

不同剂量辐射诱导小鼠胸腺 Th1-Th2-Th3 型细胞相关基因的功能分析

高辉 左斯尧 黄政基 韩海玲 董娟聪 张海芹 金顺子

【摘要】 目的 应用功能分类基因芯片技术,分析高、低剂量全身照射对小鼠胸腺细胞中 Th1、Th2 及 Th3/Tr1 各亚型功能相关基因的差异表达,探讨辐射免疫效应的分子机制。方法 健康 ICR 小鼠按随机数字表法分为低剂量组(0.075 Gy)、高剂量组(2.0 Gy)和假照组,于照射后 16 h 处死小鼠取胸腺组织,应用细胞因子与炎症反应 PCR 芯片技术进行 Th1-Th2-Th3 功能分类芯片分析。结果 低剂量(0.075 Gy)X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞中有 8 个基因表达上调,5 个基因表达下调;高剂量(2.0 Gy)X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞中有 54 个基因表达上调,3 个基因表达下调。具体有 Th 型细胞相关基因、Th2 型细胞相关基因、Th3/Tr1 型细胞相关基因、Th1/Th2 型免疫应答基因以及转录因子相关基因。其中,低剂量辐射诱导胸腺中的 Th1 型细胞相关基因 Stat4 和 Socs1 的表达上调,而对 Th2 型和 Th3/Tr 型细胞相关基因 IL-4ra、Cebpb、Gata3 及 Tgfb3 下调,最终导致 Th1 型免疫应答基因 Sftpd 上调。高剂量辐射均可诱导 Th1、Th2 和 Th3/Tr 型细胞相关基因的上调,但 Th1 型免疫应答基因表达无变化,而 Th2 型免疫应答相关基因 Cd86、IL-18、IL-10 以及 Irf4 上调。结论 低剂量辐射诱导 Th1 型免疫应答,而高剂量辐射诱导 Th2 型免疫应答。

【关键词】 辐射; 剂量; 辅助性 T 细胞; 功能分类芯片; 免疫应答

Analysis of Th1-Th2-Th3 related gene expressions in the thymus of mice irradiated with different doses Gao Hui, Zuo Siyao, Huang Zhengji, Han Hailing, Dong Juancong, Zhang Haiqin, Jin Shunzi. College of Public Medicine, Key Laboratory of Radiobiology, Ministry of Health, Jilin University, Changchun 130021, China

Corresponding author: Jin Shunzi, Email: jinsz@jlu.edu.cn

【Abstract】 Objective To analyze the effect of high and low dose radiation on the expressions of Th1, Th2 and Th3/Tr1 related-genes in mice thymocytes and investigate the possible underlying molecular mechanism. **Methods** ICR mice were randomly divided into low-dose group (0.075 Gy), high-dose group (2.0 Gy) and sham-control group. The mouse thymus tissue was extracted at 16 hours after irradiation and the expressions of Th1-Th2-Th3 related genes were measured by PCR array. **Results** Eight genes were up-regulated and five genes were down-regulated after low dose radiation (0.075 Gy); while 54 genes were up-regulated and three genes were down-regulated after high dose (2.0 Gy) radiation. These genes included Th1 cell related genes, Th2 cell related genes, Th3/Tr1 cell related genes, Th1/Th2 immune response genes and transcription factor related genes. Low dose radiation induced up-regulation of Stat4 and Socs1 of genes related to the Th1 cells, and it induced down-regulation of IL-4ra, Cebpb, Gata3 and Tgfb3 associated with Th2 and Th3 cells, which lead to Sftpd genes up-regulation of Th1 immune response eventually. The high dose radiation up-regulated all of Th1, Th2 and Th3/Tr related genes and also enhanced the expressions of Cd86, IL-18, IL-10 and Irf4 genes related to Th2 immune response, but it did not alter the gene expression of Th1 immune response. **Conclusions** Low-dose radiation induces Th1-type immune response, while high doses radiation triggers Th2 type immune response.

