

氡染毒诱导小鼠肺组织细胞凋亡的机制研究

朴春南,田梅,刘建香,阮健磊,苏旭

中图分类号: R811.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2011)02-0142-02

【摘要】 目的 研究氡诱发小鼠肺细胞凋亡的机制。方法 建立氡染毒小鼠模型,将小鼠分为氡吸入染毒不同剂量组(0.02、30 和 60WLM)和不同时间段组(24h、30d 和 90d);采用 TUNEL 法检测小鼠肺组织细胞凋亡程度;采用免疫组化法检测各组肺组织 p53 蛋白及 Bcl-2/Bax 表达情况。结果 与对照组相比,氡吸入染毒组小鼠肺组织随着剂量的增加和染毒后时间的延续凋亡细胞逐渐增多;免疫组化结果显示,随着染毒剂量的增加和染毒后随着时间的延续,小鼠肺组织中的 p53 蛋白表达量明显升高,在染毒后 30d 和 90d 时达到峰值;Bcl-2/Bax 值则明显下降。结论 氡染毒诱发小鼠肺细胞凋亡与 p53 和 Bcl-2/Bax 通路密切相关。

【关键词】 氡;肺损伤;细胞凋亡; p53; Bcl-2/Bax

Studies on the Mechanism of Apoptosis by Radon in Lung Tissue of Mice. PIAO Chun-nan, TIAN Mei, LIU Jian-xiong, et al. *National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088 China.*

【Abstract】 Objective To study the mechanism of apoptosis by radon in lung tissue of mice. **Methods** Male BALB/c mice were exposed to radon with the cumulative dose of 0.02, 30 or 60 working level month (WLM) respectively, and then were raised for different time (24h, 30d or 90d). Apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). The expression of p53 and Bcl-2/Bax protein was observed by immunohistochemistry. **Results** As compared with the control group, the apoptotic index in lung tissue increased along with the increasing of expose dose and the raise time. The protein expression of p53 increased significantly in the 30d and 90d groups. But Bcl-2/Bax expression decreased. **Conclusions** The apoptosis by radon in lung tissue of mice had close relationship with p53 and Bcl-2/Bax pathway.

【Key words】 Radon; lung Lesion; Apoptosis; p53; Bcl-2/Bax

氡是一种普遍存在于环境空气中的天然放射性气体,是一类不可忽视的呼吸系统放射性污染物。氡衰变过程中产生氦子体并且释放 α 粒子,可以被人和动物吸入,沉积在各级呼吸道^[1]。 α 粒子具有较高的能量(5.49~7.69 MeV),对支气管上皮基底细胞、粘液细胞及肺上皮细胞等靶细胞具有较强的生物学效应^[2,3],可引起 DNA 损伤、基因突变、细胞染色体畸变,甚至是肿瘤的发生^[4]。流行病学调查显示长期在氡(²²²Rn)浓度较高的矿井作业的矿工罹患肺癌的危险性将会增加,去除吸烟因素后,随着氡及其子体暴露量的不断增大肺癌发病率也明显增加。Taeger^[5]等对德国铀矿工肺癌死亡调查分析中认为铀矿工肺癌死亡率是德国东部地区普通人群的 2.9 倍。因此,氡及其子体对人类和其他生物所造成的健康危害及其作用机制,成为近年来放射生物学领域的关注热点。本实验通过建立

氡染毒小鼠肺损伤模型,检测肺组织细胞凋亡及凋亡相关的 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的变化,探讨氡吸入染毒导致肺组织凋亡的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与氡染毒模型的建立 SPF 级,2 周龄,雄性 BALB/c 小鼠 120 只,体重 18~22g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(军)2007-004,温度(22±2)℃,湿度:40%~70%,常规饲养。小鼠随机分为实验组和对照组,分别研究氡染毒不同剂量(30 和 60WLM,每组 10 只)以及染毒 60WLM 后不同时期(24h, 30d, 90d 和 180d,每组 10 只)肺组织的病理学改变及肺组织中 p53 表达变化。小鼠的氡吸入染毒在中国计量科学研究院电离辐射与医学研究所 SR-NIM02 型氡室内进行,氡室条件、氡浓度实时监测方法及染毒剂量的计算均与文献[6]相同。

