

小剂量照射后小鼠脾巨噬细胞对脾淋巴细胞功能的影响

陈志云 张 铭 刘树锋

(白求恩医科大学放射生物教研室, 长春 130021)

摘要 采用昆明小鼠, 小剂量 X 射线全身照射 50 mGy~250 mGy, 剂量率为 12.5 mGy/min。照射后不同时间处死动物, 取出脾脏, 用贴壁法分离脾巨噬细胞(M_ϕ)和淋巴细胞, 检测受照后脾 M_ϕ 与受照的脾淋巴细胞功能变化的关系。结果表明, 小剂量辐射可使脾 M_ϕ 功能增强, 主要表现在 75 mGy X 射线全身照射后, 脾 M_ϕ 对脾淋巴细胞 ConA (刀豆蛋白 A) 反应增强, IL-1 (白细胞介素 1) 分泌增多。受照的脾 M_ϕ 只对受照的脾淋巴细胞增强其 ConA 反应, 而对未受照的脾淋巴细胞无显著影响, 未受照的脾 M_ϕ 也不能增强受照的脾淋巴细胞功能。

关键词 小剂量辐射, 脾巨噬细胞, IL-1, 脾淋巴细胞

近年来的研究资料表明巨噬细胞(macrophage, M_ϕ)具有多方面的功能, 它既是免疫效应细胞又是免疫调节细胞, 具有广泛的免疫感应和免疫效应作用^[1-3]。我室已有的研究表明小剂量辐射所致的免疫增强效应可表现在多项免疫学参数上, 但主要是使 T 淋巴细胞激活^[4]。用 0.1 Gy 以下剂量的 X 或 γ 射线全身照射的小鼠和照射后又接受 SRBC 免疫的小鼠, 脾细胞对 ConA 和 IL-2 (白细胞介素 2) 的反应都明显升高, 并出现一系列免疫功能增强。本研究试图从小剂量辐射对小鼠脾脏 M_ϕ 功能的影响, 揭示受照后脾 M_ϕ 的功能变化与脾淋巴细胞免疫功能增强的关系, 为进一步研究 M_ϕ 在小剂量辐射免疫增强效应中的作用提供基础资料。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验动物

昆明种小鼠, 雄性, 体重 22 ± 2 g, 共 102 只, 由本校实验动物部提供。

1.2 照射条件

按本室已报道的方法进行全身照射^[5]。剂量率 12.5 mGy/min, 单次全身照射剂量有 50 mGy、75 mGy、100 mGy 和 250 mGy。

1.3 脾和胸腺细胞悬液制备

按本室已报道方法制备脾和胸腺细胞悬液^[6]。

1.4 脾 m_ϕ 和淋巴细胞的分离、交换培养

在 24 孔板中, 每孔加入 500 μ l 浓度为 5×10^6 /ml 的脾细胞悬液, 摇匀后, 置 37℃ CO₂ 孵箱中, 培养 2 h, 取出培养板, 轻轻摇晃 25 次, 将悬浮细胞(即脾淋巴细胞)按照一定顺序进行交换。交换之前将贴壁的巨噬细胞用 1640 培养液洗涤 2 次。

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1994-11-01, 修改稿 1995-02-14

1.5 淋巴细胞 ConA 反应性的测定

按本室已报道的方法测定淋巴细胞 ConA反应性^[6]。

1.6 M_φ分泌 IL-1 的测定

1.6.1 IL-1 粗提物的制备 常规制备脾细胞悬液,浓度为 $5 \times 10^6/\text{ml}$, 加入塑料小平皿中, 10 ml/皿置 37℃ CO₂ 孵箱中培养 2 h, 轻摇小平皿, 弃悬浮液, 并洗涤 M_φ 两次, 加入 4 ml 含 5 mmol/L EDTA 的 1640 培养液, 放入 4℃ 冰箱中 10 min 后取出, 用滴管吹打片刻, 转移到离心管中, 用 1640 液清洗离心管两次, 调浓度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 24 孔板, 1.0 ml/孔, 然后加入 1.0 ml, 浓度为 20 μg/ml 的 LPS(细菌脂多糖), 立即放入孵箱中培养 48 h, 吸取上清液备用。

1.6.2 IL-1活性测定 应用小鼠胸腺细胞检测法^[9], 每孔加 100 μl $5 \times 10^6/\text{ml}$ 胸腺细胞悬液, 内含 5 μg/ml ConA, 100 μl IL-1 液(将粗提液稀释 1 倍), 对照孔加 1640 培养液。培养 66 h 后, 加入 $1.85 \times 10^4 \text{Bq}/25 \mu\text{l}/\text{孔}$ ³H-TdR, 继续培养 6 h, 用细胞收集器收获细胞, 用液闪仪测定放射性。

