

白介素-6对受分次照射荷瘤小鼠脾细胞的辐射防护作用

梅开 刘永彪 王绪 郝兴芝

(徐州医学院肿瘤防治研究所 徐州 221002)

摘要 探讨白介素-6(IL-6)对受照射荷瘤小鼠脾脏的辐射防护作用。6MV X 射线对荷瘤小鼠进行分次全身照射(5Gy/5f/5d)后,采用黄嘌呤氧化酶法测定脾组织血清超氧化物歧化酶(T-SOD)活性,硫代巴比妥酸钠(TBA)荧光法测定氧化产物丙二醛(MDA)含量;免疫组化抗生蛋白链霉素-过氧化物酶-生物素(SP)法检测脾细胞 Bcl-2 的表达;Beckman 液体闪烁仪检测脾淋巴细胞亚群对 K₅₆₂ 细胞的杀伤活性。结果表明, IL-6 组脾组织 T-SOD 含量明显增高($p < 0.01$),而 MDA 含量明显降低($p < 0.05$); IL-6 组脾细胞 Bcl-2 的表达水平显著高于对照组($p < 0.01$); IL-6 提高了脾淋巴细胞对 K₅₆₂ 细胞的杀伤活性。抗氧化酶活性的降低和氧自由基作用的增强是电离辐射引起细胞过氧化损伤,导致细胞功能异常的重要原因。IL-6 可能通过促进脾细胞 Bcl-2 蛋白表达,增强脾细胞的抗氧化活性,抑制氧自由基对脾细胞的损伤,延长脾细胞寿命,增强其免疫功能而发挥辐射防护作用。

关键词 白介素-6, 辐射防护, 超氧化物歧化酶, 丙二醛, 脾细胞 Bcl-2, K₅₆₂ 细胞

中图分类号 R811.5

肿瘤放射治疗过程中的辐射损伤一直是亟待解决的问题。脾脏是辐射敏感器官,脾细胞在机体免疫反应过程中起重要作用。IL-6 是一种多功能细胞因子,主要由淋巴细胞产生^[1]。本工作报道白介素-6(IL-6)对受照射荷瘤小鼠脾细胞的辐射防护效应,并初步探讨其防护机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

S₁₈₀ 肉瘤腹水型荷瘤小鼠 1 只,由中国医学科学院实验动物中心提供。雄性健康昆明种小鼠 15 只,体重(20±2)g,6—8 周龄,由徐州医学院实验动物中心提供。

1.2 靶细胞

K₅₆₂ 细胞株由中国科学院上海细胞所提供。取对数生长期的 K₅₆₂ 细胞 3 mL,加入 ³H-TdR 1.2×10⁴ Bq(中国原子能研究院),37 培养 6h, PBS 洗 3 次,然后用 RPMI 1640 培养液配成 1×10⁶/mL 细胞悬液,备用。

1.3 荷瘤鼠模型的建立

无菌条件下抽取腹腔内传代的 S₁₈₀ 肉瘤荷瘤小鼠的腹水,以生理盐水稀释至细胞浓度约 1×10⁷/mL。取细胞悬液 0.2mL,接种于健康昆明种小鼠右腋下皮下。肿瘤直径约 2cm 大小时,接受照射。

1.4 动物分组

15 只被接种肿瘤的小鼠,12 只接种成功。将荷瘤小鼠随机分为两组:照射+IL-6 组及照射组,每组动物数为 6 只。

1.5 照射条件

6MV X 射线对小鼠进行全身照射(西门子直线加速器由徐州医学院二附院放疗科提供),源皮距 100cm,剂量率为 1Gy/min,剂量分割为 1Gy/f/d×5d。

1.6 给药方法

IL-6 由苏州大学孔向蓉博士惠赠,IL-6 组于照射前 1h 以 400 μg/kg 体重对小鼠皮下注射,对照组皮下注射灭活的人血浆白蛋白 400 μg·kg·d。

