

【论著】

电离辐射对小鼠脾脏 B淋巴细胞损伤的研究

张 恒, 吴红英, 李德冠, 王月英, 王小春, 杜利清, 路 璐, 张俊伶, 孟爱民

中图分类号: Q691 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2010)02-0143-02

【摘要】 目的 探讨电离辐射对小鼠脾细胞活性的影响, 阻断 P38-MAPK通路对小鼠脾细胞的防护作用。方法 从体内、体外实验研究不同剂量电离辐射对小鼠脾细胞活性的影响, 分别在照射前、后给与 P38 MAPK通路阻断剂 SB203580 观察对辐射损伤的防护和治疗作用。结果 在体外实验中, 辐射对小鼠脾细胞活性的破坏作用与剂量正相关; 体内实验表明低剂量的辐射可以提高脾细胞的活性, 高剂量辐射能破坏其活性; 在亚致死剂量的辐射下, 照射后用 SB203580对小鼠脾细胞活性的治疗作用不明显, 照射前用 SB203580对小鼠脾细胞活性具有较好的保护作用。结论 阻断 P38-MAPK通路可以有效预防辐射对小鼠脾细胞的损伤, 无明显的治疗作用。

【关键词】 电离辐射; P38-MAPK; 脾细胞增殖

The Study of Ionizing Radiation on Proliferation of Mouse Spleen B Lymphocyte ZHANG Heng, WU Hong-ying, LI De-guang et al. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

【Abstract】 Objective To study the effect of ionizing radiation on mouse spleen B lymphocytes proliferation and the protective effect by inhibiting P38-MAPK signal transduction pathway. Methods To observe the ionizing radiation with different doses on mouse spleen cells in vivo and vitro and before and after radiation, inject SB203580 on mice and analyze the protective or therapeutic effect on them. Results In vitro, ionizing radiation can impair mouse spleen cells proliferation, while in vivo, low dose ionizing radiation can enhance mouse spleen cell proliferation and high dose can hurt it. Exposed in sublethal dose ionizing radiation, mouse spleen could be protected by using SB203580. Conclusion Inhibiting P38-MAPK pathway can protect mouse spleen cells from being damaged by ionizing radiation.

【Key words】 Ionizing Radiation; MAPK; Spleen Cells Proliferation

脾脏是机体最大的免疫器官, 含大量淋巴细胞, 以 B淋巴细胞为最多, 主要分布在脾小体边缘区和红髓。淋巴细胞具有很高的辐射敏感性, 其中 B细胞较 T细胞具有更高的照射后凋亡敏感性。B细胞表面具有识别抗原的受体和有丝分裂原受体, 在特异性抗原刺激下可使相应淋巴细胞克隆发生增殖。脂多糖 (LPS对小鼠有作用) 可刺激 B细胞发生增殖, B淋巴细胞增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段, 是衡量机体体液免疫力的重要指标。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是一类在脊椎动物体内广泛存在的细胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其参与的细胞内激酶级联反应是细胞外界信号传递到细胞核内、调节基因表达的重要通路。MAPK包括 3个主要的亚家族: 细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-Jun氨基末端激酶 (JNK) 和 P38 MAPK。P38 是 1994年由 Han等发现的一种 38 kD的酪氨酸磷酸化蛋白激酶, 由 360个氨基酸组成, P38-MAPK通路的活化与细胞的凋亡和细胞周期调节密切相关^[1]。本研究拟从体内、体外实验, 研究不同剂量电离辐射对小鼠脾细胞活性的影响, 探讨阻断 P38

MAPK通路对小鼠脾细胞的防护和治疗作用。

1 材料和方法

1.1 试剂、材料和仪器 淋巴细胞分离液 (Ficoll, 天津美德太平洋科技有限公司, Celltiter-Glo Promega Cat G756B Lot 19681810, LPS Sigma SB203580, LC Lab cat s-3400 Lot arv-107, RPMI-1640 Solarb cat 31800-500 Lot 215445, 胎牛血清, Biovision cat 04-001-1A Lot 215445, CO₂ 培养箱, Heraeus 多功能酶标仪, TECAN Infinite200, ¹³⁷Cs γ射线照射源, 加拿大原子能有限公司, 型号 USQ Auto cell40, 剂量率 0.82 Gy/min, Eppendorf离心机, 型号 5810R

