

交感神经阻断对受辐照小鼠 T 淋巴细胞的影响

施莉莉¹ 刘希琴¹ 张晓红¹ 朱锡旭² 丰俊东¹ 陈达¹

¹ (南京航空航天大学材料科学与技术学院 南京 210016)

² (南京军区南京总医院放疗科 南京 210002)

摘要 研究交感神经阻断对辐照小鼠的 T 细胞、T 细胞亚群的影响。小鼠受 0.5Gy、3Gy、6Gy 辐照后, 6-羟多巴胺阻断交感神经。阻断两周后小鼠眼眶处取血, 利用流式细胞仪检测小鼠外周血中 T 细胞、T 细胞亚群的数量以及它们活化细胞数量。交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数具有极为显著的降低作用。与正常对照组相比, 受辐照小鼠的 T、Th 和 Tc/Ts 细胞数量均随辐照剂量的增加而减少, 在相同辐照剂量下, 虽然阻断组的 T 细胞数量小于未阻断组, 但是 Th 和 Tc/Ts 细胞数量均明显大于未阻断组。与正常对照组相比, 受辐照小鼠的 CD3⁺CD25⁺、活化 Th 细胞和活化 Tc/Ts 细胞数量随辐照剂量的增大反而有所提高, 并且在相同的辐照剂量下阻断组的 CD3⁺CD25⁺、活化 Th 细胞和活化 Tc/Ts 细胞数量均明显大于非阻断组。表明交感神经阻断进一步增强了受辐照机体的免疫抑制作用。

关键词 交感神经阻断, 辐照, T 淋巴细胞

中图分类号 R811, R146

20 世纪 60 年代以来的研究结果证实, 淋巴器官中存在着丰富的肾上腺素能神经纤维, 并发现淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞上有 β 肾上腺素受体 (Adrenergic receptor, AR)^[1,2]。交感神经系统可通过改变其神经递质去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE) 和神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY) 的释放量, 影响淋巴细胞的功能和施加免疫调节作用^[3]。文献[4]~[6]研究表明, 交感神经的阻断影响机体的特异性免疫功能。临床上, 放射损伤和放射治疗常常引发神经系统的损伤。电离辐射本身具有免疫抑制作用, 淋巴细胞的增值与活化受到抑制^[7]。因此, 研究神经系统对受辐射机体免疫系统的影响在放射损伤和放射治疗中具有重要的理论和临床价值, 但迄今为止有关这方面的研究报道还很缺乏。

作为中枢淋巴器官, 胸腺是产生 T 淋巴细胞场所。6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 是一种公认的特异性交感神经化学阻断剂^[8,9], 本工作采用 6-OHDA 阻断外周交感神经传导, 研究交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数和外周血液中淋巴细胞的影响, 探讨交感神经阻断对受辐照小鼠免疫系统的作用。

1 实验材料和方法

1.1 动物

清洁级 ICR 雄性小鼠 76 只, 购买自南通大学实验动物中心, 动物许可证号为 SCXK (苏) 2003-0002, 健康, 体重为 20±2g。随机将小鼠分为 10 只/笼, 在标准养育条件下饲养两周, 使其适应环境。

1.2 主要试剂和仪器

使用 6-OHDA (sigma-LDARICH 公司), 维生素 C 注射液 (金陵药业股份有限公司, 南京金陵制药厂), 肝素 (河北常山制药厂), 抗体 (Hamster anti-MouseCD3-PeCY5, Rat anti-Mouse-CD4-FITC, Rat anti-MouseCD8-FITC, Rat anti-MouseCD25-PE, 同型对照 IgG1-FITC/IgG1-PeCY5/IgG1-PE, Invitrogen 公司); 溶血素 (Multisciences Biotech Assays); 流式细胞仪 (FCM, 美国 BD 公司)。

1.3 照射条件

采用 MEVATRON 型高能医用电子直线加速器治疗机 (德国西门子公司) 对小鼠进行全身照射。

第一作者: 施莉莉, 女, 1983 年 12 月出生, 2006 年毕业于南京航空航天大学机械工程及自动化系, 现为南京航空航天大学核技术及应用专业硕士研究生

通讯联系人: 刘希琴

收稿日期: 初稿 2008-03-17, 修回 2008-05-27

吸收剂量分别为 0.5Gy、3Gy 和 6Gy, 源皮距为 97.5cm, 剂量率为 250cGy/min。

1.4 小鼠分组

随机将小鼠分为空白对照组、VC 对照组、0.5Gy 非阻断神经组、0.5Gy 阻断神经组、3Gy 非阻断神经组、3Gy 阻断神经组。将 6-OHDA 溶于含 0.01% 抗坏血酸(维生素 C)的灭菌生理盐水中, 注射前配制。从辐照当天开始, 每天下午 3 点对小鼠阻断组腹腔注射交感神经化学阻断剂 6-羟基多巴胺(6-OHDA), 100mg/kg, 连续注射 7d。

