



人血 T·B 淋巴细胞转化过程的辐射敏感性比较研究

刘克良 苏燎原 薛智谋 陶明山

马祥瑞 王明锁 王洪云

(苏州医学院)

摘要 离体人血经 ^{60}Co γ 线照射后, 用 ConA 刺激 T 细胞转化, LPS + DS 共同刺激 B 细胞转化, 以 ^{14}C -缬氨酸掺入实验。用液体培养法和扩散盒培养技术, 分别观察 T·B 细胞在转化、增殖过程中的抑制程度。结果表明: 受照射后 T 细胞比 B 细胞受抑明显, 反映 T 细胞比 B 细胞的辐射敏感性高。

关键词 刀豆球蛋白 A; 脂多糖; T-淋巴细胞; B-淋巴细胞; 辐射敏感性。

引言

淋巴细胞是具有高度辐射敏感性的非均一群体, 如包括 T·B 细胞亚群等。为进一步了解辐射对免疫功能的影响, 就有必要研究淋巴细胞亚群的性质、及其受辐射损伤的规律。我们以往的工作, 曾观察到淋巴细胞对电离辐射较为敏感^[1]。但文献报道对 T·B 细胞亚群的辐射敏感性尚有不同看法。本实验以 ^{14}C -缬氨酸掺入法, 对正常人静脉血 T·B 淋巴细胞转化过程的辐射敏感性进行了比较研究, 并对其辐射损伤规律进行初步探讨。

实验方法

献血员静脉血 10ml、肝素抗凝。每份血分装在 7 个(包括对照)小瓶内, 经不同剂量 ^{60}Co γ 线照射, 距离为 70cm, 剂量率为 78rad/min。每份血样均设有自身血对照。实验分两部份进行。

(1) 液体培养法 每份血样受 6 种剂量照射后, 立即分别培养在无缬氨酸 Eagle 氏培养液内。每瓶 2ml 培养液内含 15% 人的 AB 血清、适量青、链霉素、刀豆蛋白 A(ConA, Sigma) 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 促 T 细胞分裂素, 促 B 细胞分裂素用细菌脂多糖 (LPS, Difco) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及葡聚糖硫酸盐 (DS) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[2]。每瓶加血 0.2ml。每个剂量点的血液各分装 4 瓶, 即含两种不同分裂素的培养液各 2 瓶, 作为平行样本。37℃ 培养经 48 小时后用 ^{14}C -缬氨酸掺入、每瓶注入 1 μCi (放射性比度 250mCi/mM), 继续培养 24 小时。结束时收获在 49 型纤维滤膜上。国产 FJ2100 型液闪计数器测定。每份血样中 ^{14}C -缬氨酸掺入量 (Cpm) 即反映蛋白质合成能力, 结果取其均值。

(2) 琼脂扩散盒培养法^[3] 在无菌条件下用淋巴细胞分离液, 分离对照组、64、160rad 照射组血中淋巴细胞。然后分别用含 ConA 或 LPS + DS (含量同上) 及 15% 人的 AB 血清的 RPMI 1640 培养液, 制成单细胞悬液, 加至含 0.5% 琼脂适合人血淋巴细胞增殖的培养基中。在干燥器底层点燃酒精棉球后, 速将盛扩散盒的培养皿置入密封, 置 37℃ 温箱内培养 9 天收获计数, 每个扩散

盒内含 1×10^5 个细胞/0.15ml 悬液, 生长 50 个细胞以上计为一个集落。

结 果

(1) 9 例正常人外周血淋巴细胞经 ^{60}Co γ 线照射后转化过程中 ^{14}C -缬氨酸掺入量 (见表 1)。

表 1 不同照射剂量对 ^{14}C -缬氨酸掺入 T·B 淋巴细胞量 (Cpm) 的影响

组 别	对 照 组	10 rad	25 rad	64 rad	160 rad	400 rad	1000 rad
T 淋巴细胞 均数±标准差	7880 ±1481	7549 ±1813	6723 ±2171	6257 ±1947	4630 ±1487	4219 ±1049	3108 ±1154
占对照 (%)	100	95.8	85.3	79.4	58.8	53.5	39.4
B 淋巴细胞 均数±标准差	2049 ± 555	1829 ± 578	1576 ± 557	1329 ± 389	1233 ± 502	1178 ± 412	1096 ± 416
占对照 (%)	100	89.3	76.9	64.9	60.2	57.5	53.5