1.2 实验动物 C57BL/6小鼠, 雄性, 21~23g 购自维通利华, 合格证号: SCXK(京) 2008-0003

1.3 实验方法

1.3.1 体外实验 取 C57BL/6小鼠 4只称重, 颈椎脱臼法处死, 常规消毒后, 在超净工作台中无菌取出脾脏, 称重后置含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 制取脾细胞悬液后 Ficoll 分离, 台盼蓝鉴定细胞活性 (在 95%以上) 计数后用 RPMI-1640 培养液调细胞浓度为 2×10^6 /ml 备用。用 0.1、4 Gy 剂量的 γ射线照射后 6 h 后进行脾细胞增殖实验, 细胞悬液加入 96 孔板, 每孔 100 μl, LPS 刺激组加入用 1640 液稀释的 10 μl/ml LPS 100 μl, 对照组加入 1640 液 100 μl, 于 37℃ 培养 48 h 后加入 Celltiter-Glo 震荡孵育 10 min 转入 96 孔白板, 多功

基金项目: 国家自然科学基金 (30770645); 天津市自然科学基金 (08JCYBJC07300); 中国医学科学院放射所基金 (SF0825)

作者单位: 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 310192

作者简介: 张恒 (1975~), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物病理学、放射医学。

通讯作者: 孟爱民, 研究员, 博士生导师。

- [4] Kim FS, Kennedy RJ and Wyckoff H Q. The attenuation of gamma rays at oblique incidence [J]. Radiology 1954; 63 (1): 94-104
- [5] Nelson WR, Biggs PJ. Primary and leakage radiation calculations at 6, 10 and 25 MeV [J]. Health Phys 2002; 47(6): 811-818
- [6] National Council on Radiation Protection and Measurements

NCRP REPORT No. 49 "Structural shielding design and evaluation for medical use of X-rays and gamma rays of energies up to 10 MeV" [R]. 1976; 1-126

- [7] Abraham FG, Bello J, Purdy JA. Attenuation of primary and scatter radiation in concrete and steel for 18 MV X-rays from a clinical-20 linear accelerator [J]. Health Phys 1983; 45(5): 969-973

(收稿日期: 2009-10-17)

能酶标仪检测发光值 (luminescence功能, Integration 1000ms)。刺激指数 (SI)计算方法:

$$SI = \frac{IP\&S\&或实验组\&q\&m - 机器本底}{阴性对照\&q\&m - 机器本底}$$

1.3.2 体内照射实验 取 C57BL/6小鼠 24只分 3组,分别用 0.4 6Gy剂量的 γ 射线照射,1天后脱颈处死,无菌条件下取脾细胞,制成 $2 \times 10^6/m$ 单细胞悬液进行脾细胞增殖实验 (方法同上)。

1.3.3 体内药物防护实验 取 C57BL/6小鼠 32只,分对照组 (C组)、照射对照组 (R组)、药物治疗组 (SB-C组)和药物预防组 (SB-P组)。SB-P组于照射前 0.5h按 $15mg/kg$ 皮下注射 SB203580工作液,后 3组用 7.2Gy剂量的 γ 射线照射,SB-C和 SB-P组照射 24h后腹腔给药,隔日 1次,共 5次,C组和 R组于相同时间皮下注入等量 DMSO液,照射 15d后处死小鼠,取脾细胞进行脾细胞增殖实验,方法同上。

1.4 统计学处理 数据处理用 SPSS11.5版软件包进行分析,检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Levene检验后,采用 LSD法检验比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外实验 在体外实验中,电离辐射能够显著降低小鼠脾细胞的增殖能力,1Gy和 4Gy组均较对照组显著下降 ($P < 0.05$)。1Gy和 4Gy组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1

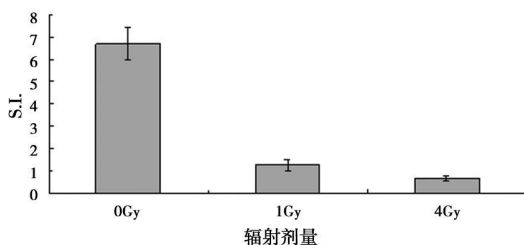


图 1 不同剂量辐射体外实验对小鼠脾细胞增殖能力影响

2.2 体内照射实验 实验结果显示,在电离辐射急性期,小鼠脾脏功能受到影响,4Gy组 SI值较对照组增高 93.1%,6Gy组较对照有所降低,没有统计学意义 ($P > 0.05$)。较 4Gy组降低 53.9%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2

