

低剂量X射线照射诱导体外EL-4淋巴瘤细胞 凋亡适应性反应及其可能机制

刘淑春 龚平生 王志成 孙丽光 龚守良

(吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 用X射线照射离体EL-4淋巴瘤细胞,其诱导剂量(D1)为25~200 mGy(剂量率12.5 mGy/min),攻击剂量(D2)为1.5 Gy(剂量率287 mGy/min),D1和D2间隔6 h。通过流式细胞仪检测其细胞凋亡百分数及其相关基因蛋白表达水平。其结果显示,当D1为25~100 mGy,D2为1.5 Gy;或D1为75 mGy,D2为0.5~2.0 Gy,与D2组比较,D1+D2组细胞凋亡百分数有显著意义降低。当D1为25~100 mGy,D2为1.5 Gy,与D2组比较,D1+D2组Bcl-2蛋白阳性百分数不同程度增加,Bax蛋白有显著意义降低,Bcl-2/Bax比值有显著意义增高;p53蛋白不同程度降低。其结果提示,在D1为25~100 mGy,D2为0.5~2.0 Gy,可诱导EL-4淋巴瘤细胞凋亡的适应性反应,其相关凋亡基因蛋白Bcl-2、Bax和p53发生的改变,与其细胞凋亡明显相关,可能在其适应性反应的机制中起到重要的调节作用。

关键词 电离辐射,淋巴瘤细胞,细胞凋亡,凋亡基因,抗凋亡基因,适应性反应

中图分类号 R811.5, Q235, R392.12, R332

1984年, Oliveri等^[1]提出低剂量辐射诱导细胞遗传学适应性反应,并被许多研究者承认。后来,联合国原子辐射生物效应科学委员会(UNSCEAR)确认这一事实^[2],为这一领域的研究奠定了重要的基础。我们也通过在体研究证实,低剂量辐射诱导胸腺细胞凋亡^[3]和细胞周期进程^[4]的适应性反应。然而,体内和体外实验结果有很大的差异^[5],通过检测细胞存活率证实,人RKO细胞不显示适应性反应、辐射旁效应或延迟基因组不稳定性。但通过某些PKO细胞染色体不稳定衍生物条件生长培养基诱导的基因组不稳定性,指出这些细胞分泌因子引起的这种反应与非照射细胞有关。这些结果阐明了低剂量辐射诱导适应性反应的复杂性,细胞对低剂量辐射反应是可变的。近年来,对低剂量/低剂量率辐射的应答不同于高剂量/高剂量率辐射的应答,又有了新的认识,即不能用经典的放射生物学“靶学说”解释某些低剂量辐射生物效应。在对低剂量/低剂量率辐射应答中,诸如辐射适应性等反应,其机制常涉及对靶和非靶事件应答的生化/分子信号;而且,辐射诱导适应性反应和旁效应的相关性也引起研究者注意^[6]。为此,本研究低剂量X射线照射诱导体外EL-4淋巴瘤细胞凋亡适应性反应,并从

细胞凋亡相关蛋白角度探讨其可能机制,以便揭示低剂量辐射效应及其诱导适应性反应的本质。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞与分组

实验用EL-4淋巴瘤细胞株,本室保存。实验分为假照射组(Sham-irradiation)、D2组和D1+D2组。实验分两部分进行:一是D1为25、50、75、100和200 mGy,D2为1.5 Gy;二是D1为75 mGy,D2为0.5、1.0、1.5、2.0和3.0 Gy。

1.2 照射条件

用国产XSS205(FZ)深部X射线治疗机照射细胞,电压200 kV,电流10 mA,滤片铜0.5 mm、铝1.0 mm。细胞首先接受诱导剂量(D1为25~200 mGy,剂量率为12.5 mGy/min)照射,6 h后再接受攻击剂量(D2为0.5~3.0 Gy,剂量率为287 mGy/min)照射。