1.2 TUNEL 法检测凋亡 取肺右叶及相连的支气管,10%中性福尔马林固定,石蜡包埋、切片,将石蜡切片进行常规脱蜡脱水,严格按 TUNEL 试剂盒(Promega)说明书进行。光镜下分析

基金项目:科技部科研院所社会公益研究专项资助项目(2005DIB1J087)
作者单位:中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所辐射流行病学室,北京 100088
作者简介:朴春南(1978~),女,朝鲜族,辽宁沈阳人,医学博士,主要从事辐射生物效应的研究。
通讯作者:苏旭,Email: suxu@nirp.cn

在辐射防护应用中,人体粪代谢过程中的核素是不可忽略的,其对辐射防护促排药物的研究有着极其重要的意义。④由于连续粪样采集的难度,而采集尿液相对容易,因此在实践中可采集尿液来通过尿粪比计算粪中元素的代谢量。当然,元素尿粪排出比是否恒定这有待于大量的样本数据来支持,本研究只做了一点探索性展望。

作为初步探索,本研究报道数据在现行我国参考人及 ICRP 参考人参数参考值中是缺少的,弥补了元素在人体代谢途径中缺少的一个环节,为完善元素与核素从外界到人体转移规律,确定我国参考人相应参数参考值和某些重要生物动力学参数提供了探索性依据,同时对辐射防护及其他相关研究领

域,尤其是药物代谢研究有极其重要的意义。

参考文献:

- [1] IAEA, Reference Asian man: Ingestion and Organ Content of Trace Elements of Importance in Radiological Protection [P]. IAEA-TECDOC-1592, June, 2008.
- [2] 国际放射防护委员会第 103 号出版物,国际放射防护委员会 2007 年建议书 [P]. 2008 278-279.
- [3] 诸洪达,王京宇,武权,等. 中国成年男子器官、组织中元素浓度研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2007, 27(4): 353-361.

(收稿日期: 2011-01-26)

结果 400×倍数下每张片子取 10 个视野,100 个细胞中阳性细胞数,棕黄色为阳性,计算凋亡细胞数占总细胞数的百分比为凋亡指数。

1.3 免疫组织化学法检测蛋白表达量 采用非生物素二步法免疫组化检测肺组织 p53、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。石蜡切片常规脱蜡、脱水、热修复,一抗稀释均为 1:100 4℃过夜。二抗 37℃孵育 30min,DAB 显色,复染,显微镜下观察。设阳性和阴性对照。p53 表达阳性为胞核棕黄色,bcl-2 和 bax 表达阳性为胞浆棕黄色。每张切片 10 个视野,计数 100 个细胞中阳性细胞数,取均值,以百分数(%)表示。

1.4 统计学处理分析 采用 SPSS 12.0 软件进行 *t* 检验,实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 肺组织细胞凋亡 TUNEL 法检测显示在氢染毒 30WLM、60WLM 染毒组肺组织细胞凋亡指数明显高于正常对照组,30WLM 组和 60WLM 组之间无明显的差异;每个剂量组随着染毒时间的延长细胞凋亡数也呈上升趋势,90d 时明显增高。见表 1。

表 1 不同染毒组不同时间段肺组织的细胞凋亡指数

组别	小鼠数	肺细胞凋亡指数		
		24h	30d	90d
正常对照组	60	9.51±0.42	10.3±7.2	11.3±6.8
30WLM 染毒组	30	25.59±1.41 ¹⁾	30.71±2.57 ¹⁾	44±11.1 ^{1) 2)}
60WLM 染毒组	30	30.10±1.95 ¹⁾	32.7±8.8 ¹⁾	50±2.16 ^{1) 2)}

注:1) 与正常对照组相比较 $P < 0.05$; 2) 与 24h 相比较 $P < 0.05$ 。

2.2 肺组织 p53 免疫组化检测结果 免疫组化检测小鼠肺组织 p53 蛋白表达情况,30WLM、60WLM 染毒组肺组织 p53 蛋白表达阳性率明显高于正常对照组;各个剂量组随着时间的延长 p53 阳性细胞数逐渐增加,染毒后 90d 达高峰。见表 2。

表 2 不同染毒组不同时间段小鼠肺组织 p53 蛋白表达的情况

组别	小鼠数	p53 阳性细胞数		
		24h	30d	90d
正常对照组	60	6.00±0.28	9.90±2.98	12.16±3.16
30WLM 染毒组	30	14.57±0.71 ¹⁾	22.75±4.73 ¹⁾	40.50±4.84 ^{1) 2)}
60WLM 染毒组	30	14.32±1.15 ¹⁾	33.46±7.31 ^{1) 2)}	43.3±2.37 ^{1) 2)}