【Key words】 Radiation; Dose; Th cells; PCR array; Immune response

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.04.003
基金项目:国家自然科学基金(30870584, 81371890);教育部
高等学校博士学科点专项科研基金(20120061110063)
作者单位:130021 长春,吉林大学公共卫生学院 卫生部放射生
物学重点实验室
通信作者:金顺子,Email: jinsz@jlu.edu.cn

近年来的免疫学理论认为,辅助性 T 细胞(Th 细胞)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。其中,Th1 细胞主要分泌 IL-2 和 IFN- γ ,可以增强杀伤细胞的毒性作用等,促进巨噬细胞活化,参与调节细胞免疫,辅助细

胞毒性 T 细胞的分化,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 IL-4、IL-6、IL-10 等,介导体液免疫,促进抗体的生成;Th3/Tr1 细胞主要分泌 TGF-β,在免疫应答中起负性调节作用。大量的研究已证实,低剂量辐射(low dose radiation, LDR)与中等以上剂量的辐射诱导的生物效应截然不同,可刺激生物体或其组织的防御适应性功能,表现为一系列的适应性反应^[1]、激活免疫功能^[2-3],预防和治疗炎症性疾病^[4],其中 T 淋巴细胞的激活是辐射免疫效应的中心环节。本研究在以往研究结果的基础上,采用 Th1-Th2-Th3 功能分类芯片技术,检测并分析高、低剂量辐射诱导小鼠胸腺的 Th 细胞各亚型功能相关基因的差异表达。

材料与方 法

1. 实验动物及分组:ICR 健康小鼠,雌雄各半,6~8 周,18~22 g,购于吉林大学白求恩医学部实验动物中心,生产许可证批号 SCXK-吉 2008-0005,使用许可证批号 SCXK(吉)2008-0011。按随机数字表法分组为:假照组 4 只、低剂量(0.075 Gy)组 4 只和高剂量(2.0 Gy)组 8 只。

2. 照射条件:国产 X. S. S. 205(FZ)型固定式 X 射线深部治疗机(辽宁丹东市康嘉仪器设备有限公司),单次高剂量(2.0 Gy)照射,源皮距 60 cm,剂量率为 0.343 Gy/min;单次低剂量(0.075 Gy)照射,源皮距为 178.50 cm,剂量率为 12.5 mGy/min。小鼠均为全身照射。

3. 样品的处理:不同剂量 X 射线照射后 24 h,断头处死各组小鼠,取出胸腺组织入 EP 管中称重,

在液氮罐里保存,次日干冰送检(上海康城生物有限公司)。

4. RNA 质量检测:质量判断标准:对 RNA 进行定量,A260/A280 应为 1.8~2.0;有清晰的 18S 和 28S 的 RNA 条带,同时 28S 和 18S 的光度比应 >2。

5. 荧光定量 PCR 条件:37℃,15 min;聚合酶激活/变性 95℃,10 min。扩增 40 个循环,循环 1:(1×)95℃,15 s;循环 2:(40×)95℃,10 min。

6. 数据分析:以 Gapdh 为参比基因,对样品进行归一化处理。经软件分析,查看每个基因的扩增情况,导出相应的域值循环数 Ct 值。采用 ΔΔCt 相对定量方法估算出各个基因在各剂量组中的相对表达量。将对照的表达量作为 1,计算出相对量,进行样品间相对量的比较(定量比值)。照射组与假照组的比值 >2.0 为上调,<0.5 为下调。

结 果

1. 不同剂量辐射诱导 Th1-Th2-Th3 PCR Array 中差异表达基因分析:结果显示,低剂量(0.075 Gy)X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞中有 8 个基因表达上调,5 个基因表达下调;高剂量(2.0 Gy)X 射线全身照射后小鼠胸腺细胞中有 54 个基因表达上调,3 个基因表达下调。

