

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00364

## 大剂量 $\gamma$ 射线对树突状细胞表型及功能的影响

周传丰, 杨彦勇, 刘 聪, 崔建国, 高 福, 李百龙, 程 赢, 孙 顶, 蔡建明\*

第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探讨大剂量电离辐射对树突状细胞(DC)表型及免疫功能的影响和辐射致免疫抑制的机制。**方法** 以粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素-4(IL-4)诱导造血干细胞产生 DC, 给予 0、10、20、30 Gy  $\gamma$  射线照射, 并于照后 24 h 进行脂多糖(LPS)处理(1  $\mu$ g/ml)使之成熟。用 Transwell 法研究 DC 的迁移能力, 流式细胞术检测 DC 表面分子(CD80、CD86、MHC-II 和 CCR7)的表达, ELISA 检测细胞因子(IL-6、IL-10 和 PGE2)的分泌。**结果** 大剂量  $\gamma$  射线对 DC 的表型无影响, 却能抑制 DC 向 CCL19 的迁移, 同时下调 CCR7 的表达, 减少 IL-6、IL-10 和 PGE2 等细胞因子的分泌。**结论** 大剂量  $\gamma$  射线可以通过下调 CCR7 和诱导凋亡抑制 DC 的迁移, 减少细胞因子的分泌, 导致免疫抑制。

**[关键词]**  $\gamma$  射线; 辐射损伤; 树突状细胞; 细胞表型**[中图分类号]** R 818**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0364-04

### Effect of high dose $\gamma$ -irradiation on phenotype and function of dendritic cells

ZHOU Chuan-feng, YANG Yan-yong, LIU Cong, CUI Jian-guo, GAO Fu, LI Bai-long, CHENG Ying, SUN Ding, CAI Jian-ming\*

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of high dose  $\gamma$ -irradiation on the phenotype and function of dendritic cells (DCs) and to study the underlying mechanism of irradiation-induced immunosuppression. **Methods** GM-CSF and IL-4 were used to generate DCs, which were then subjected to 0, 10, 20, and 30 Gy  $\gamma$ -irradiation. After 24 h irradiation DCs were treated with lipopolysaccharide for maturation. Then Transwell assay was used to determine the migration capacity of DCs, flow cytometry was used to detect the surface molecules on DCs (CD80, CD86, MHC-II, and CCR7). Cytokines secretion (IL-6, IL-10, and PGE2) was determined by ELISA. **Results** High dose  $\gamma$ -irradiation showed no influence on the phenotypes of DCs, but inhibited the migration of DCs towards CCL19. Moreover, the irradiation down-regulated CCR7 expression and decreased the secretion of IL-6, IL-10, and PGE2. **Conclusion** High dose  $\gamma$ -irradiation can inhibit DC migration by reducing CCR7 and inducing apoptosis. Moreover, it can also reduce the cytokine secretion, which provide a theoretical base for irradiation-induced immune suppression.

**[Key words]** gamma-rays; radiation injuries; dendritic cells; phenotype

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4):364-367]

电离辐射(ionizing radiation, IR)是威胁人类健康的众多天然因素之一, 近些年随着医学放射诊疗设备的广泛应用和核能的不断开发, 电离辐射已经渗透到人们生活的方方面面。电离辐射导致的机体免疫功能低下对各种放射病和感染的发生、发展有重要影响。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是免疫系统最重要的专职抗原提呈细胞, 也是免疫反应的启动者和重要调控者<sup>[1]</sup>。DC 平时定居在外周组织中, 当受到炎症刺激或细菌感染后, 它们开始向邻近的次级淋巴组织和淋巴器官迁移、定居, 并分化成熟<sup>[2]</sup>。DC 及时准确的迁移到特定的淋巴组织是其激活初始 T 淋巴细

胞的前提, 也是其发挥重要免疫功能的基础。

DC 是一种重要的免疫细胞, 对其辐射生物效应的研究报道相对较少。而相对于 T、B 淋巴细胞, DC 具有较高的辐射抗性, 在中等剂量并不表现出明显辐射损伤<sup>[3]</sup>, 因此研究大剂量电离辐射对 DC 表型及功能的影响, 并对其损伤进行防护和修复, 对于急、慢性放射病和继发感染的救治, 甚至对于免疫系统和机体的辐射防护有重要意义。

