

^{60}Co γ 射线辐射对裸鼯鼠脾脏的影响

杨 蓉¹, 赵懿宁², 杨文静¹, 赵善民¹, 柴宇静², 张成财¹, 袁 征^{3#}, 崔淑芳^{1#}

(1. 海军军医大学基础医学院实验动物学教研室, 上海 200433;

2. 上海市杨浦区精神卫生中心医技科, 上海 200090;

3. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071)

[摘要] 目的 观察 ^{60}Co γ 射线辐射后裸鼯鼠脾脏免疫系统及组织生物化学指标的变化, 初步了解裸鼯鼠脾脏辐射耐受特性。方法 用辐照剂量率为 1.163 Gy/min, 总剂量为 10 Gy 的 ^{60}Co γ 射线对裸鼯鼠全身一次性辐射。采集正常对照及辐照后 7 d、14 d 和 21 d 的裸鼯鼠脾脏, 流式细胞术检测脾脏 B 淋巴细胞和巨噬细胞比例。采用动物组织生化检测试剂盒检测脾脏组织丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (T-AOC)、谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 等指标。结果 流式细胞术检测结果显示, 辐照后 B 淋巴细胞比例及巨噬细胞比例均明显升高 ($P < 0.01$)。生化检测结果显示, 辐照后脾脏 MDA 水平明显升高 ($P < 0.05$); GSH 和 GSSG 逐渐明显降低 ($P < 0.05$); 辐照后 T-AOC 水平明显降低 ($P < 0.01$), 但辐照后 21 d 有所上升, 明显高于辐照后 7 d 和 14 d (均 $P < 0.01$)。结论 裸鼯鼠脾脏对 ^{60}Co γ 射线具有一定程度的耐受能力, 但其耐受机制尚未明确。

[关键词] 裸鼯鼠; 辐射耐受性; 脾脏; 免疫; ^{60}Co γ 射线

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)06-0519-04

随着核能和核技术在医疗卫生、工农业生产、科学研究和国防中大量应用, 辐射的危害已不容忽视。目前, 辐射耐受相关研究主要采用小鼠和大鼠、非人灵长类动物、小型猪、犬、秀丽隐杆线虫等进行^[1-4], 但上述模型动物并不具有辐射耐受特性, 只是单纯作为人类的替代进行辐

射损伤的模拟, 无法对辐射损伤防护提供有利的参考。裸鼯鼠是一种具有多种生物学特性的新型实验动物, 如抗衰老、抗肿瘤、耐低氧、耐疼痛等特性。本课题组前期研究发现, 相较于小鼠、大鼠等动物, 裸鼯鼠具有更强的辐射耐受能力^[5], 利用裸鼯鼠或许有助于更好地探索抗辐射相关机制。

电离辐射是由直接或间接电离粒子或二者混合组成的波长小于 100 nm 的电磁辐射, 能使受作用物质发生电离现象。电离辐射的特点是波长短、频率高、能量高的射线。辐射可对机体多种组织器官造成损伤。作为机体最大免疫器官的脾脏, 对辐射损伤较为敏感。前人研究发现, 辐射会导致小鼠脾脏组织内氧化应激失衡^[6], 脾脏超微结构改变^[7], 脾脏淋巴细胞功能异常^[7-9], 脾脏全基因组 DNA 甲基化水平降低^[10], 脾脏细胞周期和凋亡节律改变^[11]。本课题组前期研究结果表明, 裸鼯鼠与小鼠的脾脏在解剖学、组织

[收稿日期] 2020-10-10

[基金项目] 国家青年自然科学基金(31700923); 上海市“科技创新行动计划”实验动物研究领域项目(20140900100)

[作者简介] 杨 蓉(1990—), 女, 硕士, 助理实验师, 主要从事实验动物学教学及研究工作。

E-mail: 664710222@qq.com

[通信作者] 崔淑芳(1968—), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 实验动物资源开发与疾病动物模型研究。

