

小剂量辐射对淋巴细胞亚群间 相互作用的影响

杜泽吉 苏燎原 刘芬菊

(苏州医学院放射医学系 苏州 215007)

摘要 应用单克隆抗体铺皿法分离出 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和B细胞,小剂量X射线照射前两种细胞,观察照射后的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 对B细胞 ^3H -TdR参入的影响。结果表明,正常 $CD4^+$ 细胞对B细胞具有辅助作用, $CD4^+$ 细胞对B细胞具有抑制作用,小剂量照射可加强 $CD4^+$ 对B细胞的辅助作用,促进 $CD8^+$ 对B细胞的抑制作用,以0.10 Gy照射后这种效应最强,0.20 Gy照射后仍可观察到这种效应。

关键词 小剂量辐射,淋巴细胞亚群,相互作用,生物辐射效应

小剂量辐射引起的生物学效应是非常广泛的^[1,2],在小剂量辐射免疫增强效应中,具有辅助功能的 $CD4^+$ 和具有抑制作用的 $CD8^+$ 细胞,一直是学术界关注的焦点,因其功能的改变及对B细胞的调节主导了机体的免疫功能。应用单克隆抗体(McAbs)分离出 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和B细胞,通过 ^3H -TdR参入的方法,研究 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 对B细胞的调节作用以及在小剂量照射后这种相互作用的改变,探讨其在小剂量免疫增强效应中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 单克隆抗体分离出 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和B细胞^[3-5]及纯度^[6]和存活率的鉴定

首先用淋巴细胞分离液分离出人外周血淋巴细胞与单核细胞,按报道的Panning直接法再分离淋巴细胞各亚群细胞,首先将McAbn CD4(军事医学科学院)、McAbn CD8 (AMAC、USA)和McAbn B(DAKO, Denmark)分别包被于培养皿(Corning, USA)底,将所分离的淋巴细胞悬液按每皿 $(2-3) \times 10^7$ 轻轻加入皿中,摇匀后在4℃下放置60 min。洗去非粘附细胞,加入RPMI 1640培养液,收集粘附细胞即分别得到 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 和B细胞。采用间接免疫荧光试验[加入羊抗鼠IgG-FITC(华美生物工程公司出品)]和台盼蓝拒染法分别对所获细胞作纯度和存活率和鉴定,结果表明三种细胞的纯度和存活率均在90%以上。

1.2 照射条件

采用深部X线机,电压200 kV,电流10 mA,滤片0.5 mm Cu和1 mm Al,球靶到样品距离为2 m或0.8 m,剂量率分别为0.01 Gy/min或0.045 Gy/min,照射剂量为0.02、0.05、0.10、0.20 Gy。

1.3 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 对B细胞的调节作用

$CD4^+$ 、 $CD8^+$ 细胞在含有PWM(美洲商陆丝裂原10 μg/ml, sigma)的RPMI 1640培养液中,B

收稿日期:初稿1993-11-08,修改稿1994-04-26

细胞在含有LPS(脂多糖20 μg/ml,sigma)的 RPMI 1640 培养液中,分别加入适量单核细胞,37℃下培养 4 d,所得细胞为 PWM 激活的 CD4⁺、CD8⁺细胞(PWM CD4⁺,PWM CD8⁺)和 LPS 激活的 B 细胞(LPS B)。按1:2分别混合 PWM CD4⁺ 和 LPS B、PWM CD8⁺ 和 LPS B(每瓶细胞总数为 6×10⁵ 个),并设单独培养的 PWM CD4⁺(CD8⁺) 和 LPS B 细胞组(细胞数和混合培养中各类细胞含量一致),再在含 LPS 的培养液中继续培养 48 h。加 7.4×10⁴Bq/瓶 ³H-TdR, 24 h 后抽滤收获细胞, Beckman 液体闪烁计数器(LS-6800, USA)测 CPM 值,经平方根转换后,作t 检验或 F 检验。

2 实 验 结 果

2.1 LPS 对 CD4⁺、CD8⁺ 及 PWM CD4⁺、PWM CD8⁺ ³H-TdR 参入的影响

结果见表 1。表中无丝裂原组为阴性对照, PWM 组为 阳 性 对 照。加 LPS 的 CD4⁺、CD8⁺ PWM CD4⁺ PWM CD8⁺ 四种细胞的 CPM 值和阴性对照的相应细胞的 CPM 值之间差别均不显著(*p*>0.05),说明 LPS 对这四种细胞均无激活作用。

