

# X射线全身照射后小鼠腹腔巨噬细胞的 肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )表达量的变化\*

孙义敏 刘树铮

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

**摘要** 用L929细胞染料摄入法检测了小鼠受不同剂量(75mGy, 2.0Gy)X射线全身照射后小鼠腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )表达量的时程变化及全身照射后24h的剂量-效应关系。结果可见, 75mGy照射后3h, TNF $\alpha$ 表达量有所增加, 从6~120h, 均显著高于对照组, 12h表达量最高; 2.0Gy照射后3~120h, 不同时间点均显著高于对照, 表达量最高点为12h。从剂量-效应关系中可见, 经50mGy~2.0Gy不同剂量照射后, TNF $\alpha$ 表达量均显著高于对照组, 0.5Gy照射组其表达量最高, 而经4.0Gy和6.0Gy照射后, TNF $\alpha$ 的表达量显著低于对照组。提示一定剂量电离辐射可诱导巨噬细胞产生TNF $\alpha$ 。

**关键词** X线辐射, 腹腔巨噬细胞, 肿瘤坏死因子 $\alpha$

**中图分类号** R146, R811, R979.6

低剂量辐射可使机体免疫反应上调<sup>[1]</sup>, 其中T细胞激活起着关键作用, T细胞功能激活又受巨噬细胞(Macrophages, M $\phi$ )功能变化的制约。巨噬细胞在免疫反应中可通过分泌一系列细胞因子而发挥作用, 本实验旨在观察小鼠受X射线全身照射后腹腔巨噬细胞肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )表达量的变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和分组

昆明系小白鼠: 雄性, 体重(20 $\pm$ 2)g, 健康, 由白求恩医科大学实验动物部提供, 动物随机分为对照组和不同照射组。

### 1.2 照射条件

按文献[2]的方法照射。低剂量率为12.5mGy/min; 高剂量率为0.287Gy/min。

### 1.3 TNF的诱生

小鼠受X射线全身照射后不同时间, 无菌条件下冲洗腹腔巨噬细胞, 离心洗涤后再用含10%小牛血清(NBS)的1640培养液调整细胞浓度为 $2\times 10^6$ /mL, 以1mL/孔加到24孔板中, 在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养2h后, 用1640培养液洗涤2次, 去除未贴壁细胞, 加入含

\* 国家自然科学基金资助(39570188)

收稿日期: 初稿 1999-09-24, 修回 2000-02-17

细菌脂多糖(LPS)20 $\mu$ g/mL的1640培养液, 1mL/孔, 继续培养40h, 离心收集上清, 冻存于-20 $^{\circ}$ C待测。

#### 1.4 TNF $\alpha$ 活性测定<sup>[3]</sup>

染料摄入法: 将巨噬细胞培养上清以100 $\mu$ L/孔种于96孔板中, 同时将重组人肿瘤坏死因子 $\alpha$ (rhTNF $\alpha$ )的标准品做倍比稀释, 并以100 $\mu$ L/孔种于96孔板中, 然后用含10%NBS的1640培养液调整L929细胞, 使其浓度为 $2 \times 10^5$ /mL, 以100 $\mu$ L/孔加到24孔板, 同时设细胞对照组。每个样品三复孔。在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养16h, 弃上清, 用生理盐水洗涤3次, 加0.5%结晶紫染色液50 $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养30min, 再以生理盐水洗涤2次, 弃上清, 加脱色液100 $\mu$ L/孔, 10min后, 以酶标仪测各孔OD值(OD<sub>570</sub>)。由标准品绘制标准曲线, 各样品根据标准曲线计算出其相应TNF表达量。

#### 1.5 统计学分析

结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 $t$ 检验进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 绘制标准曲线

先用rhTNF $\alpha$ 标准品绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=0.851-0.000601X$

