

· 基础研究 ·

低剂量辐射对脐血 T 淋巴细胞膜分子表达的影响

刘长安 杨光 贾廷珍 管增伟 张玲

北京大学第三临床医学院肿瘤治疗中心(北京, 100083)

【摘要】 目的 探讨低剂量辐射对人脐血 T 淋巴细胞膜分子表达的影响。方法 62mGy γ 射线照射新鲜分离的脐血淋巴细胞, 照射前及照射后 4h、12h、24h 采用单克隆抗体直接免疫荧光标记流式细胞术检测 TCR、CD₃、CD₄、CD₈ 分子的表达。结果 低剂量辐射后, 脐血淋巴细胞 CD₃、TCR/CD₃ 复合物、CD₄、CD₈ 分子表达显著上调, 且均在 4h ~ 24h 内随时间推移而逐步增强; CD₄/CD₈ 比值无显著性变化。结论 低剂量辐射可促进脐血 T 淋巴细胞的成熟、活化和信号的转导, 从而可能在脐血移植中加速免疫功能重建, 增强移植抗白血病反应(GVL), 降低肿瘤的复发率。

【关键词】 脐血 T 淋巴细胞 膜分子 低剂量辐射 脐血移植

Effect of low dose irradiation on expression of membrane molecules of T lymphocytes from cord blood Liu Chang'an, Yang Guang, Jia Tingzhen, et al. Peking University Third Hospital, Beijing, 100083

【Abstract】 Objective To study the expression of membrane molecules of T lymphocytes of cord blood after low dose irradiation(LDI). Methods Freshly isolated lymphocytes from cord blood were irradiated with 62mGy gamma-ray. At different time(4h; 12h; 24h) after irradiation, the changes of TCR⁺, CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺ cells were examined by flow cytometry with direct immunofluorescence, respectively. Results The proportion of CD₃⁺, TCR⁺/CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺ cells increased significantly after LDI, the most obvious enhancement was noted in the 24h experimental group. There were no significant changes in the ratio of CD₄ to CD₈. Conclusions It is suggested that expedition of the maturation, activation and signal transduction of T lymphocytes from cord blood can be induced by irradiation with 62mGy gamma-ray. The reconstruction of immune functions after cord blood transplantation may be accelerated, enhancing the graft versus leukemia(GVL) effect and preventing the tumor from relapsing.

【Key words】 Cord blood T lymphocytes Membrane molecule Low dose irradiation Cord blood transplantation

脐带血 T 淋巴细胞发育幼稚, 使脐带血造血干细胞移植中移植抗宿主病(GVHD)发生率较低, 同时伴随移植抗白血病反应(GVL)减退, 免疫重建缓慢, 恶性肿瘤在脐血移植后 2 年内复发率高达 60%^[1,2]。大量研究证明, 低剂量辐射(LDI)对机体和细胞具有免疫兴奋效应^[3-5]。我们以低剂量 γ 射线照射新鲜分离的脐带血淋巴细胞, 应用流式细胞技术观察照射后淋巴细胞 TCR、CD₃、CD₄、CD₈ 等膜分子表达的变化, 以探讨低剂量辐射免疫兴奋效应用于脐血移植的可能性。

材料与方法

1. 主要试剂: 藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗人 TCR_{VP6} 单克隆抗体(MoAb), 异硫氰酸荧光素(FTTC)

标记的小鼠抗人 CD₃ MoAb, PE-人 CD₄ MoAb, FITC-人 CD₈ MoAb(以上均为 Ancell 产品)。分别以 FITC 和 PE 标记的小鼠 IgG₁ MoAb(Pharmingen 公司)。

2. 脐带血采集及单个核细胞(MNC)分离: 无菌条件下穿刺脐静脉采集 37-42 周龄足月正常分娩的新生儿脐带血, 体外肝素抗凝(20IU/ml)。采血 6 小时内应用常规密度梯度离心法分离 MNC, RPMI 1640 培养液(Hyclone)洗涤 2 次, 最后加入含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液, 计数并调整细胞浓度为 1×10^6 /ml。

