

致死剂量 γ 射线照射小鼠脾淋巴细胞凋亡特征 及与 Bax 和 Bcl - X_L 表达的关系

崔玉芳 丁彦青 张莹 徐茵 靳巍 柳晓兰 董波 毛建平 毛秉智

【摘要】 目的 观察致死剂量 γ 射线照射后小鼠脾淋巴细胞凋亡特征及其与 Bax 和 Bcl - X_L 表达的关系。方法 清洁级 C57 小鼠 225 只,随机分为 0、6、9、12、15 和 20 Gy 6 个组,经 γ 射线全身一次照射,于照射前和照射后 6 h~28 d 活杀取材,用原位末端标记法(TUNEL)和 Annexin - V 流式细胞术(FCM)检测淋巴细胞凋亡和坏死情况,用碱性磷酸酶免疫组化技术检测 Bax 和 Bcl - X_L 蛋白的表达。结果 ①各剂量组小鼠外周白血细胞在照射后 6 h 出现一过性升高,以后迅速下降。6 Gy 照射后 7 d 降至最低,至照射后 28 d 基本恢复到正常水平。②不同剂量照射后 6 h 脾淋巴细胞凋亡率达高峰;照射后 6~24 h, ≤ 12 Gy 照射后凋亡率随照射剂量的增加而升高, ≥ 15 Gy 照射后凋亡率下降。③FCM 检测结果证实,6~12 Gy 照射后 6 h,脾淋巴细胞凋亡率呈现出量-效关系, ≥ 15 Gy 照射后凋亡率下降,而坏死率明显升高。DNA 凝胶电泳图谱分析支持上述结果。④照射后 6 h, 6 Gy 照射后脾淋巴细胞 Bax 蛋白表达增加,至 12 Gy 达峰值,显示出量-效关系; ≥ 15 Gy 未显示出量-效关系;Bcl - X_L 蛋白随照射剂量增加而持续降低,在 6~12 Gy 也显示出较好的量-效关系。**结论** 6~12 Gy 照射后脾淋巴细胞死亡方式以凋亡为主, ≥ 15 Gy 照射后凋亡与坏死均为淋巴细胞的重要死亡途径。促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl - X_L 在致死剂量照射引起的淋巴细胞凋亡调控中起重要作用。

【关键词】 辐射; 脾; 细胞凋亡; Bax; Bcl - X_L

Apoptotic characteristics of spleen lymphocytes in mice irradiated by lethal dose and its relationship to the expression of Bax and Bcl - X_L proteins CUI Yu - fang *, DING Yan - qing, ZHANG Ying, XU Han, JIN Wei, LIU Xiao - lan, DONG Bo, MAO Jian - ping, MAO Bing - zhi. * Department of Immunology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 **Objective** To observe the apoptotic characteristics of mouse spleen lymphocyte after lethal dose γ - irradiation and its relationship to the expression of Bax and Bcl - X_L proteins. **Methods** Two hundred and twenty - five second - grade C57 mice were randomly divided into six groups of 0, 6, 9, 12, 15 and 20 Gy. They were sacrificed by dislocation and samples were taken on 1 - 28 days after whole body single γ - irradiation. Lymphocyte apoptosis and necrosis were analyzed by TdT - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and flow cytometry (FCM) techniques. The expression of Bax and Bcl - X_L proteins were estimated by immunohistochemical method. **Results** ①The number of peripheral white blood cells of mice increased temporarily at 6 hours after radiation, thereafter, began to decrease rapidly, which reached the minimum on day 7 and recovered normal level basically one month after 6 Gy γ - irradiation. ②Apoptotic rate of spleen lymphocytes increased significantly, peaking at 6 hours after radiation, which was found to have a dose - response relationship during 6 - 24 hours after ≤ 12 Gy irradiation, but decreased after ≥ 15 Gy irradiation. ③It was confirmed by FCM that the apoptotic rate of spleen lymphocytes increased along with the elevation of radiation dose. However, the apoptotic rate began to decrease and the necrotic rate rose distinctively after ≥ 15 Gy irradiation. The analysis of DNA gel electrophoresis supported above - mentioned results. ④The expression of Bax protein in spleen lymphocyte enhanced at 6 hours after 6 Gy γ - irradiation and peaked by 12 Gy - irradiation, showing a dose - dependent pattern, but which was not be found after ≥ 15 Gy γ - irradiation. On the other hand, the expression of Bcl - X_L protein reduced persistently with the increase of radiation dose, and also presented a better dose - dependent effect after ≤ 12 Gy irradiation. **Conclusion** After 6 - 12 Gy γ - irradiation, the apoptosis is the major death way of spleen lymphocyte, while both necrosis and apoptosis are important death pathways after ≥ 15 Gy irradiation. Pro - apoptotic Bax and anti - apoptotic Bcl - X_L play an important role in the apoptotic regulation of spleen lymphocytes induced by lethal dose radiation.

