

10. Oldham RK, et al, Radiology 97: 317, 1970.
11. Barnes B, et al, Neurology 22, 83, 1972.
12. Banerji MA, et al, J Nucl Med 13, 655, 1972.
13. Messert B, et al, Neurology 22, 789, 1972.
14. Jonas S, et al, J Nucl Med 13, 763, 1972.
15. Cooper JE, et al, J Nucl Med 14, 387, 1973.
16. Alderson B, et al, J Nucl Med 14, 609, 1973.
17. Jayabalan V, et al: Radiology 115: 403, 1975.
18. Rhodes BA. Radiology 119, 749, 1976.
19. Barbizet J, et al, Nouv Press Med 1, 2899, 1972.
20. Christiansen K, et al, Excerpta Med Nucl Med 18, 399, 1976.
21. Bolis TF, Sem Nucl Med 7, 201, 1977.

(卫生部药品生物制品检定所 夏振民综述)

X射线和中子对淋巴细胞死亡和转化的影响

引 言

淋巴细胞在体内的功能之一,是直接地或通过转化产生更具有免疫学活性的子细胞而对抗原刺激起反应。淋巴细胞转化能力的减弱、或其有丝分裂前死亡,都将减弱机体对免疫原性刺激物的反应能力。在放射治疗过程中,白细胞数下降(包括淋巴细胞)低于标准水平,是应该中止或延期放疗的一种指标。

因为淋巴细胞是放射敏感细胞,所以随着世界各地用中子治疗的增加,迫切要把中子对白细胞的效应同X和 γ 线效应相比较的资料。Hammer Smith医院那样的回旋加速器产生的中子束所致的全身剂量是比较小的,但D/T发生器产生的中子剂量则可能较大。假如中子对淋巴细胞损伤的r.b.e.特别高的话,那么,对病人白细胞数的影响,可能是设计这些发生器的一个限制性因素。

淋巴细胞也被广泛地用于估测事故性照射时患者所受的“体负荷”,以及监测慢性照射期间的“负荷”。采用体外培养法,用在转化的淋巴细胞中观察到的染色体异常可估测损伤程度。然而,对受照射的和未受照射的淋巴细胞混合物的染色体畸变研究清楚地表明,在损伤可被测定之前,许多受到照射的细胞不能进行有丝分裂。这种“失踪”细胞不是死亡,就是没有转化。出现这种情况的程度将影响体外辐射损伤的估测。在比较不同类型的辐射,而它们对染色体损伤、淋巴细胞死亡或转化的

影响可能是不同的情况下,这一点尤为重要。

由于血管外池的大小极大地影响了白细胞计数,所以,直接估测辐射对实验动物白细胞数的影响是困难而又不敏感的。例如亚临床感染或休克等因素,可以使循环血白细胞数增加近10倍之多,而预期的照射后影响则可能是很小的。因此,体外测量比体内更可靠、更敏感。鉴于这些原因,我们在体外分析了X线和中子对人体淋巴细胞的影响。按固缩细胞的形态来分析未转化的淋巴细胞的放射敏感性,而辐射对淋巴细胞转化的影响则依其对PHA的反应来检验,采用了下述方法:a.转化的形态学指标,b.用标记的胸腺嘧啶核苷类似物观察DNA合成的变化。

材 料 与 方 法

用含肝素的注射器抽取一名健康男性献血员的全血。

1. 培养技术和固缩细胞鉴定

全血以每分钟900转离心10分钟,用灭菌滴管吸出淡黄层(buffy coat)。淡黄层由血浆、白细胞及少量的红细胞组成,按1毫升含白细胞的血浆与5毫升Ham's F10(含抗菌素)之比组成培养物。在灭菌的玻璃通用瓶(universal bottle)中照射培养物,然后置37°C培养。

从不同培养时间的培养物中采集细胞标本,离心以形成稠密的细胞团块,铺展在载玻片上,立即用Sousa's固定剂固定。然后冲洗玻片,用Mayer's苏木素明矾(haemalum)染色。玻片由本部门的

