

大鼠全脑照射后早期海马组织内炎性细胞因子的变化特点

余德 田野 丁维军 朱雅群 刘春风

(苏州大学附属第二医院 苏州 215004)

摘要 探讨大脑受辐射后炎性细胞因子在脑组织内的变化特征。对被单次全脑 2、15、30Gy 照射后 1h 至 1w 的 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠, 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 和核糖核酸 (RNA) 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分别检测大脑海马组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量和其基因转录产物水平。结果表明, 15Gy 和 30Gy 照射后 12h 内, 海马中 IL-1 β 、TNF- α 含量与 mRNA 相对量有显著升高; IL-6 含量虽无明显变化, 但其 mRNA 亦有明显升高, 这些改变在照射后 1d 时可恢复至正常水平。受较高剂量全脑辐照后, 1d 内脑内主要炎性细胞因子的表达量有迅速地增加。

关键词 大脑, 电离辐射, 炎性细胞因子, 海马, 大鼠

中图分类号 R818.74

已经发现, 炎性细胞因子在一些常见中枢神经系统 (CNS) 疾病的发生、发展与转归的过程中起着重要的作用^[1-3]。近年来, 在对大脑的放射性反应/损伤研究时也观察到这些因子的异常变化, 但这些改变的特点与原因、以及所起的作用等问题尚不十分清楚^[4,5]。本实验通过对大鼠脑不同剂量照射后 1 周内海马组织中白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量和 mRNA 的检测, 了解炎性细胞因子在大脑受电离辐射后急性期的变化特征, 以期为其发病机理研究提供了新的资料与思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

将健康成年、体重为 180—220g 的 (Sprague-Dawley, SD) 大鼠 (由苏州大学实验动物科提供) 随机分为正常对照 (未作任何处理)、麻醉对照 (麻醉后置于照射野内但用铅屏蔽) 和单次 2、15、30Gy 剂量全脑照射后 1、6、12h, 1、2d, 1w 的 20 个组别, 每组有 3—5 只大鼠。经 3.6% 的水合氯醛按 1mL/100g 体重腹腔麻醉后, 用 Philips SL-18 型电子直线加速器产生的 4MeV 电子线进行全脑照射, 照射技术与剂量测定见文献^[6]。在规定的时间内对大鼠用约 250mL 的肝素化生理盐水经升主动脉作全身灌注, 断头完整取脑后, 在无核糖核酸 (RNA) 酶的环境下钝性分离

双侧海马组织并置于 Ep 管在液氮中保存。

1.2 酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定细胞因子含量

将各大鼠大脑一侧的海马组织研磨成匀浆、离心后取上清液, 用 ELISA 测定其中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量。所用试剂盒为美国 Endogen 公司产品 (产品编号分别为 ER2-IL1B、ER2-IL6 和 ER-TNFA), 测定步骤依据产品说明书完成, 其中酶标仪为奥地利 Anthos 公司 2010 型, 细胞因子含量以 pg/L 为单位。

1.3 RNA 逆转录聚合酶链反应 (Reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测细胞因子的 mRNA

RT-PCR 被用于另一侧海马中三种细胞因子 mRNA 的半定量检测 (主要试剂均购自上海生物工程公司)。用 TRIzol 试剂盒提取组织中总 RNA, RNA 的含量经紫外分光光度计测定其吸光值在 OD260/OD280 的比值在 1.7—2.0 之间。用 2 μ g RNA 以 0.5 μ g Oligo (dT) 18 为引物进行反转录合成 cDNA, 70 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后, 再加入逆转录酶 MoMLV 200 μ 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 45min, 然后 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L cDNA 用于扩增, 以 β -Actin 为内参照, 各种细胞因子的引物序列 (根据 Genebank 资料设计, 由上海生物工程公司合成) 和 PCR 反应条件见表 1。

