

· 基础研究 ·

低剂量辐射对脐血单个核细胞产生 IL-2 活性的影响

刘长安 张玲¹ 杨光 管增伟 贾廷珍

北京大学第三医院肿瘤治疗中心(北京, 100083)

【摘要】 目的 探讨低剂量辐射对脐血单个核细胞产生的白细胞介素 2(IL-2)生物学活性的影响。**方法** 新鲜分离的脐血单个核细胞接受 62mGy 的 γ 射线照射,在照射后不同培养时间(24h, 48h, 72h),应用 MTT(四甲基偶氮唑盐)法,以 CTLL 依赖株为靶细胞检测培养上清 IL-2 活性。**结果** 低剂量照射后,脐血单个核细胞上清 IL-2 活性随培养时间推移逐渐增幅,不同时间点比较均有显著性差异($P < 0.05$)。在不同培养时间(24h, 48h, 72h),接受低剂量辐射的脐血单个核细胞培养上清 IL-2 活性均显著高于未照射组($P < 0.05$)。**结论** 低剂量辐射可增强脐血 T 淋巴细胞释放的 IL-2 的生物学活性,从而可能在脐血造血干细胞移植时增强移植抗白血病(GVL)效应。

【关键词】 脐血 单个核细胞 白细胞介素 2 低剂量辐射

The effect of low dose irradiation on the expression of interleukin - 2 in the supernatants of cord blood mononuclear cells LIU Changan, ZHANG Ling, YANG Guang, et al. Cancer Treatment Center, Peking University Third Hospital, Beijing, 100083, China.

【Abstract】 Objective To study on the effect of low dose irradiation on the biological activity of interleukin - 2 (IL-2) in the supernatants of cord blood mononuclear cells. **Methods** Freshly isolated mononuclear cells from cord blood were irradiated with 62mGy gamma ray. At different culture time (24h, 48h, 72h) after irradiation, the levels of IL-2 in the supernatants were measured by a bioassay based on CTLL cells, which served as target cells. **Results** The biological activity of IL-2 in the supernatants of cord blood mononuclear cells enhanced increasingly after low dose irradiation. At different culturing time (24h, 48h, 72h), there were significantly higher biological activity of IL-2 in the supernatants of cord blood mononuclear cells irradiated with 62mGy gamma-ray as compared with those non-irradiated (All $P < 0.05$). **Conclusions** It is suggested that enhancement of biological activity of IL-2 released from T lymphocytes in cord blood, which may contribute to the strengthening of the graft-versus-leukemia (GVL) response in cord blood stem cell transplantation, can be induced by low dose irradiation.

【Key words】 Cord blood Interleukin-2 Mononuclear cells Low dose irradiation

白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)是主要由 T 淋巴细胞或 T 细胞系产生的分子量为 15000 的糖蛋白,具有广泛的免疫调节活性和其他生物活性。脐血 T 淋巴细胞释放入血清的 IL-2 水平较低,可能是造成脐血淋巴细胞免疫功能低下、脐血造血干细胞移植中免疫重建延迟、移植抗白血病(GVL)效

应较弱、肿瘤复发率高的原因之一^[1]。我们以低剂量 γ 射线照射新鲜分离的脐带血单个核细胞,在照射后不同培养时间(24h, 48h, 72h),应用 MTT(四甲基偶氮唑盐)法,以 CTLL 依赖株为靶细胞检测培养上清的 IL-2 活性,以研究低剂量辐射对脐血 T 淋巴细胞产生 IL-2 生物学活性的影响,为低剂量辐射免疫兴奋效应在脐血移植及脐血细胞过继性免疫治疗中的临床应用提供实验依据。

1 北京大学免疫学系(北京, 100083)

材料与方 法

1. 脐带血采集及单个核细胞(MNCs)分离: 无菌条件下穿刺脐静脉采集 37~42 周龄足月正常分娩的新生儿脐带血, 体外肝素抗凝(20 IU/ml)。采血 6 小时内应用常规密度梯度离心法分离 MNCs, RPMI 1640 培养液(HyClone)洗涤 2 次, 最后加入含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 计数并调整细胞浓度为 1×10^6 /ml, 细胞悬液中加入刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A, 购自美国 Sigma 公司) $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2. 照射与细胞培养: 采用 GammaCell1000 数控细胞照射仪(MDS Nordion, 加拿大)体外照射新鲜分离的脐血 MNCs, 为¹³⁷铯(¹³⁷Cs)源, 其总放射性活度为 24.05TBq。总吸收剂量为 62mGy, 吸收剂量率 3.72Gy/min。以 0 Gy 照射为对照组。立即加入 24 孔 Nunc 培养板, 于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。培养不同时间(24h, 48h, 72h), 细胞悬液以 1000rpm 离心 10min, 吸取上清液立即置于 -25℃ 冻存, 临用前室温融化。

