

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)03-0233-04

辐射损伤导致造血干/祖细胞衰老的机理研究

张琛, 孙可, 耿珊, 刘典锋, 张先平, 刘俊, 徐春燕, 王建伟, 王亚平*

(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室, 组织胚胎学教研室, 重庆 400016)

[摘要] 目的 探讨辐射损伤导致骨髓造血干/祖细胞(HSC/HPC)衰老的可能机制。方法 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为辐照组和假辐照组, 辐照组小鼠经 6.5 Gy 的 X 射线全身一次性辐照, 假辐照组小鼠处理同辐照组, 但不辐照。辐照后 24 h 免疫磁珠分选法分离并计数两组小鼠的 Sca-1⁺造血干/祖细胞(Sca-1⁺HSC/HPC), 流式细胞术检测细胞周期, β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色检测衰老细胞百分率; 混合造血祖细胞集落(CFU-Mix)培养观察分选细胞增殖分化能力, 单细胞凝胶电泳(SCGE)检测辐照导致细胞的 DNA 损伤, RT-PCR 检测细胞衰老相关基因 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} mRNA 的表达; Western blot 法检测 p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1} 蛋白表达。结果 免疫磁性分析法分离纯度的 Sca-1⁺HSC/HPC 可达 94%, 辐照后小鼠每支股骨的 Sca-1⁺HSC/HPC 数量急剧下降, 细胞出现 G1 期阻滞; 形成 CFU-Mix 集落数量和形成集落的细胞数明显降低; SA- β -Gal 染色阳性率显著增高, 彗星实验显示细胞拖尾明显延长; p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} mRNA 表达明显增强, p16^{INK4a}、p21^{Cip1/Waf1} 蛋白的表达水平上调。结论 辐射导致 HSC/HPC DNA 的损伤和衰老相关生物学改变, p16^{INK4a}-Rb 和 p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1/Waf1} 信号通路可能起一定作用。

[关键词] 造血干/祖细胞; 电离辐照; 细胞衰老; DNA 损伤

[中图分类号] R329.2 **[文献标志码]** B

Mechanism of hematopoietic stem/progenitor cell aging induced by radiation damage

ZHANG Chen, SUN Ke, GENG Shan, LIU Dianfeng, ZHANG Xianping, LIU Jun, XU Chunyan, WANG Jianwei, WANG Yaping*

Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China.

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism underlying the aging of hematopoietic stem/progenitor cells (HSC/HPC) induced by radiation stress. **Methods** Male C57BL/6J mice were divided randomly into radiation group and control group. The radiation group were treated with total 6.5 Gy X-ray radiation for 24 h; the control group received the same treatment except radiation. Thereafter, Sca-1⁺HSC/HPC were isolated by magnetic-activated cell sorting (MACS) from bone marrow of all the mice. The distributions of cell cycle were tested by flow cytometry. The percentage of aging cells was detected by SA- β -Gal staining. The potentials of self-renewal and multi-differentiation were measured by CFU-Mix assay. DNA damages of Sca-1⁺HSC/HPC were analyzed by single cell gel electrophoresis technique (SCGE). The expressions of senescence-associated genes p16^{INK4a}, p19^{Arf}, p53, p21^{Cip1/Waf1} mRNA were detected by RT-PCR. Western blotting was performed to analyze the expressions of p16^{INK4a} and p21^{Cip1/Waf1} proteins. **Results** The purity of Sca-1⁺HSC/HPC reached 94% after MACS. Compared with control group cells, after radiation, the number of Sca-1⁺HSC/HPC per femur and CFU-Mix sharply decreased ($P < 0.05$), Sca-1⁺HSC/HPC apparently showed G1 arrest and elevated percentage of SA- β -Gal positive cells ($P < 0.05$), cell trailing had a prolonged time, and the expressions of senescence-associated genes (p16^{INK4a}, p19^{Arf}, p53, p21^{Cip1/Waf1}) and relevant proteins (p16^{INK4a}, p21^{Cip1/Waf1}) were up-regulated significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** DNA damage and senescence-associated biological changes of Sca-1⁺HSC/HPC can be achieved by X-ray radiation, which may be involved in p16^{INK4a}-Rb and p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1/Waf1} signal pathways.

