

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00837

· 论 著 ·

BH3-only 成员参与辐射诱导的小鼠肝细胞凋亡

陈松,冯旭,邹赢铨,栾洁,张术,周意,储智勇*

海军医学研究所防护医学研究室,上海 200433

[摘要] **目的** 研究细胞凋亡及凋亡相关基因的表达在急性肝脏辐射损伤中的作用。**方法** 采用 BALB/c 小鼠以 ^{60}Co γ 射线进行全身照射,建立急性肝脏辐射损伤动物模型,光镜和电镜观察病变 48 h。然后采用蛋白质印迹分析法检测肝组织中 Caspase 3、Caspase 8、Bcl-2、Bcl-x_L、Bax、Bad、PUMA 和 Slug 蛋白表达,并采用原位末端标记法(TUNEL 染色)检测细胞凋亡。**结果** 辐照后 4 h 出现肝细胞变性和凋亡,辐照后 12 h 出现细胞坏死,辐照后 24~48 h 肝细胞凋亡达到峰值并检测到 Caspase 3 激活;Bcl-2 在辐照后 4~24 h 上调,于辐照后 48 h 回落;PUMA 在辐照后 4~48 h 上调;Bcl-x_L、Bad 在辐照后 6~48 h 上调;Bax、Slug 仅在辐照后 12 h 上调。**结论** 辐射诱导的 PUMA、Bad 表达上调与辐照后肝细胞凋亡增加有关。

[关键词] 肝;辐射损伤;细胞凋亡;依赖 p53 上调的凋亡调节子;Bad

[中图分类号] R 818.85 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)08-0837-05

BH3-only members are involved in radiation-induced apoptosis in mouse liver

CHEN Song, FENG Xu, ZOU Ying-xin, LUAN Jie, ZHANG Shu, ZHOU Yi, CHU Zhi-yong*

Department of Radiological Protection, Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of apoptosis-associated genes and the role of apoptosis in acute radiation-induced liver injury. **Methods** A mouse radiation model, which was irradiated with ^{60}Co γ ray, was established in this study, and the pathological changes were observed by light and electron microscopy for 48 hours. Western blotting analysis was used to measure the expression of some proteins (Caspase 3, Caspase 8, Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, Bad, PUMA, Slug) and TUNEL assay was employed to examine cell apoptosis in mouse liver. **Results** Degeneration and apoptosis were found in the liver at 4 h after irradiation and necrosis occurred at 12 h after irradiation. The peak of apoptosis with activation of Caspase 3 in liver was detected during 24-48 h after irradiation. Bcl-2 protein expression was up-regulated during 4-24 h after irradiation, then was down-regulated at 48 h; PUMA protein was up-regulated during 4-48 h after irradiation; Bcl-x_L and Bad protein were up-regulated during 6-48 h after irradiation; and Bax and Slug protein were up-regulated only at 12 h after irradiation. **Conclusion** Up-regulation of BH3-only members (PUMA and Bad) after irradiation may be associated with the increase of apoptotic cells in the liver.

[Key words] liver; radiation injuries; apoptosis; p53 up-regulated modulator of apoptosis; Bad

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8):837-841]

现在普遍认为,肝脏是放射较敏感的器官之一^[1],并且肝脏辐射损伤是临床放射性治疗(包括腹腔恶性肿瘤的放疗和骨髓移植射线预处理)、平时核事故及战时核辐射的常见并发症。以往研究表明,细胞凋亡及某些凋亡相关基因表达改变是辐射损伤的重要机制^[2-3],常见的 Bcl-2 家族成员含有 4 个短的保守 BH 结构域: BH1~BH4,而 BH3-only 亚族是指仅含有 BH3 结构域的一组蛋白,包括依赖 p53