1.7 细胞纯度鉴定

将分离的脾淋巴细胞和贴壁的脾 M_φ 都用瑞氏-吉姆萨染色测定其纯度, 脾 M_φ 纯度可达 95%, 淋巴细胞纯度可达 90%。

2 结 果

2.1 不同小剂量全身照射后 24 h, 脾 M_φ 对淋巴细胞 ConA 反应的影响

小鼠接受 50 mGy、75 mGy、100 mGy 和 250 mGy 剂量全身照射后 24 h, 检测照射脾 M_φ (irradiated macrophage, M_i)与未照射脾 M_φ(sham-irradiated macrophage, M_s)对照射脾淋巴细胞(irradiated lymphocytes, L_i)ConA 反应的影响, 发现照射脾 M_φ50 mGy 和 75 mGy 组对照射的脾淋巴细胞 ConA 反应增强, 差异显著($p < 0.01$ 和 $p < 0.05$), 分别是对照组的 133%、147%, 见表 1 所示。

Tab 1. Effect of M_i on the proliferative response of L_i to ConA

Dose/mGy	M _s + L _i (n)	M _i + L _i (n)
50	24427 ± 2742(4) ^(Δ)	32504 ± 3569(4) ⁽²⁾
75	31323 ± 4006(5)	46125 ± 11065(5) ⁽¹⁾
100	13889 ± 3470(4)	16524 ± 5203(6)
250	17015 ± 2712(6)	19384 ± 4264(5)

(Δ)M ± SD (1) $p < 0.05$, (2) $p < 0.01$ vs (M_s + L_i) group (n) = No. of mice

照射的脾 M_φ 对照射的淋巴细胞与未照射淋巴细胞(sham-irradiated lymphocytes, L_s)ConA 反应影响的比较, 表明照射淋巴细胞有增高趋势, 其中 50 mGy 组有显著差异($p < 0.01$), 见表 2。照射脾 M_φ 与未照射脾 M_φ 对未照射淋巴细胞的 ConA 反应, 和未照射脾 M_φ 对照射淋巴细胞

Tab 2. Effect of M_i on the proliferative response of L_i to ConA

Dose/mGy	M _i + L _s (n)	M _i + L _i (n)
50	15903 ± 7744(4) ^(Δ)	32504 ± 3569(4) ⁽²⁾
75	41787 ± 26602(4)	46125 ± 11065(5)
100	13456 ± 8155(4)	16524 ± 5203(6)
250	15933 ± 12762(4)	19384 ± 4264(5)

(Δ)M ± SD (2) $p < 0.01$ vs (M_s + L_i) group (n) = No. of mice

胞及未照射淋巴细胞的 ConA 反应影响均不显著。

2.2 75 mGy全身照射后不同时间脾 M ϕ 对淋巴细胞 ConA 反应的影响

小鼠接受 75 mGyX 射线全身照射后 1 d、2 d、4 d 和 7 d，观察照射脾 M ϕ 与未照射脾 M ϕ 对照射脾淋巴细胞 ConA 反应的影响，结果表明照射后 1 d~7 d，照射的脾 M ϕ 对照射的脾淋巴细胞 ConA 反应均有增强趋势，其中照射后 1d 和 4 d 差异显著($p<0.05$ 和 $p<0.01$)，见表 3。照射脾 M ϕ 对照射脾淋巴细胞与未照射脾淋巴细胞 ConA 反应的影响相比，照射的脾淋巴细胞都有增高趋势，其中照射后 2 d 差异显著($p<0.01$)，见表 4。照射脾 M ϕ 与未照射脾 M ϕ 对未照射脾淋巴细胞的 ConA 反应，和未照射脾 M ϕ 对照射脾淋巴细胞与未照射脾淋巴细胞的 ConA 反应的影响相比较，在各时间点上均无显著差异。

Tab 3. Effect of M $_1$ on the proliferative response of L $_1$ to ConA

Time/d	L $_1$ + M $_1$ (n)	M $_1$ + L $_1$ (n)
1	31323 $\pm$ 4006(5) ^(A)	46125 $\pm$ 11065(5) ⁽¹⁾
2	26918 $\pm$ 18708(6)	45374 $\pm$ 2822(4)
4	11764 $\pm$ 4372(5)	24821 $\pm$ 1913(4) ⁽²⁾
7	21307 $\pm$ 6809(4)	35743 $\pm$ 21065(5)

