

低剂量辐射对脐血 LAK 细胞体外抗肿瘤活性的影响

刘长安¹, 杨光¹, 管增伟², 贾廷珍¹

(1. 北京大学第三医院肿瘤治疗中心, 北京 100083; 2. 北京大学医药卫生分析中心, 北京 100083)

摘要: 目的 探讨低剂量辐射对脐血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞活性的影响。方法 新鲜分离的脐血单个核细胞用重组白细胞介素 2 培养 72 h 获取 LAK 效应细胞, 在培养 48 h 时给予 1 次不同剂量 (分别为 62 mGy, 124 mGy, 186 mGy, 248 mGy) 的 γ 射线照射, 应用 $^3\text{H-TdR}$ 释放实验测定 LAK 体外杀伤肿瘤靶细胞 (K562, HL-60) 活性。结果 脐血 LAK 细胞对 K562 和 HL-60 的杀伤活性与成人外周血相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。接受低剂量辐射的脐血 LAK 细胞对 K562 和 HL-60 的细胞毒性显著高于非照射对照组 ($P < 0.01$)。结论 脐血可作为 LAK 细胞的一个良好来源。低剂量辐射可增强脐血 LAK 杀伤肿瘤靶细胞的细胞毒活性, 从而可能用于清除微小残留病变及在脐血移植时增强移植抗白血病效应。

关键词: 脐血; LAK 细胞; 低剂量辐射; 细胞毒性; 过继性细胞免疫治疗

中图分类号: X591 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)06-0336-03

Effects of low-dose radiation on in vitro anti-tumor activity of LAK cells from cord blood

LIU Chang-an¹, YANG Guang¹, GUAN Zeng-wei², JIA Ting-zhen¹

(1. Cancer Treatment Center, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China; 2. Medicine Analysis Center of Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Objectives** To explore the effects of low-dose radiation on in vitro anti-tumor activity of LAK cells from cord blood. **Methods** Freshly isolated mononuclear cells from cord blood were cultured with interleukin-2 for 72 hours to obtain LAK effector cells, which were irradiated with various single dose gamma ray of 62 mGy, 124 mGy, 186 mGy and 248 mGy at 48 hours of culture respectively. Activity of LAK cells to kill tumor cells in vitro was measured by $^3\text{H-TdR}$ release assay. **Results** There was no significant difference in cytotoxic activity of LAK cells against K562 and HL-60 cells from cord blood and peripheral blood. Cytotoxic activity of LAK cells from cord blood against K562 and HL-60 cells irradiated by low-dose radiation was significantly higher than that in the non-radiation controls. **Conclusions** Cord blood is one of the good sources of LAK cells. Low-dose radiation can enhance cytotoxic activity of LAK cells against target tumor cells, which may contribute to eliminating minimal tumor residual and strengthening graft-versus-leukemia response in cord blood transplantation.

Key words: Cord blood; LAK cells; Low-dose radiation; Cytotoxicity; Adoptive cellular immunotherapy

淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphokine-activated killer cells, LAK) 是淋巴细胞在含有白细胞介素 2 (IL-2) 条件下经短期体外液体培养后能杀伤对 NK 细胞敏感或不敏感的瘤细胞系、自体或异体多种肿瘤细胞的一类功能细胞。大量研究证明, 低剂量辐射 (LDR) 对机体和细胞具有免疫兴奋效应^[1, 2]。傅强等^[3] 1995 年报道低剂量辐射可增强成人外周血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞的活性。我们采用¹³⁷铯 (¹³⁷Cs) 为放射源, 观察了低剂量 γ 射线照射对脐血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞 (K562, HL-60) 的细胞毒

活性的影响, 以初步探讨低剂量辐射免疫兴奋效应在脐血移植及脐血过继性细胞免疫治疗中的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 LAK 细胞的制备

无菌条件下采集 37~42 周龄足月正常分娩的新生儿脐带血及健康成人外周血, 体外肝素抗凝 (20 IU/ml)。采血 6h 内应用常规密度梯度离心法分离出单个核细胞 (MNCs), RPMI 1640 培养液 (HyClone) 洗涤 2 次后悬浮于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 计数并调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 rhIL-2 (中化合通生物工程有限公司) 1 000 U/ml, 于 37 °C, 5%CO₂, 饱和湿度条件下培养。72 小时后收获细胞即为 LAK 效应细胞。