上调的凋亡调节子(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)、Bad 等多个成员。BH3-only 亚族作为 Bcl-2 家族中一类重要的促凋亡分子,通过其独特的 BH3 结构域与该家族的其他成员如 Bcl-2、Bcl-x_L 和 Bax 等相互作用,引起线粒体外膜通透性增加,继而其内容物如细胞色素 C(cytochrome C)等释放入胞质并启动下游凋亡信号,因此 BH3-only 分子在凋亡调节中起着关键作用^[4],然而肝脏辐射损伤

[收稿日期] 2013-12-18 **[接受日期]** 2014-05-25

[基金项目] 海军医学研究所科研基金(12HY23)。Supported by Science Research Fund of Naval Medical Research Institute (12HY23)。

[作者简介] 陈松,硕士,助理研究员。E-mail: chensong529237@163.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81883188, E-mail: zhiyongchuleader@163.com

所引起的细胞凋亡与 BH3-only 亚族成员间关系的研究尚不多见。本研究拟通过检测凋亡相关蛋白表达和细胞凋亡的动态变化来系统地探讨肝脏辐射损伤机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与辐照方法 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 24 只,6~7 周龄,体质量(22.7±0.9)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[许可证号:SCXK(沪)2008-0016]。适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,每组 4 只,即:对照组(0 h),未接受辐照;辐照组设 5 个时相:4、6、12、24、48 h。用⁶⁰Co γ 射线辐照源(第二军医大学辐照中心提供)同时对辐照组进行 12 Gy 全身一次性均匀照射,剂量率为 2.5 Gy/min。

1.2 主要材料及试剂 一抗:Bcl-2、Bax 抗体购自 Trevigen 公司;Bcl-x_L、Bad 抗体购自 Epitomics 公司;PUMA、Caspase 3、Caspase 8 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司;锌指状转录抑制因子 Slug 抗体由美国哈佛大学医学院吴文书博士惠赠。二抗:山羊抗鼠 HRP 标记 IgG、山羊抗兔 HRP 标记 IgG 购自 Jackson ImmunoResearch 公司;兔抗鸡 HRP 标记 IgG 购自 Proteintech Group 公司。蛋白裂解液购自 Promega 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂购自深圳市创奇基因生物制品有限公司;Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒、增强化学发光(ECL)底物购自 Thermo Scientific 公司。原位细胞凋亡检测(TUNEL 染色)试剂盒购自 Roche 公司。

1.3 标本采集与病理检查 各组小鼠于辐照 4、6、12、24、48 h 后处死并收集肝脏标本。将肝脏组织分别作如下处理:(1)4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,制作 3 μ m 厚切片,H-E 染色,光镜观察组织病理改变;(2)2.5%戊二醛和 1%锇酸固定,制作 50~70 nm 超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,日立 H-7000 型透射电镜观察超微结构病理改变;(3)将剩余新鲜肝组织剪碎后速冻,液氮保存供后续实验使用。

1.4 原位细胞凋亡检测 将各组肝组织石蜡块制作成 3 μ m 厚切片,参考先前的方法^[5],按 TUNEL 染色步骤操作,DAB 显色,苏木精轻度复染后封片。凋亡细胞定量分析:在高倍镜下($\times 400$)对各组切片随机计数 5 个视野内阳性细胞数,求出每个时间点

的均数,进行统计分析。

1.5 蛋白质印迹分析检测 根据先前的方法^[6]处理各组肝总蛋白,按每泳道 80~100 μ g 总蛋白量上样,12% SDS-PAGE 分离。经电转、封闭后,一抗 anti-PUMA、anti-Bcl-2、anti-Bcl-x_L、anti-Bax、anti-Caspase 3、anti-Caspase 8、anti- β -actin (均为 1:1 000),anti-Bad (1:5 000),anti-Slug (1:10 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,相应 HRP 标记二抗(1:10 000)室温孵育 1 h;ECL 法显影,DYVERSITY 多功能成像仪(Syngene 公司)摄影记录,每项实验均重复 3 次。蛋白表达定量分析:用 ImageJ 1.41o 软件求得条带积分光密度(D)值,蛋白相对表达水平=目的蛋白 D 值/内参蛋白 β -actin D 值,以 0 h 水平为基准,结果以相对倍数表示。

