

CN9201663

CNIC-00531

SMC-0065

# 中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

淋巴细胞集落及其在辐射敏感性  
研究中的应用

LYMPHOCYTE COLONY FORMING UNITS AND ITS  
APPLICATION TO THE STUDY OF RADIOSENSITIVITY

*(In Chinese)*



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author (s) to the publisher. No part of this publication may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China.

The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

# 淋巴细胞集落及其在辐射敏感性研究中的应用

马祥瑞 汪涛 王洪云

(苏州医学院)

## 摘 要

实验对比研究了人血 T、B 细胞形成集落的规律及其辐射敏感性。发现在 LPS、MRBC 和 BSA 的作用下, B 细胞呈现相似的增殖规律。B 淋巴集落计数的峰值出现在第六天。液体培养,  $^3\text{H-TdR}$  掺入峰值则在第七天。由 PHA 诱导 T 细胞形成的集落数随培养时间的延长而增多。而  $^3\text{H-TdR}$  掺入峰在第五天。辐射敏感性实验证明: 无论是琼脂培养还是液体培养中的 T 细胞都出现双向反应。0~1.0 Gy 剂量范围内, 两快组分的  $r$  值均为 -0.96,  $D_0$  值分别是 1.71 和 4.34 Gy。1.0~6.0 Gy, 两慢组分的  $r$  值是 -0.99 和 -0.98,  $D_0$  值则是 5.88 和 7.36 Gy。B 细胞也呈现相似规律。剂量范围为 0~1.0 Gy, 快组分的  $r$  值是 -0.97,  $D_0$  值为 1.35 Gy; 慢组分的  $r$  值是 -0.99,  $D_0$  值是 4.36 Gy。实验结果表明 B 细胞的辐射敏感性高于 T 细胞。集落培养技术是检查 T、B 细胞辐射敏感性的好方法。

# LYMPHOCYTE COLONY FORMING UNITS AND ITS APPLICATION TO THE STUDY OF RADIOSENSITIVITY

(In Chinese)

Ma Xiangrui    Wang Tao    Wang Hongyun  
(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

## ABSTRACT

Kinetics and radiosensitivity of human lymphocytes were studied by the techniques of monolayer agar culture and liquid culture in vitro. In the experiments of lymphocyte kinetics, PHA was designated as a mitogen for T lymphocyte. LPS, MRBC and BSA were chosen as mitogens for B lymphocyte. The data from these experiments showed that, under the alone or combination stimulation of LPS, MRBC and BSA, B lymphocytes developed to form colonies in agar culture (0.3%) with the same manner. The stimulation of LPS to B lymphocytes was most significant. By day 6 after seeding, the numbers of colonies in agar culture were maximal. Whereas the numbers decreased significantly by day 8. The number of T lymphocyte colonies increased with culture time within 12 days. The peak of  $^3\text{H}$ -TdR incorporation into T lymphocytes in liquid culture occurred at 5th day after seeding. The data above-mentioned demonstrated that the kinetics of lymphocytes cultured in two kinds of environments were different. The studies of the radiosensitivity of T lymphocytes showed that the decreased in the number of colonies and rate of  $^3\text{H}$ -TdR incorporation varied in different dose ranges. In the range of 0~1.0 Gy,  $r = -0.96$ ,  $D_0$  value was 1.71 Gy for TL-CFC in agar culture,  $r = -0.96$ ,  $D_0$  value was 4.34 Gy for the proliferation T lymphocytes in liquid culture. In the range of 1.0~6.0 Gy,  $r$  were  $-0.99$  and  $-0.98$ , the  $D_0$  were 5.88 and 7.36 Gy respectively. The declining tendency in colonies formed by BL-CFC was the same as that of TL-CFC,  $r = -0.97$ , for the range of 0~1.0 Gy,  $r = -0.97$ , for the range of 1.0~3.0. The  $D_0$  values were 1.35 and 4.36 Gy respectively. The results from these experiments shown that the colony technique was a good method for the study in radiosensitivity.

