

白细胞介素-6对荷瘤小鼠正常组织的 辐射保护效应

刘永彪^{1,2} 梅开² 刘颖² 郝兴芝² 赵杰² 张先稳² 周强² 姚思德¹

1 (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2 (徐州医学院肿瘤研究所 徐州 221002)

摘要 以受全身照射的S₁₈₀肉瘤荷瘤小鼠为研究对象,利用化学比色法测定荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺、脑和骨髓组织的活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性,探讨白细胞介素-6(IL-6)对荷瘤机体正常组织辐射防护效应及机理。结果显示:荷瘤鼠受照射后其肝脏、肾脏、脾脏、骨髓、脑、肺组织匀浆中ROS、MDA含量明显升高,而GSH-Px和CAT活性明显降低,其机制是电离辐射造成抗氧化酶的损伤及机体内自由基含量上升。IL-6能够显著降低受照射荷瘤小鼠肝脏、脾脏、骨髓、脑组织匀浆中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平,提高谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)活性。对肾脏、肺组织匀浆中ROS、MDA含量和GSH-Px、CAT活性无明显影响。本实验提示IL-6通过清除ROS和保护抗氧化酶的损伤起辐射保护作用,IL-6对不同组织细胞辐射保护作用程度不同,是由于机体细胞中IL-6R的数量、亲和力及IL-6信号传导途径存在差异。

关键词 白细胞介素-6, 电离辐射, S₁₈₀肉瘤荷瘤小鼠, 活性氧, 丙二醛, 谷胱甘肽过氧化物酶, 过氧化氢酶
中图分类号 R811.5

放射治疗是目前治疗肿瘤最有效的方法之一,但许多肿瘤细胞辐射敏感性不高,即使接受很高的照射剂量也不能完全被杀灭;另一方面,电离辐射在杀灭或抑制肿瘤细胞的同时,不可避免地使全身正常组织造成损伤,其结果是引起机体功能紊乱,增加肿瘤局部复发和/或全身转移的机会,因此选择有效的正常组织辐射保护剂成为肿瘤放射治疗的重要研究方向之一。文献[1]、[2]报道白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)已用于辐射引起的造血系统的损伤,或与粒-巨细胞集落刺激因子等联用促进粒细胞、血小板再生^[3]。我们的研究发现IL-6通过促进Bcl-2蛋白表达,可增强脾细胞的抗氧化活性,抑制氧自由基对脾细胞的损伤,延长脾细胞的寿命,增强其免疫功能并发挥辐射防护作用^[4]。但IL-6对其它正常组织是否有辐射保护作用很少有文献报道。本文以接受全身照射的荷瘤小鼠为研究对象,就这一问题作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

7周龄左右的纯品系BALB/C雄性小鼠,体重

(20±2)g,由中国科学院上海实验动物中心提供。将荷瘤小鼠随机分为3组:(1)对照组:荷瘤小鼠不予以照射,继续饲养至实验结束。(2)单纯照射组:采用直线加速器X线全身照射。(3)照射给药组。

1.2 动物模型及辐照给药

小鼠肿瘤模型复制、照射条件、IL-6给药方参见文献[4]。

1.3 组织内氧化还原状态指标的测定

采用化学比色法对荷瘤鼠肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺、脑和骨髓组织的活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)的活性进行测定。

1.3.1 动物处理 荷瘤小鼠放射结束后次日,采用颈椎脱臼法处死小鼠,立即取出其肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺和脑组织,置于预先配制预冷的匀浆介质中,同时取其股骨,用匀浆介质冲洗收集骨髓细胞。

1.3.2 肝脏、脾脏、肾脏、心脏、肺、脑组织匀浆制备 取各组织块约1g放入冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重后放入试管中,用

第一作者:刘永彪,男,1963年出生,1999年于苏州大学获硕士学位,现为中国科学院上海应用物理研究所读博士

收稿日期:2003-10-10,修回日期:2003-12-19

量筒量取 9 倍组织块重量的预冷匀浆介质倒入试管中；在冰水中用电动匀浆器高速匀浆使组织细胞破碎，将组织匀浆于 4℃ 离心 10 min (4000 r/min)。取适量上清液进行各项指标测定。严格按测定盒(南京建成生物有限公司)说明书进行,所有试剂现用现配。