国家自然科学基金 (30170287) 资助

第一作者: 余德, 男, 1972 年 7 月出生, 2003 年在苏州大学获硕士学位, 现为福建省厦门市中山医院放疗科主治医师
通讯联系人: 田野

收稿日期: 初稿 2004-04-19, 修回 2004-06-28

将扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶平板上电泳, 用数字扫描影像分析仪测定各条带的灰度值, 各细胞因子

条带灰度值与 β -Actin 带灰度值的比值用于代表样本中该细胞因子 mRNA 的相对含量。

Table 1 Primers and condition of RT-PCR reactions

	Primers sequence	Length	The condition of reactions
IL-1 β	5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG 3'-TGCTGATGTACCAGTTGGGG	510bp	94°C 45s\54°C 45s\72°C 60s, 35 cycles
IL-6	5'-TAGAGTCACAGAAGGAGTG 3'-GCCAGTTCTTCGTAGAGAAC	210bp	94°C 30s\55°C 30s\72°C 60s, 28 cycles
TNF- α	5'-GTGATCGGTCCCAACAAGG 3'-CCTCCCAGGTACATGGGCTC	438bp	94°C 30s\60°C 30s\72°C 60s, 33 cycles
β -Actin	5'-CTGGAGAAGAGCTATGAGC 3'-AGGATAGAGCCACCAATCC	332bp	94°C 30s\55°C 30s\72°C 60s, 28 cycles

1.4 数据的处理

上述每组 ELISA 和 RT-PCR 实验所得到的 3 个数据被用来计算各组细胞因子及其 mRNA 的水平, 各组数据用算术均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 t 检验, 将不同剂量后不同检测时间的 18 个组别分别与正常对照组和麻醉对照组作组间差别的比较, 分析全脑照射、腹腔麻醉等处理对细胞因子含量和该因子 mRNA 表达量的影响程度。

2 结果

2.1 细胞因子的含量

ELISA 检测显示, 正常对照组的大鼠大脑海马

组织内 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的平均含量分别为 311、231 和 228 pg/L, 各组别三种细胞因子含量及其差别比较的结果见表 2。麻醉对照组的数据与正常组无差别, IL-6 的含量在所有组中没有明显差别, 2Gy 照射的 6 个组别与正常组和麻醉组比较亦无明显变化。而 IL-1 β 和 TNF- α 的含量则表现出相似的变化特征, 在受到 15Gy 全脑照射后 6h 和 30Gy 照射后 6h 与 12h 的情况下, SD 大鼠海马中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量显著升高 ($p \leq 0.05$), 尤其是在 30Gy6h 组两者的值分别达 436 和 341 pg/L ($p \leq 0.01$)。但在受照射后 1d 时, 除 IL-1 β 仍较高外, IL-6 和 TNF- α 量已恢复至正常水平。

Table 2 ELISA analysis of inflammatory cytokines levels ($\bar{x} \pm s$, pg/L) in the hippocampus following whole-brain irradiation in rats