3. 培养上清液 IL-2 生物学活性检测: 采用 MTT(四甲基偶氮唑盐)法, 以 CTLL 依赖株(由北京大学免疫学系提供)为靶细胞, 其培养、冻存及复苏方法同文献^[2]。用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液将 CTLL 细胞配成 5×10^5 /ml 的悬液, 向 96 孔板的每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 上述细胞悬液, 再取 $100 \mu\text{l}$ 不同稀释度的 rhIL-2 标准品(中化合通生物工程有限公司)和待测上清分别加入各孔, 均设 2 个平行样, 并设培养液对照。于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养 40h 后, 以 1500rpm 离心 5min, 从各孔中轻轻吸弃 $100 \mu\text{l}$ 上清, 各孔再加入 $50 \mu\text{l}$ MTT 溶液(1mg/ml, Sigma), 振荡 1min, 再培养 2h, 离心弃上清, 各孔加入 $200 \mu\text{l}$ 二甲亚砜(DMSO), 振荡 30s, 用酶标仪测 $A_{564\text{nm}}$ 。

4. 统计学处理: 所有变量均表示为 $\bar{x} \pm s$, 以配对设计 t 检验进行统计分析。

结 果

1. 标准剂量反应曲线的绘制: IL-2 活性在 0 U/

ml ~ 50U/ml 范围内与吸光度(A 值)有良好的剂量效应关系, 见图 1。参照文献^[3]利用 SAS 软件包进行标准剂量反应曲线的拟合, 其回归方程式为: $A = 0.012827 - 0.003968D + 0.000508D^2$ ($R_{adj}^2 = 0.9959$, $F = 737.422$, $P < 0.0001$; 式中 D 代表 IL-2 活性)

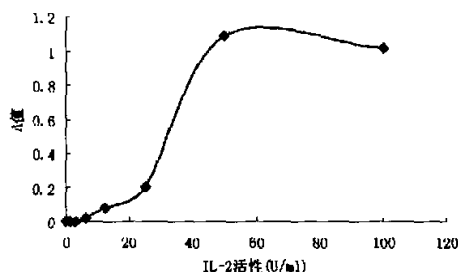


图 1 IL-2 活性标准剂量反应曲线

2. 低剂量辐射对脐血单个核细胞产生的 IL-2 生物学活性的影响: 62mGy 的 γ 射线照射后, 脐血单个核细胞上清 IL-2 活性随培养时间推移逐渐增幅, 不同时间点比较均有显著性差异(P 均 < 0.05), 62mGy γ 射线照射组脐血 MNCs 培养上清 IL-2 活性在不同培养时间点均显著高于对照组(P 均 < 0.05)。见表 1。

表 1 62mGy γ 射线照射对脐血单个核细胞培养上清 IL-2 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

培养时间	n	IL-2 活性(U/ml)		t 值	P 值
		62mGy	0Gy		
24h	10	22.12 \pm 5.44	17.13 \pm 3.76	2.181	<0.05
48h	10	27.29 \pm 0.86**	20.14 \pm 5.56	3.787	<0.01
72h	10	29.41 \pm 2.20***	13.44 \pm 7.60	6.956	<0.001

注: 与培养 24h 组相比, ** $P < 0.01$ (其中 48h 组 $t = 2.900$, 72h 组 $t = 3.931$); 与培养 48h 组相比, * $P < 0.05$, $t = 2.770$ 。

讨 论

早在 20 世纪 60 年代初, 一些学者发现多种来源于植物的外源性凝集素(如 Con A, 植物血凝素等)对淋巴细胞起着有丝分裂原作用。1976 年 Morgan 等^[4]发现小鼠脾细胞培养上清中含有一种刺激胸腺细胞生长的生物活性因子, 由于这种因子能促进和维持 T 细胞长期生长, 当时称为 T 细胞生长因

子(T cell growth factor, TCGF), 1979 年第二届国际淋巴因子会议将 TCGF 统一命名为白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)。IL-2 主要由活化 T 细胞产生, 其主要生物学活性为: 促进活化 T 细胞增殖、分化及产生 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子; 诱导和促进杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)、自然杀伤细胞(NK)、淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)等多种细胞毒性细胞的杀伤活性; 促进 B 细胞增殖、分化和抗体分泌; 活化巨噬细胞^[5,6]。由此可见, IL-2 在免疫反应的产生和调节中起关键作用。

