

· 论 著 ·

^{60}Co γ 射线照射对人脐静脉内皮细胞线粒体结构和功能的影响

闫凯欣¹, 赵亚伟¹, 王溢豪¹, 易静², 段晗², 陶宁³, 王华^{2,3}, 胡舜英¹

(1. 解放军总医院心血管病医学部, 北京 100853; 2. 军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所, 北京 100850; 3. 安徽医科大学生命科学院, 安徽 合肥 230032)

摘要:目的 探讨 ^{60}Co γ 射线照射对血管内皮细胞线粒体结构和功能的影响。方法 分别采用 ^{60}Co γ 射线 0(细胞对照组), 5, 10 和 20 Gy 单次照射人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 照射后 24 和 48 h, 采用流式细胞术检测细胞凋亡; 荧光探针 H2DCF-DA 标记, 用激光共聚焦显微镜检测细胞产生活性氧(ROS)水平; JC-1 探针标记, 分别用流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测细胞线粒体膜电位; 通过钙黄绿素-AM 探针标记, 激光共聚焦显微镜定性检测线粒体膜通道孔(mPTP)开放状态; 电镜观察线粒体结构变化; Western 印迹法检测线粒体分裂相关标志物磷酸化动力相关蛋白 1(p-Drp1)和磷酸化线粒体分裂因子(p-Mff)蛋白表达水平。**结果** 与细胞对照组相比, 照射后 24 和 48 h, 5, 10 和 20 Gy 组细胞凋亡率增加($P<0.01$), 细胞 ROS 水平增加($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞 mPTP 开放增加($P<0.05$, $P<0.01$)。流式细胞术和荧光显微镜检测结果显示, 与细胞对照组相比, 照射后 24 和 48 h, 5, 10 和 20 Gy 组线粒体膜电位下降($P<0.01$)。电镜观察显示, 与细胞对照组相比, 照射组照射后 48 h, 单个线粒体面积增加($P<0.05$, $P<0.01$), 单个线粒体周长增加($P<0.05$), 线粒体密度下降($P<0.05$, $P<0.01$), 异常线粒体数量大幅增加($P<0.01$)。与细胞对照组相比, 各照射组照射后 48 h, p-Drp1 和 p-Mff 蛋白表达水平均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** ^{60}Co γ 射线照射加重血管内皮细胞线粒体损伤, 促进线粒体分裂, 诱发线粒体功能障碍。

关键词: γ 射线; 血管内皮细胞; 线粒体功能; 线粒体分裂

中图分类号: R965, R818.03

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)09-0657-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.09.003

放射性心脏病(radiation-induced heart disease, RIHD)是临近心脏的胸部肿瘤放疗时, 射线损伤心脏所产生的迟发性心脏并发症^[1]。近年来, 对于与纵膈放疗相关的心血管并发症的研究发现, 相比无放疗史的患者, 有纵膈放疗史的患者的心脏病发生率更高, 对 RIHD 长期发展的影响更大^[2]。临床研究显示, 纵膈淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和食管癌患者在接受局部放疗后多年诱发心脏毒性的风险明显增加, 且产生的心脏毒性均与 RIHD 的发生有关^[3-4]。但是, 放射治疗是癌症治疗一种重要的手段, 通过放疗可提高许多癌症患者的生存率, 为改善肿瘤患者的长期预后, 需高度重视放疗所带来的 RIHD 并发症, 深入研究 RIHD 发病机制具有重要临床意义^[5]。

相比于心脏组织中其他类型的细胞, 血管内皮

细胞对于辐射更为敏感^[6]。目前认为, RIHD 的发病机制主要在于射线对于血管内皮细胞的损伤, 从而导致冠脉受损^[7]。研究发现, 大鼠接受 20 Gy 射线心脏局部照射, 在照射后 120 d, 照射组大鼠心肌微循环灌注较未照射组显著下降^[7]。但血管内皮细胞的放射损伤机制仍未完全阐明^[8]。放射生物学的经典理论认为, 射线导致 DNA 损伤是机体放射损伤的主要机制^[9], 而有研究显示, 射线导致细胞中线粒体代谢障碍在放射损伤的发病机制中可能亦起着重要作用^[3]。

当细胞受到放射、化疗药物和缺氧等外部刺激时, 线粒体作为一种调节生物能量和生物合成途径中的重要细胞器, 可快速调节自身功能以满足细胞的代谢需求^[12]。线粒体功能状态与线粒体膜电位、线粒体膜通道孔、活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成和线粒体分裂等变化密切相关^[13], 健康的线粒体网络对于心血管功能至关重要^[14]。本研究通过 ^{60}Co γ 射线照射人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC), 观察线粒体功能和线粒体结构, 尤其是线粒体分裂及相关

基金项目: 国家自然科学基金(82173450)

作者简介: 闫凯欣, 硕士研究生, 主要从事肿瘤心脏病学、放射性心脏损伤研究, E-mail: tammyvip@outlook.com

通讯作者: 胡舜英, E-mail: hsylyly@163.com; 王华, E-mail: 18511712135@163.com

蛋白的变化,探讨 ^{60}Co γ 射线照射对 HUVEC 线粒体结构和功能的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