收稿日期: 2001-06-14; 修回日期: 2001-07-13

作者简介: 刘长安 (1968-), 男, 陕西富平人, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 脐血移植基础及肿瘤内科。

1. 2 照射条件

采用 GammaCell 1000 数控细胞照射仪 (MDS Nordion, ^{137}Cs 源, 总放射性活度为 24.05 TBq, 吸收剂量率 3.72 Gy/min) 对培养 48h 经 rhIL-2 活化的脐血 LAK 前体细胞进行低剂量 γ 射线照射, 各实验组内的细胞吸收剂量分别为 62 mGy、124 mGy、186 mGy 及 248 mGy, 照射后继续培养到 72 小时收获, 分别检测其杀伤活性。每一样本均设非照射对照组。

1. 3 LAK 细胞杀伤活性检测

采用 ^3H -TdR 释放法, 以 K562 和 HL-60 细胞作为靶细胞。靶细胞用培养基调至 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 ^3H -TdR (中国原子能研究院, 放射性浓度为 37 MBq/ml) 3.7×10^5 Bq/ml, 37°C 培养 6 h, 培养基洗涤 3 次。收获的效应细胞和靶细胞按 20:1 的比例加入 96 孔培养板, 同时设靶细胞对照组。每一样本均设 3 个平行样, 于 37°C , 5% CO_2 , 饱和湿度条件下孵育 18 h, 将细胞收集于 49 型玻璃纤维膜上, 用 Beckman 液体闪烁计数器测定每分钟放射性计数 (CPM), 按以下公式计算 LAK 细胞的杀伤活性。

$$\text{LAK 细胞杀伤活性 (\%)} = \frac{\text{靶细胞组 CPM} - \text{实验组 CPM}}{\text{靶细胞组 CPM}} \times 100\%$$

1. 4 统计学

所有变量均表示为 $\bar{x} \pm s$, 以配对设计或成组设计 t 检验进行统计分析。

2 结果

2. 1 脐血与外周血 LAK 细胞对肿瘤靶细胞杀伤活性的比较

脐血 LAK 细胞对 K562 和 HL-60 细胞均有杀伤活性, 与外周血相比差异无显著意义; 脐血和外周血 LAK 细胞对 K562 的杀伤作用显著高于对 HL-60 的作用。见表 1。

表 1 脐血与外周血 LAK 细胞对肿瘤靶细胞杀伤活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	杀伤活性 (%)		P 值
		K562	HL-60	
脐血	17	54.9 $\pm$ 5.9	39.4 $\pm$ 7.3	< 0.01
外周血	15	56.0 $\pm$ 6.6	40.0 $\pm$ 9.2	< 0.01
P 值	—	> 0.05	> 0.05	

2. 2 低剂量辐射对脐血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞活性的影响

在培养 48 h 接受 62、124、186 mGy 及 248mGy 的 γ 射线照射后, 脐血 LAK 细胞对 K562 和 HL-60 细胞的杀伤活性均显著高于非照射对照组 (P 均 < 0.01)。见表 2。

表 2 低剂量 γ 射线照射对脐血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

照射剂量 (mGy)	例数	LAK 细胞杀伤活性 (%)	
		K562	HL-60
0	10	55.0 $\pm$ 7.1	38.8 $\pm$ 8.2
62	10	64.6 $\pm$ 5.4 **	49.5 $\pm$ 8.9 **
124	10	62.9 $\pm$ 5.9 **	48.5 $\pm$ 7.4 **
186	10	62.0 $\pm$ 5.8 **	52.7 $\pm$ 6.7 **
248	10	64.2 $\pm$ 6.3 **	50.8 $\pm$ 5.3 **

