

低剂量辐射对白血病小鼠肿瘤细胞凋亡的影响^{*}

李现军¹, 李广宙¹, 于明明¹, 杨兆禄², 孙建梅³

(¹ 潍坊医学院附属医院核医学科, 山东 潍坊 261031; ² 潍坊医学院附属医院放疗科; ³ 潍坊市第二人民医院)

[摘要] 目的 研究低剂量辐射(LDR)后不同时间白血病小鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)和骨髓白血病细胞凋亡的变化,为低剂量全身辐射辅助治疗白血病提供实验研究基础。方法 将体外培养扩增的 WEHI-3 细胞尾静脉注射接种于 BALB/c 小鼠体内,诱导移植性粒单白血病发生。60 只成功建立的粒单白血病模型小鼠,实验组和对照组各 30 只,对照组小鼠不予 LDR,实验组小鼠同时给予 75mGy 的 LDR。于 LDR 后 1d, 2d, 3d, 5d 和 10d 分别处死 6 只实验组及 6 只对照组小鼠,取其血清及骨髓,放射免疫分析法检测 TNF, 荧光显微镜、电镜观测骨髓白血病细胞的凋亡情况。结果 LDR 后不同时间小鼠血清 TNF 水平有不同程度的变化,1d 和 2d 升高最为显著 ($P < 0.05$), LDR 后 10d 血清 TNF 水平已接近对照组 ($P > 0.05$)。LDR 后第 2 天、第 3 天骨髓白血病细胞凋亡率最高,第 5 天和第 10 天次之 (P 均 < 0.05),骨髓白血病细胞凋亡率的变化略滞后于血清 TNF 的变化。结论 LDR 可使白血病小鼠血清 TNF 水平显著升高、骨髓白血病细胞凋亡率增加, LDR 对小鼠粒单白血病的治疗是积极、有效的。

[关键词] 辐射, 低剂量; 模型小鼠; 白血病; TNF; 细胞凋亡

[中图分类号] R 551 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-3101(2005)06-0407-03

The Effect of Whole Body Low Dose Radiation on Apoptosis of Mice Leukemia Cell

LI Xian-jun¹, LI Guang-zhou¹, YU Ming-ming¹, YANG Zhao-lu², SUN Jian-mei³

(¹ Department of Nuclear Medicine, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, China;

² Department of Radiotherapy, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College; ³ The Second People's Hospital)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect caused by low dose radiation (LDR) on the level of tumor necrosis factor(TNF) and apoptosis of leukemia cell in myelomonocytic leukemia mice. Stimulatory effect of LDR on immune function is to be illuminated in this study in order to provide an experimental basis for auxiliary therapy on leukemia. **Methods** WEHI-3 cells were injected into BALB/c mice through tail veins to make an experimental animal model of myelomonocytic leukemia. 60 leukemia models were used. 30 animal models were irradiated with LDR of 75mGy at the same time and the others were not. 6 animal models with LDR and 6 animal models without LDR would be killed at the time the 1st day, the 2nd day, the 3rd day, the 5th day and the 10th day after LDR in order to extract serum samples and bone marrow. The level of TNF and apoptosis percentage of leukemia cell in bone marrow were examined. **Results** There was remarkable difference between the mice which were killed at different time. The level of TNF was the highest on the 1st day and the 2nd day ($P < 0.05$) and declined after that. The percentase of leukemia cell apoptosis was raised after LDR and went to top on the 2nd day and the 3rd day. **Conclusion** LDR could significantly increase the level of TNF and apoptosis percentage of leukemia cell in bone marrow. It shows that LDR is effective on leukemia mice recovery.

