

# X 射线辐射对仔鼠肝组织结构和相关蛋白的影响

刘曜荣<sup>1,2</sup>, 俞诗源<sup>2</sup>

1. 西北师范大学附属中学, 兰州 730070
2. 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

**摘要** 为探讨 X 射线辐射对仔鼠肝重量、肝组织结构及肝中 Bax 蛋白表达的影响, 对 160 只仔鼠 (出生 6~7d), 用不同剂量 (0、1、3、5、7Gy) 的 X 射线进行全身辐射, 分别于辐射后 1、5、10、20d, 检测各期仔鼠肝重和体重的变化, 用显微技术观察仔鼠肝脏组织结构的变化, 用免疫组织化学方法检测肝脏中 Bax 蛋白的表达。结果表明, X 射线辐射影响仔鼠肝脏的生长发育, 辐射后 5~20d, 辐射组仔鼠肝重均低于对照组, 差异显著 ( $P<0.05$ ) 或极显著 ( $P<0.01$ ); 除 1Gy 辐射组外, 其他辐射组在 5~20d 时仔鼠体重均低于对照组, 差异极显著 ( $P<0.01$ ); 随辐射剂量增大, 辐射组仔鼠肝中 Bax 蛋白阳性表达逐渐增强; 辐射后仔鼠肝小叶结构不清, 肝板变细, 肝血窦变大, 肝细胞变形, 排列不规则, 细胞核萎缩, 细胞出现空泡化。

**关键词** X 射线; 仔鼠; 肝; 组织结构; Bax 蛋白

**中图分类号** Q691.5

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7857(2010)13-0087-05

## Effects of X-ray on Histological Structure and Interrelated Polypeptides in Liver of Filial Mice

LIU Yaorong<sup>1,2</sup>, YU Shiyuan<sup>2</sup>

1. High School Attached to Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China
2. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

**Abstract** To explore the effects of X-ray on weight, histological structure and expression of Bax protein in liver of developing filial mice, 160 mice of 6~7 days after birth were radiated with different dosages (0, 1, 3, 5, 7Gy) of X-ray. Changes of liver and body weight were examined, histological structure was observed using bio-microscopy, and the expression of Bax protein was measured by immunohistochemical staining in filial mice liver at 1, 5, 10 and 20d after irradiation. Results show that X-ray influences the growth and development of the filial mice liver. The liver weight of filial mice of the experimental groups is lower than that of the control group 5~20d after irradiation ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), except experimental groups with 1Gy; the body weight of filial mice of the experimental groups is lower than that of the control group 5~20d after irradiation ( $P<0.01$ ); the expression intensity of Bax protein in the liver of filial mice is significantly increased with the increase of the dose; the structure of hepatic lobule is unclear, hepatic plate is thinner, hepatic sinusoid is stronger, accompanied with hepatocyte disfiguration, irregular arrangement, nucleus atrophy, and vacuolization, after irradiation.

**Keywords** X-ray; filial mice; liver; histological structure; Bax protein

### 0 引言

随手机、家电等产品的广泛使用, 辐射污染对人和动物造成了严重伤害, 诸如放射性脑癌、肝癌、皮肤癌等疾病已威

胁着人类的生存与健康, 特别是发育期的胎儿和幼儿对辐射影响最敏感, 易受辐射的攻击, 辐射污染已成为影响人类健康和生存环境的问题, 联合国环境大会已将其列入必须控制

收稿日期: 2010-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370163); 甘肃省创新人才基金项目 (ZS006-016)

作者简介: 俞诗源 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S182700044S, M076620024M), 教授, 研究方向为动物解剖学, 电子信箱: syyu006@nwnu.edu.cn

的主要污染物之一。目前,有关电离辐射对人和动物的影响已涉及各个组织和器官,产生了不同的生物学效应,电离辐射对人和动物肝脏的影响主要集中在放射治疗后肝细胞活性及组分的改变,肝细胞增殖、分化、再生,肝组织 SOD、CAT 活性、MDA 含量及特异生长因子变化等方面<sup>[1-4]</sup>。但有关电离辐射对发育期仔鼠肝重、肝组织结构及肝中 Bax 蛋白表达影响的研究尚未见报道。本实验通过 X 射线辐射发育期仔鼠后,检测仔鼠体重、肝重及皮毛的变化,观察肝组织结构及肝中 Bax 蛋白表达的动态变化,以探讨 X 射线对仔鼠肝脏发育的影响,为电离辐射治疗及空间辐射防护提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