1.5 外周血淋巴细胞的测定

(1) 组断后第 14 d, 小鼠眼眶采血, 肝素抗凝。每个标本分成 6 份, 每份为 100 μ L, 分别转移至流式试管中摇匀, 按实验计划分别加入相应的抗体摇匀, 同时按常规设置单阳性对照管和同型对照管。室温避光孵育 30min; (2) 加入 2mL 溶血素, 摇匀, 室温避光静置 5~10min。1500g 离心 5min 后, 弃上清, 将沉淀物用 PBS 重悬一次; (3) 加入磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS) 900 μ L, 采用流式细胞仪检测, 每份标本采集 1×10^4 细胞, 采用 CellQuest 软件分析实验数据。

1.6 胸腺指数的测定

摘取小鼠的胸腺, 用滤纸吸干残血后, 称重(mg)。胸腺指数=(胸腺重量(mg)/小鼠体重(g)) $\times 10$ 。

1.7 统计学处理

实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 各组均数采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数的影响

交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数的影响如表 1 所示。0.5Gy 照射后, 非阻断神经组和阻断神经组的小鼠的胸腺指数与正常组相比较分别减少 37.3%和 67.87%, 而 0.5Gy 阻断神经组的小鼠比 0.5Gy 非阻断神经的小鼠胸腺指数减少了 48.76%。3Gy 照射后非阻断神经和阻断神经的小鼠的胸腺指数与正常组相比较分别减少 19.19%和 57.25%, 3Gy 阻断神经的小鼠比 3Gy 非阻断神经的小鼠胸腺指数减少了 47.10%。可以看出, 交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数具有极为显著的降低作用。

Table 1 Effect of sympathectomy on the thymus index of irradiated mice *n*=10

Groups	Thymus index
Control	39.44 $\pm$ 3.10
VC	39.13 $\pm$ 2.92
0.5Gy	24.73 $\pm$ 3.10
0.5Gy + S	12.67 $\pm$ 2.96 ⁺⁺
3Gy	31.87 $\pm$ 3.40
3Gy + S	16.86 $\pm$ 2.73 ^{**}

Note: *p*<0.01, All irradiated groups, vs. Control; ⁺⁺*p*<0.05, vs. 0.5Gy group; ^{**}*p*<0.01, vs. 3Gy group; S=Sympathectomy

2.2 交感神经阻断对受辐照小鼠淋巴细胞的影响

表 2 为交感神经阻断对受辐照小鼠 T (CD3⁺) 细胞、CD3⁺ CD25⁺ 细胞的影响。与正常组相比, 受辐照小鼠 T 细胞数量随辐照剂量的增大而降低, 并且在相同辐照剂量下阻断组的 T 细胞数量下降更为明显。值得注意的是, 受辐照小鼠的 CD3⁺ CD25⁺ 细胞数量随剂量的增大反而有所提高, 并且在辐照剂量相同时阻断组的 CD3⁺ CD25⁺ 细胞数量明显大于非阻断组。

Table 2 Effect of sympathectomy on the number of T cells, CD3⁺CD25⁺ cells of irradiated mice *n*=10

Groups	T cell	CD3 ⁺ CD25 ⁺ cell
Control	28.92 $\pm$ 5.35	0.48 $\pm$ 0.09
VC	28.33 $\pm$ 5.72	0.58 $\pm$ 0.14
0.5Gy	20.06 $\pm$ 4.00 ^{**}	0.80 $\pm$ 0.11 [■]
0.5Gy + S	14.25 $\pm$ 4.24 [*]	1.13 $\pm$ 0.43 ^{▲▲}
3Gy	14.50 $\pm$ 5.88 ^{**}	0.91 $\pm$ 0.31 [■]
3Gy + S	11.46 $\pm$ 2.39 [▲]	1.28 $\pm$ 0.26 ^{▲▲▲}

