

[文章编号] 1671-587X(2011)06-0985-04

电离辐射对小鼠免疫器官不同亚群 T 淋巴细胞调节因子的影响

孙宝娟¹, 董娟聪², 王金虎³, 金顺子², 吴丛梅¹

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 吉林 长春 130012; 2. 吉林大学公共卫生学院
卫生部放射生物学重点实验室, 吉林 长春 130021; 3. 吉林大学第一医院儿外科, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的: 通过观察电离辐射作用后 Th1、Th2、Th3/Tr1 标志性细胞因子 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 10 (IL-10)、转化生长因子 β (TGF- β) 分泌量的变化, 探讨其细胞平衡与辐射剂量之间的关系。方法: 采用 ELISA 方法检测不同剂量 (低剂量组为 0.075、0.100 和 0.200 Gy, 高剂量组为 1.000、2.000、4.000 和 6.000 Gy, 同时设立假照组), X 射线全身照射小鼠 16 h 后, 脾脏和胸腺中 IFN- γ (Th1 型细胞因子)、IL-10 (Th2 型细胞因子)、TGF- β (Th3/Tr1 型细胞因子) 分泌量的变化。结果: 在低剂量辐射 (0.075~0.200 Gy) 照射后, 脾细胞分泌 IFN- γ 、TGF- β 与假照组比较有所下降, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而 IL-10 分泌量明显低于假照组 ($P<0.05$); 在高剂量辐射 (2.000~6.000 Gy) 照射后, 脾细胞分泌 IFN- γ 、IL-10、TGF- β 与假照组比较明显增多 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。胸腺细胞分泌变化与脾细胞不同, IFN- γ 、IL-10 分泌量在低剂量和高剂量辐射照射后均上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 而 TGF- β 分泌量在低剂量辐射照射后明显低于假照组 ($P<0.01$), 在高剂量辐射照射后明显高于假照组 ($P<0.01$)。结论: 高、低剂量辐射可影响小鼠免疫器官 Th3/Tr1 型细胞调节因子 TGF- β 的分泌, 在辐射诱导不同免疫效应中起关键作用。

[关键词] 电离辐射; T 细胞亚群; γ 干扰素; 白细胞介素 10; 转化生长因子 β

[中图分类号] Q691 **[文献标志码]** A

Effects of ionizing radiation on regulatory factors in different subsets of T lymphocytes of immune organs in mice

SUN Bao-wa¹, DONG Juan-cong², WANG Jin-hu³, JIN Shun-zi², WU cong-mei¹

(1. School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China;
2. Key Laboratory of Radiobiology, Ministry of Health, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Department of Pediatric Surgery, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To observe the changes of Th1, Th2 and Th3/Tr1 cytokines IFN- γ , IL-10 and TGF- β after treated with ionizing radiation, and explore the relationship between cell balance and radiation dose. **Methods** After whole-body irradiation with various doses (low dose: 0, 0.075, 0.100, 0.200Gy; high dose: 0, 1.000, 2.000, 4.000, 6.000 Gy) for 16 h, ELISA was used to detect the contents of IFN- γ (Th1-type cytokine), and IL-10 (Th2 type cytokine), TGF- β (Th3/Tr1 type cytokine) in spleen and thymus. **Results** Compared with sham irradiation control group, the IFN- γ and TGF- β levels in spleen cells were decreased after low-dose radiation (0.075–0.200 Gy), but there was no statistically significant difference ($P>0.05$); however the IL-10 secretion was significantly lower than that in sham irradiation group ($P<0.01$, $P<0.05$). After high-dose radiation (2.000–6.000 Gy), the IFN- γ , IL-10, and TGF- β levels in spleen cells were higher

[收稿日期] 2011-06-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30870584)

[作者简介] 孙宝娟 (1984—), 女, 吉林省长春市人, 在读理学硕士, 主要从事辐射免疫学研究。

[通信作者] 金顺子 (Tel: 0431-85619443, E-mail: shunzij@yahoo.com.cn);

吴丛梅 (Tel: 0431-85285956, E-mail: wucmyue@sina.com)

than those in sham irradiation group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The IFN- γ and IL-10 after low- or high-dose radiation expressed more than sham irradiation group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). But the TGF- β level was lower than that in sham irradiation group after radiation at low doses ($P < 0.01$), and it was significantly higher than that in sham irradiation group after exposed to high-dose radiation ($P < 0.01$). **Conclusion** High and low-dose radiation may influence the secretion of Th3/Tr1 type cells regulatory factor TGF- β of mouse immune organs and play a key role in different immune response effects induced by different doses of radiation.

