

全身低剂量 γ 射线照射后荷瘤鼠外周血、脾及瘤内 T 淋巴细胞亚型的观察

邹华伟

苏燎原 田海林

(苏州医学院附属第一医院放疗科 苏州 215006)

(苏州医学院放射生物学教研室 苏州 215007)

摘要 通过对 T 淋巴细胞亚型变化的观察,探讨了低剂量电离辐射在肿瘤免疫调节中的兴奋效应机制。BALB/C 荷瘤鼠分别接受 5、10、20 和 50cGy γ 射线全身照射后,应用单克隆抗体免疫荧光与流式细胞仪检测技术观察其外周血、脾脏和肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 中 T 细胞亚型的相对变化。结果表明: 10cGy 照射组小鼠外周血及脾脏中 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 显著增高 ($p < 0.01$); 而 TIL 中 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 则显示进一步下降 ($p < 0.05$)。提示低剂量电离辐射通过其兴奋效应改善了荷瘤机体的免疫抑制状态,并可能使表达 Lyt_2 分子的 Tc 在肿瘤局部聚集而发挥抗肿瘤作用。

关键词 低剂量电离辐射, T 淋巴细胞亚型, 肿瘤免疫, 免疫调节

低剂量电离辐射通过其兴奋效应,能够刺激机体的免疫功能,使免疫应答能力得以提高,已反复被证实^[1]。带瘤宿主的免疫功能普遍低下,中晚期更加突出,在细胞免疫中主要表现为 T 淋巴细胞亚群间的失衡^[2]。为了探讨低剂量电离辐射在肿瘤免疫调节中的可能作用机制,应用单克隆抗体免疫荧光与流式细胞仪检测技术,系统地观察了荷瘤鼠在受到不同低剂量 γ 射线全身照射后其脾脏、外周血及 TIL 中 T 淋巴细胞亚型的相对变化。

1 材 料 和 方 法

1.1 荷瘤鼠模型

6~8 周龄、雄性 BALB/C 小鼠,体重 20 ± 2 g,购自上海中英实验动物中心。抽取 1×10^5 个 EAC(艾氏腹水癌)细胞皮下接种在小鼠右后肢。3~4d 触及肿瘤后随机分组,每组 10 只。于种植肿瘤细胞后第 5d 起开始照射。

1.2 照射条件和方法

采用 ^{226}Ra γ 射线源照射,源强度 $3.89 \times 10^8 \text{Bq}$,剂量率 0.48cGy/h 。各组小鼠均为全身持续照射,假照组除外,按源距控制吸收剂量。共照射 5d。

1.3 单克隆抗体

第一抗体分别为大鼠抗小鼠 L_3T_4 、大鼠抗小鼠 Lyt_2 ;第二抗体为荧光标记兔抗大鼠 IgG。北京医科大学免疫研究中心产品。

博士生研究课题,受苏州医学院科研基金资助

收稿日期:初稿 1997-04-01,修回 1997-06-05

1.4 淋巴细胞样品制备

1.4.1 外周血淋巴细胞样品制备 照射结束后 24h, 取小鼠眼眶血, 分设 3 管, 每管 100 μ l。用等量 0.01mol/L PBS 稀释。在 L₃T₄、Lyt₂ 样品中分别加入 100 μ l 经稀释的第一单克隆抗体, 对照管加入 100 μ l PBS。摇匀, 室温孵育 45min, 加 3ml PBS (pH7.6), 1000r/min 离心 3min。弃上清, 每管加 100 μ l 第二抗体, 摇匀后 4℃作用 45min。然后每管加 1ml 1% 草酸铵溶掉红细胞, PBS 重复洗 3 次。最后加入 500 μ l 0.1% 甲醛, 置 4℃, 避光待分析。

1.4.2 脾脏淋巴细胞样品制备 无菌条件下取出小鼠脾脏, 用毛玻璃研磨制成单细胞悬液。调细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶/ml, 余操作步骤同前。

1.4.3 TIL 样品制备 TIL 的分离参照 Whiteside 不连续密度梯度离心法^[3]。将分离的细胞悬液调细胞浓度为 1 $\times$ 10⁶ml。第一、二抗体的加入方法基本与外周血淋巴细胞样品制备方法相同。

1.5 样品测定

待测样品于检测前充分混匀, 用 Coulter EPICS XL 流式细胞仪测得各淋巴细胞亚群的相对百分数。实验数据用 EPIINFO 5.01 统计软件处理。

2 结 果

2.1 低剂量 γ 射线对荷瘤鼠脾脏 T 淋巴细胞亚型的影响

BALB/C 小鼠正常状态下脾 L₃T₄⁺ 为 39.3 $\pm$ 2.0%;Lyt₂⁺ 为 18.6 $\pm$ 2.1%; L₃T₄⁺/Lyt₂⁺ 为 2.13 $\pm$ 0.26。与假照组荷瘤鼠比较, 各项指标均有非常显著的差别 ($p < 0.01$, 结果未列入表内)。经不同低剂量辐照刺激后, 各剂量组 L₃T₄⁺ 和 L₃T₄⁺/Lyt₂⁺ 比值均有不同程度的提高, 而 Lyt₂⁺ 呈降低趋势。其中以 5cGy 和 10cGy 照射最具统计学意义, 详见表 1。

