

下限。粒细胞增殖活性无改变,幼稚细胞的分裂趋于活跃,中性粒细胞渗透压耐力无重大改变。在白细胞水平降低的全部人员中,有少数病人(9例)呈现造血功能再生障碍倾向。其骨髓有核细胞数量不超过50,000/立方毫米,平均为 $43,500 \pm 5,650$ /立方毫米。细胞的有丝分裂活性倾向于降低。粒系统细胞的相对和绝对含量都减少,尤其成熟中性粒细胞的储量减低。中性粒细胞渗透压耐力下降,证明其质量不佳。这9名倾向于再生障碍的人是Ⅱ度慢性放射病患者。其中5名以前是使用永久发光涂料的画工,确有镭掺入机体。其余4名是工龄为20~30年的X线科工作人员。

最后作者指出,慢性放射病人停止接触辐射后血象可逐渐恢复。白细胞水平略低于正常或轻度白细胞减少,有时在停止接触辐射后5~10年或更长的时期内均可见到,仅在少数病例是由造血的器质性损伤引起的,并伴有再生障碍倾向。多数病例的造血障碍是功能性的,具有粒细胞生成代偿不全的特征。临床分析表明,合并有各种慢性疾患以及病人的较大年龄,对血液系统恢复过程的延缓可能有一定影响。体内掺入了镭的病人,其造血系统的恢复过程也显著延缓。

(Грибова ИА: Мед Радиол 20 (5): 25.
1975 (俄文) 赵文正摘译 许文山校)

测定巨噬细胞吞噬红细胞作用的新方法及其与 ^3H -胸腺嘧啶核苷摄取降低测定的关系

绪 言

测定巨噬细胞的吞噬功能,以前用整体方法测定血液中颗粒的清除率;体外法,则是计数一定时间内进入巨噬细胞内的惰性颗粒、细菌或红细胞的数目。体外研究豚鼠多形核白细胞吞噬绵羊红血球发现:在抗体和补体二者共同参与下,多形核白细胞才能最大地吞噬靶细胞。这些研究是测定吞噬的靶细胞从多形核白细胞和红细胞悬液中的消失;每次测定所需要的吞噬细胞数目,大于一个豚鼠所能提供的数量。当研究许多份实验动物的细胞悬液时,该法也不很适用。

下面报告一个新的、可靠的简化的测量巨噬细胞活性的方法。它可同时测定许多份巨噬细胞悬液。我们用它研究了酵母多糖、结核菌苗、可的松、雌酮、B·百日咳疫苗和维生素A对豚鼠巨噬细胞活化的短期和长期

效应。本法的某些改良方法能定量测定包括多形核白细胞在内的玻璃粘连细胞对细菌和其他标记物质的吞噬和消化作用。将肿瘤靶细胞与效应细胞一起培养,定量测定 ^3H -胸腺嘧啶核苷对肿瘤靶细胞的参入,参入的降低也可用以测量抗肿瘤效应细胞的功能⁽¹⁾。

R·N·Germain 发现⁽²⁾介导这种效应细胞功能的主要细胞类型是活化的巨噬细胞。本文也讨论了将这种非特异的抗肿瘤效应细胞活性与吞噬红细胞作用联系起来的某些实验结果。

材 料 和 方 法

动物:正常的AKR雄性小鼠,体重18~20克。

培养基:RPMI全培养基,含RPMI-1640加0.25mM EPES缓冲液85%,小牛血清10%,非必需氨基酸溶液(100×)1%,

MEM 氨基酸(50×) 2%, 核酸前身溶液(每毫升含胞苷、尿苷、腺苷和鸟苷各1毫克) 2.5%, 青霉素—链霉素(100单位, 100微克/毫升) 0.2%。RPMI-HIAFC 培养基, 含有 RPMI-1640加 0.25mM HEPES 缓冲液90%及热灭活的(56℃, 30分钟) 小牛血清10%。

小鼠的注射: 维生素A、醋酸氢化可的松、巯基乙醇酸盐生长液、结核菌苗、酵母多糖A、雌酮或B·百日咳疫苗、用生理盐水稀释到所需浓度、腹腔注射 0.5 毫升。注射等量的生理盐水作对照。

