

CN8800001

CNIC-00110

SMC-0014

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

^{60}Co γ 射线对伴刀豆球蛋白(Con A)和脂多糖
(LPS)诱导的淋巴细胞的效应



中國核情報中心

China Nuclear Information Centre

CNIC-00110

SMC-0014

^{60}Co γ 射线对伴刀豆球蛋白(Con A)和脂多糖 (LPS)诱导的淋巴细胞的效应

苏燎原 刘克良 马祥瑞 许玉杰 刘芬菊
刘 犁 许昌韶 俞志英 姚德元 高耀明

(苏州医学院)

中国核情报中心

北京·1987.9

摘 要

应用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法研究 Con A 和 LPS 诱导后的淋巴细胞亚群的辐射效应及其相互关系。体外实验说明 Con A 细胞具有激活 LPS 对 B 细胞的诱导作用。当 Con A 细胞受 10Gy 照射后 $^3\text{H-TdR}$ 掺入明显下降, 并失去激活作用。LPS 细胞受照不能被正常 Con A 细胞所激活。两种细胞受照后混合培养出现 Con A 细胞对 LPS 细胞的抑制作用。应用琼脂扩散盒培养法反映辐射对两种细胞的效应更明显。

8例鼻咽癌病人接受一个疗程的 ^{60}Co γ 线治疗后, 其 Con A 细胞的掺入显著下降, 失去激活 B 细胞的作用。LPS 细胞不能被正常 Con A 细胞所激活。本实验提示 Con A 细胞的辐射敏感性比 LPS 细胞高。

关键词 Con A 诱导淋巴细胞 LPS 诱导淋巴细胞 $^3\text{H-TdR}$ 掺入

THE EFFECT OF ^{60}Co γ -RAYS ON Con A AND LPS INDUCED LYMPHOCYTES

Su Liaoyuan LiuKeliang Ma Xiangrui Xu Yujie

Liu Fenju Liu Li Xu Changshao

Yu Zhiying Yao Deyuan Gao Yaoming

(Suzhou Medical College)

ABSTRACT

The effect of ^{60}Co γ -rays on lymphocytes induced by Con A and LPS and the relationship between these two groups of cells were investigated by means of ^3H -TdR incorporation. The study showed that in vitro, Con A cells were able to promote the inducing effect of LPS to B cells. When Con A cells were irradiated by 10 Gy γ -rays, the ^3H -TdR incorporation value reduced significantly and the stimulating effect of Con A cells on LPS cells disappeared. Having been irradiated by γ -rays, LPS cells were not be able to be stimulated by normal Con A cells. When the groups of cells were incubated together after irradiation, the synergistic function disappeared, furthermore the suppressive effect of Con A cells on LPS cells emerged. When these two groups of cells were investigated by means of agar culture, the suppressive effect of 10Gy γ -rays on lymphocytes colony formation was more obvious. Tests on 7 patients who were suffering from carcinoma of nasopharynx showed that after a course of treatment with ^{60}Co γ -rays, the incorporation value in Con A cells became much smaller, the stimulating effect of Con A cells on LPS cells disappeared LPS cells could not be stimulated by normal Con A cells. The study demonstrated that the radiosensitivity of ConA cells is higher than that of LPS cells.

淋巴细胞是机体免疫中最重要的细胞,其不同的亚群辐射敏感性有何差异,值得探讨。作者过去研究了 ConA 诱导细胞的功能^[1],在此基础上进一步研究 Con A 和 LPS 诱导后淋巴细胞在 γ 射线作用下的效应及其相互关系,以反映辐射作用后免疫细胞的障碍及其功能调节的异常。

方法和结果

1. Con A 诱导和 LPS 诱导的淋巴细胞在体外受照后代谢功能的变化

健康人静脉血,肝素抗凝,同一人血分别培养于含 Con A (Sigma, 30 μ g/mL) 和 LPS (Sigma, 20 μ g/mL) 的 Eagle's 培养液中,每瓶 3mL 培养液加血液 0.4mL, 37°C 孵育 96h 后,吸弃上清液,用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)分离淋巴细胞,然后用生理盐水和无丝裂原的培养液各洗涤一次,作为 Con A 诱导的细胞(简称 Con A 细胞)和 LPS 诱导的细胞(简称 LPS 细胞)。

