

CN9300039

CNIC-00815

SMC-0077

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

锂与淋巴细胞在调节造血过程中的作用

THE EFFECTS OF LITHIUM AND LYMPHOCYTES
ON HEMOPOIESIS

(In Chinese)



原子能出版社

中国核情报中心

China Nuclear Information Centre



马祥瑞：副教授，苏州医学院放射医学系实验核医学研究室主任。1960年毕业于兰州医学院。

Ma Xiangrui, Associate professor, director of experimental nuclear medicine division, Suzhou Medical College. Graduated from Lanzhou Medical College in 1960.

CNIC-00615

SMC-0077

锂与淋巴细胞在调节造血过程中的作用

马祥瑞 刘克良

(苏州医学院)

摘 要

通过3组实验研究锂与淋巴细胞在调节造血过程中的作用。实验结果提示再生障碍性贫血患者的淋巴细胞对不同丝裂原呈现出4种反应,淋巴细胞对PHA和ConA的反应性均增高;对PHA的反应性增高,对ConA的反应性则降低;对ConA的反应性增高,对PHA的反应性降低;对两种丝裂原的反应性均降低。患者血清对正常淋巴细胞转化能力的抑制与淋巴细胞反应类型无明显关系。实验还发现锂能直接或间接地诱导CFU-S的增殖与分化。锂对T淋巴细胞功能有抑制作用,尤其对T_H细胞有显著的抑制作用,以控制T_H细胞对造血细胞的直接抑制作用。

THE EFFECTS OF LITHIUM AND LYMPHOCYTES ON HEMOPOIESIS

(In Chinese)

Ma Xiangrui Liu Keliang
(SUZHOU MEDICAL COLLEGE)

ABSTRACT

The regulation effects of lithium and lymphocytes on hemopoiesis were studied in three groups of experiment. The data obtained from these experiments showed that: (1) There occurred four kinds of reaction of patients lymphocytes to PHA and ConA *in vitro*; (2) Lithium could induce CFU-S to proliferate and differentiate directly or indirectly; (3) The suppressive effect of lithium upon T_H cells was stronger than upon T_H cells, So it could directly regulate the inhibitory effects of T_H cells upon hemopoietic cells.

引言

锂(Li)被列为人体的可能必需微量元素。50年代就发现锂具有提高白细胞的作用。70年代又发现它能提高患者血液与尿中CSA(colony stimulating activity)的活性。它对再障患者的疗效与淋巴细胞减少有关。据典型的再障患者的骨髓和血细胞涂片分类计数提示:红、粒细胞和血小板三系列数量明显减少,而淋巴细胞计数增高。对这种淋巴细胞计数增高的病理学意义,一直没有明确地解释。虽然自60年代开始就有人把再障列为自身免疫性疾病,对锂和淋巴细胞调节造血的作用分别进行了研究。但是,在此过程中是否存在锂与淋巴细胞的相互作用,却尚未见到过报道。作者设计了3组实验,对此进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 再障患者淋巴细胞的反应性

共检查48例再障患者(符合再障临床诊断标准)的淋巴细胞反应性。患者年龄12~64岁,男33名,女15名。其中,急性再障(AA)24名,慢性再障(CA)20名,单纯性红细胞再生障碍性贫血(红再障)4名。实验设相应正常对照。还检查了39例再障患者血清对正常人淋巴细胞反应性的影响,其中29例患者同时进行了上述两项检查指标。

实验中用PHA(100 μ g/mL,广州医工所)和ConA(25 μ g/mL,Sigma)分别为T辅助细胞(T_H)和T抑制细胞(T_S)的丝裂原,以检查患者 T_H 和 T_S 细胞的反应变化。在无菌条件下按常规方法向2mL含15%AB血清和PHA或ConA的RPMI-1640培养液(日本),分别加入0.1mL受试者的抗凝血,37 $^{\circ}$ C环境中培养72h,在终上培养前16h向每个样品瓶中加入10 μ L 3 H-TdR(2.22 $\times 10^6$ Bq/mL,北京,原子能研究院)。结束时收获在49型纤维滤膜上,处理后用Beckman,LS-6800型液闪仪按每分钟计数测量每个样品的 3 H-TdR掺入量,每个实验数据均为3个平行样品的平均值。

