

模拟失重和辐射对大鼠脾 T 细胞和胸腺的影响 及中药太空变理汤的作用

张 林, 谢 鸣*

(北京中医药大学国家重点方剂学学科, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察模拟失重和辐射对大鼠脾脏 T 淋巴细胞功能和胸腺细胞凋亡的影响, 及中药太空变理汤的调节作用。方法: 大鼠随机分为正常对照、悬吊、悬吊加辐射、中药共 4 组。后 3 组大鼠头低位-30 度尾部悬吊连续 16 d, 其中悬吊加辐射组和中药组大鼠于悬吊第 8 天接受单次总量为 4.5Gy 的⁶⁰Co γ 射线照射, 中药组大鼠从实验第 1 天开始按 7g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 给予中药太空变理汤灌胃, 其余各组大鼠灌服等容积的生理盐水。实验第 16 天处杀各组大鼠, 采用 MTT 比色法、放免法检测脾 T 淋巴细胞增殖率和分泌 IL-2 水平, 利用流式细胞仪检测胸腺细胞凋亡。结果: 较之正常对照组, 悬吊组和悬吊加辐射组大鼠脾淋巴细胞增殖率和分泌 IL-2 水平显著降低 ($P < 0.01$), 胸腺细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 悬吊组和悬吊加辐射组之间无显著差异 ($P > 0.05$); 较之于悬吊加辐射组, 中药组大鼠脾淋巴细胞增殖率显著增加 ($P < 0.05$), T 淋巴细胞分泌 IL-2 水平呈增加趋势 ($P > 0.05$), 胸腺细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。结论: 单纯失重和失重加辐射均可引起机体淋巴细胞功能降低, 太空变理汤对失重加辐射条件下的机体免疫功能具有调节作用。

[关键词] 失重; 辐射; T 细胞; 胸腺; 中医药

[中图分类号] 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)03-0035-03

载人航天实践证明, 在空间飞行中由于受到持续失重、辐射、噪声、心理等多种因素的影响, 机体的免疫功能发生紊乱^[1], 导致航天员感染性疾病发病率升高, 同时航天中出现的其他疾病也与免疫系统的功能失调有着密切的关系。已知太空失重和空间辐射是航天环境中的两个重要因素, 而脾和胸腺作为重要的免疫器官, 在机体免疫调节中发挥重要作用。本文在复制大鼠失重模型的基础上, 观察了失重加辐射复合因素对大鼠胸腺细胞凋亡和脾 T 淋巴细胞功能的影响及中药太空变理汤的干预作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只, 级别 SPF/VAF, 体重(180 \pm 10)g, 北京维通利华实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(京)2002-0003。

1.1.2 药物 太空变理汤(TKXLD): 由人参、麦冬、五味子、茯苓、黄芪、熟地黄、骨碎补、川芎组成(9: 12

: 6: 15: 12: 20: 15: 6)。全部药材购自北京同仁堂有限公司。方中麦冬、茯苓、生黄芪、熟地黄、川芎采用常规水煎煮法提取, 生晒参和五味子与骨碎补分别采用水提醇沉和醇沉法提取, 将所得全部药液混合浓缩成 100%, 干燥后加赋形剂制成颗粒, 使用前用蒸馏水溶解成 70% 浓度的药液。

1.1.3 试剂 Con A 和 MTT, Sigma 公司产品; RPMI-1640 培养基, GIBCO 公司产品; 完全 1640 培养基, 取配制好的 RPMI-1640 培养基 90 mL, 加新生小牛血清 10 mL, 再加 3% L-谷氨酰胺 1 mL, 青霉素-链霉素 1 mL, 于应用前配制。新生小牛血清, 华美生物技术公司产品; DMSO, Sigma 公司产品; IL-2 放免试剂盒, 解放军总医院科技开发中心放免研究所产品, 膜联蛋白-V-FITC (Annexin V-FITC)、标记缓冲液 (Binding Buffer) 和碘化丙啶(propidine iodide, PI): 北京宝赛生物技术有限公司产品。

1.1.4 仪器 酶标仪: 日本 Bio-Rad 2550; DFM-96 型 16 管放射免疫 γ 计数器: 上海核所日环光电仪器有限公司; FACS420 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

2 方法

2.1 动物分组与处理 大鼠随机分为 4 组: 正常组 (C)、悬吊组 (S)、悬吊加辐射组 (SAI) 和中药组

[收稿日期] 2007-11-26

[基金项目] 国防重点课题(01101310)