然后将被两种丝裂原诱导的细胞(下简称两种细胞)各分为若干等分,部分接受 ^{60}Co γ 射线照射 10Gy (照射条件:距离 104cm,吸收剂量率 5Gy/min),照射前后的两种细胞按各种组合混合再培养,并设有各种单项培养作对照。每瓶 2mL 无丝裂原的含 10% 人 AB 血清的培养液,加入每种细胞 $1\sim 2\times 10^6$ 个,每批实验所加的同一种体的两种细胞数相等,培养 48h 后,每瓶注入 $^3\text{H-TdR}$ 7.4 $\times 10^4$ Bq/20 μ L, 掺入 24h 后,每个样品加蒸馏水 6ml,转移至具有抽滤装置的 49 型玻璃纤维滤膜上过滤,再用生理盐水,5% 三氯醋酸洗弃细胞外放射性,无水乙醇 3mL 漂白,滤膜经红外灯烘干,置二甲苯闪烁液 (PPO 0.4%, POPOP 0.04%) 内用 Beckman 液体闪烁计数系统测量,每份设复管,数据取平均值。

Con A 细胞与 LPS 细胞接受照射前后混合与单独培养时 $^3\text{H-TdR}$ 掺入的结果见表 1。

表 1 Con A 细胞与 LPS 细胞受照前后匹配培养的 $^3\text{H-TdR}$ 掺入结果 (平均 CPM \pm SD)

	正常 LPS 细胞	受照 10 Gy LPS 细胞	无 LPS 细胞
正常 Con A 细胞	3848 \pm 267	2982 \pm 263	1748 \pm 149
受照 10 Gy Con A 细胞	1958 \pm 244	1332 \pm 218	1155 \pm 113
无 Con A 细胞	1315 \pm 122	1051 \pm 111	

n=11

表 1 中可见正常 Con A 细胞和 LPS 细胞混合培养与两者单独培养的 CPM 之和比较显著增高 ($P < 0.05$), 反映两种细胞有协同作用。

当 Con A 细胞受照,掺入明显下降 ($P < 0.001$),它与正常 LPS 细胞混合培养的掺入也非常显著降低 ($P < 0.001$),混合培养的 CPM 与该两种细胞单独培养的 CPM 之和近似,说明 Con A 细胞已经失去激活 B 淋巴细胞的效应。

LPS 细胞受照后掺入未见明显减少,它与正常 Con A 细胞混合培养的掺入与两种正常细胞混合培养的掺入比较显著降低 ($P < 0.05$),与该两种细胞单独培养的 CPM 之和近似 ($P > 0.05$),说明已经失去协同作用。

两种细胞都受照后混合培养的掺入受抑更明显,比两种正常细胞混合培养的掺入非常显著降低 ($P < 0.001$),也比两种细胞受照后分开培养的 CPM 之和非常显著降低 ($P < 0.01$),

提示照后 Con A 细胞不仅失去激活 B 细胞的作用, 而且出现抑制作用。

2. 淋巴细胞在体外受照后集落形成能力的变化

淋巴细胞分离液, 分离对照组和10Gy 照射组血中的淋巴细胞。然后分别用含 Con A 或 LPS (含量同上) 的培养液, 制成单细胞悬液, 加至含0.3%琼脂适合人血淋巴细胞增殖的培养基中, 每皿接种 5×10^4 个细胞/0.2mL, 放入密封的含饱和湿度和一定浓度的CO₂的容器中, 37°C培养7d收获计数, 生长的集落形态好, 轮廓清楚, 50个细胞以上计为一个集落, 每个人血设三个平行样品, 共检测五例人血, 结果见表2。