主要试剂: Bax 抗体及检测试剂盒,购于武汉博士德生物技术有限公司。

主要仪器: X 射线深部治疗机(兰州大学第一附属医院提供)。

### 1.2 实验动物与辐射方法

选 6~7 日龄昆明小鼠 160 只(体重  $4\pm 1\text{g}$ )(兰州大学实验动物中心提供),随机分为 5 组(对照组和 1、3、5、7Gy 照射组),每组 32 只。辐射时将仔鼠缚于  $40\text{cm}\times 40\text{cm}$  的玻璃盒内,每日分别接受吸收剂量为 0、1、3、5、7Gy 的 X 射线(辐射距离  $100\text{cm}$ ,辐射野面积  $40\text{cm}\times 40\text{cm}$ ),每次辐射 1 组,全身辐射 1 次,连续辐射 4d。

### 1.3 皮毛变化观察

辐射后每日早、中、晚定时观察仔鼠皮毛变化,照相记录。

### 1.4 体重测量和肝重测量

在辐射前和辐射后称量各组仔鼠体重,并分别取辐射后 1、5、10、20d 仔鼠的肝脏,用滤纸吸干,用电子称称重,记录数

据,与对照组比较。

### 1.5 组织学观察

取辐射后 1、5、10、20d 仔鼠的肝脏,迅速用冰冷的生理盐水洗净血液,放入 15% 的中性福尔马林固定 24h,然后切取各期肝组织数块,常规石蜡中包埋,连续切片,HE 染色,在显微镜(日本 Olympus FX-35WA)下观察并拍照。

### 1.6 免疫组织化学观察

采用免疫组化 ABC 法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物试剂盒)。石蜡切片常规脱蜡至水,微波处理进行抗原修复,用 PBS 冲洗后,用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  孵育消除内源性过氧化物酶活性,正常山羊血清室温孵育以封闭非特异性反应位点,一抗用兔抗 Bax 蛋白(工作浓度为 1:200),一抗置  $4^\circ\text{C}$  冰箱孵育过夜,滴加生物素标记的二抗(羊抗兔 IgG 抗血清),室温孵育 30min,滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物工作液,室温孵育 30min,空白对照用 PBS 代替一抗,DAB 显色,苏木精复染。常规脱水、透明、封片,光镜观察并拍照。具体操作步骤按试剂盒说明进行。

### 1.7 数据处理

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析处理,数据用平均值 $\pm$ SD 表示,两组间均数比较(辐射组与对照组)采用双尾  $t$  检验, $P<0.05$  表示显著差异, $P<0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 X 射线辐射后仔鼠肝脏重量变化

X 射线影响仔鼠肝脏的重量(表 1)。X 射线辐射后 1~20d,1Gy 辐射组仔鼠肝脏与对照组相比,差异不显著( $P>0.05$ );3Gy 辐射组在 5~20d 时仔鼠肝脏重量与对照组差异显著( $P<0.05$ )或极显著( $P<0.01$ );5、7Gy 辐射组在 5~10d 时仔鼠肝脏重量与对照组差异极显著( $P<0.01$ )。

表 1 X 射线辐射后仔鼠肝脏重量变化(平均值 $\pm$ SD)

Table 1 Changes of liver weight after irradiation with different dosages of X-ray in filial mice (mean $\pm$ SD)

分组	辐射时间/d			
	1	5	10	20
对照组	0.037 $\pm$ 0.007	0.071 $\pm$ 0.009	0.127 $\pm$ 0.008	0.260 $\pm$ 0.008
1Gy 辐射组	0.036 $\pm$ 0.007	0.066 $\pm$ 0.01	0.121 $\pm$ 0.007	0.253 $\pm$ 0.009
3Gy 辐射组	0.036 $\pm$ 0.005	0.054 $\pm$ 0.01*	0.104 $\pm$ 0.008**	0.226 $\pm$ 0.01**
5Gy 辐射组	0.035 $\pm$ 0.006	0.051 $\pm$ 0.008**	0.062 $\pm$ 0.009**	
7Gy 辐射组	0.035 $\pm$ 0.005	0.042 $\pm$ 0.005**		

注:与对照组比较,\*为  $P<0.05$ ,\*\*为  $P<0.01$ 。

Notes: Compared with control group, \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ .

### 2.2 X 射线辐射后仔鼠体重与行为变化

X 射线影响仔鼠的体重(表 2)。X 射线辐射后,1Gy 辐射组在 5~10d 时仔鼠体重高于对照组,但差异不显著( $P>0.05$ );3、5、7Gy 辐射组在 5~20d 时仔鼠体重显著低于对照组( $P<0.01$ )。

1Gy 辐射组仔鼠体格健壮,饮食正常,未出现异常现象;

3、5、7Gy 辐射组辐射后,仔鼠行为及饮食发生显著变化,随辐射剂量的增加,仔鼠饮水、饮食减少,运动减少,行动迟缓,精神不振,5Gy 和 7Gy 组大部分仔鼠于 10d 后死亡。

### 2.3 X 射线辐射后仔鼠肝重与体重比值变化

X 射线辐射后 1~20d,仔鼠肝重与体重的比值均有不同

研究论文 (Articles)

程度的升高 (表 3), 5Gy 辐射组在 1~10d 时仔鼠肝重与体重的比值先升高后降低, 7Gy 辐射组在 1~5d 时仔鼠肝重与体重的比值下降。

2.4 X 射线辐射后仔鼠皮毛变化

X 射线影响仔鼠的皮毛生长, 如图 1 所示。

X 射线辐射后 1~20d, 除 1Gy 组仔鼠皮毛无明显变化, 其他各辐射组仔鼠皮毛出现不同程度的脱落。3Gy 组在 5~10d

时仔鼠从头部开始脱毛, 20d 时仔鼠头部新毛又逐渐长出; 5Gy 辐射组在 5~10d 时仔鼠皮毛脱落至臀部或尾部; 7Gy 辐射组在 1~5d 时仔鼠全身皮毛脱落, 仔鼠行动迟缓, 在 5d 时全部死亡。

2.5 X 射线辐射后仔鼠肝脏组织结构的变化

X 射线影响仔鼠肝脏的组织结构, 如图 2 所示。

X 射线辐射后 1~20d, 随着辐射剂量的增大, 仔鼠肝小叶

表 2 X 射线辐射后仔鼠体重变化 (平均值±SD)

Table 2 Changes of body weight after irradiation with different dosages of X-ray in filial mice (mean±SD)

分组	辐射时间/d			
	1	5	10	20
对照组	3.843±0.309	6.697±0.413	9.481±0.572	17.098±0.341
1Gy 辐射组	3.832±0.234	6.708±0.434	9.513±0.554	16.790±0.456
3Gy 辐射组	3.835±0.415	5.613±0.473**	7.210±0.350**	13.725±0.488
5Gy 辐射组	3.815±0.454	5.362±0.434**	6.677±0.462**	
7Gy 辐射组	3.802±0.425	4.825±0.337**		

注: 与对照组比较, \*\* 为  $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, \*\*,  $P < 0.01$ .

表 3 X 射线辐射后仔鼠肝重与体重比值变化

Table 3 Changes of liver weight and body weight after irradiation with different dosages of X-ray in filial mice

分组	辐射时间/d			
	1	5	10	20
对照组	0.0096	0.0106	0.0134	0.0152
1Gy 辐射组	0.0095	0.0098	0.0127	0.0151
3Gy 辐射组	0.0094	0.0096	0.0144	0.0165
5Gy 辐射组	0.0092	0.0095	0.0093	
7Gy 辐射组	0.0092	0.0087		

