

不同剂量 X 射线照射对小鼠巨噬细胞表达 CD80 和 CD86 的影响

金顺子 何淑杰 刘树铮

(白求恩医科大学卫生部放射生物学重点实验室 长春 130021)

摘要 采用免疫组织化学法观察了 X 射线全身照射对小鼠腹腔巨噬细胞及体外照射对培养的小鼠巨噬细胞株 J774A.1 细胞表达 CD80 和 CD86 的影响。结果表明:全身照射和体外照射时 2 Gy X 射线诱导 CD80 表达增高均较 0.075 Gy 为早,而 CD86 对两种剂量的反应无明显区别。剂量效应关系的研究表明,CD80 和 CD86 的表达无论全身照射或体外照射时均在 0.075 Gy 剂量点出现峰值,而在较大剂量照射时出现第二个峰值的剂量则全身照射高于体外照射。实验结果显示,B7 分子的表达上调可能是参与低剂量电离辐射免疫增强效应的重要因素。

关键词 电离辐射,小鼠腹腔巨噬细胞,J774A.1 细胞,CD80,CD86

中图分类号 R811, R146

低剂量辐射免疫增强效应的中心环节是 T 细胞的激活^[1]。淋巴细胞活化的双信号学说认为,单一的抗原信号并不能有效激活 T 淋巴细胞,往往导致 T 细胞的无反应或免疫耐受^[2]。除抗原信号外,T 细胞的激活需要作为第二信号的共刺激因子如 B7 等的参与。B7 分子仅在某些抗原提呈细胞(APC)表面表达,如活化的 B 淋巴细胞、巨噬细胞等^[3]。文献[4]研究证明,获自低剂量全身照射小鼠的腹腔巨噬细胞和脾脏贴壁细胞可增强正常及受照射小鼠淋巴细胞的增殖反应。这种效应可能与受低剂量全身照射小鼠的 APC 表达 B7 分子的变化有关。因此,本工作采用免疫组织化学法(ABC 法),观察不同时间和不同剂量 X 射线对小鼠腹腔巨噬细胞表达 CD80(B7-1)、CD86(B7-2)的影响,并与体外培养的小鼠巨噬细胞株 J774A.1 细胞表达该表面分子的变化进行对比,以观察这两种表面分子在小鼠全身和体外照射后的反应特点。

1 材料和方法

1.1 动物和细胞株

雄性健康昆明种小鼠,体重 18—20g,购自白求恩医科大学实验动物部。随机分为假照射组,不同时间照射组和不同剂量照射组,每组 4 只动物。小鼠巨噬细胞株 J774A.1 为常规传代培养,用 DMEM 培养液(内含卡那霉素 50 μ g/mL,泰来霉素 8 μ g/mL),于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养至指数生长期进行实验。

1.2 试剂

LPS(Sigma 公司);大鼠抗小鼠 McAb—CD80 (Pharmingen 公司),效价 1:10;大鼠抗小鼠 McAb—CD86 (Pharmingen 公司),效价 1:50;生物素化的羊抗大鼠 IgG(二抗)(北京中山生物技术有限公司),效价 1:200;辣根酶标记链亲合素(北京中山生物技术有限公司),效价 1:200;DMEM(Gibco 公司)。

国家自然科学基金(39570188)资助

第一作者:金顺子,女。1965 年 7 月出生,1988 年 7 月毕业于白求恩医科大学环境医学系,博士研究生,讲师

收稿日期:初稿 2000—07—10, 修回 2001—02—19

1.3 照射条件

国产的 X·S·S-250 (FZ)型固定式 X 射线深部治疗机,电压为 200kV,电流 10mA,滤板为 0.5mm Cu、1.0mm Al,靶皮距(靶细胞距)分别为 56 cm 及 247.3 cm,吸收剂量率相应为 0.287Gy/min 及 0.0125 Gy/min。