3. 照射与细胞培养: 采用 GammaCell 1000 数控细胞照射仪(MDS Nordion, 加拿大)体外照射新鲜分离的脐血 MNC 细胞, 为 ¹³⁷ 铯(¹³⁷ Cs)源, 其总放射性活度为 24.05TBq。总吸收剂量为 62mGy, 吸收剂量

率 3.72Gy/min。照射后于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。照前及照后 4h, 12h, 24h 分别进行 TCR、CD₃、CD₄、CD₈ 检测, 并用台盼蓝拒染法检查细胞存活率。

4. TCR、CD₃、CD₄、CD₈ 测定: ①直接免疫荧光抗体标记: 调整细胞浓度为 1 × 10⁷/ml, 各取细胞悬液 100μl 加入 3 支试管。第 1 管加入 PE-人 TCR_{γβ} MoAb(1:10 稀释)、FITC-人 CD₃ MoAb(1:50 稀释) 各 80μl; 第 2 管加入 PE-人 CD₄ MoAb(1:50 稀释)、FITC-人 CD₈ MoAb(1:50 稀释) 各 80μl; 第 3 管加入以 FITC 及 PE 标记的小鼠 IgG₁ MoAb 各 20μl 作为非特异对照。4℃避光孵育 45min。PH7.4 的 PBS 洗涤 3 次。加入固定液^[6] 1ml, 混匀后置 4℃避光保存待测。②流式细胞仪检测: 采用 FACScan 型流式细胞仪 (Becton-Dickinson, USA), 激发光源为 15mW 氩离子激光, 波长 488nm, 检测前先以标准微球校准仪器, 使变异系数在 2% 以内。采用双参数模式, 设定淋巴细胞“门”(gate), 每份样品收集“门”内细胞 1 × 10⁴ 个。用 CellQuest 软件分析处理数据。

5. 统计学处理: 所有变量均表示为 $\bar{x} \pm s$, 以配对设计 t 检验进行统计处理。

结 果

1. 细胞存活率: 受照前后脐血 MNC 存活率均大于 98%, 组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2. 62mGy γ 射线照射对脐血淋巴细胞 TCR/CD₃ 表达的影响: 照射后 CD₃、TCR/CD₃ 复合物的表达均显著增加, 且均在 4h ~ 24h 内随时间推移而逐步增幅, PE 标记的 TCR_{γβ} 均与 FITC 标记的 CD₃ 分子共表达。见表 1。

表 1 62mGy γ 射线照射对脐血淋巴细胞 TCR/CD₃ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

照后时间	n	CD ₃ 阳性细胞	TCR _{γβ} /CD ₃
照射前	8	39.56 ± 8.46	1.68 ± 0.29
4h	8	41.95 ± 7.66**	1.89 ± 0.50
12h	8	48.32 ± 7.30***△△	2.54 ± 0.52***△
24h	8	52.49 ± 8.39***△△△	3.80 ± 1.37***△△△

注: 与照前相比, ** $P < 0.01$; 与照后 4h 比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与照后 12h 相比, *** $P < 0.01$ 。

3. 62mGy γ 射线照射对脐血淋巴细胞 CD₄、CD₈ 分子表达的影响: 照射后 CD₄、CD₈ 分子表达显著上调, 且在 4h ~ 24h 内随时间推移而逐步增幅, CD₄ 分子表达开始增强的时间晚于 CD₈, 照射前后各组 CD₄/CD₈ 比值无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 62mGy γ 射线照射对脐血淋巴细胞 CD₄、CD₈ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

照后时间	n	CD ₄ 阳性细胞 (%)	CD ₈ 阳性细胞 (%)	CD ₄ /CD ₈
照射前	8	29.40 ± 7.51	11.34 ± 7.17	3.90 ± 2.65
4h	8	31.34 ± 6.99	12.64 ± 6.34**	3.10 ± 1.53
12h	8	33.31 ± 9.07**	13.83 ± 7.86***△	3.15 ± 1.72
24h	8	33.78 ± 8.84***△△	15.24 ± 8.13***△△△	3.06 ± 1.75

注: 与照前相比, ** $P < 0.01$; 与照后 4h 比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与照后 12h 相比, *** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ 。

