

氩氛激光诱导离体小鼠胸腺细胞 凋亡的实验研究*

刘炳荣 史桂英 徐 清

(上海第二医科大学生物物理教研室 上海 200025)

提要 实验发现随着低功率氩氛激光照射时间的延长(激光剂量的增加),胸腺细胞凋亡的相对数相应增大,表现在其 DNA 直方图上可见亚二倍体峰升高。

关键词 氩氛激光,细胞凋亡,亚二倍体

细胞凋亡(Apoptosis, AP)是由于各种外界刺激引起细胞死亡的形态学特征,与细胞正常分化过程中引起的细胞数减少——程序性细胞死亡(Programmed Cell Death, PCD)有所区别,PCD 是一种细胞生理性死亡,但是往往将这两个名词不严加区别而互相通用。近年来,细胞凋亡在医学细胞生物学界受到关注,成为研究的热点之一。细胞凋亡的形态特征和理化特性不同于细胞坏死,在形态上细胞质膜保持完整性并不引起机体的炎症反应。现在流式细胞计(Flow Cytometer, FCM)已成为定量分析细胞凋亡的主要技术之一,通常单参数 DNA 分析用来识别细胞凋亡——亚二倍体(Subdiploid)和正常细胞。细胞凋亡群体 FCM 分析的主要问题是区分细胞凋亡和细胞碎片,本实验中通过计算机设窗将细胞碎片删除。引起细胞凋亡的因素很多,激光照射能否引起细胞凋亡?为此本实验中设计了低功率氩氛激光照射离体小白鼠胸腺细胞,恰好不致引起细胞的坏死,而是诱导胸腺细胞凋亡。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

实验动物为 2~4 周龄的 ICR 种小白鼠(中国科学院动物研究所引种)6 只。每次实验取 2 只小鼠用颈脱臼法处死,无菌条件下取胸腺,胸腺组织立刻投入 PH: 7.2 的 DMEM 液(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 美国 GIBCO BRL 公司产)仔细分离包膜,漂洗,制备单细胞悬浮液。细胞悬液经离心(1500 r/min, 5 min),弃上清液,用 DMEM 液(含 10% 小牛血清)再悬浮细胞,调节细胞浓度为 $1\sim 2\times 10^6$ 个每毫升。分装于 10 孔(24 孔细胞培养板),每孔 1.5 ml,置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱内,培养 24~26 h。

* 国家自然科学基金会信息科学部支助项目。

1.2 激光照射

氦氖激光器由上海市激光研究所提供。取出 24 孔细胞培养板, 放在 37°C 水浴箱内进行氦氖激光照射, 照射功率为 9.4~9.6 mW, 光斑直径为 16 mm, 每两孔为一组, 照射时间分别为 30, 60, 90, 120 min, 对应的激光照射剂量分别为 8.414~8.593, 16.827~17.185, 25.241~25.778 和 33.655~34.371 J/cm²。另两孔放在相同环境条件下作为对照, 不照射激光。

1.3 细胞荧光染色

激光照射后, 取出细胞样品, 放在试管中立刻用 70% 乙醇固定, 4°C 冷藏 2 h 以上。离心弃乙醇, 用 PH: 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS) 漂洗三次, 调整细胞浓度 1~2×10⁶ 个每毫升。取该胸腺细胞悬液 150 μl, 加 0.1% 的 RNAse 100 μl 混和, 温育 15 min, 加 PI(碘化丙啶) 250 μl, 定量荧光染色, PI 终浓度为 25 μg/ml, 温育 15 min。

1.4 定量检测

用 FCM(FACSscan, 美国 Becton Dickinson 公司产) 定量测定, 每个样品检测 10⁴ 个细胞, 仪器激发波长为 488 nm, 功率为 15 mW, 用 B. D. 公司的 LYSIS- 软件分析数据。以 DNA 直方图形式表示细胞 DNA 含量的改变, 纵坐标为细胞数, 横坐标为道数, 表示 DNA 的相对含量。