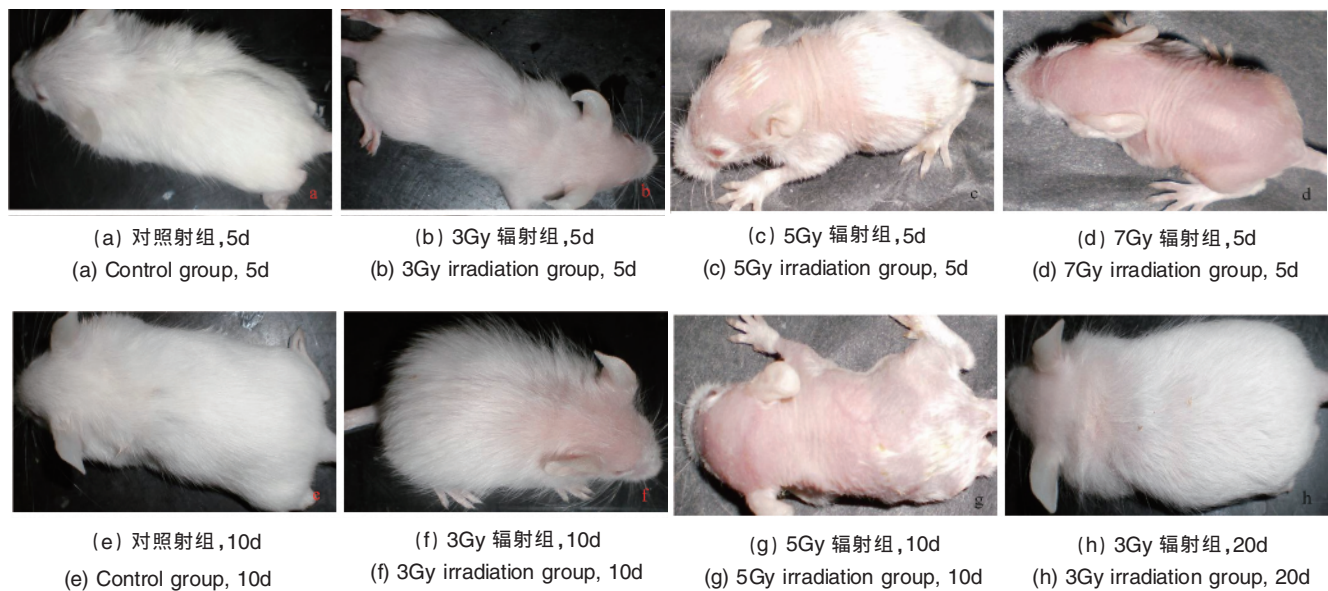


图 1 X 射线辐射后仔鼠皮毛变化

Fig. 1 Change of skin and hair after irradiation with different dosages of X-ray

界面模糊,肝板变细;肝血窦变大,肝细胞变形,大小不均一,排列不规则,双核细胞增多,细胞核萎缩,染色质浓缩,内质网断裂、腔变大,线粒体肿胀、破裂、崩解,细胞出现空泡化等。

### 2.6 X射线辐射后仔鼠肝脏 Bax 蛋白表达变化

免疫组织化学结果显示,阳性表达部位被染成棕黄色,Bax 蛋白阳性表达主要集中于细胞质。X 射线辐射后 1~20d 仔鼠肝脏 Bax 蛋白阳性表达均有不同程度的增强(图 3)。

