

淋巴因子相应靶细胞的小剂量辐射效应

刘伟宏 李修义 刘树铮

(白求恩医科大学放射生物教研室, 长春 130021)

摘要 观察了单次小剂量 X 射线全身照射后 C 57 BL/6 小鼠胸腺细胞 IL-1 反应性和脾细胞 IL-2 反应性的变化。发现在 100 mGy 以内的小剂量照射后, 整个胸腺和脾脏的细胞数趋于增多, 胸腺细胞对 IL-1 的反应性和脾细胞对 IL-2 的反应性趋于增强, 体外照射 IL-2 依赖株 CTLL-2 细胞亦出现同样的反应趋势, 但统计学处理与对照组比较均无明显差异。

关键词 小剂量辐射, 白介素 1, 白介素 2, CTLL-2 细胞

近年来小剂量辐射生物效应的研究深受国内外学者的重视^[1-3]。天然放射性高本底地区(照射剂量约为对照地区的 3 倍)居民外周血淋巴细胞对 PHA 的反应增强, 表现为体外培养时淋巴细胞形成率升高^[4]。在实验条件下, 小剂量电离辐射对淋巴细胞的功能也有刺激作用^[5-8]。为进一步探讨这一辐射免疫刺激效应的发生机制, 本实验观察了小剂量 X 射线照射后免疫活性细胞对淋巴细胞因子反应性的变化。

1 材料与方 法

1.1 动物

选用本校实验动物部提供的 C 57 BL/6 纯系小鼠, 体重 18 ± 2 g, 雌雄各半。

1.2 细胞株及其培养传代

1.2.1 MLA-144 细胞株(意大利 Adorini 教授惠赠) 为长臂猿自发性淋巴瘤细胞, 能自发分泌 IL-2。用 15% FCS 的 RPMI 1640 全培养液培养传代。换液后细胞浓度调至 5×10^6 /ml, 培养 48 h, 收集上清液(含 IL-2), 分装, -20°C 下保存备用。与此同时将上清液倍比稀释, 测其活性, 选择适宜的稀释浓度用于实验。

1.2.2 P 388 D₁ 细胞株(意大利 Adorini 教授惠赠) 为 DBA/2 小鼠巨噬细胞瘤细胞, 在适量 LPS 刺激下可分泌 IL-1, 培养条件同(1.2.1)。换液后细胞浓度调至 1×10^7 /ml, 加入 LPS 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 培养 48 h, 收集上清液(含 IL-1), 分装, -20°C 下保存备用。同时测其活性, 选择适宜的稀释浓度用于实验。

1.2.3 CTLL-2 细胞株(日本北里大学医学部赠送) 系依赖 IL-2 生长的小鼠细胞毒性 T 细胞系。用 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液添加 10% 小鼠脾细胞培养上清液, 培养传代, 每 24—48 h 传代一次。

1.2.4 小鼠脾细胞培养上清液制备 5×10^6 /ml C 57 BL/6 小鼠脾细胞加 10 ng/ml 肠毒素(Enterotoxin), 在 37°C 下 5% CO_2 孵箱内培养 48 h, 收获上清液, 即为含较高 IL-2 活性的饲养液。

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿 1992-10-05, 修改稿 1993-07-30

1.3 照射条件

整体照射: 飞利浦 X 射线深部治疗机, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤过板为 0.5 mm 厚的铜和 1.0 mm 厚的铝。剂量率为 12.5 mGy/min, 剂量分别为 0、25、50、75、100 和 250 mGy。离体照射: 生长良好的 CTLL-2 细胞接受体外照射, 剂量率和剂量同上。

1.4 胸腺、脾重量指数的测定

将小鼠称重, 断头处死后取脾和胸腺于扭力天平上称重, 求其指数。

$$\text{胸腺(脾)重量指数} = \frac{\text{胸腺(脾)重量(mg)}}{\text{体重(g)}}$$

1.5 胸腺细胞对 IL-1 的反应性测定

采用 96 孔平底微量板 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法。IL-1 取自 P 388 D₁ 细胞培养上清。胸腺细胞悬液浓度 $1 \times 10^7/\text{ml}$ (内含 PHA 1 μg)。每孔含 100 μl 细胞悬液, 100 μl IL-1 上清液 (终浓度为原上清液的 12.5%)。对照孔以 RPMI 1640 培养液代替 IL-1。在 37°C 下的 5% CO₂ 孵箱内培养 48 h 后, 每孔加 $3.7 \times 10^4 \text{Bq}/50 \mu\text{l}$ 的 $^3\text{H-TdR}$, 继续培养 24 h 后终止培养。多头细胞收集器收获细胞, 液闪仪测定 $^3\text{H-TdR}$ 掺入量。结果用 CPM/ 10^6 个胸腺细胞与 CPM/整个胸腺细胞表示。

