



X射线辐射与模拟微重力对K562细胞红系分化的联合效应及机制研究

唐梓菡 魏巍 王转子 李文建 周利斌

Researches on the Synergistic Effect of X-ray Radiation and Simulated Microgravity on Erythroid Differentiation of K562 Cells and Its Mechanism

TANG Zihan, WEI Wei, WANG Zhuanzi, LI Wenjian, ZHOU Libin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.38.2021031>

引用格式:

唐梓菡, 魏巍, 王转子, 李文建, 周利斌. X射线辐射与模拟微重力对K562细胞红系分化的联合效应及机制研究[J]. 原子核物理评论, 2021, 38(4):444–451. doi: 10.11804/NuclPhysRev.38.2021031

TANG Zihan, WEI Wei, WANG Zhuanzi, LI Wenjian, ZHOU Libin. Researches on the Synergistic Effect of X-ray Radiation and Simulated Microgravity on Erythroid Differentiation of K562 Cells and Its Mechanism[J]. Nuclear Physics Review, 2021, 38(4):444–451. doi: 10.11804/NuclPhysRev.38.2021031

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Am原子及其离子Am^{q+}(q=1~6)的K,L,M-X射线跃迁能和跃迁几率的理论研究(英文)

Theoretical Study on K, L, and M X-ray Transition Energies and Rates of Am and Its Ions Am^{q+}(q=1~6)

原子核物理评论. 2019, 36(1): 111–117 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.01.111>

基于微通道板的二维位置灵敏像探测器X射线成像研究

Study on X-ray Radiography of the Image Detector Based on MCP

原子核物理评论. 2019, 36(2): 218–223 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.02.218>

THGEM探测器X光斑寻迹和位置分辨实验研究

Research on the X-ray Spot Tracing and the Position Resolution of THGEM Detector

原子核物理评论. 2018, 35(1): 61–65 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.35.01.061>

和厚朴酚对非小细胞肺癌细胞的辐射增敏效应

Radiosensitizing Effect of Honokiol on Non-small Cell Lung Carcinoma Cells

原子核物理评论. 2019, 36(1): 104–110 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.01.104>

氧化钆纳米粒子对A549肺癌细胞的辐射增敏效应研究

Radiosensitizing Effect of Gadolinium Oxide Nanoparticles on Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

原子核物理评论. 2019, 36(3): 373–378 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.03.373>

灵芝酸A对人肝癌细胞的辐射增敏效应的初步研究

Preliminary Research on the Radiation Sensitizing Effect of Ganoderic acid A on Human Hepatoma Cells

原子核物理评论. 2020, 37(1): 97–103 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.37.2019055>

文章编号: 1007-4627(2021)04-0444-08

X 射线辐射与模拟微重力对 K562 细胞红系分化的联合效应及机制研究

唐梓茵^{1,2}, 魏巍^{1,2,†}, 王转子^{1,2}, 李文建^{1,2}, 周利斌^{1,2}

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 使用氯化高铁血红素 (hemin) 诱导 K562 细胞分化作为红系分化模型, 并对其进行 X 射线辐照及地面模拟微重力效应处理, 研究辐照、微重力及二者的复合效应对红系分化的影响及机制。X 射线辐照及模拟微重力效应处理后的联苯胺染色阳性率及 CD235a 蛋白表达均下调, 细胞增殖抑制、细胞凋亡率及坏死率均增高, 红系相关转录因子 EPOR 及 GATA-1 基因表达下调, 且 X 射线辐照及模拟微重力效应的联合作用效应强于两者单独作用。辐照及微重力联合处理影响细胞中 PI3K 复合物调控亚基 PIK3R2 基因表达, 加入 PI3K 抑制剂 3-MA 后细胞凋亡率及坏死率增高、红系分化率降低。以上结果表明, X 射线辐照及模拟微重力效应对红系分化具有协同抑制作用, 其机制与红系相关转录因子 EPOR、GATA-1 及生长信号通路因子 PI3K 相关。

关键词: X 射线; 模拟微重力效应; 红系分化; 损伤修复

中图分类号: R96

文献标志码: A

DOI: 10.11804/NuclPhysRev.38.2021031

1 引言

长期载人飞行和载人登月已成为 21 世纪航天发展的热点。复杂的空间辐射和微重力环境是影响近地轨道飞行中影响航天员身体健康的主要因素。随着今后深空探索频率和滞留时间的增加, 地球磁场、大气层及有限的飞行器载荷对宇宙射线的屏蔽效果将逐渐弱化, 因此宇宙射线对航天员的影响将逐渐凸显, 亟需关注微重力环境下宇宙射线对航天员带来的不良影响。

已有研究^[1]发现, 航天员近地轨道飞行 10~14 天后红细胞总量累计下降 10%~15%, 血红蛋白含量下降 12%~13%, 出现血浆容量、网织红细胞和血红蛋白减少, 异形红细胞增多等血液学变化, 航天医学家称之为“航天贫血症”。但美国国家航空航天局 (NASA) 的研究数据却表明, 国际空间站停留 6 个月以上的宇航员在已经适应了微重力的情况下不会出现严重贫血的情况^[2]。因此, “航天贫血症”的发生机制还有待进一步研究。