【Key words】 irradiation; spleen; apoptosis; Bax; Bcl - X_L

基金项目:军队总后勤部“十五”科研基金资助项目(01L018,01MA075,02M010)

作者单位:100850 北京,军事医学科学院放射医学研究所(崔玉芳,张莹,徐茵,靳巍,柳晓兰,董波,毛建平,毛秉智);广州第一军医大学病理学教研室(丁彦青)

作者简介:崔玉芳(1953-),男(汉族),河南省南乐人,博士研究生,硕士研究生导师,研究员,主要从事放射病理、创伤病理和免疫病理学研究,获国家和军队科技进步二等奖以上成果 5 项,参编专著 5 部,发表论文 100 余篇。

现已证实,免疫组织属电离辐射高度敏感组织,其中,在小鼠中兼具造血和免疫功能的脾脏是高度辐射敏感性器官之一。以往的研究仅限于中、小剂量射线照射后脾脏的病理变化和损伤特点^[1-3],有关致死剂量(>8 Gy)照射后脾淋巴细胞凋亡的发生规律及其促凋亡和抗凋亡基因在其中的作用国内外文献均少见报道^[4]。本实验中重点研究致死剂量⁶⁰Co γ 射线照射后脾淋巴细胞凋亡和坏死特征及其与 Bax 和 Bcl - X_L 表达的关系,旨在为重度以上急性放射病的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂:原位末端标记(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(含标记缓冲液、TdT、Bio - dUTP、Converter - POD 工作液等)和钙结合蛋白 - V - 碘化丙啶(annexin - V - PI)试剂盒均购自德国宝灵曼公司。免疫组化检测凋亡相关蛋白所用的含生物素标记羊抗鼠 IgG 和碱性磷酸酶标记的链霉卵白素(SP - AP)试剂盒及抗 Bax、Bcl - 2 单抗均购自北京中山生物试剂有限公司。

1.2 实验动物与方法:清洁级 C57 纯系小鼠 225 只,雌雄各半,平均体重(20.00 ± 2.06)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,实验过程中饲养于本院二级动物房。将动物随机分为 0、6、9、12、15 和 20 Gy 6 个组,动物数分别为 40、50、36、33、33 和 33 只。各组动物均经⁶⁰Co γ 射线全身照射 1 次,照射量率为 2.13 Gy/min,动物距照射源 2.5 m。于照射前(0 h)及照射后 6 h、12 h、24 h、72 h、7 d、14 d 和 28 d 分别活杀取材。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 白细胞计数:于各时间点取小鼠尾静脉血进行白细胞计数。

1.3.2 细胞凋亡和坏死:于各时间点活杀小鼠取脾脏,用无血清培养液在冰上制取细胞悬液并制备离心涂片,固定后用不同方法检测。①细胞涂片经缓冲的甲醛-丙酮(BFA)液固定,使用 TUNEL 细胞凋

亡检测试剂盒检测。阳性对照采用试剂盒中的试剂进行,阴性对照不加一抗。其余实验步骤及检测标准均按说明书进行,每个样品计数 300 个细胞,计算淋巴细胞凋亡率。②细胞涂片经甲醇固定和麦格-吉姆萨(MGG)染色后,光镜下根据核浓集、染色质边集及凋亡小体等典型的形态学特征,观察凋亡淋巴细胞并至少计数 600 个细胞,计算淋巴细胞凋亡率^[1-3]。③按 annexin - V - PI 试剂盒推荐步骤,用流式细胞仪检测照射后 6 h 凋亡和坏死淋巴细胞,在质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶以及 80 V 恒压下行电泳 1.5 h,紫外灯下观察,拍照^[5]。

1.3.3 Bcl - X_L、Bax 蛋白的免疫组化检测照射后 6 h 的离心涂片经纯丙酮固定后,用 SP - AP 法检测 Bcl - X_L、Bax 凋亡相关蛋白的表达,阳性和阴性对照及检测步骤均按照试剂盒推荐的方法进行。

1.4 统计学处理:检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Student *t* 检验进行统计学处理,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡率:照射后 28 d,6 Gy 组动物死亡率为 10%(5 只),≥9 Gy 照射后各组动物于 7~14 d 全部死亡。从死亡率分析,本实验所用剂量符合重度以上急性放射病的剂量范围。