机体受照射后,常用血液中淋巴细胞的变化来估算剂量。而受照射之后,机体细胞先丧失增殖能力。以增殖力为指标,研究机体淋巴细胞的变化,可能会更准确地反映出剂量效应关系。工作中曾应用半层半固体琼脂,建立了淋巴细胞集落培养技术,观察人血淋巴细胞增殖规律。在此基础上,以淋巴集落计数为指标,研究了淋巴细胞的辐射敏感性。现分两部分介绍如下。

## 1 人血淋巴细胞增殖动力学实验

### 1.1 T淋巴细胞增殖规律 实验方法与结果

**实验方法** T淋巴细胞(T细胞)增殖动力学,是用半固体琼脂培养方法(集落法)和液体培养技术(液体法)对比研究的。首先在无菌条件下,分离正常献血员的静脉血,制备单个核细胞悬液。选择PHA为丝裂原。每个受检者的细胞悬液分为两份,供对比研究应用。

**集落法** 在无菌条件下,用含PHA(100 $\mu$ g/ml)的RPMI-1640液(日本产)配制成0.3%琼脂(日本产)培养体系,分装在培养皿内,每皿的容量为0.15mL,含 $5 \times 10^4$ 个细胞。密封后在37 $^{\circ}$ C、含CO<sub>2</sub>的环境内进行培养。

**液体法** 每个培养瓶内盛装2mL、含PHA(100 $\mu$ g/mL)的RPMI-1640液。在无菌条件下,每瓶接种 $2 \times 10^6$ 个单个核细胞。密封后37 $^{\circ}$ C培养。收获前11h每瓶内加入 $4.4 \times 10^4$ Bq的<sup>3</sup>H-TdR,终止培养后,收获在49型玻璃纤维滤膜上,用FJ353型液体闪烁计数器测定各组样品的每分钟脉冲数(min<sup>-1</sup>)。

**观察时间** 集落法接种后第2,4,6,8,10和12天镜检,进行集落计数。液体培养在接种后第2,4,6,8,10和11天,测量每份样品中的<sup>3</sup>H-TdR掺入率。

**实验结果** 集落实验共选用10名正常献血员的静脉血。半固体琼脂培养,每实验点设3~5个平行样品。从接种后第2天起就可以观察到集落(为50个或50个以上的细胞团)。观察结果见图1。液体法<sup>3</sup>H-TdR掺入计数为3个平行样品的平均值。见图2。

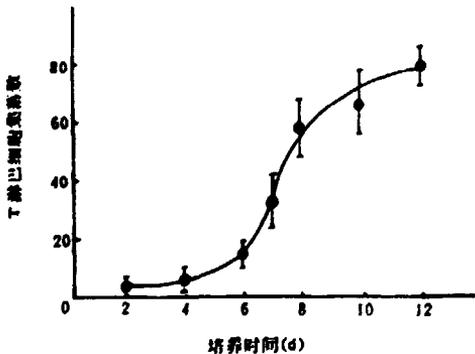


图1 在琼脂培养体系中淋巴细胞集落形成的动态观察(集落数/ $5 \times 10^4$ 个细胞)

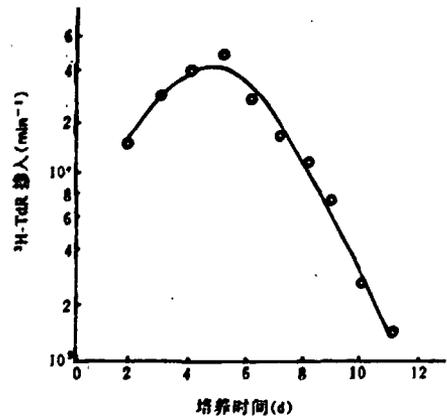


图2 液体培养中<sup>3</sup>H-TdR掺入淋巴细胞的动态观察(每个样本0.1mL全血)