腹腔渗出细胞悬液的制备: 腹腔渗出细胞得自腹腔注射待测物质 3、4 天后或28天后的 AKR 雄性小鼠。用 27号针头注射 3 毫升 RPMI-HIAFC 培养基以灌洗腹腔, 轻轻按摩后, 用 20号针头作胸穿刺抽腹液。如偶有出血流进腹腔, 这种小鼠的悬液弃之不用。所有的细胞制剂和培养基均在 4~6℃ 保存。用 R. Evans 法测定总细胞数和巨噬细胞含量。涂片作细胞分类计数。

两种方法得到的巨噬细胞数相近, 从每只未刺激的小鼠大体可得到 2×10^6 个巨噬细胞, 而用结核菌苗刺激过的小鼠腹腔, 巨噬细胞可达 1×10^7 个。巨噬细胞悬液, 供“ ^3H -胸腺嘧啶(参入)降低”的测定者, 稀释到 2×10^6 个/毫升; 供“吞噬红细胞作用”测定者, 则稀释到 4×10^5 个/毫升。

EL 4 肿瘤靶细胞悬液: EL 4 肿瘤靶细胞通过 C 57 BL/6 雄性小鼠的腹水瘤传种保存。用 RPMI-1640 全培养基洗涤并悬浮 EL 4 细胞, 标定为 4×10^5 个/毫升。

^{51}Cr 标记的调理过的绵羊红血球悬液(标记的 EA 细胞)的制备: 绵羊红血球悬液在 Alsever's 液中洗三遍, 再悬浮, 于 0.5 毫升中含 1×10^9 个细胞, 往该悬液中加入 0.1 毫升 ^{51}Cr (1000 微居里/毫升)。在 37℃ 水浴上放 30 分钟。然后加入 19.5 毫升 20℃ 的 RPMI-1640 HIAFCS 培养基。边混合边滴

加等体积 1:500 RPMI-1640 HIAFCS 稀释的含甘油兔抗羊的溶血素。混合后 20℃ 保温 20 分钟, 然后 4℃ 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟, 用 10 毫升 RPMI-1640 HIAFCS 洗三遍并悬浮成 4×10^6 个细胞/毫升。

吞噬红细胞作用的测定: 每支 15×110 毫米平底玻璃管各加 1 毫升绵羊红血球悬液, 将这种管按 3 支(或 5 支)分成组, 不同组分别加入 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 或 0.9 毫升标定的巨噬细胞悬液 (4×10^5 个细胞/毫升), 然后都调到 2 毫升。对照管包括标记对照(没有巨噬细胞或其他处理)和自溶解(没有巨噬细胞, 但经过正常处理)对照两种。除标记对照外, 其余所有管均在 25℃ 下 $800 \times g$ 离心 3 分钟, 然后在 37℃ 水浴上放 5 分钟并转移于 37℃ 7% CO_2 保温箱 90 分钟。之后, 从每支自溶解对照管取 0.5 毫升上清液分别放到放射性计数管里。剩下的细胞悬液在混合器内混合 5~10 秒钟, 并取出上清液。每管加入 1.5 毫升 RPMI-1640 HI-AFCS 培养基。混合细胞悬液取出上清液。从对照看出, 这种混合洗涤过程移除了 96% 以上的非吞噬的红细胞。将管子盖好, 用自动 γ 计数器测量管中剩余的放射性。

^3H -胸腺嘧啶核苷摄取降低的测定: 在微量组织培养板的每个孔中, 加入 0.1 毫升 4×10^5 个/毫升的 EL 4 细胞悬液, 再加 0.1 毫升标定的巨噬细胞悬液 (2×10^6 个/毫升) 或它的 1:2, 1:5, 1:10 的稀释液, 每种浓度作 3 到 6 个平行孔。对照孔只加 EL 4 细胞或巨噬细胞一种。丝裂霉素 C 或者照射过的 EL 4 对照预先加进巨噬细胞悬液。然而, 24 小时保温培养时, 不需要这种对照, 因为不论有没有 EL 4 细胞存在, 巨噬细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的量是一样的。每孔加 0.05 毫升 10 微居里/毫升 ^3H -胸腺嘧啶核苷[甲基标记], 比放射性 6.7 居里/毫克分子, 培养板培养 24 小时后, 用自动加样和采样装置收集。含有细胞沉淀的玻璃纤维垫, 洗过放到

