

低剂量 X 射线全身照射后小鼠 IL-10 和 IL-12 的反向变化

刘晓冬 刘树铮 马淑梅 刘 杨

(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 通过检测低剂量辐射(LDR)对小鼠脾淋巴细胞中 IL-10 以及腹腔巨噬细胞中 IL-12 的影响,研究LDR辐射免疫效应的机制。采用Northern blot 检测了⁷⁵mGy X 射线全身照射后, IL-10、IL-12 mRNA 水平的变化,同时分别通过流式细胞术和 ELISA 检测了 IL-10、IL-12 蛋白水平的变化。(1)Northern blot 检测表明,⁷⁵mGy X 射线全身照射后脾细胞中 IL-10 的 mRNA 转录水平从照射后 1 h 即降低,并维持较低水平,一直到 48 h 开始恢复,达到假照射水平的 86.2%;巨噬细胞中 IL-12 两亚基的 mRNA 水平的变化则表现为,照射后 1h p₃₅ 及 p₄₀ 亚基均迅速升高分别达到假照射组的 131%和 192%。而后,p₃₅ 开始回降,直至照射后 16—48 h 恢复正常,p₄₀ 亚基从照射后 1—48h 总体表现为升高。(2)对蛋白产物检测结果表明,脾细胞 IL-10 合成在照射后 2 h 开始即呈时间依赖性降低,至 48 h 仍无恢复迹象($p < 0.01$),双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测表明,巨噬细胞分泌 IL-12 明显增高。LDR 引起 IL-10 和 IL-12 发生反向变化的结果为低剂量辐射增强细胞免疫功能提供了分子水平的实验依据。

关键词 LDR,辐射兴奋效应,T 细胞分化,IL-10,IL-12

中图分类号 R811

我室多年工作表明,低剂量照射(LDR)可促使免疫反应上调,该过程涉及一系列细胞和分子变化,如促使淋巴细胞表面 TCR/CD3 表达上调,引起 IL-2、IFN- γ 等细胞因子分泌增加,IL-2R α 表达上调,表明细胞介导的免疫反应增强。其中,辅助性 T 细胞(T_H)的激活、分化与增殖是免疫反应增强的重要环节^[1]。而 T_H 据其受抗原或丝裂原刺激后分泌因子的不同可分为 T_H1、T_H2 等亚型^[2],T_H1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 等,T_H2 细胞分泌 IL-4、6、10 等。IL-10 是一种约 3.5 kD 的细胞因子,主要由 T_H2 型细胞分泌。另外,正常 B 细胞、单核吞噬细胞、角化细胞等也可分泌^[3],而 IL-12 是一种由抗原提呈细胞分泌的由 p₃₅ 和 p₄₀ 两个亚基组成的异源二聚体。在 T_H 分化过程中,IL-12 促使其向 T_H1 型细胞分化,而 IL-10 则具有抑制此过程的功能。我室以往的工作中曾用斑点杂交的方法观察到 ⁷⁵mGy 全身照射促使小鼠脾细胞 IL-10 转录水平下降,用 RT-PCR 半定量法发现 ⁷⁵mGy 全身照射则使脾细胞 IL-12p₃₅ 转录水平上调^[4]。为进一步验证低水平辐射作用后 IL-12 和 IL-10 的 mRNA 转录与蛋白表达的变化时程的相互关系,本研究旨在进一步探讨低剂量辐射诱导细胞免疫增强的分子机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取本校实验动物部饲养繁殖的昆明系小白鼠,雄性,体重 20 ± 2 g,随机分组。流式细胞

国家自然科学基金(39570188)资助

第一作者:刘晓冬,男,1972 年出生,1998 年硕士毕业,现博士在读,从事放射分子免疫专业,讲师

收稿日期:初稿 2001-04-24,修回 2001-05-31

术检测蛋白每 3 只小鼠脾细胞混为 1 个样品, 共计 5 个样品 ($n=5$); ELISA 检测蛋白时做 4 个样品 ($n=4$), 同时每样品设 2 个平行样, 杂交取 3 批样品 ($n=3$)。

