

电离辐射对小鼠派伊氏板细胞凋亡的影响

刘佳梅 陈东 刘树铮⁽¹⁾

(白求恩医科大学组胚教研室 长春 130021)

⁽¹⁾(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用原位末端标记(TUNEL)法研究不同剂量X射线全身照射后派伊氏板细胞凋亡的时间效应及剂量效应关系。结果表明:2Gy全身照射后派伊氏板TUNEL阳性细胞数增加;0.05Gy、0.075Gy全身照射后派伊氏板TUNEL阳性细胞数减少。提示2Gy全身照射促进细胞凋亡,而低剂量电离辐射抑制细胞凋亡。

关键词 电离辐射, 派伊氏板, 细胞凋亡, 原位末端标记

派伊氏板是存在于所有哺乳动物中的回肠集合淋巴小结,在消化管免疫功能上起重要作用。派伊氏板的淋巴组织从小肠固有层延伸至粘膜下层,包括淋巴小结区、小结间区及圆顶区^[1]。其中小结区主要被B淋巴细胞占据,而小结间区主要被T淋巴细胞所占据^[2]。以往曾有报道大剂量全身照射后派伊氏板淋巴细胞大量减少^[3]。但尚未见低剂量电离辐射对派伊氏板细胞凋亡影响的报道。本实验应用TUNEL方法研究了不同剂量X射线全身照射对小鼠派伊氏板小结区及小结间区细胞凋亡的影响,从而进一步为低剂量电离辐射的兴奋效应提供分子水平的理论依据。

1 材料和 方法

1.1 实验动物

雄性健康昆明鼠,体重 $20 \pm 2\text{g}$,由白求恩医科大学实验动物部提供,随机分为照射组和假照组,每组不少于3只动物。

1.2 照射

Philips深部X射线治疗机,电压200kV,电流10mA,滤板0.5mm Cu+1.0mm Al。靶皮距分别为212cm和50cm,剂量率分别为0.0125Gy/min(0.025~0.1 Gy)和0.287Gy/min(0.5~2Gy)。

1.3 组织标本制备

各剂量组照射后0.5~72h将小鼠断头处死迅速取出派伊氏板,放入OCT中浸15min,入冷丙酮中冷冻后,用恒冷箱切片机切片,厚约6 μm ,将组织切片贴于APES处理的载玻片上,无水乙醇浸泡2min,室温干燥30min后,保存于-70℃冰箱中。假照组亦按上述时间点取材。

1.4 TUNEL法原位检测DNA断裂^[4]

将组织切片从冰箱中取出,室温干燥30min后入新鲜配制的4%多聚甲醛溶液30min,PBS洗后入0.3% H_2O_2 甲醇中以封闭内源性过氧化物酶,PBS洗后入0.1%Triton-X100枸橼酸钠缓冲液中冰浴2min,PBS洗后加TUNEL反应混合液(购于宝灵曼公司),37℃反应1h,PBS洗后正常羊血清封闭,以去除非特异性反应,加POD反应液37℃30min,PBS洗后DAB显色,甲基绿复染,脱水透明封片。用显微镜观察TUNEL反应阳性细胞。

1.5 统计学处理

分别计数派伊氏板小结区及小结间区每高倍视野50个目镜网格中TUNEL阳性细胞数,计数视野不少于5个,与同时间点假照组进行比较,应用t检验。

2 实验结果

2.1 不同剂量 X 射线全身照射后的时效关系

2Gy 全身照射后,派伊氏板小结间区 TUNEL 阳性细胞数从 1h 开始明显增多,到 12h 达高峰(图 1B,图 2),72h 恢复至假照水平(表 1);小结区 TUNEL 阳性细胞数从 2h 开始明显增多,亦在 12h 达高峰,24h 恢复至假照水平(图 1B,图 3,表 2)。0.05Gy 全身照射后,派伊氏板小结间区 TUNEL 阳性细胞数从 4h 开始明显减少,到 12h 降至最低,24h 恢复至假照水平(表 1);小结区 TUNEL 阳性细胞数与假照组无明显差别(表 2)。0.075Gy 全身照射后,派伊