HUVEC,美国菌种保藏中心。DMEM 培养基、ROS 检测试剂盒,美国 Thermo 公司;胎牛血清,美国 Gemini 公司;RIPA 裂解液和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) ($\Delta\Psi\text{m}$) 检测试剂盒,碧云天公司;细胞线粒体膜通道孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 检测试剂盒,上海杰美基因公司;APC-Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒,美国 Biogens 公司;一抗: β 肌动蛋白单抗,美国 Proteintech 公司;兔抗大鼠磷酸化动力相关蛋白 1(power-related protein 1, DRP1)和磷酸化线粒体分裂因子(mitochondrial division factor, MFF) 单抗,基因集团基因生物技术国际贸易(上海)有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(二抗),北京中杉金桥公司;ECL 发光液,北京庄盟公司。Power-Pac164-5050 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司;BD FACSCalibur 流式细胞仪,美国 BD 公司;X-Light V3 转盘共聚焦,意大利 CrestOptics 公司;7500Fast 实时荧光定量 PCR 系统,美国 ABI 公司;Tanon5200 全自动化学发光成像仪,上海天能公司;VarioskanFlash 光谱扫描多功能读数仪,美国 Thermo 公司; ^{60}Co γ 射线辐照装置由军事医学研究院辐射医学研究所提供,单次照射剂量率为 $64.46\text{ cGy}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.2 HUVEC 培养和传代

以含有 10% 胎牛血清与 1% HEPES 液的低糖 DMEM 为 HUVEC 的培养基,置 37°C , 5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养,隔 2 d 换液,待细胞生长至 80%~90% 融合度时传代,传代比例为 1:3。

1.3 HUVEC 分组处理

将生长状态良好的 HUVEC 细胞以 $3\times 10^6\text{ L}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板内(每孔 2 mL)置 37°C , 5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养 24 h 使细胞均匀贴壁后,分别进行 5, 10 和 20 Gy ^{60}Co γ 射线照射,同时设未照射细胞为细胞对照组,①照射后 24 和 48 h 进行相关检测或②照射后 48 h 进行相关检测。

1.4 细胞形态观察

利用显微镜观察 1.3 分组①处理的细胞,观察细胞形态、数量并拍照记录。

1.5 流式细胞术检测 HUVEC 凋亡率

收集 1.3 分组①处理的细胞用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁的 HUVEC 细胞, $300\times g$ 离心 5 min, 收集细胞后用磷酸盐缓冲液漂洗 2 次。加 5 μL APC-Annexin V 混匀,室温避光孵育 15 min;再加入 PI 细胞核染料 5 μL 混匀,室温避光孵育 10 min。洗涤后加入 PBS 400 μL 重悬细胞,用流式细胞仪检测并分析细胞凋亡率[早期凋亡细胞(APC^+PI^-)和晚期凋亡或坏死细胞(APC^+PI^+)]。

1.6 化学荧光染色法检测 HUVEC 中 ROS 水平

取 1.3 分组①处理的细胞,弃细胞培养上清,更换 2 mL 不含血清的 DMEM 培养基,每孔加入 2 μL H2DCFDA 探针 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,使探针终浓度为 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,孵育 30 min。孵育结束后用 PBS 漂洗 3 次,在激光共聚焦显微镜下随机选取细胞分布均匀部位,观察贴壁细胞,进行定性分析。绿色荧光强度表示 ROS 水平。

1.7 流式细胞术和化学荧光染色法检测 HUVEC 线粒体膜电位

1.7.1 流式细胞术

将试剂盒中的 CCCP ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)按照 1:1000 的比例加入到细胞培养液中,稀释至 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,处理细胞 20 min 作为阳性对照。JC-1 单体的最大激发波长为 514 nm,最大发射波长为 529 nm;JC-1 聚合物的最大激发波长为 585 nm,最大发射波长为 590 nm。

取 1.3 分组①处理的细胞,胰酶消化细胞,离心弃上清,用 PBS 漂洗 1 次,加培养基 500 μL 重悬细胞;再加染色工作液 500 μL ,混匀置培养箱避光孵育 20 min; 4°C , $300\times g$ 离心 5 min,弃上清,用预冷 1 \times 缓冲液漂洗 2 次;1 \times 缓冲液 500 μL 重悬细胞,流式细胞仪检测 HUVEC 细胞中红色荧光细胞百分比,定量 MMP。

1.7.2 化学荧光染色法

取 1.3 分组①处理的细胞,按线粒体膜电位化学荧光染色法检测试剂盒操作说明操作。吸弃细胞培养上清,加新鲜细胞培养液 1 mL 和 JC-1 染色工作液 0.5 mL,充分混匀,孵育 20 min;孵育结束后吸弃上清,用预冷 1 \times JC-1 缓冲液洗涤 2 次,加细胞培养液 1 mL,在激光共聚焦显微镜下随机选取细胞分布均匀部位,观察贴壁细胞,进行定性分析。以红色荧光与绿色荧光比值定量 MMP($\Delta\Psi\text{m}$)。