[Key words] hematopoietic stem/progenitor cells; ionizing radiation; cell aging; DNA damage

收稿日期: 2012-10-20; 接受日期: 2012-11-29

基金项目: 国家自然科学基金(81173398, 30973818, 30970872)

作者简介: 张琛(1986-), 男, 陕西西安人, 硕士研究生

Tel: 13608389070; E-mail: awpvvip@yahoo.com.cn

*Corresponding author, 王亚平, E-mail: ypwangcq@yahoo.cn

电离辐射可导致骨髓造血功能抑制,血细胞生成能力下降,机体免疫力低下等。目前认为,辐射对骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)损伤是骨髓造血功能抑制主要因素。DNA损伤是导致成体干细胞减少进而产生衰老的主要原因^[1]。已有研究证明,电离辐射可以诱导HSCs的DNA损伤,这些损伤的积累最终导致造血干细胞的衰老,使其自我更新、多向分化及控制造血系统稳态能力下降^[2-3]。本实验通过对小鼠进行亚致死剂量X线辐照,探讨辐照导致HSCs的DNA损伤,检测衰老相关信号通路中关键基因和蛋白表达水平,旨在了解DNA损伤与HSCs衰老的生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 6~8周龄雄性C57BL/6小鼠,体质量28~33g,重庆市医学实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK(渝)2007-0001)。小鼠随机分成辐照组和假辐照组,每组30只。辐照组小鼠全身一次性辐照6.5 Gy的X线(直线加速器型号:SL75-14型加速器),辐照时间2 min,距离50 cm。假辐照组除不进行辐照,其他处理同辐照组。其他材料和来源如下:伊思柯夫改良Dubecco培养液(Iscove modified Dubecco's medium, IMDM)、胎牛血清(HyClone公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司);抗Sca-1磁珠试剂盒(No. 130-092-529)、MiniMACS磁珠分选系统及MS磁珠分离柱、缓冲液(Miltenyi Biotech公司);小鼠干细胞集落形成混合培养基(Stem cell公司);SA-β-gal Staining Kit试剂盒、蛋白裂解液、ECL发光试剂盒(碧云天生物技术有限公司);RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司);兔抗小鼠p16^{INK4a}、兔抗小鼠p21^{Cip1/Waf1}一抗、山羊抗兔二抗(Santa Cruz公司);FACS Vantage SE流式细胞仪(BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫磁珠分离纯化Sca-1⁺造血干/祖细胞 辐照后24 h,颈椎脱臼处死小鼠,取股骨,分离提取骨髓单个核细胞。按本课题组方法,采用免疫磁性细胞分选系统分离、纯化Sca-1⁺造血干/祖细胞(Sca-1⁺HSC/HPC),并进行细胞活性和纯度鉴定^[9]。

1.2.2 SA-β-半乳糖苷酶染色检测 按照SA-β-gal Staining Kit试剂盒方法对辐照组和假辐照组Sca-1⁺HSC/HPC进行SA-β-半乳糖苷酶染色。染色阳性细胞呈蓝色,倒置相差显微镜下观察200个细胞,计数阳性细胞百分率。

1.2.3 流式细胞术细胞周期分析 收集辐照组及假辐照组Sca-1⁺HSC/HPC, PBS洗1次,700 mL/L冰乙醇,固定24 h, RNase A处理细胞30 min,加入碘化丙啶染色30 min, FACS Vantage SE流式细胞仪检测,每个样品分析细胞数 $\geq 2 \times 10^4$ 个, PC-Lysys II软件进行分析,计算细胞周期各时相的百分比。

1.2.4 造血祖细胞混合集落(CFU-Mix)的培养 依次加入2-

巯基乙醇(1×10^{-4} mol/L)、30 g/L L-谷氨酰胺、马血清、rhEPO、IL-3、rhGM-CSF、分别加入 1×10^4 个分选后的Sca-1⁺HSC/HPC、27 g/L甲基纤维素,总体积2 mL。充分混匀后接种于96孔板,在37℃、含50 mL/L CO₂、饱和湿度的培养箱中培养7 d。根据种植Sca-1⁺HSC/HPC数与形成CFU-Mix数评价辐照组与假辐照组形成CFU-Mix能力与多向分化能力。

1.2.5 单细胞凝胶电泳(彗星实验) 在载玻片上铺琼脂糖,加入30 μL细胞悬液,将制好的凝胶放入冷的裂解液裂解2 h,蒸馏水漂洗3 min,蛋白酶K孵育2 h, Tirs(pH7.5)浸泡3 min。电泳使细胞双链DNA解螺旋,溴化乙锭染色5 min,双蒸水洗掉表面染料,荧光显微镜下观察结果。每组随机观察20个细胞,记出细胞拖尾率,并用目镜测微尺测量30个拖尾细胞的尾长(DNA迁移距离),计算出每组的平均尾长。Olive尾矩是头部中心到尾部中心的距离和尾部荧光强度百分比的乘积。

