

辐照骨髓淋巴细胞对成骨细胞的影响

邹琼 丁巧灵 徐小雅 周轶 金慰芳 高建军

(复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

摘要 探索辐照后骨髓淋巴细胞对成骨细胞增殖分化的影响。采用酶消化法分离培养新生 SD 大鼠头盖骨成骨细胞, 密度梯度离心法获取大鼠骨髓淋巴系细胞, ^{137}Cs γ -射线辐照淋巴细胞和成骨细胞, 剂量 6 Gy, 分组为 0 Gy 成骨细胞+0 Gy 淋巴细胞(0OB0L), 0 Gy 成骨细胞+6 Gy 淋巴细胞(0OB6L), 6 Gy 成骨细胞+6 Gy 淋巴细胞(6OB6L), 共培养 6 h 后, 取各组淋巴细胞与正常成骨细胞共培养, MTT 和 PNPP 法观察其对成骨细胞增殖和分化的影响, Real time PCR 方法观察成骨细胞 ALP、OCN、RANKL 和 OPG 的基因表达变化。结果显示, 辐照骨髓淋巴细胞抑制成骨细胞分化, 成骨细胞 ALP 和 OCN 的表达显著降低, RANKL 的表达增高, RANKL/OPG 的比值则显著升高。辐照后的骨髓淋巴细胞抑制成骨细胞分化并且可能通过改变 RANKL/OPG 的比值进而影响破骨细胞的功能。

关键词 淋巴细胞, 成骨细胞, 增殖分化, 共培养, 电离辐射

中图分类号 R818.74, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.030202

Arron 等^[1]于 2000 年首次提出骨免疫学的概念, 描述了骨骼系统与免疫系统之间的相互作用, 免疫失调可导致骨代谢异常。近来许多研究显示, 骨免疫参与了类风湿关节炎、骨质疏松、Paget 骨病、骨溶解等诸多骨科疾病的发生与发展, 揭示了免疫系统对骨代谢的重要调节作用^[2]。

成骨细胞起源于未分化的间充质中的多潜能干细胞, 在生长因子、激素和细胞因子的共同作用下, 通过激活转录因子 RUNX2、ATF4 和 Osterix 等调控间充质干细胞向成骨细胞分化。碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)是成骨细胞分化和功能的重要标志之一, 在基质矿化中起着关键性的作用。ALP 活性高低一定程度上可以反映出细胞的成骨分化活性。骨钙素(Osteocalcin, OCN)是分化晚期成骨细胞分泌的骨蛋白, 其水平与成骨细胞活性呈正相关。骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)和(Ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL)是通过成骨细胞和骨髓基质细胞表达的, 可以相互竞争性结合破骨细胞膜上的 RANK。OPG 和 RANKL 比值的改变可以影响破骨细胞的分化, 活化和凋亡。本研究通过细胞增殖分化以及 ALP、OCN、OPG 和 RANKL

基因表达, 研究辐照淋巴细胞对成骨细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

二氧化碳培养箱, 环流热空气消毒箱购自德国 Heraeus 公司; 倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司; Mx3000P 实时定量 PCR 系统购自美国 Stratagene 公司; 酶标仪 Elx800 购自美国 Bio-Tek 公司; 培养瓶/板/皿/Transwell 购自英国 Corning 公司; RPMI1640 培养液和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; PNPP 购自美国 Amresco 公司; 二甲基噻唑二苯基四唑溴盐购自上海思吉生物制品有限公司; TRIZOL 试剂, M-MLV RT Kits 试剂盒, Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; HISTOPAQUE®1083 购自美国 SIGMA 公司。