江苏省教委自然科学基金(98KJD320014)资助

第一作者:梅开,女,1973 年 2 月出生,1993 年毕业于苏州医学院医疗系,1999 年 9 月攻读徐州医学院肿瘤学专业,硕士
通讯联系人:刘永彪

收稿日期:初稿 2002-04-27,修回 2002-05-31

1.7 标本收集

于照射结束后 1h, 颈椎脱臼处死动物, 无菌条件下取部分脾脏, 制备细胞悬液; 取部分新鲜脾组织, 常规方法制备组织匀浆; 另一部分脾脏用中性福尔马林固定。

1.8 T-SOD、MDA 含量测定

1.8.1 血清超氧化物歧化酶(T-SOD)含量测定 采用黄嘌呤氧化酶法。

1.8.2 氧化产物丙二醛(MDA)含量测定 采用硫代巴比妥酸纳(TBA)荧光法。以上检测试剂盒由南京建成生物医学工程研究所提供。

1.9 Bcl-2 蛋白表达

免疫组化超敏 SP 法检测脾细胞 Bcl-2 蛋白表达 (SP 试剂盒、液体 DAB 酶底物显色试剂盒及 Bcl-2 一抗鼠源性单克隆抗体均购自福州迈新生物技术开发公司, 二抗为即用型生物素标记的羊抗鼠抗体)。设阳性与阴性对照, 实验步骤如下: (1) 脾组织石蜡切片脱蜡水化后, 0.01M PBS (pH=7.4) 冲洗 5min×3 次。(2) 过氧化酶阻断剂阻断内源性过氧化物酶活性, 室温孵育 10min 后 PBS 冲洗。(3) 组织抗原微波修复, 0.01mol/L (pH=6.0) 柠檬酸抗原修复 10min。(4) 加小鼠非免疫动物血清室温孵育 5min, PBS 洗 1 次。(5) 加一抗 4 过夜, PBS 冲洗。(6) 加二抗室温孵育 10min 后 PBS 冲洗。(7) 链亲和素—过氧化物酶溶液, 室温孵育 10min 后 PBS 冲洗。(8) 新鲜配制的 DAB 显色剂, 镜下观察 5—10min。(9) 自来水冲洗, 苏木素复染, 中性树胶封固。

1.10 脾细胞各亚群的肿瘤杀伤活性测定

采用 Wysocki 等^[2]建立的 Panning 直接法分离两组小鼠脾细胞悬液淋巴细胞亚群 CD⁴⁺、CD⁸⁺ 及 B 细胞, 台盼蓝拒染法鉴定细胞存活率在 90%以上。每个培养瓶内加入靶细胞 K₅₆₂ 为 1×10⁵/瓶, 将获得的

CD⁴⁺、CD⁸⁺细胞分别加到培养瓶中, 5×10⁵/瓶。观察 CD⁴⁺与 B 细胞、CD⁸⁺与 B 细胞间调节作用时, 所加每一种亚群细胞数减半, 即 2.5×10⁵/瓶, 靶细胞为 1×10⁵/瓶, 同时设单纯靶细胞组。37 继续培养各组细胞 16h, 收获细胞, Beckman 液体闪烁仪 (LS-6800, USA) 测每分钟计数值。经平方根转换后, 进行 t 检验。按下式计算亚群细胞肿瘤杀伤活性。

亚群细胞肿瘤杀伤活性 (每分钟计数/5×10⁵细胞) = 单纯靶细胞组每分钟计数 - 实验组每分钟计数。该差值越大, 说明对肿瘤杀伤活性越强 (即被杀死的肿瘤细胞越多)。

1.11 结果判定和统计方法

T-SOD、MDA 含量以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 t 检验对各组数据进行差异显著性比较。脾细胞 Bcl-2 染色以胞浆出现呈棕黄色颗粒为阳性, 双盲法随机观察 10 个高倍视野, 根据阳性细胞所占比例, <10%为+, 10%—50%为++, >50%为+++ , 统计采用 SPSS 统计软件 Pearson 卡方分析法。