E-mail: youngstar_sf@163.com

袁 征(1972—), 男, 从事实验动物科研管理工作。E-mail: yuanzheng001@126.com

共同通信作者

学和超微结构上都具有较大的差异^[12]。本研究观察 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射对裸鼯鼠脾脏功能的影响, 为研究裸鼯鼠耐辐射机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18 月龄健康雄性裸鼯鼠 28 只, 由海军军医大学实验动物学教研室生产, 饲养于屏障设施 [SYXK (沪) 2017-0004]。

1.2 实验动物分组与实验处理

28 只裸鼯鼠随机分为 2 组, 分别为对照组 7 只和实验组 21 只。实验组裸鼯鼠给予一次性全身 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线辐射, 辐射剂量率为 1.163 Gy/min, 辐射时间为 8.6 min, 总辐射剂量为 10 Gy, 由海军军医大学辐照中心完成。

1.3 主要仪器设备及试剂

荧光标记流式用抗体购自美国 Biolegend 公司; 氧化应激指标测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 脾脏淋巴细胞的分离 分别取对照组、实验组辐照后 7 d、14 d 和 21 d 各 3 只裸鼯鼠, 通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠麻醉裸鼯鼠, 打开胸腔, 取脾脏, 迅速置于预冷的 PBS 液中剪碎, 研磨脾脏获取细胞悬液, 经 200 目筛网过滤细胞悬液, 离心 (1 500 r/min, 4℃) 5 min, 弃上清液; 加入红细胞裂解液 5 mL 混匀, 静置 5 min, 离心 (1 500 r/min, 4℃) 5 min 弃上清液; 用 5 mL PBS 清洗 2 次, 每次离心 (1500 r/min, 4℃) 5 min 后弃上清液; 用 PBS 将其制成细胞悬液, 并调整细胞密度至 1×10^6 个/mL, 用于后续检测。

1.4.2 B 细胞亚群的检测 取 100 μL 淋巴细胞悬液, 加入 1 μL FITC 抗小鼠 CD3 和 1 μL APC 抗小鼠 CD19, 细胞荧光染色 30 min。设置单染及空白对照管; 加入 PBS 1 mL, 振荡混匀, 1 500 r/min 离心 2 min, 去上清液; 加入 PBS 200 μL , 振荡悬浮细胞, 进行流式检测。

1.4.3 巨噬细胞亚群的检测 取 100 μL 淋巴细胞悬液, 加入 1 μL PE 抗小鼠 CD11b, 细胞荧光染色 30 min。设置空白对照管; 加入 PBS 1 mL,

振荡混匀, 1 500 r/min 离心 2 min, 去上清液; 加入 PBS 200 μL , 振荡悬浮细胞, 进行流式检测。

1.4.4 脾脏组织氧化应激水平检测 分别取对照组、实验组辐照后 7 d、14 d 和 21 d 各 4 只裸鼯鼠, 通过腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠麻醉裸鼯鼠, 迅速打开胸腔, 取脾脏, 剪取 0.1 g 脾脏组织, 经 40 μm 孔径筛网研磨过滤后加入 1 mL 裂解液, $12\,000 \times g$, 4℃ 离心 10 min, 取上清液用于检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总抗氧化能力 (total antioxidative capacity, T-AOC)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (oxidative glutathione, GSSG) 含量, 检测步骤严格参照试剂盒说明书。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 Graphpad Prism 5.0 软件对数据进行分析。组间比较采用方差分析, 再用 Bonferroni 法进行组内两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐射对裸鼯鼠脾脏免疫细胞的影响

从图 1、表 1 可见, 裸鼯鼠经 10 Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身照射后, 与对照组相比较, 辐照后 7 d 裸鼯鼠脾脏组织中 CD3⁺CD19⁺B 淋巴细胞的比例有轻微下降, 差异没有统计学意义, 但辐照后 14 d、21 d 显著高于对照组 ($P < 0.01$)。辐照后 7 d、14 d、21 d 裸鼯鼠脾脏中 CD11b⁺ 巨噬细胞的比例显著高于对照组 ($P < 0.01$), 表明辐照未对裸鼯鼠脾脏组织的免疫系统造成损伤。

