

简 报

人外周血 T 淋巴细胞集落培养及其辐射效应

曹 霞 汪 涛 李延义

(苏州医学院放射医学系, 苏州 215007)

摘要 利用甲基纤维素微量培养和 ^3H -TdR 掺入法, 研究了 T 淋巴细胞增殖动力学、辐射敏感性及 T 淋巴细胞集落形成单位(CFU-TL)。结果表明, 外周血单个核细胞在一定浓度范围内, CFU-TL 形成数随种植细胞数而增加, 呈良好线性关系; 培养 12 d 的集落细胞在 PHA-CM 刺激下仍具有 ^3H -TdR 掺入能力, 但计数下降, 表明培养后的集落细胞 DNA 合成能力减弱; γ 射线辐照后, 随剂量增加, 集落数和 ^3H -TdR 掺入数迅速降低, CFU-TL 对辐射很敏感, $D_0 = 2.3 \text{ Gy}$ 。

关键词 T 淋巴细胞集落形成单位(CFU-TL), 增殖特性, 放射敏感性, 生物辐射效应

淋巴祖细胞是指能分化成熟为淋巴细胞的原始细胞。大量实验表明, 淋巴与其他祖细胞起源于共同的全能造血干细胞^[1,2]。目前已发现淋巴祖细胞各分化阶段均具有自我更新能力^[3], T 淋巴细胞是机体细胞免疫的重要成分, 它的辐射损伤是辐射的敏感指标之一, 能准确地反映剂量-效应关系。本文应用甲基纤维素微量培养法与 ^3H -TdR 掺入法, 对比观察 CFU-TL 增殖能力及辐射损伤效应。

1 材 料 和 方 法

1.1 外周血单个核细胞分离

用淋巴细胞分离液($d = 1.077$)分离献血员静脉抗凝血, 收集白细胞层, 洗涤二次, 制成单个核细胞悬液。

1.2 条件培养基制备及集落培养

($1-2$) $\times 10^6/\text{ml}$ 单个核细胞培养于含 15% 人 AB 血清和 0.01% PHA 的完全 RPMI 1640 培养液, 37°C 下培养 48 h, 收集上清液, 抽滤除菌, 即得 PHA 条件培养基(PHA-CM)。集落培养体系为 RPMI 1640 完全培养液、($2.5-7.5$) $\times 10^5/\text{ml}$ 浓度的细胞、20% PHA-CM、最终浓度 0.9% 的甲基纤维素(4000 CPS, Difco 公司), 培养物置扩散盒(0.2 ml)中, 5% CO_2 培养箱中 37°C 下培养 7 d, 计数、摄影、 >50 个细胞的细胞团为一个集落, 20—50 个细胞为一个簇。

1.3 鉴定方法

毛细吸管法和压片法制备样品, 进行 H-E、瑞氏姬姆萨集落染色, 光镜观察。

1.4 照射条件

细胞悬液分为 0.5 ml 共 8 瓶, 按 0、0.5、1、2、3、4、6 和 8 Gy 编组, 用 ^{60}Co γ 治疗机照射, 剂量率 1.05 Gy/min。

1.5 ^3H -TdR 掺入试验

外周血单个核细胞($1 \times 10^6/2 \text{ ml}$)在 RPMI 1640 培养液中培养 72 h, 于终止培养前 16 h 加入 $20 \mu\text{l}$ ^3H -TdR (比放射性 0.888 TBq/mmol、放射性强度 2.22 MBq/ml, 中国科学院上海原子核

收稿日期: 1992-02-10

研究所)。培养结束后收获样品,用 Beckman 液闪计数器测量。

2 结 果

2.1 T 淋巴细胞集落动态观察

18 例献血员外周血单个核细胞均形成 CFU-TL, 培养 24 h 后可见 2—4 个细胞组成的细胞簇, 第 3 d 簇增大, 5—7 d 集落增大, 数量增多达到高峰, 9—10 d 后逐渐减少。其中 50—100 个细胞组成的集落, 细胞排列疏松、胞大、边缘清晰; 大于 100 个细胞的集落, 排列致密, 轮廓不清。

2.2 CFU-TL 与细胞浓度关系

新鲜外周血分离的单个核细胞, 在 $(0.5-1.5) \times 10^5/0.2 \text{ ml}$ 范围内, 培养物形成的 CFU-TL 数与细胞浓度呈线性关系。经直线相关回归分析, CFU-TL 增长曲线为 $\hat{Y} = 0.9242 + 22.8878 X$, 相关系数 $r = 0.99$, $P < 0.01$ 。