1.6 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件包进行单因素方差分析,方差齐时组间比较采用 LSD 检验,方差不齐时组间比较采用 Dunnett's T3 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 辐照后急性期病理改变 由图 1A 可见,光镜下正常肝组织(0 h)见肝细胞形态规则,胞质染色均匀,肝索沿中央静脉呈放射状排列,肝窦清晰。辐照后 4~6 h 出现肝细胞胞质疏松化,部分细胞肿胀明显,互相挤压导致肝窦狭窄,符合肝细胞浊肿变性和气球样变性表现(图 1B)。图 1C、1D 显示,辐照后 12~24 h 肝细胞变性呈弥漫性进行性加重,部分中央静脉充血,周围肝窦扩张,门管区附近肝窦变窄、消失,局部有散在点状坏死和出血灶(▲所示)。辐照后 48 h 肝细胞损伤以细胞变性为主,坏死少见。

电镜显示正常肝细胞(0 h)胞质内含有大量糖原颗粒,细胞器丰富,以线粒体为主,核完整,核仁明显,染色质分布均匀(图 2A)。辐照后 4 h,少量肝细胞即出现早期凋亡特征,表现为细胞核染色质边集,电子密度增强,核形不规整,核膜表面凹凸不平,核仁凝固,细胞体积变小,细胞质浓缩,线粒体轻度肿胀,糖原颗粒聚集成片(图 2B)。辐照后 12 h,肝细胞形态除有凋亡改变外,还发现少量肝细胞坏死,表现为细胞核染色质凝集,细胞质电子密度增强,糖原颗粒聚集成片,细胞器结构不清,伴有游走淋巴细胞侵入肝实质(图 2C)。辐照后 24 h,肝细胞凋亡多

见,并以中期凋亡特征为主,表现为核内染色质凝聚、固缩,趋边呈月牙状,核膜孔消失,核膜呈波状

皱缩,线粒体高度肿胀,细胞体积缩小,细胞连接出现缝隙(图2D)。

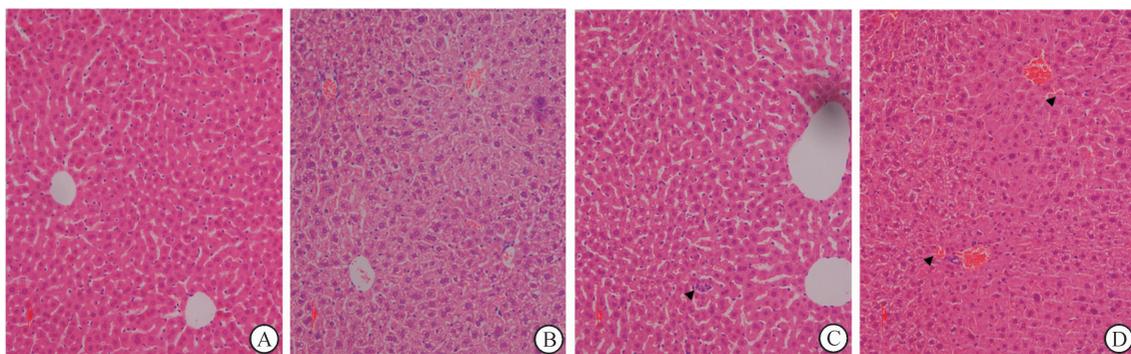


图1 辐照后小鼠肝组织病理学观察(H-E染色)

Fig 1 Histopathology of mouse liver slides after irradiation(H-E staining)

A: Normal non-irradiated liver slide (0 h); B: At 4 h after irradiation; C: At 12 h after irradiation; D: At 24 h after irradiation. Local hemorrhage and necrosis were shown (▲). Original magnification: $\times 200$

