

美洲商陆丝裂原(PWM)诱导淋巴细胞 和脂多糖(LPS)诱导淋巴细胞的 辐射敏感性*

苏燎原 耿勇志 刘芬菊 李建华** 刘犁

(苏州医学院)

摘要 应用人血在体外培养, 分别用 PWM 和 LPS 诱导淋巴细胞, 接受各种剂量 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射, 两种细胞按各种组合混合再培养, 并设有各种单项培养作对照, 以 ^3H -TdR 掺入反映淋巴细胞的增殖转化。实验结果说明 PWM 细胞能够激活 LPS 细胞转化, 当一种细胞受照后单独培养或与另一种正常细胞混合培养, 其放射性掺入即下降, 并随剂量增加而愈益明显、下降趋势均呈现负相关, 并分别得到直线回归方程, 差异显著性比较说明 PWM 细胞受照影响更严重。当 PWM 细胞接受 1 Gy 以上剂量后与正常 LPS 细胞混合培养即失去激活作用, LPS 细胞受照 1—2 Gy 仍然可被激活, 以上提示电离辐射导致机体免疫缺陷, 其中 PWM 诱导的 T 辅助细胞受损是较重要的。

关键词: PWM 诱导淋巴细胞; LPS 诱导淋巴细胞; ^3H -TdR 掺入; 辐射敏感性。

前言

淋巴细胞是机体免疫中最重要的细胞, 它可以分为许多亚群, 各亚群淋巴细胞的功能不同, 其辐射敏感性亦有差异。作者过去的报告认为人血 T 淋巴细胞比 B 淋巴细胞敏感^(1,2), 本文进一步探索 LPS 诱导的淋巴细胞亚群和 PWM 诱导的淋巴细胞亚群接受照射后的变化规律及其相互关系, 以反映辐射影响下免疫细胞的内在联系。

材料和方法

健康献血员的静脉血, 肝素抗凝, 分别培养于含 PWM (Pokeweed mitogen) (Sigma, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或 LPS (Difco、大肠杆菌提取物, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 Eagle 培养液中, 每瓶 3 ml 培养液加全血 0.4 ml, 37℃ 孵育, 96 小时后吸弃上清液, 用淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 然后用生理盐水和无丝裂原培养液各洗涤一次, 稀释至一定浓度, 作细胞计数及分类, 计算单个核细胞数。以上所培养的细胞即为 PWM 诱导淋巴细胞(简称 PWM 细胞)或 LPS 诱导淋巴细胞(简称 LPS 细胞)。

然后将两种细胞各分为若干等分, 分别接受不同剂量的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射。两种细胞按各种组合混合再培养, 并设有各种单项培养作对照, 每瓶 2 ml 无丝裂原的含 10% 人 AB 型血清的培养液, 加入每种细胞 $1\sim 2\times 10^5$, 同一个体的实验所加的两种细胞数相等, 培养 48 小时后, 每瓶注入 ^3H -

* 中国科学院科学基金会资助课题

** 同济医科大学进修生

TdR $2 \mu\text{Ci}/20 \mu\text{l}$ (比放射性 $24 \text{ Ci}/\text{mM}$), 掺入 24 小时, 培养结束时, 每瓶加 6 ml 蒸馏水, 在带有抽滤装置的 49 型玻璃纤维滤膜上过滤, 再按序以生理盐水、5% 三氯醋酸洗涤, 无水乙醇漂白滤膜。烘干后放入 5 ml 二甲苯闪烁液 (PPO 0.4%, POPOP 0.04%), 用 Beckman 液体闪烁计数器测量, 以每分钟计数 (CPM) 表示, 每份设二个平行样品, 取平均值。

结 果

PWM 细胞与 LPS 细胞接受三种剂量 ^{60}Co 照射后混合与单独培养时 ^3H -TdR 掺入的结果见表 1。

表 1 照射后 PWM 细胞与 LPS 细胞匹配实验的 ^3H -TdR 掺入结果

Table 1 ^3H -TdR incorporation in synergistic experiment of PWM-induced and LPS-induced lymphocytes after ^{60}Co γ -rays irradiation

