文章编号:1000-5404(2006)24-2459-03

论著

不同剂量γ射线对红细胞制品中细胞因子含量的影响

黎儒青,蒋天伦,肖瑞卿,任德会,曾 杰,帅桂珍 (第三军医大学西南医院输血科,重庆 400038)

提 要:目的 研究不同剂量γ射线照射后红细胞制剂中IL-6、IL-8及TNF-α等细胞因子含量的变化,以得出最佳的γ射线辐照量。**方法** 以15、20、25、30、35 Gy 5个不同梯度辐照量照射保存前的红细胞制剂,并分别于0、1、2、3、4周后检测制剂中细胞因子含量。**结果** 对照组和照射组的细胞因子含量均随保存时间延长而显著增加,但对照组中细胞因子含量增加更为明显;而在同一保存时间对照组中细胞因子含量高于照射组($P<0.05$),但25、30、35 Gy 3个照射组细胞因子含量相差不显著($P>0.05$)。**结论** 辐照血最佳γ射线辐照量为25 Gy。

关键词: γ射线;细胞因子;输血
中图法分类号: R331.141;R339.57;R392.11 **文献标识码:** A

Effect of γ-ray radiation on cytokine levels in stored red blood cells

LI Ru-qing, JIANG Tian-lun, XIAO Rui-qing, REN De-hui, ZENG Jie, SHUAI Gui-zhen (Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of γ-ray radiation at different dose on the cytokine levels of IL-6, IL-8 and TNF-α in stored red blood cells and to determine the optimal γ-ray dose for preparing the stored blood. Methods The cytokine levels of IL-6, IL-8 and TNF-α in the stored blood were studied by ELISA immediately or in 1st, 2nd, 3rd, 4th week after γ-ray irradiation at the dose of 15, 20, 25, 30, 35 Gy. Results The content of cytokines increased with prolonged storage time both in irradiated blood and control blood, more significantly in control blood, and to the stored blood of the same storage time, the levels of the cytokines in control blood were higher than those in irradiated blood ($P<0.05$), but the levels of the cytokines in irradiated blood showed no significant changes when the irradiation dose was 25, 30 and 35 Gy ($P>0.05$). Conclusion The optimal irradiation dose for blood storage is 25 Gy.

Key words: γ- ray; cytokine; transfusion

各类血液成分中白细胞所产生的细胞因子是非溶血性输血反应(febrile nonhemolytic transfusion reactions, FNHTR)和输血相关移植物抗宿主病(transfusion associated graft versus host diseases, TA-GVHD)产生的重要因素[1]。红细胞制品在保存过程中细胞因子主要来源于残留白细胞内的合成与释放,已死亡的白细胞也可释放细胞因子[2]。目前,辐照血被认为是预防上述输血反应最有效的方法,因为射线能灭活淋巴细胞活性,但对其他血细胞功能损害甚小。淋巴细胞对电离辐射十分敏感,照射后的淋巴细胞不能修复已损伤的DNA,以致其不能复制和分化,但不同辐照量对细胞因子含量也会造成一定的影响[3,4]。本研究对不同辐照量处理后红细胞制剂中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等主要细胞因子含量进行测定,从而得出适宜辐照剂量,为临床输血工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

从60袋志愿献血者的血中选取10袋抗凝全血,每袋200 ml共10袋,4 ℃条件下3 500×g离心10 min,分离血浆后加入红细胞保养液,每个标本混匀后均分为10份,其中任选5份不照射作为同期对照,其余5份为辐照组。血液辐照仪为德国STS GmbH公司生产的BioBeam 2000。细胞因子含量测定用ELISA试剂盒购自碧云天试剂公司。酶标仪为瑞士TeCan公司生产。

1.2 实验方法

辐照组采用血液辐照仪照射,γ射线照射剂量分别为15、

作者简介:黎儒青(1964-),女,四川省西昌市人,实验师,主要从事输血医学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023) 68765478

收稿日期:2006-07-13;修回日期:2006-09-30

20、25、30、35 Gy，单次均匀照射，源物距为 1 m。照射后标本均于 4 ℃保存。并分别于辐照后第 0、1、2、3、4 周取对照组和辐照组红细胞制剂各 20 ml，离心后取上清于 -50 ℃冻存待检。