2 结 果

按规定时间用氦氖激光照射离体小白鼠的胸腺细胞, 在细胞凋亡过程中引起 DNA 降解的小片段, 经过乙醇固定, 充分漂洗后, 小片段游离出细胞, 因此细胞凋亡细胞的 DNA 比正常细胞为低, 在 FCM 直方图上可观察到 G_{1/0} 峰左侧出现一个小峰——亚二倍体峰(图 1)。根据亚二倍体峰的高低可知细胞凋亡的相对数(图 2)。随着激光照射剂量的增加, 胸腺细胞凋亡数

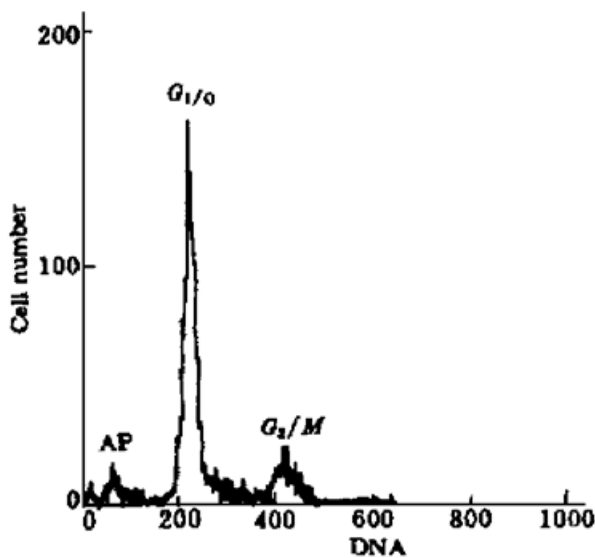


图 1 He-Ne 激光(33.655~34.371 J/cm²)照射, 小鼠胸腺细胞凋亡的 FCM 分析

Fig. 1 Flow cytometric analysis of apoptotic mice thymocytes. The cells were irradiated by a He-Ne laser in a dose 33.655~34.371 J/cm²

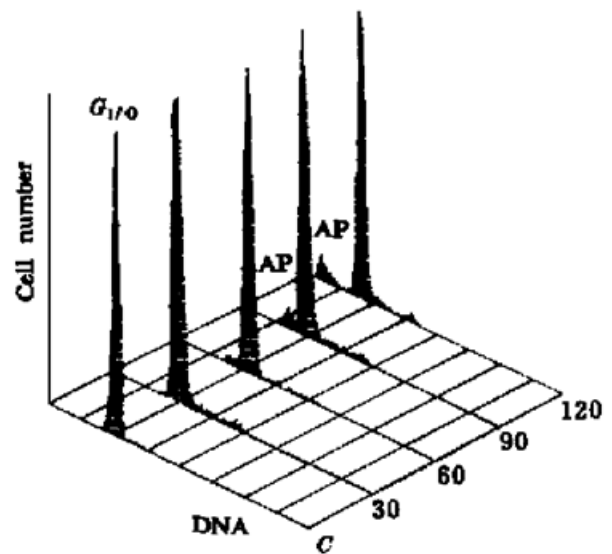


图 2 He-Ne 激光照射小鼠胸腺细胞凋亡与对照组比较

Fig. 2 Flow cytometric analysis of apoptotic mice thymocytes. Histogram shows a comparison of the group irradiated with a He-Ne laser for 30~120 min with the control group

升高(表 1), 从照射 30 min, 激光剂量为 8.414~ 8.593 J/cm², 细胞凋亡占 1.89%, 到照射 120 min, 激光剂量为 33.655~ 34.371 J/cm², 细胞凋亡增加到 13.64%。

