

· 基础研究 ·

放射线损伤对小鼠嗅上皮细胞 凋亡及再生的影响

何观文, 陈志宏, 肖文惠

(福建医科大学附属第一医院 耳鼻咽喉头颈外科, 福建省耳鼻咽喉研究所, 福建 福州 350004)

摘要: **目的** 研究放射线损伤后小鼠嗅上皮细胞凋亡和再生情况, 探讨放射治疗后嗅觉障碍的致病机制。**方法** 以4 Gy的X射线照射小鼠鼻部, 建立放射线损伤小鼠嗅黏膜的动物模型分别于照射前及照射后第1, 3, 6, 12, 60天分批处死动物取材; TUNEL法检测嗅上皮中细胞凋亡, BrdU掺入免疫组化检测基底细胞再生。**结果** 放射线损伤后小鼠嗅上皮凋亡细胞显著增多($P < 0.01$), 基底细胞再生也相应增多($P < 0.01$), 但再生细胞少于凋亡细胞($P < 0.01$)。**结论** 放射线损伤可促进嗅上皮细胞凋亡及基底细胞再生, 但再生细胞少于凋亡细胞, 二者失衡可能是放射治疗后嗅觉障碍的致病机制之一。

关键词: 放射治疗; 嗅上皮; 凋亡; 再生; 嗅觉障碍

中图分类号: R812; R364 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2010)02-0091-04

Apoptosis and regeneration of olfactory epithelium cells in mice after radiation injury

HE Guan-wen, CHEN Zhi-hong, XIAO Wen-hui

(Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, the 1st Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

Abstract: **Objective** To study apoptosis and regeneration of olfactory epithelium cells in mice after radiation injury, and discuss the possible mechanism. **Methods** The animal model of olfactory radiation injury was established by exposure of mice nose to X-ray with a dose of 4 Gy. The apoptotic cells and regenerating cells were detected with the method of TdT-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) and the technique of BrdU incorporation and monoclonal antibody labeling respectively. **Results** The apoptotic cells of olfactory epithelium increased significantly after radiation, while the regenerating cells increased with less number accordingly. **Conclusion** Radiation can induce imbalance of apoptosis and regeneration leading to cell loss in olfactory epithelium of mice, which might explain the mechanism of olfactory dysfunction after radiotherapy.

Key words: Radiotherapy; Olfactory mucosa; Apoptosis; Regeneration; Olfaction disorders

放射治疗是头颈部恶性肿瘤综合治疗的重要手段之一, 放射治疗后常引起嗅觉障碍^[1-5], 但该并发症常被忽视, 且发病机制未明, 治疗困难。嗅觉与视觉、听觉、触觉一起, 构成了人类的基本感知能力, 放射治疗

后嗅觉障碍严重影响患者的生活质量。本文通过建立放射线损伤小鼠嗅黏膜动物模型, 研究放射线对小鼠嗅上皮细胞凋亡和再生的影响, 探讨放射治疗后嗅觉障碍发生的可能机制, 希望为进一步研究其治疗方法提供理论基础。

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2008J0275)。

作者简介: 何观文, 男, 在读硕士研究生。

通讯作者: 陈志宏, Email: chenz_h@163.com.

1 材料与方法

1.1 动物模型

无特异致病病原的近交系雄性 BALB/c 小鼠 36 只, 8 周龄, 体重 18 ~ 21 g (购自中国医学科学院实验动物研究所), 随机分为 6 组, 1 个对照组, 5 个实验组, 每组 6 只, 采用 Varian 600 CD 直线加速器发出的 6 mV 的 X 射线, 单次照射小鼠鼻部, 源皮距 (SSD) 100 cm, 剂量率 300 Mu/min, 剂量 4 Gy, 分别于照射前 (对照组) 及照射后 1、3、6、12、60 d 分批处死取材。

1.2 取材和标本处理

动物处死前 2 h, 按 100 mg/kg 腹腔注射 BrdU^[6-7] (尿嘧啶脱氧核苷, 购自北京中杉公司, 为 Sigma 产品), 取鼻腔部分置 4% 多聚甲醛中固定 16 h, 10% EDTA 脱钙 14 d, 将标本修剪成小块后石蜡包埋, 鼻部冠状位连续切片, 片厚 4 μm 。

