

小鼠胸腺基质细胞辐射损伤效应

张红梅 于洪臣 凌翎 刘 及

(白求恩医科大学预防医学院, 长春 130021)

于志强

(白求恩医科大学第一临床学院, 长春 130021)

摘要 体外研究胸腺基质细胞的特性及功能, 发现不论是体外器官培养, 还是液体单层培养, 基质细胞都是在实质细胞退化死亡基础上不断增殖。单层培养可形成多角形细胞、纺锤形细胞及集落, 器官培养可形成“细胞槽”滋养细胞等特殊结构。在基质细胞上可见有免疫细胞生长。在 0.75 Gy 及 1.5 Gy 照射后, 基质细胞(含基质祖细胞)与未照射组对比减少不明显, 甚至有所增高, 而 4.0 Gy 和 8.0 Gy 照射后其数量显著下降。胸腺基质祖细胞的 D_0 值是 2.3 Gy, n 值是 1.4。

关键词 胸腺基质细胞, 辐射敏感性, 微环境, 器官培养

胸腺基质细胞构成胸腺的特异性微环境。观察胸腺细胞与基质细胞相互作用有两种类型, 一是胸腺内本来存在的细胞复合物, 如滋养细胞胞浆内有胸腺细胞(形态完整、功能正常)^[1]; 二是体外将胸腺细胞与基质细胞分离, 在实验条件下再形成特异的细胞复合物——玫瑰花环^[2], 如胸腺细胞与树突状细胞形成花环。这些复合物的类型与胸腺细胞的分化和发育的位置有关。表明基质细胞与胸腺细胞直接接触, 在胸腺中形成不同的局部微环境, 促进胸腺细胞的增殖和分化。本文主要利用多器官培养方法, 研究胸腺基质细胞特性及其辐射损伤效应, 为放射病和难治性造血免疫系统疾病的防治研究, 提供理论和实验基础。

1 材料与方 法

1.1 动物

选用本校实验动物部提供的 $C_{57}BL/6$ 纯系小鼠, 体重 20 ± 2 g, 雄性。

1.2 照射条件

飞利浦 X 射线深部治疗机, 电压 200 kV, 电流 10 mA, 滤片铜 0.5 mm 和铝 1.0 mm。剂量率为 0.435 Gy/min, 剂量分别为 0、0.75、1.5、4.0 和 8.0 Gy。照射组小鼠单次全身照射。

1.3 胸腺基质细胞培养

Лурия Е. А. 氏多器官培养法^[3]改良。脱白杀鼠, 75% 酒精消毒 5 min。取出胸腺置于装有 RPMI 1640 培养液的小平皿中。修洁后剪成约 1 mm^3 的组织小块。把预先浸入 RPMI 1640 培养液中的微孔滤膜(8×8 mm, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$)置于带孔塑料托的小孔上, 夹取组织块置于滤膜中央, 将含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 液加入小平皿中, 排出滤膜下气泡, 盖上平皿盖。置于

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1994-09-13, 修改稿 1995-05-10

37℃、5%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养1~16 d, 每天取滤膜固定, 制片观察形态。每周换全液2次。

1.4 正常胸腺基质细胞的动态变化

用目镜测微仪随机计数以种植块为中心的四个象限中的基质细胞数, 每个象限计数2个有基质细胞的视野, 共得8个数据, 绘制动态变化曲线。

1.5 受照0.75、1.5、4.0和8.0 Gy的胸腺基质细胞数量的变化

各剂量照射后杀鼠培养不同时间(1~16 d)固定, 染色。在显微镜下按上法计数基质细胞数, 绘制动态曲线。

1.6 胸腺基质辐射敏感性测定

取50只小鼠, 分8组X射线全身照射0、0.5、0.75、1.0、1.5、4.0、6.0和8.0 Gy。照射后按8组取胸腺, 制成浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 将8个剂量组的细胞分别种植于24孔培养板, 2复孔。在二氧化碳培养箱中常规培养8 d, 弃掉培养液, 去浮游细胞后用甲醛固定, 苏木精—伊红染色, 计数50个以上的成纤维细胞集落, 绘制剂量存活曲线, 推算出D₀值及n值^[4]。

2 结 果

2.1 胸腺基质细胞的动态变化

未照射组中, 随着培养时间的延长胸腺基质细胞大幅度增加, 大致呈“S”型(见图1)。0.75 Gy照射组基质细胞数基本上高于未照射组, 而1.5 Gy组接近对照组波动, 变化不大。4.0和