1.2 淋巴细胞和成骨细胞分离培养

(100±10) g SD 大鼠, 氯胺酮(0.2 mL/100 g)麻醉, 颈动脉放血处死, 取双侧股骨和胫骨, 用注射器将

基金资助: 国家自然科学基金(81102071)、复旦大学青年教师科研能力提升项目(20520133100)资助

第一作者: 邹琼, 女, 1985 年 8 月出生, 2008 年 7 月毕业于安徽理工大学, 目前为复旦大学放射医学研究所硕士研究生, 研究方向为放射生物学

通讯作者: 徐小雅, 硕士, 实验师, E-mail: xiaoyaxu@fudan.edu.cn

收稿日期: 初稿 2014-01-02; 修回 2014-02-18

骨髓冲出, 200 目滤器过滤至 15 mL, 于离心管中 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 取另一 15 mL 离心管加入 3 mL HISTOPAQUE®1083, 3 mL PBS 重悬细胞液沿管壁缓慢加入离心管, 最后沿管壁加入 1 mL RPMI1640 培养液, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 吸取两分界层中的单个核细胞, 6 mL RPMI1640 培养液 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 两次, 8 mL 10% FBS RPMI1640 培养液重悬, 计数后接种于培养瓶, 置 5% CO_2 培养箱、37 °C 下培养。24 h 后弃除贴壁单核细胞, 取全部培养液离心后重悬细胞置 5% CO_2 培养箱、37 °C 下培养。

新生(<24 h)SD 大鼠, 用 70% 的酒精浸泡消毒 10 min, 机械取下头盖骨, 置 PBS 内清除结缔组织后剪成 1 mm^2 大小, 0.25% Trypsin 37 °C 下预消化 20 min, 弃消化液, 再将骨片置 0.1% Collagenase II 振荡消化 1 h 2 次, 合并两次消化液, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 弃上清, 细胞沉淀用 10% FBS MEM 重悬, 计数后接种于培养瓶, 置 5% CO_2 培养箱、37 °C 下培养。

1.3 淋巴细胞和成骨细胞辐照共培养

取第二继代成骨细胞分别以 1×10^3 /孔密度接种于 96 孔共培养板, 1×10^5 /皿接种于 6 孔共培养板; 淋巴细胞以 1×10^4 /孔接种于共培养条, 5×10^5 /皿接种于共培养皿。淋巴细胞培养 3 d, 成骨细胞汇合后, 以 ^{137}Cs γ 射线放射源分别进行 6 Gy 照射, 照射剂量率为 $0.783 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$, 照后两种细胞马上共培养, 分组为 0 Gy 成骨细胞+0 Gy 淋巴细胞(0OB0L), 0 Gy 成骨细胞+6 Gy 淋巴细胞(0OB6L), 6 Gy 成骨细胞+6 Gy 淋巴细胞(6OB6L), 共培养 6 h 后取淋巴细胞与正常二代成骨细胞共培养。

1.4 辐照淋巴细胞对成骨细胞增殖和分化的影响

共培养 3 d 后弃培养液用 PBS 清洗, 每孔加入无血清 MEM 培养液 100 L 及 MTT 10 L, 37 °C 5% CO_2 培养箱孵育 4 h, 加入 20% 的 SDS100 L, 37 °C 放置 2 h, 经酶标仪 570 nm 波长测吸光度, 结果以 A_{570} 表示。另一组培养 3 d 后用 PBS 清洗, 每孔加入 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEA100 L, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PNPP 50 L 37 °C 孵育 30 min, 加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 50 L 终止反应, 在酶标仪 405 nm 波长测吸光度, 结果以 A_{405} 表示。

