

致死剂量 γ 射线照射小鼠淋巴结淋巴细胞凋亡动力学 及其与相关蛋白表达的关系

崔玉芳¹ 丁彦青² 徐 茵¹ 姜竺君¹ 靳 巍¹ 毛秉智¹

¹ (军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

² (南方医科大学病理学教研室 广州 510515)

摘要 用原位末端标记、原位杂交和碱磷酸免疫组化技术,观察致死剂量 γ 射线照射小鼠淋巴结淋巴细胞的凋亡动力学变化,及其与 Bax、Bcl-2 和 Bcl-X_L 表达的关系。结果表明,照射后 24h 淋巴结淋巴细胞凋亡指数迅速升高,在 6—12Gy 范围内与照射剂量成正比, ≥ 15 Gy 照射后变化不明显。6Gy 照射后 24h,淋巴细胞凋亡达高峰,尔后开始降低;然而直至照射后 6 个月和 12 个月,凋亡指数仍明显高于对照组。6Gy 照射后 24h,淋巴细胞 Bax 蛋白表达即出现升高,当剂量为 12Gy 时达到峰值,15Gy 和 20Gy 照射后未观察到这种剂量效应关系。而 Bcl-2 和 Bcl-X_L 蛋白表达在照射后 24h 明显下降。bax 和 bcl-2 mRNA 的表达显示出相似趋势。以上结果显示, ≤ 12 Gy 照射后细胞凋亡是淋巴细胞的重要死亡方式。照射后 Bax 的上调及 Bcl-X_L 的下调在致死剂量照射引起的淋巴细胞凋亡调控中起重要作用。

关键词 γ 射线照射,淋巴结,凋亡, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L

中图分类号 R392.3

免疫组织和淋巴细胞对电离辐射高度敏感,其中,作为外周免疫器官的淋巴结是高度辐射敏感性的器官之一。以往的研究仅限于中、小剂量照射后该组织的病理改变^[1-3]。有关大剂量(>8 Gy)照射后淋巴细胞凋亡的发生规律及促凋亡和抗凋亡基因的作用,国内外文献中报道较少。据此,本实验着重研究致死剂量⁶⁰Co γ 射线照射后,淋巴结淋巴细胞凋亡动力学变化,及其与 Bax、Bcl-2 和 Bcl-X_L 表达的关系,以便为重度和重度以上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

清洁级 C57 纯系小鼠 225 只(雌雄各半,6—8 周龄),体重(20.0 $\pm$ 2.1)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,饲养于本院二级动物房。

1.2 试剂

原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒

(含标记缓冲液、TdT、Bio-dUTP、Converter-POD 工作液等)和 Annexin-V-PI 试剂盒均购自德国宝灵曼公司。免疫组化检测凋亡相关蛋白所用的抗 Bax、Bcl-2、Bcl-X_L 单抗,以及 SP-AP 试剂盒(含生物素标记的羊抗鼠 IgG 和碱磷酸标记的链卵白素),购自北京中山生物试剂有限公司。

1.3 动物分组照射与取材

将上述动物随机分为 0、6、9、12、15、20Gy 6 个组,分别经⁶⁰Co γ 射线全身一次照射,照射剂量率为 2.13Gy/min,动物距照射源 2.5m。于照射前及照射后 1—28 d 分别活杀取材。

1.4 样品制备

在上述各时间点取小鼠尾静脉血进行白细胞计数,同时活杀小鼠取肠系膜淋巴结,用无血清培养液在冰上制取细胞悬液,用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离洗涤后制备离心涂片,经不同固定剂固定后用于不同指标染色。

