

热诱导人离体血淋巴细胞抗电离辐射损伤的研究

姜 杰 蔡 露 王献理

(白求恩医科大学, 长春 130021)

摘要 人离体血淋巴细胞在 G_0 、 G_1 、 S 和 G_2 期分别给予 41°C 1 h 加热、50 mGy 小剂量照射或 50 mGy 和 41°C 1 h 加热联合作用, 培养至 48 h 再给 1.5 Gy X 射线照射。结果表明三种预先处理的染色单体畸变率均明显低于单纯 1.5 Gy 组, 说明加热和小剂量 X 射线一样, 可诱导细胞对电离辐射的抗性。但 50 mGy 和 41°C 1 h 加热联合作用的适应性反应未见累加作用, 因此认为低剂量辐射和加热所诱导的适应性反应的机制可能是一致的, 即通过热休克蛋白而产生保护作用。

关键词 加热, 电离辐射, 染色单体畸变, 适应性反应, 热休克蛋白

在对低剂量辐射诱导适应性反应的研究中^[1-3], 发现低剂量辐射与许多化学致突变剂(如 BLM、MMC、 H_2O_2)之间存在着广泛地交叉耐受性, 还发现单纯加热也可诱导适应性反应, 因此考虑低剂量辐射、化学致突变剂和加热在诱导适应性反应时, 可能引发同一种机制。人们早就证明, 生物在高温条件下, 均产生一种新型蛋白质——热休克蛋白(HSP), 又称应激蛋白^[4]。它不仅增强生物的耐热性, 还可提高生物对化学致突变剂、紫外线、 H_2O_2 、电离辐射的抗性^[5-6]。因此热休克蛋白可能成为低剂量辐射等因素诱导适应性反应的共同基础。本文研究了热休克蛋白在低剂量辐射诱导适应性反应中的作用, 探讨低剂量辐射与加热诱导适应性反应的内在联系。

材料与 方法

1. 淋巴细胞培养

取健康青年静脉血(男、女各 1 例), 肝素抗凝, 加 0.2 ml 血于 2 ml RPMI 1640 培养基中(含青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 并加 0.1 ml 植物血凝素(PHA), 37°C 培养。

(1) 分别在 G_0 期(加 PHA 前)、 G_1 期(加 PHA 后 14 h)、 S 期(加 PHA 后 38 h)、 G_2 期(加 PHA 后 42 h)给予(T) 41°C 水浴 1 h 处理;

(2) 或小剂量(D_1) 50 mGy 照射;

(3) 50 mGy 和 41°C 1 h 联合处理。

上述各组培养至 48 h 均给予大剂量(D_2) 1.5 Gy 照射, 50 h 加秋水仙素, 54 h 收集细胞制片。

2. 照射条件

菲利普 X 射线治疗机, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 0.5 mmCu + 1.0 mmAl 滤过板, D_1 辐射剂量 50 mGy, 剂量率 50 mGy/min, D_2 辐射剂量为 1.5 Gy, 剂量率为 0.44 Gy/min。

3. 染色体制备及分析

收集后的淋巴细胞置于 0.5% KCl 低渗液中低渗 15 min, 新配制的甲醇与冰醋酸比例为 3:1, 固定 15 min, 反复 3 次, 常规滴片, Giemsa 染色。畸变类型按 WHO 制定的标准。

结 果

1. 小剂量电离辐射诱导的适应性反应

静脉血分别在 G_0 、 G_1 、 S 和 G_2 期照射 D_1 , 48 h 后照射 D_2 。每组分析 400 个细胞, 结果表明各期预先照射 D_1 后, 再照射 D_2 所诱导的染色体畸变率和细胞畸变率均比单纯 D_2 组低(见表 1)。

Tab 1. Adaptive response induced by low dose X-rays

Treatment	Chromatid and isochromatid breaks (%)	Cells with aberration (%)
D_2	24.50 ± 4.24	22.00 ± 1.41
$D_1(G_0) + D_2$	$14.00 \pm 3.53^{**}$	$12.75 \pm 2.47^{**}$
$D_1(G_1) + D_2$	$14.50 \pm 1.41^{**}$	$13.75 \pm 2.47^{**}$
$D_1(S) + D_2$	$15.00 \pm 0.71^{**}$	$14.00 \pm 0.71^{**}$
$D_1(G_2) + D_2$	$14.50 \pm 1.41^{**}$	$14.00 \pm 1.41^{**}$

