

大鼠卵巢局部照射对骨代谢与淋巴细胞免疫功能的影响

金慰芳 王洪复 张海军 黄 辉

(上海医科大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 雌激素维护骨代谢,并抑制淋巴细胞免疫功能。以 50 Gy X 射线局部照射大鼠卵巢,造成卵泡闭锁、雌二醇(E_2)低下,并致尿 Ca/cr(钙/肌肝)、HOP/cr(羟脯氨酸/肌肝)和血 ALP(碱性磷酸酶)升高,骨小梁数和面积减小,淋巴细胞增殖和分泌 IL-2 的活性增加。淋巴细胞分泌 IL-2 的活性与血 E_2 水平呈显著负相关,24 h 尿 Ca 量与淋巴细胞分泌 IL-2 的活性呈显著正相关。表明卵巢电离辐射效应对骨代谢和淋巴细胞免疫功能有明显影响,IL-2 在雌激素对骨代谢的影响中可能起介导作用。

关键词 电离辐射效应,卵巢,骨代谢,淋巴细胞,白细胞介素 II

雌激素是骨量保护因素之一,并抑制淋巴细胞免疫功能。女性下腹部肿瘤放射治疗中,卵巢放射损伤常引起闭经^[1]。大剂量 X 射线局部照射可致卵泡闭锁^[2]。卵巢电离辐射效应对骨代谢与淋巴细胞免疫功能的影响如何,尚未见报道。本文报道卵巢照射后所致骨代谢与淋巴细胞增殖、分泌 IL-2 活性的改变,并探讨其相关性。

1 材料与方 法

1.1 动物与照射

采用 Wistar 大鼠(上海放射医学研究所实验动物房提供,沪医实验动物准字 34),雌性,5 月龄,体重 300~350 g。随机分为卵巢照射组、卵巢切除组和假手术不照射(对照)组,每组 10 只。照射组参考 Gordan 方法^[3],在室温下用 10%乌拉坦(1 ml/100 g)腹腔麻醉,双侧腰背切口,暴露双侧卵巢盖以生理盐水纱布,以双层 0.35 铅当量铅橡皮屏蔽周围,置 F 34-1 型深部 X 射线机下照射,电压为 180 kV,电流为 15 mA,靶皮距离为 50 cm,照射野为 6 cm×8 cm,剂量率为 0.669 Gy/min,一次照射,总剂量为 50 Gy。照射结束后缝合伤口。卵巢切除组在同样环境和麻醉条件下,双侧腰背切口,切除双侧卵巢,缝合伤口。对照组用同样方法切口,切除卵巢周围小块脂肪,缝合伤口,不照射。

1.2 标本采集

照射后 4 个月,采集尿、血、脾脏、卵巢和骨的标本。尿标本是将大鼠置代谢笼内收集 24 h 空腹尿。血标本是在乙醚麻醉下由颈动脉插管采取,并在无菌条件下取脾脏标本、卵巢和骨标本,制作病理切片。

1.3 卵巢功能测定

于照射后 1 周开始,每周连续 5 d 作阴道涂片,吉姆萨染色,低倍镜下观察。白细胞数明显增

收稿日期:初稿 1995-08-28,修回 1996-02-02

多和角化上皮明显减少,为雌激素缺乏。血清 E_2 测定采用 $^3H-E_2$ RIA 法,试剂盒由上海生物制品研究所提供。促卵泡素(FSH)测定采用 ^{125}I -FSH RIA 法,试剂盒由北方免疫试剂研究所提供。操作按试剂盒说明书进行。

1.4 骨代谢生化指标测定

尿钙(Ca)测定采用甲基麝香草酚法,试剂由上海生物制品研究所提供。尿羟脯氨酸(HOP)测定采用郑少雄改良法,试剂由上海生化研究所提供。尿肌酐(cr)测定采用饱和苦味酸法,试剂由上海生物制品研究所和化工一厂提供。血碱性磷酸酶(ALP)测定采用对硝基苯磷酸盐法,试剂由宁波生化试剂厂提供。

