

# 电离辐射对小鼠小肠和结肠细胞凋亡的影响

丁桂荣 郭国祯 田芙蓉 王 晋 张李燕 郭 鹤

(第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

**摘要** 观察不同剂量  $\gamma$  射线照射对小鼠小肠和结肠细胞凋亡水平的影响。 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线全身照射 BALB/c 小鼠, 剂量分别为 1、6、12Gy, 于照射后 24h 内分批取材, 常规石蜡包埋, HE 染色, Olympus 显微镜下观察辐射诱导小肠和结肠细胞凋亡的情况。结果表明: 正常小鼠小肠细胞有自发的凋亡现象, 平均每个隐窝的凋亡细胞数为  $0.038 \pm 0.059$  个, 结肠在正常情况下没有细胞凋亡发生; 不同剂量  $\gamma$  射线照射后小肠隐窝细胞凋亡数目明显增加 ( $p < 0.05$ ), 其中 1Gy 照射组凋亡峰在照射后 12h 明显, 6Gy 和 12Gy 组分别在照射后 24h 和 6h 凋亡细胞最多。结肠未见或偶见凋亡细胞; 各照射剂量组及照射后不同时间 (照射后 6、12、24h) 组小肠隐窝细胞凋亡数较相应结肠组显著增加 ( $p < 0.05$ )。说明在电离辐射的情况下, 小肠较结肠能更有效的清除辐射损伤的细胞, 而后者在体内的蓄积可能与以后的肿瘤发生有关。

**关键词** 辐射, 小肠, 结肠, 细胞凋亡, 小鼠

**中图分类号** R818.02

众所周知, 小肠和结肠在组织形态上有很大的相似性, 它们都具有粘膜层、粘膜下层、肌层和浆膜层。它们的干细胞都位于肠隐窝, 干细胞不断分裂增殖, 子代细胞沿隐窝向上移行, 同时分化成熟, 以补充不断脱落的成熟的上皮细胞。尽管如此, 小肠和结肠的肿瘤发生率却明显不同, 小肠的肿瘤发生率远低于结肠。凋亡是由基因控制、自主的、有序的死亡。以凋亡方式清除突变的或带有恶性转化倾向的细胞在机体维持内环境稳定、减少或避免肿瘤发生中具有重要意义。本实验观察小鼠受不同剂量  $\gamma$  射线照射后, 不同时间内小肠和结肠凋亡发生的情况, 并拟从细胞凋亡的角度就小肠和结肠肿瘤发生率不同的原因进行探讨。

## 1 材料与 方法

### 1.1 实验动物

健康 BALB/c 小鼠 (医动字第 08~013 号) 60 只, 雄性, 18~22g, 由第四军医大学实验动物研究中心 (医动字第 08~011 号) 提供。动物随机分为 0、1、6、12Gy 照射组, 每组 15 只动物。每照射组再随机分为 6、12、24h 观察组, 每观察组动物为 5 只。

### 1.2 放射源

$^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线, (第四军医大学钴源室)。吸收剂量率 1.75Gy/min, 总剂量分别为 1、6、12Gy。

收稿日期: 初稿 1999-03-03, 修回 1999-08-16

### 1.3 取材

受照射小鼠分别在照射后 6、12、24h 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 4% 多聚甲醛 PB(pH:7.4) 左心室灌注固定。取小肠、结肠于上述固定液中固定后, 按常规石蜡包埋、切片、HE 染色。

### 1.4 凋亡细胞分析

光镜下对各组小鼠小肠和结肠隐窝的凋亡细胞进行计数。观察隐窝的标准是: ①隐窝纵切, ②可见潘氏细胞(小肠), ③肠腔, ④沿隐窝一侧至少有 17 个细胞(12 Gy 组, 沿隐窝一侧至少 12 个细胞)。识别凋亡细胞的标准, 依据 Kerr 等<sup>[1]</sup>的报道。每个样本观察 20-25 个隐窝。统计方法用样本均数  $t$  检验,  $p < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 病理学检查

光镜下, 对照组小肠绒毛高, 上皮被覆完整, 隐窝细胞排列紧密。1、6、12Gy 照射后 24h 内小肠绒毛较对照组无明显变化, 但隐窝部位凋亡细胞增多, 且主要集中于隐窝中下部(见图 1), 12Gy 照射后 12h 和 24h 隐窝细胞数目减少, 细胞核体积增大。另外, 在 1Gy 照射组偶尔可见绒毛上皮有凋亡现象(见图 2)。实验中照射组小鼠结肠光镜下无明显变化。

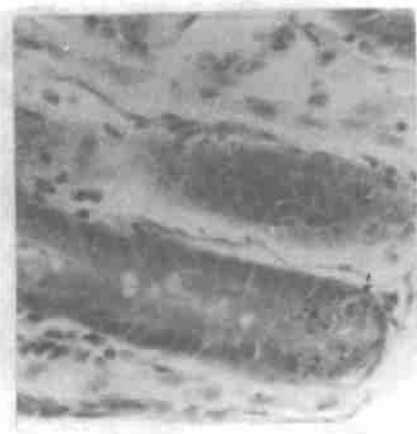


Fig.1 Apoptotic cells increased in crypt after 6Gy radiation ( $\times 400$ )