$^{**} P < 0.01$

Tab 2. Adaptive response induced by hyperthermia

Treatment	Chromatid and isochromatid breaks (%)	Cells with aberration (%)
D_2	24.50 ± 4.24	22.00 ± 1.41
$T(G_0) + D_2$	$15.00 \pm 0.71^{**}$	$14.50 \pm 0.71^{**}$
$T(G_1) + D_2$	$15.50 \pm 0.71^{**}$	$15.50 \pm 0.71^{**}$
$T(S) + D_2$	$13.00 \pm 0.00^{**}$	$12.50 \pm 0.71^{**}$
$T(G_2) + D_2$	$10.00 \pm 0.71^{**}$	$10.00 \pm 0.00^{**}$

$^{**} P < 0.01$

Tab 3. Adaptive response induced by low dose X rays and hyperthermia together

Group	Chromatid and isochromatid breaks (%)
D_2	24.50 ± 4.24
$D_1(G_0) + T + D_2$	$13.25 \pm 1.77^{**}$
$D_1(G_1) + T + D_2$	$13.50 \pm 3.50^{**}$
$D_1(S) + T + D_2$	$13.75 \pm 1.61^{**}$
$D_1(G_2) + T + D_2$	$14.25 \pm 1.71^{**}$
$T(G_2) + D_1(G_2) + D_2$	$12.00 \pm 2.83^{**}$

$^{**} P < 0.01$

2. 热诱导的适应性反应

G_0 、 G_1 、 S 和 G_2 期预先置 41°C 水浴锅中保温 1 h, 继续培养至 48 h, 各组再照射 D_2 (1.5 Gy) 所引起的染色体畸变率和畸变细胞率均明显低于单纯 D_2 组, 其中以 G_2 期效果最明显(见表 2), 统计学检验差异显著。

3. 加热与小剂量联合作用对适应性反应的影响

用同批血样, 分 6 组, 其中 4 个组在 G_0 、 G_1 、 S 、 G_2 期照射 D_1 (50 mGy), 照射 D_1 后立即

置水浴中 41℃ 保温 1 h, 另设 1 组在 G_2 期先加热 1 h, 再照射 D_1 , 48 h 后 6 个组均照射 D_2 。结果表明加热和小剂量联合作用 $D_1 + T + D_2$ 的染色体畸变率虽明显低于单纯 D_2 组(见表 3), 但和 $T + D_2$ 组(见表 2)及 $D_1 + D_2$ 组(见表 1)染色单体畸变率比较无统计学差异, 说明加热和小剂量电离辐射两者联合作用, 适应性反应无累加效应。

讨 论

Shadley 等^[7]用 10 mGy 的 X 射线分别在人外周血淋巴细胞 G_0 、 G_1 、S、 G_2 期进行照射, 48 h 后再照射 1.5 Gy X 射线, 结果除 G_0 期外, 其余各期染色体畸变率均明显低于单纯 D_2 组。蔡露^[3]用人和兔血做类似实验, 证明除了 G_1 、S 和 G_2 期可诱发适应性反应, G_0 期也可诱发适应性反应。本实验结果再次证明, 人淋巴细胞各时期给予 D_1 辐射, 均可诱导适应性反应, 且各期诱导的适应性反应程度无明显差异。

人外周血淋巴细胞在细胞各时期预先加热, 再给予 D_2 照射, 其染色单体畸变率均明显低于单纯 D_2 组, 说明不同细胞时期 41℃ 1 h 加热也可诱导适应性反应。Rieger 等人^[5]给蚕豆根尖分生组织 40℃ 1—2 h 加热后, 再用化学致突剂处理, 其染色单体畸变率明显低于单纯化学致突剂处理组, 说明加热可能诱导热休克蛋白, 提高了细胞抵抗电离辐射、化学致突剂等攻击性侵袭的能力。本实验还证明 G_2 期加热诱导的适应性反应最明显(与 G_0 、 G_1 期比较 $P < 0.05$), 这与 Rice 等人^[8]在 CHO 细胞中发现 G_2 -M 期合成的热休克蛋白量最高的现象相一致, 也充分说明 HSP 在适应性反应中的重要作用。