注:1) 与正常对照组相比较 $P < 0.05$; 2) 与 24h 相比较 $P < 0.05$ 。

2.3 肺组织 Bcl-2/Bax 免疫组化检测结果 免疫组化检测小鼠肺组织 Bcl-2/Bax 蛋白表达情况,与正常对照组相比,随着剂量的增加 Bcl-2/Bax 比值明显下降;随着染毒后时间的延长肺组织 Bcl-2/Bax 比值呈下降趋势。见表 3。

表 3 不同染毒组不同时间段小鼠肺组织 Bcl-2/Bax 比值的变化

组别	小鼠数	Bcl-2/Bax 比值		
		24h	30d	90d
正常对照组	60	0.83±0.14	1.26±0.52	1.18±0.32
30WLM 染毒组	30	0.41±0.06 ¹⁾	0.53±0.13 ¹⁾	0.17±0.06 ^{1) 2)}
60WLM 染毒组	30	0.25±0.03 ¹⁾	0.23±0.09 ¹⁾	0.16±0.03 ¹⁾

注:1) 与正常对照组相比较 $P < 0.05$; 2) 与 24h 相比较 $P < 0.05$ 。

3 讨论

氢引起肺损伤甚至是肺癌,是一个逐步的渐进的过程,其发病机制复杂,细胞凋亡是其中一个重要方面。细胞凋亡相关基因及其调控基因均与恶性肿瘤发生、发展及预后有着密切的联系。本研究采用 TUNEL 法检测不同剂量氢吸入染毒后不同时间段的小鼠肺组织细胞凋亡情况。氢吸入染毒后细胞凋亡的百分率随着氢吸入累积剂量的增加而增加,在累积剂量达到 30WLM 和 60WLM 时与对照组相比,随着小鼠的病理变化的显著,小鼠肺细胞凋亡率也明显增加。

氢及其子体主要随着人及动物的呼吸而黏附在呼吸道上,对支气管和肺泡起内照射作用,其作用特点为作用时间的持续

性和作用时间的累积性。研究证实,放射性核素诱发的细胞凋亡与其生物学特性有关。通过研究,¹⁴⁷Pm(钷)内照射诱发 Molt-4 细胞和 Ana-1 细胞死亡方式,表明¹⁴⁷Pm 诱发的细胞死亡具有典型的凋亡形态学特征,细胞凋亡的程度及 DNA 链断裂量与¹⁴⁷Pm 作用的时间和内照射的累积吸收剂量有关,提示放射性核素¹⁴⁷Pm 内照射可诱发细胞凋亡^[7]。朱寿彭等^[8]用活度为 3.7×10^5 Bq/ml 的¹⁵³Sm-EDTMT(¹⁵³Sm-乙二胺四甲撑膦酸)对骨肉瘤细胞(HO3-8603)进行内照射处理,发现¹⁵³Sm也可诱导细胞凋亡,其凋亡程度与内照射的作用时间有关。随着氢染毒后饲养时间的增加,氢及其子体对小鼠肺组织的作用时间长,因此,氢染毒小鼠肺组织细胞凋亡率随着时间的增加明显增高。本研究检测在氢染毒后不同时间段小鼠肺组织细胞凋亡率,发现染毒 30 和 60WLM 剂量组小鼠肺细胞凋亡率随着时间的延长呈上升趋势,染毒后 90d 小鼠肺细胞凋亡率最高,与氢染毒后 24h 处理组有明显的差异。推断氢染毒小鼠吸入氢及其子体后,可沿着呼吸道聚积在肺泡壁上,放射出的 α 射线使细胞受损,并可能通过细胞凋亡通路,启动一系列程序性死亡过程引起肺细胞凋亡。

辐射诱发细胞凋亡的机制大致符合其他因素诱发细胞凋亡的机制。大量文献报道认为,p53 通常和 mdm2 蛋白相互作用保持在较低水平。辐射致使 DNA 损伤后,由于 ATM、ATR 和 DNA-PK 等的作用,使 p53 基因激活,经一系列下游基因作用,包括 caspases 级联反应、细胞周期阻滞、DNA 修复或细胞凋亡^[9]。目前认为,DNA 损伤不能修复,则通过 p53 介导途径,使细胞发生周期阻滞或细胞凋亡。Bcl-2/Bax 基因在辐射所致细胞凋亡过程中起着重要作用。辐射通过促进 Bax 基因表达,改变 Bcl-2/Bax 比值而诱发细胞凋亡。本研究通过免疫组化方法检测各组 p53 蛋白的表达量,发现正常对照组 p53 蛋白表达量较低,氢染毒小鼠肺组织 p53 蛋白量明显增高,差异具有统计学意义。小鼠经氢吸入染毒 30、60WLM,随着染毒后饲养时间的增加,p53 蛋白阳性率明显增加。90d 时达到峰值。这种变化与氢染毒小鼠肺组织病理变化及肺细胞凋亡指数的变化规律相重合。可能是因为氢染毒后引起了肺损伤,并启动了 p53 通路及其他细胞凋亡通路,从而抑制细胞恶化。