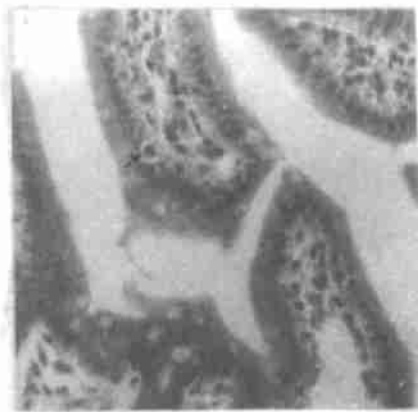


Fig.2 Numbers of crypt cells decreased after 12Gy radiation  
Apoptosis was found in villi epithium ( $\times 400$ )

### 2.2 不同剂量电离辐射对小鼠小肠和结肠隐窝细胞凋亡的影响

对照组小肠隐窝细胞有自发凋亡现象, 经 1、6、12Gy  $\gamma$  射线照射后, 隐窝细胞凋亡水平明显提高 ( $p < 0.05$ ), 且与照射剂量呈正相关(见表 1)。不同剂量  $\gamma$  射线照射, 小肠隐窝凋亡峰出现的时间并不一致, 1Gy 照射, 凋亡峰在照射后 12h 出现, 至照射后 24h 凋亡细胞数

明显减少 ( $p < 0.05$ ), 6Gy 照射后随照射后的时间延长凋亡细胞逐渐增多, 照射后 24h 组凋亡细胞数较照射后 6、12h 组明显增加 ( $p < 0.05$ ); 12Gy 照射组凋亡峰在照射后 6h 出现, 随后凋亡细胞数逐渐减少 (见表 2)。对照组结肠隐窝未见细胞凋亡现象, 电离辐射后偶尔可见个别凋亡细胞 (主要是出现在从隐窝底部算起第 5~10 个细胞位置, 见图 3), 与对照组相比无显著差异。各照射剂量组及照射后不同时间组 (1Gy 6h 组除外), 小肠隐窝细胞凋亡数明显多于结肠, ( $p < 0.05$ )。 (见表 1)。

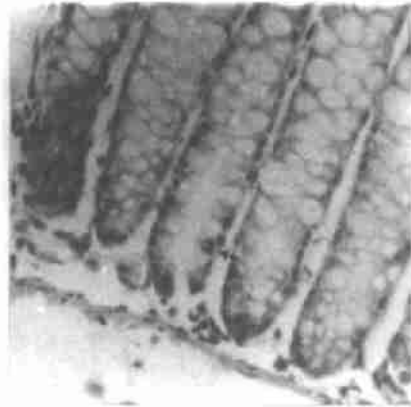


Fig.3 Apoptotic cells were occasionally found after radiation ( $\times 400$ )

Tab.1 Effects of different doses irradiation on apoptosis in crypts of small bowel and colon in mice (apoptotic cells/crypt)

Dose/Gy	Time after irradiation (small bowel)/h			Time after irradiation (colon)/h		
	6	12	24	6	12	24
Control	0.04±0.06	0.04±0.06	0.04±0.06	0±0	0±0	0±0
1	0.14±0.16	0.46±0.14 <sup>(2)</sup>	0.20±0.18	0±0	0±0 <sup>(3)</sup>	0.01±0.03 <sup>(1)</sup>
6	0.63±0.24 <sup>(2)</sup>	0.47±0.12 <sup>(2)</sup>	1.04±0.33 <sup>(2)</sup>	0±0 <sup>(3)</sup>	0.03±0.04 <sup>(3)</sup>	0±0 <sup>(3)</sup>
12	2.51±0.65 <sup>(2)</sup>	2.04±0.35 <sup>(2)</sup>	1.39±0.31 <sup>(3)</sup>	0.37±0.36 <sup>(3)</sup>	0.07±0.06 <sup>(3)</sup>	0.07±0.1 <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> $p < 0.05$ , <sup>(2)</sup> $p < 0.01$ , compared with control, <sup>(3)</sup> $p < 0.01$ , compared with small bowel

Tab.2 Changes of apoptosis in crypts of small bowel in mice at different time after irradiation (apoptotic cells/crypt)

Time after irradiation/h	Irradiation dose/Gy		
	1	6	12
6	0.143±0.160	0.632±0.236	2.509±0.645
12	0.463±0.140 <sup>(1)</sup>	0.466±0.117	2.035±0.350
24	0.199±0.179 <sup>(2)</sup>	1.039±0.328 <sup>(3)</sup>	1.386±0.306 <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> $p < 0.01$ , compared with 6h group, <sup>(2)</sup> $p < 0.05$ , compared with 12h group,

