

耐辐射球菌 PprI 蛋白对急性放射损伤小鼠 防护作用的初步研究

陈洁¹ 张永芹² 毕洁静¹ 杨占山¹

¹ (苏州大学放射医学与防护学院放射毒理教研室 苏州 215123)

² (张家港市第一人民医院 肿瘤科 张家港 215000)

摘要 研究耐辐射球菌 PprI 蛋白对哺乳动物急性放射损伤的防护作用, 初步探讨其作为一种新的抗辐射蛋白的作用机制。将 PprI 蛋白或生理盐水注射入小鼠肌肉内, 观察辐照后第 1、7、14、28 天小鼠外周血象以及小鼠骨髓、胸腺和脾脏淋巴细胞的凋亡情况。研究结果表明: 与生理盐水注射组相比, PprI 蛋白注射组外周血白细胞计数于照后第 28 天显著增高 ($p < 0.05$); 外周血小板数和淋巴细胞百分率于照后第 1、7 天显著增高 ($p < 0.05$); PprI 蛋白注射组脾脏淋巴细胞凋亡率在照后第 1、7、14 天明显降低 ($p < 0.05$); 胸腺淋巴细胞凋亡率于照后第 14 和 28 天明显降低 ($p < 0.05$); 骨髓细胞凋亡率在照后第 1、14 和 28 天明显降低 ($p < 0.05$); 并且骨髓细胞凋亡率于照后第 28 天基本恢复正常。上述结果初步表明, 耐辐射球菌 PprI 蛋白对哺乳动物急性放射损伤有着明显的防护作用。

关键词 耐辐射球菌, PprI 蛋白, 放射损伤, 防护

中图分类号 R811.5, R818.74, R818.059

耐辐射球菌是迄今为止地球上发现的辐射抗性最强的生物之一^[1,2]。该菌对电离辐射、紫外线、干燥、氧化剂等因素引起的致死和突变性 DNA 损伤具有极端抗性^[3,4], 它最显著的特点是能耐受超过 15 kGy γ 射线照射^[5], 比大肠杆菌的抗辐射能力高出 100 多倍^[6]。研究表明, 耐辐射球菌的超强抗辐射作用的机制主要体现在 3 个方面: ①DNA 损伤的高效修复; ②对活性氧自由基的有效清除; ③特殊的物质结构和生存方式。在耐辐射球菌的 DNA 损伤修复机制中, 多种修复蛋白对其特异的辐射抗性具有重要的作用。pprI 是耐辐射球菌中的特有基因, 它被认为是耐辐射球菌 DNA 修复与保护途径的总开关^[7]。该基因的表达产物 PprI 蛋白是一种促进 DNA 修复的多效蛋白的诱导物^[8,9], 被期望用于临床辐射防护及放射治疗。目前围绕此基因的功能机制研究是一大热点。

本实验室李娜等^[10]首次研究证实, 哺乳动物活体导入 pprI 基因后, 该基因对中性辐射损伤具有明显的表达和抗辐射损伤作用。本实验室陈婷婷等^[11]应用基因活体电转染技术, 研究证实了 pprI 基因对哺乳动物急性辐射损伤具有显著的防治作用。张永

芹等^[12]已成功构建了含 pprI 基因的 pET-28a-His-pprI 原核表达载体, 在大肠杆菌中高效表达, 获得较高纯度的 PprI 融合蛋白, 以下简称为 PprI 蛋白。然而关于此蛋白对哺乳动物急性放射损伤的防治作用, 目前尚未见文献报道, 本项目研究旨在探讨耐辐射球菌 PprI 蛋白对哺乳动物急性放射损伤的防护作用。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