1.2 主要试剂及仪器

Random DNA labeling kits (Promega, 美国), Monensin (Sigma, 美国), Saponin (Sigma, 美国), Rat anti-mouse IL-10 (一抗, Phamingen, 加拿大), anti-Rat IgG-PE (二抗, 苏州生物医学公司), [α - ^{32} P]-dCTP (北京亚辉医学工程公司), RNA 提取及杂交试剂购自大连宝生物公司。IL-12/P70 ELISA 抗体及标准品 mL-12 (Phamingen, 加拿大), LPS (Sigma, 美国), Phosphoimager 激光扫描仪 (美国 M-D 公司), 流式细胞仪 (美国 B-D 公司), PCR 仪 (美国 PE 公司), 550 型酶标仪 (BIO-RAD, 美国)。

1.3 照射

用国产 X·S·S-250 (FZ) 型固定式 X 射线深部治疗机照射, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mm Cu, 1.0 mm Al, 靶皮距 273 cm, 吸收剂量率 12.5 mGy/min。

1.4 脾细胞 IL-10 蛋白合成的测定

无菌制备脾单细胞悬液, 裂解红细胞后取 4×10^6 细胞加入 24 孔板, 每孔 1.5 mL, 体系为含 10% 小牛血清的 1640 培养基, Monensin $2 \mu\text{mol/L}$, rIL-2 10 U/mL , anti-CD3 (本室杂交瘤制取) 常规培养 72 h。收细胞后以 4% 多聚甲醛固定过夜, 以 0.1% Saponin 打孔 30 min, 继而每份样品加入一抗 50 μL (1:100), 4°C 反应 45 min (同时每一样本以 PBS 替代一抗设非特异对照), PBS 洗 2 次, 加二抗 50 μL (1:100), 4°C 反应 45 min, PBS 洗 2 次后上机检测。用 FACSscan 软件收集 10^4 个细胞, Lysis 软件分析, 阳性细胞百分率减去非特异对照值即为特异阳性细胞百分比。

1.5 细胞总 RNA 的提取及质量鉴定

异硫氰酸胍法见文献[5]。紫外分光仪测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 甲醛变性电泳观察 28s, 18s (比例为 2:1) 以定性。

1.6 探针合成

用 IL-10 及 IL-12 p35、p40 引物经反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 合成各自探针。IL-10 片段长为 346 bp, 5' 引物为 -TGCCTTCAGCCAGGTGAAGACT-, 3' 引物为 -AAATTCATTTCATGGCCITGTA-, 分别位于 mRNA 的 213-234、538-558 位置; p35 片段长为 371 bp, 5' 引物为 -CTACACAAGAACCAGAGTTGC-, 3' 引物为 -ATCACCTGTGATGGTCACG-, 分别位于 382-402、732-752 位置; p40 片段长为 438 bp, 5' 引物为 -TCCTCAGAAGC-TAACCATCTCC-, 3' 引物为 -TCCATGTTTCTTTCACACAGCC-, 分别位于 40-61、456-477 位置。取总 RNA 1 μg 加入 20 μL 反转录体系, AMV 5 U, 42°C 反应 60 min, 而后取 5 μL cDNA 置于 50 μL 体系中扩增, 条件为 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 35 圈, 72°C 10 min 反应结束, 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 切下特异带后用冻融法回收产物, 即为探针。

1.7 甲醛变性凝胶电泳及 Northern blot

甲醛变性凝胶电泳, 毛细管法转膜及杂交, 洗膜等方法见文献[5], 采用随机引物法标记探针, 按 Promega protocol 操作, 显影结果用 Phosphoimager 激光扫描仪 (M-D, 美国) 分析图像并测定曝光点的面积及灰度值。结果以特异探针杂交带与 GAPDH 探针杂交带的比值表示。

1.8 巨噬细胞中 IL-12 蛋白分泌的检测

采用双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测。照射后无菌取腹腔巨噬细胞种于 6 孔板,

每孔 3×10^6 细胞,加 2mL 含 10% 血清的 1640 培养液,1mg/L LPS 刺激 72h,取上清做 ELISA。OPD 显色 5-10min,在 490nm 处用酶标仪测定。所获 OD 值在标准曲线上查取相应的浓度。