1.4 方法

1) 断头处死不同剂量 X 射线全身照射及照射后不同时间的小鼠,每个剂量及时间点取 4 只小鼠,取腹腔巨噬细胞,用 PBS 洗 2 次,细胞涂片后用冷丙酮固定,用 3% H_2O_2 甲醇液清除内源性过氧化物酶,加一抗,(非特异组加 PBS)4℃ 过夜,加二抗,37℃ 1h,加辣根酶标记链亲和素,37℃ 1h,用 DAB 显色 7—8 min,用自来水冲洗,最后封片。

2) 不同剂量 X 射线照射及照射后不同时间的 J774A.1 细胞在 37℃、5% CO_2 培养箱内用 LPS(终浓度为 50ng/mL)激活 6 h 后用 0.25% 胰酶消化,收集细胞,PBS 洗 2 次,以下的步骤同方法 1。

1.5 观察分析

在 Northern Eclipse (Empix, Canada) 图像分析仪上通过摄像机将每张涂片摄入,观察 100 个以上细胞中的阳性细胞数。J774A.1 细胞为在 1 张片子上选 5 个视野(减去非特异表达),取均值及标准差。

2 实验结果

2.1 0.075 Gy X 射线照射后不同时间小鼠腹腔巨噬细胞和 J774A.1 细胞表达 CD80 和 CD86 的变化

图 1a 结果表明,当 0.075Gy X 射线全身照射后 24h 时,小鼠腹腔巨噬细胞与 J774A.1 细胞的 CD80 表达最高($p < 0.01$),而小鼠腹腔巨噬细胞 CD86 表达的最高峰出现在照射后 8h, J774A.1 细胞 CD86 表达的最高峰出现在照射后 24h。发现,小鼠腹腔巨噬细胞 CD86 的表达早于 CD80 的表达,而 J774A.1 细胞则两者峰值出现时间一致。

2.2 2.0 Gy X 射线照射后不同时间小鼠腹腔巨噬细胞和 J774A.1 细胞表达 CD80 和 CD86 的变化

图 1b 的结果表明,当 2Gy 全身照射后小鼠腹腔巨噬细胞 CD80 与 CD86 表达达到峰值分别出现在 24h 和 12h,CD86 表达早于 CD80 的表达。然后,逐渐回降,72h 时恢复到假照射组水平,而 J774A.1 细胞经 X 射线照射后 CD80 和 CD86 表达均在照射后 12h 时出现。

2.3 不同剂量 X 射线全身照射后 12 h 时小鼠腹腔巨噬细胞和照射后 24 h 时 J774A.1 细胞表达 CD80 的变化

图 1c 的结果表明,0.075、0.1、0.5、1.0、2.0Gy X 射线全身照射后 12h 时,小鼠腹腔巨噬细胞表达 CD80 明显高于假照射组($p < 0.01$),以 0.075Gy 和 1.0Gy 照射者表达增高最显著。同时观察到低剂量 X 射线照射后 24h 时,J774A.1 细胞的 CD80 的表达普遍高于假照组,以 0.075Gy 照射表达上调最显著,而较高剂量组中只有 0.5Gy X 射线照射组明显高于假照射组($p < 0.01$)。

2.4 不同剂量 X 射线全身照射后 12 h 时小鼠腹腔巨噬细胞和照射后 24 h 时 J774A.1 细胞表达 CD86 的变化

图 1d 的结果表明,0.075、0.1、0.2、0.5、1.0、4.0 Gy X 射线全身照射后小鼠腹腔巨噬细胞表达 CD86 均明显高于假照射组($p < 0.01$),而以 0.075 Gy 照射组表达升高最显著。同

时,发现 0.075、0.1、2.0Gy X 射线照射 24 h 后, J774A.1 细胞的 CD86 表达均高于假照组($p < 0.05$),并且 0.075Gy 与 2.0Gy 的效应相近。