1.5 成骨细胞相关基因的表达

共培养 2 h 后弃培养液, 每皿细胞均加入 TRIZOL 0.5 mL, 氯仿异丙醇法提取 RNA, DEPC 水溶解, 紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 计算 RNA 溶液浓度和纯度。按试剂盒方法进行逆转录和 Realtime PCR。引物序列, ALP: forward 5' TCCCAAAGGCTTCTTCTTGC3', reverse 5' ATGGCCTCATCCATCTCCAC3'(108 bp, NM_013059.1); OCN: forward 5' CTGAGTCTGACAAAGCCTTC3', reverse 5' CCATAGATGCGCTTGTAGGC3'(205 bp, NM013414.1), OPG: forward 5' ATACAGACAGCTGGCACACG3', reverse 5' TGCTTTCGATGACGTCTCAC3'(266 bp, U94330); RANKL: forward 5' ACCAGCATCAAAATCCCAAG 3', reverse 5' GGACGCTAATTCCTCACCA 3'(132 bp, AF187319); GAPDH: forward 5' AAACCCATCACCATCTTCCA 3', reverse 5' GTGGTTCACACCCATCACAA 3'(198 bp, DQ403053)。产物经融解曲线单峰验证, 于 T 阶段采集信号获得 Ct 值, 计算各测试基因与内参基因 GAPDH 比值作相对分析。

1.6 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的差异用 SPSS20.0 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐照骨髓淋巴细胞抑制成骨细胞分化

辐照淋巴细胞与相关成骨细胞共培养 6 h 后, 对正常成骨细胞的分化明显抑制, ALP 活性检测结果显示: 0OB6L 组较 0OB0L 组下降 15.98%($p < 0.01$); 6OB6L 组较 0OB0L 组下降 28.53%($p < 0.001$); 6OB6L 组较 0OB6L 组下降 14.93%($p < 0.05$) (见图 1)。对正常成骨细胞的增殖无明显影响, 统计学无差异 (见图 2)。

2.2 辐照骨髓淋巴细胞抑制成骨细胞 ALP 和 OCN 的表达

辐照淋巴细胞与相关成骨细胞共培养 6 h 后,

对正常成骨细胞 ALP 和 OCN 的 mRNA 表达明显抑制, 相应溶解曲线只有一个峰 (见图 3-5)。Real time PCR 的结果显示: 0OB6L 组 ALP 的 mRNA 水平较 0OB0L 组下降 20.96% ($p<0.01$), 6OB6L 组较 0OB0L 组下降达 39.33% ($p<0.001$), 6OB6L 组 ALP 水平又较 0OB6L 组下降 23.25% ($p<0.05$) (见图 6); 0OB6L 组 OCN 的 mRNA 水平较 0OB0L 组下降 19.02% ($p<0.05$), 6OB6L 组较 0OB0L 组下降达 40.49% ($p<0.001$), 6OB6L 组 OCN 水平又较 0OB6L 组下降 26.52% ($p<0.05$) (见图 7)。

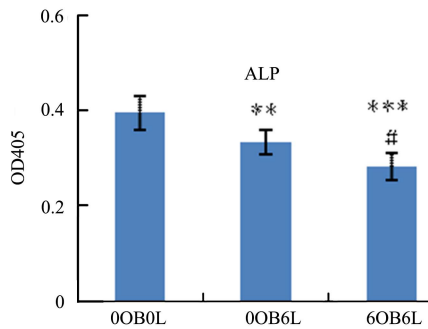


图 1 成骨细胞分化效应

Fig.1 Effects on the differentiation of osteoblast
结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=8$, **, $p<0.01$, *** $p<0.001$, 与 0OB0L 组比较, #, $p<0.05$, 与 0OB6L 组比较
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=8$; **, $p<0.01$, *** $p<0.001$, compared with 0OB0L, #, $p<0.05$, compared with 0OB6L