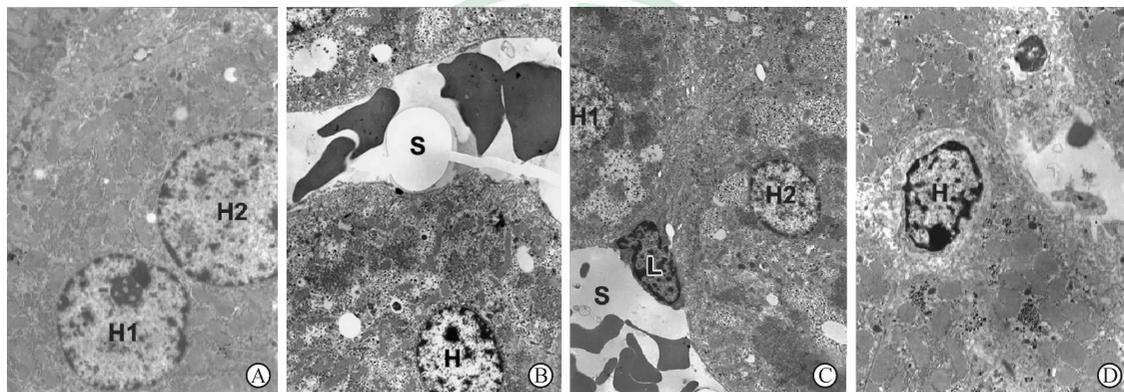


图2 辐照后小鼠肝超微病理学观察

Fig 2 Ultrastructural pathology of mouse liver slides after irradiation

H: Hepatocyte; S: Hepatic sinusoid; L: Lymphocyte. A: Normal non-irradiated liver slide (0 h); B: At 4 h after irradiation; C: At 12 h after irradiation; D: At 24 h after irradiation. Original magnification: $\times 3\,500$ (A), $\times 3\,000$ (B), $\times 2\,500$ (C), $\times 4\,000$ (D)

2.2 原位细胞凋亡检测结果 正常肝组织(0 h)平均每高倍视野可见到(0.20±0.45)个阳性细胞;辐照后4、6、12、24和48 h平均每高倍视野分别见到(4.20±0.84)、(12.40±1.82)、(14.20±2.05)、(66.20±4.38)和(72.40±7.02)个阳性细胞,以上阳性细胞仅指肝细胞和肝窦内皮细胞。其中除辐照后6 h和12 h、24 h和48 h间凋亡细胞数量差异无统计学意义($P>0.05$)外,其余各组两两比较均差异有统计学意义($P<0.01$)。原位细胞凋亡检测结果见图3。

2.3 辐照后肝脏凋亡相关蛋白的表达 凋亡效应酶Caspase 8在辐照后48 h内未见激活,而Caspase 3在辐照后24~48 h检测到剪切片段(图4A)。抗凋亡蛋白方面,Bcl-x_L于辐照后6~48 h上调;Bcl-2

于辐照后4~24 h上调,至48 h回落。促凋亡蛋白方面,作为凋亡执行者的Bax仅在辐照后12 h一过性上调(图4B)。由图4B和4C可见,作为凋亡调节者的BH3-only亚族成员,Bad蛋白表达呈上调趋势,同0 h水平比较,辐照后12、24、48 h表达量均上调($P<0.01$);PUMA蛋白表达也呈上调趋势,同0 h水平比较,辐照后4、12 h表达量均上调($P<0.01$),并于辐照后24~48 h维持在较高水平($P<0.05$)。作为抑制PUMA转录的调节因子Slug,同基础水平(0 h)比较,仅在辐照后12 h轻度上调($P<0.01$),其余时间点的表达量均低于基础水平并有统计学差异,即辐照后4、24 h($P<0.05$)和辐照后6、48 h($P<0.01$)。

