

# 低剂量 $\gamma$ 射线对丝裂霉素 C 损伤小鼠脾细胞的影响

孟庆勇 高莉莉 徐美奕  
(广东医学院分析中心 湛江 524023)

**摘要** 探讨低剂量辐射诱导哺乳动物抗丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 损伤的免疫适应性反应。小鼠接受低剂量  $\gamma$  射线作用后 6h, 再给予损伤剂量的 MMC, 然后通过脾细胞计数、流式细胞术、Con A 和 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化观察小鼠脾细胞数、细胞周期和 DNA 含量的变化。1mg/kg 的 MMC (B) 组小鼠脾细胞数明显低于正常对照 (A) 组, 50—100mGy 照射加 MMC (C、D、E) 组小鼠脾细胞数明显高于 B 组。Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化细胞周期分析表明, D 组、E 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞相对百分率分别显著低于和高于 B 组。而 LPS 刺激组, 除 E 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期外, D 组、E 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞相对百分率也分别明显低于和高于 B 组。低剂量  $\gamma$  射线可以诱导 MMC 损伤小鼠脾细胞数和细胞周期进程的适应性反应。

**关键词** 低剂量  $\gamma$  射线, 抗丝裂霉素 C, 适应性反应, 细胞周期, 脾淋巴细胞转化, 小鼠

**中图分类号** R811.5

低剂量电离辐射和低浓度 MMC (Mitomycin C, 丝裂霉素 C) 之间可以诱导交叉适应性反应。以人外周血淋巴细胞、整体小鼠骨髓细胞和生殖细胞染色体畸变为指标的实验结果表明, 低剂量 X 射线可以诱导 MMC 损伤的适应性反应, 低浓度 MMC 也可以诱导辐射损伤的适应性反应<sup>[1]</sup>。Ikushima 用中国仓鼠 V79 细胞为观察对象, 微核和姊妹染色单体畸变为指标, 发现低剂量  $\gamma$  射线可以诱导抗 MMC 损伤的适应性反应, 说明辐射和 MMC 之间存在细胞遗传学交叉适应性反应<sup>[2]</sup>。关于辐射与 MMC 之间的免疫交叉适应性反应未见报道, 它对于探讨适应性反应的广度和深度均有重要的理论和实践意义。因此, 本工作从脾细胞数、脾淋巴细胞转化和细胞周期 3 个方面, 探讨低剂量  $\gamma$  射线诱导抗 MMC 损伤的免疫交叉适应性反应。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与分组

广东医学院实验动物中心饲养繁殖的雄性昆明小白鼠 75 只, 体重 (20±2)g。根据随机区组实验设计分成 5 组, 每组 15 只。分别为正常对照组 (A 组)、MMC 组 (B 组)、50mGy  $\gamma$  射线照射加 MMC 组 (C 组)、75mGy  $\gamma$  射线照射加 MMC 组 (D 组) 和 100mGy  $\gamma$  射线照射加 MMC 组 (E 组)。MMC 用量为 1mg/kg。

### 1.2 主要试剂和仪器

刀豆球蛋白 A (Concanavalin, Con A)、脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 和 RNA 酶为美国 Sigma 公司产品, 购自华美生物工程公司。RPMI 1640 培养基 (GIBCO, 美国), <sup>3</sup>H-TdR (中国原子能研究所产品), MMC (浙江海正药业股份有限公司), 其它试剂均为国产分析纯试剂。Epics-XL 型流式细胞仪 (Coulter, 美国), LS-6000SC 液体闪烁计数器 (BECKMAN, 美国)。

### 1.3 照射条件

照射源为 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线, 滤过板 3.6cm 铅砖, 靶皮距 180cm, 吸收剂量率为 12.5mGy/min。

