

ACTD 对 V79 旁观者细胞光学和超微结构影响*

靳翠红, 巫生文, 逯晓波, 刘秋芳, 刘洋, 蔡原

摘要:目的 观察放线菌素 D (ACTD) 对靶细胞和旁观者细胞的光学和超微结构影响, 探讨 ACTD 能否诱导旁观者效应 (BE)。方法 用不同剂量 ACTD (0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L) 处理 V79 靶细胞 1 h, 在 4 mg/L ACTD 作用 4、8、12 和 24 h 取靶细胞去细胞培养液 (CM) 培养正常细胞 24 h 后, 观察 BE; 形态学观察用倒置光学显微镜, 超微结构用透射电子显微镜观察, 存活率用克隆形成实验检测。结果 随着 ACTD 剂量增加, 靶细胞数量逐渐减少, 而变形细胞数量增多; CM 处理旁观者细胞数目减少, 脱壁增加; 超微结构观察 CM 处理旁观者细胞出现凋亡征象, 光学及超微结构改变均以 4 h CM 组效应最重, 随 CM 时段延后减轻; 细胞存活率在 4、8、12、24 h CM 组分别为 (59.5 ± 3.4)%、(69.2 ± 4.5)%、(88.8 ± 5.2)% 和 (61.3 ± 6.8)%, 均低于对照组, 高于 4 mg/L ACTD 组 (50.0 ± 6.5)% ($P < 0.05$)。结论 ACTD 可以诱导旁观者细胞凋亡, 以 4 h CM 效应最强。

关键词: 放线菌素 D; 条件培养液; 旁观者效应; 超微结构

中图分类号: Q 355

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)02-0204-03

Effect of actinomycin D on apoptosis in V79 target and bystander cells JIN Cui-hong, WU Sheng-wen, LU Xiao-bo et al. Department of Toxicology, School of Public Health, China Medical University (Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To observe the effect of actinomycin D (ACTD) and conditioned medium obtained from ACTD-exposed V79 cells on cell morphology and ultrastructure to determine whether ACTD could induce bystander effect in V79 cells. **Methods** V79 cells were administrated with ACTD for 1 hr at different dose (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0 mg/L). Different period conditioned medium (CM) was collected at 4, 8, 12 and 24 hr after ACTD treatment to culture bystander cells for 24 hr to observe the bystander effect. Cell morphology and ultrastructural changes were observed under phase contrast optical microscope and transmission electron microscopy, respectively. **Results** The numbers of V79 cells reduced and those of abnormal cells increased in ACTD-treated groups in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Bystander cells were much less and the cells turned round and many cells got rid of wall. The bystander cells damage alleviated with the time but aggravated in 24 hr CM-treated bystander cells. Under transmission electron microscopy, the cells were in normal shape with normal organelles and nuclear. In 4 mg/L ACTD-exposed cells, shrank and apoptotic bodies formed. Amongst the bystander cells treated with 4 hr CM, apoptosis phenomenon was the most obvious and apoptosis reduced with the time till a rebound in 24 hr CM. Death type of the bystander cells was mainly apoptotic. Survival rates of the bystander cells in 4, 8, 12, and 24 hr CM groups were 59.5 ± 3.4%, 69.2 ± 4.5%, 88.8 ± 5.2%, and 61.3 ± 6.8%, respectively, which all were lower than that of the control group (100.0 ± 0.1%) and higher than that of 4 mg/L ACTD group (50.0 ± 6.5%). **Conclusion** ACTD could induce apoptosis of bystander V79 cells. The 4 hr CM treatment induces the strongest bystander effect.

Key words: actinomycin D; conditioned medium; bystander effect; ultrastructure

电离辐射所致旁观者效应 (bystander effect, BE) 的发现已有 50 余年, 但直到近几年才发现某些化学物也可引起 BE, 具体机制尚不清楚⁽¹⁾。实验证实, 电离辐射作用细胞后可能分泌细胞因子进入培养液, 影响未受照细胞存活率, 而单独照射无细胞培养基不产生这种效应⁽²⁾。提示细胞因子参与电离辐射 BE 机制。靶细胞 DNA 损伤是 BE 起因, 而化学因素是引起遗传物质和一般毒性损伤最重要、最普遍因素, 故证实化学因素可能诱发 BE 具有重要意义⁽³⁾。本研究采用经典肿瘤治疗药物放线菌素 D (actinomycin D, ACTD), 用共培养转移试验观察靶细胞和旁观者细胞凋亡/坏死情况来确定 ACTD 能否通过释放可溶性因子来诱导 BE 发生。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞及培养 中国仓鼠成纤维细胞 V79-C3 细胞株 (中国医学科学院基础医学研究所细胞中心)。细胞株于含

