

准分子激光和紫外线照射对胰岛 免疫原性的影响*

汤星里 袁才来 蒋宝财

(中国科学院上海光机所, 上海 201800)

胡远峰 张洪德 董维平

(上海市第一人民医院, 上海 200080)

摘要 新生大鼠胰岛样细胞团经准分子激光和中波紫外线照射预处理后,其免疫原性明显降低,激光组尤为显著,形态学检查示胰岛细胞分泌颗粒和亚细胞结构保持完整无损。胰岛素分泌功能与对照组无明显差异。经STZ引致的糖尿病大鼠中胰岛异体移植,结果表明激光组受体大鼠糖尿病缓解时间较紫外线组与对照组明显延长。

关键词 胰岛细胞,免疫原性,准分子激光,紫外线

1 引言

糖尿病是一种常见的代谢病,近年来随着人民生活水平的提高,人均寿命延长等因素,我国糖尿病患病率逐年增高,其中胰岛素依赖型糖尿病必须长期终年依赖胰岛素注射得以生存,甚为痛苦。而且应用胰岛素治疗不能使糖尿病得到较理想的控制,常致并发多种疾病,严重威胁病人的健康和生命。

近二十年来大量研究表明,胰岛移植是糖尿病较理想的治疗方法。存在的关键问题是异体移植物的免疫性排斥。因此,研究安全有效的抗排斥方法是极其有意义的。据报道^[1~3],在移植前将胰岛移植物作预处理,如24℃体外培养,紫外线照射等,实验表明可明显降低供体胰岛的致免疫性。本文采取国际上尚无使用过的激光方法,对胰岛移植物进行预处理,研究其致免疫性的变化,获得了较好的结果。

2 实验装置

实验装置原理图如图1。其中SP是分光板,R是反射镜,M是紫外窗口,S是样品池。激光通过光学均匀器使光束均匀分布,SP使部分激光进入能量计,进行能量监控。光束通过变焦系统、反射镜和紫外窗口M,进入操作箱中,均匀地辐照

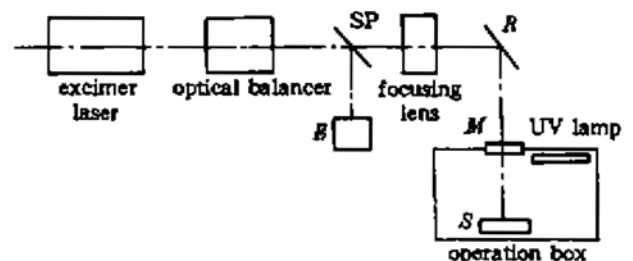


图1 实验装置

Fig. 1 Experimental arrangement

* 国家自然科学基金和上海市自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1996-01-05; 收到修改稿日期: 1996-04-03

到样品池 S 上面。

试验时,首先对操作箱用 UV 灯消毒,确保室内无菌,然后放入样品,进行试验,试验后对样品进行各项分析测试。

使用的激光器是 XeCl 准分子激光器,波长为 308 nm,重复频率为 1~5 Hz 可调,单脉冲能量为 200 mJ,脉宽为 30 ns。激光能量可调,一般在样品池上的能量密度为 20~40 mJ/cm²。

使用的 UV 灯是连续铽-汞放电灯,功率为 300 W,经测试紫外波段的总能量为 19.9 mW/cm²。在波长 290~320 nm 之间的能量为 100 mW/m²。

3 材料和方法

制备好新生大鼠胰岛样细胞团 (ICCs),用激光和紫外线照射。激光照射脉冲数为 1200 次,1000 次和 800 次三种。紫外线照射分为 50 s,40 s 和 30 s 三种。然后进行 3.3 胰岛-淋巴细胞混合培养 (MILCs)。用液闪仪 (3800 型,美国 Bechman 公司生产)测定 cpm 值,按下式计算刺激指数 (SI)

$$SI = \text{cpm}(\text{ICCs} + \text{淋巴细胞} / \text{cpm})$$

再进行胰岛内 Ia 阳性细胞检测,用光学显微镜计数,以 $\bar{x} + SD$ 表示。

用电镜作形态学检查以及作胰岛素释放试验和染色体检查。最后进行糖尿病大鼠模型制备和异体胰岛移植。将激光、紫外线预处理与对照组各 9 只糖尿病鼠进行移植对照,不用任何免疫抑制剂,移植后禁食血糖降至小于 11.1 mM 为有效,移植有效鼠血糖连续二次大于 13.9 mM,以第一次血糖上升时作为排斥。

