

小鼠脾淋巴细胞辐射死亡与凋亡之间的关系

崔玉芳 杨红 高亚兵 熊呈琦 夏国伟 高临路 王德文

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 探讨细胞凋亡在小鼠脾脏辐射损伤与重建中的作用及其机制,为急性放射病的防治提供依据。用原位末端标记、DNA电泳和免疫组化技术观察经2~8Gy不同剂量 γ 射线整体照射后,小鼠脾脏淋巴细胞凋亡的动态变化过程和Bax、Bcl-2蛋白在其中的作用。结果表明,(1)照射后早期淋巴细胞凋亡率迅速增加,如6Gy照射后4h和1d凋亡率分别为对照值的4.9和9.7倍;凋亡率还随照射剂量的增加而迅速升高,照射后8h当照射剂量为2、4、6、8Gy时,凋亡率分别为对照值的3.7、5.4、6.2和8.3倍。(2)透射电镜观察表明,6Gy γ 射线照射后,小鼠脾脏淋巴细胞出现早、中、晚期典型凋亡细胞的形态学特征。DNA凝胶电泳显示6Gy照射后4和6h,脾脏淋巴细胞出现特征的DNA梯形谱;末端标记法显示6Gy照射后4h凋亡率约为照前值的3.4倍。(3)照射后Bax、Bcl-2蛋白的异常表达证实两者在淋巴细胞凋亡的调控中起重要作用。细胞凋亡参与了小鼠脾脏辐射损伤与修复的全过程,Bax和Bcl-2蛋白对淋巴细胞凋亡的调控起重要作用。

关键词 淋巴细胞凋亡,辐射,Bax和Bcl-2蛋白,小鼠脾脏

淋巴细胞是淋巴器官和外周血中对辐射最敏感的免疫活性细胞,脾脏不仅是机体重要的淋巴器官之一,而且在维持机体造血和免疫功能中也起着至关重要的作用。有关照射后淋巴细胞数量迅速减少和机体免疫功能下降已有资料报道^[1],然而有关脾脏淋巴细胞损伤和免疫功能下降与细胞凋亡的关系,特别是在整体照射条件下细胞凋亡变化的规律,目前还报道不多。据此,本实验观察了整体照射后小鼠脾脏淋巴细胞损伤与重建的变化特点,着重于细胞凋亡在其中的作用及其与损伤的量效关系,期望能为辐射免疫损伤的规律和特点提供某些新的认识,为急性放射病的防治提供实验依据。

1 材料与 方法

1.1 实验动物与分组

LACA纯系雄性小鼠225只,体重(21±2.06g),随机分为0~8Gy5个组,各组鼠数分别为25、35、35、65和65只。

1.2 照射和取材

全身一次⁶⁰Co γ 射线照射,剂量率为 $5.01 \times 10^{-2} \text{C} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,于照射后2~8h和1~28d分别活杀取材。

1.3 样品制备

取小鼠尾静脉血制备血涂片;用无血清培养液在冰上制取脾脏细胞悬液并制备离心涂片。制备组织常规切片和超薄切片。

1.4 病理形态观察

总后勤部留学回国人员启动基金和军事医学科学院第二届创新基金资助项目

收稿日期:初稿1998-07-17;修回1998-12-14

常规 HE 染色在光镜下观察脾脏组织损伤的病理变化特点。用透射电镜观察 6Gy γ 射线照射后 4 和 6h 脾脏淋巴细胞超微结构的改变。

1.5 凋亡细胞检测

用 May-Grunwald-Giemsa (MGG) 染色^[2]、原位末端标记法^[3]在光镜下检测并计数凋亡细胞, 每个样品至少计数 600 个细胞。

1.6 DNA 电泳梯带^[4]

经 6Gy γ 射线照射后 4 和 6h 观察凋亡淋巴细胞电泳梯带。1.5% 琼脂糖、75V 电泳 1.5~2h, 紫外观察并照相, ECOR1/HINDIII 为 DNA 片断大小标志。

1.7 Bax、Bcl-2 凋亡相关蛋白检测

用 AP-SA 免疫组织化学技术检测 Bax、Bcl-2 凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2 多克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司, AP-SA 试剂盒为美国 Zymed 公司生产), 每个样品至少计数 600 个细胞。

1.8 统计学处理

用 Student's *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 照射后淋巴细胞凋亡的动态变化

