

单核巨噬细胞在免疫反应中的作用 及其辐射敏感性

中国医学科学院放射医学研究所 刘淑华综述 于洪臣 刘 及审

摘 要 单核巨噬细胞在机体免疫反应中,既是免疫效应细胞,又是免疫调节细胞。对辐射较其它射线敏感细胞更具抗性,且分次照射的损伤轻于一次照射,这对肿瘤放疗照射剂量的分配更具有实际意义。

单核巨噬细胞是参与机体免疫反应的免疫活性细胞之一。它既是免疫效应细胞,又是免疫调节细胞,并和其它免疫活性细胞有密切关系,其本身可分泌多种细胞因子,调节免疫反应和杀伤肿瘤细胞,在抗肿瘤的免疫反应中有十分重要的作用。

一、单核巨噬细胞的活化及其产生细胞因子的研究

单核细胞来自骨髓的多能造血干细胞,一般认为是前单核细胞和巨噬细胞($M\phi$)之间的细胞群体,在进驻机体各脏器之后即为 $M\phi$,如肝脏的Kuffer's细胞,肺脏的肺泡 $M\phi$,浆膜腔(胸和腹腔)的 $M\phi$ 等等。研究最多的是小鼠或大鼠腹腔和肺泡的 $M\phi$,单核细胞多是从人或动物外周血纯化和分离进行研究。

用生理盐水或缓冲液冲洗腹腔所得的 $M\phi$ 为固有的或静止的 $M\phi$,其数量少,形态多为圆形或椭圆形。用巯基乙醇酸盐,小牛血清等注入动物腹腔,所引起无菌性炎症中的 $M\phi$ 为应答性 $M\phi$,它可被 $M\phi$ 活化因子激活,激活后的 $M\phi$ 称活化的 $M\phi$ [1]。应答性 $M\phi$ 很多,可为固有 $M\phi$ 的几千倍,且细胞形态多样化,其数量增多的原因认为是固有的 $M\phi$ 被刺激后,进行分化成熟而来,或者可能是骨髓造血干细胞分化成熟加快的原因。应答性 $M\phi$ 对活化因子如MAF(淋

巴细胞分泌的 $M\phi$ 活化因子)的反应可高出固有 $M\phi$ 的20~30倍。80年代兴起的生物反应调节剂(Biological response modifier's BRM)如IL-2、香菇多糖等对 $M\phi$ 均有激活作用。激活的 $M\phi$ 体积大,形态多样化,胞浆丰富,细胞膜皱褶增多。胞浆内各种细胞器如线粒体、溶酶体、Golgi体等数量增多。溶酶体中的酸性磷酸酶, β -葡萄糖酶及组织蛋白酶等含量亦增多。

应答性 $M\phi$ 对肿瘤细胞只能结合而不能溶解。孙德明等[2]报告,用巯基乙醇酸盐诱导出的小鼠腹腔 $M\phi$ 在体外与肿瘤细胞一起培养,发现此炎症性 $M\phi$ 对肿瘤细胞增殖有促进作用。这些 $M\phi$ 如用MAF激活后则显示出对肿瘤细胞的杀伤作用。

Gretha和Sodhi[3,4]发现用Ciplatin(cp,顺氯氨铂,抗癌药物),LPS(脂多糖),MDP(胞壁二肽)在体外可激活小鼠腹腔 $M\phi$,杀伤肿瘤细胞,并产生 O_2^- 及 H_2O_2 ;又发现如预先用rIFN(重组r-干扰素)处理 $M\phi$,做为激活 $M\phi$ 的第一信息,则显示出它与LPS或MDP的协同作用,可增强对肿瘤细胞的杀伤作用和增加 O_2^- 及 H_2O_2 的产量。

近年来,一些学者研究了IL-2对人及小鼠外周血单核细胞(PBMC)产生细胞因子的影响[5-7]。用rIL-2、rIFN及分裂原PHA和ConA(刀豆球蛋白)分别在体外处