Note: ^{**}*p*<0.01, vs. Control group; ^{*}*p*<0.05, vs. 0.5Gy group; [▲]*p*<0.05, vs. 3Gy group; [■]*p*<0.05, vs. Control group; ^{▲▲}*p*<0.05, vs. 0.5Gy group; ^{▲▲▲}*p*<0.05, vs. 3Gy group; S=Sympathectomy

表 3 为交感神经阻断对受辐照小鼠 Th (CD4⁺) 数量的影响。与正常组相比, 虽然受辐照小鼠 Th 细胞的数量随辐照剂量的增大而减少, 但是在相同辐照剂量下阻断组 Th 细胞数量却明显大于未阻断组。交感神经阻断对受辐照小鼠的活化 Th 细胞的影响规律与 CD3⁺ CD25⁺ 细胞完全一致。

Table 3 Effect of sympathectomy on the number of Th cells of irradiated mice $n=10$

Groups	Th cell	Activated Th cell
Control	1.77±4.89	0.29±0.07
VC	11.26±2.22	0.32±0.05
0.5Gy	7.96±2.36 [■]	0.42±0.13 [■]
0.5Gy + S	10.52±2.55 [*]	0.59±0.12 [*]
3Gy	6.64±2.26 [■]	0.48±0.11 [■]
3Gy + S	8.86±1.37 [▲]	0.62±0.16 ^{▲▲▲}

Note: [■] $p<0.01$, vs. Control group; ^{*} $p<0.05$, vs. 0.5Gy group; [▲] $p<0.05$, vs. 3Gy group; [■] $p<0.05$, vs. Control group; ^{▲▲▲} $p<0.01$, vs. 3Gy group; S=Sympathectomy

表 4 为交感神经阻断对受辐照小鼠 Tc/Ts ($CD8^+$) 数量的影响。与正常组相比,虽然受辐照小鼠 Tc/Ts 细胞的数量随辐照剂量的增大而减少,但是在相同辐照剂量下阻断组 Tc/Ts 细胞数量却明显大于未阻断组。交感神经阻断对受辐照小鼠的活化 Tc/Ts 细胞的影响规律与 $CD3^+CD25^+$ 和活化 Th 细胞相同。

Table 4 Effect of sympathectomy on the number of Tc/Ts cells of irradiated mice $n=10$

Groups	Tc / Ts cell	Activated Tc / Ts cell
Control	6.61±0.30	0.03±0.02
VC	6.76±0.28	0.03±0.01
0.5Gy	4.76±0.79 [■]	0.05±0.03 [■]
0.5Gy + S	5.88±0.88 [*]	0.08±0.02 [*]
3Gy	3.22±0.69 ^{■▲▲}	0.06±0.03 [■]
3Gy + S	4.52±0.89 [▲]	0.10±0.03 [▲]

Note: [■] $p<0.05$, vs. Control group; ^{*} $p<0.05$, vs. 0.5Gy group; ^{▲▲▲} $p<0.01$, vs. Control; [▲] $p<0.05$, vs. 3Gy group; S=Sympathectomy

3 讨论

实验中曾试图研究高辐照剂量(6Gy)对小鼠的反应,但在照后的2周内,阻断组与非阻断组所有的小鼠均全部死亡。给予VC的小鼠发育最好,皮毛光亮。辐照组与阻断组小鼠则发育不良,皮毛黯淡,体重减轻,阻断组尤甚。作为产生T淋巴细胞的中枢淋巴器官,胸腺对电离辐射极为敏感。交感神经的调节免疫应答功能是通过增加其递质NE的释放量而实现的。胸腺中NE主要来自交感神经

的囊泡^[10],胸腺细胞和胸腺上皮细胞表达AR^[11],说明胸腺中NE影响T细胞的发育。作为一种神经毒药物,6-羟基多巴胺阻断神经后,可选择性地作用于含有儿茶酚胺的神经元,破坏外周释放去甲肾上腺素的神经纤维,耗竭淋巴器官中90%以上的NE^[12]。对于阻断组来说,不仅辐照造成淋巴细胞凋亡,而且交感神经阻断后胸腺中NE的大幅度减少又导致T细胞发育受损,因此受辐照小鼠的胸腺体积急剧萎缩,交感神经阻断对受辐照小鼠胸腺指数具有极为显著的降低作用,交感神经对胸腺功能的恢复具有重要的调节作用。

