

电离辐射对小鼠胸腺 Th17 细胞相关细胞因子的影响

魏威 陈海燕 邵立虹 史涛 高辉 董卓 金霖霖 赵刚 申延男 金顺子

【摘要】 目的 通过研究电离辐射对小鼠胸腺 Th17 细胞相关细胞因子的影响,探讨高、低剂量辐射诱导不同的免疫效应中 Th17 细胞功能。**方法** 将健康 ICR 小鼠按随机数字表法分为健康对照组、低剂量照射组(0.05、0.075 Gy)和高剂量照射组(0.5、1.0、2.0、4.0 Gy)探讨剂量-效应关系,用 X 射线深部治疗机进行不同剂量的全身照射,于照射后 24 h 处死。同时,探讨时间-效应关系,即分为健康对照组、低剂量照射组(0.075 Gy)和高剂量照射组(2.0 Gy),于照射后 12、24、48 h 处死,取胸腺组织制备成组织匀浆,ELISA 法检测小鼠胸腺细胞中白介素-17a(IL-17a)与白介素-21(IL-21)的浓度。**结果** 在时间-效应结果中,与健康对照组相比,0.075 Gy 照射组胸腺细胞 IL-17a 和 IL-21 分泌量呈下降趋势,其分泌量于 48 h 降到最低($t = 3.85, 4.73, P < 0.05$);而 2.0 Gy 照射组均呈大幅度上升趋势,其分泌量在 48 h 达到最高($t = -6.74, -6.19, P < 0.05$);在剂量-效应结果中,与健康对照组相比,较低剂量照射组胸腺细胞 IL-17a 与 IL-21 分泌量下降,在 0.05 Gy 最低($t = 8.39, 16.45, P < 0.05$);较高剂量照射组胸腺细胞的分泌量上升,在 4.0 Gy 时升至最高($t = -15.60, -18.62, P < 0.05$)。**结论** 高剂量辐射可以诱导小鼠胸腺细胞 IL-17a 与 IL-21 分泌量的增加,而低剂量辐射使其下降,表明 Th17 细胞相关的细胞因子在低剂量辐射诱导的免疫功能增强效应和高剂量辐射诱导免疫抑制效应中起着重要的作用。

【关键词】 电离辐射; Th17 细胞; 细胞因子; 免疫功能

Effect of ionizing radiation on the cytokines of mouse thymus Th17 cells Wei Wei*, Chen Haiyan, Shao Lihong, Shi Tao, Gao Hui, Dong Zhuo, Jin Linlin, Zhao Gang, Shen Yannan, 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 study the cytokine releases in the thymus Th17 cells of irradiated mice, and to explore the function of Th17 cells in different immune responses to radiation of different doses. **Methods** According to the random number table method, ICR mice were divided into three groups i. e., healthy control group, low-dose group (0.05, 0.075 Gy) and high-dose group (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 Gy) to explore the dose-effect relationship. In the dose-effect group, the ICR mice exposed to different dosages of whole body X-ray irradiation were decapitated at 24 h after irradiation. Meanwhile, ICR mice were divided into three groups i. e., healthy control group, low-dose group (0.075 Gy) and high-dose group (2.0 Gy) to explore the time-effect relationship. The mice were decapitated after 12, 24, and 48 h of 0.075 and 2 Gy of whole body X-ray irradiation, then prepared for the thymus tissue homogenization. The expressions of IL-17a and IL-21 in the thymus tissue homogenization were detected by ELISA. **Results** For the time-effect, following a low dose irradiation of 0.075 Gy, the levels of IL-17a and IL-21 in the thymocytes continuously decreased along with the time post-irradiation and reached its lowest value at 48 h after radiation but it was still higher than that in the control group ($t = 3.85, 4.73, P < 0.05$); the expressions of these cytokines dramatically increased along with the time post-irradiation and reached to its highest level at 48 h after irradiation of 2.0 Gy ($t = -6.74, -6.19, P < 0.05$). For the dose-effect group, at 24 h after irradiation, the expressions of IL-17a and IL-21 in mouse thymocytes were lower than