2.2 辐射对裸鼯鼠脾脏氧化应激水平的影响

与对照组相比较, 辐照后 7 d 脾脏组织中 MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$); 随着辐照时间延长, 脾脏组织中 MDA 含量仍在增加, 辐照后 21 d 显著高于对照组 ($P < 0.01$)。辐照后 7 d 脾脏组织中 GSH 与 GSSG 含量均有轻微降低, 但与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 辐照后 14 d、21 d GSH 与 GSSG 含量均明显降低 ($P < 0.05$)。T-AOC 水平于辐照后 7 d 和 14 d 均显著降低 ($P < 0.01$), 辐照后 21 d 有所上升, 明显高于辐照后 7 d 和 14 d ($P < 0.01$), 但仍低于对照组 ($P < 0.01$) (表 2)。

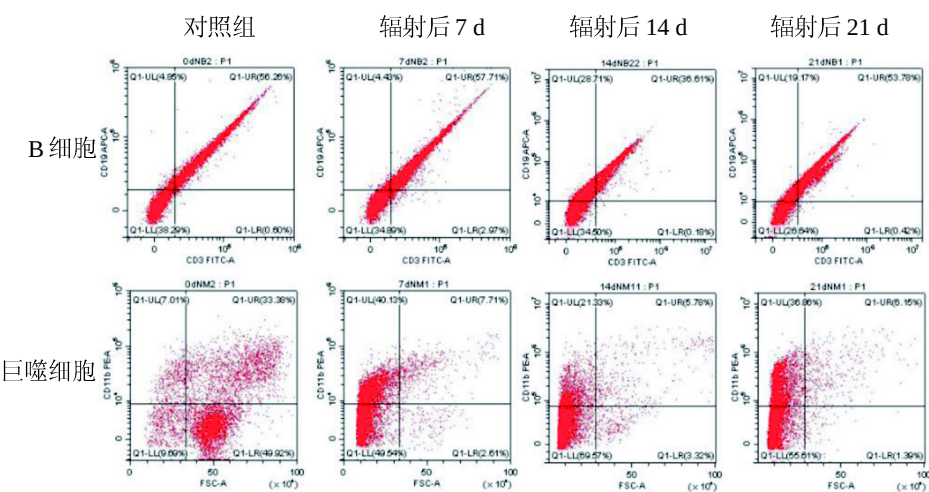


图 1 流式细胞术检测裸鼹鼠脾脏免疫细胞

Figure 1 Flow cytometry tests for immune cells in spleen of naked mole rats

表 1 辐射对裸鼹鼠脾脏免疫细胞的影响

Table 1 Effects of radiation on immune cells in spleen of naked mole rats				
指 标	对照组 (n=3)	辐照后 7 d (n=3)	辐照后 14 d (n=3)	辐照后 21 d (n=3)
CD3 ⁺ CD19 ⁺ (%)	4.85 ± 0.01	28.71 ± 0.06**	4.43 ± 0.01	19.17 ± 0.05**
CD11b ⁺ (%)	7.01 ± 0.01	40.13 ± 0.47**	21.33 ± 0.05**	36.86 ± 0.51**

注：与对照组比较，***P* < 0.01。

表 2 辐射对裸鼹鼠脾脏氧化应激水平的影响

Table 2 Effects of radiation on oxidative stress in spleen of naked mole rats				
指 标	对照组 (n=4)	辐照后 7 d (n=4)	辐照后 14 d (n=4)	辐照后 21 d (n=4)
MDA/(μmol · g ⁻¹)	2.906 ± 0.342	3.839 ± 0.346*	4.086 ± 0.240*	7.658 ± 0.406**
GSH/(μmol · g ⁻¹)	2.161 ± 0.092	2.139 ± 0.097	1.688 ± 0.179*	0.867 ± 0.110**
GSSG/(μmol · g ⁻¹)	1.081 ± 0.040	1.070 ± 0.015	0.844 ± 0.100*	0.434 ± 0.010**
T-AOC/(mmol · g ⁻¹)	0.451 ± 0.007	0.295 ± 0.010**	0.289 ± 0.010**	0.399 ± 0.010***