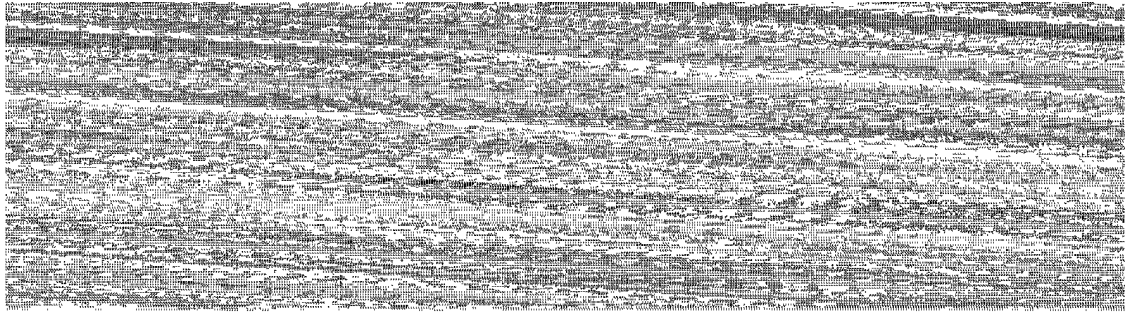


Fig. 1 Frozen section of mouse Peyer's patches, showing the number and distribution of TUNEL-positive cells (deep black stained) in the follicular area (FA) and interfollicular area (IFA) × 100
(A) Sham-irradiation (B) 12h after 2Gy irradiation (C) 12h following 0.075 Gy irradiation

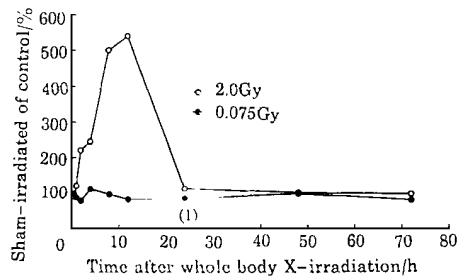
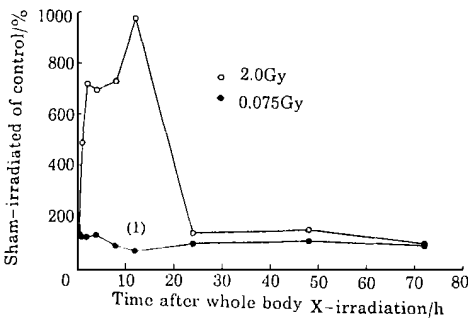


Fig. 2 TUNEL positive cells in the interfollicular area of Peyer's patches after WBI
(¹) $p < 0.05$ vs sham-irrad

Fig. 3 TUNEL positive cells in the follicular area of Peyer's patches after WBI
(¹) $p < 0.05$ vs sham-irrad

氏板小结间区 TUNEL 阳性细胞数只在 12h 明显低于假照组(图 1C),其它时间点与假照组无明显差别(表 1);小结区 TUNEL 阳性细胞数在 12h 和 24h 均明显减少,48h 恢复至假照水平(图 3,表 2)。0.025Gy 全身照射后,无论是小结区还是小结间区各时间点 TUNEL 阳性细胞数与假照组相比均无明显差异(表 1,2)。

2.2 X 射线全身照射后 12h 的量效关系

0.5~2Gy 全身照射 12h 后,无论是小结区还是小结间区,TUNEL 阳性细胞数均呈剂量依赖性增加。小剂量全身照射 12h 后,0.05Gy、0.075Gy 剂量组 TUNEL 阳性细胞数明显减少;0.025Gy、0.1Gy 剂量组 TUNEL 阳性细胞数与假照组无明显差异。全身 X 射线照射 12h 后的剂量-一效应曲线呈 'J' 型,如图 4 所示。