(^A)M $\pm$ SD, (¹) $p<0.05$, (²) $p<0.01$ vs (M $_1$ + L $_1$) rogup (n) = No. of mice

Tab 4. Effect of M $_1$ on the proliferative response of lymphocytes to ConA

Time/d	M $_1$ + L $_1$ (n)	M $_1$ + L $_1$ (n)
1	41787 $\pm$ 26602(4) ^(A)	46125 $\pm$ 11065(5)
2	23060 $\pm$ 10707(6)	45374 $\pm$ 2822(4) ⁽¹⁾
4	20328 $\pm$ 9335(5)	24821 $\pm$ 1913(4)
7	20814 $\pm$ 7845(5)	35743 $\pm$ 21065(5)

(^A)M $\pm$ SD, (¹) $p<0.01$ vs (M $_1$ + L $_1$) group, (n) = No. of mice

2.3 75 mGy全身照射后不同时间脾 M ϕ 分泌 IL-1 功能的变化

采用胸腺细胞增殖法，取 50% 稀释的 IL-1 粗提液，在亚剂量 ConA 的协同刺激下观察胸腺细胞增殖能力。结果表明，照射脾 M ϕ 分泌 IL-1 的能力有高于未照射脾 M ϕ 的趋势，其中在照射后 2 d，差异显著($p<0.05$)，见表 5。

Tab 5. Activity assay of IL-1 from macrophage after 75 mGy irradiation

Time/d	M $_2$ (n)	M $_1$ (n)
1	9672 $\pm$ 2288(4) ^(A)	14610 $\pm$ 4532(5)
2	7505 $\pm$ 2817(5)	12401 $\pm$ 3961(6) ⁽¹⁾
4	7348 $\pm$ 2255(5)	9533 $\pm$ 4488(5)
7	7362 $\pm$ 2269(4)	8918 $\pm$ 4258(5)

(^A)M $\pm$ SD, (¹) $p<0.05$ vs M $_2$ group, (n) = No. of mice

2.4 75 mGy 全身照射后 24 h，脾淋巴细胞对 rIL-1 反应性的变化

小鼠接受 75 mGy X 射线全身照射后 24 h，用贴壁法除去脾 M ϕ ，用重组白介素 1 (rIL-1, Sigma)10 u/孔 与亚剂量 ConA(2.5 μ g/ml)协同刺激脾淋巴细胞，测定脾淋巴细胞对 rIL-1 的反应性，结果表明照射组脾淋巴细胞对 rIL-1 反应性显著高于对照组($p<0.01$)，见表 6。

Tab 6. Changes in reaction of lymphocytes to rIL-1 at 24 hours after whole body Irradiation

	Sham-irradiated(n)	Irradiated(n)
ConA + 1640	2762±644(6) ^(A)	2188±283(6)
ConA + rIL-1	3263±292(6)	3986±448(6) ⁽¹⁾

(A)M±SD, ⁽¹⁾p<0.01 vs sham-irradiated group, (n) = No. of mice

3 讨 论

本研究主要观察了小剂量 X 射线全身照射后小鼠脾脏 M ϕ 的主要功能变化及其与脾淋巴细胞功能增强的关系。结果表明, 小剂量辐射可使脾 M ϕ 功能增强, 主要表现在 75 mGy X 射线全身照射后小鼠脾 M ϕ 对脾淋巴细胞 ConA 反应增强, IL-1 分泌增多。其 M ϕ 对淋巴细胞 ConA 反应增强的特点是受照射的脾 M ϕ 只对受照射的脾淋巴细胞增强其 ConA 反应, 而对未受照射的脾淋巴细胞无显著影响; 未受照射的脾 M ϕ 也不能增强受照射脾淋巴细胞的功能。检测受照射的脾淋巴细胞对外源性 IL-1 存在时的 ConA 反应性显著增高。

