

低剂量 X 射线照射对 J774A.1 细胞 IL-12 和 p38 MAPK 表达的影响

刘晓冬 刘树铮 马淑梅 刘 扬

(吉林大学白求恩医学部卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 通过检测低剂量辐射(LDR)对 J774A.1 细胞株中白细胞介素 12(IL-12)及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)的影响,以研究 LDR 辐射免疫效应的机制。分别采用流式细胞术和 ELISA 检测了 p38 MAPK、IL-12 蛋白水平的变化。结果表明,75mGy X 射线照射后,J774A.1 细胞分泌 IL-12 量在照射后 2、4、8h 升高($p < 0.05$),随后即开始下降至恢复假照射水平;而 p38 MAPK 也于照射后 2h 出现升高,两者在发生时间上呈现一致性。结果显示 LDR 引起 IL-12 表达增加,而 p38 MAPK 传导通路可能在其中发挥作用,为低剂量辐射增强细胞免疫功能提供了实验依据。

关键词 LDR, 辐射兴奋效应, IL-12, p38 MAPK

中图分类号 R811

低剂量照射(LDR)可促使免疫反应上调,该过程涉及一系列细胞和分子变化,可表现为通过细胞间直接作用或通过细胞因子间接参与调控。在免疫调控过程中,IL-12 发挥着重要作用。IL-12 是一种主要由抗原提呈细胞分泌的由 p35 和 p40 两个亚基组成的异源二聚体,其功能体现在促使辅助性 T 细胞(T_H)向 T_H1 型细胞分化,同时增强 T 细胞、NK 细胞活性,诱导 B 细胞增殖和分化,并可介导抗肿瘤作用。p38 MAPK 是蛋白质激酶超家族中的一员,可调节炎症反应包括细胞因子分泌和细胞凋亡。已往整体研究发现,LDR 可诱导昆明小鼠腹腔巨噬细胞中 IL-12 表达上调^[1],但其活化机制尚不清楚。本工作拟通过离体实验观察电离辐射对 IL-12 和 p38 MAPK 的影响来研究 p38 MAPK 信号传导通路在 IL-12 活化过程中的作用,旨在进一步探讨低剂量辐射诱导细胞免疫增强的分子机理。

1 材料和方法

1.1 细胞株

J774A.1 细胞为小鼠巨噬细胞株,本室保存。

1.2 主要试剂和仪器

Purified Rabbit anti-mouse-p38 MAPK 抗体(Centa Cruz 公司),anti-Rabbit IgG-FITC 荧光抗体(苏州生物医学公司),Purified anti-mouse-IL-12/P70McAb(一抗)、Biotin-anti-mouse-IL-12/P70McAb(二抗)及标准品 rmIL-12(Pharmingen,加拿大),LPS(Sigma,美国),流式细胞仪(美国 B-D 公司),550 型酶标仪(BIO-RAD,美国)。

1.3 照射条件

用国产 X.S.S.250(FZ)型固定式 X 射线深部治疗机,电压 200kV、电流 10mA、滤板

国家自然科学基金(37570188)资助

第一作者:刘晓冬,男,1972 年 2 月出生,2002 年 7 月博士毕业于吉林大学白求恩医学部,讲师,从事放射分子免疫研究
收稿日期:初稿 2002-01-11, 修回 2002-02-14

0.5mm Cu、1.0mm Al、靶皮距 273cm,吸收剂量率为 12.5mGy/min。

1.4 p38 MAPK 蛋白表达的测定

采用免疫荧光抗体流式细胞术, 每组各不同时间点设 5 个样品($n=5$)。照射前至少 12h 取 5×10^6 细胞种入培养瓶, 每瓶 10mL, 培养体系为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 37℃, 5%CO₂。75mGy 照射后设 2、4、8、16、24、48h 组, 假照射组及照射组在收获细胞前 30min 加 LPS 至终浓度为 10μg/mL 刺激培养。用 0.25% 胰酶消化后, PBS 洗 2 次, 每份样品加入 p38 MAPK 一抗 50μL(1:100), 4℃反应 45min(同时每组以 PBS 替代一抗设非特异对照), PBS 洗 2 次, 加荧光标记二抗 50μL(1:100), 4℃反应 45min, PBS 洗 2 次后上机检测。用 FACSscan 软件收集 1×10^4 细胞, Lysis 软件分析资料, 记录阳性细胞百分率, 减去非特异对照值, 得出特异阳性细胞百分比。

1.5 IL-12 蛋白分泌的检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)。每组各不同时间点设 4 个样品($n=4$), 每个样品再设 2 个平行样。细胞培养及刺激同前, 照射后不同时间收取上清待用。用一抗包被过夜, 洗涤后加入阻断缓冲液室温孵育 2h, 洗涤后加入待测样过夜, 同时另设平行样加标准品做标准曲线。再加入二抗室温孵育 1h, 洗涤后加入链亲和素标记的辣根过氧化酶作用 30min, 用邻苯二胺(OPD)显色 5—10min, 在 490nm 处用酶标仪测定。所获 OD 值在标准曲线上查取相应的浓度。

