

管博文,卢延华,苏路路,等. 亚致死剂量 $\gamma$ -射线全身照射对小鼠造血免疫功能远期影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(11): 50-57,64.

Guan BW, Lu YH, Su LL, et al. Long-term effects of a sublethal  $\gamma$ -ray total body irradiation on the long-term hematopoietic immune function in mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(11): 50-57,64.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.11.008

# 亚致死剂量 $\gamma$ -射线全身照射对小鼠造血免疫功能远期影响

管博文<sup>1</sup>, 卢延华<sup>1</sup>, 苏路路<sup>1</sup>, 李程程<sup>1</sup>, 荆学双<sup>2</sup>, 董银萍<sup>2</sup>, 王月英<sup>2</sup>,  
李德冠<sup>2\*</sup>, 孟爱民<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室, 天津 300192)

**【摘要】** 目的 观察4 Gy、6 Gy全身照射后6个月C57BL/6 J小鼠的造血和免疫等功能指标变化。方法 对8~12周的C57BL/6 J小鼠分别进行4 Gy和6 Gy全身照射,照射6个月后检测外周血细胞计数及分类、胸腺系数及脾系数、外周血及脾免疫细胞分型、脾T细胞p16表达水平。结果 照射后6个月外周血白细胞、红细胞计数仍然明显低于对照组。血小板与对照组无明显差异。外周血细胞分类结果显示照射组小鼠中性粒细胞比例升高、淋巴细胞比例下降,呈现细胞分化偏移现象。与对照组相比,6 Gy照射后6个月,胸腺系数明显降低( $P < 0.05$ )。脾系数无差异。外周血流式分析,结果显示4 Gy、6 Gy照射后,B淋巴细胞、NK细胞仍然低于对照组,提示受照后6个月未完全恢复。受照组CD4比例高于对照组。CD8、单核细胞与对照组未见差异。脾免疫细胞进行流式分析,结果显示4 Gy和6 Gy照射后6个月,B220对于对照组均有明显下降,均具极显著性差异( $P < 0.01$ )。相比于对照组,6 Gy组脾T细胞p16表达有升高的趋势,但无显著性差异。结论 亚致死剂量照射后6个月各项检测基本恢复,但是外周血分类中性粒持续升高,胸腺系数及外周血、脾B淋巴细胞比例仍低于对照组。提示可能有远期损伤。本项实验数据为中高剂量照射后造血免疫功能长期损伤研究提供了基础数据。

**【关键词】** 亚致死剂量照射;远期;外周血细胞计数;免疫脏器;免疫分型;小鼠

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 11-0050-08

## Long-term effects of a sublethal $\gamma$ -ray total body irradiation on the long-term hematopoietic immune function in mice

GUAN Bowen<sup>1</sup>, LU Yanhua<sup>1</sup>, SU Lulu<sup>1</sup>, LI Chengcheng<sup>1</sup>, JING Xueshuang<sup>2</sup>, DONG Yinping<sup>2</sup>, WANG Yueying<sup>2</sup>,  
LI Deguan<sup>2\*</sup>, MENG Aimin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS);  
Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); NHC Key Laboratory of

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81372928, 81573094); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-3-015); 国家重点研发计划(2017YFA0105200); 国家自然科学基金(81703170)。

**【作者简介】** 管博文(1992—),男,技师,研究方向:比较医学。E-mail: 872724882@qq.com

**【通信作者】** 孟爱民(1963—),女,研究员,博士生导师,研究方向:比较医学。E-mail: ai\_min\_meng@126.com

李德冠(1982—),男,副研究员,研究方向:放射生物学、实验动物学。E-mail: ldguan@163.com \* 共同通信作者

Human Disease Comparative Medicine; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing100021, China. 2. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) and Peking Union Medical College (PUMC); Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Tianjin 300192)

**【Abstract】 Objective** To observe the changes in hematopoietic and immune function at 6 months post 4 Gy or 6 Gy  $\gamma$ -ray total body irradiation (TBI) in C57BL/6 J mice. **Methods** C57BL/6 J mice of 8–12 weeks of age were irradiated with 4 Gy or 6 Gy TBI. At 6 months after irradiation exposure, the peripheral blood cell count and classification, immune organ coefficient, immune phenotyping of the peripheral blood and spleen cells, and expression level of splenic T cell p16 were detected. **Results** Six months after irradiation exposure, the peripheral blood leukocyte and red blood cell count in the mice exposed to TBI remained significantly lower than those in the control group. There was no significant difference in the count of platelets in the irradiated mice compared to the control group. The result of the peripheral blood cell classification showed that the proportion of neutrophils in the irradiated mice group increased and the proportion of lymphocytes decreased, indicating a skew in blood cell differentiation. Compared with the control group, the thymus coefficient in the irradiated mice was significantly decreased at 6 months post 6 Gy TBI ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the spleen coefficient. Phenotyping of the peripheral blood cells was performed by flow cytometry. The result showed that the proportion of B lymphocytes and NK cells in the irradiated mice remained lower than those in the control group, while the proportion of CD4 lymphocytes in the irradiated group was higher than that in the control group. There was no significant difference between CD8 lymphocytes and monocyte levels in the irradiated group compared with the control group. The proportion of B220 cells was clearly decreased in the irradiated mice compared with the control group based on the splenic immune phenotyping assay ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the expression of p16 in the splenic T cells of the 6 Gy TBI mice was increased but not significantly ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Hematopoietic immune phenotyping indicated the recovery at 6 months after the sublethal dose of TBI but the neutrophils in the peripheral blood continued to be increased, and the thymus coefficient and the proportion of B lymphocytes in the peripheral blood and spleen were still lower than those in the control group, suggesting a long-term injury. These experimental result provide basic data for the study of total body irradiation-induced long-term injury of hematopoietic immune function.

