

· 论 著 ·

海带多糖对放疗后颌下腺细胞凋亡的影响*

梁杰珍¹, 孙文忠², 徐志文^{1△}, 曾曼丽¹, 陈美球¹

(1. 广西医科大学第一附属医院耳鼻喉科, 南宁 530000; 2. 广西柳州市人民医院 545000)

摘要:目的 探讨海带多糖(LJP)对放疗后颌下腺细胞凋亡的影响。方法 将 Wistar 大鼠随机分为 4 组:正常对照组、放疗对照组, 放疗 LJP A 组(LJP 30 mg/kg)及放疗 LJP B 组(LJP 300 mg/kg)。放疗对照组、放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组的大鼠颌下腺给予一次性 γ 射线照射, 每只总剂量 15 Gy。采用免疫组化法及原位切口末端标记(TUNEL)法分别检测大鼠颌下腺细胞的 Bcl-2, Bax 表达及凋亡情况。结果 与放疗对照组比较, 放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组大鼠颌下腺细胞的 Bcl-2 表达水平明显增强($P < 0.05$), Bax 水平无明显改变($P > 0.05$); 与正常对照组比较, 放疗对照组的凋亡细胞明显增加($P < 0.05$), 而与放疗对照组比较, 放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组的凋亡细胞明显减少($P < 0.05$)。结论 LJP 可调节细胞 Bcl-2 及 Bax 的表达水平, 抑制细胞凋亡, 从而保护颌下腺免受放疗损伤。

关键词:颌下腺; 细胞凋亡; 海带多糖; 放射损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)15-1466-02

Effects of laminaria japonica polysaccharides on apoptosis of submandibular gland cells induced by radiation in rats*

Liang Jiezheng¹, Sun Wenzhong², Xu Zhiwen^{1△}, Zeng Manli¹, Chen Meiqiu¹

(1. Department of ENT, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530000, China;

2. People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou, Guangxi 545000, China)

Abstract: **Objective** To explore effects of laminaria japonica polysaccharides (LJP) on apoptosis of submandibular gland cells induced by radiation in rats. **Methods** Wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal group, radiation control group, radiation LJP A group (LJP 30 mg/kg) and radiation LJP B group (LJP 300 mg/kg). Each rat in radiation control group, radiation LJP A group and radiation LJP B group was received a single and total dose of 15Gy γ -irradiation on the area of rat submandibular gland. Immunohistochemistry and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) methods were employed to detect expression of Bcl-2, Bax and apoptosis of submandibular gland cell in rats. **Results** Compared with radiation control group, levels of Bcl-2 expression of submandibular cells of rats in radiation LJP A and radiation LJP B groups were increased ($P < 0.05$) while that of Bax had no significantly change ($P > 0.05$); the number of apoptotic cells in radiation control group were increased markedly compared to normal group ($P < 0.05$), and it were decreased obviously in radiation LJP A group and radiation LJP B group compared to radiation control group ($P < 0.05$). **Conclusion** LJP has protective effects on submandibular gland against radiation injury via regulation levels of Bcl-2 and Bax expression and inhibition cellular apoptosis.

Key words: submandibular gland; apoptosis; laminaria japonica polysaccharides; irradiation damage

海带 (*Laminaria japonica* aresch) 属海带目海带科, 是一种营养价值较高且种植广泛的大型褐藻。近年来研究表明, 海带多糖 (*Laminaria japonica* polysaccharides, LJP) 具有抗凝血、调节血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗辐射等多种生物学活性^[1], 但目前有关 LJP 对唾液腺放射性损伤所致口干症治疗研究仍未见报道。头面部恶性肿瘤放射治疗(放疗)时对唾液腺造成不可逆损伤, 引起口干症, 严重影响患者的生活质量^[2]。目前认为, 放疗后导致的唾液腺结构和功能的损伤是其主要因素^[3], 而放疗导致唾液腺放射性损伤的主要机制尚未完全明确, 研究认为放疗引起的细胞凋亡可能为其机制之一^[4], 而 Bcl-2、Bax 是调控细胞凋亡的重要信号分子。本实验通过研究放疗后以及给予 LJP 干预后, 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化, 探讨颌下腺放射性损伤机制以及早期干预效果。