1.3 TUNEL 法检测凋亡细胞

原位凋亡检测试剂盒购自北京中杉公司, 为 Roche 产品。主要步骤: 石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 min \times 3; 0.5% 胰酶 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; 滴加 TUNEL 反应混合液, 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 60 min, PBS 洗 3 min \times 3; 滴加转化剂 - POD, 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 30 min, PBS 洗 3 min \times 3; DAB 显色; 苏木素轻度复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明; 封片、光镜观察。阴性对照: PBS 代替反应混合液。

1.4 BrdU 掺入免疫组化检测再生细胞

小鼠抗 BrdU 单克隆抗体购自北京中杉公司, 为 Invitrogen 产品; PowerVisionTM 二步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉公司。主要步骤^[7]: 石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 0.1% Triton X-100, 0.1% 柠檬酸渗透, 冰上孵育 2 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 0.125% 胰酶室温孵育 10 ~ 20 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 冷 0.1 M 盐酸室温孵育 10 min; 2 M 盐酸 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min; 0.1 M 四硼酸钠 ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 室温孵育 10 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; 滴加

1: 50 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体, 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 2 h, PBS 洗 3 min \times 3 次; 滴加二抗, 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 30 min, PBS 洗 3 min \times 3 次; DAB 显色、苏木素复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片观察。阴性对照: PBS 代替一抗。

1.5 阳性细胞计数^[6]

光学显微镜下计数阳性细胞, 计算出每 100 μm 嗅上皮内的阳性细胞数。每组至少计数 5 张切片, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 代表各组切片的阳性细胞数。

1.6 统计学处理

所有资料用 SPSS 11.0 处理, 组间差异比较采用 One-Way ANOVA 进行分析, 相同实验组两个指标间比较采用 t 检验进行分析, 显著性水平取值 0.05。

2 结果

2.1 阳性细胞染色

镜下观察嗅上皮阳性细胞, 呈特异性的棕黄色, TUNEL 和 BrdU 阳性细胞的胞核散在分布于嗅上皮全层 (图 1, 2)。

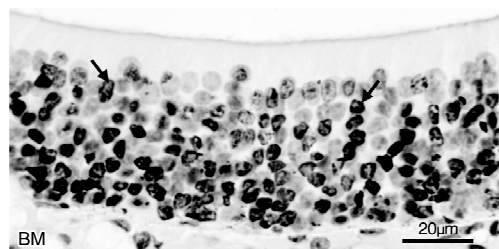


图1 嗅上皮 TUNEL 免疫组化染色
(DAB 显色, 标尺 = 20 μm , 箭头示阳性细胞, BM 示基底膜)

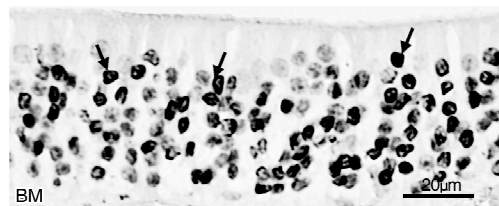


图2 嗅上皮 BrdU 免疫组化染色
(DAB 显色, 标尺 = 20 μm , 箭头示阳性细胞, BM 示基底膜)

2.2 统计分析

①各实验组与对照组阳性细胞数比较:5个实验组 T_{unel} 及 BrdU 阳性细胞均显著高于相应对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。T_{unel} 阳性细胞高峰出现在照射后第1天和第6天,BrdU 阳性细胞高峰则出现在第6天(表1,图3)。② T_{unel} 与 BrdU 阳性细胞数比较:各实验组 T_{unel} 阳性细胞显著多于 BrdU 阳性细胞,有统计学意义($P < 0.01$)。对照组二者间无显著性差异($P > 0.05$)(表2)。

