

文章编号: 1007-4627(2009)04-0348-04

# 低剂量连续辐射引起的小鼠免疫系统的变化<sup>\*</sup>

谢 漪<sup>1</sup>, 张 红<sup>1, #</sup>, 党秉荣<sup>1</sup>, 郝冀芳<sup>1</sup>, 王小虎<sup>2</sup>

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 甘肃省医学科学研究院, 甘肃 兰州 730050)

**摘 要:** 为了评估低剂量 X 射线连续辐射对 BALB/c 小鼠健康机体免疫系统的影响, 实验采用 X 射线全身连续照射 BALB/c 小鼠, 照射第一天剂量为 0.07 Gy, 剂量率 0.2 Gy/min, 之后每天照射 0.08 Gy, 共照射 12 d, 累积剂量 1.03 Gy, 照射后 24 和 48 h 取血、胸腺和脾脏。流式细胞仪检测免疫细胞周期和凋亡的变化, 胸腺和脾脏指数用重量法获取。实验结果表明, 小鼠胸腺细胞的周期在照射后 24 h 被阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期; 外周血淋巴和胸腺细胞周期 48 h 被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 细胞凋亡比例在照射后两个时间点都显著增加; 脾脏淋巴细胞周期 24 h 被阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 48 h 被阻滞在 S 期, 细胞凋亡比例在 24 和 48 h 显著减少; 脾脏指数在照射后 48 h 显著减少。故低剂量 X 射线连续全身照射 BALB/c 小鼠可激活免疫细胞不同的周期监测点, 引起免疫细胞凋亡比例发生变化, 造成一定的辐射损伤, 且这种影响随着免疫器官的不同而不同。

**关键词:** X 射线连续辐射; 免疫细胞; 细胞周期和凋亡; 脾脏和胸腺指数; 小鼠

**中图分类号:** Q691; R818.74      **文献标识码:** A

## 1 引言

在航空或航天飞行中, 飞行人员或多或少受到来自宇宙射线的辐射, 即使在地面上, 人们也会受到一定剂量的辐射, 所以辐射损伤和防护的研究日益受到人们的重视<sup>[1]</sup>。近年来辐射损伤防护大多集中在较大剂量急性辐射生物学效应等方面的研究<sup>[2]</sup>, 而关于低剂量率连续照射研究进行得较少。淋巴细胞的周期及分布反映了淋巴细胞生长增殖的具体过程, 它的变化较为客观地显示了机体免疫力的变化<sup>[3]</sup>。辐射可延长细胞的周期<sup>[4, 5]</sup>, 但辐射后随着时间的变化细胞周期和凋亡会发生改变。胸腺和脾脏指数的变化显示了淋巴样器官细胞量(T 和 B 淋巴细胞的数量)的变化。为了较为全面和系统地了解低剂量辐射对机体免疫功能的影响, 实验观察了照射后不同时间点低剂量 X 射线连续辐射对小鼠免疫系统的影响, 获得不同免疫细胞和器官的放射生物学效应的规律。期望可以为建立面向生物

学对象的免疫模型和辐射防护提供一些实验依据。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验动物

实验用纯种 BALB/c 小鼠, 雌雄各半, 健康, 4—5 周龄, 体重(20±1) g, 由甘肃省医学科学研究所动物实验中心提供。随机分为 3 组(每组 6 只): 对照组, 累积剂量为 1.03 Gy 24 h 组和 48 h 组<sup>[2]</sup>。

### 2.2 主要试剂、仪器和照射条件

淋巴细胞分离液(上海生物工程技术服务有限公司), 碘化丙啶(Propidium iodide, 简称 PI)购自上海生物工程技术服务有限公司, 磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, 简称 PBS), FACSCalibur 流式细胞仪(B-D 公司, 美国)。采用 PRIMUS 型医用电子直线加速器(西门子公司, 德国), 利用

\* 收稿日期: 2009-01-09; 修改日期: 2009-02-25

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(10835011); 国家自然科学基金面上项目(10675151); 甘肃省 2007 年重大专项项目(0702NKDA045); 甘肃省 2008 年重大专项项目(0801NKDA001); 兰州市-中国科学院科技攻关资助项目(07-2-07)