红系分化是骨髓造血干细胞分化为多向祖细胞, 再不断增殖逐步分化为红系祖细胞、红系前体细胞, 最后发育为成熟红细胞并释放到外周血中的过程。红系各阶

段细胞增殖与分化、生长与凋亡之间的平衡需要多种细胞因子共同调控完成^[3]。促红细胞生成素 (EPO) 能诱导 EPO 受体 (EPOR) 形成二聚体, 是刺激骨髓红系祖细胞增生、诱导红系分化和促进红细胞成熟的主要因子。磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K) 是催化磷脂酰 4, 5 二磷酸 (PIP2) 转变为磷脂酰 3, 4, 5 三磷酸 (PIP3) 从而激活 PI3K-AKT 通路, 进而调控细胞增殖、凋亡等生命活动的一个激酶复合物。PI3K 蛋白与激活的 EPOR 结合^[4], 进一步激活下游调节细胞周期、生存、分化和代谢的 AKT 蛋白, 也激活一系列红系相关基因, 如内源性 GATA-1、红系 Krüppel 样因子 (*EKLF*)、 β -珠蛋白 (β -globin) 等的表达^[5]。因此, 造血干细胞凋亡与增殖抑制可能造成红系分化障碍。

K562 红白血病细胞系^[6]能够被羟基脲、阿糖胞苷、hemin 等化合物诱导红系分化^[7], 呈现和正常红细胞相似的表面抗体和血红蛋白合成等表型特征, 近年来已被广泛应用于红系分化相关的机制研究^[8-9]。我们以前期实验确定的 40 μ M 氯化高铁血红素诱导 K562 细胞作为红系分化模型, 并对该模型进行地面微重力效应模拟及 X 射线辐照处理, 研究二者对红系分化的影响及相

收稿日期: 2021-03-30; 修改日期: 2021-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (11005131)

作者简介: 唐梓茵 (1996-), 女, 四川遂宁人, 硕士研究生, 从事空间辐射药物防护研究; E-mail: tzhzihan@163.com

† 通信作者: 魏巍, E-mail: weiwei@impcas.ac.cn.

关机理。

2 材料与方法

2.1 实验材料

人髓性白血病细胞系 K562 购自上海富衡生物科技有限公司, RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司、胎牛血清购自民海公司, 双抗(青、链霉素)、CCK-8 购自北京 Solarbio 公司, CD235a 抗体、Trizol 裂解液购自美国 Invitrogen 公司, 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司, cDNA 反转录试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司, 2×SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 ABI 公司, qPCR 引物由武汉天一辉远生物科技公司合成, 联苯胺购自天津光复, 30% 过氧化氢购自上海沪试, 亚铁氰化钾购自上海中秦, 冰乙酸购自天津富宇, 氯化高铁血红素购自北京 Solarbio 公司, 3-MA 购自大连美仑公司。

2.2 实验仪器

X 射线生物辐照仪 (X-RAD225, PXI 公司)、流式细胞仪 (Aminis, 德国 Merck Millipore 公司)、酶标仪 (Epoch, 美国 Biotech 公司)、荧光正置显微镜 (BX-53, 德国 Olympus 公司)、荧光定量 PCR 仪 (StepOnePlus, 美国 Applied Biosystems 公司)。

2.3 细胞培养及诱导分化

K562 细胞常规培养使用体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 于体积分数为 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 饱和湿润环境下培养。处于对数生长期的 K562 中加入氯化高铁血红素 (40 μmol/L) 诱导作为红系分化模型以进行后续实验。

2.4 实验处理

本实验采用细胞回转器来模拟微重力, 其原理是样品在电机的带动下不停地绕水平轴匀速旋转, 适当转速下的流体剪切力与自由落体相抵消, 形成模拟微重力环境。回转器的半径是 3 cm, 采用转速 30 r/min。实验采用 X 射线辐照仪进行辐照, 剂量率为 1.15 Gy/min。实验分为 5 组: 空白模型组 (Ctr 组); 1.0 Gy 照射组 (R 组); 微重力处理组 (M 组); 1.0 Gy 辐照+微重力联合处理组 (R+M 组); 3-MA (PI3K 抑制剂)+1.0 Gy 辐照+微重力联合处理组 (R+M+3-MA 组)。Ctr 组不经过任何照射和微重力处理; R 组仅接受 1.0 Gy 照射处理; M 组仅进行 3 h 微重力处理; R+M 组先模拟微重力处理 3 h 后, 接受 1.0 Gy 辐照。PI3K 抑制剂 3-MA 的药物处理浓度为 5 mmol/L。

2.5 CCK-8

收集细胞, 离心弃上清, 加入新鲜培养基 300 μL 重悬, 铺于 96 孔板中 3 孔, 每孔 100 μL, 每孔再加入 CCK8 溶液 30 μL, 37 °C 继续孵育 4 h, 终止培养, 用酶标仪检测各孔的 490 nm 吸光度, 以空白孔 (不接种细胞, 其余操作一致) 调零, 细胞存活率 % = 实验组 A 均值 / 对照组 A 均值 × 100%。

2.6 联苯胺染色

收集细胞后, 离心后弃上清, 重悬于 250 μL PBS 中, 加入联苯胺溶液 14 μL, 30% 过氧化氢 1 μL, 避光孵育 2 min, 后加入 1 μL 亚铁氰化钾, 孵育 10 min。重悬, 弃上清, 加入 10 μL PBS 重悬, 于显微镜下拍照计数 500 个细胞, 深色为含有血红蛋白细胞的阳性细胞, 不着色的为阴性细胞, 阳性细胞率 % = 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。

2.7 CD235a 含量检测

收集细胞, 预冷的 PBS 洗两次, 重悬于 90 μL PBS 中, 加 10 μL 一定比例稀释好的抗体 CD235a (1:500), 避光孵育 30 min。PBS 洗细胞 3 次, 重悬于 100 μL PBS, 用流式细胞仪收集数据, 用 IDEAS 软件分析流式数据。