**【Keywords】** sublethal irradiation; long-term; peripheral blood cell count; immune organ; immunophenotyping; mouse

随着科学技术的进步,核电设施使用增多,人类太空活动能力提升使辐射暴露的可能性不断增加。另外临床接受放射性治疗癌症患者也在不断上升。造血系统和免疫系统对电离辐射(ionizing radiation, IR)具有高度的敏感性。受照后不仅会引起急性骨髓抑制,对远期造血免疫也会有影响。

受到亚致死剂量照射后会出现造血免疫系统急性损伤性变化。随着时间延长机体各项免疫指标逐步恢复,但也会出现一些持久性改变,从而影响机体的健康状态,本文对在 4 Gy、6 Gy 亚致死剂量  $\gamma$  射线全身照射(total body irradiation, TBI)后 6 个月 C57BL/6 J 小鼠的各项免疫指标进行检测,为照射后造血免疫功能长期损伤研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

10~12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 J 小鼠,体重

22~24 g,共 24 只,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。小鼠饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物房屏障环境[SYXK(津)2014-0002]。本实验经过中国医学科学院放射医学研究所 IACUC 的批准,批准号为 1402,并根据 3R 原则对实验动物的使用和饲养给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

荧光标记抗体 NK1.1-FITC 购于 Biolegend 公司;CD11b-APC 购于 Invitrogen 公司;B220-percp、F4/80-PE、CD4-PE-cy7、CD8a-APC-cy7 购于 BD 公司;B220-percp-cy5.5、CD3-APC 购于 Biolegend 公司;EDTA-K<sub>3</sub> 购于 Sigma 公司;红细胞裂解液购于 Invitrogen 公司;大鼠脾单个核细胞分离液试剂盒购于索莱宝公司;EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit 购于 STEMCELL Technologies 公司。全自动血液分析仪 MEK-7222 K(日本光电);BD 流式分析仪(BD

FACSAria II cell sorter, BD Bioscience); 铯源伽马射线辐照仪 (Gammacell-40, 加拿大原子能有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组与照射

小鼠随机分为对照 (control) 组、4 Gy IR 组和 6 Gy IR 组。照射组接受<sup>137</sup>Cs $\gamma$  射线一次性全身照射 4 Gy 或 6 Gy, 剂量率为 1Gy/min。对照组接受假照射。

#### 1.3.2 外周血细胞计数及分类

将小鼠称重, 0.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (50 mg/kg)。进行内眦静脉取血, EDTA-K<sub>3</sub> 抗凝, 血细胞计数仪测定外周血计数及分类<sup>[1]</sup>。

#### 1.3.3 免疫脏器系数

小鼠称重后, 分别取胸腺和脾并称量, 记录下用于计算胸腺系数和脾系数。脏器系数 = 脏器重量 (mg) / 小鼠体重 (g)<sup>[2-3]</sup>。

#### 1.3.4 外周血免疫细胞和脾淋巴细胞分型检测

将分离的小鼠脾研磨制备脾细胞悬液。分别取外周血和脾细胞悬液 50  $\mu$ L, 各加入 1 mL 1 $\times$ 红细胞裂解液, 室温条件下裂解 8 min (期间混匀两次), 1500 r/min 离心 5 min, 4 $^{\circ}$ C。弃去上清, 每个样品加入 100  $\mu$ L PBS 重悬, 分别加入对应的混合抗体, 冰上避光孵育 30 min。2 mL PBS 洗一遍, 离心条件保持不变。加入 300  $\mu$ L PBS 重悬并过滤至流式管, 上机检测<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.5 脾 T 细胞分离及 p16 mRNA 表达量检测

按索莱宝 ficoll 试剂盒和 STEMCELL Technologies 的 T 细胞阴选试剂盒说明书方法进行分离。将收集的细胞重悬计数, 按每  $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个细胞加入 1 mL TRIzol 保存, 送至上海欧易生物医学科技有限公司检测 p16 mRNA 表达量。

### 1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件处理数据、作图, 计量资料数据用平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异采用 ANOVA 检验和卡方检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 外周血计数及分类

外周血计数结果如图 1, 与对照组相比, 受照后 6 个月小鼠白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度均有一定程度的下降。其中 4 Gy 组与对照组相比, 白细胞计数从  $8.62 \pm 1.52$  下降到  $7.01 \pm 0.8$ ,

下降了 18.65% ( $P < 0.001$ )。红细胞计数从  $8.99 \pm 0.36$  下降到  $8.56 \pm 0.33$ , 下降了 4.70% ( $P < 0.05$ )。血红蛋白和血小板组差异没有显著性。