1 材料与方

1.1 材料及仪器 清洁级 Wistar 雄性大鼠 70 只(广西医科大学实验动物中心), 体质量 180~200 g。戊巴比妥钠粉剂(德国, 批号 20090512), Bcl-2、Bax、免疫组化链霉菌抗生物素蛋

白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)法通用型二抗试剂盒(北京中衫金桥公司), 3,3'-二氨基联苯胺(3,3-Diaminobenzidine, DAB)染色剂(福州迈新生物公司)。LJP(陕西慈缘生物公司), 细胞凋亡末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位切口末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒(Roche Applied Science, 德国), 毛果芸香碱(广西医科大学第一附属医院药剂科), GWXJ80 型钴-60 远距离治疗机(广西医科大学第一附属医院放疗科, 中核动力有限公司), 生物显微镜 CX41(OLYMPUS 公司, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 将 70 只 Wistar 大鼠在实验室普通饲料饲养适应 1 周后, 按照随机分组原则分为: (1) 正常对照组 ($n=10$); (2) 放疗对照组 ($n=10$); (3) 放疗 LJP A 组 ($n=25$); (4) 放疗 LJP B 组 ($n=25$)。70 只大鼠均给予腹腔注射 1% 戊巴比妥钠麻醉, 将放疗对照组、放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组的大鼠固定于放疗专用铅板上, 每只大鼠给予一次性 γ 射线照射, 每只总剂量 15 Gy, 照射范围为下颌骨至锁骨上的颈

部(即唾液腺区),而正常对照组在麻醉后不给予 γ 射线照射。在放疗前后 3 d,放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组的大鼠分别给予 30 mg/kg 及 300 mg/kg 的 LJP 溶液腹腔注射,对照组腹腔注射生理盐水。

1.2.2 组织标本处理 取麻醉大鼠颌下腺组织,迅速固定于 4% 的多聚甲醛溶液中,固定 24 h 后,脱水包埋,冷冻切片,免疫组织化学 SP 法检测 Bcl-2、Bax;按照 TUNEL 检测试剂盒说明书的原位末端标记法检测细胞凋亡。

1.2.3 图像采集及处理 用游标卡尺确定切片组织的长短轴,在背面画线标记,分别在 4 个顶点和中心点部位取一个相对完整的细胞视野,采用病理图像分析仪给每个切片拍摄 5 张图片,Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件测定积分光密度值(integrated optical density,IOD)和面积(Area),并计算平均光密度值(IOD/Area),平均光密度值越高,其代表的指标表达水平越高^[5]。

1.3 统计学处理 所得数据均用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数间的比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 SNK-q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 LJP 对放疗后颌下腺细胞 Bcl-2 及 Bax 表达的影响

Bcl-2(插 I 图 1)、Bax 在各组颌下腺导管细胞及腺泡细胞都有不同程度的表达。放疗对照组的 Bcl-2 表达水平相对正常对照组下降,而 Bax 水平升高;放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组大鼠颌下腺细胞的 Bcl-2 的表达水平相对放疗对照组有明显升高,而细胞内 Bax 水平与放疗对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠颌下腺细胞 Bax 及 Bcl-2 表达的 IOD/Area 值

组别	Bax	Bcl-2
正常对照组	0.099 ± 0.023	0.207 ± 0.039
放疗对照组	0.249 ± 0.034*	0.089 ± 0.004*
放疗 LJP A 组	0.237 ± 0.02	0.133 ± 0.017#
放疗 LJP B 组	0.234 ± 0.019	0.164 ± 0.023#