2.8 细胞凋亡

收集细胞, 预冷的 PBS 洗 2 次, 重悬细胞于 100 μL 凋亡试剂盒中的 1× 染料结合缓冲液, 再依次加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶染液, 混匀, 室温避光孵育 15 min, 于流式细胞仪上进行检测。用 IDEAS 软件分析流式数据。

2.9 K562 细胞总 RNA 提取、质量评估及测序结果分析

各处理组细胞在 24 h 收集, 离心后弃上清, 将 Trizol 裂解液加入细胞。静置 10 min。加入氯仿, 震荡 15 s, 静置 5 min。4 °C, 12000 g 离心 10 min, 弃去上清液, 得到 RNA 沉淀。用无 RNase 的水制备的 75% 乙醇溶液洗涤 RNA 沉淀, 4 °C, 12000 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 30~50 μl 的无 RNase 的水。Illumina HiSeq-4000 第二代测序平台用于测序。实验按照标准 Protocol 执行, 总 RNA 提取后先进行质量评估, 然后进行文库构建、文库质量检测和文库测序。

各样品 Clean Data 均在 5.78 G 以上, Q30 碱基百分比能达到 92.34%。HISAT2 用于分别将各样品的 Clean Reads 与参考基因组进行序列对比。从比对结果统计来看, 样品的 Reads 与参考基因组的比对效率在 94.98%~96.05% 之间, 说明测序结果可信。使用 FP-

KM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)作为基因表达水平的指标。使用DESeq2进行两种情况/组的差异表达分析,将Fold Change ≥ 1.5 且FDR(False Discovery Rate) < 0.05 作为筛选差异表达基因的标准。

2.10 实时荧光定量 PCR

对 *GATA-1*、*EPOR*、*PIK3R2*基因表达进行实时荧光定量PCR检测,引物列表见表1。取2 μg 的总RNA用于每份cDNA反转录,cDNA合成按照逆转录试剂盒说明书进行。以获得的cDNA为模板,按照Qiagen SYBR Green荧光定量PCR试剂盒说明书进行实时荧光定量PCR。所有结果经Actin内参校正,用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法计算表达量。

2.11 结果分析

数值表示为均数 \pm 标准差,采用成组设计资料的 t 检验,SPSS统计软件和GraphPad Prism8绘图软件。

表 1 qRT-PCR 引物列表

| 基因名称 | 引物序列(5'-3') |
|---------------|---------------------------------|
| <i>Actin</i> | F: <i>GGACTTCGAGCAAGAGATGG</i> |
| | R: <i>CTGTACGCCAACACAGTGCT</i> |
| <i>GATA-1</i> | F: <i>CCAAGCTTCGTGGAAGCTCTC</i> |
| | R: <i>ATTGTCAGTAAACGGGCAGG</i> |
| <i>EPOR</i> | F: <i>GAGCATGCCCA GGATACCTA</i> |
| | R: <i>TCTGCTGCCAGCTTTGAGTA</i> |
| <i>PIK3R2</i> | F: <i>CCTGGCACCTATGTGGAGTT</i> |
| | R: <i>CAGTTCTCCCCACCTGATGT</i> |