作者简介: 谢漪(1981—), 女(汉族), 河北石家庄人, 博士, 从事辐射生物学研究; E-mail: xieyi@impcas.ac.cn

# 通讯联系人: 张红, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

能量为 6 MeV 的电子束产生的 X 射线治疗机进行全身照射,照射靶皮距(Source to surface distance, 简称 SSD)为 100 cm。第一天照射了 0.07 Gy,而后 12 d 每天照射 0.08 Gy,累积剂量为 1.03 Gy,剂量率为 0.2 Gy/min。

### 2.3 免疫细胞周期和凋亡的测定

采用流式荧光强度分析<sup>[6]</sup>。照射后 24 和 48 h,小鼠眼眶放血<sup>[7]</sup>,收集血液,肝素抗凝。全血加等量的 PBS 稀释,混匀后置于 2 ml 淋巴细胞分离液上,密度梯度离心后(3000 r/min, 20 min),吸出淋巴细胞层,PBS 冲洗 1 次,75%的酒精固定。小鼠处死,取胸腺和脾脏,称重,PBS 冲洗,胸腺用剪刀剪碎,后用 300 目的过滤网过滤,PBS 冲洗两遍即可用酒精(75%)固定;脾脏用 250 目的钢网碾碎,后用 300 目的过滤网过滤,置于 2 ml 淋巴细胞分离液上,离心后吸出淋巴细胞层,用 PBS 冲洗 1 次后即酒精(75%)固定。所有样品经 PI 染色 0.5 h 后采用流式细胞仪检测,波长取为 488 nm, FACSscan 软件收集  $1 \times 10^4$  细胞, Modfit 3.0 软件分析细胞周期和凋亡的变化。

### 2.4 胸腺和脾脏指数的测定

小鼠的胸腺和脾脏,研磨前用滤纸吸干残血,称重(mg),分别除以小鼠体重(g),乘以 10,得到胸腺和脾脏指数。

### 2.5 统计方法

数据用  $\bar{x} \pm sd$  ( $sd$  为标准偏差)表示,各组均数采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 小鼠免疫细胞周期的变化

经过连续 13 d 累积剂量为 1.03 Gy 的 X 射线辐射后 24 h,小鼠胸腺细胞在  $G_2/M$  期的数目增加了 40.02%,48 h 时,外周血淋巴和胸腺细胞在  $G_0/G_1$  期数目增加;脾脏淋巴细胞照射后 24 h  $G_0/G_1$  期所占比例较对照组增加了 13.17%,48 h 时,S 期所占比例增加了 34.29%(见表 1)。

### 3.2 小鼠免疫细胞凋亡比例的变化

小鼠外周血淋巴细胞和胸腺细胞的凋亡比例在照射后 24 和 48 h 都有显著增加,脾脏淋巴细胞在两个时间点显著减少(见图 1)。照射后 24 h,胸腺细胞凋亡比例比对照组升高了 14 倍,而脾脏淋巴细胞凋亡比例降低了 39.89%。

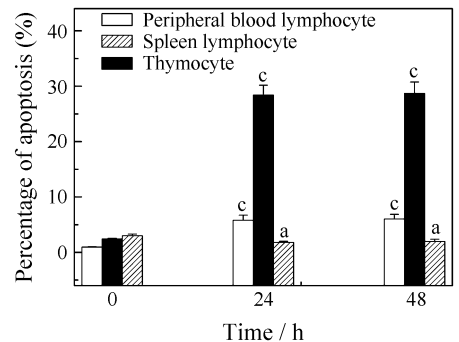


图 1 X 射线全身连续剂量为 1.03 Gy 照射后小鼠免疫细胞凋亡比例的变化

a  $p < 0.05$ , c  $p < 0.001$  相对于对照组,  $n = 6$ 。

表 1 X 射线全身连续剂量为 1.03 Gy 照射后小鼠免疫细胞周期的变化( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n = 6$ )<sup>\*</sup>

细胞周期(%)	对照组	24 h	48 h
外周血淋巴细胞			
$G_0/G_1$	88.3 ± 1.2	88.8 ± 1.4	91.7 ± 0.7 <sup>a</sup>
S(%)	5.5 ± 0.8	2.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.9 ± 0.7
$G_2/M$ (%)	6.2 ± 1.2	8.7 ± 1.4	4.4 ± 0.3
胸腺细胞			
$G_0/G_1$	67.6 ± 1.9	67.5 ± 1.2	92.9 ± 0.9 <sup>a</sup>
S(%)	14.8 ± 1.2	2.8 ± 0.8 <sup>c</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>c</sup>
$G_2/M$ (%)	17.4 ± 0.8	29.4 ± 1.6 <sup>c</sup>	6.1 ± 1.0 <sup>c</sup>
脾脏淋巴细胞			
$G_0/G_1$	72.1 ± 1.3	81.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	77.6 ± 0.7 <sup>b</sup>
S(%)	14.6 ± 0.3	15.4 ± 1.0	19.6 ± 1.1 <sup>b</sup>
$G_2/M$ (%)	13.3 ± 1.5	2.9 ± 0.8 <sup>c</sup>	2.7 ± 0.6 <sup>c</sup>