## 1.2 B淋巴细胞增殖规律 实验方法与结果

**实验方法** 在进行B细胞增殖动力学实验之前,先通过预实验。选择LPS、MRBC(小鼠红细胞)和BSA(牛血清白蛋白)作为B细胞的丝裂原,并确定每皿接种 $0.75 \times 10^5$ 个单个核细胞为最合适的浓度。

B细胞培养仍采用半固体琼脂培养法。在无菌条件下,用RPMI-1640液将正常献血员的单个核细胞悬液稀释成一定浓度,并分成五份。分别加入适当浓度的LPS(20 $\mu$ g/mL, Sigma), 0.5%MRBC, 5%BSA, LPS+0.5%MRBC和LPS+5%BSA, 配成0.3%琼脂培养体系,分装到容积为0.2mL的培养皿内。置于密封37 $^{\circ}$ C, 含CO<sub>2</sub>潮湿容器内培养,在不同的时间间隔内镜检计数。前三组的观察时间:接种后第2,6,8和10天;后二组为接种后2,4,6和8天。为对比研究,同时按常规液体培养方法,LPS和LPS+5%BSA为丝裂原,用Eagle's(日本产)和RPMI-1640液分别进行全血培养。在接种后第4,5,6,7和8天测量掺入率。方法和条件与T细胞液体培养相同。

**实验结果** 液体法每个实验点的结果为3个平行样品的平均值。可是,无论是Eagle's还是RPMI-1640液,B细胞转化率都很低,仅接种后第7天的<sup>3</sup>H-TdR掺入率最高。表1还提示:液体培养条件下,LPS+BSA的作用比LPS单独应用强,用Eagle's液培养时,这种现象更明显。

表1:人外周血B淋巴细胞液体培养7天后

		<sup>3</sup> H-TdR 掺入率(10例均值)	min <sup>-1</sup>
组	别	$\bar{X} \pm SD$	P
Eagle's	LPS组	156.0 $\pm$ 24.9	
培养液	LPS+5%BSA	528.2 $\pm$ 193.5	<0.01
RPMI	LPS组	182.8 $\pm$ 36.0	
1640			<0.01
培养液	LPS+5%BSA	340.6 $\pm$ 76.3	

(含LPS或LPS+5%BSA的2mL培养液内加0.2mL全血)

**集落法** 在LPS,0.5%MRBC和5%BSA分别作用下,或是在LPS+0.5%MRBC和LPS+5%BSA协同作用下,B细胞集落(CFU-BL)形成良好。各组集落计数差异非常显著(表2,3)。计数结果表明:各组的增殖峰出现在接种后的第6天(图3)。前3组的第6天集落计数差异有显著性, $P < 0.05$ 。后2组的差异统计显著, $P < 0.01$ 。LPS的激活作用表现较强。

**形态学观察** 5个实验组的集落多为致密型。集落涂片用非特异性酸性酯酶染色,96%以上的细胞为阴性反应。液体培养的细胞涂片Wright's染色,油镜检查,可见到典型的浆细胞。

表2 接种后不同时间各实验组 B 淋巴细胞集落数

时间(d)	LPS 组	0.5%MRBC 组	5%BSA 组
2	75.6±6.1	96.2±8.5	62.0±6.8
6	160.2±32.7	116.4±11.5	131.4±8.0
8	89.4±7.1	72.1±5.6	75.0±16.1
10	77.0±11.0	42.4±8.7	77.0±6.2
	P<0.01	P<0.01	P<0.01

n = 10  $\bar{X}$  ±SD

表3 接种后不同时间两实验组 B 淋巴细胞集落计数

时间(d)	LPS+0.5MRBC 组	LPS+5%BSA 组
2	74.4±0.5	48.9±10.7
4	104.7±14.4	79.0±9.5
6	150.0±16.2	110.3±20.9
8	97.0±23.5	97.4±16.5
	P<0.01	P<0.01