3 结果

3.1 X射线辐照、模拟微重力效应对K562细胞红系分化模型的影响

联苯胺染色检测K562细胞中血红蛋白的表达情况,不同处理组的24h的K562细胞联苯胺染色结果如图1(a)所示,R组、M组、R+M组、Ctr组的联苯胺

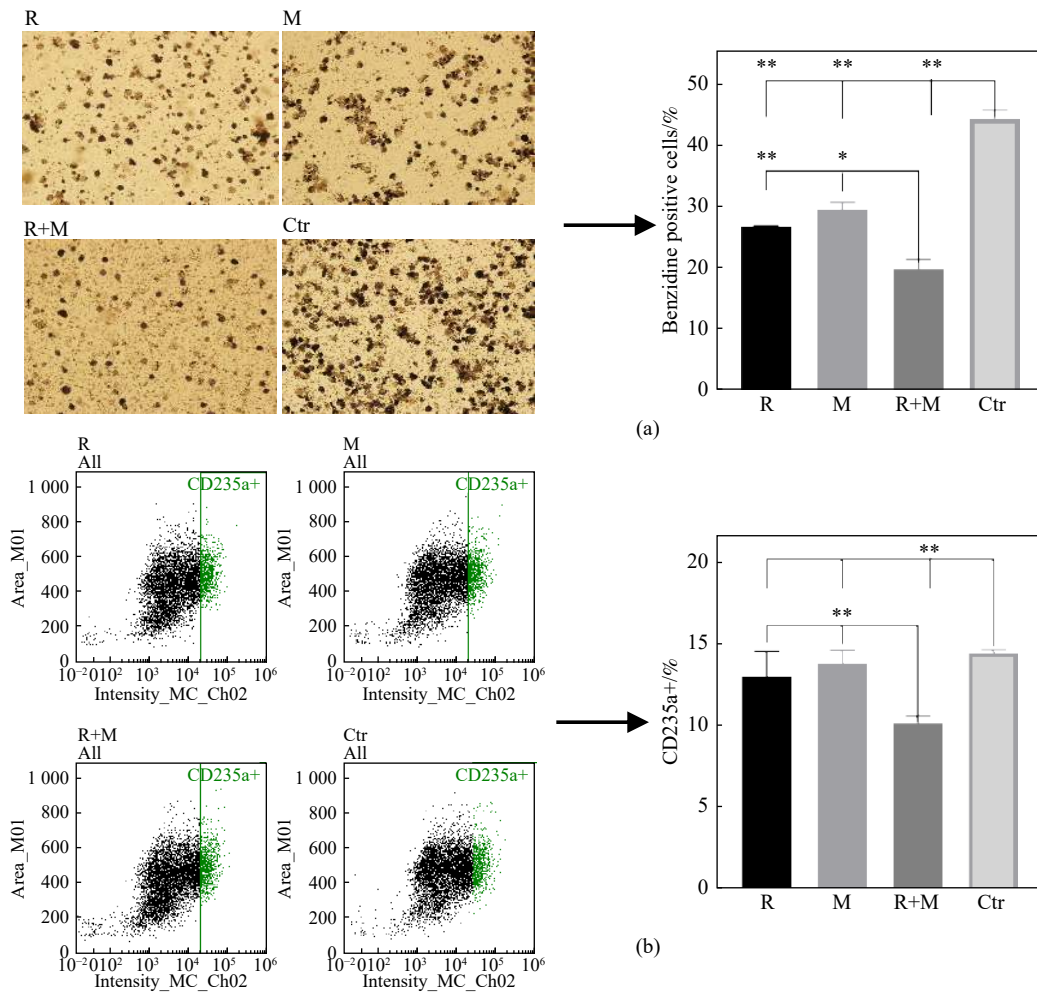


图 1 (在线彩图)X射线辐照、模拟微重力效应后K562细胞红系分化变化

(a)各处理组24h的联苯胺染色阳性率;(b)各处理组24h的CD235a表达;** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

染色阳性染色率依次为: (26.84±0.11)%, (29.62±1.15)%, (19.94±1.52)%, (44.27±1.38)%。各处理组的联苯胺染色阳性率均与 Ctr 组有显著性差异 ($P < 0.01$), R+M 组的阳性率显著低于 R 组和 M 组。这些结果说明, 辐照及微重力处理后血红蛋白表达显著降低, 且二者具有协同作用。

为了验证联苯胺染色结果, 同时检测了红系分化过程表面标志蛋白 CD235a 的表达情况^[10][图 1(b)]。结果显示, R 组、M 组、R+M 组、Ctr 组的 CD235a 阳性细胞比例依次为: (13.00±1.57)%, (13.77±0.87)%, (10.20±0.43)%, (14.45±0.21)%。各处理组的 CD235a 蛋白表达下调; R+M 组相较于 R 组及 M 组, CD235a 蛋白表达下调。以上结果说明, 辐照及模拟微重力能够抑制 K562 细胞红系分化, 且两者共同的抑制作用大于单独作用。

K562 细胞作为模型中的红系分化前体细胞, 其增殖、凋亡与坏死都可能影响红系分化的结果。各处理组 24h 的 CCK8 结果如图 2(a) 所示: 与 Ctr 组相比, R+M 组的细胞增殖抑制最为显著 ($P < 0.001$), R 组的增殖抑制也较显著 ($P < 0.05$), M 组有一定的增殖抑制

作用, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。如图 2(b) 所示, R 组、M 组、R+M 组、Ctr 组 K562 细胞的凋亡率依次为 (10.74±1.55)%, (8.37±1.55)%, (10.81±1.19)%, (7.19±1.45)%; 坏死率依次为 (12.97±1.08)%, (9.00±1.34)%, (15.40±2.85)%, (8.41±0.31)%; 凋亡+坏死细胞比例依次为 (23.93±2.57)%, (17.37±5.39)%, (26.21±7.76)%, (15.60±6.29)%。与 Ctr 组相比, R 组、M 组及 R+M 组的凋亡率及死亡细胞比例均不同程度增加。这些结果说明, X 射线辐照及模拟微重力效应能够诱导 K562 细胞增殖抑制、凋亡及坏死, 且二者具有协同效应。

3.2 X 射线辐照、模拟微重力效应 K562 细胞转录组及红系分化相关因子的基因表达的影响

通过转录组测定分析得到了各组间差异基因的火山图(图 3)。与 Ctr 组相比, R+M 组的差异表达基因数为 3514(上调 1957, 下调 1557)。R 组与 R+M 组的差异基因数为 15(上调 7, 下调 8), 远小于 M 组与 R+M 组的差异基因数量 236(上调 46, 下调 190)。结果说明, 模拟微重力效应及 X 射线辐照联合作用对 K562 红系分化模型细胞的基因表达产生较大影响, 且主要受 X 射

