DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.001

电离辐射致人T淋巴细胞CD_3抗原表达的改变

论著

闵 锐* 程天民 罗成基 孟祥顺** 丁振海** 杨如俊** 陈 杞** (第三军医大学预防医学系防原医学教研室,630038)

提 要 用流式细胞仪、免疫细胞化学和免疫透射电镜方法,分析研究不同剂量γ线体外照射人外周血T淋巴细胞后,不同时间细胞表面CD_3抗原的表达和分布。发现随照射剂量增加,CD_3阳性细胞百分率减少,同一照射剂量随照后时间延长,CD_3阳性细胞百分率缓慢增加。受照细胞胞浆内游离CD_3随照射剂量增加而增多,并于浆内出现CD_3-SPA-胶体金颗粒(未照射细胞只见于细胞表面,全未见于浆内)。CD_3、CD_4双阳性流式细胞仪分析的结果与CD_3单阳性分析结果基本一致,同时发现CD_3、CD_4双阴性细胞随受照剂量增加而增多,随照后时间延长而减少。

关键词 辐射,电离;T-淋巴细胞;抗原表达
中图法分类号 R818.02;R392.11

T细胞分化抗原决定簇3(CD_3)是T淋巴细胞表面重要分化抗原之一。近来发现,成熟T淋巴细胞表面CD_3与T细胞抗原受体(TCR)以非共价键构成复合物,共同承担T细胞识别、结合抗原、传递抗原刺激信号的任务[1~2]。研究表明,成熟T细胞表面功能抗原的数量和活性关系到T细胞的活化及功能[3]。而电离辐射可以从多途径,多方面影响细胞表面抗原及受体的表达和活性[4],对这些方面进行研究对于探讨辐射致T细胞功能损伤的机制十分有益。

1 材料与方法

1.1 细胞收集、照射与培养

常规方法分离健康青年男性(21~24岁)外周血单个核细胞(PBMC),洗涤后用含10%小牛血清的RPMI1640(Gibico)培养液调整细胞计数为4×10^6/ml,加入24孔培养板内,医用^{60}Co放射治疗机(EYC-50H,上海)室温(22±3℃)条件下照射。照射剂量为1、2、4和6 Gy,照射量率为9.3 mG/s。4℃条件下收集受照细胞,调整细胞浓度为2×10^6/ml,24孔培养板内,终浓度50 μg/ml的PHA(广州医药工业公司),1 000 u/ml的重组IL-2(第二军医大学分子生物学教研室),37℃,5% CO_2饱和湿度条件下培养,每3天换液1次,根据实验需要,于不同时间取用细胞。

1.2 流式细胞仪分析样本制备

培养细胞用Hanks液洗涤后,调整细胞悬液体积约20 μl,加入等量饱和浓度的抗人T淋巴细胞CD_3抗原单克隆抗体(上海长海医院免疫室沈茜博士提供),同时加入鼠IgG作为阴性对照。混匀,4℃作用45~60 min。Hanks液洗2次。加入1∶50稀释的FITC标记二抗(Sigma),4℃作用45~60 min,Hanks液洗3次,细胞悬液约200~300 μl用于流式细胞仪CD_3单阳性细胞百分率分析。细胞处理同前,加入约20 μl抗人T细胞CD_3-FITC/抗人T细胞CD_4-EP双标记单克隆抗体(Becton Dickinson Co. USA),同时加入豚鼠IgG_1-FITC/IgG_1-EP双标抗体作为阴性对照,4℃作用45~60 min,PBS(pH7.2)洗3次,定容至200 μl用于CD_3、CD_4双阳性细胞百分率分析。流式细胞分析仪分别为美国Coulter公司EPICS-V和Becton-Dickinson公司FACStar,计数5 000以上个细胞,计算相对阳性细胞百分率。

1.3 免疫细胞化学分析

细胞涂片经含7%福尔马林,12%丙酮的PB液固定1~2 min,自来水冲洗后晾干。点加1∶50稀释的抗人T细胞CD_3单抗,4℃湿盒过夜。载玻片在PBS缸内漂洗2~3次,晾干。加入1∶200稀释的生物素标记二抗(用前新配),37℃作用40 min,PBS漂洗3次,晾干。加入ABC复合物(Avidin-Biotin Complex),37℃ 45 min,PBS洗3次。加DAB(3,3′-氨基联苯胺)-H_2O_2混合液显色,镜下控制显色时间,蒸馏水冲洗终止显色,苏木精衬染后封片镜检。同样染色条件,一抗用鼠IgG代替作为阴性对照。

1.4 免疫胶体金透射电镜分析

细胞用0.1 mol/L二甲砷酸钠(pH7.4)洗1次,1%戊二醛微波固定3~4 s,二甲砷酸钠洗3次。加入抗人T细胞CD_3单克隆抗体(1∶50),37℃振荡孵育1 h,二甲砷酸钠洗1次,加入胶体金-SPA(葡萄球菌A蛋白)振荡孵育1 h,洗3次,凝块,常规包埋,定位切片后,日立H-8000型透射电镜镜检。