注：与对照组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01；与辐照后 7 d 和 14 d 比较，****P* < 0.01。

3 讨论

脾脏是机体最大的免疫器官，是成熟淋巴细胞定居的场所。Paranich 等^[13]发现，小鼠脾脏细胞在 2 Gy γ射线照射后开始失去功能活性和形态结构特征，且随着辐射剂量的增加，这些变化过程越明显。淋巴细胞是对辐射最敏感的细胞群之一，是放射损伤早期诊断的重要参考指标。Anderson 等^[14]发现电离辐射能引起免疫系统和淋巴细胞的严重损伤；Harrington 等^[15]发现电离辐射能引起 T、B 细胞迅速减少，对丝裂原的反应能力明显降低；何颖等^[16]研究发现，1 Gy ⁶⁰Coγ

射线全身照射 24 h 后，小鼠脾脏 B 淋巴细胞比例显著降低，说明电离辐射导致小鼠脾脏 B 淋巴细胞数量减少，辐射对小鼠免疫功能造成了损伤。本课题组预实验发现，辐照后 15 d 内全部小鼠陆续死亡。本研究结果显示，辐照后 7 d 裸鼹鼠脾脏 B 淋巴细胞比例有轻微下降，但辐照后 14 d、21 d 裸鼹鼠脾脏 B 淋巴细胞比例均明显高于对照组；与对照组相比，辐照后巨噬细胞比例明显升高，提示辐照后裸鼹鼠脾脏免疫系统可以做出相应的免疫应答，表明辐照未对裸鼹鼠脾脏造成严重损伤，不影响其发挥免疫应答功能。

脂质过氧化代谢产物 MDA 的含量反映活性

氧在体内的积累情况。GSH 和 GSSG 作为机体内重要的抗氧化和自由基清除剂,反映机体清除活性氧的能力。左丽丽等^[17]发现,小鼠经 6 Gy 的 ^{60}Co γ 射线照射后,其脾脏组织 MDA 含量显著增加,表明 6 Gy 的辐射剂量导致小鼠脾脏组织产生了明显的脂质过氧化反应;李辉等^[18]发现,小鼠经 7 Gy ^{60}Co γ 射线照射后,其脾脏组织中 GSH 含量显著降低。本研究发现,辐照后 7 d 裸鼯鼠脾脏组织 MDA 水平明显升高,随着辐照后时间延长,裸鼯鼠脾脏组织 MDA 水平进一步升高,表明辐照后脾脏组织发生了明显的脂质过氧化反应。随着活性氧在体内的积累,辐照后裸鼯鼠脾脏组织中 GSH 和 GSSH 水平均明显降低,体现了抗氧化物质的消耗,与小鼠研究结果一致。T-AOC 反映机体总体的抗氧化能力,辐照后 7 d 裸鼯鼠脾脏组织 T-AOC 明显降低,表明裸鼯鼠脾脏组织总体抗氧化能力下降,但辐照后 21 d 裸鼯鼠脾脏组织 T-AOC 出现了相当程度的回升,表明裸鼯鼠在遭受氧化应激损伤后脾脏组织总体的抗氧化能力得到较大恢复。

综上所述,本研究发现,虽然 MDA 的积累提示裸鼯鼠脾脏出现了氧化应激损伤,但辐照后 21 d 裸鼯鼠脾脏组织总体的抗氧化能力逐渐恢复,且辐照并未影响脾脏 B 淋巴细胞发挥免疫应答功能。结果表明裸鼯鼠脾脏组织确实具有一定程度的辐射耐受能力,另一方面也说明裸鼯鼠脾脏组织中还可能还存在其他尚未明确的抗氧化修复机制。本研究结果为进一步探讨裸鼯鼠抗电离辐射机制提供了参考。

