

# 低剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞转铁蛋白受体表达的影响

罗 灿 苏 旭 刘建香 付士波 鞠桂芝

(白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室 长春 130021)

**摘要** 采用直接免疫荧光流式细胞术方法,检测了低剂量 X 射线全身照射对小鼠脾脏淋巴细胞转铁蛋白受体(TfR)表达的影响。结果表明,低剂量 X 射线全身照射可增强脾脏淋巴细胞 TfR 的表达,由于 TfR 是 T 淋巴细胞激活与增殖过程中表达在细胞表面的重要受体之一,与 T 淋巴细胞激活与增殖有着密切关系。所以上述结果可能是低剂量电离辐射增强机体免疫功能的又一证据,同时也说明 TfR 在低剂量电离辐射免疫增强效应中起着重要作用。研究证实,T 淋巴细胞激活与增殖是低剂量电离辐射增强机体免疫功能的中心环节。

**关键词** TfR, 脾细胞, X 射线, 低剂量辐射

以往的研究表明,低剂量电离辐射全身照射可增强机体的免疫功能<sup>[1]</sup>,诱导适应性反应<sup>[2]</sup>,抑制肿瘤生长和扩散<sup>[3,4]</sup>。近年来,对低剂量辐射诱导机体免疫功能增强的机理研究证实,T 淋巴细胞激活与增殖是低剂量电离辐射增强机体免疫功能的中心环节<sup>[1]</sup>。转铁蛋白受体(TfR)是 T 淋巴细胞激活与增殖过程中表达在细胞表面的重要受体之一,与 T 淋巴细胞激活与增殖有着密切关系。目前,关于电离辐射对 TfR 表达的影响,尚未见国内外有研究报道。为探讨 TfR 的低剂量辐射效应及其在低剂量辐射诱导机体免疫功能增强机制中的作用,本文采用流式细胞术方法,观察了低剂量 X 射线全身照射对小鼠脾细胞 TfR 表达的影响。同时采用 ConA 激活的淋巴母细胞法<sup>[5]</sup>,检测了不同低剂量 X 射线照射后,小鼠脾细胞 IL-2 活性的变化,以进一步阐明低剂量辐射增强机体免疫功能的机理。

## 1 材 料 与 方 法

### 1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠,体重  $20 \pm 2g$ ,购自白求恩医科大学实验动物部。动物随机分为对照组和不同剂量照射组或  $75mGy$  照射后不同时间组。

### 1.2 照射条件

Philips 深部 X 射线治疗机,电压  $200kV$ ,电流  $10mA$ ,滤板  $0.5mmCu$  和  $1.0mmAL$ ,照射组给予  $25 \sim 200mGy$  全身照射,剂量率  $12.5mGy/min$ ,靶皮距  $212cm$ ,对照组给予假照射。

### 1.3 TfR 表达的诱导

不同剂量照射组动物,于照后  $24h$  断头处死;  $75mGy$  照射后不同时间组动物,在不同时间照射,同时断头处死。在无菌条件下取出脾脏,放入盛有 RPMI-1640 培养液的平皿中,用毛

国家自然科学基金资助项目

收稿日期:初稿 1998-10-26; 修回 1998-12-07

玻片研磨制成单细胞悬液,离心 1000 r/min, 4℃, 5 min, 弃上清, Hanks 液洗细胞 2 次。加 5 mL Tris-NH<sub>4</sub>Cl, 作用 5 min, 裂解红细胞。Hanks 液洗细胞 2 次, 将细胞重悬于含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液中, 调细胞浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL。无菌 24 孔培养板, 每孔加细胞 100  $\mu$ L, 加 850  $\mu$ L 含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液, 加 50  $\mu$ L 浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 ConA (Sigma, 美国), 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48h。

#### 1.4 TfR 表达的检测

采用直接免疫荧光流式细胞术, 美国 B-D 公司生产的 FACScan 流式细胞仪进行检测。上述培养 48h 的细胞, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 离心 1500 r/min, 4℃, 5 min, 细胞重悬于 150  $\mu$ L 0.01 mol/L PBS 中, 加 FITC-抗小鼠 TfR 单克隆抗体 4  $\mu$ L (Sigma, 美国), 4℃, 反应 45 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤两次。用 FACS 软件收集细胞, Lysys 软件分析处理数据, 每个样品收集  $1 \times 10^4$  个细胞, 记录阳性细胞百分率。

#### 1.5 IL-2 样品的收集

用无菌青霉素小瓶, 将培养 48h 的脾细胞培养上清收集起来作为检测 IL-2 的样品。

#### 1.6 淋巴母细胞的诱生

C57BL/6 小鼠, 断头处死, 取脾脏制成单细胞悬液, 离心洗涤后, 用含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液调细胞浓度为  $5 \times 10^6$  个/mL。无菌 24 孔培养板, 每孔加 1 mL 细胞, 50  $\mu$ L ConA (100  $\mu$ g/mL), 培养 2d, 用淋巴细胞分离液分离母细胞, 离心 2000 r/min, 4℃, 20 min<sup>[5]</sup>。将母细胞层吸出, 用含 10% NBS 的 RPMI-1640 培养液洗涤 2 次。