国家自然科学基金(30371368)和军队“十五”科研基金(01L018;01MA075;02M010)资助

第一作者:崔玉芳,男,1953 年 8 月出生,1977 年毕业于上海复旦大学,研究员,主要从事放射病理、创伤病理和免疫病理学研究

收稿日期:初稿 2004-06-14,修回 2004-08-16

1.5 凋亡细胞检测

涂片经缓冲的甲醛-丙酮 (BFA) 液固定后, 使用 TUNEL 凋亡检测试剂盒进行检测。实验步骤及检测标准均按说明书进行, 每个样品计数 300 个细胞, 计算淋巴细胞的凋亡指数 (百分数均值)。上述细胞涂片经甲醇固定和 MGG 染色^[1-3]后, 光镜下根据核浓集、染色质边集及凋亡小体等典型形态学特征, 观察凋亡细胞, 计数 300—600 个细胞, 计算凋亡指数。

1.6 Bax、Bcl-2 和 Bcl-X_L 蛋白的免疫组化检测

上述涂片经纯丙酮固定后, 用碱磷酶标记链卵白素 (SP-AP) 法检测 Bcl-X_L、Bax 凋亡相关蛋白表达, 阳性和阴性对照及检测步骤均按试剂盒推荐的方法进行^[4,5]。

1.7 bcl-2、bax mRNA 的原位杂交检测

原位杂交所用的 bio-bax 和 bio-bcl-2 cRNA 探针购自北京大学医学院病理系; Avidin-HRP 为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品。DAB 购自北京中山生物技术公司。方法简述如下: 样品经预处理 (4% 多聚甲醛后固定、0.1mol/L 的 HCL 酸化、0.5% 的 PK 37°C 消化、0.1mol/L 的 PBS 洗涤) 后, 进行预杂交, 每个样品加入 20 μ L 预杂交液 (含去离子甲酰胺、鲑精 DNA 3 μ L、NaCl、Tris-HCl、20 $\times$ SSC

10 μ L、硫酸葡聚糖等成分), 于湿盒内 42°C 孵育 2h。洗涤后进行杂交, 每个样品加 20 μ L 的杂交液 (含 bio-bax 或 bio-bcl-2 cRNA 探针、鲑精 DNA、去离子甲酰胺、20 $\times$ SSC、硫酸葡聚糖、DTT 和 Denhardt's 液)。cRNA 探针需在加入到杂交液之前进行 100°C 变性。置湿盒内于 42°C 孵育过夜。经不同 Buffer 洗涤后, 加入 AP-SA, 37°C 孵育 1h, 在 1mL Buffer 液中加入 BCIP 和 NBT, 混匀后, 于暗处显色, 镜下控制显色时间 (室温 2h 或 4°C 过夜)。终止显色后在光镜下观察, 胞核显示紫蓝色的细胞为阳性。

1.8 统计学处理

实验数据用 Student's T 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 不同剂量照射后小鼠外周血白细胞计数

6Gy 组动物在照射后 1 月内的死亡率为 10%; ≥ 9 Gy 照射组动物于 7d 后全部死亡 (见表 1)。

从死亡率分析, 本实验所用剂量符合重度和重度以上急性放射病的剂量范围。从表 1 还可发现, 不同剂量 γ 射线照射后 6h, 小鼠外周血白细胞有一短暂性升高, 以后迅速下降。6Gy 组照射后 7d 降至最低, ≥ 9 Gy 照射后 3d 降至最低, 但 7d 后动物全部死亡。至照射后 28d 回升到正常水平。

Table 1 White blood cell counts of mouse peripheral blood after γ -ray irradiation to different doses ($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Time after irradiation	Irradiation doses / Gy					
	0	6	9	12	15	20
6h	5.7 $\pm$ 2.3	15.0 $\pm$ 6.6 ⁽¹⁾	12.6 $\pm$ 2.1 ⁽²⁾	9.6 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	9.6 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	9.5 $\pm$ 3.7 ⁽¹⁾
12h		4.9 $\pm$ 1.4	5.4 $\pm$ 3.1	4.8 $\pm$ 1.6	3.2 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 2.5
24h		2.2 $\pm$ 0.3 ⁽¹⁾	2.0 $\pm$ 0.7 ⁽¹⁾	1.8 $\pm$ 0.3 ⁽¹⁾	1.2 $\pm$ 0.3 ⁽¹⁾	1.3 $\pm$ 0.4 ⁽¹⁾
3d		1.2 $\pm$ 0.5 ⁽¹⁾	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.3
7d		1.0 $\pm$ 0.2 ⁽²⁾	1.0 $\pm$ 0.1 ⁽²⁾	—	—	—
14d		1.4 $\pm$ 0.3 ⁽²⁾	—	—	—	—
28d		8.1 $\pm$ 5.8	—	—	—	—