### 1.4 细胞悬液制备

低剂量  $\gamma$  射线全身照射小鼠后 6h, 再接受 MMC 作用 24h, 处死小鼠。无菌取出脾脏, 每 3 个脾脏为一个样本, 放入 1.5mL RPMI 1640 培养液中研磨, 5 个样本为一组。200 目不锈钢网过滤, 将脾细胞调成 5×10<sup>6</sup>/mL 的单细胞悬液。取 5×10<sup>6</sup>/mL 脾细胞置于 96 孔培养板, 100 $\mu$ L/孔, 3 孔/样, 15 孔/组。每孔再加入 100 $\mu$ L Con A (终浓度为 0.5 $\mu$ g/mL) 或 LPS (终浓度为 20 $\mu$ g/mL), 放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 56h。然后, 每孔加 30 $\mu$ L <sup>3</sup>H-TdR

广东省医学科学技术研究基金 (WA1997340) 资助

第一作者: 孟庆勇, 男, 1960 年 12 月出生, 1995 年在白求恩医科大学获博士学位, 放射医学专业, 副教授

收稿日期: 初稿 2003-06-18, 修回 2003-08-11

(1.85kBq/30 $\mu$ L), 继续培养 16h。最后, 用多头细胞收集器收集样品, 用液体闪烁计数器测定 CPM (Count per minute, 每分钟计数) 值。另外, 按照上述程序同时培养一份重复样本, 用于流式细胞仪测定。当脾细胞培养 72h 时, 用滴管收集脾细胞于塑料离心管, 用 0.01mol/L PBS 洗 2 次, 弃上清液。加 0.01% RNA 酶 100 $\mu$ L 和 50mg/L PI 0.5mL 混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光 30min, 流式细胞仪检测细胞周期进程。

### 1.5 统计分析

实验结果用 (平均值 $\pm$ 标准差) 表示, 通过 SPSS10.0 单因素方差分析进行统计学处理。

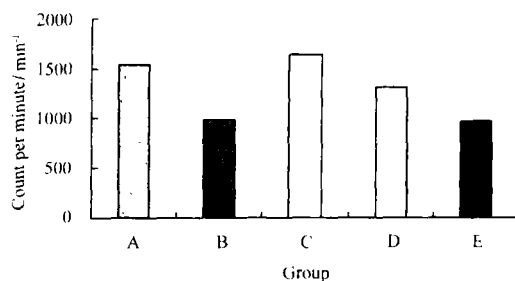
**Table 1** Effect of low doses of gamma-rays to challenge doses of MMC on the number of splenocytes in mice ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Group	Irradiation /mGy	MMC (mg/kg)	Number of splenocytes
A	0	0	87.25 $\pm$ 9.84
B	0	1	28.80 $\pm$ 11.64 <sup>(1)</sup>
C	50	1	60.75 $\pm$ 22.33 <sup>(2)</sup>
D	75	1	81.45 $\pm$ 35.19 <sup>(2)</sup>
E	100	1	105.90 $\pm$ 76.66 <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>  $p < 0.01$ , vs A group, <sup>(2)</sup>  $p < 0.01$ , vs B group

### 2.2 低剂量 $\gamma$ 射线对 MMC 损伤小鼠 Con A 刺激脾淋巴细胞转化的影响

图 1 为小鼠在低剂量辐射作用 6h 后, 再接受损伤剂量的 MMC, 由 Con A 诱导的脾淋巴细胞转化结果, 图 1 显示 B 组 Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化低于 A 组, C 组和 D 组 Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化高于 B 组, 但均无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。



**Fig.1** Effect of low doses of  $\gamma$ -rays to challenge doses of MMC on the splenic lymphocyte transformation induced by Con A in mice