* * 与非照射组相比, $P < 0.01$ 。

3 讨论

LAK 细胞对肿瘤细胞的识别和杀伤是非特异性的和非 MHC (主要组织相容性复合物) 限制性的, 能杀死放、化疗不敏感的多种肿瘤细胞, 但不损伤正常细胞。同种异体 LAK 细胞 (Allo-LAK) 与自体 LAK 细胞在体内外有同等或相近的抗癌效能, Allo-LAK 细胞过继免疫治疗的大量临床研究中未观察到明显和典型的移植物抗宿主病 (GVHD) 的发生, 证明 Allo-LAK 细胞过继免疫治疗是安全有效的^[4]。脐血自然杀伤细胞 (NK) 活性显著低于成人外周血^[5], 但是我们的研究表明脐血 LAK 细胞对 NK 敏感的 K562 细胞及 NK 抵抗的 HL-60 细胞均具有明显的毒性作用, 与外周血相比差异无显著性。脐血 LAK 细胞在产生抗肿瘤活性的同时, 仍有造血祖细胞活性, 保持在体内重建造血的能力^[6]。脐血来源广泛, 采集简便, 易获得大量高活性的 LAK 细胞, 其 HLA (人白细胞抗原) 表达弱, 不易诱发 GVHD, 对免疫功能低下的肿瘤和白血病患者更安全, 因此, 脐血 LAK 细胞有可能用于肿瘤的过继性细胞免疫治疗和活化脐血移植, 克服常规脐血移植的缺点^[2], 更有效地清除微小残留病变 (MRD)。

剂量在 0.2 Gy 以内的低 LET (传能线密度) 辐射或 0.05 Gy 以内的高 LET 辐射被认为是低剂量辐射 (LDR)。大量研究证实: LDR 具有免疫兴奋效应^[1]。我们观察了低剂量 γ 射线照射对脐血 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞的细胞毒活性的影响, 结果显示 LDI 可显著增强脐血 LAK 细胞对小负荷肿瘤细胞 K562 和 HL-60 的杀伤效应。LDR 对脐血 LAK 细胞产生辐射刺激效应的机制可能是 LDR 促进了脐血 LAK 前体细胞成熟、活化、信号转导的加快及膜表面 IL-2 受体的表达, 内源性细胞因子的分泌及激活了细胞 DNA、RNA 聚合酶, 使得细胞能够合成更多的细胞毒颗粒, 从而发挥更强的直接和间接抗肿瘤活性所致^[1~3, 7]。

低剂量辐射对脐血 LAK 细胞对肿瘤细胞的杀伤

活性具有显著的辐射刺激效应, 提示脐血移植中以下策略也许是值得考虑的: 一份脐带血, 一部分冻存, 另一部分经 IL-2 短时间激活并接受低剂量辐射从而获得具有更高活性的 LAK 细胞, 然后混合移植。这样做, 既避免了造血干细胞在培养中的过多丢失, 又可以更好地发挥 Allo-LAK 细胞清除微小残留病变的效应, 增强移植物抗白血病效应 (GVL), 降低肿瘤的复发率, 从而改善脐血移植的疗效。常规手术、放疗及化疗后达完全缓解的肿瘤患者体内残留的小负荷肿瘤细胞 (即 MRD) 往往对放、化疗耐受, 是造成日后肿瘤复发、影响患者生存期和生活质量的根源之一。由于肿瘤患者细胞免疫监视功能低下^[8], 过继性细胞免疫治疗可能是必要的, 该疗法不依赖于宿主本身的免疫功能状态, 即使在宿主免疫功能低下状态仍可比较快速地发挥治疗作用^[4]。脐血 Allo-LAK 细胞的来源广泛易得, 对 NK 细胞敏感或不敏感的多种肿瘤细胞均具有杀伤活性, LDR 对脐血 LAK 细胞抗肿瘤活性有显著的辐射刺激效应, 因此, 利用 LDI 刺激的脐血 LAK 细胞多次输注进行肿瘤的过继性细胞免

疫治疗可能有其潜在的临床价值。

参考文献:

- [1] 刘树铮. 低水平辐射兴奋效应研究进展 [J]. 国外医学放射医学核医学分册, 1996, 20 (5): 219-223.
- [2] 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 [J]. 中国微创外科杂志, 2001, 1 (2): 114-116.
- [3] 傅强, 张澜生, 朱寿彭, 等. 低剂量照射对 LAK 细胞体外杀伤肿瘤靶细胞的影响 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15 (5): 321-325.
- [4] 杨镇. 肿瘤免疫学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 132-141.
- [5] 陈旭芳, 贾廷珍. 脐血淋巴细胞表型分析与自然杀伤细胞活性 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17 (4): 257-259.
- [6] 师晓东, 于载泳, 马瑞英. 白细胞介素 2 激活脐血单个核细胞体外抗肿瘤活性的实验研究 [J]. 中华儿科杂志, 1997, 35 (5): 229-232.
- [7] 刘长安, 张玲, 杨光, 等. 低剂量辐射对脐血单个核细胞产生白细胞介素 2 活性的影响 [J]. 中国微创外科杂志, 2001, 1 (3): 162-164.
- [8] Liu CA, Guan ZW, Sun W, et al. Clinical value of detecting T lymphocyte subset and NK cell activity in patients with colorectal cancer [J]. China Medical Abstracts Intern Med, 2001, 18 (1): 51-54.

196 名职业病患者洁齿前口腔保健知识调查

福建省三明市职业病防治院 (365000) 陈东辉, 肖方威

为了解职业病患者对口腔保健知识的认识程度, 为今后有针对性地进行口腔健康教育, 让他们能够自觉地采取一些力所能及的措施, 养成良好的口腔卫生习惯, 减少口腔内科常见病发病率, 我们于 1998 年 1 月至 2000 年 12 月对在我院住院的职业病患者进行了口腔保健知识调查。

1 对象与方法

调查对象为我院住院的 196 名职业病患者。调查内容包括职业病患者年龄及性别、文化程度; 对牙结石的认识与文化程度的关系。

2 结果

196 名职业病患者中, 男 154 人, 女 42 人; 20~35 岁 91 人 (男 71 人, 女 20 人), 36~50 岁 72 人 (男 55 人, 女 17 人), 51 岁以上 33 人 (男 28 人, 女 5 人)。

职业病患者文化程度与对牙结石认识情况的关系见表 1。

表 1 对牙结石的认识与文化程度的关系

文化程度 (人)	钙化的细菌斑		牙齿的一部分		不知道		合计
	人数	%	人数	%	人数	%	
高中以上 (48)	16	33.30	0	0	32	66.70	48
初中 (140)	42	30.00	5	3.60	93	66.40	140
小学 (8)	0	0	2	25.00	6	75.00	8
合计 (196)	58	29.60	7	3.60	131	66.80	196

3 讨论

菌斑是未矿化的细菌性沉积物, 它是细菌生长的极好生态环境, 所以菌斑包含有大量的致病菌和其他毒素, 并且它

的附着力很强, 尤其齿龈下菌斑毒素更甚。菌斑为无色透明的薄膜, 肉眼不易发现, 用菌斑显示剂方可显示出来。牙石是矿化了的菌斑和其他沉积物, 它的形成速度因人而异, 受唾液量、唾液成分、饮食和口腔卫生习惯的影响。牙结石的存在会妨碍口腔卫生, 促使菌斑更多地形成, 而牙石本身也包含着许多细菌毒素。所以菌斑和牙石可以使牙周支持组织受到破坏而发生牙周病、牙龈出血、牙周溢脓、牙齿松动甚至脱落。调查结果显示, 对于牙结石能够正确认识的职业病患者占 29.60%, 不知道的占 70.40%。其中受过高中以上教育的占 33.30%, 初中教育占 30%, 小学占 100%, 高中、初中比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。与小学文化组比较差异有极显著性。这充分说明了口腔健康教育任务十分繁重, 口腔健康教育对象仍应面对各文化层次人群, 对于低文化程度人群更应重视。

本次调查过程中, 经口腔医师的宣传教育, 调查对象懂得了口腔卫生保健的重要性, 全部愿意接受洁牙, 这也充分说明口腔医务工作者, 决不能只满足口腔疾病的治疗工作, 应将口腔健康教育宣传与治疗放在同等重要的位置, 将被动治疗转为主动治疗。

刷牙是预防牙菌斑、牙结石形成的最简单、最有效的方法。我国约 85% 以上的人都刷牙, 但是能掌握正确的刷牙方法、时间及次数的人群比例是比较低的。所以, 作为口腔医务工作者完全有必要向患者强调正确刷牙的方法, 让他们知道正确的刷牙还是预防龋齿和牙周病的一项重要措施。