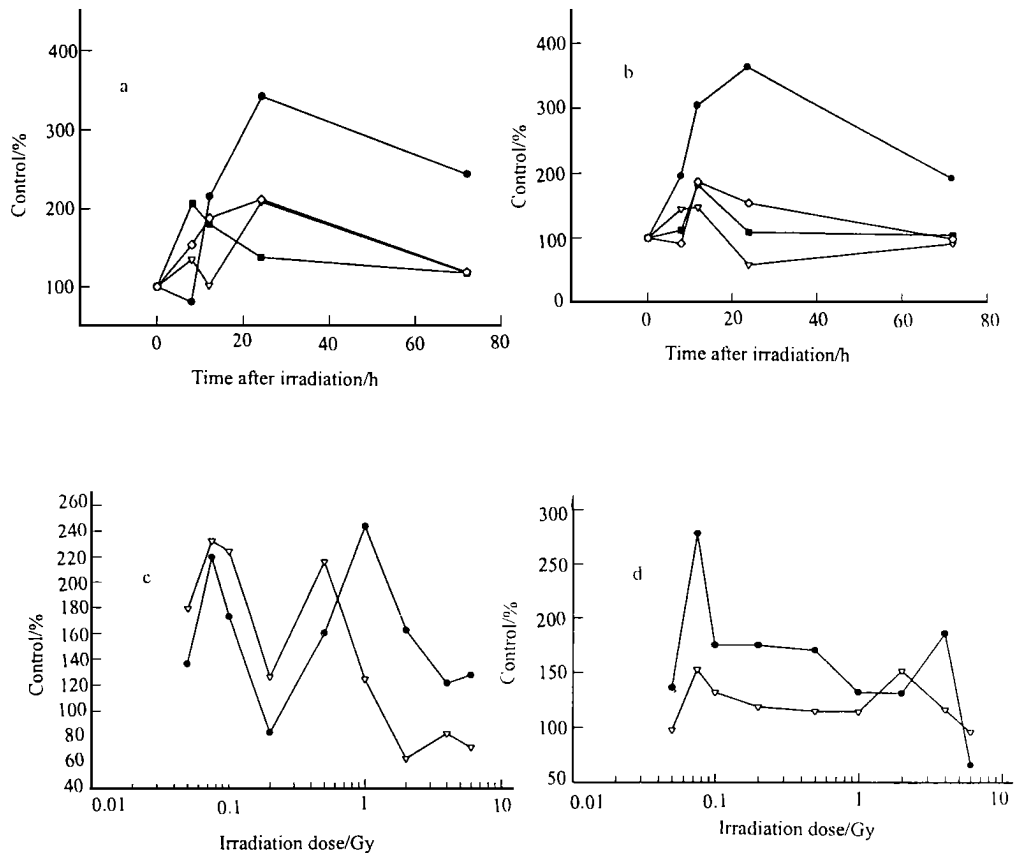


Fig. 1 Time - effect and dose - effect relationship of CD80 and CD86 expression on peritoneal macrophages and J774. A1 cell

a 0.075 ● CD80/macrophage, ▽ CD80/J774. A1, ■ CD86/macrophage, ◇ CD86/J774. A1, b 2Gy ● CD80/macrophage, ■ CD86/macrophage, ◇ CD86/J774. A1, c CD 80 dose - effect ● CD80/macrophage, ▽ CD80/J774. A1, d CD86 dose effect ● CD86/macrophage, ▽ CD86/J774. A1,