Tab.1 Changes in the number of TUNEL positive cells in the interfollicular area of Peyer's patches after WBI

Time after WBI/h	Dose/Gy				
	Sham-irrad	0.025	0.05	0.075	2.0
0.5	3.5±0.63	4.7±0.30	2.5±0.55	4.3±0.20	4.5±0.44
1	4.1±0.27	5.2±0.27	3.4±1.31	4.8±0.57	20.0±1.81 ⁽²⁾
2	4.1±0.55	4.6±0.35	3.2±0.27	4.8±0.651	29.5±6.51 ⁽²⁾
4	4.3±0.21	4.5±0.20	2.9±0.51 ⁽¹⁾	5.4±0.53	29.9±4.18 ⁽²⁾
8	4.9±0.44	4.7±0.45	2.9±0.27 ⁽²⁾	4.1±0.32	35.7±5.47 ⁽²⁾
12	4.2±0.10	4.4±0.40	2.8±0.29 ⁽²⁾	2.7±0.36 ⁽²⁾	41.0±13.00 ⁽²⁾
24	4.1±0.46	4.4±0.36	4.4±0.10	3.8±0.29	5.5±0.46 ⁽¹⁾
48	3.4±0.50	4.6±0.35	3.9±0.25	3.6±0.20	5.1±0.76 ⁽¹⁾
72	4.8±0.27	4.5±0.15	3.7±0.40	4.4±0.17	4.8±0.47

⁽¹⁾ $p < 0.05$ vs sham-irrad ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs sham-irrad

Tab.2 Changes in the number of TUNEL positive cells in the follicular area of Peyer's patches after WBI

Time after WBI/h	Dose/Gy				
	Sham-irrad	0.025	0.05	0.075	2.0
0.5	39.0±0.87	36.3±2.52	28.2±3.88	38.8±3.33	35.0±4.24
1	38.7±1.50	35.4±0.40	37.1±1.04	34.5±3.97	46.9±9.40
2	39.2±3.71	37.7±0.06	32.8±2.75	31.0±11.31	86.3±10.12 ⁽²⁾
4	35.6±7.01	33.9±0.85	31.7±1.28	40.0±5.00	87.2±4.46 ⁽²⁾
8	30.3±2.08	32.7±1.04	34.7±4.51	29.5±2.12	151.7±26.86 ⁽²⁾
12	32.9±1.06	37.7±0.61	29.5±2.12	27.4±1.91 ⁽¹⁾	178.2±39.70 ⁽²⁾
24	30.1±0.85	33.0±1.73	39.7±7.25	25.7±1.53 ⁽¹⁾	34.0±4.24
48	30.6±0.82	31.3±1.97	38.1±1.15	30.5±0.71	31.5±2.12
72	35.3±4.16	29.6±0.96	36.2±5.25	29.3±6.81	35.2±0.85

⁽¹⁾ $p < 0.05$ vs sham-irrad ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs sham-irrad

3 讨 论

细胞凋亡是近年来生物学研究的热点, 电离辐射作为一种外环境因素影响细胞凋亡的发生。曾有报道大剂量电离辐射可促进胸腺细胞的凋亡, 而低剂量电离辐射可抑制胸腺细胞的凋亡。其发生的分子机制可能由于低剂量电离辐射可以促进胸腺细胞 DNA 的合成与增殖; 而高剂量照射可以使 DNA 合成抑制^[5]; 低剂量全身照射可促进胸腺细胞的成熟、分化和细胞内的信息传递过程^[6]。本实验应用检测细胞凋亡比较敏感的末端脱氧核苷酰转移酶标记法(TUNEL)检测了派伊氏板小结区及小结间区的细胞凋亡, 结果发现 2Gy 全身照射促进派伊氏板细胞的凋亡, 而低剂量电离辐射可抑制派伊氏板细胞的凋亡。此结果与以往对胸腺细胞的研究结果一致。推测其发生机制可能相似。从本实验结果看, 派伊氏板的小结间区以成熟的 T 淋巴细胞为主, 其更新率较低, 而小结区特别是生发中心区以处于增殖状态的 B 淋巴细胞为主, 其更新率较高, 因此两者细胞凋亡的对照水平相差甚远, 后者为前者的 7~8 倍。在 0.05 及 0.075Gy 照射后 12h 小结间区细胞凋亡减少似较小结区更为明显, 而在 0.5