以相应正常对照者的脉冲计数为基数,求出各实验组的刺激指数。实验结果出现4种反应类型:I.患者的淋巴细胞对PHA和ConA的反应性均增高;II.对PHA的反应性增高,对ConA的反应性降低;III.对PHA的反应性降低,对ConA的反应性增高;IV.对PHA和ConA的反应性均降低(表1)。

表1 48例再障患者淋巴细胞对两种丝裂原的反应

类型	PHA	ConA
I	2.397 \pm 1.269	3.696 \pm 2.713
II	3.698 \pm 3.530	0.516 \pm 0.213
III	0.472 \pm 0.272	2.021 \pm 1.473
IV	0.565 \pm 0.279	0.547 \pm 0.195

注:相应的对照为1, $\bar{x}\pm SD$

将各实验组的脉冲数经 \sqrt{x} 转换后,用配对计量资料比较的t检验方法进行统计处理,患者与相应对照者的淋巴细胞反应性相比较,差异非常显著(表2)。

表 2 48 例再障患者淋巴细胞对
不同丝裂原的反应差异

	组别	对照	患者	P
I	PHA	11779±17721	40999±36214	<0.01
	ConA	4908±4365	13466±10298	<0.01
II	PHA	16655±9150	38935±24180	<0.02
	ConA	6515±5019	3537±2985	<0.01
III	PHA	15977±8157	12212±7704	<0.01
	ConA	4369±2872	7382±3820	<0.02
IV	PHA	24139±16526	13392±11410	<0.02
	ConA	7978±3712	4670±3829	<0.01

注:脉冲计数,又±SD

被检查血清的 39 例患者,无论是急性再障患者还是慢性再障患者的血清,对正常人的淋巴细胞反应性的影响不一致,或出现刺激作用或表现抑制作用(表 3)。

表 3 再障患者血清对正常人淋巴细胞
反应性的影响

	AA		CA	
	刺激作用	抑制作用	刺激作用	抑制作用
例数	12	12	6	9
对照组*	33130±11703	35762±15932	41066±13337	28793±12595
加血清组	44657±11598	24891±13510	45403±16306	22436±12091
%	134.79	69.60	110.56	77.92
P	<0.01	<0.001	<0.01	<0.001

注:脉冲计数,又±SD,对照组为 100%

综合上述结果可以看出,表 1、表 2 提示再障患者的淋巴细胞对 PHA 和 ConA 的反应性的变化,与相应的对照组相比差异非常显著。表 3 反映出慢性再障患者对正常人淋巴细胞反应性的抑制作用较明显。

1.2 锂对 CFU-S 的影响

为研究锂对造血的调节作用,用集落法观察锂对照射后第九天的脾结节(CFU-S₂)和第十四天的脾结节(CFU-S₁)形成的影响,用细胞形态学方法检查锂对 CFU-S₁ 和 CFU-S₂ 的细胞分化,以及骨髓细胞的恢复。

实验共选用 60 只 20g 重的雌性小鼠,分 3 组:对照组、照前给药组(照射前服用 3 天 Li₂CO₃, 2mmol/L, 每日一次 0.1mL),照后给药组(照后服用 3 天 Li₂CO₃, 剂量同前)。照射条件用⁶⁰CO-γ 射线对 60 只小鼠进行全身照射,剂量率 1Gy/min,总剂量 8.5Gy。在照射后 1h 内给每只小鼠尾静脉注入 5×10⁵ 个同种小鼠骨髓有核细胞。于照射后第 9 天和第 14 天杀死实验小鼠,取出脾脏经 Bouin's 液固定后,计数第 9 天的脾结节(CFU-S₂)和第 14 天脾结节(CFU-S₁),结果见表 4。

