

ผลของรังสีเอกซ์ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

อุทุมมา มั่นะเนมิ *

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาผลของรังสีเอกซ์ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ผู้วิจัยได้ฉีดเม็ดเลือดแดงแกะให้กับหนู (Mice) พันธุ์ C57BL/6, 2 วันต่อมาหนูไปฉายรังสีเอกซ์ ปริมาณ 150 cGy จากนั้นในช่วง 3-30 วันหลังฉีดเม็ดเลือดแดงแกะนำม้ามของหนูมาศึกษาหาปริมาณเซลล์ที่สร้าง IgG โดยวิธี hemolytic plaque assay และ immunofluorescent ผลการทดลองพบว่า 9 วันหลังจากได้รับรังสี จำนวนเซลล์ที่สร้าง IgG ของกลุ่มที่ได้รับรังสีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับรังสี และเมื่อเปลี่ยนแปลงปริมาณรังสีเป็น 50, 100, 150 และ 300 cGy โดยเลือกศึกษาเฉพาะวันที่ 9 หลังจากได้รับรังสีพบว่า จำนวนเซลล์ที่สร้าง IgG ของกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับรังสีปริมาณอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาโดยวิธี immunofluorescent ในกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy พบว่าจำนวน Thy-1.2 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนจำนวน B cells ไม่แตกต่างกัน ขณะที่อัตราส่วนของ CD4+ cells ต่อ CD8+ cells สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองสรุปได้ว่าการเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อรังสีเอกซ์ปริมาณ 150 cGy น่าจะเป็นผลจากการเพิ่มบทบาทของ helper T cells ในการกระตุ้นให้ B cells มีการแบ่งตัวและเจริญขึ้น ซึ่งมีผลให้เซลล์ที่สร้าง IgG สูงขึ้น

คำหัด : รังสีเอกซ์, การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

* ภาควิชารังสีเทคนิค คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Effect of X-Irradiation on The Immune Response

Utumma Maghanemi*

To observe the immune response after in vivo X-irradiation, 10-12 weeks C57BL/6 mice were injected with sheep red blood cell (SRBC), two days later they were irradiated with X-ray at 150 cGy. Spleen cell suspension of these mice were prepared to study the immune response by using hemolytic plaque assay and immunofluorescent method at day 3 to 30 after SRBC

injection. The result of hemolytic plaque assay showed significant increase of IgG producing cells at day 9 after X-irradiation compared with the control group. Observation of the plaque forming cell (PFC) at day 9 after X-irradiation by varying doses at 50, 100, 150 and 300 cGy, showed significantly increased in IgG producing cells number of treatment group at dose of 150 cGy. Flow analysis of lymphocytes performed on a fluorescent activated cell sorter showed decreased in Thy-1.2 cells of treatment group, while nonsignificant difference of B cells number. The CD4+ cells/CD8+ cells ratio of treatment group with 150 cGy X-irradiation was significantly increased. In conclusion, X-irradiation may affect the immune response by enhancing of helper T lymphocytes with induce the proliferation and differentiation of B cell, that result in the increasing of IgG producing cells.

Keyword : X-irradiation, Immune Response.

* Department of Radiological Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University.

บทนำ

รังสีนั้นมีผลในการลด และ/หรือ ทำลายเซลล์ อันมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ ทั้งนี้รวมถึงการลดและเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันด้วย(1-3) อย่างไรก็ตามได้มีรายงานวิจัยหลายเรื่องที่กำลังกล่าวถึงการเพิ่มการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจากการกระตุ้นด้วยรังสี(4-6) ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มากขึ้น เพื่อที่จะอธิบายถึงกลไกในการเพิ่มการตอบสนองนี้(5-9) สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของรังสีเอกซ์ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันว่าจะเป็นอย่างไ และผลนี้น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ชนิด

ใดในระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง ด้วยวิธี Hemolytic plaque assay ซึ่งคัดแปลงมาจากวิธีของ Jerne และคณะ(10) และวิธี Immunofluorescent(11)

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนู (Mice) พันธุ์ C57BL/6 อายุ 10-12 สัปดาห์ จำนวน 520 ตัว

วิธีการ

ฉีดเม็ดเลือดแดงแกะ (Sheep red blood cell, SRBC) 1 % 1 มล. เข้าในช่องท้องของหนู แล้วแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมซึ่งไม่นำไปรับรังสี และกลุ่มที่รับรังสีโดยกลุ่มนี้สองวัน

