

小鼠免疫器官(胸腺、脾脏和淋巴结)成克隆 基质祖细胞辐射敏感性的研究

于洪臣 张红梅 凌翎 于志强¹ 刘 及

(白求恩医科大学预防医学院卫生毒理教研室, 长春 130021)

(¹白求恩医科大学第一临床学院, 长春 130021)

摘要 用体外液体单层培养技术研究了小鼠胸腺、脾脏和淋巴结成克隆性基质祖细胞(CFU-F)的辐射敏感性: 胸腺CFU-F的 D_0 值为2.3 Gy, n 值为1.5, 脾脏为2.8 Gy和1.2; 而淋巴结的则为2.7 Gy及1.4。脾致密型CFU-F亚群的 D_0 值为2.1 Gy, $n=1.5$, 而松散型CFU-F亚群的 $D_0=4.4$ Gy, $n=1.2$ 。这为大剂量辐射损伤混输基质细胞以提高受体免疫造血功能, 提供了实验依据。

关键词 辐射敏感性, 细胞存活, 免疫器官, 免疫基质祖细胞

放射敏感性是放射生物学中衡量辐射生物效应的重要指标。 D_0 值则是衡量细胞放射敏感性的重要参数。绘制剂量存活曲线是衡量有增殖能力细胞辐射生物效应量效关系的重要手段。用体外液体单层培养法检测造血器官基质成克隆性祖细胞的辐射敏感性的报道较多^[1-3], 但对免疫器官成克隆性基质祖细胞(CFU-F)辐射敏感性研究甚少。文献曾证明混输脾基质细胞与骨髓细胞悬液在小鼠大剂量辐射免疫造血损伤修复中起重要作用^[4]。为深入了解免疫器官中CFU-F的特性, 以便利用基质更好促进免疫造血器官辐射损伤后的及早恢复, 本文研究了小鼠胸腺、脾脏及淋巴结的CFU-F集落形成规律及辐射敏感性。

1 材料与 方法

1.1 实验动物

C₅₇BL/6 雄性小鼠, 体重为 20 ± 2 g, 由白求恩医科大学实验动物部提供。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫器官(胸腺、脾脏及淋巴结)单个核细胞悬液的制备 取C₅₇BL/6小鼠用乙醚处死, 放到低浓度苯酚溶液中, 洗净后固定于石蜡板上, 酒精消毒后取出颈、腋下及腹股沟处淋巴结、胸腺及脾脏, 放入盛有DMEM液(每ml含青、链霉素各100 u)平皿中冲洗二次, 用无菌毛玻璃片分别将上述器官被膜内组织研细后, 移到盛有10 ml MEM培养液的广口瓶内, 用带4号针头注射器吹打后抽出, 移入另一广口瓶中, 制成单个核细胞悬液。

1.2.2 培养及染色 将上述细胞悬液, 调配成浓度分别为 2×10^6 /ml、 4×10^6 /ml、 6×10^6 /ml及 8×10^6 /ml各12ml培养体系(其中小牛血清20%, DMEM培养液80%), 然后将各组平均分装到底面积为7.5 cm²的4个培养瓶中, 放入日产RKI-1002型CO₂孵箱内(含5% CO₂、饱和湿度, 37℃), 培养10 d。终止培养时先去掉上层悬浮液, 冲洗后用10%甲醛固定贴壁细胞集落。苏木

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿1994-11-15, 修改稿1995-06-07

精、伊红染色，计数含 50 个细胞以上的 CFU-F 集落数，推算出成集落率，画出 CFU-F 数与植入单个核细胞数变化曲线。

1.2.3 CFU-F 辐射敏感性的测定 取 45 只小鼠分 5 组，在 4 °C 条件下用 ⁶⁰Co γ 射线全身照射 0、1.5、4.0、6.0 及 8.0 Gy。照后按 5 组取淋巴结、脾脏及胸腺，分别制成浓度为 4 × 10⁶/ml 及 8 × 10⁶/ml 的单细胞悬液，5 个剂量组的每个脏器的细胞，分别种植于 24 孔培养板孔中，每平行样 6 孔。按上法培养，染色及计数，做出剂量存活曲线，测算 D₀ 值及 n 值。