将表 1 中 Cpm 值经平方根转换后, 进行随机化区组实验的方差分析, F 值分别为 8.89、4.16, $P < 0.01$ 。即不同照射剂量间, γ 线对 ^{14}C -缬氨酸掺入淋巴细胞蛋白质的效应 (放射性计数的均数间) 均有非常显著差异。再用 Keuls 检验法进行比较, ^{14}C -缬氨酸掺入除对照与 10rad 组差异不显著外, 与其余各组均有非常显著差异。各种照射剂量与 ^{14}C 掺入 T·B 细胞放射性计数的对数间呈直线关系 (见图 1)。

(2) 正常人外周血经 ^{60}Co γ 线照射后淋巴细胞集落形成能力的结果 (见表 2)。

由表 2 可见, 淋巴细胞受照射后, 其转化增殖能力均受到明显抑制, 与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$)。且 T·B 淋巴细胞的增殖能力, 亦随照射剂量加大而明显下降。

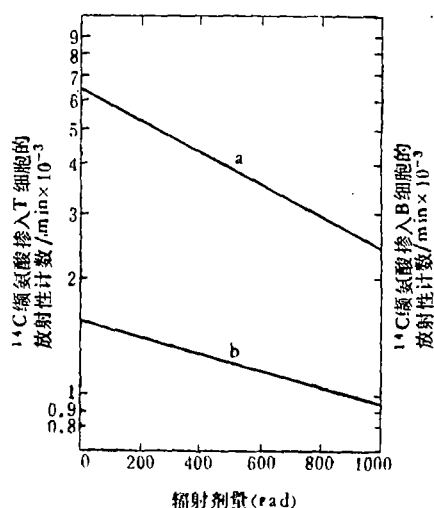


图 1 不同剂量 γ 线照射与 T·B 细胞蛋白质合成的关系

$$a: \log \hat{y}_T = 3.8131 - 0.0004 x$$

$$b: \log \hat{y}_B = 3.1782 - 0.0002 x$$

表 2 不同剂量照射对 T·B 淋巴细胞集落形成能力的影响

组 别	对 照 组	64 rad	160rad
T 淋巴细胞	120.0±7.4	71.6±26.0	34.8±17.6
占对照 (%)	100	59.6	29.0
B 淋巴细胞	65.0± 7.8	50.4±12.7	22.4± 5.8
占对照 (%)	100	77.5	34.5

每组为 5 个样本均数±标准差

讨 论

辐射引起淋巴细胞损伤已为人们所熟知,随着淋巴细胞亚群的发现,对其辐射敏感性的研究亦逐渐深入。有关 T·B 淋巴细胞的辐射敏感性已有不少报道;多数作者认为 B 细胞比 T 细胞敏感^[4~8],但也有相反的结果^[9~10]。本实验中从剂量与掺入两条回归线的回归方程看出:¹⁴C-缬氨酸在 T·B 淋巴细胞转化过程中掺入量与剂量相关的回归系数(*b*)分别是 0.0004 和 0.0002。剂量为 1000 rad 时, T 细胞 ¹⁴C-缬氨酸掺入率占对照的 39.4%, B 细胞占 53.5%。由扩散盒培养法也获得相同结果;如受 160 rad 照射后, T 细胞的集落形成能力是对照的 29%, B 细胞是 34.5%。从总的趋势看, T 细胞的辐射效应比 B 细胞大。但小于 160 rad 照射, B 细胞蛋白质合成受抑大于 T 细胞;与辐射对 T·B 细胞集落形成能力的受抑情况相反。这除因射线对淋巴细胞蛋白质合成与增殖活力的抑制敏感性不同外,还可能因 T·B 细胞各自包含辐射敏感性不同的亚群。用 ConA 激活的主要是 T 细胞群中抑制性 T 细胞。LPS + DS 激活的是 B 细胞群。两者比较,虽从总的趋势看是 T 细胞敏感性高于 B 细胞。但受较低剂量照射时蛋白质合成受抑却相反,此现象提示 B 淋巴细胞群为非均一的群体。

由表 2 看出,无论是受 64 或 160rad 照射后, T 细胞集落形成能力比 B 细胞受抑明显。这可能是半固体培养法,培养时间比液体培养时间长(9 天),更能反映子代细胞的分裂增殖及代谢活力,故所得结果与表 1 中小于 160 rad 照射蛋白质合成受抑的结果相反。但是 T·B 细胞的辐射敏感性,因取材及实验方法不同,所得结果可能有所不同。如用小鼠整体照射后观察脾脏 T·B 细胞分别在 PHA 或 DS 刺激下的转化反应^[6],结果是 B 细胞转化反应对辐射效应比 T 细胞转化反应更为敏感。但我们曾用 DS 激活血中 B 细胞就未获成功。可能是小鼠脾脏 B 细胞对分裂素的应答反应与人外周血 B 细胞有所不同。若用淋巴细胞有关膜受体的辐射效应^[4],亦获得 B 细胞辐射敏感性高于 T 细胞的结果;并认为复杂的膜系统可能是辐射损伤的另一个重要靶子。本实验仅从正常人血受不同剂量 γ 线照射后,以 ConA 激活 T 细胞与 LPS + DS 激活 B 细胞,在离体培养转化过程中蛋白质合成受抑程度,及在半固体培养中的增殖能力进行比较,而初步认为 T 细胞辐射效应较 B 细胞更为敏感。