表 4 Li_2CO_3 对 CFU-S_1 和 CFU-S_2 形成的影响

	CFU-S_1	CFU-S_2
对照组	14.7±3.6	18.4±9.0
照前给药组	7.2±1.6	9.2±0.8
照后给药组	11.0±6.4	10.0±4.3

注: $\bar{x} \pm \text{SD}$ $n=20$

上述实验结果按成组比较的 t 检验方法进行统计处理,无论是照射后第 9 天还是第 14 天,仅有照前给药组与对照组间差异显著。脾结节的形态学检查,照射后第 9 天对照组以红系集落为主,集落小;照前给药组集落大,主要是红系集落。脾脏内有散在成熟的红系和粒系细胞。照射后给药组脾脏充血较前两组明显,集落小。照射后第 14 天对照组集落大,细胞数多并出现分裂细胞,可见粒、红混合集落。照前给药组集落细胞数多,除红系集落外也出现混合集落。照后给药组集落小,脾脏内有散在的粒系和红系细胞。

照射后第 9 天对照组的骨髓涂片,仅有少数成熟的粒细胞,罕见幼粒、幼粒细胞。照前和照后给药两组除见散在的网状细胞、浆细胞外,还可见幼粒和幼红细胞。第 14 天对对照组骨髓涂片上,有小簇粒系细胞散在。照前给药组的粒系细胞增生活跃,可见原红细胞及出现红系分裂细胞。照后给药组的涂片上出现各阶段粒系细胞,红系以中幼红细胞多见。

上述实验结果提示,本组实验中锂不仅没有表现出刺激脾结节形成的作用,相反服用锂两组的集落计数还低于对照组。但骨髓涂片检查结果表明, CFU-S_1 的增殖与照射后的骨髓恢复是一致的。

1.3 锂对淋巴细胞反应性的影响

本组实验以淋巴细胞转化为指标,PHA 和 ConA 为丝裂原,用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法研究锂对 T_H 、 T_S 细胞转化功能的影响,以阐明锂对人血淋巴细胞各亚群的影响。

实验方法按常规方法在无菌条件下,取 20 名健康献血员的肝素抗凝静脉血,以随机方式按 0.1mL 血样分别加入含有 PHA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);PHA(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)+0.2mL Li_2CO_3 (2mmol/L);ConA(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$);ConA+ Li_2CO_3 的 2mLRPMI-1640 培养液中,37 $^\circ\text{C}$ 培养,在收获前 11h 向样品内加 20 μL 的 $^3\text{H-TdR}$ (4.44 $\times 10^4\text{Bq}$),72h 终止培养收获在 49 型纤维滤膜上,用液体闪烁计数器计数每个样品的 ^3H 掺入量,每个实验数据为 3 个平行样品的平均值,以每分钟计数表示,结果见表 5。

表 5 Li_2CO_3 对 T_H 细胞和 T_S 细胞转化能力的影响

组别	cpm	%	P
PHA	46972±17804	100	
PHA+ Li_2CO_3	35410±13520	75	<0.01
ConA	2380±1426	100	
ConA+ Li_2CO_3	1121±698	47	<0.01

注: $n=20, \bar{x} \pm \text{SD}$ 表 5 提示,锂对 T_S 细胞有较强的抑制作用。

2 讨论

自从在血液循环中发现免疫复合物以及淋巴细胞调节造血的作用以来,淋巴细胞在再障发病过程中的作用便受到人们广泛的重视。尤其是近 20 年来,研究证明淋巴细胞对正常和病理造血均有重要的作用,形成造血-免疫-造血生物调节环,以维持造血的平衡。根据 T 淋巴细胞膜分泌抗原的生物学特性,将其分为 CD4⁺,即 T 辅助细胞/诱导细胞(T_H/T_I 细胞)和 CD8⁺,即 T 抑制细胞/细胞毒细胞(T_S/T_C 细胞)。它们可以直接或间接地调节造血功能。在骨髓中不同的 T 淋巴细胞可以直接作用于造血干细胞,诱导其增殖或解体。在丝裂原或抗原的诱导下,T 淋巴细胞并能产生多种造血因子:白细胞介素 3(IL-3),粒系(GM-CSF)、红系(BPA)等造血祖细胞生长因子,和 γ -干扰素(γ -IFN)和淋巴细胞毒素(LT)等造血抑制因子。并通过这些调节因子的相互协同或相互拮抗作用调节机体的造血功能。