1.2.6 p16^{INK4a}, p19^{Arf}, p53, p21^{Cip1/Waf1} mRNA表达检测 分别提取辐照组及假辐照组Sca-1⁺HSC/HPC各 6×10^6 个, TRIzol裂解后提取各组细胞总RNA。将总RNA反转录为相应的cDNA,反转录反应条件:42℃ 30 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min。以RNA反转录得到的cDNA为模版,扩增p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1}、GAPDH为内参照。引物序列见表1,设计和合成由上海生工公司完成。反应条件为:94℃ 2 min, 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 共35个循环。PCR产物进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统对基因条带进行扫描成像, Quantity One软件(Bio Rad)分析电泳图上每条基因条带光密度值,计算各个样本的强度与内参的比值。

表1 PCR引物

基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
p16 ^{INK4a}	正向: TCCGCTGCAGACAGACTGGCCAG	295
	反向: CATCGCCACATCCAGCCGAGC	
p19 ^{Arf}	正向: AAGAAGTCTGCGTGGCGAC	215
	反向: AGTACCGGAGGCATCTTGGACA	
p53	正向: CACGTACTCTCTCCCTCAA	294
	反向: GGCTCATAAGGTACCACCAG	
p21 ^{Cip1/Waf1}	正向: ATTCTGGTGATGTCGAC	144
	反向: AAAGTTCACCCGTTCTCGG	
GAPDH	正向: GTGCTGACTATGCTGCTGAGTCT	602
	反向: GAGTGGAGTGTGCTGTGAAGT	

1.2.7 Western blot法检测p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1}蛋白的表达 收集辐照组及假辐照组细胞,分别提取与测定总蛋白浓度。取等量总蛋白经SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜,50 g/L脱脂奶粉封闭2 h,加入兔抗鼠p16^{INK4a}一抗(1:200),4℃过夜,漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:5 000),室温反应2 h, ECL增强发光试剂显色,凝胶成像系统曝光,显影定影后观察结果。相同方法检测p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1}蛋白的表达。

1.2.8 统计学分析 数据处理应用SPSS 17.0软件完成,统计方法采用方差分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫磁珠分离纯化 Sca-1⁺HSC/HPC MACS 分选前 Sca-1⁺细胞百分比为(1.02 ± 0.19)%; MACS 分离纯化后 Sca-1⁺细胞纯度可达(93.66 ± 0.83)% (图1)^[4]。

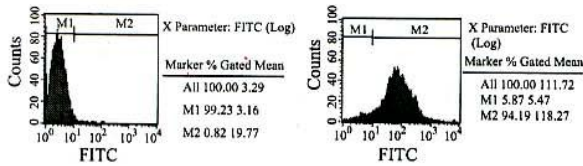


图1 磁珠分选前后 Sca-1⁺HSC/HPC 纯度的比较

2.2 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 计数 辐照后24 h 时, 辐射组 Sca-1⁺HSC/HPC 数量比假辐射组急剧下降。

表2 辐照组小鼠单个股骨 Sca-1⁺HSC/HPC 计数 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	Sca-1 ⁺ HSC/HPC 计数(× 10 ⁴)
辐照组	3.42 ± 0.27
假辐照组	0.36 ± 0.08*

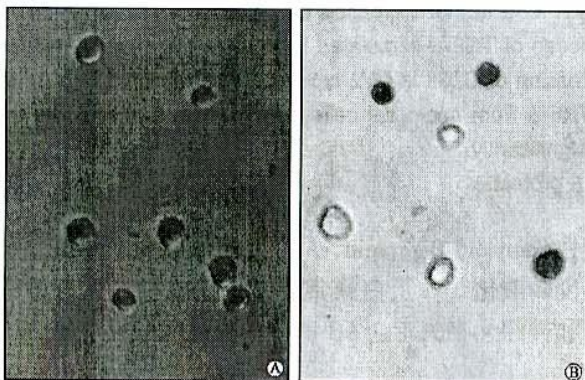
*P < 0.05 vs 假辐照组.

2.3 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 衰老 SA-β-半乳糖苷酶染色 SA-β-半乳糖苷酶染色后衰老细胞呈阳性, 胞质内可见蓝色颗粒; 阴性细胞未着色。结果表明, 辐照组 SA-β-半乳糖苷酶染色阳性细胞明显高于假辐照组(图2, 表3)。

表3 辐照组 Sca-1⁺HSC/HPC 的 SA-β-半乳糖苷酶染色阳性细胞百分比 (n = 10, %, $\bar{x} \pm s$)

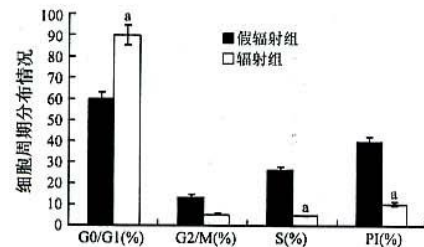
组别	SA-β-Gal 阳性细胞百分比(%)
辐照组	12.05 ± 0.49
假辐照组	2.10 ± 0.18*

*P < 0.05 vs 假辐照组.



