

低剂量辐射对荷瘤小鼠抑瘤作用及其免疫功能的影响

范正平 朱炳钗 吕家本 沈先荣 鲁永杰 张鸿源 潘 燕 何 颖

(海军医学研究所 上海 200433)

摘要 利用低剂量辐射 (LDR) 对接种 Lewis 肺癌细胞小鼠进行全身照射, 观察了 20 d 内肿瘤抑制率及免疫学指标的动态变化。研究结果表明, 受 75mGy 剂量单次或分割照射后的肿瘤抑制率分别为 40.34% 和 51.19%; 脾 NK 细胞活性在照后 1~4 d 呈一过性升高; 外周血 T 淋巴细胞表面 CD4、CD8 水平早期不同程度增高, 而 CD4/CD8 比值在照后也反映出升高。提示在本实验条件下, LDR 对 Lewis 肺癌的生长有抑制作用, 同时对荷瘤机体的免疫功能也显示一定的刺激效应。

关键词 低剂量辐射 (LDR), 荷瘤鼠, 肿瘤抑制作用, 免疫功能, NK 细胞, T 淋巴细胞

LDR 具有抗癌作用, 不仅已被实验研究证实, 而且人类辐射流行病学调查也显示高本底地区人群癌发生率低于低本底地区^[1], 近年还有将 LDR 全身照射结合大剂量局部照射治疗人类肿瘤的报道^[2]。尽管人们对 LDR 抗肿瘤作用的机理的认识还不尽一致, 但仍在进行深入研究。目前研究比较多的是 T 淋巴细胞功能及其调节机制的探讨^[3~4]。本文利用 75 mGy 剂量 γ 射线对 Lewis 肺癌小鼠进行单次或分割全身照射, 观察了 20 d 肿瘤抑制率、脾 NK 细胞活性及外周血 T 淋巴细胞表面 CD4、CD8 水平的动态变化, 并就 LDR 的抑瘤效果及其对荷瘤机体的免疫功能的影响作了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

选用上海计生所提供的雄性 C₅₇BL/6 小鼠共 105 只, 4~5 周龄, 平均体重 16.97 ± 0.76 g。实验分为两个照射组和一个对照组, 每组 35 只。

1.2 肿瘤细胞接种

Lewis 肺癌模型由上海医药工业研究院分院提供。无菌条件下摘除新鲜瘤体, 在 200 目尼龙网上剪碎、研磨制成细胞悬液, 再经离心、稀释、显微计数, 细胞浓度最终为 9×10^6 /ml。每鼠右腋皮下接种 0.2ml (1.8×10^6 个细胞)。

1.3 照射

采用海军医学研究所小剂量 ^{60}Co γ 点源。细胞接种后 24 h 开始进行单侧双向全身照射, 源距 14m, 剂量率 1.79mGy/min, 剂量 75 mGy。分割照射组每天照射 15mGy, 连续照 5d。

收稿日期: 初稿 1997-02-28, 修回 1997-06-25

1.4 观察指标

1.4.1 胸腺、脾平均重量 照射后 20 d, 每组断颈椎处死 10 只动物, 取胸腺、脾脏称重。

1.4.2 平均瘤重与抑瘤率 在测胸腺和脾重量时, 摘除瘤体称重, 求各组平均瘤重。再按下列公式计算出抑瘤率:

$$\text{抑瘤率} = [\text{对照组平均瘤重 (g)} - \text{照射组平均瘤重 (g)}] / \text{对照组平均瘤重 (g)} \times 100\%$$

1.4.3 脾 NK 细胞活性测定^[5] 取荷瘤鼠脾脏过 200 目筛网, 用淋巴细胞分离液 (比重 1.077±0.002, 上海试剂二厂) 分离出单个核细胞, 加入 NH₄ Cl-Tris 缓冲液, 用 2% 小牛血清 RPMI-1640 洗涤, 置平皿中 37 ℃温育 1h。将 1×10⁶ 个 YAC-1 细胞悬于 1ml 培养基中, 加入 7.4×10⁵ Bq ³H-TdR (比度 1.48×10¹²Bq, 上海原子核所) 37 ℃培养 2h。取 36 孔 0.1ml 10⁴ 个标记的 YAC-1 细胞 (靶细胞)、0.1 ml 5×10⁵ 个脾单个核细胞 (效应细胞), 效靶比例为 50:1。相同条件下不加效应细胞的靶细胞作为对照。每样品 3 个平行孔, 37 ℃ 5% CO₂ 培养 18h。用多头细胞收集仪将细胞收集在 49# 玻璃纤维滤纸上, 闪烁仪测定其放射性计数。

$$^3\text{H-TdR 释放率} = (\text{单加靶细胞孔 cpm} - \text{效靶细胞孔 cpm}) / (\text{单加靶细胞孔 cpm}) \times 100\%$$

$$\text{特异性释放率} = \text{照射组 } ^3\text{H-TdR 释放率} - \text{对照组 } ^3\text{H-TdR 释放率}$$

