

小剂量照射的淋巴细胞外液诱导其亚群细胞 DNA 合成的适应性反应⁽²⁰⁾

孔向荣 苏燎原 刘永彪 赵雨杰

(苏州医学院放射医学系 苏州 215007)

摘要 预先给予4.0cGy γ 射线照射的人外周血淋巴细胞,经PHA刺激24h后提取细胞外液,观察其在大剂量照射后受损伤的亚群细胞的影响。结果表明,CD8⁺、CD4⁺细胞损伤明显减轻,且损伤剂量分别为1.5、3.0Gy时,适应性反应最强。结果还显示,CD8⁺细胞较CD4⁺细胞对辐射更为敏感,且在1.5Gy剂量点附近,适应性反应亦更强。

关键词 小剂量辐射,细胞外液,淋巴细胞亚群,适应性反应

以往的研究发现,1.0cGy γ 射线照射人外周血淋巴细胞可明显减轻其后大剂量照射引起的淋巴细胞损伤^[1],证实了小剂量辐射诱导的免疫适应性反应的存在。目前对免疫适应性反应的研究大多集中在小剂量辐射对免疫细胞的直接刺激作用上,考虑到机体的免疫应答依赖于整体调节及细胞间的相互作用,因此本实验着眼于细胞外液介导的小剂量辐射的间接刺激作用,研究了4.0cGy照射的淋巴细胞外液对大剂量照射所致淋巴细胞亚群损伤的影响及特点,这将有助于揭示适应性反应的相关机制。

1 材 料 和 方 法

1.1 淋巴细胞制备

健康献血员静脉血,肝素抗凝,淋巴细胞分离液(上海荣盛试剂厂产)分离出单个核细胞(Mononuclear Cells, MNC),PBS洗3次,最后用RPMI 1640培养液稀释成 $(0.5 \sim 1) \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液,加入无菌培养皿(Corning, USA)中,每皿加3~5ml,37℃静置90min。吸取非贴壁细胞,PBS洗2次,即为淋巴细胞备用。贴壁细胞为单核细胞,收集并计数,供亚群培养时使用。

1.2 McAb 分离CD4⁺、CD8⁺细胞及其纯度、存活率和产额测定

按Wysocki等人^[2]建立的Panning直接法分离亚群细胞。采用间接免疫荧光实验^[3]和台盼蓝拒染法分别鉴定所分离细胞的纯度和存活率。

⁽²⁰⁾ 苏州医学院青年科学基金课题

1.3 D₁ 和 D₂ 照射源及照射条件

D₁ 为小剂量照射, 采用²²⁶Ra γ 源固定于培养箱底部, 在培养箱内搁置三夹板, 照射时将样品置于三夹板上, 辐射源 $38.9 \times 10^7 \text{ Bq}$, 剂量率 0.48 cGy/h , 中央源距 50 cm 。D₂ 为大剂量照射, 采用⁶⁰Co γ 射线源(苏州医学院辐照中心)辐照, 剂量率 1 Gy/min 。

1.4 D₁ 照射的淋巴细胞外液制备

将分离的淋巴细胞制成淋巴细胞悬液, 给予 4 cGy 的 D₁ 照射, 然后用 RPMI 1640 培养液(含 PHA $50 \mu\text{g/ml}$) 调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 37°C 条件下培养 24 h 后, 1500 r/min 离心 10 min , 收集上清液即为所需淋巴细胞外液, 备用。同等条件下培养、收集未受照射的淋巴细胞外液, 以备对照。