对数据进行统计学处理,所有数据均以均值 \pm SD 表示,胰岛素含量采用方差分析。

4 结 果

4.1 胰岛-淋巴细胞混合培养 (MILCs)

经激光与紫外线预处理 ICCs MILCs 的刺激指数比对照组明显降低,见表 1。激光组刺激指数比紫外线组显著降低,提示激光预处理 ICCs 其免疫原性降低较紫外线照射为显著,激光照射剂量以 1200 次组效果尤甚。

4.2 胰岛内 Ia 阳性细胞检测

激光组与紫外线组胰岛内 Ia 阳性细胞数明显低于对照组 ($P < 0.05 \sim 0.001$)。激光组中以 1200 次剂量的效果最为显著,与其他剂量及紫外线组 Ia 阳性细胞数有显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.001$),见表 2。

表 1 胰岛-淋巴细胞混合培养结果

Table 1 Result of MILCs

	Control	Laser (times)			UVB (seconds)		
		1200	1000	800	50	40	30
SI	17.4 \pm 3.3	3.0 \pm 1.5***	6.0 \pm 2.7***	10.7 \pm 1.7***	12.3 \pm 3.1**	11.6 \pm 1.8***	13.2 \pm 4.1*
N	8	8	8	8	8	8	8

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

表 2 胰岛内 Ia 阳性细胞检测
Table 2 Ia-positive cell count in islets

Control	Laser (times)			UVB (seconds)		
	1200	1000	800	50	40	30
111±3.3	29±4***	50±5***	74±7*	72±7*	70±15*	71±3**

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001

4.3 胰岛形态学检查

经激光和紫外线照射预处理的新生大鼠胰岛经 HE 染色显示胰岛团结构与正常组相同。胰岛细胞排列紧密,核居中呈圆形或椭圆形,核仁清晰,胞浆丰富,见图 2,图 4。

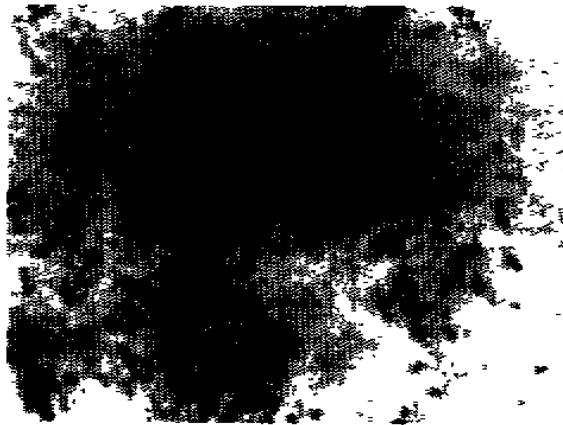


图 2 Iα 单抗染色, 200×。准分子激光照射后, 胰岛内 Iα 阳性细胞明显减少

Fig. 2 Laser-irradiated islets of a normal neonatal rat, Iα-MAb immunoenzyme-labeling stain, 200×. Brown-stained Iα-positive cells decreased markedly

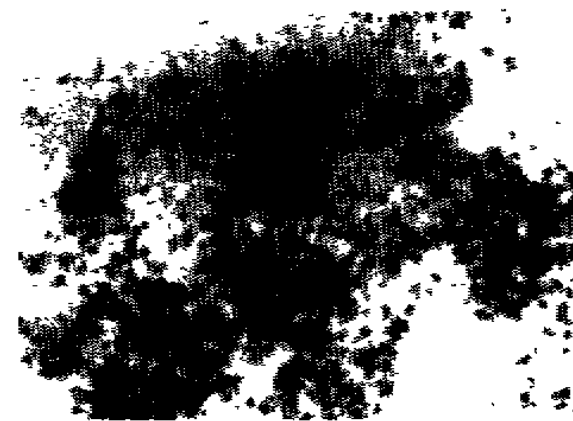


图 4 Iα 单抗染色, 200×。紫外线照射后, 胰岛内 Iα 阳性细胞明显减少

Fig. 4 UV beam irradiated islets of a normal neonatal rat, Iα-MAb immunoenzyme-labeling stain, 200×. Brown-stained Iα-positive cells decreased markedly