Tab.1 Effects of low dose irradiation on subsets of splenic T-lymphocyte ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Group	Dose/cGy				
	0	5	10	20	50
L ₃ T ₄ ⁺	31.2 $\pm$ 2.4	34.5 $\pm$ 2.3	35.9 $\pm$ 2.5 ⁽²⁾	33.9 $\pm$ 2.1	33.1 $\pm$ 2.2
Lyt ₂ ⁺	27.4 $\pm$ 2.5	23.5 $\pm$ 2.3 ⁽²⁾	21.8 $\pm$ 2.4 ⁽¹⁾	23.7 $\pm$ 2.1	25.2 $\pm$ 2.1
L ₃ T ₄ ⁺ /Lyt ₂ ⁺	1.15 $\pm$ 0.20	1.49 $\pm$ 0.26 ⁽¹⁾	1.68 $\pm$ 0.33 ⁽¹⁾	1.44 $\pm$ 0.22 ⁽²⁾	1.33 $\pm$ 0.21

(¹) $p < 0.01$ (²) $p < 0.05$ (Compared with 0cGy group)

2.2 低剂量 γ 射线对外周血 T 细胞亚型的影响

正常 BALB/C 小鼠外周血中 L₃T₄⁺ 为 48.5 $\pm$ 3.3%; Lyt₂⁺ 为 23.8 $\pm$ 3.0%; L₃T₄⁺/Lyt₂⁺ 为 2.05 $\pm$ 0.31。各项指标与假照组荷瘤鼠比较均有非常显著差别 ($p < 0.01$)。低剂量照射后的变化大致同脾 T 细胞亚型。10cGy 照射组 L₃T₄⁺/Lyt₂⁺ 与假照组比较差别非常显著, 5cGy 照射组亦有显著差别 (见表 2)。

Tab.2 Effects of low dose irradiation on subsets of PBL ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Group	Dose/cGy				
	0	5	10	20	50
L ₃ T ₄ ⁺	38.5 $\pm$ 2.5	42.5 $\pm$ 2.7 ⁽²⁾	43.0 $\pm$ 2.8 ⁽²⁾	38.9 $\pm$ 2.7	40.0 $\pm$ 2.9
Lyt ₂ ⁺	36.5 $\pm$ 2.4	30.5 $\pm$ 2.8 ⁽¹⁾	29.1 $\pm$ 2.7 ⁽¹⁾	32.5 $\pm$ 2.6 ⁽²⁾	34.3 $\pm$ 2.8
L ₃ T ₄ ⁺ /Lyt ₂ ⁺	1.05 $\pm$ 0.18	1.39 $\pm$ 0.25 ⁽²⁾	1.48 $\pm$ 0.24 ⁽¹⁾	1.26 $\pm$ 0.22	1.18 $\pm$ 0.31

(¹) $p < 0.01$ (²) $p < 0.05$ (Compared with 0cGy group)

2.3 低剂量 γ 射线对 TIL 中 T 细胞亚型的影响

如表 3 所示，肿瘤组织内浸润的 T 细胞亚型变化与脾脏及外周血中的改变完全不同。在肿瘤组织中， $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 普遍倒置。10cGy 照射后其比值及 $L_3T_4^+$ 进一步降低，而 Lyt_2^+ 百分数升高。

Tab.3 Effects of low dose irradiation on subsets of TIL ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Group	Dose/cGy				
	0	5	10	20	50
$L_3T_4^+$	35.8±3.2	32.7±2.8	31.4±2.9 ⁽¹⁾	33.8±2.7	34.7±3.0
Lyt_2^+	50.2±3.3	52.5±2.8	53.5±2.8 ⁽¹⁾	51.7±2.6	51.1±3.0
$L_3T_4^+/Lyt_2^+$	0.71±0.04	0.62±0.04	0.59±0.03 ⁽¹⁾	0.65±0.02	0.68±0.03

⁽¹⁾ $p < 0.05$ (Compared with 0cGy group)