10% 胎牛血清高糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) 培养液中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 隔天传代。

1.2 主要试剂和仪器 放线菌素 D (浙江海正药业股份有限公司), DMEM 高糖培养基 (英国 Gibco 公司), 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司), 四甲基偶氮唑盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] (美国 Sigma 公司); IMT-413 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 公司), HF90CO₂ 培养箱 (香港 Heal Force 公司), JEM-1200EX 透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司)。

1.3 指标及检测方法

1.3.1 ACTD 处理 在细胞对数生长期, 用不同剂量 ACTD (0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L) 无血清培养液培养 V79 细胞 1 h, 弃去培养液, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 洗 3 次, 加入正常培养液培养 24 h, 观察靶细胞效应。以 ACTD 处理结束 (4.0 mg/L) 作为旁观者细胞培养计时起点, 分别在第 4、8、12 和 24 h 取细胞培养液, 0.22 μm 滤器过滤后加入到正常 V79-C3 细胞 (旁观者细胞) 中, 再培养 24 h 后, 进行旁观者效应观察。

1.3.2 形态学观察 将不同剂量 ACTD 处理后细胞用 PBS

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30471475)

作者单位: 中国医科大学公共卫生学院毒理教研室 辽宁 沈阳 110001

作者简介: 靳翠红 (1973-), 女, 河南开封人, 博士, 副教授, 研究方向: 遗传毒理学。

通讯作者: 蔡原, E-mail: emuycai@163.com

洗 3 次,加入正常培养基,继续培养 24 h,用倒置相差显微镜观察、摄像。

1.3.3 透射电子显微镜观察细胞超微结构 将细胞以 5×10^4 个/mL 密度接种于细胞瓶中,贴壁后加入 ACTD 处理细胞 1 h, PBS 洗 3 次,加入正常培养基继续培养 24 h。胰酶消化收集细胞,于离心管 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗 2 次,再将细胞转移至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 15 ~ 20 min 使细胞成团,小心吸弃上清,沿管壁轻轻加入 2.5% 戊二醛 4 °C 固定,冷 PBS 洗 2 次,1% 锇酸固定 30 ~ 60 min,酒精梯度脱水。Epon812(环氧树脂)包埋 2 h,切成 70 nm 超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色。透射电子显微镜下观察并拍照。

1.3.4 克隆形成实验观察细胞存活率 将 V79 细胞制成单细胞悬液,以适当细胞密度按每皿 100、200 个细胞梯度接种于培养皿中(直径 60 mm),以十字方向轻晃培养皿使细胞分散均匀,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 2 ~ 3 周。出现肉眼可见克隆终止培养,弃去培养液,用磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)小心浸洗 2 次,加纯甲醇 5 mL 固定 15 min。弃去固定液后,加 Giemsa 染色 30 min,流水冲洗,空气干燥,肉眼直接计数克隆数。克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数) × 100%。

1.4 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计学分析。计量指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用单因素方差分

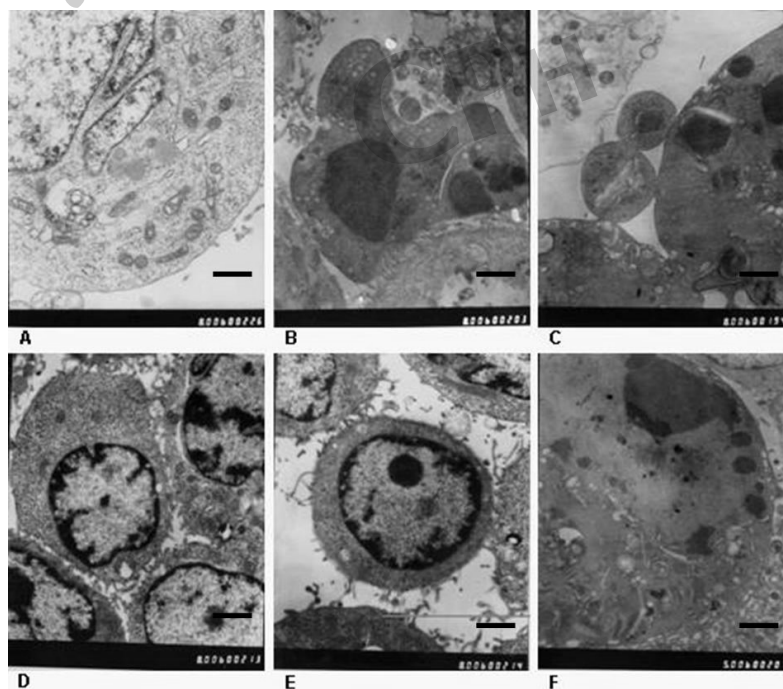
析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度 ACTD 对靶细胞形态学影响 对照组细胞形态正常,呈梭形、多角形和扁平状。0.25 mg/L ACTD 组细胞形态无明显变化。0.5 mg/L ACTD 组少部分贴壁细胞变圆、脱落。1 mg/L 组细胞数量明显减少,部分细胞皱缩变圆、细胞膜完整,有发泡现象。随剂量增加变形细胞数量增多,8 mg/L ACTD 组,细胞损伤最为严重,细胞溶解、消失,死亡细胞过多。故选择效应明显的 4 mg/L ACTD 来获取去细胞培养液来观察 BE。

