

# 大剂量 $\gamma$ 射线照射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究

李德冠 王月英 吴红英 路璐 王小春 张恒 樊飞跃 孟爱民

**【摘要】 目的** 探讨亚致死剂量 6 Gy  $\gamma$  射线一次性全身照射小鼠免疫细胞对脂多糖刺激反应性的远期影响。**方法** 将实验小鼠分为假照射组和照射组,假照射组不接受照射,照射组给予 6 Gy  $\gamma$  射线照射。照射后 10 周,分别将假照射组和照射组小鼠按组别腹腔注射脂多糖(20 mg/kg),对照组注射等量的生理盐水。分别于 24 h 和 1 h 后取材,进行外周血白细胞计数及 CD4、CD8、B220 细胞比例检测。取脾脏和胸腺称重,计算脏器指数。冲洗单侧股骨进行有核细胞计数。**结果** 与假照射对照组小鼠相比,照射对照组小鼠的 CD4 细胞比例显著升高 ( $t=2.940, P<0.05$ ), CD8 和 B220 细胞比例显著下降 ( $t=6.485$  和  $4.351, P$  均  $<0.01$ )。照射+脂多糖 1 h 组小鼠的 CD4 ( $t=2.510, P<0.05$ )、CD8 ( $t=2.862, P<0.05$ ) 和 B220 ( $t=7.074, P<0.01$ ) 细胞比例较假照射+脂多糖 1 h 组小鼠显著降低,差异有统计学意义。与假照射+脂多糖 24 h 组小鼠相比,照射+脂多糖 24 h 组小鼠单侧股骨有核细胞计数显著升高,差异有统计学意义 ( $t=2.078, P<0.05$ )。**结论** 6 Gy  $\gamma$  射线一次性全身照射后 10 周,小鼠免疫系统尚未完全恢复;与假照射组相比,在接受脂多糖刺激后照射组小鼠胸腺指数和外周血中 CD8 和 B220 细胞比例未见显著变化。辐射对小鼠免疫系统损伤的远期影响有待进一步研究。

**【关键词】**  $\gamma$  射线; 辐射损伤; 免疫系统; 小鼠, 近交 C57BL; 脂多糖类

**The long-term effects of high  $\gamma$ -ray dose on the mice immune system** LI De-guan, WANG Yue-ying, WU Hong-ying, LU Lu, WANG Xiao-chun, ZHANG Heng, FAN Fei-yue, MENG Ai-min. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

Corresponding author: MENG Ai-min, Email: ai\_min\_meng@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the long-term effects of high  $\gamma$ -ray dose on the mice immune system to stimulation of lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The mice were randomly divided into sham-irradiation group and irradiation group. Mice in sham-irradiation group received no irradiation, while mice in irradiation group received 6 Gy  $\gamma$ -ray irradiation. The mice were accepted intraperitoneal injection of LPS (20 mg/kg) in LPS treated group at 10 weeks after irradiation, while the mice in control group were accepted intraperitoneal injection of saline. The mice were sacrificed after 1 h and 24 h respectively. The white blood cells, CD4, CD8 and B220 cells in peripheral blood were detected. The index of spleen and thymus were calculated and the number of bone marrow nucleated cells per femur were counted. **Results** Compared to the mice in sham-irradiation-control group, the ratio of CD4 cells in irradiation-control group increased ( $t=2.940, P<0.05$ ), while the CD8 and B220 cells decreased ( $t=6.485$  and  $4.351$ , both  $P<0.01$ ). Compared to the mice in sham-irradiation-LPS 1h group, the ratio of CD4 ( $t=2.510, P<0.05$ ), CD8 ( $t=2.862, P<0.05$ ) and B220 ( $t=7.074, P<0.01$ ) cells in irradiation-LPS 1 h group significantly decreased. Compared to the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2012.02.013

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(2011CB964800-G); 国家自然科学基金(81072237, 81102873); 天津市自然科学基金(12JCQNJC09100)