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.10.003

基金项目: 国家自然科学基金(30870584, 81371890)

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(魏威、邵立虹、高辉、董卓、金霖霖、赵刚、申延男、金顺子);吉林大学第一医院(陈海燕);佳木斯大学附属第一医院(史涛)

通信作者: 金顺子, Email: jinsz@jlu.edu.cn

controls for low dose groups and had the lowest level at 0.05 Gy ($t = 8.39, 16.45, P < 0.05$), while they increased in the high dose groups and had the highest level at 4.0 Gy ($t = -15.60, -18.62, P < 0.05$).

Conclusions After irradiation, the secretions of IL-17a and IL-21 in mouse thymocytes are inhibited by low dose irradiation but triggered by higher doses, which indicates that Th17-related cytokines play an important role in immune suppression induced by a high dose radiation, while the immune function enhancement is induced by low dose radiation.

【Key words】 Ionizing Radiation; Th17 cells; Cytokines; Immune function

细胞因子是免疫细胞与基质细胞之间对话交流的媒介。辅助性 T 细胞 17 (Th17) 是新发现的一种 T 淋巴细胞亚群, 参与先天性免疫和获得性免疫反应, 其主要通过分泌 IL-17 细胞因子诱导白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等多种炎症因子高表达, 被认为是一群重要的介导炎症反应的细胞^[1-3]。转化生长因子 β (TGF- β)、IL-6、IL-23 及 IL-21 在 Th17 细胞的分化形成过程中起着积极的促进作用。因此, 研究不同剂量电离辐射对小鼠免疫细胞 Th17 细胞相关细胞因子的影响, 有助于阐明高、低剂量电离辐射诱导的免疫功能机制。本实验通过检测高、低剂量辐射全身照射的小鼠胸腺细胞 IL-17a 与 IL-21 的分泌量的时间-效应和剂量-效应变化, 探讨高、低剂量辐射诱导的免疫效应中 Th17 细胞功能。

材料与方 法

1. 实验动物: 健康 ICR 小鼠雌、雄各半, 体重 18 ~ 22 g, 购于吉林大学基础医学院实验动物中心, 许可证编号 SCXK (吉) 2013-0001。在时间-效应实验中, 将 ICR 小鼠按随机数字表法分为健康对照组、低剂量照射组 (0.075 Gy) 和高剂量照射组 (2.0 Gy), 低剂量照射组和高剂量照射组又分别分为 12、24、48 h 组, 每组 6 只, 于照射后 12、24、48 h 断头处死小鼠取胸腺组织; 在剂量-效应实验中, 将 ICR 小鼠按随机数字表法分为健康对照组、0.05、0.075、0.5、1.0、2.0、4.0 Gy 组, 每组 6 只, 于照后 24 h 断头处死小鼠取胸腺组织。

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), 单次剂量 0.5 ~ 4.0 Gy, 源靶距 60 cm, 吸收剂量率 0.343 Gy/min; 单次剂量 0.05 ~ 0.075 Gy, 源靶距 178.50 cm, 吸收剂量率 11.9 mGy/min。

3. 样品处理: 取每只小鼠的胸腺组织 1 g, 在冷生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 放入 10 ml 的小烧杯中, 用移液管量取预冷的 0.86% 生理盐水, 溶剂体积比为 1:9, 尽快剪碎组织块, 用玻璃匀

浆器进行粉碎, 取 10% 匀浆用低温离心机 1 500 r/min, 离心半径 11.5 cm, 离心 10 ~ 15 min 后, 留取上清 -80℃ 保存备用。

4. IL-17a 与 IL-21 分泌量的检测: 按照 ELISA 试剂盒操作方法 (鼠 IL-17a 和 IL-21 购于美国 Biotechnology 公司), 取组织匀浆上清液 100 μ l 加入到平底酶标板中, 每组设有 3 个平行样, 用 ELx800 自动酶联免疫标记仪 (美国 BioTek 公司), 450 nm 处检测吸光度 (A) 值。根据标准品绘制标准曲线, 求出所测样品的相应浓度。