2.2 激活的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞对激活的 B 细胞的调节作用

Tab 1. Effect of LPS on ³H-TdR incorporation of CD4⁺、CD8⁺、PWM CD4⁺ and PWM CD8⁺ (CPM, $\bar{x} \pm s$)

	CD4 ⁺	CD8 ⁺	PWM CD4 ⁺	PWM CD8 ⁺
Non-mitogen	64.1±12.6	71.0±16.9	1068.6±124.6	1139.2±134.0
PWM/10 μg·ml ⁻¹	2258.7±290.8	2339.0±347.2	20867.0±8095.0	23541.0±9510.0
LPS/20 μg·ml ⁻¹	58.7±14.6	76.3±11.5	1098.0±176.7	1117.1±115.3

n = 6

Tab 2. Regulatory effects of PWM CD4⁺、PWM CD8⁺ on LPS B cell (CPM, $\bar{x} \pm s$)

Mono-culture			Co-culture	
PWM CD4 ⁺	LPS B	PWM CD8 ⁺	PWM CD4 ⁺ + LPS B	PWM CD8 ⁺ + LPS B
1098.0±176.7	94301.1±3558.2	1117.1±115.3	113200.7±4907.9	81377.0±13857.1

n = 6

PWM 激活后的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞对 LPS B 的作用见表 2。单独培养的 PWM CD4⁺、PWM CD8⁺的 ³H-TdR 参入是很低的,说明它们在含LPS的培养液中不再继续被激活,其功能是 PWM 激活后的延续;PWM CD4⁺ 和 LPS B细胞混合培养的 CPM 值大于 PWM CD4⁺ 和 LPS B 细胞单独培养的 CPM 值之和(*p*<0.01),说明 PWM CD4⁺ 和 LPS B 细胞间存在着辅助作用,而 PWM CD8⁺ 和 LPS B 细胞混合培养的 CPM 值小于单独培养时 PWM CD8⁺ 和 LPS B细胞的 CPM 值之和(*p*<0.05),说明 PWM CD8⁺ 对 LPS B 细胞有抑制作用。

2.3 小剂量照射后 CD4⁺ 对 B 细胞调节作用的变化

0—0.20 Gy 照射后的 CD4⁺ 细胞, PWM 激活后与 LPS B 的相互作用见表 3。在 0.20 Gy 剂量内的照射均可加强 CD4⁺ 对 B 细胞的辅助作用,尤以 0.10 Gy 照射的效应最为明显,为对照的 141.8%(*p* 值小于 0.01)。

2.4 小剂量照射后 CD8⁺ 对 B 细胞调节作用的变化

实验设计同 CD4⁺。结果表明(见表 4), CD8⁺ 在小剂量照射后经 PWM 激活,其抑制 LPS B 细胞 ³H-TdR 参入的功能明显增强,以 0.05 Gy 和 0.10 Gy 剂量点抑制明显,分别为对照组的

80.1%和 73.3%(p 值分别小于 0.05 和 0.01)。

Tab 3. Regulatory effect of PWM CD4⁺ on LPS B cell after low dose radiation ($\bar{x} \pm s$)

	Dose/ 10^{-2} Gy				
	0	2	5	10	20
n	5	7	7	7	7
CPM	260268 $\pm$ 76738	324715 $\pm$ 53917	352088 $\pm$ 40626	368240 $\pm$ 35827	328488 $\pm$ 44048
Percentage	100	124.8 $\pm$ 16.0 ⁽¹⁾	135.5 $\pm$ 29.1 ⁽²⁾	141.8 $\pm$ 24.3 ⁽²⁾	126.7 $\pm$ 27.8 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ (compared with "0 Gy" group)

Tab 4. Regulatory effect of PWMCD8⁺ on LPS B cell after low dose radiation ($\bar{x} \pm s$)

	Dose/ 10^{-2} Gy				
	0	2	5	10	20
n	5	7	7	7	7
CPM	294860 $\pm$ 58759	294592 $\pm$ 51675	236191 $\pm$ 50411	216109 $\pm$ 75426	274431 $\pm$ 68477
Percentage	100	99.8 $\pm$ 15.4	80.1 $\pm$ 18.5 ⁽¹⁾	73.3 $\pm$ 20.2 ⁽²⁾	93.1 $\pm$ 21.3