* 现在第二军医大学工作
** 第二军医大学放射医学研究室,上海 200433

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 CD_3 阳性及 CD_3、CD_4 双阳性细胞分析结果

细胞经1～6Gy γ线照射后不同时间，CD_3阳性细胞百分率发生不同变化。受照立即，CD_3阳性细胞百分率随照射剂量增加变化并不十分明显。然而，受照细胞在体外培养4 d后，CD_3阳性细胞百分率明显呈照射剂量依赖性下降。同一照射剂量，随照后细胞培养时间延长，CD_3阳性细胞百分率增加，增加程度反比于受照剂量。CD_3、CD_4双阳性细胞分析结果与CD_3单阳性细胞的分析结果相吻合，同时可见CD_3、CD_4双阴性细胞数随照射剂量增加而增加，同一照射剂量，随照后细胞培养时间延长而减少。结果见附表，图1。

附表 T细胞离体照射后 CD_3(单色)和 CD_3、CD_4(双色)阳性细胞百分率

Tab Positive cell percentage of CD_3(singal color) and CD_3, CD_4(double color) analysis after T cells irradiated *in vitro*

Mark	Postradiation Time	Radiation Dose (Gy)				
		0	1	2	4	6
CD_3^+ ($n=3$) ($\bar{p}\pm S_{\bar{p}}$)	Imediate	69.2±19.2	68.6±9.7	68.4± 5.3	64.6± 7.9	62.7± 4.1
	Day 4	71.7±11.1	50.3±8.4	43.0±17.3	39.9± 6.5	30.1±13.8
	Day 8	81.1± 5.6	56.8±7.5	48.9± 7.6	41.2± 8.8	75.4±10.1
	Day 14	91.3± 7.4	68.6±5.6	54.7± 8.3	35.5±11.2	38.3± 9.0
$CD_3^+CD_4^+$	Imediate	51.1		46.2	44.5	44.4
	Day 7	54.6	50.8	48.7	51.0	
	Day 14	74.1	66.7	67.0	55.5	
$CD_3^+CD_4^-$	Imediate	26.3		31.9	32.2	33.5
	Day 7	16.4	17.8	18.8	17.9	
	Day 14	1.6	5.5	7.4	14.0	

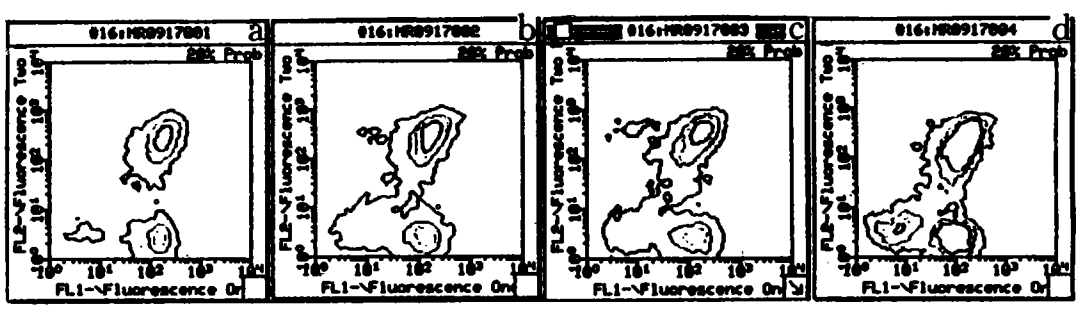


图1 离体T细胞受2、4、6 Gy(分别为图b、c、d，图a为对照)照射后14 d，流式细胞仪双色标记(CD_3-FITC、CD_4-EP)直接免疫荧光法测定结果

Fig 1 Maps of flowcytometer two colour analysis of CD_3-FITC (cross axle/CD_4-EP (vertical alxe) at 14 days after T cells were uradiated by 0(a), 2(b), 4(c) and 6(d) Gy γ rays