1.3.3 骨髓细胞标本制备 取骨髓细胞悬液,离心 10 min (1500 r/min), 去上清, 加入匀浆介质调细胞浓度为 1×10^7 /mL, 取细胞悬液 1 mL, 4℃ 下离心 10 min (1500 r/min), 去上清, 再加入 1 mL 匀浆介质, 在冰水中用电动匀浆器低速匀浆使细胞破碎, 将细胞裂解液以 4000 r/min 离心 10 min, 取适量上清液进行各项指标测定。

1.3.4 组织 ROS 的测定 将配制好的应用液先在 37℃ 水浴中预热 3 min, 在 37℃ 水浴中加入试剂, 按说明书试剂加入操作步骤进行, 同时设标准空白管、标准管, 在室温下加入显色剂, 混匀, 反应 20 min 后用 752 紫外分光光度计测定 550 nm 处吸光度 (OD 值)。

ROS 含量 = [(测定管 OD 值 - 对照管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 标准空白管 OD 值)] × 标准管浓度 × 1 mL (取样量)。

1.3.5 MDA 测定 先取 200 μL 各样本加入试管中, 按说明书试剂加入操作步骤进行, 测定空白管中加入 50% 冰醋酸, 95℃ 水浴 40 min, 取出冷却后 3000r/min 离心 10 min, 取上清置于 1cm 比色杯, 用分光光度计测定 532 nm 处每管吸光度。每次实验均设 2 只标准管、标准空白管和测定空白管。

MDA 含量 = [(测定管 OD 值 - 测定空白管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 标准空白管 OD 值)] × 标准品浓度 × 蛋白含量。

1.3.6 GSH-Px 测定 (1) 酶促反应 对照管和测定管分别加 1mmol/L 的 GSH 液和样本 200 μL 后 37℃ 水浴 5 min, 加入试剂 1 在 37℃ 水浴准确反应 3min, 再各加入试剂, 对照管加 200 μL 样本, 混匀后离心 10 min (4000r/min), 取上清 2 mL 进行显示反应。(2) 显示反应 取上清 2 mL, 依次按试剂

盒说明加入各试剂后混匀, 反应 15 min, 用 1cm 比色杯, 测定 412 nm 处各管吸光度。每次实验均设空白管标准管。

GSH-Px 活力 = [(非酶管 OD - 酶管 OD) / (标准管 OD - 空白管 OD)] × 标准管浓度 × 稀释倍数 / (反应时间 × 蛋白含量)。

1.3.7 CAT 测定 取各标本 20 μL 加入比色皿底部, 将底物溶液(已预热至 25℃, OD 值在 0.5—0.55 之间) 3mL 用移液器快速冲入比色皿中, 240nm 处立即测定吸光度, 记下 OD₁ 值, 比色皿不取出, 1min 后立即再测定一次吸光度, 记下 OD₂ 值。

CAT 活力 = [log (OD₁/OD₂)] × (2.303 × 稀释倍数 × 组织蛋白含量) ÷ 60s。

1.3.8 组织蛋白含量测定用考马斯亮蓝法 考马斯亮蓝 CBB_{G250} 贮备液用时按所需用量用蒸馏水 1 : 4 稀释配成应用液, 蛋白标准品 1 瓶用时以生理盐水稀释成 0.7mg/mL 浓度。向测定管先加入样品 50 μL, 再加入显色剂, 混匀后反应 10 min, 用 1cm 光径比色杯测定 595 nm 处吸光度。

蛋白含量 (mg/mL) = (测定管吸光度 × 标准管浓度) / 标准管吸光度。

1.4 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性差异用 *t* 检验。

2 结果

荷瘤小鼠受照射后其肝脏、肾脏、脾脏、骨髓、脑、肺组织匀浆中 ROS、MDA 含量明显升高, 而肝脏、脾脏、骨髓、脑组织匀浆中 GSH-Px 和 CAT 活性明显降低。IL-6 能够显著降低受照射荷瘤小鼠肝脏、脾脏、骨髓、脑组织匀浆中 ROS、MDA 水平, 提高肝脏、脾脏、骨髓、脑组织匀浆中 GSH-Px 活性和 CAT 肝脏、脾脏、骨髓组织匀浆中活性。对肾脏、肺组织匀浆中 ROS、MDA 含量和 GSH-Px 活性及肾脏、肺、脑组织匀浆中 CAT 活性无明显影响。结果见表 1—表 4。

