

p53和Bcl-2/Bax在辐射诱导胸腺 细胞凋亡中的作用^[20]

苏旭 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 130026)

摘要 采用流式细胞术对昆明小鼠接受75mGy和2Gy X射线全身照射后, 胸腺细胞内细胞凋亡相关基因p53、Bcl-2和Bax蛋白的表达进行了比较研究。结果表明, 75mGy X射线全身照射后24h, p53基因蛋白产物的表达显著降低($P < 0.005$), 而2Gy X射线全身照射后24h, p53基因蛋白表达则显著增高($P < 0.005$)。75mGy X射线全身照射后24h, Bcl-2/Bax比值明显增加($P < 0.05$)。而2Gy X射线全身照射组, Bcl-2/Bax比值无明显变化。提示: p53和Bcl-2/Bax在辐射诱导的胸腺细胞凋亡中起着重要作用。

关键词 p53, Bcl-2, Bax, 细胞凋亡, 电离辐射, 流式细胞术(FCM)

近年来大量的研究表明, 0.1Gy以下的剂量全身照射可引起一系列的免疫增强效应。其中以75mGy X射线全身照射后T淋巴细胞的反应最为明显^[1,2], 75mGy X射线全身照射可促进胸腺细胞的成熟、分化和细胞内的信息传递过程^[3]。辐射诱导胸腺细胞凋亡剂量效应关系并非线性, 在一定条件下出现J型曲线, 在全身照射和离体照射下均曾观察到这一现象^[4,5]。即200mGy以上剂量电离辐射照射后, 凋亡呈剂量依赖性增加, 而200mGy以下剂量辐射则不增加甚至降低凋亡, 但此种J型曲线发生的分子机制尚待阐明。本研究采用间接免疫荧光流式细胞术(FCM)对75mGy和2Gy X射线全身照射后, 细胞凋亡相关基因p53、Bcl-2和Bax蛋白的表达进行了检测, 为揭示小剂量辐射免疫增强效应和J型曲线发生的分子机制提供初步的实验数据。

1 材 料 和 方 法

1.1 动物和细胞

雄性健康昆明小鼠, 体重 20 ± 2 g, 购自白求恩医科大学实验动物部。随机分组后进行假照射(对照)、75mGy和2Gy全身照射。照射后24h断头处死, 取3只动物胸腺制备一份细胞悬液样品, 每组5个样品。

[20] 国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿: 1996-09-09, 修回 1996-10-21

1.2 照射

用 Philips X 射线深部治疗机进行全身照射。电压 200kV，电流 10mA，过滤板 0.5mmCu 和 1.0mmAl。⁷⁵mGy 组：靶皮距 212cm，剂量率 12.5mGy/min。²Gy 组：靶皮距 50cm，剂量率 0.287Gy/min。

1.3 基因蛋白表达的检测

采用间接免疫荧光流式细胞术检测。仪器为 FACScan 流式细胞仪(Bccton－Dickinson，USA)。细胞悬液浓度为 1×10^7 /ml，每份样品取细胞悬液 200 μ l(2×10^6 细胞)，75%冷乙醇固定，过夜，0.01mol/LPBS 清洗 2 次，加 4 μ l 第一抗体 McAb－p⁵³(McAb－Bcl－2 或 McAb－Bax) (Santa Cruz Biotechno－logy· Inc，USA)，4 $^{\circ}$ C 反应 45min，0.01mol/LPBS 清洗 2 次，加第二抗体 Goat Anti－mouseIgG－FITC(Research Product Division，Gainthersburg，MD，USA) 20 μ l(1:100 稀释)，4 $^{\circ}$ C 反应 45min，0.01mol/L PBS 清洗 2 次。每一样品均设非特异对照，以 PBS 代替第一抗体，其余步骤同上。流式细胞术检测和分析，记录阳性细胞百分率，减去非特异对照值。