PprI 蛋白由本实验室张永芹通过原核表达纯化获得^[12]; 凋亡试剂盒购自 Invitrogen 公司; Cytomics FC500 型流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物及分组 采用清洁级雄性 ICR 小鼠 36 只, 6–8 周年龄, 体重(18±2) g, 由苏州大学医学部实验动物中心提供, 经一周左右适应期饲养, 将小鼠随机分为对照组和照射组, 其中对照组 4 只, 未实施照射; 照射组分为 PprI 蛋白注射组和生理盐

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072236)、国防基础科研项目 (A3820060138)、江苏省高校优势学科建设工程资助

第一作者: 陈洁, 女, 1985 年 9 月出生, 2009 年毕业于山东省济宁医学院, 现为苏州大学放射医学专业硕士研究生

通讯作者: 杨占山, Email: fd@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-12-07, 修回 2012-02-27

水注射组各 16 只。采用苏州大学 ^{60}Co γ 射线源照射，剂量率为 0.57 Gy/min，吸收剂量为 4 Gy，照后小鼠置于无菌室喂养。实验组分别于照后第 1、7、14 和 28 天每组各处死 4 只小鼠取样检测。

1.2.2 蛋白注射 根据初期对小鼠急性辐射损伤防护的注射方式及蛋白剂量的探索结果，各组分别于 γ 射线照射前 1 天，照射当天和照射后 3 天给予 PprI 蛋白或生理盐水肌肉注射 0.1 mL，PprI 蛋白剂量为 100 μg /kg。

1.2.3 小鼠外周血象的观察 小鼠眼球取血，EDTA 抗凝，经血液细胞分析仪（深圳迈瑞公司 BC3000PLUS）测定白细胞、红细胞和血小板总数。同时制备血涂片，用瑞氏染液染色，镜下进行淋巴细胞分类计数。

1.2.4 骨髓细胞、脾脏和胸腺淋巴细胞凋亡检测 小鼠处死，取脾和胸腺，置于 2 mL PBS 中，用梳刮法制备淋巴细胞单细胞悬液。取股骨，用 1 mL PBS 冲洗骨髓腔，制备骨髓细胞单细胞悬液。将单细胞悬液离心后，再用 PBS 洗一次，离心后弃去上清，加入 3 mL Tris- NH_4Cl (pH7.2) 混匀，静置 5 min，以破除红细胞，再加入 PBS 至 10 mL 中止破红，离心后加入 AnnexinV-binding buffer 调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液，加入 5 μL AnnexinV 和 1 μL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI，室温孵育 15 min，再加入 400 μL AnnexinV-binding buffer，冰上混匀后立即用流式细胞仪（美国 Beckman 公司）进行凋亡检测，结果以细胞凋亡率（%）表示。

1.2.5 统计学处理 结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SAS8.0 统计软件包对实验数据进行方差分析，对各组实验数据之间进行 SNK 检验。 $p<0.05$

为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠外周血象的变化

2.1.1 外周血白细胞的变化 不同处理组小鼠照后不同时间外周血白细胞的变化列于表 1。

由表 1 可见，与对照组比较，照后第 1、7、14 天，PprI 蛋白注射组和生理盐水注射组白细胞计数均出现明显降低 ($p<0.05$)，并于照后第 1 天降至最低值，7 天开始恢复，至第 28 天基本恢复正常；与生理盐水注射组比较，PprI 蛋白注射组白细胞计数增高，但第 1、7、14 天未见有统计学意义的差异，第 28 天有显著统计学差异 ($p<0.05$)。

2.1.2 外周血红细胞的变化 不同处理组小鼠照后不同时间外周血红细胞的变化列于表 2。

由表 2 可见，照后第 1 天，PprI 蛋白注射组红细胞总数较对照组明显升高，第 14 天和第 28 天 PprI 蛋白注射组及生理盐水注射组与对照组相比明显升高，具有显著统计学差异 ($p<0.05$)。蛋白注射组与生理盐水注射组相比，无明显的统计学差异 ($p>0.05$)。