理PBMC, 可使其产生 $\text{TNF}\alpha$ (α -坏死因子) 和 $\text{TNF}\beta$ (β -坏死因子)。若 rIL-2 与 $\text{rIFN}\gamma$ 共同作用PBMC, 比单独应用 IL-2 , $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{TNF}\beta$ 的产量分别增加 2 和 4 倍。而单独应用 rIFN 时, PBMC 不产生任何因子。又发现 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{TNF}\beta$ 产量最高时是 PBMC 分离至贴壁和非贴壁的时候。实验证明了 $\text{TNF}\alpha$ 是由 PBMC 中的贴壁细胞产生, 而 $\text{TNF}\beta$ 是由非贴壁细胞中的 T、B 淋巴细胞产生。PBMC 被 IL-2 激活产生 TNF , 是 IL-2 直接作用于 PBMC 诱导 IL-2 受体 mRNA 和肽(缩胺酶)的结果^[8]。Valitititi^[9] 用流氏细胞术和电镜观察了激活的或未激活的 PBMC 表面 IL-2 受体, 发现被激活的 PBMC 表面和胞浆内粗面内质网上结合有 $\text{P55}^{\text{IL-2R}}$ 链, IL-2R 的 P55 是由被激活的 PBMC 形成。

癌症病人的 PBMC 和 $\text{M}\phi$ 的功能如何呢? Okubo^[10] 将健康者和肺癌患者 PBMC 和 AM (alveolar macrophages AM, 肺泡 $\text{M}\phi$) 分别进行体外培养, 将其培养上清液再作用于 L929 瘤细胞, 发现无论健康供体或癌症患者的 PBMC 对瘤细胞不产生任何毒性物质, 而 AM 也只产生低水平的 $\text{TNF}\alpha$ 。如果用 LPS 处理 PBMC 和 AM, 则产生 $\text{TNF}\alpha$ 。作者又证实了 PBMC 的成熟程度影响其产生 $\text{TNF}\alpha$ 。已知 GM-CSF (粒、巨噬系集落刺激因子) 在体外可诱导单核细胞成熟, 经 GM-CSF 处理后的细胞从形态上似典型的 $\text{M}\phi$, 细胞大, 伸展; 经 GM-CSF 处理的细胞产生较多的 $\text{TNF}\alpha$, 说明了 PBMC 产生的 $\text{TNF}\alpha$ 可为细胞分化成熟状态而决定。

二、巨噬细胞亚群或异质性

$\text{M}\phi$ 有多种重要的免疫功能, 但并不是由均一的 $\text{M}\phi$ 来完成的。 $\text{M}\phi$ 是由形态、功能及结构各异的细胞亚群组成, 即所谓 $\text{M}\phi$ 的异质性。一般采用单克隆抗体和密度梯度离心的方法来识别不同的亚群。孙德明、

Ronal 等^[11, 12] 用杂交瘤技术制备单抗, 用间接放射免疫测定和补体介导细胞试验, 发现每个单抗可特异性地识别一个 $\text{M}\phi$ 亚群。 M102 在补体的参与下能使 $\text{M}\phi$ 的 NK 活性降低, 说明 NK 细胞可能是单核细胞系列的一个亚群; $\text{M}\phi$ 经单抗 M43 加补体处理后 ADCC (抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用) 活性受抑制。由此可见, 通过高度特异性抗 $\text{M}\phi$ 单抗, 可将 $\text{M}\phi$ 分成若干亚群。

