

γ射线辐照外周血单个核细胞对人胃癌 MKN - 28细胞的杀伤作用

张献清^{1,2}, 吴道澄¹, 穆士杰², 刘忠湘³, 夏爱军², 黄晓峰⁴, 安群星²

中图分类号: R331⁺42 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 714X(2007)03 - 0270 - 03

【摘要】 目的 观察 γ射线辐照外周血单个核细胞对培养人胃癌细胞系 MKN - 28细胞的杀伤作用。方法 实验设 MKN - 28肿瘤细胞对照组、单纯外周血单个核细胞对照组、照射和未照射的外周血单个核细胞与肿瘤细胞共培养组,照射剂量为 0.5 ~ 3Gy。利用吖啶橙 溴化乙锭(AO/EB)荧光双染色法,观察外周血单个核细胞对肿瘤细胞的杀伤情况。结果 在外周血单个核细胞照射后各组培养至 144h均有大量细胞死亡,存活细胞明显少于未照射组,培养至 240h时,照射与非照射组中存活的外周血单个核细胞均减少,但是在照射的各组中减少更为明显。在外周血单个核细胞与 MKN - 28肿瘤细胞共培养组中,各照射组间在培养 72h内无明显差异,在共培养 96 ~ 240h时,0.5 ~ 2Gy γ射线照射外周血单个核细胞对胃癌细胞的杀伤作用明显增强,尤其是 1Gy组。而 2.5 与 3Gy γ射线辐照组对肿瘤细胞的杀伤作用明显低于 0.5 ~ 2Gy各组,在培养至 240h时,仍有肿瘤细胞存活并出现增生。结论 γ射线辐照对某些外周血单个核细胞有损伤作用,0.5 ~ 2Gy γ射线辐照的外周血单个核细胞杀伤肿瘤细胞活性增强,肿瘤细胞对辐照后的外周血单个核细胞有趋化及细胞毒作用,2.5Gy和 3Gy γ射线辐照对分离后的外周血单个核细胞对肿瘤细胞杀伤有抑制作用。

【关键词】 外周血单个核细胞, γ射线, 胃癌细胞

Killing Effect of Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiated by γ ray on Human Gastric Cancer MKN - 28 cell
ZHANG Xian-qing WU Dao-cheng MU Shi-jie et al *The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710038 China*

【Abstract】 Objective To observe the killing effect of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) irradiated by γ ray on cultured human gastric cancer cell line MKN - 28. **Methods** The experiment were divided into MKN - 28 tumor cell control group, PBMCs groups and MKN - 28 cells with irradiated or non - irradiated PBMCs co - culture groups. Radiation dosage were from 0.5 to 3Gy, acridine orange / ethidium bromide (AO/EB) staining were used to observe the kill effect of PBMCs on tumor cells in different period. **Results** After culture for 144h, the dead cells of several dosage irradiated PBMCs are much more than those of non - irradiated PBMCs group. At 240 hours of culture, the alive PBMCs decreases in number in both irradiated and non - irradiated groups, but decreases in irradiated groups are more obvious. After culture for 72 h in the co - cultured groups, the difference is not evident among all radiation dosage groups. After 96 ~ 240 h of co - culture, the killing effect of 0.5 ~ 2Gy irradiated PBMCs on tumor cells is very strong, especially in 1Gy group, but the killing effect of PBMCs irradiated by 2.5 ~ 3Gy on tumor cells were weaker than that of 0.5 ~ 2Gy irradiated groups. At 240 hours co - cultured groups irradiated by 2.5 ~ 3Gy, tumor cells still survive and proliferate. **Conclusion** Gamma ray irradiation have killing effect to some PBMCs. The cytotoxic effect of PBMCs irradiated by 0.5 ~ 2Gy on tumor cells were increased. Chemotaxis and cytotoxic effect of tumor cells to postirradiated PBMCs were also found. The killing effect of PBMCs irradiated by 2.5 and 3Gy on tumor cells were restrained.