1.3 细胞因子测定

IL-6、IL-8 及 TNF-α 等细胞因子含量用 ELISA 方法进行测定，操作步骤按试剂盒说明书进行，反应结束后读取酶标仪 492 nm处吸光度值[$D(492)$]，绘制标准曲线并根据标准曲线计算出细胞因子含量(ng/L)。

1.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

辐照组和对照组中 3 种细胞因子的含量随保存时间的增长而明显增加，且与保存前比较差异显著($P<0.01$)，但同期对照组增加更为明显，说明 γ 射线照射可以有效降低红细胞制剂中细胞因子的产生。在保存 1 周后，15、20、25 Gy 3 个辐照组中，随照射剂量的增大，照射组细胞因子含量与同期对照组相差显著($P<0.05$)，且差异呈现加大趋势，说明当 γ 射线剂量小于 25 Gy 时不能使红细胞制剂中的细胞因子有效凋亡。但在 25、30、35 Gy 3 个照射组之间细胞因子含量相差不显著($P>0.05$)。具体见表 1～3。

表 1 γ 射线照射对红细胞制剂保存过程中细胞因子 IL-6 含量的影响($n=10$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量(Gy)	组别	时间(t/周)				
		0	1	2	3	4
0	对照组	0.04±0.01	0.32±0.06	0.47±0.16	0.55±0.16	0.60±0.20
15	照射组	0.05±0.02	0.19±0.04[a]	0.36±0.12[a]	0.48±0.15[a]	0.52±0.17[a]
0	对照组	0.05±0.01	0.39±0.10	0.50±0.12	0.58±0.12	0.59±0.13
20	照射组	0.05±0.01	0.17±0.03[a]	0.39±0.12[a]	0.42±0.13[a]	0.30±0.10[a]
0	对照组	0.04±0.01	0.34±0.08	0.47±0.12	0.55±0.13	0.59±0.16
25	照射组	0.05±0.02	0.18±0.06[a]	0.21±0.07[a]	0.27±0.10[a]	0.32±0.08[a]
0	对照组	0.04±0.01	0.30±0.05	0.46±0.11	0.52±0.11	0.61±0.19
30	照射组	0.06±0.02	0.16±0.04[a]	0.19±0.04[a]	0.26±0.08[a]	0.32±0.11[a]
0	对照组	0.05±0.01	0.34±0.06	0.44±0.12	0.57±0.13	0.59±0.15
35	照射组	0.04±0.01	0.19±0.04[a]	0.22±0.05[a]	0.28±0.06[a]	0.33±0.08[a]

a：$P<0.05$，与同期对照组比较

表 2 γ 射线照射对红细胞制剂保存过程中细胞因子 IL-8 含量的影响($n=10$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量(Gy)	组别	时间(t/周)				
		0	1	2	3	4
0	对照组	17.21±3.10	91.55±17.81	129.12±21.08	164.49±24.10	206.75±25.12
15	照射组	19.02±4.14	35.59±8.13[a]	82.73±15.44[a]	102.44±25.1[a]	195.47±26.85[a]
0	对照组	18.11±2.25	94.78±19.22	135.79±19.87	167.23±23.97	222.11±26.01
20	照射组	17.97±3.78	33.57±6.29[a]	72.45±15.71[a]	83.65±16.12[a]	135.12±20.07[a]
0	对照组	18.37±2.87	98.56±16.92	134.59±14.07	169.77±24.12	212.32±25.17
25	照射组	19.26±4.05	32.57±5.68[a]	42.81±8.20[a]	49.59±10.51[a]	63.07±12.11[a]
0	对照组	17.55±2.56	90.99±15.64	122.73±17.12	159.59±23.97	217.78±25.33
30	照射组	18.72±3.89	33.45±7.43[a]	43.56±7.72[a]	51.25±10.97[a]	60.79±12.45[a]
0	对照组	19.79±3.17	89.78±15,47	138.79±16.17	162.21±23.11	219.54±25.12
35	照射组	18.57±3.18	31.07±7.03[a]	43.01±6.87[a]	50.33±11.21[a]	58.32±12.09[a]