1.6 脾细胞对 IL-2 的反应性测定

采用 96 孔平底微量板 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法。IL-2 取自 MLA-144 细胞培养上清。脾细胞悬液浓度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ (内含 ConA 0.25 μg)。每孔含 100 μl 细胞悬液, 100 μl IL-2 上清液 (终浓度为原始上清液的 12.5%)。对照孔以 RPMI 1640 培养液代替 IL-2。培养 48 h 后每孔加入 $3.7 \times 10^4 \text{Bq}/50 \mu\text{l}$ 的 $^3\text{H-TdR}$, 继续培养 4 h 后收获细胞。液闪仪测量, 结果以 CPM/ 10^5 个脾细胞与 CPM/整个脾细胞表示。

1.7 CTLL-2 细胞对 IL-2 反应性测定

受照的 CTLL-2 细胞与平行对照细胞分别加入 96 孔平底培养板, 每孔含 CTLL-2 细胞 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 100 μl , 25% 和 3.13% 浓度的含有 IL-2 的培养上清液 100 μl 。培养 24 h, 终止培养前 4 h 加入 $1.8 \times 10^4 \text{Bq}/25 \mu\text{l}$ 的 $^3\text{H-TdR}$, 收获细胞, 液闪仪测量结果, 以 CPM/ 5×10^3 个细胞与对照的百分数表示。

2 结 果

2.1 脾和胸腺重量指数的变化

C 57 BL/6 小鼠经单次 X 射线全身照射后 24 h, 在 0—250 mGy 范围内脾重量指数无明显改变, 胸腺重量指数较对照有增高的趋势 (见表 1), 经统计学处理差异不明显。

2.2 胸腺细胞对 IL-1 反应性变化

Tab 1. The influence of low dose radiation on the spleen and thymus index

| Dose /mGy | Spleen index | | Thymus index | |
|--------------|----------------------------|-------------|--------------|-------------|
| | Control | Irradiated | Control | Irradiated |
| 25 | 5.79 ± 0.84 ⁽¹⁾ | 5.95 ± 0.30 | 4.49 ± 0.58 | 4.76 ± 0.34 |
| 50 | 5.52 ± 0.76 | 5.74 ± 0.44 | 4.53 ± 0.46 | 5.19 ± 0.52 |
| 75 | 4.94 ± 0.85 | 5.09 ± 0.80 | 3.66 ± 0.37 | 4.21 ± 0.56 |
| 100 | 5.82 ± 0.42 | 5.92 ± 0.71 | 3.74 ± 0.38 | 4.39 ± 0.30 |
| 250 | 5.20 ± 1.00 | 5.66 ± 1.12 | 4.03 ± 0.65 | 4.42 ± 0.91 |

(1) $\bar{x} \pm s$ $n = 5$

从图1可看出整个胸腺细胞对IL-1的反应性(以对照百分数表示)在25—75 mGy剂量照射后,胸腺细胞数增多,导致整个器官的反应性增强,其中以25 mGy组为最高,为对照的122%,经统计学处理无明显差别(F-检验)。另从图1可看出胸腺对IL-1反应的剂量效应曲线与空斑形成细胞(PFC)反应曲线的形式相似^[5]。

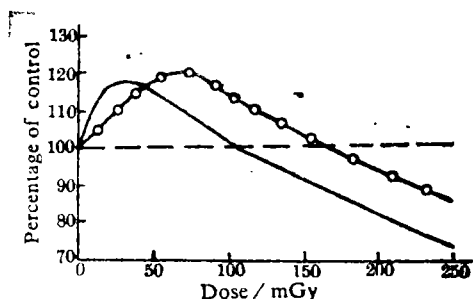


Fig 1. The changes of the reactivity of thymus to IL-1 after single whole body X-irradiation with low doses in C 57 BL/6 mice
(—) cpm/thymus, (-○-) cells/thymus