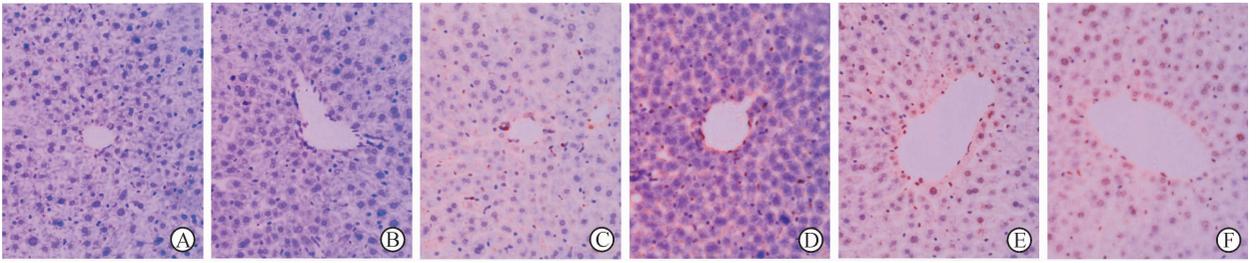


图 3 辐照后小鼠肝组织原位细胞凋亡检测(TUNEL 染色)

Fig 3 Detection of *in situ* apoptosis in mouse liver slides after irradiation(TUNEL staining)

A: Normal non-irradiated liver slide (0 h); B: At 4 h after irradiation; C: At 6 h after irradiation; D: At 12 h after irradiation; E: At 24 h after irradiation; F: At 48 h after irradiation. Original magnification: × 400

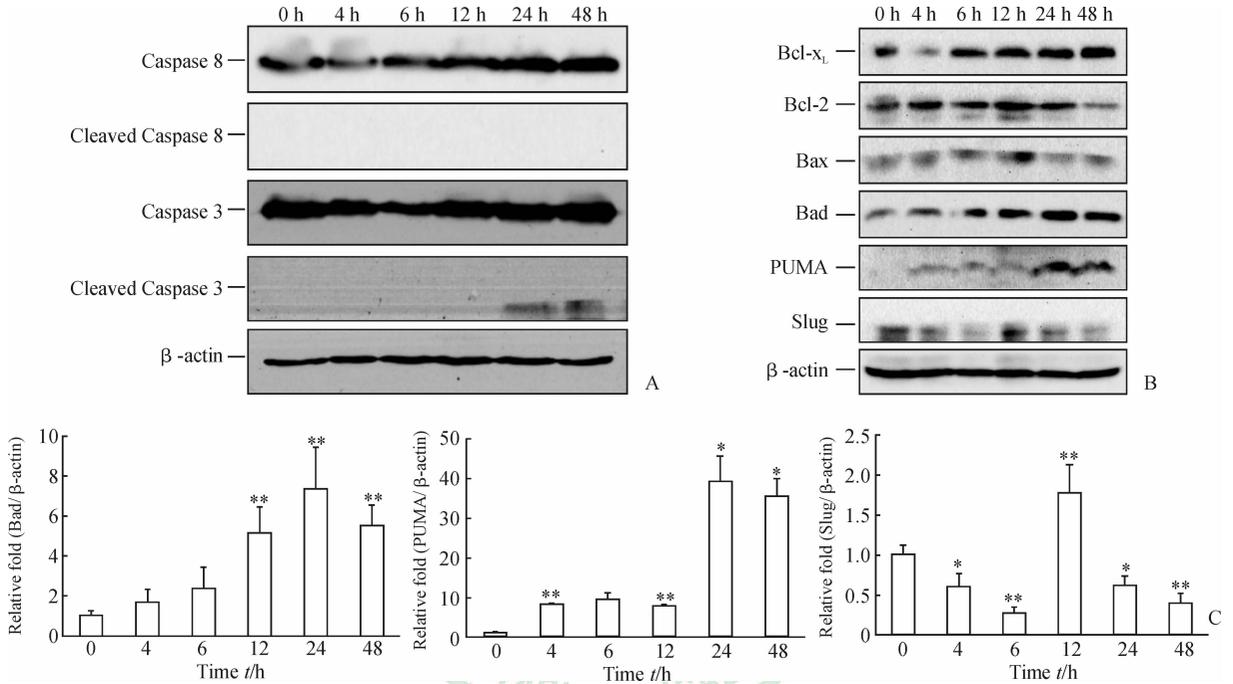


图 4 蛋白质印迹分析检测辐照后小鼠肝脏凋亡相关蛋白表达

Fig 4 Expression of apoptosis-associated proteins in mouse liver after irradiation detected by Western blotting analysis

PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis. A: Immunoblot graph of activation of Caspase 3 and Caspase 8; B: Immunoblot graph of some Bcl-2 family members; C: Band density of Bad, PUMA and Slug were shown as relative fold. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

临床上将电离辐射所引起肝脏的损伤统称为放射性肝病,根据病程可划分为两个阶段:急性放射性肝炎期和后续发生的肝纤维化及肝硬化期,并提出引起急性放射性肝炎的最小单次照射剂量约为 11 Gy^[7]。因此本研究选择 12 Gy γ 射线照射建立小鼠肝脏辐射损伤模型,通过光镜和电镜观察肝脏辐射损伤的病理特征,从而证实了该条件建模的可靠性。

结合透射电镜和光镜(H-E+TUNEL 染色)的动态观察结果,定性定量地研究辐照后急性期肝损伤情况,我们发现上述检测结果能够互相吻合,显示辐照后 48 h 内肝损伤呈进行性加重趋势。值得指

出的是,辐照后 4 h 即可观察到肝细胞超微结构的改变并提示有细胞凋亡发生,证实肝脏具有相当的辐射敏感性;辐照后 12 h 肝细胞同时出现凋亡和坏死两种损伤结局,此后肝细胞凋亡数量迅速跃升,并维持在较高水平,和李淑萍等^[3]的结果类似,因此推测辐照后 12 h 可能是肝脏辐射损伤的临界点,这对今后开展科研和医疗工作具有一定的参考价值。

为深入研究辐射诱导肝细胞凋亡的发生机制,我们首先检测了凋亡酶 Caspase 家族的激活情况, Caspase 8 作为死亡受体介导的凋亡通路关键环节,在辐照后未见激活;而作为凋亡执行者的 Caspase 3 却在辐照后 24~48 h 激活,与同时段 TUNEL 染色结果吻合,加之电镜显示该时间点肝细胞线粒体高

度肿胀,提示线粒体途径介导的凋亡可能是辐射诱导肝细胞损伤的主要机制。其次,我们还检测了辐照后肝脏凋亡相关蛋白的表达情况,结果表明 Bcl-2 家族中抗凋亡和促凋亡成员的表达水平同时上调,其中 Bax 上调仅见于辐照后 12 h,结合 TUNEL 染色结果分析,我们推测肝细胞凋亡增加并不完全依赖 Bax 的上调,而与 BH3-only 亚族成员 PUMA 和 Bad 的持续上调相关。我们先前的研究^[5]报道了 PUMA 参与调节正常小鼠肝细胞的凋亡,体内实验发现上调肝内 PUMA 水平后,不仅能同步带动抗凋亡分子 Bcl-x_L 上调,而且能显著诱导肝细胞凋亡和坏死,这一效应与 PUMA 介导的线粒体破坏和炎症细胞因子上调有关。而 Galmiche 等^[8]报道 Bad 参与调节人肝癌细胞的凋亡敏感性,Bad 的活性与其磷酸化水平呈负相关,单纯过表达 Bad 并不增加肝癌细胞凋亡,而在多激酶抑制剂索拉菲尼(sorafenib)的作用下,同时过表达 Bad 即可显著诱导凋亡,这可能与索拉菲尼降低 Bad 磷酸化水平,从而激活其功能有关。据此推测 PUMA 和 Bad 的上调可能是辐射诱导肝细胞凋亡的主要因素;而 Bcl-x_L 和 Bcl-2 的上调可能只是一种保护性反应,并不能扭转肝细胞凋亡增多的局面。BH3-only 亚族作为 Bcl-2 家族中一类特殊的促凋亡分子,在凋亡调控方面起着重要的作用,Shao 等^[9]报道 γ 射线诱导 PUMA 上调会引起造血干/祖细胞凋亡,我们的研究也提示 PUMA 与辐照后肝细胞凋亡相关,说明 PUMA 介导的凋亡信号对于辐射损伤机制具有较为普遍的意义。此外 Wu 等^[10]报道辐照后 Slug 上调能够抑制部分造血祖细胞凋亡,发挥一定的保护作用,其机制是锌指转录抑制因子 Slug 能够与 *puma* 基因转录起始区的特殊位点结合,并抑制其他转录激活因子的活性,从而在转录水平阻断 PUMA 表达,我们发现在肝脏 Slug 仅于辐照后 12 h 升高,而在辐照后 24~48 h 回落,因而推测经过 12 h 损伤临界点后 Slug 未能继续发挥抑制效应。总之,BH3-only 蛋白 PUMA 和 Bad 与辐照后急性期肝细胞凋亡有关,但何者占主导地位尚待进一步研究,探索辐照后磷酸化 Bad 的变化规律或许对回答该问题有所帮助;其次,Slug 蛋白持续表达能否提高肝细胞的辐射抗性也值得继续研究。