【Key words】 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC); Gamma Ray; Gastric Cancer Cells

辐照后的全血回输后可提高患者癌症患者抗辐射能力,但对于 γ射线辐照外周血分离的单个核细胞的抗肿瘤活性,尤其是中等剂量(1 ~ 5Gy) γ射线照射外周血分离的单个核细胞

的活性,国内外尚未见报道。为此,本研究采用人胃癌细胞系 MKN - 28细胞和分离的外周血单个核细胞共培养方法,利用吖啶橙 溴化乙锭(AO/EB)荧光双染色法,对 1 ~ 5Gy γ射线辐照分离后的外周血单个核细胞的抗肿瘤活性进行了观察,以探讨不同剂量 γ射线辐照后的外周血单个核细胞与抗肿瘤活性的相关性。

作者单位: 1 西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室,陕西西安 710038; 2 第四军医大学西京医院输血科; 3 第四军医大学病原生物学教研室; 4 第四军医大学电镜中心。
作者简介: 张献清(1965 -)男,湖南安乡人,副教授,从事生物材料与组织工程及输血医学研究。
通讯作者: 吴道澄

1 材料和方法

项检测指标。造成射线束与影像接收器平面是否垂直的因素有很多,如 X射线管是否水平、X射线靶面安装的是否正确等都可能影响射线束的垂直度;照射野与灯光野一致性是关系受检者是否受到多余照射和涉及到诊断信息能否丢失的一项检测指标,既是性能方面的检测内容同时,也是防护的检测内容之一。

对诊断设备的 QC 检测,国家的相关标准已有明确规定,所以在一致性检测中可以参照执行,但在验收检验时除严格遵循国家的相关标准外,厂家给出的出厂标准也应予以借鉴。在国家的相关标准中,对此也有要求,甚至对在验收检验时,对供购双方的合同也应予以参考,尤其是厂家给出的出厂技术指标或性能标准本人认为在验收检验时,凡高于国家相关标准,就应采用厂家给出的出厂技术标准或性能标准,低于国家的相关

标准的,应执行国家的标准,一般来讲,出厂标准高于行业标准,行业标准高于国家的标准,国家标准又高于国际标准,所以验收检测时应本着就高不就低原则。许多设备在出厂时已对设备有关技术性能进行了自检,并将检测结果随设备一起装箱,因而在安装后的调试时应作为验收的重要依据。

目前,各种 X射线的诊断设备五花八门,并各有千秋,但对性能的检测标准只能遵循一个,目的也只有一个,即保证设备能满足临床诊断的要求,影像质量能作到最佳,同时在获取最佳影像的同时又使受检者减少或避免多余照射,较差的影像质量除引起误、错、漏诊的情况外,重复照射是增加受检者照射剂量的主要来源。在放射科实施 QA、QC检测就是要实现上述目标。

(收稿日期: 2007 - 01 - 30)

1.1 材料 人胃癌细胞系 MKN-28由第四军医大学实验动物中心馈赠,胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购自北京元亨圣马生物技术研究所, RPM 11640购自 GIBCO公司, AO/EB染色液购于美国 One Lambda公司,倒置荧光显微镜为日本 OLYMPUS公司 BX60型,血液辐照仪为加拿大 Nordian公司 Gamma cell R 1000E 1an型。

1.2 单个核细胞分离 从无偿献血者捐献的全血(第四军医大学西京医院输血科提供)中抽取白膜,放入刻度离心管内,1000 rpm离心 10min 弃去上层血浆及血小板,其沉淀的血细胞再用 RPM 11640培养液按 1:2(V/V)稀释混匀。另取一离心管,用毛细滴管吸取 3~4ml 淋巴细胞分离液小心地加入离心管底部,并沿离心管壁徐徐加入 5~6ml 稀释的细胞悬液,然后置于水平转子离心机中,以 2000 rpm离心 20min 离心完毕,用直头平口吸管吸取云雾状的淋巴细胞层,加入 5倍体积 RPM 11640用 1500 rpm离心 5min 洗涤 2次。最后加适量含 10% FCS的 RPM 11640培养基制成细胞数为 2×10^5 ml 的细胞悬液,分装到青霉素瓶中,每瓶 2ml 备用。

1.3 肿瘤细胞接种 肿瘤细胞按常规复苏后接种于含 10% 灭活胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的 RPM 11640培养基瓶中,置于 5% 的 CO₂、饱和湿度和 37℃ 条件下培养,待细胞数占满瓶底 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化传代,取对数生长期细胞用于实验。在实验时用含 10% FCS 的 RPM 11640重新悬浮计数,制成 4×10^4 个细胞/ml 悬液,加入 96孔培养板中,每孔 100μl 二氧化碳培养箱培养 24h。

1.4 辐照及细胞培养 实验中所用 PBMCs 分为未照射(对照)和照射两组,照射组照射剂量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0 Gy。然后分别加入上述已接种肿瘤细胞的 96孔板中与肿瘤细胞共培养,同时各照射组和未照射组的单个核细胞均设不加肿瘤细胞的空白对照孔,每孔加 100μl 单个核细胞及 RPM 11640培养基。