1.8 化学荧光染色法检测 HUVEC 细胞线粒体膜通道孔开放状态

取 1.3 分组①处理的细胞,按 mPTP 检测试剂

盒操作说明操作。小心吸弃细胞培养上清,加 37℃ 预热的清理液 0.5 mL 清洗 1 次,再加染色工作液 0.5 mL,充分混匀,置培养箱 37℃ 避光孵育 20 min,孵育结束后吸弃染色工作液,用预热的清理液清洗 2 次,在激光共聚焦显微镜下随机选取细胞分布均匀部位,观察贴壁细胞,进行 mPTP 开放定性分析。绿色荧光减弱表明 mPTP 活性增强、开放增加。

1.9 透射电镜观察 HUVEC 细胞线粒体结构

取 1.3 分组②处理的细胞,软毛刷轻轻刮下细胞,用 2.5% 戊二醛 2% 多聚甲醛混合固定液 4℃ 固定过夜后,吸弃废液,用磷酸盐缓冲液(PBS)(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4)洗 3 次;1% 四氧化锇(OsO₄)常温下固定 1 h;回收 OSO₄ 废液;再次用 PBS(0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4)洗涤 3 次,每次 10 min;梯度乙醇脱水后,分别用 3:1,1:1 的丙酮和环氧树脂进行样本浸透。置烘箱 60℃ 聚合 24 h。用 ImageJ 软件计算线粒体个数,并测量周长和面积。

1.10 Western 印迹法检测 HUVEC 中 p-Drp1 和 p-Mff 蛋白表达水平

取 1.3 分组②处理的细胞,用 RIPA 裂解液裂解,10 000×g,4℃ 离心 10 min,吸取上清液。BCA 法测定蛋白质浓度,调整各组蛋白质浓度,以 4:1 体积比加入 5× 上样缓冲液混匀,100℃ 煮 10 min。将提取的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,上样量为 20 μg,分离后转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入一抗(抗 p-Drp1 和 p-Mff 抗体,稀释比均为 1:2000),4℃ 孵育过夜。TBS-T 清洗 4 次,每次 5 min。随后加 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(二抗)(1:5000),室温孵育 1 h,TBS-T 洗膜 4 次,每次 5 min。以 β 肌动蛋白作为内参对照。发光、显影、扫描后分析蛋白条带积分吸光度(integrated absorbance, IA),用目标蛋白与内参蛋白 IA 比值表示目标蛋白相对表达水平。

1.11 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 GraphPad-Prism7 进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析和正态分布 *t* 检验分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ⁶⁰Co γ 射线照射对 HUVEC 细胞形态的影响

形态观察结果显示,HUVEC 细胞经 ⁶⁰Co γ 射线照射后 24 和 48 h,细胞对照组(0 Gy)生长状态均良好,细胞数量多,细胞延展性较好,贴壁牢固,折光性好;而 5,10 和 20 Gy 照射组,随照射剂量增加,HUVEC 细胞数量逐渐减少,且细胞均有不同程度变小、皱缩,贴壁不牢固(图 1)。

2.2 ⁶⁰Co γ 射线照射对 HUVEC 细胞凋亡的影响

流式结果显示,⁶⁰Co γ 射线照射后 24 和 48 h,与细胞对照组相比,5,10 和 20 Gy 组 HUVEC 细胞凋亡率均增加(*P* < 0.01)(图 2)。

2.3 ⁶⁰Co γ 射线照射对 HUVEC 中 ROS 水平的影响

荧光染色结果显示,⁶⁰Co γ 射线照射后 24 和 48 h,与细胞对照组相比,5,10 和 20 Gy 组 HUVEC 绿色荧光强度明显增加(*P* < 0.05, *P* < 0.01),表明 ⁶⁰Co γ 射线照射导致 ROS 产生增加(图 3)。

2.4 ⁶⁰Co γ 射线照射对 HUVEC 线粒体膜电位的影响

流式细胞术结果显示,⁶⁰Co γ 射线照射后 24 和 48 h,与细胞对照组相比,5,10 和 20 Gy 组 HUVEC 红色荧光细胞比例显著降低(*P* < 0.01)(图 4),表明线粒体膜电位下降。

荧光共聚焦显微镜观察结果显示,⁶⁰Co γ 射线照射后 24 和 48 h,与细胞对照组相比,5,10 和 20 Gy 组 HUVEC 红色荧光与绿色荧光比值显著降低(*P* < 0.01)(图 5)。

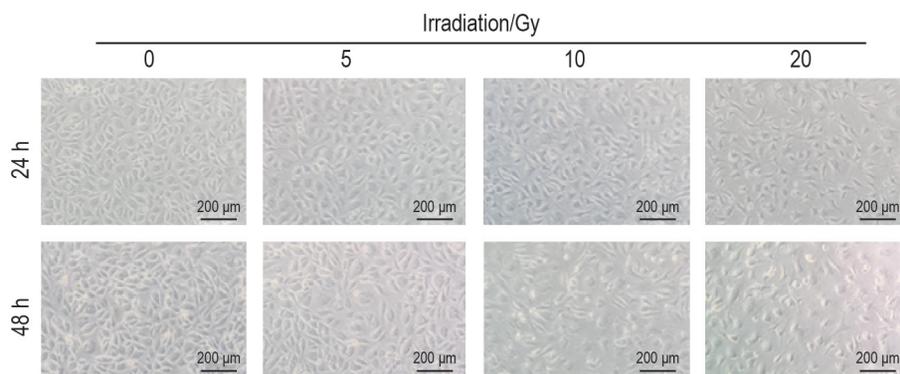


Fig.1 Effect of ⁶⁰Co γ-ray irradiation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) morphology at 24 and 48 h post-irradiation under microscope.

