

# 小鼠低剂量脾区照射与低剂量全身照射对T细胞免疫功能的影响

厉彦子<sup>1</sup>, 吕红英<sup>1</sup>, 梁东海<sup>1</sup>, 周非<sup>1</sup>, 陈文秀<sup>1</sup>, 赵伟<sup>2</sup>, 矫晨晨<sup>1</sup>, 周雨媛<sup>1</sup>, 于洪升<sup>1</sup>

<sup>1</sup>青岛大学附属医院肿瘤科, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛市黄岛区中医院放疗科, 山东 青岛

收稿日期: 2022年3月6日; 录用日期: 2022年3月29日; 发布日期: 2022年4月8日

## 摘要

目的: 通过观察小鼠低剂量脾脏照射、低剂量全身照射与空白对照组小鼠脾脏指数、脾脏T淋巴细胞亚群变化, 探讨其差异变化的意义。方法: 经不同辐射剂量照射小鼠脾脏或全身体, 建立小鼠模型。处死小鼠取脾脏组织计算各组小鼠脾脏指数改变、采用流式细胞术分析脾脏T淋巴细胞亚群改变。结果: 与空白对照组相比, 低剂量脾区照射组与低剂量全身照射组小鼠脾脏指数均升高, 而低剂量脾区照射组小鼠升高更为明显; 低剂量脾区照射组、低剂量全身照射组小鼠脾脏CD3+ T淋巴细胞、CD4+ T淋巴细胞较空白对照组比例升高, 低剂量脾区照射组升高更为明显。结论: 经低剂量脾区照射、低剂量全身照射小鼠后, 脾脏T淋巴细胞亚群发生改变, 使CD3+ T淋巴细胞、CD4+ T淋巴细胞表达比例升高, 而低剂量脾区照射刺激作用更强。

## 关键词

低剂量脾区照射, T淋巴细胞, 免疫

# Effects of Low Dose Splenic Region Irradiation and Low Dose Total Body Irradiation on T Cell Immune Function in Mice

Yanzi Li<sup>1</sup>, Hongying Lv<sup>1</sup>, Donghai Liang<sup>1</sup>, Fei Zhou<sup>1</sup>, Wenxiu Chen<sup>1</sup>, Wei Zhao<sup>2</sup>, Chenchen Jiao<sup>1</sup>, Yuyuan Zhou<sup>1</sup>, Hongsheng Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Radiation Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

<sup>2</sup>Radiotherapy Department, Huangdao District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingdao City, Qingdao Shandong

Received: Mar. 6<sup>th</sup>, 2022; accepted: Mar. 29<sup>th</sup>, 2022; published: Apr. 8<sup>th</sup>, 2022

文章引用: 厉彦子, 吕红英, 梁东海, 周非, 陈文秀, 赵伟, 矫晨晨, 周雨媛, 于洪升. 小鼠低剂量脾区照射与低剂量全身照射对T细胞免疫功能的影响[J]. 临床医学进展, 2022, 12(4): 2519-2526. DOI: 10.12677/acm.2022.124363

## Abstract

**Objective:** To observe the changes of spleen index and T lymphocyte subsets in mice with low dose splenic irradiation, low dose total body irradiation and blank control group, and to explore the significance of the difference. **Method:** The mouse model was established by irradiating the spleen or the whole body with different doses of radiation. The spleen tissues of the mice were taken to calculate the changes of spleen index and the changes of T lymphocyte subsets in spleen were analyzed by flow cytometry. **Result:** Compared with blank control group, spleen index of mice in low dose splenic area irradiation group and low dose total body irradiation group increased, but the increase of mice in low dose splenic area irradiation group was more obvious. Compared with blank control group, the proportion of CD3+ T lymphocytes and CD4+ T lymphocytes in spleen of mice in low dose splenic area irradiation group and low dose total body irradiation group increased, and the increase was more obvious in low dose splenic area irradiation group. **Conclusion:** The spleen T lymphocyte subsets of mice were changed after low and low dose splenic irradiation and low dose total body irradiation, and the expression proportion of CD3+ T lymphocyte and CD4+ T lymphocyte increased, while the stimulation effect of low dose splenic irradiation was stronger.