2.2 白细胞计数(表 1):不同剂量 γ 射线照射后,小鼠外周血白细胞于照射后 6 h 短暂性升高,后迅速下降。≥9 Gy 照射后 24~72 h 降至最低;6 Gy 组照射后 7 d 降至最低,然后开始回升,至照射后 28 d 基本恢复到正常水平。

2.3 TUNEL 法检测小鼠脾淋巴细胞凋亡率的变化(表 2):不同剂量 γ 射线照射后小鼠脾淋巴细胞凋亡与照射剂量呈一定的量-效关系。6~9 Gy 照射后 6 h 及 12~20 Gy 照射后 6 h 和 12 h,脾淋巴细胞凋亡率达高峰;照射后 6~24 h,12 Gy 以下剂量时凋亡率随照射剂量增加而增加,剂量 ≥15 Gy 后变化不明显。

表 1 不同剂量 γ 射线照射后小鼠外周血白细胞计数的变化($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Changes of white blood cell counts of peripheral blood after different doses

照射剂量(Gy)	γ irradiation in mouse($\bar{x} \pm s, n = 5$)							$\times 10^9/L$
	照后 0 h	照后 6 h	照后 12 h	照后 24 h	照后 72 h	照后 7 d	照后 14 d	
6	5.70 ± 2.30	15.00 ± 6.60*	4.90 ± 1.35	2.20 ± 0.34*	1.20 ± 0.53*	1.00 ± 0.19**	1.40 ± 0.30**	8.10 ± 5.80
9	5.70 ± 2.30	12.60 ± 2.10**	5.40 ± 3.10	2.00 ± 0.68*	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.10**		
12	5.70 ± 2.30	9.60 ± 2.76*	4.80 ± 1.64	1.80 ± 0.34*	1.00 ± 0.19			
15	5.70 ± 2.30	9.60 ± 2.80*	3.20 ± 0.59	1.20 ± 0.33*	1.00 ± 0.43			
20	5.70 ± 2.30	9.50 ± 3.70*	4.60 ± 2.50	1.30 ± 0.38*	2.00 ± 0.25			

注:与同照射剂量照后 0 h 比较;* *P* < 0.05,** *P* < 0.01;空白处表示动物全部死亡

表 2 不同剂量 γ 射线照射后小鼠脾淋巴细胞凋亡率的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Changes of spleen lymphocyte apoptosis rate after different doses γ irradiation in mouse($\bar{x} \pm s, n=5$)

照射剂量 (Gy)	脾淋巴细胞凋亡率(%)			
	照后 6 h	照后 12 h	照后 24 h	照后 72 h
6	13.60±4.45**	13.20±3.80**	6.70±1.53**	4.20±0.75**
9	16.90±3.06**	14.00±2.37**	9.10±1.62**	3.00±0.89*
12	18.20±4.06**	17.00±2.64**	10.80±1.75**	3.20±0.75*
15	13.10±3.22**	10.00±2.40**	6.50±1.58**	2.80±0.75*
20	11.80±1.86**	11.00±1.50**	5.70±1.22**	3.00±0.82*

注:与 0 Gy(1.70±0.57%)比较;*P<0.05,**P<0.01

2.4 流式细胞仪检测小鼠脾淋巴细胞凋亡率和坏死率的变化(表 3);6~12 Gy 照射后,脾淋巴细胞凋亡率与照射剂量呈一定的量-效关系,随照射剂量增加,凋亡率和坏死率均增加。≥15 Gy 照射后凋亡率下降,而坏死率明显升高,如 20 Gy γ 射线照射后凋亡率仅为 6 Gy 的 1.48 倍,而坏死率为 19.3 倍。

表 3 不同剂量 γ 射线照射后 6 h 脾淋巴细胞凋亡率和坏死率的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Changes of apoptotic and necrotic rates of mouse spleen lymphocyte 6 hours after different doses γ irradiation in mouse($\bar{x} \pm s, n=5$)

照射剂量(Gy)	淋巴细胞凋亡率(%)	淋巴细胞坏死率(%)
0	0.30±0.03	0
6	14.90±0.80**	1.50±0.20
9	27.10±1.10**	9.20±3.10**
12	27.20±7.20**	10.20±0.70**
15	20.80±3.20**	22.10±4.20**
20	22.10±1.20**	29.00±3.40**