2.2 不同时段 CM 对旁观者细胞形态学影响 对照组旁观者细胞数目较多,形态正常;4 h CM 组细胞数目大量减少、间隙增大,细胞变圆,脱壁细胞增多;8 h CM 组细胞数目减少,存在少量脱壁细胞;12 h CM 组细胞数稍降;24 h CM 组细胞数量明显减少,细胞变圆。

2.3 不同时段 CM 对旁观者细胞超微结构影响(图 1) 对照组旁观者细胞形状正常,细胞器、核清晰;4 mg/L ACTD 组细胞固缩,胞膜完整,多个凋亡小体形成。4 h CM 组细胞凋亡现象明显,出现细胞皱缩,染色质固缩,出现吐泡现象;8 h CM 组多数细胞出现染色质边集,聚集成块;12 h CM 组个别细胞染色质边集;24 h CM 组细胞有凋亡小体形成。



注: A: 对照组; B: 4 mg/L ACTD 靶细胞组; C ~ F: 分别为 4、8、12、24 h CM 组。

图 1 旁观者细胞和靶细胞超微结构改变

2.4 不同时段 CM 及 ACTD 对旁观者细胞和靶细胞存活率影响 不同时段 CM 培养旁观者细胞,旁观者细胞存活率均低于对照组细胞而高于靶细胞。4、8、12、24 h CM 存活率分别为 $(59.5 \pm 3.4)\%$ 、 $(69.2 \pm 4.5)\%$ 、 $(88.8 \pm 5.2)\%$ 和 $(61.3 \pm 6.8)\%$, 均低于对照组 $(100.0 \pm 0.1)\%$ ($F = 36.76$, $P < 0.05$), 高于 4 mg/L ACTD 组 $(50.0 \pm 6.5)\%$ ($F = 15.80$, $P < 0.05$)。旁观者细胞存活率在 4 ~ 12 h 逐渐增加,24 h 又下降,可能是 12 ~ 24 h 期间,旁观者因子有蓄积造成的。而 4 h CM 诱导旁观者细胞损伤的作用最强。

3 讨论

理化因素所致 BE 报道较少。2002 年, Xiao 等⁽⁴⁻⁵⁾ 首次报道 UVA 及濒死靶细胞 CM 均可诱发 BE。近几年研究发现化学因素也能诱导 BE⁽⁶⁻⁷⁾。但对于某些化学毒物(遗传物质损伤剂)是否能引起 BE 还未见报道。电离辐射诱导介质中可溶性因子分泌已经得到了广泛证实⁽⁸⁾, 而对其他 DNA 损伤剂诱导 BE 能力却知之甚少。ACTD 是一种 DNA 损伤剂,广泛应用于临床肿瘤治疗⁽⁹⁾。本研究形态学观察发现细胞数量随剂量增加而减少,变形细胞数量增多,8 mg/L 组对细胞

损伤最为严重,细胞溶解消失,死亡细胞多。故选择 4 mg/L 作为处理因素来获取 CM。旁观者细胞形态学观察及透射电镜观察发现靶细胞 4 h CM 处理组细胞发生染色质固缩,随时间延后效应减弱,在 24 h 由于收集更长时间 CM(12~24 h) 出现反弹现象。与靶细胞改变相似,均表现为细胞凋亡。本研究证实 ACTD 处理后不同时段 CM 作用于旁观者细胞引起了 BE(不存在细胞与细胞连接),提示在 ACTD 所致 V79 靶细胞凋亡进程中分泌了某种因子导致 BE 发生。

