

对于放射性药物的应用,必需考虑一些其他因素,其中之一是放射性药物保持完整性的时间。药效学评价没有绝对标准,但医用示踪剂必需只在完成研究的这段时间在体内保持稳定。例如,如果钨标记红细胞或人血清白蛋白,在注射后30分钟期间能精确反映血管池的大小,那么这些制剂就符合衍生物在体内稳定性的标准,在这段时间里是有效的。

^{99m}Tc 的化学

选择 ^{99m}Tc 用作核子医学扫描是由于它的有利核素性质($T_{1/2}$ —6小时, γ 发射能量140千电子伏,无 β 衰变)和来源方便。从吸附于氧化铝柱的 ^{99}Mo 发生器用盐水洗脱 ^{99}Mo 的衰变产物 ^{99m}Tc 。核衰变中生成钨的稳定化学态 TcO_4^- 水溶液。但这一高钨酸盐发生器产物不与螯合剂结合,也不吸附于骨、肺、肾扫描所必须的微粒。因而要完成这些研究必需生产一种不太稳定,带正电荷的还原态 ^{99m}Tc 。

和各种螯合剂结合的 ^{99m}Tc 主要是还原态的 Tc(III) Tc(IV) Tc(V) ,它们可用各种还原剂处理而得。最常用的还原剂是(1)亚锡离子,(2)氯化铁和抗坏血酸,(3)亚铁离子,(4)硼氢化钠,(5)浓盐酸。高钨酸盐也可用电解还原,虽然用铂电极时会存在其他还原品种。还原态的钨容易与螯合剂结合生成用于诊断扫描的化合物。

钨的氧化物、硫化物、氯化物受到相当注意,关于氧化物,在高价氧化态中以氧代化合物为主,常见的是 TcO_2 和 Tc_2O_7 ,二氧化钨(TcO_2)水合物由 TcCl_6^{2-} 或 TcBr_6^{2-} 等 Tc(IV) 溶液加碱而得。也可在 HCl 中用 Zn 还原 TcO_4^- 制备。蒸发高钨酸盐的酸溶液产生 Tc_2O_7 。

简单的钨卤化物曾有报导,虽然它们是不稳定的,在碱存在时水解。 Tc(IV) 氯化物的复合物对水解稳定并被制备作为可能的骨扫描剂。但与磷酸盐标记物比较并无优点。用浓 HCl 还原高钨酸盐也制得六氯化物,在稀酸中缓慢水解。

钨在 H_2S 或硫代硫酸钠存在下生成硫化物。 $2\sim 6\text{NHCl}^{99}\text{TcO}_4^-$ 溶液用 H_2S 饱和得到 Tc_2S_7 。用此法元素硫以胶体析出往往不完全,因此临床用制备较易的硫代硫酸钠溶液作为肝闪烁照相用的胶体硫的来源。

除钨本身的化学外,必需考虑金属还原剂螯合物的化学。有关最常用还原剂氯化亚锡的资料较少,但焦磷酸盐和 DTPA 亚锡螯合物的平衡常数是已知的,这些常数决定在中性 pH 维持该金属溶解度必需的螯合剂浓度。由于金属氧化物竞争干扰并抑制所需要的钨的结合,还原剂必需是螯合物形式以防止副反应的发生。(未完待续)

(Eckelman WC等: Int J Appl Rad Isot 28: 67, 1977 (英文) 邹正国节译 谢毓元 张永令校)

根据 ^3H -TdR标记核分裂细胞的液闪计数 确定细胞周期时间

对于哺乳动物已建立的常备组织培养需要定期测定细胞周期时间(T_c),以确证细胞动力学各参数保持稳定。除了需要烦琐而乏味的采样外,应用标准的标记核分裂百分数的方法(PLM),放射自显影以及应用

显微镜来确定标记核分裂的百分数,一般需要7天或更长时间。

Carver 和 Mendelsohn 以及 Gray 和 Mendelsohn 等最近(1975)报告了关于应用连续采样, S 期细胞电子分类和液闪计数

进行快速的细胞周期分析的技术。

本文报告一个简单的、准确和快速的技术，它在实验结束后一小时就能确定细胞周期的各个参数。其步骤包括非同步单层细胞培养 ^3H -TdR瞬时标记和连续收集核分裂细胞的液闪计数。