Sample groups		IL-1 β	IL-6	TNF- α
Dose/Gy	Sampling time after irradiation			
2	1h	315 $\pm$ 51	240 $\pm$ 26	236 $\pm$ 29
2	6h	331 $\pm$ 47	247 $\pm$ 31	272 $\pm$ 31
2	12h	312 $\pm$ 38	236 $\pm$ 33	215 $\pm$ 36
2	1d	306 $\pm$ 45	250 $\pm$ 41	225 $\pm$ 42
2	2d	291 $\pm$ 52	225 $\pm$ 37	205 $\pm$ 20
2	1w	285 $\pm$ 43	232 $\pm$ 29	218 $\pm$ 23
15	1h	335 $\pm$ 37	256 $\pm$ 28	210 $\pm$ 33
15	6h	374 $\pm$ 47 ⁽¹⁾	232 $\pm$ 34	267 $\pm$ 41 ⁽¹⁾
15	12h	322 $\pm$ 47	246 $\pm$ 40	208 $\pm$ 37
15	1d	310 $\pm$ 59	239 $\pm$ 38	238 $\pm$ 37
15r	2d	297 $\pm$ 62	252 $\pm$ 27	211 $\pm$ 36
15	1w	315 $\pm$ 43	244 $\pm$ 22	221 $\pm$ 29
30r	1w	311 $\pm$ 29	233 $\pm$ 35	243 $\pm$ 31
30	6h	436 $\pm$ 72 ⁽²⁾	237 $\pm$ 41	341 $\pm$ 38 ⁽²⁾
30	12h	382 $\pm$ 46 ⁽¹⁾	235 $\pm$ 27	291 $\pm$ 37 ⁽¹⁾
30	1d	366 $\pm$ 57 ⁽¹⁾	242 $\pm$ 32	229 $\pm$ 28
30r	2d	335 $\pm$ 51	229 $\pm$ 36	221 $\pm$ 45
30	1w	327 $\pm$ 45	242 $\pm$ 41	203 $\pm$ 38
Normal control		311 $\pm$ 39	231 $\pm$ 38	228 $\pm$ 36
Anaesthetized control		309 $\pm$ 36	224 $\pm$ 43	230 $\pm$ 30

⁽¹⁾ $p \leq 0.05$, ⁽²⁾ $p \leq 0.01$

2.2 细胞因子 mRNA 的相对含量

IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 基因转录产物 mRNA 的 RT-PCR 电泳, 结果分别见图 1、图 2 和图 3 所示。图中可见这三种细胞因子基因转录产物在受不同剂量照射后, 不同时间的组别中表达的量也有较明显的不同, 其相对含量的结果见表3。其中, 麻醉对照组、2Gy 照射各组与正常对照组仍无差别, 说明麻醉处理与低剂量照射对本实验结果无明显影响。三种细胞因子基因转录水平在 15Gy 和 30Gy 两组表现出较为一致的变化趋势, 其 mRNA 的含量在受照射后迅速出现显著的升高 ($p \leq 0.05$ 或 ≤ 0.01), 其中 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的升高发生在受照射后的 1h 和 6h; 而 IL-6 的升高稍晚, 发生在受照射后 6h 和 12h。IL-1 β 和 TNF- α mRNA 的增幅最高为 3 倍和 10 倍, IL-6 mRNA 为 2 倍, 但它们均在受照射后 24h 时恢复至正常状态。

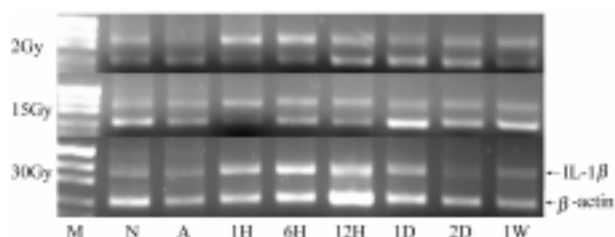


Fig.1 Original RT-PCR findings of IL-1 β mRNA (M: DNAMarker, N: Normal control group, A: Anaesthetized control group, H: Hour, D: Day, W: Week)

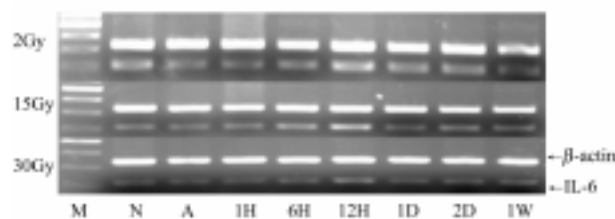


Fig.2 Original RT-PCR findings of IL-6 mRNA (M: DNA marker, N: Normal control group, A: Anaesthetized control group, H: Hour, D: day, W: week)