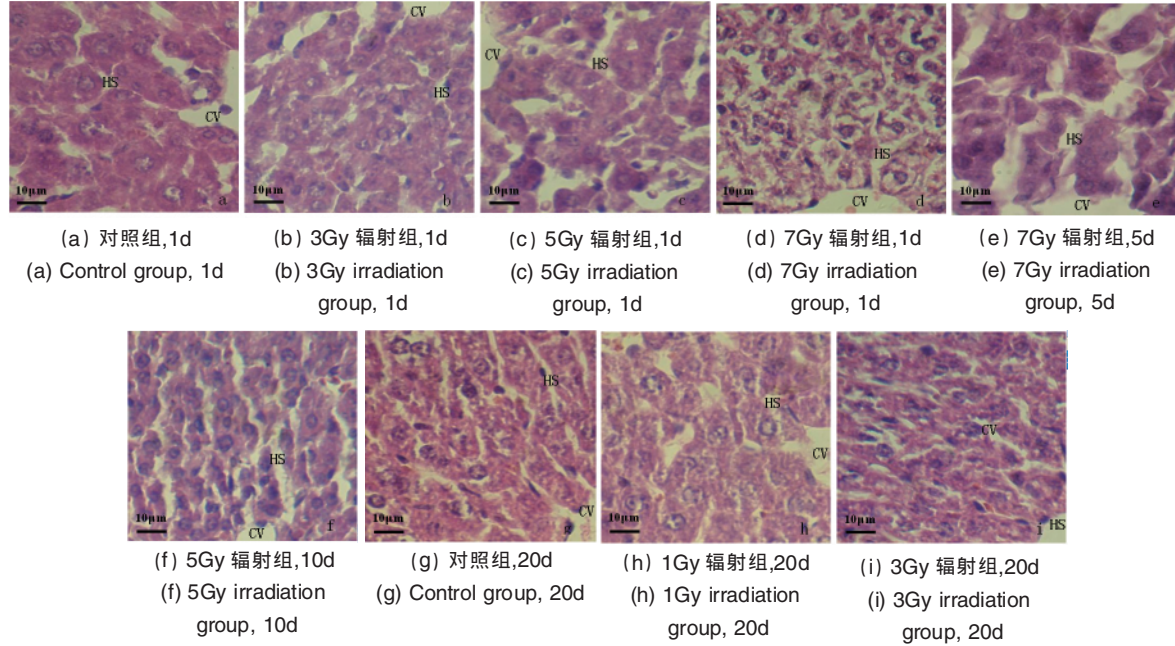


图 2 X 射线辐射后仔鼠肝脏组织光镜图

Fig. 2 Changes of liver histological structure after irradiation with different dosages of X-ray

注: HS—肝血窦;CV—中央静脉;标尺—10µm。

Notes: HS, hepatic sinusoid; CV, central veins; Bar, 10µm.

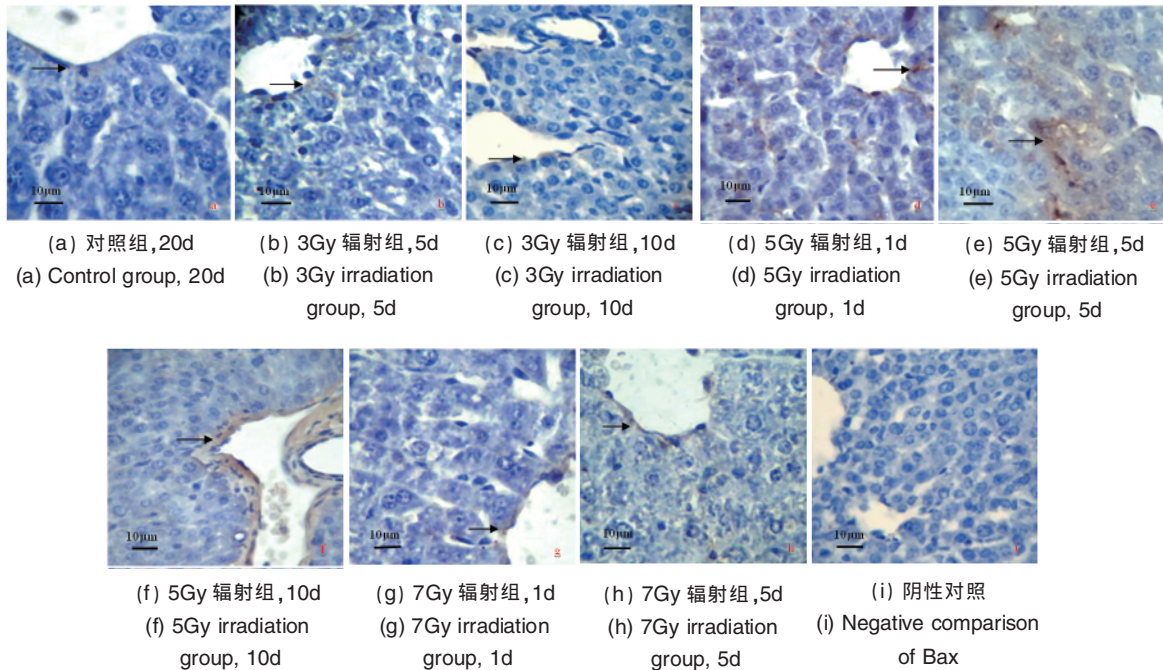


图 3 X 射线辐射后仔鼠肝脏 Bax 蛋白表达变化

Fig. 3 Changes of Bax protein expression in liver after irradiation with different dosages of X-ray