⁽¹⁾ $p<0.05$ and ⁽²⁾ $p<0.01$, vs the control (without irradiation)

—, no survival in the irradiated group

2.2 不同剂量 γ 射线照射后 24h 小鼠淋巴结淋巴细胞凋亡指数的变化

从表 2 可见, 6—12Gy 照射后 24h, 淋巴结淋

巴细胞凋亡指数随照射剂量增加而持续增高, 呈现出较好的量效关系; 而 ≥ 15 Gy 照射后凋亡指数明显下降, 未观察到量效关系。

Table 2 Changes of lymphocyte apoptotic index in mouse lymph node 24h after γ -ray irradiation to different doses ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Irradiation doses / Gy	Apoptotic index of lymphocyte
The control	2.2 $\pm$ 0.8
6	14.1 $\pm$ 1.5 ⁽¹⁾
9	18.3 $\pm$ 2.6 ⁽¹⁾
12	24.3 $\pm$ 1.2 ⁽¹⁾
15	17.0 $\pm$ 1.9 ⁽¹⁾
20	11.4 $\pm$ 2.0 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs the control (without irradiation)**2.3 6Gy 和 12Gy γ 射线照射后小鼠淋巴结淋巴细胞凋亡指数的变化**

从表 3 可见, 6Gy 和 12Gy γ 射线照射后 3h, 淋巴细胞凋亡指数即出现增高, 24h 达高峰, 呈现出时效关系, 且 12Gy 组凋亡率始终高于 6Gy 组。3d 出现降低, 但仍明显高于对照值。

Table 3 Changes of lymphocyte apoptotic index in mouse lymph node after 6Gy and 12Gy γ -ray irradiation ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Time after irradiation	Apoptotic index of lymphocyte	
	6Gy	12Gy
The control	2.2 $\pm$ 0.8	2.2 $\pm$ 0.8
3	7.0 $\pm$ 1.5 ⁽¹⁾	8.3 $\pm$ 1.7 ⁽¹⁾
6	12.0 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	12.2 $\pm$ 2.4 ⁽¹⁾
24	13.3 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	14.7 $\pm$ 2.1 ⁽¹⁾
72	8.8 $\pm$ 2.1 ⁽¹⁾	7.7 $\pm$ 1.9 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs the control (without irradiation)**2.4 6Gy γ 射线照射后小鼠淋巴结淋巴细胞凋亡指数的动态变化**

表 4 结果表明, 6Gy γ 射线照射后 0.5 月, 淋巴细胞凋亡指数仍处于较高水平, 而后开始降低;

Table 4 Changes of lymphocyte apoptotic index in mouse lymph node 0.5-12 months after 6Gy γ -ray irradiation ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Time after irradiation / months	Apoptotic index of lymphocyte
The control	1.3 $\pm$ 0.7
0.5	11.4 $\pm$ 1.9 ⁽¹⁾
1	5.5 $\pm$ 2.4 ⁽¹⁾
3	5.4 $\pm$ 1.3 ⁽¹⁾
6	5.8 $\pm$ 1.3 ⁽¹⁾
12	3.7 $\pm$ 0.6 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs the control (without irradiation)

然而直至照射后 6 个月和 12 个月, 凋亡指数仍明显高于对照组。

2.5 不同剂量 γ 射线照射后 24h 小鼠淋巴结淋巴细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达与凋亡的关系