## Keywords

Low Dose Splenic Region Irradiation, T Lymphocyte, Immunity

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

提起辐射对人体的作用,大多数学者支持线性阈值概念,是指所有剂量水平的长时间的辐射对机体都是有害的[1]。然而研究者也曾指出,低剂量辐射在某些情况可以引起机体免疫反应的积极作用。80年代初,美国 Luchey 首次提出了“辐射刺激作用(Radiation Hormesis)”的假说[2],联合国原子辐射效应科学委员会于 1986 年提出,低剂量照射是指 $<0.2$  Gy 的低线性能量转移辐射或 $<0.05$  Gy 的高线性能量转移辐射,同时剂量率 $<0.05$  mGy/min [3],有关研究观察到低剂量电离辐射可以诱导免疫兴奋,它可以增强免疫反应,提高机体自身适应能力,加速损伤的修复。相关研究显示,低剂量辐射还可以提高个体对肿瘤的抵抗能力,减轻放疗和化疗的副作用。有关研究还发现,用低剂量照射预处理后,可以减轻高剂量照射对机体的损伤[4] [5]。低剂量辐射同时能够抑制细胞的衰老过程,延缓癌症的发展[6]。而脾脏作为机体的重要的免疫器官之一,是多种免疫细胞产生、增殖和进行免疫表达的场所。日本学者栗原涛之分别采用低剂量辐射照射小鼠全身、单纯照射脾脏、遮避脾区照射全身、只照射肿瘤局部,去观察抗肿瘤效果,结果表明前二者效果相似,而后二者未出现抗肿瘤作用,证实只要脾脏组织未受到低剂量照射,抗肿瘤效果就不会产生,只有免疫功能受到低剂量辐射后激活,才会具有抗肿瘤的作用[7]。有关实验也已证明,低剂量脾区照射可以对人体产生有益影响[8]。低剂量照射能刺激脾脏产生 IL-2 和 IFN- $\gamma$  分泌,激活自然杀伤细胞和抗原依赖性细胞介导的细胞毒作用,增加脾脏免疫细胞的增殖[9]。某些研究也证实通过低剂量脾区照射刺激脾脏功能可以对肿瘤等疾病的治疗产生积极的作用[10]。所以,本研究选择脾脏作为照射靶区。本研究为确定低剂量脾区照射及全身照射对机体免疫系统的具体影响,将正常健康未经照射小鼠作为对照,利用流式细胞术检测对照组及不同实验组小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群变化,来明确低剂量脾区、全身照射对于机体免疫系统的影响。

## 2. 实验方法

### 2.1. 实验动物

本 4~6 周龄昆明小鼠模型(饲养环境: SPF 级), 雌雄各半, 由济南鹏越提供, 体重为  $17 \pm 2$  g。常规饲养 1 周后体重增加至  $20 \pm 2$  g 进行实验。

### 2.2. 实验器械

本 23EX 直线加速器, 美国 Varian medical systems 产品; 流式细胞仪, 英国 APOGEE 公司产品; 其他器械: 超净工作台、低速离心机、微量移液器和常规手术器械及其他常规器械。

### 2.3. 药品及试剂

PBS (1X), 4%多聚甲醛, 溶血素红细胞裂解液, CD3+ APC, CD4+ FITC, CD8+ PE 荧光标记单克隆抗体均购自 BD 公司。

### 2.4. 实验设计及照射方法

建立不同照射条件 3 组: 1) 空白对照组( $n = 10$ ): 适龄雄性/雌性小鼠模型; 2) 实验组 1 ( $n = 10$ ): 适龄雄性/雌性小鼠模型 + 低剂量(LDR)脾脏照射; 3) 实验组 2 ( $n = 10$ ): 适龄雄性/雌性小鼠模型 + 低剂量分割(多次分割 LDR)脾脏照射; 照射组均使用自制纸盒盛装固定小鼠, 低剂量(LDR)脾照射与低剂量全身照射均调整剂量率为 5 cGy/min, 总量为 75 mGy (7.5 cGy), 低剂量脾区照射视野固定为小鼠脾区(左上腹部), 范围  $2 \times 2$  cm。低剂量全身照射视野固定为小鼠全身, 范围  $15 \times 5$  cm。

