

γ 射线对人淋巴细胞 CD3、CD4、CD8、B7.1 分子表达的影响 *

周建华 苏燎原 童建

(苏州医学院放射医学系 苏州 215007)

摘要 用间接免疫荧光-流式细胞仪测定方法,观察 γ 射线对人淋巴细胞 CD3、CD4、CD8、B7.1 分子表达的影响。结果表明:高剂量 γ 射线影响 CD3、CD4、CD8 分子的表达,预先给予低剂量 γ 射线,再接受高剂量照射,可减少这种影响。 γ 射线能激活静止的淋巴细胞表达 B7.1 分子。

关键词 γ 射线, CD3、CD4、CD8、B7.1 分子表达

中图分类号 R811.5

淋巴细胞膜受体的表达是淋巴细胞信息传递的重要环节。如 T 细胞的激活和发挥效应作用需要两个信号系统的共同参与^[1~4]:第一信号依赖于 T 细胞受体(T-cell receptor,TCR)/CD3 复合物和 CD4、CD8 协同受体的结合,第二信号依赖共刺激信号。介导共刺激信号的分子以 B7 为主。若膜受体受影响,将直接影响 T 细胞的作用。本实验研究观察了不同剂量 γ 射线对人外周血淋巴细胞 CD3、CD4、CD8、B7.1 分子表达的影响,以阐明辐射损伤(效应)的免疫调节机理,探讨辐射损伤监测的早期敏感指标。

1 材料和方法

1.1 细胞制备

健康献血员的静脉血,肝素抗凝,常规方法分离外周血单个核细胞(PBMC),磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)洗2次,调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$,以每瓶 1mL 接种培养瓶中。

1.2 照射条件和照射方法

实验在两种情况下进行。第一种情况为高剂量照射,第二种情况为先用低剂量照射,再用高剂量照射。高剂量照射用 ^{60}Co γ 射线源,活度为 2.22PBq,照射剂量分别为 0.5、2.0、4.0、8.0Gy,剂量率为 1.0Gy/min,照射后培养 24h。在第二种情况下低剂量照射用 ^{226}Ra γ 射线,活度为 $5.48 \times 10^8\text{Bq}$,剂量为 10cGy,剂量率为 1.0cGy/h,在 37°C 培养箱中照射 10h。停止照射后培养 4h,再用高剂量照射,继续培养 24h 和 48h 后收集细胞进行检测。

1.3 淋巴细胞 CD3、CD4、CD8、B7.1 分子表达的检测

采用单克隆抗体免疫荧光和流式细胞仪检测技术^[5]。经照射的细胞在培养 18h、24h 或 48h 后,分别加入 100 μL 1:100 稀释的鼠抗人 McAbCD3、McAbCD4、McAb CD8(DAKO)、McAbB7.1(Antibody Diagnostica InC., U.S.A),混匀,室温反应 30min,用 PBS 洗 2 次,再加

* 苏州医学院博士研究生基金

收稿日期:初稿 1999-11-09,修回 1999-12-27

50μL 1:50 稀释的羊抗鼠 IgG-FITC(DAKO, Denmark), 混匀, 室温避光反应 20min, PBS 洗 2 次, 然后加 1% 多聚甲醛 400μL。每一组样品设非特异对照组。EPIC—XL 型流式细胞仪 (Coulter,USA) 检测分析, 记录阳性细胞百分率, 减去非特异对照值。

2 结 果

2.1 不同剂量 γ 射线照射后 T 淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 分子的表达

经不同剂量照射的人淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 阳性细胞百分率的结果 (见表 1) 表明, 高剂量 γ 射线使 CD3、CD4、CD8 分子的表达下降, 且有一定的剂量反应关系, 0.5Gy 组 CD3、CD8 分子的表达, 2、4、8Gy 组 CD3、CD4、CD8 分子的表达与 0Gy 组比较均有显著性或非常显著性 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$) 差异。

Tab.1 Effects of γ-radiation with high dose on the expression of membrane receptors CD3, CD4 and CD8 in lymphocytes/% ($\bar{x} \pm s$)

Group	Irradiated dose/Gy				
	0	0.5	2	4	8
CD3	62.6±1.6	53.6±1.9(85.6) ⁽¹⁾	49.8±1.4(79.6) ⁽²⁾	50.7±2.0(81.2) ⁽²⁾	41.0±2.0(65.3) ⁽²⁾
CD4	40.5±1.1	36.0±1.9(88.9)	29.9±8.2(73.8) ⁽¹⁾	24.7±5.0(61.0) ⁽¹⁾	21.5±5.7(53.1) ⁽²⁾
CD8	25.8±4.2	22.1±1.9(85.7) ⁽¹⁾	17.6±1.9(68.2) ⁽¹⁾	14.2±1.1(55.0) ⁽¹⁾	12.1±1.1(46.9) ⁽²⁾
CD4:CD8	1.57	1.63	1.70	1.957	1.78