### 1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器 雄性 C57BL/6 小鼠, 4~6周

**[收稿日期]** 2011-04-06**[接受日期]** 2011-04-11**[基金项目]** 国家自然科学基金(30970679, 81001221)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30970679, 81001221)。**[作者简介]** 周传丰, 助教。E-mail: zcf302@yahoo.com.cn

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871148, E-mail: caijianming882003@yahoo.com.cn

龄,购自中国科学院上海实验动物中心。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素-4(IL-4)、CC趋化因子配体19(CCL19)购自Peprotech Systems(Rocky Hill, NJ, Minneapolis, MN);脂多糖(LPS)购自Sigma公司(USA);CD80-PE、CD86-PE、MHC-II-PE和CCR7-PE抗体购自Ebioscience公司(San Diego, CA);Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒购自Bipece Biopharma(Massachusetts, USA);ELISA试剂盒购自R&D(Minneapolis, MN)。主要仪器为第二军医大学辐照中心 $^{60}\text{Co}$ 辐照装置;Beckman Coulter流式细胞仪及分析系统。

1.2 DC培养与照射 取小鼠骨髓单个核细胞,Tris破红,以 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度培养于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中。该培养液含有10 ng/ml的鼠重组GM-CSF和1 ng/ml的鼠重组IL-4,用于诱导造血干细胞分化为DC。培养至第3天,轻轻吸掉悬浮细胞,贴壁细胞继续培养至第5天,即为未成熟的DC(imature DC, iDC)<sup>[4]</sup>。第5天,给予0、10、20、30 Gy  $\gamma$ 射线照射,并于照后24 h进行LPS处理(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )使其成熟。

1.3 DC表型分析 以CD80-PE、CD86-PE、MHC-II-PE和CCR7-PE等标记细胞,上流式细胞仪检测并分析结果。

1.4 Transwell体外趋化诱导分析 在24孔板中加入0.6 ml含5% BSA的RPMI 1640培养液(其中含100 ng/ml的CCL19),将Transwell管置于上方。在Transwell的上层加入0.1 ml含 $2 \times 10^5$  DCs的培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。轻轻移去Transwell管,收集24孔板中的培养液及细胞,3 759 $\times g$ 离心5 min,弃上清。用无菌PBS重悬,流式细胞仪计数<sup>[5-6]</sup>。

1.5 细胞因子检测 采用ELISA方法检测DC培养液上清中IL-6、IL-10和前列腺素E2(PGE2)的水平,操作严格按照说明书进行。

1.6 细胞凋亡检测 收集细胞,以Annexin V-FITC和PI标记细胞,采用流式细胞仪检测并分析结果。

1.7 统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用Student's *t*检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 大剂量 $\gamma$ 射线照射不影响DC抗原提呈分子 高剂量 $\gamma$ 射线照射后,与抗原提呈功能密切相关的分子CD80、CD86、MHC II均未发生明显改变;同时照射后,LPS诱导CD80的能力也未见明显变