6 Gy 照射 6 个月后, 与对照组相比, 白细胞计数从  $8.62 \pm 1.52$  下降到  $5.94 \pm 0.83$ , 下降了 31.00% ( $P < 0.001$ )。红细胞计数也从  $8.99 \pm 0.36$  下降到  $8.33 \pm 0.26$ , 下降了 7.27% ( $P < 0.001$ )。血红蛋白浓度, 6 Gy 组比对照组从  $123.13 \pm 5.51$  下降到  $113.75 \pm 2.71$ , 下降了 7.55% ( $P < 0.001$ )。血小板计数 6 Gy 组和对照组相比未见显著性差异。可以看出血小板计数基本以恢复到正常水平, 见图 1A~1D。

4 Gy 与 6 Gy 两组间比较发现, 只有血红蛋白浓度这项指标在 4 Gy 和 6 Gy 之间有明显降低, 呈极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 相差 5.04%。外周血计数各项指标均无计量依赖性, 各项指标均恢复到正常范围。

中性粒细胞百分比, 4 Gy 和 6 Gy 组相较于对照组有明显上升, 分别从 ( $8.3 \pm 1.09$ )% 上升到 ( $15.46 \pm 1.94$ )% ( $P < 0.001$ ) 和 ( $16.87 \pm 6.89$ )% ( $P < 0.05$ )。淋巴细胞百分比从 ( $90.95 \pm 1.9$ )% 下降到 ( $85.29 \pm 3.19$ )% ( $P < 0.01$ ) 和 ( $82.75 \pm 7.06$ )% ( $P < 0.05$ ), 分别具有极显著性和显著性。见图 1E~1F。

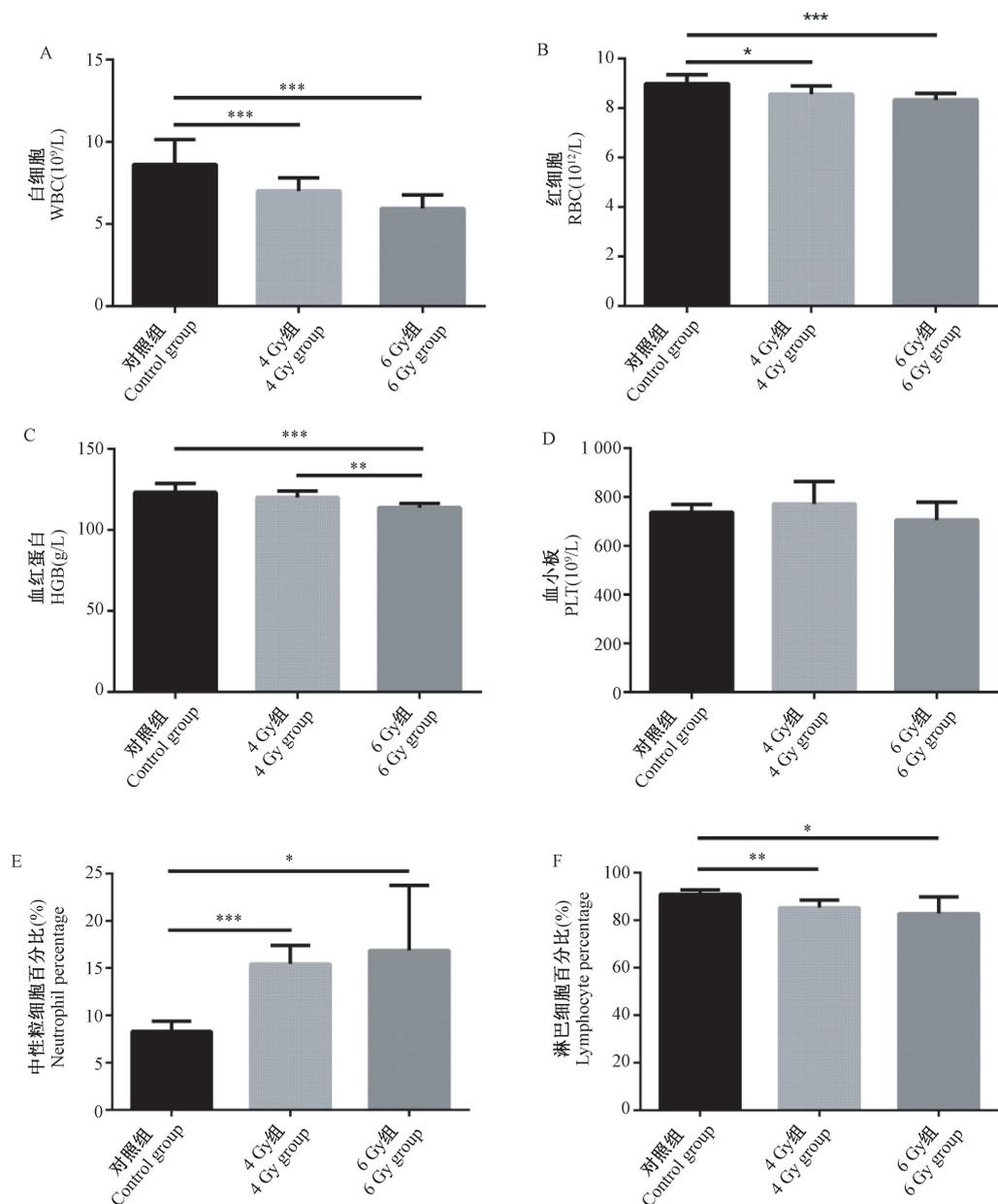
外周血白细胞计数及分类结果显示, 亚致死剂量全身照射后 6 个月, 外周血计数及分类已经恢复正常。但是白细胞、红细胞计数仍然明显低于对照组。白细胞降低有照射剂量依赖的趋势。外周血细胞分类结果显示照射组小鼠中性粒细胞比例升高, 淋巴细胞比例下降, 呈现细胞分化偏移现象, 未见明显的剂量效应关系。