从表 5 可见, 6Gy γ 射线照射后 24h, 淋巴细胞 Bax 蛋白表达即出现增加, 随照射剂量增加升高更为明显, 至 12Gy 时达到峰值, 约为对照组的 7.1 倍; ≥ 15 Gy 照射后未显示出剂量效应关系。而 Bcl-2 蛋白的表达呈明显下降趋势, 在 6—12Gy 范围内呈现出较好的剂量效应关系, 12Gy 照射后约降低为对照组的 20%。

Table 5 Expressions of lymphocytic Bax and Bcl-X_L proteins in mouse lymph node 24h after 6Gy γ -ray irradiation and its relationship to apoptosis ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Irradiation doses / Gy	Apoptotic index of lymphocyte	Bax ⁺	Bcl-2 ⁺
The control	2.2 $\pm$ 0.83	3.4 $\pm$ 1.00	23.7 $\pm$ 3.24
6	14.1 $\pm$ 1.45 ⁽¹⁾	14.2 $\pm$ 1.38 ⁽¹⁾	11.3 $\pm$ 2.34 ⁽¹⁾
9	18.3 $\pm$ 2.64 ⁽¹⁾	20.3 $\pm$ 2.50 ⁽¹⁾	5.7 $\pm$ 1.41 ⁽¹⁾
12	24.3 $\pm$ 1.22 ⁽¹⁾	24.3 $\pm$ 2.69 ⁽¹⁾	4.8 $\pm$ 1.72 ⁽¹⁾
15	17.0 $\pm$ 1.94 ⁽¹⁾	15.2 $\pm$ 1.56 ⁽¹⁾	11.7 $\pm$ 1.80 ⁽¹⁾
20	11.4 $\pm$ 2.01 ⁽¹⁾	12.3 $\pm$ 1.58 ⁽¹⁾	14.2 $\pm$ 1.30 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs the control (without irradiation)**2.6 6Gy γ 射线照射后小鼠淋巴结淋巴细胞 Bcl-X_L 蛋白表达与凋亡的关系**

表 6 结果表明, 6Gy γ 射线照射后小鼠淋巴结淋巴细胞 Bcl-X_L 蛋白的表达随照射剂量的增加持续降低, 照射后 6h—3d 呈现一定的时间效应关系, 并与细胞凋亡显示出较好的对应关系。照射后 28d 仍未恢复到对照水平。

Table 6 Expressions of lymphocytic Bcl-X_L proteins in mouse lymph node after 6Gy γ -ray irradiation and its relationship to apoptosis ($\bar{x} \pm s, \%, n=5$)

Time after irradiation / d	Apoptotic index of lymphocyte	Bcl-X _L ⁺
The control	2.2 $\pm$ 0.8	31 $\pm$ 3.6
0.25	12.0 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	12 $\pm$ 2.0 ⁽¹⁾
1	14.1 $\pm$ 1.5 ⁽¹⁾	14 $\pm$ 1.5 ⁽¹⁾
3	8.8 $\pm$ 2.1 ⁽¹⁾	10 $\pm$ 2.0 ⁽¹⁾
28	5.5 $\pm$ 2.4 ⁽¹⁾	41 $\pm$ 4.0 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.01$, vs the control (without irradiation)

2.7 6Gy γ 射线照射后小鼠胸腺淋巴细胞 bax 和 bcl-2 mRNA 表达与凋亡的关系

表 7 结果表明, 6Gy γ 射线照射后 6h 和 24h, 淋巴结淋巴细胞 bax mRNA 表达明显增强, 分别为对照值的 2.5 倍和 3.4 倍。而 bcl-2 mRNA 的表达迅速降低, 分别为对照值的 71% 和 58%。两者均与凋亡指数显示出较好的对应关系。

Table 7 Expressions of lymphocytic bcl-2 and bcl-X_L mRNA in mouse lymph node after 6Gy γ -ray irradiation and its relationship to apoptosis
($\bar{x} \pm s$, %, $n=5$)