1.4.4 T 淋巴细胞表面 CD4、CD8 水平测定^[6,7] 荷瘤鼠摘眼球取血样, 肝素抗凝。按 1:1.5 比例将血样与 PBS 混合后, 用淋巴细胞分离液 (比重 1.077±0.002) 分离出单个核细胞。将 200μl 单核细胞悬液加入经 2g/L 浓度小牛血清白蛋白包被的 Eppendorf 管内, 再加入抗 Lyt₂ McAb 或 L₃t₄ McAb (一抗, 北京医科大学免疫教研室提供), 静置 30min, 然后以 3000rpm 离心 5min。弃上清后用 PBS 洗两次, 再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠 IgG (二抗)。放置 30min 后, 用 PBS 再洗涤两次, 加入邻苯二胺 (OPD) 及 H₂O₂ 反应 20min, 最后加入 H₂SO₄ 终止反应。用 Bio-Rad、RD640 酶标仪在 492nm 处测定其吸收值, 所测得的 CD₄、CD₈ 水平以 OD 值表示。

2 结 果

2.1 主要免疫器官重量的变化

Tab.1 Average weights of thymus, spleen or tumor, and tumor inhibitory rate in tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Group	Irradiation fashion	Average thymus weight/g	Average spleen weight/g	Average tumor weight/g	Tumor inhibitory rate/%
1	15 mGy×5 d	0.072±0.01 ⁽¹⁾	0.283±0.088	1.44±0.56 ⁽²⁾	51.19
2	75 mGy×1d	0.106±0.04	0.218±0.035	1.76±0.73	40.34
3	0 Gy	0.108±0.04	0.285±0.103	2.95±1.03	

Note: ⁽¹⁾vs control $p < 0.1$, ⁽²⁾vs control $p < 0.01$

胸腺和脾脏是小鼠的主要免疫器官。表 1 所示, 受 75mGy 单次照射后, 荷瘤鼠平均脾重略低于对照; 而分割照射组平均胸腺重量稍轻于对照。经 t 测验, 两样品均数在组间未见有显著性差异。提示 75 mGy 低剂量照射对荷瘤小鼠主要免疫器官平均重量无明显影响。

2.2 平均瘤重与抑瘤率

从表 1 可见，接种后 20d 两照射组平均瘤重均小于对照组，尤其受分割照射组肿瘤生长更为缓慢，其平均瘤重显著低于对照 ($p < 0.01$)。此外，单次和分割照射后的抑瘤率分别达到 40.34% 和 51.19%，说明 75 mGy 剂量照射对 Lewis 肺癌的生长有明显的抑制作用。

2.3 脾 NK 细胞活性的变化

如表 2，当分割照射组累积剂量分别为 15、60 和 75mGy 时，脾 NK 细胞特异释放率略高于对照组，但统计比较无差异。而单次照射组在照后第 1d，即见 NK 细胞活性显著高于对照 ($p < 0.05$)，但于第 4d 即又恢复至对照水平。此说明 75mGy 剂量单次照射可致荷瘤鼠脾 NK 细胞活性呈一过性升高。

Tab.2 Dynamic changes in splenic NK cell activity post-irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	No.of animals	Irradiation fashion	Specific release rates post-irradiation/%				
			1 d	4 d	8 d	14 d	20 d
1	25	15mGy×5d	52.88±3.66 (15mGy) ⁽¹⁾	47.20±2.49 (60mGy)	65.94±11.43 (75mGy)	44.84±8.0	60.68±7.33
2	25	75mGy×1d	57.22±2.13 ⁽²⁾	37.76±2.66	65.24±10.52	53.40±9.17	50.82±3.54
3	25	0Gy	46.72±4.73	40.16±1.96	60.94±6.50	51.20±6.10	55.40±4.21

Note: ⁽¹⁾The numbers in parenthesis indicate accumulated doses, being same in next tables, ⁽²⁾vs control $p < 0.05$