### 2.2 免疫脏器系数

与对照组小鼠相比, 4 Gy 组和 6 Gy 组小鼠胸腺系数降低, 其中 6 Gy 组与对照组差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 脾系数略有增加, 差异无显著性, 结果见图 2。

### 2.3 外周血免疫分型

外周血采用流式分析法进行分型测定。检测辅助 T 细胞 (CD4)、细胞毒 T 细胞 (CD8a)、B 淋巴细胞 (B220)、自然杀伤细胞 (NK1.1), 单核细胞采用 F4/80 和 CD11b 共标。其中辅助 T 细胞、细胞毒 T 细胞和 B 淋巴细胞是从单个核细胞亚群去分析, NK 细胞和单核细胞是从白细胞群去分析。如图 3



注:A:白细胞计数;B:红细胞计数;C:血红蛋白浓度;D:血小板计数;E:中性粒细胞百分比;F:淋巴细胞百分比。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

图1 受照组小鼠与对照组小鼠外血计数比较

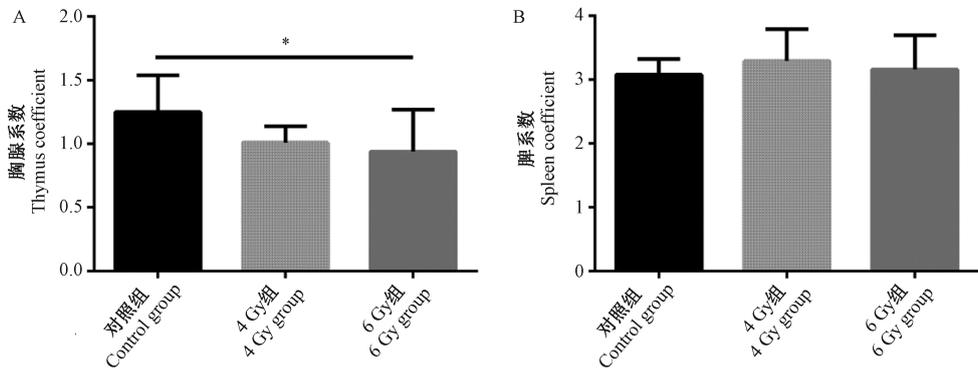
Note. A, White blood cell count. B, Red blood cell count. C, Hemoglobin concentration. D, Platelet count. E, Neutrophil percentage. F, Lymphocyte percentage. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

Figure 1 Comparison of the peripheral blood counts between irradiated mice and control mice

所示。

结果显示,相对于对照组,4 Gy组和6 Gy组CD4<sup>+</sup>均有上升,从(12.49±1.16)%分别上升到(14.6±0.51)%和(16.48±2.0)% ,差异均具有显著性( $P < 0.05$ )。CD8a<sup>+</sup>细胞三个组别之间未见明显变化。CD4/CD8比值分别为对照组1.16±0.10,4 Gy照射组1.28±0.17,6 Gy照射组1.46±0.26,6 Gy组

CD4/CD8比值与对照组比较有明显上升( $P < 0.05$ )。B220<sup>+</sup>细胞从对照组(62.89±2.33)%降低到4 Gy照射组(55.63±3.61)%和6 Gy照射组(54.2±3.54)% ,差异均具有极显著性( $P < 0.001$ )。NK1.1<sup>+</sup>细胞与B220<sup>+</sup>细胞变化趋势一样,从(8.44±0.7)%分别降低到(6.81±1.58)%和(6.6±0.65)%。上述三组4 Gy和6 Gy之间差异均无显



注:A:胸腺系数;B:脾系数。\*  $P < 0.05$ 。

图2 受照组小鼠与对照组小鼠脏器系数比较

Note.A, Thymus coefficient. B, Spleen coefficient. \*  $P < 0.05$ .