2.3 CFU-TL 增殖和核酸代谢功能

新鲜单个核细胞培养物, 随细胞浓度增加, ^3H -TdR 掺入计数呈比例升高, $\text{Log } \hat{Y} = 2.5304 + 0.1210 X$, $r = 0.98$, $p < 0.01$ (图 1.A)。将甲基纤维素中培养 12 d 形成的集落制成细胞悬液, 其 ^3H -TdR 掺入计数亦呈线性关系, $\text{Log } \hat{Y} = 2.5347 + 0.0375 X$, $r = 0.96$, $p < 0.01$ (图 1.B), 表明培养 12 d 后细胞掺入计数明显降低, 但仍具有一定的增殖和核酸代谢功能。

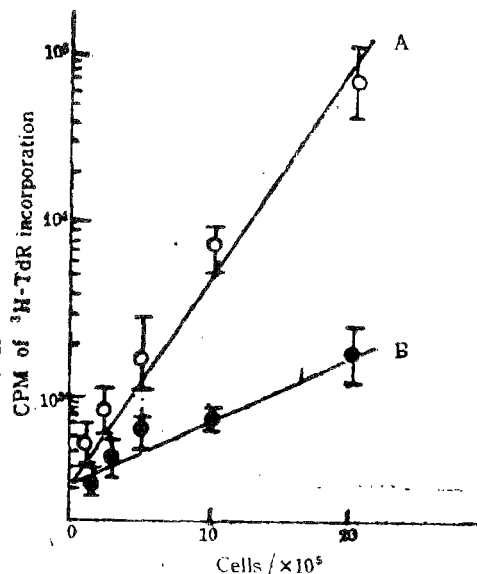


Fig 1. Comparison of ^3H -TdR incorporation between cells from CFU-TL and mononucleus cells fresh peripheral blood. A. ^3H -TdR incorporation in mononucleus cells from peripheral blood, $\text{Log } \hat{Y} = 2.5304 + 0.1210 X$, $r = 0.98$. B. ^3H -TdR incorporation in cells from CFU-TL, $\text{Log } \hat{Y} = 2.5347 + 0.0375 X$, $r = 0.96$.

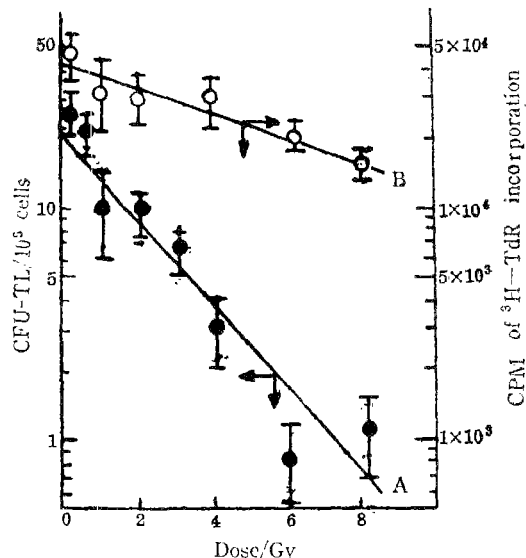


Fig 2. Effects of ionizing irradiation on CFU-TL and ^3H -TdR incorporation.

2.4 CFU-TL 辐射敏感性

电离辐射作用后, CFU-TL 的计数随剂量增加而迅速降低, $\text{Log } \hat{Y} = 1.3338 - 0.1879 X$, $r = -0.96$, $D_0 = 2.3 \text{ Gy}$ (图 2.A), 数据符合二项分布, $p < 0.01$, 差异非常显著。照射后的单个核细胞悬液 ^3H -TdR 掺入计数, 亦随剂量增强而缓慢下降, $\text{log } \hat{Y} = 4.6339 - 0.0517 X$, $r = -0.95$,

$p < 0.05$ (图 2.B)。

3 讨 论

3.1 PHA-CM对T细胞集落的影响

PHA刺激单个核细胞所得上清液中主要成分为T淋巴细胞生长因子(TCGF, 即IL-2)^[4], 是体外T细胞生长的必备条件。在加入PHA-CM的培养物中, 没有发现其他类型集落出现, 尽管PHA致敏的T淋巴细胞能产生一系列的集落刺激活性(CSA), 但其数量不足以刺激单个核细胞中巨噬细胞、粒细胞集落的发育^[5]。

3.2 CFU-TL增殖及核酸代谢功能

为探讨培养第7d以后的CFU-TL的增殖能力, 观察了12d集落细胞的³H-TdR掺入能力。结果发现随种植细胞数增加, 掺入数虽呈线性增加, 但已有明显下降, 显示DNA合成功能逐步降低。同时T集落细胞再培养时, 不需要加入PHA, 这些细胞为一类幼稚的依赖于TCGF的活化细胞。