1.5 骨形态计量学测定

取左侧胫骨上端 1/3 段标本,常规制作脱钙病理标本,由上海医科大学形态中心应用英国 Ams 公司制造的 VIDS Ⅲ型图像分析仪作形态计量学测定,放大 40 倍,观察 9 个视野,计算机图像分析计测得平均骨小梁数(MTN)、平均骨小梁面积(MTV)和平均骨小梁间隙(MTS)。

1.6 淋巴细胞免疫功能测定

采用脾细胞标本制备脾细胞悬液,进行淋巴细胞增殖反应和分泌 IL-2 的活性测定,方法见文献[4]。

2 结 果

2.1 卵巢功能改变

卵巢照射组于照射后 4~5 周大鼠阴道涂片,角化上皮明显减少,5 周后布满白细胞。卵巢切除组大鼠阴道涂片所见与照射组相似。卵巢照射组血 E_2 水平较对照组明显降低 ($P<0.01$),FSH 水平明显升高 ($P<0.01$) (见表 1),与卵巢切除组改变无明显差异 ($P>0.05$)。病理切片可见对照照射组各级卵泡均存在,卵巢照射组和卵巢切除组大鼠卵泡闭锁。

Tab 1. Serum E_2 and FSH level after ovarian X-irradiation or ovariectomy n = 10

Group	$E_2/\text{fmol ml}^{-1}$	FSH/mIU L ⁻¹
ovarian X-irradiation	$39.42 \pm 7.14^{(1)(2)}$	$3.42 \pm 0.59^{(1)(2)}$
ovariectomy	$40.75 \pm 7.30^{(1)}$	$3.65 \pm 0.71^{(1)}$
control	91.42 ± 31.83	2.02 ± 0.32

⁽¹⁾compared with control, $p<0.01$

⁽²⁾compared with ovariectomy, $p>0.05$

2.2 骨代谢生化指标改变

卵巢照射组尿 Ca/cr、HOP/cr、血 ALP 水平均显著高于对照组 ($P<0.01$) (见表 2),而与卵巢切除组改变无明显差异 ($P>0.05$)。

Tab 2. Effect of urine Ca/cr, HOP/cr and serum ALP level after ovarian X-irradiation or ovariectomy n = 10

Group	Ca:cr/mg:mg	HOP:cr/ $\mu\text{g:mg}$	ALP/IU L ⁻¹
ovarian X-irradiation	$5.00 \pm 0.86^{(1)(2)}$	$1.49 \pm 0.47^{(1)(2)}$	$127.30 \pm 11.30^{(1)(2)}$
ovariectomy	$4.81 \pm 0.51^{(1)}$	$1.51 \pm 0.54^{(1)}$	$121.60 \pm 16.80^{(2)}$
control	0.88 ± 0.44	0.61 ± 0.11	50.30 ± 7.50

⁽¹⁾ compared with control, $p<0.01$ ⁽²⁾compared with ovariectomy, $p>0.05$

2.3 骨形态计量学指标改变

卵巢照射组胫骨 MTN、MTV 和 MTS 的改变较对照组有显著性差异($P<0.01$)(见表3),较卵巢切除组无显著性差异($P>0.05$)。

Tab 3. Effect of ovarian X-irradiation on MTN, MTV and MTS n=6

Group	MTN/ T/field	MTV/ $\mu\text{m}/\text{field}$	MTS/ $\mu\text{m}/\text{field}$
ovarian X-irradiation	$8.0 \pm 4.0^{(1)(2)}$	$1.63 \pm 0.83^{(1)(2)}$	$68.91 \pm 6.26^{(1)(2)}$
ovariectomy	$7.0 \pm 2.0^{(1)}$	$1.51 \pm 0.32^{(1)}$	$76.71 \pm 6.12^{(1)}$
control	19.0 ± 5.0	5.17 ± 0.28	31.13 ± 7.62