หลังจากฉีด SRBC นำไปปรับรังสีเอกซ์ 150 cGy (3 mA 200 kVp, ใช้ฟิลเตอร์ทองแดง 0.5 มม. และอลูมิเนียม 0.5 มม.) โดยให้ระยะทางจากเป้าหลอดถึงผิว (target skin distance) 158.5 ซม. และ dose rate 1.25 rad ต่อนาที จากนั้นนำหนูทั้งสองกลุ่มนี้มาฆ่า โดยกลุ่มควบคุมเริ่มจากวันที่ 1 หลังฉีด SRBC ไปจนถึงวันที่ 15 แล้วเว้นระยะไปเป็นวันที่ 30 ส่วนกลุ่มที่ได้รับรังสีเริ่มจากวันที่ 1 หลังได้รับรังสี (หรือวันที่ 3 หลังฉีด SRBC) ไปจนถึงวันที่ 13 แล้วเว้นระยะไปเป็นวันที่ 28 หลังจากได้รับรังสี หลังจากนั้นให้นำม้ามมาศึกษาหา IgG และ IgM producing cells ด้วยวิธี Hemolytic plaque assay

การศึกษาด้วยวิธี Hemolytic plaque assay

นำ 5×10^6 spleen cell suspension 0.1 มิลลิลิตร ไปผสมกับ 0.5% melt agarose ใน MEM medium 0.4 มิลลิลิตร และ 20% SRBC 0.05 มิลลิลิตร เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วเทสารผสมให้สม่ำเสมอลงบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วย 1% agarose แล้วนำไปอุ่นที่ 37°C 1 ชม. จากนั้นเติม complement (Guinea pig serum) อุ่นไว้ที่ 37°C 1 ชม. แล้วนำมานับจุลไส (plaque) เรียกว่า Direct plaque forming cell (DPFC) ซึ่งเป็นการนับจำนวน cell ที่สร้าง IgM แอนติบอดี สำหรับเซลล์ที่สร้าง IgG แอนติบอดี หรือ Indirect plaque forming cell (IPFC) หลังจากอุ่นสารผสมใน Medium ตามขั้นตอน DPFC แล้วเติม rabbit-antimouse serum ลงไปและอุ่นต่อที่ 37°C 1 ชม. จากนั้นใส่ complement เช่นเดียวกับขั้นตอนของ DPFC จุลไสที่เกิดจาก IPFC จะเป็นค่าของเซลล์ที่

สร้าง IgM และ IgG แอนติบอดี เพราะฉะนั้นถ้า นำค่า IPFC ลบด้วยค่า DPFC จะได้ค่าของเซลล์ที่สร้าง IgG แอนติบอดีออกมา

นอกจากนี้ยังได้ทดลองหา DPFC และ IPFC ที่วันที่ 9 หลังจากได้รับรังสีปริมาณต่างกัน คือ 50, 100, 150 และ 300 cGy

การศึกษาด้วยวิธี Immunofluorescent

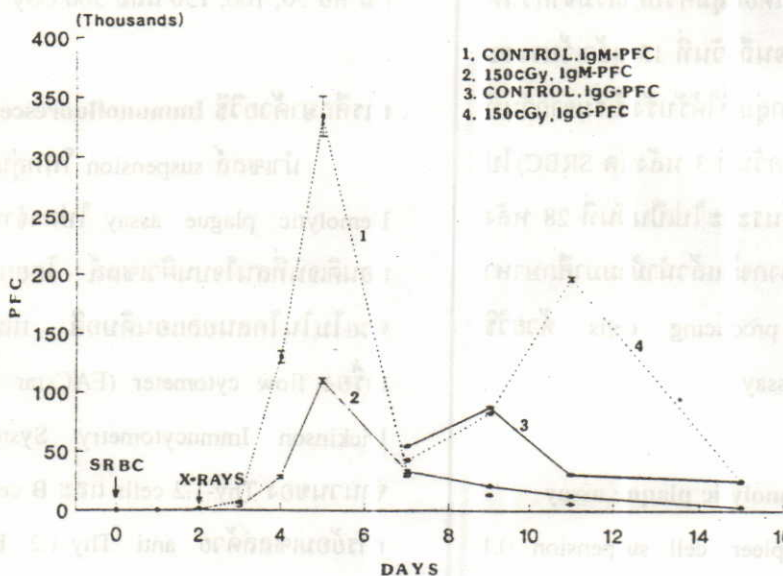
นำเซลล์ suspension ในกลุ่มเดียวกับที่ทำ Hemolytic plaque assay ไปหาจำนวนเซลล์ที่มีแอนติเจนที่สนใจบนผิวเซลล์ โดยการย้อมเซลล์ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี และอ่านผลด้วยเครื่อง flow cytometer (FACstar TM, Becton Dickinson Immunocytometry Systems) โดยที่จำนวนของ Thy-1.2 cells และ B cells หาได้โดยการย้อมเซลล์ด้วย anti Thy-1.2 biotin-avidin-FITC และ anti IgM-FITC ตามลำดับ อัตราส่วนของ T-cell subsets หาได้จากการเปรียบเทียบจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก (cell staining positively) โดยที่ใช้ anti L3 T4-FITC ในการหา helper/inducer T lymphocytes (CD4+) และ anti Lyt-2 biotin-avidin-FITC สำหรับ suppressor/cytotoxic T lymphocytes (CD8+)

ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงผลของรังสีเอกซ์ 150 cGy ต่อเซลล์ที่สร้าง IgG และ IgM แอนติบอดีในหนูหลังจากฉีด SRBC ไปแล้ว 2 วัน พบว่า IgM-PFC ในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับรังสี ส่วน IgG-PFC ในกลุ่มที่ได้รับรังสีมีจำนวน

เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัย

สำคัญในวันที่ 9 หลังจากได้รับรังสี (รูปที่ 1)



1. CONTROL.IgM-PFC
2. 150cGy.IgM-PFC
3. CONTROL.IgG-PFC
4. 150cGy.IgG-PFC

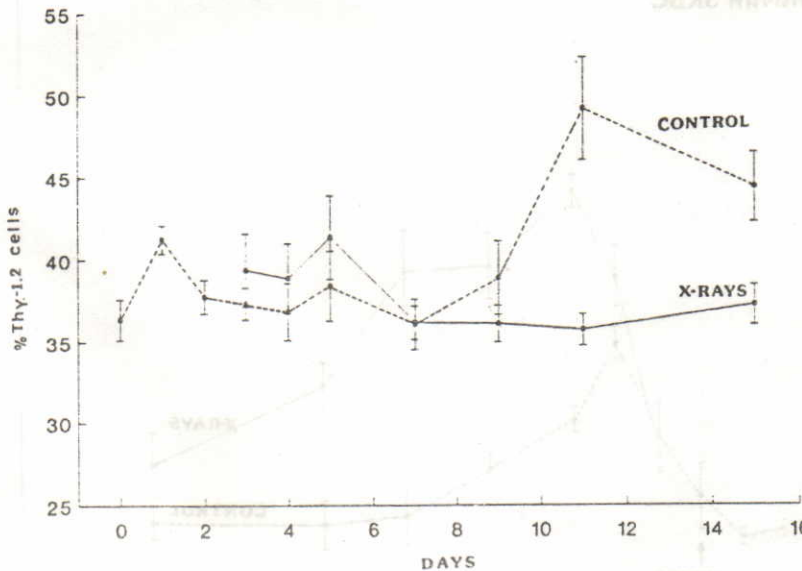
รูปที่ 1 ผลของรังสีเอกซ์ 150 cGy ต่อเซลล์ที่สร้างแอนติบอดี DPFC และ IPFC หลังจากฉีด SRBC ไปแล้ว 2 วัน

จากการทดลองศึกษา IgG-PFC ในวันที่ 9 หลังจากได้รับรังสีปริมาณต่างกัน คือ 50,100, 150 และ 300 cGy พบว่าอัตราส่วนของ PFC ของกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy ต่อกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับรังสีสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ปริมาณรังสีที่ 50, 100 และ 300 cGy ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวน IgG-PFC อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

