

低剂量 X 射线辐射对 BALB/C 小鼠免疫系统的影响

谢漪^{1,3} 党秉荣¹ 张红¹ 邴涛^{1,3} 郝冀芳¹ 郭红云² 王小虎²

¹ (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

² (甘肃省肿瘤研究所 兰州 730000)

³ (中国科学院研究生院 北京 100039)

摘要 为评估低剂量辐射对健康机体产生的生物学风险,检测了低剂量 X 射线照射对 BALB/C 小鼠免疫系统的影响。采用 X 射线全身照射,剂量分别为 0、0.39、0.55 和 1Gy,剂量率为 0.2Gy/min,照射 24h 后取血及器官,用流式细胞仪检测免疫细胞周期和凋亡的变化,用重量法得到胸腺和脾脏指数。发现照射后小鼠的外周血淋巴细胞、胸腺细胞和脾脏淋巴细胞的周期被阻滞在 G₀—G₁ 期;外周血淋巴细胞和胸腺细胞的凋亡比例随剂量的增大而增大,但是脾脏淋巴细胞的凋亡随着剂量的增大而减小;胸腺和脾脏指数随着剂量的增大而减小。故低剂量 X 射线全身照射可引起试验动物的免疫细胞周期和凋亡比例发生变化,对其造成一定的损伤;对小鼠免疫系统的影响因器官而异。本实验可为辐射防护提供实验依据。

关键词 X 射线辐射, 外周血淋巴细胞, 胸腺细胞, 脾脏淋巴细胞, 细胞周期和凋亡, 脾脏和胸腺指数, 小鼠
中图分类号 Q691, Q782, R818.74, R392.3

细胞周期和凋亡是近年来细胞生物学、分子生物学、免疫学以及肿瘤学研究的前沿课题和研究热点,特别是淋巴细胞的周期及分布反映着淋巴细胞生长增殖的具体过程。它的变化较为客观的显示了机体免疫力的变化,老化的免疫细胞可以导致机体免疫功能的下降,从而诱发一系列的像传染性疾病、癌症、以及自身免疫系统紊乱等疾病^[1]。淋巴细胞中 T 细胞在胸腺内分化成熟,而脾脏中存在大量的巨噬细胞、B 细胞和 T 细胞。辐射可延长细胞的细胞周期,但不同阶段的细胞辐射敏感性不同。放射生物学研究表明:电离辐射作用后可改变细胞的周期进程^[2,3],对于不同的细胞可引起 G₁ 期、G₂ 期或 S 期阻滞的不同变化。胸腺和脾脏指数的变化显示了淋巴样器官细胞量(T、B 淋巴细胞的数量)的变化。为了较全面和系统的了解低剂量辐射对机体免疫功能的影响,本文观察了不同低剂量 X 射线辐射对小鼠免疫系统的影响,获得不同免疫细胞和器官对低剂量 X 射线辐射的放射生物学效应的规律。期望可以为建立面向生物学对象的免疫模型和辐射防护方面提供一些实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验用纯种 BALB/C 小鼠,雌雄各半,健康,6—7 周龄,体重(23±1)g,由甘肃省医学科学院动物实验中心提供。随机分为四组(每组 6 个),0、0.39、0.55 和 1Gy,剂量率为 0.2Gy/min。

1.2 主要试剂、仪器和照射条件

淋巴细胞分离液(上海生物工程技术有限公司),碘化丙啶(Propidium iodide, PI)购自上海生物工程技术有限公司,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS),FACSCalibur 流式细胞仪(B—D 公司)。采用 PRIMUS 型医用电子直线加速器(西门子),能量为 6MeV 的电子束产生的 X 射线治疗机进行全身照射。照射靶皮距(Source to surface distance, SSD)为 100cm。

1.3 免疫细胞周期和凋亡的测定

采用流式荧光强度分析。照射 24 h 后,小鼠眼眶放血,收集血液,肝素抗凝。全血加等量的 PBS(给出全称,且应在上节提及)液稀释,混匀后置

中国科学院 2003 年西部之光课题(XB040602)、中国科学院“百人计划”基金、中国科学院 2002 年西部之光课题(XB030622)资助

第一作者:谢漪,女,1981 年 1 月出生,2003 毕业与西北师范大学,现为中国科学院近代物理研究所读博士生,辐射生物学专业

收稿日期:初稿 2006-01-03,修回 2006-02-28

于2mL淋巴分离液上,密度梯度离心后(3000r/min, 20min),吸出淋巴细胞层,PBS洗1次,75%的酒精固定。小鼠处死,取胸腺和脾脏,PBS冲洗,胸腺用剪刀剪碎,后用300目的过滤网过滤,PBS洗两遍即可用酒精(75%)固定;脾脏用250目的钢网碾碎,后用300目的过滤网过滤,置于2mL淋巴细胞分离液上,离心后吸出淋巴细胞层,用PBS洗1次后即酒精(75%)固定。所有样品经PI染色半小时后流式细胞仪检测,波长为488nm,用FACScan软件收集 1×10^4 细胞,Modfit3.0软件分析细胞周期和凋亡的变化。