表 1 氦氛激光照射引起小鼠胸腺细胞凋亡的百分比

Table 1 The apoptosis mice thymocytes generated by irradiation of He-Ne laser (%)

control group	irradiated group (min)			
	30	60	90	120
0	1.89	3.40	9.11	13.64

3 讨 论

细胞凋亡同细胞有丝分裂一样, 在生物界普遍存在, 例如几乎所有高等动物的胚胎发育的过程中, 以及病理和生理条件下的组织增生和萎缩都发生细胞凋亡, 体外实验中, 轻度的外界损伤可诱导细胞凋亡。Zamai 等^[1]用地塞米松(DEX)可诱导小鼠胸腺细胞的细胞凋亡。Ingrid Schmid 等^[2]发现人胸腺细胞受到 DEX 的作用引起细胞凋亡的过程。徐清等^[3]用氦氛激光进行血管内照射治疗, 应用 FCM 检测到外周血淋巴细胞中有细胞凋亡。刘凡光等^[4]应用 510 nm 激光照射体外培养的血管平滑肌细胞, 表明激光直接照射能引起平滑肌细胞出现细胞凋亡。细胞凋亡是由于钙离子、镁离子依赖的细胞内源性核酸内切酶的激活^[5], 细胞内长链 DNA 分子被内切酶切断而降解, 形成分子量不一的小片段, 当细胞用 70% 的乙醇固定后, 经充分漂洗使细胞内 DNA 小片段游离出来, 细胞的 DNA 含量减少。Karu 等^[6]用氦氛激光照射人外周血淋巴细胞, 激光剂量为 56 J/cm², 发现激光照射后 2 min 内细胞内的 [Ca²⁺]_i, 照射激光组比对照组增加 2~ 3 倍, 在基线以上 270~ 422 nmol, 对照组为 124~ 135 nmol, 照射后 3~ 6 min, 与对照组相比, 无统计意义。

本实验用氦氛激光照射 30 min, 激光剂量达到 8.414~ 8.593 J/cm² 就出现细胞凋亡, 可能因为激光光强呈高斯分布, 光束中心的光密度比较强, 首先出现细胞凋亡。随着激光照射时间延长, 照射剂量的增加, 细胞凋亡数所占比例逐渐递增, 照射到 120 min 时, 激光剂量达到 33.655~ 34.371 J/cm², 细胞凋亡增加到 13.64%。

参 考 文 献

- 1 Zamai L., Falcieri E., Zauli G. *et al.*. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry*, 1993, **14**: 891~ 897
- 2 Ingrid Schmid, Christel H. U., Janis V. G.. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry*, 1994, **15**: 12~ 20
- 3 Xu Qing, Xu Songlin, Shi Guiying *et al.*. Quantification of apoptosis in peripheral blood lymphocytes of ILIB patients. *Laser Biology (激光生物学)*, 1996, **5**(4): 923~ 926 (in Chinese)
- 4 Liu Fanguang, Gu Ying, Li Junheng *et al.*. Preliminary study on laser (510 nm) induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Chinese Journal of Laser Medicine (中国激光医学杂志)*, 1996, **5**(3): 137~ 139 (in Chinese)
- 5 Cohen L. J., Duke R. C.. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol*, 1984, **132**(1): 38~ 42
- 6 Karu T., Smolyaninova N., Zelenin A.. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. *Lasers Life Sci.*, 1991, **4**(3): 167~ 178

Research of Apoptotic Mice Thymocytes in Vitro Generated by He-Ne Laser Irradiation

Liu Bingrong Shi Guiying Xu Qing

(*Department of Biophysics, Shanghai No.2 Medical University, Shanghai 200025*)

Abstract An instant elevation in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) appears significant after the irradiation of cells with a He-Ne laser. Studies using various cell types have demonstrated changes in DNA fluorescence that were attributable to a process of the apoptosis. The apoptosis is activation of an endonuclease, which has relation to the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The study has discovered an increase of the apoptosis of the mice thymocytes following the irradiation time elongation with the He-Ne laser. The apoptosis shows an elevation of the subdiploid peak in a histogram.

Key words He-Ne laser, apoptosis, subdiploid