

小剂量电离辐射增强小鼠免疫器官 c-fos 基因的表达

万虹 刘树铮

(白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室 长春 130021)

摘要 应用原位杂交方法观察 75 mGy X 射线全身照射后不同时间小鼠胸腺、脾、肠系膜淋巴结 c-fos 基因 mRNA 转录水平的变化。结果发现, 假照组胸腺、脾、肠系膜淋巴结内巨噬细胞、多突起细胞、部分淋巴细胞(主要为大淋巴细胞) c-fos mRNA 有低水平基础表达; 75 mGy 全身照射后 c-fos 的转录水平明显增高, 胸腺为 1 h 达峰值, 脾脏 2 h 达峰值, 肠系膜淋巴结变化幅度较小, 但持续时间较长。胸腺和脾脏阳性细胞 12 h 基本恢复至假照水平, 而淋巴结细胞 c-fos 至照后 12 h 仍稍高于对照组。实验结果表明, 小剂量电离辐射可使免疫活性细胞 c-fos 的转录水平上调。

关键词 小剂量照射, c-fos 转录水平, 原位杂交

以往的实验证明, 小剂量电离辐射可提高机体的免疫力, 诱导机体的适应性反应^[1], 促进胸腺和脾淋巴细胞的信息传递过程^[2]。曾用胸腺和脾组织提取 mRNA 的点杂交法观察到照射后 c-fos 和 c-jun 表达上调^[2]。为了观察免疫器官中不同细胞 c-fos 的表达, 本实验应用原位杂交技术, 观察小剂量照射后不同时间 c-fos mRNA 转录水平的变化。

1 材料与 方法

1.1 动物与处理

实验用雄性健康昆明小白鼠, 由白求恩医大实验动物部提供, 体重 20 ± 2 g。动物随机分为: 正常对照组、方法对照组和照射组。

1.2 照射条件

采用 Philips 深部 X 光机, 电流 10 mA, 电压 200 kV, 滤过板 0.5 mm 铜和 1.0 mm 铝。靶皮距离 212 cm, 剂量率 12.5 mGy/min, 累积剂量 75 mGy。照射后 15、30 min 和 1、2、4、8、12 h 分 7 批处死动物。正常对照组进行假照射。

1.3 标本制备

水合氯醛麻醉小鼠后, 行心脏插管, 先灌 37℃ 生理盐水, 再灌入 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液, 取胸腺、脾和肠系膜淋巴结置同样的固定液内后固定 6 h, 于 20% 蔗糖溶液内过夜, 置于干冰-丙酮浴中骤冷, 入恒冷箱中冰冻后切片, 片厚 12 μ m, 以冷风吹干, 置 -70℃ 冰箱中备用。

1.4 原位杂交组织化学方法^[3]

从 -70℃ 冰箱中取出切片, 以冷风吹干, 用 PBS 冲洗, 吸干后滴加蛋白酶 K (25 μ g/ml, Sigma), 37℃ 下静置 15 min, 以 4% 多聚甲醛室温下固定 5 min, 凉干后滴加杂交液, 覆盖蜡

膜，湿盒中 50℃ 保温 2 h。杂交液的组成见文献[4]。杂交后，滴加胶体金标链亲合素（终浓度 1 mg/ml），室温放置 15 min，然后在 37℃下，用大容积洗脱液 I（2×SSC，0.1% Triton X-100）和洗脱液 II（0.1×SSC，0.1% Triton X-100）分别振荡冲洗 30 min，银显影放大金颗粒显示杂交结果。甲基绿衬染，然后脱水、透明、封片、镜检。

1.5 方法对照

用 25 μg/ml RNA 酶预处理切片 30 min，使组织中的 mRNA 预先被 RNA 酶水解，然后再进行杂交，操作同 1.4。

1.6 杂交结果图像分析仪定量分析

用 CMIAS-007 全新型多功能真彩色病理图像分析系统，对金颗粒进行定量分析，测定平均光密度(M.O.D)值。

1.7 邻片标本 HE 染色作定位分析

2 结 果

由表 1 可见，正常组胸腺、脾、肠系膜淋巴结细胞内 c-fos mRNA 均有低水平基础表达。邻片 HE 染色定位分析证明，胸腺、脾、肠系膜淋巴结内的巨噬细胞、多突起细胞和部分淋巴细胞（主要为大淋巴细胞）均呈 c-fos 反应阳性，方法对照组为反应阴性。

Tab 1. Changes of c-fos mRNA level in thymus, spleen and lymph node after whole body irradiation (WBI) with 75 mGy X-rays

Time after irradiation	Mean optical density		
	Thymus	Spleen	Lymph node
Sham-irrad.	0.18±0.02 ⁽¹⁾	0.18±0.04	0.17±0.08
15 min	0.20±0.03	0.21±0.02	0.18±0.02
30 min	0.20±0.04	0.23±0.04	0.24±0.06
1 h	0.33±0.05 ⁽²⁾	0.27±0.05 ⁽¹⁾	0.25±0.07
2 h	0.28±0.07 ⁽¹⁾	0.31±0.03 ⁽²⁾	0.25±0.04
4 h	0.23±0.03 ⁽¹⁾	0.28±0.07	0.26±0.04
8 h	0.21±0.03	0.23±0.04	0.25±0.03
12 h	0.19±0.04	0.19±0.05	0.26±0.02

