

低剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞糖皮质激素受体表达的影响 *

罗 灿 付士波 鞠桂芝

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用放射性配体结合法, 观察了不同低剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞糖皮质激素受体 (GCR) 表达的影响及 75mGy 全身照射后 GCR 表达的时程变化。结果显示, 25、50、75mGy X 射线全身照射后 8h 小鼠脾细胞 GCR 表达明显下降; 75mGy X 射线全身照射后 4h GCR 表达开始下降, 8hGCR 表达显著低于对照组。低剂量 X 射线全身照射可降低小鼠脾细胞 GCR 的表达, 提示 GCR 表达下调可能在低剂量辐射免疫增强效应中发挥作用。

关键词 糖皮质激素受体, 脾细胞, X 射线, 低剂量辐射

中图分类号 R811.5

糖皮质激素受体 (GCR) 是一类重要的转录因子^[1], 介导糖皮质激素的生物效应。低剂量电离辐射全身照射下调下丘脑 - 垂体 - 肾上腺皮质 (HPA) 轴功能, 血清糖皮质激素 (皮质酮) 水平降低^[2]。然而, 低剂量电离辐射全身照射对机体免疫器官内细胞 GCR 表达有何影响未见有报道。本研究采用放射性配体结合法观察了低剂量电离辐射全身照射对小鼠脾细胞 GCR 表达的影响, 以探讨低剂量电离辐射全身照射对 HPA 轴功能的影响与其增强机体免疫功能之间的可能关系。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠, 体重 $20 \pm 2g$, 购自白求恩医科大学实验动物部。动物随机分为对照组和不同剂量照射组或 75mGy 照射后不同时间组。

1.2 照射条件

应用 Philips 深部 X 射线治疗机进行照射, 电压 200kV, 电流 10mA, 滤板 0.5mm Cu 和 1.0mmAL, 照射组给予 25、50、75、100mGy 全身照射, 剂量率 12.5mGy/min, 靶皮距 212cm, 对照组给予假照射。

1.3 脾单细胞悬液的制备

不同剂量照射组动物, 于照射后 8h 断头处死; 75mGy 照射后不同时间组动物, 在不同时间照射, 同时断头处死。杀鼠时间均在上午 8~10 时之间。在无菌条件下取出脾脏, 放入盛有

* 国家自然科学基金资助 (39170275)

收稿日期: 初稿 1999-12-06, 修回 2000-01-24

RPMI-1640 培养液的平皿中, 用毛玻片研磨制成单细胞悬液, 离心 1000 r/min, 4 °C, 5 min, 弃上清, Hank's 液洗细胞 2 次。加 5mL Tris-NH₄CL, 作用 5min, 裂解红细胞。Hank's 液洗细胞 2 次, 将细胞重悬于 Hank's 液中, 放 34~35 °C, 15min, 然后用 Hank's 液洗两次, 以去除内源性皮质酮。用 Hank's 液调细胞浓度为 3×10^7 个 /mL, 锥虫蓝 (台盼蓝) 试验证明细胞存活量在 95% 以上。

1.4 GCR 反应体系的制备

96 孔细胞培养板, 每孔加 100 μ L 细胞和 50 μ L ³H- 皮质酮 (上海原子核研究所生产, 放化纯度 >95%, 放射性比活度 45Bq/m·mol), 终浓度 65nm/L; 非特异性结合孔加 50 μ L 纯品皮质酮 (Sigma), 终浓度 65 μ m/L, 总结合孔加 50 μ L Hank's 液, 总反应体积为 200 μ L。各样品均做六复孔孵育, 非特异性结合和总结合各三孔, 样品和试剂加完后, 21 °C 孵育 3h。

1.5 GCR 含量的检测和计算

孵育结束后, 将 96 孔板迅速转入冰水浴中终止反应。立即用多头细胞收集器, 经 49 型玻璃纤维滤膜减压抽滤, 以冰冷的 0.01mol/L PBS 冲洗, 将细胞收集于滤膜上, 时间控制在 30s 以内。滤膜干燥后, 放入 3.5mL 闪烁液中, 用 LKB-1214 自动液体闪烁计数器测定样品的 counts/min 值。总结合孔 counts/min 值减去非特异性结合孔 counts/min 值为特异性结合 counts/min 值, 按公式 [3] 将特异性结合孔 counts/min 值转换为 fmole/ 3×10^6 细胞, 算出各组小鼠脾细胞的 GCR 含量。

1.6 统计学处理

采用 student's *t* 检验。

2 结果

2.1 低剂量 X 射线照射对 GCR 表达的影响

25、50、75、100mGy X 射线全身照射后 8h, 检测小鼠脾细胞 GCR 表达的变化。结果表明, 25、50、75mGy 照射后 8h, GCR 表达均明显下降, 与对照组比较均有显著性差异 ($p < 0.05 \sim p < 0.01$), (见表 1)。

Tab.1 GCR expression in mouse splenocytes at 8h after whole body irradiation with low dose X-rays

Irradiation dose /mGy	GCR expression/fmol·(3×10 ⁶ cells) ⁻¹
0	14.50±2.96
25	7.52±4.96 ^[1]
50	9.50±2.38 ^[1]
75	6.86±3.51 ^[2]
100	14.35±2.01