讨 论

自 1989 年首例脐血造血干细胞移植治疗 Fanconi 贫血患儿获得成功以来, 脐血移植已在世界范围广泛用于恶性肿瘤、白血病、遗传性疾病及放射病的治疗, 初步显现出广阔的应用前景。纽约血液中心 1992 年 8 月至 1998 年 1 月即为 562 例患者施行了异基因脐血移植^[7]。我国北京、广州、济南等城市也建立了初具规模的脐血库, 已有脐血移植成功的报道。脐血移植的优点在于: 来源易得, 采集简便, 对供者无损伤; 相对纯净; 造血干/祖细胞含量丰富, 其中 CD₃₄⁺CD₃₈⁻ 细胞亚群比例高于成人骨髓; 移植抗宿主病 (GVHD) 发生率及严重程度均较低; 脐血造血干/祖细胞对某些细胞因子联合作用敏感, 体外扩增能力强。但是, 由于脐血造血祖细胞分化不足, 所含数量不多的 T 淋巴细胞发育幼稚, 缺乏成熟的 T 淋巴细胞应有的支持造血重建的功能, 造成脐血移植植入慢, 免疫重建慢, GVHD 较低的同时伴随其 GVL 减退, 肿瘤的复发率高等缺点^[1,2], 成为制约脐血移植疗效的主要因素之一。GVL 机制不明, 移植中的 T 淋巴细胞和 NK 细胞可能与其发生有关^[8], 而脐血移植后的恶性病复发不可能用同供者淋巴细胞输注 (donor lymphocyte infusions, DLI) 进行治疗。

剂量在 0.2Gy 以内的低 LET (传能线密度) 辐射或 0.05Gy 以内的高 LET 辐射被认为是低剂量辐射^[3]。大量的人群流行病学调查和实验室研究已经证实: 低剂量辐射具有免疫增强效应^[3-5]。为初步探讨低剂量辐射免疫兴奋效应用于脐血移植的可能性, 我们应用低剂量 γ 射线照射新鲜分离的脐血淋巴细胞, 观察 T 淋巴细胞细胞膜分子表达的变化, 结果表明: 照射后 CD₃、CD₄、CD₈ 及 TCR/CD₃ 复合物等 T 细胞膜分子表达显著增强, 均在 4h ~ 24h 内随时间推移而逐步增幅; CD₄/CD₈ 比值在照射前后无显著差异。CD₃ 是 T 细胞的重要分子, TCR 是 T 细胞特有的表面标志。TCR/CD₃ 复合物是 T 细胞识别

抗原和转导信号的主要单位。LDI 后 TCR/CD₃ 的表达上调一方面是脐血 T 淋巴细胞成熟加快的标志, 另一方面是 T 细胞对抗原及丝裂原反应增强, 向细胞内传递信号加快的基础^[5,9]。CD₄ 和 CD₈ 分子属 T 细胞辅助受体 (co-receptor), 分别与 MHC II/I 类分子相结合, 既加强了 T 细胞与 APC (抗原呈递细胞) 或靶细胞的相互作用, 又参与了抗原刺激 TCR/CD₃ 信号转导过程。LDI 后 CD₄、CD₈ 分子表达上调表明 CD₄⁺ 细胞亚群及 CD₈⁺ 细胞亚群比例增加, T 细胞发育成熟、分化及信号转导加快。CD₄ 分子表达增强开始时间晚于 CD₈ 分子, CD₈⁺ 细胞对 LDI 敏感性可能高于 CD₄⁺ 细胞^[4]。LDI 后 CD₄/CD₈ 比值无显著变化, 与文献报道一致^[5,10], 同样不支持 LDI 引起 Th/Ts 比值上升的假说。

T 淋巴细胞表型与其功能是相一致的^[9], 因此脐血淋巴细胞受低剂量辐射后膜分子 CD₃、TCR/CD₃ 复合物、CD₄、CD₈ 表达上调可间接提示其 T 淋巴细胞成熟、活化及信号转导的加快, 免疫功能趋于成熟。上述结果提示, 脐血移植中以下策略也许是值得考虑的: 一份脐带血, 一部分冻存, 另一部分联合采用免疫磁珠分离法及流式细胞仪富集纯化 CD₃₄⁺ 细胞体外大量扩增造血祖细胞, 淋巴细胞接受 LDI, 有控制地诱导部分 T 淋巴细胞发育成熟, 然后混合输注。这样做, 既避免了干细胞在培养中的过多丢失, 又在培养中使造血祖细胞和 T 淋巴细胞得