表1 各组 T_{unel} 及 BrdU 阳性细胞表达关系

组别	T _{unel} 阳性细胞	BrdU 阳性细胞
对照组	9.02 ± 1.27	7.0 ± 1.67
1 d	64.46 ± 5.49	29.08 ± 5.56
3 d	43.58 ± 3.65	25.26 ± 9.40
6 d	68.26 ± 3.36	38.86 ± 5.87
12 d	42.26 ± 4.33	22 ± 4.68
60 d	35.3 ± 3.13	21.82 ± 3

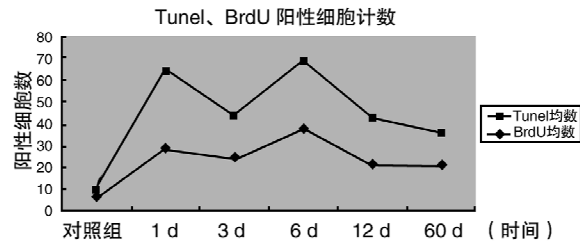


图3 T_{unel} 与 BrdU 阳性细胞表达关系

3 讨论

目前国内外对放射治疗后嗅觉障碍的研究报道甚少,且多为临床观察^[1-5],而放射线损伤对嗅感觉神经元(olfactory sensory neurons, OSNs)的影响尚未见报道。以往对嗅感觉神经元凋亡和再生的研究主要有以下两种模型^[6,8,9]:①通过嗅神经离断或嗅球切除,损伤嗅神经元的轴突。②经鼻吸入或全身应用各种毒素损伤嗅上皮,如秋水仙碱、甲基溴、硫酸锌、Triton X-100等。本研究参阅文献^[10]并经预实验摸索,选择4 Gy剂量的X射线照射小鼠鼻部,建立放射线损伤小鼠嗅黏膜的动物模型;用

原位末端标记(T_{unel})的方法检测嗅上皮中细胞凋亡,BrdU掺入免疫组化法检测细胞再生,探讨放射治疗后嗅觉障碍可能的发病机制。T_{unel}是分子生物学与形态学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,在细胞凋亡的研究中被广泛采用。BrdU作为胸腺嘧啶核苷的类似物,可以作为DNA合成的底物掺入到处于DNA合成期(S期)细胞的DNA中,新生的细胞从而被检测出来。本实验中BrdU标记的阳性细胞即为嗅上皮中具有再生能力的干细胞-基底细胞。嗅上皮中OSNs十分特殊,生理条件下即存在一定程度的凋亡和再生的动态平衡,凋亡损失的OSNs通过嗅上皮中基底细胞的再生、分化得以补充,维持其总数的相对恒定。本实验中,T_{unel}阳性细胞核散在分布于嗅上皮中,提示X射线可造成嗅上皮中包括OSNs在内的多种细胞凋亡,其机制可能为:一方面放射线本身是一种基因毒剂,可使细胞核DNA双链断裂或激活细胞膜上的信号-靶系统诱发凋亡;另一方面,放射线可导致局部组织瘢痕化、血管闭锁,通过影响血运引起凋亡。同样,BrdU阳性细胞核亦散在分布于嗅上皮上,提示在放射线损伤导致嗅上皮细胞数量减少的情况下,基底细胞可以发挥干细胞的潜能,迅速再生、分化以补充损失的细胞成份^[11-12],但其具体机制未明,可能和以下因素有关^[13]。①影响OSNs的前体细胞。正常情况下成熟的OSNs可发出特定信号抑制其前体(基底细胞)的形成^[6],这使OSNs在凋亡致数量减少时可促进基底细胞再生。②激活嗅鞘细胞(olfactory esheathing cells, OECs)。OECs具有中枢神经系统星形胶质细胞和外周雪旺氏细胞的特性,可通过分泌多种细胞因子,如细胞黏膜分子L1、神经营养因子等,促进OSNs再生;通过发挥免疫功能吞噬轴突碎片而变肥大,并与星形胶质细胞胞突相互作用,在损伤部位形成通道,以便再生的轴突通行^[14];通过表达与新生血管发生有关的因子,促进新生血管的形成,帮助神经修复。黄涛等^[15]经实验证实大鼠嗅神经切断后,能成功激活嗅鞘细胞,因此我们推测,