Figure 2 Comparison of the organ coefficient between irradiated mice and control mice

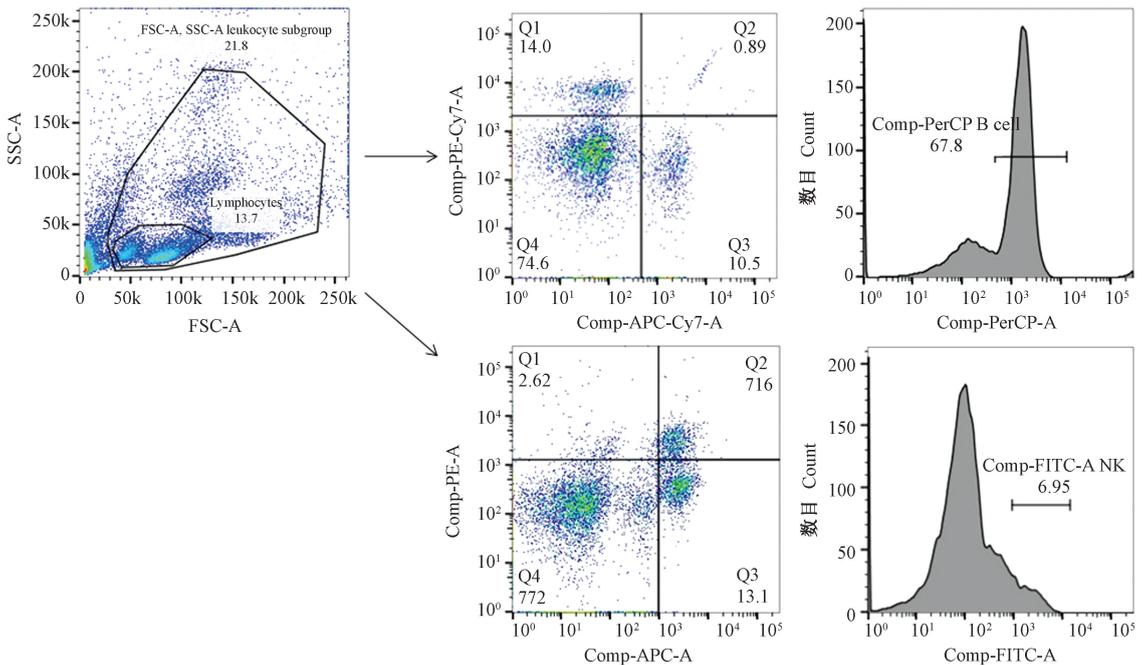


图3 流式分析外周血门的设置及示意图

Figure 3 Representative gating strategy used for the peripheral blood immune cell phenotypes analyzed by flow cytometry

著性区别。单核细胞三个组别之间未见到明显差异。结果见图4。

外周血细胞免疫分型结果显示,4 Gy、6 Gy 照射后,B 淋巴细胞、NK 细胞仍然低于对照组,提示受照后6个月未完全恢复。受照组 CD4 比例高于对照组。CD8 单核细胞与对照组未见差异。

#### 2.4 脾免疫细胞分型

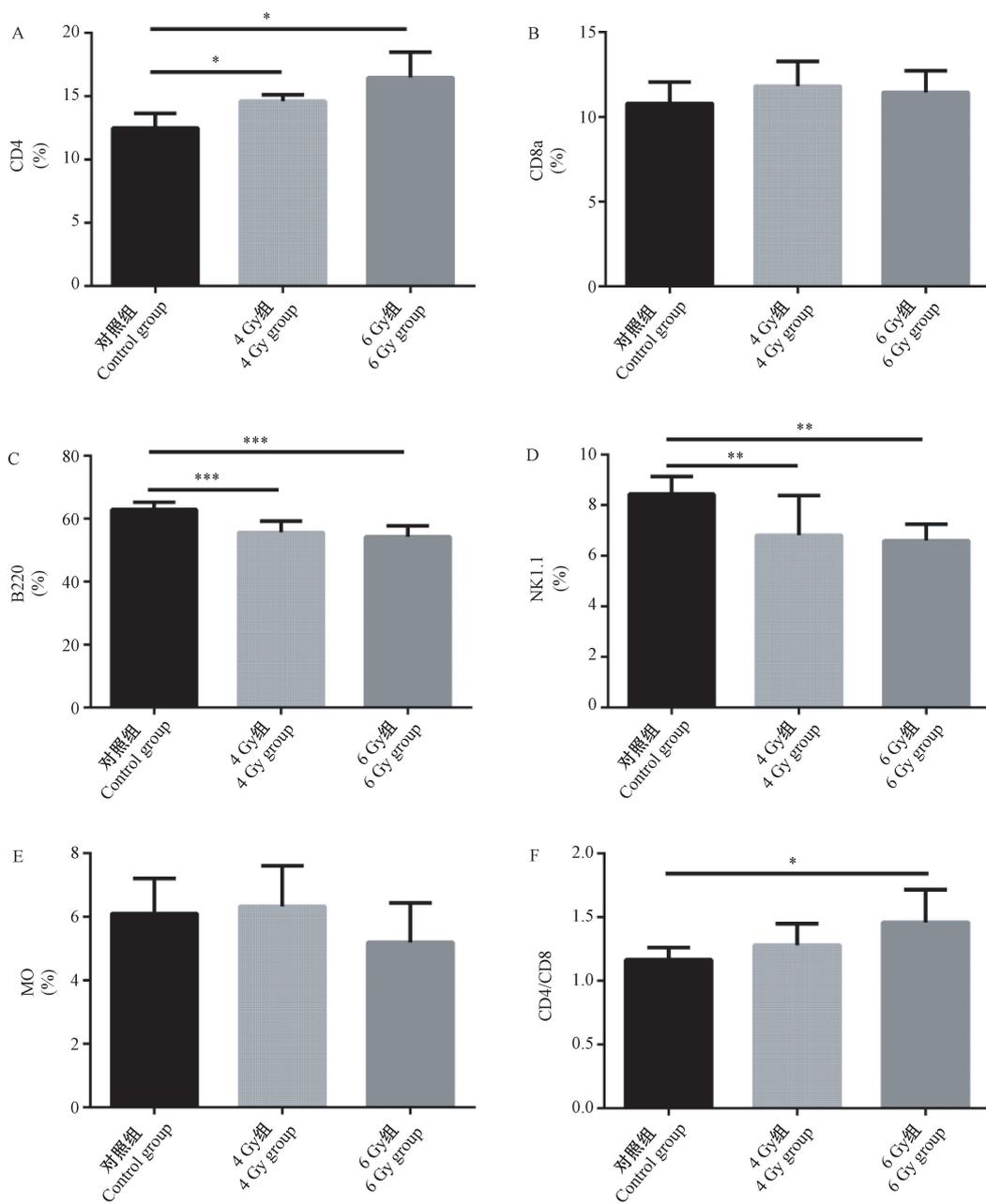
采用流式细胞术分析脾中 T 细胞 (CD3) 和 B 淋巴细胞 (B220) 在脾单个核细胞分群中的占比变化。如图5所示。