参考文献

- Hall EJ, Hei TK. Genomic instability and bystander effects induced by high-LET radiation[J]. *Oncogene*, 2003, 22: 7034-7042.
- Maguire P, Mothersill C, Seymour C, et al. Medium from irradiated cells induces dose-dependent mitochondrial changes and BCL2 responses in unirradiated human keratinocytes[J]. *Radiat Res* 2005, 163: 384-390.
- Zhou H, Suzuki M, Geard CR, et al. Effects of irradiated medium with or without cells on bystander cell response[J]. *Mutat Res*, 2002, 499: 135-141.
- Xiao Y, de Feyter E, Van Oven CH, et al. Induction and detection of bystander effects after combined treatment of cells with 5-bromo-2'-deoxyurine, Hoechst33258 and ultraviolet A light[J]. *Int J Radiat Biol* 2004, 80: 105-114.
- 蔡原, 肖云. 联合处理 V79 细胞对旁观者效应的诱导及识别[J]. *中国公共卫生* 2004, 20(10): 1215-1216.
- Asur RS, Thomas RA, Tucker JD. Chemical induction of the bystander effect in normal human lymphoblastoid cells[J]. *Mutat Res*, 2009, 676(1-2): 11-16.
- Asur R, Balasubramaniam M, Marples B, et al. Bystander effects induced by chemicals and ionizing radiation: evaluation of changes in gene expression of downstream MAPK targets[J]. *Mutagenesis*, 2010, 25(3): 271-279.
- Yang H, Asaad N, Held KD. Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts[J]. *Oncogene* 2005, 24: 2096-2103.
- Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, et al. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D[J]. *Leukemia* 2001, 15(12): 1868-1877.

收稿日期: 2011-09-19

(解学魁编辑 郑新校对)

【公共卫生论坛】

中国基本公共卫生服务均等化现状、问题及对策*

陈丽¹ 姚岚¹ 舒展²

关键词: 基本公共卫生服务; 均等化; 政策建议

中图分类号: R-012

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)02-0206-04

公共服务均等化是现代文明发展的重要标尺^[1],也是“以人为本”执政理念的直接体现和政府公共服务职能的重要内容^[2]。2009 年党中央、国务院做出了进一步深化医药卫生体制改革战略决策,坚持以公益、公平和人人享有基本医疗卫生服务为导向,提出了将基本医疗卫生制度作为公共产品向全民提供,并正式从基本公共卫生服务着手逐步实现均等化的目标^[3]。目前,以九类基本公共卫生服务为重点,包含重大公共卫生服务专项在内的基本公共卫生服务项目在全国各地全面开展。本研究总结了目前基本公共卫生服务均等化的进展情况,分析了均等化推进过程中存在的问题,为各地进一步完善公共卫生服务均等化实施策略提出相应的政策建议。

1 研究背景

基本公共卫生服务概念的提出是在对公共卫生服务认识的基础上,结合目前的社会发展水平和可支配的公共卫生资源所提出的具有可操作、可持续、可保障的公共卫生服务范围^[4],是全体公民最集中、最迫切和最低水平的公共卫生服务需求。均等化则是现代社会公平正义的必然要求,不仅要

平等和过程公平。在国外发达国家,公共服务均等化作为国家的基本施政纲领得到了较好的体现^[5]。在中国,从均等化的视角来看,公共医疗卫生服务发展大致经历了 4 个阶段:从建国初期以“四苗六病”计划免疫、公费劳保和新农合保障制度为代表,“低水平、局部性覆盖”的均等化,到 20 世纪 80 年代“开放搞活”口号下的效率优先,90 年代经济社会发展不平衡的宏观背景下不均等趋势的进一步强化,再到 21 世纪初对卫生服务公平性的反思和城乡全民均等化目标的提出,实现了从部分人群、城乡有别的均等化向城乡全民均等的发展。2006 年十届全国人大四次会议通过的“十一五”规划《纲要》正式提出“逐步推进基本公共服务均等化”,十六届六中全会进一步明确提出要“完善公共财政制度,逐步实现基本公共服务均等化”,并以决定的形式把教育、卫生、文化等 8 个方面列入政府承担的公共服务范畴^[6]。2007 年的十七届全国人大会议报告和 2008 年的政府工作报告也先后强调要转变政府职能,促进基本公共服务均等化。2009 年 1 月 21 日国务院常务会议审议并原则通过《关于深化医药卫生体制改革的意见》和《2009-2011 年深化医药卫生体制改革实施方案》,正式提出了建立覆盖城乡的基本医疗卫生制度,实现人人享有基本医疗卫生服务的工作目标,并将促进基本公共卫生服务的逐步均等化列为 2009-2011 年近期五项重点改革内容之一。随后,卫生部专门出台了《关于促进基本公共卫生服务逐步均等化的意见》[卫社发(2009)70 号],提出了健全基本公共卫生服务经费保障机制、加强基层公共卫生服务体系

* 基金项目: 卫生部政策法规司 2009 年立项卫生政策研究课题(政研 2009)

作者单位: 1. 华中科技大学同济医学院医药卫生管理学院卫生经济教研室,湖北 武汉 430030; 2. 华中师范大学管理学院

作者简介: 陈丽(1986-),女,江苏无锡人,博士在读,研究方向: 卫生政策与管理。

通讯作者: 姚岚, E-mail: lanyao@mails.tjmu.edu.cn