A: 假辐照组 SA-β-半乳糖苷酶表达; B: 辐照组 SA-β-半乳糖苷酶表达. 图2 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 的衰老 SA-β-半乳糖苷酶染色(× 200)

2.4 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 的细胞周期 6.5 Gy 全身小鼠辐照 24 h, 骨髓 Sca-1⁺HSC/HPC 出现 G1 期阻滞, 其 G0/G1 期比例明显增高, S 期比例减少, 增殖指数 PI[(S + G2)/M] 明显降低(P < 0.05, 图4)。



*P < 0.05 vs 假辐照组.

图3 辐照后骨髓 Sca-1⁺HSC/HPC 的细胞周期分布

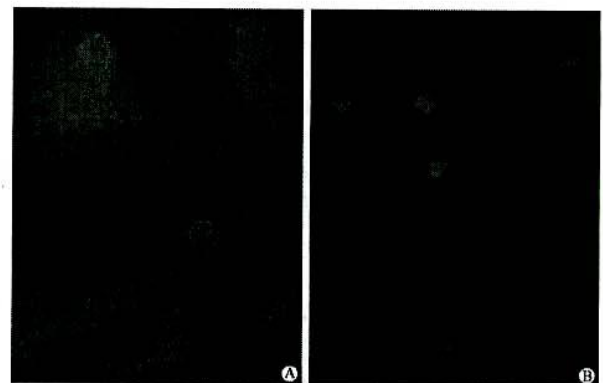
2.5 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 形成造血祖细胞混合集落能力 辐照组 Sca-1⁺HSC/HPC 形成造血祖细胞混合集落(CFU-Mix)集落数量和形成集落的细胞数明显低于假辐照组(表4)。

表4 辐照后 Sca-1⁺HSC/HPC 混合集落形成数量检测

组别	造血细胞混合集落个数 (个/10 ⁴ Sca-1 ⁺ HSC/HPC)
辐照组	4.75 ± 0.50
假辐照组	12.75 ± 0.96*

*P < 0.05 vs 假辐照组.

2.6 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 的 DNA 损伤 辐照组 Sca-1⁺HSC/HPC 有明显的拖尾现象。辐照组尾长 109.50 ± 6.36, Olive 尾矩 106.63 ± 7.69, 而假辐照组无拖尾现象(图4)。



A: 辐照组; B: 假辐照组.

图4 两组细胞的彗星实验荧光图片(× 200)

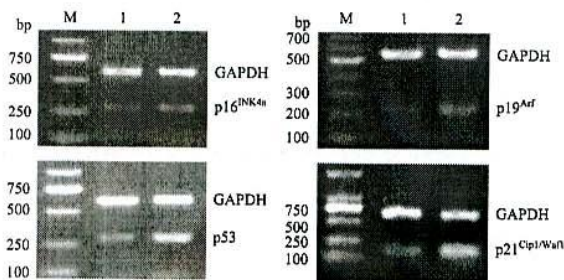
2.7 辐照小鼠 Sca-1⁺HSC/HPC 衰老相关基因的 mRNA 表达水平的变化 琼脂糖凝胶电泳可清晰见

到 28S、18S 和 5S 3 个条带,说明提取的 RNA 完整性好。PCR 结果显示,辐照组 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} mRNA 表达水平显著高于假辐照组(图 5,表 6)。

表 5 辐照组与假辐照组彗星实验尾长及 Olive 尾矩

组别	(n = 10, $\bar{x} \pm s$)	
	尾长	Olive 尾矩
辐照组	109.50 ± 6.36	106.63 ± 7.69
假辐照组	4.33 ± 2.08 ^a	1.48 ± 0.23 ^a

^aP < 0.05 vs 假辐照组。Olive 尾矩是头部中心到尾部中心的距离和尾部荧光强度百分比的乘积。



M: DNA 标准参照物; 1: 假辐照组; 2: 辐照组。

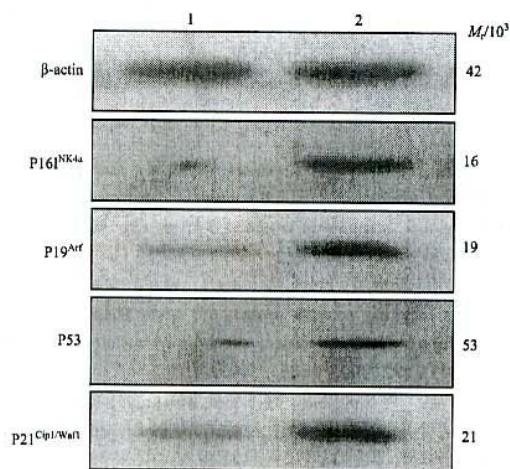
图 5 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} mRNA 表达