抗原特异性的 T 细胞的活化需要两个 M ϕ 信号, 一是与 M ϕ 结合, 处理并提呈抗原, 这是在 M ϕ 免疫基因产物参与下进行的; 二是 M ϕ 分泌的单核因子-IL-1, 作为 T 细胞活化的第二信号。也有人提出 T 细胞活化的三信号模型, 即 T 细胞要达到最大限度的活化, 必须包括 T 细胞受体 (TCR) 的激活、细胞因子受体的激活和辅佐细胞之间的相互作用^[7]。M ϕ 提呈处理过的抗原作用于 TCR 可激活 T 细胞。IL-1 可增强抗 CD₃ 单抗引发的 T 细胞增殖反应。何礼芳等^[8]认为经 M ϕ 处理的外来抗原, 及 M ϕ 表面自身的 I_a 抗原, 通过 T 细胞受体 (Ti-CD₃) 识别, 并与 M ϕ 表面的 Ag 和自身的 Ag 分子结合, 让 Ag 信号进入静止 T 细胞, 诱导 T 细胞表达 IL-1 受体。M ϕ 可释放可溶性 IL-1, 它是 T 细胞激活的信号, 在活化 T 细胞过程中起着重要作用。IL-1 和 T 细胞表面的 IL-1 受体结合, 促使 T 细胞活化。本实验揭示了小剂量辐射在一定剂量与一定时间内激活了脾 M ϕ , 其释放的 IL-1 增多; 推测受照射的脾淋巴细胞表面其 IL-1 受体可能增多, 故对 IL-1 的反应性相对增高, 促进 T 细胞增殖。

参 考 文 献

- 1 Adams D O, Hamilton J A. Ann. Rev. Immunol., 1984, 2: 283
- 2 Natham C F. J. Cliton Invest., 1987, 79(2): 319
- 3 叶天星.医用免疫学基础(林飞卿主编), 第四章, 上海医科大学出版社, 1989
- 4 刘树铮.中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(5): 229
- 5 刘伟宏, 刘树铮.中华放射医学与防护杂志, 1990, 10(2): 85
- 6 Liu S Z, Qi J, Zhang Y C. 白求恩医科大学学报 1992, 18(3): 209
- 7 Pankewgez O. G. Clin. Immunol. Immunopathal, 1990, 55(1): 66
- 8 何礼芳等.国外医学, 免疫学分册, 1991, 14(2): 60
- 9 杨贵贞等.免疫生物工程纲要与技术, 吉林科学技术出版社, 1991: 17~18

(下接第 192 页 Continued to p192)

EFFECTS OF LOW DOSE IRRADIATION ON TUMOR CELLS AND TUMOR PATIENT'S BLOOD NK ACTIVITY IN VITRO

Tian Hailin Su Liaoyuan

(Department of Medical Radiobiology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT In this paper, relative effects of LDI on NK activity of blood lymphocytes in normal subjects and cancer patients in vitro and effects of LDI on K_{562} cells were studied. NK activity was determined by ^3H -TdR release assay. 21 patients and 10 normal individuals blood were analysed. All samples were irradiated by ^{226}Ra γ -rays with doses 0, 5, 10, 30, 50, 80, 120 cGy separately. The results indicated that the NK activity of lymphocytes in cancer patient's blood increased significantly in 50 cGy irradiation group (120.5% of control). No significant changes were found in other dose groups. While in normal subjects, NK activity increased at both dose groups, 10 and 50 cGy. The peak value of NK activity appeared at dose of 50 cGy. The tendency of the increase of NK activity in normal subjects after LDI was higher than that in patients. There was significant difference of NK activity changes between two groups of persons after 50 cGy irradiation. ^3H -TdR incorporation was used to study the effects of LDI on K_{562} cells. The result showed that ^3H -TdR incorporation in K_{562} cells increased significantly after 10 cGy irradiation. It indicated stimulating effect. As the dose is above 80 cGy, ^3H -TdR incorporation decreased significantly, which indicated that the stimulating effect disappeared.

KEYWORDS Low dose irradiation, Tumor cell, NK activity, Stimulating effect

(上接第 189 页 Continued from p189)

EFFECTS OF LOW DOSE IRRADIATION ON THE SPLENIC MACROPHAGES FUNCTION IN MICE

Chen Zhiyun Zhang Ming Liu Shuzheng

(Department of Radiation Biology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT It is known that low dose ionizing radiation stimulated the immune functions in human subjects and mice. In order to examine the situation of macrophages a series of changes in the immune system in Kunming mice following low dose whole body irradiation were observed based on the study of macrophages from spleen. The present study was designed by whole body X-rays with the doses of 50, 75, 100 and 250 mGy, respectively. The dose rate was 12.5 mGy/min. All the results showed that low dose irradiation may enhance the function of macrophages on the reaction of lymphocytes to ConA, and increase content of IL-1 from macrophages.

KEYWORDS Low dose irradiation, Splenic macrophages, IL-1, Splenic lymphocytes