结果显示,相较于对照组,照射组 CD3<sup>+</sup> 细胞有

上升的趋势,但无显著性差异。B220 细胞,照射组均有明显下降,4 Gy 组和 6 Gy 组相较于对照组有极显著差异 ( $P < 0.01$ ),两组之间未见明显差异。见图6。

#### 2.5 脾 T 细胞 p16 mRNA 表达量检测

为了进一步研究照射对小鼠免疫细胞的远期影响,分离小鼠脾 T 细胞,用 RT-PCR 检测照射后6个月脾 T 细胞中 p16 mRNA 表达,检测结果通过标准曲线公式以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行比较。结果显示,与对照组相比,6 Gy 组有个别数据 p16 mRNA 明显升高,采用卡方检验,未见显著性差异。结果见图7。



注:A:CD4<sup>+</sup>;B:CD8<sup>+</sup>;C:B220<sup>+</sup>;D:NK1.1<sup>+</sup>;E:CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>;F:CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>。\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001。

图4 老年小鼠与年轻小鼠外周血免疫细胞分型比较

Note. A, CD4<sup>+</sup>. B, CD8<sup>+</sup>. C, B220<sup>+</sup>. D, NK1.1<sup>+</sup>. E, CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>. F, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Figure 4 Comparison of peripheral blood immune cell typing between the irradiated mice and control mice

### 3 讨论

本研究检测亚致死剂量电离辐射全身照射对小鼠造血系统和免疫系统造成的远期损伤。与对照组比较,结果显示小鼠受到4 Gy或6 Gy全身照射6个月后,外周血白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度仍低于对照组。而照射组小鼠中性粒细胞比例升高,淋巴细胞的比例降低。提示受到照射后,与对照组比较外周血白细胞仍然处于较低水

平,可能导致机体抵抗力下降。外周血分类比例改变,提示出现了分化偏移现象。但是除了血红蛋白外,6 Gy组与4 Gy组差异没有统计学意义。说明在经过长时间恢复后,外周血和免疫细胞比例已经基本恢复。

小鼠胸腺对电离辐射十分敏感,在接受照射6个月后,胸腺系数依旧未恢复至对正常水平。另一免疫器官,脾系数虽和对照组无显著差别,外周血免疫分型中,照射组小鼠CD4<sup>+</sup>细胞占单个核细胞亚

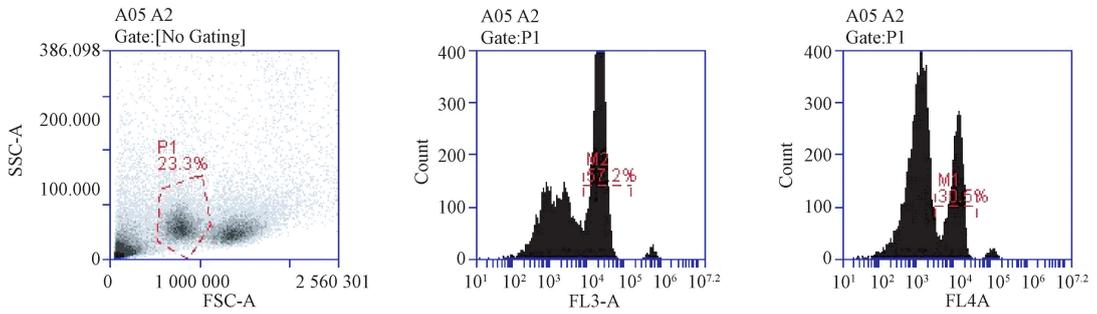
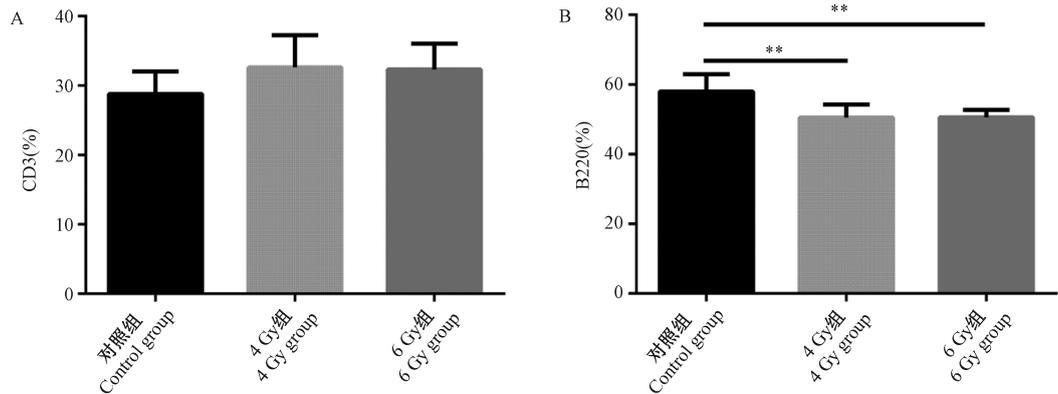