3 讨 论

在免疫系统中,巨噬细胞的作用至关重要,其功能包括吞噬、分泌、抗原提呈以及免疫调节等。体内的巨噬细胞一般处于静止状态,当受到异物或细胞因子等刺激后被活化。近年来研究表明,T 淋巴细胞功能激活可能受低剂量照射后巨噬细胞变化的制约,从细胞间协同关系的实验中发现,受照射机体的腹腔巨噬细胞和脾脏的贴壁细胞可增强分离的正常和受照射动物的 T 细胞的增殖反应^[4]。已有实验证实,低剂量辐射诱导 Th1 型细胞因子活化,并增强 IL-12 基因转录和蛋白表达,而 IL-12 诱导 Th1 细胞产生 IFN γ ,IFN γ 又可诱导小鼠腹腔巨噬细胞产生 IL-12,如此形成一个正反馈环路,放大了机体的免疫功能^[5]。Trinchieri 等在人和鼠的 T 细胞中已发现 IL-12 对 CD28、B7 共刺激引起的 T 细胞增殖和细胞因子产生具有协同作用^[6]。文献[7]报道 CD86(B7-2)在活化 B 细胞中的出现明显早于 CD80(B7-1)。

J774A.1 为小鼠巨噬细胞传代细胞系,在 DMEM 培养基中生长良好,具有与小鼠正常巨

噬细胞基本相同的功能,包括吞噬、消化异物和递呈抗原,并表达各种表面抗原,后者在 LPS 诱导下表达明显增高。但与腹腔巨噬细胞不同,它不分泌 IL-12。我们曾用不同浓度 LPS 刺激 J774A.1 细胞 6—24h,均不能在其上清液中测出 IL-12p70。我们在体外实验中,用不同浓度的 LPS 刺激 J774A.1 细胞,观察其表达 CD80 和 CD86 的量效变化。发现 50ng/mL 刺激 6h 变化较适中,因此, X 射线照射后选择该浓度刺激 6h,观察其 CD80 和 CD86 表达的变化。结果发现,在时间—效应关系上,全身照射与体外照射时 2Gy X 射线诱导 CD80 表达增高均早于 0.075Gy,而 CD86 则相反,0.075Gy 组表达增高早于 2.0Gy 组。这说明小剂量 X 射线在免疫反应中使巨噬细胞先表达 CD86,而 2Gy X 射线则使巨噬细胞表达 CD80 早于 CD86。

由于 J774A.1 细胞 CD80 和 CD86 表达的检测均在 LPS 刺激 6h 后进行,其数值均高于腹腔巨噬细胞的表达值。另一方面,巨噬细胞 CD80 表达的时程实验和量效实验中对照值相差较大,可能与动物批次等因素有关,但照射后表达升高的幅度则十分接近。因此,对数据进行相对量的分析,以各组对照值为基准可以看出,0.075Gy 全身照射后 12h, CD80 表达增高的幅度在时程实验中为 215.2% (图 1a),在量效实验中为 219.6% (图 1c); 0.075Gy 体外照射后 24h, CD80 表达增高幅度在时程实验中为 208.4% (图 1a),在量效实验中为 232.4% (图 1c)。随着照射剂量增加, CD80 表达出现第二个峰值,全身照射出现在 1Gy,其幅度为 243.7%,体外照射出现在 0.5Gy,其幅度为 216.2% (图 1c)。以上结果表明了两种条件下 CD80 表达上调的共性。但随着照射剂量增大,全身照射与体外照射的效应则有所不同,体外 2Gy 照射后 24h、72 h, J774A.1 细胞 CD80 表达受抑(图 1b),在量效实验中 2、4、6Gy 照射后均有表达受抑的趋势(图 1c)。但在 2Gy 全身照射后 24h,腹腔巨噬细胞 CD80 表达明显增高(图 1b),而且 4Gy 和 6Gy 照射后的表达仍稍高于对照(图 1c)。CD86 的表达无论全身或体外照射也同样在 0.075Gy 的剂量下出现第 1 个峰值(图 1d); 第 2 个峰值在全身照射后出现于 4Gy 照射后,体外照射出现于 2Gy 照射后(图 1d),而两种条件下均未出现表达受抑的现象。上述差异的原因尚不清楚。文献[8]报道,单核细胞 CD86 的表达为固有型,而 CD80 的表达则为诱导型。另一方面,较大剂量全身照射引起体内复杂的变化。这些是否影响 CD80 的表达,尚待研究。