5. 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。IL-17a 与 IL-21 分泌量数据进行 ANOVA 方差分析和独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠胸腺细胞 IL-17a 和 IL-21 分泌量的时-效变化: X 射线照射不同时间后小鼠胸腺细胞两种细胞相关因子表达的时-效变化结果列于表 1。由表 1 可知, 与健康对照组相比, 0.075 Gy X 射线照射后 IL-17a 的分泌量呈下降趋势, 并于 48 h 降至最低 ($t = 3.85, P < 0.05$); 而在 2.0 Gy X 射线照射后其分泌量随时间逐渐增多, 至 48 h 达最高 ($t = -6.74, P < 0.05$)。0.075 Gy X 射线照射后 IL-21 的分泌量呈下降趋势, 并于 48 h 降至最低 ($t = 4.73, P < 0.05$); 而在 2.0 Gy 照射后分泌量随时间上升, 并于 24 h 达到最高水平, 到 48 h 后仍处于高水平 ($t = -10.38, -6.19, P < 0.05$)。

2. 小鼠胸腺分泌 IL-17a 与 IL-21 浓度的量-效变化: X 射线不同剂量照射后小鼠胸腺细胞两种细胞相关因子表达的量-效变化结果列于表 2。由表 2 可知, 与健康对照组相比, 低剂量 (0.05 和 0.075 Gy) 全身照射后, 胸腺中 IL-17a 的表达均降低, 在 0.05 Gy 时达到最低 ($t = 8.39, P < 0.05$); 而较高剂量 (0.5、1、2 和 4 Gy) 全身照射后 IL-17a 的表达呈剂量依赖性上升趋势, 于 4.0 Gy 时达峰值 ($t = -15.60, P < 0.05$)。IL-21 表达的量-效变化与

IL-17a 的趋势相近,在 0.05 Gy 降至最低 ($t = 16.45, P < 0.05$);而较高剂量全身照射后逐渐呈剂量依赖性上升趋势,并于 4.0 Gy 处升至最高 ($t = -18.62, P < 0.05$),超过健康对照组水平的 4.5 倍。

表 1 X 射线照射不同时间后小鼠胸腺细胞 IL-17a 和 IL-21 表达的时-效变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-17a	IL-21
健康对照组	6	100.00 \pm 7.95	100.00 \pm 18.86
0.075 Gy 时效组			
照射后 12 h	6	87.55 \pm 4.45	75.75 \pm 7.81
照射后 24 h	6	83.29 \pm 0.43 ^a	57.46 \pm 13.87 ^b
照射后 48 h	6	76.82 \pm 6.75 ^a	43.28 \pm 3.37 ^b
2.0 Gy 时效组			
照射后 12 h	6	113.27 \pm 1.53	132.28 \pm 4.25
照射后 24 h	6	196.41 \pm 15.94 ^a	231.36 \pm 11.56 ^b
照射后 48 h	6	248.56 \pm 36.21 ^a	192.75 \pm 18.35 ^b

注:与同指标健康对照组比较,^a $t = 3.63, 3.85, -9.24, -6.74, P < 0.05$;^b $t = 3.05, 4.73, -10.38, -6.19, P < 0.05$

表 2 X 射线不同剂量照射后小鼠胸腺细胞 IL-17a 与 IL-21 表达的量-效变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IL-17a	IL-21
健康对照组	6	100.00 \pm 7.95	100.00 \pm 2.04
量效组(Gy)			
0.05	6	60.39 \pm 1.63 ^a	32.56 \pm 6.79 ^b
0.075	6	70.05 \pm 2.39	74.00 \pm 21.91
0.5	6	74.43 \pm 2.78	53.38 \pm 8.45 ^b
1.0	6	73.13 \pm 18.53	184.05 \pm 5.09 ^b
2.0	6	167.24 \pm 22.03 ^a	350.30 \pm 13.97 ^b
4.0	6	176.39 \pm 3.26 ^a	445.78 \pm 32.14 ^b