2.4 LDR 对 CD4 水平的影响

Tab.3 Dynamic changes of CD4 levels in peripheral blood post-irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	No. of animals	Irradiation fashion	Values of OD post-irradiation				
			1 d	4 d	8 d	14 d	20 d
1	25	15mGy× 5d	0.044±0.018	0.213±0.074 ⁽¹⁾	0.056±0.016	0.170±0.047 ⁽¹⁾	0.294±0.099 ⁽¹⁾
2	25	75 mGy×1d	0.130±0.029 ⁽¹⁾	0.098±0.044 ⁽²⁾	0.083±0.017	0.188±0.021 ⁽¹⁾	0.204±0.024 ⁽¹⁾
3	25	0Gy	0.042±0.015	0.063±0.017	0.088±0.038	0.379±0.144	0.418±0.123

Note: ⁽¹⁾vs control $p < 0.01$, ⁽²⁾vs control $p < 0.05$

CD4 水平的升高与下降直接反映出机体免疫系统辅助性 T 淋巴细胞 (T_H) 功能的变化，升高则表示 T_H 细胞免疫活性增强，反之则表示降低。如表 3 所示，荷瘤鼠受 75mGy 剂量单次照射后第 1d，外周血 CD4 水平呈显著性增高，为对照的 309.52% ($p < 0.01$)，第 4d 仍维持较高水平。分割照射时第 4d(累积剂量 60 mGy)，CD4 水平也呈显著性升高，为对照的 338.10% ($p < 0.01$)。第 8d 以后，两照射组均呈波动性下降。

2.5 LDR 对 CD8 的效应

Tab.4 Dynamic changes of CD8 levels in peripheral blood post-irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	No. of animals	Irradiation fashion	Values of OD post-irradiation				
			1 d	4 d	8 d	14 d	20 d
1	25	15mGy×5d	0.053±0.008	0.160±0.047 ⁽¹⁾	0.065±0.024 ⁽¹⁾	0.119±0.041 ⁽¹⁾	0.296±0.073 ⁽²⁾
2	25	75 mGy×1d	0.158±0.034 ⁽¹⁾	0.062±0.026	0.071±0.031 ⁽¹⁾	0.164±0.020 ⁽¹⁾	0.319±0.059 ⁽²⁾
3	25	0Gy	0.081±0.020	0.056±0.012	0.124±0.061	0.388±0.164	0.491±0.115

Note: ⁽¹⁾vs control $p < 0.01$, ⁽²⁾vs control $p < 0.05$

CD8 水平的增高与降低,也可反映抑制性 T 淋巴细胞 (T_S) 功能的变化。如表 4,分割照射组在照后第 1d CD8 水平较对照降低,但第 4d 则迅速升至对照的 285.71%($p < 0.01$),第 8 d 以后则出现持续性显著下降 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。与分割照射有所不同,单次照射组第 1d CD8 水平即呈显著性升高,为对照的 195.06% ($p < 0.01$),第 4 d 仍略高于对照组,此后变化同分割照射组,呈现显著性下降。

2.6 CD4/CD8 比值的变化

Tab.5 The ratio of CD4/CD8 at different time intervals post-irradiation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	No. of animals	Irradiation fashion	The ratio of CD4/CD8 post-irradiation				
			1 d	4 d	8 d	14 d	20 d
1	25	15mGy×5d	0.830±0.216 ⁽¹⁾	1.331±0.271	0.862±0.298	1.429±0.304 ⁽²⁾	0.993±0.150
2	25	75mGy×1d	0.822±0.311 ⁽¹⁾	1.581±0.342 ⁽²⁾	1.169±0.103 ⁽²⁾	1.146±0.256	0.639±0.068
3	25	0Gy	0.519±0.258	1.125±0.078	0.710±0.329	0.978±0.111	0.851±0.210