另一人编号,以使检查者不知道标本属于那一组(“盲法”)。每一玻片计数500个细胞,分成正常和固缩细胞两类。

2. 淋巴细胞转化的鉴定技术

(1) 作转化指数的形态学分析时,用改良的Purrott和Lloyol微量法培养。在盛有8毫升Ham's F10, 2.0毫升小牛血清的灭菌玻璃通用瓶中,加入0.75毫升全血。每份培养物于照射后立即加0.2毫升PHA。用Moorbead等的方法,在PHA刺激后48和72小时收集细胞。标本用Jenner-Giemsa染色,每一玻片用盲目法计数500个细胞。具有大而浅色的核,含染色质块,直径为10~25微米的细胞,被认为是转化的淋巴细胞。

(2) DNA合成的鉴定。用Pellegrino等的方法,测定在全血培养物中 ^{125}I UdR对细胞的掺入。此化合物结构与脱氧胸腺嘧啶核苷类似,在DNA合成过程中,能部分地代替胸腺嘧啶核苷。

IUdR标记物的掺入在培养48及72小时后脉冲标记6小时进行测定。像作形态学测定的实验时一样,每一样品制备双份及三份的培养物($1\sim 1.5 \times 10^6$ 细胞/每份培养物)。每份培养物加入的 ^{125}I UdR(比活性99毫居里/毫克)最终浓度为2.5微居里。6小时后,用0.15M氯化钠洗涤细胞三次,在4°C以1800g离心5分钟,用Nuclear Enterprise自动样品计数器计数。其结果为每份培养物每分钟的脉冲数,以相当于同一培养时间的对照组的百分率来表示。培养物之间的最大误差是10%。

(3) 细胞进程。为了鉴定IUdR摄取的减少究竟是由于正在合成DNA的细胞数目的低下,还是由于每个细胞DNA合成的低下,有些培养物在PHA刺激后48或72小时,固定前用6- ^3H 胸腺嘧啶核苷(比活性500毫居里/毫克分子量)脉冲标记1小时。放射自显影术按Rickinson和Ilbery的方法处理和制备标本。在计算每个细胞的颗粒数时,每份培养物计数的细胞不得少于500个。

3. 照射方法

(1) X线照射。细胞置玻璃通用瓶内,在空气中和室温下用250千伏X线照射,滤板为0.5毫米铜,1.0毫米铝(半价层为1.5毫米铜),培养物置于旋转台上,距离探头(monitor head)21厘米,用与组织等价的陶土复盖。根据连接到Farmer-Baldwin剂量仪的小型电离室测量,在通用瓶中心位置的剂量率为3.33戈瑞/分钟。

(2) 中子照射。快中子源为Hammer-Smith

医院的MRC回旋加速器,它用16.7百万电子伏的氘核轰击钨靶产生平均能量为7百万电子伏的中子。通用瓶垂直放在泡沫聚苯乙烯屏蔽物开口的中央,距开口2厘米。用连接在Keithley固态电子仪的由聚乙稀作壁的充气电离室测量。该位置的剂量率为1.5戈瑞/分钟(中子和 γ 线)。 γ 线的含量为3%。

结 果

1. 未受刺激的淋巴细胞的固缩

使用的X线和中子的剂量为0.15~15.0戈瑞。各种剂量的X线和中子照射后,在最初20小时期间,固缩细胞的比例迅速增加;在其后的50小时,增加就较为缓慢。在照射后20、50和72小时,正常细胞的百分率同剂量的函数关系如图1所示。本资料提示,淋巴细胞是一混合性细胞群,由一非常敏感的组份和少量的不敏感组份组成,后者约占20%。