3 讨 论

荷瘤机体的免疫功能异常，早期以局部免疫应答反应为主，随着肿瘤的生长对全身免疫功能的抑制才逐渐明显^[4]，并主要是细胞免疫的抑制。本实验中，假照组荷瘤鼠与未种植肿瘤的 BALB/C 小鼠比较，脾脏和外周血中 $L_3T_4^+$ 、 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比值均显著降低， Lyt_2^+ 百分数相对增高。整体状态下， $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比例平衡是维持细胞免疫功能正常的主要指标。两者失去平衡，将抑制细胞免疫功能。当荷瘤鼠受到 5cGy 和 10cGy 的 γ 射线全身照射后，其脾脏和外周血中 $L_3T_4^+$ 及 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 均显著增高，特别是 10cGy 照射与假照组比较差别非常显著。提示低剂量电离辐射能够增强荷瘤机体的免疫功能。有作者认为低剂量电离辐射是通过选择性破坏 T_S (抑制性 T 细胞) 而产生抗肿瘤作用^[5,6]。但既往的实验研究和国内一些作者的研究表明^[1,7]：低剂量辐射未能引起 T_S 功能的选择性下降，也不能直接导致 T_H/T_S 比值变化。因此认为低剂量电离辐射可能是通过限制肿瘤细胞产生免疫抑制作用而使荷瘤鼠 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比值得以部分恢复。肿瘤细胞产生的免疫抑制因子主要有 PGE_2 、 $TGF-\beta_2$ 等^[8]。前者对抗原诱发的 T 淋巴细胞活化反应具有抑制作用；后者能够抑制细胞因子介导的免疫增殖反应。低剂量辐射在其中的可能影响尚有待于今后进一步的实验研究去探讨。

多数学者发现肿瘤中浸润的单个核细胞主要是 T 淋巴细胞，而且证实大多数是细胞毒性 T 细胞 (T_C)^[9]。在表型上 T_C 和 T_S 细胞相似，都表达 Lyt_2^+ 分子。本实验中荷瘤鼠肿瘤组织局部以 Lyt_2^+ 占多数， $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比例倒置。10cGy 照射进一步降低了 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比值，一方面是 Lyt_2^+ 细胞百分数的升高，另一方面是 $L_3T_4^+$ 细胞百分数的相对下降。

低剂量电离辐射对 TIL 的影响可能与对脾脏和外周血的影响具有不同的作用机制。整体上， T_H 和 T_S 相互协调和制约，对免疫应答起调节作用，是调节性 T 细胞。如前所述，低剂量电离辐射可能是通过纠正肿瘤的免疫抑制机制来恢复 T_H 和 T_S 之间的平衡，促进机体的免疫功能。而在肿瘤组织局部， T_C 是杀伤肿瘤的主要效应性 T 细胞。其中，一方面是外部迁入的 T_C ，另一方面可能是 T_C 在局部原位扩增的结果，或者兼而有之。低剂量辐射提高 TIL 中 Lyt_2^+ 细胞所占比例，引起 $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ 比值下降，推测与 T_C 有密切关系。其确切联系有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(4):217
- 2 Phondeley M K, Mehra K D, Mehra N K *et al.* J Neurosurg, 1988, 68:589
- 3 Whiteside T L, Miescher S, Mac Donald H R *et al.* J Immunol Methods, 1986, 90:221
- 4 Gellesf W. Ann Surg, 1992, 215:166
- 5 Anderson R E, Tokuda S, Williams W L *et al.* Am J Path, 1982, 108:24
- 6 Tilkin A F, Schaaf L N, Van Acker A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78:1809
- 7 杜泽吉, 苏燎原. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12(1):59
- 8 Castelli M G, Chiabrande C, Fanelli R *et al.* Cancer Res, 1989, 49:1505
- 9 Hitchcock E R, Monis C S. J Neurosurg, 1988, 68:432

EFFECT OF LOW DOSE IRRADIATION ON SUBSETS OF T-LYMPHOCYTE OF PERIPHERAL BLOOD, SPLEEN AND TUMOR TISSUE

Zou Huawei

(Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Suzhou Medical College, Suzhou 215006)

Su Liaoyuan Tian Hailin

(Department of Medical Radiology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT Purpose: In order to understand the mechanism of the stimulation effects of low dose radiation (LDR), we observed the immune changes of T-lymphocyte subsets. Meteria and methods: Whole body of BALB/C bring-tumor mice were exposed to the doses of 5, 10, 20 and 50cGy γ -rays. The changes of T-lymphocyte subsets in peripheral blood, spleen and tumor-infiltrating lymphocyte (TIL) were studied with flow cytometry (FCM). Results: The ratio of $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ remarkably increased in the peripheral blood and spleen ($p < 0.01$) and the ratio of $L_3T_4^+/Lyt_2^+$ further decread in the TIL group of mice exposed 10cGy ($p < 0.05$). Conclusion: We suggested that the immune functions were promoted by the stimulating effects of LDR of γ -rays in the bodies of the bring-tumor mice. CTL, expressing Lyt_2^+ molecules, were concentrated in the tumor tissues and they carried out the killing function to the tumor cells.

KEYWORDS Low dose radiation, Subset of T-lymphocyte, Tumor immunity