2. 低剂量辐射诱导 Th1-Th2-Th3 细胞相关基因的功能分析:表 1 结果显示,低剂量辐射诱导胸腺中的 Th1 型细胞相关基因 Stat4 和 Socs1 的表达上调,而对 Th2 型和 Th3/Tr 型细胞相关基因 IL-4ra、Cebpb、Gata3 及 Tgfb3 的下调,最终导致 Th1 型免疫应答基因 Sftpd 上调。

表 1 0.075 Gy 辐射诱导小鼠胸腺 Th1-Th2-Th3 功能相关的差异表达基因

功能	基因符号	基因名称	倍数
Th1 型细胞相关基因			
上调	Stat4	信号转导及转录激活子 4	2.97
	Socs1	细胞因子信号传导抑制蛋白 1	2.22
下调	Tnf	肿瘤坏死因子	-2.09
Th2 型细胞相关基因			
上调	—		
下调	IL-4ra	白介素 4 受体, α	-3.25
	Cebpb	cAMP 反应元件结合蛋白	-3.02
	Gata3	GATA 结合蛋白 3	-2.20
Th3/Tr1 型细胞相关基因			
上调	—		
下调	Tgfb3	转化生长因子,β 3	-4.03
Th1 型免疫应答基因			
上调	Sftpd	表面活性物质相关蛋白 D	2.54
下调	—		

注:“—”为无上调或下调基因;倍数为 0.075 Gy 辐射诱导下该基因与未照射时基因表达的倍数关系

表 2 2.0 Gy 辐射诱导小鼠胸腺 Th1-Th2-Th3 功能相关的差异表达基因

功能	基因符号	基因名称	倍数	功能	基因符号	基因名称	倍数
Th1 型细胞相关基因				Th2 型细胞相关基因			
上调	Ifng	干扰素 γ	13.14	上调	Il-10	白介素 10	5.27
	Il-2ra	白介素 2 受体, α 链	13.00		Ccr3	趋化因子受体 3	4.87
	Ccr5	趋化因子受体 5	9.51		Tlr4	Toll-样受体 4	4.06
	Il-18bp	白介素 18 结合蛋白	8.24		Maf	肌腱膜纤维肉瘤 AS42 癌基因同源物	3.11
	Tbx21	T-盒 21	7.68		Irf4	干扰素调节因子 4	2.80
	Stat1	信号转导及转录激活子 1	5.96		Cebpb	cAMP 反应元件结合蛋白	2.51
	Il-18	白介素 18	5.63		Ccl11	趋化因子配体 11	2.18
	Stat4	信号转导及转录激活子 4	5.61		Jak1	Janus 激酶 1	2.02
	Igsf6	免疫球蛋白超家族成员 6	5.34	下调	Il-4ra	白介素受体 4, α	-5.17
	Il-12b	白介素 12B	4.83		Ccr4	趋化因子受体 4	-2.79
	Irf1	干扰素调节因子 1	4.28		Gfi1	独立生长因子 1	-2.02
	Socs1	细胞因子信号传导抑制蛋白 1	3.03	Th3/Tr1 型细胞相关基因			
	Tnf	肿瘤坏死因子	3.00	上调	Il-23a	白介素 23, α 亚组 p19	4.03
	Socs5	细胞因子信号传导抑制蛋白 5	2.89		Il-17a	白介素 17A	2.18
	Il-18r1	白介素 18 受体 1	2.77		Tgfb3	转化生长因子, β 3	2.18
	Csf2	集落刺激因子 2	2.07	下调	—	—	—
	Il-2	白介素 2	2.06	Th2 型免疫应答基因			
下调	—	—	—	上调	Cd86	CD86 抗原	7.26
Th2 型细胞相关基因					Il-18	白介素 18	5.63
上调	Ccl7	趋化因子配体 7	11.14		Il-10	白介素 10	5.27
	Il-5	白介素 5	8.74		Irf4	干扰素调节因子 4	2.80
	Ccl5	趋化因子配体 5	7.17	下调	—	—	—
	Il-13ra1	白介素 13 受体, α 1	5.88				