Note: ⁽¹⁾vs control $p < 0.1$, ⁽²⁾vs control $p < 0.05$

如表 5 所示,除单次剂量照射组在照后第 20d CD4/CD8 比值较对照略显降低外,在任一时间点上两照射组此比值均高于对照组。

3 讨 论

3.1 LDR 对 Lewis 肺癌的生长抑制作用

实验研究证实,预先给小鼠照射一定小剂量辐射对移植性肿瘤有抑制生长的作用,表现为肿瘤重量和体积的明显缩小。但预先给小鼠接种瘤细胞,一定时间后再予 LDR 照射以评价抑瘤效果的研究报道甚少。本实验预先给小鼠移植 Lewis 肺癌细胞,24h 后再以单次或分割照射方式全身照射 75mGy。结果发现两种照射方式对 Lewis 肺癌均产生了抑制作用,照射后 20d 平均肿瘤重量较对照组明显缩小,其抑瘤率分别为 40.34% 和 51.19%(表 1)。有关 LDR 在一定条件下可抑制肿瘤生长的机理,目前说法不一。Anderson 等^[8]认为 LDR 可激活机体防御系统,使其抗病、抗肿瘤能力增强,从而达到对移植性肿瘤的抑制,并降低其生长速度。傅海青等^[9]认为 LDR 的抑瘤作用是通过机体各系统的整体调节来提高机体免疫力而实现的,不同于大剂量局部照射直接对肿瘤细胞造成杀伤。

3.2 LDR 对荷瘤机体的免疫刺激作用

LDR 不仅对正常机体产生免疫刺激作用,还可增强荷瘤机体的肿瘤免疫功能。本实验尽管未发现 LDR 对荷瘤小鼠主要免疫器官平均重量有直接刺激作用(表 1),但从脾 NK 细胞活性、外周血 T 淋巴细胞表面 CD4、CD8 水平及 CD4/CD8 比值等客观指标的变化,似乎表明 LDR 对 Lewis 肺癌小鼠的免疫机能产生了一定的刺激效应(表 2~5)。这种免疫刺激效应主要表现在受 LDR 照射后的早期阶段,如 75mGy 剂量单次照射组,在照后第 1d 即见脾 NK 细胞活性显著升高,其后在对照水平上下波动(表 2)。又如,从表 3 中可见荷瘤鼠在照后第 1 和第 4d,CD4 水平呈现显著升高,提示 T_H 细胞可能受到刺激;表 4 中 CD8 水平与 CD4 变化相似,即在同一时间点上 CD8 水平也呈显著性增高,这似乎也提示 T_S 细胞受到刺激。但在上述两个时间点上, T_H 和 T_S 两者增加的幅度不同, $T_H > T_S$, T_H 分别为对照的 309.52% 和 338.10%,而 T_S 则为 195.06% 和 285.71%。

此外，表 5 中除个别点外，所有时间点上 T_H/T_S 比值照射组始终高于对照。由此可见，LDR 使荷瘤机体外周血 CD4 和 CD8 水平升高，而导致 CD4/CD8 比值上升，是由于 CD4 水平上升幅度大于 CD8 所致。

参 考 文 献

1 何伟辉. 中华放射医学与防护杂志, 1985, 5(2):109
2 坂本澄彦. 原子力工业, 1990, 36(5):3
3 杜泽吉, 苏燎原, 刘克良等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12(4):247
4 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(4):217
5 沈茜, 汪美先, 章国华等. 第二军医大学学报, 1993, 14(4):334
6 Carriere D, Fontaine C, Berthier A M et al. Clin Chem, 1994, 40(1):30
7 Freinke L, Nugel E, Docke W D et al. Clin Chem, 1994, 40(1):38
8 Anderson R E, Tokuda S, Williams W L et al. Am J Path, 1982, 108:24
9 傅海清, 李修义, 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(1):65

EFFECTS OF LOW DOSE RADIATION ON TUMOR INHIBITION
AND IMMUNOLOGICAL FUNCTION IN TUMOR-BEARING MICE

Fan Zhangping Zhu Bingchai Lu Jiaben Shen Xianrong
Lu Yongjie Zhang Hongyuan Pan Yan He Ying
(*Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433*)

ABSTRACT This paper reports the effect of total body irradiation with low dose radiation (LDR) on tumor inhibition and the dynamic changes of immunological indexes in Lewis lung cancer cell-inoculated mice in 20 days. Results show that tumor inhibitory rates in single and fractionated irradiation of 75mGy were 40% and 51% respectively, splenic NK cell activity was elevated in 1 to 4 days, CD4 and CD8 levels on T lymphocyte surface were up-regulated early to some extent, and the ratio of CD4/CD8 was risen post-irradiation. It suggests that under the experimental condition LDR might lead to growth inhibition of Lewis lung cancer cells and immunological hormesis in the tumor-bearing mice.

KEYWORDS Low dose radiation (LDR), Tumor-bearing mice, Tumor inhibition, Immunological function, NK cells, T lymphocyte