

T 淋巴细胞的增殖动力学和辐射敏感性研究

马祥瑞 汪 涛 王洪云

(苏州医学院)

摘要 PHA 诱导淋巴细胞在琼脂培养基上形成集落, 是研究电离辐射影响 T 淋巴细胞增殖能力的灵敏方法。本实验用琼脂培养和液体培养法比较研究了人血 T 淋巴细胞的增殖动力学和辐射敏感性。结果提示: (1) 在 12 天内 T 淋巴细胞集落数随培养时间延长而增加; (2) 集落数和 ^3H -TdR 掺入率随照射剂量加大而降低, 且在不同的剂量范围内, 下降的速度亦不同, 其中集落数降低较明显。

关键词 T 淋巴细胞; 增殖; 辐射敏感性; 集落。

引 言

PHA 诱导外周血淋巴细胞在琼脂培养基上形成集落给研究 T 淋巴细胞增殖能力提供了一个良好的方法^[1]。此法已广泛地应用于淋巴细胞增殖分化、功能、特性的研究。本实验用单层琼脂培养和液体培养技术, 对人外周血 T 淋巴细胞增殖动力学及其辐射敏感性进行了比较研究。

实 验

实验用正常献血员的淋巴细胞悬液 (10 例淋巴细胞悬液, 分别用淋巴细胞分离液分离全血获得)。PHA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 为丝裂原。在无菌条件下制成 0.3% 琼脂培养体系, 分别装在培养皿内 (每个培养皿内含 5×10^4 个细胞/0.15 ml), 供实验用。

实验分两部份, (1) T 淋巴细胞增殖动力学观察, (2) T 淋巴细胞辐射敏感性研究。两部份实验均用集落法和 ^3H -TdR 掺入实验进行对比研究。首先将淋巴细胞悬液分成 12 等份, 供琼脂和液体培养 (2×10^6 个单个核细胞) 用。每两份样品为一组, 进行 ^{60}Co 线照射, 剂量率: 75 rad/min, 剂量分别为 0 (对照组)、50、100、200、400 和 600 rad。

动力学实验中琼脂培养的观察时间为接种后 2、4、6、8、10 和 12 天。液体培养在接种后第 2、3、4、5、6、7、8、9、10 和 11 天收获计数。琼脂培养: 将琼脂培养皿置于密封的含 5% CO_2 的潮湿环境中, 37℃ 培养 9 天, 收获计数, 凡由 50 或 50 个以上的细胞聚成的细胞团, 即记为一个集落。液体培养: 将 0.1 ml 肝素抗凝血或 2×10^6 个单个核细胞接种到 2 ml 含 PHA 的 RPMI-1640 培养液中, 37℃ 培养。收获前 11 小时每瓶内注入 1.2 μCi ^3H -TdR (放射性比度: 19 Ci/mM)。

辐射敏感性实验的收获时间在接种后第 4 天 (为便于安排实验工作, 选用接种后第 4 天收获)。培养结束时将细胞收获在 49 型玻璃纤维滤膜上, 用国产 FJ353 型液体闪烁计数器测定各样品的脉冲数 (cpm)。

实 验 结 果

1. 人血 T 淋巴细胞增殖动力学观察

实验共采用 10 名献血员的血样。琼脂培养每组设 3~5 个平行样本。从接种后第 2 天起即可

观察到集落, 结果如图1所示。

液体培养结果: ^3H -TdR 掺入计数为3个样本的平均值, 见图2。

2. 人血T淋巴细胞辐射敏感性

将各组淋巴细胞集落数换算成百分数(对照组为100%), 再经反正弦函数转换后, 进行F检验, $p < 0.01$ 。组均数间两两相比较, 差异非常显著。上述实验结果表明: 在0~100 rad剂量范围内, 集落数下降速度较快; 在100~600 rad范围内, 集落数下降速度较慢。分别对快、慢两组份进行直线回归和相关分析, 0~100 rad组: $r = -0.96$; 100~600 rad组: $r = -0.99$ (t 检验, $p < 0.05$)。 D_0 值分别为171.0和588.0 rad(见图3A)。