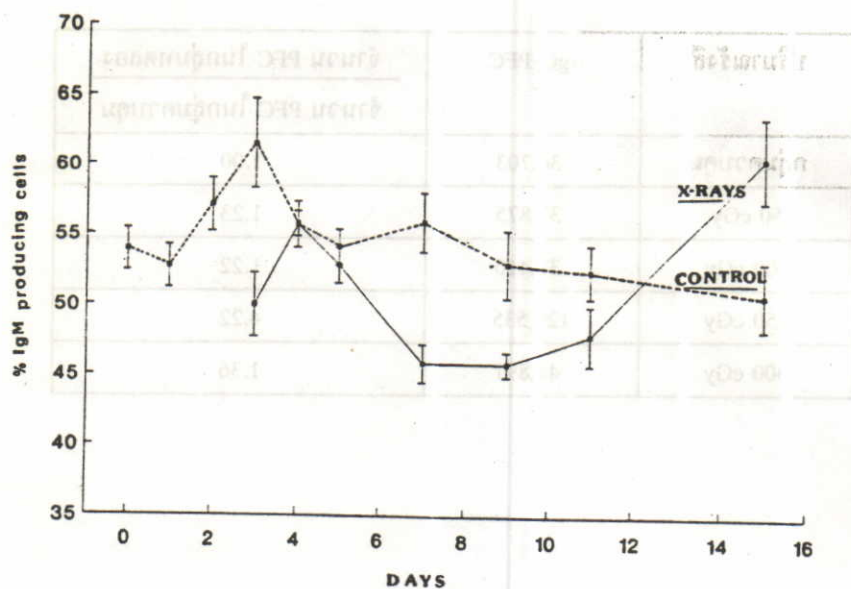
ผลการทดลองศึกษาด้วยวิธี Immunofluorescent พบว่าค่า Thy-1.2 cells ในกลุ่มที่รับรังสีมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วน B cells ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับรังสีมีค่าไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 2 และ 3) ในขณะที่อัตราส่วนของ CD4+ cells ต่อ CD8+ cells ในกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4)

ตารางที่ 1 จำนวน IgG-PFC ในหนูหลังจากฉีด SRBC และได้รับรังสีเอกซ์ 50, 100, 150 และ 300 cGy ไปแล้ว 9 วัน

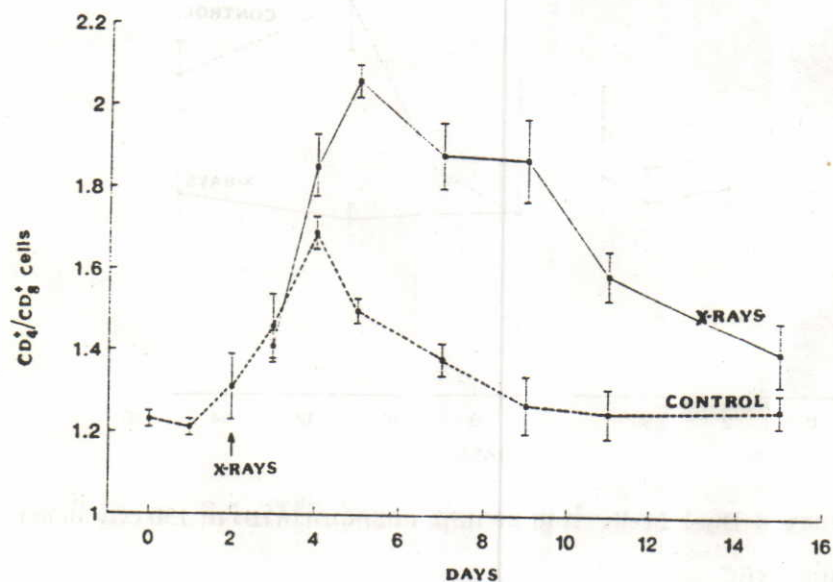
ปริมาณรังสี	IgG-PFC	จำนวน PFC ในกลุ่มทดลอง จำนวน PFC ในกลุ่มควบคุม
กลุ่มควบคุม	30,703	1.00
50 cGy	37,875	1.23
100 cGy	37,410	1.22
150 cGy	129,535	4.22
300 cGy	41,891	1.36



รูปที่ 2 จำนวนร้อยละของ Thy-1.2 cells ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy ที่เวลาต่างๆ หลังฉีด SRBC



รูปที่ 8 จำนวนร้อยละของ B cells ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับรังสี 150 cGy ที่เวลาต่างๆ หลังฉีด SRBC



รูปที่ 4 ผลของรังสีเอกซ์ 150 cGy ต่ออัตราส่วนของ CD4+ cells ต่อ CD8+ cells ในหนูหลังจาก ฉีด SRBC

