

T淋巴细胞辐射生物学效应研究的新进展

第二军医大学放射医学研究室 闵锐综述

第三军医大学防原教研室 程天民 罗成基 陈杞* 刘及**审

摘要: T淋巴细胞辐射生物学效应是辐射免疫学研究的重要内容。T淋巴细胞细胞数目减少、比例失调及功能损伤是中等以上剂量电离辐射后机体免疫学功能下降的主要原因,关系着急性放射损伤的治疗及预后。本文从T淋巴细胞的辐射敏感性、辐射对T淋巴细胞分化及分子表达的影响、T淋巴细胞间期死亡机制方面综述近年来的研究进展。

T淋巴细胞是生物体内最重要的免疫活性细胞之一,主行细胞免疫功能并协助、参与体液免疫。与低剂量电离辐射在某些条件下可兴奋机体免疫系统不同^[1-5],中等以上剂量的电离辐射对T淋巴细胞及细胞功能通常只是破坏、抑制或致死效应,这些效应的发生发展与T淋巴细胞的辐射敏感性、受照后T淋巴细胞分化发育及功能分子的表达和活性变化、T淋巴细胞的间期死亡等因素有关。近年来,这些方面的研究不断深入,出现一些新的见解和实验结果,不仅丰富了辐射免疫学研究的内容,也为辐射防护及辐射损伤的救治提供了理论依据。

一、T淋巴细胞的辐射敏感性

各种免疫活性细胞辐射敏感性的研究不仅对评价电离辐射后机体的免疫功能、指导放射损伤的医学救治及远后效应观察有意义,也是移植物抗宿主反应研究中不可缺少的内容。过去的研究揭示,NK细胞、M ϕ 细胞具有较高的辐射抗性;B淋巴细胞较T淋巴细胞对辐射敏感;B淋巴细胞中,不同抗体分泌细胞及细胞发育的不同阶段也有不同的辐射敏感性^[6];T淋巴细胞亚群之间也存在不同的辐射敏感性差别,Ts细胞比Th

细胞敏感。但近来的一些研究结果,尤其是对T淋巴细胞亚群的研究,与过去的发现大相径庭。

在T、B淋巴细胞辐射敏感性的研究方面,对曾暴露于电离辐射人群的免疫学调查表明,与正常人群相比,受照者晚年外周血B淋巴细胞计数无多大变化,但T淋巴细胞计数及对PHA(植物血凝素)、异源性抗原的反应能力显著降低。虽然一定年龄范围内,人外周血T、B淋巴细胞及功能随年龄增加而下降,但T、B淋巴细胞生发组织及细胞本身的辐射敏感性不同,其损伤程度也会出现明显差别。因此,辐射敏感淋巴细胞的生发组织辐射损伤后功能障碍可能是T淋巴细胞计数及功能异常的主要原因^[7]。

有关T淋巴细胞亚群间辐射敏感性的研究认为,如果这种辐射敏感差异确实存在,则一次全身大剂量的电离辐射应该选择性地清除辐射敏感的T淋巴细胞亚群,而选择后的人外周血T淋巴细胞应表现出更高的辐射抗性。然而,Nakamura等^[8]对曾接受大于1.5Gy,小于0.05Gy电离辐射的人群外周血T淋巴细胞D₀值进行观察,发现两组D₀值基本一致,剂量大于1.5Gy组,外周血T淋巴细胞的辐射抗性并不高于0.05Gy以下受照组。将人外周血T淋巴细胞分成CD₄⁺, CD₈⁺和

* 第二军医大学放射医学研究室 ** 长春白求恩医科大学

CD₄⁺CD₈⁺三群,用流式细胞仪分别进行剂量活存率测定,三群细胞的D₀值分别为3.13±0.10Gy, 3.34±0.50Gy和3.14±0.17Gy,组间无显著差异,表明外周血T淋巴细胞辐射敏感性基本上是均一的^[9]。动物实验也未发现脾细胞内CD₄⁺,CD₈⁺细胞辐射敏感性的差异,受照组织中亦未发现死亡的CD₈⁺细胞^[10]。