n = 10  $\bar{X}$  ±SD

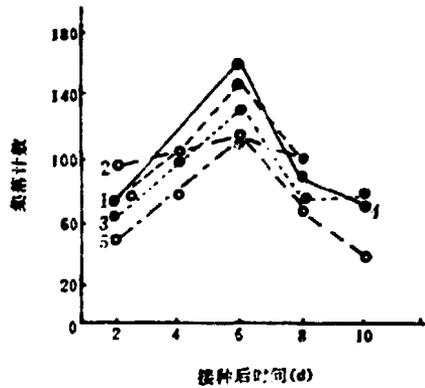


图3: 不同丝裂原作用下, 人血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖情况

1——LPS 组; 2——0.5%MRBC 组; 3——5%BSA 组; 4——LPS+0.5%MRBC 组; 5——LPS+5%BSA 组。

## 2 淋巴细胞辐射敏感性实验

### 2.1 T 细胞辐射敏感性 实验方法与结果

**实验方法** 辐射敏感性实验的条件与方法, 与 T 细胞增殖动力学实验相同。仅在无菌条件下, 将单个核细胞悬液分为两组, 供集落法和液体法实验用。每 2 份细胞悬液为一组, 同时进行<sup>60</sup>Co-γ 射线照射, 剂量率为 0.75Gy/min, 剂量分别为 0(对照组), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 和 6.0Gy。

**观察时间** 集落法在接种后第9天进行集落计数;液体法在接种后第4天收获,测量样品中的<sup>3</sup>H-TdR 掺入率。

**实验结果** 各组 T 淋巴集落(CFU-TL)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,差异极显著。实验结果还提示:在 0~1.0Gy 范围内,集落数下降速度快;1.0~6.0Gy 范围内,下降速度慢。两组分的剂量相关系数( $r$ )分别是-0.96 和-0.99( $t$  检验,  $P < 0.05$ )。  $D_0$  值是 1.71 和 5.88Gy(图 4)。

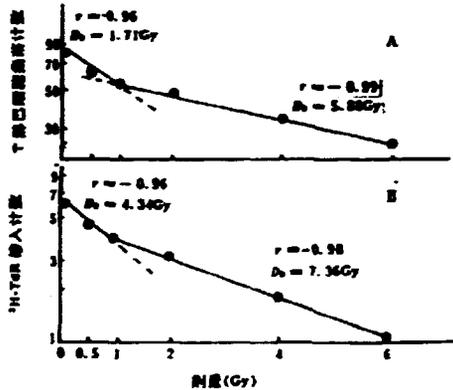


图 4:  $\gamma$  线照射对不同培养环境中人血 T 淋巴细胞增殖能力的影响

用百分数表示各剂量组的<sup>3</sup>H-TdR 掺入计数,并与集落计数的百分数相比较(表 4)。差异极显著。表 4 还表明: $\gamma$  射线对 T 淋巴集落形成细胞(TL-CFC)的增殖能力的抑制作用较强。

表 4  $\gamma$  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

组别	例数	集落数%	<sup>3</sup> H-TdR 掺入率%	P
对照	10	100	100	
0.5Gy	10	70.2 ± 3.53	72.7 ± 13.77	<0.02
1Gy	10	59.1 ± 3.64	63.8 ± 9.09	
2Gy	10	40.5 ± 3.69	50.1 ± 11.41	
4Gy	10	28.8 ± 3.40	29.6 ± 10.73	
6Gy	10	12.5 ± 2.60	15.2 ± 3.71	