本实验条件下, 在0~1000U/mL范围内, TNF $\alpha$ 表达量与光密度之间呈现良好的线性关系, 相关系数 $r=-0.8997$ ,  $p < 0.005$ 。上式中 $Y$ 为光密度,  $X$ 为TNF $\alpha$ 表达量(U/mL)。

### 2.2 电离辐射作用后腹腔巨噬细胞的TNF $\alpha$ 表达的时程变化

给予小鼠75mGy及2.0Gy X射线全身照射, 观察照射后3、6、12、24、48、72、120h, 腹腔巨噬细胞TNF $\alpha$ 表达量的变化见表1。

Tab.1 Time course of TNF $\alpha$  expression changes in mouse peritoneal macrophages after whole-body irradiation with X-rays

Time after irradiation/h	TNF $\alpha$ /U $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	
	75mGy	2.0Gy
0	115 $\pm$ 34 <sup>(1)</sup>	115 $\pm$ 34
3	134 $\pm$ 57	234 $\pm$ 50 <sup>(2)</sup>
6	334 $\pm$ 106 <sup>(2)</sup>	351 $\pm$ 49 <sup>(3)</sup>
12	527 $\pm$ 108 <sup>(3)</sup>	581 $\pm$ 67 <sup>(3)</sup>
24	338 $\pm$ 67 <sup>(3)</sup>	361 $\pm$ 100 <sup>(3)</sup>
48	357 $\pm$ 59 <sup>(3)</sup>	431 $\pm$ 71 <sup>(3)</sup>
72	480 $\pm$ 93 <sup>(3)</sup>	397 $\pm$ 125 <sup>(2)</sup>
120	327 $\pm$ 109 <sup>(2)</sup>	334 $\pm$ 91 <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$  for each group, <sup>(2)</sup> $p < 0.01$ ,

<sup>(3)</sup> $p < 0.001$  vs 0h group

Tab.2 Changes in TNF $\alpha$  expression in mouse peritoneal macrophages 24h after whole-body irradiation with different doses of X-rays

Dose/Gy	TNF $\alpha$ /U $\cdot$ mL <sup>-1</sup>	
	doses of X-rays	
0	115 $\pm$ 34 <sup>(1)</sup>	
0.050	280 $\pm$ 81 <sup>(2)</sup>	
0.075	338 $\pm$ 67 <sup>(3)</sup>	
0.1	317 $\pm$ 84 <sup>(2)</sup>	
0.2	337 $\pm$ 43 <sup>(3)</sup>	
0.5	411 $\pm$ 48 <sup>(3)</sup>	
1	350 $\pm$ 71 <sup>(3)</sup>	
2	361 $\pm$ 100 <sup>(3)</sup>	
4	27 $\pm$ 4 <sup>(3)</sup>	
6	7 $\pm$ 1 <sup>(3)</sup>	

<sup>(1)</sup> $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$  for each group, <sup>(2)</sup> $p < 0.01$ ,

<sup>(3)</sup> $p < 0.001$  vs 0Gy group

由表1可见: 在75mGy X射线全身照射后3h, TNF $\alpha$ 表达即有所增加, 从6~120h, 均显著高于对照组, 12h时表达量最高; 2.0Gy照射后3~120h, 均显著高于对照组, 表达量最高

点为照射后 12h。

### 2.3 电离辐射作用后, 腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF}\alpha$ 的剂量 - 效应关系

给小鼠 0.050、0.075、0.100、0.20、0.50、1.0、2.0、4.0 和 6.0Gy X 射线全身照射后, 24h 获取腹腔巨噬细胞, 观察其  $\text{TNF}\alpha$  表达量的变化见表 2。由表 2 可见: 经 50mGy~2.0Gy 照射后, 小鼠腹腔巨噬细胞表达的  $\text{TNF}\alpha$  显著高于对照组, 0.5Gy 照射组  $\text{TNF}\alpha$  最高, 而 4.0Gy 和 6.0Gy 照射组,  $\text{TNF}\alpha$  的表达量显著低于对照组。

