

小鼠全身照射后辅佐细胞与 脾淋巴细胞间的相互作用 *

孙义敏 刘树铮

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 小鼠全身照射后, 分别获取腹腔巨噬细胞、脾辅佐细胞及脾淋巴细胞, 观察它们之间的相互作用。结果表明: 75mGy 照射可增强 ConA 刺激的淋巴细胞增殖反应, 2.0Gy 照射使其明显降低。5 次细胞贴壁去除辅佐细胞后, 其对 ConA 的反应性明显减弱, 并且受低剂量照射后的腹腔巨噬细胞和脾辅佐细胞可以增强受低剂量照射后的 T 淋巴细胞的增殖反应及 IL-2 的产生。

关键词 巨噬细胞, 脾辅佐细胞, 电离辐射

中图分类号 R146, R811

小鼠受电离辐射全身作用后可以引起免疫系统发生一系列的变化。大剂量辐射可使免疫功能受损, 而低剂量辐射可使免疫反应上调^[1]。已知淋巴细胞的激活需要来自辅佐细胞的信号^[2,3]。在上述效应中, 淋巴细胞和辅佐细胞各有何变化, 未见报道。本实验旨在观察不同剂量电离辐射全身作用后获取的腹腔巨噬细胞和脾辅佐细胞同脾淋巴细胞间的相互作用在淋巴细胞激活中的意义。

1 材料与 方法

1.1 实验动物

昆明系小白鼠, 雄性, 体重 20 ± 2 g, 健康, 由白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室实验动物部提供。

1.2 腹腔巨噬细胞的收集

断头处死小鼠, 无菌条件下剪开腹部皮肤, 避开血管, 腹腔注入约 5mL 培养液, 轻揉腹部约 1min, 腹膜开一小口, 用吸管吸出腹腔液, 3 只小鼠的腹腔液混合为一个样品, 共 5 个样品(取自 15 只小鼠, 下同), 离心洗涤一次, 并用新鲜培养液重悬, 置 100mm 玻璃平皿中于 37°C 5%CO₂ 培养箱中培养 2h, 去除上清中的未粘附细胞, 用吸管吹打贴壁细胞, 收集并计数。

1.3 脾淋巴细胞的收集

在无菌条件下取脾, 置于盛有 RPMI1640 培养液的平皿中, 用毛玻璃研磨制成单细胞悬液, 过 200 目尼龙网, 收集到 10mL 离心管中, 1500r/min 离心 5min, 弃上清, 用红细胞裂解液溶去红细胞, Hanks' 液洗涤两次, 重悬于含 10% NBS 的 RPMI1640 培养液中。加到 100mm

* 国家自然科学基金资助 (39570188)

收稿日期: 初稿 1999-06-28, 修回 1999-11-19

直径的玻璃培养皿中,在 37°C 5% CO_2 培养箱中经过5次贴壁,每次1h,去辅佐细胞,收集最后一次的悬浮细胞作为分离出的淋巴细胞^[4]。经吉姆萨染色测其纯度,淋巴细胞纯度达98%以上。

1.4 脾辅佐细胞的获取

在脾淋巴细胞的收集过程中进行脾细胞贴壁时,用培养液充分漂洗贴壁细胞,收集第一次贴壁的细胞作为脾辅佐细胞。

1.5 ConA 刺激的淋巴细胞增殖反应

采用 ^3H -TdR 参入法:用完全培养基制备去辅佐细胞后的淋巴细胞悬液,调细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$, $100\mu\text{L}/$ 孔加于96孔板中。同时加腹腔巨噬细胞或脾辅佐细胞 $2\times 10^5/\text{mL}$, $50\mu\text{L}/$ 孔;另外每孔加入 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 的ConA $50\mu\text{L}$ 。每份样品设自身对照,三复孔培养。于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养72h,终止培养前6h,每孔加 $20\mu\text{L}$ ^3H -TdR 18.5kBq 。多头细胞收集器收集细胞于49型玻璃纤维滤膜上,自然干燥后,液闪仪测定 ^3H -TdR的参入量,结果以counts/min表示。

1.6 淋巴细胞 IL-2 的诱生及活性测定

1.6.1 IL-2 的诱生^[5] 调淋巴细胞浓度为 $2\times 10^6/\text{mL}$,以 $0.5\text{mL}/$ 孔加入24孔板,腹腔巨噬细胞或脾辅佐细胞为 $2\times 10^5/\text{mL}$, $0.5\text{mL}/$ 孔;ConA $100\mu\text{g}/\text{mL}$, $30\mu\text{L}/$ 孔。于 37°C 5%的 CO_2 培养箱中培养40h,离心收集上清液, -20°C 冻存待测。