#### 1.7 IL-2 活性测定

将收集的淋巴母细胞调浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 无菌 96 孔培养板, 每孔加 100  $\mu$ L 细胞, 100  $\mu$ L IL-2 上清(1:2 稀释), 三复孔培养; 空白对照以 1640 培养液代替 IL-2 上清; ConA 对照加 ConA 100  $\mu$ L, 终浓度 2.5  $\mu$ g/mL, 细胞继续培养 48h, 终止培养前 6h 每孔加<sup>3</sup>H-TdR 18.5 kBq, 用 LKB1214 液闪仪检测每孔每分钟计数。

#### 1.8 统计学处理

采用 student's *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 低剂量 X 射线全身照射后脾脏淋巴细胞 TfR 表达的变化

0~100 及 200 mGy X 射线全身照射后 24h, 小鼠脾脏淋巴细胞数及 TfR 表达阳性细胞数的检测结果见表 1。不同低剂量 X 射线照射后, 小鼠脾脏 TfR 阳性细胞数在 75 mGy 组显著增高, 与对照组比较差异显著 ( $p < 0.05$ )。

### 2.2 75 mGy 照射后 TfR 表达的时程变化

75 mGy X 射线全身照射后 12、24、48、72h, 小鼠脾脏淋巴细胞数及 TfR 表达时程变化的检测结果见表 2。脾脏 TfR 阳性细胞数于照后 24h 开始升高, 以照后 72h 升高最为显著, 与对照组比较有显著性差异 ( $p < 0.01$ )。

### 2.3 低剂量 X 射线全身照射后小鼠脾淋巴细胞 IL-2 活性的变化

**Tab.1 Change of TfR expression in lymphocytes in spleens of mice 24 hours after whole body irradiation with low dose X-rays**

X-rays		(X±s)	
Dose /mGy	Splenocytes /10 <sup>7</sup> cells	TfR <sup>+</sup> cells/spleen /10 <sup>7</sup> cells	
0	7.25±0.74	1.71±0.19	
25	8.63±1.58	1.72±0.41	
50	7.60±1.78	1.58±0.46	
75	8.51±1.72	2.22±0.32 <sup>(1)</sup>	
100	6.85±3.78	1.94±0.37	
200	5.57±1.64	1.28±0.47	

n=5, <sup>(1)</sup>p<0.05 vs control group

0~100 及 200mGy X 射线全身照射后 24h, 小鼠脾淋巴细胞分泌的 IL-2 的活性变化见表 3。表中可见 75mGy 组小鼠脾淋巴细胞 IL-2 活性明显升高, 与对照组比较, 差异显著 (p<0.05)。以上结果表明, 低剂量电离辐射可使小鼠脾细胞 TfR 表达增多, IL-2 活性增强, 从而增强了 T 淋巴细胞激活和增殖能力, 提高机体的免疫功能。

**Tab.2 Time course of TfR expression in lymphocytes in spleens of mice after whole body irradiation with 75mGy X-rays (X±s)**

after irradiation/h	Splenocytes /10 <sup>7</sup> cells	TfR <sup>+</sup> cells/spleen /10 <sup>7</sup> cells
0	6.52±2.75	2.10±0.70
12	6.83±2.25	2.05±0.71
24	8.34±6.25	2.67±1.52
48	7.86±2.41	2.28±0.56
72	9.83±2.58	2.85±0.78 <sup>(2)</sup>

n=10, <sup>(1)</sup>p<0.01 vs control

**Tab.3 Change of activity of IL-2 in splenocytes of mice 24h hours after whole body irradiation with low dose X-rays(X±s)**

Dose/mGy	IL-2 activity of splenocytes/cpm
0	23743±2816
25	20276±3961
50	24481±2288
75	28474±2383 <sup>(1)</sup>
100	20848±4091
200	23251±4362