2.1.1 6Gy γ 射线照射后不同时间小鼠脾脏淋巴细胞凋亡率的变化 结果见表 1 (为 MGG 检测结果)。从表 1 看出, 6Gy 照射后 4h 淋巴细胞凋亡率迅速增加, 至照射后 1d 达到高峰, 约为对照值的 9.7 倍; 而淋巴细胞绝对数和白细胞总数迅速减少, 至照射后 7d 淋巴细胞绝对数降至最低, 约为对照值的 4%。然而至照射后 28d 者均未恢复到对照水平。

Tab. 1 Apoptotic percentages of mouse spleen lymphocyte at various time after 6Gy whole body γ -irradiation ($\bar{X} \pm s$)

Days after irradiation	n	Apoptotic percentages of lymphocytes	Lymphocyte absolute counts/ 10^9L [$]/10^9\text{L}$	W B C
0	10	1.8 ± 0.80	8.3 ± 0.56	11.6 ± 3.03
4h	5	$8.9 \pm 2.92^{(1)}$	$3.9 \pm 0.18^{(1)}$	9.2 ± 1.92
1	5	$17.4 \pm 1.51^{(1)}$	$0.85 \pm 0.06^{(1)}$	$4.2 \pm 1.38^{(1)}$
3	5	$8.4 \pm 3.20^{(1)}$	$0.42 \pm 0.05^{(1)}$	$2.5 \pm 0.98^{(1)}$
7	5	$7.1 \pm 1.69^{(1)}$	$0.32 \pm 0.04^{(1)}$	$1.5 \pm 0.66^{(1)}$
14	5	$5.0 \pm 2.40^{(1)}$	$0.35 \pm 0.07^{(1)}$	$1.3 \pm 0.25^{(1)}$
28	5	$4.2 \pm 1.39^{(1)}$	$2.21 \pm 0.32^{(1)}$	8.9 ± 0.66

⁽¹⁾ $p < 0.01$

2.1.2 不同剂量 γ 射线照射后 8、24h 小鼠脾脏淋巴细胞凋亡率 从表 2 可见, 2Gy 照射后 8h 脾脏淋巴细胞凋亡率即升高至对照值的 3.7 倍, 且随照射剂量的增大而增加, 至 8Gy 达到峰值, 相当于对照值的 8.3 倍。随着照射后时间的延长, 各剂量组淋巴细胞凋亡率也明显增加, 如 2、4、6 和 8Gy 照射 24h, 其凋亡率分别为 8h 的 1.1、1.5、1.6 和 1.3 倍, 呈现出较好的时效关系。

此外还可看出,在照射后 24h,随着照射剂量的增大,外周血淋巴细胞绝对数迅速下降,如 2、4、6、8Gy 照射后 24h,淋巴细胞绝对数分别为对照值的 28%、15%、11%和 5%,与脾脏淋巴细胞凋亡率的升高呈现出相反的变化趋势。

Tab-2 Apoptotic percentages of mouse spleen lymphocyte at 8h and 24h after various doses γ -irradiation ($\bar{x} \pm s$)

Doses /Gy	n	Apoptotic percentages/Lymphocyte absolute counts/ 10^9 L		
		8h	24h	24h
0	10	1.8 \pm 0.69	1.8 \pm 0.80	8.2 \pm 0.56
2	5	6.7 \pm 1.21 ⁽¹⁾	7.7 \pm 2.74 ⁽¹⁾	2.3 \pm 0.48 ⁽¹⁾
4	5	9.7 \pm 2.64 ⁽¹⁾	14.7 \pm 2.40 ⁽¹⁾	1.2 \pm 0.24 ⁽¹⁾
6	5	11.2 \pm 1.72 ⁽¹⁾	17.4 \pm 1.51 ⁽¹⁾	0.9 \pm 0.16 ⁽¹⁾
8	5	14.9 \pm 4.08 ⁽¹⁾	18.7 \pm 3.39 ⁽¹⁾	0.4 \pm 0.09 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$