1.5 D₁ 照射的淋巴细胞外液对 D₂ 照射的亚群细胞的影响

McAb 分离的 CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞分别用 RPMI 1640 培养液调细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 并分别给予 1.5 、 3.0 、 6.0 Gy 的大剂量照射, 照射后的细胞中立即加入已制备的同源淋巴细胞外液。取培养瓶, 每瓶加亚群细胞悬液及上述制备的淋巴细胞外液各 $100 \mu\text{l}$, 同时加入约 $1/20$ 同源单核细胞, 以最终浓度含 PHA $50 \mu\text{g/ml}$ 的 2 ml RPMI 1640 培养液进行培养, 54 h 后加入 $20 \mu\text{Ci}$ $^3\text{H-TdR}$ ($7.4 \times 10^4 \text{ Bq}$, 放射比活度 $20 \times 10^{10} \text{ Bq/ml}$, 中国原子能科学研究院), 继续培养 16 h , 抽滤制膜, 干燥后用 Beckman LS-6800 液体闪烁计数器(USA) 测量 cpm 值, 设平行样品。结果用 DNA 合成损伤减轻的百分数(DRP) 表示适应性反应的强弱, 即指由 D₁ 照射的淋巴细胞外液诱导的, 对相继大剂量照射所致 DNA 合成损伤的抗性(损伤减轻), 占单纯大剂量照射引起 DNA 合成损伤的百分数。计算公式如下:

$$\text{DRP} = \frac{D_{1+2} - D_2}{D_e - D_2} \times 100\%$$

式中 D_{1+2} 为加 4 cGy 照射的淋巴细胞外液的大剂量照射组的 DNA 合成的 cpm 值; D_2 为加未受照射淋巴细胞外液的单纯大剂量照射组的 DNA 合成的 cpm 值; D_e 为未给任何照射组的 DNA 合成的 cpm 值, 用方差检验对结果作统计学分析。

2 结 果

2.1 CD₄⁺CD₈⁺ 细胞的纯度和存活率

CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞的纯度分别为 89.3% 、 90.1% , 存活率分别为 96.3% 、 96.8% , 可满足实验要求。

2.2 D₁ 照射的淋巴细胞外液对 D₂ 照射的亚群细胞的影响

从表 1 和表 2 中可见。 $^3\text{H-TdR}$ 参入的 cpm 值经平方根转换后作 t 检验表明, 两种细胞各剂量点 D_{1+2} 组与 D_2 组比较, 差别显著($P < 0.05$), 说明 CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞均产生明显的适应性反应, 并且 D_2 剂量影响适应性反应的强弱。CD₄⁺ 细胞最适 D_2 为 3.0 Gy (DRP 为 49.5%), 在 1.5 Gy 照射时适应性反应未得到充分表达(DRP 为 33.9% , 和 3.0 Gy 点比较, $P < 0.05$), 而 6.0 Gy 的照射又超过了诱导的细胞所能适应的程度(DRP 为 14% , 和 3.0 Gy 点比较, $P < 0.01$)。CD₈⁺ 细胞最适 D_2 则为 1.5 Gy (DRP 为 47.83%), 3.0 Gy 照射, 6.0 Gy 照射的 DRP 值均较低。

Tab. 1 Effects of extracellular fluid of lymphocyte irradiated with ⁴cGy on adaptive response of CD₄⁺ cells

	³ H-TdR incorporation $\bar{x} \pm s$ (cpm)		
	1.5Gy	3.0Gy	6.0Gy
D _e		23378.3 ± 3482.06	
D ₂	18981.67 ± 2452.68	15739.5 ± 2826.40	9108.5 ± 1623.96
D ₁ +2	20533.17 ± 3271.73 ⁽¹⁾	19455.33 ± 3246.43 ⁽²⁾	11113.85 ± 1926.45 ⁽²⁾
DRP	33.9 ⁽³⁾	49.5	14.0 ⁽⁴⁾

n=6 vs D₂ group ⁽¹⁾ P<0.05 ⁽²⁾ P<0.01 vs 3.0Gy group ⁽³⁾ P<0.05 ⁽⁴⁾ P<0.01

Tab. 2 Effects of extracellular fluid of lymphocyte irradiated with ⁴cGy on adaptive response of CD₈⁺ cells