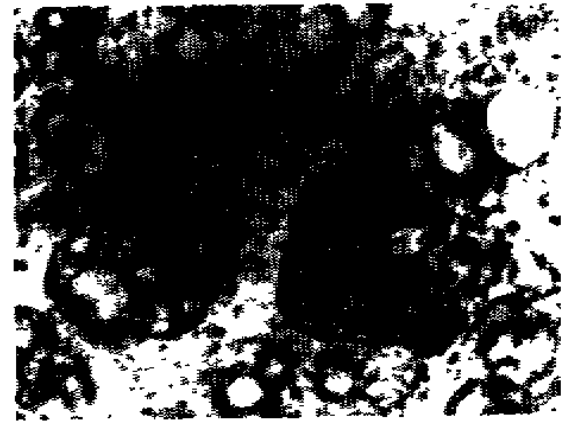


图 3 HE 染色, 200×。准分子激光照射后, 胰岛内分泌细胞结构完整, 与正常对照相似

Fig. 3 Laser-irradiated islets of a normal neonatal rat. HE. 200×. Islet cells appeared intact and similar to those of the normal control



图 5 HE 染色, 200×。紫外线照射后, 胰岛内分泌细胞结构完整, 与正常对照相似

Fig. 5 UV beam irradiated islets of a normal neonatal rat, HE. 200×. Islet cells appeared intact and similar to those of the normal control

Iα 单抗特殊染色显示激光组与紫外线组胰岛内 Iα 阳性细胞较正常组胰岛内 Iα 阳性细胞

明显减少,见图 3,图 5。

胰岛素与胰高糖素抗体免疫酶标染色显示激光组与紫外线组胰岛内 B 细胞和 A 细胞形态结构与正常胰岛相同。

激光组胰岛电镜检查显示 B 细胞核膜完整,胞浆内含电子密度较高的胰岛素分泌颗粒,线粒体和粗面内质网等亚细胞结构完整。

4.4 胰岛素释放试验

经预处理的 ICCs 的胰岛素释放试验结果与对照组无明显差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 胰岛素释放试验结果

Table 3 Result of insulin release test (pmol/Icc⁻¹)

	Control	Laser(times)			UVB(seconds)		
		1200	1000	800	50	40	30
LG	1.63±0.32	2.00±0.49	1.78±0.41	1.50±0.34	1.78±0.16	1.51±0.25	2.01±0.62
HG	2.59±0.71	3.15±0.94	3.34±0.68	2.60±0.52	2.68±0.41	3.89±1.19	3.58±0.70
HG/LG	1.60±0.33	1.60±0.44	2.02±0.74	1.79±0.45	1.51±0.18	2.55±0.52	1.89±0.49

LG: low glucose; HG: high glucose+theophylline

4.5 染色体检查

人外周血淋巴细胞经激光照射后,染色体无破损和致畸。

4.6 经预处理新生大鼠胰岛异体移植结构

激光组、紫外线组与对照组糖尿病大鼠异体胰岛移植后,各组各有 7 只有效,其中激光组缓解时间明显较紫外线组与对照组为长,但无统计学意义;移植物存活时间各组间无明显差异,见表 4。

表 4 新生大鼠胰岛异体移植

Table 4 Transplanting effect of neonatal rat islets

Groups	Blood glucose(mmol/L)		Survival of allografts(day)	
	Pre-Tx	Post-TX	Time of effect	Time of survival
Control (n = 9)	20.9±2.3	6.6±1.0	4±2	13±4
Laser (n = 0)	21.2±1.4	6.5±1.0	9±3	15±5
UVB (n = 9)	21.8±1.4	8.1±7.3	4±1	12±6