表 1 白介素-6 对受照荷瘤小鼠正常组织中活性氧含量的影响

Table 1 The effect of IL-6 on content of ROS in normal tissues of tumor-bearing mice after irradiation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

器官 Organs	对照组 Control	单纯照射组 Irradiation	照射给药组 Irradiation + IL-6
Liver	54.35 ± 6.58	73.85 ± 8.64 ²⁾	58.70 ± 5.26 ³⁾
Kidney	29.58 ± 2.53	34.32 ± 4.25 ¹⁾	31.66 ± 3.84
Spleen	26.48 ± 3.77	42.54 ± 6.01 ²⁾	30.2 ± 3.87 ³⁾
Marrow	13.63 ± 2.54	18.96 ± 3.57 ²⁾	14.78 ± 2.89 ³⁾
Brain	24.47 ± 3.49	32.15 ± 4.41 ²⁾	26.11 ± 3.78 ³⁾
Lung	40.66 ± 5.52	48.5 ± 6.21 ¹⁾	44.21 ± 5.96

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (vs control), 3) $P < 0.01$ (vs irradiation)

表 2 白介素-6 对受照荷瘤小鼠正常组织中丙二醛含量的影响

Table 2 The effect of IL-6 on content of MDA in normal tissues of tumor-bearing mice after irradiation ($x \pm s, n = 6$)

器官 Organs	对照组 Control	单纯照射组 Irradiation	照射给药组 Irradiation + IL-6
Liver	8.25 ± 0.98	13.12 ± 1.65 ²⁾	10.47 ± 2.81 ⁴⁾
Kidney	3.44 ± 0.46	4.88 ± 0.62 ¹⁾	4.68 ± 0.54
Spleen	6.42 ± 1.01	9.24 ± 1.22 ²⁾	7.56 ± 1.32 ³⁾
Marrow	3.68 ± 0.48	8.65 ± 0.85 ²⁾	4.05 ± 0.66 ⁴⁾
Brain	10.15 ± 1.32	18.54 ± 2.77 ²⁾	12.55 ± 3.33 ⁴⁾
Lung	12.28 ± 1.82	15.12 ± 2.16	13.08 ± 2.69

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (vs control), 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ (vs irradiation)

表 3 白介素-6 对受照荷瘤小鼠正常组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

Table 3 The effect of IL-6 on activities of GSH-Px in normal tissues of tumor-bearing mice after irradiation ($x \pm s, n = 6$)

器官 Organs	对照组 Control	单纯照射组 Irradiation	照射给药组 Irradiation+IL-6
Liver	48.5 ± 5.24	34.58 ± 4.55 ¹⁾	39.64 ± 5.63 ²⁾
Kidney	30.77 ± 4.24	28.56 ± 3.12	29.78 ± 5.14
Spleen	22.74 ± 2.85	15.60 ± 2.03 ¹⁾	19.87 ± 2.23 ²⁾
Marrow	16.32 ± 2.47	11.78 ± 2.94 ¹⁾	15.38 ± 3.12 ³⁾
Brain	23.16 ± 4.10	16.54 ± 3.37 ¹⁾	20.10 ± 3.97 ²⁾
Lung	18.26 ± 3.22	16.34 ± 3.07	16.50 ± 3.42

1) $P < 0.01$ (vs control), 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$ (vs irradiation)

表 4 白介素-6 对受照荷瘤小鼠正常组织中过氧化氢酶活性的影响

Table 4 The effect of IL-6 on activities of CAT in normal tissues of tumor-bearing mice after irradiation ($x \pm s, n = 6$)

器官 Organs	对照组 Control	单纯照射组 Irradiation	照射给药组 Irradiation+IL-6
Liver	448.62 ± 46.42	315.20 ± 34.68 ²⁾	379.45 ± 45.32 ³⁾
Kidney	230.54 ± 24.64	201.22 ± 22.77	210.47 ± 25.60
Spleen	45.78 ± 4.02	24.33 ± 2.56 ²⁾	37.30 ± 4.55 ³⁾
Marrow	58.74 ± 5.71	39.27 ± 4.01 ²⁾	45.97 ± 4.87 ³⁾
Brain	34.68 ± 5.22	29.45 ± 5.14 ¹⁾	28.47 ± 4.24
Lung	120.74 ± 14.52	108.47 ± 10.12	103.41 ± 9.48