	³ H-TdR incorporation $\bar{x} \pm s$ (cpm)		
	1.5Gy	3.0Gy	6.0Gy
D _e		18705.67 ± 2569.29	
D ₂	14122.83 ± 2066.55	12254.17 ± 2033.10	5644.33 ± 805.54
D ₁ +2	16300.83 ± 2066.53 ⁽²⁾	14338.50 ± 2594.73 ⁽¹⁾	7164.17 ± 1348.35 ⁽²⁾
DRP	47.8	35.2 ⁽³⁾	9.6 ⁽⁴⁾

n=6 vs D₂ group ⁽¹⁾ P<0.05 ⁽²⁾ P<0.01 vs 1.5Gy group ⁽³⁾ P<0.05 ⁽⁴⁾ P<0.01

2.3 CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞辐射敏感性差异的比较

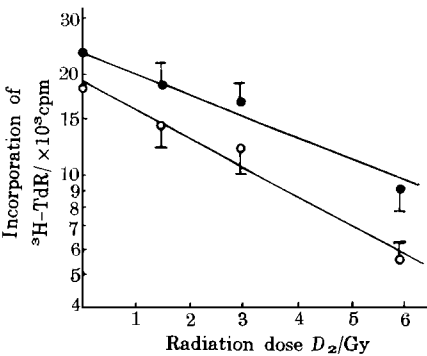


Fig.1 The difference of radiosensitives between CD₄⁺ and CD₈⁺ cells
(●) CD₄⁺ (○) CD₈⁺ n=6

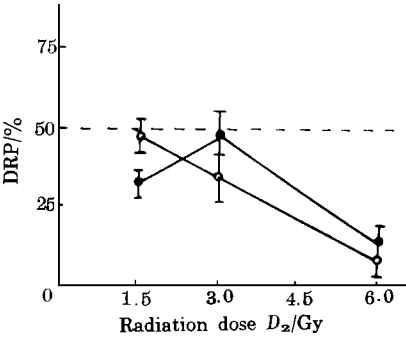


Fig.2 The difference of effect on adaptive response between CD₄⁺ and CD₈⁺
(●) CD₄⁺ (○) CD₈⁺ n=6

以照射剂量(D₂)为自变量, 将 cpm 值(Y) 经对数变换进行直线回归分析, 回归方程如下:

CD₄⁺ 细胞 lgY₁=4.3760 - 0.0686X

CD₈⁺ 细胞 lgY₂=4.2865 - 0.0858X

从图 1 中可知, 上述两条直线分别进行回归系数 b 的显著性检验, 结果均有非常显著意义(P<0.01), 说明回归方程成立. 将两条直线的回归系数 b 作两两比较的显著性检验, 结果

表明差异有显著性($P < 0.05$),说明两种细胞辐射敏感性有显著差别。 CD_8^+ 细胞下降趋势更明显。

2.4 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞适应性反应的差异

从图2中可知, CD_8^+ 细胞 DRP 值随 D_2 剂量的加大而迅速降低, CD_4^+ 细胞 DRP 值则随 D_2 先逐渐升高,至 $3.0Gy$ 时最大,然后迅速降低。在 $1.5Gy$ 剂量点附近, CD_8^+ 细胞较 CD_4^+ 细胞适应性反应更强(经 t 检验, $P < 0.05$)。

