

乙酰胆碱对小剂量辐射小鼠脾 细胞增殖反应的影响

赵 勇 龚守良 刘树铮

(白求恩医科大学放射生物教研室 长春 130021)

摘要 采用 75 mGy X 射线全身和离体照射昆明系雄性小鼠脾细胞, 观察乙酰胆碱(Ach)对其增殖反应的影响。其结果发现, Ach 增强脾细胞自发增殖能力及对 ConA 反应性; 75 mGy X 射线全身和离体照射后脾细胞增殖反应变化不同, 全身照射后早期增殖更为显著, 而离体照射时似较未受照射细胞为差。提示, Ach 可刺激脾细胞增殖反应, 并在一定程度上具有小剂量辐射早期的刺激作用, 但其在全身和离体照射对脾细胞增殖反应不同, 推测与脾细胞微环境不同有关。

关键词 X 辐射, 小剂量辐射, 乙酰胆碱, 增殖反应

近些年来, 关于乙酰胆碱(Ach)对免疫功能的影响已有许多报道^[1~4], 但有关 Ach 对小剂量照射脾细胞免疫功能的影响尚未见报道。为此, 在观察 5-HT 对小剂量辐射小鼠脾细胞免疫功能影响的基础上^[5], 又观察了 Ach 对正常脾细胞及对小剂量 X 射线照射全身和离体小鼠脾细胞自发增殖能力和 ConA 反应性的影响, 以便探讨 Ach 的免疫调节及其在小剂量辐射免疫刺激效应中的作用。

1 材料与 方法

1.1 动物及动物照射和处理

白求恩医大实验动物部提供雄性昆明系小鼠, 20 ± 2 g。应用 Philips 深部 X 射线机照射小鼠或脾细胞, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤片铜 0.5 mm、铝 1.0 mm; 照射组接受 75 mGy 单次照射, X 射线靶距离 212 cm, 剂量率 12.5 mGy/min, 对照组同时进行假照射。小鼠全身照射后 1、2 d 处死, 取脾, 制备单细胞悬液, 或取正常小鼠脾细胞制备悬液给予照射, 照射后即刻, 进行自发增殖能力及对 ConA 反应性的测定。

1.2 脾细胞悬液制备

小鼠断头后, 在无菌条件下取脾, 置于盛有 RPMI 1640 培养液的平皿中, 采用玻片磨压法及 200 目尼龙网过滤制备单细胞悬液, 调细胞浓度至 1×10^7 u/ml。

1.3 脾细胞自发增殖能力及对 ConA 反应性测定

在 96 孔培养板中, 每孔加 50 μ l 脾细胞悬液, 100 μ l 不同浓度的 Ach (军事医学科学院惠赠)、50 μ l 20 μ g/ml ConA, 自发增殖能力测定孔不加 ConA, 加 50 μ l 培养液。每样设 4 平行孔。于 5% CO₂、37℃ 孵箱中培养 66 h 后, 每孔加 0.5 μ Ci (1.85×10^4 Bq)/25 μ l ³H-TdR, 继续培养 6 h, 收获细胞于 49 型玻璃纤维滤膜上。应用 1214-Packbeta 自动液闪计数仪测其 ³H-TdR 掺入

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿 1995-11-27, 修回 1996-02-26

量, 结果以 cpm 表示。所测数据用 t 检验进行处理。

2 结 果

2.1 离体照射实验

从表 1 可以看出, 在正常的小鼠脾细胞 Ach 各浓度中, 与 0 nmol/L 组比较, 其自发增殖能力具有一定的增强作用; 当 75 mGy X 射线离体照射后即刻, 脾细胞自发增殖能力低于对应 Ach 浓度的正常脾细胞, 但仅 553 nmol/L 组降低明显 ($p < 0.05$), 然而却高于 0 nmol/L Ach 的照射脾细胞。

Tab 1. Effect of Ach on spontaneous proliferations of murine splenocytes immediately after 75 mGy X-irradiation in vitro $\bar{x} \pm s$ (cpm/ 1×10^7 cells) $n = 4$

Ach concentration/nmol L ⁻¹	Normal splenocytes	Irradiated splenocytes
0	13393 ± 1164	12377 ± 1741
0.22	14999 ± 3284	14165 ± 409
1.1	18198 ± 3268 ⁽¹⁾	15263 ± 2685
2.2	15979 ± 2942	13617 ± 625
5.6	15956 ± 747 ⁽¹⁾	14533 ± 945
11.1	18051 ± 2610 ⁽¹⁾	15774 ± 1985 ⁽¹⁾
22.2	15797 ± 1789	13292 ± 1391
111.0	16479 ± 1622 ⁽¹⁾	14784 ± 2063
553.0	19774 ± 2177 ⁽²⁾	16338 ± 1207 ^{(1)(a)}