1.9 统计方法

流式分析、ELISA 检测结果各组均数比较采用 Student *t* 检验,杂交结果取各组特异带与 GAPDH 比值后与假照组相比变化的百分率表示。

2 结果

2.1 LDR 对脾脏 IL-10 mRNA 及巨噬细胞 IL-12 p35、p40 亚基 mRNA 水平的影响

Northern blot 杂交带经 Phosphoimager 激光扫描仪扫描,扫描结果见图 1。由图 1 可见,75 mGy 照射后,脾脏 IL-10 mRNA 水平从照射后 1 h 即显著下降为假照射组的 64.7 % ($p<0.05$),以后一直维持较低水平,48h 开始恢复,达到假照射组的 88.3 %。这一结果与文献[4]报道的斑点杂交结果基本一致。巨噬细胞中 IL-12 mRNA 水平 p35、p40 有相似的趋势,p35、p40 从照射后 1h 即显著升高($p<0.05$),分别达到假照射组的 131%、192%。然后,p35 有所下降直至 16 h 开始恢复,而 p40 亚基在照射后总体表现为升高,在照射后 1、4h 有统计学意义。

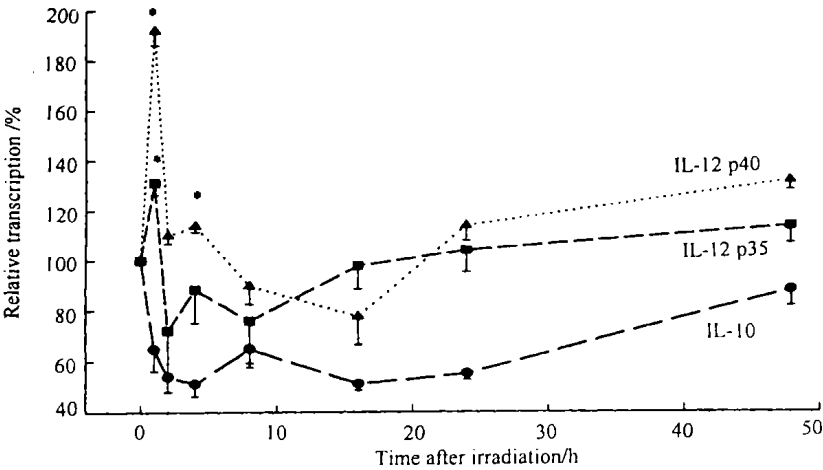


Fig.1 Changes in the mRNA level of IL-10 in splenocytes and IL-12 in macrophages by Northern blot (n=3, * $p<0.05$ vs sham)

2.2 LDR 对脾淋巴细胞 IL-10 蛋白合成的影响

以 Monensin 阻止细胞合成的 IL-10 向细胞外分泌,检测到为保持于细胞内 IL-10 总合成量,流式细胞分析结果见表 1。由表 1 可见,75 mGy 照射后脾脏 IL-10 蛋白水平从照射后 2 h 即开始降低,并随时间进程进行性下降,一直维持较低水平至照射后 48 h 仍未见恢复($p<0.05$)。

2.3 LDR 对巨噬细胞 IL-12 蛋白分泌的影响

经 LPS 刺激 72 h 后取上清(含巨噬细胞分泌的 IL-12p70),酶标测定后在标准曲线上查相应浓度,结果见表 2。由表 2 可见,75mGy 照射后腹腔巨噬细胞中 IL-12 蛋白的分泌从照射后 2 h 即开始升高,在 4、8 h 达到峰值($p<0.05$),随后逐渐恢复至假照水平。