DNA 合成是细胞转化的物质基础。蛋白质合成也是细胞进行有丝分裂所必需的。DNA 的复制和 RNA、蛋白质合成密切相关^[11~12]。测定淋转反应时,用 DNA 合成或蛋白质合成为指标所得结果是紧密平行的。受照射后的血液在相应促分裂素刺激下,以 ¹⁴C-缬氨酸掺入分别反映 T·B 细胞转化,即可观察 T·B 细胞辐射敏感性的差异。用这种直接测定 T·B 细胞转化方法,来直接比较辐射对 T·B 细胞转化能力的影响,比用测定免疫球蛋白或膜受体形态法,来研究其辐射敏感性,在方法学上更为简便和可靠。

小 结

用 ConA, LPS + DS 分别激活 T·B 细胞,以 ¹⁴C-缬氨酸掺入,反映照射后 T·B 细胞转化时蛋白质合成受抑程度。发现照射后 T·B 细胞的转化、增殖能力均随剂量加大而明显下降。剂量与掺入回归线的系数(*b*)各为 0.0004 和 0.0002。当剂量达 1000rad 时,用液体培养法测定 T 细胞 ¹⁴C-缬氨酸掺入率占正常对照的 39.4%, B 细胞占 53.5%。用扩散盒培养法,照射剂量达 160rad

时, T 细胞集落形成能力占对照的 29%, B 细胞占 34.5%。从总的趋势看, ConA 激活的 T 细胞比 B 细胞对辐射的作用更为敏感。

参 考 文 献

- [1] 苏州医学院卫生系, 第三教研组, 生物化学与生物物理进展, 3, 10(1977)。
- [2] 苏燎原, 薛智谋, 孙正德, 徐琴秋, 中华微生物学和免疫学杂志, 2(6), 346(1982)。
- [3] 马祥瑞, 汪涛, 王洪云, 苏州医学院学报, 2, 49(1982)。
- [4] 虞介昌, 茅子均, 殷志伟, 第二届全国辐射研究学术会议论文摘要汇编, 上册, 64(1982)。
- [5] 茅子均, 冯树一, 罗健君, 苏州医学院学报, 1, 38(1981)。
- [6] J. S. Prosser, *Int. J. Radiat. Biol* 30(5), 459(1976)。
- [7] R. S. Mello, D. Kwan and A. Normon, *Radiat. Res.*, 60, 482(1974)。
- [8] S. K. Durun and N. Gengozian, *Int. J. Radiat. Biol.*, 34, 1(1978)。
- [9] M. Abe and M. Nakamura *Exc. Med. Hemat.*, 12, 87(1975)。
- [10] Z. Fuks, S. Strober, A. M. Bobrove and T. J. Sasazuki, *Clin. Invest.*, 58, 804(1976)。
- [11] 苏燎原, 刘克良, 林兴成, 冯纪辛, 遗传学报, 8(3), 216(1981)。
- [12] 太田行人, 岡田節人, 岡田善雄, 細胞の構造と機能 I, p. 206, 岩波書店, 1978。

(1982 年 12 月 7 日收到)

THE COMPARATIVE STUDY OF RADIOSENSITIVITY OF HUMAN T AND B LYMPHOCYTES DURING TRANSFORMATION

Liu Keliang Su Liaoyuan Xue Zhimou Tao Mingsan

Ma Xiangrui Wang Mingsuo Wang Hongyun

(Soochow Medical College, Soochow)

ABSTRACT By means of liquid culture and agar culture in vitro, the variety of ability of reproduction of human T and B lymphocytes induced by radiation has been studied comparatively. Human blood exposed to ^{60}Co γ -rays in vitro was incubated respectively in Eagle's medium or agar medium. In one group of the experiment Con A was a mitogen for T lymphocytes. LPS and DS were added into the another group of the experiments for reproducing of B lymphocytes. ^{14}C -valine was incorporated into all samples of liquid cultures. The results from the comparative study showed that the ability of T lymphocytes declined more significantly than B lymphocytes. Hence it may be suggested that T lymphocytes were more radiosensitive than B lymphocytes.

KEY WORDS Concanavalin A (Con A); Lipopolysaccharide (Lps); T-Lymphocyte; B-Lymphocyte; Radiosensitivity.