1.5 AO/EB染色 在实验过程中每天取单纯肿瘤细胞、未照射和不同剂量照射后的单纯外周血单个核细胞、未照射和不同剂量照射后的外周血单个核细胞和瘤细胞共培养组各 3孔,在每孔中加入 30μl AO/EB 染色液,室温染色 15min 倒置荧光显微镜下观察细胞状态, AO 和 EB 用 488nm 激发后,分别用 525/20nm 滤片和 635/20nm 滤片检测^[3]。连续观察 10d,实验共重复 3次。

2 结果

2.1 单纯肿瘤细胞对照组 培养的单纯肿瘤细胞对照组,在实验的所有时间点生长良好,增殖明显,并可见瘤巨细胞形成。

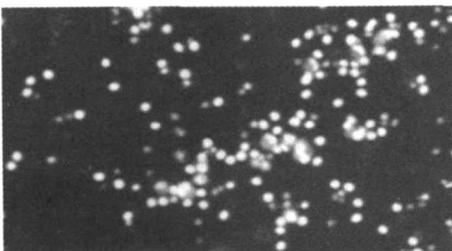


图 1 未照射的外周血单个核细胞,培养 144h(AO/EB × 200)

2.2 单纯照射或未照射外周血单个核细胞对照组 单纯未照射的外周血单个核细胞,在 144h 仍有大量活的单个核细胞,细胞数未见明显减少,死亡细胞少见(见图 1)。各照射组与未照射组相比,在 144h 时有比较明显的细胞死亡(见图 2)。在培养 10d(240h)时,照射和未照射组单个核细胞都减少,但未照射组仍有较多活的单个核细胞,而照射组活的小细胞较少。照射和未照射单个核细胞对照组都出现体积较大的细胞(见图 3),部分细胞有明显突起。

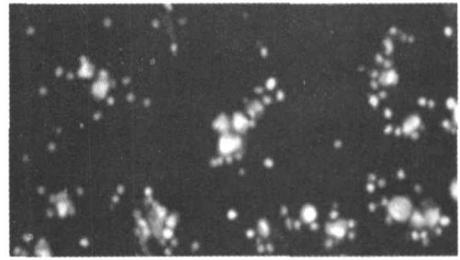


图 2 1Gy 照射的外周血单个核细胞,培养 144h(AO/EB × 200)

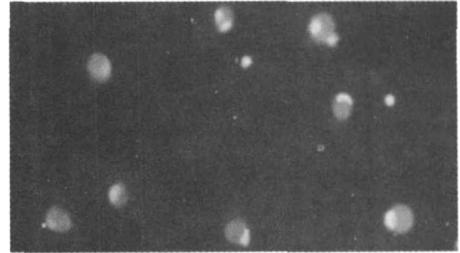


图 3 2 Gy 照射的外周血单个核细胞,培养 240h(AO/EB × 200)

2.3 未照射的外周血单个核细胞与肿瘤细胞共培养组 未照射的外周血单个核细胞与肿瘤细胞共培养组,在单个核细胞加入肿瘤细胞孔内后,出现大量单个核细胞围绕肿瘤细胞形成花环样结构,48h 后可见大量单个核细胞包围肿瘤细胞形成团块样结构。72h 肿瘤细胞和淋巴细胞开始明显死亡,但仍可见较多活淋巴细胞和少量肿瘤细胞,96h 后可见淋巴细胞大量死亡,少量肿瘤细胞残存,120h 后,仅见个别肿瘤细胞残存,单个核细胞已几乎全部死亡,240h 时,残存的肿瘤细胞有增生现象。

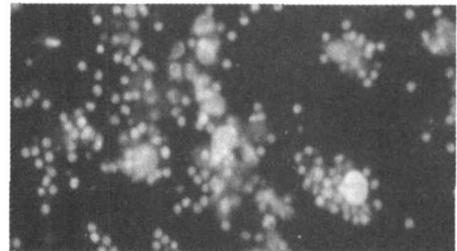


图 4 1Gy 射线辐照的单个核细胞与肿瘤细胞共培养 24h(AO/EB × 200)

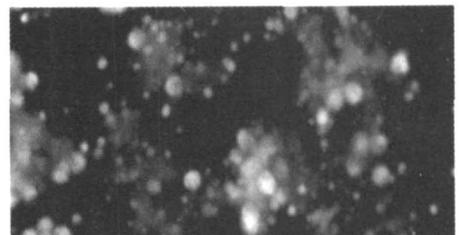


图 5 2Gy 射线辐照的单个核细胞与肿瘤细胞共培养 48h(AO/EB × 200)