1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (vs control), 3) $P < 0.05$, (vs irradiation)

3 讨论

正常情况下体内自由基及脂质过氧化物不断产生, 又在内源性抗自由基损伤系统的作用下不断被清除, 始终保持适度的低水平。少量的自由基参与许多重要的生化反应, 在维持生命活动中起重要作用^[5]。在放射治疗过程中, 抗氧化酶活性的降低和 O_2^- 等氧自由基作用的增强, 是电离辐射引起机体过氧化损伤、导致组织细胞功能异常的重要原因。由于对正常组织的放射损伤限制了肿瘤放疗时剂量的增加, 因此降低了肿瘤局控率。活性氧 (ROS) 包括羟自由基 ($\cdot OH$)、超氧自由基 (O_2^-)、单线氧 ($^1O_2^*$) 和过氧化氢 (H_2O_2), 广泛存在于组织器官中^[6], 细胞内的抗氧化物起到清除这类代谢产物的作用, 但

当生成和清除平衡受到破坏时就会产生一种氧胁迫持续状态, 当一些有关细胞生命的关键大分子氧化损伤到一定程度后, 可导致包括信号转导和基因表达的变化, 从而促进细胞有丝分裂的发生、突变以及细胞死亡^[7, 8]。近年来细胞分子水平调节的研究显示, 活性氧自由基与肿瘤的发生、发展及抗肿瘤免疫的关系十分密切。

本实验结果表明, 荷瘤鼠受照射后其肝脏、肾脏、脾脏、骨髓、脑、肺组织匀浆中 ROS、MDA 含量明显升高, 而 GSH-Px 和 CAT 活性明显降低。电离辐射作用于有机体, 可以产生包括 ROS 在内的自由基, 使得自由基生成和清除平衡受到破坏而产生一种氧胁迫环境, 可使细胞膜上饱和脂肪酸发

生氧化损伤,形成脂质过氧化物(LPO),MDA是由环过氧化物 β -断裂而产生,可以作为衡量脂质过氧化程度的指标,MDA能进攻蛋白分子的氨基,导致蛋白质分子的交联和分子间交联。CAT、GSH-Px具有防御氧毒性、清除超氧阴离子自由基的作用,在增强机体抗辐射能力、维持体内超氧阴离子自由基产生与清除的动态平衡中起重要作用;GSH-Px的主要生物学作用是清除脂类过氧化物及 H_2O_2 ,减轻有机氢过氧化物对机体的损伤。辐射损伤可使多种酶,特别是清除自由基的酶活性下降,进一步造成机体内自由基的产生与清除不平衡。

本实验发现IL-6能明显降低荷瘤鼠受X线照射后骨髓、肝脏、脑、脾脏组织匀浆中的ROS、MDA含量,提高荷瘤鼠受X线照射后骨髓、肝脏、脑、脾脏组织匀浆中的GSH-Px活性及骨髓、肝脏、脾脏组织匀浆中的CAT活性,而荷瘤鼠肺和肾脏组织匀浆中的ROS、MDA含量和GSH-Px、CAT活性在本实验条件下照射后均无明显变化。IL-6这种选择性的对荷瘤鼠机体正常组织辐射防护效应结果未见有文献报道。电离辐射引起的机体不同组织细胞自分泌、旁分泌和内分泌IL-6基因的表达水平是决定辐射结果的重要方面,这些蛋白的诱导不但与急性、亚急性、慢性的辐射损伤有关,同时也与细胞生存和增殖密切相关^[9-10]。IL-6和GSH对减轻ROS引起的辐射损伤有协同作用^[11],在不同剂量下小鼠的生存能力与IL-6和GSH剂量有剂量依赖关系。外源性的IL-6进入机体发挥生物效应的机制较复杂,不同组织细胞的IL-6受体(IL-6R)分布和含量差别较大,IL-6抗辐射引起的组织损伤可能通过一个功能性的受体系统实现^[12-13]。IL-6通过靶细胞膜上的特异性受体(IL-6R)起作用,IL-6R由IL-6R α (80kD)和IL-6R β (gp130)参与IL-6高亲和力结合位点的形成,具有信号传递功能,只有高亲和力的IL-6R(有gp130参与)才能有效介导IL-6的信号转导。IL-6的信号转导途径主要有两条:Jak/Stata途径和Ras/NF-IL-6途径,而且它们可能分别介导IL-6不同的生物学功能,Ras/NF-IL-6途径的活化在很多类型的靶细胞上与IL-6所介导的细胞增殖相关,PKA途径的活化可以调控IL-6的Jak/Stata途径的诱导激活^[14-15]。在不