1.2.4 脾脏 CFU-F 不同亚群的辐射敏感性测定 如上法照射、培养、固定染色后，分别计数致密型及松散型集落数，再做出它们各自的剂量存活曲线并推算 D₀ 值及 n 值^[5]。

2 结 果

2.1 成克隆性基质祖细胞集落的形成

各器官单细胞悬液培养 3 d，可见贴壁圆形细胞及个别长形细胞，培养 6 d 可见由数个成纤维样细胞组成的小细胞丛，8~10 d 成纤维细胞丛变大，细胞数增多形成集落。典型集落中心为少数核圆或椭圆形的小细胞和个别巨大细胞，向外为中等大长形细胞，最外周为大型成纤维样细胞。脾脏致密型集落系由基质细胞紧密排列而成，其集落核心部分细胞密度最大，有的集落细胞呈复层分布。疏松(散)型集落则由单层基质细胞松散排列所形成，集落中心不如致密型明显，细胞数相对较少。

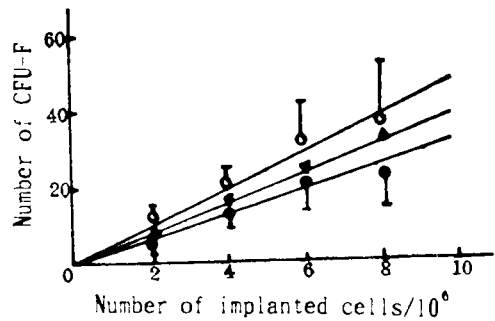


Fig 1. Linear relationship between numbers of formed CFU-F and implanted cells (○) thymus (▲) spleen (●) lymph node

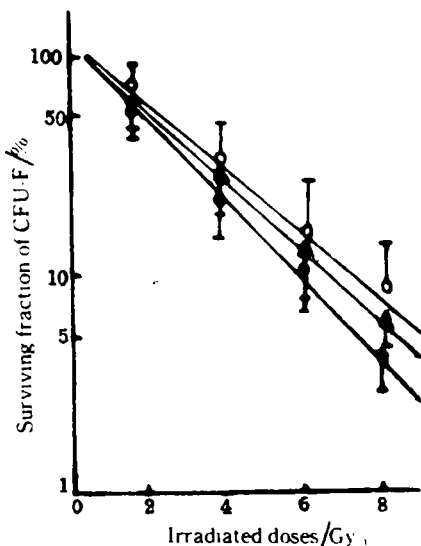


Fig 2. Dose-survival curve of CFU-F in immune organs (●) thymus (▲) lymph node (○) spleen

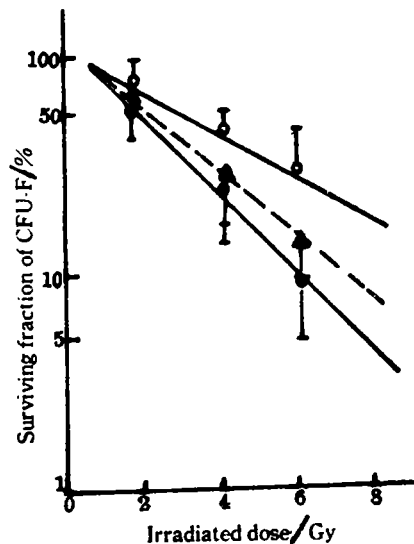


Fig 3. The radiosensitivity subpopulation of CFU-F in spleen (●) dense colonies (▲) total colonies (○) loose colonies

2.2 植入细胞数与成集落数呈现良好线性关系

当免疫器官(胸腺、脾脏及淋巴结)体外单层液体培养单个核细胞时,在检测的 $0\sim 8\times 10^6$ 种植细胞范围内,种植细胞数与集落形成数之间呈现良好的线性关系(图1)。这表明,三个脏器的基质集落是克隆性的。其中胸腺 CFU-F 成集落率相对最高(5×10^{-6}),淋巴结者最低(3×10^{-6}),脾脏者居中(3.5×10^{-6})。