**作者单位:** 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室

**通信作者:** 孟爱民 (Email: ai\_min\_meng@126.com)

mice in sham-irradiation-LPS 24 h group, the number of bone marrow nucleated cells in irradiation-LPS 24h group significantly increased ( $t=2.078, P<0.05$ ). **Conclusions** The immune system of mice had not entirely recovered at 10 weeks after 6 Gy  $\gamma$ -ray irradiation. After the stimulation of LPS, the changes of thymus index and CD8, B220 cells numbers were less in the mice of irradiation group than the sham-irradiation group. The long-term effects of radiation on the mice immune system need to be further explored.

**【Key words】** Gamma rays; Radiation injuries; Immune system; Mice, inbred C57BL; Lipopolysaccharides

免疫系统对电离辐射极为敏感, 电离辐射会导致机体免疫系统损伤, 严重者会出现持久性的骨髓造血抑制, 进而导致免疫系统功能低下。小鼠受照后 2 个月, 外周血白细胞计数基本恢复<sup>[1-2]</sup>, 但免疫系统功能是否恢复仍有待进一步研究。本研究在小鼠接受 6 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线一次性全身照射后 10 周, 利用革兰氏阴性菌内毒素脂多糖进行刺激, 观察受照小鼠免疫系统对严重感染的应激能力, 进而探讨亚致死剂量 6 Gy  $\gamma$  射线照射对小鼠免疫系统的远期影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

C57BL/6 纯系小鼠, 雄性, 体质量为 18~22 g, 由北京维通利华实验动物中心提供。乙二胺四乙酸三钾、脂多糖购自美国 Sigma 公司。异硫氰酸荧光素标记的小鼠 CD4 抗体、藻红蛋白标记的小鼠 CD8 抗体和藻红蛋白-花青染料分子标记的小鼠 B220 抗体购自美国 Ebioscience 公司。 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源由加拿大原子能有限公司提供, 剂量率为 0.78 Gy/min。Coulter Altra 型流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品, poch-100i 型全自动血液分析仪为日本 sysmex 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

将 30 只 C57BL/6 雄性小鼠分为 6 组, 每组 5 只: 假照射对照组、假照射+脂多糖 1 h 组、假照射+脂多糖 24 h 组、照射对照组、照射+脂多糖 1 h 组、照射+脂多糖 24 h 组。假照射各组不接受照射, 照射各组给予 6 Gy  $\gamma$  射线照射。照射后 10 周, 脂多糖 24 h 组小鼠提前 24 h 腹腔注射脂多糖 (20 mg/kg, 100  $\mu\text{L}$ /只), 脂多糖 1 h 组小鼠提前 1 h 腹腔注射脂多糖, 对照组小鼠提前 1 h 腹腔注射等量的生理盐水。随后同时处死小鼠, 取材进行检测。

#### 1.2.2 白细胞和骨髓有核细胞计数

取外周血后用乙二胺四乙酸三钾抗凝, 冲洗单侧股骨, 用全自动血液分析仪检测外周血白细胞和骨髓有核细胞计数。

#### 1.2.3 脏器指数测定

处死小鼠前称重, 随后取各小鼠脾脏、胸腺称重, 计算脾脏和胸腺的脏器指数。

#### 1.2.4 外周血细胞分型测定

取 50  $\mu\text{L}$  抗凝血加入到 1 ml 血细胞裂解液中, 剧烈震荡混匀, 避光放置 15 min。按 10 ml/L 血清加入磷酸缓冲溶液洗涤 2 次, 以离心半径为 13.5 cm, 1000 r/min 离心 5 min。弃上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  磷酸缓冲溶液悬起细胞后, 再加入相应抗体混匀, 避光孵育 15 min。最后加入 400  $\mu\text{L}$  的磷酸缓冲溶液或者鞘液, 混匀后过 200 目滤网滤入流式管, 上机检测。并用 EXPO32 软件进行检测及配套的 EXPO32 Analysis 软件进行分析。