1.3 EL-4淋巴瘤细胞培养

EL-4细胞株是由9,10-二甲基-1,2-苯并蒽在C57BL/6N小鼠中诱导的淋巴瘤细胞。从液氮中取

国家自然科学基金(30570546)资助

第一作者:刘淑春,女,1966年2月出生,2006年于吉林大学获硕士学位,放射生物学专业,主管技师

通讯联系人:龚守良, E-mail: gongsl@163.com

收稿日期:初稿 2007-10-17,修回 2007-12-24

出冻存的 EL-4 细胞株立即放于 37°C 恒温水浴融化, 经 1~2 min 后待细胞株完全融化倒入 10 mL 刻度离心管用 RPMI-1640 液洗两次, 每次 1500 r/min, 离心 5 min, 然后将细胞移到培养瓶中, 在 RPMI-1640 全培养基中加 10% 胎牛血清, 以 5% CO₂ 空气及饱和湿度条件下传代培养。细胞倍增时间为 14 h, 取指数生长期细胞, 调细胞浓度为 $5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。在 6 孔板的每孔中加 1 mL, 6 平行样。

1.4 细胞凋亡测定

取待测细胞用 0.01 mol/L PBS 洗 2 次, 离心 (1500 r/min, 4°C, 5 min), 弃上清, 加 0.01% RNase 100 μL , 37°C 水浴 30 min, PBS 洗 1 次, 加 50 mg/L 碘化丙啶 0.5 mL, 4°C 避光 30 min 后应用流式细胞仪检测。CellQuest 软件收集 10 000 个细胞, 细胞凋亡数据用 ModFit 软件分析, 记录 Ap 区亚峰细胞凋亡百分数。

1.5 基因蛋白 p53、Bcl-2 和 Bax 表达的检测

采用间接荧光流式细胞术检测。取 1 mL 细胞悬液, 75% 冷乙醇固定, 过夜。0.01 mol/L PBS 清洗 2 次, 加第一抗体 McAb-p53、McAb-Bcl-2 或 McAb-Bax (Santa cruz biotechnology inc, USA) 1 μL , 4°C 反应 45 min。PBS 清洗 2 次, 加第二抗体羊抗小鼠 IgG-FITC (Research Product Division, Gainsburg, MD, USA) 50 μL (1:200 稀释), 4°C 反应 45 min, PBS 清洗 2 次。每一组样品均设非特异对照, 以 PBS 代替第一抗体, 其余步骤同上。用 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson, USA) 检测和分析, 记录基因 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达阳性细胞的百分率, 减去非特异对照值, 即为基因蛋白表达水平。

1.6 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验评价数据的统计学意义, 用 SPSS 统计软件处理分析结果。

2 结果

2.1 LDR 诱导体外 EL-4 淋巴瘤细胞凋亡的剂量效应

EL-4 淋巴瘤细胞体外预先分别接受 25、50、75、100 和 200 mGy (D1) X 射线单次照射后 6 h, 再接受 1.5 Gy (D2) X 射线照射, 于照射 18 h 后观察其凋亡细胞百分数的变化 (表 1)。由表 1 可见, D2 组凋亡细胞百分数有显著意义高于假照组 ($P < 0.05$); D1 + D2 各组凋亡细胞百分数与各自 D2 组

比较, 除 200 mGy + 1.5 Gy 组无统计学意义外, 其余各组均有显著意义降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

当 D1 为 75 mGy, D2 为 0.5、1.0、1.5、2.0 和 3.0 Gy 时, D2 各组凋亡细胞百分数变化分别显示于图 1。由图 1 可见, D2 各组凋亡细胞百分数均有显著意义高于假照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 而 D1 + D2 各组 AB 百分数, 除 75 mGy + 3.0 Gy 组外, 均有显著意义低于各自 D2 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

Table 1 Adaptive response of EL-4 lymphoma cell apoptosis induced by irradiation with different low doses

Group	Percentage of apoptosis /%
Sham-irradiation	10.2 ± 1.71
1.5 Gy	13.4 ± 2.05 [#]
25 mGy + 1.5 Gy	10.9 ± 1.53 [*]
50 mGy + 1.5 Gy	9.5 ± 3.09 [*]
75 mGy + 1.5 Gy	10.0 ± 2.69 [*]
100 mGy + 1.5 Gy	9.9 ± 1.18 ^{**}
200 mGy + 1.5 Gy	11.3 ± 3.06