1.4 胸腺和脾脏指数的测定

摘取小鼠的胸腺和脾脏,用滤纸吸干残血,称重(mg),分别除以小鼠体重(g),再乘以10,得到胸腺指数和脾脏指数。

$$\text{脾脏指数} = (\text{脾脏重量} / \text{小鼠体重}) \times 10$$

$$\text{胸腺指数} = (\text{胸腺重量} / \text{小鼠体重}) \times 10$$

1.5 统计方法

数据用均数 \pm sd表示,各组均数采用单因素方差分析,采用SPSS13.0统计软件和Origin7.0绘图软件。

2 结果

2.1 小鼠免疫细胞周期的变化

经过不同低剂量的X射线照射,小鼠外周血淋巴细胞和胸腺细胞周期在 G_0 — G_1 期所占的比例有所增加,特别是在0.55Gy时,而在1Gy时又有所减少;S期和 G_2 —M期所占的比例有所减少,在1Gy时却有所增加(见表1)。而脾脏淋巴细胞在 G_0 — G_1 期所占的比例在0.39Gy时有所减少,在0.55Gy时增加,后又在1Gy时减少;S期所占比例在0.39Gy时有所增加,在0.55Gy时减少,在1Gy时又减少; G_2 —M期所占的比例在减少,特别是在0.55Gy,在1Gy时又有所增加(见表1)。

Table 1 Immunocyte cycle changes in X-ray irradiated mice

($\bar{x} \pm s, n=6$)

Cell cycle	Control	0.39Gy	0.55Gy	1Gy
Peripheral blood lymphocyte				
G_0 - G_1 / %	85.462 \pm 2.257	94.465 \pm 0.588 ^c	97.183 \pm 0.153 ⁽³⁾	90.603 \pm 0.892 ⁽³⁾
S / %	5.157 \pm 0.460	1.528 \pm 0.250 ^c	0.988 \pm 0.169 ⁽³⁾	4.98 \pm 0.685 ^c
G_2 -M / %	9.34 \pm 2.130	4.007 \pm 0.420 ⁽²⁾	1.832 \pm 0.190 ⁽²⁾	4.418 \pm 0.586 ⁽²⁾
Thymocyte				
G_0 - G_1 / %	68.175 \pm 0.264	78.232 \pm 1.567 ⁽³⁾	81.178 \pm 2.105 ⁽³⁾	83.26 \pm 0.974 ⁽³⁾
S (%)	13.26 \pm 0.944	7.702 \pm 0.926 ⁽³⁾	6.598 \pm 0.307 ⁽³⁾	7.418 \pm 0.519 ⁽³⁾
G_2 -M / %	18.468 \pm 1.127	14.068 \pm 1.590 ⁽²⁾	12.39 \pm 2.092 ⁽²⁾	9.238 \pm 0.717 ⁽²⁾
Spleen lymphocyte				
G_0 - G_1 / %	77.840 \pm 0.900	76.697 \pm 1.346 ⁽¹⁾	80.225 \pm 0.646 ⁽¹⁾	79.663 \pm 0.645 ⁽¹⁾
S / %	5.085 \pm 0.423	6.49 \pm 2.115 ⁽¹⁾	4.305 \pm 0.452 ⁽¹⁾	1.183 \pm 0.195 ⁽¹⁾
G_2 -M / %	17.16 \pm 1.042	16.812 \pm 0.977	15.77 \pm 0.441	19.2 \pm 0.715

The significance of difference among radiated groups and control was determined by One-way ANOVA.