Key words: ionizing radiation; T cells subsets; interferon- γ ; interleukin-10; transforming growth factor- β

最新的免疫学理论认为:辅助性 T 细胞 (Th) 按其分泌的细胞因子和功能可分为不同的亚群,即 Th1、Th2、Th3/Tr1 细胞^[1]。其中, Th1 细胞分泌白细胞介素 2 (IL-2) 和 γ 干扰素 (IFN- γ) 及淋巴毒素,促进巨噬细胞活化,参与调节细胞免疫,辅助细胞毒性 T 细胞分化,介导细胞免疫应答,参与迟发型超敏反应等; Th2 细胞主要分泌白细胞介素 4 (IL-4)、白细胞介素 6 (IL-6) 及白细胞介素 10 (IL-10) 等,介导体液免疫,促进抗体的生成; Th3/Tr1 细胞主要分泌转化生长因子 β (TGF- β),在免疫应答中起负性调节作用。IFN- γ 、IL-10、TGF- β 可作为区分 Th1、Th2、Th3/Tr1 细胞的细胞标志之一,而其之间的平衡在免疫调节过程中起很重要的作用^[2]。本实验选择小鼠中枢免疫器官胸腺和外周免疫器官脾脏作为主要研究对象,探讨不同亚群 T 细胞的动态平衡与辐射剂量之间的关系,揭示不同剂量辐射诱导不同免疫效应的细胞学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 昆明小鼠 60 只,雌雄各半,6~8 周龄,购于吉林大学实验动物中心。

1.2 照射条件 国产固定式 X 射线深部治疗机,单次高剂量 (1.0~6.0 Gy) 电压为 180 kV,电流 18 mA,靶皮距 60 mm,剂量率为 $0.34 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$; 单次低剂量 (0.075~0.200 Gy) 电压为 140 kV,电流 18 mA,靶皮距 178.5 mm,剂量率为 $12.79 \text{ mGy} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 样品处理 断头处死 X 射线照射 16 h 后的小鼠,取出胸腺、脾脏组织放入 EP 管中,称质量,按比例加入 $1 \times \text{PBS}$ 稀释。用组织匀浆器制备组织匀浆,用低温离心机 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清,以备检测。

1.4 细胞因子检测 采用 ELISA 试剂盒——Mouse IFN- γ ELISA Kit、Mouse IL-10 ELISA Kit 和 Mouse TGF- β ELISA Kit (均购置于美国

GBD 公司),用自动酶联免疫标记仪,在 450 nm 处检测 A 值。根据标准品绘制标准曲线,求出所测样本的相应浓度。每组设有 3 个平行样。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理,IFN- γ 、IL-10 和 TGF- β 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较应用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 不同剂量辐射后 16 h 小鼠脾脏、胸腺细胞分泌 IFN- γ 的变化 低剂量辐射后,脾细胞中 IFN- γ 分泌量无明显变化;高剂量辐射后,呈现不规律性变化。在胸腺细胞中,低剂量和高剂量辐射后 IFN- γ 分泌量均增多 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 辐射后 16 h 小鼠脾脏和胸腺细胞分泌 IFN- γ 的变化
Tab.1 The changes of IFN- γ in spleen and thymus cells 16 h after irradiation of mice [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_n / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	IFN- γ	
	Spleen	Thymus
Sham irradiation	56.23 \pm 4.88	33.91 \pm 1.97
Experiment(D/Gy)		
0.075	55.00 \pm 4.38	59.46 \pm 1.63*
0.100	57.53 \pm 2.28	49.96 \pm 2.33*
0.200	43.36 \pm 3.45*	41.16 \pm 2.61*
1.000	45.34 \pm 2.01*	67.78 \pm 3.49*
2.000	68.21 \pm 5.10*	70.99 \pm 4.96*
4.000	39.44 \pm 2.93*	93.97 \pm 3.47*
6.000	53.88 \pm 4.11	78.08 \pm 3.27*

* $P < 0.01$ vs sham irradiation group.