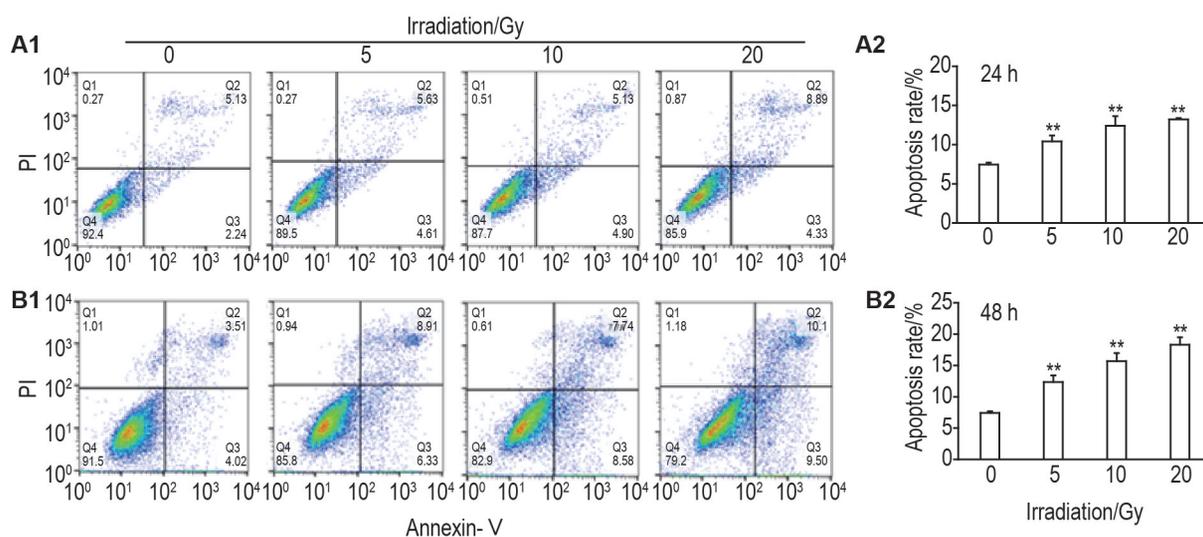


Fig.2 Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on apoptosis of HUVECs evaluated by flow cytometry. A2 and B2 were the quantitative results of A1 (24 h) and B1 (48 h), respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with 0 Gy (cell control) group.

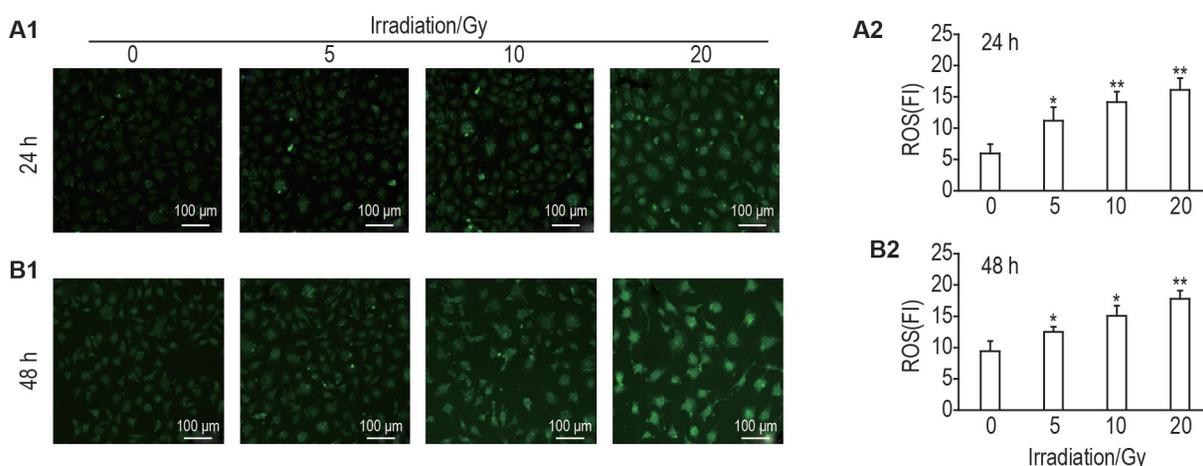


Fig.3 Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on reactive oxygen species (ROS) production in HUVECs by laser confocal fluorescence imaging. A2 and B2 were the semi-quantitative results of A1 (24 h) and B1 (48 h), respectively. FI: fluorescence intensity. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group.