## 2.2 B 细胞辐射敏感性 实验方法与结果

**实验方法** B 细胞辐射敏感性实验条件与方法同 B 细胞增殖动力学实验。仅选用 LPS 为丝裂原。在无菌条件下,将分离的单个核细胞悬液分成 5 份,分别接受 0(对照组),0.5, 1.0, 2.0 和 3.0Gy 的<sup>60</sup>Co $\gamma$  射线照射。剂量率为 0.75Gy/min。观察时间为接种后第 7 天,镜检计数每皿内的集落数。

**实验结果** 以对照组为 100%,将各剂量组的集落计数换算成相对百分数,进行反正弦

函数转换后,作F检验,  $P < 0.01$ 。实验结果提示:照射后B细胞形成集落的能力受抑制的程度与剂量相关的(表5)。在不同剂量范围内,集落计数下降的速度不同(图5), 0~1.0Gy 和 1.0~3.0Gy 不同剂量范围内的剂量相关系数( $r$ )为-0.97 和-0.99,两组分的  $D_0$  值分别是 1.35 和 3.04Gy。

表5  $\gamma$ 线照射对正常人血B淋巴细胞集落形成能力的抑制效应

组别	集落形成数	%	P
对照	89.27 ± 10.41	100	<0.01
0.5Gy	58.30 ± 6.20	65.30	
1Gy	41.79 ± 4.44	46.81	
2Gy	29.89 ± 2.75	33.48	
3Gy	21.65 ± 2.30	24.25	

$n = 14 \bar{X} \pm SD$

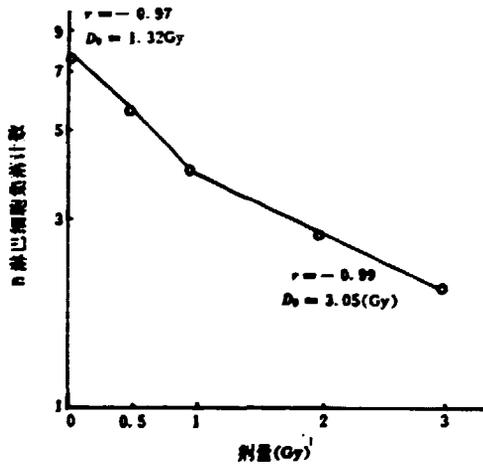


图5 B淋巴细胞集落计数与剂量的关系

### 3 讨 论

电离辐射作用后,血液学变化可作为辐射损伤的指标。尤其是淋巴细胞的变化,因为它是一定量的生物反应系统,可在其中进行直接测量,以估计照射剂量。所以,在辐射敏感性研究中,多以淋巴细胞变化为指标。

70年代末,国外建立了用丝裂原诱导淋巴细胞在半固体琼脂培养基上形成集落的技术,为深入研究淋巴细胞提供了新手段。但多采用双层培养技术或二步培养方法。我们曾用分离的细胞悬液作单层琼脂培养,对胎儿胸腺中的 TL-CFC 和豚鼠的 BL-CFC 的增殖能力进

行研究。在此基础上,用集落法对人血 T、B 细胞的增殖动力学,和辐射敏感性进行了研究。

淋巴细胞的激活和细胞集落技术的建立,是免疫学领域中的重要课题。60 年代发现 PHA 等能激活静止的淋巴细胞,使之转化为母细胞。这一发现为深入研究淋巴细胞打开了新的门户。研究中多用 PHA、ConA、PWM 和 LPS。已证明 ConA 和 PWM 为多克隆性的丝裂原。PHA 和 LPS 是单克隆性的丝裂原。PHA 只激活 T 细胞。所以,在实验中选用它作 T 细胞的丝裂原。而 LPS 则只激活 B 细胞。不过传统的观点认为 LPS 对人的 B 细胞作用微弱。国外用 PWM 作丝裂原<sup>[1]</sup>。由于它激活的细胞中 60% 的细胞为 T 细胞。要获得纯 B 细胞,必须纯化分离。无疑使实验过程复杂化,增加干扰因素,而我们则用 LPS 作丝裂原。为了证实 LPS 对人 B 细胞的作用。根据 B 细胞膜受体的特性<sup>[2,3,4]</sup>,又选用 MRBC 和 BSA 作丝裂原,进行对比研究。