2.2 不同剂量辐射后 16 h 小鼠脾脏和胸腺分泌 IL-10 的变化 0.1~1.0 Gy 辐射后,脾脏分泌 Th2 型细胞因子 IL-10 明显低于假照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),随后逐渐增加,在 6.000 Gy 时明显高于假照组 ($P < 0.01$)。在 0.100~6.000 Gy 辐射后,胸腺分泌 IL-10 随着剂量的加大其分泌量逐渐增多,与假照组比较均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 不同剂量辐射后 16 h 小鼠脾脏、胸腺分泌 TGF- β 的变化 低剂量辐照后, 在脾脏中 Th3/Tr1 型细胞因子 TGF- β 分泌量无明显变化, 而在高剂量辐照后, 2.000 和 6.000 Gy 时其分泌量明显高于假照组 ($P < 0.01$); 在胸腺中, 0.075 ~ 0.200 Gy 范围内 TGF- β 分泌量明显下降 ($P < 0.01$), 而高剂量辐照后, TGF- β 分泌量明显高于假照组 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 辐射后 16 h 小鼠脾脏和胸腺分泌 IL-10 的变化
Tab.2 The changes of IL-10 in spleen and thymus cells 16 h after irradiation of mice [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	IL-10	
	Spleen	Thymus
Sham irradiation	54.83 \pm 0.60	27.98 \pm 4.66
Experiment(D/Gy)		
0.075	56.90 \pm 5.69	26.62 \pm 0.65
0.100	39.01 \pm 5.16*	59.31 \pm 4.66**
0.200	40.38 \pm 8.78*	77.20 \pm 10.33**
1.000	38.66 \pm 4.66*	69.98 \pm 2.07**
2.000	51.05 \pm 5.69	67.92 \pm 2.07**
4.000	53.46 \pm 4.13	81.33 \pm 6.20**
6.000	127.79 \pm 17.56**	127.45 \pm 25.30**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham irradiation group.

表 3 辐射后 16 h 小鼠脾脏和胸腺分泌 TGF- β 的变化
Tab.3 The changes of TGF- β in spleen and thymus cells 16 h after irradiation of mice [$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	TGF- β	
	Spleen	Thymus
Sham irradiation	116.37 \pm 9.17	67.66 \pm 3.10
Experiment(D/Gy)		
0.075	99.00 \pm 7.69	49.50 \pm 3.37*
0.100	106.72 \pm 6.11	20.09 \pm 4.34*
0.200	105.92 \pm 7.76	33.91 \pm 7.37*
1.000	118.13 \pm 5.11	64.93 \pm 2.10
2.000	189.66 \pm 18.24*	131.80 \pm 4.76*
4.000	87.11 \pm 2.68*	163.94 \pm 15.73*
6.000	162.01 \pm 7.49*	140.64 \pm 7.65*

* $P < 0.01$ vs sham irradiation group.

3 讨论

Mosmann 等^[3]应用 Th 细胞克隆培养技术和产生细胞因子的不同发现: 小鼠 CD4⁺ T 细胞群是一个不均一的亚群, 可分为 Th1 和 Th2 两个功能不同的独立亚群。Hideyuki 等^[4]的研究结果表明: Th1、Th2、Th3/Tr1 在机体内是相对平衡状态。机体在不同剂量辐照后, Th1、Th2、Th3/Tr1 亚群的变化在国内外报道甚少。本研究着重观察了小

鼠经不同剂量的 X 射线全身照射后, Th1、Th2、Th3/Tr1 的标志性细胞因子 IFN- γ 、IL-10、TGF- β 的分泌量变化, 探讨免疫器官中不同 T 细胞亚群的平衡与辐射剂量之间的关系。

辐射引发机体细胞和体液免疫功能低下的重要原因之一是受辐射后 T 细胞功能亚群数量和功能的变化^[5]。Th1 型细胞因子 IFN- γ 促进巨噬细胞活化, 参与调节细胞免疫, 辅助细胞毒性 T 细胞分化^[6]。本实验结果发现: 低剂量辐照后, 在脾脏中 IFN- γ 分泌量无明显变化, 而在高剂量辐照后, 呈不规律性变化; 在胸腺中不管是低剂量还是高剂量辐照, 均使 IFN- γ 分泌量增多。说明胸腺细胞分泌 IFN- γ 受到辐射影响较明显, 而脾细胞只在高剂量辐射时分泌量变化明显, 与剂量变化不相关。可能原因在于胸腺中含有大量的未成熟 T 细胞, 而脾脏中的细胞成分比较复杂, 而且存在的 T 淋巴细胞主要是以成熟的细胞为主, 因此胸腺对辐射比较敏感。