T淋巴细胞亚群中发挥免疫调节作用的主要是辅助性T淋巴细胞(Th)和抑制性T淋巴细胞(Ts),Tc细胞是一群 $CD3^+CD4^+CD8^+$ T淋巴细胞,与Ts细胞的表面标志相同,在细胞免疫中特异性直接杀伤靶细胞。T淋巴细胞在幼稚阶段辐射敏感性最高,随着分化成熟敏感性降低。对各亚系的敏感性,尽管不同作者报道的结果不尽相同,但总结报道资料,Tc/Ts比Th略敏感些^[13]。小鼠受辐照后,T细胞总数、Tc/Ts、Th随照射剂量的增加而迅速下降,在0.5Gy辐照下Th比Tc/Ts下降明显,而在3Gy辐照下Tc/Ts比Th下降更为显著(见表3和表4)。1995年Sakaguchi等^[14]首次分离出了 $CD4^+CD25^+$ T细胞。研究发现,当 $CD4^+CD25^+$ T细胞与 $CD4^+CD25^-$ T细胞共同温育时,能抑制由CD3特异性抗体诱导的 $CD4^+CD25^-$ T细胞增殖反应;此外,研究还表明 $CD4^+CD25^+$ T细胞能抑制 $CD8^+$ T细胞的增殖和效应性因子的产生^[15]。同时,在人外周血中也存在少量 $CD8^+CD25^+$ 细胞亚群,该亚群有着与 $CD4^+CD25^+$ 亚群相类似的表型和功能^[16]。随着辐照剂量的增大,受辐照小鼠的活化Th和活化Tc/Ts细胞数量增加(见表3和表4),增强了对其他T细胞增殖的抑制作用,证实了辐照对免疫具有抑制作用。

交感神经阻断的效果与小鼠的种系、所实验的淋巴器官、小鼠的免疫状态有关,但都表现为T细胞数量减少^[17]。 β_2AR 是一种在体内广泛分布的G蛋白偶联型受体,是交感神经系统调控免疫系统的主要承担者。 β_2AR 与NE特异性结合,导致受体兴奋,从而调节免疫细胞的活性。在Th细胞中 β_2AR 主要表达于1型辅助性T细胞(T helper 1, Th1)表面,2型辅助性T细胞(T helper 2, Th2)表面则未检测到 β_2AR 。Th1所介导的细胞免疫反应离不开NE,NE通过Th1细胞间接参与了Tc细胞的增殖过程^[18]。T淋巴细胞是一个非常复杂的群体,始终处

于静止、激活、分化的动态平衡状态中。交感神经阻断后 NE 被耗竭, 未免疫的 $CD4^+$ T 细胞增殖受到抑制, T 淋巴细胞数量减少, 免疫功能降低。从实验结果看, 交感神经阻断后, 受辐照小鼠的活化 Th 和活化 Tc/Ts 细胞数量增加 (见表 3 和表 4), 表明交感神经阻断进一步增强了受辐照机体的免疫抑制作用。

令人困惑的是 T 细胞总数最少的阻断组, Th、Tc/Ts 却高于辐照组。从实验结果看, 两组阻断组的 Th 和 Tc/Ts 的和略高于 T 细胞的总数, 两组辐照组的 Th 和 Tc/Ts 的和明显低于 T 细胞的总数。原因可能有两点: 正常情况下, CD4 不仅在 T 细胞上表达, 还在单核细胞上表达。采用 FSC 和 SSC 散点图射门可区分单核细胞和淋巴细胞。但当机体受到辐射后, 淋巴细胞和单核细胞的形态结构会发生改变, 导致部分单核细胞混入淋巴细胞群。在阻断组, 由于淋巴细胞总数的减少, 这部分假阳性细胞的存在就导致了 Th 比例增高。同样, CD8 不仅表达于 Tc/Ts 细胞表面, 还表达于 30% 的 NK 细胞表面。其二, 辐照不仅改变了细胞的结构, 而且导致细胞的某些特性发生改变, 如某些细胞的自发荧光增强、跨膜电压、离子通道等改变。给予阻断剂后膜上的受体, 离子通道进一步发生改变, 可能影响到细胞的分化抗原。对第二种情况的深入理解是正确预防和治疗放射损伤和放射治疗中神经损伤的关键。

虽然本实验只观察了阻断后第 14 天的细胞变化, 但仍可确定交感神经对受辐照小鼠的免疫系统的恢复有积极的作用。由于交感神经阻断进一步增强了受辐照机体的免疫抑制作用, 在放射治疗过程中应避免损伤交感神经。