材料和方法

细胞系

全部实验用中国地鼠卵巢细胞系(CHO)单层生长在许氏改良的McCoy氏加20%胎牛血清的5A培养基中。生长分值为95%。细胞群体双倍时间为16小时。电镜常规检查有无支原体(mycoplasma介于病毒与细菌之间的一种微生物——校者注)从来没有看到过污染。

细胞周期测定

培养瓶或培养皿单层培养生长的细胞用 ^3H -TdR(1微居里/毫升, 1.9居里/毫克分子)瞬时标记, 37℃10分钟。然后细胞用温暖的含有7.5毫克分子没有标记的TdR培养液清洗, 并且在新的温暖的培养基里再培养。用于细胞周期测定的细胞用以下三种方法获得:(A)整个实验中核分裂细胞均取自一个单个培养瓶;(B)每次取标本时, 核分裂细胞取自不同的细胞培养瓶;(C)复制许多个60毫米培养皿, 每隔两小时从一个培养皿中取出细胞标本。

标记核分裂百分数方法(PLM)

当应用PLM的方法时, 先将 5×10^5 细胞接种在含有5毫升生长培养基的复制培养皿里培养18小时后, 再用 ^3H -TdR瞬时标记。这样可以保证在实验开始时细胞群已处于完全指数生长阶段。每次取标本时, 从每个培养皿得到的培养基移到离心管, 并且用胰蛋白酶消化(0.025%, 5分钟)收集细胞。离心并用生理盐水冲洗后, 将细胞固定在Corroy's溶液里, 用2%醋酸地衣红(aceto-orcein)染色, 片子用于放射自显影(Kodak NTB-2液体核乳胶), 曝光7天, 在Kodak

D-19里显影。每次取的标本计数其标记核分裂百分数(PLM), 并确定细胞周期各时相的持续时间。这就是用来确定细胞周期各参数的标准方法, 并且用来作为这些实验中所应用的其他方法的对照。

单个培养瓶核分裂细胞的获得-液闪计数法(MSC)

6×10^5 细胞接种在含有25毫升生长培养基的32呖(OZ)培养瓶里培养18小时, 再用 ^3H -TdR瞬时标记。按照Terasima和Tomach(1961)描述方法的改良方案, 在整个实验中从同一个培养瓶收集核分裂细胞。每次取标本时培养瓶用力振荡15秒以移去贴附不牢的间期细胞。弃去培养基换上新鲜温暖的培养基, 细胞再培养。15分钟后, 培养瓶再振荡15秒, 并且收集悬浮的核分裂细胞, 离心和再混悬于生理盐水中。计数细胞数和核分裂指数, 用吸量管直接吸取 10^5 细胞加到含有荧光素(fluor)的小玻璃瓶里作液闪计数。由核分裂闪烁计数法(MSC)所得的结果以每分钟计数/细胞与 ^3H -TdR标记后的时间作图。在每分钟计数/细胞第一次峰的最大值的一半处测定所有的细胞周期时间, 细胞周期各时相持续时间用改良的PLM方法计算, 即在每分钟计数/细胞初期上升(在50%值)和初期下降的时间间隔为S期。 T_c 是在每分钟计数/细胞第一个初期上升峰和每分钟计数/细胞第二个上升峰(在50%值)之间的时间间隔。其他时相的持续时间是Howard, Pele(1953)描述的方法计算。用这种方法收集的细胞群体中核分裂指数总是大于90%。

除液闪计数外, 所获得的相同核分裂细胞的其余部分也作了放射自显影, 并用PLM方法进行细胞动力学计算。

多个培养瓶核分裂细胞收集-液闪计数法

在这一步骤中, 核分裂细胞的收集和液闪计数方法都和前面相同, 只不过是为了确定哪个过程对正常细胞进行性动力学影响最

小, 在每次取标本时是从不同的培养瓶获得核分裂细胞。

结果和讨论

为了测量细胞周期各时相的持续时间, 我们曾试验了一个快速的方法。这个方法需要: (1) 一瓶非同步生长的细胞培养用 ^3H -TdR作瞬时标记; (2) 瞬时标记后 20~24 小时内, 每隔2小时从培养瓶中收集一次核分裂细胞; (3) 在液闪计数器中测定每次所取得标本的 ^3H -每分钟计数/细胞数值。Bostock, Prescott和Hatch (1972) 在他们关于Satellite和主链DNA复制时间的研究中应用过一个类似的技术, 然而据我们所知, 未曾像本文所描述的这样用于对完整细胞周期的测量。

