

低剂量辐射增强荷瘤小鼠巨噬细胞功能的实验研究

张英 孙义敏 李修义 牟颖 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 采用 C57BL/6J 小鼠右肢腓肠肌内接种 Lewis 肺癌细胞做为实验动物模型,在肿瘤接种后 10d,给予荷瘤小鼠 75mGyX 射线全身照射,照射后 18h 处死。检测小鼠腹腔巨噬细胞(M ϕ)的肿瘤细胞静止效应,并采用原位杂交免疫组织化学方法测定腹腔 M ϕ 内肿瘤坏死因子 α (TNF α)和白细胞介素 I β (IL-1 β)的 mRNA 转录水平。结果显示,受照射小鼠的 M ϕ 肿瘤静止效应由假照射组的 $52.9 \pm 8.1\%$ 增至 $79.9 \pm 4.2\%$ ($p < 0.01$), M ϕ 内 TNF α 和 IL-1 β 的 mRNA 转录水平亦有明显提高。照射组的 M ϕ 内转录活性增高的阳性颗粒增多,染色加深,平均光密度值(MOD)由 0.204 ± 0.005 , 0.216 ± 0.015 分别增至 0.272 ± 0.012 和 0.285 ± 0.005 , 具有显著的差异 ($p < 0.01$)。提示小剂量辐射可显著增强荷瘤小鼠的 M ϕ 的功能。

关键词 低剂量辐射,巨噬细胞,细胞静止效应,肿瘤坏死因子 α ,白细胞介素 I β , mRNA 转录

随着对低剂量辐射免疫增强效应研究的不断深入,探讨低剂量辐射兴奋效应(radiation hormesis)的生物学意义日益引起有关方面的重视。目前已获得了一些动物实验和初步的临床观察资料。证实低剂量辐射对小鼠移植肿瘤的发生率、生长速度及其播散有抑制作用^[1,2],改善了接受放疗、化疗的非何杰金氏病患者的预后^[3],其机制可能与低剂量辐射刺激机体的抗肿瘤免疫反应有关。众所周知,M ϕ 在机体免疫反应网络中具有重要作用,本文观察了低剂量辐射对荷瘤机体腹腔 M ϕ 功能的影响。

1 材料与 方法

1.1 动物

C57BL/6J 纯系小鼠,6~8 周龄,体重 20 ± 2 g,雌雄各半,购自白求恩医科大学实验动物部,隔离检疫一周后随机分为照射组和假照射组。

1.2 瘤株

Lewis 肺癌细胞株由日本北里大学惠赠,经 C57BL/6J 小鼠皮下传代。

1.3 照射条件

按文献[4]的方法。剂量率为 $12.5\text{mGy}/\text{min}$,总剂量为 75 mGy。

1.4 肿瘤动物模型的制备

按文献[4]的常规方法。

1.5 腹腔 MΦ 肿瘤细胞静止效应的测定

参见文献[5],将小鼠腹腔 MΦ $1.2\times 10^6/\text{ml}$ 和 Lewis 肺癌细胞 $2\times 10^5/\text{ml}$ 各 $100\mu\text{l}$ 加入 96 孔培养板各孔(效/靶比为 6:1),置 37°C 、 5% CO_2 孵育 48h,在终止培养前 4h,加入 $^3\text{H}-\text{TdR}$ $18.5\text{kBq}/\text{孔}/30\mu\text{l}$,多头细胞收集器收集各孔细胞,液闪计数器测定 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 掺入量,结果以 cpm 表示,肿瘤细胞静止效应按下面公式计算:

$$\text{肿瘤细胞静止效应} = \frac{\text{单纯肿瘤细胞组 cpm 值} - \text{实验组 cpm 值}}{\text{单纯肿瘤细胞组 cpm 值}} \times 100\%$$

1.6 腹腔 MΦ 内 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IL}-1\beta$ 的 mRNA 转录水平的测定

1.6.1 探针标记 用于制备探针的 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{IL}-1\beta$ 的 cDNA 由加拿大 Koropatnick 教授惠赠,用购自德国 Bioehringer Mannheim 公司的 Dig-DNA 标记 Kit 标记,按说明书操作。