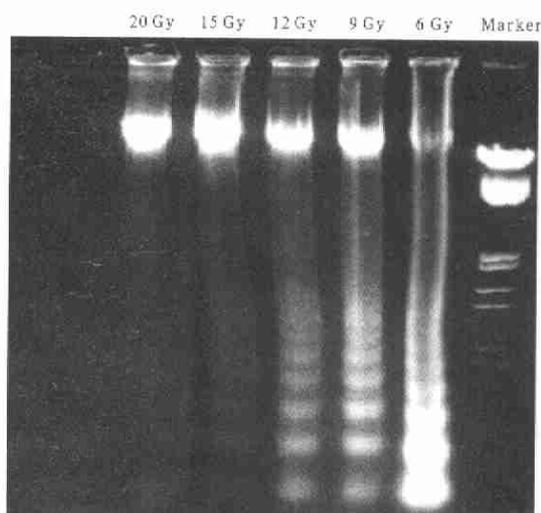
注:与 0 Gy 比较;**P<0.01

2.5 脾淋巴细胞 DNA 凝胶电泳图谱变化(图 1);6~12 Gy 组 DNA 梯形谱明显,即显示大量的凋亡细胞出现。≥15 Gy 照射后,梯形谱明显减弱,提示凋亡细胞明显减少;出现由坏死细胞形成的片状电泳条带(Smear 带),提示坏死细胞增加。其结果与流式细胞仪检测结果符合较好。

2.6 脾淋巴细胞 Bax 和 Bcl-X_L 蛋白表达的变化(表 4);6 Gy γ 射线照射后 6 h,脾淋巴细胞 Bax 蛋白表达即出现增加,随照射剂量增加升高更为明显,至 12 Gy 时达到峰值,≥15 Gy 照射后未显示出量-效关系;Bcl-X_L 蛋白表达呈明显下降趋势,在 6~12 Gy 范围内呈现出较好的量-效关系,12 Gy 照射后 6 h,约降低为 0 Gy 组的 14%。

3 讨论

急性放射病免疫器官严重损伤和淋巴细胞数量的急剧减少大大增加了治疗难度。脾脏是机体重要



注:Marker 为分子质量标记

图 1 不同剂量照射后 6 h 小鼠脾淋巴细胞 DNA 凝胶电泳图谱

Figure 1 DNA ladder(apoptosis) and smear band(necrosis) estimated by DNA electrophoresis 6 hours after radiation

表 4 不同剂量 γ 射线照射后 6 h 小鼠脾淋巴细胞 Bax 和 Bcl-X_L 表达及凋亡率的变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Expression of Bax, Bcl-X_L proteins and apoptosis rate of spleen lymphocyte after different doses γ irradiation in mouse($\bar{x} \pm s, n=5$)

照射剂量(Gy)	凋亡率(%)	Bax(%)	Bcl-X _L (%)
0	1.70±0.57	3.30±1.00	28.00±1.00
6	13.60±4.45**	14.00±1.39**	10.00±2.00**
9	16.90±3.06**	29.00±3.60**	7.00±0.58**
12	18.20±4.06**	45.00±2.57**	4.00±1.00**
15	13.10±3.22**	35.00±3.55**	6.00±0.58**
20	11.80±1.86**	26.00±1.81**	9.00±1.00

注:与 0 Gy 比较;**P<0.01

的外周免疫器官之一,对电离辐射高度敏感。本课题组近几年应用分子病理学、免疫组化、图像分析和流式细胞术等技术,系统观察了 2~8 Gy 不同剂量 γ 射线所致免疫系统的损伤特点,基本阐明了中度和中度偏重剂量照射后免疫组织的病变规律以及量-效关系^[6-8]。而有关大剂量(>8 Gy) γ 射线照射后脾淋巴细胞凋亡的发生规律及促凋亡和抗凋亡基因在其中的作用,国内外文献均少见报道^[4]。

本研究中应用流式细胞术、DNA 凝胶电泳和 TUNEL 等不同方法检测了致死剂量 γ 射线照射后小鼠脾淋巴细胞凋亡率和坏死率。结果表明:①在 6~12 Gy 范围内,脾淋巴细胞的死亡方式以凋亡为主。在 15~20 Gy 范围内,坏死是除凋亡外另一条重要的细胞死亡途径。②一次大剂量照射后脾淋巴细胞凋亡的高峰出现在照射后 6 h。以往实验显示,6 Gy 照射后 28 d,脾淋巴细胞凋亡率仍然高于对照组^[2],显示急性照射对脾组织损伤存在潜在的远期