*: $P < 0.05$,与正常对照组相比;#: $P < 0.05$,与放疗对照组相比。

2.2 LJP 对放疗后颌下腺细胞凋亡的影响 细胞凋亡主要见于导管细胞,在腺泡细胞亦可见有凋亡。放疗对照组凋亡细胞相对正常对照组明显增多,而与放疗对照组比较,放疗 LJP A 组及放疗 LJP B 组的凋亡细胞明显减少,见图 2、表 2。

表 2 大鼠颌下腺细胞凋亡 TUNEL 检测的 IOD/Area 值

组别	IOD/Area 值
正常对照组	0.194 ± 0.014
放疗对照组	0.388 ± 0.126*
放疗 LJP A 组	0.298 ± 0.076#
放疗 LJP B 组	0.239 ± 0.050#

*: $P < 0.05$,与正常对照组相比;#: $P < 0.05$,与放疗对照组相比。

3 讨论

目前对唾液腺放射防护的研究主要集中在放射防护剂、放射技术、基因转移技术等多个方面^[6],关于中药对其的防护目前仍较少见,LJP 具有多种生物学效应,其抗辐射作用近年来备受关注,但具体的作用机制尚不明确,研究提示抑制细胞凋亡是其可能机制^[7]。细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育,维护内环境稳定,由基因控制的细胞主动性死亡的过程^[8]。Bcl-2 基因家族在控制细胞凋亡过程中起着重要的作

用,该家族包括抑制凋亡的基因 Bcl-2、Bcl-xL 等以及促进凋亡基因 Bax、Bak 等。Bax 主要作用是与 Bcl-2 拮抗,促进细胞凋亡^[9]。Bax 蛋白受到刺激后,促使线粒体离子通道开放,诱导凋亡蛋白从线粒体间隙释放到细胞质中,执行凋亡程序,拮抗 Bcl-2 的保护作用,使细胞趋于凋亡。而 Bcl-2 可以与 Bax 结合形成 Bcl-2 和 Bax 异二聚体,阻止插入线粒体外膜,保护线粒体电势梯度,调节细胞内 Ca^{2+} 的自稳状态和氧化还原状态,抑制凋亡。Bax/Bcl-2 比值是决定细胞是否发生凋亡的关键因素之一。目前,使用药物干预进行组织损伤的防治研究,其目的在于探索药物能否改变 Bax/Bcl-2 比值,达到抗凋亡目的,从而发挥药物的防治作用。赵智明等^[10]认为美托洛尔可通过抑制细胞凋亡相关蛋白的合成,降低心肌细胞的凋亡。郭庆和任豪^[11]研究表明超声微泡联合促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)能够调节 Bax/Bcl-2 比值,抑制心肌细胞凋亡。

在防治放疗损伤的研究中,调节 Bax/Bcl-2 比值,对抑制细胞凋亡同样具有重要意义^[12-13]。本研究结果显示,平均光密度值(IOD/Area)越高代表阳性率越高,即所检测指标表达水平越高,两者呈正相关。放疗对照组的 Bcl-2 表达与正常对照组相比,明显降低($P < 0.05$),而 Bax 表达明显增加,Bax/Bcl-2 比值增加,细胞趋于凋亡,在细胞凋亡检测中也表明放疗对照组细胞的凋亡水平比正常对照组高($P < 0.05$),因此,颌下腺放射性损伤中引起凋亡增加的可能机制之一为通过上调 Bax 表达,同时降低 Bcl-2 的表达,进而影响 Bax/Bcl-2 比值,导致细胞凋亡。而在给予 LJP 干预后,Bcl-2 的表达率相对于放疗对照组的 Bcl-2 水平有明显升高($P < 0.05$),而 Bax 水平未见明显改变,结果 Bcl-2/Bax 比值增大,使细胞趋于存活。刘杨等^[14]发现,在 LJP 抗放射作用的研究中,Bcl-2 表达增加可促脾细胞提高对各种致命因素的抵抗力,延长脾细胞寿命。在本研究的颌下腺细胞凋亡 TUNEL 检测结果中,LJP 实验组的凋亡相对放疗对照组减少,结果与吴晓旻等^[15]研究的 LJP 具有保护作用的结果相符,LJP 各组淋巴细胞凋亡率显著降低,显著调节放射性损伤大鼠的免疫功能。因此,本研究表明,LJP 通过调节颌下腺组织细胞 Bcl-2 的表达,调控细胞凋亡,这可能是 LJP 增强颌下腺组织对抗放射损伤的机制,表明 LJP 对颌下腺放射性损伤具有保护作用。