### 2.5. 小鼠脾脏指数表达

空白对照组小鼠模型及照射组小鼠模型成模后, 称重小鼠体重, 后经二氧化碳窒息法人道主义处死小鼠后取脾脏组织, 去除脂肪及结缔组织后称重, 计算各组小鼠脾脏指数。

### 2.6. 小鼠脾脏组织 CD3+ T 淋巴细胞、CD4+ T 淋巴细胞、CD8+ T 淋巴细胞表达测定

空白对照小鼠模型及照射小鼠模型成模后, 经二氧化碳窒息法人道主义处死, 取小鼠外周血抗凝处理; 取脾脏组织过 200 目筛网, 得脾脏单细胞悬液, 另分别取 200  $\mu$ l 脾脏细胞悬液按照 1:10 比例加入 1X 红细胞裂解液, 摇匀后全血及脾脏细胞分别裂解 15 min 和 5 min, 250 xg 离心 5 min 后重悬, 按照 1:100 稀释比例将标记抗体分别加入 200  $\mu$ l 脾脏细胞混合均匀, 避光染色 30 min 后, 用 PBS 洗去非特异结合, 然后进行流式细胞分析, 并比对分析其检测结果。

### 2.7. 小鼠脾脏组织 CD3+ T 淋巴细胞、CD4+ T 淋巴细胞、CD8+ T 淋巴细胞表达测定

所有的实验操作重复 3 次, 实验结果统计学分析采用 SPSS21.0 版本。定量统计结果若符合正态分布, 以  $M \pm SD$  表示, \*\*代表  $P < 0.01$ 、\*代表  $P < 0.05$  认为有统计学意义上的差别。两组样本间比较采用 T 检验, 多样本间比较采用单因素方差分析法。

## 3. 结果

### 3.1. 小鼠脾脏指数

脾脏指数变化: 低剂量脾区照射组较低剂量全身照射组, 脾脏指数未见明显改变( $P > 0.05$ ); 低剂量脾区照射组及低剂量全身照射组较空白对照组脾脏指数有明显增加( $*P < 0.05$ )。见表 1。

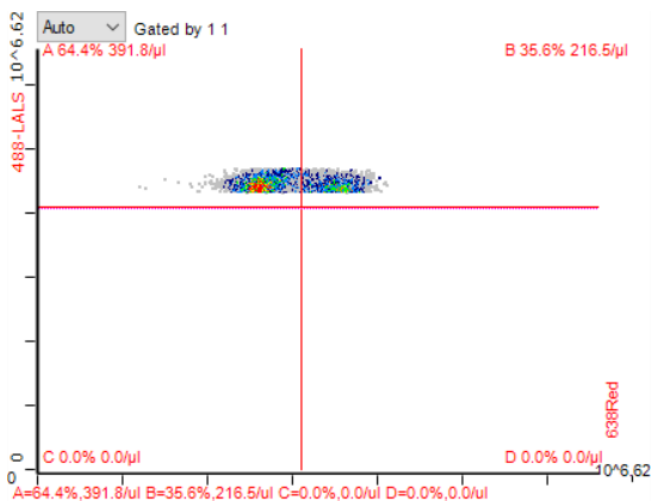
**Table 1.** Spleen index data of mice

**表 1.** 小鼠脾脏指数结果数据

	脾脏重量/(mg)	体重/(g)	脾脏指数/(mg/g)
空白对照组	83.14 ± 2.65	20.33 ± 1.23	4.09 ± 0.17
低剂量脾区照射组	86.19 ± 2.54	20.23 ± 1.08	4.26 ± 0.15
低剂量全身照射组	86.24 ± 1.73	20.31 ± 1.32	4.24 ± 0.14