Note: $\bar{x} \pm s$, $n = 6$; [#] $P < 0.05$, vs sham-irradiation group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.001$, vs 1.5 Gy group

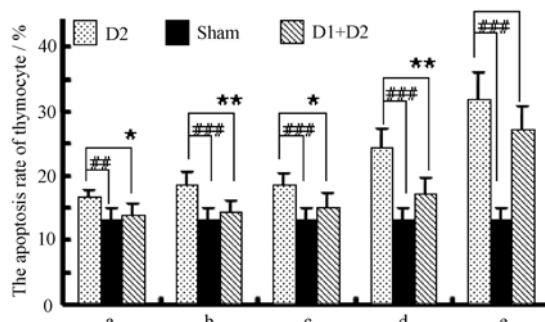


Fig. 1 Adaptive response of EL-4 lymphoma cell apoptosis induced by irradiation with 75 mGy.

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$; ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.01$, vs sham-irradiation group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, vs D2 group; the doses of D2 in a, b, c, d and e are 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 Gy, respectively

2.2 LDR 诱导体外 EL-4 淋巴瘤细胞适应性反应的相关基因蛋白表达

当 X 射线照射体外 EL-4 淋巴瘤细胞, 其 D1 剂量为 25、50、75、100 和 200 mGy (12.5 mGy/min), D2 剂量为 1.5 Gy (287 mGy/min), D1 和 D2 间隔 6h。表 2 显示, D2 组与假照射组比较, 其细胞凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白表达阳性百分率有显著意义降低 ($P < 0.05$), Bax 有显著意义增加 ($P < 0.001$), 而 Bcl-2/Bax 比值有显著意义降低 ($P < 0.001$); p53 有显著意义增加 ($P < 0.01$)。D1 + D2 组与 D2 组比较, D1 为 25 和 50 mGy 照射的 Bcl-2 阳性百分率有

显著意义增加 ($P < 0.05$), 25、50、75 和 100 mGy 照射的 Bax 有显著意义降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 而 25、50、75 和 100 mGy 照射的 Bcl-2/Bax 比值有

显著意义增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 25、50 和 75 mGy 照射的 p53 有显著意义降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

Table 2 Expressions of EL-4 lymphoma cell apoptosis-associated gene Bcl-2, Bax and p53 proteins induced by different low doses

Group	D1 /mGy	Bcl-2 /%	Bax /%	Bcl-2/Bax	p53 /%
Sham-irradiation	—	70.9 ± 5.28	81.6 ± 2.04	0.87 ± 0.06	18.1 ± 2.48
D2	—	63.0 ± 5.72 [#]	91.1 ± 2.13 ^{###}	0.69 ± 0.06 ^{###}	28.2 ± 4.86 ^{##}
D1 + D2	25	72.4 ± 7.64 [*]	81.1 ± 1.76 ^{***}	0.89 ± 0.09 ^{**}	20.8 ± 3.68 [*]
	50	71.0 ± 5.45 [*]	82.1 ± 2.44 ^{***}	0.86 ± 0.07 ^{**}	20.7 ± 2.20 ^{**}
	75	67.8 ± 3.92	80.5 ± 5.08 ^{***}	0.84 ± 0.05 ^{***}	22.6 ± 2.99 [*]
	100	66.3 ± 5.57	86.2 ± 3.56 [*]	0.77 ± 0.06 [*]	25.4 ± 5.39
	200	68.3 ± 3.00	92.5 ± 3.46	0.74 ± 0.03	31.6 ± 5.32

Note: $\bar{x} \pm s, n = 5; ^{\#}P < 0.05, ^{##}P < 0.01, ^{###}P < 0.001$, vs sham-irradiation group; $^*P < 0.05, ^{**}P < 0.01, ^{***}P < 0.001$, vs D2 group

3 讨论

低剂量电离辐射对机体的影响是当前国内外放射生物学领域研究的热点, 低剂量辐射诱导适应性反应已成为这一领域的重要研究课题。阐明低剂量辐射生物效应及其适应性反应, 对放射生物学理论和辐射防护实践均具有重要意义。本实验在我们以往在体研究基础上, 进行了低剂量X射线照射诱导体外EL-4淋巴瘤细胞凋亡适应性反应及其可能机制的研究。