化(图1)。

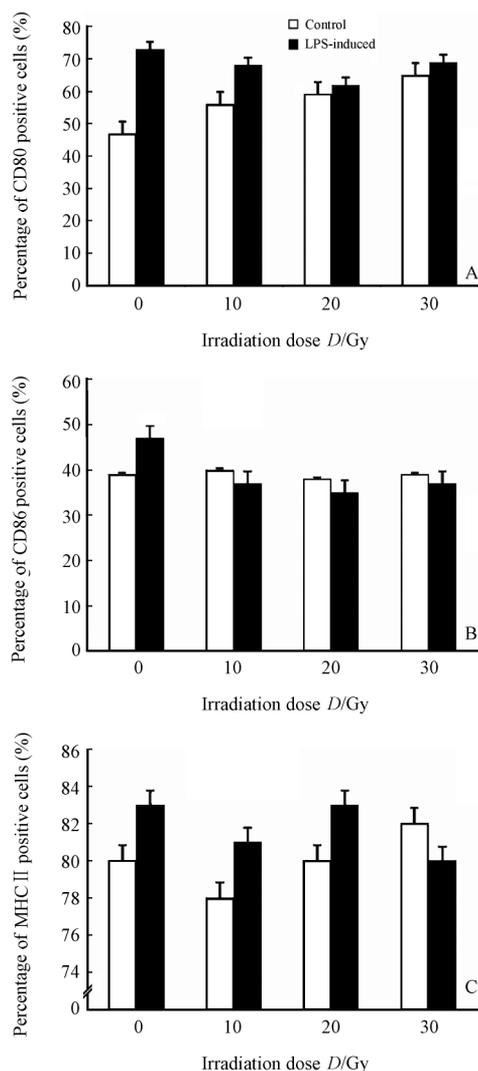


图1 大剂量 $\gamma$ 射线照射对DC表面分子CD80(A)、CD86(B)和MHC-II(C)的影响

Fig 1 CD80(A), CD86(B) and MHC-II(C) expression on DCs exposed to high dose  $\gamma$ -irradiation  
 $n=8, \bar{x} \pm s$

2.2 大剂量 $\gamma$ 射线照射抑制LPS诱导的DC向CCL19的迁移 Transwell法结果(图2)显示, $\gamma$ 射线能明显抑制LPS诱导的DC向CCL19迁移,并具有剂量依赖性。未照射时,和未成熟DC相比,LPS诱导成熟的DC向CCL19迁移的能力明显增强( $P < 0.05$ )。大剂量照射后,LPS诱导成熟的DC向CCL19迁移能力明显减弱( $P < 0.05$ )。

2.3 大剂量 $\gamma$ 射线照射对细胞因子分泌的影响 除了抗原提呈,DC还发挥重要的免疫调节作用,因此,我们检测了大剂量辐射对DC细胞因子分泌功能的影响。由图3可见,未照射时,LPS诱导成熟的DC分泌IL-10、IL-6和PGE2的能力明显增强

( $P < 0.05$ )。不同剂量照射之后,成熟 DC 分泌这些细胞因子的能力明显下降 ( $P < 0.05$ ),而未成熟 DC 分泌 IL-10、IL-6 和 PGE2 的能力并不受照射影响。

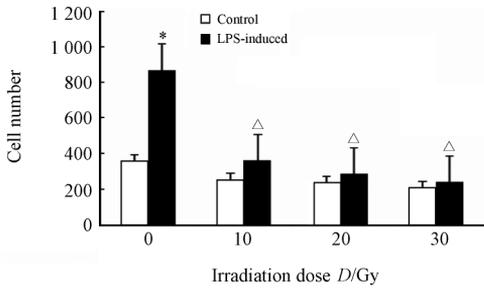


图 2 大剂量  $\gamma$  射线照射抑制 DC 向 CCL19 迁移

Fig 2 High dose  $\gamma$ -irradiation inhibited DC migration to CCL19 *in vitro*

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs 0 Gy.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

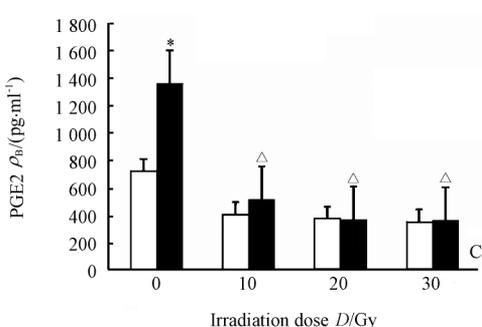
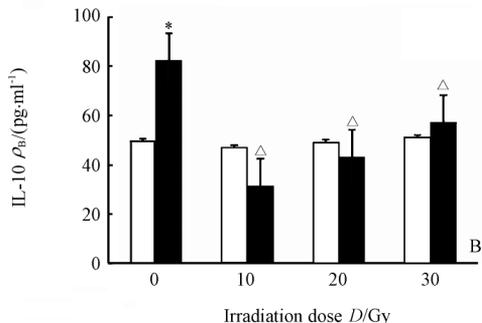
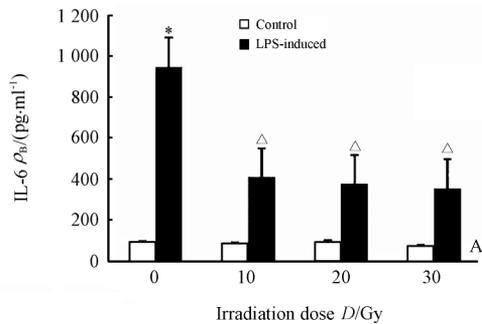