注: ↑—Bax 蛋白的阳性表达;标尺—10µm。

Notes: ↑, stands for expression of Bax protein; Bar, 10µm.

### 3 讨论

#### 3.1 X射线对发育期仔鼠体重及肝重的影响

研究表明,电离辐射能对多种组织器官产生损伤,特别是胃肠道的损伤,辐射后早期机体出现恶心呕吐、腹泻,小肠黏膜上皮损伤,小肠收缩和张力增高,分泌亢进,肠激酶活力增强,吸收功能降低<sup>[5]</sup>。电离辐射能引起细胞器功能异常,肝线粒体中的顺乌头酸酶的活性下降,细胞色素减少,肝血糖水平改变,肝脏能量代谢系统被破坏<sup>[6]</sup>。在本实验中,1Gy 辐射组仔鼠体格健壮,饮食正常,未出现异常现象;3、5、7Gy 辐射组在辐射后早期仔鼠饮水、饮食减少,运动减少,行动迟缓,精神不振,部分仔鼠死亡,仔鼠的体重肝重均低于对照组,一方面可能是发育期的仔鼠正处在器官构建的关键期,要摄取大量的能量适应机体发育,当机体遭受大剂量辐射时机体的能量代谢系统被破坏,造成机体能量供应不足,导致机体及器官发育不良;另一方面可能是大剂量辐射破坏了仔鼠的消化系统,导致小肠对营养物质的吸收率下降<sup>[5]</sup>,间接影响了机体及器官的正常发育。

#### 3.2 X射线对发育期仔鼠肝脏组织结构的影响

肝脏作为机体新陈代谢的中心站,是机体能量加工和解毒的最重要器官,肝细胞对电离辐射敏感,易受电离辐射损害。研究发现,动物接受辐射后肝组织出现腹水,肝酶升高,引发肝纤维化和肝硬化的炎症反应<sup>[4]</sup>,严重破坏肝脏的组织结构,影响了肝脏的生理功能。小鼠经高强 EMP 辐射后,肝细胞 DNA 含量显著升高,表明电离辐射影响肝细胞核酸的合成与代谢,激活细胞增殖与分化,甚至导致癌变<sup>[11]</sup>。大鼠经高强度微波辐射后肝组织 MDA 的含量明显升高,肝线粒体肿胀,肝脏组织脂质过氧化损伤严重,在很大程度上增加了病理现象发生的几率<sup>[1]</sup>。本实验显示,1Gy 辐射组仔鼠肝组织结构、细胞结构基本正常;高剂量辐射组中,仔鼠肝小叶界面不清,肝血窦空隙增大,肝细胞索变细,肝细胞变大,细胞核萎缩,染色质浓缩,细胞出现空泡及线粒体的崩解,表明 X 射线对肝组织细胞有显著的损伤效应。

#### 3.3 X射线对发育期仔鼠肝脏 Bax 蛋白表达的影响

电离辐射、紫外线等外界因素可诱导机体产生大量的活性氧类(Reactive Oxygen Species, ROS),其中超氧阴离子自由基( $\cdot O_2^-$ )和羟自由基( $\cdot OH$ )是化学性质非常活跃的活性氧,活性氧类在机体或组织中大量积累,若不能及时清除就会造成机体过氧化损伤,诱导细胞大量凋亡,Bax 蛋白作为一种促进细胞凋亡的蛋白,在正常细胞中以单聚体形式存在于细胞质中<sup>[7]</sup>,当细胞发生凋亡时,Bax 蛋白会从细胞质转移到线粒体,发生寡聚化的同时通过其 C 端疏水结构域插入到线粒体外膜,导致线粒体膜通透性增加、跨膜电位消失、释放膜间隙凋亡相关蛋白,激活下游 caspase-9/caspase-3 通路使细胞发生不可逆凋亡<sup>[8-9]</sup>,因此,Bax 蛋白的表达在一定程度上反映了肝脏组织的损伤程度。研究发现,艾滋病患者脑组织、何杰金氏病人、肝细胞癌中均有 Bax 高表达<sup>[10]</sup>,正常大鼠肝细胞中均有不同程度 Bax 蛋白阳性表达。在本实验中,低剂量组仔鼠肝