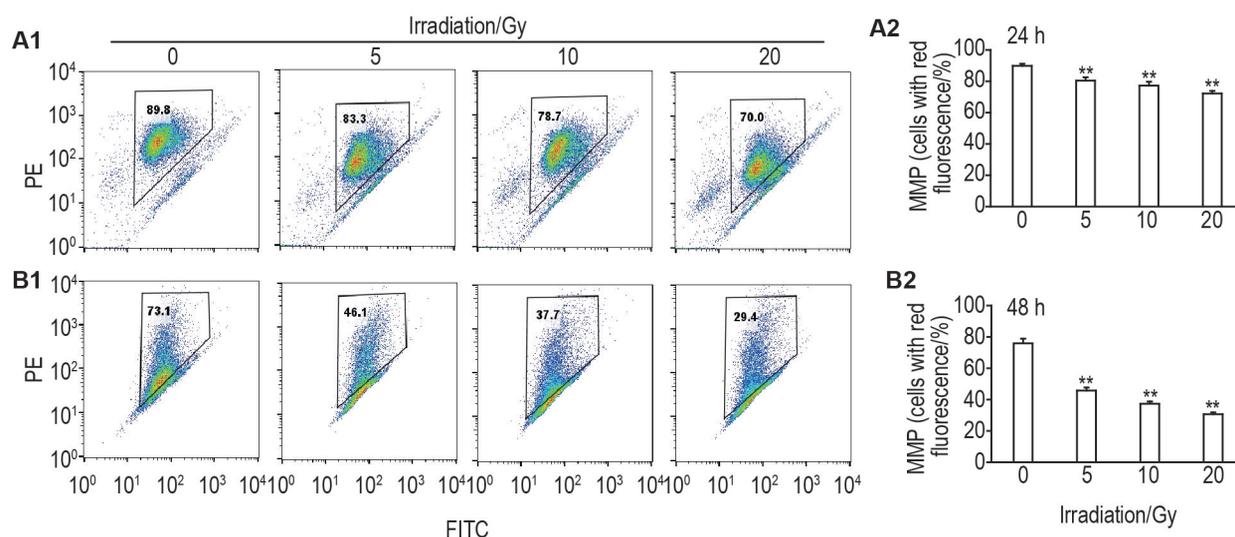


Fig.4 Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on mitochondrial membrane potential (MMP) in HUVECs by flow cytometry. A2 and B2 were the quantitative results of A1 (24 h) and B1 (48 h), respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

2.5 ^{60}Co γ 射线照射对 HUVEC 线粒体膜通道孔开放的影响

结果显示, ^{60}Co γ 射线照射后 24 和 48 h, 与细胞对照组相比, 5, 10 和 20 Gy 组 HUVEC 绿色荧光强度显著减弱 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 6), 提示 ^{60}Co γ 射线照射导致 HUVEC 的 mPTP 开放程度提高。

2.6 ^{60}Co γ 射线照射对 HUVEC 线粒体结构的影响

电镜观察线粒体结构结果显示, 细胞对照组线粒体结构完整, 线粒体脊保存完好。5, 10 和 20 Gy 照射组线粒体内部有不同程度的肿胀, 线粒体内部

结构破坏严重, 特异性结构脊不清晰 (图 7A)。与细胞对照组相比, 5, 10 和 20 Gy 组单个线粒体面积显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 7B1); 10 和 20 Gy 组单个线粒体周长增加 ($P<0.01$) (图 7B2); 5, 10 和 20 Gy 组线粒体密度显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$) (图 7B3); 5, 10 和 20 Gy 组异常线粒体比例显著增加 ($P<0.01$) (图 7B4)。