表 6 衰老相关基因的 mRNA 表达

组别	(GAPDH 光密度比值, n = 6)			
	p16 ^{INK4a} /GAPDH	p19 ^{Arf} /GAPDH	p53/GAPDH	p21 ^{Cip1/Waf1} /GAPDH
假辐照组	0.500 ± 0.028	0.479 ± 0.033	0.531 ± 0.037	0.489 ± 0.024
辐照组	0.880 ± 0.043 ^b	0.878 ± 0.041 ^b	0.881 ± 0.043 ^b	0.789 ± 0.031 ^b

^bP < 0.01 vs 假辐照组。

2.8 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 蛋白的表达水平的变化 Western blot 结果显示辐照组细胞的 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 蛋白表达水平较假辐照组明显升高(图 6)。



1: 假辐照组; 2: 辐照组。

图 6 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} 蛋白表达

3 讨论

正常组织内环境的稳定间接由组织特异性的干细胞来维持与控制,而衰老机体在应激与损伤状态时保持稳态和恢复稳态能力均下降,这些现象实际上都与组织中干细胞数量减少和功能衰退密切相关^[5]。造血干细胞是干细胞研究与应用领域中开展最早,也是迄今了解最深入的一种成体干细胞,造血干细胞衰老与机体衰老密切相关^[6-7]。电离辐照可以诱导造血干细胞 DNA 的损伤^[11],而 DNA 损伤反应在诱导造血干细胞衰老的机制中起重要作用^[8-9]。

单细胞凝胶电泳实验结果显示,辐照组小鼠的 Sca-1⁺ HSC/HPC 细胞出现明显的拖尾现象,拖尾率 100%,而假辐照组无拖尾现象,说明 X 线辐照导致了辐照组小鼠 Sca-1⁺ HSC/HPC 细胞 DNA 的严重损伤。辐照组小鼠的 Sca-1⁺ HSC/HPC 的 SA-β-gal 染色阳性率明显提高,出现了显著地衰老现象;G0/G1 期细胞比例增加,提示辐照组小鼠的 Sca-1⁺ HSC/HPC 细胞大多数停止在 G1 期,细胞周期停滞,细胞的增殖功能受到严重抑制;CFU-Mix 集落数量和形成集落的细胞数明显低于假辐照组,这些都符合干细胞衰老的相关生物学特征,即自我更新和多向分化能力衰退。说明造血干细胞 DNA 的损伤诱导了其自身的衰老。

细胞衰老过程是借助于信号转导途径来实现的,其中,端粒非依赖的 p16^{INK4a}-Rb 和端粒依赖的 p19^{Arf}-p53-p21^{Cip1} 信号途径是 HSC 衰老的两个关键分子信号通路,任何一条信号通路激活均可诱导 HSC 衰老^[10]。Janzen 等^[11]以 p16^{INK4a} 正反义载体分别转染年轻的人成纤维细胞,p16^{INK4a} 过表达抑制了 Rb 磷酸化引起细胞发生 G1 期阻滞而早衰;其反义载体转染可以延缓细胞的衰老,抑制 p16^{INK4a} 的表达,出现端粒缩短减慢,细胞 DNA 损伤修复能力增强,说明 p16^{INK4a} 的积累不是衰老的结果,而是衰老的诱因。在不同 p53 活性水平的突变小鼠中,研究发现老年小鼠细胞中 p53 低水平突变的小鼠中 HSC 细胞数量增多并且其造血干细胞的增殖能力增强,而高水平 p53 突变小鼠的 HSC 细胞的移植能力显著下降,说明 p53 效能的改变在一定程度上会严重影响衰老机体中 HSC 数量、增殖和潜能^[12]。p21 作为 p53 下游激活产物对调控细胞周期具有重要作用,它能够与 CDK 结合而抑制其活性,从而阻止 DNA 合成和细胞分裂导致 G1 期阻滞。本研究显示辐照组细胞 p16^{INK4a}、p19^{Arf}、p53、p21^{Cip1/Waf1} mRNA 表达水平明显高于假辐照组,且蛋白表达水平与转录

(下转 241 页)