#### 1.2.5 统计学分析

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  来表示, 两组数据之间比较采用 Excel 软件中的非配对双边  $t$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 6 Gy $\gamma$ 射线照射对小鼠外周血白细胞和骨髓有核细胞计数的远期影响

小鼠在接受 6 Gy  $\gamma$  射线照射后 10 周, 分别提前 24 h 和 1 h 腹腔注射脂多糖, 最后同时收集血样和单侧股骨细胞进行检测, 小鼠外周血白细胞和单侧股骨有核细胞计数结果见表 1。假照射+脂多糖 1 h 组与照射+脂多糖 1 h 组小鼠的白细胞数目与各自的对照组相比均急剧下降 ( $t=10.009$  和 4.538,  $P$  均  $<0.01$ ), 但照射+脂多糖 24 h 组白细胞数日基本恢复。假照射组与照射组小鼠在接受脂多糖刺激后, 仅照射+脂多糖 24 h 组出现单侧股骨有核细胞

数升高 ( $t=2.078$ ,  $P<0.05$ ), 其余组均未见明显变化, 说明小鼠在 6 Gy  $\gamma$  射线照射后 10 周, 外周血白细胞和骨髓有核细胞损伤基本恢复。

表1 6 Gy  $\gamma$  射线全身照射后 10 周假照射组和照射组小鼠外周血白细胞和单侧股骨有核细胞计数 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	个体数	白细胞 ( $10^9/L$ )	骨髓有核细胞 ( $10^6/股骨$ )
假照射对照组	5	5.37 $\pm$ 0.92	27.9 $\pm$ 2.3
假照射+脂多糖 1 h 组	5	1.52 $\pm$ 0.16	29.9 $\pm$ 5.3
假照射+脂多糖 24 h 组	5	3.00 $\pm$ 0.37	26.1 $\pm$ 8.8
照射对照组	5	4.30 $\pm$ 1.92	18.4 $\pm$ 1.0
照射+脂多糖 1 h 组	5	0.38 $\pm$ 0.21	20.1 $\pm$ 8.1
照射+脂多糖 24 h 组	5	4.29 $\pm$ 1.50	35.6 $\pm$ 5.2

2.2 6 Gy  $\gamma$  射线照射对小鼠脾脏和胸腺脏器指数的远期影响

6 Gy  $\gamma$  射线照射对小鼠脾脏和胸腺脏器指数的远期影响结果见表 2。在接受脂多糖刺激 1 h 和 24 h 后, 假照射+脂多糖 1 h 组和假照射+脂多糖 24 h 组小鼠脾脏指数较假照射对照组分别提高了 118% 和 128%, 差异均有统计学意义 ( $t=1.650$  和 1.607,  $P$  均 $<0.05$ ), 而照射+脂多糖 1 h 组和照射+脂多糖 24 h 组小鼠脾脏指数较照射对照组分别提高了 31% 和 57%, 仅照射+脂多糖 24 h 组与照射对照组差异有统计学意义 ( $t=4.488$ ,  $P<0.01$ ); 假照射+脂多糖 1 h 组和假照射+脂多糖 24 h 组小鼠胸腺指数较假照射对照组分别下降了 17% 和 28%, 差异均有统计学意义 ( $t=2.839$  和 3.181,  $P$  均 $<0.05$ ), 而照射+脂多糖 1 h 组和照射+脂多糖 24 h 组小鼠胸腺指数与照射对照组相比未见明显变化。

表2 6 Gy  $\gamma$  射线全身照射后 10 周假照射组和照射组小鼠脾脏和胸腺脏器指数 [ $(\bar{x}\pm s)$ mg/g]