图 3 大剂量  $\gamma$  射线照射降低 DC IL-6(A)、IL-10(B) 和 PGE2(C) 的分泌

Fig 3 IL-6(A), IL-10(B), and PGE2(C) secretion by DCs was down-regulated after high dose  $\gamma$ -irradiation

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs 0 Gy.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

2.4 大剂量  $\gamma$  射线照射下调 CCR7 的表达并诱导 DC 凋亡 CCR7 介导 DC 向 CCL19 的迁移功能<sup>[6]</sup>,

因此我们检测了照射后 DC 表面 CCR7 的表达水平。结果显示,大剂量辐射诱导 CCR7 表达下调,具有剂量依赖性 ( $P < 0.05$ );LPS 处理组 CCR7 表达明显高于未处理组 ( $P < 0.05$ ,图 4A)。0、10、20、30 Gy  $\gamma$  射线照射后,DC 凋亡率明显增高,具有剂量依赖性 ( $P < 0.05$ ,图 4B)。

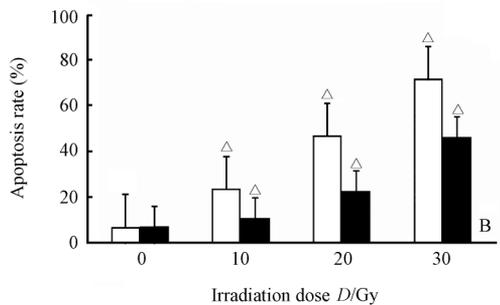
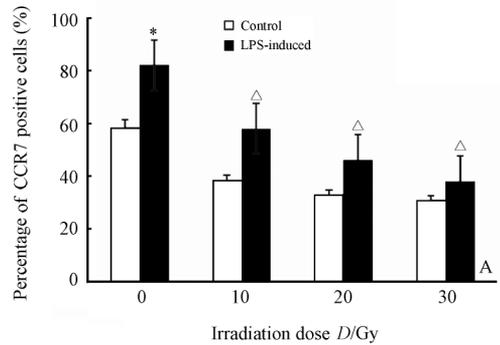


图 4 大剂量  $\gamma$  射线照射下调 CCR7 的表达并诱导 DC 凋亡

Fig 4 High dose  $\gamma$ -irradiation decreased CCR7 and induced DC apoptosis in a dose-dependent manner

\*  $P < 0.05$  vs control;  $\Delta P < 0.05$  vs 0 Gy.  $n = 8, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

电离辐射对生物体造成严重的损害,而免疫抑制是导致很多放射病预后不良甚至久治不愈的重要原因。电离辐射除了杀伤免疫系统放射敏感性较高的细胞以外,还对放射敏感性相对不高的一些细胞(如 DCs 和 Treg 等)的功能产生影响,从而对免疫系统产生调控作用<sup>[7]</sup>。

DC 是最重要的专职抗原提呈细胞,在免疫系统发挥重要作用<sup>[1]</sup>。DC 在 CD80、CD86 等共刺激分子的辅助下,通过 MHC-II 向 CD4<sup>+</sup> T 细胞呈递抗原<sup>[8]</sup>,而大剂量电离辐射对 CD80、CD86 和 MHC-II 等分子无明显影响,提示辐射对 DC 的抗原提呈功能影响不大。但辐射却能明显抑制 DC 向 CCL19 的迁移能力,而 DC 准确及时的迁移至二级淋巴器官是其大量激活 T 细胞的前提。我们发现电离辐射可使体外实验中 LPS 处理过的成熟 DC 的迁移能力明