注:与同指标健康对照组比较,^a $t = 8.39, -4.92, -15.60, P < 0.05$;^b $t = 16.45, 9.17, -26.67, -30.75, -18.62, P < 0.05$

讨 论

近代免疫学理论认为,根据细胞的分化和功能将 CD4 + T 细胞分为 1 型和 2 型辅助性 T 细胞(Th)和调节性 T 细胞(Treg)^[4]。2005 年发现新型效应性 Th 细胞亚群—Th17 细胞,发现 Th17 细胞由 TGF- β 、IL-1、IL-6、IL-21、IL-23 所诱导,并分泌大量的 IL-17a、IL-17f 和 IL-22,在组织炎症和自身免疫疾病发生的过程中起到重要作用。

IL-17 是一种由活化的 T 细胞产生的致炎细胞因子,可以促进 T 细胞的激活并刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子,从而导致炎症的产生^[5-6]。Th17 的分化通过 TGF- β 和 IL-6 的共同作用来启动;新分化的 Th17 细胞通过其分泌的 IL-21 促进 Th17 的扩增,最后,Th17 细胞特征的稳定和维持是通过 IL-23 实现的。IL-6 是一个致炎

性因子,感染或局部炎症能产生大量的 IL-6 和 TGF- β ,可抑制巨噬细胞和淋巴细胞等细胞的免疫功能,发挥免疫负调控作用,从而能够维持免疫耐受的稳定状态^[7]。本实验中,较高剂量辐射诱导的 IL-17a 增多,其变化出现时间和剂量依赖现象,可能与 TGF- β 分泌增多有关,高剂量电离辐射可使小鼠免疫细胞 TGF- β 的表达量上升^[8],可能在 TGF- β 和 IL-6 的共同诱导下分化为 Th17^[9],使 IL-6 和 IL-17 的表达量升高,进而影响机体免疫功能。而低剂量电离辐射可以使负性调节因子 TGF- β 的表达量呈下降趋势^[10],并且使正向调节因子 γ 干扰素(IFN- γ)呈上升趋势^[11],从而使 IL-17a 分泌量显著下降,提示正向调节的细胞因子分泌的增加和负性调节因子的下降,可能是低剂量辐射兴奋效应的主要原因之一。已有研究发现,IFN- γ 可通过抑制 TGF- β 下游信号转导因子 Smad3 磷酸化,从而阻断 Smad3 对 TGF- β 受体的作用,进而干扰 TGF- β 诱导 Th17 细胞分化的过程,导致 IL-17 的分泌量降低,从而发挥免疫效应^[12]。

IL-21 是 IL-2 家族成员,由 Th17 细胞大量分泌,IL-21 与 TGF- β 协同促进 Th17 细胞的分化。Bettelli 等^[13]发现,在 IL-6 缺陷的条件下,TGF- β 和 IL-21 共存可促进 CD4 + T 细胞分化为 Th17 细胞,并释放 IL-21。进一步研究发现,在 Th1、Th2 细胞 IL-21 的分泌水平较低,而在 Th17 细胞 IL-21 则相反。本实验结果显示,较高剂量照射后小鼠胸腺细胞 IL-21 分泌量增加,可能与 TGF- β 的共同作用下,导致 IL-17a 的分泌量增加,从而参与诱导机体免疫功能的下降;相反,低剂量辐射对小鼠胸腺细胞分泌 IL-21 有抑制作用,因为 IL-21 是 Th17 的驱动因子,所以低剂量辐射可以抑制 Th17 的分化形成,从而降低 IL-17a 的表达。文献报道,较高剂量辐射可以诱导小鼠免疫细胞 TGF- β 的表达量上升^[10],幼稚 Th 细胞在 TGF- β 存在的情况下趋向于表达转录因子 Foxp3,从而分化为 Treg 细胞。在 TGF- β 和 IL-21 共同存在的情况下,能抑制 TGF- β 诱导的 Foxp3 的表达,从而阻止 Treg 细胞的分化,使得幼稚 T 细胞向 Th17 细胞分化。单独的 TGF- β 或者 IL-21 均不能使幼稚 T 细胞大量产生 IL-17a,只有两者同时作用才能引起 IL-17a 的大量分泌。本实验结果提示,较高剂量电离辐射可能通过增强 TGF- β 和 IL-21 的分泌量,共同促进 Th17 细胞的分化,从而诱导 IL-17a 的分泌,在抑制机体免疫功能