液体培养: 各剂量组 ^3H -TdR 掺入计数, 经平方根($\sqrt{x}$)转换后进行F检验, $p < 0.01$ 。

组均数间两两相比较, 除50和100 rad组间无差异外, 其余各组间的差异非常显著。在0~100 rad和100~600 rad剂量范围内 ^3H -TdR 掺入计数下降速度也不同。快、慢两组份的直线回归和相关分析: 0~100 rad组: $r = -0.96$; 100~600 rad组: $r = -0.98$ (t 检验, $p < 0.05$)。 D_0 值分别为434.0和736.0 rad(见图3B)。

用百分数表示各剂量组的 ^3H -TdR 掺入计数, 并与集落计数的百分数相比较(见表), $p < 0.02$ 。

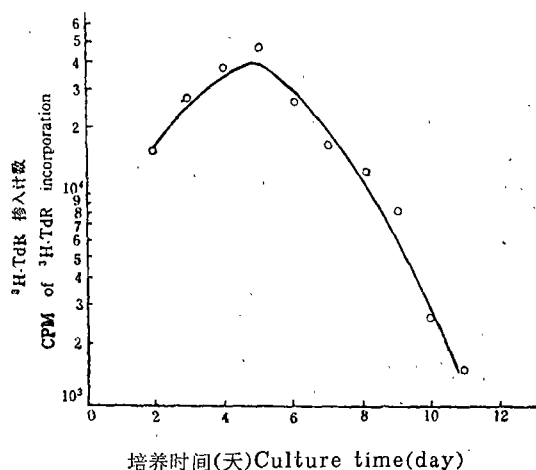


图2 液体培养中 ^3H -TdR 掺入淋巴细胞的动态观察

(每个样本0.1 ml全血)

Fig. 2 The Kinetics of ^3H -TdR incorporating into T lymphocytes (Each sample contained 0.1 ml blood)

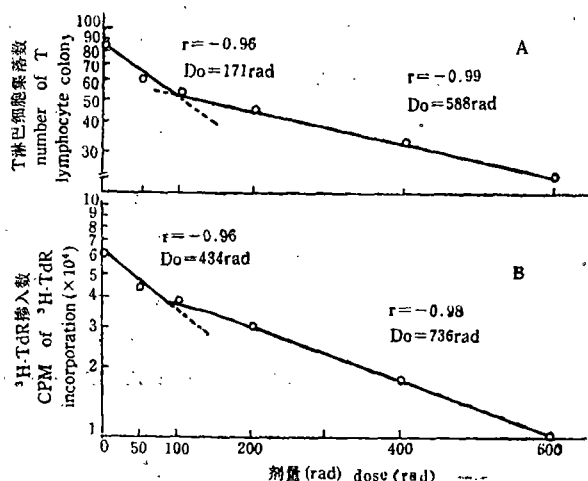


图3 γ -射线对不同培养环境中人血T淋巴细胞增殖能力的影响

A. 琼脂培养 B. 液体培养

Fig. 3 The effect of γ -irradiation on proliferation of human blood T lymphocytes cultured in agar culture and liquid culture.

A: agar culture B: liquid culture

表
Table
γ-射线照射对不同培养环境中 T 淋巴细胞增殖能力影响的比较
The comparison of the effects of γ-irradiation on proliferation of T lymphocytes cultured in different environments

讨 论

组别 Group	例数 Cases	集落数(%) colony count(%)	³ H-TdR 掺入率(%) ³ H-TdR incorporation rate(%)	P
对照 Control	10	100	100	0.02 V
50 rad	10	70.2±3.53	72.7±13.77	
100 rad	10	59.1±3.64	63.8±9.09	
200 rad	10	40.5±3.69	50.1±11.41	
400 rad	10	26.8±3.40	29.6±10.73	
600 rad	10	12.5±2.60	16.2±3.71	

养 ³H-TdR 掺入的峰值出现在接种后第 5 天。无疑表明了 T 淋巴细胞在不同的培养环境中, 具有不同的生长规律。从接种后第 6 天起, ³H-TdR 掺入率明显降低, 可能与细胞死亡及转化了的 T 淋巴细胞成熟有关^[3]。