[KEY WORDS] Low dose radiation; Mice model; Leukemia; TNF; Apoptosis

急性白血病是血液系统最常见的恶性疾病,克隆中的白血病细胞停滞在细胞发育的不同阶段,在骨髓和其它组织中异常增生及浸润,可导致造血功能抑制及免疫功能受损。近年来,低剂量辐射(LDR)的抗肿

瘤作用日益受到众多学者的关注,本研究旨在通过研究 LDR 对白血病小鼠血清肿瘤坏死因子(TNF)和骨髓白血病细胞凋亡的影响,探索低剂量全身辐射对白血病的辅助治疗价值。

* [基金项目] 山东省卫生厅科研基金资助项目(课题编号:HZ153)

[作者简介] 李现军(1975 年 7 月~),男(汉族),山东省临朐县人,在读硕士。主要研究方向:肿瘤核医学。

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立 小鼠粒单白血病细胞系 WEHI-3 由协和医科大学细胞中心提供, 将体外培养扩增的细胞悬液 0.5ml (含 WEHI-3 细胞 1×10^6), 尾静脉注射接种于 8 周龄成年 BALB/c 小鼠 (编号: 鲁动质字 200001002 号) 体内。接种后密切观察小鼠生活习性的变化, 于第 15 天、第 20 天、第 25 天和第 28 天经尾静脉取外周血进行白细胞计数及分类, 血涂片瑞氏染色 OLYMPUS U-SPT 光学显微镜观察。

1.2 分组及处理方法 60 只成功建立的粒单白血病模型小鼠, 实验组和对照组各 30 只。对照组小鼠不予 LDR, 实验组小鼠同时给予总剂量 75mGy 的 LDR, 密切观察小鼠生活习性的变化, 于 LDR 后 1d, 2d, 3d, 5d 和 10d 分别处死 6 只实验组小鼠及相应数量的对照组小鼠, 取血清、骨髓及骨髓涂片。照射使用 WDVE-6/100 型直线加速器, 靶皮距 212cm, 剂量率 12.5mGy/min, 总剂量 75mGy, 将小鼠置于加速器照射野内一次性全身照射。

1.3 TNF 的检测 北京核仪器厂 BH6020 型 γ 计数器, TNF 放免试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供, 操作按说明书进行。

1.4 骨髓涂片的荧光显微镜观察 处死小鼠取其骨髓涂片, 使用碧云天 Hoechst 凋亡染色试剂盒 (产品编号 C0003, 生产日期 2004 年 9 月), 具体步骤按其说明进行。德国产 LEICA DMIREZ 型荧光相差倒置显微镜观察, 计数 200 个白血病细胞, 计算凋亡细胞百分率。

1.5 骨髓标本的电镜观察 处死小鼠取其骨髓, 用 3% 戊二醛固定 2h, 1% 的锇酸后固定 1h, 常规梯度脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 超薄切片, 经醋酸双氧铀、柠檬酸铅染色后封片, 日本产 H-7500 透射电镜观察。

1.6 统计方法 各组计量资料数据以表示, 两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 动物模型的观察 接种 WEHI-3 细胞后 BALB/c 小鼠外周血白细胞计数于 15d 开始升高, 出现未成熟粒、单核细胞 (见表 1)。接种后 20~28d 发病, 外周血中可以见到粒单白血病细胞, 光镜下胞体较大, 形态不规则, 核染色质纤网状, 可见凹陷折叠, 胞浆天蓝色, 可见紫红色嗜天青颗粒。小鼠发病后精神萎靡, 目光暗淡, 步态不稳, 行动迟缓, 食量减少, 腹部日渐膨隆。上述检测显示白血病模型已成功建立。白血病小鼠 LDR 后 2d 内活力明显增强, 进食增多, 活动量增加。

表 1 小鼠外周血白细胞计数及分类结果 ($n=70, \bar{x} \pm s$)

检测指标	正常值	15d	20d	25d	28d
白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	8.0 ± 2.0	19.2 ± 1.7	51.5 ± 1.9	69.1 ± 3.6	98.5 ± 3.4
未成熟粒单核细胞 (%)	< 3.0	5.2 ± 0.9	13.3 ± 0.7	18.0 ± 0.7	24.9 ± 0.72

表 2 LDR 后不同时间血清 TNF 及骨髓细胞凋亡率检测结果 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

