

# 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照小鼠头部对 脾脏细胞周期分布的影响

邴涛<sup>1</sup> 党秉荣<sup>1</sup> 谢漪<sup>1</sup> 邱荣<sup>1</sup> 李文建<sup>1</sup> 郭红云<sup>2</sup> 李雪萍<sup>2</sup>  
高清祥<sup>3</sup> 郝冀方<sup>1</sup> 王菊芳<sup>1</sup> 张红<sup>1</sup>

<sup>1</sup> (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

<sup>2</sup> (甘肃省医学科学院 兰州 730050)

<sup>3</sup> (兰州大学生命科学院 兰州 730000)

**摘要** 研究重离子辐照小鼠头部对脾脏细胞周期分布的影响,为重离子放射治疗癌症和太空防护提供基础数据。80 MeV/u 能量的  $^{12}\text{C}^{6+}$  对 BALB/c 小鼠头部给以 0、0.5、1、2、4、10 Gy 的照射,用流式细胞仪测脾脏细胞周期分布。重离子辐照后 36 h,小鼠脾脏细胞 S 期细胞随着辐照剂量的增加显著减少 ( $p < 0.05$ ); 0.5 Gy 组、4 Gy 组和 10 Gy 组出现  $G_1/G_0$  期阻滞明显阻滞 ( $p < 0.05$ ), 1 Gy 组和 2 Gy 组无显著变化 ( $p > 0.05$ ); 0.5 Gy 组  $G_2/M$  期细胞显著减少 ( $p < 0.01$ ), 其它剂量组明显阻滞 ( $p < 0.05$ )。重离子辐照小鼠头部对小鼠脾脏细胞周期分布有明显影响。

**关键词** 神经内分泌系统,重离子辐照,脾脏,细胞周期分布

中图分类号 Q691, R392, R339.57

传统的观念认为神经内分泌系统和免疫系统是两个独立作用的系统,然而现代医学认为,动物和人体内存在免疫—神经—内分泌网络 (Immuno-neuro-endocrine Network, I-N-EN), 这一网络各组成部分之间相互作用,共同维持机体的正常生理功能和内环境的稳定<sup>[1]</sup>。关于重离子辐照小鼠头部对中枢神经系统引起损伤,所导致免疫系统的变化报道鲜见。本工作利用  $^{12}\text{C}^{6+}$  对小鼠头部给以不同剂量的辐照,研究小鼠脾脏细胞周期的变化,以探讨重离子局部放疗时,对免疫系统的影响,为重离子治疗癌症及太空防护提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与分组

BALB/c 小白鼠,雌雄各半,体重 (20±2)g,甘肃省医学科学院实验动物中心提供,随机分成 6 组,每组四只,雌雄各半,常规饲养,饮水、食物不限。

### 1.2 主要试剂和仪器

淋巴细胞分离液 (上海恒信化学试剂有限公司),碘化丙啶 (Bio Basic Inc, Canada),核糖核酸酶 (Ribonuclease, RNAase), (AMRESCO, USA), Triton X-100 (AMRESCO, USA), 流式细胞仪 (Becton/Dickinson 公司, USA)。

### 1.3 辐照条件

$^{12}\text{C}^{6+}$  由中国科学院近代物理研究所的兰州重离子研究装置 (Heavy ions research facility at Lanzhou, HIRFL) 产生,引出能量为 81MeV/u,经过降能后  $^{12}\text{C}^{6+}$  的能量是 80MeV/u (水中射程为 17.1 mm)。将小鼠装入特制的盒子中固定,对小鼠头部分别给以 0、0.5、1、2、4、10Gy 的辐照,剂量率为 1 Gy/min。

### 1.4 脾指数和脾脏细胞的制备

小鼠辐照后,正常喂养 36 h,脱颈处死,取出脾脏,称重。由脾脏指数=脾脏重量 (mg)/小鼠重

“西部之光”资助项目 (XB040602) 国家自然科学基金重点项目 (10335050) 近代物理研究所所长基金 (SZ050624) “甘肃省青年科学基金 (3ES041-A25-025)” 资助

第一作者:邴涛,男,1982年3月出生,2004年于山东大学获理学学士学位,现为中国科学院近代物理研究所 2004 级在读硕士生,生物物理专业,从事生物物理学、免疫学相关的研究