对于淋巴细胞群的敏感和不敏感组份,X线和中子照射后所见的正常细胞百分率都落在相同的剂量效应曲线上,故未受刺激的淋巴细胞致死性辐射损伤的r.b.e.为1。

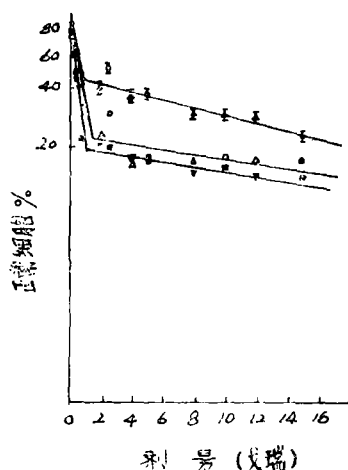


图1 未受过刺激的淋巴细胞的固缩

×——对照; ●——X线; ▲——中子,照射后20小时。
*——对照; ○——X线; △——中子,照射后54小时。
□——对照; ■——X线; ▼——中子,照射后72小时

2. 受照射淋巴细胞的转化

(1) 形态学分析。在X线和中子照射后30~72小时的不同时间内,经过固定和染色的细胞标本作淋巴细胞转化的形态学分析表明,虽然转化细胞总是占有高的比例(图2),但与对照组相比,细胞的收获数明显减少。这些结果同Braeman和Moore的

报导似乎相矛盾。然而,由于死亡的和固缩的细胞在本实验所用的采集方法中可能被丢失。因此对转化细胞的比例进行了调整,在调整时已考虑到非转化的细胞的死亡(假定它们遵循图1所示的相同方式)。

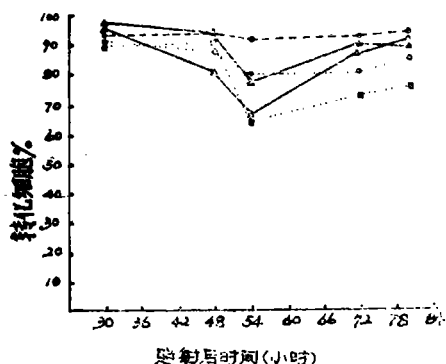


图2 转化细胞的形态学分析

●——对照; ○——2.5戈瑞X线; ■——15戈瑞X线; ▲——4戈瑞中子; △——12戈瑞中子

调整后的数据见图3,转化淋巴细胞以占原初淋巴细胞培养物的百分比表示,此值与 Braeman 和 Moore 的结果非常一致,图中也列出了他们用X线所得到的结果。

X线和中子照射后看到了双相反应(图3)。由对X线和中子反应不敏感组份的数据所画的直线所得的外推值相似,即均为25%。用最小二乘法对剂量低于5戈瑞的X线及剂量低于2戈瑞的反应作回归

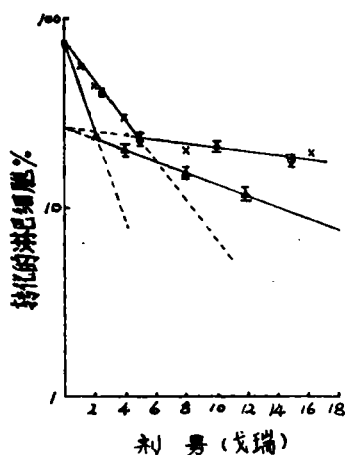


图3 已转化的细胞占淋巴细胞原培养的百分率

照射后48小时, ●——对照; ■——X线;
▲——中子; ×——Braeman和Moore
(1974)的资料

线配合,用以评价辐射敏感的组份,并对高剂量反应作相同处理以评价辐射不敏感组份。根据斜率之比值求出r.b.e.值。

对于不敏感的组份r.b.e.值为 2.46 ± 0.12 ,而敏感组份则为 2.36 ± 0.16 。因为所采用的中子剂量并不是低到足以测定敏感组份的效应,所以后者是r.b.e.值的下限。