过去常认为Ts和Th细胞辐射敏感性的差异是造成电离辐射后,T淋巴细胞乃至机体细胞免疫和体液免疫功能失调的原因之一,现在认为这种观点值得进一步探讨。即使Ts, Th细胞间辐射敏感差异确实存在,电离辐射后体内Th/Ts值的变化也并非仅仅取决于Ts, Th细胞值的本身, Macklis等^[11]发现Hodgkin's病人淋巴结治疗性照射后,外周血中具有CD₁₆标志的NK细胞比例显著增加,这些细胞虽然缺乏完整的T细胞CD₃标志,但一半细胞具有CD₈标志,这种CD₁₆⁺CD₈⁺ NK细胞的增多也可显著引起体内Th/Ts值的减少,而且这种变化可持续数年。

另一种影响T淋巴细胞辐射敏感性的因素可能与年龄、性别有关。Wangh等^[12]发现新生儿脐带血T淋巴细胞辐射敏感性高于儿童及成年人外周血T淋巴细胞。不同性别成人之间外周血T淋巴细胞的辐射敏感性差别不显著^[13]。

二、辐射抗性T淋巴细胞前体细胞的分化及表面抗原表达

一般认为,细胞的辐射敏感性与细胞的分裂能力成正比,与分化程度成反比,幼稚细胞的辐射敏感性大于成熟细胞。从现在的一些实验结果看,这种叙述并不完整。Dunn等^[14]发现被激活及受免疫学诱导的T淋巴细胞,可从辐射敏感状态转变为高度抗辐射状态,转变后的细胞功能并未丧失,说明在辐射作用下部分T淋巴细胞仍能正常发育。在移植抗宿主的研究中,供体淋巴细胞6Gy

射线照射后,某些T淋巴细胞反被激活而功能增强,预示在淋巴细胞生发组织中存在辐射抗性的T淋巴细胞^[15]。进一步深入研究证明,胸腺内确有不同辐射敏感的组分,某些T淋巴细胞前体细胞的辐射抗性可高达20Gy以上^[16]。这些辐射抗性前体细胞分化途径及过程与正常细胞无明显不同。小鼠经8Gy照后5天,胸腺内主要由Thy-1低L3T4⁺/Lyt-2⁻细胞组成;照后7天,细胞发育为Thy-1高L3T4⁺/Lyt-2⁺及一定数量的Thy-1高L3T4⁻/Lyt-2⁻细胞群;照后14天,胸腺内细胞变为Thy-1高H-2低L3T4⁺/Lyt-2⁺细胞^[17]。同样,在8Gy剂量照射后,胸腺内少量具有CD₃⁺或F23.1⁺标记的CD₄⁻CD₈⁻细胞,多数表达高水平的Thy-1, H-2K和PNA(花生凝集素)抗原,照后5天出现高水平的Pgp-1(由CD₄₄识别的膜成份)表达,7~9天表达渐弱,照后7~8天,一过性表达IL-2R^[18]。实验还证明,辐射抗性细胞前体细胞在胸腺内成熟,经由IL-2/IL-2R通路,CD₄⁻CD₈⁻双阴性细胞在胸腺内成熟为CD₄⁺CD₈⁺, CD₄⁺CD₈⁻和少量CD₄⁻CD₈⁺细胞后,迁移至胸腺以外^[19-20]。

比较受亚致死剂量照射后,胸腺内辐射抗性细胞与正常细胞的发育过程,基本可以认为成熟细胞的抗辐射性不是后天获得,亦不是环境因子的贡献,而是先天性的。某些细胞在幼稚阶段即具辐射抗性,可正常发育为成熟细胞。然而,这些成熟细胞与非辐射抗性正常细胞在功能上是否有什么不同,目前尚不清楚。研究胸腺内辐射抗性细胞分化的方法亦可用来研究正常T淋巴细胞自干细胞的分化途径,及胸腺内有关T淋巴细胞阴性或阳性选择的机制^[16]。

三、电离辐射后T淋巴细胞表面T细胞受体基因重排及基因表达顺序

TCR(T淋巴细胞抗原受体)属于免疫球蛋白超家族成员,有 $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 四个亚单位,常