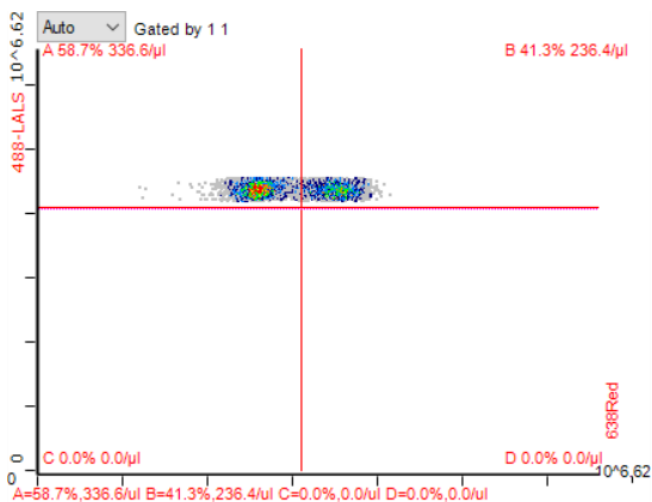
### 3.2. 对照组及照射组小鼠脾脏 CD3+ T 淋巴细胞流式分析

经流式细胞术上机检测后，低剂量脾区照射组、低剂量全身照射组小鼠脾脏 CD3+ T 淋巴细胞较空白对照组比例升高(\*\*P < 0.05)，低剂量脾区照射组 CD3+ T 淋巴细胞比例升高更明显(\*P < 0.01)；流式细胞图见图 1~3，统计结果见图 4。



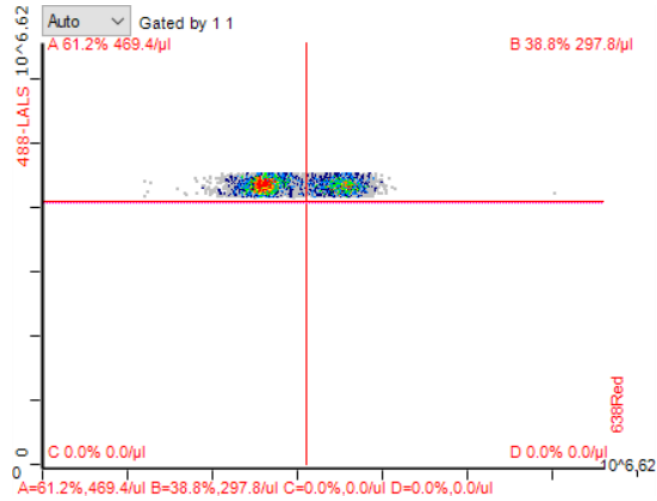
**Figure 1.** CD3+ T lymphocytes in blank control group