图 5 流式分析脾免疫细胞门的设置及示意图

Figure 5 Representative gating strategy used for spleen immune cell phenotypes analyzed by flow cytometry



注: A, CD3<sup>+</sup>; B, B220<sup>+</sup>. \*\*  $P < 0.01$ .

图 6 受照组小鼠与对照组小鼠脾免疫细胞分型比较

Note. A, CD3<sup>+</sup>. B, B220<sup>+</sup>. \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 6 Comparison of spleen immune cell phenotyping between the irradiated mice and control mice

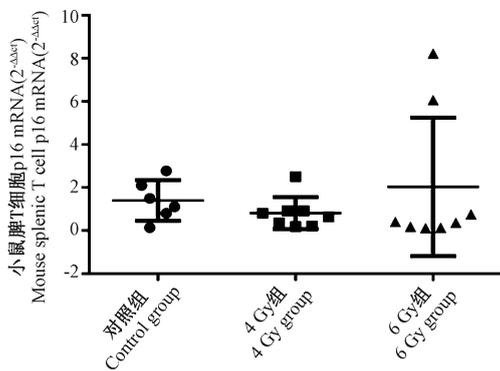


图 7 受照组小鼠与对照组小鼠脾 T 细胞的 p16 mRNA 表达比较

Figure 7 Comparison of p16 mRNA expression in the splenic T cells between irradiated mice and control mice

群的百分比上升, B 淋巴细胞下降, 自然杀伤细胞在白细胞的百分比明显下降。提示照射引起天然免疫和适应性免疫功能下降。淋巴细胞比例下降, 以 B 淋巴下降为主; 天然免疫功能下降以 NK 细胞下降为主。脾免疫分型中, B 淋巴细胞在脾单个核细胞百分比降低。在脾 T 细胞中, 6 Gy 照射 6 个

月后 p16 mRNA 表达量高于对照组, 但无显著性差异。

课题组对辐射引起的造血系统免疫损伤进行了系统研究。小鼠外周血计数结果显示, 受照后大部分指标恢复正常, 但是白细胞计数、红细胞计数和血红蛋白浓度依然低于对照组。路璐等研究结果显示, 6 Gy 照射 2 个月内, 白细胞和血小板下降程度明显, 红细胞和血红蛋白下降较为平缓<sup>[5]</sup>。两个月内恢复的趋势也与本研究结果一致。造成这种现象的原因可能是造血系统对辐射损伤敏感, 亚致死剂量的电力辐射造成了造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 损伤和衰老, 影响其造血免疫功能, 最后导致了度过了照射后初期白细胞血小板快速下降, 以及中期红细胞和血红蛋白的下降后, 远期 (照射后 6 个月) 外周血计数虽在缓慢恢复, 但依然低于对照组。随着小鼠受照后时间的延长, 造血干细胞的衰老和损伤会导致其分裂分化能力降低, 进一步导致其数量减少, 最终出现长期骨髓抑制等情况<sup>[6]</sup>。外周血细胞分类结果显示照射组小

鼠中性粒细胞比例升高、淋巴细胞比例下降,呈现细胞分化偏移现象,没有明显剂量反应关系。与老年小鼠外周血计数结果一致,暗示着照射导致的骨髓细胞出现了病理性的衰老改变<sup>[7]</sup>。在老年机体中,HSC不能保持细胞静止状态,并趋向于向髓系细胞进行分化,使得幼稚淋巴细胞数量下降。最终导致免疫功能整体下降。发生髓系分化偏移除了会造成免疫功能的下降,还会使髓系白血病发生的危险性升高。在急性髓系白血病中,主要是由白血病前体干细胞异常增殖导致的。而白血病前体干细胞倾向分化为髓系细胞<sup>[8]</sup>。亚致死剂量受照小鼠远期仍然表现出髓系偏移的变化,与老年小鼠一致。