### 2.3 低剂量 $\gamma$ 射线对 MMC 损伤小鼠 LPS 刺激脾淋巴细胞转化的影响

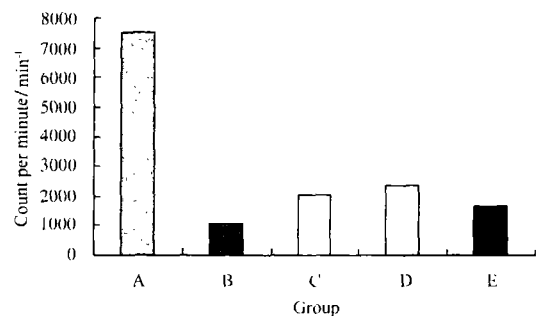
图 2 为小鼠在低剂量辐射作用 6h 后, 再接受损伤剂量的 MMC, 由 LPS 刺激的脾淋巴细胞转化结果, 图 2 显示 B 组 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化

## 2 结果

### 2.1 低剂量 $\gamma$ 射线对 MMC 损伤小鼠脾细胞数的影响

表 1 为小鼠在低剂量辐射作用 6h 后, 再接受损伤剂量的 MMC 脾细胞数的变化结果, 从表 1 中可以看出, B 组小鼠脾细胞数明显低于 A 组 ( $p < 0.01$ ), C—E 组的脾细胞数极显著高于 B 组 ( $p < 0.01$ ), E 组的脾细胞数最多。

极显著低于 A 组 ( $p < 0.01$ ), C—E 组 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化高于 B 组, 但只有 C 组和 D 组 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化显著高于 B 组 ( $p < 0.05$ )。



**Fig.2** Effect of low doses of  $\gamma$ -rays to challenge doses of MMC on the splenic lymphocyte transformation induced by LPS in mice

### 2.4 低剂量 $\gamma$ 射线对 MMC 损伤小鼠 Con A 刺激脾淋巴细胞转化细胞周期的影响

B 组 Con A 刺激脾淋巴细胞转化  $G_0/G_1$  期脾细胞百分率高于 A 组, 而 A 组 S 期脾细胞百分率低于 B 组, 但无统计学意义 ( $p > 0.05$ )。D 和 E 组  $G_0/G_1$  期脾细胞百分率显著低于 B 组 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), 而 S 期脾细胞百分率极显著高于 B 组 ( $p < 0.01$ )。  $G_2/M$  期脾细胞百分率各组无明显变化 (见表 2)。

**Table 2** Effect of low doses of  $\gamma$ -rays to challenge doses of MMC on the cell cycle progression induced by Con A in mice ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Group	$\gamma$ -rays / mGy	MMC (mg/kg)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
A	0	0	80.80±10.75	9.40±6.93	9.75±3.89
B	0	1	86.52±6.96	6.79±7.78	6.69±3.03
C	50	1	82.73±4.47	11.83±3.58	5.44±1.56
D	75	1	80.55±5.06 <sup>(1)</sup>	14.33±4.77 <sup>(2)</sup>	5.11±1.48
E	100	1	78.30±4.65 <sup>(2)</sup>	16.57±4.96 <sup>(2)</sup>	5.15±1.62

<sup>(1)</sup> $p<0.05$ , <sup>(2)</sup> $p<0.01$ , vs B group

### 2.5 低剂量 $\gamma$ 射线对 MMC 损伤小鼠 LPS 刺激脾淋巴细胞转化细胞周期的影响

D 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期脾细胞百分率显著低于 B 组

( $p<0.05$ ), D 和 E 组 S 期脾细胞百分率明显高于 B 组 ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。G<sub>2</sub>/M 期脾细胞百分率各组无明显变化 (见表 3)。

**Table 3** Effect of low doses of gamma-rays to challenge doses of MMC on the cell cycle progression induced by LPS in mice ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Group	$\gamma$ -rays / mGy	MMC (mg/kg)	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
B	0	1	85.90±5.87	6.53±4.50	6.51±2.39
C	50	1	81.34±7.33	13.37±6.52	5.29±3.18
D	75	1	78.28±6.10 <sup>(1)</sup>	13.65±6.84 <sup>(1)</sup>	7.04±1.70
E	100	1	80.41±5.09	12.59±4.39 <sup>(2)</sup>	7.00±2.66