闪烁杯中,加液体闪烁液,用自动闪烁计数器测量。

结果的计算:利用 ^3H 及 ^{51}Cr 多次计数和巨噬细胞计数绘出一条线性回归线。它代表用最小二乘法计算的真正曲线的估计值。其斜率随着一定数目的巨噬细胞吞噬红细胞活性的提高而增加。从该回归线可计算出吞噬50%的标记红血球或肿瘤靶细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷能力的降低所必需的巨噬细胞数。然后将数据记录为每 1×10^6 个细胞的50%单位数。这种数据分析类似于 Cerotini 和 Brunner(7)所用的方法,线性回归分析之前,将吞噬 ^{51}Cr 标记 EA 细胞的数据,记录为百分摄取加标准误以及和正常值比较的 P 值。

结 果

表 1 代表腹腔注射巯基乙醇酸酯,酵母多糖,结核菌苗和维生素 A 两天后的腹腔渗出细胞吞噬红细胞作用和降低 EL4 肿瘤细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的结果。酵母多糖和结核菌苗使标记的 EA 细胞的百分摄取率达到最高。在所用的剂量水平上,用标记的 EA 细胞的摄取法测量,腹腔注射巯基乙

醇酸酯,维生素 A 和结核菌苗后第四天的腹腔渗出细胞的吞噬能力似乎最高。但是,注射 0.5 毫克酵母多糖动物的腹腔渗出细胞的吞噬活性,是在注射后的第二天而不是第四天最高(表 2)。

B·百日咳疫苗注射后四天,不同的剂量都能明显增加腹腔渗出细胞的吞噬能力。可的松注射剂量直到 100 毫克/公斤时,至不明显改变腹腔渗出细胞的吞噬能力;可是超过 5 毫克/公斤的剂量却明显降低胸腺与体重的比。雌酮在所用的最高剂量(0.5 毫克/公斤),可轻微刺激腹腔渗出细胞吞噬标记 EA 细胞的活性。在一批相似的动物上,于给药后 28 天重复了同样测定,只有结核菌苗和酵母多糖处理的小鼠所产生的腹腔渗出细胞其吞噬能力明显增加。同一渗出细胞悬液也测定其降低肿瘤靶细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的能力,结果见表 1。对照组与给药组在统计学上的差异是明显的。可是,组内和组间的变异性,已经排除了吞噬红细胞作用和降低肿瘤靶细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷之间有任何统计相关关系。我们即将重新评价通常测量效应细胞降低肿瘤细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的测定技术。

表 1 腹腔注射巯基乙醇酸酯、酵母多糖、结核菌苗和维生素 A 两天后腹腔渗出细胞吞噬红细胞作用和降低 EL4 细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的作用

处 理 ⁽¹⁾	剂 量	2×10^6 个巨噬细胞吞噬的 EA 细胞的百分数 $\pm \text{S.E.}; P^{(2)}$	吞噬红细胞作用 $\text{PO} / 10^6^{(3)}$	对 EL4 细胞摄取 ^3H -胸腺嘧啶核苷的降低 $\text{AU}/10^6 \text{ (4)}$
生理盐水		7.4 ± 0.1	0.50	0.60
巯基乙醇酸酯	0.50 毫升	$22.1 \pm 0.1; <0.01$	2.25	1.25
酵母多糖	0.07 毫克	10.4 ± 0.8 ; 无意义	1.48	0.89
	0.50 毫克	$20.0 \pm 2.0; <0.01$	2.58	2.00
	3.00 毫克	$48.0 \pm 2.0; <0.01$	5.47	2.94
结核菌苗 ⁽⁵⁾	0.143 ×	$19.7 \pm 0.5; <0.01$	2.22	0.71
	1.00 ×	$35.0 \pm 1.0; <0.01$	4.02	0.91
	5.00 ×	$28.0 \pm 4.0; <0.01$	3.23	0.86
维生素 A	1000 单位	$13.6 \pm 0.6; <0.02$	1.40	0.39
	3000 单位	7.0 ± 1.0 ; 无意义	1.28	0.87
	6000 单位	7.7 ± 0.8 ; 无意义	1.10	0.50
维生素 A + 结核菌苗 ^{1.0 ×}	3000 单位	$21.0 \pm 2.0; <0.01$	3.04	1.00