注:“—”为无下调基因;倍数为 2.0 Gy 辐射诱导下该基因与未照射时基因表达的倍数关系

3. 高剂量辐射诱导 Th1-Th2-Th3 细胞相关基因的功能分析:表 2 结果显示,2.0 Gy 辐射均可诱导 Th1 型、Th2 型和 Th3/Tr 型细胞相关基因的上调,但 Th1 型免疫应答基因表达无变化,而 Th2 型免疫应答相关基因 Cd86、IL-18、IL-10 以及 Irf4 的上调。

4. 不同剂量辐射诱导 Th1-Th2-Th3 细胞转录因子及相关基因的分析:表 3 结果显示,低剂量辐射诱导转录因子 Stat4 的上调及 Cebpb 和 Gata3 的下调,高剂量辐射可诱导转录因子相关基因 Tbx21、Stat1、Stat4、Irf1、Nfkb1 和 Cebpb 的上调,但无下调基因。

讨 论

胸腺是 T 淋巴细胞分化成熟的重要中枢免疫器官,也是电离辐射作用高度敏感的靶器官之一。因此,胸腺细胞的辐射反应是辐射免疫学研究的重点之一。不同剂量的电离辐射作用于机体可产生不同的生物效应,中等剂量以上的电离辐射对机体

表 3 高、低剂量辐射诱导小鼠胸腺 Th1-Th2-Th3 细胞转录因子相关的差异表达基因

不同剂量下功能	基因简名	基因简述	倍数
0.075 Gy			
上调	Stat4	信号转导及转录激活子 4	2.97
下调	Cebpb	cAMP 反应元件结合蛋白	-3.02
	Gata3	GATA 结合蛋白 3	-2.20
2.0 Gy			
上调	Tbx21	T-盒 21	7.68
	Stat1	信号转导及转录激活子 1	5.96
	Stat4	信号转导及转录激活子 4	5.61
	Irf1	干扰素调节因子 1	4.28
	Nfkb1	对轻肽基因增强子核因子 1, p105	2.79
	Cebpb	cAMP 反应元件结合蛋白	2.51
下调	—	—	—

注:“—”为无下调基因;倍数为 0.075 和 2.0 Gy 辐射诱导下该基因与未照射时基因表达的倍数关系

产生有害的影响已众所周知,而低剂量的电离辐射效应与之相反,目前仍是辐射研究领域研究的热点。联合国原子辐射效应科学委员会(UNSCEAR)1986 年报告指出,低水平辐射是指 0.05 Gy 以内的

高传能线密度 (LET) 辐射或 0.2 Gy 以内的低 LET 辐射, 辐射剂量率均应 < 0.05 mGy/min。目前大量的实验研究已证实低剂量电离辐射可以引起机体免疫功能的增强^[5-6]。

功能分类芯片由于针对性比较强, 避免了表达谱芯片中无关基因的干扰, 其准确性和灵敏度更高, 因此, 在辐射免疫学研究中有应用增多的趋势。最新发展的 PCR 功能分类芯片^[7], 把实时定量 PCR 技术与基因芯片技术结合, 能在同一张芯片上对上百个基因的 mRNA 表达水平准确定量检测。该芯片技术克服了先前应用的差异显示 PCR 方法的假阳性率高、重复性差及对高拷贝基因有偏向性的缺点。本研究通过 Th1-Th2-Th3 功能分类芯片的结果分析发现, 低剂量 X 射线主要上调诱导 Th1 细胞中起重要作用的转录激活子 4 (signal transducer and activators of transcription, Stat4), 同时下调 Th2 细胞的重要转录因子 GATA 结合蛋白 3 (Gata3) 和 Th3/Tr1 细胞的标志性细胞因子 TGF- β , 促使 T 细胞向 Th1 细胞分化, 诱导 Th1 型免疫应答, 最终提高免疫功能。