与CD₃组成复合物出现在T淋巴细胞表面,与接受抗原刺激、传递刺激信号及细胞激活有关。TCR基因重排发生于T淋巴细胞正常发育的过程中,但在电离辐射作用下,重排频率显著增高,常导致编码蛋白分子量的改变及基因缺失,影响TCR的正常表达及功能。X射线分次照射诱导的胸腺瘤中,可见特异的TCR基因重排现象,用不同的TCR cDNA探针探测发现持续的 γ 链基因重排,少量 β 链基因重排,无 α 链基因重排。然而与正常胸腺组织内T淋巴细胞相比,虽X射线照射诱导的胸腺T淋巴细胞TCR γ 链基因表达显著,降低、 α 链表达也低于正常,但 β 链表达与正常无显著差别^[21]。小鼠全身亚致死剂量照射后,胸腺内抗辐射细胞发育过程中,TCR基因表达顺序的研究表明:照后7天胸腺内Thy-1高L3T4⁻/Lyt-2⁻细胞表达大量的 γ 链基因产物,几乎没有 α 、 β 链基因表达;照后14天,细胞发育为Thy-1高H-2低L3T4⁺/Lyt-2⁺细胞,TCR基因产物主要是 β 链, α 链,而 γ 链产物降到最低^[17]。Kishihara等^[22]用6Gy剂量照射小鼠得出上述类似结果,同时对照后7天,主要由CD₃⁺CD₄⁻CD₈⁻细胞表达的 γ 、 δ 链基因核苷酸序列分析发现,14个 γ 链互补DNA测到7个功能转录本,分别由V γ_{2-1} 、V γ_{2-c} 、V γ_2 或V γ_{1-1} 、V γ_{4-c} 和V γ_4 基因片段组成;10个 δ 链互补DNA测到1个功能转录本,分别由V δ_{M23-D} 、V δ_{1-D} 、V δ_{2-1} 和 δ_{1-c} 构成。为研究TCR基因组份克隆选择发生的阶段,Yuuki等^[23]详细观察AKR鼠受亚致死剂量照射后,早期不同抗原表达的T淋巴细胞亚群TCR基因表达及时序,发现照后7天,胸腺内大量CD₄⁺、CD₈⁺暴增样细胞,CD₄⁻CD₈⁻细胞只占15%~25%,少量CD₃高CD₄⁺CD₈⁻/CD₄⁻CD₈⁺细胞、CD₄⁻CD₈⁻细胞中,约22%CD₃高,其中约27%(整个CD₄⁻CD₈⁻细胞的6%)为F23.1⁺。比较照后7天胸腺细胞18个功能 β 链cDNA V区全部组份,和照后14天从大量CD₃低CD₄⁺CD₈⁺细胞及少量

CD₃高CD₄⁺CD₈⁺细胞得到的20个功能 β 链cDNA V区全部组份,发现与过去在异常BALB/C鼠胸腺细胞上的发现显著不同,不同时间表达在胸腺细胞上V β 基因全部组份的分布高度一致。结果表明,无论是阴性还是阳性选择,TCR V β 基因全部组份的克隆选择发生在T细胞分化的早期阶段,即发生在暴增样CD₄⁺CD₈⁺胸腺细胞阶段。

四、辐射致T淋巴细胞间期死亡的可能机制

淋巴细胞属高辐射敏感细胞,即使很低剂量的照射也可发生间期死亡。过去普遍认为辐照后细胞通透性的改变、细胞能量代谢障碍及细胞核损伤是造成间期死亡的主要原因。近来又提出一些新的可能机制:1、认为在高辐射敏感细胞的间期死亡过程中,有一种被激活的自分解过程起主要作用。利用儿童具有CD₁、CD₄和CD₈标志的淋巴细胞样淋巴瘤建立在裸鼠上的淋巴瘤模型,低剂量照射后,诱导出具有形态学和生物化学特征的自分解过程。其形态学特征可由扫描电镜观察到,生物化学特征则以胞内游离DNA增多及碎片出现为标志。整个自分解过程需要合成一种新的特异蛋白^[24],这类蛋白可能与PKC(蛋白激酶)有关;2、Khanoson等^[25]认为辐射致T淋巴细胞死亡不过是通常情况下细胞死亡的一种特例。电离辐射、诱导细胞终末分化的因子及细胞的自然死亡均表现为激活了某些特异基因,这种基因编码出细胞分解过程中所需要的特异蛋白;3、Eidus等^[26]认为辐射诱导的间期死亡与培养细胞的浓度有关。小鼠胸腺细胞照后,培养细胞浓度为 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 细胞/ml时,细胞固缩和死亡与文献报道一致;细胞浓度为 2×10^5 细胞/ml时,即使照射量增加到50Gy也未发生细胞固缩和死亡。认为细胞间期死亡与受照淋巴细胞和胸腺内具有杀伤活力的细胞相互作用有关,抑制杀伤细胞与靶细胞