同的组织细胞中IL-6R的数量、亲和力及IL-6信号转导途径存在差异,由此引起细胞对辐射的敏感性不同的机制还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Seki H, Iwai K, Kanegane H, *et al.* Cell Immunol, 1995, **163** (1):30—36
- 2 Patchen M L, Fischer R, Macvittie T J, *et al.* Exp Hematol, 1993, **21** (2):338—346
- 3 Geissler K, Valent P, Bettelheim P, *et al.* Blood, 1992, **79** (5):1155—1162
- 4 梅开, 刘永彪, 王绪, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2003, **21** (2):131—134
MEI Kai, LIU Yongbiao, WANG Xu, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2003, **21** (2):131—134
- 5 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1987. 251—254
FANG Yunzhong, LI Wenjie. Free radical and enzyme. Beijing: Science Press, 1987. 251—254
- 6 Wiseman H, Halliwell. B. Biochem, 1996, **313** (1):17—29
- 7 Hunt C R, Sim J E, Sullivan S J, *et al.* Cancer Res, 1998, **58** (17):3986—3992
- 8 Mills E M, Takeda K, Yu Z X, *et al.* J Biol Chem, 1998, **273** (35):22165—22168
- 9 HONG Angela, Med M, ZHANG M, *et al.* Int Oncology Radioation Biol Phys. 2001, **50** (2):533—540
- 10 Kesara J W, WANG X C, Rebecca J, *et al.* Int Oncology Radioation Biol Phys, 2000, **49** (4):1015—1021
- 11 Brouazin-Jousseume V, Guitton N, Legue F, *et al.* Anticancer Res, 2002, (1A):257—262
- 12 Dar-chone Chow1, Lena Brevnova1, HE Xiaolin, *et al.* Biochimica et Biophysica Acta, 2002, (1592):225—235
- 13 Zoran Culig, Georg Bartsch. Molecular and Cellular Endocrinology. 2002, **197**(2):231—238
- 14 Taga T, Kishimoto T. Annu Rev Immunol, 1997, **15**(4):797—807
- 15 Ogata A, Chanhan D, Teoh G. *et al.* J Immunol, 1997, **159** (5):2212—2221

The studies on radio-protective effects of IL-6 to normal tissue of irradiated tumor bearing mice

LIU Yongbiao^{1,2} MEI Kai² LIU Ying² HAO Xingzhi² ZHAO Jie²
ZHANG Xianwen² ZHOU Qiang² YAO Side¹

1 (Shanghai Institute of Applied Physics, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

2 (The Cancer Institute of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002)

Abstract In order to investigate radioprotective effects of interleukin-6 (IL-6) to normal tissues of irradiated tumor-bearing S₁₈₀ sarcoma mice and its related mechanism, the contents of reactive oxygen species(ROS), malondialdehyde (MDA), activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in liver, kidney, spleen, lung, brain, marrow were determined. It was found that the content of ROS and MDA increased and the content of GSH-Px and CAT decreased in normal tissues of tumor-bearing S₁₈₀ sarcoma mice under fractional total-body-irradiation (TBI). With addition of IL-6 the content of ROS and MDA was decreased and the activity of GSH-Px and CAT was increased in liver, spleen, brain, marrow, whereas there is no significant effect on the lung and kidney tissues. It can be deduced that IL-6 has some radio-protective effects to the normal tissue of tumor-bearing mice involved in fractional TBI via scavenging ROS and protecting antioxidant enzymes. As the number, affinity of IL-6 receptor and signal transfer pathway of IL-6 are changeable, the radio-protective effects of IL-6 in various tissues are different.

Key words Interleukin-6, Ionizing radiation, Tumor-bearing S₁₈₀ sarcoma mice, Reactive oxygen species, Malondialdehyde, Glutathione peroxidase, Catalase

CLC R811.5