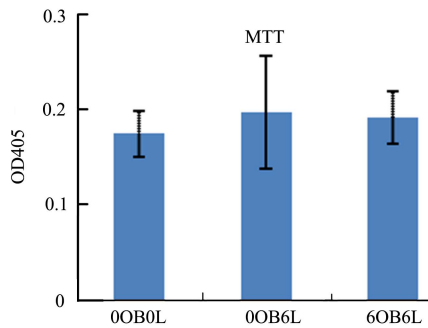


图 2 成骨细胞增殖效应

Fig.2 Effects on the proliferation of osteoblast

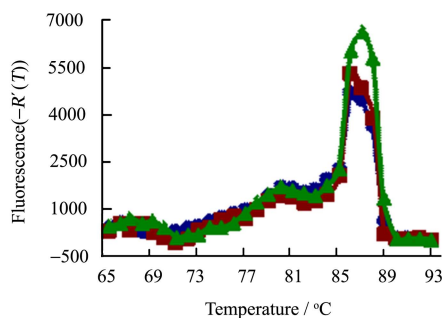


图 3 GAPDH 溶解曲线

Fig.3 Melting curves of GAPDH

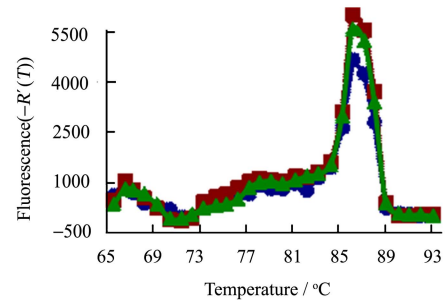


图 4 ALP 溶解曲线

Fig.4 Melting curves of ALP

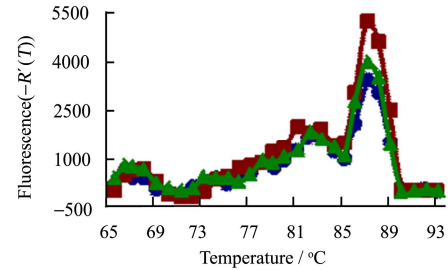


图 5 OCN 溶解曲线

Fig.5 Melting curves of OCN

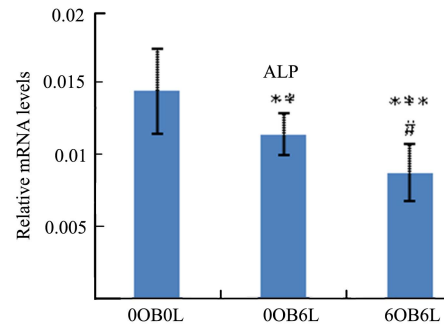


图 6 ALP 的 mRNA 表达

Fig.6 The relative mRNA expression of ALP
结果以 $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, *** $p<0.001$, 与 0OB0L 组比较, #, $p<0.05$, 与 0OB6L 组比较
Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, *** $p<0.001$, compared with 0OB0L, #, $p<0.05$, compared with 0OB6L

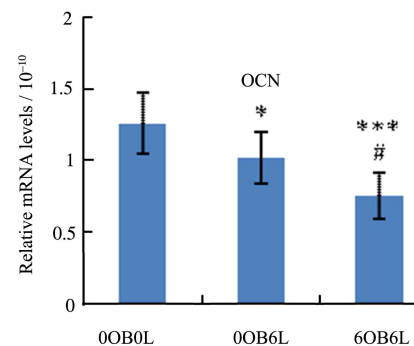


图 7 OCN 的 mRNA 的表达

Fig.7 The relative mRNA expression of OCN

2.3 辐照骨髓淋巴细胞促进成骨细胞 RANKL 表达, RANKL/OPG 比值上升

辐照淋巴细胞与相关成骨细胞共培养 6 h 后, 对正常成骨细胞 RANKL 的 mRNA 表达明显促进, OPG 的表达无明显影响 (见图 8), RANKL/OPG 比值明显升高, 相应溶解曲线只有一个峰 (见图 9 和图 10)。

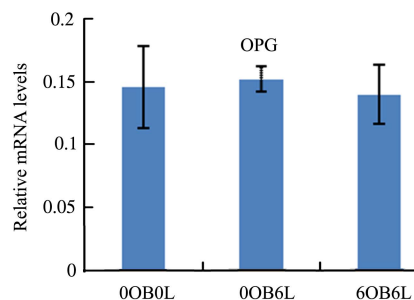


图 8 OPG 的 mRNA 的表达

Fig.8 The relative mRNA expression of OPG
结果以 $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *, $p<0.05$, *** $p<0.001$, 与 0OB0L 组比较, ###, $p<0.001$, 与 0OB6L 组比较

Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *, $p<0.05$, *** $p<0.001$, compared with 0OB0L, ###, $p<0.001$, compared with 0OB6L

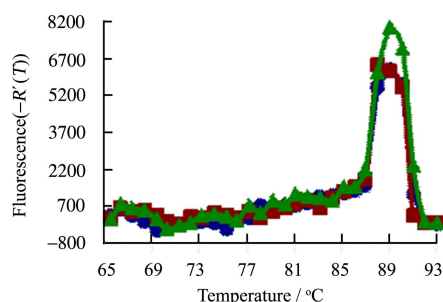


图 9 OPG 溶解曲线

Fig.9 Melting curves of OPG

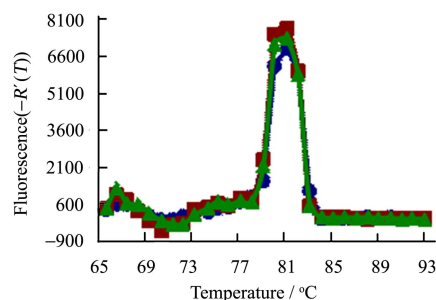


图 10 RANKL 溶解曲线

Fig.10 Melting curves of RANKL

Real time PCR 的结果显示: 0OB6L 组 RANKL 的 mRNA 水平较 0OB0L 组上升 42.45% ($p<0.05$), 6OB6L 组较 0OB0L 组上升 121.04% ($p<0.001$), 6OB6L 组 RANKL 水平又较 0OB6L 组上升

55.17% ($p<0.001$) (见图 11); 0OB6L 组 RANKL/OPG 的比值较 0OB0L 组上升 40.04% ($p<0.001$), 6OB6L 组较 0OB0L 组上升 138.07% ($p<0.001$), 6OB6L 组又较 0OB6L 组上升 70.00% ($p<0.001$) (见图 12)。

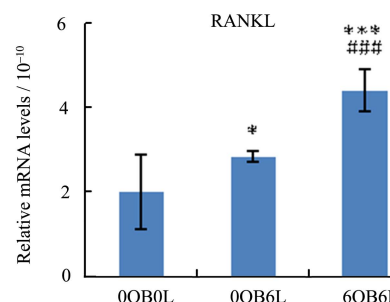


图 11 RANKL 的 mRNA 的表达

Fig.11 The relative mRNA expression of RANKL

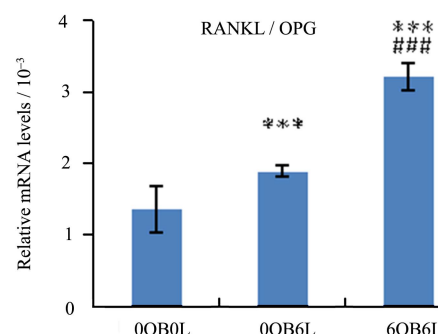


图 12 RANKL/OPG 的比值

结果以 $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *** $p<0.001$, 与 0OB0L 组比较, ###, $p<0.001$, 与 0OB6L 组比较

Fig.12 The ratio of RANKL/OPG

Date are presented as $\bar{x} \pm s$, $n=4$; *** $p<0.001$, compared with 0OB0L, ###, $p<0.001$, compared with 0OB6L

3 讨论

骨髓是造血器官,也是各种免疫细胞的发源地,骨髓中各阶段细胞不断在完成更新、增殖、分化和成熟等发育过程。其原始阶段细胞为多能干细胞,可以形成红细胞、粒细胞、巨噬细胞等,以及 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。骨髓造血干细胞的分化需要特殊的骨微环境,骨微环境主要由各种骨基质细胞组成,最主要的是间充质干细胞,而成骨细胞系对维持正常的造血功能,特别是为淋巴细胞的发育提供了不可或缺的支持作用。Runx2 和 Osterix 是间充质干细胞向成骨细胞分化早期的转录因子,这两种因子的失表达会导致成骨细胞数目严重减少,骨组织缺失,并且伴随骨髓造血功能低下,淋巴细胞缺失^[3-7]。Zhu 等^[8]又发现体外培养的头盖骨成骨细胞能充分支持造血干细胞向 B 淋巴细胞分化发育的全