<sup>\*</sup> a  $p < 0.05$ , b  $p < 0.01$ , c  $p < 0.001$  相对于对照组。

### 3.3 胸腺和脾脏指数的变化

胸腺指数无明显变化, 而脾脏指数在照射后 48 h 减少了 41.66% (见图 2)。

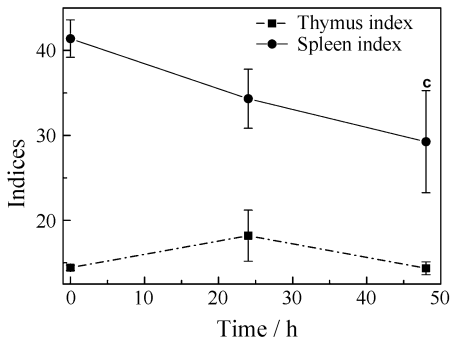


图 2 X 射线全身连续剂量为 1.03 Gy 照射后小鼠胸腺指数和脾脏指数的变化

c  $p < 0.001$  相对于对照组,  $n = 6$ 。

## 4 讨论

小鼠胸腺细胞的周期在照射后 24 h 被阻滞在  $G_2/M$  期, 外周血淋巴和胸腺细胞的周期在照射后 48 h 时被阻滞在  $G_0/G_1$  期 (见表 1), 细胞凋亡比例在照射后 24 和 48 h 都有显著的增加 (见图 1), 发生这种现象的机理与辐射生物学效应相关。众所周知, 辐射会导致淋巴细胞的染色体和 DNA 发生变化, 例如 DNA 的断裂、缺失<sup>[8, 9]</sup> 和染色体的损伤<sup>[10, 11]</sup>, 而反映到免疫细胞的周期<sup>[12]</sup> 和凋亡比例<sup>[13]</sup> 的变化需要一定的时间, 所以不同的时间间隔在周期和凋亡上有不同的表现。胸腺指数在 24 和 48 h 没有显著变化, 原因可能与胸腺的结构有关, 胸腺上皮细胞本身就对辐射具有一定的抗性<sup>[14]</sup>, 而胸腺作为对辐射较为敏感的器官, 细胞的凋亡反应较为容易产生<sup>[15]</sup>。

脾脏淋巴细胞的周期在照射后 24 h 被阻滞在  $G_0/G_1$  期, 48 h 时被阻滞在 S 期 (见表 1), 淋巴细胞的凋亡比例在 24 和 48 h 两个时间点显著减少 (见图 1), 脾脏指数在 48 h 后也显著减少 (见图 2), 产生这种现象的机理可能与脾脏的功能有关。脾脏内的淋巴细胞中有 T 细胞、B 细胞、K 细胞和 NK 细胞等, 巨噬细胞和淋巴细胞在脾脏内都参与免疫活动。当脾脏受到低剂量辐射时, 脾的体积和内部结构发生变化, 辐射免疫应答时, 淋巴小结增多增大, 脾索内浆细胞增多, 脉周围淋巴鞘显著增厚, T

细胞和 B 细胞在脾脏的白髓中产生, 所以说脾脏是一个产生辐射保护作用的免疫应答场所。因此脾脏比其他的器官有较强的辐射抗性<sup>[16]</sup>。

同时, 比较连续辐射与一次照射产生的生物学效应, 发现较大差异。有报道称相同的剂量和剂量率的 X 射线全身照射 BALB/c 小鼠, 一次照射剂量为 1 Gy, 照射后 24 h, 免疫细胞的周期被阻滞在  $G_0/G_1$  期, 凋亡的淋巴细胞数目较少<sup>[2]</sup>。这种现象的机理可能与连续照射和一次性辐射所引起的 DNA 及染色体的损伤不同有关, 不同的 DNA 和染色体损伤会引起不同的细胞周期和凋亡的变化<sup>[17]</sup>, 这种假设现在还没有较为充分的证据证实。