a：$P<0.05$，与同期对照组比较

表 3 γ 射线照射对红细胞制剂保存过程中细胞因子 TNF-α 含量的影响($n=10$, ng/L, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量(Gy)	组别	时间(t/周)				
		0	1	2	3	4
0	对照组	0.16±0.02	0.90±0.22	1.41±0.23	2.38±0.29	3.87±0.51
15	照射组	0.15±0.02	0.19±0.03[a]	0.93±0.16[a]	1.65±0.21[a]	2.95±0.52[a]
0	对照组	0.16±0.02	0.92±0.18	1.33±0.25	2.41±0.32	3.29±0.41
20	照射组	0.14±0.03	0.16±0.02[a]	0.63±0.13[a]	1.23±0.16[a]	1.59±0.35[a]
0	对照组	0.16±0.02	0.89±0.17	1.35±0.22	2.47±0.41	3.95±0.59
25	照射组	0.15±0.03	0.17±0.02[a]	0.31±0.11[a]	0.42±0.12[a]	0.98±0.23[a]
0	对照组	0.15±0.03	0.91±0.16	1.37±0.23	2.52±0.36	3.87±0.71
30	照射组	0.14±0.03	0.16±0.05[a]	0.29±0.05[a]	0.51±0.13[a]	1.05±0.27[a]
0	对照组	0.16±0.03	0.90±0.21	1.40±0.15	2.71±0.35	3.55±0.69
35	照射组	0.15±0.04	0.18±0.04[a]	0.33±0.07[a]	0.50±0.12[a]	0.97±0.20[a]

a：$P<0.05$，与同期对照组比较

3 讨论

目前，红细胞制剂通常采用低温冷藏方法保存，以最大限度的保持细胞活性，延长其使用的有效期。但红细胞制剂中的白细胞在冷藏条件下，受细胞因子协同作用可发生凋亡而进一步释放细胞因子，给受血者带来一系列诸如 FNHTRs 的免疫效应[5]，因此细胞因子在输血过程中的作用备受关注。在前期研究中，我室曾利用过滤方法去除血液制品中的白细胞，从而减少其中的细胞因子[6-8]，但采取物理方法洗掉和过滤去除血液制品中的白细胞均不是一种适宜的方法，因滤器过滤后仍残存 $10^6 \sim 10^8$ 的淋巴细胞，并且有输注滤过后血液制品后仍发生 TA-GVHD 的报道，同时过滤过程无疑增加了污染机会[9]，所以寻找一种既安全有效又能最大限度去除或减少细胞因子的方法成了输血工作关注的焦点。

目前国际推荐辐照血液是预防 TA-GVHD 和

FNHTRs 的等输血反应最适宜的方法。由于 γ 射线对红细胞没有损伤作用，而白细胞经 γ 射线照射后能消除其对有丝分裂原的反应能力及刺激同种异基因 T 淋巴细胞分化的能力，使得照射后的淋巴细胞不能修复已损伤的 DNA，以致其不能复制和分化，使淋巴细胞失去免疫活性，而 γ 射线的强弱决定了对白细胞的凋亡程度[10]。低剂量放射线可发生单股 DNA 损伤，高剂量时可使核 DNA 产生不可逆的损伤并干涉其正常修复过程。

本研究表明，红细胞制剂在保存前受到一定剂量的 γ 射线照射可以有效降低 IL-6、IL-8 和 TNF-α 等细胞因子的产生，从而达到有效预防相关输血性疾病产生的目的。从实验数据可以看出，以 25 Gy 照射剂量为例，对照组中 IL-6 含量在保存 4 周后由保存前的（0.04 ± 0.01）ng/L 增加至（0.59 ± 0.16）ng/L；IL-8 含量在保存 4 周后由保存前的（18.37 ± 2.87）ng/L 增加至（212.32 ± 25.17）ng/L；TNF-α 含量在保存 4 周后由保存前的（0.16 ± 0.02）ng/L 增加至（3.95 ± 0.59）ng/L。同样以 25 Gy 照射剂量为例，照射组中 IL-6 含量在保存 4 周后由保存前的（0.05 ± 0.02）ng/L 增加至（0.32 ± 0.08）ng/L；IL-8 含量在保存 4 周后由保存前的（19.26 ± 4.05）ng/L 增加至（63.07 ± 12.11）ng/L；TNF-α 含量在保存 4 周后由保存前的（0.15 ± 0.03）ng/L 增加至（0.98 ± 0.23）ng/L。由此可知，对照组中细胞因子含量增加比照射组更为显著（$P < 0.05$）。

在照射剂量和细胞因子水平的关系方面，以红细胞制剂保存 4 周时细胞因子变化为例，IL-8 在 15 Gy 和 20 Gy 时分别为（195.47 ± 26.85）ng/L 和（135.12 ± 20.07）ng/L。但在 25、30、35 Gy 时 IL-8 的含量分别为（63.07 ± 12.21）、（60.79 ± 12.45）、（58.32 ± 12.09）ng/L。由此可知，红细胞制剂保存 4 周后 25 Gy 以下剂量组和 25 Gy（包括 25 Gy）以上剂量组相比 IL-8 的含量相差显著（$P < 0.05$），但 25 Gy 以上剂量组之间差异不显著（$P > 0.05$）。而同期 IL-6 和 TNF-α 的含量变化趋势亦是如此。所以，我们认为当 γ 射线的强度小于25 Gy时，其不足以对红细胞制品中的白细胞造成足够数量的凋亡，以至于在照射一段时间后细胞因子会有较大程度的恢复。而当照射剂量达到 25 Gy 或以上时，3 种细胞因子在照射后较长时间内逐渐增高，但其增高的幅度远远小于 25 Gy 以下组，两者相差显著，但25 Gy及以上组之间细胞因子产生数量相差不显著。

在细胞因子水平和红细胞制剂保存时间的关系方面，从表中可以看出，对照组和照射组中 3 种细胞因子的含量均随保存时间延长而显著增加，且在保存 1 周后其含量增加更为明显。也就是说，红细胞制剂中的白细胞在冷藏条件下，受细胞因子协同作用可发生凋亡而进一步释放细胞因子，且随着保存血中白细胞的凋亡增加，其释放的细胞因子随之增加。这样就给受血者带来一系列的免疫效应。所以我们建议在临床输血工作中以照射后马上使用或短期冻存尽快使用为佳。

从表中数据可知，红细胞制剂中细胞因子在同一保存时间点随着照射剂量的增加而减少，考虑到辐照量的加大会对血液制剂中其他诸如血红蛋白等成分造成损伤，同时也为了减少不必要的能源损耗，加之 25 Gy及以上组之间细胞因子产生量相差不显著，所以本实验室推荐 25 Gy 为辐照血的最佳照射剂量。

参考文献：

[1] 张献清，王　军，穆士杰，等. 不同剂量紫外线照射对浓缩血小板保存中细胞因子含量的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志，2001，23(1)：23－25.

[2] ADDAS-CARVALHO M，ORIGA A F，SAAD S T. Interleukin 1 beta and tumor necrosis factor levels in stored platelet concentrates and the association with gene polymorphisms[J]. Transfusion，2004，44(7)：996－1003.

[3] APELSETH T O，HERVIG T A，WENTZEL-LARSEN T，*et al*. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage[J]. Transfusion，2006，46(5)：800－810.

[4] 夏爱军，张献清，穆士杰，等. γ 射线辐照对红细胞生化性质的影响[J]. 第四军医大学学报，2003，24(21)：2015－2016.

[5] FRABETTI F，TAZZARI P L，MUSIANI D，*et al*. White cell apoptosis in platelet concentrates[J]. Transfusion，2000，40(2)：160－168.

[6] 成晓玲，赵树铭，胡　建，等. 滤除白细胞对血小板保存期间炎性细胞因子水平的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1496－1497.

[7] 向国春，张佳思，成晓玲，等. 输注去白细胞红细胞悬液预防非溶血性发热性输血反应的临床应用分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：872－873.

[8] 成晓玲，赵树铭，林武存，等. 白细胞滤器过滤晶体盐红细胞悬液进行血液质量与临床效果评估[J]. 第三军医大学学报，2001，23(12)：1482－1484.

[9] 王竹筠，滕本秀. 床旁过滤去除库存血白细胞效果的观察[J]. 第三军医大学学报，2002，24(5)：610，612.

[10] 张献清，穆士杰，胡兴斌，等. γ 射线照射对浓缩血小板保存中细胞因子含量的影响[J]. 西北国防医学杂志，2003，24(2)：108－109.

（编辑　薛国文）