

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

细胞摄入 ^{197}Hg 的影响。100万个淋巴细胞首先在含有PHA 0.05微克的McCoy's 5A的培养基中孵育72小时,并不断地振荡。然后加入 ^{197}Hg 在37℃孵育2小时进行细胞标记。在同一条件下(但不加PHA刺激剂)进行对照实验,然后测定淋巴细胞摄入标记物的数量,并比较对照样品和含有PHA刺激剂样品的结果。

结 果

温度的影响:将2微居 $^{197}\text{HgCl}_2$ 加到含有100万个淋巴细胞的1毫升混悬液中,分别在0℃, 25℃和37℃孵育2小时进行标记。与0℃或25℃的标记率相比较在37℃的标记率稍有增加但不显著。所以以后的全部实验都是在37℃下进行的。

培养时间对标记的影响:将2微居里 $^{197}\text{HgCl}_2$ 加到含有100万个淋巴细胞的1毫升混悬液中制备样品,每一个时间间隔取四个样品分别在37℃在不同时间间隔中即30分、1小时、2小时和3小时进行孵育。平均结果说明了在孵育1小时以上时标记率即不再呈现明显增加。

标记物浓度的影响:将不同含量的 $^{197}\text{HgCl}_2$ 加到1毫升细胞悬液中(含100万个淋巴细胞), 37℃孵育2小时。结果表明,淋巴细胞摄入 ^{197}Hg 量随加入的放射性量在到达3微居里前都呈线性增加,但是当加入放射性量大于3微居里时则不呈线性增加。

淋巴细胞浓度对标记的影响:淋巴细胞浓度介于 10^6 到 10^7 个细胞的样品分别和2微居里的 ^{197}Hg 在37℃孵育2小时。淋巴细胞摄入 ^{197}Hg 的量随着细胞浓度的增加而增加。

PHA刺激剂的效应:比较正常淋巴细胞和受PHA刺激的淋巴细胞对 ^{197}Hg 标记率的效应时,三个实验结果表明受PHA刺激的淋巴细胞的 ^{197}Hg 摄入量为77%,正常淋巴细胞摄入 ^{197}Hg 的量为51%,PHA刺激的淋巴细胞摄入 ^{197}Hg 的量要比正常人淋巴细胞摄入 ^{197}Hg 增加50%。

标记的牢固性:标记细胞用生理盐水清洗三次,并测量标记细胞的和清洗液的活性。漂洗出来的清洗液的活性每次不超过3%。

淋巴细胞和红细胞摄取 ^{197}Hg 的比较:每100万个淋巴细胞或红细胞分别用2微居里 ^{197}Hg 在37℃孵育条件下进行标记。发现淋巴细胞摄取 ^{197}Hg 相当于红细胞的1000倍。

亚细胞分布:用Demus方法研究了淋巴细胞标记的亚细胞水平的分布。取2微居里 ^{197}Hg 标记净化了的淋巴细胞,然后在4℃将其悬浮于1毫升10毫克分子Tris-HCl-0.15M NaCl缓冲液(pH7.4)中。悬浮液用0.1毫米间隙的匀浆器匀浆。然后将匀浆液在700g离心10分钟沉淀细胞核和细胞膜。再将上清液经7000g 20分钟离心,沉淀的为线粒体部分,微粒体则存留于上清液中。测量各个部分的放射活性,并以占总活性的百分数来表示。发现示踪剂的60%集中在细胞核和细胞膜中,而有15%和8%分别定位于线粒体和微粒体,清洗时丢失17%。

讨 论

采用上述方法用 ^{197}Hg 标记人淋巴细胞是完全可能的。当将2微居里 ^{197}Hg 加到100万淋巴细胞的生理盐水中,在37℃培养2小时所获得的标记率为48%。标记率随着淋巴细胞数的增加而增长。用Ficoll-Hypaque方法,淋巴细胞和红细胞不能完全分离,混有约10%的红细胞。由于 ^{197}Hg 标记红细胞的效率仅是淋巴细胞的千分之一,所以这种沾染不影响标记淋巴细胞的临床应用。

当加入的放射活性量超过3微居里时,标记率随着加入放射活性的增加而相应地降低,这可能是由于稳定性的汞原子数随加入 ^{197}Hg 时一起增加。在我们的实验中使用的 ^{197}Hg 的比放射活性为10到15微居里/微克汞。因而在3微居里 ^{197}Hg 中,稳定性汞的含量约为0.2~0.3微克,这对100万个细胞来说已达到饱和量。为了要标记从10毫升人血液获得的2000万个淋巴细胞,要用的最大放