图1表示的全部资料来自同一个24小时内同时完成的五组实验的结果。在 ^3H -TdR瞬时标记后不同时间分别由各个培养皿(PLM方法)收集细胞作成标本。实验结束后7天放射自显影观察到的PLM资料由图1(c)表示。图中在核分裂50%标志点上进行细胞动力学计算。可看出: $T_c = 15$ 小时, $T_{G_1} = 4.3$ 小时, $T_S = 8.6$ 小时, $T_{G_2} = 1.6$ 小时核分裂指数为3.5%, 因为生长分值接近1.0, 所以 T_M 是由公式 $T_M = MI \times T_c$ 计算的, 大约为0.5小时。在实验中的其余部分都采用这个 T_M 值。

应用单个或多个分开的培养瓶, 由MSC方法所得的曲线见图1(a), 并且是在实验结束后1小时内就可以得到。细胞周期各时相的持续时间是在每分钟计数/细胞处在第一个峰最大值的50%点时计算的。由单个培养瓶观察的 T_c 值为14.7小时。每次取标本时, 从不同的平行配制的培养瓶里收集核分裂细胞者, T_c 延长4% (15.3小时)。最大变化是发生在 G_1 时相的持续时间的计算上: 在单个培养瓶里是4.2小时, 在多个分开的培养瓶里为5.6小时, 这表示 G_1 时相持续时间相差1.4小时或25%。

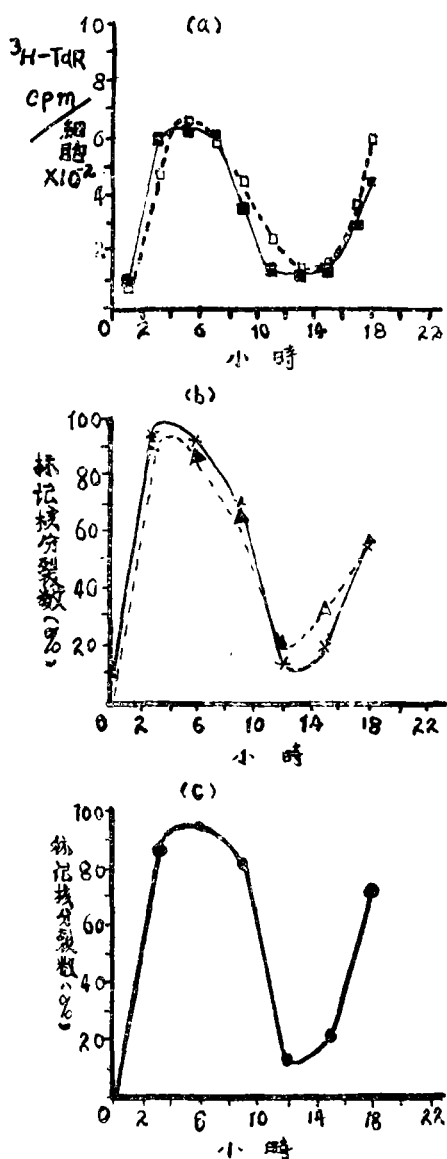


图1 各种方法所得的细胞周期时间的比较

(a) 核分裂收集-液闪计数方法, \square , 单个瓶: $T_c = 14.7$ 小时, $T_{G_1} = 4.2$ 小时, $T_S = 8.0$ 小时, $T_{G_2} = 2.0$ 小时, $T_M = 0.5$ 小时。■, 多个分开瓶: $T_c = 15.3$ 小时, $T_{G_1} = 5.6$ 小时, $T_S = 7.5$ 小时, $T_{G_2} = 1.7$ 小时, $T_M = 0.5$ 小时。
 (b) 核分裂收集-放射自显影, \times , 单个瓶, $T_c = 15.9$ 小时, $T_{G_1} = 5.6$ 小时, $T_S = 8.4$ 小时, $T_{G_2} = 1.4$ 小时, $T_M = 0.5$ 小时, \blacktriangle , 多个分开瓶, $T_c = 15.5$ 小时, $T_{G_1} = 5.2$ 小时, $T_S = 8.2$ 小时, $T_{G_2} = 1.4$ 小时, $T_M = 0.5$ 小时。
 (c) 单个培养碟-放射自显影, \bullet $T_c = 15.0$ 小时, $T_{G_1} = 4.3$ 小时, $T_S = 8.6$ 小时, $T_{G_2} = 1.6$ 小时, $T_M = 0.5$ 小时。