<sup>(1)</sup> $p<0.05$ , <sup>(2)</sup> $p<0.01$ , vs B group

## 3 讨论

小鼠预先给予 75mGy 低剂量全身照射后, 再接受 1.5Gy 较大剂量辐射, 免疫损伤比 1.5Gy 照射组明显减轻的现象, 称之为免疫适应性反应<sup>[3]</sup>。鞠桂芝等对低剂量辐射诱导免疫适应性反应的剂量和时间作了较为详细的研究<sup>[4]</sup>。有关低剂量辐射诱导细胞凋亡和细胞周期进程适应性反应的研究也有报道<sup>[5]</sup>, 预照射剂量 ( $D_1$ ) 为 25—100mGy, 损伤性剂量 ( $D_2$ ) 为 1—2Gy,  $D_1$  和  $D_2$  间隔时间为 6h, 可诱导小鼠胸腺细胞凋亡和细胞周期进程的适应性反应。但是, 未见低剂量  $\gamma$  射线诱导 MMC 损伤小鼠脾淋巴细胞转化和细胞周期进程适应性反应的报道。本实验结果显示, B 组的脾细胞数明显低于 A 组, 说明 MMC 的损伤剂量选择是适合的。C—E 组的脾细胞数高于 B 组, 提示低剂量辐射能够诱导 MMC 损伤小鼠脾细胞数的适应性反应 (见表 1)。LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化程度 C 组和 D 组显著高于 B 组 ( $p<0.05$ ), 而 Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化 C—E 组与 B 组比较均无统计学差异, 提示 C 组和 D 组 LPS 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化程度高于 Con A 刺激的小鼠脾淋巴细胞转化, 说明在 50—100mGy 的  $\gamma$  射线照射后 MMC 损伤的脾细胞对 LPS 的反应程度大于其对 ConA 的反应 (见图 1 和图 2)。但是, 低剂量 X 射线 (100mGy 以内)

单独作用于小鼠, 脾细胞对 Con A 的反应程度大于其对 LPS 的反应<sup>[6]</sup>, 与本实验结果相反, 提示 MMC 损伤后的脾细胞 LPS 刺激的增殖反应对射线的敏感性高于 Con A 刺激的增殖反应, 发生这种现象的原因可能与 MMC 损伤小鼠脾细胞有关。

低剂量辐射增强免疫的机制尚未阐明, 目前有几种假说<sup>[7]</sup>, (1) 低剂量辐射引起  $T_H/T_S$  比值升高; (2) 低剂量辐射促进放射敏感细胞凋亡; (3) 低剂量辐射增强免疫的细胞学基础和分子机制。第 3 种假说在低剂量辐射增强免疫机制中占有重要地位, 朱寿彭等给大鼠低剂量  $^{134}\text{Cs}$  和  $^{147}\text{Pm}$  静脉注射。结果发现, 大鼠骨髓和胸腺细胞  $^3\text{H-TdR}$  自发掺入率明显增加<sup>[8]</sup>。75mGy 照射后小鼠胸腺细胞浆和胸腺细胞核中发现一些蛋白分子比假照射组增加, 而且这些蛋白分子具有一定的生物活性<sup>[9]</sup>。上述结果提示低剂量辐射对中枢免疫器官的细胞增殖和蛋白分子表达具有刺激作用, 本实验证实低剂量  $\gamma$  射线能够刺激损伤小鼠外周免疫器官脾细胞增殖活性, 表现为脾细胞数增加 (见表 1)。低剂量 X 射线全身照射小鼠后不同时间观察胸腺细胞周期进程的变化, 流式细胞分析法表明细胞周期 S 期细胞百分率增高, 而 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分率相应地减少<sup>[10]</sup>, 与表 2 和表 3 显示的 C 组和 D 组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期脾细胞百分率显著低于 B 组, 而 S 期脾细胞百分率明显高于 B 组的结果相似, 说明低剂量辐射不仅可以刺激胸腺细