2.2 γ 射线整体照射后小鼠脾淋巴细胞凋亡的依据

2.2.1 淋巴细胞凋亡的超微结构特征 6Gy γ 射线照后 4~8h,小鼠脾脏淋巴细胞即出现明显变化(此种变化最早可出现在照后 2h)。首先在脾脏白髓区,淋巴细胞核肿胀,体积增大,出现大量散在的浓染细胞团(细胞核嗜碱性增强)。电镜下(图 1)可见这些浓染的细胞团呈现典型的凋亡特征。早期表现为核染色质浓缩、边集;中期染色质聚集在核膜下形成半月形、环状、块状和其它不规则形状;后期形成多个凋亡小体,并可见较多的淋巴细胞碎片。3d 后,淋巴细胞数量极度减少,脾脏组织严重受损,7~14d,淋巴细胞开始增加,脾脏组织出现再生修复。首先在脾脏白髓,尔后在红髓区淋巴细胞体积增大,染色质丰富,可见分裂相。淋巴细胞明显增多,排列趋于整齐。照后第 28d,沿脾脏被膜和脾索下出现以红系和红系+巨核系为主的各类新生的造血细胞灶,脾脏组织开始恢复。然而值得提出的是,直至照射后 28d,仍可见凋亡细胞散在分布,脾脏组织及淋巴细胞数量均远未恢复到正常水平。

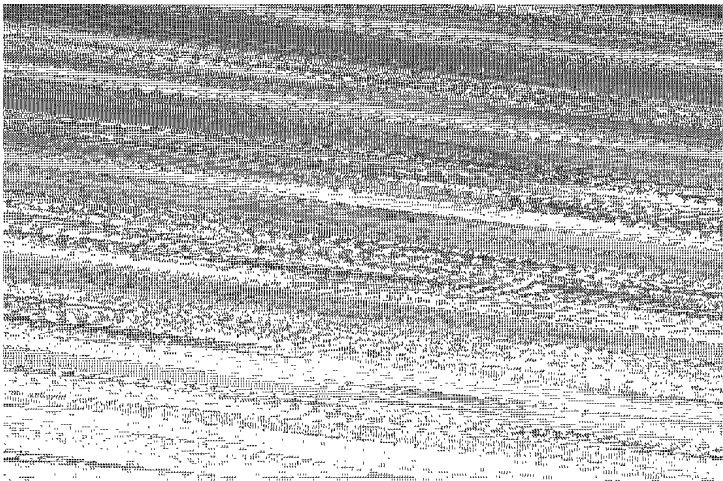


Fig-1 Ultrastructure of lymphocyte apoptosis in mouse spleen 4h after 6 Gy γ -irradiation. 1. Normal spleen lymphocyte ($\times 17000$); 2. Apoptotic lymphocyte in middle stage: crescent chromatin ($\times 22000$); 3. Apoptotic lymphocyte in middle stage: clumping chromatin ($\times 13000$); 4. Apoptotic lymphocyte in late stage: Apoptotic bodies ($\times 10000$)

2.2.2 小鼠脾脏淋巴细胞凋亡的原位末端标记检测 为进一步证实照射后淋巴细胞凋亡率的变化,用目前常用的原位末端标记法(ISTL)进行检测,结果表明(见表 3):6Gy 照射后 4h 淋巴细胞凋亡率迅速增加,相当于对照值的 3.4 倍,与 MGG 染色检测的结果基本接近。

Tab.3 Apoptotic percentages of mouse spleen lymphocyte 4h after 6 Gy γ -irradiation

After irradiation/h	MGG/%	ISTL positive cells/%
0	1.8 \pm 0.80	2.7 \pm 0.56
4	8.9 \pm 2.92 ⁽²⁾	9.3 \pm 1.53 ⁽¹⁾

($\bar{x}\pm s$) $n=3$ ⁽¹⁾ $p<0.01$; ⁽²⁾ $p<0.05$

2.2.3 DNA 凝胶电泳分析 DNA 电泳分析结果表明,6Gy 照射后 4h 和 6h,小鼠脾脏淋巴细胞显示出典型的 DNA 梯形谱(见图 2)。

Tab.4 Expression of Bax and Bcl-2 proteins in mouse spleen lymphocyte at various times after 6Gy whole body γ -irradiation

After radiation/h	Bax positive cells/%	Bcl-2 positive cells/%
0	3.0 \pm 0.58	14 \pm 3.06
4	22 \pm 4.16 ⁽¹⁾	2 \pm 1.15 ⁽¹⁾
24	27 \pm 2.64 ⁽¹⁾	6 \pm 1.00 ⁽²⁾
72	32 \pm 1.53 ⁽¹⁾	5 \pm 0.58 ⁽¹⁾