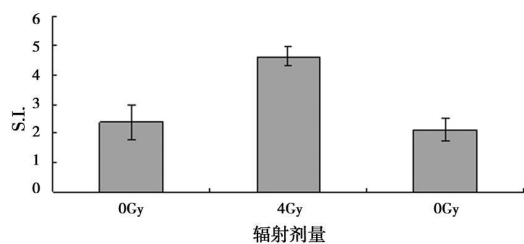


图 2 体内急性期不同剂量辐射对小鼠脾细胞增殖能力影响

2.3 体内药物防护实验 在体内药物防护实验中,采用亚致死剂量的 γ 射线对实验小鼠进行了照射,实验中有近半数的照射小鼠死于胃肠道损伤。由存活的小鼠研究发现,小鼠经亚致死剂量电离辐射后脾细胞增殖能力下降,SB203580治疗后其增殖能力有所上升,但较照射组无统计学意义差异,SB203580预防组较照射组增高 77.7%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3

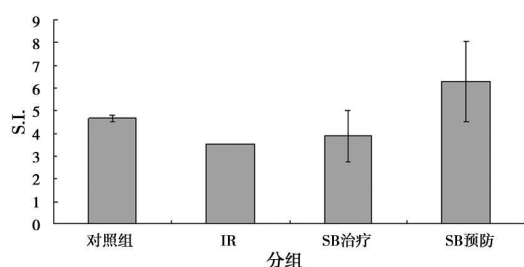


图 3 体内 SB203580干预实验

3 讨论

由图 1可见,在体外实验中,电离辐射可以降低小鼠脾细胞免疫活性,随照射剂量增大其损害作用增强,其原理可能在于:电离辐射可以直接破坏 DNA双链,导致细胞凋亡^[2];电离辐射可在细胞内产生大量活性氧,诱发细胞凋亡^[3]。由图 2的数据表明,在体内实验时的情况与体外实验不同,在 4Gy剂量时脾细胞的活性反而增强,6Gy剂量时脾细胞活性较 4Gy时显著下降,而与对照组处于相同水平,这一结果与 Kojkov D等^[4]的研究结果相似。其原因在于当脾脏受到低剂量辐射时,可引起免疫应答的发生,脾的体积和内部结构也发生变化,使脾脏成为具有一定辐射保护作用的免疫应答场所^[5]。

SB203580预防组较照射组的 SI值升高 77.7%,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。活化的 P38可以直接磷酸化 P53磷酸化的 P53不能被其抑制蛋白 MDM2结合和降解,因此含量增高,能活化靶基因 P21^{WAF1}的转录,有效地将细胞周期阻滞在 G₁/G₂期^[6]。P21与周期蛋白—CDK复合物结合,可以抑制 CDK1、2、4的活性使细胞阻滞与 G₂/M关卡处^[7]。可见,阻断 P38—MAPK通路后,可以降低各级造血细胞所处 G₂/M期的比例,提高 G₁/S期的比例,而细胞处于 G₂/M期对辐射较敏感,处于 G₁/S期时对辐射的耐受力较强。所以,我们认为,应用 SB203580可以预防辐射对小鼠脾细胞的损伤,从而提高机体的体液免疫力。

在今后的研究中,我们将对 P38—MAPK通路的上游活化因子和下游与细胞周期、细胞凋亡的相关效应蛋白进行深入研究,并探讨该通路与 TGF- β /Smad β /P53等细胞信号传导通路的交互作用,为临床应用提供更多依据。

(致谢:常建辉,翟志斌,刘金剑,王彦,褚丽萍等为我们提供的帮助。)

参考文献:

- [1] Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route P38[J]. Trends Biochem Sci. 2007 32: 364—371
- [2] McGarr M, Girardi C, Fabris S, et al. DNA repair in modelled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays[J]. Mutat Res. 2009 26(1—2): 32—39
- [3] Liu Q, He X, Liu Y, et al. NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species: A new mechanism for X-ray-induced HeLa cell death[J]. Biochem Biophys Res Commun. 2008 377(3): 775—779
- [4] Kojkov D, Criswell Sampath L, et al. Clusterin: a protein with multiple functions as a potential ionizing radiation exposure marker[J]. Radiation Life Sciences. 2003 16(24): 219—32
- [5] Yang ZW, Li JA, Yang MH, et al. Comparison of blood counts in splenic, renal and mesenteric arterial and venous blood in post-pubertal rabbits[J]. Res Vet Sci. 2005 79(2): 149—154
- [6] el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in P53-mediated G1 arrest and apoptosis[J]. Cancer Res. 1994 54: 1169—1174
- [7] Chen WJ, Chang CY, Lin K. Induction of G1 phase arrest in MCF human breast cancer cells by pentagalloylucose through the down-regulation of CDK4 and CDK2 activities and up-regulation of the CDK inhibitors p27 (Kip) and p21 (Cip)[J]. Biochem Pharmacol. 2003 65: 1777—1785

(收稿日期: 2009—09—25)