		LPS				
		正 常	10 Gy	20 Gy	40 Gy	—
PWM	正 常	10285 $\pm$ 1913	6312 $\pm$ 775	5749 $\pm$ 757	3936 $\pm$ 1008	3932 $\pm$ 1040
	10 Gy	2119 $\pm$ 352	1340 $\pm$ 134			1438 $\pm$ 420
	20 Gy	1514 $\pm$ 191		1066 $\pm$ 143		1421 $\pm$ 491
	40 Gy	1136 $\pm$ 252			918 $\pm$ 163	933 $\pm$ 320
	—	930 $\pm$ 209	642 $\pm$ 121	565 $\pm$ 82	538 $\pm$ 65	

注: 四次实验的平均 CPM $\pm$ 标准误

Note. Values are the C. P. M. means $\pm$ S. E. of 4 experiments

表 2 ^{60}Co γ 线对 PWM 细胞和 LPS 细胞 ^3H -TdR 掺入的效应

Table 2 The effect of ^{60}Co γ -rays on ^3H -TdR incorporation in PWM-induced and LPS-induced lymphocytes

		LPS							
		正 常	1 Gy	2 Gy	4 Gy	10 Gy	20 Gy	40 Gy	—
PWM	正 常	14110 $\pm$ 234	9345 $\pm$ 308	8578 $\pm$ 66	7334 $\pm$ 1251	6452 $\pm$ 1122	5202 $\pm$ 1107	2465 $\pm$ 330	3017 $\pm$ 399
	1 Gy	10254 $\pm$ 1806	5364 $\pm$ 1223						2159 $\pm$ 315
	2 Gy	5318 $\pm$ 1021		3282 $\pm$ 1130					1100 $\pm$ 114
	4 Gy	2545 $\pm$ 472			2556 $\pm$ 51				1133 $\pm$ 178
	10 Gy	1711 $\pm$ 458				1202 $\pm$ 86			
	20 Gy	1389 $\pm$ 262					1224 $\pm$ 171		
	40 Gy	1316 $\pm$ 30						1034 $\pm$ 109	
	—	860 $\pm$ 171	736 $\pm$ 252	556 $\pm$ 158	516 $\pm$ 11				

注: 二次实验的平均 CPM $\pm$ 标准误

Note. Values are the C. P. M. means $\pm$ S. E. of 2 experiments

表中可见正常 PWM 细胞和 LPS 细胞混合培养与两者单独培养的 CPM 之和比较增多一倍以上($P < 0.05$), 反映两种细胞有协同作用。

当一种细胞受照时混合培养的掺入即显著下降($P < 0.01$), 并随剂量增加而愈益明显, 经统计处理, 两种细胞被掺入的下降趋势均呈负相关, 相关系数分别为 $\gamma_P = -0.998$ 、 $\gamma_L = -0.969$ 、并得到以照射剂量的对数为自变量、 $^3\text{H-TdR}$ 放射性掺入 CPM 为倚变量的直线回归方程、分别为 $\hat{Y}_P = 10231 - 2612 \lg X$ 、 $\hat{Y}_L = 10416 - 1553 \lg X$ 。比较两个方程的回归系数, 有显著性差异($p < 0.05$), 说明 PWM 细胞受照影响更严重。

两种细胞中一种受照的混合培养的 CPM 与该两种细胞单独培养之和比较差异不显著, 说明已失去协同作用。

细胞单独培养时, 随照射剂量增加掺入愈益下降, 经统计处理, 两种细胞的下降趋势均呈负相关, 相关系数分别为 $\gamma_P = -0.994$ 、 $\gamma_L = -0.997$, 并得到以照射剂量的对数为自变量、 $^3\text{H-TdR}$ 放射性掺入 CPM 为倚变量的直线回归方程, 分别为 $\hat{Y}_P = 3934 - 809 \lg X$ 、 $\hat{Y}_L = 934 - 107 \lg x$ 。比较两个方程的回归系数, 有显著性差异($p < 0.0001$), 说明 PWM 细胞受照射影响更严重。

