

γ 辐射对 B 淋巴杂交瘤细胞 抗体分泌功能作用研究

陈传松 徐建人

(第二军医大学放射医学研究室, 上海 200433)

摘要 分泌特异性抗体的 B 淋巴杂交瘤细胞, 是高度分化的免疫活性细胞。在 ^{60}Co γ 射线作用下, 抗体分泌总量随受照剂量的增大而降低。然而每个克隆细胞的抗体分泌量却随受照射剂量的增加而有上升趋势。抗体分泌细胞受照射后抗体分泌浓度增加的效应, 经细胞传代、冻存后丧失。表明抗体分泌功能的增强, 是由于电离辐射一过性刺激的结果。实验表明, 高度分化了的抗体分泌细胞在电离辐射作用下, 存在着潜在致死性损伤, 但这种损伤不影响存活细胞的抗体分泌功能。因而提示在放射损伤治疗中, 使用能促进免疫细胞分裂、增殖的因子或药物, 可能有利于机体免疫功能的恢复。

关键词 γ 辐射, 抗体分泌细胞, 杂交瘤细胞, 辐射效应

业已研究证明, 杂交瘤单克隆抗体分泌细胞经 ^{60}Co γ 射线照射后, 其抗体分泌功能与照射剂量有很好的依赖关系。随着照射剂量的增加, 细胞存活率不断降低, 抗体分泌的总量也随之减少; 但每个单克隆细胞的抗体分泌浓度, 却随着照射剂量的增加而升高^[1]。这种抗体分泌能力的增强, 是一过性还是持久性值得研究。本文在以往工作的基础上, 研究照射后抗体分泌功能增强的细胞, 在传代和改变生长环境后其分泌能力有何改变, 分泌功能增强的现象能否继续保存。

1 材料和 方法

1.1 抗体分泌细胞

采用鼠源性抗人绒毛膜促性腺激素(HCG)单克隆抗体杂交瘤细胞株^[1], 扩大培养后分装于 6 只 25 ml 培养瓶中, 照射前每瓶细胞密度均为 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 。

1.2 照射条件

^{60}Co γ 射线照射, 培养瓶与放射源中心距离为 2 m, 剂量率为 1.366 Gy/min。分别照射 0、1、2、4、6 和 8 Gy, 计 6 个剂量组。

1.3 细胞传代、冻存和复苏

经不同剂量照射后的细胞, 在 5% CO_2 和 37°C 饱和湿度培养箱中培养 3 周时间, 每天更换培养液 1 次, 丢弃多余细胞。增殖、传代约 20 代时, 稀释细胞密度至 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 。取 10 ml 细胞悬液(细胞总数为 100×10^4), 收集细胞, 加入 2 ml 冻存液, 置冻存管中冻存。

冻存程序参照 EMBO SKMB^[2] 教程所制定的方法与步骤进行。冻存液含 20% 小牛血清(杭州四季青家畜配种站产品), 70% RPMI 1640(日水制药株式会社), 10% 二甲亚砜(Sigma)。冻

存程序: -20°C 1 h 后 -40°C 1 h 再 -80°C 1 h 然后浸入液氮中。

细胞在冻存管中冻存三个月后,取出冻存管立即投入 $37-40^{\circ}\text{C}$ 温浴中解冻,用无血清 1640 培养液洗去二甲亚砜,然后加入 10 ml 完全培养液混匀,取 1 ml 测定细胞活存率,其余的细胞悬液继续培养 1 周后,测定抗体分泌浓度。

1.4 细胞活存率测定

用台盼蓝染色法。测定前,用 0.01 mol/L 的 pH 8 磷酸盐缓冲液洗涤细胞 1 次,然后用 RPMI 1640 培养液悬浮细胞并加入适量的 2% 台盼兰染液于细胞悬液中(每毫升细胞悬液加染液 1—2 滴),温浴 4 min 后。在高倍镜下计数细胞活存率。

1.5 特异性抗体检测

1.5.1 照射后克隆化培养 7 d 的细胞抗体分泌浓度 细胞经不同剂量照射后,用有限稀释法^[3]克隆化培养,稀释至每孔 10 个细胞,加入 96 孔板中,每剂量点 16 孔。将培养板放入 5% CO_2 和 37°C 饱和湿度的培养箱中,培养 7 d 后测定培养孔上清液中的抗体总浓度,并计算每个单克隆细胞分泌的抗体浓度。

抗体检测用 ELISA 间接法。HCG 抗原(上海生物化学制药厂生产)包被 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$,结果以 OD 值表示,OD 值高者,抗体浓度亦高。