近年来的研究表明, 当 IL-12 通过 STAT4 的信号途径可使 CD4⁺ 细胞的分化为 Th1 细胞, 而 IL-4 则通过 Stat6 的信号途径诱导 Th0 细胞分化为 Th2 细胞, 并发现这些细胞因子的信号途径对 Th1/Th2 细胞的极化是与不同 SOCS 成员的表达有关^[8]。如 Th 分化为 Th1 型细胞时, SOCS1 的表达可比 Th2 高出 2 倍; 分化为 Th2 型细胞则表达 SOCS3, 其表达量可比 Th1 细胞高出 23 倍^[9]。在本研究结果中发现, 2.0 Gy 辐射照射后 SOCS3 的表达高于假照组 11.95 倍, 而 SOCS1 却上调 3.03 倍, 说明高剂量照射可能主要通过 SOCS3 的表达上调, 向 Th2 型细胞分化。

另外, 本研究结果显示, 高剂量辐射上调的基因还有正向调节的细胞因子 (IL-12b、IL-15、IL-18、Gm-CSF 等) 和负向调节的细胞因子 (IL-5、TGF- β 、IL-10、IL-6、IL-17、IL-23 等) 以及负向调节的共刺激

分子 (CTLA-4), 同时下调在 Th 2 细胞分化早期起重要作用的 Gfi-1 基因和 CD124 (IL-4ra), 使 T 细胞主要向 Th3/Tr1 细胞分化, 诱导 Th2 型免疫应答, 抑制机体免疫反应。本实验结果将为辐射免疫学理论增添新的实验依据。

参 考 文 献

- [1] Iyer R, Lehnert BE. Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells[J]. *Mutat Res*, 2002, 503(1-2): 1-9.
- [2] Ina Y, Sakai K. Activation of immunological network by chronic low-dose-rate irradiation in wild-type mouse strains: analysis of immune cell populations and surface molecules[J]. *Int J Radiat Biol*, 2005, 81(10): 721-729.
- [3] Lacoste-Collin L, Joazan S, Cances-Lauwers V, et al. Effect of continuous irradiation with a very low dose of gamma rays on life span and the immune system in SJL mice prone to B-cell lymphoma[J]. *Radiat Res*, 2007, 168(6): 725-732.
- [4] Otani A, Kojima H, Guo C, et al. Low-dose-rate, low-dose irradiation delays neurodegeneration in a model of retinitis pigmentosa[J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(1): 328-336.
- [5] Shan YX, Jin SZ, Liu XD, et al. Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose-response relationship, mechanisms and implications[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2007, 46(1): 21-29.
- [6] Dong JC, Cheng GH, Shan YX, et al. Role of PLC-PIP2 and cAMP-PKA signal pathways in radiation-induced immune-suppressing effect [J]. *Biomed Environ Sci*, 2014, 27(1): 27-34.
- [7] Lim J, Derrick SC, Kolibab K, et al. Early pulmonary cytokine and chemokine responses in mice immunized with three different vaccines against *Mycobacterium tuberculosis* determined by PCR array[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(1): 122-126.
- [8] Tang Y, Chen X, Zhang Y, et al. Fusion protein of tapasin and hepatitis B core antigen 1827 enhances T helper cell type 1/2 cytokine ratio and antiviral immunity by inhibiting suppressors of cytokine signaling family members 1/3 in hepatitis B virus transgenic mice[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(4): 1171-1178.
- [9] Sporri B, Kovanen PE, Sasaki A, et al. JAB/SOCS1/SSI-1 is an interleukin-2-induced inhibitor of IL-2 signaling[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 221-226.

(收稿日期: 2014-08-29)