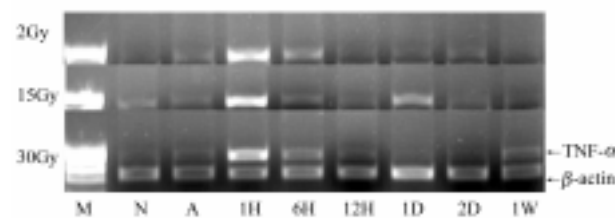


Fig.3 Original RT-PCR findings of TNF- α mRNA (M: DNA marker, N: Normal control group, A: Anaesthetized control group, H: Hour, D: day, W: week)

Table 3 Semiquantitative RT-PCR analysis of inflammatory cytokines mRNA relative levels (The ratio of cytokine/ β -Actin, $\bar{x} \pm s$) in the hippocampus following whole-brain irradiation in rats

Sample groups		IL-1 β	IL-6	TNF- α
Dose/Gy	Sampling time			
2	1h	1.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2
2	6h	1.6 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1
2	12h	1.4 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1
2	1d	0.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.0
2	2d	1.5 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1
2	1w	1.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.0
15	1h	2.4 $\pm$ 0.7 ⁽¹⁾	0.6 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.1 ⁽¹⁾
15	6h	2.7 $\pm$ 0.2 ⁽¹⁾	1.6 $\pm$ 0.1 ⁽¹⁾	0.3 $\pm$ 0.2
15	12h	1.4 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2 ⁽¹⁾	0.1 $\pm$ 0.0
15	1d	0.8 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.0
15	2d	1.8 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
15	1w	0.9 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.0
30	1h	2.6 $\pm$ 0.1 ⁽¹⁾	0.7 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2 ⁽²⁾
30	6h	3.5 $\pm$ 0.1 ⁽²⁾	1.1 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1 ⁽¹⁾
30	12h	1.0 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.3 ⁽¹⁾	0.1 $\pm$ 0.0
30	1d	1.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.0
30	2d	1.4 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.0
30	1w	1.3 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.1 $\pm$ 0.1
Normal control		1.1 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1
Anaesthetized control		1.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1

⁽¹⁾ $p \leq 0.05$, ⁽²⁾ $p \leq 0.01$

3 讨论

细胞因子是一系列的, 由多种细胞分泌的小分子多肽的统称, 它们具有调节免疫-神经-内分泌系统、参与炎症和应答各类损伤以及调控造血等十分复杂的功能, 其中白细胞介素、集落刺激因子和肿瘤坏死因子等在炎症反应起着重要的作用, 常将它们称为炎性细胞因子^[3]。炎性细胞因子除了由外周免疫器官分泌、经血脑屏障进入中枢神经系统 (CNS) 外, 脑内神经元和胶质细胞自身也可以产生, 它们彼此之间相互联系、构成网络, 通过靶细胞上的受体产生各种各样的效应^[1,3]。在多数常见大脑疾病 (脑缺血/再灌注、多发性硬化、退行性变和创伤等) 发病机理的实验研究中已经观察到, 它们参加脑水肿的形成、调节神经胶质细胞的反应、诱导和促进炎症级联反应; 它们参与了 CNS 损伤与修复的全过程, 既有直接毒性和扩大损伤范围的作用, 又有限制炎症/免疫反应、促进细胞生长等有利的一面; 因此, 通过炎性细胞因子途径可以干预这些疾病的发生与发展, 并可以设计新的诊治方案^[1-3]。