本研究对辐射诱导肝细胞凋亡的机制提出了新的见解:BH3-only 亚族成员 PUMA 和 Bad 的持续上调,保护性因子 Slug 的应答乏力可能是促进肝细

胞凋亡的重要原因。因此在遗传和化学水平特异性地抑制 BH3-only 亚族的功能,或者诱导保护性因子 Slug 表达,比如通过特异性干扰 RNA、BH3 结构域封闭剂、Slug 过表达载体等干预手段研究其抗辐射效应,可能会为筛选辐射防护药物提供新的思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 傅尚志,张楚毅,张景源. 电离辐射对肝脏的损伤[J]. 国外医学放射医学核医学分册, 1997, 21: 188-191.
- [2] 余日胜,陈丽荣,章伟敏,丁文洪,华建明,程莉芬,等. 高曝光剂量 CT 辐射致家兔肝组织发生病理变化的初步探讨[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15: 894-898.
- [3] 李淑萍,何津祥,李敏,杜兰宁,刘兆辰. 不同剂量 X 射线照射对小鼠胸腺、脾脏、肝脏细胞凋亡及 p53 基因表达的影响[J]. 辐射防护, 2007, 27: 349-356.
- [4] Adams J M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis[J]. Genes Dev, 2003, 17: 2481-2495.
- [5] Chen S, Zheng J, Hao Q, Yang S, Wang J, Chen H, et al. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice[J]. J Hepatol, 2010, 52: 864-871.
- [6] 陈松,郝强,杨生生,陈欢,焦炳华,蔡在龙. PUMA 在小鼠肝再生早期的表达及其调控机制[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30: 2731-2733.
- [7] 刘丽波,王剑峰,程光惠,王铁君,朴春姬,陈大伟. 《放射性肝病诊断标准》解读[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2012, 36: 252-255.
- [8] Galmiche A, Ezzoukhy Z, François C, Louandre C, Sabbagh C, Nguyen-Khac E, et al. BAD, a proapoptotic member of the Bcl2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cancer Res, 2010, 8: 1116-1125.
- [9] Shao L, Sun Y, Zhang Z, Feng W, Gao Y, Cai Z, et al. Deletion of proapoptotic PUMA selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation[J]. Blood, 2010, 115: 4707-4714.
- [10] Wu W S, Heinrichs S, Xu D, Garrison S P, Zambetti G P, Adams J M, et al. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing *puma* [J]. Cell, 2005, 123: 641-653.