5 讨 论

据文献报道,中波紫外线能抑制人或动物外周血淋巴细胞增殖^[1-4]。本文中新生大鼠 ICCs 经准分子激光或紫外线照射预处理后,MLC 结果证明其刺激指数较对照组明显降低 ($P < 0.01$ 与 $P < 0.001$);胰岛内 Ia 阳性细胞数较对照组明显减少;激光组中 1200 次与 1000 次剂量组 SI 较紫外线各组均有明显差异 ($P < 0.05 \sim 0.001$);胰岛内 Ia 阳性细胞数亦较紫外线各组明显减少,提示激光预处理可明显降低大鼠胰岛的免疫原性。经预处理胰岛形态检查表明胰岛 B 细胞和 A 细胞的特殊分泌颗粒及亚细胞结构均保持完整无损,胰岛素释放试验证明分泌功能与对照组无明显差异,提示本文中所采用的照射预处理对胰岛分泌功能并无不良影响。

经激光或紫外线照射的新生大鼠胰岛异体移植结果表明,激光组受体大鼠糖尿病缓解时

间较对照组明显延长,但各组胰岛移植物存活时间并无明显差异,提示激光照射虽可使胰岛的免疫原性明显降低,但胰岛内仍残留少量 Ia 阳性细胞,可能诱发移植物排斥。Kenyon 等^[4]报告狗胰岛经紫外线照射后 MLC 反应明显降低,胰岛异体移植后若不用免疫抑制剂,移植物存活时间仍不可能延长,应用环孢素治疗才明显延长移植物存活。因此我们认为激光预处理虽可使胰岛的免疫原性显著降低,但异体胰岛移植后仍需适当应用免疫抑制治疗,以利胰岛移植物长期存活。

紫外线的照射除能引起 DNA 的损伤外,还可引起细胞膜的变化,改变细胞表面抗原,并干扰细胞间相互作用,抗原提呈与淋巴因子释放,从而改变供体的致免疫性和宿主的免疫应答。淋巴细胞经紫外线照射后即失去其在混合淋巴细胞培养(MLC)中作为刺激细胞的功能。

单核、巨噬细胞与树突状细胞(dendritic cells, DC)是强力的抗原提呈细胞,DC 是 MLC 中最强力的刺激细胞,涉及 DC 的免疫应答一般通过 DC 与淋巴细胞的细胞团形成而进行,如 DC 经紫外线照射即不能形成细胞团,淋巴细胞不能增殖,DC 在 UV 介导的免疫抑制中起重要的作用。此外,细胞团形成涉及到钙依赖性信号,促有丝分裂性与同种异体性刺激可促使正常细胞内游离钙骤增。但 UV 照射细胞则不能增加细胞内游离钙,提示 UV 介导的免疫抑制可能通过一种钙敏感性机理。准分子激光能量集中,波段符合中波紫外光谱(280~320 nm)故经激光照射降低胰岛致免疫性的效果应比 UVB 要好。

致谢 参加本工作的还有乐耀康、钟胜荣、徐静娟、张洪等同志。

参 考 文 献

- 1 M. A. Hardy, H. Lau, C. Weber *et al.*. Pancreatic islet transplantation: Induction of graft acceptance by ultraviolet irradiation of donor tissue. *Ann. Surg.*, 1984, 200:441~450
- 2 P. Y. Benhamou, E. Stein, Y. Mullen. Effect of ultraviolet-B irradiation on the function and immunogenicity of fetal porcine islet. *Transplantation Proceedings*, 1994, 26(2):705
- 3 P. Y. Benhamou, Y. Mullen, E. Stein *et al.*. Ultraviolet-B irradiation for immunoalteration of human islets. *Transplantation Proceedings*, 1994, 26(2):750
- 4 N. S. Kenyon, S. Strasser, R. Alejandro. Ultraviolet light immunomodulation of canine islets for polongation of allograft survival. *Diabetes*, 1990, 39:305~311

The Influences of Irradiation of Excimer Laser and an Ultraviolet Beam On Immunogenecity of Pancreatic Islet

Tang Xinli Yuan Cailai Jiang Baocai

(Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800)

Hu Yuanfeng Zhang Hongde Dong Weiping

(Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080)

Abstract After the pretreatment of neonatal rat islet-like cell clusters (ICCs) with irradiation of an excimer laser and an ultraviolet beam (UVB), the immunogenecity of islet was significantly reduced, especially in the excimer laser group. Morphological examination of the pretreated islets revealed that the secretory granules and subcellular structures remained intact, and the insulin secretion function of the pretreated islets showed no

significant difference with that of the control group. The islet allotransplantation in STZ-induced diabetes rats indicated that the diabetes remission period of the rats of the excimer laser group was significantly longer than that of the UVB group and the control group.