Hayari 等^[13] 用小牛血清将小鼠腹腔 $\text{M}\phi$ 进行不连续的梯度密度离心, 分成五部分, 而后在体外分别用 LPS 激活, 发现 1、2 两部分细胞体积大, 为 PGE_2 (prostaglandin E_2) 的主要生产者。第 5 部分 $\text{M}\phi$ 产生 IL-1 。 PGE_2 和 IL-1 是具有拮抗作用的二种因子, 前者刺激胸腺细胞增殖, 后者则相反。消炎痛可抑制 PGE_2 的合成, 但不降低 IL-1 的产量, 说明此二种因子可由同一调节剂诱导, 但二者产生的过程并无联系, 因为它们是由不同 $\text{M}\phi$ 亚群所产生的。Khansarin^[14] 将 PBMC 分成 A、B、C、D 四个亚群, 证明了 D 部分主要为 IL-1 的生产者, 在体外能增强免疫球蛋白的合成。C 部分 $\text{M}\phi$ 主要合成 PGE_2 , 在体外对 IgG、IgM 的合成有抑制作用。A 和 B 两部分产生 IL-1 和 PGE_2 最少, 这些实验证明了外周血单核细胞群在功能上的异质性。

Tzehoval 等^[15] 对 $\text{M}\phi$ 亚群做了有意义的研究, 他们观察了小鼠腹腔 $\text{M}\phi$ 不同亚群免疫抗原表达能力的控制。实验证明, 小鼠腹腔 $\text{M}\phi$ 存在两个主要亚群, 其中一个对 T 淋巴细胞有递呈抗原的能力, 另一个亚群有明显的吞噬功能, 但不能递呈抗原。进而用特异性抗血清直接测定 H-2I 区基因产物, 结果证实了免疫抗原递呈群表达了 H-2I 区制约膜抗原。 $\text{M}\phi$ 递呈抗原的功能是由 T 细胞精密控制, T 细胞有缺陷的小鼠 (nu/nu) 缺少有递呈抗原能力的 $\text{M}\phi$ 亚群。但输注成熟的 T 淋巴细胞后, 能使其获得抗原递呈能

力。有人以细胞直径大小进行速度离心来分离大鼠腹腔 $M\phi$ 。当流速为20ml/min时,细胞直径与流速呈线性关系,用电镜,荧光显微镜和 3H -TdR放射自显影观察分离培养的 $M\phi$,发现细胞大小与细胞周期相一致,其吞噬能力与受体表达和细胞直径相关。如从 G_1 期向 G_2 期过度,随着细胞的变大,其吞噬活性和受体表达逐渐增强,所以 $M\phi$ 的增殖状态影响它们的吞噬功能^[16]。

三、 $M\phi$ 和其它免疫活性细胞的关系

早已证明, $M\phi$ 处理抗原递呈抗原诱导免疫反应,T淋巴细胞的增殖与分化及抗体形成细胞的成熟均需 $M\phi$ 参与。带 Ia^+ 抗原的 $M\phi$ 和 T_H 细胞(helper T cells, T辅助细胞)相互联结,彼此作用,通过直接接触或产生可溶性产物促进T、B淋巴细胞的增殖与分化,B细胞分化成抗体形成细胞^[17]。Unanue^[18]对抗原递呈调节的机理进行了评论。虽然早已证明了与 $M\phi$ 相关的抗原能强烈地刺激免疫反应,但直到发现MHC(Major histocompatibility complex)后对抗原递呈本质方获正确评价。在诱导各种蛋白质抗原反应时, T_H 的激活是重要的一步,它不是由游离的抗原激活,而是由结合在 $M\phi$ 上的抗原而激活。而T细胞对有抗原结合的 $M\phi$ 的应答受MHC的控制。 $M\phi$ 表达的 Ia 抗原阳性和阴性的调节,在控制免疫反应中又是一个关键的环节。任何调变表达的过程均可明显地影响免疫反应。表达 Ia 决定簇的 $M\phi$ 百分比,组织与组织间不尽相同。腹腔和肺在正常情况下, Ia 表达受限,而其它组织如胸腺和脾则 Ia 表达百分比高。 Ia 表达主要在年轻的 $M\phi$,要维持机体组织中的 Ia 水平需 $M\phi$ 干细胞不断分化,所有的 $Ia^+-M\phi$ 最终将转化为 $Ia^-M\phi$,而所有的 $M\phi$ 干细胞是 Ia 阴性,但它们均可产生 Ia^+ 后代。