2.1.3 外周血小板数的变化 不同处理组小鼠照后不同时间外周血小板数的变化列于表 3。

由表 3 可见，与对照组相比，照后第 1 天，PprI 蛋白注射组及生理盐水注射组血小板绝对数未出现明显变化，照后第 7 天迅速降至最低，14 天各组均恢复正常；PprI 蛋白注射组血小板明显高于生理盐水注射组，尤其在第 1 天和第 7 天，具有显著性统计学意义 ($p<0.05$)。

Table 1 The changes of peripheral blood leukocytes of mice at different time after irradiation ($\bar{x}\pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group / 10^9 L^{-1}	4	7.25 $\pm$ 2.98	—	—	—
Physiological saline injection group / 10^9 L^{-1}	4	1.50 $\pm$ 0.26 ^a	1.73 $\pm$ 0.41 ^a	2.80 $\pm$ 0.41 ^a	4.85 $\pm$ 0.30 ^a
PprI protein injection group / 10^9 L^{-1}	4	1.50 $\pm$ 0.54 ^a	2.58 $\pm$ 0.15 ^a	3.35 $\pm$ 0.26 ^a	6.73 $\pm$ 0.66 ^b

Note: ^a, compared to the control group, $p<0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p<0.05$.

Table 2 The changes of peripheral blood erythrocytes of mice at different time after irradiation ($\bar{x}\pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group/ 10^{12} L^{-1}	4	6.83 $\pm$ 0.34	—	—	—
Physiological saline injection group/ 10^{12} L^{-1}	4	7.38 $\pm$ 0.34	7.35 $\pm$ 0.37	8.25 $\pm$ 0.19 ^a	8.05 $\pm$ 0.21 ^a
PprI protein injection group / 10^{12} L^{-1}	4	7.58 $\pm$ 0.29 ^a	7.23 $\pm$ 0.26	7.38 $\pm$ 0.83 ^a	8.58 $\pm$ 0.56 ^a

Note: ^a, compared to the control group, $p<0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p<0.05$.

Table 3 The changes of peripheral blood platelets of mice at different time after irradiation($\bar{x} \pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group/ 10^9 L^{-1}	4	962.00±96.57	—	—	—
Physiological saline injection group/ 10^9 L^{-1}	4	917.00±25.36	289.00±78.36 a	848.00±200.06	976.50±101.54
PprI protein injection group / 10^9 L^{-1}	4	1076.50±67.3	482.75±70.41ab	795.50±74.70	1008.67±177.25

Note: ^a, compared to the control group, $p < 0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p < 0.05$.

2.1.4 外周血淋巴细胞百分率的变化 不同处理组小鼠照后不同时间外周血淋巴细胞百分率的变化列于表4。

由表4可见, 照后第1天, PprI蛋白注射组及生理盐水注射组淋巴细胞百分率均出现明显降低, 并均于照后第7天开始恢复, 但一直保持在一个相对较低的水平, 与对照组比较有显著性统计学差异 ($p < 0.05$)。第1天和第7天PprI蛋白注射组淋巴细胞百分率显著高于生理盐水注射组 ($p < 0.05$)。

2.2 γ 射线照射后不同时间脾脏、骨髓和胸腺细胞凋亡率的变化

2.2.1 脾细胞凋亡率的变化 不同处理组小鼠照后不同时间脾脏细胞的凋亡率列于表5。

由表5可见, 照后第1、7、14和28天, PprI蛋白注射组及生理盐水注射组脾脏细胞凋亡率升

高, 与对照组相比具有明显的统计学差异 ($p < 0.05$); PprI蛋白注射组及生理盐水注射组相比, PprI蛋白注射组凋亡率明显降低, 始终维持在一个较低的水平, 尤其是第1天、第7天和第14天, 脾细胞凋亡率具有明显的统计学差异 ($p < 0.05$)。