到扩增和发育, 从而发挥 T 淋巴细胞支持造血重建的调控作用, 促进造血干细胞植入和免疫重建, 增强 GVL 效应, 降低肿瘤的复发率, 改善脐血移植的临床疗效。有必要对低剂量辐射在脐血移植中的应用价值进行深入探讨。

参考文献

- 唐佩弦. 当前造血干细胞研究面临的挑战. 中国实验血液学杂志, 2000, 8: 1-4.
- 贾廷珍, 克晓燕. 脐血在放射病临床应用中的前景. 中华放射医学与防护杂志, 1998, 18: 330-333.
- 刘树铮. 低水平辐射兴奋效应研究进展. 国外医学放射医学核医学分册, 1996, 20: 219-223.
- 苏康原, 著. 淋巴细胞及其辐射效应. 北京: 原子能出版社, 2000. 112-168.
- 苏旭, 张迎春, 万虹, 等. 低剂量辐射对小鼠胸腺细胞成熟、分化、凋亡和激活的影响. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17(3): 162-165.
- 刘长安, 贾廷珍. 脐血 CD₃₄⁺ 造血干/祖细胞含量的研究. 中国工业医学杂志, 1999, 12: 90-91.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med, 1998, 339: 1565-77.
- Apperley JF, Gluckman E, Gratwohl A, Eds. Blood and Marrow Transplantation, Revised edition. Paris: European School of Haematology, 2000. 210-211.
- 陈慰峰. 医学免疫学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 89-97.
- 刘树铮. 低水平辐射诱导免疫系统兴奋效应的研究现状. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15: 217-221.

(上接第 119 页)

卵管峡部, 电凝切断, 单极电凝钳夹右卵巢固有韧带, 电凝切断。从脐下切口取出切除组织, 快速冰冻病理检查示良性肿瘤。遂以生理盐水、低分子右旋糖酐冲洗腹腔, 4 号丝线连续缝合脐下切口处腹膜, 分层关腹, 结束手术。手术历时 4 小时, 术中失血约 120ml, 尿量 800ml。术后病理: (右) 卵巢浆液性囊腺瘤, 同侧输卵管未见异管。术后一天拔尿管, 术后第二天肛门排气, 术后 3 天痊愈出院。

讨论: 妇科腹腔镜手术由于切口小、损伤小、恢复快而日益受到广大患者和妇科医生的欢迎, 但对于卵巢的巨大肿块通常仍采用开腹探查术。本病例虽然为巨大卵巢肿瘤, 但根据其病史长、肿瘤标志物正常、B 超为囊壁光滑的卵巢囊肿, 无泌尿道和消化道的侵犯变形等特点, 初步判断卵巢良性肿瘤的可能性大, 因而选择腹腔镜手术治疗。常规腹腔镜是

在未直视腹腔的情况下, 从腹壁插入气腹针, 充气后, 再插入套管针进镜观察腹腔的情况。对于本例如此巨大的卵巢囊肿, 如果用传统闭合式套管针穿刺, 势必造成囊肿破裂, 囊液流入腹腔, 从而为肿瘤的种植和扩散埋下祸根。因此我们采用了开放式腹腔镜手术, 即先在腹壁纵行小切口达腹腔, 用细针穿刺证实囊液清亮后, 再予气腹针穿刺放液。这样既达到了缩小肿瘤体积, 为腹腔镜手术创造条件, 又避免了囊肿破裂、肿瘤种植和扩散。可见, 只要病例选择合适, 手术方法应用得当, 一部分巨大卵巢囊肿患者仍可选用腹腔镜手术治疗。需要指出的是, 手术一定要采用纵形小切口, 一旦怀疑为恶性肿瘤, 应及时改为开腹手术, 并按恶性肿瘤的治疗原则进行治疗。另外, 囊肿穿刺时应选择囊肿较高点穿刺抽吸, 并应尽量避免溢入腹腔。如有溢出应尽量冲、吸干净。