8.0 Gy组培养的头几天基质细胞数急剧减少, 到第6 d达最低, 以后逐渐增多, 4.0 Gy组相对增加较快。故随照射剂量的增加基质细胞数减少, 剂量越大, 减少越快(见图2)。

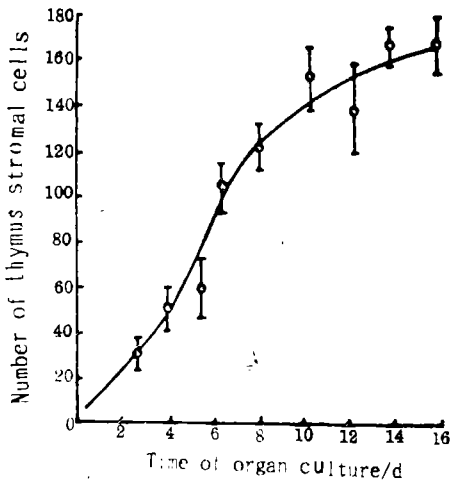


Fig 1. Dynamic characteristics of stromal cells in organ culture of normal thymus of mice

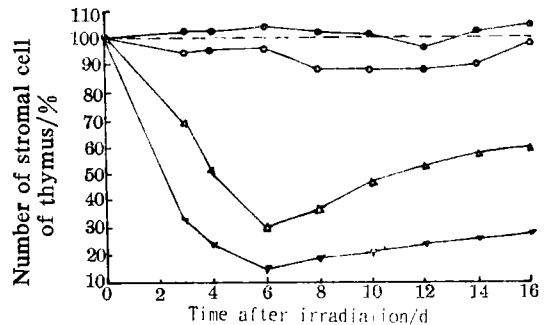


Fig 2. Dynamic change of stromal cell of thymus in irradiated mice
(---) 0 Gy (●) 0.75 Gy (○) 1.5 Gy
(△) 4.0 Gy (▼) 8.0 Gy

2.2 胸腺基质细胞辐射敏感性测定

胸腺成集落基质细胞剂量存活曲线见图3。在小剂量组, 随剂量加大, 基质细胞存活数改变不明显, 其D₀值及n值分别是2.3 Gy、1.4。

2.3 胸腺基质细胞对实质细胞的支持作用

未照射组胸腺器官培养的头2 d, 胸腺细胞在种植块周围大量迁移, 形成直径上超过种植块

3~4倍的堤。4~6 d 出现小的淋巴细胞灶,淋巴细胞与基质细胞紧密接触。多数迁移出的淋巴细胞很快退化,只在种植块周围或与基质细胞接触的淋巴细胞有生存能力。培养6 d 时基质细胞大量游离,增殖。8 d 出现“细胞槽”结构,同时基质细胞吞噬细胞碎屑。10~12 d 从种植块迁移出的淋巴细胞基本上都退化,只在种植块周围尚有少量淋巴细胞,而基质细胞仍大量增殖持续存在于滤膜上,且在生长区边缘拉长形成纺锤形的成纤维样细胞及多角形细胞,部分排列成条索状。

各照射剂量组胸腺器官培养的头2 d,同样地胸腺细胞急剧地向外迁移,但退变的淋巴细胞增多,且首先迁移到边缘。随着照射剂量的增大,这种现象更明显,只要基质细胞出现在滤膜上,就能观察到与淋巴细胞直接接触或其周围有淋巴细胞排列,甚至可观察到滋养细胞。随着培养时间的延长,淋巴细胞逐渐退变,基质细胞显露而增多,有的拉长呈成纤维样,有的呈多角形。在第10 d 仍可观察到基质细胞与淋巴细胞相互作用。0.75 Gy 组在第6 d 可观察到“细胞槽”结构,4.0 Gy 组第8~10 d 有此结构。

3 讨 论

在胸腺内,以胸腺上皮细胞为主体的胸腺基质细胞构成海绵样网状组织,胸腺细胞居于网眼内,与胸腺基质细胞紧密接触。位于不同部位的胸腺细胞处于发育过程的不同阶段^[6]。本实验的未照射组中,也观察到在滤膜上胸腺器官生长区域内,具有生存能力的淋巴细胞只保留在与基质细胞接触的部位,似通过这种方式,淋巴细胞获得必须的新陈代谢产物及ATP形式的能量^[6]。同时还观察到,基质细胞与胸腺细胞形成细胞复合物,甚至有少数基质细胞将胸腺细胞吞到胞浆内,与胸腺细胞形成共生现象,这与文献[1]报道一致。滋养细胞虽然使胸腺细胞与周围的微环境暂时完全隔离,但却为胸腺细胞分化提供了一个特殊的微小环境,这是细胞间直接作用的有力证据。