NK细胞是机体内的自然杀伤细胞,与单核巨噬细胞相互作用,参与肿瘤免疫反

应。但是分离和纯化人PBMC的方法会影响NK细胞活性。用percoll梯度密度离心分离的单核细胞对NK细胞活性不产生影响,但用培养皿贴壁纯化得来的多数供体单核细胞可使NK细胞活性增强。NK活性的增强与单核细胞产生IL-1和 PGE_2 之间的平衡的升高有关。用消炎痛处理单核细胞使其失去 PGE_2 合成能力,而单核细胞膜结合IL-1的评价是用1%多聚甲醇固定单核细胞,经过处理的单核细胞进行体外培养,证明了单核细胞产生的 PGE_2 能抑制NK细胞活性,IL-1可增强NK细胞活性。 PGE_2 和IL-1之间功能上的平衡,决定了对NK活性是抑制还是增强^[19]。

四、单核巨噬细胞的辐射敏感性

60年代就有人对小鼠腹腔 $M\phi$ 的辐射敏感性进行了研究,发现小鼠腹腔 $M\phi$ 要比腹腔淋巴细胞抗辐射,而腹腔淋巴细胞比血液中的淋巴细胞对辐射更具抗性。

Lin对小鼠腹腔 $M\phi$ 和肺泡AM进行了较为系统的研究,实验证明,它们在体外均有集落形成能力。前者称腹腔集落形成细胞(peritoneal colony-forming cell PCF-C),后者为肺泡巨噬集落形成细胞(alveolar macrophage colony-forming AL-CFC)。对二者的辐射敏感性进行了比较,用 γ 射线照射小鼠或体外照射腹腔细胞,PCFC的 D_0 值体内外分别为1.1Gy和1.18Gy^[20]。作者又研究了AL-CFC的辐射敏感性,用高活性的 3H -TdR测定处于S时相的AL-CFC,发现AL-CFC数目无明显减少,由此可见,它们当中仅有很少的细胞处于S期,或者说它们的增殖是很慢的。AL-CFC对 γ 射线照射比PCFC更具抗性,其体内外照射的 D_0 值分别为2Gy和1.98Gy^[21]。

Lin等^[22]又报告了分次照射和照射剂量率对AL-CFC增殖能力的影响,并和骨髓GM-CFC的辐射敏感性做了比较。实验

用C3H/He小鼠,用X射线照射,剂量率为0.03, 0.1和0.85Gy/min。将肺泡 $M\phi$ 进行体外照射,照射剂量为5Gy。实验结果表明,采用剂量率0.03和0.1Gy/min照射时,其活存的细胞明显地多于0.85Gy/min照射者,三个剂量率照射细胞存活率分别为0.22, 0.16, 和0.06。照射3Gy时,只有剂量率为0.03Gy/min与0.85Gy/min之间有差异,前者细胞存活多于后者。照射1Gy时,上述两个剂量率照射的生物效应未见差异。整体照射剂量率的影响,其结果基本和体外照射的反应相同。全身照射5Gy,骨髓GM-CFC的辐射反应在用剂量率0.03Gy/min照射时,即显出明显的剂量率效应。

他们的第二部分实验是观察分次照射对AL-CFC的生物效应。总照射剂量为6Gy,一组是2Gy \times 3(每天照射2Gy,连续照射3天),二组是1Gy \times 6(每天照射2次,每次照射间隔6h,连续照射3天),第三组是一次照射6Gy。实验结果表明:1Gy \times 6组动物的AL-CFC未受到明显损伤;2Gy \times 3照射组细胞存活率为0.4;细胞存活率最差的是一次照射6Gy组。从同一供体取出的骨髓细胞,观察GM-CFC的分次照射效应。6Gy \times 1, 2Gy \times 3, 1Gy \times 6三个照射组,动物骨髓GM-CFC的存活率分别为0.009, 0.075和0.016。从上述结果看,分次照射可减轻AL-CFC的损伤,剂量率达0.85Gy/min时,照射效应最明显,骨髓GM-CFC的损伤比AL-CFC更严重,说明GM-CFC比AL-CFC有更高的辐射敏感性。