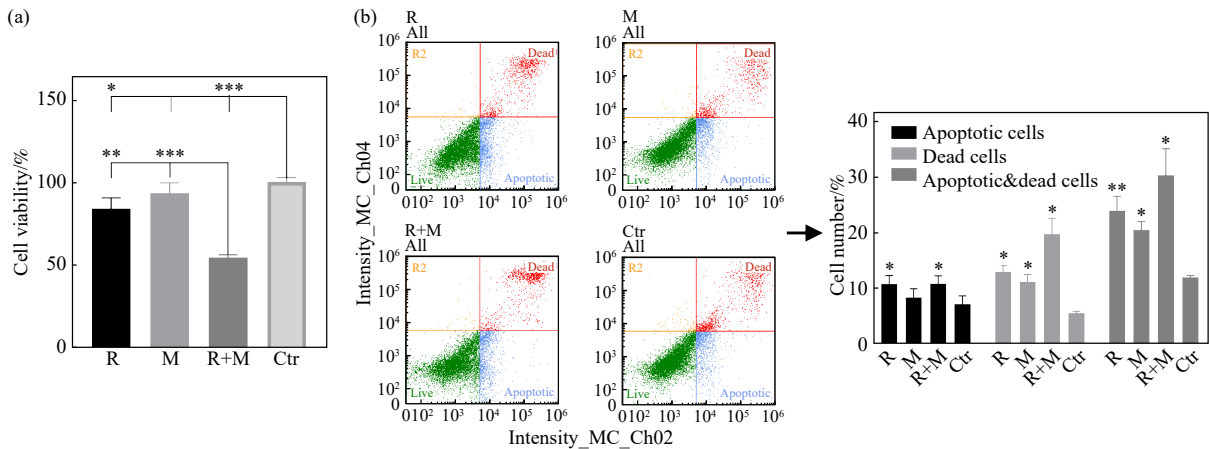


图 2 (在线彩图)X 射线辐照、模拟微重力效应处理后 K562 细胞增殖、凋亡及死亡的影响

(a) 各处理组 24 h 的增殖活性; (b) 各处理组 6 h 的凋亡及坏死情况。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

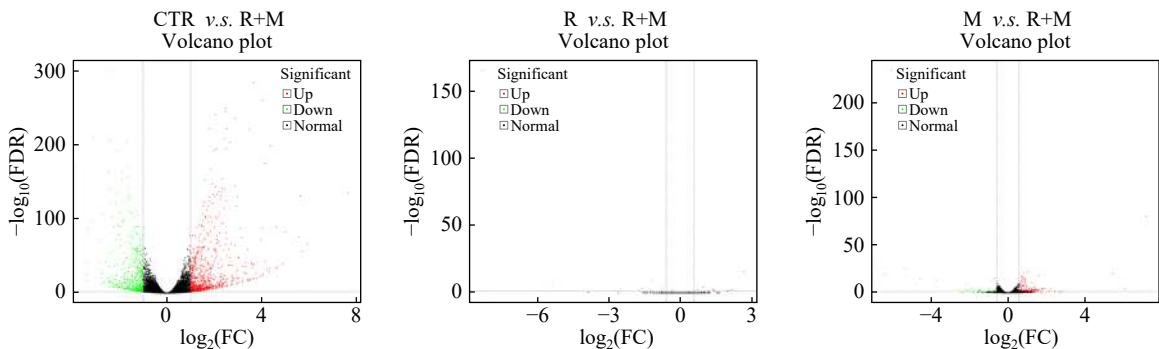


图 3 (在线彩图)X 射线辐照、模拟微重力效应处理后 24h 时各组差异表达基因火山图

后一组相对于前一组的差异基因量; X 轴表示基因表达变化程度, Y 轴表示表达变化差异程度; 红点代表表达显著上调基因, 绿点代表表达显著下调基因。

线辐照处理影响。

为了确定模拟微重力效应与 X 射线辐照对红系分化相关因子表达的影响,进一步对比了各处理组 24h 红细胞生成素受体 EPOR 及红系分化特异转录因子 GATA-1 的基因表达水平,结果如图 4 所示: R 组、M 组、R+M 组、Ctr 组的 EPOR 的 FPKM 值依次为 6.6089 ± 0.3273 , 6.3477 ± 0.8320 , 6.7441 ± 0.1993 , 12.5745 ± 0.8763 , R 组、M 组及 R+M 组相较于 Ctr 组 EPOR 的基因表达量均显著下调 ($P < 0.001$), R 组、M 组及 R+M 组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。GATA-1 的 FPKM 值依次为 62.9573 ± 1.9620 , 78.9515 ± 4.5264 , 60.0713 ± 1.0468 , 128.0182 ± 0.6819 。R 组、M 组及 R+M 组相较于 Ctr 组 GATA-1 的基因表达量均显著下调 ($P < 0.001$), R+M 组的下调程度大于 R 组、M 组; R+M 组与 R 组无显著性差异,与 M 组有显著性差异 ($0.001 < P < 0.01$)。

以上结果说明,模拟微重力效应及 X 射线辐照可通过下调 EPOR 及 GATA-1 的基因表达抑制红系分化,其中 X 射线辐照对下调 GATA-1 起主要作用。

为对转录组结果进行验证,使用 qRT-PCR 比较了各处理组相对于 Ctr 组 GATA-1、EPOR 基因表达量的差异,结果如图 5 所示, qRT-PCR 的结果与转录组测序各组表达变化一致,说明了转录组测序结果和分析结果的可靠性。

3.3 PI3K 对 X 射线辐照、模拟微重力效应处理的 K562 细胞红系分化的影响

转录组结果显示: R 组、M 组、R+M 组、Ctr 组 PI3K 激酶调控亚基 PIK3R2 的 FPKM 值依次为 11.2543 ± 0.0441 , 11.9680 ± 1.4448 , 0.2726 ± 0.0829 , 0.4436 ± 0.0038 。与 Ctr 组相比, R 组及 M 组的 PIK3R2 基因表达显著上升 ($P < 0.001$), 而 R+M 组的 PIK3R2 基因表达显著下调 ($P < 0.001$) (图 6)。PI3K 在辐照及微重力处理后表达发生变化,为了验证 PI3K 在辐照及微重力对 K562 细胞红系分化模型的影响中发挥的作用,在 R+M 组中加入 PI3K 抑制剂 3-MA 抑制 PI3K 活性,并检测诱导分化后的 K562 细胞增殖抑制、凋亡、坏死及红系分化。48h 时, R+M+3-MA 组的细胞增殖是 R+M