2.7 ^{60}Co γ 射线照射对 HUVEC 中 p-Drp1 和 p-Mff 蛋白表达水平的影响

Western 印迹实验结果 (图 8) 显示, 与细胞对

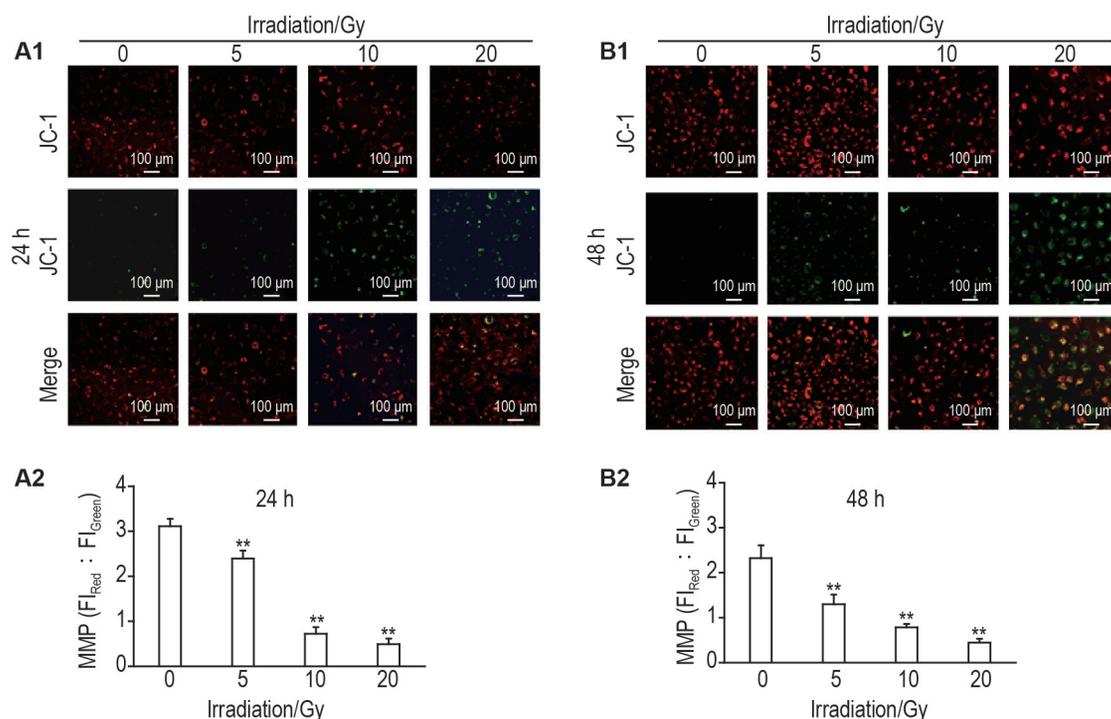


Fig.5 Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on MMP in HUVECs by laser confocal fluorescence imaging. A2 and B2 were the semi-quantitative results of A1 (24 h) and B1 (48 h), respectively. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

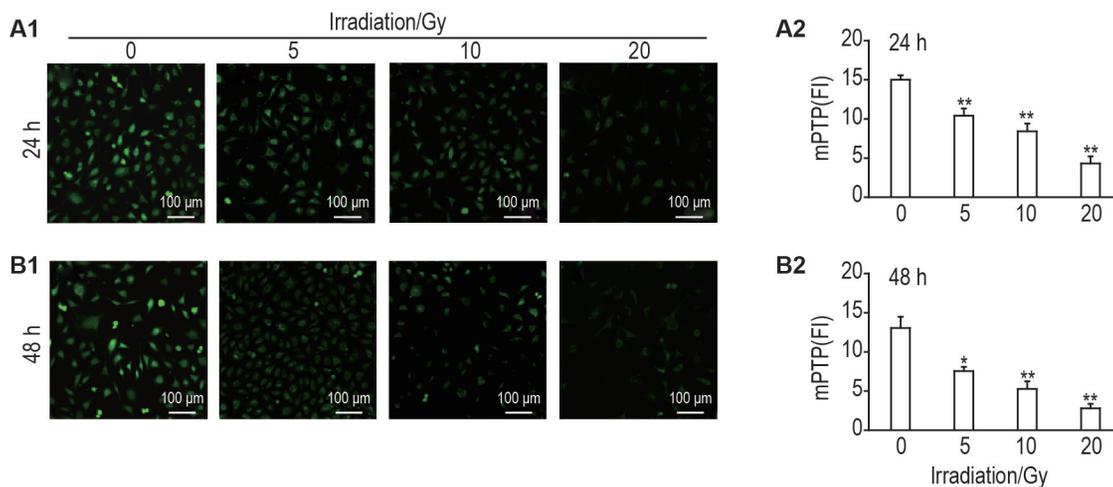


Fig.6 Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening in HUVECs by laser confocal fluorescence imaging. A2 and B2 were the semi-quantitative results of A1 (24 h) and B1 (48 h), respectively. $\bar{x}\pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group.

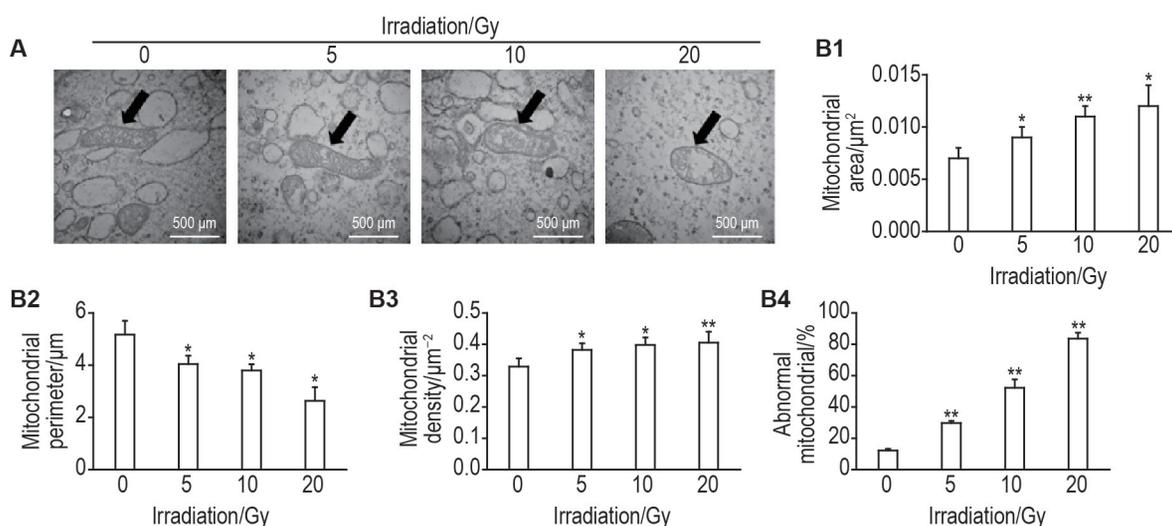


Fig.7 Effect of ⁶⁰Co γ-ray irradiation on mitochondrial morphology in HUVECs under transmission electron microscope. Arrows show the mitochondrial structure. B1, B2, B3 and B4 were the semi-quantitative results of A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group.