$\bar{x}\pm s$ $n=3$ ⁽¹⁾ $p<0.01$; ⁽²⁾ $p<0.05$

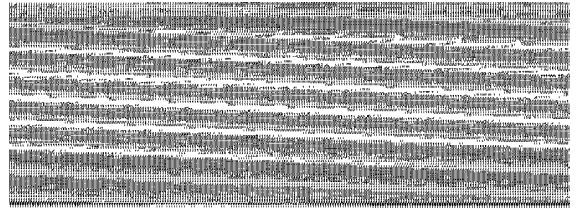


Fig.2 DNA ladders in mouse spleen lymphocytes at 4h and 6h after 6Gy γ -irradiation

Lane 1: 6h after 6Gy irradiation; Lane 2: 4h after 6Gy irradiation; Lane 3: normal control; Lane 4: DNA molecular marker

2.3 淋巴细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白检测

6Gy γ 射线全身照射后小鼠脾脏 Bax 蛋白阳性的淋巴细胞迅速增加,至照射后 24~72h 达到高峰,为对照值的 9~11 倍;而 Bcl-2 蛋白阳性的淋巴细胞明显降低,在照射后 4h 降至对照值的 14%(见表 4),此后 Bcl-2 蛋白表达则一直处于较低水平。

3 讨论

在急性放射病防治研究中,有关淋巴免疫系统的研究,特别是细胞凋亡在免疫组织辐射损伤与修复中究竟起什么作用,目前报道不多。本研究着重观察了整体照射条件下,小鼠脾脏组织病理变化特点和细胞凋亡在其中的作用,获得了一些新的认识。

对整体照射小鼠脾脏组织 4h~28d 的动态病理变化观察表明,辐射引起的脾脏组织损伤具有两个显著特点:(1)早期损伤严重,表现在低剂量照射后,即可引起组织明显损伤,淋巴细胞数量迅速减少;(2)后期恢复缓慢,如照射后 28d,虽然脾脏组织出现早期恢复,然而淋巴细胞数量远未恢复到正常水平。根据上述特点,本工作将其病理过程分为早期脾脏组织严重受损、淋巴细胞凋亡损伤期,后期淋巴细胞数量明显增加、脾脏组织早期恢复期。上述分期对于急性放射病的诊断治疗具有一定参考价值。

本结果表明,经不同剂量 γ 射线照射后,脾脏组织和外周血淋巴细胞数量迅速减少,如2Gy照射后24h外周血淋巴细胞下降至对照值的28%。与淋巴细胞绝对数降低成明显相反的趋势,2Gy照射后4h脾脏淋巴细胞凋亡率即出现明显升高,至照射后24h迅速升高到对照值的9.7倍。上述结果清楚表明,照射后一定时间内,细胞凋亡是淋巴细胞死亡的主要途径之一;也是辐射引起免疫功能下降的重要原因。

为了进一步探讨细胞凋亡是否参与脾脏组织辐射损伤与重建的全过程,本实验对整体照射后4h~28d淋巴细胞凋亡的观察结果显示,脾脏淋巴细胞凋亡经历了初始期、高峰期和下降期三个阶段,直至照后1个月仍未恢复到正常水平。作者将前两个阶段统称为淋巴细胞损伤死亡期(照后4h~3d)。此时期,淋巴细胞数量迅速减少,而淋巴细胞凋亡率急剧升高,并迅速达到峰值(照射后1d)。提示此时期凋亡在淋巴细胞损伤死亡中起着至关重要的作用;而在脾脏组织再生修复和早期恢复期(照射后7~28d),细胞凋亡率持续下降,淋巴细胞数量开始回升,很显然,凋亡率的减少有利于淋巴细胞的再生恢复。由此推测在照射后晚期,凋亡也参与了脾脏组织再生和恢复过程中淋巴细胞数量的调节。上述对整体照射后淋巴细胞凋亡动态变化的观察结果显示,细胞凋亡在淋巴细胞辐射损伤的全过程中均起着重要作用,这一结果为以后从细胞凋亡角度,减轻或改善辐射引起的免疫功能降低提供了新的启示。