同一细胞标本剩余部分作放射自显影, PLM变化曲线如图1(b)所示。由单个和多个分开的培养瓶观察到的细胞周期数据之间比较,可以看出是很接近的。

因为在求取细胞周期数据时, PLM方法是最常用的技术, 所以在这一组实验中用它来作为对照。表1是由单个或多个培养瓶(MSC方法)获得的细胞动力学参数与用PLM技术得到的数据相比。此表可以看出由单个培养瓶MSC技术观察到的数据与标准的PLM方法得到的数据只有很小的差别。细胞周期持续时间只有2%(0.3小时)差别。 G_1 期持续时间只差0.1小时, 而S期持续时间相差7%(0.6小时)。虽然 G_2 相差20%, 但实际时间只差0.4小时。在每一个采样时间点, 用取自不同培养瓶的核分裂细胞所获细胞周期数据, 与PLM方法比较, 波动范围较大: T_{C_2} 和 T_c 的估计值

是好的, 但是 G_1 时相持续时间延长1.3小时(23%), S时相持续时间缩短1.1小时(13%)(表1)。因此, 这个资料表明在

表1 MSC和PLM方法之间相对差别

方 法	T_c	T_{G_1}	T_s	T_{G_2}
单个培养瓶 MSC/PLM	2% (0.3)*	2% (0.1)	7% (0.6)	20% (0.6)
多个分开培养瓶 MSC/PLM	2% (0.3)	23% (1.3)	13% (1.1)	6% (0.1)

* 括弧内数字为小时

整个实验中从同一培养瓶收集的被 3H 标记的核分裂细胞液闪计数与PLM方法最接近。

在不同天中完成了16个其他实验, 这些结果见表2, 平均结果是很相似的, 但是数值的范围较大, 大概是因为这些实验是在一年多期间由不同的人在不同的日子里作的。

表2 利用不同标本和测定技术所得的平均细胞周期时间和范围

方 法	T_c (小时)	T_{G_1} (小时)	T_s (小时)	T_{G_2} (小时)	T_M (小时)
单个培养瓶 MSC	15.9(14.7~16.8)*	6.3 (4.2~7.3)	7.4(6.8~8)	1.6(1.2~2)	0.5
多个分开培养瓶 MSC	15.2(15.1~15.3)	6.1 (5.6~6.6)	7.0(6.4~7.5)	16.5(1.6~1.7)	0.5
单个瓶放射自显影	15.4(15 ~15.9)	5.8 (5.6~6.3)	7.9(7 ~8.4)	1.2(1.0~1.4)	0.5
多个分开瓶放射自显影	16.2(15.5~16.8)	5.9 (5.2~6.5)	8.5(8.2~8.8)	1.3(1.0~1.6)	0.5
PLM	15.0(15.0~15.1)	4.25(4.2~4.3)	8.8(8.6~9)	1.5(1.4~1.6)	0.5

* 不同日期完成的16个试验

* 括弧内数字为所观察到的最大波动范围

在这些实验中的实验方法各有优缺点。当每次从好多份培养皿或培养瓶平行样品中采样时我们必须假设所有细胞所处的环境是相似的, 但是可能也并非如此, 因为细胞是来自不同的培养瓶。在整个实验中都由单独一个培养瓶采样时, 细胞是从同一细胞群中得到的; 然而更换培养基, 单层细胞的强烈振荡和在每次取标本时取出了3~4%的细胞, 这就很可能改变了细胞群体的进程动力学和时间, 尽管如此, PLM和单个培养瓶MSC方法之间比较表明细胞周期测量结果