**图 1.** 空白对照组 CD3+ T 淋巴细胞

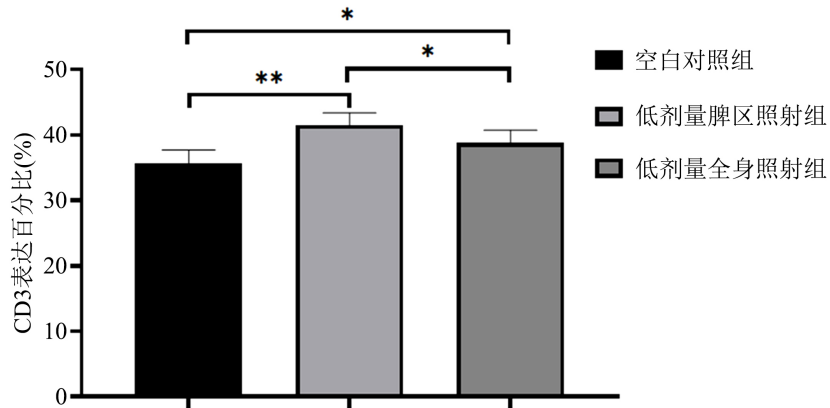


**Figure 2.** CD3+ T lymphocytes in low dose splenic irradiation group

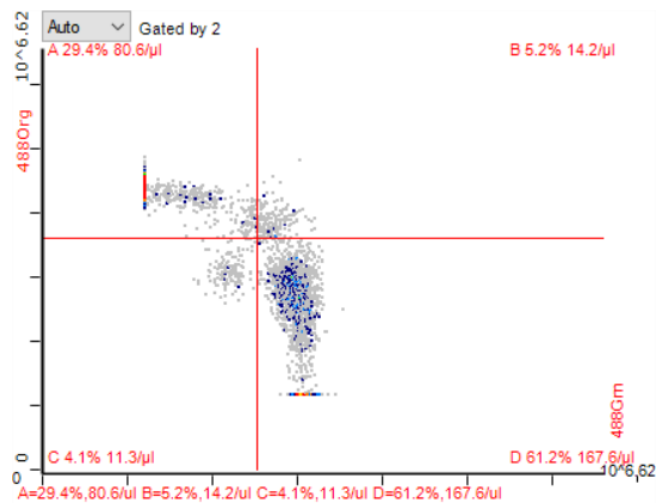
**图 2.** 低剂量脾区照射组 CD3+ T 淋巴细胞



**Figure 3.** CD3+ T lymphocytes in low dose total body irradiation  
**图 3.** 低剂量全身照射组 CD3+ T 淋巴细胞



**Figure 4.** Flow cytometry analysis of CD3+ T lymphocytes in mouse spleen  
**图 4.** 小鼠脾脏 CD3+ T 淋巴细胞流式分析



**Figure 5.** CD4+/CD8+ T lymphocytes in blank control group  
**图 5.** 空白对照组 CD4+/CD8+ T 淋巴细胞

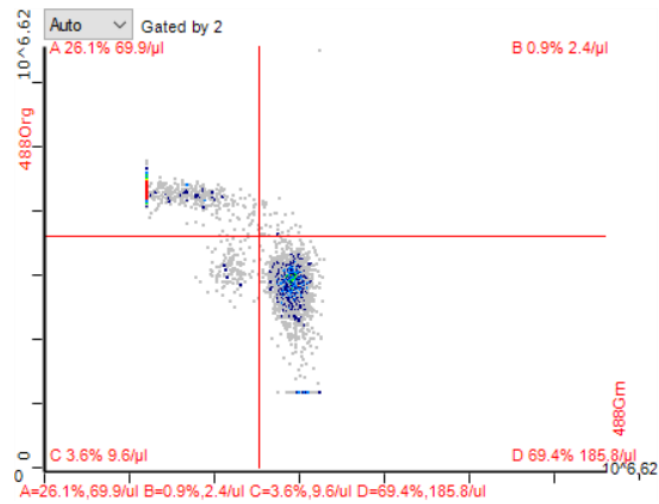


Figure 6. CD4+/CD8+ T lymphocytes in low dose splenic irradiation group  
 图 6. 低剂量脾区照射组 CD4+/CD8+ T 淋巴细胞

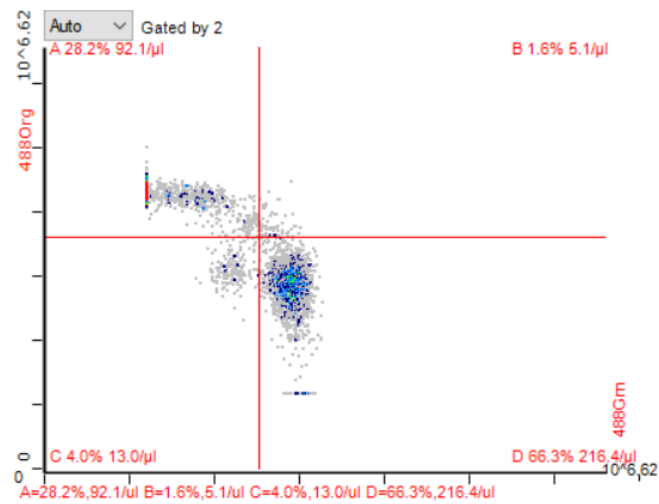


Figure 7. CD4+/CD8+ T lymphocytes in low dose total body irradiation group  
 图 7. 低剂量全身照射组 CD4+/CD8+ T 淋巴细胞

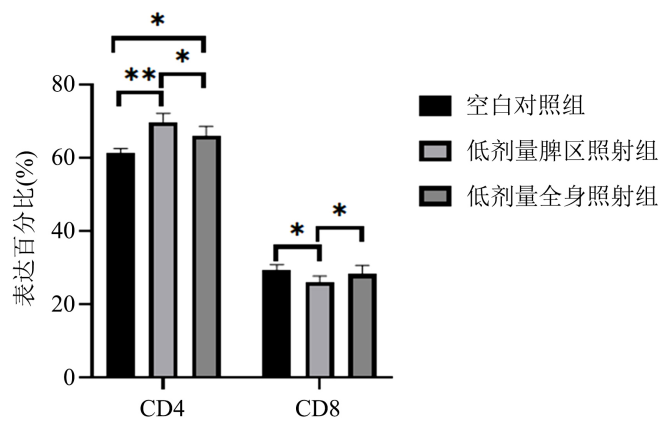


Figure 8. Flow cytometry analysis of CD4+/CD8+ T lymphocytes in mouse spleen  
 图 8. 小鼠脾脏 CD4+/CD8+ T 淋巴细胞流式分析