3.3 T细胞集落克隆性质

Donnenberg等^[6]用显微摄影术研究了淋巴细胞在半固体培养基中的动力学变化, 认为集落形成是细胞间相互作用、增殖和运动的综合结果, 集落呈多克隆性。Knox等^[7]用表面标记和酶细胞化学特性证实单个集落细胞为T淋巴细胞, T淋巴细胞是由血液中激活的不同淋巴细胞亚群所组成^[8]。细胞集落的数量, 反映该细胞增殖能力的变化。实验表明, 分离的新鲜血单个核细胞, 在 $(0.5-1.5) \times 10^5/0.2$ ml的完全培养基中, 得到T集落生长的线性关系, CFU-TL随种植细胞数增加而上升, $r = 0.99$ 。在此悬液中除T细胞外, 还有一定的单核细胞、B细胞及裸细胞等, 推测此类细胞相互间的协同作用及诱导释放淋巴因子共同促进T集落的生长。

3.4 CFU-TL辐射损伤效应

淋巴细胞对辐射损伤敏感, 实验表明 γ 射线对T淋巴细胞增殖和代谢功能均有明显抑制作用。随剂量增加损伤越严重, 证明集落技术是研究辐射对淋巴细胞损伤效应的一个好方法, 本实验与Knox^[7]等人结果相一致。

参 考 文 献

- 1 Pantel K, Nakeff A. Int. J. Cell Cloing, 1989, 7: 2
- 2 Abramson S, Miller R G, Phillips R A. J. Exp. Med., 1977, 145: 1567
- 3 McCulloch E A. Blood, 1983, 62: 1
- 4 Ruscetti F W, Gallo R C. Blood, 1981, 57: 379
- 5 Rozenszajn L A, Shoham D, Kalechman I. Immunology, 1975, 29: 1041
- 6 Donnenberg A P, Cameron J. Exp. Hematol. 1985, 13: 29
- 7 Knox S J, Wilson F D, Greenberg B R et al., J. Cell Biochem., 1982, 18: 15
- 8 Farcet J P, Testa U. Exp. Hematol, 1982, 10: 172
- 9 马祥瑞, 江涛, 王洪云. 辐射研究与辐射工艺学报, 1985, 3(2): 6

THE EFFECTS OF RADIATION ON T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD AND CFU-TL

Cao Xia Wang Tao Li Yanyi

(Department of Radiation Medicine, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT The kinetics, metabolism and radiosensitivity of T-lymphocytes in peripheral blood and colony forming unit-T lymphocyte (CFU-TL) were studied with technique of tissue culture with methycellulose and ^3H -TdR incorporation. The linear relationship was observed between the number of CFU-TL and the planted mononucleus cells at a certain concentration of cells. The number of colonies increased with planted cells in the range of $(0.5-1.5) \times 10^5$. It was found that in the cells cultured for 12 days, ^3H -TdR incorporation still can be achieved but incorporation was lower than that in fresh separated mononucleus cells, which suggests decreased in the exposed cells. After γ -irradiation, both the number of colonies and CPM of ^3H -TdR incorporation decreased rapidly. The result indicates that CFU-TL is more sensitive, $D_0 = 2.3 \text{ Gy}$.

KEYWORDS T-lymphocyte colony forming unit (CFU-TL), Proliferation characteristic, Radiosensitivity, Biological radiation effects

(上接第 188 页 Continued from P 188)

EFFECTS OF LOW LEVEL PRENATAL BETA-IRRADIATION OF TRITIATED WATER ON POSTNATAL BEHAVIOR, LEARNING AND MEMORY ABILITY IN MICE

Wang Bing Zhou Xiangyan

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing 100088)

ABSTRACT Pregnant adult C 57 BL/6 J strain mice, randomly assigned to 1 of 4 experimental groups, were irradiated with exponentially decreasing doses of tritium beta-rays but group 1 (used as a control) by single injection of tritiated water (HTO) at their 12.5 th day of gestation. Offsprings of male, received accumulative doses of 0, 0.5, 0.10 or 0.30 Gy in uterus were trained or examined on learning and memory ability or with behavioral tests. Significant dose-response relationships for alternations in those tests were found due to exposure to 0.10 Gy or above. These results indicate that exposure to HTO during the fetal period in mice results in dose-dependent alteration in postnatal behavior, learning and memory ability. 0.05--0.10 Gy exposure may represent a threshold for the experimental conditions of this research using these parameters.

KEYWORDS Tritiated water, Internal irradiation, Threshold brain development, Behavior test, Learning and memory ability, Animal experiment, Mouse