收稿日期:初稿 2005-07-05,修回 2005-09-07

量(g)计算脾脏指数。将脾脏剪碎,200目尼龙网过滤,用磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)冲洗,制备单细胞悬液,然后从底部加入2 mL 淋巴分离液,经3000 r/min离心15 min,吸出淋巴细胞层移入含5 mL PBS液的试管中,离心2000 r/min,时间为10 min,这样重复洗涤细胞2次后,收集脾脏细胞于70%冷酒精中固定,-20℃冷冻,至少18 h。

### 1.5 流式细胞仪检测脾脏细胞周期

将酒精固定的脾细胞用PBS洗涤2次,弃上清。加入0.5 mL 染色溶液(100 μg/mL RNA酶、50 μg/mL 碘化丙啶和0.1% (v/v) Titon X-100)混匀<sup>[2,3]</sup>,4℃避光30 min。用Becton / Dickinson公司FACSClibur流式细胞仪检测,Cellquest软件采集,ModFit LT软件分析,每个样本采集 $1 \times 10^4$ 个细胞。

### 1.6 统计分析

实验结果用平均值±标准差表示,用社会学统计程序包(Statistics package for social science,SPSS12)进行统计学处理。

## 2 结果

脾脏是重要的免疫器官,在机体免疫防御中发挥着重要的作用。从图1中可以看出,重离子辐照后,脾脏指数变小,但无统计学意义。

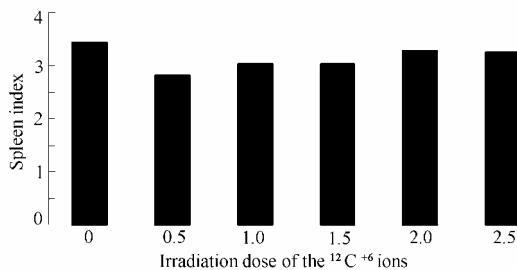


Fig.1 Spleen index of mice 36 h after irradiations of different doses by  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions

表1为小鼠在头部辐照36 h后,脾细胞周期分布的变化结果。从表1中可以看出,0.5 Gy组 $G_1/G_0$ 期细胞显著增多( $p < 0.01$ ),出现 $G_1/G_0$ 期阻滞,S期与 $G_2/M$ 期细胞显著减少( $p < 0.01$ );1 Gy和2 Gy组 $G_1/G_0$ 期无显著变化,S期细胞显著减少( $p < 0.01$ ), $G_2/M$ 期细胞开始出现阻滞,2 Gy组显著( $p < 0.01$ );4 Gy组 $G_1/G_0$ 期细胞开始出现阻滞( $p < 0.05$ ),S期细胞显著减少( $p < 0.01$ ), $G_2/M$ 期细胞阻滞显著( $p < 0.01$ );10 Gy组 $G_1/G_0$ 期细胞

显著期阻滞( $p < 0.01$ ),S期细胞显著减少( $p < 0.01$ ), $G_2/M$ 期细胞阻滞亦显著( $p < 0.05$ )。经分析S期与剂量存在负相关性( $p < 0.05$ ),即随着剂量的增加,S期的细胞逐渐减少。

Table 1 Changes of cell cycle distribution of mouse spleen 36 h after different doses of irradiation with  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

Group/Gy	$G_1/G_0$	S	$G_2/M$
Control	80.83±0.89	13.63±1.83	5.54±0.99
0.5	91.31±1.77 <sup>(2)</sup>	3.98±0.51 <sup>(2)</sup>	4.7±1.94 <sup>(2)</sup>
1	83.87±5.15	5.38±1.79 <sup>(2)</sup>	10.75±3.97 <sup>(1)</sup>
2	79.48±4.28	3.57±3.06 <sup>(2)</sup>	16.93±2.1 <sup>(2)</sup>
4	84.69±2.44 <sup>(1)</sup>	5.83±3.63 <sup>(2)</sup>	9.48±1.32 <sup>(2)</sup>
10	89.77±1.3 <sup>(2)</sup>	3.02±1.2 <sup>(2)</sup>	7.12±0.8 <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> $p < 0.05$  vs Control, <sup>(2)</sup> $p < 0.01$  vs Control