表 2 和表 3 说明:LPS、MRBC 和 BSA 都能激活人血 B 细胞增殖形成集落。其中 LPS 的作用最强。这纠正了以往对 LPS 的认识。实验结果还表现出:在 3 种物质单独作用下,或者协同作用下,B 细胞出现相似的增殖规律。与 Radnay 的结果一致<sup>[1]</sup>,即峰值出现在接种后的第 6 天,第 8 天集落数已明显下降。这不同于豚鼠 BL-CFC 的增殖规律<sup>[5]</sup>,也不同于 B 细胞在液体培养环境中的增殖规律。两种不同环境中的 B 细胞对 LPS 的反应性有程度差异,可能是由于半固体琼脂培养基能为 B 细胞提供良好的支架作用,便于细胞的移行与相互接触,促进细胞的分裂与增殖。在这方面我们与 Jean-Pierre. Farcet 等<sup>[6]</sup>的看法是一致的。

形态学检查表明:在三种物质作用下,B 细胞能在半固体琼脂培养基上形成良好的集落。尤其是 96% 以上的细胞为非特异性酸性酯酶染色阴性。就进一步说明:以 LPS 为丝裂原,用集落法研究 B 细胞的特性与功能是可行的。不过,在液体培养环境中 LPS 的激活作用微弱,证明它的刺激作用是受环境因素制约的。

PHA 能诱导 T 细胞在半固体培养基上形成集落。从图 1 可以看出集落计数随培养时间(12d)的延长而增多。与我们曾研究的胎儿胸腺中的 TL-CFC 的增殖规律相似。但 Diane 等<sup>[7]</sup>的结果是培养 7 天后集落数急剧下降。这可能是采用的实验条件不同的缘故。图 2 提示:液体法的<sup>3</sup>H-TdR 掺入峰值出现在接种后的第 5 天,反映出 T 细胞在不同的环境中也呈现出不同的生长规律。从接种后第 6 天起,<sup>3</sup>H-TdR 掺入率明显降低,可能与细胞死亡和转化了的 T 细胞成熟有关。

考虑到集落形成过程中细胞间的相互协作关系。在实验中采用的单个核细胞悬液没进行去巨噬细胞处理。采用的 RPMI-1640 液中含有 15% AB 型血清,有利于 B 细胞增殖研究。加入 15% 胎牛血清,则利于浆细胞的成熟。这在我们的增殖动力学研究中得到证实。

Izaguirre 等<sup>[2]</sup>提出接种后第 3 天有明显的集落形成。而本实验发现在接种后第二天就有明显的集落形成,可能与种植细胞密度高和 B 细胞增殖速度快有关。但在 CFU-BL 形成的过程中,是否存在两个或两个以上的 B 细胞同时增殖而形成一集落的可能性呢?是值得探讨的。此外, Jean-Pierre, Farcet 等<sup>[6]</sup>曾提出在琼脂培养基上能形成集落的 BL-CFC 不能表示定向祖细胞的特性。Winelstein 等曾用表面球蛋白研究说明 BL-CFC 是成熟的 B 细胞。所以,琼脂培养基上的 BL-CFC 必定服从于 B 细胞的增殖规律。又有人用 G-PD 同工酶研究证实 CFU-TL 不是起源于单个 T 细胞的克隆<sup>[9]</sup>。Jean-Pierre. Farcet 也提出:在琼脂培养基上形成的初级人血淋巴细胞集落(Primary Lymphocyte Colony)是起源于多细胞集落形成单位(Multi

cellular Colony Forming Unit),是由少数血液中能激活的、不同的淋巴细胞亚群组成的。关于这一点在我们的辐射敏感性实验中也得到证实,即集落形成细胞的非均质性。鉴于这些事实,可以说在琼脂上能够形成 CFU-L 的 TL-CFC 或是 BL-CFC 的生物特性,与血液中的 T、B 细胞相似,所以用集落法研究淋巴细胞的增殖动力学的辐射敏感性是比较理想的。