1.5.2 照射后经传代、冻存复苏的细胞抗体分泌浓度 细胞冻存、复苏后,在完全培养液中培养 1 周时间左右,待各瓶的细胞密度都增殖至 $10\times 10^4/\text{ml}$ 后(超过者都调整至 $10\times 10^4/\text{ml}$),换一次培养液,再培养一天,比较各瓶 24 h 的抗体分泌量。抗体检测方法同上。

2 结 果

2.1 抗体分泌细胞抗体分泌浓度与照射剂量的关系

细胞受不同剂量照射后,克隆化培养 7 d,测定每孔上清液的抗体浓度,结果见图 1。每孔抗体浓度,随受照射剂量的增高而线性下降($r = -0.93$, $y = 1.2080 - 0.070x$)。但是,如果按每克隆细胞计算,照射后抗体分泌细胞抗体分泌的浓度却随照射剂量的增高而有上升趋势($r = 0.74$, $y = 0.2390 + 0.0270x$)。

2.2 抗体分泌细胞照射后经传代、冻存复苏,细胞存活率和抗体分泌浓度的变化

抗体分泌细胞经不同剂量 γ 照射后,冻存前光学显微镜下观察,在形态上与对照组无明显差异。冻存三个月复苏后,细胞存活率随受照射剂量的增加而下降(见表 1)。2 Gy 以下组,存活率在 10% 以上,4 Gy 以上组,存活率仅为

3% 左右。但即使受 8 Gy 照射者,仍有 3% 的存活率,并保持有增殖能力。

细胞复苏后培养一周左右,测定同等密度($10\times 10^4/\text{ml}$)细胞的 24 h 抗体分泌量,各剂量组与对照相比,均无明显差异($p > 0.05$)。

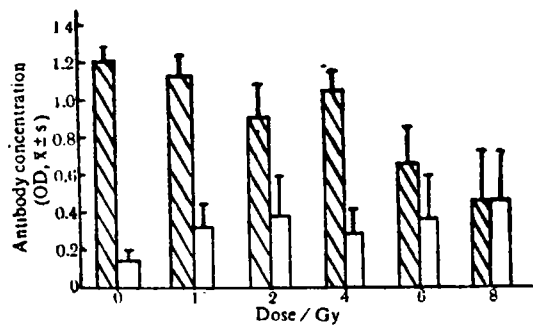


Fig 1. Changes of antibody concentration after irradiation on hybridoma cells

■ OD/Well ($\text{OD}, \bar{x} \pm s$)
□ OD/Clone ($\text{OD}, \bar{x} \pm s$)

Tab 1. The changes of survival rate and antibody concentration after γ - irradiation thawing hybridoma cells

| Dose /Gy | Survival rate | | Antibody concentration (OD, $\bar{x} \pm s$) |
|-------------|-----------------------------|-------|--|
| | Suvival cells/Counted cells | % | |
| 0 | 39/51 | 76.47 | 1.671 \pm 0.422 |
| 1 | 13/53 | 24.53 | 1.717 \pm 0.355 |
| 2 | 6/53 | 11.32 | 1.563 \pm 0.134 |
| 4 | 2/52 | 3.84 | 1.760 \pm 0.327 |
| 6 | 2/70 | 2.85 | 2.010 \pm 0.517 |
| 8 | 2/60 | 3.33 | 1.973 \pm 0.477 |

3 讨 论

分泌特异性抗体的 B 淋巴杂交瘤细胞株, 受不同剂量 γ 照射后培养 7 d, 在培养孔上清液中测得的抗体浓度, 不但与孔内细胞克隆数有关, 也受每个克隆细胞分泌抗体能力强弱的影响。由图 1 可见, 每孔抗体浓度随受照剂量的增大而下降, 这与孔内细胞克隆数随受照射剂量增加而减少相一致。但在本实验的剂量范围内, 每个克隆细胞平均抗体分泌浓度随照射剂量增加而有上升趋势, 显示了具有辐射抗性的抗体分泌细胞, 在 γ 辐射作用下抗体分泌功能的增强。Taliaferro^[4] 等认为这种现象是由于在辐射损伤时, 机体内产生的核酸和其它代谢产物可能对细胞有激活作用, 或可促进其增殖。本实验是离体的单一抗体分泌细胞辐射效应实验, 虽然在培养系统中辐照后可产生各种分解产物, 但在细胞被照射后的克隆化、传代培养中, 以及抗体检测前都更换了培养液, 使上述产物存在于培养体系中并刺激细胞分泌功能的可能性甚小。