1.6.2 IL-2 活性的测定 采用ConA活化的脾母细胞微量测定法^[5]

1.7 照射条件^[6]

采用Philips深部X线机,电流10mA,电压200kV,滤过板为0.5mmCu和1.0mmAl。剂量 $\leq 200\text{mGy}$ 时,剂量率为 $12.5\text{mGy}/\text{min}$;剂量大于 200mGy 时,剂量率为 $0.287\text{Gy}/\text{min}$ 。对照组给予假照射。

1.8 实验分组

A:各相应组未经分离的全脾细胞;B:各相应组去除辅佐细胞后的脾淋巴细胞;C:B加上对照组的腹腔巨噬细胞;D:B加上75mGy组的腹腔巨噬细胞;E:B加上2.0Gy组的腹腔巨噬细胞;F:B加上对照组的脾辅佐细胞;G:B加上75mGy组的脾辅佐细胞;H:B加上2.0Gy组的脾辅佐细胞。

1.9 统计学分析

结果以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm s$)表示,统计学分析采用两两比较 t 检验。

2 结 果

2.1 ConA 刺激的淋巴细胞增殖反应

表1显示,小鼠受不同剂量X射线作用后24h,75mGy照射可增强ConA刺激的淋巴细胞增殖反应,而2.0Gy照射则使增殖能力明显降低。通过5次贴壁去除辅佐细胞,其对ConA的反应性明显减弱。当加入辅佐细胞,不论是腹腔M ϕ 还是脾辅佐细胞,淋巴细胞增殖反应又得以恢复。而且75mGy组的淋巴细胞加入不同处理组的辅佐细胞,对ConA的反应性显著高于对照组和2.0Gy组,而2.0Gy照射组显著低于对照组。

2.2 淋巴细胞培养上清液中 IL-2 活性测定

用淋巴母细胞微量测定法,观察了辅佐细胞和脾淋巴细胞相互作用后培养上清中IL-2的

活性。由表 2 可见：与对照组相比，75mGy 照射可明显增加 IL-2 的活性，而 2.0Gy 照射结果相反。与 ConA 刺激的淋巴细胞增殖反应有相同的变化趋势。

Tab.1 Changes in ConA-induced proliferative reaction of splenic lymphocytes interacted with peritoneal macrophages or splenic accessory cells after whole-body irradiation of mice with X-ray (%)

Group	Sham	75mGy	2.0Gy
A: WSC	100.0±18.2 ⁽¹⁾	241.7±30.4 ⁽²⁾	34.9±5.0 ⁽³⁾
B: SL	21.0±8.7	39.0±7.8 ⁽²⁾	4.1±1.2 ⁽³⁾
C: SL+Sham Mφ	127.0±8.7	150.7±14.9	75.0±5.6 ⁽³⁾
D: SL+75mGy Mφ	133.4±12.8	190.4±20.4 ⁽²⁾	87.5±14.3 ⁽³⁾
E: SL+2.0Gy Mφ	149.6±25.3	177.3±16.2	56.4±9.8 ⁽³⁾
F: SL+Sham SAC	75.3±14.7	130.6±19.0 ⁽²⁾	36.2±10.5 ⁽³⁾
G: SL+75mGySAC	87.8±5.7	176.0±34.6 ⁽²⁾	44.4±4.0 ⁽³⁾
H: SL+2.0GySAC	86.4±12.2	166.3±40.8 ⁽³⁾	30.1±4.5 ⁽³⁾

⁽¹⁾ cpm, $\bar{x} \pm s$ $n=5$ for each group ⁽²⁾ or ⁽³⁾ $p < 0.05$ vs corresponding sham irradiation group WSP: Whole Spleen Cell; SL:Splenic Lymphocytes SAC: Splenic Accessory Cells; Mφ:peritoneal macrophages

Tab.2 Changes in IL-2 production from splenic lymphocytes interacted with peritoneal macrophages or splenic accessory cell after whole body irradiation of mice with X-ray (%)