1.6.2 标本制备 肿瘤移植后 10d,每只小鼠给予腹腔注射 0.1ml 0.1% 糖原,24h 后给予 75mGy X 射线全身照射。于照射后 18h 将小鼠颈椎脱臼处死,注入 5ml $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS 冲洗腹腔,将含有大量 MΦ 的渗出液吸出至内置两片涂过多聚赖氨酸载玻片的培养皿中。在 37°C 、 5% CO_2 条件下培养 2h 后,用 37°C $0.01\text{mol}/\text{L}$ PBS 洗去未贴壁细胞,再将贴满 MΦ 的载玻片用 4% 多聚甲醛 $0.1\text{mol}/\text{L}$ PBS 固定 15min。

1.6.3 杂交、显色和结果分析 将固定过的载玻片用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 3 次,每次 5min,再用 4% Triton X-100 $0.1\text{mol}/\text{L}$ PBS 处理 15min,然后用 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K,在 37°C 条件下消化 15min, 4% 多聚甲醛 $0.1\text{mol}/\text{L}$ PBS 固定 10min 后,用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 3 次,每次 5min,再用 0.25% 乙酸酐(用 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 三乙醇胺配制)处理 10min,然后用 $2\times\text{SSC}$ 漂洗 2 次,每次 10min,用灭菌滤纸吸干载玻片后,滴加杂交液(50% 去离子甲酰胺, $5\times\text{SSC}$, 10% 硫酸葡聚糖, $5\times$ Denhart's 液, 10% SDS, 1% 变性鲑鱼精子 DNA),每片滴加 $30\mu\text{l}$,探针 DNA 浓度为 $2\text{ng}/\mu\text{l}$,覆盖蜡膜,在 43°C 温箱内静置 12h 后, $4\sim 0.5\times\text{SSC}$ 梯度处理,每次 10min,再用 $0.05\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 3 次,每次 5min,然后滴加碱性磷酸酶标记的地高辛抗体 1:1000 稀释(稀释液: 0.1% BSA, 4% Triton X-100, $0.05\text{mol}/\text{L}$ PBS),每个载玻片滴加 $40\mu\text{l}$,在室温下放置 4h,然后用 $0.05\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 3 次,每次 5min,再用 TSM_1 ,处理 2 次,每次 5min,然后用 TSM_2 处理 2 次,每次 5min,每片滴加 NBT 和 BCIP 显色液 $30\mu\text{l}$ 后,在室温下避光放置 12h,然后用 $0.05\text{mol}/\text{L}$ PBS 漂洗 10min,室温干燥,甘油明胶封片,镜检。定量分析用 CMIA-007 全新型多功能真彩色病理图像分析系统,每片取左、右、中、上、下共 5 个视野,测定 MΦ 内转录活性增高的阳性颗粒的数量和染色强度,结果以平均光密度值(MOD)表示。

1.7 统计学处理

所有实验结果采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 低剂量辐射对荷瘤小鼠腹腔 MΦ 肿瘤细胞静止效应的影响

表 1 数据表明, 75mGy X 射线全身照射可明显增强荷瘤小鼠腹腔 MΦ 的肿瘤细胞静止效应,同

假照射组相比,照射组小鼠腹腔 $M\phi$ 对 Lewis 肺癌细胞增殖的抑制作用明显增强($p<0.01$)。

2.2 低剂量辐射对荷瘤小鼠腹腔 $M\phi$ 内 $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的 mRNA 转录水平的影响

应用原位杂交免疫组织化学技术检测了腹腔 $M\phi$ 内 $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ mRNA 转录水平的变化,光镜下见阳性细胞表现为蓝紫色颗粒,线状或斑片状分布于胞浆内,以靠近胞膜下最为明显(见图 1、2)。阳性颗粒的平均光密度值(MOD)见表 1。可见荷瘤机体接受 $75mGy$ X 射线全身照射后, $M\phi$ 内阳性颗粒的 MOD 较假照射组明显提高。提示低剂量辐射可促进 $M\phi$ 内 $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的转录。

Tab.1 Effect of low dose radiation on the peritoneal $M\phi$ function of tumor-bearing mice

$M\phi$ function	Sham-irradiated group	Irradiated group
Cytostasis/%	52.9±8.1	79.9±4.2 ⁽¹⁾
$TNF\alpha$ mRNA transcription level (MOD)	0.204±0.005	0.272±0.021 ⁽¹⁾
$IL-1\beta$ mRNA transcription level (MOD)	0.216±0.015	0.285±0.005 ⁽¹⁾