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, ⁽³⁾ $p < 0.001$ vs. control

2.2 小鼠淋巴细胞凋亡的变化

经过不同剂量X射线的辐射,小鼠外周血淋巴细胞和胸腺细胞的凋亡比例随着剂量的增大而增大;脾脏淋巴细胞的凋亡在0.39Gy时减少,后又随着剂量的增加而缓慢增加(见图1)。

2.3 胸腺和脾脏指数的变化

胸腺和脾脏指数随着剂量的增加而减小(见图2),在0.39Gy时,胸腺和脾脏指数减少到16.4%和26.7%;0.55Gy时,变为37.3%和32.2%;1Gy时,变为38.5%和48.2%。

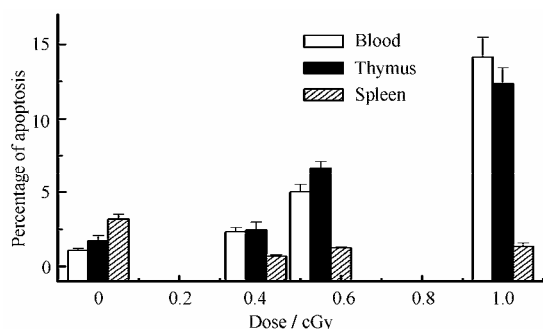


Fig.1 Percentage changes of apoptosis of immunocyte in X-ray irradiated mice (The significance of difference between the irradiated and control groups was determined by One-way ANOVA, $p < 0.001$; $n=6$)

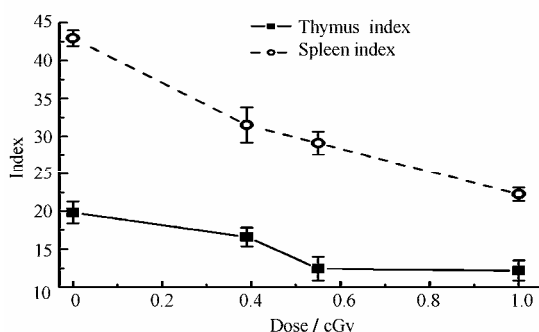


Fig.2 Thymus and spleen index alterations in X-ray irradiated mice (The significance of difference between the irradiated and control groups was determined by One-way ANOVA, $p < 0.01$ vs; $n=6$)

3 讨论

小鼠外周血淋巴细胞和胸腺细胞经低剂量 X 射线照射后, 细胞周期基本上被阻滞在 G_0-G_1 期, 细胞凋亡随着剂量的增加而增加, 胸腺指数则随着剂量的增加减少 (见表 1, 图 1、图 2), 符合“超敏理论”。“超敏理论”认为在照射细胞或组织时, 细胞周期在剂量 $< 0.5\text{Gy}$, 会很快地被阻滞在 G_0-G_1 , 到达一定的限度后, 才会慢慢的有所回升, 曲线的形状符合线性平方模型^[4,5]。这种现象出现的原理可能与细胞的辐射敏感性 (Hyperradiosensitivity, HRS) 和辐射抗性 (Radioresistance, IRR) 有一定的关系, 在低剂量时, HRS 对细胞的影响较大, 同时染色体不稳定的细胞都被阻滞在了 G_0-G_1 期, 随着剂量的增加, IRR 开始发挥较大的作用, 同时曲线开始有所回升^[6]。这种假设至今还没有证据支持, 众所周知, DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 是 HRS/IRR 的一种标志物, 而 Vaganay 等^[7]研究证明在 $0.2-0.5\text{Gy}$ 之间, DNA-PK 的水平没有任何的变化, 关于这方面的讨论现在还在继续。另外, 我们还发现小鼠的胸腺细胞在辐射的作用下细胞周期变化较外周血淋巴细胞

的变化小, 原因可能与胸腺组织的结构有关。众所周知, 正常胸腺细胞的退化是从发育期的早期开始的, 其衰老是因为胸腺上皮细胞的选择性缺失^[8]; 且胸腺上皮细胞本身就对辐射具有一定的抗性^[9], 而胸腺作为对辐射较为敏感的器官, 细胞的凋亡反应较为容易产生^[10]。

有趣的是, 脾脏淋巴细胞的周期也被阻滞 G_0-G_1 期, 同时脾脏指数在低剂量辐射的影响下呈抑制状态, 而辐射对脾脏淋巴细胞凋亡却呈现出激活作用 (见表 1、图 1、图 2)。产生这种现象的原因可能与脾脏的构造和功能有关。脾脏的表面有一层致密结缔组织的被膜。被膜及由被膜伸入脾实质而形成的小梁共同构成脾的支架。被膜与小梁之间为脾实质, 又称脾髓, 可分为白髓和红髓^[11]。白髓主要由密集淋巴组织构成, 呈球状或长筒形; 红髓分布在白髓之间, 由排列成索状的淋巴组织和血窦构成^[12]。脾脏还有产生淋巴细胞的功能, 脾内的淋巴细胞中 T 细胞占 40%, B 细胞占 55%, 还有一些 K 细胞和 NK 细胞等, 脾内的巨噬细胞和淋巴细胞都参与免疫活动。当脾脏受到低剂量辐射时, 可引起免疫应答的发生, 脾的体积和内部结构也发生变化。体液免疫应答时, 淋巴小结增多增大, 脾索内浆细胞增多; 细胞免疫应答时, 则脉周围淋巴鞘显著增厚, T 细胞和 B 细胞在脾脏的白髓中产生, 所以说脾脏是一个产生辐射保护作用的免疫应答场所。因此脾脏比其他的器官有较强的辐射抗性^[13]。有报道称脾脏中的蛋白质和脾脏细胞的凋亡在辐射剂量高达 7.5Gy 和 5Gy 时才会出现显著的增加^[14,15]。