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, vs 0 nmol L⁻¹ Ach

^(a) $p < 0.05$, vs normal splenocytes with corresponding Ach concentrations

Tab 2. Effect of Ach on response of murine splenocytes to Con A immediately after 75 mGy X-irradiation in vitro $\bar{x} \pm s$ (cpm/ 1×10^7 cells) $n = 4$

Ach concentrations/nmol L ⁻¹	Normal splenocytes	Irradiated splenocytes
0	13842 ± 1455	12663 ± 1569
0.22	14368 ± 1439	12916 ± 1218
1.1	15152 ± 1749	13180 ± 1768
2.2	16280 ± 924 ⁽¹⁾	14638 ± 964
5.6	17007 ± 1844 ⁽¹⁾	15967 ± 1413 ⁽¹⁾
11.1	17408 ± 4808 ⁽¹⁾	16172 ± 1827 ⁽¹⁾
22.2	19308 ± 3591 ⁽¹⁾	17597 ± 1559 ⁽²⁾
111.0	20159 ± 3817 ⁽¹⁾	18853 ± 2273 ⁽²⁾
553.0	16721 ± 3326	22936 ± 1740 ^{(2)(a)}
2764.0	15151 ± 2855	28956 ± 5312 ^{(2)(b)}

⁽¹⁾ $p < 0.05$, ⁽²⁾ $p < 0.01$, vs 0 nmol L⁻¹ Ach

^(a) $p < 0.05$, ^(b) $p < 0.01$, vs normal splenocytes with corresponding Ach concentrations

表 2 所示, Ach 对小鼠脾细胞 ConA 反应性具有增强作用, 并且在浓度 0.22~111 nmol L⁻¹ 范围内, 随着浓度的增加而增加, 但高浓度(553~2764 nmol L⁻¹)不及低浓度增强明显。当 75 mGy X 射线体外照射脾细胞即刻, 随着 Ach 浓度的增加, 脾细胞对 ConA 反应性也增加; 在 Ach 浓度 0.22~111 nmol L⁻¹ 范围内, 脾细胞对 ConA 反应性均低于对应 Ach 浓度的正常脾细胞, 而在高

浓度(553~2764 nmol L⁻¹)却明显高于对应 Ach 浓度的正常脾细胞($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.2 全身照射实验

表3所示,在正常的脾细胞 Ach 各浓度中,与 0 nmol L⁻¹ 组比较,脾细胞自发增殖能力呈现增强趋势,其中 111 nmol L⁻¹ 组增强明显($P<0.05$)。当 75 mGy X 射线全身照射小鼠后 1 d,无论 Ach 存在与否,脾细胞自发增殖能力均明显高于对应 Ach 浓度的正常脾细胞($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而照射后 2 d 回降接近对应 Ach 浓度的正常脾细胞水平。

表4所示,在正常的脾细胞 Ach 各浓度中,与 0 nmol L⁻¹ 比较,随着 Ach 浓度的增加,脾细胞对 ConA 反应性也增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。当 75 mGy X 射线全身照射后 1 d,无论 Ach 存在与否,脾细胞对 ConA 反应性均高于对应 Ach 浓度的正常脾细胞,而且随着 Ach 浓度的增加,其反应性也增加;照射后 2 d,其反应性与照射后 1 d 基本一致。

Tab 3. Effect of Ach on spontaneous proliferations of murine splenocytes 1 and 2 days after whole-body irradiation with 75 mGyX-rays $\bar{x} \pm s$ (cpm/ 1×10^7 cells) $n=4$

Ach concentrations /nmol L ⁻¹	Normal splenocytes	Irradiated splenocytes	
		1 d after irradi.	2 d after irradi.
0	18485 ± 3201	37285 ± 6416 ⁽²⁾	19550 ± 2841
1.1	19750 ± 3982	35956 ± 5055 ⁽²⁾	23054 ± 3315
5.6	20761 ± 3814	33123 ± 4638 ⁽²⁾	22786 ± 2407
22.2	21677 ± 3180	39444 ± 6244 ⁽²⁾	21564 ± 2137
111.0	23213 ± 3879 ⁽¹⁾	37785 ± 5460 ⁽¹⁾	20819 ± 3850
553.0	19712 ± 4320	40971 ± 5728 ⁽²⁾	23104 ± 2705

⁽¹⁾ $p<0.01$, ⁽²⁾ $p<0.001$, vs normal splenocytes with corresponding Ach concentrations

Tab 4. Effect of Ach on response of murine splenocytes to Con A 1 and 2 days after whole-body irradiation with 75 mGy X-rays $\bar{x} \pm s$ (cpm/ 1×10^7 cells) $n=6$