照组相比, 5, 10 和 20 Gy 照射 48 h 组, p-Drp1 和 p-Mff 蛋白表达水平均显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

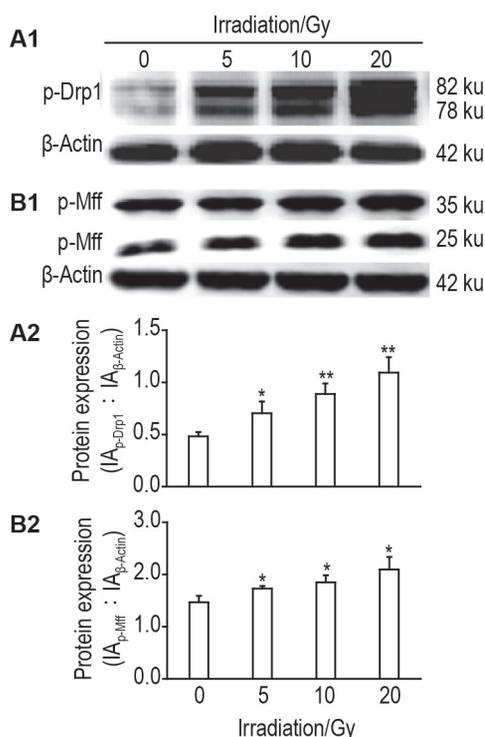


Fig.8 Effect of ⁶⁰Co γ-ray irradiation on levels of phosphorylated dynamin-related protein 1 (p-Drp1) and p-mitochondrial fission factor (p-Mff) in HUVECs by Western blotting. HUVECs were radiated for 48 h. A2 and B2 were the semi-quantitative results of A1 (p-Drp1) and B1 (p-Mff), respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group.

3 讨论

利用放射疗法治疗肿瘤是一种常见的治疗手

段,但在放射治疗时,心脏被归属为放射不敏感器官,因而心脏的放射损伤并未得到应有的重视,而且放射治疗导致的心脏并发症多发生在患者进行放疗很多年以后,已经不在随访范围内^[15]。而且,射线几乎可以对心脏的所有结构造成损伤,包括心脏瓣膜病、心包疾病、冠脉疾病、心肌病、传导系统疾病等^[16],因此放射性心脏损伤的发生率有低估的可能。目前研究认为,内皮细胞是射线损伤的靶细胞,血管内皮细胞受损,会导致心脏循环障碍继发心肌细胞的变性及心肌纤维化^[3]。本研究发现,⁶⁰Co γ射线照射可对HUVEC造成损伤,加重线粒体分裂,导致显著的线粒体功能障碍,可能是放射性心脏损伤的重要机制之一。

本研究结果显示,HUVEC受到⁶⁰Co γ射线照射后,细胞形态发生变化,细胞皱缩,贴壁不牢,细胞凋亡显著增多,同时活性氧生成增多,细胞功能受损;此外,线粒体膜电位下降、线粒体膜通道孔开放增加,显示放射诱导显著的线粒体功能障碍。线粒体是制造能量的细胞器,当线粒体功能受损后,细胞中能量生成减少,会进一步导致细胞功能障碍;而细胞功能受损,又会影响线粒体的正常功能。辐射对细胞损伤的早期作用,有可能是通过线粒体功能紊乱进行调节的。

本研究电镜结果显示,照射后HUVEC线粒体内部有不同程度的肿胀,内部结构破坏严重,特异性结构脊不清晰;线粒体密度明显下降,单个线粒体面积、单个线粒体周长和异常线粒体数量明显增加,显示线粒体结构严重受损。线粒体分裂在维持

线粒体稳态,调节线粒体功能中发挥重要作用^[17]。线粒体分裂是线粒体动态变化的重要特征之一^[18],目前发现的介导线粒体分裂的主要蛋白分子包括位于细胞基质中的 Drp1^[19]。线粒体的表面受体,可以招募 Drp1,从而使线粒体发生分裂^[19],目前已知的受体包括 Mff, Fis1, MiD49 和 MiD51^[20]。本研究结果显示,受照后 HUVEC 中线粒体相关分裂蛋白 p-Drp1 和 p-Mff 表达水平升高,表明⁶⁰Co γ 射线照射可以促进线粒体分裂相关蛋白的表达,加重了线粒体分裂。