2 结果

2.1 受照射荷瘤小鼠脾组织 T-SOD 及 MDA 含量

表 1 显示, IL-6 组小鼠脾组织 T-SOD 活性明显高于对照组 (p<0.01), 而 MDA 含量较对照组低 (p<0.05)。

2.2 脾细胞 Bcl-2 蛋白表达

IL-6 组脾细胞 Bcl-2 表达阳性率 63%明显高于对照组 31% (见图 1a、b)。

2.3 脾淋巴细胞亚群的杀伤活性

IL-6 提高了脾淋巴细胞亚群对 K₅₆₂ 细胞的杀伤活性, 结果见表 2。

Tab.1 The effects of IL-6 on the activities of antioxidases and the content of MDA in spleens of irradiated tumor-bearing mice

Group	T-SOD/Nu ml ⁻¹	MDA / nmol ml ⁻¹
Radiation	198.34 ± 15.43	21.20 ± 4.52
IL-6+radiation	259.64 ± 18.28 ⁽²⁾	12.68 ± 5.38 ⁽¹⁾

$\bar{x} \pm s$ n=6, ⁽¹⁾p<0.05, ⁽²⁾p<0.01 vs control

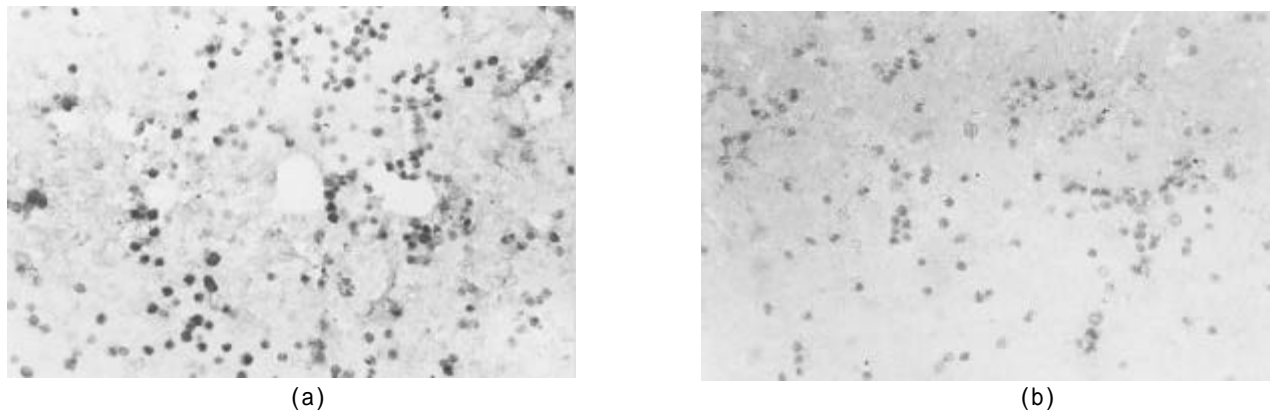


Fig.1 The effect of IL-6 on the expression of Bcl-2 in spleen cells of tumor-bearing mice.

(a) IL-6, (b) Control

Tab.2 The effects of IL-6 on the natural killing activity of lymphocytes on K_{562} cells (counts/min)

Group	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ +B	CD8 ⁺ +B
Radiation	4826 ± 291	4 117 ± 264	6372 ± 526	5728 ± 509
IL-6+radiation	5751 ± 343 ⁽¹⁾	4937 ± 287 ⁽¹⁾	8872 ± 588 ⁽²⁾	7226 ± 596 ⁽²⁾

($\bar{x} \pm s$), $n=6$, ⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs control