肺泡 $M\phi$ 被认为是终末细胞,较骨髓GM-CFC有较高的抗辐射能力。另外也认为肺泡 $M\phi$ 是一种在正常或病理状态下,自我维持的细胞群体,AL-CFC被认为是局部干细胞,这对研究肺脏的辐射效应是很重要的。在放射治疗中,已证实照射剂量率的大小和分次照射剂量的分配直接影响肺癌病人的两大并发症,即局部放射性肺炎和肺纤

维化的发生程度。

Scher和Beller等^[23, 24]观察了 $Ia^+M\phi$ 的辐射敏感性。他们认为带Ia抗原的 $M\phi$ 在诱导免疫反应时,是辐射敏感的过程。实验用显微镜和荧光激活细胞计数器观察和计数带Ia抗原的 $M\phi$,做辐射敏感试验。实验用A/st小鼠,给小鼠注射MIRF[MIRF是受抗原刺激的淋巴细胞产生的一种蛋白质,为 $Ia^+M\phi$ 的辅助因子macrophage (Ia -positive) recruiting factor,即MIRF],它可使腹腔中的 $Ia^+M\phi$ 上升10~20倍。如果在注射MIRF前将小鼠照射 23.23×10^{-2} C/kg(900R),则腹腔渗出物中的 $Ia^+M\phi$ 完全消失。若在小鼠照射后15~20h注射同系小鼠的 6×10^7 个骨髓细胞,七天后注射MIRF,则 $Ia^+M\phi$ 的数量得以恢复。若用anti- A^k 和补体C或者用IgG2b和C处理小鼠骨髓,使骨髓失去 $Ia^+M\phi$ 。将这种失去 $Ia^+M\phi$ 的骨髓细胞再输给照射受体,则不影响腹腔渗出物中 $Ia^+M\phi$ 的数量及 $Ia^+M\phi$ 和 $Ia^-M\phi$ 之间的平衡。作者对这一现象的解释是,虽然骨髓中 $Ia^+M\phi$ 被去掉,但尚有 $Ia^-M\phi$ 的干细胞,它们可转化为 $Ia^+M\phi$,认为MIRF诱导 $Ia^+M\phi$ 需有更新能力的干细胞源来维持。另一个实验是给小鼠注射MIRF后8h,进行全身照射 23.23×10^{-2} C/kg,照后不同时间测腹腔渗出物中的 $Ia^+M\phi$ 。随着照射时间的推移, $Ia^+M\phi$ 和 $Ia^-M\phi$ 数量都减少,但 $Ia^+M\phi$ 下降得更明显,而 $Ia^-M\phi$ 的数量一直高于 $Ia^+M\phi$,如照射后第6天, $Ia^-M\phi$ 为 $Ia^+M\phi$ 的29倍。他们认为照射后不是 $Ia^+M\phi$ 由腹腔移出,而是 $Ia^+M\phi$ 转化为 $Ia^-M\phi$ 。给小鼠注射TG(Thioglycollate)培养基3天后,全身照射 23.23×10^{-2} C/kg,随后注射MIRF,收集腹腔细胞测 $Ia^+M\phi$ 和 $Ia^-M\phi$,发现MIRF不能诱导 $Ia^-M\phi$ 向 $Ia^+M\phi$ 转化。