(2) IUdR掺入的测定。在一定的剂量范围内,于照射后48和72小时,研究了体外照射对 $^{125}\text{IUdR}$ 掺入的影响。48小时是测得的 $^{125}\text{IUdR}$ 掺入量为最小的时间,6小时的脉冲标记能达到第一个细胞周期的S/G₂分界。72小时接近于最大的掺入时间,许多细胞将处于第二个S期。

图4(a)和(b)表明,在42~48小时和66~72小时掺入培养物的IUdR随照射剂量的增加而减少,但在较后时间更明显。X线和中子照射后,上

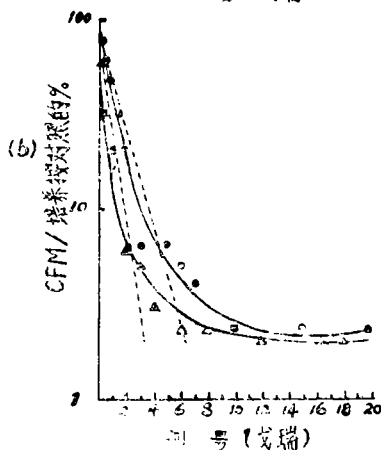
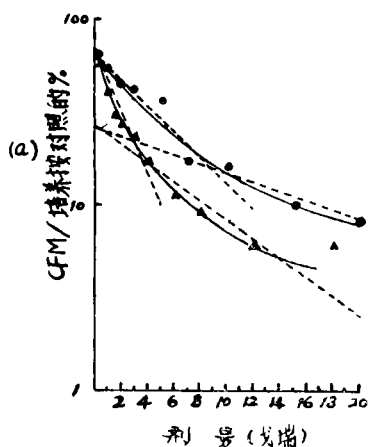


图4 IUdR掺入转化的淋巴细胞

(a)照射后48小时; (b)照射后72小时;
●——X线; ▲——中子

述两个时间的结果都显示出双相应。有一个非常敏感的组份,在用低剂量照射时,DNA合成就显著下降,还有一个较不敏感的组份,在48小时它占IUdR掺入的20%,而72小时则不到10%。这表明刺激后进入第一次分裂的细胞很少持续到第二次分裂,但似乎有一个少量而富有抗性的细胞“尾巴”(tail),它不受本实验所用辐射剂量的影响。

敏感组份在48小时的r.b.e.值为 2.44 ± 0.29 ,不敏感组份为 2.07 ± 0.45 。72小时的r.b.e.值为 1.95 ± 0.21 。

(3) 细胞进程。未受照射的细胞和用中子照射的细胞于培养后48小时和72小时, ^3H -胸腺嘧啶核苷的摄取如图5(a)(b)所示。在这两个时间里,未受

照射和受照射细胞内的粒子计数没有差异,表明在照射过的淋巴细胞的培养物中, ^{125}I UdR摄取的减少是由于处于合成期的细胞数量的下降,而不是转化细胞DNA合成水平的下降。Rickinson和Libery在用 ^{60}Co γ 线照射的细胞也观察到类似的结果。

讨 论

固缩细胞的计数结果表明。未经PHA刺激的人体淋巴细胞有高度的辐射敏感性,正如在X线照射后许多作者观察的一样,在中子照射后也能看到。Schrek描述了一种用非常高剂量的X线照射后,按照不同形式发生的间期死亡,他认为这是由于细胞质受损所致。在本实验采用的X线和中子剂量下,没有观察到这种类型的死亡。我们所得到的低r.b.e.值和Geraci等使用华盛顿大学的回旋加速器产生8百万电子伏中子体外照射未经刺激的大鼠胸腺细胞用标记方法所分析的细胞死亡的观察结果相类似。其r.b.e.值和未经PHA刺激的淋巴样细胞致死所见值相近似,可能部份地反映了未受刺激的淋巴细胞缺乏修复亚致死损伤的能力。众所周知,与造血系统损伤有关的试验恒定地出现较低的r.b.e.值以及较低的修复亚致死损伤的能力。Jackson等已报导的结果证明,未经刺激的大鼠胸腺细胞在X线离体照射后缺乏修复损伤的能力。