3 讨论

正常情况下体内自由基及脂过氧化物不断产生,又在抗自由基损伤系统的作用下不断被清除,始终保持适度的低水平,少量的自由基参与许多重要的生化反应,为维持生命活动所必需^[3,4]。低线性能量传递(LET)射线放射主要通过间接作用产生的自由基引起细胞DNA链断裂。抗氧化酶活性的降低和氧自由基作用的增强,可能是电离辐射引起机体过氧化损伤导致组织细胞功能异常的重要原因^[5,6]。

本文结果表明,IL-6能明显提高受照射荷瘤小鼠脾组织T-SOD活性,并在一定程度上降低了脂质过氧化物(LPO)的产生。SOD具有防御氧毒性、催化超氧阴离子自由基的作用,在增强机体抗辐射能力、维持体内超氧阴离子自由基产生与清除的动态平衡中起重要作用^[7,8]。

本文研究结果还显示,IL-6可以促进脾细胞Bcl-2蛋白表达。Bcl-2是迄今研究得最深入、最广泛的凋亡调控基因之一,通过广泛抑制各种刺激剂诱导的细胞凋亡,延长细胞活力而发挥生物学作用。进一步研究显示,Bcl-2也能拮抗T细胞对各种凋亡刺激信号(射线、糖皮质激素等)的反应^[9]。外源性IL-6的注入能引起体内相关基因的表达。Teague等^[10]发现,小鼠CD4⁺T细胞离体后能立即表

达Bcl-2,但24h后培养液中Bcl-2不能测到,如果在此期间将T细胞与IL-6共同孵育,Bcl-2表达将不会下调。因此,推测IL-6阻止小鼠静止T细胞的凋亡是通过维持或诱导Bcl-2的表达起作用的。

Bcl-2是一种细胞凋亡抑制基因^[11,12],还是一种氧自由基(OFR,Oxygen Free Radical)拮抗剂。Steinma等^[13]的研究发现,在哺乳动物细胞中Bcl-2的过表达能减少LPO的产生,并且对H₂O₂、Vit K₃刺激和谷胱甘肽(GSH)缺乏引起的凋亡抵抗能力增强。Bcl-2蛋白定位于线粒体膜、内质网膜和核膜,Bcl-2蛋白发挥抗氧化作用的部位与其蛋白定位一致^[14]。Hockenbery等^[15]也发现,通过表达Bcl-2能完全抑制LPO,在自由基产生部位,Bcl-2发挥抗氧化作用,而且Bcl-2最显著的特征是能阻止电离辐射诱导的细胞死亡。辐射产生的OH·是最活泼的氧自由基,能直接氧化损伤DNA、蛋白质、膜脂等生物大分子。通过表达Bcl-2的细胞仍然产生过氧化物,但不损害膜脂等细胞成分。

Bcl-2抗氧化作用与抑制凋亡的作用在细胞水平上的表现是一致的。Bcl-2抑制细胞凋亡的许多变化都与氧化还原状态有关,如:增加GSH、抑制氧自由基的损伤作用,增加过氧化氢酶(CAT)和SOD的活性等。一些研究资料表明,活性氧自由基参与细胞程序化死亡的过程。因此有人认为,Bcl-2对于细胞程序化死亡的抑制作用机制与Bcl-2作为

一种抗氧化剂以及抑制活性氧自由基的产生有关^[16, 17]。

另外, 本文通过 ³H-TDR 释放实验检测了 CD4⁺ 和 CD8⁺ 淋巴细胞单独培养或与 B 细胞混合培养时对肿瘤细胞的杀伤活性, 在两种情况下, IL-6 组与对照组比较 ³H-TDR 释放量均有明显差异, 表明 IL-6 提高了脾淋巴细胞亚群的肿瘤杀伤活性。

由上述资料可知, IL-6 可能通过促进脾细胞 Bcl-2 蛋白表达, 抑制氧自由基对脾细胞的损伤作用, 延长脾细胞的寿命, 增强其免疫功能, 从而起到一定辐射防护作用。