Time after irradiation /h	Apoptotic index	bax mRNA	bcl-2 mRNA
The control	2.2 $\pm$ 0.8	15 $\pm$ 1.6	55 $\pm$ 4.9
6	12.0 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	38 $\pm$ 3.3 ⁽¹⁾	39 $\pm$ 3.1 ⁽¹⁾
24	13.3 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	51 $\pm$ 1.8 ⁽¹⁾	32 $\pm$ 2.5 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p<0.01$, vs the control (without irradiation)

3 讨论

众所周知, 淋巴结是机体重要的免疫器官, 也是目前研究急性放射病免疫损伤机制的靶器官之一。我们曾观察了中等和中等以上剂量 (2—8Gy) γ 射线照射后小鼠淋巴结组织损伤的分子病理机理, 以及淋巴细胞急剧下降的原因, 发现经 2—8Gy γ 射线照射后, 淋巴结组织出现大量细胞凋亡, 并证实凋亡是导致急性照射后淋巴细胞迅速减少和免疫功能降低的重要原因^[3]。然而有关致死剂量照射后, 免疫组织淋巴细胞凋亡的发生规律和调控机制的报道较少。本实验着重观察了经致死剂量 γ 射线照射后, 小鼠淋巴结淋巴细胞的凋亡规律以及与 Bax、Bcl-2 和 Bcl-X_L 凋亡相关基因和蛋白表达的关系, 发现经致死剂量 γ 射线照射后 24h, 淋巴结淋巴细胞的凋亡率迅速升高, 在 6—12Gy 的范围内照射剂量与细胞的凋亡指数呈较好的量效关系, 而 ≥ 15 Gy 的剂量照射后关系不明显。经 6Gy 和 12Gy 照射后 3h, 淋巴细胞凋亡指数即出现增高, 24h 达高峰, 呈现出时效关系, 且 12Gy 组凋亡率始终高于 6Gy 组。以上结果表明, 致死剂量照射同样能诱发淋巴细胞的大量凋亡, 且在一定剂量范围内呈量效关系。初步证实, 在 6—12Gy 的剂量范围内淋巴细胞的死亡方式以凋亡为主, 而 ≥ 15 Gy 的剂量照射后除凋亡外, 坏死可能也是淋巴细胞死亡的重要途径 (待发表资料), 这一结果与在小鼠胸腺和脾脏观察到的结果是一致的。同时以 6Gy 的 γ 射线照射

后, 对小鼠淋巴结淋巴细胞凋亡指数长期动态观察的结果表明, 照射后半个月, 细胞的凋亡指数仍显著高于对照组, 尔后开始降低, 然而, 直至照射后 6 个月和 12 个月, 凋亡指数仍明显高于对照组。提示急性电离辐射对淋巴结等免疫组织具有潜在的远后效应, 这可能是辐射导致机体免疫功能长期低下和功能失调的重要原因之一^[6,7]。

对致死剂量 γ 射线照射后, 淋巴细胞凋亡调控因素的分析结果表明, 6Gy 的 γ 射线照射后 24h, Bax 蛋白的表达即升高, 且随着照射剂量的增加升高更为明显, 至 12Gy 时达到峰值, 而 ≥ 15 Gy 照射后未显示出这种剂量效应关系。Bax 是 Bcl-2 家族的重要成员之一, 但却具有较强的诱发细胞凋亡的功能^[4,5]。本实验发现, 照射后 24h, 在 12Gy 组淋巴细胞的凋亡率达到峰值时, Bax 蛋白的表达也最强, 表明 Bax 在辐射所致的淋巴结淋巴细胞凋亡的调控中发挥着重要作用。而 Bcl-2 与 Bcl-X_L 蛋白于照射后明显下降, 且 Bcl-X_L 蛋白的表达与凋亡率呈较好的对应关系。抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 也是 Bcl-2 家族中的重要成员, 具有比 Bcl-2 更强的抗凋亡作用, 而且可不依赖 Bcl-2 的表达而单独发挥这种作用^[4,5]。本实验发现, 照射后 Bcl-2 和 Bcl-X_L 的表达, 随着照射剂量和淋巴细胞凋亡率的变化呈规律性的改变, 表明两者在大剂量照射引起的细胞凋亡的调控中起着重要作用。对 6Gy 的 γ 射线照射后 bax 和 bcl-2 mRNA 表达水平的分析, 也支持蛋白水平检测的结果。上述实验结果, 无疑为今后从细胞凋亡角度研究减轻或改善辐射引起的免疫组织损伤和免疫功能降低提供了重要启示。