的结合对细胞间期死亡没有影响,而抑制细胞毒因子的分泌或在细胞膜上的相互作用可阻止细胞的间期死亡,说明造成细胞间期死亡的细胞间相互作用,不是杀伤细胞直接粘附到靶细胞上直接攻击杀伤,而是通过细胞毒因子的分泌。上述三种观点都涉及发生在间期死亡过程中一种蛋白或因子的合成或分泌,那么这种蛋白或因子是何物,值得进一步深入研究。

总之,因为(1)T淋巴细胞有较高的辐射敏感性,低于0.05Gy的电离辐射便可产生可测出的生物学性能的改变^[27]; (2)T淋巴细胞从骨髓干细胞分化、到抗原诱导直至成为效应细胞的整个过程已了解较清楚^[28]; (3)对与T淋巴细胞增殖及受抗原刺激后转化有关的代谢过程、分子水平的变化都有特定的观察指标^[29]; (4)与年龄、性别等影响T淋巴细胞生物学功能有关的因素已基本掌握^[30]; (5)T淋巴细胞易获得,可重复采样并可体外克隆培养,有利于长期动态观察^[31]。因此,不仅辐射免疫学研究,在诸如辐射遗传、辐射生物剂量、辐射远后效应观察甚至造血干细胞分化等方面的研究中,亦用T淋巴细胞作为工作模型。然而,有关电离辐射致T淋巴细胞功能损伤和抑制的机制研究并不多,分子水平的工作更少。对于辐射后T淋巴细胞表面的一些重要功能分子,如TCR/CD₃复合物、CD₂及CD₂₈IL-2R, LFA_s(淋巴细胞功能相关抗原), ICAM_s(细胞间细胞粘附分子),在基因、表达及功能水平的变化与T淋巴细胞功能损伤和抑制的关系方面,国内外尚未见系统的研究报道。

参 考 文 献

- 1 Sagan LA et al. Health phys, 1990; 59(1): 11-13
- 2 Makinodan T et al. Health Phys, 1990; 59(1): 29-34
- 3 Wolff S et al. Mutat Res, 1991; 250:

- 229-306
- 4 Shadley JD et al. Mutat Res, 1992; 265: 273-218
- 5 Liu SZ et al. Acta Biol Hungarica, 1990; 41(1-3): 149-157
- 6 Uckun FM et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1991; 21(6): 1553-1560
- 7 Akiyama M et al. J Radiat Res, 1991; 32 (Suppl): 301-309
- 8 Nakamura N et al. J Radiat Res, 1991; 32(suppl): 327-329
- 9 Nakamura N et al. Radiat Res, 1990; 123(2): 224-227
- 10 De Ruysscher D et al. Radiother Oncol, 1990; 18(4): 229-305
- 11 Macklis RM et al. Cancer, 1992; 69(3): 778-783
- 12 Wang AP et al. Int J Radiat Biol, 1991; 59(3): 767-776
- 13 Green MH et al. Int J Radiat Biol, 1991; 59(3): 749-765
- 14 Dunn PL et al. J Leukoc Biol, 1991; 49(4): 388-396
- 15 Vasin MV et al. Radiobiologia, 1991; 31(3): 368-371
- 16 Toki J et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(17): 7548-7551
- 17 Tomooka S et al. J Immunol, 1987; 139(12): 3986-3990
- 18 Ayukawa K et al. Thymus, 1990; 15(2): 65-78
- 19 Ditten GR et al. Science, 1991; 251(4998): 1228-1231
- 20 Zuniga Pflanz JD et al. J Immunol, 1990; 144(10): 3736-3740
- 21 Amari NM et al. Mol Cell Biol, 1987; 7(12): 4159-4168
- 22 Kishihara K, et al. Eur J Immunol, 1988; 18(6): 841-417
- 23 Yuuki H et al. J Immunol, 1989; 142(10): 3683-3691
- 24 Igarashi T et al. Exp Hematol, 1990; 18(7): 824-831