2.4 不同剂量照射的外周血单个核细胞与肿瘤细胞共培养组 不同辐照剂量照射的外周血单个核细胞,与肿瘤细胞作用后,在不同时间有不同表现。在单个核细胞加入肿瘤细胞后即可发现,各组单个核细胞就围绕肿瘤细胞形成的花环样结构,24h 后肿瘤细胞周围围绕的单个核细胞逐渐增厚,尤其以 1Gy 照射组出现的花环层更厚、更明显(见图 4)。至 48h 时,除 3Gy 组外,其他各组单个核细胞均包裹肿瘤细胞形成团块样结构,各组淋巴细胞和肿瘤细胞都明显死亡。至 72h 时,各剂量组团块样结构减少,死亡的淋巴细胞和肿瘤细胞明显增加,可见大量坏死细胞碎片(见图 5),1Gy 组在 72h 时虽仍可见较多淋巴

细胞,但肿瘤细胞已少见。混合培养 96h后,0.5~2.0Gy组除偶见存活的淋巴细胞外,均未见存活肿瘤细胞。2.5Gy组自96h至240h均可见少量存活的肿瘤细胞,但增生不活跃,淋巴细胞少见(见图6)。3Gy组自96h至120h存活的肿瘤细胞仍较多,未见活淋巴细胞;在培养144h后,残存的肿瘤细胞开始增生,至240h残存的肿瘤细胞开始克隆样增生,形成细胞团,细胞体积较小,有瘤巨细胞出现(见图7)。

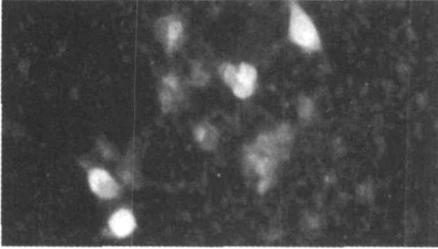


图6 2.5Gy γ 射线辐照的单个核细胞与肿瘤细胞共培养 96h(AO EB $\times 200$)

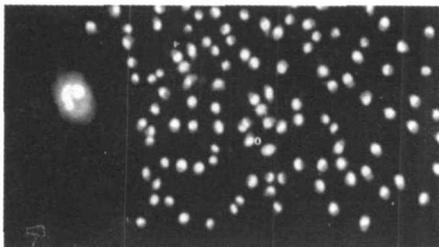


图7 3Gy γ 射线辐照的单个核细胞与肿瘤细胞共培养 240h(AO EB $\times 200$)

3 讨论

放射剂量一般分为低剂量(1Gy以下)、中低剂量(1.0~2.0Gy)、中高剂量(2.0~5.0Gy)、高剂量(5.0Gy),其中剂量在5~7Gy时为非常高剂量,而大于10Gy则为超高剂量。有文献报道低剂量0.2~0.5Gy辐射自体血可刺激机体的免疫功能^[4],但对发挥作用的细胞未进行详细研究。本实验发现单纯单个核细胞组,在细胞培养144h后,不同剂量照射的单个核细胞大部分死亡,存活细胞明显减少,而未照射的单个核细胞组未见明显减少,仍见大量活细胞,由此说明照射对单个核细胞肯定具有损伤作用,这种损伤作用似有随照射剂量增加而增强的趋势,但不明显。在单纯单个核细胞对照组,培养72h后即可见有体积较大的细胞出现,240h时,无论照射还是未照射组,存活的单个核细胞都已很少,而出现很多体积较大的细胞,推测小细胞为淋巴细胞,随培养时间的延长而自然死亡,而大细胞性质还不清楚,可能来自血液中的单核细胞、树突状细胞等,其性质在进一步鉴定中。

在单个核细胞与肿瘤细胞共培养组,我们发现单个核细胞具有明显的趋肿瘤细胞性,在单个核细胞加入肿瘤细胞后,发现单个核细胞围绕肿瘤细胞形成的花环样结构,24h后肿瘤细胞周围围绕的单个核细胞层逐渐增厚,至48h除3Gy组外,各组可见单个核细胞围绕肿瘤细胞形成的团块样结构,随着共培养时间延长,肿瘤细胞周围出现越来越多的单个核细胞,出现这种现象的原因还不清楚,可能是肿瘤细胞产生的某种物质对单个核细胞有趋化作用所致。经0.5~2.0Gy γ 射线照射后的单个核细胞对肿瘤细胞的杀伤作用与未照射组比较明显增强,其中以1.0Gy照射组对肿瘤细胞的杀伤作用似乎更强一些。而在剂量为2.5~3Gy辐照时对外周血单个核细胞没有提高其杀伤肿瘤细胞能力的作用,尤其是3.0Gy γ 辐照组的杀肿瘤细胞作用似有减弱,由此可以肯定,低剂量照射可以提高外周血单个核细胞的杀肿瘤作用,但对辐射增强外周血单个核细

