

电离辐射对 NK 细胞活性及数量的影响

闵 锐 程天民¹ 罗成基¹ 陈 杞 丁振海 孟祥顺

(第二军医大学放射医学研究室, 上海 200433)

摘要 正常人外周血单个核细胞(PBMCs)体外经1—6 Gy γ 射线照射,照射后不同时间, H^3 -TdR 释放法测 NK 细胞活性, 免疫细胞化学法计数 CD_57 阳性 NK 细胞数。发现在 2 Gy 照射剂量范围 NK 活性基本不变, 增大照射剂量活性逐渐下降。NK 细胞活性亦随照射后时间而变化, 照射后 12 h 活性最低, 随后逐渐恢复, 恢复程度与受照射剂量有关。实验照射剂量范围, NK 细胞数量改变不明显。rIL-2 刺激受照 NK 细胞可显著增强活力。

关键词 电离辐射, NK 细胞, 免疫细胞化学

NK 细胞属于淋巴细胞类, 与 T、B 淋巴细胞不同, NK 细胞介导抗原非依赖性细胞免疫, 其杀伤作用不受 MHC 限制^[1], 同时, NK 细胞能识别 MHC 类抗原, 因此并不攻击自体正常细胞^[2]。NK 细胞的功能和特性是临床放射治疗及放射生物学家十分感兴趣的研究对象。然而, 除发现 NK 细胞具有一定的辐射抗性外, 有关 NK 细胞的辐射剂量效应、辐射对 NK 细胞活性的影响等问题仍待进一步深入研究。

1 材料与 方法

1.1 细胞分离与照射

常规方法分离健康青年男性(21—24岁)PBMCs, 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hanks 液洗涤 2 次, 含 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液调整细胞数为 $4 \times 10^5/ml$, 分装于 24 孔培养板内。应用医用 ^{60}Co 放射治疗机(EYC-50 H, 上海医疗器械二厂)在室温($22 \pm 3^\circ C$)下照射。照射剂量分别为 1 Gy、2 Gy、4 Gy 和 6 Gy, 剂量率 9.3 mGy/s。

1.2 受照细胞处理

照后细胞用含 5% 小牛血清 RPMI 1640 洗涤 1 次。含 10% 小牛血清 RPMI 1640 液重悬细胞, 部分照后细胞立即进行 NK 活性分析和细胞计数, 其余转移至 24 孔培养板, 加入和不加 rIL-2 (终浓度 500 U/ml, 本校基因重组产品), $37^\circ C$, 5% CO_2 饱和湿度条件下培养。

1.3 NK 细胞活性测定

$2 \times 10^5/ml$ 对数生长期的 K_562 细胞, 加 $1.1 \times 10^6 Bq$ ^3H -TdR, $37^\circ C$ 下孵育 3 h, 洗涤 3 次, 调整细胞计数为 $1 \times 10^5/ml$ 作为 NK 攻击的靶细胞。分别取 $5 \times 10^5/100 \mu l$ 效应细胞和 $1 \times 10^4/100 \mu l$ 靶细胞(效靶比 50:1)于 96 孔培养板内, CO_2 孵箱中培养 18 h, 弃尽培养上清, 加胰蛋白酶(终浓度 0.15%)和 DNA 酶(终浓度 0.025%)混合液, 断续孵育 30 min, 收集细胞, 液闪测量。按下列公式计算释放率, 即 NK 细胞杀伤百分率。

$$\text{释放率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 cpm} - \text{本底 cpm}}{\text{对照组 cpm} - \text{本底 cpm}} \right) \times 100\%$$

¹ 第三军医大学防原医学教研室, 重庆 630038

收稿日期: 初稿 1993-09-08, 修改稿 1994-01-10

1.4 NK 细胞计数

与 NK 细胞活性测定同步,取少许效应细胞悬液涂片,常规处理后加鼠抗人 CD₅₇ 单克隆抗体,4℃湿盒作用过夜。用 PBS(pH 7.2)冲洗 3 次,后按 Vector 公司 ABC 分析试剂盒(华美生物试剂公司)说明书进行操作。计数 200—250 个细胞,计算阳性百分率。

1.5 数据处理

所有实验数据按小样本 t 检验进行处理^[3]。

2 结 果

2.1 NK 细胞杀伤活性的辐射剂量 效应和时间效应

细胞经 1—6 Gy 剂量照射,分别在不同照射后时间,观察 NK 细胞的杀伤活力。发现在小于 2 Gy 照射剂量范围内,NK 细胞杀伤活性变化不明显。随照射剂量增加,NK 细胞杀伤活力呈剂量依赖性降低,6 Gy 照射后,NK 活性显著低于对照和小剂量照射组。NK 细胞活性变化 亦与照射后时间有关,照射后 12 h 时活力最低,随后逐渐回升,恢复的速度和程度与受照射剂量成反比。细胞照射后立即加入高浓度 rIL-2 进行刺激培养,72 h 后 NK 细胞活力显著高于未刺激对照组,结果见表 1。