## 3 讨论

中枢神经系统同免疫系统一起对生物体的内稳态、适应和对外界不利因素的防御发挥着重要的作用<sup>[4]</sup>。普遍认为,神经内分泌系统和免疫系统间存在一个双向反馈调节的网络<sup>[5]</sup>:兴奋性刺激传导至大脑时,通过神经递质将信息传导至下丘脑,引起下丘脑-垂体-肾上腺轴(Hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis, HPA轴)兴奋,分泌肾上腺激素而抑制免疫系统,同时也反馈性地抑制下丘脑和垂体。此外这种兴奋性的刺激还使脑干蓝斑兴奋,继之兴奋交感神经系统,分泌去甲肾上腺素而抑制免疫系统。另一方面,免疫系统分泌的IL-1和IL-6也可兴奋HPA轴、交感神经系统、下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamo-pituitary-gonad, HPG轴)、下丘脑-垂体-甲状腺轴(Hypothalamo-pituitary-thyroid gland, HPT轴)等。这种反馈调节系统在正常情况下则调节淋巴细胞的周期性变化以及自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)细胞的功能和细胞因子的分泌<sup>[6]</sup>。中枢神经系统,尤其下丘脑是调控免疫的中枢,下丘脑神经元活性可直接影响免疫功能。前下丘脑损坏可导致有核脾脏细胞和胸腺细胞的减少,使有丝分裂原刀豆球蛋白A(ConA)的T细胞增殖反应下降和NK细胞活性的下降<sup>[7]</sup>。损坏下丘脑中部可导致T、B淋巴细胞数量减少<sup>[8]</sup>。

重离子辐照小鼠头部后,主要损伤中枢神经内分泌系统,下丘脑是电离辐射敏感性较高的脑

区<sup>[9,10]</sup>, 下丘脑—垂体系统神经内分泌系统发生复杂的变化<sup>[11]</sup>, 从而打破神经内分泌系统与免疫系统之间的双向反馈作用, 造成脾脏细胞的周期分布变化。这可能是辐照小鼠头部以后, 引起下丘脑—垂体系统增强<sup>[12]</sup>, 分泌肾上腺激素而抑制免疫系统, 从而抑制了脾脏的细胞分裂。从表1中可以看出, 在 0.5 Gy 辐照时, 可能对中枢神经系统的辐照敏感部位造成了损伤, 从而引起了辐照组显著  $G_1/G_0$  阻滞 ( $p < 0.01$ ), S 期与  $G_2/M$  期细胞显著减少 ( $p < 0.01$ )。辐照从 1 Gy 到 10 Gy, 随着辐照剂量的增大, 对中枢神经系统的各个器官都有损伤, S 期细胞都出现了显著阻滞 ( $p < 0.01$ ), 并且随着剂量的增加, S 期细胞减少, 即 S 期与剂量存在负相关性 ( $p < 0.05$ )。  $G_1/G_0$  期细胞从阻滞不显著 ( $p > 0.05$ ) 到显著 ( $p < 0.01$ )。这可能与辐照小鼠头部后对小鼠中枢神经内分泌系统损伤加重有关。另一方面, 辐射作为一种危险信号, 由机体的抗原呈递细胞 (Antigen present cells, APCs) 识别和接收, 进而激活 APCs, 为 T 细胞提供了第二信号, 引起 T 细胞和 (或) B 细胞的活化和增殖<sup>[13]</sup>, 最终产生一系列特异性的和非特异性免疫应答, 这种持久、过强的免疫应答进一步加重免疫器官的损伤。同时表明, 电离辐照对小鼠全身辐照所引起的免疫系统细胞周期分布的变化不仅仅与电离辐照的直接损伤有关<sup>[14]</sup>, 而且可能与中枢神经内分泌系统的间接影响有关。脾脏的功能与神经系统、内分泌系统及免疫系统功能均应有密切的联系<sup>[7]</sup>, 这样脾脏细胞周期被改变后, 反过来会影响神经系统、内分泌系统及免疫系统的功能。

当然对于小鼠头部受到辐照后, 神经内分泌系统发生哪些变化 (包括各种激素、神经肽), 通过何种途径引起脾脏细胞周期变化的, 中枢神经内分泌系统的哪些组织在发挥作用及它们之间是如何协调的, 以及脾脏细胞周期分布被改变后对中枢神经内分泌系统的影响, 这些问题还需要进一步的研究。这些问题的研究与解决可以为放疗中减少对免疫系统的损伤提供解决方法, 将对重离子治疗及太空辐射防护研究有重要的应用价值。

致谢 本次实验在兰州重离子加速器国家实验室完成, 向负责加速器的所有工作人员致以真挚的谢意; 同时感谢中国科学院近代物理研究所生物物理和生物医学研究室的各位老师和同学提供的帮助, 感谢甘肃省医学科学院毒理与药理研究室的李德杏、梁涛、高波、胡清荣和张永东等老师。