受同等剂量照射的两种细胞混合培养时, 亦随照射剂量的增加, 掺入的 CPM 愈益下降, 两者呈负相关($r = -0.994$), 它与 PWM 细胞单独受照的混合培养掺入降低的幅度近似($p > 0.05$), 但却显著低于 LPS 细胞单独受照的混合培养($p < 0.05$), 也反映了 PWM 细胞在协同中起了主要作用。

两种细胞分别受六种剂量照射后混合与单独培养时 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的结果见表 2。

表中同样反映了两种正常细胞的协同作用($p < 0.01$)。

当一种细胞受照射时, 混合培养的掺入即下降, 并随照射剂量增加而愈益明显, 经统计处理, 在六种剂量照射时掺入下降的趋势呈负相关(PWM 细胞受照的混合培养 $r = -0.940$, LPS 细胞受照的混合培养 $r = -0.973$), 并分别得到以照射剂量的对数为自变量, $^3\text{H-TdR}$ 放射性掺入 CPM 为倚变量的直线回归方程(PWM 细胞受照的 $\hat{Y}_P = 14782 - 3976 \lg X$, LPS 细胞受照的 $\hat{Y}_L = 14768 - 2968 \lg X$)。

受同等剂量照射的两种细胞混合培养的放射性掺入亦与照射剂量的对数呈负相关($r = -0.978$), 其掺入降低的幅度与 PWM 细胞单独受照的混合培养近似($p > 0.05$), 但与 LPS 细胞单独受照的混合培养比较却显著降低($p < 0.05$), 说明了 PWM 细胞在协同作用中是主要的。

PWM 细胞接受 1 Gy 以上的照射与正常 LPS 细胞混合培养即失去协同作用。LPS 细胞受照 1~2 Gy 与正常 PWM 细胞混合培养比该两种细胞单独培养的 CPM 之和显著增高($p < 0.05$)。

讨 论

我们过去成功地建立了人血 B 淋巴细胞转化的方法⁽³⁾, 在此基础上研究 B 淋巴细胞受照射后代谢功能的变化及其与 T 辅助细胞的关系, 并进一步了解哪一亚群淋巴细胞更敏感。

近年来, 国内外有关 B 淋巴细胞的工作曾经报道: B 淋巴细胞在抗原作用下能产生免疫球蛋白, 其中还需要 T 细胞的协助和 T 细胞因子^(4,5), PWM 能够诱导 T 辅助细胞和 B 淋巴细胞⁽⁶⁾, 甚至进一步认为用 PWM 诱导 B 淋巴细胞产生免疫球蛋白的反应中, $T_H I_1$ 及 $T_H I_2$ 两个群体都能单独协助 B 淋巴细胞⁽⁷⁾。

因此, 本实验分别用含 PWM 和 LPS 的培养液培养淋巴细胞, 根据作者的实验结果, 培养四

天是诱导细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的高峰, 此时洗弃培养液中的丝裂原, 然后接受 ^{60}Co 线照射, 再按各种组合混合培养, 并以各类单独培养作对照, 以 $^3\text{H-TdR}$ 掺入作为增殖转化的指标, 研究两类细胞受照后的变化规律。

本文首先肯定了 PWM 细胞与 LPS 细胞的协同作用, 也就是 LPS 诱导的 B 淋巴细胞转化受到 PWM 诱导的细胞的激活, 反映了 PWM 细胞具有 T 辅助细胞的功能。

单项细胞培养时, 随照射剂量增加掺入愈益下降, 均呈负相关, 表现一定规律性, 并分别得到直线回归方程, 比较两回归系数说明 PWM 细胞比 LPS 细胞受照射影响更严重。

在混合培养中, 只要其中有一种受照即影响掺入, 也表现了剂量与效应的相关性, 回归系数的比较也说明了 PWM 细胞比 LPS 细胞对辐射更敏感。受同等剂量照射的两种细胞混合培养与 PWM 细胞单独受照的混合培养掺入降低的幅度近似, 但却显著低于 LPS 细胞单独受照的混合培养, 都反映了在两种细胞的协同作用中 PWM 细胞占有更重要的地位。