วิจารณ์

ในการศึกษาผลของรังสีเอกซ์ต่อการสร้างแอนติบอดีต่อเม็คเล็ดแดงแเกาะในหนู (mice) พันธุ์ C57BL/6 พบว่าระดับแอนติบอดีต่อเม็คเล็ดแดงแเกาะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มที่ได้รับรังสีจำนวน 150cGy เทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี การเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ารังสีเอกซ์ อาจไปมีผลต่อการทำงานของ immunoregulatory T-cells (helper T-cells และ suppressor T-cells) ซึ่งจะไปควบคุมการทำงานของ B-cells เพื่อสร้างแอนติบอดีอีกทีหนึ่ง หรือรังสีเอกซ์อาจไปมีผลโดยตรงต่อการทำงานของ B-cells เพื่อศึกษาถึงผลของรังสีเอกซ์อย่างละเอียด ผู้วิจัยได้ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มี Thy 1.2, CD4 และ CD8 แอนติเจนบนผิวเซลล์โดยวิธี immunofluorescent ในหนูกลุ่มที่ได้รับรังสีเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสี ผลการทดลองพบว่าจำนวน Thy 1.2 cells ในกลุ่มที่ได้รับรังสีมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่อัตราส่วน CD4+ cells/CD8+ cells เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับรังสี การทดลองนี้แสดงว่า การเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีเมื่อได้รับรังสีเอกซ์ น่าจะเป็นเพราะมีการเพิ่มขึ้นของ helper T-cells (CD4+ cells) หรือ มีการลดลงของ suppressor T-cells (CD8+ cells) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่าการเพิ่มการทำงานของ T-cells ในคนและสัตว์ทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี(6-8) การเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของ helper T-cells/suppressor T-cells เป็นผลมาจากการที่ helper T-cells มีความสามารถในการต้านทาน

รังสีได้สูงกว่า suppressor T-cells(12) การเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยรังสีเอกซ์นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ใช้ โดยพบว่าที่ปริมาณรังสีน้อยกว่าหรือมากกว่า 150 cGy ไม่มีผลต่อการเพิ่มการสร้างแอนติบอดีเลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะที่ระดับรังสีน้อยๆ ไม่อาจลดการทำงานของ suppressor T-cells ได้ และที่ระดับรังสีที่มากเกินไป ปริมาณรังสีอาจทำลาย helper T-cells ได้ ปริมาณรังสีที่ 150 cGy เป็นปริมาณรังสีที่พอเหมาะที่ทำให้การสร้างแอนติบอดีชนิด IgG เพิ่มขึ้นในหนูสายพันธุ์ C57BL/6 แต่ปริมาณรังสีนี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีชนิด IgM ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณรังสีดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการคงอยู่ของ helper T-cells ที่ทำหน้าที่กำหนดการสวิตซ์การสร้างอิมมูโนโกลบูลินของ B-cells เป็นชนิด IgG

เอกสารอ้างอิง

1. Flidner TM, Bond VP, Cronkite EP. Structural, cytologic and autoradiographic (H^3 -thymidine) changes in the bone marrow following total body irradiation. Am J Pathol 1961; 38 : 599-623.
2. Harvey MP, Henry Q. Radiation effects on cell renewal and related systems. Physiol Rev 1963; 43 (3) : 357-96.
3. Anderson RE, Warner NL. Ionizing radiation and the immune response. Adv Immunol 1976; 24 : 215-335.

4. Dixon FJ, Mc Conahey PJ. Enhancement of antibody formation by whole body x-radiation. J Exp Med 1963; 117 : 833-48.
5. Anderson RE, Lefkovits I. In vitro evaluation of radiation-induced augmentation of the immune response. Am J Pathol 1979; 97 (3) : 456-72.
6. Troup GM, Anderson RE. Radiation-induced augmentation of mitogenic responsiveness in murine spleen cells. Fed Proc 1982; 41, 335 (Abs.).
7. Anderson RE, Tokuda S, Williams WL, Spellman CW. Low dose irradiation permits immunization of A/J mice with subimmunogenic numbers of Sal cells. Br J Cancer 1986; 54 : 505-09.
8. James SJ, Makinodan T. T-cell potentiation in normal and autoimmune-prone mice after extended exposure to low doses of ionizing radiation and/or caloric restriction. Int J Radiat Biol 1988; 53 : 137-52.
9. Feinendegen LE, Bond VP, Booz J, Muhlensiepen H. Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects. Int J Radiat Biol 1988; 53 : 23-37.
10. Jerne NK, Nordin AA, Henry C. The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. In : Amos B and Koprowski H, editors. Cell-Bound Antibodies. Philadelphia : Wistar Institute Press, 1963: 109-25.
11. Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cell II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J Exp Med 1950; 91 : 1.
12. Moretta L, Webb SR, Grossi CE, Lydyard PM, Cooper MD. Functional analysis of two human T-cell subpopulations : Help and suppression of B-cell responses by T-cells bearing receptors for IgM or IgG. J Exp Med 1977; 146 : 184-8.

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Dr. Toshihiko Sado, Dr. Mashahiro Muto และ Ms. Hitoko Kamisaku แห่ง National Institute of Radiological Sciences, ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา, แนะนำ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจาก Sciences and Technology Agency ประเทศญี่ปุ่น