

γ 线照后 PHA、ConA 和 PWM 激活的人血淋巴细胞转化、DNA 单链断裂及其修复比较

耿勇志 苏燎原 刘克良

(苏州医学院, 苏州)

摘要 本文采用 ^3H -TdR 参入法和羟基磷灰石层析法, 比较了 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后 PHA、ConA、PWM 激活的人血淋巴细胞的转化、DNA 单链断裂及其修复, 结果表明: 受照后淋巴细胞转化受抑, 在 0—8 Gy 剂量范围内, 剂量效应呈双相线性关系, 其中 PWM 激活的细胞对射线的敏感性最低。三种细胞受照后 DNA 发生单链断裂, 在 0—30 Gy 范围内, 与剂量呈线性相关, 三者之间无显著差异。受 15 Gy 照射后, 细胞在 37°C 条件下能重接 DNA 断链, 但重接不完全, 重接后如经较长时间保温仍会发生再断裂, PWM 激活的细胞重接修复率最高。淋巴细胞转化对辐射的敏感性可能与 DNA 断链的重接修复能力有关。

关键词 淋巴细胞, DNA 单链断裂, DNA 重接修复, 辐射敏感性, PHA, ConA, PWM

淋巴细胞是机体中辐射敏感性最高的细胞成份之一, 其中不同群体对辐射的敏感性不同, 目前多数学者认为 B 淋巴细胞的辐射敏感性高于 T 淋巴细胞^[1,2], 但也有持相反意见者^[3]。T、B 淋巴细胞中还有辐射敏感性不同的亚群^[4]。但关于 T、B 淋巴细胞及其亚群辐射敏感性差异的机制, 有待于进一步研究。有作者观察了受照后小鼠胸腺细胞的存活^[5]、脾脏淋巴细胞的转化^[6]与 DNA 单链断裂及其修复之间的关系。本文比较研究了 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射后三种不同丝裂原刺激的人血淋巴细胞转化的差异及其与 DNA 单链断裂和修复之间的关系。

材 料 与 方 法

1. 淋巴细胞转化的测定

取正常献血人员外周静脉血, 肝素抗凝, 常温下接受 0.5、1、2、4、8 Gy 的 $^{60}\text{Co}\gamma$ 线照射, 剂量率 1 Gy/min, 分别在含植物血凝素(PHA, 广州医药工业研究所, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、刀豆球蛋白 A (ConA, Sigma, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 或美洲商陆丝裂原(PWM, Sigma, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 Eagle 培养液(日本, 含 10% 人 AB 型血清)中培养。每瓶 2 ml 培养液, 加全血 0.1 ml (含 PHA 的瓶中) 或 0.2 ml (含 ConA 或 PWM 的瓶中)。细胞在 37°C 下培养 72 h, 终止培养前 24 h 加入氚胸腺嘧啶核苷(^3H -TdR, 放射性比度为 $153.55 \times 10^3 \text{Bq}/\text{mol}/\text{L}$, 北京原子能所) $2.22 \times 10^4 \text{Bq}/\text{瓶}$ (含 PHA 的瓶中) 或 $3.7 \times 10^4 \text{Bq}/\text{瓶}$ (含 ConA 或 PWM 的瓶中)。培养结束后, 滤膜法^[7]制样, 用 LS 6800 型液体闪烁计数器(Beckman)测量放射性。

2. 淋巴细胞 DNA 单链断裂及其重接修复的测定

(1) 细胞培养、照射及保温 全血来源同前。分离获得单个核细胞悬液, 分别培养于上述含 PHA、ConA 或 PWM 的培养液中。每瓶 2 ml 培养液, 加入 1×10^6 单个核细胞, 37°C 下培养

72 h, 加入 ^3H -TdR $3.7 \times 10^4 \text{ Bq/瓶}$ (PHA) 或 $5.5 \times 10^4 \text{ Bq/瓶}$ (ConA 或 PWM), 再培养 24 h。离心收集细胞, 洗涤后分装成每瓶 0.2 ml 细胞悬液, 冰浴下接受 ^{60}Co γ 线照射。剂量为 1、4、8、15、30 Gy, 剂量率 2 Gy/min。然后检测其 DNA 单链断裂; 或冰浴下照射 15 Gy, 然后 37°C 水浴, 保温 10, 30, 120, 480 min, 再放入冰浴中, 检测 DNA 单链断裂的重接修复。

(2) DNA 单、双链分离 主要参照 Rydberg 的羟基磷灰石层析法^[8]。照射(及保温)过的样品, 每瓶加 1 ml 碱性溶胞液(0.03 mol/L NaOH, 0.01 mol/L Na_2HPO_4 , 0.9 mol/L NaCl, pH 12), 置暗处 30 min, 快速加入 1 ml 0.034 mol/L HCl(含酚红指示剂)中和。冰浴中用 CPS-1 型超声波发生器超声波处理 30 S。加入 1.5 ml 0.5% 十二烷基磺酸钠(SDS), 混匀后加到羟基磷灰石层析柱(每柱 0.25 g 羟基磷灰石)上。在 60°C 条件下进行层析, 先用 $2 \times 2.5 \text{ ml}$ 0.01 mol/L 磷酸钾缓冲液(KPB, pH 6.9)洗涤, 然后用 $2 \times 3 \text{ ml}$ 0.125 mol/L KPB 洗脱单链 DNA, 再用 $2 \times 3 \text{ ml}$ 0.25 mol/L KPB 洗脱双链 DNA, 分别收集。取一定量转移到玻璃纤维滤膜上, 烘干, 进行液体闪烁测量。将测得的每分钟放射性计数(CPM)换算成 DNA 单或双链部分的 CPM, 数据以双链 CPM 占 DNA 总 CPM 的百分比(F)表示(F 值下降表明 DNA 单链断裂增加)。

$$F = \frac{\text{DNA 双链 CPM}}{\text{DNA 双链 CPM} + \text{单链 CPM}} \times 100\%$$

DNA 单链断裂的重接修复率用 R 表示

$$R = \frac{\text{照后保温细胞 } F - \text{照后未保温细胞 } F}{\text{正常对照细胞 } F - \text{照后未保温细胞 } F} \times 100\%$$

实验结果

1. γ 射线对三种丝裂原激活的淋巴细胞转化的影响

1~8 Gy 剂量的 γ 线照射后, PHA、ConA、PWM 激活的淋巴细胞(分别简称为 PHA 细胞、

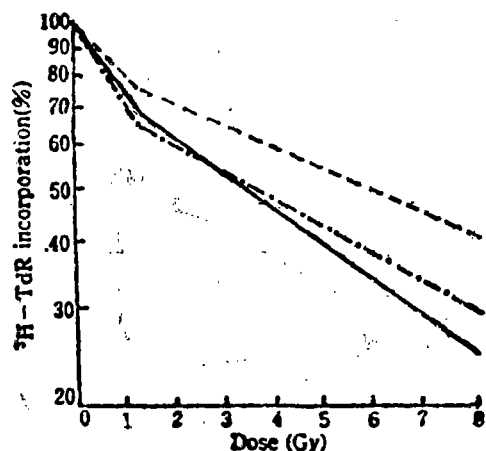


Fig 1. Effect of γ -rays on lymphocyte transformation

— PHA Cell
 - - - ConA Cell
 PWM Cell

ConA 细胞和 PWM 细胞) 在转化过程中 ^3H -TdR 的参入量都明显下降, 说明淋巴细胞的转化增殖受到抑制。三种细胞的剂量效应回归曲线都呈双相性, 见图 1, 曲线的参数见表 1 (10 例正常人血)。比较三种细胞曲线的斜率, 无论在 0—1 Gy 或 1—8 Gy 剂量范围内, 任意两种细胞之间差异均非常显著 ($P < 0.01$), 说明三种细胞对 γ 线的敏感程度, 在 0—1 Gy 范围内, ConA 细胞 $>$ PHA 细胞 $>$ PWM 细胞; 在 1—8 Gy 范围内, PHA 细胞 $>$ ConA 细胞 $>$ PWM 细胞。

2. 羟基磷灰石层析法分离 DNA 单、双链的效果

本实验曾用天然 DNA (即双链 DNA) 和热变性 DNA (即单链 DNA, 按 Bernardi 方法^[9]制备) 分别进行羟基磷灰石层析, 然后用 751-G 型分光光度计(波长 260 nm)测定 0.125 mol/L KPB

和 0.25 mol/L KPB 洗脱液中的 DNA 含量。结果天然 DNA 0.25 mol/L KPB 洗脱液中的双链

Tab 1. Parameters of dose-effect curves of lymphocyte transformation

0—1 Gy				1—8 Gy		
	Correlation coefficient	Regression equation	D_0 (Gy)		Regression equation	D_0 (Gy)
PHA Cell	-0.9978	$\lg \hat{Y} = 2.0027 - 0.1395 X$	3.11	-0.9954	$\lg \hat{Y} = 1.9020 - 0.06360 X$	6.83
ConA Cell	-0.9975	$\lg \hat{Y} = 1.9968 - 0.1588 X$	2.73	-0.9912	$\lg \hat{Y} = 1.8744 - 0.05048 X$	8.60
PWM Cell	-0.9997	$\lg \hat{Y} = 2.0008 - 0.1071 X$	4.05	-0.9959	$\lg \hat{Y} = 1.9236 - 0.04016 X$	10.81

DNA 量占其 DNA 总量的 $92.1 \pm 3.0\%$ ($\bar{x} \pm SD$), 热变性 DNA 的相应数值为 $7.8 \pm 7.0\%$ 。将三种丝裂原刺激后参入 ^3H -TdR 的正常人淋巴细胞按本文实验方法 2 进行 DNA 单、双链的测定, 结果双链 DNA 占总 DNA 的比例分别为 $83.5 \pm 5.1\%$ (PHA 细胞)、 $82.2 \pm 5.8\%$ (ConA 细胞)、 $81.3 \pm 5.2\%$ (PWM 细胞)、与其他文献报道的正常细胞的结果相近^[8]。可见本法分离 DNA 单、双链的效果良好。

3. γ 射线引起的淋巴细胞 DNA 单链断裂

1—30 Gy γ 线照射后, 三种淋巴细胞的 DNA 双链比例(F)都明显减少, 说明细胞内 DNA 发生了单链断裂。F 的对数与剂量之间存在线性关系(见图 2, 11 例), 相关系数分别为 -0.9495 (PHA 细胞)、-0.9602 (ConA 细胞)、-0.9493 (PWM 细胞)。对任意两个回归系数进行比较, 差异均不显著($P > 0.05$)。再对三种细胞各相同剂量点的 F 占对照的百分比(数据未列出)进行 T 检验, 差异亦都不显著。说明这三种淋巴细胞之间, 受照后 DNA 单链断裂的程度无显著性差异。

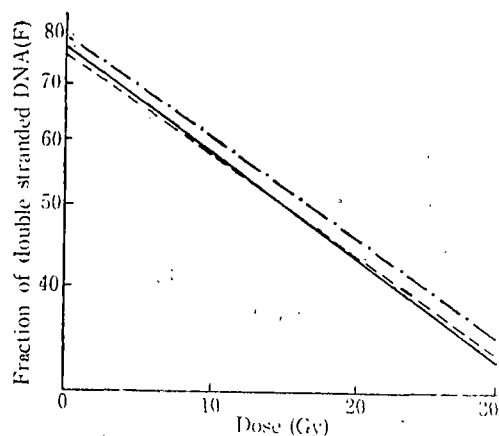


Fig 2. Fraction of double-stranded DNA in lymphocytes exposed to γ -rays
 — $\lg \hat{Y}_{PHA} = 1.8891 - 0.0124 X$
 - - $\lg \hat{Y}_{CONA} = 1.9025 - 0.119 X$
 ··· $\lg \hat{Y}_{PWM} = 1.8852 - 0.0120 X$

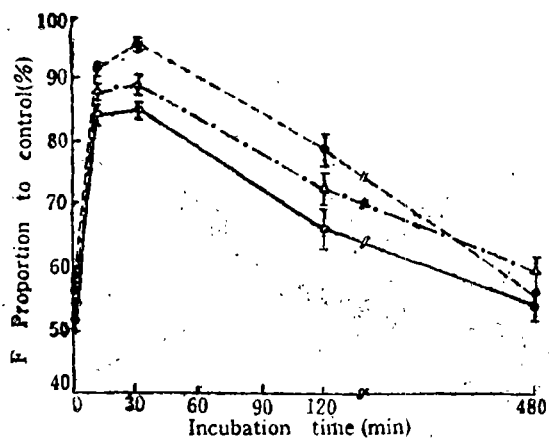


Fig 3. Repair of DNA single strand breaks in lymphocytes exposed to 15 Gy γ -rays
 ○ — PHA Cell
 △ — ConA Cell
 ● — PWM Cell

4. γ 射线照射后淋巴细胞 DNA 单链断裂的重接修复

15 Gy γ 线照射后, 淋巴细胞在 $37^\circ C$ 水浴中分别保温 10, 30, 120, 480 min, 其 DNA 双链比例在 10 min 内迅速上升, 30 min 时达到高峰, 说明单链断裂可被重接, 但此后双链比例又有下降, 其变化见图 3 (9 例)。分别对三种细胞的 F 值(未列出)进行双因素方差分析, 结果不同

处理组及不同个体之间, 差异均非常显著。

将三种细胞受照后同一保温时间的 DNA 断裂重接修复率(用 R 表示, 见实验方法)进行 T 检验, 结果见表 2。由表 2 可见, PWM 细胞在保温 10, 30, 120 min 时的 R 值显著高于保温相同时间的 PHA 细胞, 保温 30 min 时的 R 值显著高于 ConA 细胞。PHA 细胞与 ConA 细胞之间, 各保温组 R 值差异均不显著。

Tab 2. Repair ratio of DNA single strand breaks (R) in the lymphocytes stimulated with three mitogens following exposure to 15 Gy γ -rays.

Incubation time (min)	10	30	123	480
PHA Cell	66.99 $\pm$ 3.35	68.36 $\pm$ 3.08	29.47 $\pm$ 7.03	5.13 $\pm$ 5.11
R ConA Cell	73.19 $\pm$ 2.19	75.82 $\pm$ 3.30	38.16 $\pm$ 5.68	9.94 $\pm$ 5.63
PWM Cell	80.37 $\pm$ 2.68	89.58 $\pm$ 1.37	50.28 $\pm$ 6.24	-2.66 $\pm$ 7.13
PHA C:ConA C	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
P PHA C:PWM C	<0.01	<0.01	<0.05	>0.05
ConA C:PWM C	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05

$\bar{X} \pm SE$ n=9

讨 论

本实验所用三种丝裂原, 其中 PHA 和 ConA 是选择性刺激 T 淋巴细胞转化的^[10], PWM 则对 T、B 淋巴细胞都有激活作用^[11], 有实验证明 PWM 激活的 T 细胞具有辅助功能^[12]。本实验中, 受 γ 射线照射的人外周血淋巴细胞在这三种丝裂原刺激下的转化增殖都明显受抑, 剂量效应曲线都呈双相, 低剂量(≤ 1 Gy)范围内 ConA 细胞对射线最敏感, 高剂量(1—8 Gy)时则 PHA 细胞最敏感, 这说明 T 淋巴细胞中包含辐射敏感性不同的亚群。PWM 细胞在低和高剂量时, 辐射敏感性都低于 PHA 细胞和 ConA 细胞, 这可能反映了 T 辅助细胞辐射抗性较高, 也可能表明 B 细胞不如 T 细胞敏感。

羟基磷灰石层析法是检测细胞 DNA 单链断裂的基本方法之一, 本实验对人血淋巴细胞进行测定, 结果稳定可靠。实验中三种丝裂原激活的淋巴细胞受 γ 射线照射后, DNA 都发生单链断裂, 并且与剂量呈线性关系, 但三者之间差别无显著性。许多文献也报道, 辐射敏感性不同的细胞受照后 DNA 单链断裂的程度相似^[8,13]。这说明辐射所致 DNA 单链断裂的程度不能反映出细胞的辐射敏感性。

本实验淋巴细胞受照后 37℃ 保温一段时间, DNA 双链比例上升, 表明细胞可重接 DNA 单链断裂。重接在 10 min 内进行很快, 30 min 时达到峰值, 但此时双链比例与正常细胞之间仍有一段差距, 说明重接不完全。比较三种细胞的 DNA 断链重接修复率(见表 2), PWM 细胞的修复率最高, 与前面的结果相对照, 可见淋巴细胞转化对辐射的敏感性与 DNA 单链断裂的修复能力之间可能有一定关系, 修复能力越强, 辐射敏感性越低。有作者用小鼠淋巴细胞进行的实验也观察到存在这样一种关系^[5,6]。

实验中受照淋巴细胞保温 2 h, DNA 双链比例开始下降, 到 8 h, 下降到与未保温细胞相近, 表明已修复的 DNA 发生了再断裂。其他学者也观察到这一现象^[6,14], 并认为 DNA 修复后再断裂是不可逆的, 可能与细胞致死有关。本实验中 PWM 细胞照后保温 2 h, DNA 修复后再断

裂程度较低(R 值显著高于 PHA 细胞), 与其辐射敏感性较低是一致的。

目前许多学者认为细胞的辐射敏感性与 DNA 分子的单链断裂之间关系不大^[6,13], 而与单链断裂的重接修复可能有关^[5,6], 本文支持这一观点。近年来不少文献报道 DNA 双链断裂与照射后的细胞死亡有关, 并能反映出细胞的辐射敏感性^[15], 但这些实验都不是用淋巴细胞进行的。由于淋巴细胞与其他增殖细胞不完全相同, 因此有关淋巴细胞这方面的研究值得进一步深入。

参 考 文 献

- [1] R. E. Anderson, G. B. Olson, J. R. Autry, J. L. Howarth, G. M. Troup and P. H. Bartels, *J. Immunol.*, 118, 1191(1977).
- [2] E. J. V. Rensburg, W. K. A. Louw, H. Izatt and J. J. V. D. Watt, *Int. J. Radiat. Biol.*, 47, 673(1985).
- [3] A. Facchini, N. M. Maraldi, S. Bartoli, A. Farulla and F. A. Manzoli, *Radiat. Res.*, 68, 339(1976).
- [4] J. L. Schwartz, J. C. Darr and M. E. Gauden, *Mutat. Res.*, 107, 413(1983).
- [5] I. V. Filippovich, N. I. Sorokina, V. A. Soldatenkov and E. F. Ronantzev, *Int. J. Radiat. Biol.*, 42, 31(1982).
- [6] 殷建林, 苏燎原, 刘克良, 辐射研究与辐射工艺学报, 6(1), 33(1988).
- [7] 苏燎原, 林兴成, 周有宁, 遗传学报, 7(1), 13(1980).
- [8] B. Rydberg, *Radiat. Res.*, 61, 274(1975).
- [9] G. Bernardi, *Nature (London)*, 206, 779(1965).
- [10] J. Andersson, G. Möller and O. Sjöberg, *Cell. Immunol.*, 4, 381(1972).
- [11] H. C. Stevenson, P. J. Miller, M. J. Waxdal, B. E. Haynes, C. A. Thomas and A. S. Fauci, *Immunology*, 49, 633(1983).
- [12] T. Hirano, T. Kuritani, T. Kishimoto and Y. Yamamura, *J. Immunol.*, 119, 1235(1977).
- [13] I. P. Hesselwood, *Int. J. Radiat. Biol.*, 34, 461(1978).
- [14] 郑秀龙, 赵芳, 丁振英, 高建国, 辐射研究与辐射工艺学报, 3(1), 28(1985).
- [15] I. R. Radford, *Int. J. Radiat. Biol.*, 49, 611(1986).

(稿件收到日期: 1988 年 8 月 8 日)

COMPARISON OF TRANSFORMATION, DNA SINGLE STRAND BREAKS AND ITS REPAIR IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES STIMULATED WITH PHA, ConA AND PWM FOLLOWING EXPOSURE TO γ -RAYS

Geng Yongzhi, Su Liaoyuan and Liu Keliang
(Suzhou Medical College, Suzhou)

ABSTRACT The transformation, DNA single strand breaks and its repair in human peripheral blood lymphocytes stimulated with PHA, ConA and PWM respectively following exposure to ^{60}Co γ -rays were analyzed by ^3H -thymidine incorporation and hydroxylapatite chromatography. The transformation of lymphocytes stimulated with PHA, ConA and PWM were suppressed by γ -rays and the dose-effect curves were biphasic within the range of 0-8 Gy. The lymphocytes stimulated with PWM were the most resistant to γ -rays. The extent of DNA single strand breaks in lymphocytes induced by γ -rays was linearly related to the dose within the range of 0-30 Gy and there was no marked difference in the three kinds of lymphocytes. After a period of post-irradiation (15Gy) incubation at 37°C the DNA single strand breaks could be rejoined but incompletely. The rejoined strands broke again if the cells were incubated longer. The repair ratio of single strand breaks in the lymphocytes stimulated with PWM was the highest among the cells with three mitogens. The results suggest that the difference of the radiation effect on transformation in different lymphocytes is probably related to the repair ability of DNA single strand breaks.

KEY WORDS Lymphocyte, DNA single strand break, DNA repair, Radiosensitivity, PHA, ConA, PWM