孙远强^[25]观察了不同剂量的 $^{60}Co\gamma$ 射线照射对小鼠腹腔 $M\phi$ 的影响。照射剂量为1,

3, 5 和 8Gy, 观察指标是 $M\phi$ 吞噬和消化鸡红细胞的能力, $M\phi$ 面积以及溶酶体酶: 酸性磷酸酶 (Acpase), 酸性酯酶 (ANAE), 三磷酸腺苷酶 (ATPase) 和粘多糖 (PAS) 含量的变化, 发现 1 和 3Gy 照射时, $M\phi$ 的吞噬与消化功能增强, 酶含量增多, 细胞面积增大。当照射达 5.8Gy 时, $M\phi$ 的吞噬消化能力下降, 各种酶含量亦下降, 但只在照射 8Gy 时 PAS 才显著减少。作者认为低剂量照射时, $M\phi$ 呈激活状态, 所以细胞变大, 吞噬与消化功能增强, 射线促进了酶的合成。随着照射剂量的加大, $M\phi$ 呈抑制效应, $M\phi$ 的吞噬能力与酶含量明显减少, 因照射剂量加大, 可直接损伤细胞, 抑制酶合成。8Gy 照射时糖元减少可能与 $M\phi$ 消耗增多有关, 或与射线抑制糖元酶的合成有关。

五、结 语

单核巨噬细胞在免疫反应中起重要作用, 近 10 年来受到广泛的重视, 并进行了深入的研究。单核巨噬细胞可被许多激活剂激活, 并产生很多细胞因子, 参与和介导免疫反应, 与其它免疫活性细胞相互作用, 杀伤肿瘤细胞。 $M\phi$ 比机体其它射线敏感细胞, 如造血干细胞对射线更具抗性, 且分次照射对 $M\phi$ 的损伤轻于一次照射, 这对肿瘤的放疗分次照射的剂量分配更有实际意义。许多免疫调节剂可以激活 $M\phi$, 因此在免疫调节剂抗肿瘤机理的研究中, $M\phi$ 作用是不可忽视的重要环节。

参 考 文 献

- 1 张友会. 国外医学免疫学分册, 1987; 6: 305-306
- 2 孙德明等. 中华肿瘤学杂志, 1986; 8(4): 247-249

- 3 Greetha et al. Nat Immun Cell Growth Regul, 1989; 8(2):100-107
- 4 Sodhi A et al. Nat Immun Cell Growth Regul, 1989; 8(2):108-116
- 5 Miroslav M et al. Nature, 1987; 325(15): 262-265
- 6 Mumerof RP et al. J Leukoc Biol, 1987; 42:545
- 7 Green E et al. J Immunol, 1985, 135 (4):2492-2497
- 8 Economou JS et al. Immunology, 1989; 67 (4):514-5197
- 9 Valitititi A et al. Immunology, 1988; 67 (1):44-50
- 10 Okubo A et al. Jpn J Cancer Res, 1990; 81(4):403-409
- 11 孙德明等. 中华微生物和免疫学杂志, 1981; 1(6):381-385
- 12 Ronald E et al. cell Immunol, 1987; 108(2):255-268
- 13 Hayari Y et al. Eur J Immunol, 1985; 15(1):43-47
- 14 Khansarin N, et al. Eur J Immunol, 1985; 15(1):48-51
- 15 Tzelohval E et al. Eur J Immunol, 1981; 11(2):323-328
- 16 William SW et al. Eur J Immunol, 1988; 11(2):492-500
- 17 Alan S et al. N Engl J Med, 1980; 303 (20):1153-1156
- 18 Vnanue ER. J Immunol, 1984; 132(1): 1-4
- 19 Eda T. Nat Immunol Cell Groth Regue, 1990; 9(1):36-48
- 20 Lin H. Radiat Res, 1975, 63(3):560-566
- 21 Lin H et al. Radiat Res, 1982; 89(2) 283-290
- 22 Lin H et al. Radiat Res, 1985; 103(2): 260-265
- 23 Scher MG et al. J Immunol, 1982; 128 (1):447-450
- 24 Beller DI et al. J Immunol, 1981; 126 (1):363-369
- 25 张远强. 第四军医大学学报, 1989; 10: 190