过程, 确认了成骨细胞与 B 淋巴细胞前体的相互作用。成骨细胞在整个分化过程中是否对淋巴细胞的发育都有作用, 相关的研究表明, 只有分化早期的成骨细胞具有支持淋巴细胞分化的作用, 而分化成熟的成骨细胞对淋巴细胞分化无明显影响^[9-10]。本研究采用的骨髓淋巴细胞大多为早期不成熟淋巴细胞, 因此我们选取早期头盖骨成骨细胞与其共培养, 从而使成骨细胞支持骨髓淋巴细胞的分化。

近来许多研究显示, 骨免疫参与了类风湿关节炎、骨质疏松、Paget 骨病、骨溶解等诸多骨科疾病的发生与发展, 揭示免疫系统对骨代谢的重要调节作用^[2]。这种调节作用主要表现为免疫细胞和骨细胞间通过许多细胞因子(如肿瘤坏死因子 TNF- α , 白介素 IL-1、3、6、7、11、15、17 和 RANKL/RANK/OPG 系统)及其受体相互作用。T 淋巴细胞对成骨细胞和破骨细胞的刺激或抑制作用与 T 淋巴细胞亚群、细胞因子和局部因素密切相关。T 淋巴细胞激活后产生 RANKL、TNF- α 和 M-CSF, 这些因子可促进破骨细胞前体的分化和破骨细胞活化, 导致病理性骨吸收增强^[11-14]。B 淋巴细胞也可表达 RANKL, 但研究显示 B 淋巴细胞分泌的 RANKL 主要是促进 B 淋巴细胞的增殖和分化。同时细胞学研究表明前 B 淋巴细胞在 RANKL 和 M-SCF 刺激下可分化成破骨样细胞^[15-16]。这样, 免疫系统的两大主要细胞可通过细胞因子影响骨代谢。

以往大部分的研究结果都集中在免疫细胞对破骨细胞的影响, 很少有关免疫细胞对成骨细胞的影响。本研究通过辐照刺激淋巴细胞, 与早期成骨细胞共培养后作用于正常成骨细胞, 发现辐照共培养淋巴细胞抑制成骨细胞的分化, 碱性磷酸酶活性明显降低, ALP 和 OCN 的表达也明显降低。0OB6L 组和 6OB6L 组较 0OB0L 组碱性磷酸酶活性下降 15.98%($p<0.01$)和 28.53%($p<0.001$), ALP 基因表达下降 20.96%($p<0.01$)和 39.33%($p<0.001$), OCN 基因表达下降 19.02%($p<0.05$)和 40.49%($p<0.001$)。同时我们发现 6OB6L 组较 0OB6L 组对成骨细胞分化的抑制作用更明显, 具有统计学意义。以往的研究表明, 早期的成骨细胞对淋巴细胞的分化极其重要, 但是辐射刺激的淋巴细胞与成骨细胞的相互作用可能并非如生理状态, 其相互作用的结果使淋巴细胞抑制正常成骨细胞的分化。辐照共培养的淋巴细胞促进了成骨细胞 RANKL 的表达, RANKL/OPG 比值明显增高。0OB6L 组和 6OB6L 组较 0OB0L 组

RANKL/OPG 比值上升 40.04%($p<0.001$)和 138.07%($p<0.001$), 6OB6L 组又较 0OB6L 组上升 70.00%($p<0.001$)。RANKL 是破骨细胞分化和活化的重要因子, RANKL/OPG 比值的升高可以显著促进破骨细胞前体的分化和破骨细胞活化, 导致骨吸收增强。