从未受刺激的和已转化的淋巴细胞得出的结论表明,至少存在两类放射敏感性不同的淋巴细胞亚群,这和许多作者所见一致。Prosser用排斥染料法在体外分别研究了未受刺激的T和B细胞的活存率,发现在1000拉德X线照射后96小时,这两类细胞中均有活存的细胞存在。他认为,在未受刺激的淋巴细胞中所见的放射敏感性不同的细胞群,在T和B淋巴细胞中均能发现。他还指出,T和B淋巴细胞反应的时间过程是不同的,T细胞在照射后具有活存较长时间的能力。

随着有效地分离淋巴细胞亚群的技术的出现,已证明PHA是胸腺源淋巴细胞(T细胞)的有丝分裂原,而B细胞却不能转化。人们曾指出,转化有助于保护淋巴细胞免于照射后死亡,这主要是保护T细胞而不是B细胞。不管这种情况是否存在,有证据表明转化的T和B细胞的辐射敏感性是不同的。Michalowski已证明,虽然在单独培养中B细胞并不能被PHA转化,但在T和B细胞混合培养中大概是能转化的,这可能是T细胞具有营养性特点所致。因此,认为淋巴细胞的双相反应曲线主要是

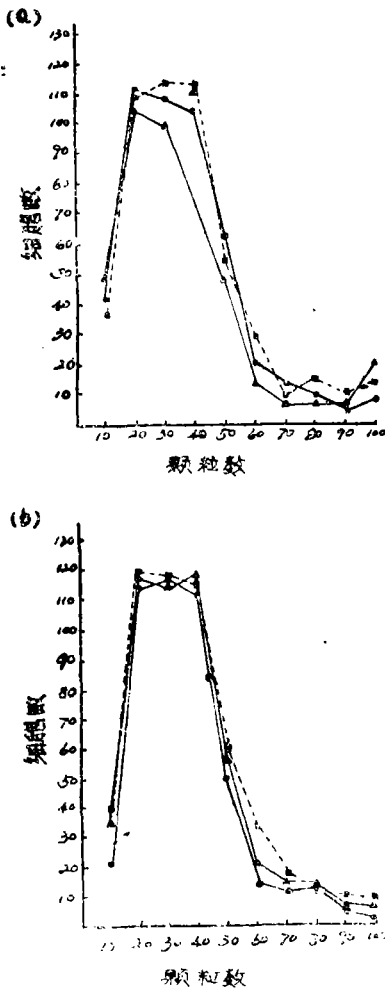


图5 用 ^3H -胸腺嘧啶核苷脉冲标记的培养物中颗粒数量的分布

(a) 照射后48小时; (b) 照射后72小时 ■——未受照射的对照组; ▲——5戈瑞中子; ●——10戈瑞中子

反映了T和B淋巴细胞之间的差异的看法,未免过于简单化了。

淋巴细胞对X线敏感性的差异,在中子照射后也可看到。这种未受到刺激的淋巴细胞对X线和中子的反应是相同的。敏感和不敏感组份的r.b.e.值均为1。受过刺激的细胞群对X线和中子的反应表现出一定差异。X线或中子照射后,用摄取 ^{125}I UdR来估测转化。得出照后48小时的r.b.e.值为2.0~2.4,照后72小时则大约为2。有趣的是,从不同的淋巴细胞亚群(无论是转化了的还是未转化的)的损伤所得到的r.b.e.值都是相同的。

用淋巴细胞非稳定性畸变来估测的从Hammer-smith回旋加速器产生的中子相对于 ^{60}Co γ线的r.b.e.,在2戈瑞~0.27戈瑞的剂量范围内为4.7~23。这些值比我们未转化的淋巴细胞致死所估测的为大,且减少了转化指数。这意味着,在任一剂量下,X线或中子照射后淋巴细胞群细胞空虚的程度