是接近的。在每个采样时间点把核分裂指数也考虑进去, 也就是计算每分钟计数/分裂细胞, 则有可能提高MSC方法的精确性。在这些实验中我们还没有这样做。

MSC方法最大优点是速度快, 用这种方法在最后一个标本制备后1小时内就可以得到细胞周期各参数, 对比PLM方法则需7~10天。事实上, 就分析速度而言, 此方法与应用流体显微荧光光度术和电子细胞分类术进行细胞周期分析技术相比, 有过之而无不及。

结论:由这些实验得到的资料表明,利用核分裂细胞-液闪计数技术可以求出细胞周期各时相的持续时间,这个技术与标准的

PLM方法比较,是精确的和更加快速的。

(Barraco SC等: Cell and Tissue Kinet 10 (4): 335, 1977 (英) 赵乃坤译 高凤鸣校 张舞西审)

用 ^{197}Tl 标记人淋巴细胞

近年来关于用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{67}Ga 以及 ^{51}Cr 标记淋巴细胞和白细胞已有许多报告。由于各种技术问题,这些方法中有许多不能作为常规应用。近来由于标记的淋巴细胞在临床应用的重要性,特别是为了研究淋巴细胞的移动型式,从而促使我们试图用 ^{197}Tl 标记淋巴细胞。 ^{197}Tl 的半衰期为65小时,通过电子俘获衰变,并且放出77千电子伏的 γ 光子和67~80千电子伏的KX线。这些放射性特点以及汞的化学性质提示了在核子医学中汞可作为放射标记物。我们提出了在各种物理化学条件下用 ^{197}Tl 标记人淋巴细胞的数据,也报导了 ^{197}Tl 标记物在淋巴细胞中的亚细胞定位数据。

方 法

白细胞分离:首先从人血液中分离白细胞,以减少红细胞的污染。用肝素化试管收集正常人血液10毫升。血样品在800g(18℃)离心10分钟,绝大部分红细胞沉降到试管的底部。把血浆和含有白细胞的浅黄色膜层一起分离出来,然后使白细胞重新悬浮在血浆中。这种悬浮液用800g(18℃)离心5分钟,其中白细胞和残留的红细胞沉淀析出,而血小板则仍悬浮于血浆中。然后轻倒血浆于另一试管中并在3000g离心10分钟使血小板沉淀析出。把离心过的血浆4毫升和生理盐水4毫升加到白细胞沉淀物中,便获得白细胞悬浮液。

淋巴细胞的分离:分离淋巴细胞用Böyum的Ficoll-Hypaque方法略加改进。Ficoll-Hypaque混合物(FH)是取9%聚蔗糖

糖100份和60%泛影钠18份混合而制得。其比重为1.076~1.078,先吸取6毫升FH混合液于15毫升试管中,然后吸取4毫升白细胞悬浮液层加在FH混合液之上,用400g离心1小时,然后吸出在界面上呈现银白色膜层的淋巴细胞于10毫升Falcon塑料试管中,然后用生理盐水洗涤两次,最后再将其悬浮于生理盐水,使其浓度为每毫升悬浮液中含100万个细胞。

对细胞悬浮液的鉴别计数表明,80%以上是淋巴细胞,而红细胞和粒细胞都小于10%,用0.4%台盼兰检查了细胞的存活率,可在90%以上。

淋巴细胞的标记:取已知量的 $^{197}\text{TlCl}_3$,其比活性为10~15微居里/每微克汞,加到每毫升含有 10^6 细胞的1毫升细胞悬液中,然后放到含有95%的氧气和5%的二氧化碳的大气中,在预先确定的温度和要求的时间内孵育。孵育完毕后离心,取上清液计数后弃去。用生理盐水洗细胞三次以除去没有结合的示踪剂,最后将细胞悬浮于2毫升生理盐水中。用Na(Tl)井型计数器分别测量全部清洗液和细胞悬液。

确定在体外标记淋巴细胞的最佳条件会受到(1)培养温度,(2)培养时间,(3)放射性核素的浓度,(4)细胞的浓度和(5)PHA刺激剂等因素的影响。每当研究其中一参数的效应时,保持其他参数不变。完成上述所有的条件试验之后,即可确定最大的标记率条件。

在最佳条件下取等量的细胞作红细胞标记和淋巴细胞标记对比研究。

在最佳条件下研究PHA刺激剂对淋巴