(1) compared with control, $p<0.01$ (2) compared with ovariectomy, $p>0.05$

2.4 免疫功能指标改变

以脾淋巴细胞增殖反应和分泌 IL-2 的活力为指标,卵巢照射组和卵巢切除组较对照组分别增加 39.7%, 93% 和 63.9%, 139%(见图1、2)。

2.5 相关性分析

对淋巴细胞分泌 IL-2 的活性与血 E_2 水平的相关性分析结果为: $r = -0.952$, $p < 0.01$, 呈显著负相关。对 24 h 尿钙含量与淋巴细胞分泌 IL-2 的水平的相关性分析结果为: $r = 0.821$, $p < 0.01$, 呈显著正相关。

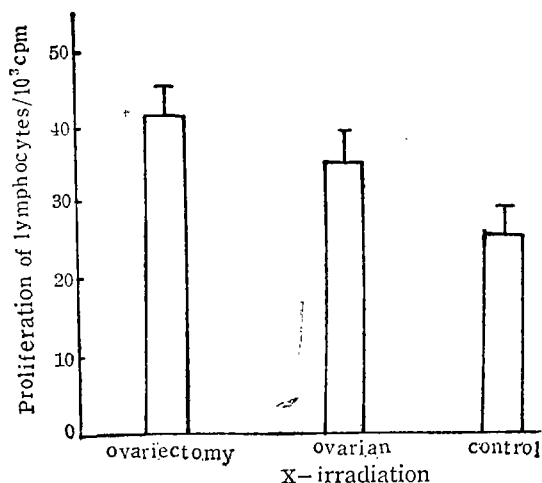


Fig 1. Proliferation of lymphocytes after ovarian X-irradiation or ovariectomy

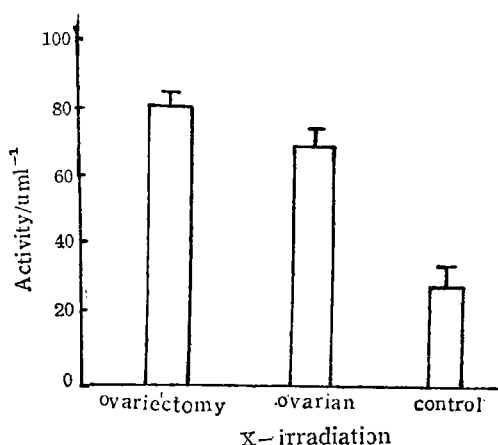


Fig 2. Activities of IL-2 secreted by lymphocytes after ovarian X-irradiation or ovariectomy

3 讨 论

卵巢功能、骨代谢和机体免疫功能三者关系密切,绝经妇女可见负钙平衡和淋巴细胞免疫功能升高。在放射生物学中,卵巢的电离辐射效应如何影响骨代谢和免疫功能,文献中很少报道。

Mandl、Gordan^[2~3]分别用44 Gy和30 Gy X射线局部照射大鼠卵巢,引起卵泡闭锁和 E_2 分泌能力明显降低,未报道骨代谢研究。本工作以50 Gy X射线照射大鼠卵巢,可见卵巢功能明显受损,并对骨代谢和淋巴细胞免疫功能产生明显影响。

骨代谢指标中,尿Ca/cr、HOP/cr比值升高,呈显著负钙平衡和骨基质分解状态;血ALP水平升高,说明在骨吸收激活的同时,骨形成能力也增加;骨小梁明显被吸收,主要影响表现为松质病的病理特点。这些改变与妇女绝经后骨质疏松的病理生理特点相似。Albright^[5]将妇女骨质疏松归因于性腺功能不足。现已证明,一定的雌激素水平对于妇女骨量的维护是最重要因素。成骨细胞存在雌激素受体,在 E_2 刺激下可使成骨细胞由不活跃型转变成活跃型,激活骨形成功能^[6]。雌激素对甲状旁腺激素(PTH)的骨吸收作用有拮抗功能,并对甲状腺C细胞分泌的降钙素(calcitonin, CT)有刺激作用,CT抑制破骨细胞骨吸收功能。此外,雌激素可激活肝、肾 1α 、 25α 羟化酶,使 $1.25(OH)_2D_3$ 生成增多,促进肠钙吸收。本结果表明卵巢受大剂量照射后,雌激素分泌不足是造成骨代谢障碍的主要病理生理学基础。临床上也可见到放射治疗腹部肿瘤的患者,由于卵巢受照射而导致骨质疏松和骨折^[7,8]。