低剂量辐射诱导适应性受许多因素影响, 但其照射剂量是主要因素。本实验发现, EL-4淋巴瘤细胞体外预先分别接受25 ~ 100 mGy (D1) X射线单次照射后6 h, 再接受1.5 Gy (D2) 照射, 与D2组比较, D1 + D2各组凋亡细胞百分数有显著意义降低(表1); 当D1为75 mGy, D2为0.5 ~ 2.0 Gy时, D1 + D2各组凋亡细胞百分数也有显著意义降低(图1)。上述结果说明, 低剂量辐射除了诱导在体胸腺细胞凋亡的适应性反应^[2], 也可与其剂量基本一致的范围内诱导离体EL-4淋巴瘤细胞凋亡的适应性反应。Feinendegen证实^[7], 0.01 ~ 0.2 Gy低LET照射培养的细胞发生适应性反应; 并认为, 当D1超过0.2 Gy, 适应性反应难以诱导; 当超过0.5 Gy, 几乎不能被诱导。在体研究中, pKZ1小鼠接受0.001 mGy (D1) 照射, 4 h后接受1 Gy (D2) 照射, 可诱导其染色体转位的适应性反应^[8]。通过人群外周血单核细胞微核、凋亡和DNA修复检测发现, 4 Gy (D2) 照射其单核细胞, 高本底地区人群也可发生适应性反应^[9]。另外, 给予0.5 Gy 低剂量¹³⁷Cs γ 射线D1照射, 而后再给予0.4、0.8或1.6 Gy高剂量D2照射可诱导在体小鼠抗氧化能力的适应性反应^[10]。综合文献提示,

无论是在体实验还是离体实验, 可能由于实验的终点指标不同、实验的环境和条件不同、所用的剂量及D1和D2间隔时间不同、急性照射或慢性照射不同, 以及诱导适应性反应机制的复杂性, 低剂量诱导适应性反应的D1和D2剂量效应存在很大的差别。

目前, 有关低剂量辐射诱导适应性反应的机制有几种可能的解释, 还不完全清楚。总的来说, 低剂量诱导适应性反应, 通过DNA损伤或其他途径, 活化细胞信号传递通路, 调节蛋白分子的表达, 激活DNA修复酶类和诱导产生保护性蛋白及/或减少抑制性蛋白, 启动细胞适应性反应^[11]。本研究探讨低剂量X射线照射诱导体外EL-4淋巴瘤细胞凋亡适应性反应的机制, 可能与细胞凋亡相关调控基因密切相关。细胞凋亡过程是受基因精确调控而实现的, 其相关基因分为促凋亡基因和抑凋亡基因。其中, 在bcl-2家族中bcl-2为重要的抑凋亡基因, bax为促凋亡基因, 两者的比值决定细胞凋亡的比例; 另外, p53为重要的促凋亡基因。本研究结果证实, 单纯1.5 Gy X射线照射小鼠后, 其细胞凋亡相关基因蛋白Bcl-2有显著意义降低, Bax有显著意义增加, 而Bcl-2/Bax比值有显著意义降低; p53有显著意义增加。因此, 其结果决定了细胞凋亡的增加, 与低剂量照射具有明显的相反效应^[11]。然而, 低剂量照射提高抑凋亡基因蛋白分子的表达, 降低促凋亡基因蛋白分子的表达, 最终导致细胞凋亡的降低。

本研究结果证实, 与D2组比较, 在D1 + D2组中, D1为25 ~ 50 mGy照射, Bcl-2有显著意义增加; 25 ~ 100 mGy照射, Bax有显著意义降低, 而Bcl-2/Bax比值有显著意义增高; 25 ~ 75 mGy照射, p53有显著意义降低, 其结果导致凋亡的细胞减少。已知野生型p53作为电离辐射诱导细胞凋亡