辐射可以引起染色体畸变, 及基因突变^[5]。抗体分泌细胞受照射后抗体分泌能力的增强, 是否与辐射诱发的这些遗传性变异有关? 在本实验中, 抗体分泌细胞受照射后连续传代培养, 并冻存三个月, 然后复苏扩大培养, 在相同细胞密度下所测得的抗体分泌浓度与对照组均无明显差异(见表 1)。显示照射后细胞抗体分泌功能的增强仅是暂时的, 并没有在传代和冻存后保持下来, 说明这种早期分泌功能增强, 并不是由于辐射诱发的基因变异所致。抗体分泌细胞照射后早期一过性的抗体分泌功能增强, 可能是由于细胞内某些与抗体合成或分泌有关的基团或结构, 在 γ 辐射刺激下活力暂时增加, 促使细胞抗体合成或分泌增加, 是电离辐射对细胞一过性刺激反应所致, 这种反应在一定剂量范围内, 照射剂量越大反应愈明显。

受不同剂量 γ 照射后存活的抗体分泌细胞, 经传代培养后, 在细胞形态和增殖能力方面与对照组无明显差异。把这些细胞冻存三个月后复苏, 细胞的存活率却随受照剂量的增加而明显下降(见表 1), 说明受照射后的存活细胞存在着潜在着致死性损伤。这种损伤, 由于细胞的冻存而显示出来。实验结果表明, 即使照射 8 Gy, 仍有约 3% 的存活率, 这也显示了高度分化的抗体分泌细胞具有较高的辐射耐受性。而且所有照射剂量组, 经潜在致死效应之后, 存活细胞的抗体分泌功能与对照组细胞没有差异。

小剂量电离辐射对免疫系统功能的刺激作用颇受重视^[6,7]。在小剂量电离辐射刺激下, 抗体形成反应增强, 白细胞介素 2 产生增多、NK 细胞活性增高、淋巴细胞对丝裂原的反应加快并增强, 甚至可促进 DNA 损伤的修复。大剂量电离辐射照射, 一致认为对免疫功能有损害作用。本实验表明, 一定剂量的 γ 照射, 存活的抗体分泌细胞早期特异性抗体分泌功能有一过性增强。存

活细胞经传代培养后,可能存在有潜在致死性损伤。但传代培养后存活细胞仍保留分泌特异性抗体的功能,并与对照组细胞无明显差异。由此设想,机体在受大剂量电离辐射损伤后,免疫系统受到严重伤害,一时难以恢复。如果设法采取相应措施,促使残存的具有高度辐射抗性的免疫细胞增殖,可能有助于患者渡过危险的免疫功能低下阶段。

参 考 文 献

- 1 陈传松,李雅春,徐建人. 第二军医大学学报, 1991, 12(6): 504
- 2 EMBO SKMB Course, Hybridoma Techniques. Basel; 1989: 61
- 3 James S E, Arlett C F, Green M H L et al., Int. J. Radiat. Biol., 1983, 44(5): 417
- 4 Taliaferro L G, Taliaferro W H. J. Immunol., 1970, 104: 1364
- 5 Evans H J. Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes. In: Graman J (ed) chromosomes and cancer. Wiley; New York. 1974: 191
- 6 刘树铮,刘伟宏,蔡露,孙俭波. 中华放射医学与防护杂志, 1989, 9(4): 247
- 7 鞠桂芝,刘树铮,齐进. 中华放射医学与防护杂志, 1989, 9(1): 8

STUDIES OF ANTIBODY SECRETING FUNCTIONS OF B LYMPHOCYTE HYBRIDOMA CELLS AFTER γ -IRRADIATION

Chen Chuansong Xu Jianren

(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT The antibody secreting B lymphocyte hybridoma cells were irradiated with ^{60}Co γ -rays. A markedly dose-related depression of total production of specific antibody was observed. However, production of specific antibody per clone was raised with increase of radiation dose. The increase in antibody secretion by B lymphocyte hybridoma cells was lost after long term culture and freezing of survival cells. γ -radiation could induce potentially lethal damage of monoclonal antibody secreting cells, but this damage didn't affect the antibody secreting function of those surviving cells. These results indicate that ionizing radiation stimulates the secreting function of B lymphocyte hybridoma cells in the initial period after exposure.

KEYWORDS γ -radiation, Antibody secreting cell, Hybridoma, Radiation effect