## 3 讨论

低剂量辐射可引起免疫功能的增强, 巨噬细胞在其发生机制中具有重要作用。巨噬细胞是一种多功能的间质细胞, 其中部分功能是通过分泌细胞因子而发挥效应的。 $\text{TNF}$  是巨噬细胞分泌的最重要的细胞因子之一。

$\text{TNF}$  基因表达受多种因素调节, 正向调节因素有细菌感染、X 射线、白细胞介素-2(IL-2)、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN- $\gamma$ )等, 负向调节因素有基因突变、激素、白细胞介素-4(IL-4)等, 双向调节因素有细菌脂多糖(LPS)、蛋白激酶 C(PKC)等。 $\text{TNF}$  的生物学效应是通过与靶细胞上的  $\text{TNF}$  受体(TNFR)结合而产生的。 $\text{TNF}$  受体分布广泛, 多数肿瘤细胞、正常细胞均表达一定水平的 TNFR。 $\text{TNF}$  的生物学作用也很多样, 例如, 抗病毒作用, 诱导主要组织相容性复合体(MHC)抗原表达, 还可诱导转录因子  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、c-fos、c-jun 等的表达以及 NO 的产生, 并可上调细胞间粘附分子-1(ICAM-1)mRNA 的表达。 $\text{TNF}\alpha$  的最主要生物学活性就是对某些肿瘤细胞的细胞毒(Cytotoxicity)作用。

本实验用 L929 细胞染料摄入法, 检测了小鼠受 X 射线全身照射后  $\text{TNF}\alpha$  蛋白表达水平的时程变化与剂量关系。从表 1 可见: 两种不同剂量照射后  $\text{TNF}\alpha$  蛋白的表达在 6~120h 均显著高于对照组, 12~72h 表达持续于峰值。不同剂量照射后, 24h 时  $\text{TNF}\alpha$  蛋白水平的变化见表 2。从表 2 可见, 0.5Gy 照射时  $\text{TNF}\alpha$  表达量最大, 且 4.0、6.0Gy 照射后,  $\text{TNF}\alpha$  的表达量明显低于对照组 ( $p < 0.001$ )。文献 [2] 报道  $\text{TNF}\alpha$ mRNA 转录水平的时程变化如下: 75mGy 照射后, 从 0.25~16h 表达逐渐增加, 16h 达峰值, 然后降低; 2.0Gy 照射后, 从 0~2h 转录水平增加幅度较大, 2~8h 持续于峰值, 而后逐渐降低。将这一结果与本文的观察结果相结合, 表明在 mRNA 与蛋白两个水平上的变化基本呈一致趋势。

$\text{TNF}\alpha$  在免疫调节中的地位极其重要。有文献报道, 接受刺激后  $\text{TNF}\alpha$  从 4h 开始分泌, 持续到 24h, 从本实验结果中可见, 蛋白水平变化的峰值出现在照射后 12~72h, Keisuke<sup>[4]</sup> 用  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线, 以 0.35Gy/min 的剂量率体外照射腹腔巨噬细胞, 照射剂量为 1.0Gy, 用 L929 细胞生物分析法测定  $\text{TNF}\alpha$  表达量, 结果照射后 6h 可检测到  $\text{TNF}\alpha$  的表达, 而且照射与 LPS 并用  $\text{TNF}\alpha$  表达量显著高于单独刺激。这一实验证实鼠腹腔巨噬细胞在电离辐射作用后  $\text{TNF}\alpha$  表达增加, LPS 可诱导巨噬细胞  $\text{TNF}\alpha$  的表达, 辐射也可以通过相似的途径激活  $\text{TNF}\alpha$  的表达。