表2 γ 射线对Con A细胞与LPS细胞集落形成能力的影响
(平均集落数 \pm SD)

组 别	对 照	受 照 10 Gy	对 照, %
Con A细胞	67.0 \pm 6.98	4.0 \pm 0.54	5.97
LPS 细 胞	82.0 \pm 4.77	9.2 \pm 0.86	11.21

n=5

表中可见, 受10Gy γ 射线照射后 Con A 细胞和 LPS 细胞集落形成受到显著抑制, 比³H-TdR 掺入法反映的辐射效应更明显。其中仍然表现为 Con A 细胞比 LPS 细胞辐射敏感性高。

3. 人体受照后Con A诱导和LPS诱导的淋巴细胞的功能变化

8例鼻咽癌病人接受⁶⁰Co γ 射线治疗一个疗程, 照射剂量106~175Gy, 每个病人各个照射野和照射剂量的乘积之和为15040~30524cm²Gy, 平均值 \pm 标准误为22512 \pm 2190cm²Gy。抽取患者静脉血、肝素抗凝, 分别培养于 Con A 和 LPS 的培养液中, 方法同上, 分别得到 Con A 细胞和 LPS 细胞。同法由健康人静脉血得到 Con A 细胞和 LPS 细胞, 每例病人和一例正常血两种细胞配对混合培养, 掺入实验方法同1., 结果见表3。

表3 γ 射线受照病人与正常人Con A细胞与LPS细胞混合培养的³H-TdR掺入结果
(平均CPM \pm SD)

		LPS		
		正 常 人	受 照 病 人	—
Con A	正 常 人	4970 \pm 350	4430 \pm 634	2535 \pm 289
	受 照 病 人	2432 \pm 351	1439 \pm 220	875 \pm 125
	—	984 \pm 111	689 \pm 79	

n=8

表中仍可见正常 Con A 细胞和 LPS 细胞混合培养与两者单独培养的 CPM 之和比较显著增高 ($P < 0.05$), 反映两种细胞有协同作用。

患者 Con A 细胞掺入非常显著降低 ($P < 0.001$), 它与正常 LPS 细胞混合比两种正常细胞混合培养的掺入非常显著下降 ($P < 0.001$), 与患者 Con A 细胞、正常 LPS 细胞单独培养的 CPM 之和没有显著差异 ($P > 0.05$), 说明已经失去协同作用。

患者 LPS 细胞的掺入没有明显减少 ($P>0.05$)，它和正常人 Con A 细胞混合培养与两种正常细胞混合培养的掺入近似，与患者 LPS 细胞、正常 Con A 细胞单独培养的 CPM 之和没有显著差异，说明已经失去协同作用。

患者两种细胞混合培养的掺入受抑最明显，比以上各组的混合培养的掺入均显著减少。比患者两种细胞分开培养的 CPM 之和近似，也已失去协同作用。

讨 论

Con A 和 LPS 是促进淋巴细胞转化的有效丝裂原，一般认为 LPS 是 B 淋巴细胞的丝裂原。作者成功地建立了检测人血 B 淋巴细胞转化的方法^[1]。Con A 诱导的是 T 抑制细胞或 T 辅助细胞还有争论，作者过去的工作认为 Con A 诱导的细胞具有激活 B 淋巴细胞转化的作用^[1]。本文进一步研究两种细胞的相互关系及其辐射敏感性。

本实验进一步肯定了 Con A 细胞和 LPS 细胞的协同作用，说明 Con A 诱导的细胞具有 T 辅助细胞的功能。当 Con A 细胞在体外受 10Gy 照射或放疗患者的淋巴细胞经 Con A 诱导，其掺入已显著减少，它与正常 LPS 细胞混合培养比两种正常细胞混合培养掺入显著减少，并失去激活 B 淋巴细胞的效应。

LPS 细胞受 10Gy 照射后，掺入虽没有明显降低，但它与正常 Con A 细胞混合培养比该两种正常细胞混合培养的掺入 CPM 显著降低，与受照 LPS 细胞、正常 Con A 细胞单独培养的 CPM 之和近似，说明已经失去被 Con A 细胞激活的效应。