放射线损伤同样可能通过激活嗅鞘细胞促进基底细胞再生,以修复受损的 OSNs。

③影响一些细胞因子发挥神经修复作用,如 NO、转化生长因子、神经营养素-3 等。我们还发现,细胞凋亡出现 2 个高峰,首个高峰可能为 X 射线引起的急性损伤,第 2 个高峰则可能是由于放射线启动凋亡后,按照细胞自身特定的动力学进行,这需要一定的时间。与凋亡情况有所不同的是,虽然再生的细胞在照射后第 1 天即迅速增加,但高峰在第 6 天形成,这与凋亡的高峰相呼应,我们推测,分裂周期较短的球基底细胞在照射后早期占有重要的部分,而分裂周期较长的水平基底细胞在照射后晚期所占比例上升^[8,12]。

上述结果表明,X 射线照射可促进小鼠嗅上皮细胞的凋亡,并刺激基底细胞再生,但再生细胞远少于凋亡细胞,二者的失衡最终影响嗅功能,这可能是放射治疗后嗅觉障碍的发病机理之一。

参考文献:

[1] Ophir D, Guterman A, Gross-Isseroff R. Changes in smell acuity induced by radiation exposure of the olfactory mucosa [J]. Arch Otolaryngol Head and Neck Surg, 1988, 114 (8): 853 - 855.

[2] Ho WK, Kwong DL, Wei WI, et al. Change in olfaction after radiotherapy for nasopharyngeal cancer-a prospective study [J]. Am J Otolaryngol, 2002, 23 (4): 209 - 214.

[3] Holscher T, Seibt A, Appold S, et al. Effects of radiotherapy on olfactory function [J]. Radiother Oncol, 2005, 77 (2): 157 - 163.

[4] 邱前辉,陈少华,蒙翠原,等.放疗对鼻咽癌患者嗅

觉的影响 [J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2001, 15 (2): 57 - 58.

- [5] Hua MS, Chen ST, Tang LM, et al. Olfactory function in patients with nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy [J]. Brain Inj, 1999, 13 (11): 905 - 915.
- [6] Suzuki Y, Takeda M, Obara N, et al. Colchicine-induced cell death and proliferation in the olfactory epithelium and vomeronasal organ of the mouse [J]. Anat Embryol, 1998 (198): 43 - 51.
- [7] 陈志宏,倪道凤,高扬,等.流感病毒感染后小鼠嗅觉感觉神经元的凋亡与再生 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2004, 10 (6): 324 - 326.
- [8] Catherine Dulac, Lisa Zakhary. Stem cells of the olfactory epithelium [A] // Robert Lanza in Handbook of Stem Cells [M]. New York: Academic Press, 2004, 233 - 244.
- [9] Jang W, Youngentob SL, Schwob JE. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion [J]. J Comp Neurol, 2003, 460 (1): 123 - 140.
- [10] 李淑萍,何津祥,李敏,等.不同剂量 X 射线对小鼠胸腺脾脏、肝脏细胞凋亡及 P53 基因表达的影响 [J]. 辐射防护, 2007, 27 (6): 349 - 356.
- [11] James E. Schwob. Restoring Olfaction: A View from the Olfactory Epithelium [J]. Chem Senses, 2005, 30 (suppl 1): i131 - i132.
- [12] Huard JM, Schwob JE. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium [J]. Dev Dyn, 1995, 203 (1): 17 - 26.
- [13] 叶菁,张重华.影响嗅觉感觉神经元再生的相关因素的研究进展 [J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2009, 14 (4): 270 - 272.
- [14] Li Y, Li D, Raisman G. Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the pathway hypothesis [J]. J Neurocyto, 2005, 34 (3 - 5): 343 - 351.
- [15] 黄涛,贺西京,田锋.预变性成年大鼠嗅神经后嗅球嗅鞘细胞的培养 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2009, 25 (3): 260 - 261.

(修回日期:2010-03-01)