$n=3$, ()Percent: compared with 0Gy, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$

2.2 预先低剂量照射后高剂量照射淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 阳性细胞百分率的变化

预先给予低剂量照射, 培养 4h 后, 再给予高剂量照射, 分别在 24h 和 48h 后进行检测, CD3、CD4 和 CD8 阳性细胞百分率比单纯高剂量照射的阳性细胞百分率有所上升, 尤以 0.5Gy 组更明显, 2Gy 组 CD3、CD4 和 CD8 的表达虽有下降, 但与 0Gy 组比较无显著性 ($p > 0.05$) 差异。其于各组虽然也有随剂量增加 CD3、CD4 和 CD8 表达下降的情况, 但不如直接给予高剂量照射组明显。这表明低剂量照射对 CD3、CD4、CD8 的表达有适应性反应。具体数据见表 2。

Tab.2 Effect of γ-irradiation with low dose followed by high dose on the expression of membrane receptors CD3, CD4, and CD8 in lymphocyte (%)

Group	Cultured time/h	D_2 /Gy				
		0	0.5	2	4	8
CD3	24	50.3±1.6	52.4±1.7(104.2)	44.4±2.0(88.3)	46.4±1.7(92.2)	43.1±1.9(85.7)
	48	47.6±1.4	49.6±2.3(104.2)	39.7±1.9(83.4)	30.7±1.2(64.5) ⁽¹⁾	22.6±3.7(47.5) ⁽²⁾
CD4	24	34.5±1.4	30.1±1.8(87.2)	29.0±2.0(84.1)	27.2±1.6(78.8) ⁽¹⁾	27.4±1.8(79.4) ⁽¹⁾
	48	33.7±1.5	35.5±2.7(105.2)	30.7±1.9(91.1)	28.4±0.4(84.3)	20.8±6.2(61.7) ⁽¹⁾
CD8	24	18.7±1.4	16.3±1.4(87.2)	17.4±2.0(93.0)	14.4±1.6(77.0) ⁽¹⁾	12.0±1.7(64.2) ⁽¹⁾
	48	17.8±1.4	21.6±2.6(121.3)	11.1±1.9(62.4) ⁽¹⁾	3.6±1.2(20.2) ⁽²⁾	4.9±1.5(27.5) ⁽²⁾

$n=3$, D_2 : The highly irradiated dose, () Percent: compared with 0 Dy, ⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$

2.3 γ 射线对淋巴细胞 B7.1 分子表达的影响

γ 射线能激活 T 淋巴细胞表达 B7.1 分子, 且有剂量反应关系 ($r=0.886$, $p < 0.05$)(见图

1)。

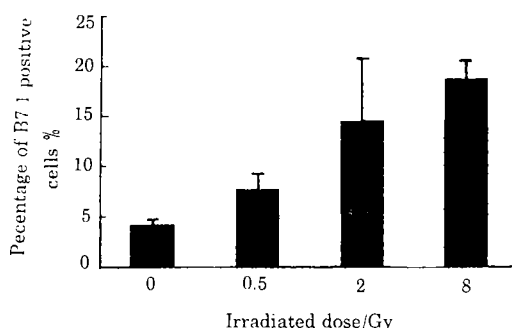


Fig.1 Effect of γ -irradiation on the expression of membrane molecule B7.1 in lymphocyte

3 讨论

CD3 是 T 细胞表面的分化抗原, 能与 TCR 结合形成 TCR/CD3 复合物, 启动细胞内一系列信息传递过程^[5], 使 T 淋巴细胞活化、增殖, 并在细胞间粘附、细胞因子分泌等方面发挥重要辅助和调节作用^[6]。电离辐射后, T 细胞表面 TCR/CD3 复合物的损伤和恢复直接影响其介导 T 细胞抗原激活的能力和细胞内信息传递, 进而影响 T 细胞功能。因而也有人将监测 TCR/CD3 标志物作为电离辐射的敏感指标, 作为生物剂量计^[7,8]。本实验研究发现, 0.5Gy γ 射线照射就可对 T 细胞表面 CD3 分子的表达产生影响, 且随剂量增加, CD3 阳性细胞百分率下降, 表明 CD3 对辐射非常敏感。能否作为生物剂量计还将作进一步的研究。预先低剂量照射可部分阻止高剂量照射引起的 CD3 阳性细胞百分率的下降, 说明低剂量照射对 CD3 分子的表达也产生适应性反应, 可促进 T 细胞活化和信息传递, 与小鼠胸腺细胞研究的结果相似^[9,10]。提示, 为了减少大剂量照射对淋巴细胞的损伤, 提高疗效, 放疗病人可尝试先低剂量照射, 再高剂量分次照射。