脏 Bax 蛋白表达呈弱阳性,高剂量组仔鼠肝脏 Bax 蛋白呈强阳性表达,随着辐射剂量的增大,辐射组仔鼠肝脏 Bax 蛋白阳性表达逐渐增强,进一步表明 X 射线对肝组织细胞有损伤效应,导致肝细胞大量凋亡。

### 4 结论

研究表明,X 射线辐射破坏了仔鼠肝脏组织结构,导致组织器官生理功能紊乱,影响了仔鼠体重、肝重、皮毛的生长发育。有关 X 射线辐射对仔鼠肝脏发育影响的机制还有待进一步研究。

#### 参考文献 (References)

- [1] 田志杰,沈南,吕士杰,等. 高强度微波辐射对 Wistar 大鼠血清 SOD、HSP70 和肝脏 MDA、Mit 肿胀的影响[J]. 四川动物, 2009, 28(4): 528-531.  
Tian Zhijie, Shen Nan, Lv Shijie, et al. *Sichuan Journal of Zoology*, 2009, 28(4): 528-531.
- [2] Guryev D V. Histologic assessment of regenerating rat liver under low-dose rate radiation exposure [J]. *International Congress Series*, 2005, 1276: 181-182.
- [3] Zhao Jiandong, Guo Liangjiang, Wei Ganghu, et al. Hepatocyte regeneration after partial liver irradiation in rats [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2009, 61: 511-518.
- [4] Christiansen H, Saile B, Neubauer-Saile K, et al. Irradiation leads to susceptibility of hepatocytes to TNF- $\alpha$  mediated apoptosis[J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2004, 72: 291-296.
- [5] 邓海平,俞诗源,陈玉琴,等. X 射线辐射对仔鼠体重、皮毛生长及肝、肾脏组织 SOD、CAT 活力及 MDA 含量的影响 [J]. 动物学报, 2008, 54(6): 1029-1037.  
Deng Haiping, Yu Shiyuan, Chen Yuqin, et al. *Acta Zoologica Sinica*, 2008, 54(6): 1029-1037.
- [6] Chung H C, Kim S H, Lee M G, et al. Mitochondrial dysfunction by  $\gamma$ -irradiation accompanies the induction of cytochrome P450 2E1(CYP2E1) in rat liver[J]. *Toxicology*, 2001, 161: 79-91.
- [7] Okuno S, Saito A, Hayashi T, et al. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7879-7887.
- [8] Shibata M, Murray M, Tessler A, et al. Single injections of a DNA plasmid that contains the human bcl-2 gene prevent loss and atrophy of distinct neuronal populations after apinal cord injury in adult rats[J]. *Neurohabil Neural Repair*, 2000, 14(4): 319-330.
- [9] Goll D E, Thompson V F, Li H Q, et al. The calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 731-801.
- [10] 刘同慎,刘希琴,白成勇,等. Bax 蛋白在大鼠肝癌发生过程中的表达和意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2000, 9(3): 269-271.  
Liu Tongshen, Liu Xiqin, Bai Chengyong, et al. *Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2000, 9(3): 269-271.
- [11] 姚莉,梁晓刚,王德文,等. 高场强电磁脉冲辐射对小鼠肝细胞 DNA 含量和倍体影响的定量学研究 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(4): 386-388.  
Yao Li, Liang Xiaoli, Wang Dewen, et al. *Chinese Journal of Radiological Medicine and Protection*, 2004, 24(4): 386-388.

(责任编辑 陈广仁)