Group	sham	75mGy	2.0Gy
A: WSC	100.0±10.9 ⁽¹⁾	173.2±7.23 ⁽²⁾	28.6±3.0 ⁽³⁾
B: SL	12.5±1.7	9.4±1.1	8.9±1.8
C: SL+Sham Mφ	74.1±3.8	86.2±2.4 ⁽³⁾	66.0±1.2
D: SL+75mGy Mφ	75.5±3.8	120.6±7.3 ⁽²⁾	82.2±0.6
E: SL+2.0Gy Mφ	67.0±0.9	76.8±3.7 ⁽²⁾	64.8±3.6
F: SL+Sham SAC	96.6±8.7	12.3±1.5 ⁽²⁾	77.0±2.7
G: SL+75mGySAC	105.2±1.9	121.0±3.9 ⁽²⁾	74.4±1.3 ⁽³⁾
H: SL+2.0GySAC	66.3±4.2	116.0±3.5 ⁽²⁾	36.3±2.1 ⁽³⁾

⁽¹⁾ cpm, $\bar{x} \pm s$ $n=5$ for each group ⁽²⁾ or ⁽³⁾ $p < 0.05$ vs corresponding sham irradiation group The directions of Tab.2 are same as those Tab.1

3 讨 论

小鼠受不同剂量 X 射线作用后，在脾淋巴细胞对 ConA 刺激的增殖反应及 IL-2 的活性测定中均可见高剂量辐射使反应性和活性降低，而 75mGy 照射则使之增高 ($p < 0.05$)。在这些变化中脾淋巴细胞的变化固然占有重要地位，但其中辅佐细胞的作用也不容忽视。白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室曾用点杂交方法发现低剂量全身照射后胸腺和脾组织中 c-fos 表达上调，进一步用原位杂交技术对不同淋巴器官内 c-fos mRNA 表达时程进行了观察，发现照射后早期主要是巨噬细胞、树突状细胞及大淋巴细胞内表达水平显著增强。这些发现促使我们加强对淋巴器官内辅佐细胞在低剂量全身照射促进免疫增强效应发生机制中所起作用的研究^[7]。脾脏是机体最大的外周免疫器官，是体液免疫和细胞免疫的重要场所，其细胞种类也较复杂，有 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞、红细胞等。当机体受到抗原刺激时，脾脏的辅佐细胞首先要提呈抗原，通过 Ia 与抗原的结合创造出供 Th 识别的抗原决定族，并呈递于细胞膜，向淋巴细胞提供抗原决定族及 MHC I、MHC II, 另外，单核吞噬细

细胞分泌 IL-1^[8],同时辅佐细胞向淋巴细胞提供共刺激因子 B7 与淋巴细胞的 CD28 反应,启动激活信号^[3]。本实验分别获取腹腔巨噬细胞、脾辅佐细胞及脾淋巴细胞,从实验结果可见,腹腔巨噬细胞虽然是不同的组织来源,但同样可以辅佐淋巴细胞反应。小鼠受不同剂量 X 射线作用后 24h, 75mGy 照射可增强 ConA 刺激的淋巴细胞增殖反应及 IL-2 的产生 ($p < 0.05$)。而 2.0Gy 照射则使增殖能力明显降低, IL-2 的产生明显减少 ($p < 0.05$)。通过 5 次贴壁去除辅佐细胞,淋巴细胞对 ConA 反应性明显降低,而且 IL-2 产生能力也明显缺乏。当加入腹腔巨噬细胞或分离的脾辅佐细胞后,上述淋巴细胞增殖反应以及 IL-2 产生能力又得以恢复,而且分离的 75mGy 照射组的淋巴细胞加上分离的不同辅佐细胞后,其反应性均高于或明显高于对照组;而 2.0Gy 照射组的淋巴细胞反应性的结果恰恰相反。从表 1 的 D 组与 C 组, G 组与 F 组进行两两比较,可得知 75mGy 照射的淋巴细胞加上 75mGy 照射的辅佐细胞反应性高于或显著高于 75mGy 照射的淋巴细胞加上对照组的辅佐细胞;而对照组的淋巴细胞加上 75mGy 照射组辅佐细胞后反应性与对照组的淋巴细胞加上对照组的辅佐细胞的反应性相比,有增加趋势,但没有明显差异 ($p > 0.05$)。而且加入 2.0Gy 照射后的辅佐细胞其辅助能力较对照组及 75mGy 组并未出现明显减弱 ($p > 0.05$),而有的组较对照组有明显增强,这与辅佐细胞辐射抗性较强有关。刘树铮^[9]报道,巨噬细胞的辐射抗性较高,哺乳动物平均致死剂量的辐射对巨噬细胞的形态结构、游走功能和吞噬作用均无影响,对细胞内分解代谢作用则可有抑制效应,特别在 10Gy 范围的辐射时抑制较肯定;与此相反,胞内的某些生化活动可能有所增强,结合抗原增多。因此,一定条件下,巨噬细胞向淋巴细胞提呈抗原的作用有可能受到辐射的刺激。当小鼠受 2.0Gy 照射后,虽然辅佐细胞仍有辅助能力,淋巴细胞对辐射较敏感,淋巴细胞增殖能力及 IL-2 产生较对照组及 75mGy 组明显降低。