雌激素对免疫功能的影响已引起人们的重视,临床可见妊娠早期的妇女免疫功能下降^[9,10]。雌激素抑制免疫细胞活性^[11],因而卵巢功能衰退可导致淋巴细胞免疫功能增高。本结果表明 E_2 缺乏组大鼠(照射与切除)淋巴细胞增殖反应和分泌IL-2的活性升高,血压 E_2 水平与淋巴细胞分泌IL-2活力呈显著负相关。近年来,一些免疫因子对骨代谢的影响已有不少报道。IL-1、2、3、6和TNF、IFN被认为是骨吸收促进因子。免疫因子中IL-6是最重要的骨吸收因子,它可直接刺激破骨细胞前体细胞转化形成破骨细胞,而且加强IL-1等细胞因子的作用。人体成骨细胞、单核细胞、淋巴细胞等多种细胞能分泌IL-6,性激素可抑制这些细胞分泌IL-6,性激素缺乏时,IL-6的分泌将增多,成为刺激骨吸收的重要因素。IL-2可直接或间接激活破骨细胞^[12]。本结果表明淋巴细胞分泌IL-2能力与24 h尿钙排出量呈显著正相关。推测IL-2可能是雌激素对破骨细胞调节的介导因素之一,在卵巢功能抑制后的骨量丢失病理生理机制中可能有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Mandl A M et al. Bio. Rew., 1964, 39: 288
- 2 Mandl A M et al. J. Endocrin., 1961, 23: 179
- 3 Gordan J M et al. Endocrinology, 1969, 84: 1004
- 4 黄 辉等. 上海医科大学学报, 1993, 20: 31
- 5 Albright F et al. J. Am. Med. Assoc., 1941, 116: 2465
- 6 Ericksen E F et al. Science, 1988, 241: 84
- 7 Lundin B et al. Acta Oncol., 1990, 29: 211
- 8 Artsen E J et al. Eur. J. Surg. Oncol., 1990, 16: 42
- 9 Gutpa S et al. J. Reprod. Immunol., 1986, 9: 1
- 10 於亢笛等. 上海医学, 1989, 12: 403
- 11 Weinstein Y et al. J. Immunol., 1984, 132: 656
- 12 王桂兰, 王颜刚. 骨质疏松研究与防治, 刘忠厚主编, 北京: 化学工业出版社, 1994, 10, 280~284

BONE METABOLISM AND IMMUNOLOGICAL FUNCTION OF SPLENIC AFTER OVARIAN IRRADIATION

Jin Weifang Wang Hongfu Zhang Haijun Huang Hui

(*Institute of Radiation Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 200032*)

ABSTRACT Estrogen is a factor supporting the equilibrium of bone metabolism and inhibiting the immunological function of lymphocytes. In this paper, the occlusion of ovarian follicle, the reduction of estradiol secretion, the increase of values of Ca/cr and HOP/cr in urine and ALP in serum, the decrease of MTN (mean trabeculae number) and MTV, (mean trabeculae volume) and the increase of proliferation and secretion of IL-2 in splenic of rats were observed when their ovaries had been irradiation with X-rays of 50Gy. There was obvious negative correlation between the IL-2 secretion and the level of estradiol in serum. It also showed marked positive correlation between the level of calcium in urine and the activity of IL-2 secreted by splenic lymphocytes. It was suggested that the bone metabolism and the immunological function of lymphocytes could be influenced by the ovaries exposed to irradiation. The effect of estrogen on bone metabolism might be mediated by IL-2.

KEYWORDS Radiation effect, Ovary, Bone metabolism, Immunological function, Interlukin-2