n=5, <sup>(1)</sup>p<0.05 vs control group

## 3 讨 论

TfR 是一种细胞膜受体, 通过与转铁蛋白结合向细胞内转运铁, 供细胞生长和代谢需要。研究表明丝裂原诱导的 T 淋巴细胞增殖是依赖 IL-2 和转铁蛋白的<sup>[6]</sup>。静止的 T 淋巴细胞不表达 TfR, 受到丝裂原刺激后, T 细胞首先启动细胞内各种反应, 如 c-myc 蛋白产生、IL-2R 的表达及 IL-2 的释放等, 细胞由静止期进入 G<sub>1</sub> 期并诱导 TfR 表达, 细胞进入 S 期。如果用抗 TfR 抗体封闭 TfR, 细胞的 DNA 合成和生长受抑制<sup>[7]</sup>, 而且可消除 IL-2 的促分裂作用。可见 TfR 在 T 淋巴细胞增殖过程中发挥着重要作用。辐射对 TfR 表达的影响尚未见国内外有研究报道。本研究结果显示, 75mGy X 射线全身照射后, 小鼠脾脏 TfR 阳性细胞数在照后 24h 和 72h 明显升高, 与对照组相比, 差异显著 (p<0.05), 脾细胞分泌 IL-2 的活性亦显著地高于对照组。说明低剂量 X 射线全身照射可增强脾细胞 TfR 的表达, 刺激 T 淋巴细胞的活化和增殖。已有研究证实, TfR 的表达受 IL-2 和 IL-2R 的相互作用的诱导。Neckers 等的研究表明, 用丝裂原刺激 T 细胞后, 在 TfR 的表达之前将抗 IL-2R 抗体加入刺激培养的 T 细胞中, TfR 的表达完全被抑制; 如果在刺激培养 3h 后, 去除丝裂原, 加入 IL-2 亦可增加 TfR 表达。本研究检测到的低剂量辐射后脾细胞 IL-2 活性的升高, 说明 TfR 表达增强可能是由于低剂量辐射后, T 细胞 IL-2 分泌增高, 并诱导 IL-2R 表达增强所致。由此可见, 低剂量辐射

后, T 淋巴细胞激活和增殖能力的增强与辐射刺激了 T 细胞 IL-2 分泌和 TfR 表达增强有密切关系, TfR 在低剂量辐射增强机体免疫功能的机制中发挥着重要作用。

近年来有研究报道, TfR 具有信号转导功能。Cano 等<sup>[8]</sup>研究表明, FG1/6 抗 TfR 单克隆抗体, 在亚丝裂剂量的佛波酯存在下, 可诱导 T 细胞增殖和 IL-2 的合成。认为 FG1/6 通过 TfR 向 T 细胞提供了激活 PKC 的辅助信号。亦有研究已证明, TfR 与 TCR $\zeta$  链以及  $\zeta$  链结合的 ZAP70 酪氨酸激酶有关。TfR 诱导的信号通过 TCR/ $\zeta$  链复合物在细胞表面的表达不依赖其它 TCR 复合物亚单位的表达。TfR 诱导的信号通过 TCR/ $\zeta$  链起放大由抗原与 TCR 结合所传递的信号的作用<sup>[9]</sup>。低剂量辐射可增强脾脏 T 淋巴细胞 TfR 的表达, 是否 TfR 表达的增多其信号传导功能也增强, 并通过增强的信号传导功能促进 T 细胞的激活和增殖, 从而在低剂量辐射增强免疫功能的机制中发挥作用, 还需要研究。

### 参 考 文 献

- 1 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, **15**(4): 217~222
- 2 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, **15**(5): 293
- 3 李修义, 陈玉丙, 夏凤琴等. 中国辐射卫生, 1996, **5**(1): 21~24
- 4 金敖兴, 汪思应, 魏道严等. 中国辐射卫生, 1996, **5**(1): 18~20
- 5 杨贵贞. 免疫生物工程纲要与技术. 吉林省科技出版社, 1991. 41~48
- 6 Neckers L M, Cossman J. Pro-Natl-Acad-Sci-U-S-A, 1983, **80**: 3494~3498
- 7 Pelosi E, Testa U, Louache F *et al.* J Biol Chem, 1986, **261**(7): 3036~3041
- 8 Cano E, Pizarro A, Redondo J M *et al.* Eur J Immunol, 1990, **20**: 765~770
- 9 Salmeron A, Borroto A, Fresno M *et al.* J Immunol, 1995, **154**: 1675~1683

## EFFECT OF WHOLE BODY IRRADIATION WITH LOW DOSE X-RAYS ON EXPRESSION OF TRANSFERRIN RECEPTOR IN SPLENOCYTES OF MICE

LUO Can SU Xu LIU Jianxiang FU Shibo JU Guizhi

(*smallit MH Radiobiology Research Unit Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021*)

**ABSTRACT** It has been demonstrated that the activation and proliferation of T lymphocytes is a crucial link in enhancing immune function by low dose ionizing radiation. Transferrin receptor (TfR) is one of the important membrane receptors expressed in T cells during activation and proliferation of T lymphocytes and is closely related with the activation and proliferation of T lymphocytes. TfR expression in lymphocytes in mouse spleens was examined using direct immunofluorescence and flow cytometric analysis. The results showed that whole body irradiation (WBI) with low dose X-rays could stimulate TfR expression in lymphocytes in mouse spleens, and this might be another evidence for enhancing immune function with low dose radiation and meanwhile indicated that TfRs play an important role in enhancing immune function with low dose radiation.

**KEYWORDS** TfR, Splenocytes, X-rays, Low dose radiation