1.4 统计学处理

t 检验。

2 结 果

2.1 p⁵³ 基因蛋白的表达

用间接免疫荧光流式细胞术检测假照射组(对照组)、⁷⁵mGy 和 ²GyX 射线全身照射后 24h 小鼠胸腺细胞 p⁵³ 基因蛋白(基因产物) 表达阳性的细胞百分率，减去非特异对照值。结果表明：⁷⁵mGy X 射线全身照射后 24h，p⁵³ 基因蛋白的表达显著降低($P<0.005$)。表现为 p⁵³ 阳性细胞数的百分率显著减少；而 ²Gy X 射线全身照射后 24h，p⁵³ 基因蛋白表达则显著降低($P<0.005$) (见表 1)。

Tab. 1 Expression of p⁵³ protein and changes in Bcl－2/Bax ratio 24 hours after X－irradiation $\bar{x}\pm s$

Sham－irrad	⁷⁵ mGy	^{2.0} Gy	
p ⁵³	8.09 $\pm$ 2.11	2.41 $\pm$ 1.57 ⁽²⁾	15.59 $\pm$ 3.38 ⁽²⁾
Bcl－2	51.95 $\pm$ 4.23	63.81 $\pm$ 11.32	78.76 $\pm$ 9.39 ⁽²⁾
Bax	53.29 $\pm$ 3.53	49.86 $\pm$ 2.89	73.13 $\pm$ 4.03 ⁽²⁾
Bcl－2/Bax	0.98 $\pm$ 0.05	1.29 $\pm$ 0.29 ⁽¹⁾	1.08 $\pm$ 0.11

n=5 (1) $P<0.05$ (2) $P<0.005$ vs sham－irradgroup

2.2 Bcl－2 和 Bax 基因蛋白的表达

用以上同样方法检测假照射(对照组)、⁷⁵mGy 和 ²Gy X 射线全身照射后 24h，小鼠胸腺细胞 Bcl-2 和 Bax 基因蛋白表达阳性的细胞百分率，减去非特异对照值。结果表明：⁷⁵mGy X 射线全身照射后 24h，Bcl-2/Bax 比值显著高于假照射组($P<0.05$)；而 ²Gy 照射组无明显变化($P>0.05$) (见表 1)。

3 分析和讨论

野生型 p53 基因是一个重要的抑癌基因,它直接参与细胞分化和增殖的调控。当野生型 p53 基因发生突变、丢失、灭活时,将会导致恶性肿瘤的发生。正常的 p53 基因产物半衰期短(约 3h),突变后的 p53 基因,其蛋白产物发生构型上的改变,半衰期明显延长,稳定性增强,在细胞内发生堆积,含量增高。因此,采用 McAb-p53 进行 p53 基因蛋白表达的检测时,所得结果往往反映的是突变性 p53 基因蛋白表达的变化。在多种肿瘤中都发现 p53 基因蛋白产物表达增高。近年的研究发现,在大剂量电离辐射诱导细胞凋亡的过程中^[1-5],p53 基因蛋白表达显著增加^[6],说明 p53 参与辐射诱导的细胞凋亡。近年的研究表明;0.5Gy 以上的辐射可明显诱导胸腺细胞凋亡,而小剂量(<0.1Gy)辐射可抑制凋亡,尤其以 50~75mGy 最为显著。其剂量效应关系呈 J 型曲线。还证实剂量辐射具有抑制肿瘤生长的作用^[7]。本结果表明,75mGy X 射线全身照射可使突变型 p53 基因蛋白表达显著降低($P<0.005$),该结果对探讨小剂量辐射免疫增强效应和小剂量辐射抑瘤作用的分子机制具有重要意义。2Gy X 射线全身照射后,p53 基因蛋白表达增强,再次证明了 p53 参与了辐射诱导细胞凋亡的调控。

Bcl-2 基因最初是在淋巴瘤细胞第 14 和 18 号染色体异位断裂点 t(14,18)(q31~q21)分离获得^[8]。编码 26kD 的蛋白定位于线粒体膜、核膜和内质网^[9],能在各种不同的正常组织和细胞(如 T 细胞、B 细胞和造血细胞)的激活过程中表达。随着研究的深入,人们发现:基因 Bcl-2 的过度表达抑制细胞凋亡。Bcl-2 蛋白的活性被一个与其同源的 21kD 的蛋白质 Bax 调节。Bax 以二聚体形式存在于细胞中,它也可与 Bcl-2 结合成异二聚体,而使 Bcl-2 失去活性,所以 Bax 和 Bcl-2 的比例改变可调节 Bcl-2 的作用。本研究发现:75mGy X 射线全身照射可使 Bcl-2/Bax 比值上调($P<0.05$)。进而抑制细胞凋亡。