已经证实,细胞凋亡是由基因介导的一种细胞‘主动自杀’的死亡方式。在研究细胞凋亡的基因调控时发现,Bcl-2基因及其蛋白能够抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡,因而被称之为细胞凋亡抑制基因^[5]。最近Oltvai等研究Bcl-2基因家族时发现并分离出一个分子量约为21KD的Bcl-2蛋白,命名为Bax蛋白。进一步研究证实,当Bax在细胞内过度表达时,可形成Bax-Bax同源二聚体,此时与p53基因产物一样,Bax是促进细胞凋亡的^[6]。本研究证实,在照射后早期,即淋巴细胞凋亡期,淋巴细胞Bax蛋白表达明显增加,而Bcl-2蛋白表达持续下降;表明两者在淋巴细胞凋亡的调控中均起着重要作用。

本实验证实,细胞凋亡是辐射损伤早期淋巴细胞减少的主要原因之一,且与照射剂量和照射后时间密切相关,如照射后8h在2~6Gy照射剂量范围内显示出较好的剂量效应关系。对整体照射后4h~28d淋巴细胞凋亡的观察结果显示:细胞凋亡参与了脾脏辐射损伤与修复的全过程,而凋亡相关基因Bax和Bcl-2参与了细胞凋亡的调控过程。为以后从细胞凋亡角度改善辐射引起的免疫功能降低提供了重要实验依据。

参 考 文 献

- 1 Harrington N P, Chambers K A, Ross W M *et al.* Clin Exp Immunol, 1997, **107**:417~424
- 2 Cui Y F, Zhou P K, Lord B I *et al.* Chinese Science Bulletin, 1997, **42**(2):155~158
- 3 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. J Cell Biol, 1992, **119**(3):493~501
- 4 Arends M J, Morris R J, Wyllie A H. Am J Pathol, 1990, **136**:593~608
- 5 Cui Y F, Yan P, Wang D W. Foreign Medical Sciences Section of Pathophysiology and Clinical Medicine, 1997, **17**(2):157~160
- 6 Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer *et al.* Cell, 1993, **74**:609~612

ROLE OF APOPTOSIS IN RADIATION-INDUCED MOUSE SPLEEN DAMAGE AND REPAIR AND ITS MECHANISM

CUI Yufang YANG Hong GAO Yabing XIONG Chengqi XIA Guowei GAO Linlu
WANG Dewen

(*Institute of Radiation Medicine, AMMS, Beijing 100850*)

ABSTRACT To investigate the role of apoptosis in radiation-induced damage and repair of mouse spleen and provide the basis for expounding the corresponding mechanism as well as for the prevention and treatment of acute radiation. Using in situ terminal labeling (ISTL), DNA electrophoresis and immunohistochemical techniques, we studied the dynamic changes of apoptosis of mouse spleen lymphocytes and the expression of bax and bcl-2 gene products after 2, 4, 6 and 8 Gy whole body γ -irradiation. Results (1) At the early stage after irradiation the percentages of lymphocyte apoptosis increased rapidly, for instance, 4h and day 1 after 6 Gy γ -irradiation the apoptotic lymphocyte were 4.9 and 9.7 times those of control values; At the same time, with the increase of radiation doses the percentages of lymphocyte apoptosis increased rapidly, for instance, 8h after 2, 4, 6 and 8 Gy γ -irradiation the apoptotic lymphocyte were 3.7, 5.4, 6.2 and 8.3 times those of control values respectively. (2) After 6 Gy γ -irradiation typical morphological characteristics of spleen apoptotic lymphocyte in early, middle and late stages were observed by transmission electron microscope. Using DNA gel electrophoresis technique the spleen lymphocytes displayed characteristic DNA ladders 4 and 6 h after 6 Gy γ -irradiation. The percentage of lymphocyte apoptosis measured by ISTL was 3.4 times higher than that of control value 4 h after 6 Gy γ -irradiation. (3) Abnormal expression of bcl-2 and bax gene products in irradiated lymphocytes confirmed that they played a vital role in the apoptosis of mouse spleen lymphocytes. Conclusion Apoptosis played an important role in the whole process of radiation-induced damage and repair of mouse spleen lymphocyte and Bcl-2 and Bax proteins could regulate the process of lymphocyte apoptosis.

KEYWORDS Lymphocyte apoptosis, Irradiation, Bax and Bcl-2 proteins, Mouse spleen