实验证明, 经过 X 射线连续全身照射后可引起小鼠免疫细胞周期和凋亡比例发生变化, 造成其免疫系统的一定损伤, 而且这种影响随着器官和照射方法的不同而不同。本实验也许能为辐射防护和航空航天飞行提供一些实验依据。

### 参考文献 (References):

- [1] Xie Yi, Dang Bingrong, Bing Tao, *et al.* Nuclear Physics Review, 2005, **22**(3): 288 (in Chinese). (谢漪, 党秉荣, 邴涛等. 原子核物理评论, 2005, **22**(3): 288.)
- [2] Xie Y, Dang B R, Zhang H, *et al.* Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2006, **24**(3): 167 (in Chinese). (谢漪, 党秉荣, 张红等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2006, **24**(3): 167.)
- [3] Hale T J, Richardson B C, Sweet L I, *et al.* Cellular Immunology, 2002, **220**(1): 51.
- [4] Teyssier F, Bay J O, Dionet C, *et al.* Bull Cancer, 1999, **86**(4): 345.
- [5] Hwang A, Muschel R J. Radiat Re, 1998, **150**(5): 52.
- [6] Peng X Y, Jin J, Giri S, *et al.* Journal of Neuroimmunology, 2006, **178**(1-2): 130.
- [7] Giannetti P, Facciabene A, Monica N L, *et al.* Journal of Immunological Methods, 2006, **316**(1-2): 84.
- [8] Perrin J, Lussato D, De Mèo M, *et al.* Toxicology in Vitro, 2007, **21**(1): 81.
- [9] Cauët E and Liévin J. Advances in Quantum Chemistry, 2007, **52**: 121.
- [10] Ballardini M, Antonelli A, Cipollini M, *et al.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2007, **626**(1-2): 61.

- [11] Povirk L F. DNA Repair, 2006, **5**(9—10): 1199.
- [12] Dasika G K, Lin S C, Zhao S, *et al.* Oncogene 1999, **18** (55): 7883.
- [13] Lee J H, Park J W. Free Radical Biology and Medicine, 2007, **42**(1): 44.
- [14] Toki J, Adachi Y, Jin T, *et al.* Immunobiolog, 2003, **207** (4): 247.
- [15] Deng D X, Cai L, Chakrabarti S, *et al.* Toxicology, 1999, **134**(1): 39.
- [16] Yang Z W, Li J A, Yang M H, *et al.* Research in Veterinary Science, 2005, **79**(2): 109.
- [17] Brugmans L, Kanaar R, Esser J. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2007, **614** (3): 95.

## Changes of Immune System in Mice Irradiated by Continual X-rays<sup>\*</sup>

XIE Yi<sup>1</sup>, ZHANG Hong<sup>1, #</sup>, DANG Bing-rong<sup>1</sup>, HAO Ji-fang<sup>1</sup>, WANG Xiao-hu<sup>2</sup>

(1 *Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;*

*2 Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China*)

**Abstract:** For estimating the effect of low doses X-ray continual irradiation to immunity system of mouse, BALB/c mice were continually irradiated to 1.03 Gy by X rays at a dose rate of 0.2 Gy/min in 13 d. At 24 or 48 h after irradiation, the immunocyte cycle and apoptosis were determined by flow cytometry, and the thymus and spleen weights were measured too. The results showed that the cycle of thymocyte were arrested in G<sub>2</sub>/M at 24 h, the number of peripheral blood lymphocytes and thymocytes in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase at 48 h was up and the percentage of apoptosis had a significance increase in both of time points; the cycle of spleen lymphocytes was delayed in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> at 24 h, in S phase at 48 h, the apoptosis had a significance decrease at 24 and 48 h; spleen index declined significantly at 48 h. The results suggested that low doses continual X-ray whole-body irradiation could activate different cell cycle checkpoints, and result in some changes of apoptosis and some damages to immunocytes. The continual X-ray irradiation affects the organs differently, it might provide experiment basis for radioprotection.

**Key words:** X-ray continual irradiation; immunocyte; cellular cycle and apoptosis; thymus and spleen index; mouse

\* **Received date:** 19 Jan. 2009; **Revised date:** 25 Feb. 2009

\* **Foundation item:** National Natural Science Foundation of China(10675151, 10835011); Key Scientific Technology Research Projects of Gansu Province(0702NKDA045, 0801NKDA001); Science and Technology Research Project of Lanzhou-Chinese Academy of Science(07-2-07)

# **Corresponding author:** Zhang Hong, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn