

电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞的影响

张远强 黄威权 王文超 郭 鹤

(第四军医大学, 西安)

摘要 应用定量酶细胞化学和环核苷酸免疫细胞化学方法, 观察到小鼠经 ^{60}Co 线8 Gy整体照射后, 腹腔巨噬细胞具有代表性的溶酶体酶 AcPase, ANAE 和 ATPase 活性发生明显变化, cAMP 和 cGMP 免疫荧光强度随之改变, 提示辐射效应在损伤细胞生物膜结构的同时, 亦损伤与其相关的酶蛋白, 这种损伤可能是通过影响其 cAMP 和 cGMP 起作用, 并直接影响巨噬细胞对抗原物质的吞噬和处理, 降低机体的免疫能力。

关键词: 电离辐射, 酶细胞化学, 荧光抗体技术, 巨噬细胞, 小鼠

电离辐射对机体特异性和非特异性免疫功能的抑制, 是机体辐射损伤后感染并导致机体死亡的重要原因之一, 因此探讨巨噬细胞的辐射效应具有重要意义。本文利用定量酶细胞化学和环核苷酸免疫细胞化学, 从细胞水平进一步探讨辐射对巨噬细胞的损伤规律及其原理。

材 料 和 方 法

- (1) 动物 选用本校繁殖纯系 LACA 雄性小鼠, 8-12 周龄, 体重 17-20 g。
- (2) 试剂 cAMP 和 cGMP 系 Mannheim 产品; cAMP 和 cGMP 抗血清由本校生化教研室提供; 放射免疫稀释度 1:3000, 自制 FITC 标记兔抗羊 IgG, 琼脂双扩效价 1:16。
- (3) 照射源 ^{60}Co γ 射线, 整体照射, 距 ^{60}Co 源中心位置 80 cm, 剂量 8 Gy, 剂量率 0.85 Gy/min。
- (4) 动物分组 动物数 80 只, 随机分成对照和实验组。对照组 20 只, 实验组分别于照后 1、3、和 6 d 取材, 每时间点 20 只。
- (5) 巨噬细胞悬液及贴片制备^[1] 用含肝素(25 u/ml) Hank's 液(pH 7.2)注入腹腔, 按摩数次。打开腹腔, 吸取腹腔内液, 行体外培养。加入 10 μl 鸡红细胞(10%, CRBC)悬液, 置 37°C 下孵育 50 min, 取出贴壁玻片, PES 洗去游离 CREC 和非贴壁细胞, 自然凉干, 备用。
- (6) 巨噬细胞吞噬活力测定^[1] 贴片 Giemsa 染色, 高倍镜下观察并计数吞噬率和吞噬指数。
- (7) 酶细胞化学 为保证实验各组在操作过程中条件一致及便于比较, 将各组贴片放入同一缸内, 分别显示 AcPase, ANAE 和 ATPase。Gomori 改良法显示酸性磷酸酶(AcPase); Müller 法显示酸性酯酶(ANAE); Glick 法显示三磷酸腺苷酶(ATPase), 各种方法均有对照。
- (8) 定量细胞化学 用 Leitz 图象分析系统(TAS)对上述三种酶进行含量(相对质量)测定, 同时测定细胞面积。选用扫描法对单个巨噬细胞进行扫描, 每张贴片扫描 20 个细胞, 每组 200 个细胞。所测每细胞的光值(E 值)全部输入 TAS 专用计算机内, 经处理得出 E 值 $\bar{X}$ 和 SD。各组数据同时输入 IBM-PC/XT 计算机, 进行方差分析比较, 得出 P 值^[1]。
- (9) 环核苷酸免疫细胞化学 染色步骤见文献[2], 结果用 Ridit 法统计处理。

结 果

1. 巨噬细胞吞噬活力观察

巨噬细胞吞噬活力在 8 Gy 照射后 1-3 d 逐渐增强, 到第 6 d 显著下降(表 1)。对照和实验各组间比较有非常显著意义($p < 0.01$)。实验各组间比较相差也非常显著($p < 0.01$)。对照组吞噬的 CRBC 结构多数完整, 少数开始被消化。1、3 d 组被吞噬的 CRBC 结构多数不完整, 有的已被消化, 仅剩 CRBC 残影, 尤以 3 d 为甚。照后 6 d 组基本无消化迹象。巨噬细胞面积的变化趋势与吞噬活力的变化相似(表 1)。说明膜面积变化与吞噬活力的改变密切相关。

Tab 1. The effect of ionizing radiation on phagocytic function and area of peritoneal macrophages of mice ($n = 20$, $\bar{X} \pm SD$).

Group	(Phagocytic %)		Phagoindex		Area	
Control	29.95	4.32	0.406	0.067	360.65	21.59
1 Day/Postradiation	40.51	6.68	0.660	0.105	410.82	39.88
3 Day/Postradiation	56.57	6.40	0.913	0.133	453.59	40.76
6 Day/Postradiation	21.5	8.17	0.168	0.046	174.25	46.79

2. 巨噬细胞酶细胞化学观察

(1) 光镜观察 对照组 AcPase 呈密集棕黑细颗粒, 分布在细胞质中(图 I-1)。照后 1 d 酶活性增强, 3 d 组更明显, 胞质满布阳性颗粒(图 I-2)。6 d 组酶活性显著减弱或消失(图 I-3)。对照组 ANAE 呈红褐色均质块状(图 I-4), 照后 1 d 酶反应加深, 至第 3 d 酶反应呈红褐色粗块状并, 有弥散(图 I-5)。6 d 组酶反应减弱成浅红色(图 I-6)。对照组 ATPase 呈棕黄色细小颗粒, 位于胞质和胞膜上(图 I-7), 照后 1 d 和 3 d 天组酶活性逐渐增强, 阳性颗粒呈棕色, 均匀散布(图 I-8)。6 d 组明显减弱或消失, 颗粒呈黄色(图 I-9)。

Tab 2. The effect of ionizing radiation on the activities of AcPase, ANAE and ATPase of peritoneal macrophages of mice ($n = 20$, $\bar{X} \pm SD$).

Group	AcPase		ANAE		ATPase	
Control	0.443	0.050	0.479	0.054	0.306	0.011
1 Day/Postradiation	0.517	0.042	0.539	0.036	0.349	0.032
3 Day/Postradiation	0.628	0.042	0.622	0.036	0.412	0.015
6 Day/Postradiation	0.309	0.021	0.312	0.018	0.147	0.039

(2) 定量测定 三种酶含量比较见表 2, E 值(总均数)分布见图 II。方差分析表明, AcPase 和 ANAE 在对照和实验组间的比较, 差异非常显著($p < 0.01$)。实验各组间的比较, 差异也有显著意义($p < 0.01$)。从上述结果看出, 辐照后 1、3 d 酶活性增强, 至 6 d 则明显下降。对照和实验各组间 ATPase 含量比较相差非常显著($p < 0.01$); 照后 1、3 d 和 6 d 的比较同样非常显著($p < 0.01$), 1 d 与 3 d 的比较有显著意义($p < 0.05$)。

3. 环核苷酸免疫细胞化学

经半抗原竞争性抑制试验, 或以正常血清及 PBS 替代试验均不显示荧光, 证明该方法具有特异性和可靠性。对照组 cAMP 免疫荧光主要位于细胞质和细胞膜上, 荧光呈不规则粒状或块状, 其强度为 ++。与对照组相比, 照后 1 和 3 d 组, 其荧光强度变化不大, 少数细胞荧光强度稍

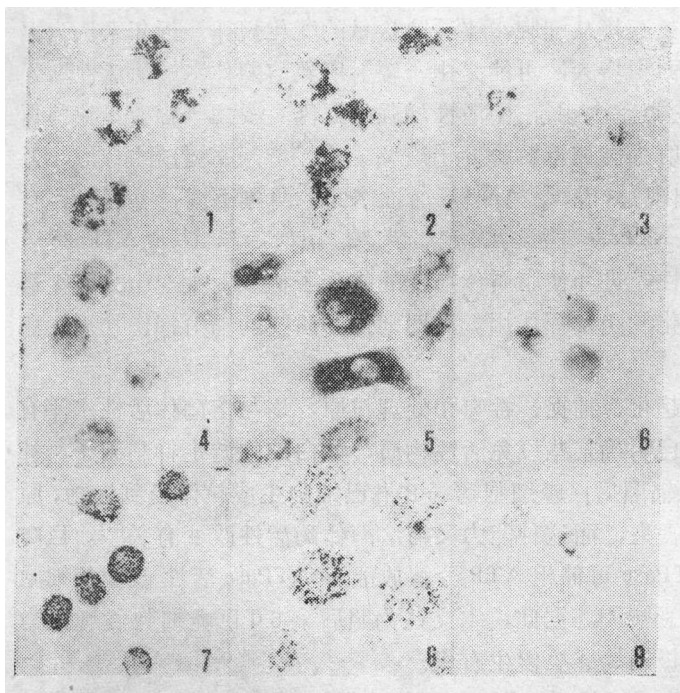


Fig 1. The effect of ionizing radiation on the activities of AcPase, ANAE and ATPase of peritoneal macrophages of mice. Enzyme cytochemistry, $\times 200$.

1. AcPase of peritoneal macrophages in control group $\times 200$.
2. AcPase of peritoneal macrophages on 3 days postradiation $\times 200$.
3. AcPase of peritoneal macrophages on 6 days postradiation $\times 200$.
4. ANAE of peritoneal macrophages in control group $\times 200$.
5. ANAE of peritoneal macrophages on 3 days postradiation $\times 200$.
6. ANAE of peritoneal macrophages on 6 days postradiation $\times 200$.
7. ATPase of peritoneal macrophages in control group $\times 200$.
8. ATPase of peritoneal macrophages on 3 days postradiation $\times 200$.
9. ATPase of peritoneal macrophages on 6 days postradiation $\times 200$.

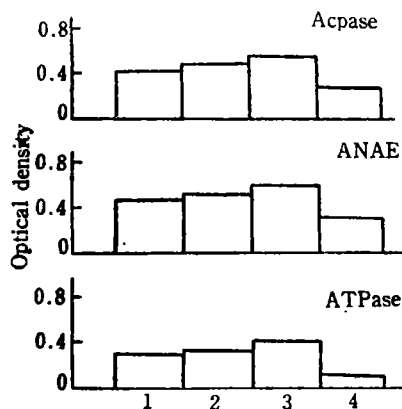


Fig 2. The distribution of E (x) of AcPase, ANAE and ATPase of peritoneal macrophages of mice.

1. Control; 2. 1 Day/Postradiation;
3. 3 Day/Postradiation;
4. 6 Day/Postradiation.

减, 差异不显著。照后 6 d 组 cAMP 强度明显增加, 核内也出现块状荧光, 多数细胞的强度为 + + +, 与其它各组相比, 差异显著。对照组 cGMP 免疫荧光主要位于核内, 核膜荧光更显, 其强度为 + +。照后 1 d 组 cGMP 变化不明显, 3 d 组免疫荧光强度明显增加, 达 + + +, 且在胞质和胞膜也出现荧光。照后 6 d 组, cGMP 免疫荧光强度明显下降, 有的细胞荧光完全消失, 多数细胞仅核膜处残留荧光 ±, 与其它组比较, 差异显著。

讨 论

本文应用光镜, 定量酶细胞化学和环核苷酸免疫细胞化学观察了电离辐射对小鼠腹腔巨噬细胞的影响。结果表明受 $^{60}\text{Co}-\gamma(8 \text{ Gy})$ 整体照射后早期, 小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬率、吞噬指数及消化能力均明显增强, 至第 6 d 上述指标显著下降。同时巨噬细胞面积也出现相似变化(表 1)。这种动态变化与 Pribnow 等人^[3]的观察结论一致。定量酶细胞化学的结果(表 2, 图 2)也表明巨噬细胞内具有代表性的溶酶体水解酶(AcPase, ANAE)及 ATPase 也同样出现上述的动态变化, 此结果与 Trocha^[4,5]用生化方法测定的结果一致。由于定量细胞化学测定的是单个细胞的含量,

其精度较组织液或匀浆的测定高得多,能更直接从细胞水平反映含量的变化规律。近年来认为辐射后早期巨噬细胞吞噬消化能力增强及膜面积增大,可能是由于辐射所致溶酶体水解酶活性增强的结果^[6]。本实验结果(表1,表2)与此论点完全相符。酶活性增强的原因主要由于辐射导致酶再合成增加及从外部转移增加。进而由于辐射损伤加重对酶分子破坏或直接抑制酶蛋白的合成,致使酶活性水平下降^[6,7]。因此,照后6d出现AcPase, ANAE活性水平的急剧下降,并同时伴有明显的吞噬消化功能的抑制。巨噬细胞的ATPase主要分布在质膜上,辐射后早期的ATPase活性增强可能是由于射线影响质膜脂质流动性,进而使脂质体结合的酶分子构型发生变化或直接影响酶分子,使酶分子更易暴露或有利于催化基团发挥作用。后期则由于质膜的辐射损伤加重,酶活性随之下降。

巨噬细胞的非特异性免疫功能,包括趋化、捕捉、吞噬和处理抗原,均与溶酶体活性水平有关,并直接反映该细胞的功能状态^[8]。现已明确某些免疫活性物质,如白细胞游走抑制因子,补体C1和C3本身就具备ANAE的特性。辐照后巨噬细胞诱导B淋巴细胞生成抗体受到抑制,原因在于该细胞处理并传递抗原信息的能力丧失,而这种能力又与溶酶体酶活性改变有关^[9]。巨噬细胞表面膜行为是一种主动耗能过程,ATPase可催化ATP分解放能,ATPase活性改变使细胞内氧化磷酸化,及捕捉吞噬活动都会受到影响^[8]。据此,本文认为照后第6d巨噬细胞吞噬能力及酶活性水平下降,可能与造血型放射病极期的感染发生有关。

近年来的资料表明巨噬细胞的功能是在cAMP和cGMP调控下进行的,并已证实凡能降低cAMP或提高cGMP水平的物质,均可促进其功能活动^[10]。电离辐射是否也通过刺激或抑制环化酶来改变巨噬细胞的功能?本文的环核苷酸免疫细胞化学证实,辐照后早期cGMP免疫荧光的强度增加,而第6d cAMP免疫荧光的强度显著增加,cGMP荧光强度下降。因此,我们考虑巨噬细胞的辐射损伤可能是通过刺激或抑制环化酶系统而起作用。后期由于辐射损伤的加重,组织及体液中的生物胺及前列腺素类物质增加,刺激腺苷酸环化酶,升高cAMP,引起生化连锁反应,抑制溶酶体酶的合成^[11]。溶酶体酶的活性下降,必然会影响到细胞对异物的消化分解能力,进而影响超抗原的形成及对免疫系统的调节和放大作用。这种作用的机理尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张远强、郭 鹤,病理生理学报,4,22(1985)。
- [2] 张远强、郭 鹤,上海免疫学杂志,4,244(1985)。
- [3] J. F. Pribnow and M. S. Silverman, J Immunol., 98, 225 (1967)。
- [4] P. J. Trocha and G. N. Catravas, Radiat Res., 83, 658 (1980)。
- [5] P. J. Trocha and G. N. Catravas, Int. J. Radiat. Biol., 38, 503 (1980)。
- [6] S. M. Reichard and J. P. Pilkins, The Reticuloendothelial System, Vol 7, pp 398-412, Plenum Press, New York, 1985。
- [7] D. Donadson, S. Marcus, K. K. Gyi, and E. H. Perkins, J. Immunol., 76, 192 (1956)。
- [8] H. Fridman, Fed. Proc., 121, 806 (1978)。
- [9] R. Gallily and M. Fridman, Immunology., 12, 197 (1967)。
- [10] R. M. Schultz, J. P. Papamatheakis and M. A. Chirigos, Cell Immunol., 42, 71 (1977)。
- [11] 王克为,第四军医大学学报,3,350(1984)。

(稿件收到日期:1989年7月14日)

(下转第181页)

AN ANALYSIS OF THE TRACE ELEMENT IN IRRADIATED BAISHAYE WINE

Fu Junwu

(Hunan Institute for Application of Atomic Energy in Agriculture Changsha)

Xiao Jiyue Li Guixin

(Changsha, Brewery)

ABSTRACT This paper mainly deals with the rules governing the change of the content of the trace element in irradiated Baishaye wine. The results of chromatographic analysis show that the contents of total acid, ester, aldehyde and high-grade alcohol for Baishaye wine can be enhanced by irradiation and the impure alcohol oil of the wine be decreased by irradiation thus, the quality of the wine can be improved and the period of preservation may be shortened.

KEY WORDS Baishaye wine, irradiation, trace element

(上接第 176 页)

THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECT OF IONIZING RADIATION ON PERITONEAL MACROPHAGES OF MICE

Zhang Yuanqiang, Huang Weiwan, Wang Wenchao and Guo Yao

(Department of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, Xian)

ABSTRACT The effect of ionizing radiation on peritoneal macrophages of mice was investigated by means of the quantitative enzyme cytochemistry and the cyclic nucleotide immunocytochemistry. It was found that the activities of the lysosomal enzyme (AcPase and ANAE) and ATPase of macrophages were remarkably changed after the animals were irradiated (^{60}Co γ -ray, 8 Gy). Further studies demonstrated that the specific immunofluorescence of cAMP and cGMP in macrophages was apparently influenced as compared with the control group. It is considered that ionizing radiation changes the structure of membrane and enzyme proteins of macrophages by the cyclic nucleotide (cAMP and cGMP). The mechanism of the effect of ionizing radiation on macrophage will be further studied.

KEY WORDS Ionizing radiation, Enzyme cytochemistry, Fluorescent antibody technic, Macrophage, Mouse