Tab 1. Changes of NK cell activity after irradiation

Irradi- ation dose/Gy	Time course of NK cell activity change after irradiation/h						
	Immediate	6	12	24	48	72	72 ^(a)
0	45.1±15.6 ^(b)	43.6±21.1	44.0±14.7	44.5±15.0	44.6±14.2	41.7±18.3	60.6±25.5
1	46.1±10.8	43.9±13.4	35.8±8.8	39.7±10.7	43.1±13.9	41.6±12.9	61.3±16.7 ⁽²⁾
2	44.7±8.6	42.0±12.7	36.8±13.2	37.8±11.5	41.2±11.2	39.1±15.0	58.9±20.3 ⁽¹⁾
4	37.4±11.1	36.6±14.5	28.1±12.7 ⁽¹⁾	30.2±10.8	32.7±11.6	32.8±13.3	44.4±10.0 ⁽¹⁾
6	32.3±10.1 ⁽¹⁾	30.0±7.4 ⁽¹⁾	20.6±3.9 ⁽²⁾	26.4±7.8 ⁽¹⁾	21.1±6.4 ⁽²⁾	23.7±10.2 ⁽²⁾	37.4±16.5 ⁽¹⁾

(a) rIL-2 stimulate, (b) n = 12, $\bar{x} \pm s$

⁽¹⁾ p<0.05 ⁽²⁾ p<0.01

2.2 NK 细胞数量变化

不同照射剂量照射后不同时间 CD₅₇(NK 细胞表面标志抗原)阳性细胞百分率 观察发现,在 1—6 Gy 照射剂量范围内,NK 细胞数量改变不显著,随照射后时间延长,4 Gy 以上照射组 NK 细胞数略有下降。用 rIL-2 刺激受照射细胞,可增加 NK 细胞的数目,增加程度与照射剂量成反比,但统计处理,变化不显著(见表 2)。

Tab 2. CD₅₇ positive percentage after NK cell irradiated with different doses

Irradiation dose/Gy	Number of NK cells with different postirradiation time/h				
	Immediate	12	48	72	72 ^(a)
0	20.5±8.4 ^(b)	17.7±6.2	22.2±15.7	17.7±7.1	30.5±16.3
1	18.3±8.2	18.1±7.3	21.5±6.8	16.0±7.5	26.6±10.4
2	20.0±5.6	18.8±3.5	19.0±4.4	18.2±3.4	27.2±5.6
4	15.2±5.4	16.0±5.6	15.5±7.6	13.7±6.1	18.8±10.0
6	18.2±7.8	14.6±7.5	14.0±7.3	10.5±4.8	14.4±6.7

(a) rIL-2 stimulate, (b) n = 3, $\bar{x} \pm s$

3 讨 论

T、B淋巴细胞及NK细胞是生物体内重要的免疫活性细胞,共同承担机体特异和非特异,体液及细胞免疫功能。从细胞发生学的角度分析,目前虽未明确T、B和NK细胞来源于同一组细胞,但对三类淋巴细胞在定向及分化成熟后的表型特征,功能特性和差别都已有一定的认识^[4]。NK细胞免疫功能的非抗原依赖性在于分化过程中,不发生类似T、B淋巴细胞所经历的T细胞受体(TCR)和表面免疫球蛋白(Ig)基因的重排^[6],这种细胞分化过程中的差别可能是三类淋巴细胞辐射敏感性差异的重要原因。然而,最近有学者认为,不仅NK细胞与T细胞同源、同祖,而且在细胞的发生上,NK细胞是T细胞的前体细胞^[8]。T细胞或NK细胞在部分细胞表型上的完全一致,对这种观点是一力证^[7]。