胞的 DNA 合成, 而且能够提高 MMC 损伤小鼠脾细胞的增殖活性。这可能是低剂量辐射拮抗 MMC 损伤和诱导适应性反应的原因之一。

### 参考文献

- 孟庆勇, 蔡露, 金玉珂. 辐射防护, 2002, 22 (4): 212-218  
MENG Qingyong, CAI Lu, JI Yuke. Radiat Prot, 2002, 22 (4): 212-218
- Ikushima T. Mutat Res, 1989, 227 (4): 241-246
- 鞠桂芝, 齐进, 刘树铮. 白求恩医科大学学报, 1990, 16(增刊): 1-4  
JU Guizhi, QI Jin, LIU Shuzheng. J N Bethune Univ Med Sci, 1990, 16 (Supper): 1-4
- 鞠桂芝, 宋春华. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, 13 (2): 95-98  
JU Guizhi, SONG Chunhua. J Radiat Res Radiat Process, 1995, 13 (2): 95-98
- 龚守良, 刘淑春, 刘建香等. 辐射防护, 2000, 20 (5): 294-298  
GONG Shouliang, LIU Shuchun, LIU Jianxiang *et al.* Radiat Protect, 2000, 20 (5): 294-298
- 刘树铮, 刘伟宏. 中华放射医学与防护杂志, 1989, 9 (4): 247-250  
LIU Shuzheng, LIU Weihong. Chin J Radiol Med Prot, 1989, 9 (4): 247-250
- 刘树铮. 低水平辐射兴奋效应. 北京: 科学出版社, 1996. 271-311  
LIU Shuzheng. Radiation Hormesis with Low Level Exposures. Beijing: Science Press, 1996. 271-311
- 朱寿彭, 夏芬. 中华放射医学与防护杂志, 1994, 14 (1): 19-21  
ZHU Shoupeng, XIA Fen. Chin J Radiol Med Prot, 1994, 14 (1): 19-21
- 孟庆勇, 陈沙力, 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 2003, 23 (1): 14-16  
MENG Qingyong, CHEN Shali, LIU Shuzheng. Chin J Radiol Med Prot, 2003, 23 (1): 14-16
- 刘树铮, 张迎春, 齐进. 白求恩医科大学学报, 1992, 18(5): 405-408  
LIU Shuzheng, ZHANG Yingchun, QI Jin. J N Bethune Univ Med Sci, 1992, 18: 405-408

## Effect of low doses of $\gamma$ -rays to challenge doses of MMC on the splenic lymphocyte in mice

MENG Qingyong GAO Lili XU Meiyi

(Analysis Center of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023)

**ABSTRACT** To investigate the adaptive response of low doses of gamma-rays to challenge doses of Mitomycin C(MMC) on the splenic lymphocytes in mammalian, mice were irradiated with inductive doses of 50, 75, 100mGy 6h before challenge dose of MMC (1mg/kg). Observations were made on efficacy of splenocyte count, cell cycle progression, DNA synthesis in number of splenocytes, Flow cytometry, the splenic lymphocyte transformation induced by Con A and LPS. The number of splenocytes in Group B(1mg/kg of MMC) was significantly lower than that the control(Group A). The number of splenocytes in Group C, D and E (50-100mGy + MMC) was significantly higher than that in Group B. Both the percentages of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> and S phase cells in Group D and E were lower and higher than that in Group B in cell cycle progression of the splenic lymphocyte transformation induced by Con A. Significant changes of the numbers were found in the LPS treated groups (except G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of Group E). The results showed adaptive response of low doses of  $\gamma$ -rays to challenge doses of MMC on number of splenocytes and cell cycle progression of the splenic lymphocyte transformation induced by Con A and LPS in mice.

**KEYWORDS** Low dose  $\gamma$ -rays, Mitomycin C, Adaptive response, Cell cycle progression, Splenic lymphocyte transformation, Mice

**CLC** R811.5