有研究表明,抗原特异性 T 细胞活化至少需要 3 个信号:(1)T 细胞特异性抗原识别受体 (TCR) 与抗原递呈细胞表面递呈的经过处理的抗原与 MHC 分子形成的复合物相结合;(2)单核吞噬细胞分泌的 IL-1;(3)辅助协同刺激分子如 LFA-1、LFA-3、ICAM-1 以及 B7 和 CD28 等的相互作用。在此 3 种信号的共同作用下,激活的 T 细胞分化成熟为不同功能的 T 细胞亚群,并发挥各自的生物学作用。在我们的实验中充分证实了辅佐细胞的存在有着重要意义。而且可以看出,腹腔巨噬细胞虽然是不同组织来源,但同样可以辅助淋巴细胞反应,而且其与脾脏分离的辅佐细胞在淋巴细胞增殖反应中所起作用结果未见明显差异 ($p > 0.05$)。另外,陈志云^[10]等报道,受 75mGy 照射的脾巨噬细胞对受照射的脾淋巴细胞增强其 ConA 反应,而对未受照射的脾淋巴细胞无显著影响;未受照射的脾 MΦ 也不能增强受 75mGy 照射脾淋巴细胞的功能。Ibuki 等报道,受低剂量 γ 射线照射的小鼠巨噬细胞可增强脾细胞对 ConA 的反应。这些与本实验结果报道一致。并且本实验可见,未受照射的脾辅佐细胞能显著增强受 75mGy 照射脾淋巴细胞功能,且较对照组脾淋巴细胞为高 ($p < 0.05$);未受照射的腹腔巨噬细胞不能显著增强受 75mGy 照射脾淋巴细胞的功能 ($p > 0.05$),但有增加趋势。由此可见:低剂量辐射免疫功能增强的关键是 T 淋巴细胞功能增强,同时,受 75mGy 照射后,辅佐细胞功能增强也不容忽视。2.0Gy 照射后淋巴细胞受到了明显损伤,辅佐细胞辅助能力未见明显降低,这时即使加入受刺激的或对照的辅佐细胞,淋巴细胞的反应性也不可能提高。

参 考 文 献

- 1 Liu S Z, Liu W H, Qi J *et al.* Chin J Radiat Med Prot (in Chinese). 1992, 12:299-303

- 2 Crabtree GR, Clipstone NA. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**:1045-1085
- 3 Ward S G. *Biochem J*, 1996, **318**:361-377
- 4 Freundlich B, Avdalovic N. *J Immunol Meth*, 1983, **62**:31-38
- 5 Wang X L, Gao L S, Li Q S *et al.* *Chin J Immunol* (in Chinese), 1989, **5**:106-109
- 6 Liu W H, Liu S Z. *Chin J Radiol Med Prot* (in Chinese), 1990, **10**:85-89
- 7 Wan H, Liu S Z. *J Radiat Res Radiat Proces* (in Chinese), 1996, **14**:244-246
- 8 Shuo J L. *Progress in physiol Sci* (in Chinese), 1996, **27**:43-49
- 9 Liu S Z. *Medical Radiation Biology* (in Chinese), Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1986. 155-157
- 10 Chen Z Y, Zhang M, Liu S Z. *J Radiat Res Radiat Proces* (in Chinese), 1995, **13**:186-189

INTERACTION OF ACCESSORY CELLS WITH SPLENIC LYMPHOCYTE AFTER WHOLE-BODY X-IRRADIATION OF MICE

SUN Yimin LIU Shuzheng

(*MH Radiobiology Research Unit, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021*)

ABSTRACT We have examined the interaction among peritoneal macrophages, splenic accessory cells and splenic lymphocytes after whole body-irradiation (WBI) of mice with X-rays. The results showed: WBI with 75mGy X-rays could increase the proliferative response of splenic lymphocytes to ConA treatment, while 2 Gy WBI decreased it. If the splenic cell suspension was depleted of adherent accessory cells, proliferative response of lymphocytes was lowered. Peritoneal macrophages and splenic accessory cells obtained from mice exposed to lower dose radiation induced increase of proliferative response of T lymphocytes to ConA and IL-2 production.

KEYWORDS Macrophages, Splenic accessory cells, Irradiation

CLC R146, R811