通过抑制IFN- γ 、IL-12影响NK的细胞毒作用等。因IL-10的核苷酸序列及蛋白质氨基酸序列与其它细胞因子相比较无明显同源性^[11],故本研究对IL-10的检测结果具有较好的特异性。本实验以小鼠脾淋巴细胞为研究对象(脾脏是外周免疫器官,含成熟的T、B淋巴细胞群体),观察到75 mGy照射后不同时间点脾细胞IL-10基因转录水平均不同程度下降,最低时达假照组的30.2%。同时,采用抗CD3单抗及IL-2刺激后间接免疫荧光标记,流式细胞仪检测IL-10蛋白表达的变化,发现低剂量辐射在抑制IL-10转录的基础上伴有蛋白表达的下调,而且蛋白水平的改变直到照射后48 h仍未见恢复。另外,我们在腹腔巨噬细胞中又观察到LDR使IL-12表达升高,与IL-10呈明显反向变化,IL-12的p35和p40亚基的转录水平均在照射后上调,用ELISA法测得75 mGy全身照射后巨噬细胞培养的上清中IL-12p70蛋白分泌量升高,在时程上与IL-10的合成呈反向关系。间接支持了Du等^[12]报道的IL-10可抑制IL-12 p40 mRNA转录从而影响IL-12活性的结论。IL-10的下降使其对IL-12的抑制减轻,IL-12开始发挥其促T_H1分化的作用。另外IL-10下降又减轻了对APC表面MHC II的抑制,可增强其对TCR的刺激能力,促进T_H的增殖与分化,同时我室发现LDR使共刺激因子B7表达上调^[13],在主要刺激信号与共刺激信号作用下,激活免疫链锁反应,使免疫功能上调。可以认为,LDR对IL-10和IL-12的反向影响,是免疫功能上调的重要因素之一。随着低剂量电离辐射生物效应研究的不断深入,其影响T细胞分化、细胞因子的表达及其相互作用的机制将逐步澄清。

参 考 文 献

- 1 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, **15**(4): 217—222
LIU S Z. Chin J Radiol Med Prot, 1995, **15**(4): 217—222
- 2 Mosmann T R, Cherwinski H, Bond M W *et al.* J Immunol, 1986, **136**: 2348—2356
- 3 Macneil I A, Suda T, Moore K W *et al.* J Immunol, 1990, **145**: 4167—4173
- 4 刘树铮, 白欧, 陈东 等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(3): 175—186.
LIU S Z, BAI O, CHEN D *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(3): 175—186
- 5 Shambrook J, Maniatis T, Fritsch E F *et al.* Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed, New York: CSH, 1989
- 6 LIU S Z. In: Sugahane T ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992, 225—232
- 7 刘树铮, 万红, 陈沙力. 白求恩医科大学学报, 1996, **22**(6): 559—565
LIU S Z, WAN H, CHEN S L. J Norman Bethune Univ Med Sci, 1996, **22**(6): 559—65
- 8 Tone Y, Thompson S A, Babik J M *et al.* Eur J Immunol, 1996, **26**(6): 1222—1227
- 9 Fiorentino D F, Bond M W, Mosmann T R *et al.* J Exp Med, 1989, **170**(6): 2081—2095
- 10 Foss D L, Murtaugh M P. Vet Immunol Immunopathol. 1997, **57**(1): 121—134
- 11 Moore K W, Vieira P, Fiorentino D F *et al.* Science, 1990, **248**(4960): 1230—1244
- 12 DU C, Sriram S. J Leukoc Biol. 1998, **64**(1): 92—97
- 13 金顺子, 刘树铮. 白求恩医科大学学报, 2001, **27**(2): 111—113
JIN S Z, LIU S Z. Norman Bethune Univ Med Sci, 2001, **27**(2): 111—113

CHANGES IN OPPOSITE DIRECTIONS FOR THE EXPRESSION OF
IL-10 AND IL-12 AFTER LOW DOSE IRRADIATION

LIU Xiaodong, LIU Shuzheng, MA Shumei, LIU Yang

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

ABSTRACT To observe the effects of LDR on the synthesis of IL-10 in splenocytes and the secretion of IL-12 by peritoneal macrophages. Northern blot and flow cytometry were adopted to detect the changes of IL-10 at mRNA and protein level, respectively. Northern blot and ELISA were used respectively to examine the changes of IL-12p35/p40 mRNA and IL-12p70 protein levels. In splenocytes IL-10 mRNA decreased significantly, while both IL-12 p35 and p40 subunits in macrophages increased after WBI with 75 mGy X rays. Meanwhile, IL-10 synthesis in splenocytes decreased beginning from 4h after exposure and remaining at low level up to 48h, and IL-12 secretion by macrophages was found to take an opposite direction. WBI with 75mGy X rays may suppress IL-10 both at the mRNA level and protein level and stimulate IL-12 expression simultaneously, and this would lead to a shift of the immune response in favour of TH1 differentiation.

KEYWORDS Low dose radiation, Radiation hormesis, T cell differentiation, TIL-10, IL-12
CLC R811