相对而言,关于大脑放射性反应/损伤的研究还是较少,只有美国加州大学洛杉矶分校的 McBride WH 工作组进行了较系统的研究^[4,5]。他们近年来先后报告了小鼠中脑或全身在受到大于 7Gy 照射后,脑组织内 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的水平快速增加,4—8h 时达到高峰,1d 后消退;在照射后 2—3 个月时再次升高,6 月时仍高于正常;他们通过 TNF 受体基因剔除小鼠(缺乏 TNFRp75)的实验证明了 TNF 信号途径在放射性脑损伤发生中的重要作用^[5,7,8]。Kyrkanides 等^[9]的实验表明:大鼠大脑受照射后数小时内就可以发生细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)和粘附分子的高表达,通过胶质细胞的参与可导致了脑内急性炎症反应的发生,而这些反应与继发的血脑屏障通透性改变和白质坏死有明显的相关性。Kim 等^[10]在对 SD 大鼠进行 10Gy 半脑照射后的 1 至 8 周里发现:大鼠前脑组织中的 TNF- α 和 TGF- β 1 的含量明显增加。因此,Tofilon 和 Belka^[4,5]在他们各自的文献综述中都指出:在 CNS 放射性损伤的进程中,除了已知的血管系统和神经胶质细胞系统的损害以外,还有炎症细胞因子和神经干细胞的异常变化值得注意。

本实验对被单次全脑照射后 1 周内的 SD 大鼠,用 ELISA 和 RT-PCR 方法在蛋白质和 mRNA 两个水平对三种主要炎症细胞因子进行了检测。虽然在 RT-PCR 测定细胞因子 mRNA 含量的准确性,以及 15Gy 组别中细胞因子在蛋白质和 mRNA 水平的变化不完全成平行关系等方面有待于进一步观察。但其结果表明在大鼠全脑受到大于 15Gy 照射后,具有神经损伤作用的炎症细胞因子 TNF- α 与 IL-1 β 的表达在 24h 内呈现出“快上快下”的特点,它与

近期国外的相关报告的结果基本相似。结合在同样实验条件下所发现的神经胶质细胞放射反应性的变化特征^[6,11],我们认为细胞因子、胶质细胞和神经免疫系统在放射性脑损伤发病机理中可能发挥了非常重要的作用,该课题值得深入研究。

参考文献

- 1 Stoll G, Jander S, Schroeter M. *J Neural Transm*, 2000, **59**(Suppl): 81-89
- 2 Marshall L F. *Neurosurg*, 2000, **47**(1): 189-198
- 3 Szelenyi J. *Brain Res Bull*, 2001, **4**(4): 329-338
- 4 Tofilon P J, Fike J R. *Radiat Res*, 2000, **153**(3): 357-370
- 5 Belka C, Budach W, Kortmann R D, *et al.* *Brit J Cancer*, 2001, **85**(9): 1233-1239
- 6 田野,包仕尧,殷蔚伯. *中华放射肿瘤学杂志*, 1999, **8**(1): 43-46
TIAN Ye, BAO Shiyao, YIN Weibo. *Chin J Radiat Oncol*, 1999, **8**(1): 43-46
- 7 Hong J H, Chiang C S, Campbell I L, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1995, **33**(3): 619-626
- 8 Daigle J L, Hong J H, Chiang C S, *et al.* *Cancer Res*, 2001, **61**(15): 8859-8865
- 9 Kyrkanides S, Olschowka J A, Williams J P, *et al.* *J Neuroimmunol*, 1999, **95**(2): 95-106
- 10 Kim S, Lim D, Chung Y, *et al.* *J Korean Med Sci*, 2002, **17**(2): 242-248
- 11 田野,包仕尧,刘春风,等. *中华放射肿瘤学杂志*, 2001, **10**(4): 255-257
TIAN Ye, BAO Shiyao, LIU Chunfeng, *et al.* *Chin J Radiat Oncol*, 2001, **10**(4): 255-257

The expression changes of inflammatory cytokines in the hippocampus following whole-brain irradiation in rats

YU De TIAN Ye DING Weijun ZHU Yaqun LIU Chunfeng

(Second Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou 215004)