检测时间	TNF ($\mu g \cdot L^{-1}$)		凋亡率 (%)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
1d	2.29 ± 0.23^a	1.27 ± 0.15	17.3 ± 2.4^a	8.5 ± 2.0
2d	1.91 ± 0.34^a	1.21 ± 0.19	29.4 ± 3.6^a	7.9 ± 1.6
3d	1.79 ± 0.46^a	1.34 ± 0.21	28.2 ± 3.1^a	8.3 ± 1.8
5d	1.54 ± 0.49^a	1.28 ± 0.22	19.4 ± 2.9^a	9.2 ± 1.9
10d	1.40 ± 0.44	1.29 ± 0.26	12.8 ± 2.1^a	7.3 ± 1.7

与对照组比较 $^a P < 0.05$; 与对照组比较 $^b P < 0.01$

2.2 TNF 的检测结果 白血病小鼠经 75mGy 的 LDR 后 1d, 2d, 3d 和 5d TNF 水平较对照组有明显升高, 其中以 1d 和 2d 升高最为显著 (P 均 > 0.05), LDR 后 10d 血清 TNF 水平已接近对照组 ($P > 0.05$), 对照组不同时

间 TNF 水平无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 荧光显微镜观察 荧光显微镜下可见小鼠正常骨髓细胞核发出淡蓝色的荧光, 发生凋亡的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 形状不规则。小鼠骨髓白血病细胞凋亡百分率与对照组比较, 照射后第 2 天、第 3 天最高, 第 5 天和第 10 天次之 (P 均 < 0.05), 对照组间凋亡细胞百分率无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.4 电镜观察 电镜下实验组和对照组骨髓中均可见胞核形状极不规则的白血病细胞, 实验组电镜下多见发生凋亡的白血病细胞, 可见核染色质边集现象和典型的凋亡小体, 对照组少见。

3 讨论

早在 1980 年 Luckey 就证明了 LDR 能使机体的某些生物功能增强, 即一定的低剂量辐射对生物生命活动的兴奋效应。有研究显示, LDR 可减少肿瘤的生长、扩散及转移^[1]。吉林大学谭业辉等人^[2]近年来的动物实验证实 LDR 具有抗淋巴细胞白血病的作用, 可使荷瘤小鼠白血病细胞生长受抑制, 延缓白血病小鼠病情进展, 生存期延长。已有研究发现细胞因子的表达与调控异常可能参与了白血病的发生及发展过程^[3]。TNF 在机体免疫应答、免疫调节和抗肿瘤免疫中具有重要作用, 已有文献证实^[4,5], 白血病患者血清 TNF 水平明显低于正常人, 它的产生或表达异常与临床疾病有密切关系。本研究给予 75mGy 的 LDR 后白血病小鼠的活力明显增强, 较照射前饮食及活动量增加, 血清 TNF 水平在 1~2d 内显著升高, 其后逐渐降至对照组水平, 说明 LDR 对白血病小鼠具有明显的免疫兴奋效应, 导致了血清 TNF 的升高。

荧光显微观察说明 75mGy 的 LDR 可以有效的提高小鼠骨髓白血病细胞凋亡率, 其作用明显不同于大剂量射线治疗对细胞的杀伤, 通过电镜亚细胞结构的观察也可以说明这一点, 这说明 75mGy 的 LDR 对小鼠粒单白血病的治疗是有效的。骨髓白血病细胞凋亡率的变化略滞后于血清 TNF 的变化, 亦说明细胞因子 TNF 的变化可能与白血病细胞的凋亡之间存在某种内在机制。但 LDR 抗肿瘤作用的机制是一个相当复杂的问题, 其表现涉及复杂的细胞间反应和天然及获得免疫间的相互关系, 还有大量的问题亟待研究^[6]。

[参考文献]