Chrest⁽⁶⁾报道在某些缺乏免疫反应性疾病中, PWM 细胞是疾病的关键, 免疫反应低的患者 PWM 细胞不能激活正常人的 LPS 细胞。相反, 正常人的 PWM 细胞, 却能很好地激活低反应患者的 LPS 细胞, 导致免疫球蛋白分泌。

本文 PWM 细胞接受 1 Gy 以上照射即失去激活 B 淋巴细胞的作用, 但 LPS 诱导的 B 淋巴细胞受照 2 Gy 还能被正常 PWM 细胞所激活, 以上结果提示电离辐射导致机体免疫缺陷, 其中 PWM 诱导的 T 辅助细胞受损是较重要的。这与过去我们的实验结果是一致的, 即 T 淋巴细胞比 B 淋巴细胞对辐射更敏感。

苏州医学院放射医学系 ^{60}Co 辐射室协助照射, 致谢!

参 考 文 献

- [1] 刘克良、苏燎原、薛智谋、陶明山、马祥瑞、王明锁、王洪云 辐射研究与辐射工艺学报 2(1), 56 (1984)。
- [2] 刘克良、苏燎原、薛智谋、陶明山、耿勇志 生物化学与生物物理进展 (5), 43(1984)。
- [3] 苏燎原、薛智谋、陈光伟、孙正德、徐琴秋 中华微生物学和免疫学杂志 2(6), 346(1982)。
- [4] N. Kondo, T. Orii and H. Uetake, Clin. Immunol. Immunopath. 26, 192(1983)。
- [5] F. J. Chrest, J. E. Nagel, R. S. Pyle and W. H. Adler, Clin exp. Immunol. 53, 465 (1983)。
- [6] E. dr Veries, J. P. Van der Weij, C. J. P. van der and A. Cats, Virchows Arch (Cell Pathol) 43, 17(1983)。
- [7] 洪锦心, 肿瘤, 4(1), 31(1984)。

(收到日期 1986 年 1 月 22 日)

RADIOSENSITIVITY OF PWM-INDUCED LYMPHOCYTE AND LPS-INDUCED LYMPHOCYTE

Su Liaoyuan Geng Yongzhi Liu Fenju Li Jianhua Liu Li

(Department of Medical Radiobiology, Suzhou Medical College)

ABSTRACT Human whole blood were incubated in vitro. Lymphocytes were induced by mitogen PWM and LPS respectively. After exposure to $^{60}\text{Co}\gamma$ -rays at various doses, the cells were incubated together in different combination. Lymphocyte induced by one kind of mitogen was incubated as control. The rate of lymphocyte proliferation and transformation was determined by ^3H -TdR incorporation. This study demonstrated that PWM-induced lymphocyte was able to enhance the stimulating effect of LPS on B lymphocyte. Lymphocytes induced by one kind of mitogen were exposed to 1-40 Gy r-rays, and the cells were incubated alone or with the lymphocyte induced by another mitogen, thus, the ^3H -TdR incorporation became much lower than that in control. The result showed that the decrease in incorporation of ^3H -TdR was dose dependent and it had a negative correlation. The relationship between the logarithm of radiation dosage and the radioactivity counts for ^3H -TdR incorporation was expressed by the linear regression equations. By T-test, it was shown that PWM-induced lymphocyte was damaged more markedly than LPS-induced lymphocyte by irradiation. The stimulating effect of the PWM-induced lymphocyte disappeared after 1 Gy irradiation, but the LPS-induced lymphocyte after 1-2 Gy irradiation was still stimulated by the PWM lymphocyte. It demonstrated ionizing radiation caused defect of immunity in organism, the damage of the PWM-induced T helper lymphocyte was more important in maintaining the function of immunity.

KEYWORDS PWM-induced lymphocyte; LPS-induced lymphocyte; ^3H -TdR incorporation; Radiosensitivity.