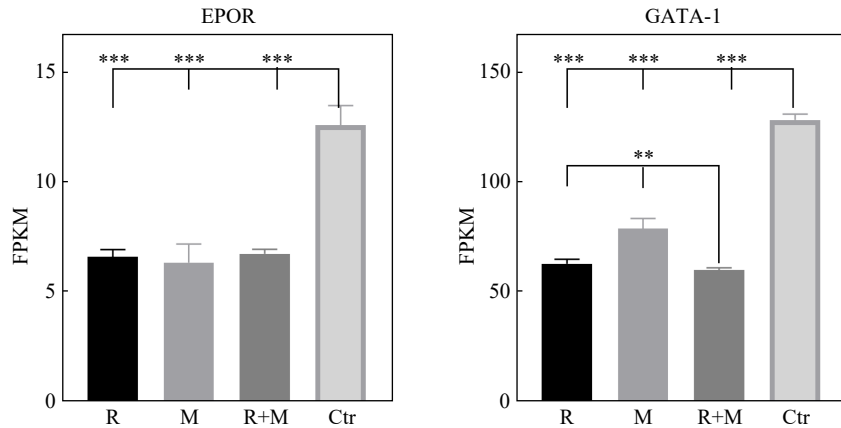


图 4 (在线彩图) X 射线辐照、模拟微重力效应处理后 24h 时红系分化相关因子 EPOR、GATA-1 基因表达量变化
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 。

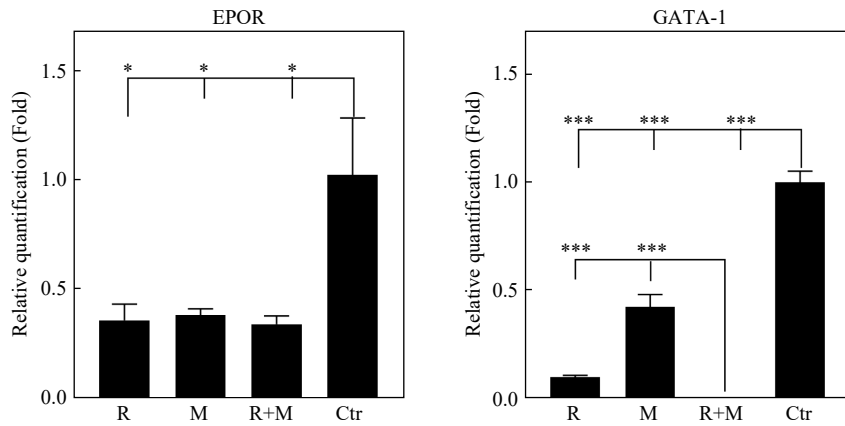


图 5 (在线彩图) 实时荧光定量 PCR 验证转录组数据 (GATA-1 中 R+M 组过低无显示)
*** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

组的 40.13%，显著受到抑制 ($P < 0.01$)。Ctr 组、Ctr+3-MA 组、R+M 组、R+M+3-MA 组的凋亡细胞比例依次为 (5.97±0.14)%，(7.32±0.11)%，(9.37±2.14)%，(16.87±3.09)%；坏死细胞比例依次为 (6.52±0.02)%，(9.49±0.22)%，(7.43±1.19)%，(21.08±2.65)%；凋亡+坏死细胞比例依次为 (12.50±0.12)%，(16.81±0.16)%，(16.80±0.70)%，(37.95±0.21)%。R+M 组的 CD235a 阳

性细胞比例为 (21.17±1.00)%，R+M+3-MA 组为 (12.80±1.47)%。R+M+3-MA 相较于 R+M 组及 Ctr+3-MA 组凋亡及坏死细胞比例显著增加，其相较于 R+M 组凋亡及坏死的增加大于 Ctr+3-MA 组相较 Ctr 组凋亡及坏死细胞比例增加。3-MA 作用于 R+M 组细胞后红系分化率降低。以上结果说明，通过抑制 PI3K 会抑制 K562 细胞红系分化 (图 7)。

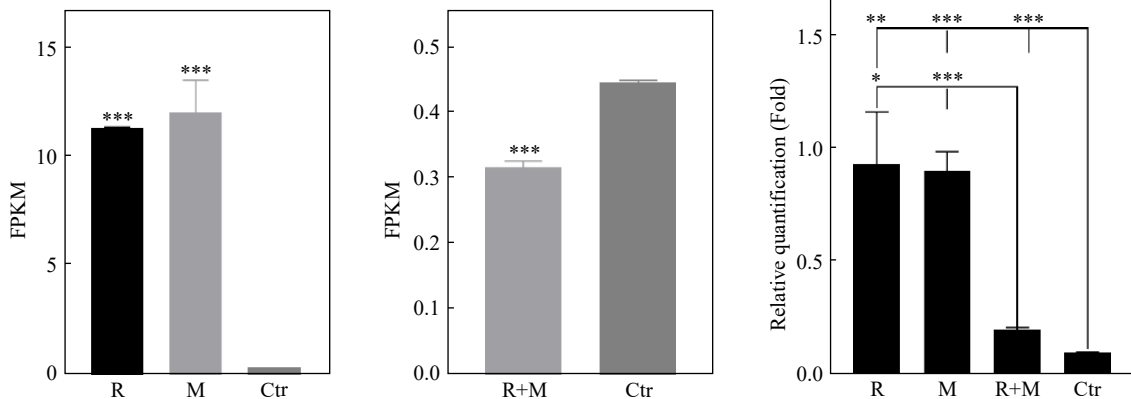


图 6 (在线彩图)X 射线辐射、模拟微重力效应处理后 24h 时 *PIK3R2* 基因表达量变化及 RT-qPCR 验证
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