以上结果提示:p53、Bcl-2 和 Bax 参与了辐射诱导细胞凋亡的调控。小剂量辐射全身照射使 p53 基因蛋白产物表达显著降低,Bcl-2/Bax 比值上调,该结果为揭示小剂量辐射免疫增强效应、小剂量辐射抑瘤作用和 J 型曲线发生的分子机制提供了初步的实验依据。同时对阐明辐射诱导细胞凋亡信息传递通路具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 刘树铮.核技术,1994,17(6):381
- 2 刘树铮,刘伟宏,齐进等.中华放射医学与防护杂志,1992,12(5):299
- 3 Liu Shu-Zheng, Su Xu, Zhang Ying-Chun, Zhao Yong. International J Occupational Medicine and Toxicology. 1994, 3(2):107
- 4 苏旭,张迎春,刘树铮.辐射研究与辐射工艺学报,1995,13(2):126
- 5 Liu Shuzheng, Zhang Yingchun, Mu Ying, Liu Jianxiang. J Norman Bethune University of Medical Sciences, 1995, 21(6):551
- 6 Lowe S W, Shmitt E M, Smith S W, Osborne B A, Jacks T. Nature, 1993, 362(6423):847
- 7 李修义,陈玉丙,夏凤琴,刘树铮.中国辐射卫生,1996,5(1):21
- 8 Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, Nowell P C, Croce C M. Science, 1984, 30, 226(4678):1097
- 9 Korsmeyer S J. Immunology Today, 1992, 13(8):25

THE EFFECTS OF p^{53} AND $Bcl-2/Bax$ ON APOPTOSIS OF THYMOCYTES INDUCED BY IONIZING RADIATION

Su Xu Wan Hong Lui Shuzheng

(*MH Radiobiology Research Unit, Changchun, 130021*)

ABSTRACT Kunming mice were whole-body irradiated (WBI) with ^{75}mGy and 2Gy X-rays. The expression of p^{53} , $Bcl-2$ and Bax proteins was analyzed with flow cytometry. It was found that the expression of p^{53} protein showed, significantly decreased ($p < 0.005$) 24 hours after WBI with ^{75}mGy X-rays and significantly increased ($p < 0.005$) after WBI with 2Gy X-rays. The ratio of $Bcl-2/Bax$ was significantly increased ($p < 0.05$) 24 hours after WBI with ^{75}mGy X-rays and not significant changed after WBI with 2Gy . The change in expression of p^{53} and $Bcl-2/Bax$ ratio WBI with ^{75}mGy and 2Gy X-rays may give partial explanation to the inhibitory effect of low dose radiation on thymocyte apoptosis. The results suggested that p^{53} and $Bcl-2/Bax$ play an important role on apoptosis of thymocytes induced by ionizing radiation.

KEYWORDS p^{53} , $Bcl-2$, Bax , Apoptosis, Ionizing radiation, Flow cytometry (FCM)

(上接第 126 页 Continued from p126)

STUDY ON PLASMA SURFACE MODIFICATION OF CHITOSAN MEMBRANES AND THEIR PERMEABILITIES

Fang Yue'e Wang Huanting¹ Shi Tianyi¹

(*Department of Applied Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026*)

Zhang Jianxiang Tang Jian Xu Bin Cai Keqin

(*Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230072*)

ABSTRACT In glow discharge, Chitosan membrane was modified by depositing plasmopolymer of petroleum ether onto chitosan membrane surface. The thermal stability, hydrophilicity and mechanical properties of the modified membranes were studied. The permeation rates and permeation coefficients of creatinine, urea and uric acid through the chitosan membrane and modified membranes were researched.

KEYWORDS Chitosan membrane, Plasma modification, Permeability

¹Department of Materials Science and Engineering, University of Science and Technology of China