Animol number $n=5$, $\bar{x} \pm s$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ vs control group

Tab.2 Time course of GCR expression in mouse splenocytes after irradiation with 75mGy X-rays

Time after irradiation /h	GCR expression/fmol·(3×10 ⁶ cells) ⁻¹
Sham irradiation	11.79±3.90
2	13.59±7.66
4	10.67±3.62
8	6.48±1.74 ⁽¹⁾
12	15.85±7.00
18	14.10±6.17
24	25.79±12.81 ⁽¹⁾

Animal number $n=5$, $\bar{x} \pm s$, ⁽¹⁾ $p < 0.05$ compared with control group

2.2 75mGy X 射线照射后 GCR 表达的时程变化

75mGy X 射线全身照射后 2~24h, 检测 GCR 表达的变化, 结果显示, 照射后 4h GCR 表达开始下降, 照射后 8h, GCR 表达明显下降, 与对照照射组比较差异显著 ($p < 0.05$)。照射后 24h GCR 表达明显升高, (见表 2)。

3 讨论

低剂量电离辐射全身照射可增强机体的免疫功能已被许多研究所证实^[4]。但在体外实验中, 低剂量辐射直接照射小鼠脾细胞不能产生整体实验中所观察到的 Con A 刺激的增殖反应增强现象^[5]。说明低剂量全身照射的免疫增强效应除了产生于照射直接对免疫系统的影响外, 照射对机体的调节系统即神经内分泌系统的影响可能在其中发挥重要作用, 尤其是 HPA 轴的调节作用。已有研究证实^[2], 低剂量电离辐射全身照射下调 HPA 轴功能, 血清中糖皮质激素(皮质酮)水平降低。糖皮质激素对免疫系统的作用是抑制免疫功能, 其效应是通过 GCR 实现的。低剂量电离辐射全身照射后 GCR 表达有何变化尚未见报道。本研究结果显示, 25、50、75mGy X 射线全身照射后 8h GCR 表达均明显降低, 说明低剂量 X 射线全身照射可下调 GCR 表达。提示低剂量电离辐射可能在下调 HPA 轴功能使血清中糖皮质激素(皮质酮)水平降低的同时又降低了免疫器官细胞的 GCR 表达, 从而减轻 HPA 轴对免疫系统的抑制作用, 间接促进了机体免疫功能的增强。此外, GCR 是激素依赖的转录因子。它可通过蛋白与蛋白相互作用干扰 AP-1、NF- κ B、Oct-1 等转录因子与它们在 IL-2 基因增强子上的位点结合^[6~8], 干扰 IL-2 基因的转录而抑制免疫功能。低剂量电离辐射下调 GCR 的表达, 也可能通过间接促进 IL-2 基因的转录而增强机体的免疫功能。GCR 在低剂量电离辐射增强机体免疫功能效应中的作用值得深入探讨。

参 考 文 献

- 1 McEwan I J, Wright A P, Gustafsson J A. *Bioessays*, 1997, 19(2):153-160
- 2 Liu S Z, Zhao Y, Han Z B *et al.* *Chin J Radiol Med Prot* (in Chinese), 1994, 14(1):11-14
- 3 Lu B Z, Tian Y. *An Introduction to Receptors* (in Chinese). Beijing: Science Press, 1991, 32-35
- 4 Liu S Z, Zhao Y, Han Z B *et al.* *Chin J of Radiol Med Prot* (in Chinese), 1995, 15(4):217~222
- 5 Liu W H, Liu S Z. *J Norman Bethune Univ of Med Sci* (in Chinese), 1989, 15(4):331-334
- 6 Barrett T J, Vig E, Vedeckis W V. *Biochemistry*, 1996, 35(30):9746-9753
- 7 Scheinman R I, Gualberto A, Jewe C M *et al.* *Mol-Cell-Biol*, 1995, 15(2):943-953
- 8 Gottlicher M, Miner J N, Yoshinaga S K *et al.* *Steroids*, 1996, 61(4):257-262

EFFECT OF WHOLE BODY IRRADIATION WITH LOW DOSE X-RAYS ON EXPRESSION OF GLUCOCORTICOID RECEPTOR IN MOUSE SPLENOCYTES

LUO Can FU Shibo JU Guizhi

(*MH Radiobiology Research Unit Norman Bethune University of Medical Sciences,
Changchun 130021*)

ABSTRACT In this study, the effect of whole body irradiation (WBI) with different low doses of X-rays on the expression of Glucocorticoid receptor (GCR) in mouse splenocytes and the time course of GCR expression after WBI with 75mGy X-rays were observed using the radioactive ligand binding assay. Results showed that the GCR expression in mouse splenocytes decreased significantly 8h after WBI with 25, 50 and 75mGy X-ray irradiation, and in the case of 75mGy, the GCR expression began to decrease 4h after irradiation. Based on the fact that WBI with low doses of X-rays could reduce GCR expression in mouse splenocytes, it suggested that the down-regulated GCR expression may play a role in the enhancement of immune effect caused by low dose radiation.

KEYWORDS GCR, Splenocytes, X-rays, Low dose radiation

CLC R811.5

Supported by the National Natural Science Foundation of China (39170275)