是相等的(即细胞致死的r.b.e.为1),在这种情况下测定染色体的异常,中子的r.b.e.为4.7~23。但是,如果在染色体损伤水平相似条件下测定r.b.e.时,X线照射后存活下来的淋巴细胞占原有细胞数的比例将比同剂量的中子要小得多。如果这种损伤导致淋巴细胞死亡,或者转化作用的抑制以任何方式与引起染色体异常有关的话,就可能造成对从染色体畸变率来估算r.b.e.的误差。

只要淋巴细胞在体内的反应和在体外相同,我们就可以预期,处于血液循环中的淋巴细胞损伤的r.b.e.值是比较小。淋巴细胞致死的r.b.e.值为1和转化的r.b.e.值为2,比其它许多组织细胞所见的值要低,特别在低剂量时尤其如此。因此,很可能白细胞数的减少和随之而来的免疫反应的丧失,并不是限制中子治疗剂量的一个主要因素。

(Hedges MJ等: Int J Radiat Biol 33(3) : 291~300, 1978 (英文)曹和姪 陈顺乐译 徐承熊校)

二丁酰环腺苷一磷酸对小鼠肿瘤和正常组织辐射敏感性的影响

Sutherland及其同事于1958年发现环腺苷一磷酸(cAMP),此后不久又发现了腺苷酸环化酶。激活腺苷酸环化酶或抑制cAMP磷酸二酯酶的制剂能增高细胞cAMP的水平。影响细胞辐射敏感性的制剂,已知有前列腺素 E_1 和Ro-20-1724 [4-(3-丁氧基-4-甲氧苄基)-2-咪唑二酮],它们使细胞cAMP增高,其原因有二,一是刺激了腺苷酸环化酶,二是抑制了磷酸二酯酶。前列腺素 E_1 和Ro-20-1724于照射前加到CHO(中国田鼠卵巢)细胞中,增加了照射细胞的存活。

Scaife用增高细胞cAMP的化合物处理同步的人肾T细胞,观察到被照射细胞的分裂加速,并使X线引起的有丝分裂延迟减少。同样,Boynton和Evans证明了在照射前注射茶碱咖啡碱或二丁酰cAMP缩短了S-180腹水癌细胞的有丝分裂抑制期。

Lehnert证明cAMP磷酸二酯酶抑制剂二甲基氨基利血平(DL-152),照射前45分钟按80毫克/公斤给予时,小鼠全身照射的平均致死剂量从1150拉德增至1600拉德。V-79细胞,在照射期间细胞cAMP增高时,发现存活曲线的肩宽增加,曲线指数部分的斜率降低。发现相同类型的细胞亚致死损伤的

修复是由于细胞cAMP水平增高。

本文目的是比较照射前腹腔注射二丁酰cAMP对增生毛囊、小肠、肺纤维肉瘤显微转移(micrometastases)的辐射敏感性以及对两种不同乳腺癌的TCD $_{50}$ 的影响。

材料和方法

小鼠,实验用动物为无特殊病原的3月龄雄性和雌性的C $_3$ Hf/BU小鼠。

毛存活试验:于照射前3天,在麻醉下(60毫克/公斤戊巴比妥钠)拔掉右后小腿和大腿的毛。腹腔注射二丁酰cAMP(30毫克/公斤),随后用Piker X线机照射增生毛囊,照射条件是50千伏峰值,36毫安,1.6毫米铝滤过板。照射后第17天,小腿和大腿剃毛后20~24小时,给每只动物的3个区域照相,每个区域约2平方毫米,由照片计数活存的毛。

空肠隐窝干细胞存活试验:用Withers和El-kind的方法。简言之,照射前4小时给动物腹腔注射和不注射二丁酰cAMP(30毫克/公斤),然后全身照射。每组5只小鼠,装在有机玻璃盒中进行γ线照射, ^{137}Ba 源距体中心28厘米,剂量率260拉德/