IL-10 具有多效性生物学活性, 对机体的免疫活性和炎症过程具有重要的调节作用。一方面介导体液免疫, 促进抗体的生成^[7]; 另一方面可间接促进 Th2 细胞增殖, 促进肥大细胞和胸腺细胞增殖。IL-10 能够抑制 T 淋巴细胞的激活及其细胞因子, 尤其是 Th1 细胞因子 (如 IL-2、IFN- γ) 的分泌, 诱导 T 淋巴细胞的免疫耐受, 抑制抗体依赖性 T 淋巴细胞的增生^[8]。本实验结果发现, 低剂量辐射降低脾脏分泌 IL-10, 在胸腺中 IL-10 分泌量变化不明显; 而高剂量辐射明显增加 IL-10 的分泌量, 特别是胸腺中的变化非常明显, 这可能与胸腺和脾脏的细胞成分不同有关, 因为胸腺中含有高比例的 (90% 左右) T 淋巴细胞, 而脾脏中除 T 淋巴细胞之外, 有很多抗原递呈细胞 (APC)。有文献报道: IL-10 对 T 细胞激活的负性调节作用是因为其对 APC 的免疫抑制作用所诱导。本实验结果表明: 高剂量辐射后 Th2 型细胞分化增多, 增强 IL-10 的分泌, 从而增强免疫抑制作用。

Th3/Tr1 型细胞因子 TGF- β 在免疫应答中起负性调节作用, 抑制 Th1 细胞介导的免疫应答反应^[9]。Treg 发挥抑制淋巴细胞活化作用的重要途径之一就是分泌相关细胞因子或诱导其他细胞分泌相关的细胞因子, 其中最为重要的是 TGF- β ^[10]。本实验结果发现: 低剂量辐照后, 在脾脏中 Th3/Tr1 型细胞因子 TGF- β 分泌量无明显变化, 而在高剂量辐照后, 2.000 和 6.000 Gy 时

其分泌量明显高于假照组 ($P < 0.01$); 在胸腺中, 0.075~0.200 Gy 范围内其分泌量明显下降, 而高剂量辐照后, TGF- β 分泌量明显高于假照组。说明胸腺细胞分泌 TGF- β 受到辐射影响较明显, 而脾细胞只在高剂量辐射时分泌量变化明显, 与剂量变化不相关。可能原因在于脾脏中细胞成分比较复杂, 低剂量照射对其影响不明显, 而高剂量时照射影响明显。胸腺中细胞成分相对单一, 因此胸腺对辐射比较敏感。

IFN- γ 、IL-10 和 TGF- β 是调节细胞和体液免疫功能的关键细胞因子, 三者之间相互作用共同调节机体的免疫平衡^[11-12]。本研究揭示了高、低剂量辐射诱导的免疫效应中 T 淋巴细胞不同亚群调节因子的作用, 为低剂量辐射兴奋效应理论提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] Halonen M, Lohman IC, Stern DA. TH1 / TH2 patterns and balance in cytokine production in the parents and infants of a large birth cohort [J]. *J Immunol*, 2009, 182 (5): 3285-3293.
- [2] Ward FJ, Hall AM, Cairns LS, et al. Clonal regulatory T cells specific for a red blood cell autoantigen in human autoimmune hemolytic anemia [J]. *Blood*, 2008, 111 (2): 680-687.
- [3] Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cell: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional

- properties [J]. *Ann Rev Immunol*, 1989, 7 (1): 145-173.
- [4] Ubukata H, Motohashi G, Tabuchi T, et al. Evaluations of interferon-g/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients [J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102 (2): 742-747.
- [5] 郑辉, 涂序珉, 甄荣, 等. 不同剂量辐射损伤后 T 淋巴细胞亚群 Th1 和 Th2 变化观察 [J]. *中国辐射卫生*, 2009, 18 (1): 13-15.
- [6] 吴春风, 马忠森, 王秀丽, 等. 特发性肺纤维化患者外周血单个核细胞 T 淋巴细胞亚群及 Th1/Th2 型细胞因子的检测 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2008, 34 (2): 282-284.
- [7] Fukui T, Matsui K, Kato H, et al. Significance of apoptosis induced by tumor necrosis factor- α and/or interferon-g against human gastric cancer cell lines and the role of the p53 gene [J]. *Surg Today*, 2009, 33 (3): 847-853.
- [8] 吴越菲, 孟刚, 唐梦, 等. FOXP3 调节性 T 细胞及 IL-10 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中的表达及其与预后的关系 [J]. *中国辐射卫生*, 2010, 46 (5): 462-466.
- [9] 余皎, 徐可树. TGF- β 家族在肝纤维化中的不同作用及对策 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 14 (28): 2789-2792.
- [10] 孟凡旭, 单玉兴, 董娟聪, 等. 不同剂量电离辐射对小鼠脾脏调节性 T 细胞及 TGF- β 1 表达的影响 [J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2011, 37 (3): 398-402.
- [11] Chen DY, Shi YW, Hua Y. Expression of transcription factor T-bet and GATA-3 in peripheral blood mononuclear cells and its correlation with immune status in esophageal cancer patients [J]. *Immunity*, 2009, 31 (3): 189-191.
- [12] Corthay A. How do regulatory T cells work [J]. *Scand J Immunol*, 2009, 70 (4): 326-336.

异物致回盲部穿孔并发阑尾炎 1 例报告

解放军第 208 医院 461 临床部普外科 (吉林 长春 130021) 高福智, 郝颜涛, 李峰龙

1 临床资料

患者, 男性, 30 岁。因间歇性腹部疼痛 1 个月, 加重 1 d, 以急性阑尾炎入院。患者缘于 1 个月前无明显诱因出现脐周隐痛, 疼痛呈间歇性, 每次约半小时, 无恶心、呕吐及腹泻。期间曾就诊于本市某医院, 行腹透检查诊断为“肠梗阻”, 门诊给予补液、抗炎等治疗, 症状缓解。后来症状仍时有发作, 未再诊治。入院前 1 d 患者再次出现腹痛, 以右下腹稍明显, 且逐渐加重。查体: 体温 37.5℃, 急性病容, 表情痛苦, 心肺未见异常, 腹部膨隆, 无胃肠型及蠕动波, 肝脾肋下未触及, 下腹部广泛压痛, 以右下腹麦氏点明显, 并有肌紧张及反跳痛。辅助检查: 白细胞 $11.6 \times 10^9 L^{-1}$, 中性粒细胞比率 78.9%。腹部彩超: 右下腹肠间隙可见液性暗区 0.7 cm。拟诊为: 急性阑尾炎; 局限性腹膜炎。立即在硬膜外麻醉下行阑尾切除术, 取麦氏切口, 长约 4 cm, 进腹后见腹腔有少量脓性渗出液, 右下腹局部严重黏连, 大网膜已包裹回盲部, 钝性分离黏连的大网膜及肠管, 于回盲部腹腔内触及一硬质异物, 取出后见为一枚完整竹质牙签, 长约 6 cm, 两端均锐利。沿结肠带找到阑尾, 阑尾长约 7 cm, 直径约 1 cm, 阑尾充血、水肿明显, 表面覆有脓苔, 常规切除阑尾, 清拭腹腔, 未发现回盲部明确的穿孔部位, 于右下腹置引流管一枚结束手术。术后诊断: 消化道异物穿孔; 急性化脓性阑尾炎; 局限性腹膜炎。病理诊断: 急性化脓性阑尾炎, 阑尾周围炎, 浆膜面炎症较重 (另有牙签 1 枚)。术后患者恢复顺利。

2 讨论

牙签致回盲部穿孔同时并发急性化脓性阑尾炎国内外尚未见报导。术后追问病史, 患者否认有吞服异物史, 但患者有大量饮酒嗜好及吃豆腐串史, 考虑为患者醉酒后误吞。牙签入胃后, 因胃壁较厚且容量大, 一般不易刺穿胃壁; 入小肠后, 因牙签较长、细、尖且硬, 肠腔相对狭小, 随着小肠蠕动, 可刺破肠壁致穿孔; 但牙签穿孔细小, 穿孔后流出的肠内容物不多, 一般不产生急腹症的症状及体征; 但异物及少量肠内容物入腹后可形成局部炎症反应, 包裹异物及形成炎性肿物。