参考文献

- 1 CUI Yufang, YANG Hong, WU Shuxia, *et al.* CMJ (China), 2002, **115**(7): 1070-1073
- 2 崔玉芳, 杨红, 高亚兵, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1999, **17**(2): 101-105
CUI Yufang, YANG Hong, GAO Yabing, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1999, **17**(2): 101-105
- 3 崔玉芳, 杨红, 高亚兵, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, **21**(3): 63-65
CUI Yufang, YANG Hong, GAO Yabing, *et al.* Chin J Radiat Med Prot, 2001, **21**(3): 63-65
- 4 崔玉芳, 张莹, 柳晓兰, 等. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, **20**(1): 39-41
CUI Yufang, ZHANG Ying, LIU Xiaolan, *et al.* Chin J Cell Mol Immunol, 2004, **20**(1): 39-41
- 5 崔玉芳, 张莹, 杨红, 等. 细胞与分子免疫学杂志,

2003, **19**(5):54-56CUI Yufang, ZHANG Ying, YANG Hong, *et al.* Chin JCell Mol Immunol, 2003, **19**(5): 54-566 Harrington N P, Chambers K A, Rose W M, *et al.* Clin
Exp Immunol, 1997, **107**(5): 417-4247 Savina N P. Radiat Biol Radioecol, 1995, **35**(4): 463-480

Apoptotic dynamic changes of mouse lymph node lymphocytes irradiated by lethal dose γ -irradiation and its relationship to the expressions of apoptosis-related proteins

CUI Yufang¹ DING Yanqing² XU Han¹ JIANG Zhujun¹ JIN Wei¹ MAO Binzhi¹¹ (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)² (Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT By using TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL), *in situ* hybridization and immunohistochemical method of alkaline phosphatase, we observed the apoptotic dynamic changes of mouse lymph node lymphocyte after lethal dose γ -ray irradiation, and its relationship to the expressions of Bax, Bcl-2 and Bcl-X_L proteins and bax, bcl-2 mRNAs. The results showed that 24h after irradiation, apoptotic index of lymph node lymphocytes increased swiftly, with a positive correlation to the doses within 6—12Gy, whereas no relationship was observed for 15Gy and 20Gy irradiation groups. Twenty-four hours after 6Gy irradiation, the lymphocytes apoptosis reached a maximal level and decreased thereafter. However, up to 6 and 12 months after the 6Gy irradiation, the apoptotic index was still higher than the control group. Twenty-four hours after the irradiation, the expression of lymphocyte Bax protein enhanced immediately, with the 12Gy group being highest value, whereas such a dose-effect was not found for the 15Gy and 20Gy groups. While the expressions of Bcl-2 and Bcl-X_L proteins decreased evidently 24h after the irradiation, the analysis on bax and bcl-2 mRNA showed also a similar tendency. It was suggested that apoptosis was an important way of lymphocyte death pathways after ≤ 12 Gy irradiation. The up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 or Bcl-X_L indicate that they play an important role in the apoptotic regulation of lymphocytes induced by lethal dose radiation.

KEYWORDS γ -ray irradiation, Lymph node, Apoptosis, Bax, Bcl-2, Bcl-X_L

CLC R392.3