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$ (compared with "0 Gy" group)

3 讨 论

对小剂量辐射(LDR)免疫增强效应的研究,国内外已做了大量工作^[7],这些工作除了PFC(空斑形成细胞)反应能从一定程度上说明免疫调节细胞间相互作用外,大多都是针对某种免疫活性细胞或某种因子来观察LDR的刺激效应,而PFC又是全淋巴细胞受照后的综合反应,不能说明辅助性(Th)和抑制性(Ts)细胞在LDR后的功能变化。

PWM激活的CD4⁺、CD8⁺细胞对LPS激活的B细胞分别有辅助作用和抑制作用^[8],LDR作用后,CD4⁺的辅助作用和CD8⁺的抑制作用都增强了,而且在相同剂量下辅助作用的增强大于抑制作用的增强,这和文献[9]研究结果是一致的。由此认为LDR诱导的免疫增强效应,可能是由于LDR激活了免疫调节细胞特别具有辅助作用的CD4⁺细胞,进而促进B细胞的功能加强。过去的观点^[10,11]认为,LDR后Th/Ts细胞数量比例升高或者是超敏的前T细胞自杀刺激了前T细胞的增殖,进而促进免疫效应增强,都因无实验证据而被否定。

机体的免疫功能取决于免疫活性细胞和调节因子,前者主要有Th、Ts和B细胞,它们通过直接接触和调节因子的作用,完成调节功能^[12],即Th促进B细胞分化、诱导细胞毒T细胞和激活巨噬细胞,Ts对B细胞的抑制及对辅助T细胞的抑制。小剂量照射后,ConA诱导的T细胞功能活化,而LPS诱导的B细胞活化不明显^[13],ConA激活的细胞又以Th(CD4⁺)为主^[12],故本实验结果提示LDR主要是激活了CD4⁺细胞,一方面通过上述的调节过程促进B细胞分化成抗体形成细胞,增强体液免疫;另一方面通过促进细胞毒T细胞的诱导,以及释放免疫增强的调节因子(如IL-2, IFN- γ 等)^[14],促进细胞免疫功能,并加强了NK细胞的杀伤力。

参 考 文 献

- 1 Luckey T D. Health Phys., 1982, 43(6): 771
- 2 Liu S Z. Chin. Med. J., 1989, 102(10): 750

- 3 Young C et al. J. Immunol. Methods, 1988, 107(1): 31
- 4 Reinherz E L et al. Clin. Immunol. Immunopathol., 1981, 21(2): 257
- 5 Wysocki L J, Sato V L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, 75(6): 2844
- 6 Reinherz E J et al. J. Immunol., 1979, 123(6): 2894
- 7 刘树铮.中华放射医学与防护杂志, 1989, 9(5): 313
- 8 徐映东, 苏燎原.辐射研究与辐射工艺学报, 1987, 5(4): 58
- 9 杜泽吉, 苏燎原.辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12(1): 59
- 10 Anderson R E et al. Contemp. Top. Immunobiol., 1980, 11: 245
- 11 Kondo S. Int. J. Radiat. Biol., 1988, 53: 95
- 12 苏燎原等.辐射研究与辐射工艺学报, 1988, 6(3): 29
- 13 刘伟宏, 刘树铮.生物化学与生物物理进展, 1990, 17(1): 71
- 14 Zhang L S et al. Int. Symp. Biol. Effect Low Level Expos., Changchun, China, Oct. 12—16, 1993, P 51

EFFECTS ON REGULATION BETWEEN LYMPHOCYTE SUBSETS AFTER LOW DOSE RADIATION

Du Zeji Su Liaoyuan Liu Fenju

(Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT Monoclonal antibodies of anti CD4, anti CD8 and anti B were used to separate CD4⁺, CD8⁺ and B lymphocyte subsets respectively. After low dose X-rays radiation, the regulatory functions of CD4⁺ and CD8⁺ on B cell were studied by using ³H-TdR incorporation. The results indicated that CD4⁺ cell could increase the ³H-TdR incorporation of B cell, CD8⁺ could decrease the ³H-TdR incorporation of B cell. Low dose radiation could enhance the helping effect of CD4⁺ and inhibitive effect of CD8⁺ on B cell at a dose range of 0.02—0.20 Gy, especially at the dose of 0.10 Gy X-rays radiation.

KEYWORDS Low dose radiation, Lymphocyte subsets, Inter-regulation, Biological radiation effects