Bcl-2 和 Bax 基因是近年来发现的一对关系密切的凋亡基因,在细胞凋亡调控中起重要作用。Bcl-2 抑制细胞的凋亡,Bax 则促进细胞凋亡。本研究观察了氢吸入染毒后小鼠肺组织 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达变化,氢吸入染毒后 24h、30d 和 90d 均出现了随着剂量的增加 Bax 表达明显增加,而且随着染毒后时间的增加,Bax 表达亦出现了显著的增加;Bcl-2 则随着氢染毒剂量及染毒后时间的延长呈下降趋势;Bcl-2/Bax 比值在氢染毒后不同阶段随着剂量的增加明显降低;每个剂量组随着时间的延长 Bcl-2/Bax 比值呈下降趋势。相关研究证实,Bcl-2 和 Bax 在细胞内是以同源二聚体或异源二聚体形式存在的。当 Bax 过表达时,形成同源二聚体 Bax/Bax,促进细胞凋亡;当 Bcl-2 过表达时,形成异源二聚体 Bcl-2/Bax,抑制细胞凋亡。Bcl-2/Bax 比值的变化调节着细胞增殖和凋亡的平衡^[10]。因此,Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体是其调节细胞凋亡的必要条件,而 Bcl-2/Bax 比值对决定细胞命运起关键作用,在正常情况下 Bcl-2/Bax 保持一定比例,并以 Bcl-2/Bax 异源二聚体形式存在,维持细胞正常数量和寿命。当 Bax 增加,Bax 同源二聚体形成增加,Bcl-2/Bax 比值下降,便诱导细胞凋亡^[11,12]。推测,可能是随着氢染毒后小鼠肺组织的损伤加重,启动了细胞凋亡的通路,p53 基因的增加,促进了促凋亡基因 Bax 表达增加,抑制凋亡基因 Bcl-2 表达降低,增加 Bax 同源二聚体的形式,下调 Bcl-2/Bax 比值而促进肺细胞凋亡。

细胞凋亡是非常复杂的网络状信号转导调控模式,涉及到很多基因,因此,氢染毒小鼠肺细胞凋亡的机制有待于我们更深入的研究证实。

(下转第 145 页)

加(与正常对照组比较, $P < 0.01$)推测可能与它促进静止期(G_0 期)的干细胞向增殖期(G_1 期)干细胞转化有关。增殖后的造血干细胞将进一步分化为造血祖细胞(包括红系造血祖细胞、粒-单系造血祖细胞及巨核系造血祖细胞)。然而本实验的结果并未显示牛膝精能促进造血干细胞向红系造血祖细胞分化的迹象。因为无论是早期红系造血祖细胞或晚期红系造血祖细胞的集落产率均无明显改变(与正常对照比较, $P > 0.05$)。

表2 牛膝精对BFU-E和CFU-E的影响

组别	样本数(皿)	BFU-E 集落数 (个/皿)	CFU-E 集落数 (个/皿)
对照组	15	3.2 ± 0.3	42.7 ± 4.7
50 mg/L 组	15	$3.2 \pm 0.4^{1)}$	$42.9 \pm 5.1^{1)}$
100mg/L 组	15	$3.2 \pm 0.2^{1)}$	$40.0 \pm 4.6^{1)}$
200mg/L 组	15	$3.0 \pm 0.3^{1)}$	$41.8 \pm 4.4^{1)}$

注:1)与对照组比较 $P < 0.01$ 。

(上接第143页)

参考文献:

[1] Nikezic D ,Novakovic B ,Yu KN. Absorbed fraction of radon progeny in human bronchial airways with bifurcation geometry [J]. Int J Radiat Biol ,2003 ,79 (3) : 175 - 180.

[2] Nikezic D ,Lau BMF ,Stevanovic ,et al. Absorbed dose in target cell nuclei and dose conversion coefficient of radon progeny in the human lung [J]. J Environ Radioact ,2006 ,89 (1) : 18 - 29.