胸腺对辐射高度敏感,即使很小剂量,如0.005 Gy 照射后,其淋巴成分就能发生形态和功能变化^[7]。照射后前T-淋巴细胞(无论是骨髓的,还是胸腺内的)方面表露出的变化不断发展,而且其特征直接影响胸腺特殊再生^[8]。T-细胞在胸腺内发育成熟并向周围淋巴器官输送。受照射的胸腺移植实验表明,当剂量为4.0 Gy 时,淋巴样细胞就出现迁移减弱^[9],因此辐射后胸腺损伤能否恢复,直接影响机体的细胞免疫功能。胸腺的修复涉及由骨髓向胸腺输送的外来干细胞和受照后胸腺本身存留的仍具有增殖能力的胸腺细胞的增殖^[10]。

实验中0.75 Gy 照射组培养的第1 d 就有大量淋巴细胞退变死亡,而且随着照射剂量的增大,损伤的淋巴细胞增多,到8.0 Gy 照射组在滤膜上生长区内较“荒芜”。但胸腺基质细胞辐射敏感性比胸腺细胞低得多,通过实验得出其 D_{50} 值为2.3 Gy,而Sharp J. G. 等人依据支持胸腺内祖细胞增殖的能力,来确定胸腺微环境的辐射敏感性,发现8.0 Gy 以内不出现功能的变化,

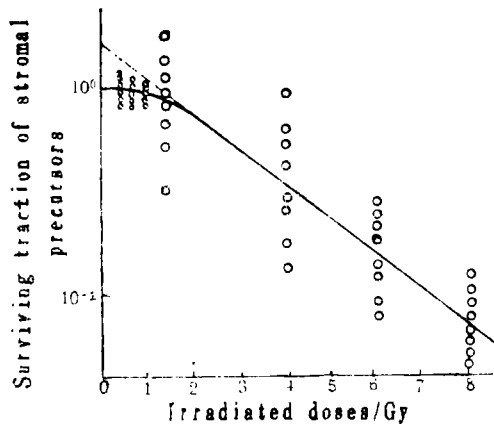


Fig 3. Dose-survival curve of stromal precursor cells of thymus in mice

进一步提高剂量则下降, 得出 D_0 值为 $1.8 \text{ Gy}^{[11]}$ 。由此可以得出, 胸腺基质细胞在辐射损伤后胸腺细胞的修复中很重要。

参 考 文 献

- 1 Andrews P, Boyd R, L. Eur. J. Immunol., 1985, 15(1): 36
- 2 Fink P J, Weissman I L, Daplan H S et al. J. Immunol. 1984, 132: 2266
- 3 Лурия Е А, Снегирева А Е. Б Э БМ, 1966, 5: 103
- 4 吴祖泽. 造血动力学概论. 北京科学出版社, 1978: 397
- 5 Дхалалов У Д. Методы структурнофункционального анализа компеноаторноприспособительных процессов. Ташкент, 1986, 32
- 6 Лурня Е А. В кн: Кроветворная и лимфоидная ткоть в культурах. Москва, 1972; 112
- 7 刘及. 辐射血液学. 原子能出版社, 1991: 176
- 8 Ярилин А А, Полушкина Э Ф, Мирошниченко И В, и др. Радиобиология, 1985, 15(4): 505
- 9 Haran-Ghera N. Radiat. Res., 1965, 26: 442
- 10 Беляков И. М, Кузьменок О И, Ярилин А А. Радиобиология, 1993, 33: 214
- 11 Sharp J G, Watkins E. B. Immunopharmacologic effects of radiation therapy. New York: Garland Pub. Inc, 1981; 137

RADIATION EFFECTS OF THYMUS STROMAL CELLS

Zhang Hongmei Yu Hongchen Ling Ling Liu Ji

(School of Preventive Medicine, Norman Bethune University of Medical Sciences,
ChangChun 130021)

Yu Zhiqiang

(First Hospital, Norman Bethune University of Medical Sciences, ChangChun 130021)

ABSTRACT By using the techniques of culture of mice thymus stromal cells in vitro, the characteristics of thymus stromal cells, their dynamic changes in various times in normal and after irradiation, their radiosensitivity was studied. The values of D_0 and n of thymus stromal cells were 2.3 Gy and 1.4 respectively. Decreases in number of stromal cells after irradiation with doses of 0.75 Gy and 1.5 Gy was not significant compared with group of non-irradiation. Significant decreases in number of stromal cells occurred by irradiation with doses of 4.0 Gy and 8.0 Gy .

KEYWORDS Thymus stromal cells, Radiosensitivity, Macroenvironment, Organ culture