参考文献

- 1 Kawano M M, Mihara K, Huang N H et al. Blood, 1995, 85 (2): 487-494
- 2 Wysocki L J, Sato. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75 (6): 2844-2849
- 3 陈瑗. 中华放射医学与防护杂志, 1984, 4 (6): 63-67
CHEN Y. Chin J Radiol Med Prot, 1984, 4 (6): 63-67
- 4 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1987. 251-253
FANG Y Z, LI W J. Free radical enzyme, first edition, Beijing: Science Press, 1987. 251-253
- 5 刘树铮. 医学放射生物学. 北京: 原子能出版社, 1986. 20-24
LIU S Z. Medical Radiobiology. Beijing Atomic Energy Press, 1986. 20-24
- 6 Halliwell B, Gutteridge J M C. Arch Biochem Biophys, 1986, 246: 501-514
- 7 Petkau A. Br J Cancer, 1987, 55 (Suppl): 87-95
- 8 陈晓穗, 骆训懿, 周丽君等. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17 (3): 189-192
CHEN X S, LUO X Y, ZHOU L J et al. Chin J Radiol Med Prot, 1997, 17 (3): 189-192
- 9 Korsmeyer S J. Blood, 1992, 80 (4): 879-889
- 10 Teague T K, Marrack P H, Kappler J W et al. J Immunol, 1997, 158: 5791-5801
- 11 Hiyashita T, Reed J C. Blood, 1993, 81: 151-157
- 12 Strasser A, Harris A W, Cory S. Cell, 1991, 67: 889-899
- 13 Steinman H M. J Bio Chem, 1995, 270 (8): 3487-3490
- 14 Monaghan P, Robertson D, Amos T A S et al. J Histochem Cytochem, 1992, 40: 1819-1825
- 15 Hockenbery D M, Oltval Z N, Yin X M et al. Cell, 1993, 75: 241-251
- 16 Zhong L T, Sarofinn T, Kane D J et al. Pro Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4533-4537
- 17 Kane D J, Sarafian T H A, Anton R et al. Science, 1993, 262: 1274-1276

RADIOPROTECTIVE EFFECT OF IL-6 ON THE SPLEEN CELLS IN IRRADIATED TUMOR-BEARING MICE

MEI Kai LIU Yongbiao WANG Xu HAO Xingzhi

(Laboratory of Oncology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002)

ABSTRACT The paper is to study radioprotective effect of Interleukin 6 (IL-6) on the spleen cells of irradiated tumor-bearing mice. After 6MV X-ray irradiation (5Gy/5f/5d), the activities of total superoxide dismutase (T-SOD) in spleens of irradiated tumor bearing mice were measured by the method of xanthineoxidase. The contents of malondialdehyde (MDA) were measured by thiobarbituric acid (TBA) fluorescence; Immunohistochemical technique was performed to detect Bcl-2 protein in spleen cells; The effects of IL-6 on natural killing activity of lymphocytes on K₅₆₂ cells were determined by Beckman liquid scintillation counter IL-6 showed significant radioprotective effect on the spleen cells of irradiated tumor bearing mice, including increasing the activities of T-SOD ($p < 0.01$) and reducing the contents of MDA ($p < 0.05$). The increased expression level of Bcl-2 in spleen cells was observed in the IL-6 group ($p < 0.01$). IL-6 enhanced the natural killing activity of lymphocyte on K₅₆₂ cells. Decrease of antioxidase activities and increase of free radicals may be the main causes of peroxidation induced by irradiation and damage to cell activities. IL-6 has radioprotective effect on the spleen cells, which may be due to its function of increasing the expression of Bcl-2 and antioxidase activities, eliminating free radicals, lengthening the life span of spleen cells and promoting their functions.

KEYWORDS Interleukin 6, Radioprotection, Superoxide, Dismutase, MDA, Bcl-2

CLC R811.5