射量 ^{197}Hg 是60微居里。假设标记率为50%，那么可以获得 ^{197}Hg 标记的淋巴细胞至多为30微居里。这个数量是比较小的，或许是本方法的主要局限性所在。Gillespie等人也发现了当放射活性介于0.3到2.5毫居里时，8000个I型肉瘤细胞摄入 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的量呈线性增加，而当放射活性超出上述水平时，则标记率与放射活性量不呈线性增加。

用 ^{197}Hg 标记淋巴细胞的机理尚未阐明。因为温度对标记的影响最小，标记的机理可能是一个被动过程，Glenn等人指出 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记淋巴细胞是细胞膜现象。我们的亚细胞定位实验表明了约有60%标记物是定位于细胞核和细胞膜，而有23%的量则集中在线粒体和微粒体部分。因此，至少有23%的 ^{197}Hg 示踪剂主动地通过细胞膜而其余的示踪剂进行细胞标记或者附着在细胞膜上。汞和细胞的任何成分的化学结合的性质还不明瞭。但是，汞能和-SH基呈牢固的结合。而在淋巴细胞的不同成分中存在着含有各种-SH基的蛋白质，所以人们设想 ^{197}Hg 示踪剂能和淋巴细胞牢固地结合。

PHA刺激之后淋巴细胞摄入示踪剂的量增加50%是可以充分预料到的。PHA刺激作用增加细胞的增殖能力，从而可使细胞摄入量增加。Merz等人也进行了类似的观察，他们以 ^{67}Ga 标记PHA刺激的淋巴细胞，发现其标记率比未受PHA刺激的淋巴细胞增加达60%。

近年来，用放射性核素标记淋巴细胞来研究淋巴细胞移动形式的兴趣有了很大的增长。在用 ^{51}Cr 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和 ^{67}Ga 标记淋巴细胞的实验中存在许多问题，譬如结合不牢固，混有红细胞，放射性核素的辐射特性不合适等。Marchlonis等人用乳酸过氧化酶和过氧化氢酶的方法使 ^{125}I 碘化正常细胞和淋巴样肿瘤细胞。在本文中我们介绍了用 ^{197}Hg 标记淋巴细胞的简单方法。此标记方法容易而且与核素呈牢固结合，加上放射特性的适宜，因此用 ^{197}Hg 标记淋巴细胞在临床研究中具有很多优点。

(Saha GB 等: J Nucl Med 8(1): 70 ~ 73, 1977
(英文)莫启忠摘译 朱寿彭 张永令 编辑组校)

文 摘

放 射 卫 生

031 液体放射性废物的等级划分

从事放射性物质和其它电离辐射源工作的现行卫生规章(OCII-72)没有对液体废物按照放射性水平加以分类，只是给出了归属放射性废物的定义，该定义是以不超过为水体水所制订的废物的年平均容许浓度为根据的。

治理放射性废物的任一阶段首先需按照放射性的水平对废物作出明确的分类，这在目前还是非常困难的。在颁布OCII-72后已失效的 №477-64 放射性废物的收集，排除和埋藏卫生规章中曾把液体放射性废物分为两级，比放射性在 10^{-4} 居里/升以下的弱放射性废物和比放射性大于 10^{-4} 居里/升的高放射性废物。在№101-70国际标准中把液体放射

性废物按照放射性水平划分为五级： 10^{-9} 居里/升以下为第一级， $10^{-9} \sim 10^{-8}$ 居里/升为第二级， $10^{-8} \sim 10^{-4}$ 居里/升为第三级， $10^{-4} \sim 10$ 居里/升为第四级，大于10居里/升为第五级。该标准中还列举了10个国家有关液体放射性废物的非正式的分级资料(见表)。

由表可见，各国根据本国的特点制定了不同的划分液体放射性废物的比放射性水平。例如，低放射性液体废物水平在波兰、印度、捷克斯洛伐克定为 10^{-7} 居里/升以下；在日本、瑞典和法国的二个原子中心则定为 10^{-6} 居里/升以下；同时，在日本还引用了“很低放射性”的概念，在法国的二个原子中心则提出了“非均(相)废物”(ненежны-