1.6 统计方法

流式分析、ELISA 结果各组均数比较采用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 LDR 对 IL-12 分泌的影响

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法检测 IL-12 蛋白分泌, 图 1 为 IL-12 标准曲线。图 2 显示为 75mGy X 射线照射后细胞上清中 IL-12 分泌量的变化, 横坐标轴为所测 OD 值经标准曲线查取所获得的相应的浓度。可见, 在照射后 2—8 h IL-12 分泌显著增加, 尤其 2h 明显($p<0.01$)。

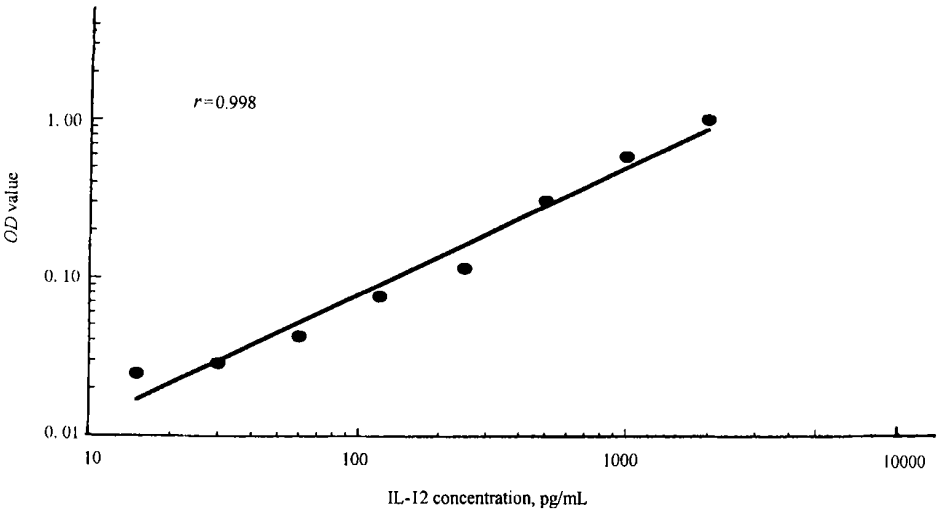


Fig.1 Standard curve for IL-12 secretion by ELISA($Y = -2.264 + 0.695X$, $r = 0.998$)

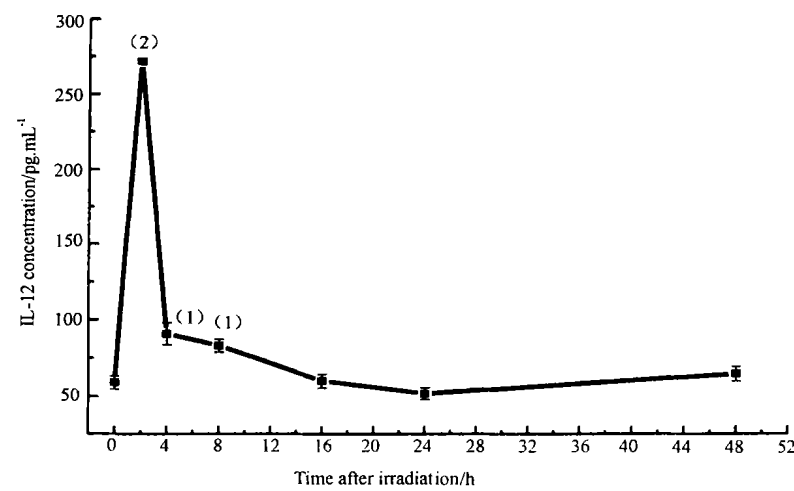


Fig.2 Time course changes of IL-12 secretion after 0.075Gy X ray irradiation in stimulated J774A.1 cell line
 $n=4$, $(1)p<0.05$, $(2)p<0.01$ vs sham-irradiation

2.2 LDR 对 p38 MAPK 表达的影响

图 3 显示为 75mGy X 射线照射后细胞 p38 MAPK 表达的变化,可见照射后 2 h p38 MAPK 表达显著增加,随后逐渐下降,虽有所反复,但无统计学意义。

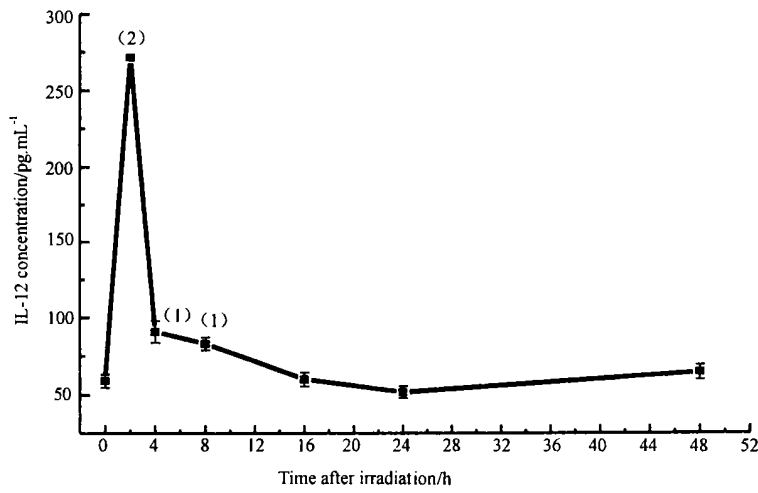


Fig.3 Time course changes of p38 MAPK expression after 0.075Gy X ray irradiation in stimulated J774.1 cell line
 $n=5$, $(2)p<0.01$ vs sham irradiation