鉴于这种新的观点及过去有关NK细胞辐射生物效应研究结果的多样性,本文在研究T淋巴细胞辐射生物学效应的同时,仔细观察了NK细胞活性及数量变化的辐照剂量效应和时间效应,并与T细胞研究结果进行比较,结果显示NK细胞的辐射抗性十分有限,杀伤活力仅在2 Gy照射剂量范围内基本不变,超过2 Gy照射剂量,活性呈剂量依赖性下降,下降趋势与T淋巴细胞一致。当照射剂量增至6 Gy时,NK细胞活性降至对照组的60%左右,显著低于对照组。2 Gy以上的电离辐射,NK细胞活力随照射剂量的增加下降的速度低于T淋巴细胞,且出现显著下降的辐射剂量阈值高于T淋巴细胞,但在总体上,两类淋巴细胞杀伤活力的辐射剂量效应基本一致。在损伤的恢复方面,NK细胞活力在经历照射后12 h的最低值后渐渐恢复,而同样条件下T淋巴细胞杀伤活力在一定时期内进行性下降,即使是小剂量照射所致T淋巴细胞功能损伤,也需相当长时间才能恢复。NK细胞与T淋巴细胞在活性损伤及恢复方面的异同性,表明两类淋巴细胞既有联系又相互区别,这种联系是否因细胞在发生上同源、同祖及NK细胞原本就是T细胞的前体细胞,区别是否由于在细胞分化成熟的不同阶段,既可获得某一特性(如辐射抗性)、亦可丢失这种特性,尚待进一步深入研究。

有关辐射引起的淋巴细胞间期死亡,过去有不少研究^[8]。研究表明,NK细胞数量改变对辐射不敏感,在一定时间内直至6 Gy剂量的照射,NK细胞数量变化亦不明显,而1—6 Gy照射剂量范围内,NK细胞数量变化不显著,而在同一照射剂量下NK细胞活性可发生显著变化,说明辐射所致的NK细胞活性改变,主要原因是NK细胞的功能损伤,而不是数量减少。

与其它淋巴细胞一样,部分NK细胞亦可表达白细胞介素2受体(IL-2R),因此,通过细胞IL-2R的介导,外源性IL-2的刺激可使NK细胞激活和增殖。细胞经照射后,外源性IL-2刺激可提高NK细胞活性,且有增加细胞数量的趋势表明,在放射损伤及放射治疗的医疗过程中,应该十分注意NK细胞在机体免疫功能恢复及机体免疫耐受中的作用。

参 考 文 献

- 1 Gao E K, Lo D, Sprent J. J. Exp. Med., 1990, 171(4): 1101
- 2 Ljunggren H G, Karre K. Immunology Today, 1990, 11(7): 237
- 3 周怀悟. 数理统计, 济南: 山东教育出版社, 1984: 93—107
- 4 Lanier L L, Phillips J H, Hackett J J et al. J. Immunology, 1986, 137(9): 2735
- 5 Lanier L L, Spits H, Phillips J H. Immunology Today, 1992, 13(10): 392
- 6 Rogier Versteeg. Immunology Today, 1992, 13(7): 244
- 7 Rodewald H R, Moingeon P, Lucich J L et al. Cell, 1992, 69(1): 139
- 8 王宜强. 国外医学放射医学核医学分册, 1993, 17(2): 58

THE EFFECTS OF RADIATION ON ACTIVITY AND NUMBER OF NK CELL

Min Rui Cheng Tianmin¹ Luo Chengji¹ Chen Qi Din Zhenhai Mon Xiangshun

(The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

(¹ The Third Military Medical University, Chongqin 630038)

ABSTRACT Peripheral blood mononuclear cells from normal persons were irradiated by 1—6 Gy γ -rays in vitro. NK activity was determined by means of ³H-TdR releasing and CD₅₇ positive cells were counted by means of immunocytochemistry, respectively. The results showed that NK cell activity changed unobviously within 2 Gy irradiation dose and dropped gradually with increasing irradiation dose and was distinguished lower than that of control when irradiation dose increased to 6 Gy. NK cell activity changed with time and was lowest at 12 hours after irradiation, then it restored gradually. The restoring level of NK cell activity was related to irradiation dose. The number of NK cell had little change till 6 Gy irradiation. The activity of NK cell increased significantly when irradiated cells were stimulated with IL-2.

KEYWORDS Irradiation, NK cell, Immunocytochemistry

(上接第 188 页 Continued from P 188)

STUDIES ON CERTAIN CHARACTERISTICS OF ADAPTIVE RESPONSE INDUCED BY LOW DOSE RADIATION IN MICE SPERMATOCYTES

Wang Ping Piao Xianggen Cai Lu

(Department of Basic Medical Science Norman Bethune University of
Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT The male mice were irradiated in whole-body to chronic γ -radiation or X-ray fractional radiation (D_1). D_2 (1.5 Gy X-rays) was given 40 days after exposure to D_1 . The effect of chronic or fractional pre-exposure of low dose radiation on the chromosome damage induced by subsequently high dose irradiation was observed. The results showed that the adaptive response could be induced by low dose chronic or fractional radiations in male mice germ cells.

KEYWORDS Adaptive response, Germ cell, Chromosome aberration, Low dose radiation