$\bar{x}\pm s$ ⁽¹⁾ $p<0.01$ vs sham-irradiated group, n=6



Fig.1 The $TNF\alpha$ mRNA transcription in the peritoneal $M\phi$ of tumor-bearing mice (10×40)
Cytoplasm of $M\phi$ was full of the positive granules of $TNF\alpha$ mRNA, which were stained in blue-purple color and was more obvious in the area under the membrane



Fig.2 The $TNF\alpha$ mRNA transcription in the peritoneal $M\phi$ of tumor-bearing mice treated with low dose radiation (10× 40)
Cytoplasm of $M\phi$ was full of the positive granules of $TNF\alpha$ mRNA, which were stained in blue-purple color and was more obvious in the area under the membrane

3 讨论

既往的工作表明^[6],低剂量辐射可刺激机体的免疫功能,其中 T 淋巴细胞的激活为其中心环节。在免疫系统中, $M\phi$ 的作用至关重要。在机体抗肿瘤免疫反应中, $M\phi$ 不仅是直接吞噬、溶解肿瘤细胞的效应细胞,而且在肿瘤免疫的细胞和体液两方面发挥重要的调节作用。结果表明,给予荷瘤小鼠 $75mGy$ X 射线全身照射,其腹腔 $M\phi$ 的抑瘤活性明显增强,表现为 $M\phi$ 对肿瘤细胞增殖的静止效应提高, $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 的 mRNA 转录水平显著提高。提示低剂量辐射可促进荷瘤机体的 $M\phi$ 对肿瘤的直接抑制作用,另一方面也表明低剂量辐射可能增加 $M\phi$ 的 $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 两种细胞因子的合成,发挥其细胞溶解和免疫调节的双重作用。

肿瘤的发生发展与机体抗肿瘤免疫功能状态密切相关,事实上,已观察到低剂量全身照射后,在小鼠 $M\phi$ 功能提高的同时, NK、LAK、特异性 CTL 杀伤活性明显增强,脾脏、胸腺 DNA 合成增加

等一系列免疫增强效应,同时肿瘤的生长速率降低,肺转移瘤结节数亦有减少趋势^[7]。以上结果提示低剂量辐射的免疫增强效应是机体抑瘤作用增强的重要基础,在此过程中, $M\phi$ 的功能激活具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Anderson R E, Tokuda S, Williams W L *et al*. Am J Path. 1982, 108:24
- 2 Li Xiuyi, Li Youjun, Fu Haiqing *et al*. Proc ISBELLS, Changchun, China, 1993, 103
- 3 Takai Y, Yamada S, Nemoto K *et al*. Proc ICLB, Kyoto, Japan, July 12~16, 1992, 113
- 4 张英,李修义,刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17:112
- 5 张宗梁,姚鑫. 实验肿瘤学基础,王薏文主编. 北京:人民卫生出版社, 1992, 259
- 6 刘树铮,刘伟宏,齐进等. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12:299
- 7 张英,吕吉喆,李修义等. 白求恩医科大学学报, 1997, 23:579

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE ENHANCED MACROPHAGE($M\phi$) FUNCTION IN TUMOR-BEARING MICE TREATED WITH LOW DOSE RADIATION

Zhang Ying Sun Yimin Li Xiuyi Mu Ying Liu Shuzheng

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

ABSTRACT C57BL/6J mice implanted with Lewis lung carcinoma cells in the right thighs were used as an experimental animal model and whole body irradiation(WBI) with ^{75}mGy X-rays was given at the 10th day after tumor implantation. We detected the cytostasis function of peritoneal $M\phi$ of the mice (with the method of $^3\text{H-TdR}$ incorporation assay) and the levels of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ mRNA transcription (with the method of in situ hybridization immunohistochemistry) 18 hours after irradiation. The experiment showed that the cytostasis function of peritoneal $M\phi$ of irradiated mice was significantly increased compared with that of the sham-irradiated mice (irradiated mice: $79.9 \pm 4.2\%$, sham-irradiated mice: $52.9 \pm 8.1\%$, $p < 0.01$). The levels of $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ mRNA transcription were quantitatively measured with a scanning densitometry and the data showed that both the $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ mRNA transcriptional levels of peritoneal $M\phi$ of irradiated mice were much higher than those of sham-irradiated mice ($p < 0.01$). The results mentioned above suggested that low dose radiation could markedly enhance the $M\phi$ function in tumor-bearing mice and the enhanced $M\phi$ function played an important role in the process of immunoenhancement and antitumor immune reaction induced by low dose radiation.

KEYWORDS Low dose radiation, Macrophage, Cytostasis, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, mRNA transcription