由图 1c、d 可见,无论全身照射和体外照射, B7 分子的表达增高均在 0.075Gy 照射后出现明显的峰值。此外,我们按 5 种不同分度(无表达为 0, 1/4 表达为+, 1/3 表达为++, 1/2 表达为+++, 2/3 以上表达为++++)分析统计了 CD80 和 CD86 表达的细胞百分数。结果发现: 0.075 Gy X 射线照射后表达 2/3 以上(++++)的细胞百分数较 2 Gy X 射线照射组高,提示低剂量 X 射线诱导巨噬细胞(包括全身和体外照射)表达较高密度(+++以上) CD80 和 CD86 的细胞较多,而较高剂量 X 射线虽然也能诱导其表达,但表达较高密度 CD80 和 CD86 的细胞比例较低,并且受到更大剂量(4—6Gy)照射时 CD80 和 CD86 表达均不增高。巨噬细胞具有较高的辐射抵抗力,剂量—效应关系研究中观察到 CD80 和 CD86 表达上调的两个峰值显然与此有关。但应指出, 2Gy 以上的剂量照射后虽然巨噬细胞的 CD80 和 CD86 表达均可增高,但由于此时淋巴细胞已遭受严重抑制,亦无从诱导免疫反应增强。在低剂量电离辐射增强免疫效应中 T 淋巴细胞激活虽占有关键地位,但还需要 B7 分子的参与。本文提供的资料可为低剂量辐射免疫增强效应的细胞机制提供更深层的解释。

参 考 文 献

- 1 刘树铮. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(4): 217—222

LIU S Z. Chin J Radiat Med prot, 1995, 15(4): 217—222

- 2 Schwartz R H. *Science*, 1990, **248**: 1349—1356
- 3 CHEN L, Ashen S, Brady WA *et al.* *Cell*, 1992, **71**(7): 1093—1102
- 4 孙义敏, 刘树铮. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **180**(2): 108—112
SUN Y M, LIU S Z. *J Radiat Res Radiat Proces*, 2000, **180**(2): 108—112
- 5 LI H S, WANG L. *Foreign Med Sci Sect Immunol*, 1997, **20**(1): 44—46
- 6 Trinchieri G. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 251—276
- 7 Freeman G J, Gribben J G, Boussiotis V A *et al.* *Science*, 1993, **262**: 909—911
- 8 王孟昭. 国外医学分子生物学分册, 1998, **20**(2): 71—75
WANG M Z. *Foreign Med Sci Sect Mol biol*, 1998, **20**(2): 71—75

EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF X RAYS ON THE EXPRESSION OF CD80 AND CD86 IN MOUSE MACROPHAGES

JIN Shunzi HE Shujie LIU Shuzheng

(The MH Radiobiology Research Unit, Changchun 130021)

ABSTRACT The effect of X irradiation on CD80 and CD86 expression in peritoneal macrophages of mice irradiated with whole body irradiation (WBI) and in J774A.1 mouse macrophage cells line irradiated was studied with immunohistochemistry (ABC method). Results showed that the upregulation of CD80 expression induced by WBI and in vitro irradiation with 2Gy X rays appeared earlier than that with 0.075Gy X rays, but no significant difference was found in the response of CD86 to these doses. The study on the dose—effect relationship showed that the expression of both CD80 and CD86 reached its peak at 0.075 Gy after WBI as well as in vitro irradiation with X—rays. The doses inducing the second peak of CD80 and CD86 upregulation were higher in the case of WBI in comparison with the in vitro irradiation. The results suggested that the upregulation of expression of B7 molecules after irradiation may be an important factor involved in the enhancing effect of low dose radiation on immunity.

KEYWORDS Ionizing radiation, Mouse Peritoneal macrophage, J774A.1 cell line, CD80, CD86

CLC R811, R146