## 参考文献

- 1 朱长庚, 李正莉. 解剖学报, 1996, **27**(4): 339-344  
ZHU Changgeng, LI Zhengli. Acta Anat Sin, 1996, **27**(4): 339-344
- 2 Shankar B, Premachandran S, Bharambe S D, *et al.* Immunol Lett, 1999, **68**(2-3): 237-245
- 3 龚守良, 吕喆, 刘淑春, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(6): 413-415  
GONG Shouliang, LV Zhe, LIU Shuchun, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2003, **23**(6): 413-415
- 4 Mašek K, Slánský J, Petrovický P, *et al.* International Immunopharmacology, 2003, **3**(8): 1235-1246
- 5 刘艳, 林文娟. 心理学动态, 1997, **5**(4): 10-16  
LIU Yan, LIN Wenjuan. J Dev Psychol, 1997, **5**(4): 10-16
- 6 Wilder R. Annu Rev Immunol, 1995, **1** (13): 307-308
- 7 胡格, 穆祥, 段慧琴, 等. 动物医学进展, 2003, **24**(1): 5-7  
HU Ge, MU Xiang, DUAN Huiqin, *et al.* Prog Vet Med, 2003, **24**(1): 5-7
- 8 Katayama M, Kobayashi S, Kuramoto N, *et al.* Ann New York Acad Sci, 1987, **496**(1): 366-376
- 9 尉军, 冀致敏, 刘树铮. 辐射研究与辐射工艺学报, 1990, **8**(4): 235-239  
WEI Jun, JI Zhimin, LIU Shuzheng. J Radiat Res Radiat Process, 1990, **8**(4): 235-239
- 10 龚守良, 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1990, **10**(1): 28-31  
GONG Shouliang, LIU Shuzheng. Chin J Radiol Med Prot, 1990, **10**(1): 28-31
- 11 龚守良, 尉军, 徐桂珍, 等. 中国病理生理杂志, 1994, **10**(6): 603-606  
GONG Shouliang, WEI Jun, XU Guizhen, *et al.* Chin J Pathophysiol, 1994, **10**(6): 603-606
- 12 龚守良, 李修义, 尉军, 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1992, **10**(3): 152-155  
GONG Shouliang, LI Xiuyi, WEI Jun, *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1992, **10**(3): 152-155
- 13 吴明媛, 强亦忠, 张学光. 国外医学·放射医学核医学分册, 2004, **28**(6): 274-277  
WU Mingyuan, QIANG Yizhong, ZHANG Xueguang. Foreign Med Sci-Sec Radiat Med Nucl Med, 2004, **28**(6): 274-277
- 14 姚莉. 国外医学·放射医学核医学分册, 2004, **28**(1): 33-36  
YAO Li. Foreign Med Sci-Sec Radiat Med Nucl Med, 2004, **28**(6): 274-277

## Spleen cell cycle changes of mice irradiated at head by 80MeV/u $^{12}\text{C}^{6+}$ ions

BING Tao<sup>1</sup> DANG Bingrong<sup>1</sup> XIE Yi<sup>1</sup> QIU Rong<sup>1</sup> LI Wenjian<sup>1</sup> GUO Hongyun<sup>2</sup>  
LI Xueping<sup>2</sup> GAO Qingxiang<sup>3</sup> HAO Jifang<sup>1</sup> WANG Jufang<sup>1</sup> ZHANG Hong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

<sup>2</sup>(Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050)

<sup>3</sup>(Institute of Biological Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

**ABSTRACT** After whole head irradiation (WHI) of mice with  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions (80 MeV/u), changes of cycle distribution of spleen cells were studied, in an attempt to provide basic data for heavy ion radiotherapy and space radiation protection. The heads of the BALB/c mice were irradiated with 0, 0.5, 1, 2, 4 or 10 Gy by the  $^{12}\text{C}^{6+}$  ions. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Thirty-six hours after the irradiation, the S phase cells were reduced significantly ( $p<0.05$ ) with increasing doses. The 0.5 Gy, 4 Gy and 10 Gy WHI groups showed evident arrest in  $G_1/G_0$  phase ( $p<0.05$ ), but the 1 Gy and 2 Gy WHI groups had no significant arrest ( $p>0.05$ ).  $G_2/M$  phase of the 0.5 Gy WHI group was reduced markedly ( $p<0.01$ ), while the other groups showed obvious arrest ( $p<0.05$ ). After WHI of mice with the heavy ions, spleen cell cycle distribution of mice changed significantly.

**KEYWORDS** Neuro-endocrine System, Heavy ion irradiation, Spleen, Cell cycle distribution

**CLC** Q691, R392, R339.57