显减弱,并随照射剂量的增大而加重,提示 $\gamma$ 射线对DC向CCL19迁移的抑制在辐射免疫抑制中可能具有重要作用,而未成熟DC长期定居于外周组织,受抗原刺激后才开始迁移<sup>[9-10]</sup>,因此在体外实验中,辐射对其迁移能力影响较小。由于DC表面CCR7分子是趋化因子CCL19和CCL21的受体<sup>[6, 11-12]</sup>,我们的研究发现辐射明显下调CCR7的表达,提示其可能与DC迁移的抑制有重要关系。而由于PGE2在CCR7介导的DC向CCL19的迁移中有重要作用<sup>[6]</sup>,本研究中PGE2的水平下调也为辐射导致的DC迁移能力下降提供了间接证据。

DC通过分泌多种细胞因子而发挥重要的免疫调节作用<sup>[1]</sup>。在我们的研究中IL-6、IL-10水平明显下降。IL-10的改变可影响Th1和Th2在免疫反应中的平衡,调节耐受<sup>[13-14]</sup>;IL-6是一种多效细胞因子,对多种细胞功能有重要调节作用,如细胞增殖、分化、免疫防御等<sup>[15-16]</sup>。因此大剂量辐射可能使DC对免疫系统的整体调节能力下降,具体机制仍需进一步研究。另外,大剂量辐射导致DC凋亡率增加,细胞活力下降,也可能与辐射导致迁移能力的下降和细胞因子的分泌下降有关。

#### [参考文献]

[1] Banchereau J, Steinman R M. Dendritic cells and the control of immunity[J]. *Nature*, 1998, 392: 245-252.

[2] Xin H M, Peng Y Z, Yuan Z Q, Guo H. *In vitro* maturation and migration of immature dendritic cells after chemokine receptor 7 transfection[J]. *Can J Microbiol*, 2009, 55: 859-866.

[3] Rao V, Saunes M, Jørstad S, Moen T. *In vitro* experiments demonstrate that monocytes and dendritic cells are rendered apoptotic by extracorporeal photochemotherapy, but exhibit unaffected surviving and maturing capacity after 30 Gy  $\gamma$  irradiation [J]. *Scand J Immunol*, 2008, 68: 645-651.

[4] Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells[J]. *Nat Immunol*, 2004, 5: 1124-1133.

[5] Scandella E, Men Y, Legler D F, Gillessen S, Prikler L, Ludewig B, et al. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migra-

tion of dendritic cells requires prostaglandin E2 [J]. *Blood*, 2004, 103: 1595-1601.

[6] Scandella E, Men Y, Gillessen S, Förster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2002, 100: 1354-1361.

[7] Iarilin A A. [Radiation and immunity. Interference of ionizing radiation with key immune processes][J]. *Radiats Biol Radioecol*, 1999, 39: 181-189.

[8] Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells[J]. *Cell*, 2001, 106: 263-266.

[9] Jahns J, Anderegg U, Saalbach A, Rosin B, Patties I, Glasow A, et al. Influence of low dose irradiation on differentiation, maturation and T-cell activation of human dendritic cells[J]. *Mutat Res*, 2011 Mar 3. [Epub ahead of print]

[10] Cummings R J, Mitra S, Foster T H, Lord E M. Migration of skin dendritic cells in response to ionizing radiation exposure [J]. *Radiat Res*, 2009, 171: 687-697.

[11] Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J, et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions[J]. *Immunity*, 2004, 21: 279-288.

[12] Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells[J]. *Nat Med*, 2003, 9: 744-749.

[13] Merrick A, Errington F, Milward K, O'Donnell D, Harrington K, Bateman A, et al. Immunosuppressive effects of radiation on human dendritic cells: reduced IL-12 production on activation and impairment of naive T-cell priming[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92: 1450-1458.

[14] Schmitt D A, Ullrich S E. Exposure to ultraviolet radiation causes dendritic cells/macrophages to secrete immune-suppressive IL-12p40 homodimers[J]. *J Immunol*, 2000, 165: 3162-3167.

[15] Chen T, Burke K A, Zhan Y, Wang X, Shibata D, Zhao Y. IL-12 facilitates both the recovery of endogenous hematopoiesis and the engraftment of stem cells after ionizing radiation[J]. *Exp Hematol*, 2007, 35: 203-213.

[16] Meeran A V, Bertho J M, Vandamme M, Gaugler M H. Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells[J]. *Mediators Inflamm*, 1997, 6: 185-193.

[本文编辑] 孙岩