2.2.2 胸腺细胞凋亡率的变化 不同处理组小鼠照后胸腺细胞凋亡率的变化列于表6。

由表6可见, 照后第1天, PprI蛋白注射组及生理盐水注射组胸腺细胞凋亡率开始升高, PprI蛋白注射组第7天升至最高, 以后开始恢复, 生理盐水注射组第14天升至最高, 以后开始恢复。与生理盐水注射组相比, PprI蛋白注射组胸腺细胞凋亡率第14天和第28天明显降低, 具有显著性统计学差异 ($p < 0.05$)。

2.2.3 骨髓细胞凋亡率的变化 不同处理组小鼠照后骨髓细胞凋亡率的变化列于表7。

Table 4 The changes of lymphocyte percentages of mice at different time after irradiation($\bar{x} \pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group/%	4	87.50±12.52	—	—	—
Physiological saline injection group/%	4	19.50±2.92 ^a	40.25±1.26 ^a	73.00±3.83 ^a	73.25±1.50 ^a
PprI protein injection group/%	4	41.00±4.16 ^{ab}	47.25±3.10 ^{ab}	74.25±3.40 ^a	73.25±3.77 ^a

Note: ^a, compared to the control group, $p < 0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p < 0.05$.

Table 5 The apoptosis of spleen cells of mice at different time after irradiation($\bar{x} \pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group / %	4	2.90±0.99	—	—	—
Physiological saline injection group / %	4	20.86±5.43 ^a	30.25±6.99 ^a	39.65±4.84 ^a	20.83±0.42 ^a
PprI protein injection group / %	4	13.43±0.40 ^{ab}	17.16±1.80 ^{ab}	24.85±4.01 ^{ab}	19.40±3.89 ^a

Note: ^a, compared to the control group, $p < 0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p < 0.05$.

Table 6 The apoptosis of thymus cells of mice at different time after irradiation($\bar{x} \pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group / %	4	3.62±0.47	—	—	—
Physiological saline injection group / %	4	9.07±3.38 ^a	13.25±2.77 ^a	16.31±1.33 ^a	13.20±0.98 ^a
PprI protein injection group / %	4	7.70±1.09 ^a	10.78±3.03 ^a	8.86±1.80 ^{ab}	6.21±0.93 ^{ab}

Note: ^a, compared to the control group, $p < 0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p < 0.05$.

Table 7 The apoptosis of bone marrow cells of mice at different time after irradiation

($\bar{x} \pm s$)

	Sample number	Time after irradiation / d			
		1	7	14	28
Control group / %	4	4.77 ± 1.13	—	—	—
Physiological saline injection group / %	4	15.65 ± 1.25 ^a	23.93 ± 3.41 ^a	32.79 ± 5.64 ^a	21.86 ± 10.50 ^a
PprI protein injection group / %	4	10.70 ± 2.53 ^{a b}	19.91 ± 5.16 ^a	18.74 ± 4.00 ^{a b}	5.31 ± 1.36 ^b

Note: ^a, compared to the control group, $p < 0.05$; ^b, compared to the physiological saline injection group, $p < 0.05$.

由表 7 可见, 照后第 1、7、14 天, PprI 蛋白注射组及生理盐水注射组骨髓细胞凋亡率明显升高, 与对照组相比具有显著性统计学差异 ($p < 0.05$), 照后第 7 天, PprI 蛋白注射组骨髓细胞凋亡率达到最大值, 以后开始下降, 至第 28 天基本恢复正常; 与生理盐水注射组相比, PprI 蛋白注射组于第 1、14、28 天骨髓细胞凋亡率明显降低, 具有显著性统计学差异 ($p < 0.05$)。