胞杀肿瘤细胞的机理还不清楚,对该机理的进一步研究,有利于解释照射对人外周血单个核细胞既有损伤又有免疫增强作用这一看似矛盾的现象。

本研究的结果还发现,各共培养组中的单个核细胞与其各自单纯单个核细胞对照组比,单个和细胞存活时间明显缩短,这表明肿瘤细胞对单个核细胞具有杀伤作用,但其杀伤机理还不清楚。

Chapman等^[6]发现小剂量(1.8~2.0Gy)辐照可对细胞产生灭活作用,还发现造成培养细胞染色质凝集的辐射剂量为2Gy^[6],本实验在2.5和3.0Gy组才出现明显的外周血单个核细胞死亡,与以上发现基本一致。但李志强等^[7]通过观察不同剂量⁶⁰Co辐照后血细胞的超微结构,认为经15~35Gy超高剂量辐照后血液除部分嗜中性粒细胞与淋巴细胞超微结构有影响外,对其他血细胞超微结构几乎无影响。徐文皓等^[8]的研究发现15Gy辐照后对3种表型的T细胞分泌表达的细胞因子的影响也不大,只有20~35Gy各剂量组里,对3种表型的T细胞分泌表达的细胞因子才有不同程度的影响,且剂量越大,影响越大,抑制效应也越明显。但以上实验中均未观察中等剂量(1.0~5.0Gy)辐照对血细胞的影响。因此,2.5~3.0Gy γ 射线辐照后出现杀伤减弱的机理还不能完全用辐射造成的外周血单个核细胞损伤解释,可能与肿瘤细胞通过表达无功能的Fas或Fas分子表达下调有关^[8]。

本研究通过在体外对不同照射剂量的外周血单个核细胞对培养的肝癌细胞系MKN-28的杀伤作用进行的观察结果表明,经0.5~2.0Gy γ 射线辐照后的外周血单个核细胞虽有损伤,但其杀伤肿瘤细胞的活性明显增强,但是在剂量增大后,外周血单个核细胞杀伤肿瘤细胞的效果不明显,因此,如果采用自体血辐照回输进行抗肿瘤治疗或者诱导机体的适应性反应时,最好采用低剂量或中低剂量的 γ 射线辐照,但是其作用机制以及在临床上的应用还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘树铮,刘伟宏,齐进,等. 低剂量辐射增强免疫的细胞机制[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1992, 12(5): 299-305.
- [2] 封丽,邓大平. 低剂量辐射抗肿瘤治疗的研究进展[J]. 中国辐射卫生, 2006, 15(3): 377-378.
- [3] WANG Y K, HUANG Z Q. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro. *Pharmacol Res* 2005, 5(2): 174-182.
- [4] 范士怀,贺方学,葛来增,等. 自体血照射回输在鼻咽癌放疗治疗中的作用[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 22(1): 42-43.
- [5] CHAPMAN J D, STOBBE C G, GALES T, et al. Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics[J]. *Radiat Res* 1999, 151(4): 433-441.
- [6] CHAPMAN J D, STOBBE C G, Matsumoto Y. Chromatin compaction and tumor cell radiosensitivity at 2 gray[J]. *Am J Clin Oncol* 2001, 24(5): 509-515.
- [7] 李志强,徐文皓,乐嘉宜. 不同剂量⁶⁰Co辐照血细胞超微结构的变化[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(3): 143-146.
- [8] 徐文皓,胡来光,李志强,等. ⁶⁰Co γ 线辐照全血对T淋巴细胞分泌细胞因子的影响[J]. 临床血液学杂志, 2005, 18(5): 296-298.
- [9] NAGAO M, NAKAJIMA Y, HISANAGA M, et al. The alteration of Fas receptor and ligand system in hepatocellular carcinoma: how do hepatoma cells escape from the host immune surveillance in vivo[J]. *Hepatology* 1999, 30(2): 413-421.

(收稿日期: 2007-01-30)