本研究结果显示,⁶⁰Co γ 射线照射促进 HUVEC 凋亡,ROS 生成增多,MMP 下降、mPTP 开放增加,诱发了线粒体功能障碍;电镜检测发现,⁶⁰Co γ 射线照射显著加重 HUVEC 线粒体结构损伤,线粒体分裂相关蛋白表达增多,促进线粒体分裂。提示放射诱导的线粒体结构和功能障碍可能是血管内皮细胞放射损伤的重要机制,放射诱导的线粒体分裂可能在其中起着重要作用。但本研究仍有很多不足之处,需要进一步通过体内实验得以验证;辐射诱导的线粒体分裂相关蛋白变化是如何调控线粒体分裂以及线粒体功能功能,具体机制仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Boerma M. Experimental radiation-induced heart disease: past, present, and future[J]. *Radiat Res*, 2012, 178(1): 1-6.
- [2] Lee Chuy K, Nahhas O, Dominic P, et al. Cardiovascular complications associated with mediastinal radiation[J/OL]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2019, 21(7): 31 (2019-06-04) [2022-07-01]. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11936-7-019-0737-0>.
- [3] Wang H, Wei J, Zheng Q, et al. Radiation-induced heart disease: a review of classification, mechanism and prevention[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2128-2138.
- [4] Liu LK, Ouyang W, Zhao X, et al. Pathogenesis and prevention of radiation-induced myocardial fibrosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(3): 583-587.
- [5] Madan R, Benson R, Sharma DN, et al. Radiation induced heart disease: pathogenesis, management and review literature[J]. *J Egypt Natl Cancer Inst*, 2015, 27(4): 187-193.
- [6] Tapio S. Pathology and biology of radiation-induced cardiac disease[J]. *J Radiat Res*, 2016, 57(5): 439-448.
- [7] Hu S, Chen Y, Li L, et al. Effects of adenovirus-mediated delivery of the human hepatocyte growth factor gene in experimental radiation-induced heart disease[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009, 75(5): 1537-1544.
- [8] Sárközy M, Varga Z, Gáspár R, et al. Pathomechanisms and therapeutic opportunities in radiation-induced heart disease: from bench to bedside[J]. *Clin Res Cardiol*, 2021, 110(4): 507-531.
- [9] Friedland W, Schmitt E, Kundrát P, et al. Track-structure simulations of energy deposition patterns to mitochondria and damage to their DNA[J]. *Int J Radiat Biol*, 2019, 95(1): 3-11.
- [10] Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics in regulating the unique phenotypes of cancer and stem cells[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(1): 39-48.
- [11] Ng MYW, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion[J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 881-905.
- [12] Dorn GW 2nd, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart[J]. *Genes Dev*, 2015, 29(19): 1981-1991.
- [13] Lee G, Muramoto GG, Chute JP, et al. Nanomechanical fingerprints of gamma radiation damage to DNA[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9(12): 7359-7363.
- [14] Yamamori T, Sasagawa T, Ichii O, et al. Analysis of the mechanism of radiation-induced upregulation of mitochondrial abundance in mouse fibroblasts[J]. *J Radiat Res*, 2017, 58(3): 292-301.
- [15] Zou B, Schuster JP, Niu K, et al. Radiotherapy-induced heart disease: a review of the literature [J]. *Precis Clin Med*, 2019, 2(4): 270-282.
- [16] Badiyan SN, Puckett LL, Vlacich G, et al. Radiation-induced cardiovascular toxicities [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2022, 23(10): 1388-1404.
- [17] Kleele T, Rey T, Winter J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 435-439.
- [18] Losón OC, Song Z, Chen H, et al. Fis1, Mff, Mid49, and Mid51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(5): 659-667.

Effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on mitochondrial structure and function of human umbilical vein endothelial cells

YAN Kai-xin¹, ZHAO Ya-wei¹, WANG Yi-hao¹, YI Jing², DUAN Han², TAO Ning³,
WANG Hua^{2,3}, HU Shun-ying¹

(1. Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the effect of ^{60}Co γ -ray irradiation on mitochondrial structure and function of vascular endothelial cells. **METHODS** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were irradiated with ^{60}Co γ -ray at 0 (cell control), 5, 10 and 20 Gy, respectively. The apoptosis of HUVEC cells was detected by apoptosis kit at 24 and 48 h after irradiation, the reactive oxygen species (ROS) levels by laser confocal microscopy after H2DCF-DA labeling, the mitochondrial membrane potential by flow cytometry and laser confocal microscopy after JC-1 probe labeling, and the open state of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) qualitatively by laser confocal microscopy through calcein-AM probe labeling. The structural changes of mitochondria were observed by electron microscopy. The mitochondrial division-related markers, phosphorylated power-related protein 1 (p-Drp1) and p-mitochondrial fission factor (p-Mff) protein expressions were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with the cell control group (0 Gy), the cell apoptosis was increased ($P<0.01$), ROS levels were increased ($P<0.05$, $P<0.01$) and opening of mPTP was increased ($P<0.05$, $P<0.01$) in the 5, 10 and 20 Gy groups 24 and 48 h after irradiation. Flow cytometry and fluorescence microscopy results showed a decrease in mitochondrial membrane potential in the 5, 10 and 20 Gy groups at 24 and 48 h after irradiation compared with the cell control group ($P<0.01$). Electron microscopic observations showed that the irradiated group showed an increase in individual mitochondrial areas ($P<0.05$, $P<0.01$) and in individual mitochondrial perimeters ($P<0.05$), a decrease in mitochondrial density ($P<0.05$, $P<0.01$), and a significant increase in the number of abnormal mitochondria ($P<0.01$) 48 h after irradiation compared with the cell control group. Compared with the cell control group, the expression levels of p-Drp1 and p-Mff proteins were significantly increased in the irradiated groups 48 h after irradiation ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** ^{60}Co γ -ray irradiation aggravates mitochondrial damage in vascular endothelial cells, promotes mitochondrial division, and induces mitochondrial dysfunction.

Key words: gamma ray; vascular endothelial cell; mitochondrial function; mitochondrial fission

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (82173450)

Corresponding author: HU Shun-ying, E-mail: hsylyly@163.com; WANG Hua, E-mail: 18511712135@163.com

(收稿日期: 2022-07-01 接受日期: 2022-09-05)

(本文编辑: 乔虹)