组别	个体数	脾脏指数	胸腺指数
假照射对照组	5	2.34 $\pm$ 0.17	1.84 $\pm$ 0.14
假照射+脂多糖 1 h 组	5	5.10 $\pm$ 1.31	1.53 $\pm$ 0.20
假照射+脂多糖 24 h 组	5	5.34 $\pm$ 0.37	1.33 $\pm$ 0.33
照射对照组	5	3.05 $\pm$ 0.55	1.77 $\pm$ 0.13
照射+脂多糖 1 h 组	5	3.99 $\pm$ 0.74	1.42 $\pm$ 0.24
照射+脂多糖 24 h 组	5	4.79 $\pm$ 0.67	1.47 $\pm$ 0.33

2.3 6 Gy  $\gamma$  射线照射对小鼠外周血淋巴细胞分型的远期影响

6 Gy  $\gamma$  射线照射对小鼠外周血淋巴细胞分型的远期影响结果见表 3。与假照射对照组相比, 照射

对照组小鼠 CD4 细胞比例升高 ( $t=2.940$ ,  $P<0.05$ ), B220 细胞和 CD8 细胞比例降低 ( $t=4.351$  和 6.485,  $P$  均 $<0.01$ ); 与假照射+脂多糖 1 h 组相比, 照射+脂多糖 1 h 组小鼠 CD4 ( $t=2.510$ ,  $P<0.05$ )、CD8 ( $t=2.862$ ,  $P<0.05$ ) 和 B220 ( $t=7.074$ ,  $P<0.01$ ) 细胞比例均明显降低。与假照射对照组相比, 假照射+脂多糖 1 h 组和假照射+脂多糖 24 h 组的 CD4、CD8 细胞比例升高, B220 细胞比例显著降低; 而与照射对照组相比, 照射+脂多糖 1 h 组和照射+脂多糖 24 h 组的 CD4、B220、CD8 细胞比例均未见显著变化。

表3 6 Gy  $\gamma$  射线全身照射后 10 周假照射组和照射组小鼠淋巴细胞分型 [ $(\bar{x}\pm s)\%$ ]

组别	个体数	CD4 细胞	CD8 细胞	B220 细胞
假照射对照组	5	12.1 $\pm$ 0.9	11.7 $\pm$ 0.8	50.6 $\pm$ 6.5
假照射+脂多糖 1 h 组	5	26.4 $\pm$ 6.0	15.9 $\pm$ 2.1	40.0 $\pm$ 5.4
假照射+脂多糖 24 h 组	5	23.6 $\pm$ 2.0	15.2 $\pm$ 1.5	16.2 $\pm$ 7.1
照射对照组	5	21.9 $\pm$ 7.4	8.8 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 12.2
照射+脂多糖 1 h 组	5	19.4 $\pm$ 1.7	11.0 $\pm$ 3.2	20.9 $\pm$ 2.7
照射+脂多糖 24 h 组	5	20.0 $\pm$ 4.1	8.7 $\pm$ 2.3	20.4 $\pm$ 6.3

3 讨论

免疫系统对辐射极为敏感, 当小鼠受到照射后, 脾脏、胸腺等免疫器官及淋巴细胞会受到损伤并导致免疫功能下降, 且其恢复也很缓慢<sup>[2-3]</sup>。脂多糖进入人或其他敏感动物体内, 将对宿主各系统、器官产生广泛的影响, 可用于检测免疫系统对感染的应激能力<sup>[4]</sup>。本研究利用脂多糖进行刺激, 观察亚致死剂量 6 Gy  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线一次性全身照射对小鼠免疫系统的远期影响。

外周血白细胞是免疫系统的重要检测指标之一。本研究结果表明, 小鼠在接受 6 Gy  $\gamma$  射线照射后 10 周, 外周血白细胞和骨髓细胞的辐射损伤已基本恢复。对外周血淋巴细胞分型进行检测, 结果发现假照射组小鼠对脂多糖刺激有不同的反应, 照射组小鼠对脂多糖刺激无显著变化, 这与 Pecant 等<sup>[5-7]</sup>的研究结果一致。对脾脏与胸腺两个主要免疫器官进行称重发现<sup>[8]</sup>, 与假照射组相比, 照射组小鼠脾脏指数与胸腺指数在受脂多糖刺激前后均未见显著变化。在受脂多糖刺激 24 h 后, 照射组与假照射组的脾脏指数均增加, 假照射组的胸腺指数显著下降, 而照射组未见明显变化。说明小鼠在受