从免疫学的角度来看,人们常把体内的免疫反应看成是 T_H 细胞和 T_S 细胞相对活性的总和。但在调节造血过程中,两者的作用则相反。再者,自身免疫学说认为 T 淋巴细胞是自身抗原发生反应的细胞。所以,选择测定再障患者淋巴细胞对 PHA 和 ConA 反应性的变化,不仅可以了解患者各类 T 细胞亚群比例的变化,也可以了解患者免疫功能的变化,以探讨与再障疾病发生的关系。

国内曾报道^[1],再障患者的 PHA 和 ConA 刺激细胞增生明显。Sabbe^[2]提出 PHA 诱导的再障患者的淋巴细胞转化率正常。大部分病人的 ConA 诱导的 T 细胞转化率低下。Nicholas^[3]等提出患者的 T_H/T_S 的比例倒转。本文表 1.1 反映出淋巴细胞对不同丝裂原的反应有四种类型,其中的第 IV 种类型反映,T_H 和 T_S 细胞摄入³H-TdR 量均低于相应的正常对照值(表 1.2)。如化学物质和药物引起的急性再障患者就反映出此类反应,这是由于造血干细胞的损伤,而影响淋巴细胞使之数量和功能发生变化。其它三类型都与患者的 T_H 细胞和 T_S 细胞的功能变化有关。第 I 种反应与相应的对照组比较,T_H 细胞和 T_S 细胞摄入³H-TdR 量增加,即病人的 T_H 和 T_S 细胞功能增强。第 II 类型反应,病人的 T_S 细胞功能降低,T_H 细胞功能亢进。第 III 类反应,病人的 T_S 细胞功能增强,T_H 细胞功能低下。红再障患者的淋巴细胞表现如此。表 3 提示,急性和慢性再障患者的血清对正常人淋巴细胞的转化能力表现出不同的作用,刺激作用或抑制作用。在 14 例急性再障患者中 8 例表现出刺激作用,其淋巴细胞反应类型一半是第 I 类;6 例表现出抑制作用,淋巴细胞反应类型 II 类占一半。15 例慢性再障病人中 6 例表现出刺激作用,第 II 类淋巴细胞反应占半数,9 例表现出抑制作用,其淋巴细胞反应类型主要是第 I 类。从表 1.1,提示的结果可以看出,无论是急性再障患者还是慢性再障患者的淋巴细胞功能变化都是复杂的。患者血清对正常淋巴细胞转化能力的影响与其淋巴细胞反应类型之间无明显关系。这点与 Nicholas 等^[3]的报道是一致的,表现出这些变化,除了在发病过程中各亚群淋巴细胞功能损伤程度不同外,也与各亚群淋巴细胞异质性有关^[4]。

国内^[5]的研究发现,再障患者白细胞介素(IL-2)活性、 γ -IFN 及 T_S 细胞增高,IL-2 主要由 T_H 细胞分泌产生。它具有增强 T_C、T_S、NK 细胞和 K 细胞活性,并能诱导 γ -IFN 生成等功