2.3 胸腺、脾脏及淋巴结 CFU-F 的辐射敏感性测定

D_0 值是衡量 CFU-F 辐射敏感性的重要参数,胸腺 CFU-F 的 D_0 值为 2.3 Gy, $n=1.4$,脾脏的为 2.8 Gy 和 $n=1.2$,而淋巴结的则分别为 2.7 Gy 和 $n=1.4$ (见图2)。以成集落为指标的免疫器官 CFU-F 的辐射敏感性,较以存活率为指标的骨髓造血干细胞(CFU-S)的辐射敏感性为低(CFU-S 的 D_0 值为 1 Gy)^[6]。

2.4 脾脏 CFU-F 不同亚群的剂量存活曲线

从图3可见,致密型 CFU-F 亚群的 $D_0=2.1$ Gy, $n=1.5$,而松散型亚群则分别为 4.4 Gy, $n=1.2$ 。脾脏 CFU-F 集落总的 D_0 值为 2.8 Gy, $n=1.2$ (虚线)。

3 讨 论

免疫器官基质祖细胞是免疫微环境的重要细胞成分,对实质细胞起支持、营养与调控作用。因此深入研究成克隆基质祖细胞的性质和功能实属必要。实验结果中,种植细胞数与成集落数的美好线性关系、直线通过零点,表明所形成的集落是克隆性的。

本文实验所得到的免疫器官 CFU-F 的 D_0 值在 2.1~4.4 Gy 之间(总集落 D_0 值为 2.3~2.8 Gy)。虽然 CFU-F 的辐射敏感性较实质细胞的为低,但是,大剂量照后不但实质细胞损伤严重,基质细胞也明显受损。因而,大剂量辐射损伤免疫造血功能,适时回输体外培养、富集的基质细胞与正常同系实质细胞是必要且可行的^[4]。

脾脏成克隆性基质细胞,是由对射线敏感的、体外培养形成致密集落及放射耐受的、体外培养形成松散集落的二个亚群所组成。二亚群的性质和功能尚待深入研究。有人^[7]测定豚鼠骨髓 CFU-F 致密型亚群的 $D_0=1.43$ Gy, $n=1$,而形成中小体积的松散型亚群的 D_0 值为 4.31 Gy, $n\approx 1$,认为放射敏感的致密型 CFU-F 亚群可能是成骨干细胞,它能进行自身复制;而耐放射的松散型亚群则是成骨干细胞的分化后代。

参 考 文 献

- 1 Горская Ю. Ф. Грошева А. Г. Иммунология, 1986, 3: 26
- 2 Чайлахян Р. К. БЭБМ, 1984, (11): 605
- 3 于洪臣,刘及·白求恩医科大学学报,1982,3(增刊): 219
- 4 于洪臣,凌翎,李勇等.辐射研究与辐射工艺学报,1994,12(1): 40
- 5 吴祖泽.造血细胞动力学概论,北京:科学出版社,1978: 397
- 6 Till J E and E A McCulloch. Radiat. Res., 1961, 14: 213
- 7 Фриденштейн А Я, Лурья Е А. Клеточные Основы Кроветворного Микроокружения. Москва, 1980: 113

RADIOSENSITIVITIES OF IMMUNE ORGANS' STROMAL PROGENITORS

Yu Hongchen Zhang Hongmei Ling Ling Yu Zhiqiang¹ Liu Ji

*(Dept. of Health Toxicology, School of Preventive Medicine, Norman Bethune University
of Medical Sciences, Changchun 130021)*

(¹ First Teaching Hospital of Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT By using the technics of culture of immuno-stromal progenitors in vitro, we studied their radiosensitivities after irradiation in various doses. The values of D_0 and n of thymus, spleen and lymph node were 2.3 Gy and 1.5, 2.8 Gy and 1.2, 2.7 Gy and 1.4 respectively. The radiosensitivity of the CFU-F subgroups which formed dense colonies was significantly higher than that of loose colonies, when cultured in vitro.

KEYWORDS Radiosensitivity, Survival cells, Immune organ, Immuno-stromal progenitors