. Microtubule-organizing centres abnormal in number, structure, and nucleating activity in X-irradiated mammalian cells, *J. Cell Biol.* 96(3), 776~782, 1983
- [11] Gal V. et al. Effect of γ -irradiation on microtubule assembly *in vitro*, *Int. J. Radiat. Biol.* 46(4), 435~442, 1984
- [12] Cox R. A. et al. The effects of X-irradiation on microtubule assembly *in vitro*, *Radiat. Res.* 85, 99~115, 1981
- [13] Biaglow J. E. et al. The effects of ionizing radiation on mammalian cells, *J. Chem. Educ.* 58(2), 114~156, 1981

**^{60}Co γ 射线对小鼠腹腔区嗜细胞
和人外周血单核细胞骨架系统的影响**

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

原子能出版社激光照排中心排版

北京市海淀区三环快速印刷厂印刷



开本 787×1092 1/16 ·印张 1/2 ·字数 10 千字
1990 年 3 月北京第一版 · 1990 年 3 月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0422-7

TL · 211

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

ISBN 7-5022-0423-7

TL • 211

P.O.Box 2103

Beijing, China

China Nuclear Information Centre