Ach concentrations /nmol L ⁻¹	Normal splenocytes	Irradiated splenocytes	
		1 d after irradi.	2 d after irradi.
0	30531 ± 4678	32604 ± 5528	33849 ± 5310
1.1	42783 ± 11898 ⁽¹⁾	46307 ± 4794 ⁽³⁾	44452 ± 8499 ⁽¹⁾
5.6	55157 ± 10210 ⁽³⁾	64537 ± 3617 ⁽³⁾	62889 ± 7855 ⁽³⁾
22.2	57132 ± 11417 ⁽³⁾	73048 ± 9773 ^{(3)(a)}	74916 ± 12619 ^{(3)(a)}
111.0	73013 ± 12740 ⁽³⁾	80979 ± 9942 ⁽³⁾	77914 ± 9583 ⁽³⁾
553.0	77616 ± 10068 ⁽³⁾	118237 ± 6551 ^{(3)(c)}	106696 ± 12845 ^{(3)(b)}

⁽¹⁾ $p<0.05$, ⁽²⁾ $p<0.001$, vs 0 nmol L⁻¹ Ach,

^(a) $p<0.05$, ^(b) $p<0.01$, ^(c) $p<0.001$, vs normal splenocytes with corresponding Ach concentrations

3 讨 论

结果表明, Ach 可增强小鼠脾细胞自发增殖能力及对 ConA 反应性。说明 Ach 对小鼠脾细胞增殖反应具有一定的刺激作用。Lane 观察到^[1], 胆碱受体激动剂氨甲酰胆碱可使小鼠脾中的细胞毒性 T 细胞杀伤离体肿瘤细胞的能力增强。另有报道, Ach 与 T 细胞作用,可使胞膜产生最大的去极化^[2],促进 T 细胞增殖和杀伤靶细胞^[3]。Marlinski 发现^[4],大鼠胸腺细胞具有与 M 型受体拮抗剂结合的位点。文献资料与本研究结果提示, Ach 对免疫细胞主要表现为刺激效应。另外,发现高浓度 Ach 对正常脾细胞 ConA 反应性不及低浓度增强明显,而离体照射的脾细胞

却随着 Ach 浓度的增加, 对 ConA 反应性也增加。其原因不清, 尚待进一步研究。

结果还证实, 75 mGy X 射线体外照射脾细胞, Ach 使其自发增殖能力及对 ConA 反应性(在一定剂量范围内)似较未照射脾细胞为低; 而 75 mGy X 射线全身照射后 1 d, Ach 使小鼠脾细胞自发增殖能力及其对 ConA 反应性均增高; 照射后 2 d, 其自发增殖能力变化不明显, 而对 ConA 反应性仍增高。提示 Ach 同 5-HT^[5] 一样, 在小剂量辐射免疫刺激效应中起一定作用, 但其在全身和离体照射后对脾细胞的作用机制不同, 可能与脾细胞局部的微环境改变有关。

以往的实验证实, 小剂量全身照射小鼠可引起免疫功能的增强^[6~8]; 但是, 体外小剂量照射小鼠脾细胞, 对 ConA 反应性的增强不明显, 而对 LPS 反应性表现为抑制效应^[8]。实验结果也证实, 全身和离体照射后脾细胞表现不同效应, 当 0 nmol L⁻¹ Ach 正常的和照射的脾细胞两组比较, 离体照射使脾细胞自发增殖能力及其对 ConA 反应性似较正常脾细胞为低, 而全身照射使之增高, 尤其是全身照射后 1 d 脾细胞增殖能力增高明显。上述结果提示, 小剂量全身和离体照射小鼠脾细胞, 由于体内环境不同于体外, 其免疫功能发生了不同的改变。

参 考 文 献

- 1 Lane M A, J. Natl. Cancer, 1978, 61: 923
- 2 Shapiro H M, Strom S B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77: 4317
- 3 Strom T B, Lane M A, George K. J. Immunol., 1981, 127: 705
- 4 Maslinski W, Ryzewski J, Bartfai T. J. Neuroimmunol, 1988, 17: 275
- 5 赵 勇, 龚守良, 刘树铮. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, 3: 173
- 6 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12: 1
- 7 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1989, 7: 247
- 8 刘伟宏, 刘树铮. 辐射防护, 1992, 12: 282

EFFECTS OF Ach ON PROLIFERATIVE REACTION OF MURINE SPLENOCYTES RADIATED WITH LOW DOSE RADIATION

Zhao Yong Gong Shouliang Liu Shuzheng

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

ABSTRACT The present study was designed to observe the effects of acetylcholine (Ach) on the proliferative reaction of the splenocytes irradiated with low dose X-rays in Kunmin male mice in vivo and in vitro. The results showed that Ach enhanced significantly the spontaneous proliferations of the splenocytes and the responses of the splenocytes to ConA. But, the immune functional changes of the splenocytes irradiated with 75 mGy in vivo and in vitro were different. It would increase more in vivo, while less in vitro. These results suggest that Ach may stimulate the splenocyte proliferative reaction and participate in the immunoenhanced effect following low dose radiation to a certain extent. However, the action mechanism of Ach on the immune functional changes of the splenocytes irradiated with low dose X-rays in vivo and in vitro may be different. It is supposed to have relation to the change of the microenvironment of the splenocytes.

KEYWORDS X-radiation, Low dose radiation, Acetylcholine, Proliferative reaction