效应。这一结果为探索急性放射病可治疗的剂量范围提供了重要实验依据。

进一步分析脾淋巴细胞凋亡调控因素显示,促凋亡蛋白 Bax 出现规律性改变。已知 Bax 为 Bcl-2 家族的重要成员之一,然而它却具有与 Bcl-2 相反的作用,即较强的诱发细胞凋亡功能。目前研究显示,Bax 促凋亡作用主要是通过形成同源或异源二聚体实现的。当大量 Bax 同源二聚体形成时,诱导细胞凋亡;随 Bcl-2 表达量上升,Bax 与 Bcl-2 形成更稳定的 Bcl-2/Bax 异源二聚体,中和了 Bax 同源二聚体诱导细胞凋亡的作用^[9]。本研究结果表明,照射后 Bax 蛋白的表达也明显增强,且表达水平与照射后剂量呈明显的量-效关系。6~12 Gy 照射后 6 h,脾淋巴细胞的凋亡率达峰值,此时 Bax 蛋白也呈现出相同的变化趋势,因而 Bax 的表达规律证实了其在辐射诱导脾淋巴细胞凋亡调控中的重要作用。而在 15~20 Gy 范围坏死明显增加时,Bax 的表达却下降,表明 Bax 与坏死之间的关系不明显。抗凋亡蛋白 Bcl-X_L 是 Bcl-2 家族的另一重要成员,它具有与 Bcl-2 相同的抑制细胞凋亡作用。然而,Bcl-X_L 具有比 Bcl-2 更强的抗凋亡作用,且能不依赖于 Bcl-2 的表达而单独发挥作用。因此,目前 Bcl-X_L 已经成为研究凋亡调控的重要基因^[10]。本实验中发现,照射后 Bcl-X_L 表达与照射剂量和淋巴细胞凋亡率呈现较好的量-效关系,提示其在大剂量照射引起的细胞凋亡调控中起着重要作用。

综上所述,本研究中首次报道了急性致死剂量照射

后脾淋巴细胞凋亡和坏死的剂量范围,并探讨了凋亡相关蛋白在其中的变化规律,这些结果无疑为重度以上急性放射病的防治提供了重要依据。

参考文献:

- 1 Cui Yufang, Yang Hong, Wu Shuxia, et al. Molecular mechanism of damage and repair of mouse thymus lymphocytes induced by radiation[J]. CMJ, 2002, 115: 1070-1073.
- 2 崔玉芳, 杨红, 高亚兵, 等. 小鼠脾淋巴细胞辐射死亡与凋亡的关系[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1999, 17: 101-105.
- 3 崔玉芳, 杨红, 高亚兵, 等. 辐射诱发小鼠淋巴结细胞凋亡特征和意义的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2001, 21: 63-65.
- 4 Harrington N P. Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107: 417-424.
- 5 Cui Y F, Zhou P K, Lord B I, et al. Apoptosis in bone marrow cells of mice with different P53 genotypes after γ -rays irradiation in vitro[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1995, 14: 159-163.
- 6 崔玉芳, 付小兵, 夏国伟, 等. 单纯和放射复合伤口愈合中循环血 T 淋巴细胞亚群的变化及其与愈合延迟的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 675-677.
- 7 崔玉芳, 夏国伟, 付小兵, 等. Bax 和 Bcl-2 基因在单纯和放射复合伤口中的表达及与细胞凋亡和愈合延迟的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 421-423.
- 8 崔玉芳, 夏国伟, 杨红, 等. 放射延迟伤口愈合机制的初步研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 430-432.
- 9 崔玉芳, 夏国伟, 付小兵, 等. 放射复合伤口中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达与细胞凋亡的关系研究[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13: 404-406.
- 10 Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimers in vivo with a conserved homology, bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74: 609-619.

(收稿日期: 2004-04-15 修回日期: 2004-12-16)

(本文编辑: 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

欢迎订阅 2005 年《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志,是我国急救医学界权威性学术期刊,为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊,每月 10 日出版,国际通用 16 开大版本,内文用 80 克铜版纸印刷,内容丰富,且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2005 年的订阅手续。邮发代号: 6-58; 定价: 7.8 元/期,全年 93.6 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国 NLM《MEDLINE》、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。本刊设有各种栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。

地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内;邮编:300050。

(本刊编辑部)