注:

(1) 腹腔注射 4 只 18~20 克重的 AKR 小鼠。

(2) 标记的 EA 细胞: 巨噬细胞 = 20:1; P 值由 "t 测验表" 查得。

(3) PU/10⁶ 即 10⁶ 腹腔渗出细胞的 "吞噬单位" 数, 是从 EA 细胞吞噬百分数的线性回归曲线计算出来的, 亦即由不同数目的巨噬细胞所吞噬的 EA 细胞吞噬百分数的线性回归分析计算出来。每个测定, 一般取 5 个点, 每个点测 3 次 (EA 细胞和巨噬细胞的比 = 100:1, 33:1, 20:1, 14:1 和 11:1)。一个单等于吞噬 50% 的 ⁵¹Cr 标记的红血球所必需的巨噬细胞数。

(4) AU/10⁶ 即 10⁶ 个腹腔渗出细胞的 "活性单位" 数, 是与不同数目的巨噬细胞一起培养的 EL4 细胞 ³H- 胸腺嘧啶核苷摄取百分数降低的线性回归最小二乘法分析计算出来的。每个测点一般取 4 点, 每点测 3 次 (EL4 和巨噬细胞的比 = 0.5, 1, 2.5 和 5:1)。一个单位等于降低 EL4 细胞摄取 ³H- 胸腺嘧啶核苷 50% 所需的巨噬细胞数。

(5) 1 × 结核菌苗等于 1 瓶 Claxo 结核菌苗, 每瓶含有 4~9 × 10⁶ 个活菌。

表 2 腹腔注射巯基乙醇酸酯、维生素 A、结核菌苗和酵母多糖后 2、3 天和 4 天腹腔渗出细胞的吞噬红细胞作用

处 理 剂 量	测定日	2 × 10 ⁶ 个巨噬细胞吞噬的 EA 细胞百分数 $\bar{P} \pm S.E.$	PU/10 ⁶
巯基乙醇酸酯 0.5 毫升	2	60 ± 18	3.11
	3	51 ± 6	5.03
	4	93 ± 24	12.39
维生素 A 3000 单位	2	12 ± 1	1.63
	4	17 ± 1	0.89
结核菌苗 1x ⁽³⁾	2	55 ± 5	5.64
	4	56 ± 1	5.26
酵母多糖 0.5 毫克	2	100 ± 2	12.78
	4	39 ± 7	3.26

讨 论

以标记 EA 细胞摄取量来测量巨噬细胞的活化, 不但迅速, 而且允许同时检查许多份标本。本文一系列实验结果表明, 甚至动物的年龄, 性别和体重相同 (表 1) 这组 and 那组实验动物的腹腔渗出细胞的吞噬能力, 还是不同。以前曾报道过⁽³⁾, 体外抗体刺激实

验之所以也具有与上面相似的变异性, 显然是由于在负重和动物驯化期间的应激反应有变异性。Rilley⁽⁹⁾ 也注意到环境应激反应对宿主抗肿瘤形成作用。在巨噬细胞 EA 细胞培养的一组多次实验中标标准误是比较低的。吞噬红细胞作用测定法, 目前常用以定量不同因素活化巨噬细胞的活化水平。我们正在继续研究该测定方法与活化的巨噬细胞具有非特异性抗肿瘤效应细胞活性之间可能存在的关系。现在的研究趋向采用这种技术来测定标记细菌悬液的摄取, 并将定量测定多形核白细胞的吞噬活性作为决定宿主抗传染病的一个指标。总之, 本法似乎比体内颗粒的清除或显微镜下计数的方法更方便, 更适合于测定吞噬活性。

{Scheetz ME 等: Immunological

Communications 5 (3):189~203.

1976 (英文) 赵武述译 王世真 林 汉校}

¹¹碳-碘甲烷的制备及其用于¹¹碳-甲基-乙-蛋氨酸的合成

短半衰期放射性示踪物, 在器官体外显影应用中, 具有高灵敏度、高分辨率的优点。它们对人体的辐射剂量很小, 又便于短时间内重复使用。但是, 它们的合成受到时间的

限制。本工作的目的是建立一个能够用于标记一些有生物学意义的化合物的快速合成途径, 即采用 ¹¹CH₃I 来制备 ¹¹C-甲基-L-蛋氨酸。