照射组小鼠的胸腺系数出现明显下降,胸腺对电离辐射损伤敏感,在 6 个月后依旧没有恢复到正常水平。受照组小鼠脾系数有少许上升,但与对照组相比,无显著性差异。李德冠等<sup>[9-10]</sup>的研究显示,照射组小鼠受 4 Gy 和 6 Gy 照射 10 周后胸腺系数脾系数分别出现上升或下降的改变,但均无显著性差异,且不呈剂量依赖性。胸腺受损会导致 T 细胞在发育过程中出现问题,减少幼稚 T 细胞的数量,进而影响细胞免疫效果。

外周血分型与李德冠等人<sup>[11]</sup>的研究比较发现在 6 Gy 照射后 10 d 时,小鼠处于辐射损伤急性期,外周血 CD4、CD8、B220 分别从  $(19.7 \pm 4.7)\%$ 、 $(18.5 \pm 1.7)\%$  和  $(52.0 \pm 6.6)\%$  降到  $(15.5 \pm 2.0)\%$ 、 $(5.1 \pm 2.9)\%$  和  $(7.9 \pm 4.1)\%$ 。在 10 周时,4 Gy 组和 6 Gy 组 CD4 从  $(12.1 \pm 0.9)\%$  分别上升到  $(18.7 \pm 0.4)\%$  和  $(21.9 \pm 7.4)\%$ , CD8 由  $(11.7 \pm 0.8)\%$  分别上升至  $(17.2 \pm 2.1)\%$  和下降到  $(8.8 \pm 0.6)\%$ , B220 则从  $(50.6 \pm 6.5)\%$  分别下降到  $(38.1 \pm 2.9)\%$  和  $(23.7 \pm 12.2)\%$ <sup>[9-10]</sup>。变化趋势与本研究照射后 6 个月时的外周血免疫分型结果接近。本实验中,CD4% 的上升是源于在单个核细胞群中,CD4 阳性细胞随时间的恢复,且 B220 阳性细胞死亡比例较高恢复较慢导致的,属于相对升高。崔玉芳等人<sup>[12]</sup>在研究中认为小鼠受照后免疫方面有两个特点:①短期内损伤严重,②后期阶段机体恢复速度缓慢。其中特别的是,在受到照射后 6~12 月,淋巴细胞仍处于恢复阶段时,外周血淋巴细胞的凋亡率仍高出正常水平。CD3 和 CD8 阳性 T 细胞仍未恢复到对照的水平<sup>[12]</sup>。本实验中,先天免疫主要以 NK 细胞的减少为主,单核细胞照射组与对照组之间基本无差别,淋巴细胞中 B 细胞依旧处

于缓慢恢复阶段,T 细胞则恢复明显。与吴安庆等人<sup>[13]</sup>的研究中提出的淋巴细胞比单核细胞辐射敏感性强,淋巴细胞中 B 细胞也比 T 细胞对辐射更加敏感的结论相一致。6 Gy 组 CD4%/CD8% 与对照组相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),但比值的上升主要是因为 CD4% 的相对上升,与免疫系统亢进不一样。

之后进行脾免疫细胞分型中发现,B 淋巴细胞在单个核细胞中的比例有明显下降,并具有极显著差异 ( $P < 0.01$ )。说明虽然在脾系数上与对照组没有区别,但是功能上还没有恢复至对照组水平。B 淋巴细胞比例的下降可能会导致获得性免疫中体液免疫水平的降低。进一步造成抗体数量的减少和免疫记忆的减弱,无法及时在抗原入侵机体时有效的启动免疫应答。

p16 基因是一种直接参与细胞周期调控的细胞周期基因,同是也是一个抑癌基因。在受到一些细胞因子或是 DNA 损伤刺激下,会激活 p38MAPK 级联反应,进而激活 p16-Rb 通路,造成细胞的衰老,是常用的衰老标志物<sup>[14]</sup>。我们前期研究结果显示,亚致死剂量全身照射可以引起造血干细胞衰老,表现为 p16 升高,自我更新能力下降<sup>[15-16]</sup>。临床研究显示细胞毒性化疗药物及骨髓移植患者 T 细胞中 p16 表达水平明显升高<sup>[17]</sup>。本研究中,6 Gy 组结果显示在 8 个有效数据中,有 2 例明显升高,但无显著性差异。T 细胞 p16 mRNA 是否可以作为受照后引起的衰老生物学标志有待进一步研究认证。

本项研究对中高剂量照射对小鼠造血免疫远期损伤初步分析结果显示,受照组小鼠在经过 6 个月的恢复后,免疫系统基本重建完毕,趋于稳定。但髓系淋系分化偏移,B 淋巴细胞比例下降等仍持续存在。这与造血免疫系统老龄化改变相似。讨论中比较了照射后不同时间点造血免疫损伤程度及恢复情况,也与老年小鼠进行了比较。这些初步探讨进一步验证了亚致死剂量照射引起了小鼠造血免疫系统衰老性改变,为治疗改善远期辐射损伤提供了基础数据,也为受照小鼠用于造血免疫系统老年性改变机制研究提供支持。

#### 参考文献:

- [1] 李程程,管博文,苏路,等. 白消安对小鼠造血干细胞功能的损伤作用[J]. 中国比较医学杂志, 2018,28(2):26-32.
- [2] 巩萍,孙铜,戴晓莉,等. 松花粉对环磷酰胺增效减毒作用研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(5):60-63.