能。已证明,除肿瘤细胞外,NK细胞对一部分正常细胞也显出细胞毒效应或抑制效应,如未成熟的胸腺细胞、骨髓细胞等。通过识别这些细胞膜上的早期分化抗原,而对细胞加以破坏或抑制。所以,NK细胞对胸腺和骨髓细胞增殖分化有一定的意义。这证明在IL-2刺激下,增殖的NK细胞产生的 γ -IFN,和IL-2一样,也可以增强NK细胞的攻击作用。 γ -IFN可直接抑制造血,已肯定地认为 γ -INF是引起再障发生与发展的主要抑制因子。可见, T_H 细胞功能亢进也在再障发病中占有重要地位。 T_S 细胞能直接抑制造血,尤其是再障患者的骨髓中的 T_S 细胞处于活化状态时,更有其病理学意义。可见,再障患者骨髓和血液内淋巴细胞分类的相对增高,并不单纯是疾病发展的结果。

国内唐佩云等^[9]证明,T.B淋巴细胞(T.B细胞)对造血具有放大作用。尤其是B细胞的调控作用更明显。还发现正常B细胞培养的上清液具有调节造血活性。在体外对CFU-Mix(混合集落)和CFU-E(红系造血祖细胞)有刺激作用。而 T_S 细胞调节造血作用是通过抑制红系造血和提高粒系造血而实现的。本实验的单纯红再障患者的ConA诱导 T_S 细胞功能增强,即证明 T_S 细胞对红系造血的抑制作用。Mine等^[7]却指明ConA诱导的 T_S 细胞与它的上清液对离体培养的粒系和红系祖细胞增殖均有抑制作用。可见其作用机制是值得进一步探讨的。

对于锂如何调节造血进行了广泛的研究,Cupta^[8]和Harker^[9]等分别发现:锂能提高血液和尿液中的CSA。Tisman^[10]提出锂能直接作用于粒系造血祖细胞(CFU-G)。Vincent等^[11]报道锂能直接作用于小鼠CFU-S(造血干细胞)。国内有研究^[12]证明:Li-PHA条件培养基能刺激CFU-GM(粒-巨噬系祖细胞)和CFU-GEMM(多能造血祖细胞)的增殖。Christian等^[13]介绍锂诱导粒细胞增生,主要是由于基质细胞产生CSA的关系,但需要T细胞功能完整,而且骨髓细胞培养中加入环孢霉素A(CYA)能阻止淋巴细胞产生CSA。这一事实表明锂的效应系由淋巴细胞产生CSA的缘故。

为阐明锂对造血的调节作用,作者采用外源性集落方法进行研究。集落法是由Till和McCulluch分别建立的,是测定造血干细胞(CFU-S)的唯一方法,仅适用于啮齿类。1978年以来Fauser和Messner建立的造血细胞体外固体培养方法,只能测定人的多能造血祖细胞。多年来的研究证明,造血干细胞也不是一个均一的细胞群体,经过多次有丝分裂后会逐渐变“老”,自我更新潜能减退。1982年Hodgson和Bradley发现迟出现的脾结节,称之为前CFU-S。同年Magli和Lscove以摄影定位方法进一步发现第八天脾结节在72小时内消失,到第11天又开始形成新的脾结节,第14天明显易见,两者有不同的生物特性,年龄结构也不相同。第14天的脾结节具有较强的增殖潜能。因此,便把它称为CFU-S₁。第8天的脾结节则称为CFU-S₂。本文比较观察了锂对CFU-S₁和CFU-S₂增殖分化以及骨髓造血恢复的影响。分析结果发现:无论是照射前还是照射后服用锂剂的第9天和第14天的脾结节都低于对照组,这可能与锂的药理作用有关。生理条件下血液中锂的浓度19 μ g/L^[3]。实验动物服用锂剂药物后,体内锂浓度高于正常值。Vincent^[11]曾证明当锂的浓度(2.5mmol/L⁺)增高时,显著抑制CFU-S形成,计数低于正常对照组。骨髓涂片检查发现照射后第9天所有的实验动物骨髓表现空虚,第14天骨髓细胞开始增生,表明骨髓造血干细胞的增殖潜能与CFU-S₁是