[通讯作者] * 谢 鸣, Tel: (010) 64286992; E-mail: xieming603@263.net

(TKXLD), 每组 10 只。TKXLD 组大鼠从实验第 1 天开始按 $7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (颗粒剂量) 给予太空变理汤灌胃。其余各组大鼠灌服等容积的生理盐水。S 组、SAI 组、TKXLD 组大鼠采用头低位 - 30° 尾部悬吊法^[2] 模拟失重, 每天悬吊 24 h, 共悬吊 16 d; SAI 和 TKXLD 组大鼠于悬吊第 8 天接受 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 射线辐射 (钴源由军事医学科学院放射医学研究所提供), 总剂量为 4.5 Gy; C 组大鼠不采取任何处理。实验第 16 天, 各组大鼠于灌胃后 2 h 脱颈椎处死。无菌条件下剪取脾脏和胸腺。

2.2 指标测定

2.2.1 脾 T 淋巴细胞增殖转化功能测定 采用 MTT 比色法^[3]。无菌条件下制备脾细胞悬液, 用完全 RPMI-1640 培养基调整脾细胞浓度为 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 置 96 孔细胞培养板, 100 μL /孔, 再加入 Con A (终浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。置 37°C , 5% CO_2 培养箱中孵育 68 h, 每孔弃液 100 μL , 并加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 10 μL 。再置 37°C , 5% CO_2 培养箱孵育 4 h。加入 DMSO 150 μL , 振荡摇匀, 10 min 后, 酶标仪测定光吸收值 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$)。

2.2.2 IL-2 的诱生与测定 将上述制备的脾细胞悬液, 调细胞浓度为 5×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 置 24 孔培养板, 1 mL/孔, 并加 Con A (终浓度为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 5% CO_2 培养 48 h, 离心收集上清, -20°C 保存待测。上清液中 IL-2 的测定采用放免法检测。

2.2.3 胸腺细胞凋亡测定 无菌条件下制备胸腺细胞悬液, 调整浓度为 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 1 mL 胸腺细胞, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 4°C 离心 10 min, 弃上清。加入 2 mL 冷 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮。用 PBS 重复洗细胞两次后, 将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer 中。加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 30 min。加入 300 μL Binding Buffer, 30 min 后上机检测。应用 CELL QUEST 软件获取细胞 10 000 个, 进行凋亡细胞计数。

2.3 统计学处理 所得数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 11.0 软件处理, 单因素方差分析 (one-way ANOVA) 后, 行多组间比较, 采用 Student-Newmarr-Keuls 检验。

3 结果

3.1 模拟失重加辐射对大鼠脾 T 淋巴细胞增殖反应的影响及 TKXLD 的作用 结果见表 1。从表 1 中可以看出, 与 C 组比较, S 组和 SAI 组大鼠脾 T 淋巴

细胞增殖率均明显降低 ($P < 0.01$), 两组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 与 SAI 组比较, TKXLD 组大鼠脾 T 淋巴细胞增殖率提高 ($P < 0.05$)。

3.2 模拟失重加辐射对大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的影响及 TKXLD 的作用 结果见表 1。从表 1 中可以看出, 与 C 组比较, S 组和 SAI 组大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平均明显降低 ($P < 0.01$), 但两组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 与 SAI 组比较, TKXLD 组大鼠脾淋巴细胞分泌 IL-2 的水平呈增加趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3.3 模拟失重加辐射对大鼠胸腺细胞凋亡率的影响及 TKXLD 的作用 结果见表 1。从表 1 中可以看出, 与 C 组比较, S 组大鼠胸腺细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$), SAI 组大鼠胸腺细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$), 但两组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 与 SAI 组比较, TKXLD 组大鼠胸腺细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.01$)。

表 1 模拟失重和辐射对大鼠脾 T 淋巴细胞增殖、分泌 IL-2 和胸腺细胞凋亡的影响及中药复方太空变理汤的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	脾淋巴细胞增殖 反应 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$)	IL-2 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	胸腺细胞 凋亡率 (%)
正常组	—	0.459 ± 0.031	1.276 ± 0.345	8.730 ± 1.464
悬吊组	—	$0.417 \pm 0.032^{2)}$	$0.888 \pm 0.186^{2)}$	$11.963 \pm 2.678^{1)}$
悬吊加辐射组	—	$0.401 \pm 0.021^{2)}$	$0.880 \pm 0.206^{2)}$	$13.812 \pm 2.557^{2)}$
太空变理汤组	7	$0.440 \pm 0.019^{3)}$	1.135 ± 0.300	$8.482 \pm 1.868^{4)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与悬吊加辐射组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