参考文献:

[1] 郭锐,刘艳华.海带多糖的保健功效及其在职业防护中的应用展望[J].国际医药卫生导报,2008,14(2):118-121.
 [2] 罗小宁,黄晓明.放射性口干症[J].国际耳鼻喉头颈外科杂志,2009(1):46-48.
 [3] 赵云艳,王晓萍.放射性唾液腺损伤机制的研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2010,15(6):572-574.
 [4] 霍文艳,颜兴,韩培彦.涎腺放射损伤的发病机制与治疗[J].中华老年口腔医学杂志,2009,7(2):106-109.
 [5] 崔巍,王硕仁,朱陵群,等.平均光密度值分析法和阳性染色面积分析法在免疫组化图像分析中的对比研究[C]//中华中医药学会内科分会.中医内科学科建设研讨会论文集汇编.北京,2008:148-151.
 [6] 秦俭,王仁生.唾液腺放射性损伤及其防护[J].国际肿瘤学杂志,2007,34(4):258-261.
 [7] 邓长江,朱希强,郭学平.海带多糖药理作用的研究进展[J].食品与药品,2006,8(4):30-32. (下转第 1470 页)

3 讨 论

本研究采用生命质量的研究方法,根据 SF-36 量表制作调查问卷^[1-2],测定煤工尘肺患者的生存质量,将有助于全面评价其带病生存的质量和生命活动的特征^[3-4],分析可能影响生存质量的因素^[5]。

通过单因素分析发现,尘肺病情越严重的患者,在 PF、BP、VT 3 个方面生存质量出现明显下降。有的尘肺患者由于出现了呼吸系统感染、肺源性心脏病、气胸等并发症,加重了尘肺病的病情,加剧了患者在 BP、VT、SF、MH 4 个方面的损害。国内研究表明,慢性疾病患者生存质量比未患病者差^[6-7]。由此,进一步还可能引起患者出现消极的心理影响,使得这部分患者的心理健康出现问题^[8-9]。并且,由于目前的临床治疗手段无法根除尘肺,尘肺患者需要终身进行对症和支持治疗,如果没有相应的良好的医疗保障,疾病带来的生理和心理上的影响就会严重削弱尘肺患者的生存质量^[10-11]。

本研究还就煤工尘肺患者生存质量的影响因素进行了多因素分析,将 PF、RP、BP、GH 4 个维度定义为生理健康,VT、SF、RE、MH 4 个维度定义为心理健康。多元逐步回归分析发现,按照影响因素作用的大小,生理健康的影响因素为尘肺病分期、并发症、原发疾病、年龄等;心理健康的影响因素为福利满意度、良好医疗保障、生活自理能力、健康教育。可以看出,影响生理健康的因素主要是尘肺病本身和患者个体因素,而对心理健康的影响主要是外部的生活、生存、就医等环境对患者健康的影响。

综上所述,煤工尘肺患者的生存质量偏低,要提高煤工尘肺患者的生存质量,需要从生理健康和心理健康加以改善^[12]。对于煤工尘肺患者,在减轻病痛对患者身体上的损害之外,还必须改善患者的职业病待遇,解决患者的心理健康问题,最大程度的提高煤工尘肺病患者的生存质量。

参考文献:

- [1] Stewart AL, Hays RD, Ware JE. The MOS short-form general health survey. Reliability and validity in a patient population[J]. *Med Care*, 1988, 26: 724-735.
- [2] 张淳,陈婕,江一鸣,等. SNOT-20、VAS 及 SF-36 量表相结合用于慢性鼻-鼻窦炎患者生存质量的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(9): 1039-1041.
- [3] 钟原,江越全. 心肌细胞凋亡及其相关基因[J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(3): 202-203.
- [4] 伍昌林,薛俭成,党鑫堂. 辐照血液凋亡相关蛋白 Fas/FasL、Bcl-2/Bax 的检测及意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(7): 683-684.
- [5] 赵智明,郭寒,焦东东,等. 美托洛尔对异丙基肾上腺素诱导心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(9): 1039-1041.
- [6] 郭庆,任豪. 超声微泡联合 EPO 对于急性心肌梗死后大鼠心肌保护作用的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10): 1198-1200.
- [7] Rades D, Fehlauer F, Wrobleksy J, et al. Prognostic factors in head-and-neck cancer patients treated with surgery

学, 2008, 37(12): 1319-1321.