• 原文用5mg/L。

相似的。这与国外的报道是一致的。细胞形态分析结果提示,脾结节仍以红系细胞为主,由脾脏造血微环境所决定。照射后骨髓恢复造血时,粒系与红系增生发展不平衡,红系造血早于粒系^[4]。而服用锶的实验动物骨髓细胞检查显示第 14 天时粒系造血比较占优势。综上所述,可以说锶能直接作用于 CFU-S,并诱导其向 CFU-GM 分化,以提高骨髓和血液中粒细胞计数。

Christian 等认为锶能诱导基质细胞产生 CSA 与淋巴细胞有关。Peter^[11]等证明,受照射的小鼠骨髓细胞 Dexter 培养系统中的基质细胞能使 CSA 增高,以维持该培养系统中细胞的增殖。可是,受致死剂量照射后,小鼠骨髓有核细胞与淋巴细胞显著减少,仅残留基质细胞、网状细胞和浆细胞,以及成熟的粒、红细胞。由此可见,基质细胞是 CSA 的主要来源。锶使 CSA 增高故能间接地促使造血细胞的增殖。

以淋巴细胞转化能力为指标,研究锶对 T 淋巴细胞的作用,可以清楚地看出,锶对 T 淋巴细胞有抑制作用,尤其是对 T_s 细胞有较强的抑制能力。T_s 细胞不仅对造血有直接作用,对免疫系统也有调控作用,它能直接作用于 B 细胞,也可通过 T_H 细胞间接地调节 B 细胞功能。因此,当 T_s 细胞功能降低或数量减少时,B 细胞的功能可以增高。孔祥瑞^[5]证明再障患者的发锶含量降低,这样失去锶对 T_s 细胞的控制作用使之功能亢进,这样不仅能直接抑制造血,也可抑制 B 细胞的功能,而间接影响机体造血功能。

总之,从本文 3 组实验结果可以看出,锶对造血的调节作用,除通过诱导基质细胞产生 CSA 间接作用于造血祖细胞外,还能直接作用于 CFU-S 水平上调节造血。此外,锶对 T_s 细胞有显著的抑制作用,以减少 T_s 细胞对 CFU-S 的直接损伤,并可以通过 B 细胞增强造血功能。上述锶与淋巴细胞之间的作用,是锶对骨髓造血起保护作用的机制。

参考文献

- [1] 鲍斯等. 中华血液学, 1986, 7(4), 209
- [2] Sebbe LJM, et al Acta Haemat. , 1984, 71 : 178
- [3] Nicholas CZ, et al Brit. J. Haemat. , 1984, 58 : 95
- [4] 杨怀志. 国外医学免疫学分册, 1986, 4 : 174
- [5] 储翰林. 中华内科, 1991, 30(5) : 262
- [6] 唐佩弦等. 中华血液学, 1985, 6 : 504
- [7] Mine, H. , et al. Exp. Hematol, 1985, 13 : 963
- [8] Gupta, RC. , et al Am. J. Med. , 1976, 61 : 29
- [9] Harker, WG. et al. Blood, 1977, 46 : 263
- [10] Tisman, O. et al. Br. J. Haematol, 1973, 24 : 763
- [11] Vincent, S. , et al. Blood, 1980, 56 : 1150
- [12] 孔祥瑞. 必需微量元素的营养生理及临床意义. 安徽科学出版社, 1982, 40
- [13] Christian, C. , et al Blood, 1983, 62 : 172
- [14] 刘树伟等. 医学放射生物学. 原子能出版社, 1986 年, 139
- [15] Peter. Q. , et al. Exp. Hematol(Suppl. 56), 1985, 13 : 43

髓与淋巴细胞在调节造血过程中的作用

原子能出版社出版

(北京 2108 信箱)

原子能出版社激光照排中心排版

北京市海淀区三环快速印刷厂印刷

☆

开本 787×1092 1/16 · 印张 1/3 · 字数 10 千字

1992 年 6 月北京第一版 · 1992 年 6 月北京第一次印刷

ISBN 7-5022-0696-5

TL · 430

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT



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, except abstract, 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.

ISBN 7-5022-0696-5
TL • 430

P.O.Box 2103
Beijing, China

China Nuclear Information Centre