参考文献:

- [1] Xie TW, Park JS, Zhuo WH, et al. Development of a nonhuman primate computational phantom for radiation dosimetry[J]. *Med Phys*, 2020, 47(2):736-744. doi: 10.1002/mp.13936.
- [2] Maremonti E, Eide DM, Rossbach LM, et al. *In vivo* assessment of reactive oxygen species production and oxidative stress effects induced by chronic exposure to gamma radiation in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152:583-596. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.037.
- [3] Bilko DI, Russu IZ, Bilko NM. Assessment of radioprotective action of basidiomycotic melanin pigments on the hematopoietic system of BALB/c mice under exposure to ionizing radiation in sublethal dose[J]. *Probl Radiac Med Radiobiol*, 2019, 24:210-219. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-210-219.
- [4] Zhang XH, Xing XS, Liu HW, et al. Ionizing radiation induces ferroptosis in granulocyte-macrophage hematopoietic progenitor cells of murine bone marrow[J]. *Int J Radiat Biol*, 2020, 96(5):584-595. doi: 10.1080/09553002.2020.1708993.
- [5] 陈超,丛薇,杨文静,等.裸鼯鼠与小鼠抗辐射能力比较研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(6):479-483.
- [6] 于纯淼,王贺,赵力松,等.不同辐照剂量率 X 射线对小鼠外周血细胞及免疫器官的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(2):140-143.
- [7] 曾桂英,金成,任东青,等.电磁脉冲辐照引起小鼠免疫功能 and 脾脏超微结构的变化[C]. 宁波:第七届全军防原医学专业委员会第五届中国毒理学会放射毒理专业委员会学术会议, 2004.
- [8] 孟凡旭,何淑梅,董娟聪,等.电离辐射对小鼠脾细胞中调节性 T 细胞及其相关分子表达的影响[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2010, 30(5):540-543.
- [9] 王月华,蒋林哲,徐俊杰,等.微波辐射对孕鼠脾淋巴细胞活性氧和线粒体膜电位影响的研究[J]. *中国妇幼保健*, 2013, 28(31):5194-5196.
- [10] 陈凤鸣.低剂量辐射对小鼠骨髓、肝及脾 DNA 甲基化的影响[D]. 重庆:重庆医科大学, 2014.
- [11] 童建,田海林,秦立强,等. γ -辐射对小鼠脾细胞周期和凋亡节律的毒作用[J]. *工业卫生与职业病*, 1999, 25(6):344-347.
- [12] 赵善民,赵懿宁,汤球,等.裸鼯鼠胸腺、脾脏及淋巴结解剖学、组织学与超微结构的初步观察[J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(5):395-399.
- [13] Paranch AV, Tyslenko KV, Frolova NA, et al. Structural and functional changes in various cells following radiation exposure[J]. *Biofizika*, 2001, 46(6):1103-1107.
- [14] Anderson RE, Warner NL. Ionizing radiation and the immune response[J]. *Adv Immunol*, 1976, 24:215-235.
- [15] Harrington NP, Chambers KA, Rose WM, et al. Radiation damage and immune suppression in splenic mononuclear cell populations[J]. *Clin Exp Immunol*, 1997, 107(2):417-424. doi: 10.1111/j.1365-2249.1997.272-ce1158.x.
- [16] 何颖,张俊玲,赵忆宁,等.西咪替丁对伽马射线辐照小鼠免疫功能的保护作用[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2018, 36(2):25-31.
- [17] 左丽丽,富校轶,高永欣,等.狗枣猕猴桃多酚对 ^{60}Co γ 射线辐射防护作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 22:344-353.
- [18] 李辉,白海娜,刁岩,等.松多酚及其炭黑曲霉转化产物对 γ -辐射诱导小鼠免疫损伤的防护研究[J]. *航天医学与医学工程*, 2016, 29(2):84-89.