### 3.3. 对照组及照射组小鼠脾脏 CD4+/CD8+ T 淋巴细胞流式分析

低剂量脾区照射组、低剂量全身照射组小鼠脾脏 CD4+ T 淋巴细胞较空白对照组升高(\* $P < 0.05$ ), 低剂量脾区照射组 CD4+ T 淋巴细胞比例升高更明显(\* $P < 0.01$ ); 低剂量脾区照射组脾脏 CD8+ T 淋巴细胞较空白对照组及低剂量全身照射组比例均有降低(\* $P < 0.05$ )。流式细胞图见图 5~7, 统计结果见图 8。

## 4. 讨论

论脾脏作为机体最重要的免疫器官之一, 与细胞免疫及体液免疫密切相关, 对脾内及外周血中的 T 淋巴细胞的量和比例有重要的调节作用[11], T 淋巴细胞亚群又可以分 CD3+ T 细胞、CD4+ T 细胞(辅助/诱导性 T 淋巴细胞)和 CD8+ T 细胞(抑制性/细胞毒 T 淋巴细胞)。CD3+ T 淋巴细胞几乎存在于所有的 T 细胞表面, CD4+ T 淋巴细胞可协助 B 细胞分泌抗体和调节其他 T 细胞的免疫应答, CD8+ T 淋巴细胞常表现细胞毒活性, 是主要的细胞毒效应细胞。在机体内起到抗肿瘤效应的细胞主要包括抗体、T 淋巴细胞和自然杀伤细胞[12], T 淋巴细胞则主要通过抗原特异性反应来准确识别肿瘤细胞, 可表达识别肿瘤特异性抗原的受体, 并分化成效应性或记忆性 T 淋巴细胞, 从而发挥识别并杀伤肿瘤的作用[13]。T 淋巴细胞可以通过识别机体内“非自我”的抗原而杀灭肿瘤细胞[14]。T 淋巴细胞也能够穿过复杂的血脑屏障(BBB) [15], 这种穿透特性使得 T 淋巴细胞能够杀灭一般药物难以到达的病灶脑转移部位, 例如原发性脑肿瘤及脑转移瘤[16]。根据本实验结论证实, 低剂量脾区照射后对于机体产生的适应性改变可以通过调节 T 淋巴细胞亚群所产生的, 李德锐教授通过对鼻咽癌患者脾区接受低剂量照射后外周血 T 淋巴细胞亚群的变化研究中, 观察到在放射治疗的同时, 加入脾区低剂量照射的干预后, CD3+ T 淋巴细胞、CD4+ T 淋巴细胞较常规照射组增加, CD8+ T 淋巴细胞减少, CD4/CD8 比率增高[17]。同时, 国外学者发现, 多次低剂量照射后的抗肿瘤作用较一次照射后效果更好[18], 这可能与多次低剂量照射较一次低剂量照射所引起的免疫效应更强有关。同时, 早期研究发现胃癌随着病期进展, 脾脏中 CD8+ T 淋巴细胞的活性较外周血明显增高, 而 CD4+ T 淋巴细胞活性却明显降低[19]。这说明随着肿瘤的发展, 会使得脾脏的免疫功能受到抑制。

综上所述, 利用低剂量辐射对小鼠脾脏及全身进行照射, 通过流式细胞术观察脾脏 T 淋巴细胞亚型的变化、脾脏指数的改变, 可以发现低剂量脾区照射后会导致机体免疫兴奋及其对脾脏和 T 淋巴细胞的表达所产生的具体影响, 为放射治疗及免疫治疗未来的研究提供了新的想法。