辐照骨髓淋巴细胞抑制成骨细胞分化, 其机制可能是通过抑制成骨细胞 ALP 和 OCN 的表达; 同时辐照淋巴细胞促进成骨细胞 RANKL 的表达, RANKL/OPG 比值升高, 间接促进破骨细胞分化和活化。

参考文献

- 1 Arron J R, Choi Y. Bone versus immune system [J]. *Nature*, 2000, **408**(6812): 535-536.
- 2 Schett G. Osteoimmunology in rheumatic diseases [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2009, **11**(1): 210.
- 3 Komori T, Yaqi H, Nomura S, *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast [J]. *Cell*, 1997, **89**(5): 755-764.
- 4 Otto F, Thormell A P, Crompton T, *et al.* Cbfa1-a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development [J]. *Cell*, 1997, **89**(5): 765-771.
- 5 Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, **108**(1): 17-29.
- 6 Zhou X, Zhang Z, Feng J Q, *et al.* Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice [J]. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*, 2010, **107**(29): 12919-12924.
- 7 Deguchi K, Yaqi H, Inada M, *et al.* Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1999, **255**(2): 352-359.
- 8 Zhu J, Garrett R, Jung Y, *et al.* Osteoblast support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells [J]. *Blood*, 2007, **109**(9): 3706-3712.
- 9 Ducy P, Desbois C, Boyce B, *et al.* Increased bone formation in osteocalcin deficient mice [J]. *Nature*, 1996, **382**(6590): 448-452.
- 10 Cheng Y H, Chitteti B R, Streicher D A, *et al.* Impact of

- maturational status on the ability of osteoblasts to enhance the hematopoietic function of stem and progenitor cells [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, **26**(5): 1111-1121.
- 11 Walsh M C, Kim N, Kadono Y, *et al.* Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism [J]. *Annual Review of Immunology*, 2006, **24**: 33-63.
- 12 Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, **7**(4): 292-304.
- 13 Teitelbaum S L. Bone resorption by osteoclasts [J]. *Science*, 2000, **289**(5484):1504-1508.
- 14 Suda T, Takahashi N, Udagawa N, *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families [J]. *Endocrine Reviews*, 1999, **20**(3): 345-357.
- 15 Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, *et al.* Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice [J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, **19**(7): 1137-1143.
- 16 Katavic V, Grcevic D, Lee S K, *et al.* The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast precursors [J]. *Bone*, 2003, **32**(6): 581-590.

Effects of radiated lymphocyte on the osteoblast

ZOU Qiong DING Qiaoling XU Xiaoya ZHOU Yi JIN Weifang GAO Jianjun

(*Institute of Radiation Medicine of Fudan University, Shanghai 200032, China*)

ABSTRACT The osteoblast was cultured from cranium of fetal rat with enzymatic digestion method; bone marrow lymphocyte was cultured by density gradient centrifugation; two kinds of cells were irradiated with ^{137}Cs γ -rays of 6 Gy; the groups were set as 0 Gy osteoblast+0 Gy lymphocyte(0OB0L), 0 Gy osteoblast+6 Gy lymphocyte(0OB6L), and 6 Gy osteoblast+6 Gy lymphocyte(6OB6L). After 6 h co-cultivation, the lymphocyte was co-cultured with normal osteoblast, and then the proliferation and differentiation of osteoblasts were detected by MTT and PNPP after 72 h, meanwhile, the mRNA expression of ALP, OCN, RANKL, and OPG of the osteoblast were detected after 2 h. The results suggest that radiated lymphocyte can inhibit the differentiation of osteoblast, down-regulate the mRNA expression of ALP and OCN, up-regulate the mRNA expression of RANKL and increase the ratio of RANKL/OPG. The radiated bone marrow lymphocyte not only suppresses the differentiation of osteoblast, but also affects the osteoclast by changing the ratio of RANKL/OPG.

KEYWORDS Lymphocyte, Osteoblast, Proliferation and differentiation, Co-culture, Ionizing radiation

CLC R818.74, TL71