实验证明低剂量 X 射线全身照射 BALB/C 小鼠时, 可引起免疫细胞周期和凋亡比例的变化, 对其造成一定的损伤; 同时 X 射线低剂量辐射对小鼠免疫系统的影响随着器官的不同而不同。本实验为建立面向生物学对象的免疫模型和辐射防护方面提供一些实验依据。

参考文献

- 1 Timothy J Hale, Bruce C Richardson, Leonard I Sweet, *et al.* Cell Immunol, 2002, **220**(1): 51-62
- 2 Teyssier F, Bay J O, Dionet C, *et al.* Bull Cancer, 1999, **86**(4): 345-357
- 3 Hwang A, Muschel R J. Radiat Res, 1998, **150**(5): 52-59
- 4 Joiner M C, Marples B, Lambin P. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **49**(2): 379-389
- 5 Jackie Harney, Susan C, Nihal Shah M D, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, **59**(4): 1190-1195
- 6 Michael C Joiner, Brian Marples, Philippe Lambin, *et al.*

- International J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, **49**(2): 379-389
- 7 Vaganay Juery S, Muller C, Abdulkarim B, *et al.* Brit J Cancer, 2000, **83**(4): 514-518
- 8 George A J, Ritter M A. Immunol Today, 1996, **17**(6): 267-272
- 9 Junko Toki, Yasushi Adachi, Tienan Jin, *et al.* Immunobiolog, 2003, **207**(4): 247-256
- 10 Deng D X, Cai L, Chakrabarti S, *et al.* Toxicology, 1999, **134**(1): 39-49
- 11 Kraal G, Rodrigues H, Hoeben K, *et al.* Immunology, 1989, **68**(2): 227-232
- 12 Weiss L. J Trop Med Hyg 1989, **41**(2): 144-160
- 13 YANG Z W, LI J A, YANG M H, *et al.* Res Vet Sci, 2005, **79**(2): 109-154
- 14 Amer T M. J Egypt Ger Soc Zool, 1993, **11**(3): 335-347
- 15 Klokov D, Criswell T, Sampath L, *et al.* Clusterin: a protein with multiple functions as a potential ionizing radiation exposure marker. Proceedings of First Nagasaki Symposium of International Consortium for Medical Care of Hibakusha and Radiation Life Sciences, Amsterdam: Y. Shibata, S. Yamashita, M. Watanabe and M. Tomonaga, 2003, 219-232

Changes of immune system in mice irradiated by X-rays

XIE Yi^{1,3} DANG Bingrong¹ ZHANG Hong¹ BING Tao^{1,3} HAO Jifang¹
GUO Hongyun² WANG Xiaohu²

¹(Institute of Modern Physics, the Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000)

²(Institute of Medicine Science in Gansu Province, Lanzhou 730000)

³(Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039)

ABSTRACT For estimating biological risks from low doses irradiation, BALB/C mice were irradiated to 0, 0.39, 0.55 and 1Gy by X-rays at a dose rate of 0.2Gy/min. The immunocyte cycle and apoptosis were determined by flow cytometry, and the thymus and spleen weight were measured, too. The results showed that the cycle of peripheral blood lymphocyte, thymocyte and spleen lymphocyte were arrested in G₀—G₁. The apoptosis (except for spleen lymphocyte) induced by the irradiation increased, whereas the thymus and spleen index declined with increasing dose. The results suggested that low doses X-ray total-body irradiated could result in changes of cycle and apoptosis, and some damages to immunocytes, and the X-ray irradiation affected the organs differently. It might provide experiment basis for radioprotection.

KEYWORDS X-ray irradiation, Blood lymphocytes, Thymocyte, Spleen lymphocytes, Cellular cycle and apoptosis, Thymus and spleen index, Mouse

CLC Q691, Q782, R818.74, R392.3