ABSTRACT To investigate the change pattern of some inflammatory cytokines in brain tissue at the acute phase after brain irradiated. The whole brain of SD rats was irradiated by the single dose of 2, 15, or 30Gy of 4 MeV electron beam. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the measurement of IL-1 β , IL-6, and TNF- α content in hippocampus tissue of rats at 1h, 6h, 12h, 1d, 2 and 1week post-irradiation. The mRNA of IL-1 β , IL-6, and TNF- α were detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the same experimental groups. It was analyzed about the influence of dosage and post-irradiation duration with the cytokines expression. Compared with both the normal control and the anaesthetized with chloral hydrate but sham-irradiation groups, there were no difference about the three inflammatory cytokines expression in rats with 2Gy irradiated. At 6h after irradiation with 15Gy, 6 and 12h with 30Gy groups, the content of IL-1 β and TNF- α in hippocampus tissue were sig-

nificantly increased, and were returned to normal level after 12 to 24h. The same change tendency of their mRNA relational level was observed in 15 and 30Gy groups, but it happened earlier in 1h after exposure. Although the content of IL-6 in hippocampus kept stable in all the groups, its mRNA level raised obviously in 12h group. After 15—30Gy whole-brain irradiation, the expression of some inflammatory cytokines increased abruptly in the hippocampus of SD rat within 1 day, but the interplay between inflammatory cytokines changes and the pathogenesis of radiation injury was incompletely understood at present.

KEYWORDS Brain, Radiation, Inflammatory cytokines, Hippocampus, Rat

CLC R818.74

•会议报道• 第六届辐射研究与辐射工艺学术年会在西安召开

孙汉文

(中国科学院上海应用物理研究所)

第六届辐射研究与辐射工艺学术年会,于2004年10月22—26日在西安举行。年会由辐射研究与辐射工艺学会主办,第四军医大学协办。中国核学会、中国科学院上海应用物理研究所和第四军医大学校领导到会或致电祝贺。日本和印度辐射化学学会派代表参加本届年会。与会代表140余位,会议论文120多篇,代表人数、论文数、及其国际交流特色均为历届年会之最。青年学者成为本届会议学术交流的主力军,显示了我国本领域研究的兴旺发达。

本届年会的学术交流以大会报告与分会报告形式进行,内容涵盖辐射物理与辐射化学,辐射改性高分子材料,辐射医学与辐射生物学,放射医学,以及环境保护、纳米材料、辐照工艺与剂量、辐照装置与设备等研究领域。复旦大学放射医学所、中国科技大学、长春应用化学所、上海应用物理所、浙江大学农学院、第四军医大学、印度巴巴拉原子研究中心和日本东京大学、早稻田大学、北海道大学等的代表在大会报告中介绍了各相关领域的代表性研究工作。一批年轻学者在分会交流中报告了辐射医学与辐射生物学、高分子材料辐射改性、辐射加工技术等领域的研究成果。《辐射研究与辐射工艺学报》将刊出会议详细摘要论文集。

会议期间,中国、日本、印度的辐射研究学会签署了合作举办亚太地区辐射化学研讨会的协议书。研讨会学科领域包括辐射化学、辐射工艺及相关学科交叉领域,将在中、日、印轮流召开,主办国辐射研究学会负责研讨会筹备事宜,研讨会组织委员会由中、日、印和其他国家的辐射研究学者组成。第一届亚太地区辐射化学研讨会将于2006年在上海召开

会议期间还举行了第六届学会委员会会议,本届学会委员会由来自40家成员单位的55名委员组成,其中新委员占69%。本届学会委员会新增南方医科大学等11家成员单位,5家原成员单位因研究方向改变而不再参加本学会。与会委员推选林念芸、孙家珍、毛秉智、魏根栓为学会委员会顾问,推选盛康龙为主任委员,姚思德为常务副主任委员兼秘书长,张志成、金一尊、杨晓明、翟茂林为副主任委员,并推选了23位常务委员。会议高度肯定了第五届学会委员会的工作,也对下一届学会工作提出了宝贵建议。

本届学术年会有利于促进我国和亚太地区辐射研究界的学术交流,并推动我国和亚太地区的辐射研究和辐射加工技术的进一步发展。