<sup>(3)</sup> $p < 0.05$ , compared with 6h group

### 3 讨论

凋亡是机体为维持内环境稳定, 由基因控制的自主有序的死亡<sup>[2]</sup>。目前, 检测凋亡细胞的方法很多, 但迄今为止凋亡的形态学观察被认为是识别凋亡细胞的金指标。Kerr 等<sup>[1]</sup>认为, 用形态学的标准判别凋亡细胞较末端标记技术更为可靠。小肠和结肠具有相似的组织结

构,而肿瘤发生率却不同,它们的干细胞都位于隐窝部位,且隐窝部位对射线又非常敏感,故我们选择此处进行观察。

辐射可诱导小肠隐窝细胞凋亡,已是公认的事实。但是关于凋亡细胞与射线之间的量效和时效关系目前还没有一致的结论。我们的研究表明,小肠隐窝细胞的凋亡水平与照射剂量有密切关系,在本实验中随照射剂量的增大凋亡细胞的数量明显增多。1、6、12Gy照射,凋亡细胞出现最多的时间分别是照射后12、24、6h。动物受照射后,不同组织器官凋亡细胞出现最多的时间不尽相同,并且受照射剂量甚至昼夜节律的影响,但多在照射后6h和12h达到高峰。本研究凋亡细胞出现最多的时间和动物受照射剂量之间的内在联系尚须进一步探讨。另外,辐射后小肠细胞的凋亡并不仅限于隐窝部位,绒毛上皮的细胞也有凋亡发生,尽管绒毛上皮较隐窝细胞的辐射敏感性低。

在不同剂量照射后的小鼠结肠隐窝未发现凋亡细胞的明显增加,考虑有以下两方面原因,第一:结肠隐窝细胞对射线不如小肠隐窝细胞敏感,损伤较轻;第二:隐窝细胞受到损伤,但是由于某种原因(例如:bcl-2基因的表达<sup>[3]</sup>)阻止了凋亡的发生,而使受损细胞在体内存活下来。尽管总体而言,结肠较小肠的敏感性低,但就隐窝的干细胞而言,对辐射是非常敏感的; Merritt<sup>[3]</sup>等的研究发现,在小鼠结肠隐窝底部有Bcl-2基因的表达,而在小肠隐窝Bcl-2基因的表达是缺失的。bcl-2是凋亡的抑制基因,它的作用是阻止或抑制凋亡的发生。辐射后小鼠结肠细胞很少发生凋亡,可能与Bcl-2基因的表达有关。

实验结果还表明小肠隐窝细胞凋亡的位置恰好包括了干细胞的位置(第4~5个细胞位置<sup>[4]</sup>),而结肠隐窝偶尔发生的凋亡也不位于干细胞位置(第1~2个细胞位置<sup>[4]</sup>)。综上所述,小肠隐窝的细胞凋亡与照射剂量之间有一定的量效关系,即照射剂量越大,细胞凋亡数越多;凋亡峰出现的时间随照射剂量不同而异;照射后小肠隐窝的凋亡细胞数较结肠隐窝明显增加,其原因可能与两者凋亡基因的表达不同有关。我们推断:小肠较结肠能更有效的清除辐射损伤的干细胞,而后者在体内的蓄积,可能与以后的肿瘤发生有关。

### 参 考 文 献

- 1 Kerr J F, Gobe G C, Winterford C M, *et al.* *Meth Cell Biol*, 1995, 46:1~27
- 2 Cheng J. *Apoptosis and Diseases*. Beijing, Beijing and Xiehe Medical University (in Chinese), 1997
- 3 Merritt A J, Potten C S, Watson A J, *et al.* *J Cell Sci*, 1995, 108(Pt6):2261~2271
- 4 Potten C S, Li Y Q, O'Connor J, *et al.* *Carcinogenesis*, 1992, 13(12):2305~2312

## EFFECT OF RADIATION ON APOPTOSIS IN SMALL INTESTINE AND COLON OF MICE

DING Guirong GUO Guozhen TIAN Furong WANG Jin ZHANG Liyan GUO Yao

*(Dept. of Radiation Medicine, the Fourth Military Medical University Xi'an 710032)*

**ABSTRACT** To discuss the changes of apoptosis level in small bowel and colon of mice after  $\gamma$ -ray irradiation. The mice were irradiated with different doses (1, 6, 12Gy). The incidence of apoptosis in small bowel and colon were observed at different time (6, 12, 24h) after irradiation using morphological method. The results indicate that there were apoptosis in small bowel of normal mice, the number of apoptotic cell was  $0.038 \pm 0.059$  per whole crypt. No apoptosis was observed in colon of normal mice and irradiated mice; The incidence of apoptosis significantly increased in small bowel after different doses of irradiation ( $p < 0.05$ ). The apoptosis peak appeared at 12, 24, 6h after 1, 6, 12Gy irradiation; The incidence of apoptosis was higher in small bowel than that of colon after different doses of irradiation and at different time after irradiation. From the results we propose that the radiation-damaged cells might be more effectively removed in small bowel than in colon after irradiation. Radiation-damaged cells may tend to remain in colon and related to later tumorigenesis.

**KEYWORDS** Radiation, Small bowel, Colon, Apoptosis, Mice

**CLC** R818.02