放疗患者的 LPS 细胞，掺入没有明显降低，它与正常 Con A 细胞混合培养与该两种正常细胞混合培养的掺入 CPM 近似，从这个指标看，患者 LPS 细胞受伤较体外受 10Gy 照射为轻。但与患者 LPS 细胞、正常 Con A 细胞单独培养的 CPM 之和无明显差异，反映已经失去被 Con A 细胞激活的效应。

从以上两种细胞的功能对比，提示 Con A 细胞比 LPS 细胞的辐射敏感性高。

两种细胞在体外受照 10Gy 或放疗患者的淋巴细胞受两种丝裂原诱导后的混合培养，其掺入的放射性最低，比其中任何一种细胞受伤的混合培养都明显减少。尤应指出，体外受照的两种细胞混合培养的掺入 CPM 比该两种细胞受照后分开培养的 CPM 之和非常显著降低，说明不仅 Con A 细胞失去激活 B 淋巴细胞转化的作用，而且出现抑制 B 淋巴细胞的作用。按文献[3]指出：Con A 激活 T 细胞，则 T_H 和 T_S 细胞都能起增殖反应，但只有 T_H 细胞成为 T 抑制细胞，抑制 B 淋巴细胞，而 T_S 细胞则能辅助 B 细胞。本结果指示在作者的实验条件下，正常人的 Con A 细胞中 T_H 细胞亚群起主导作用，表现为辅助 B 细胞的转化，而当 Con A 细胞和 LPS 细胞受 10Gy 照射后 T_S 细胞受伤更严重，而 T_H 细胞亚群起主导作用，表现为对受伤的 B 细胞的抑制作用。但受照病人的淋巴细胞受伤程度较轻，其 Con A 细胞尚未出现抑制作用。

本实验除用 3H -TdR 掺入方法反映细胞的代谢功能外，还从形态方法辅助观察细胞的增殖功能，反映细胞体外照射的辐射效应。因为直接观察 Con A 细胞和 LPS 细胞的死亡数有一定困难，作者应用琼脂扩散盒培养法观察细胞集落的形成，可以准确反映两种丝裂原诱导的淋巴细胞的增殖能力。实验结果说明该法反映的辐射效应更严重。这是因为集落法是观察集落后 7 天的结果， 3H -TdR 掺入法则只观察照后 3 天。集落法是淋巴细胞在丝裂原诱导前接

受照射，掺入法则是照射被丝裂原诱导后的细胞，因为受激活的淋巴细胞 DNA 聚合酶的活性较高，有利于修复。细胞集落的形成需要细胞连续不断地增殖，在7天内分裂6次以上，才能超过50个细胞^[4]。而掺入法只需要在注入³H-TdR时有DNA合成即有放射性掺入。

集落法反映受照后 Con A 细胞和 LPS 细胞残留的具有正常增殖功能的活细胞分数。本实验反映了 Con A 细胞比 LPS 细胞的辐射敏感性高，与掺入实验的结果一致，也与作者过去的报道相吻合^[5]。

参 考 文 献

- [1] 辜燎原, 刘克良, 刘芬菊, 徐映东, 耿勇志. 中华微生物学和免疫学杂志, 6(2), 71 (1986)。
- [2] 辜燎原, 薛智谋, 陈光伟, 孙正德, 徐琴秋. 中华微生物学和免疫学杂志2(6), 346 (1982)。
- [3] 洪锦心, 肿瘤4(1), 31 (1984)。
- [4] 刘树铮, 医学放射生物学, 第45页, 原子能出版社, 北京, 1986年。
- [5] 刘克良, 辜燎原, 薛智谋, 陶明山, 马祥瑞, 王明锁, 王洪云, 辐射研究与辐射工艺学报2(1), 56 (1984)。



P.O.Box 2103

Beijing, China

China Nuclear Information Centre