3 讨 论

虽然小剂量辐射诱导的适应性反应早期局限于以染色体畸变为代表的细胞遗传学效应的研究,但人们很快在整体、细胞和亚细胞及分子水平上都证实了适应性反应的广泛存在。并在诱导适应性反应的预照射(D_1)、损伤性照射(D_2)及两者间隔时间等方面的规律获得了大量资料。作者的实验证实了小剂量照射的淋巴细胞外液可诱导 CD_4^+ 、 CD_8^+ 亚群细胞 DNA 合成的适应性反应。根据我们已做过的工作(待发表资料)表明, $4.0cGy$ γ 线诱导的人外周血淋巴细胞外液能产生最强的免疫增强效应。故本实验选择 $4.0cGy$ 为 D_1 剂量,攻击剂量 D_2 选取 1.5 、 3.0 和 $6.0Gy$ 三个剂量点。观察结果表明, CD_4^+ 与 CD_8^+ 的最适 D_2 剂量分别为 3.0 、 $1.5Gy$, DRP 值分别达 49.5% 与 47.83% ,细胞损伤减轻非常明显,说明细胞外液能介导小剂量辐射诱导的免疫适应性反应。

该结果对探究适应性反应的机理很有意义。已有实验结果表明适应性反应的诱导可能与蛋白质表达和修复酶类激活有关。Wolff^[4]证实人外周血淋巴细胞在体外接受 $1cGy$ X 射线照射后经双向电泳分析发现有新蛋白质产生,其中两种能与辐射损伤的 DNA 结合。Boothman^[5]报道了 $5cGy$ 照射的人肿瘤细胞株 U1-Mel 及 Hep-2 给予 D_2 前用放线菌酮处理可使适应性反应消失。Ikushima^[6]还发现适应性反应中多聚核糖转移酶(ADPRT)活性增高,此酶对 DNA 损伤修复有重要作用。另外,适应性反应中细胞外 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子浓度也发生变化^[7]。本实验从另一角度反映了小剂量照射的淋巴细胞外液中能够产生或激活某类保护性物质,从而减轻大剂量照射所致免疫细胞的损伤。

另外还发现两种亚群细胞之间存在辐射敏感性和适应性反应的差异。相同剂量照射后, CD_8^+ 细胞损伤程度大于 CD_4^+ ,说明 CD_8^+ 细胞对辐射更为敏感。并且 CD_8^+ 细胞在 $1.5Gy$ 剂量点附近表现出更强的适应性反应,这种差别是否提示适应性反应机制的多层次性还有待进一步实验证实。

参 考 文 献

- 1 杜泽吉,苏燎原,田海林. 辐射研究与辐射工艺学报,1995,13(2):105
- 2 Wysocki L J, Sato V L. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(6):2844
- 3 Reinherz E J, Kung P C, Goldstein G et al. J Immunol, 1979, 123(6):2894
- 4 Wolff S. In: Sugahara T, et al eds. Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms, Amsterdam: Elsevier Science Publisher B V, 1992, 21

- 5 Bothman D A et al. Cancer Res, 1989, 49(10):2871
- 6 Ikushima T. In: International Symposium on Biological Effects of Low Level Exposures to Radiation and Related Agents (ISBELLES), Changchun, China, 1993;37
- 7 Keiichiro Ishii et al. In: International Symposium on Biological Effects of Low Level Exposures to Radiation and Related Agents (ISBELLES), Changchun, China, 1993;37

ADAPTIVE RESPONSE OF LYMPHOCYTE SUBSETS TO LOW DOSE 低剂量⁶⁰Co RADIATION ON DNA SYNTHESIS

Kong Xiangrong Su Liaoyuan Liu Yongbiao Zhao Yujie

(Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT The extracellular fluid was extracted from human peripheral blood lymphocytes cultured with PHA for 24 hours after 4cGy irradiation. The effects of subsequent higher radiation doses on lymphocyte subsets were studied by intermixing the extracellular fluid. The result showed that the radiation damage of CD_8^+ and CD_4^+ were decreased significantly, and the strongest adaptive response occurred at the dose of 1.5Gy and 3.0Gy separately. It also found that CD_8^+ cells was more radiosensitive than CD_4^+ cells and the adaptive response of CD_8^+ was more obvious than that of CD_4^+ at the dose of 1.5Gy .

KEYWORDS Low dose irradiation, Extracellular fluid, Lymphocyte subsets, Adaptive response