3 讨论

融合蛋白技术是一种很有发展潜力的生物工程技术, 在肿瘤治疗研究中^[13], 很多制品已进入了临床试验, 并取得了很大的进展。目前, 有关动物细胞因子的研究也得到了迅猛发展, 一些重组细胞因子已在动物疾病的预防、治疗和诊断, 特别是在发展安全、高效基因工程疫苗等方面显示出广阔的应用前景^[14]。pprI 基因作为耐辐射球菌抗辐射损伤修复中的重要开关, 其原核表达融合蛋白的合成无疑为其抗辐射损伤修复机制的研究提供了有力的支持。PprI 蛋白由 DR-0167 编码, 能刺激辐射后的 recA 基因转录增加^[7,8,15], 通过调节 recA、pprA 等基因的表达而加速对电离辐射引起的 DNA 损伤修复^[7]。

γ 射线是一种低 LET 辐射, 可诱发生物体 DNA 损伤和修复、染色体畸变、细胞周期阻滞、细胞凋亡及相对生物学效应等一系列变化。本科室李娜^[10]和陈婷婷^[11]通过活体基因电转导方法将 pprI 基因转入小鼠体内, 分别在中子照射和低 LET γ 射线辐射下研究证实, pprI 基因可以发挥明显的抗辐射损伤作用。本实验在以上研究的基础上, 应用此 PprI 融合蛋白作为研究药物, 探讨其作为辐射防护剂对动物的抗辐射损伤的影响。

通过对小鼠外周血象的观察, 发现 γ 射线照射后白细胞、红细胞、血小板数及淋巴细胞比例显著下降, 说明该射线对小鼠的造血系统有一定的损伤。然而 PprI 蛋白注射组的细胞水平显著高于生理盐水注射组, 可见 PprI 蛋白对急性辐射所致的小鼠造血系统损伤有一定的防护作用。通过对脾脏、胸腺、

骨髓细胞凋亡率的观察, 发现 γ 射线照射后可引起这三种器官细胞凋亡, 由此推测 γ 射线通过引起脾脏、胸腺和骨髓细胞的凋亡来影响免疫及造血系统, 然而 PprI 蛋白注射组的细胞凋亡水平明显低于生理盐水注射组, 可见 PprI 蛋白对急性辐射所致的小鼠脾脏、胸腺、骨髓细胞凋亡有较明显的防护作用。综上可知, PprI 蛋白有望作为一种原核生物蛋白辐射防护剂用于放射损伤的防护。

参考文献

- Battista J R, Era L A M, Park M J. Why is Deinococcus radiodurans so resistant to ionizing radiation[J]? Trends microbiol, 1999, 7: 362-365
- Minton K W. DNA repair in the extremeLy radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans[J]. MOL Microbiol, 1994, 13: 9-15
- COX M M, Battista J R. Deinococcus radiodurans-the consummate survivor[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3: 882-892
- BLasius M, Sommer S, HÜbscher U. Deinococcus radiodurans: What belongs to the survival kit[J]? Crit Rev Biochem Mol Biol, 2008, 43: 221-238
- Lange C C, Wackett L P, Minton K W, et al. Engineering a recombinant Deinococcus radiodurans for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environment[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(10): 929-933
- Xu W L, Shen J Y, Dumn C A, et al. The Nudix hydroLases of Deinococcus radurans[J]. Molecular Microbiology. 2001, 39(2): 286-290
- Gao G, Tian B, Liu L, et al. Expression of deinococcus radiodurans PprI enhances the radioresistance of Escherichia coli[J]. DNA Repair(Amst), 2003, 2(12): 1419-1427
- Hua Y J, Issay Narumi, Gao G J, et al. pprI: a generaL switch responsibLe extreme radioresistance of Deinococcus radiodurans[J]. Biophy Res Commun, 2003, 306: 354-360
- Sheng D H, Liu R, Xu Z J, et al. Dual negative

- regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiations resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans*[J]. DNA repair, 2005, **4**(6): 671-678
- 10 杨占山, 李娜, 王天昶. 一种含有原核基因 *pprI* 的真核重组质粒及其用途. 国家发明专利, 专利号: ZL 2009 1 0003512.2, 2011.4.6
YANG Zhanshan, LI Na, WANG Tianchang. A eukaryotic restructuring plasmid containing pronucleus gene *pprI* and its application. Chinese invention patent: ZL 2009 1 0003512.2, 2011. 4. 6
 - 11 陈婷婷, 连利霞, 牟英, 等. 耐辐射球菌 *pprI* 基因活体电转染救治小鼠急性辐射损伤的实验研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2010, **28**(3): 166-171
CHEN Tingting, LIAN Lixia, MOU Ying, *et al.* Research on *pprI* gene of *deinococcus radiodurans* transferred by electroporation in vivo for remedy of the γ -rays radiation injury with mice[J]. Radiat Res Radiat Process. 2010, **28**(3): 166-171
 - 12 张永芹, 周辉, 陈洁, 等. 耐辐射球菌 *PprI* 蛋白质表达及其纯化的实验研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, **29**(2): 117-122
ZHANG Yongqin, ZHOU Hui, CHEN Jie, *et al.* Research on the expression and purification of the the *PprI* protein from *Deinococcus radiodurans* R1[J]. Radiat Res Radiat Process, 2011, **29**(2): 117-122
 - 13 刘荣, 姜文国, 刘芳, 等. 人 421BBL 胞外区/抗 CD20 融合蛋白的构建和表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, **24**(6): 543-549
LIU Rong, JIANG Wenguo, LIU Fang, *et al.* The construction an expression of the 421BBL extracellular/anti-CD20 fusion protein of people[J]. Cellular and molexcular immunology, 2008, **24**(6): 543-549
 - 14 房永祥, 冯海燕, 莫斯科, 等. 细胞因子融合蛋白技术及其应用前景[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, **25**(9): 856-859
FANG Yongxiang, FENG Haiyan, MO Sike. Cytokine fusion protein technology and its application prospects[J]. Cellular and Molexcular Immunology, 2009, **25**(9): 856-859
 - 15 Earl A M, Mohundro M M, Mian I S, *et al.* Battista, the IrrE protein of *deinococcus radiodurans* R1 is a novel regulator of *recA* expression[J]. J Bacteriol, 2002, **184**: 6216-6224

Studying the protective effect of *deinococcus radiodurans* PprI on acute radiation injury in mice

CHEN Jie¹ ZHANG Yongqin² BI Jiejing¹ YANG Zhanshan¹

¹(Department of Radioxicolog, School of Radiation Medicine & Protection, University of Soochow, Suzhou 215123, China)

²(Department of Oncology, the First Peoples' Hospital of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215000, China)

ABSTRACT In this paper the effect of *PprI* protein of *deinococcus radiodurans* to protect mice from acute radiation injury had been investigated meanwhile the relative mechanism had also been discussed. After injecting *PprI* protein or physiological saline into the muscle of mice, the blood cell count and the apoptotic rates of bone marrow cells, spleen cells and thymocyte cells on the 1st, 7th, 14th, and 28th day after irradiation were investigated. Compared with the physiological saline injection group, it has been found that the leucocyte number is significantly higher on the 28th day after irradiation ($p < 0.05$), the platelet number and the lymphocyte ratio is obvious higher on the 1th day and the 7th day after irradiation ($p < 0.05$) in peripheral blood of the *PprI* protein injection group. On the other hand, the apoptotic rate of spleen cells is significantly lower on the 1th, 7th, and 14th day ($p < 0.05$), the apoptotic rate of thymocytes is significantly lower on the 14th and 28th day ($p < 0.05$), the apoptotic rate of bone marrow cells is significantly lower on the 1st, 14th and 28th day ($p < 0.05$), and the apoptotic rate of bone marrow cells is return to normal level on the 28th day after irradiation. The result indicates that the *PprI* protein of *deinococcus radiodurans* can prevent mice from the acute radiation injure apparently.

KEYWORDS *Deinococcus radiodurans*, *PprI* protein, Radiation injury, Prevention and protection

CLC R811.5, R818.74, R818.059