Key words pancreatic islet, immunogenecity, excimer laser, ultraviolet beam

Cr⁴⁺:YAG 被动调 Q 连续 Nd:YAG 激光

1991年, D. M. Andrauskas 和 C. Kennedy 提出:四价铬离子掺杂钇铝石榴石晶体(Cr⁴⁺:YAG)可以作为无驱动源的即插即用型饱和吸收被动调 Q 器件。它不仅具有经济实用的特点,还特别有益于激光二极管泵浦固体激光器的小型化。

然而,Cr⁴⁺:YAG 晶体生长有其特殊性,主要表现在 Cr 离子价态变化的控制方面。因而直到 1996 年才首次以 Cr⁴⁺:YAG 实现了对于连续 Nd:YAG 激光的被动调 Q:脉宽 80~300 ns,频率 2~29 kHz,平均功率约为 4 W。

我们采用中频感应加热提拉法生长 Cr⁴⁺:YAG 单晶,并进行特别退火处理后,以促使三价 Cr³⁺ 失电子而增加 Cr⁴⁺ 离子饱和吸收中心的浓度,整合晶格以消除生长应力提高晶体的损伤阈值,并同时试图降低点缺陷浓度以稳定晶体中的带电缺陷中心。晶体的光学品质得到了明显的改善,将其引入连续 Nd:YAG 激光腔后,泵浦阈值仅提高为原来调 Q 时连续 Nd:YAG 激光器的 1.3 倍。

连续氦灯泵浦的 Nd:YAG 激光器,腔长 640 mm, $\phi 6 \times 120$ mm 的激光棒居中放置,平面输出耦合腔镜透过率为 12%。为了进一步提高晶体的损伤阈值,并且希望增加其调 Q 性质的稳定性,本文将 1 mm 厚度的 Cr⁴⁺:YAG 片状晶体的一个通光面加镀 1064 nm 波长的全反膜(相对于水的折射率),即可以此面作为 Nd:YAG 激光器的后腔镜,又能够对 Cr⁴⁺:YAG 晶体的整个表面加以水冷;而另一面则加镀 1064 nm 波长的增透膜,使得 Cr⁴⁺:YAG 晶体能够对 Nd:YAG 1064 nm 激光加以调制。调 Q 实验中采用的 Cr⁴⁺:YAG 晶体的小信号吸收系数为 0.69 cm^{-1} ,透过率为 93%。

我们用 National VP-5512A 100 型示波器和 148C 型功率计进行测试,表明我们研制的 Cr⁴⁺:YAG 晶体已经能够实现连续 Nd:YAG 激光比较完全的调制(因为单脉冲波形表明脉冲后沿基本上已经达到基线);当氦灯驱动电流逐渐上升时(11.2~15.0 A)脉宽保持在 800 ns 左右,脉冲重复频率为 3~13.33 kHz,平均功率为 0~13 W,最大峰值功率高达 1200 W 以上。特别是再插入一片小信号透过率为 96%(总透过率即为 89.3%)的 Cr⁴⁺:YAG 晶体,则脉宽迅速下降到 500~600 ns,频率下降为 200~450 Hz。这说明只要选择不同浓度和厚度的 Cr⁴⁺:YAG 晶体,同样可达到声光、电光等主动调制器对脉宽和频率的选择。为增加调 Q 输出的稳定性,关于改进退火工艺的实验正在进行中。

(中国科学院上海光机所 陈伟 徐军 杨香春 孙占鳌
万小珂 邓佩珍 干福熹 收稿日期:1996-11-08)