$\bar{x} \pm s, n = 4$
(¹⁾ $p < 0.05$ (²⁾ $p < 0.01$ vs Sham-irrad. groups

表中也表明，75 mGy 全身照射后，胸腺、脾和肠系膜淋巴结细胞内 c-fos mRNA 水平明显增高，在胸腺内 1 h 达峰值，脾脏内 2 h 达峰值，肠系膜淋巴结 c-fos 表达水平稍有增高(数值在统计学上不显著)。胸腺和脾细胞的 c-fos 表达水平于 12 h 均基本恢复至假照射水平，而淋巴结细胞内 c-fos 持续有较小幅度升高，至 12 h 仍未完全回复至假照水平。邻片 HE 染色观察可见，胸腺、脾、肠系膜淋巴结内的巨噬细胞、多突起细胞和部分淋巴细胞(主要为大淋巴细胞) c-fos 阳性显示更明显(见照片 1，2，3)。

3 讨 论

实验应用原位杂交方法，通过图像分析仪定量研究和邻片 HE 染色定位分析表明，75 mGy 全身照射，可使免疫细胞 c-fos 基因表达增强，且主要发生在巨噬细胞、多突起细胞和部分淋巴



Fig 1. Expression of c-fos mRNA in murine lymphoid organs

The positive cells with c-fos mRNA in the lymphoid organs were filled with densely arranging black granules after 75 mGy whole body X-irradiation (background staining with methyl green, 10×10)

(1) Thymus (2) Spleen (3) Mesenteric lymph node

细胞。c-fos 属即刻早期基因, 参与正常细胞增殖的调控, 为细胞信息传递过程中的第三信使, 促进 DNA 合成上调, 细胞周期进程加快。本实验室以往的研究表明, 小剂量 X 射线和 γ 射线单次全身照射能增强人或动物的免疫反应^[3], 且多数免疫功能指标在 75 mGy 全身照射时反应最为明显。众所周知, 免疫细胞的活化必须经过信息传递过程, 其中蛋白激酶 C (PKC) 的激活、 $[Ca^{2+}]_i$ 的增高、即刻早期基因的表达是免疫细胞活化的重要环节。曾报道 75 mGy 全身照射后 T 淋巴细胞的 PKC 活性显著升高^[2], 并用流式细胞术分析证明, 75 mGy 全身照射使胸腺细胞 TCR 和 CD₃ 阳性细胞百分数增高, 丝裂原或表面抗原单抗作用下动员 $[Ca^{2+}]_i$ 的反应增强^[1-3], 说明小剂量照射可促进信息传递, 使 DNA 合成加快, 促进细胞的增殖, 免疫活性增加。

从表中可见, 胸腺细胞 c-fos mRNA 的水平 1 h 达峰值, 脾脏 2 h 达峰值, 肠系膜淋巴结变化比较平稳。说明不同的免疫器官对小剂量照射反应的敏感性不同。胸腺为中枢免疫器官, 是 T 淋巴细胞成熟和分化的场所, T 淋巴细胞在此成熟后, 被输送到周围免疫器官脾脏和淋巴结。本实验中发现胸腺细胞 c-fos mRNA 的峰值明显先于脾脏, 提示胸腺细胞对小剂量辐射的敏感性高于脾脏。

应当指出, 以往用点杂交检测胸腺和脾脏 mRNA 提取物中 c-fos 和 c-jun 的表达时, 发现昆明小鼠全身 75 mGy 照射后 c-fos 转录水平于照射后 12 h 达峰值^[7]。而本实验中应用原位杂交方法检测免疫器官不同细胞 c-fos 的表达, 发现胸腺和脾巨噬细胞、多突起细胞中 c-fos 转录水平于 1~2 h 即达高峰, 12 h 已回复至对照水平。上述 c-fos mRNA 转录水平变化时程的差别, 可能与采用的方法不同有关。点杂交实验用整个器官的 RNA 提取物, 杂交前未经电泳分离, 而原位杂交测定每个细胞的 mRNA 转录水平, 生物素标记探针与胶体金标链亲和素结合后, 又经银显影放大, 其敏感性与特异性较高。不同细胞 c-fos 表达的时序值得进一步研究。另外在碱性磷酸酶标记的 Fos 蛋白免疫组化研究中发现, 75 mGy 全身照射后免疫细胞核内 Fos 蛋白的表达也明显增加(待发表), 照射后 12 h 仍在增加, 这与本实验的结果是相吻合的。至于小剂量照射对其它转录基因表达的影响, 以后将报道。

参 考 文 献

- 1 刘树铮等. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12: 299
- 2 Liu Shuzheng et al. Int. J. Occupat. Med. Toxicol., 1994, 3(2): 107
- 3 何 彬等. 解剖学杂志, 1992, 15(4): 297
- 4 苏慧慈. 原位杂交, 中国科学技术出版社, 1994, 72—73
- 5 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1987, 7(4): 241
- 6 刘树铮等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12(1): 61
- 7 刘树铮. 低水平辐射兴奋效应, 第1版, 北京: 科学出版社, 1996, 307~309

ENHANCED EXPRESSION OF c-fos PROTOONCOGENE IN MOUSE LYMPHOID ORGANS FOLLOWING LOW DOSE RADIATION

Wan Hong Liu Shuzheng

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

ABSTRACT In situ hybridization was used to examine the expression of c-fos mRNA in mouse thymus, spleen and lymph node following whole body irradiation (WBI) with 75mGy X-rays. The results showed that the basal expression of c-fos mRNA in macrophages, interdigitating cells and some large lymphocytes of thymus, spleen and mesenteric lymph node was markedly enhanced after WBI with 75mGy X-rays. The expression of c-fos mRNA in the thymus and spleen reached its peak 1 h and 2 h after irradiation respectively and both returned to the sham-irradiated level 12 h after irradiation. However, the increase in expression of c-fos mRNA in the lymph node was not so marked but lingered longer after irradiation. The implications of these findings were briefly discussed in connection with our previous data.

KEYWORDS Low dose radiation, Protooncogene, c-fos, In situ hybridization