## 参考文献

- [1] Fukunaga, H., Butterworth, K.T., Yokoya, A., *et al.* (2017) Low-Dose Radiation-Induced Risk in Spermatogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, **93**, 1291-1298. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1355579>
- [2] Liu, S.Z. (1989) Radiation Hormesis. A New Concept in Radiological Science. *Chinese Medical Journal*, **102**, 750-755.
- [3] O'Connor, M.K. (2017) Risk of Low-Dose Radiation and the BEIR VII Report: A Critical Review of What It Does and Doesn't Say. *Physics in Medicine*, **43**, 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.07.016>
- [4] Frakulli, R., Salvi, F., Balestrini, D., *et al.* (2017) Radiological Differential Diagnosis between Fibrosis and Recurrence after Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Translational Lung Cancer Research*, **6**, S1-S7. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.10.01>
- [5] Kumar, A., Woody, N.M., Djemil, T., *et al.* (2014) Synchronous Non Small Cell Lung Cancer Nodules Treated with Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT). *Journal of Radiosurgery & SBRT*, **3**, 81-88.
- [6] Yang, G., Wei, L., Jiang, H., *et al.* (2016) Low-Dose Radiation Maybe a Novel Approach to Enhance the Effectiveness of Cancer Therapeutics. *International Journal of Cancer*, **139**, 2157-2168. <https://doi.org/10.1002/ijc.30235>
- [7] 栗原涛之. 极低剂量放射线的生物效应[J]. 放射线科学, 1991, 34(6): 171.
- [8] Tharmalingam, S., Sreetharan, S., Kulesza, A.V., *et al.* (2017) Low-Dose Ionizing Radiation Exposure, Oxidative

- Stress and Epigenetic Programming of Health and Disease. *Radiation Research*, **188**, 525-538. <https://doi.org/10.1667/RR14587.1>
- [9] Chen, S.L., Cai, L., Meng, Q.Y., *et al.* (2000) Low-Dose Whole-Body Irradiation (LD-WBI) Changes Protein Expression of Mouse Thymocytes: Effect of a LD-WBI-Enhanced Protein RIP10 on Cell Proliferation and Spontaneous or Radiation-Induced Thymocyte Apoptosis. *Toxicological Sciences*, **55**, 97-106. <https://doi.org/10.1093/toxsci/55.1.97>
- [10] Morel, K.L., Ormsby, R.J., Bezak, E., *et al.* (2017) Parthenolide Selectively Sensitizes Prostate Tumor Tissue to Radiotherapy While Protecting Healthy Tissues *in Vivo*. *Radiation Research*, **187**, 501-512. <https://doi.org/10.1667/RR14710.1>
- [11] 徐明, 鲁建国, 马庆久. 脾神经与脾脏免疫功能研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(11): 2177-2179.
- [12] Zanetti, M. (2015) Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. *Journal of Immunology*, **194**, 2049-2056. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402669>
- [13] Schreiber, R.D., Old, L.J. and Smyth, M.J. (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, **331**, 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- [14] Chen, D.S. and Mellman, I. (2013) Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, **39**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- [15] Engelhardt, B. and Ransohoff, R.M. (2012) Capture, Crawl, Cross: The T Cell Code to Breach the Blood-Brain Barriers. *Trends in Immunology*, **33**, 579-589. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>
- [16] Tsai, A.K. and Davila, E. (2016) Producer T Cells: Using Genetically Engineered T Cells as Vehicles to Generate and Deliver Therapeutics to Tumors. *Oncimmunology*, **5**, e1122158. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1122158>
- [17] 李德锐, 许少彦, 陈世坚, 等. 鼻咽癌患者脾区低剂量照射对外周血T-淋巴细胞亚群的影响[J]. 汕头大学医学院学报, 2000, 13(1): 23-25.
- [18] 宮本美弥子. 低線量全身照射の抗腫瘍効果に関する放射線生物学的研究[J]. 癌症臨床, 1987, 33(8): 1211-1220.
- [19] Toge, T., Kuroi, K., Kuninobu, H., *et al.* (1988) Role of the Spleen in Immunosuppression of Gastric Cancer: Predominance of Suppressor Precursor and Suppressor Inducer T Cells in the Recirculating Spleen Cells. *Clinical & Experimental Immunology*, **74**, 409-412.