同样在细胞各时期预先给予小剂量照射和加热处理, 然后照射 1.5 Gy。结果表明小剂量照射和 41℃ 加热联合作用也可诱导适应性反应(见表 3), 但和 $D_1 + D_2$ 组(见表 1)、 $T + D_2$ 组比较, 适应性反应无累加效应。同时, 本文选择适应性反应相对敏感的 G_2 期, 比较了 $D_1 + D_2$ 、 $T + D_2$ 、 $D_1 + T + D_2$ 、 $T + D_1 + D_2$ 四组适应性反应的差异, 虽 $T + D_2$ 组染色体畸变率低于其它三组, 但统计学分析表明四组之间无显著差异($P > 0.05$)。因此说明加热和小剂量照射先后顺序对适应性反应程度无影响。

适应性反应的机制通常认为有两种可能。一是 D_1 辐射激活了 DNA 修复系统, 使损伤后修复能力增强; 二是 D_1 辐射诱导细胞产生某种保护性蛋白, 减少了原始损伤。Fan 等^[9]研究证明在同一细胞周期内两次 D_1 辐射处理和一次 D_1 辐射处理产生的适应性反应程度一样, 即适应性反应不受再次 D_1 辐射的影响, 有饱和现象。本实验证明 D_1 辐射加热均可诱导适应性反应, 如果 D_1 辐射是通过激活修复酶系统使损伤后修复能力增强, 而加热诱导热休克蛋白, 保护细胞减少原始损伤。那么, 推测两种因素同时作用, 适应性反应应具有累加作用。但实验结果表明 $D_1 + T + D_2$ 组染色体畸变率与 $D_1 + D_2$ 组或 $T + D_2$ 组比较无明显差异($P > 0.05$)。即无累加效应。Wolff^[10]曾用 10 mGy X 射线照射人外周血淋巴细胞, 发现细胞内有几种新蛋白质合成。用蛋白质合成抑制剂^[11]处理 D_1 照射后的淋巴细胞, 发现其适应性反应消失。这些结果提示: D_1 辐射诱导的适应性反应与加热诱导的适应性反应可能是同一机制, 即通过诱导热休克蛋白而起保护作用。

参 考 文 献

- 1 蔡 露, 刘树铮. 中华医学杂志, 1990, 70(11): 624
- 2 蔡 露. 国外医学, 放射医学与核医学分册, 1990, 14(4): 159
- 3 Cai L, Liu S Z. Int J Radiat Biol., 1990, 58(1): 187
- 4 DeNagel D C, Pierce S K. Immunol. Res., 1991, 10: 66
- 5 Rieger R, Michaelis A, Schubert I. Mutat. Res., 1985, 143: 79
- 6 Ohnishi T, Iwata K, Ohishi H. Int. J. Radiat. Biol. Radiat. Stud. Phys. Chem. Med., 1989, 56(2), 193
- 7 Shadley J D, Afzal V, Wolff S. Radiat. Res., 1987, 111: 511
- 8 邢 成. 国外医学, 军事医学分册, 1989, 6: 16
- 9 Fan S, Vijayalaxmi, Mindek G, Buerkart W. Mutat. Res., 1990, 243: 53
- 10 Baverstock K F, Stather J W. Low dose radiation: biological bases of risk assessment, London, Taylor and Francis, 1989: 446—454

(稿件收到日期: 1991年9月18日)

INDUCTION OF RADIORESISTANCE IN HUMAN LYMPHOCYTES BY PREHEAT TREATMENT

Jiang Jie Cai Lu Wang Xianli

(Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT Human lymphocytes pre-treated by heat (41°C 1 h), low dose irradiation (50 mGy), or both low dose radiation and heat together, became less susceptible to chromatid damage induced by subsequent high dose of X-rays. Either heat or low dose X-rays could significantly reduced the yield of chromatid aberrations, but the magnitude of adaptive response was not enhanced when combined treatment with low dose radiation and heat were used. The results implied that the mechanism of adaptive response induced by low dose X-rays was as same as the mechanism of adaptive response induced by hyperthermia, which may be related with some protective proteins.

KEYWORDS Hyperthermia, Radiation, Chromatid aberration, Adaptive response, Heat shock protein