CD4 和 CD8 是 T 细胞表面跨膜蛋白, 它们在两类不同方式的主要组织相容性复合体 (MHC) 限制的 T 细胞中表达, 并在促进 T 细胞和抗原呈递细胞 (APC) 或靶细胞相互作用中作为辅助分子发挥作用。CD4 分子既可作为细胞粘连分子发挥作用, 也是一个传递信号的分子, 促使 T 细胞的激活。表达 CD8 的 T 细胞具有细胞毒性, CD8 除了细胞粘连功能外, 还具有信号传递功能。CD4、CD8 表达受影响, 势必影响 T 细胞的功能。本实验结果表明, 高剂量照射也影响 CD4、CD8 的表达, 但 CD8 比 CD4 更敏感。与苏州医学院放射医学系的报道一致^[11]。

对有效激活 T 细胞而言, 特别是静止的 T 细胞, 还需要一个附加信号^[12,13]。称为共刺激信号或称共刺激分子。介导共刺激信号的主要是 B7 分子。抗原呈递细胞表达 B7 分子, 静止的 B、T 细胞、大多数肿瘤细胞不表达 B7 分子。B7 分子可被 CD4⁺T 细胞表面的 CD28 分子识别, 当 T 细胞的 TCR/CD3 复合物与抗原 MHC 复合物结合后, 如果存在 B7, 则 B7 与 CD28 相互作用, 由此产生共刺激信号, 使 T 细胞激活, 如无 B7 表达, 则 CD4⁺T 细胞不能应答抗原的刺激, 表现为无细胞免疫反应或失活。本实验发现, 电离辐射可激活 T 细胞表达 B7, 而其效应尚待研究。

综上所述, 从本实验研究结果分析可以看出, 高剂量电离辐射对 T 细胞 CD3、CD4、CD8 分子的表达有影响, 以 CD3、CD8 更敏感, 可作为辐射损伤的早期敏感指标继续进行

探讨。预先低剂量照射,再给予高剂量照射,可减少高剂量照射对 CD3、CD4、CD8 表达的影响。 γ 射线能活化淋巴细胞表达 B7.1 分子。进一步的研究正在进行中。

参 考 文 献

- 1 Daniel P T, Kroidl A, Cayeux S *et al.* J Immunol, 1997, 159:3808-3815
- 2 Li Y W, Hellstrom K E, Newby S A *et al.* J Exp Med, 1996, 183:639-644
- 3 Boehme S A, Zheng L X, Lenardo M J. J Immunol, 1995, 155:1703-1712
- 4 Guinan E J, Gribben J, Boussiotis V *et al.* Blood, 1994, 84:3261-3269
- 5 Bluestone J A. Immunity, 1995, 2:555-564
- 6 Wang C Q. The Base of Molecular Immunology, Beijing: The Publishing House of Beijing University (in Chinese), 1997, 162-215
- 7 Nahoko I, Shigeko U, Yuko H *et al.* Mut Res 1997, 390:269-282
- 8 Shigeko U, Takako S, Yoichirok *et al.* Mut Res. 1997, 393:37-46
- 9 Su X, Zhang Y C, Wan H *et al.* Chin J Radiol Med Prot (in Chinese), 1997, 17(3):162-165
- 10 Ju G Z, Su X, Qi J *et al.* Chin J Radiol Med Prot (in Chinese), 1995, 15(2):93-95
- 11 Xu Y D, Su L Y. J Radiat Res Radiat Pro (in Chinese). 1987, 5(4):58-62
- 12 Fleischer J, Soeth E, Reiling N *et al.* Immunology, 1996, 89:592-598
- 13 Alexander D, Starling C C, Williams L A *et al.* Eur J Immunol, 1995; 25:2064-2068

EFFECT OF γ -RAYS IRRADIATION ON EXPRESSION OF CD3, CD4, CD8, B7.1 MOLECULES IN HUMAN LYMPHOCYTES*

ZHOU Jianhua SU Liaoyuan TONG Jian

(Department of medical Radiodiagnosis, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT The effects of γ -rays irradiation on CD3, CD4, CD8, B7.1 molecules expression of human lymphocytes which were irradiated with 0.5, 2, 4 and 8Gy γ -rays or with 0.5, 2, 4 and 8Gy (D_2) γ -rays 4h after 10cGy irradiation (D_1) were investigated in normal donor. 24h or 48h after final irradiation the changes of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, B7.1⁺ molecules were measured by flow cytometry(FCM) with immunofluorescence technique. The results showed that the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ molecules expression in the highly irradiated groups decreased with dose increase, while the CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ molecules privously exposed to 10cGy irradiation could reduce this influence, and the B7.1⁺ molecule expression in the high dose irradiation groups was enhanced with increasing dose.

KEYWORDS γ -ray, CD3, CD4, CD8, B7.1 molecule expression

CLC R811.5

* Doctor study fund of Suzhou Medical College