- [3] Li L, Wang HM, Shen Y. Chinese SF-36 health survey: translation, cultural adaptation, validation, and normalization[J]. *J Epidemiol Commun Health*, 2003, 57: 259-263.
- [4] Tseng HM, Lu JF, Gandek B. Cultural issues in using the SF-36 health survey in Asia: results from Taiwan [J]. *Health Qual Life Outcomes*, 2003, 1: 72-76.
- [5] Hopman WM, Towheed T, Anastassiades T, et al. The Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research Group Canadian normative data for the SF-36 health survey[J]. *Can Med Assoc J*, 2000, 163: 265-271.
- [6] 王红妹,李鲁. 初级卫生保健中慢性病对健康相关生命质量的影响[J]. *中国全科医学*, 2004, 7(19): 1439-1442.
- [7] 安丰玲,周成超,徐凌忠. 济南市不同躯体健康状况低保居民的生命质量[J]. *中国心理卫生杂志*, 2010, 24(11): 873-874.
- [8] Caseras X, Mataix-Cols D, Trasovares MV, et al. Dynamics of brain responses to phobic-related stimulation in specific phobia subtypes[J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(8): 1414-1422.
- [9] Bravo P, Edwards A, Rollnick S, et al. Tough decisions faced by people living with HIV: a literature review of psychosocial problems[J]. *AIDS Rev*, 2010, 12(2): 76-88.
- [10] Harris KM, Edlund MJ. Self-medication of mental health problems: new evidence from a national survey[J]. *Health Serv Res*, 2005, 40(1): 117-134.
- [11] Li XM, Stanton B, Fang XY, et al. Social stigma and mental health among rural-to-urban migrants in China: a conceptual framework and future research needs[J]. *World Health Popul*, 2006, 8(3): 14-31.
- [12] Tambs K, Ranning T, Prescott CA, et al. The Norwegian Institute of Public Health Twin Study of Mental Health: examining recruitment and attrition bias[J]. *Twin Res Hum Genet*, 2009, 12(2): 158-168.

(收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2011-03-08)

(上接第 1467 页)

- [8] 钟原,江越全. 心肌细胞凋亡及其相关基因[J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(3): 202-203.
- [9] 伍昌林,薛俭成,党鑫堂. 辐照血液凋亡相关蛋白 Fas/FasL、Bcl-2/Bax 的检测及意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(7): 683-684.
- [10] 赵智明,郭寒,焦东东,等. 美托洛尔对异丙基肾上腺素诱导心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(9): 1039-1041.
- [11] 郭庆,任豪. 超声微泡联合 EPO 对于急性心肌梗死后大鼠心肌保护作用的研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10): 1198-1200.
- [12] Rades D, Fehlauer F, Wrobleksy J, et al. Prognostic factors in head-and-neck cancer patients treated with surgery followed by intensity-modulated radiotherapy (IMRT), 3D-conformal radiotherapy, or conventional radiotherapy [J]. *Oral Oncol*, 2007, 43(6): 535-543.
- [13] Konings AW, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 62(4): 1187-1194.
- [14] 刘杨,亢登峰,王英元. 大鼠脊髓损伤后 IGF-1 和 Bcl-2 表达变化的免疫组织化学研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2007, 5(2): 134-136.
- [15] 吴晓旻,杨明亮,黄晓兰,等. 海带多糖的抗辐射作用与脾细胞凋亡[J]. *武汉大学学报:医学版*, 2004, 25(3): 241-244.

(收稿日期: 2010-09-19 修回日期: 2011-03-14)