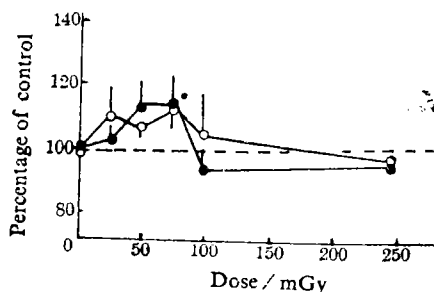


Fig 2. Effect of low dose radiation on the CTLL-2 cells
(-●-) 25% IL-2,
(-○-) 3.1% IL-2

2.3 脾细胞对 IL-2 反应性的变化

从表2和表3可见,脾细胞对IL-2的增殖反应因剂量不同而呈双向变化。250 mGy照射后12 h和24 h脾细胞对IL-2的反应性均低于对照,分别为对照的79.1%和81.7%,而50 mGy则有反应性增高的趋势,分别为对照的102.2%和122.4%,但统计学处理差异均不显著。此双向反应趋势与胸腺对IL-1反应性的变化趋势一致。50 mGy照后12 h和24 h脾脏对IL-2反应性较对照亦有增高的趋势,分别为对照的146.9%和116.6% ($P > 0.05$), 50 mGy照后12 h脾脏有核细胞数趋向于增多,为对照的133.1% ($P > 0.05$)。

Tab 2. The changes of the reactivity of splenocytes to IL-2 12 h and 24 h after low dose radiation

| Dose /mGy | CPM/ 10^5 cells | |
|-----------|----------------------------|-------------|
| | 12 h | 24 h |
| 0 | 5556 ± 1225 ⁽¹⁾ | 3336 ± 754 |
| 50 | 5678 ± 1545 | 4084 ± 1175 |
| 250 | 4395 ± 903 | 2726 ± 1227 |

⁽¹⁾ $\bar{x} \pm s$ $n = 5$

Tab 3. The changes of the reactivity of whole splenic cells to IL-2 12 h and 24 h after low dose radiation

| Dose /mGy | 10^3 CPM/spleen | | 10^6 Cells/spleen | |
|-----------|---------------------------|------------|---------------------|-----------|
| | 12 h | 24 h | 12 h | 24 h |
| 0 | 2569 ± 710 ⁽¹⁾ | 1359 ± 506 | 507 ± 255 | 414 ± 135 |
| 50 | 3776 ± 1198 | 1585 ± 386 | 675 ± 198 | 412 ± 139 |
| 250 | 2515 ± 878 | 1002 ± 654 | 564 ± 135 | 354 ± 113 |

⁽¹⁾ $\bar{x} \pm s$ $n = 5$

2.4 CTLL-2 细胞的小剂量辐射效应

CTLL-2 系小鼠细胞毒性 T 淋巴细胞株, 在体外依赖 IL-2 的存在而增殖。当接受小剂量 X 射线后在 25—250 mGy 范围内, 其反应趋势与整体照射 24 h 所致脾细胞对 IL-2 反应性和胸腺对 IL-1 反应性的变化趋势一致。在剂量低于 100 mGy 时较对照有增高的趋势(见图 2)。

3 讨 论

较小剂量的辐射在一定条件下可增强抗体形成反应, 同时不伴有 T 淋巴细胞亚组比例的改变^[5-8]。因此用小剂量辐射损伤或消除了放射敏感性较高的抑制性 T 细胞(T_S), 从而使辅助性 T 细胞(T_H)处于相对优势, 由于 T_H/T_S 比值增高而导致免疫功能增强的假设是很难解释小剂量辐射免疫增强效应的^[9]。已知在抗体形成的激活过程中有许多体液因子参与, 这些因子在抗体形成过程中发挥着各自的作用。其中 IL-1 和 IL-2 是较为关键的成分。有人发现 IL-1 和 IL-2 可协同诱导不含 T 细胞的脾细胞产生抗 SRBC 的抗体反应^[10]。因此在抗体形成反应受低水平辐射刺激而增强时, 有必要弄清低水平辐射对淋巴因子产生的影响及其对靶细胞的作用。

IL-1 是巨噬细胞产生的单核因子, 而巨噬细胞具有极高的辐射抗性。曾有实验表明, 高达 9 Gy 的剂量亦不能抑制巨噬细胞分泌 IL-1 的功能(本研究室未发表资料)。因此在小剂量辐射作用下 IL-1 的来源显然不会减少。本实验表明, 胸腺对 IL-1 的反应性在 25—75 mGy 单次照射后可能由于胸腺细胞数趋于增多, 使整个胸腺作为一个器官对 IL-1 的反应量趋于增大。由于 IL-1 对胸腺主要是提供成熟信号而不是增强信号, 这与本研究中发现的小剂量照射后外源性 IL-1 作用下, 胸腺细胞的 ³H-TdR 掺入没有明显改变是一致的, 小剂量照射后胸腺细胞数趋向增高, 可能是小剂量辐射全身照射后胸腺内细胞 CSF 分泌增多呈正反馈放大效应^[9]。