中发挥重要作用。

综上所述,胸腺细胞受到高、低剂量电离辐射作用后,Th17 细胞相关的细胞因子 IL-17a 和 IL-21 分泌量的变化完全相反,主要表现为低剂量照射后降低,而较高剂量照射后升高,从而为阐明辐射免疫学理论提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Chen O, Zhu X, Ren H, et al. The imbalance of Th17/Treg in Chinese children with Henoch-Schonlein purpura [J]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(1) : 67-71.
- [2] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells[J]. Nature, 2007, 448(7152) : 480-483.
- [3] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis[J]. Nature, 2007, 445(7128) : 648-651.
- [4] Moore-Connors JM, Fraser R, Halperin SA, et al. CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells promote Th17 responses and genital tract inflammation upon intracellular chlamydia muridarum infection[J]. J Immunol, 2013, 191(6) : 3430-3439.
- [5] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2006, 177(1) : 566-573.
- [6] Chen WS, Chang YS, Lin KC, et al. Association of serum interleukin-17 and interleukin-23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis [J]. J Chin Med Assoc, 2012, 75(7) : 303-308.
- [7] 陈俊伟,张少然,闫成兰,等. T 辅助细胞亚型细胞相关因子在类风湿关节炎发病中的作用[J]. 中国药物与临床, 2012, 12(4) : 420-423.
- [8] Dong JC, Cheng GH, Shan YX, et al. Role of PLC-PIP2 and cAMP-PKA signal pathways in radiation-induced immunosuppressing effect [J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(1) : 27-34.
- [9] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies[J]. Am J Pathol, 2012, 181(1) : 8-18.
- [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-β1 表达的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(3) : 398-402.
- [11] 李修义,陈玉丙,夏凤琴,等. 低剂量辐射对小鼠移植肿瘤生长和肿瘤诱生的影响[J]. 中国辐射卫生, 1996, 5(1) : 21-23.
- [12] McKarns SC, Schwartz RH. Distinct effects of TGF-β1 on CD4 + and CD8 + T cell survival, division, and IL-2 production; a role for T cell intrinsic Smad3 [J]. J Immunol, 2005, 174(4) : 2071-2083.
- [13] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy[J]. Curr Opin Immunol, 2007, 19(6) : 652-657.

(收稿日期:2015-04-25)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

DOI 及使用

DOI 是 digital object identifier 的首写字母缩写,译文为数字对象唯一标志。DOI 主要由前缀和后缀组成,前缀由“10.”开始,后面 4 位(可以加长)数字是注册号号码。一般每个成员都有 1 个前缀,但也可有多种前缀(如每种期刊各有 1 个前缀)。后缀是由若干个字符数量不等的节点组成(既包括单字符节点,也包括多字符节点)。后缀也与前缀一样是可以扩展的,目前后缀通常由 4~5 项内容组成。目前中华医学会系列杂志 DOI 后缀为 6 项,如“cma. j. issn. 0254-5098. 2015. 06. 001”,分别代表“中华医学会. 杂志. 国际标准连续出版物号. 出版年. 期. 论文流水号”。

DOI 目前主要用于原始文献的查找。通过 DOI 查找原始文献可借助 <http://dx.doi.org> 或 <http://www.crossref.org> 网址。一种方法是先进入上述网址,然后按照 DOI 提示框输入 DOI,点击“Go”或“submit”按钮,系统就会自动链接到 URL 地址,并显示相应页面。另一种方法是直接将 DOI 加在 <http://dx.doi.org> 网址上,如 <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.95.253601>,按回车后直接进入相应页面。

(本刊编辑部)