照后 10 周, 脾脏辐射损伤已基本恢复, 而胸腺辐射损伤仍未恢复, 这也与小鼠外周血淋巴细胞的分型测定结果一致。

总之, 本研究探讨了亚致死剂量 6 Gy  $\gamma$  射线全身照射对小鼠免疫系统的远期影响。研究结果表明, 在小鼠受照后 10 周, 受照小鼠胸腺对脂多糖刺激无反应, 与假照射组脂多糖刺激后胸腺指数显著下降存在显著差异, 受照小鼠 CD8 和 B220 的细胞比例在受脂多糖刺激前后均显著低于假照射组。结果表明一次性大剂量受照后, 尽管小鼠白细胞和骨髓有核细胞计数基本恢复, 但是小鼠胸腺和外周血中 CD8 和 B220 细胞比例仍未完全恢复。一次性  $\gamma$  射线照射对免疫系统的远期影响有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, et al. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 348-356.
- [2] 崔玉芳, 丁彦青, 徐茵, 等. 大剂量  $\gamma$  线照射对小鼠免疫功能近期、远期的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, 2(6): 675-677.
- [3] Lu J, Guan S, Shen X, et al. Immunosuppressive activity of 8-gingerol on immune responses in mice. *Molecules*, 2011, 22, 16(3): 2636-2645.
- [4] 路璐, 王月英, 李德冠, 等. LPS 对辐射暴露后小鼠血清 IL-10、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平的影响. *中国辐射卫生*, 2010, 19(3): 265-266.
- [5] Pecaut MJ, Dutta-Roy R, Miller GM, et al. Radiation and primary immune response to lipopolysaccharide: lymphocyte distribution and function. *In Vivo*, 2007, 21(3): 463-470.
- [6] Pecaut MJ, Gridley DS. Radiation and secondary immune response to lipopolysaccharide. *In Vivo*, 2008, 22(4): 423-434.
- [7] 李德冠, 王月英, 路璐, 等. 辐射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(12): 1362-1363.
- [8] 习忻, 刘韩英, 徐早早, 等. 五鹤续断对辐射损伤小鼠保护作用的研究. *国际放射医学核医学杂志*, 2011, 34(2): 116-119.

(收稿日期: 2012-02-10)

## ·消息·

### 全国放射卫生标准宣贯培训班第一轮通知

为贯彻落实新修订《中华人民共和国职业病防治法》及相关法律法规, 推进我国放射卫生标准广泛应用, 按照《卫生部监督局关于印发<2012 年全国放射卫生教育培训计划>的通知》(卫监督放便函[2012]114 号)安排, 受卫生部委托, 中国医学科学院放射医学研究所定于 2012 年 7 月中旬在云南丽江举办全国放射卫生标准宣贯培训班。培训班将授予国家级医学继续教育 I 类学分 10 分, 并颁发结业证书。培训内容: (1)内照射放射诊断标准; (2)放射性甲状腺疾病诊断标准; (3)放射性疾病诊断标准体系研究进展; (4)新修订《中华人民共和国职业病防治法》法律的解读。欢迎全国放射性疾病诊断机构、疾病预防控制中心、监督中心、国家及省级核辐射救治基地以及从事放射医学基础和临床救治的相关人员参加。

有关培训班具体事宜的正式通知请见中国医学科学院放射医学研究所网站 (<http://www.irm-cams.ac.cn/html/main.asp>)。联系人: 张颖珍 (022-85682236, 13803000723, Email: zhangyz12345@yahoo.cn), 余义 (022-85683034, 13920709252)。传真: 022-85682236, 022-85683033。