胸腺淋巴细胞在 IL-1 作用下分泌 IL-2, 因此胸腺对 IL-1 反应增强可能进一步导致 IL-2 分泌的增多^[11]。IL-2 有活化 T 细胞的作用, 在抗体形成过程中处于中心环节。单次 X 射线照射后 12 h 和 24 h 时检测的结果均表明, 在 50 mGy 照射后脾细胞对 IL-2 反应性势向于增高, 体外照射 IL-2 效应细胞 CTLL-2, 发现小剂量照射后其对 IL-2 的反应能力有增高的趋势。提示小剂量辐射可能诱导 IL-2 受体表达增多, 结合 IL-2 的能力增强。作者以往的研究结果可以证实这种推测, 小剂量辐射可提高小鼠 IL-2 和 IFN- γ 分泌量, 增强 DNA, RNA 和蛋白质合成, 其中 DNA 复制可达到对照的 4—5 倍, 说明脾脏 T 细胞增殖旺盛, 同时脾脏对外源性 IL-2 的反应可达到对照的 185%, 提示激活的 T 细胞 IL-2 R 表达增多^[9]。这一系列变化表明小剂量全身照射可增强 T 细胞激活过程产生免疫放大效应, 在此基础上继发地诱生抗体形成的增多, 体液免疫增强。

参 考 文 献

- 1 Fabrikant J. Health Phys., 1987, 52: 561
- 2 Planel H, et al. Health Phys., 1987, 52: 571
- 3 Congdon C C. Health Phys., 1987, 52: 593
- 4 刘树铮等. 中华放射医学与防护杂志, 1985, 5: 124
- 5 刘伟宏, 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1986, 6: 77
- 6 刘伟宏, 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1987, 7: 336
- 7 刘伟宏, 刘树铮. 白求恩医科大学学报, 1990, 16: 1
- 8 刘树铮等. 白求恩医科大学学报, 1992, 18: 209
- 9 刘树铮等. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(5): 299
- 10 Hoffman M, Watson J J. Immunol., 1979, 122: 1371
- 11 刘伟宏. 白求恩医科大学博士研究生学位论文, 1988: 51

(下转第 108 页 Continued of P 108)

UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS INDUCED BY LOW ENERGY N⁺ HEAVY ION OF SEED EMBRYOS IN TRITICUM AESTIVUM

Wang Chongying Wang Rujuan Yang Hanmin

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou, 730000)

ABSTRACT Using the method of ³H-TdR incorporation, this paper studied the change of DNA synthesis during the early period of germination of wheat seeds irradiated by low energy N⁺ heavy ion. The results showed: 1) the low energy N⁺ heavy ion was also able to induced a unscheduled DNA synthesis (UDS) in seed embryos of wheat: 2) the peak of the UDS occurred at the 6 h after seeds soaking, being 4h earlier than the peak of the normal DNA synthesis of seed embryos: 3) the rate of UDS was roughly in positive proportion to irradiation doses: 4) the level of the normal DNA synthesis decreased with the increase of the UDS in the wheat seed embryos irradiated.

KEYWORDS Nitrogen ion, Heavy ion, ³H-TdR, DNA synthesis, Triticum

(上接 78 页 Continued from p 78)

EFFECT OF LOW DOSE RADIATION ON THE TARGET CELLS TO LYMPHOKINES RELATED

Liu Weihong Li Xiuyi Liu Shuzheng

(Department of Radiation Biology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021)

ABSTRACT The changes of reactivities of thymocyte to IL-1 and splenocyte to IL-2 were studied in C 57 BL/6 mice after whole body X-irradiation with low doses. It was found that the number of thymocyte and splenocyte was increased, the reactivities of thymocyte to IL-1 and splenocyte to IL-2 also showed a tendency to increase after X-irradiation with low doses below 100 mGy, but the increase was statistically not significant. There was a same effect of low dose radiation on the CTLL-2, growing dependent on IL-2, irradiated in vitro.

KEYWORDS Low dose radiation, Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), CTLL-2 cell