25 Khanson KP et al. Vestn Akad Med Nauk SSSR, 1990; (2):34-39

26 Edidus LK et al. Radiat Res, 1990; 123 (1):17-21

27 Anderson RE. et al. Am J Pathol, 1979; 97(3):456-472

28 Golub ES, Immunology: A Synthesis, Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc. 1987

29 Crabtree Gr. Science, 1989; 243(4889):355-361

30 Mukinodan T et al. Arch Pathol Lab Med, 1987; 111(10):910-914

31 Prosser JS et al. Int J Radiat Biol, 1990; 58(2):293-301

辐射对天然杀伤细胞及其活性的影响

军事医学科学院放射医学研究所 王宜强综述 王珏 刘树铮*审

摘要:天然杀伤细胞是机体非特异性细胞免疫的一个重要组成部分,在辐射免疫学中占一定地位。NK活性对辐射的敏感性和受照后的变化动力学都具有很强的异质性,但NK活性对辐射具有相对耐受性的观点,已被公认。辐射对NK活性的作用主要是影响NK细胞的杀伤能力,而对其数量、存活力等影响较小。本文还综述了遗传、射线种类、照射方式、IL-2等影响NK活性辐射敏感性的因素,以及NK细胞与辐射致癌的关系。

七十年代初,人们在研究细胞介导的细胞毒作用时,发现来自正常人或动物淋巴细胞可以杀伤肿瘤细胞,并把这种不需抗原刺激、不依赖于抗体和补体存在、不受主要组织相容性抗原限制的细胞毒作用称为天然杀伤(NK)活性,介导NK活性的细胞称为NK细胞^[1-3]。这是一组在来源、形态、功能、调节等方面都有很强异质性的细胞群。现在普遍认为NK细胞来源于骨髓干细胞,为非T、非B性,属大颗粒淋巴细胞(LGL),具有抗肿瘤、抗病毒、介导骨髓移植排斥等作用,参与多种生理过程的调节,同时也受多种因子的调控。NK细胞杀伤溶解靶细胞要经过效靶细胞结合、NK细胞活化、毒素因子(如NK细胞毒因子NKCF,胞溶素CL等)释放及与靶细胞结合、靶细胞裂解等过程。

一、NK细胞的辐射敏感性

细胞受射线作用后发生形态、结构、功

能的变化,表现为破坏、死伤、功能抑制或丧失。淋巴细胞是辐射敏感的细胞之一,而NK细胞较T、B细胞则不敏感。据报道人外周血淋巴细胞(PBLC)受 γ 射线照射后,T、B各亚群存活曲线的 D_0 值为0.5~5.5Gy,而其对肿瘤细胞的NK活性的效应-剂量曲线的 D_0 值为7.5~8.5Gy^[4],有些资料^[5]显示后者还要大(>15Gy)(本文中除特殊说明者外,人PBLC或人外周血单个核细胞(PBMC)照射均在体外)。刘树铮^[6]报道小鼠受X射线全身照射(TBI)24小时后,胸腺和脾脏各种指标的 D_{37} 中,脾脏NK活性的 D_{37} 值(16.4Gy)大于T、B各亚群数量或功能的 D_{37} 值(0.65~11.15Gy)。NK细胞对辐射的反应各家报道很不一致,反映了NK细胞辐射反应性的强异质性。有报道10Gy γ 射线照射对人PBLC的NK活性和克隆形成抑制活性(CIA)影响不大^[7],甚至有些人的NK活性对30Gy仍抗拒,但大多数报道认为4~5Gy的X射线或 γ 射线即可引起

*白求恩医科大学