参考文献

- Dahlström A B, Zetterström B E M. *Science*, 1965, **147**(1): 1583-1585
- Kendall M D, Al-Shawaf A, Zaidi S A. *Adv Exp Med Biol*, 1988, **237**(1): 255-261
- 彭聿平, 邱一华, 王建军. *中国神经科学杂志*, 2003, **19**(5): 318-327
PENG Yuping, QIU Yihun, WANG Jianjun. *Chin J Neurosci*, 2003, **19**(5): 318-327
- Leo N A, Bonneau R H. *J Neuroimmunol*, 2000, **110**(10): 45-56
- Kruszewska B, Felten S Y, Moynihan J A. *J Immunol*, 1995, **155**(10): 4613-4620
- Rice P A, Boehm G W, Moynihan J A, *et al.* *J Neuroimmunol*, 2001, **114**(3): 19-27
- 徐瑞明, 武宁, 刘扬, 等. *中华放射医学与防护杂志*, 2007, **27**(1): 60-62
XU Ruiming, WU Ning, LIU Yang, *et al.* *Chin J Radiol Med Prot*, 2007, **27**(1): 60-62
- 王琳, 黄绍敏, 戴琴韵. *中国实验临床免疫学杂志*, 1996, **8**(2): 46-49
WANG Lin, HUANG Shaomin, DAI Qinyun. *Chin J Exp Clin Immunol*, 1996, **8**(2): 46-49
- 赵建础, 赵续民, 刘文琴, 等. *针刺研究*, 1995, **20**(1): 40-43
ZHAO Jianchu, ZHAO Xumin, LIU Wenqin, *et al.* *Acupunct Res*, 1995, **20**(1): 40-43
- Vizi E S, Orso E, Osipenko O N, *et al.* *Neuroscience*, 1995, **68**(10): 1263-1276
- Nicholas Trotter, Ruth L Stornetta. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 2007, **131**(1): 9-20
- Madden K S, Felten S Y, Felten D L, *et al.* *J Neuroimmunol*, 1994, **49**(1): 67-75
- 夏寿萱. *《放射生物学》*. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 472-475
XIA Shouxuan. *Radiobiology*. Beijing: Military Medical Science Publisher, 1998. 472-475
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, *et al.* *J Immunol*, 1995, **155**: 1151-1164
- 李健. *内分泌外科杂志*, 2007, **1**(4): 268-270
LI Jian. *J Endocr Surg*, 2007, **1**(4): 268-270
- 王卫文, 张戎, 杨晓帆, 等. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, **27**(10): 1092-1097
WANG Weiwen, ZHANG Rong, YANG Xiaofan, *et al.* *Acta Univ Med Nanjing (Natural Science)*, 2007, **27**(10): 1092-1097
- Kelley S Madden, Suzanne Y Stevens, David L Felten, *et al.* *J Neuroimmunol*, 2000, **103**(1): 131-145
- Nicholas W K, Virginia M S. *J Leu Bio*, 2006, **79**(6): 1093-1104

Effect of sympathectomy on T lymphocytes of irradiated mice

SHI Lili¹ LIU Xiqin¹ ZHANG Xiaohong¹ ZHU Xixu² FENG Jundong¹ CHEN Da¹

¹ (College of Material Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China)

² (Department of Radiotherapy, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT In this paper the effects of sympathectomy on T lymphocytes of irradiated mice were investigated. The whole blood sample was collected from mice irradiated with 0.5Gy, 3Gy and 6Gy and injected with 6-OHDA respectively. The number of T lymphocytes, T lymphocyte subsets and their activated cells were detected by flow cytometry. Results show that the thymus index of irradiated mice with sympathectomy obviously decline. And the number of T, Th and Tc/Ts cells collected from irradiated mice decrease with the increment of absorbed doses. The number of Th, Tc/Ts cells becomes obviously larger though the number of T cells of sympathectomized group is smaller than that of the group without sympathectomy at the same absorbed doses. Compared with the control group, the number of CD3⁺CD25⁺, activated Th and Tc/Ts cells increase with the increment of absorbed doses while the parameter of the sympathectomized sample are larger than that of control group. All these indicate that the sympathetic nerve has a positive function to the immune function of irradiated mice.

KEYWORDS Sympathectomy, Irradiation, T lymphocyte

LCL R811, R146