- [1] Berrington A, Darby SC, Weiss HA, et al. 100 years of observation on British radiologists: mortality from cancer and other causes 1897~1997[J]. *Britain Journal of Radiology*, 2001, 74 (882): 507~519.
- [2] 谭业辉, 王畅, 王冠军. 低剂量辐射对白血病模型小鼠治疗作用研究[J]. *吉林大学学报*, 2002, 28(1): 3 032.
- [3] Nakase K, Kita K, Shirakawa S, et al. Induction of cell surface interleukin 2 receptor alpha chain expression on non-T lymphoid leukemia cells[J]. *Leukemia Research*, 1994, 18: 855~859.
- [4] 郑绍同. 白血病患者外周血 T 淋巴细胞亚群和 IL-2, sIL-2R, TNF- α 水平的观察[J]. *放射免疫学杂志*, 2002, 15(3): 151~152.
- [5] Xu X, Fu XY, Plate J, et al. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and Fas L expression[J]. *Cancer Research*, 1998, 58: 2 832~2 837.
- [6] Trinchieri G. Interleukin 12 and the regulation of innate and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2003, 3: 133~146.

[收稿日期] 2005-10-12

乳腺 Paget 病 1 例

李洪利¹, 刘雨清¹, 尹崇高², 郭爱华¹, 张伟栋¹

(¹ 潍坊医学院病理科, 山东 潍坊 261042;

² 潍坊医学院护理系临床教研室)

[关键词] Paget 病; 乳腺肿瘤; 病例报告

[中图分类号] R 730.23 [文献标识码] B

[文章编号] 1004-3101(2005)06-0409-01

患者, 女, 49 岁, 左侧乳头皲裂 4 个月。4 个月前无意中发现左乳头皲裂, 伴有渗出、结痂、局部疼、痒、不适。曾在外院以乳头湿疹治疗, 效果不佳。临床检验为: 双乳腺对称, 皮肤无桔皮样改变, 左乳头皲裂。左乳头外上象限近乳晕处可触及约 0.8cm × 0.8cm × 0.8cm 大小肿物, 质韧、界清, 稍活动, 轻触痛。同侧腋窝未扪及肿大淋巴结。病理检查: ①肉眼观: 不规则皮肤组织 2cm × 1cm × 0.5cm, 表面细小颗粒状。不规则乳腺组织 8cm × 6cm × 4cm, 大部分为脂肪, 穿插于灰白色乳腺组织中; ②光镜检查: 乳头表皮内有散在、成巢或腺样的 Paget 细胞, 该细胞体积大, 圆形或椭圆形, 境界清楚。细胞核大, 核仁明显, 核分裂像易见。胞浆丰富, 淡染或空亮(见图 1, 图 2)。真皮内见大量淋巴细胞, 浆细胞浸润。乳腺组织内未见肿瘤细胞; ③病理诊断: (乳头) 派杰氏病(湿疹样癌)。

讨论 乳腺 Paget 病最早由 James Paget^[1] 于 1874 年首先报道。泌乳导管来源的乳腺癌向外伸展引起乳头结痂样改变。此病是一种合并乳头、乳晕部病变的特殊类型乳腺癌, 又称湿疹样癌。发病率低, 约为女性乳腺癌的 0.7%~3%, 男性较少见。因其发病缓慢, 病程长, 早期主要表现为乳头乳晕区糜烂、潮红、皮肤增厚、瘙痒、烧灼感, 易误诊为乳头湿疹^[2]。该患者早期即被误诊为乳头湿疹, 但治疗效果不佳, 所以应考虑为乳腺湿疹样癌。通过病理检查可以确诊。此病常伴有导管内癌, 部分可见浸润性导管癌, 而该患者做乳腺癌改良术后常规病理示: 肿块边缘及乳头下方均未查见肿瘤组织, 腋窝淋巴结 8 枚, 均未见肿瘤累及, 说明该患者不伴有导管内癌或浸润性导管癌, 为单纯乳头 Paget 病, 预后较好。镜下病变早期 Paget 细胞主要位于表皮基层, 基底膜完整; 随着病变的发展, Paget 细胞可突破基底膜病进入真皮层。

(本文图见插页 II)

[参考文献]

- [1] 田林, 赵宏耀, 赵润珍. 乳腺湿疹样癌 32 例临床病例分析[J]. *临床医药实践杂志*, 2004, 13(10): 765~766.
- [2] 杨名添, 龙浩, 何洁华, 等. 乳腺派杰氏病 45 例临床分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(3): 131~134.

[收稿日期] 2005-04-12