脐血清中低水平的 IL-2 和高浓度的可溶性 IL-2 受体(sIL-2R)反映脐血 T 淋巴细胞发育幼稚、活化程度不足, 以免疫抑制效应占主导地位^[1]。脐血清中高浓度的 sIL-2R 可竞争性抑制细胞膜表面 IL-2R 与 IL-2 的结合, 同时可以中和活化 T 细胞周围的 IL-2, 使 IL-2 廓清加速, 从而抑制 IL-2 的生物学活性, 降低 T 细胞、NK 细胞及 B 细胞等免疫细胞的活性。脐血 T 淋巴细胞产生 IL-2 的能力低下可能是造成脐血造血干细胞移植后免疫重建缓慢、移植抗白血病(GVL)效应较弱、肿瘤复发率高的原因之一。

IL-2 依赖株细胞 CTLL(小鼠杀伤性 T 细胞系)因其生长对 IL-2 依赖, 而对 Con A、植物血凝素(PHA)等有丝分裂原和 IL-2 以外其他细胞因子均无反应的特性, 被用于 IL-2 活性的检测, 通过比较待测样品与标准品之间对 CTLL 细胞促增殖能力的强弱来确定待测样品的 IL-2 活性^[2], 实验结果显示, 在一定范围内有良好的剂量反应关系。

剂量在 0.2Gy 以内的低 LET(传能线密度)辐射或 0.05Gy 以内的高 LET 辐射被认为是低剂量辐射。大量研究证实: 低剂量辐射具有免疫兴奋效应, 其最佳剂量在 50~100mGy 之间^[7]。我们应用低剂量 γ 射线照射新鲜分离的脐血单个核细胞, 观察培养上清 IL-2 活性的变化, 结果表明 62mGy 的 γ 射线照射后, 脐血 MNCs 上清 IL-2 活性随培养时间推移逐渐增幅, 照射组脐血 T 细胞分泌的 IL-2 活性显著高于假照射组。低剂量辐射刺激 IL-2 分泌的机制

尚不明确, 联合国原子辐射效应科学委员会(UNSCEAR)1994 年报告书提出以下模式以解释小剂量照射后淋巴细胞信息传递机制: 小剂量辐射→T 细胞膜分子变化→信息传递易化→[Ca²⁺]_i 和蛋白激酶 C→即刻早期基因转录→IL-2 产生和 IL-2R 表达→细胞激活和细胞增殖^[8]。

低剂量辐射可以促进脐血 T 淋巴细胞 IL-2 的产生, 从而可能增强 T 细胞、NK 细胞及 B 细胞等免疫细胞的活性, 促进 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子的分泌。此前我们的研究表明: 低剂量辐射可诱导脐血 T 淋巴细胞成熟、活化及信号转导的加快, 使其免疫功能趋于成熟^[9]。因此, 脐血淋巴细胞接受低剂量辐射, 诱导部分 T 淋巴细胞发育成熟及 IL-2 的分泌, 可能在脐血造血干细胞移植时更好地发挥 IL-2 的免疫调节作用及 T 淋巴细胞支持造血和免疫重建的调控作用, 增强 GVL 效应, 降低白血病和肿瘤的复发率。利用低剂量辐射处理的脐血淋巴细胞输注进行过继免疫治疗也可能有利于清除微小残留病变(minimal residue disease, MRD)和预防肿瘤复发。

参 考 文 献

- 1 刘长安, 贾廷珍, 邵玉霞. 脐血清中 IL-2、TNF α 及 sIL-2R 的表达水平. 临床荟萃, 2000, 15: 562-563.
- 2 李影林主编. 中华医学检验全书. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 2242-2245.
- 3 刘长安. SAS 在辐射剂量-效应研究中的应用. 中国工业医学杂志, 2001, 14: 10-12.
- 4 Morgan. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science, 1976, 193: 1007-1008.
- 5 These J, Alzari PM, Bertoglio J. Interleukin-2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. Immunology Today, 1996, 17: 481-486.
- 6 Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. Science, 1988, 240: 1169-1176.
- 7 吕兑财. 低剂量辐射兴奋效应及其机制. 国外医学放射医学核医学分册, 2000, 24: 275-281.
- 8 联合国原子辐射效应科学委员会(UNSCEAR)著; 冷瑞平等译. 电离辐射源与效应. 北京: 原子能出版社, 1996. 261.
- 9 刘长安, 杨光, 贾廷珍, 等. 低剂量辐射对脐血 T 淋巴细胞膜分子表达的影响. 中国微创外科杂志, 2001, 1: 114-116.