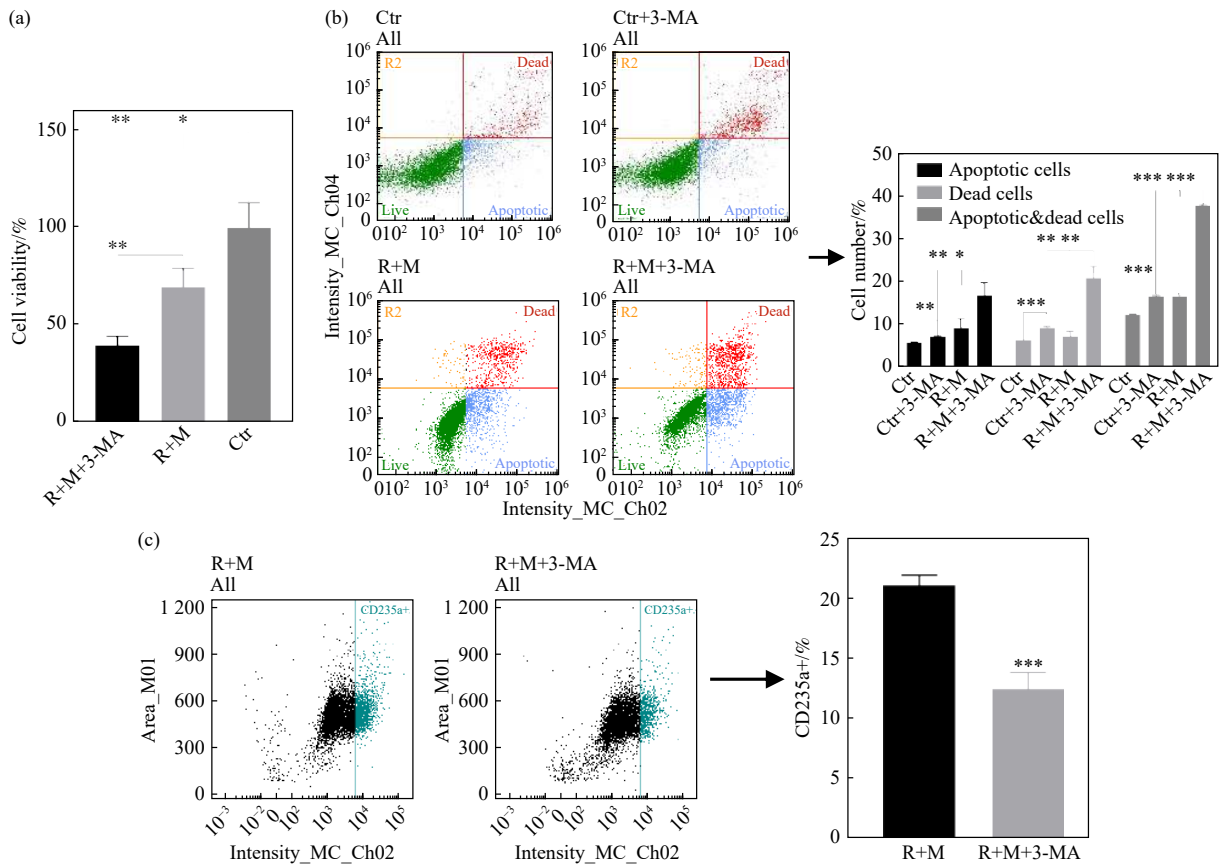


图 7 (在线彩图)加入 3-MA 后 X 射线辐射、模拟微重力效应处理 48h 的 K562 细胞凋亡及红系分化
(a) 加入 3-MA 后 48h 时的 K562 细胞增殖情况；(b) 加入 3-MA 后 48h 时凋亡情况；(c) 加入 3-MA 后 48h 时 CD235a 表达情况；
*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 。

4 讨论

“航天贫血症”能引起人体各系统的生理病理变化,直接影响航天员健康和航天任务的完成,红细胞数量下降是该领域研究的核心问题。红系各阶段细胞增殖与分化的平衡需要多种转录因子共同调控完成^[11]。有研究表明,航天员飞行过程中EPO分泌减少会降低外周血红细胞含量^[12]。模拟微重力作用于定向祖细胞能明显抑制红系分化和增殖^[13]。电离辐射也通过G-CSF/Stat3/BATF通路影响红系分化^[14],能造成外周血红细胞减少^[15]。但电离辐射与微重力效应的复合作用对红系分化的影响尚不明确,目前尚未见到相关报道。

本实验利用X射线辐照和模拟微重力效应处理K562红系分化细胞模型,红系分化检测结果显示,辐照及微重力效应均能降低红系分化率,且两者能起到协同抑制的作用,其中X射线的效果大于微重力。转录组分析结果显示,微重力与协同处理组的差异基因表达数量远大于辐照与协同处理组的差异基因表达数量,表明辐照在协同处理对基因表达的影响中同样发挥更重要的作用。EPOR及下游因子GATA-1是红系特异性转录因子,能促进红系细胞的分化和成熟。进一步分析转录组数据及qRT-PCR验证发现,辐照及微重力能抑制EPOR及GATA-1的表达,虽然EPOR表达中未显示出协同效应,但其下游基因GATA-1表达显示出协同效应且辐照的影响更大,说明辐照及微重力可以通过抑制EPOR和GATA-1的表达影响K562细胞的红系分化,两者具有协同效应,且辐照的作用大于微重力的作用。