IL-2, CSF, IFN- $\gamma$ , NO 的联合或单独作用均可刺激  $\text{TNF}\alpha$  mRNA 的转录及蛋白的分泌。另外,  $\text{TNF}$  的表达又受  $\text{PGE}_2$ 、cAMP 等反馈调节, 所以当产生过量的  $\text{TNF}$  后, 负反馈作用也会使表达回降到一定限度。李卓娅<sup>[5]</sup> 等报道, 细胞微管聚合抑制剂秋水仙碱(colchicine,col)可抑制细菌脂多糖(LPS)刺激大鼠腹腔巨噬细胞表达  $\text{TNF}\alpha$ 。Ding 等<sup>[6]</sup> 报道  $\text{Co1}$  对花生四烯酸代谢产物  $\text{PGE}_2$ 、 $\text{LTB}_4$  及  $\text{LTC}_4$  的产生有影响。李卓娅等<sup>[7]</sup> 的实验进一步证实,  $\text{Co1}$

对 TNF $\alpha$  的抑制作用是由 PGE<sub>2</sub> 而起作用的, 并且微管功能与 TNF $\alpha$  合成有密切关系。谢凤等 [8] 报道 X 射线全身照射后 24h 时胸腺细胞 cAMP 和 cGMP 含量的变化为, 大剂量照射时 (尤其 4.0Gy), cAMP 含量较对照组明显增加 ( $p < 0.001$ ), cGMP 含量较假照组明显降低, cAMP/cGMP 比值是对照组的 9.25 倍。是否大剂量电离辐射作用对巨噬细胞 cAMP、cGMP 的影响也会有相同的效应, 由此而使 TNF mRNA 转录受抑制, 尚无资料报道。这也许是高剂量辐射作用后巨噬细胞分泌 TNF 减少的一种可能机制, 还有待于探讨。另外, 高剂量辐射是否可直接损伤微管功能而影响 TNF 的表达也有待于研究。Spengler 等 [9] 报道 PGE<sub>2</sub> 可抑制 TNF $\alpha$  基因表达, 它是 TNF $\alpha$  负性反馈的重要调节因子之一。

### 参 考 文 献

- 1 Liu S Z. Chin J Radiat Med Prot (in Chinese), 1995, 15:217-219
- 2 Sun Y M, Liu S Z. Radiat Prot (in Chinese), 1998, 18:119-125
- 3 Yang G Z. Outline and Technique of Immunological Biology Engineer (in Chinese), Jilin:Publishing House of Science and Technique, 1991, 190-191
- 4 Keisukes, Iwamoto, William H. Radiat Res, 1994, 139:103-108
- 5 Li Z Y, Gemsa D, Feng X W. Chin J Immunol (in Chinese), 1995, 11:70-74
- 6 Ding A H, Porten F, Sanchez E. Science, 1990, 248:370-378
- 7 Li Z Y, Gemsa D, Feng X W. Immunol J (in Chinese), 1995, 11:215-221
- 8 Liu S Z. Human and Ecological Risk Assessment, 1998, 4:1217-1254
- 9 Spengler R N, Spengler M L, Lincoln P. Infect Immun, 1989, 57:2837-2841

## CHANGES IN TUMOR NECROSIS FACTOR $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) EXPRESSION IN MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES AFTER WHOLE BODY X-RAY IRRADIATION

SUN Yimin LIU Shuzheng

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

**ABSTRACT** The TNF-mediated L929 cell toxicity bioassay was used to examine the expression of TNF $\alpha$  in mouse peritoneal macrophages following whole body irradiation (WBI). The expression of TNF $\alpha$  gradually increased after WBI with 0.075Gy, reaching its peak at 12h. The TNF $\alpha$  expression of TNF $\alpha$  gradually increased from 3 to 120h after WBI with 2Gy. The expression of TNF $\alpha$  was significantly increased at 24h after WBI with 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0Gy. The expression of TNF $\alpha$  increased most markedly in the group irradiated with 0.5Gy.

**KEYWORDS** X-ray irradiation, Peritoneal macrophages, Tumor necrosis factor  $\alpha$

**CLC** R146, R811, R979.6

Supported by the Natural Science Foundation of China (39570188)