从表 4 和表 5 提示结果来看,电离辐射对淋巴细胞形成集落的能力有抑制作用。照射剂量越大抑制作用越强。由于淋巴细胞不是均质的细胞群,无论是 T 细胞还是 B 细胞对电离辐射都呈现双向反应,即在不同的剂量范围内,集落计数下降速度不同。两不同的组分间辐射敏感性差异明显,具体表现在两组分的  $D_0$  值相差较大,如 B 细胞的两组分的  $D_0$  值分别是 1.35 和 3.04Gy, T 细胞的两组分的  $D_0$  值也相差甚大,分别是 1.71 和 5.88Gy。同样,在液体培养环境中的 T 细胞也呈现双向反应,两组分的  $D_0$  值则是 4.34 和 7.36Gy。上述事实说明, B 细胞辐射敏感性较 T 细胞高,与其他报道<sup>[10,11]</sup>是一致的。半固体琼脂培养基上的 T 细胞的辐射敏感性较液体培养中 T 细胞高。所以说,用集落法检查淋巴细胞的辐射敏感性是比较灵敏的。<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验是通过细胞的 DNA 合成代谢功能的变化来反映淋巴细胞的变化。受照射后,细胞死亡前出现的变化是:先丧失增殖能力,后丧失生理功能和代谢功能。因此,在生物化学研究中,用液体培养方法是比较好的。这与 Francis<sup>[9]</sup>的看法是一致的。

此外,由于单层琼脂培养技术操作简便,干扰因素少。该方法不只是为辐射研究提供了新手段,也是实验血液学、免疫学研究的好方法,并可推广到临床检验学领域中,成为免疫系统疾病的检查方法之一。

## 参 考 文 献

- [1]. J. Radney, I. Goldman, L. A. Romasaj. Nature. 1979, 278: 351~353
- [2]. C. A. Languirre, M. D. Minden, et al. Br. J. Cancer, 1980, 42: 430~437
- [3]. Sudhir Gupta, Rodret. A. Good. Seminars in Hematology, 1980, 17 (1): 1~29
- [4]. 宗庭益等主编,免疫学基础与临床 安徽科学技术出版社,1980. 11~12
- [5]. 马祥瑞、汪涛等. 苏州医学院学报, 1982, 2 期: 13
- [6]. Jean-Pierre Farci, Ugo Testa, Exp. Gerontol 1982, 10 (2): 172~177
- [7]. J. Brochis, Lethichy, In: Human Lymphocyte differentiation: its application to cancer, edited by: R. Serru and C. Rosenfeld 1978. 60~70
- [8]. G. Dian Yice, R. Frederick Davey, Exp. Hematol., 1983, 11(5): 394~401
- [9]. W. Francis Ruscetta, G. Ruscetta, et al. Blood, 1981, 57(3): 397~394
- [10]. 朱子均等. 中华放射医学与防护杂志, 1982, 2 (5): 33
- [11]. 傅映东等. 中国核科技报告. CNTC-00264: 原子能出版社, 1989

**淋巴细胞集落及其在辐射敏感性研究中的应用**

**原子能出版社出版**

**(北京 2106 信箱)**

**中国原子能工业公司翻译部排版**

**北京市海淀区三环快速印刷厂印刷**

☆

**开本 787×1092 1/16·印张 1·字数 10 千字**

**1991 年 7 月北京第一次·1991 年 7 月北京第一次印刷**

**ISBN7-5022-0545-4**

**TL·306**

# CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



ISBN7-5022-0545-4  
TL • 306

P.O.Box 2103  
Beijing, China

## China Nuclear Information Centre