电离辐射和微重力效应均能引起细胞损伤,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡及坏死^[15-16]。本研究中各处理组的增殖抑制率、凋亡及坏死率均上升,微重力对细胞损伤的诱导程度低于X射线辐照,两者具有协同效应。X射线辐照及模拟微重力效应对K562细胞的损伤结果[图2(b)]与红系分化结果[图1(a)]负相关,提示细胞生长信号传导途径中的相关因子可能影响红系分化。转录组及qRT-PCR数据显示辐照和微重力处理影响PI3K的调控亚基PIK3R2表达,与对照组相比,辐照、微重力处理后24h时PIK3R2表达上升,两者联合处理后PIK3R2表达下降,为了进一步研究PI3K与红系分化的相关性,在辐照联合微重力处理前加入PI3K抑制剂3-MA,发现抑制PI3K活性能进一步导致联合处理组细胞增殖活性降低、细胞凋亡与坏死率增高,加重红系

分化障碍,说明PI3K在辐照联合微重力造成的红系分化障碍中发挥重要作用。各处理组PI3K不同时间的表达差异及相关机制将在之后的工作中进行探究。

综上所述,X射线辐照及模拟微重力效应对K562细胞红系分化具有协同抑制的作用,不仅可通过特异性分化因子EPOR、GATA-1直接调控红系分化,PI3K调控的生长信号通路相关因子也可能参与其中。转录组分析数据显示各处理组之间还有其它差异表达的基因,其对红系分化的影响机制还有待进一步研究。本实验结果为研究空间血液病的发病机理提供了细胞生物学实验数据,对深空飞行辐射危害的评价及安全措施制定都具有一定的意义。

参考文献:

- [1] KUNZ H, QUIRIARTE H, SIMPSON R J, et al. *BMC Hematology*, 2017, 17(1): 12.
- [2] AFSHIN B, SHAYONI R, HOMER F, et al. *PLOS ONE*, 2018, 13(7): e0199621.
- [3] STAMATOYANNOPOULOS G. *Experimental Hematology*, 2005, 33(3): 259.
- [4] YU R, HAMILTON G, BAKER D, et al. *Journal of Vascular Surgery*, 2012, 55(6): 76S.
- [5] JOKINEN M, GAHMBERG C. *Nature*, 1979, 278(22): 364.
- [6] MOON A M, LEY T J. *Blood*, 1991, 77(10): 2272.
- [7] MAHDI T, ALCALAY D, COGNARD C, et al. *Biology of the Cell*, 1998, 90(9): 615.
- [8] JIN W P, KANG J Y, HAHM J Y, et al. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 462.
- [9] HU C Y, ZHANG H J, FU C B, et al. *Chinese Association of Pathophysiology*, 2020, 28(6): 2071.
- [10] MA Yanni, GONG Bei, DONG He, et al. *Basic & Clinical Medicine*, 2013, 33(5): 557. (in Chinese)
(马艳妮, 巩蓓, 董贺, 等. *基础医学与临床*, 2013, 33(5): 557.)
- [11] KOISTINEN P O, RUSKO H, IRJALA K, et al. *Med Sci Sports Exerc*, 2000, 32(4): 800.
- [12] GAO Y, PING B H, ZHENG L, et al. *Chinese Journal of Microcirculation*, 2012, 22(02): 24.
- [13] ZHENG L, LIU J Z, HU Y W, et al. *Aviation, Space, and Environmental Medicine* 2011, 82(5): A1.
- [14] FANG Lianying, WANG Yan, XU Chang, et al. *Basic & Clinical Medicine*, 2017(2): 256. (in Chinese)
(方连英, 王彦, 徐畅, 等. *基础医学与临床*, 2017(2): 256.)
- [15] SI J, ZHANG J H, GAN L, et al. *Oncology Reports*, 2020, 44: 303.
- [16] PRASAD B, D GRIMM, STRAUCH S M, et al. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(24): 9373.

Researches on the Synergistic Effect of X-ray Radiation and Simulated Microgravity on Erythroid Differentiation of K562 Cells and Its Mechanism

TANG Zihan^{1,2}, WEI Wei^{1,2,†}, WANG Zhuanzi^{1,2}, LI Wenjian^{1,2}, ZHOU Libin^{1,2}

(1. *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: In this study, using K562 cells induced by hemin as erythroid differentiation models, the synergistic effects and mechanisms of radiation and simulated microgravity on erythroid differentiation were investigated. Results showed that the positive rates of benzidine staining and the expression of CD235a were down-regulated after treatment with X-ray radiation and simulated microgravity, meanwhile, cell proliferation was inhibited and the rates of apoptosis and necrosis were increased. The expressions of transcription factors related to erythroid differentiation EPOR and GATA-1 were down-regulated. The synergistic effects of X-ray irradiation and simulated microgravity were much stronger than those of the two alone. After irradiation and microgravity combined treatment, PIK3R2 gene expression was down-regulated. After adding PI3K inhibitor 3-MA, the apoptosis and necrosis rate of cells increased, and the erythroid differentiation rates decreased. These results indicate that X-ray irradiation and simulated microgravity treatment have synergistic inhibitory effects on erythroid differentiation, and the mechanism is related to erythroid related transcription factors EPOR, GATA-1 and damage repair pathway factor PI3K.

Key words: X-ray; simulated microgravity effects; erythroid differentiation; damage repair

Received date: 30 Mar. 2021; **Revised date:** 28 Apr. 2021

Foundation item: National Natural Sciences Foundation of China(11005131)

† **Corresponding author:** WEI Wei, E-mail: weiwei@impcas.ac.cn.