最近报道的 G-6 PD 同功酶研究证实 T 淋巴细胞集落不是起源于单个 T 细胞的克隆^[5]。Jean-Pierre Farcet^[6]等指出: 在琼脂培养基上形成的初级人血淋巴细胞集落(Primary lymphocyte Colony)不能代表定向祖细胞的特性, 而是起源于多细胞集落形成单位(multicellular Colony forming unit), 是由血液中少数能被激活的、不同的淋巴细胞亚群所组成的。由此可见, 淋巴细胞在琼脂培养基上形成集落的数量, 可以反映外周血淋巴细胞增殖能力的变化。

从图 3 可以看出: γ 射线对人血 T 淋巴细胞增殖能力有明显的抑制作用。两部分实验结果都表现出: 在不同的剂量范围内, 集落数和 ³H-TdR 掺入计数下降的速度不同。表明人血 T 淋巴细胞辐射敏感性的非均质性, 表中的数据还提示: 电离辐射对人血 T 淋巴细胞形成集落能力的抑制作用较强。所以成集落细胞的 D₀ 值小于增殖型 T 淋巴细胞(Proliferating T-lymphocyte)的 D₀ 值。由于细胞受电离辐射作用, 首先丧失增殖能力, 随后丧失生理功能和代谢功能。因此, 就研究电离辐射对淋巴细胞增殖能力的影响而言, 琼脂培养技术是比较理想的方法。而液体培养技术是通过测定 DNA 合成代谢的变化来反映电离辐射对于淋巴细胞功能的影响, 所以, 此方法用于细胞生化研究上比较合适, 在这一点上, 我们与 Francis^[6] 的看法是一致的。

参 考 文 献

- [1] V. Pistoia, A. Nocera, R. Ghio, A. Leprini, A. Perata, M. Pistone and M. Ferrarini, *Exp. Hematol.*, 11(3):249~259.(1983).
- [2] A. A. Morley, K. J. Trainor and R. S. Seshadri. *Exp. Hematol. Exp. Hematol.*, 11(5):418~424.(1983).
- [3] Frederic Triebel, A. William Robinson, R. Anthony. Hayward and Pierre Goub de Laforest, *J. Immunol.*, 126(5): 2020~2023(1981).
- [4] G. Diane Tice and R. Frederick Davey. *Exp. Hematol.*, 11(5): 394~401. (1983).

[5] W. Francis Ruscetta and G. Robert Gollo. *Blood*, 57(3):379~394.(1981).

[6] Jean-Pierre Farcet and Ugo testa. *Exp. Hematol.*, 10(2):172~176(1982).

(1983年11月12日收到)

THE STUDY OF THE KINETICS AND RADIOSENSITIVITY OF T LYMPHOCYTES IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD

Ma Xiang Rui Wang Tao Wang Hong yun

(Suzhou Medical College Suzhou)

ABSTRACT The determination of the colony formation in agar culture is a good method for studying the proliferation of T lymphocytes induced by PHA. The suspension of lymphocytes separated from the blood of ten healthy volunteers was used in our experiments. PHA (100 $\mu\text{g/ml}$) was chosen as a mitogen. The kinetics and radiosensitivity of T lymphocytes in human peripheral blood were studied comparatively using the techniques of agar culture (0.3% agar) and liquid culture. The data obtained from the study on the kinetics of T lymphocytes suggested that the number of T lymphocyte colonies increased with culture time within 12 days, the peak of $^3\text{H-TdR}$ incorporation into lymphocytes in liquid culture occurred at 5th day after seeding. These data also demonstrated that the kinetics of T lymphocytes cultured in two kinds of environment were different. The study of the radiosensitivity of T lymphocytes in agar culture and in liquid culture showed that the decrease in the number of colonies and rate of $^3\text{H-TdR}$ incorporation were different in the dose ranges of 0~100 rads and 100~600 rads. i. e. the declining tendency in colonies formation or in $^3\text{H-TdR}$ incorporation ratio was characterized by a biphasic change. In the range of 0~100 rads, the D_0 values were 171.0 rads for colony-forming cells in agar culture and 434.0 rads for the proliferating T lymphocytes in liquid culture. In the range of 100~600 rads the D_0 values were 588.0 and 736.0 rads respectively. The foregoing results demonstrated that T lymphocytes in human peripheral blood were not homogeneous in radiosensitivity and that the colony technique was a more sensitive method to test the proliferating capability of cells in culture.

KEY WORDS T-lymphocyte; Proliferation; Radiosensitivity; Colony.