的重要诱导基因, 与 bcl-2 协同作用, 是维持细胞死亡的关键^[12]。p53 作为诱导适应性反应的信号转导因子 (transducer)^[13], 控制 DNA 修复和细胞周期调节系统^[14]。p53 介导细胞凋亡的下游靶分子, 其中主要有 bcl-2 家族蛋白, 诱导 Bax, 抑制 Bcl-2, 通过线粒体调控细胞凋亡^[15]。因此, 在低剂量辐射诱导的适应性反应中, p53 蛋白和 bcl-2 家族中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达发生变化起重要作用, 可能在其反应的机制中作为主要的调节因素之一。

参考文献

- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. *Science*, 1984, **223**(4636): 594-597
- UNSCEAR 1994 Report. Annex B (中译本). 北京: 原子能出版社, 1996. 216
- 龚守良, 吕喆, 刘淑春, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23** (6): 413-415
GONG Shouliang, LÜ Zhe, LIU Shuchun, *et al.* *Chin J Radiol Med Prot*, 2003(6), **23**: 413-415
- 龚守良, 刘淑春, 吕喆, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2004, **22** (3): 176-180
GONG Shouliang, LIU Shuchun, LÜ Zhe, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2004, **22** (3): 176-180
- Bosi A, Olivieri G. *Mutat Res*, 1989, **211**: 13-17
- Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, *et al.* *J Radiat Res (Tokyo)*, 2007, **48** (2): 97-106
- Feinendegen L E. *Hum Exp Toxicol*, 1999, **18**: 426-432
- Day T K, Zeng G, Hooker A M, *et al.* *Radiat Res*, 2006, **166** (5): 757-766
- Mohammadi S, Taghavi-Dehaghani M, Gharaati M R, *et al.* *J Radiat Res (Tokyo)*, 2006, **47** (3-4): 279-285
- Otsuka K, Koana T, Tauchi H, *et al.* *Radiat Res*, 2006, **166** (3): 474-478
- 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 2003(6), **23**: 393-398
LIU Shuzheng. *Chin J Radiol Med Prot*, 2003(6), **23**: 393-398
- Basu A, Haldar S. *Mol Hum Reprod*, 1999, **4** (1): 1099-1109
- Coleman M A, Yin E, Peterson L E, *et al.* *Radiat Res*, 2005, **164**: 369-382
- Schwartz J L, Jordan R, Slovic J, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2007, **83**(3): 153-159
- Burns T F, Eldeiry W S. *J Cell Physiol*, 1999, **22**(6): 264-269

Adaptive response of apoptosis in EL-4 lymphoma cells induced by low dose radiation and its mechanism

LIU Shuchun GONG Pingsheng WANG Zhicheng SUN Liguang GONG Shouliang

(Key Laboratory of Radiobiology, Ministry of Health School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT EL-4 lymphoma cells were irradiated with the inductive doses (D1: 25 ~ 200 mGy, dose rate: 12.5mGy/min) and the challenging dose (D2: 0.5 ~ 3.0 Gy, dose rate: 287 mGy/min), and the time interval between D1 and D2 was 6 h. The percentage of cell apoptosis and the expressive levels of cell apoptosis-associated gene proteins were measured with flow cytometry. The percentages of cell apoptosis in the D1 + D2 group with 25 ~ 100 mGy (D1) and 1.5 Gy (D2) or 75 mGy (D1) and 25 ~ 200 mGy (D2) were significantly lower than those in the D2 group. As compared with the D2 group, the positive percentage of cell Bcl-2 protein expression increased somewhat, and Bax decreased significantly, meanwhile the ratio of Bcl-2/Bax increased significantly and p53 decreased somewhat in D1 + D2 group with 25 ~ 100 mGy (D1) and 1.5 Gy (D2). The adaptive response of EL-4 lymphoma cell apoptosis could be induced by pre-irradiation with 25 ~ 100 mGy. Meantime, the expressive levels of cell apoptosis-associated gene Bcl-2, Bax and p53 proteins could change accordingly with cell apoptosis. These gene protein changes may play an important role in the mechanism of the adaptive response.

KEYWORDS Ionizing radiation, Lymphoma cell, Cell apoptosis, Apoptotic gene, Anti-apoptotic gene, Adaptive response

CLC R811.5, Q235, R392.12, R332