3 讨论

IL-12 是由 p35、p40 两个亚基组成的异源二聚体细胞因子,其作用于 NK、T 细胞上的受体后可使受体细胞发生一系列蛋白质分子酪氨酸磷酸化,进而使其活化发挥生物学作用。近年来有关 IL-12 生物学效应的研究成为热点,尤其利用 IL-12 进行肿瘤治疗,但 IL-12 具体的作用机制仍有待进一步阐明。本研究拟通过离体实验观察电离辐射对 IL-12 和 p38 MAPK 的影响来研究 p38 MAPK 信号传导通路在 IL-12 活化过程中的作用,旨在进一步探讨低剂量辐射诱导细胞免疫增强的分子机理。

通常信号传导包括有 JAK/STAT 和 MAPK 通路,以往研究都认为 IL-12 的信号传导是利用 JAK/STAT 途径而实现的^[2,3]。但 Zhang 等^[4]发现,该过程也涉及 p38 MAPK 的激活。同时, Aicher A 等^[5]观察到 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可以从 mRNA 及蛋白水平阻断 CD40 诱导的 IL-12 p40 在树突状细胞中的产生,直接和间接的证据均提示 p38 MAPK 在 IL-12 活化过程中可能具有重要的作用。

已往研究发现^[1],LDR 可诱导 IL-12 表达上调,在本实验对 J774A.1 细胞株的研究中也发现了 IL-12 表达上调,在照射后 2-8h IL-12 分泌显著增加,尤其 2 h 明显。而 p38 MAPK 也于照射后 2h 发生显著升高,随后即恢复正常,大概其发生改变的时间比较早,这与 Dabrowski 等^[6]报道的紫外线 BC(UVB),辐射可引起胰泡细胞中 p38 MAPK 在照射后 30min 即发生早期激活,并于 3h 达到高峰的结果有类似之处。虽然 p38 MAPK 在 IL-12 信号传导中的作用尚无定论,但有研究认为^[7],p38 MAPK 至少可以促进 NF- κ B 核转位及其核结合活性,已知 IL-12 p40 亚基及小鼠 IL-12 p35、p40 亚基启动子上游均含有转录因子 NF- κ B、AP1 等结合位点^[8],是否 p38 MAPK 通过激活转录因子进而活化 IL-12 的表达,为我们提供了新的思路。

参 考 文 献

- 1 刘晓冬,刘树铮,马淑梅等. 辐射研究与辐射工艺学报,2001, **19**(4):283-288
LIU X D, LIU S Z, MA S M *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2001, **19**(4):283-288
- 2 Bacon C M, McVicar D W, Ortaldo J R *et al.* J Exp Med, 1995, **181**(1): 399-404
- 3 Jacobson N G, Szabo S J, Weber R M *et al.* J Exp Med, 1995, **181**(5): 1755-1762
- 4 Zhang S, Kaplan M H. J Immunol, 2000, **165**(3): 1374-1380
- 5 Aicher A, Shu G L, Magaletti D *et al.* J Immunol, 1999, **163**(11): 5786-5795
- 6 Dabrowski A, Tribillo I, Dabrowski M I *et al.* Z Gastroenterol, 2000, **38**(6): 469-481
- 7 Ingram A J, James L, Thai K *et al.* Am J Physiol Renal Physiol, 2000, **279**(2):F243-251
- 8 Tone Y, Thompson S A, Babik J M *et al.* Eur J Immunol, 1996, **26**(6):1222-1227

INFLUENCE OF LOW DOSE X RAYS IRRADIATION ON IL-12 AND p38 MAPK EXPRESSION IN J774A.1 CELL LINE

LIU Xiaodong LIU Shuzheng MA Shumei LIU Yang

(MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune Medical Center, Jilin University, Changchun 130021)

ABSTRACT To observe the effects of LDR on the p38 MAPK expression and the secretion of IL-12 in J774A.1 cell line, we used ELISA and flow cytometry to examine the changes in these two specialities. Results showed that IL-12 p70 in J774A.1 increased 2-8h after 75mGy X irradiation, and consistently, p38 MAPK expression increased at the 2nd h after exposure. Both of these increases showed statistic significance. Conclusions were drawn that LDR might stimulate IL-12 expression, and p38 MAPK might play some role in the activation of IL-12, which would provide theoretic basis for the hormesis effect of LDR.

KEYWORDS Low dose radiation, Radiation hormesis, IL-12, p38 MAPK,

CLC R811