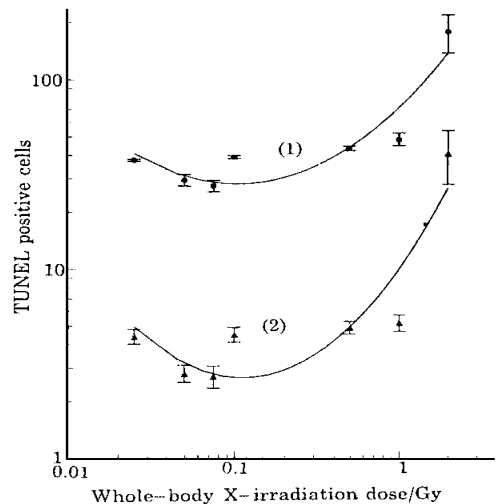


Fig.4 TUNEL reaction in mouse Peyer's patches
 (1) Follicular zone, control level=32.9±1.06
 (2) Interfollicular zone, control level=4.2±0.10

在 0.05 及 0.075Gy 照射后 12h 小结间区细胞凋亡减少似较小结区更为明显, 而在 0.5

和 1.0Gy 照射后 12h 其增多的幅度则稍低于小结区。只有在 2Gy 照射后 12h 其增多的幅度超过小结区,这可能与小结间区细胞凋亡的原始水平较低有关。另外,在本实验中,0.5Gy 全身照射 12h 后,细胞凋亡数明显增加,随着剂量的加大,细胞凋亡数呈剂量依赖性增加;而低剂量全身照射 12h 后,细胞凋亡数明显减少。从而首次在派伊氏板证实了电离辐射诱导细胞凋亡的 J 型曲线,为低剂量电离辐射的兴奋效应进一步提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Faulk W P, McCormick J N, Goodman J R *et al*. Cellular Immunology, 1971, **1**:500~520
- 2 Parrott D M, de Sousa M A. Clinical and Experimental Immunology, 1971, **8**:663~684
- 3 Thomas H E, Harold J S, Robert L O. Laboratory Investigation, 1988, **59**(5):591~597
- 4 Yael G, Yoav S, Shmuel A. The Journal of Cell Biology, 1992, **119**(3):493~501
- 5 LIU Shuzheng, ZHANG Yingchun, MU Ying *et al*. Mutat Res, 1996, **358**:185~191
- 6 LIU Shuzheng, SU Xu, ZHANG Yingchun. Int J Occupat Med Toxicol, 1994, **3**:107~117

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON APOPTOSIS IN MOUSE PEYER'S PATCHES

LIU Jiamei CHEN Dong LIU Shuzheng⁽¹⁾

Department of Histology and Embryology Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun

130021)⁽¹⁾(*MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021*)

ABSTRACT The relationship of time-effect and dose-effect of apoptosis in mouse Peyer's patches after whole body irradiation (WBI) with different doses of X-rays was studied by the method of TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The results showed that the number of TUNEL positive cells in mouse Peyer's patches were significantly increased following WBI with 2 Gy irradiation. While the number of TUNEL positive cells were decreased after WBI with doses of 0.05Gy and 0.075Gy X-rays. The results support the view that 2Gy irradiation promote the apoptosis of immune cells and the low doses of radiations suppress the apoptosis of immune cells.

KEYWORDS Ionizing radiation, Peyer's patches, Apoptosis, TUNEL