4 讨论

淋巴细胞是构成免疫器官的基本单位, 其功能反映了机体免疫系统的功能状态。曾有研究表明航天中的失重因素可以引起淋巴细胞活性降低^[4]。人卧床模拟失重 2 d 后 T 淋巴细胞受 PHA 刺激后的增殖率明显下降^[5]; 大鼠尾部悬吊模拟失重 14 d 脾 T 淋巴细胞增殖和其产生 IL-2 的能力显著降低^[4]。本实验也观察到, 大鼠悬吊 16 d 脾 T 淋巴细胞增殖功能及其分泌 IL-2 水平均降低, 表明模拟失重可引起脾 T 淋巴细胞功能的抑制。汪涛等^[6] 曾报道经单次 2Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 照射后悬吊 7 d, 大鼠脾淋巴细胞增殖能力和其产生 IL-2 的功能明显降低。本实验中大鼠悬吊 7 d 后经用 4.5Gy $^{60}\text{Co-}\gamma$ 一次性照射再继续悬吊 8 d, 其脾 T 淋巴细胞增殖功能及分泌 IL-2 水平均明显降低, 再次证明辐射与失重复合可以引起脾 T 淋巴细胞功能的降低。已知 T 淋巴细胞的活化增殖是发挥免疫应答的必要条件, 静止 T 淋巴细胞在接受抗

原等刺激后,可发生增殖活化而形成效应细胞,并分泌 IL-2, IL-2 又可进一步促进 T 淋巴细胞活化而进入增殖状态。上述结果提示,失重或失重加辐射引起的免疫功能降低可能涉及到 T 淋巴细胞功能增殖与活化环节的抑制。

胸腺是 T 细胞发育和成熟的场所,在整个免疫系统中起着中枢作用,其损伤必将导致免疫功能障碍而引发一系列疾病。胸腺细胞凋亡作为影响机体免疫调节重要途径之一,在航天飞行免疫适应中的作用正引起人们的重视。曾有研究发现尾悬吊小鼠 1 d,其胸腺细胞总凋亡细胞数及早期凋亡细胞数呈增加趋势,悬吊 2 d 早期凋亡细胞数明显升高,总凋亡细胞数显著增加^[7];并且有研究观察到 3Gy ⁶⁰Co γ 照射后 2 h,小鼠胸腺淋巴细胞 DNA 凝胶电泳呈现典型梯状带,证明细胞发生了凋亡^[8]。本实验采用 Annexin V 和 PI 双染的流式细胞仪定量方法检测,发现大鼠尾悬吊 16 d 时的胸腺细胞凋亡率呈显著升高。结果表明模拟失重可引起胸腺细胞凋亡率的增加,提示航天飞行中机体免疫功能的降低可能涉及到失重对胸腺细胞凋亡的诱导。

理论上认为,单纯失重或辐射均有降低免疫功能的作用,二者复合作用对免疫功能的影响可能会出现叠加效应。但本实验观察到两组间并无显著性差异,表明模拟失重和模拟辐射对脾 T 淋巴细胞的功能和胸腺细胞的凋亡的影响无明显叠加作用。结果提示失重和辐射两个因素复合作用于整体时,机体多系统间或免疫系统内可能存在复杂的调控关系。

中医认为航天飞行环境中存在失重、孤独少动、外感辐射等因素可以引起脾肾两虚、气阴不足、气虚血滞等病机。复方太空变理汤则是依据对航天飞行生理适应性反应的中医辨证立法组方而成,该方具有益气滋阴、补肾活血的功效。本实验观察到,模拟

失重加辐射可引起大鼠脾 T 淋巴细胞功能的减低和增加胸腺细胞凋亡率,太空变理汤能显著提高模型大鼠减低的脾 T 淋巴细胞功能和减少其异常升高的胸腺细胞凋亡率,结果表明太空变理汤具有对抗模拟失重和辐射引起的大鼠免疫功能受损的作用,提示依据中医学理配伍而成的太空变理汤对航天飞行适应中的机体免疫状态可能具有保护作用。

[参考文献]

- [1] Klaus DM, Howard HN. Antibiotic efficacy and microbial virulence during space flight[J]. Trends Biotechnol, 2006, 24(3): 131-136.
- [2] Morev Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects[J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4): 1367-1377.
- [3] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1-2): 55-63.
- [4] Yamauchi K, Hales NW, Robinson SM, et al. Dietary nucleotides prevent decrease in cellular immunity in ground-based microgravity analog[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(1): 161-166.
- [5] 汪涛,温秀兰,杨光华,等. -6°卧床对 T 淋巴细胞增殖功能和细胞因子产生的影响[J]. 航天医学与医学工程, 1998, 11(2): 107-110.
- [6] 汪涛,杨光华,温秀兰. 模拟失重和辐射对大鼠免疫功能和垂体 β 内啡肽含量的影响[J]. 航天医学与医学工程, 1995, 8(4): 257-261.
- [7] 张虹,汪涛,陈建和,等. 尾部悬吊对小鼠胸腺细胞凋亡的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2001, 14(4): 291-294.
- [8] 唐启令,陈雪红,张鲁平,等. 盐藻 β 胡萝卜素对 ⁶⁰Co 辐射引起小鼠胸腺淋巴细胞凋亡的影响[J]. 中国海洋药物杂志, 2007, 26(2): 38-42.