[3] Groves - Kirkby CJ ,Denman AR ,Phillips PS ,et al. Radon mitigation in domestic properties and its health implications - a comparison between during - construction and post - construction radon reduction [J]. Environ Int ,2006 ,32 (4) : 435 - 443.

[4] Samet JM. Residential radon and lung cancer: end of the story? [J] J Toxicol Environ Health A ,2006 ,69 (7) : 527 - 531.

[5] Taeger D ,Krahn U ,Wiethege T ,et al. A study on lung cancer mortality related to radon ,quartz ,and arsenic exposures in German uranium miners [J]. J Toxicol Environ Health A ,2008 ,71(13 - 14) : 859 - 865.

[6] 朴春南 ,田梅 ,刘建香 ,等. 氡诱发小鼠肺损伤与 p53 和 Bcl

有文献报道^[3] 在造血干细胞向造血祖细胞分化的过程中存在竞争抑制现象 即造血干细胞向各系造血祖细胞的分化并不均衡 当它向某系祖细胞分化占优势时 就可能抑制它向另外一些系列祖细胞的分化。前期我们报道过的牛膝精能促进造血干细胞向粒-单系造血祖细胞的分化是否就是这一推测的体现 尚待进一步的实验证实。

参考文献:

[1] 邹丹 ,张宇明 ,全宏勋. 牛膝对辐照小鼠粒-单系造血功能的影响 [J]. 中国辐射卫生 2008 ,17(4) : 407 - 408.

[2] 付莉 ,张宇明 ,刘建峰 ,等. 不同部位的巨噬细胞对小鼠红系血细胞发生的影响 [J]. 郑州大学学报 2009 ,44(5) : 974 - 976.

[3] Metcalf D ,Nicola NA. Proliferative effects of Purified granulocyte colony - stimulating factors(G - CSF) on normal mouse hemopoietic cells [J]. J cell Physiol. 1983 ,116: 198.

(收稿日期:2010 - 09 - 25)

- 2、Bax 蛋白表达的研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志 ,2009 29(2) : 195 - 198.

[7] 傅强. 放射性核素¹⁴⁷Pm 诱发 Molt - 4 细胞和 Ana - 1 细胞凋亡 [J]. 中华放射医学与防护杂志 ,1998 ,18(2) : 92 - 96.

[8] 朱寿彭. 电镜形态和 DNA 断裂研究¹⁵³Sm 内照射诱发骨肉瘤细胞凋亡 [J]. 中华放射医学与防护杂志 ,1998 ,18(2) : 98 - 100.

[9] Laperle KM ,Blomme EA ,Sagartz JE ,et al. Epididymal cribriform hyperplasia with nuclear atypia in p53 homozygous knockout mice on a mixed 129/SV - FVB/N background [J]. Comp Med ,2002 ,52(6) : 568 - 571.

[10] Yu X ,Kubota H ,Wang R ,et al. Involvement of Bcl - 2 family genes and Fas signaling system in primary and secondary male germ cell apoptosis induced by 2 - bromoprapane in rat [J]. Toxicol Appl Pharmacol ,2001 ,184(1) : 35 - 48.

[11] 苏旭 ,张迎春 ,万虹 ,等. 低剂量辐射对小鼠胸腺细胞成熟、分化、凋亡和激活的影响 [J]. 中华放射医学与防护杂志 ,1997 ,17(3) ,162 - 165.

[12] 苏旭 ,万虹 ,刘树铮. p53 和 bcl - 2/bax 在辐射诱导胸腺细胞凋亡中的作用 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报 ,1997 ,15(2) ,119 - 122.

(收稿日期:2010 - 12 - 02)

论文中法定计量单位的书写要求

本刊法定计量单位实行国务院 1984 年 2 月颁布的《中华人民共和国法定计量单位》并以单位符号表示。具体使用参照 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。正文中时间的表达 ,凡前面带有具体数据者应用 d、h、min、s ,而不用天、小时、分钟、秒。注意单位名称与单位符号不可混合使用 如 $ng \cdot kg^{-1} \cdot 天^{-1}$ 应改为 $ng \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$; 组合单位符号中表示相除的斜线多于 1 条时应采用负数幂的形式表示 如 $ng/kg/min$ 应采用 $ng \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式; 组合单位中斜线和负数幂亦不可混用 如前例不宜采用 $ng/kg^{-1} \cdot min^{-1}$ 的形式。在叙述中 ,应先列出法定计量单位数值 括号内写旧制单位数值; 但如同一计量单位反复出现 ,可在首次出现时注出法定计量单位与旧制单位的换算系数 然后只列法定计量单位数值。