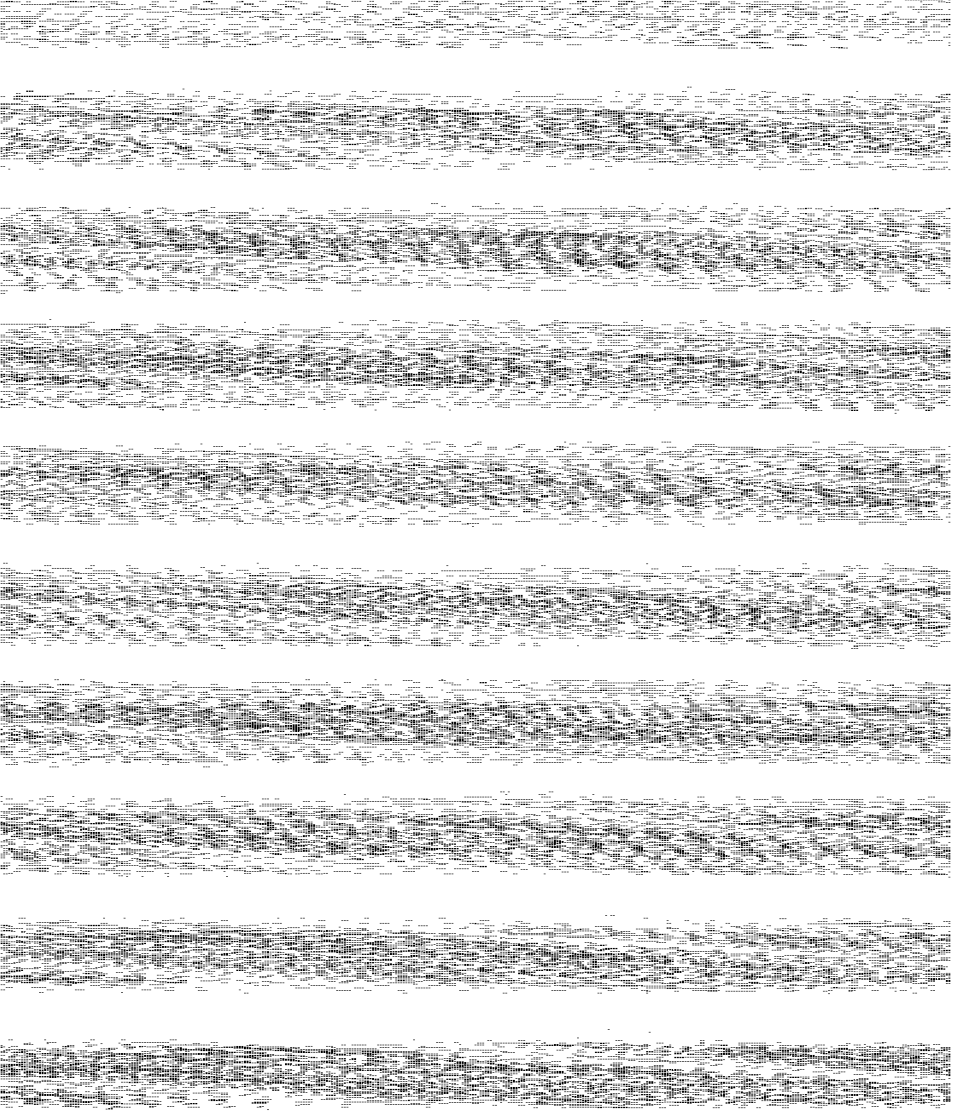
2.2 受照细胞免疫细胞化学分析结果

与CD_3阳性细胞分析同步取样涂片，用ABC(Avidin-Biotin Complex)免疫细胞化学分析方法分析表达CD_3在受照细胞内的分布。照后4 d，胞浆内即可见CD_3阳性染色，随照射剂量增大，胞浆内CD_3阳性染色的细胞数增多，照后8～12 d，可见大量CD_3阳性染色出现在受照细胞胞浆内。同一染色条件，阴性对照样本细胞胞浆内未见CD_3阳性染色信号，见图2。

2.3 免疫胶体金透射电镜分析结果

以SPA(葡萄球菌A蛋白)联接的胶体作为显示剂，常规免疫透射电镜分析方法用来进一步检测细胞受不同剂量照射后体外培养一定时间，CD_3抗原在细胞内的分布。结果可见，未照射对照细胞CD_3抗原仅出现在细胞表面，浆内全无，而不同剂量照射细胞浆内均可见了不同程度的CD_3-SPA-胶金颗粒，并随照射剂量增大而增多，见图3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

究中，已经发现细胞免疫功能缺陷患儿外周血T细胞TCR/CD_3复合物量明显低于正常，而在体外实验中发现将TCR基因转入TCR表达缺陷，CD_3阴性的突变细胞株，该细胞不仅TCR和CD_3都恢复正常表达，而且对抗原刺激的反应也随之恢复[8~9]。这些结果表明，在TCR/CD_3的表达和介导T细胞抗原刺激反应的功能上，CD_3与TCR是相互影响的，TCR表达的缺乏或缺陷可造成细胞表面CD_3抗原量的减少，反之亦然。

大剂量电离辐射是非常强的哺乳类细胞致畸致伤因子，射线的作用可发生在胞膜、胞浆和胞核。类似CD_3一类的T细胞表现功能相关抗原和受体，无论是在基因阶段还是表达蛋白阶段都对辐射十分敏感，电离辐射的直接或间接作用都可能在不同层次和水平影响T细胞表面抗原及受体的表达和活性，继而造成T细胞功能的损害。本研究发现T细胞表面CD_3抗原随照射剂量增加明显减少，同时发现受照细胞胞浆内CD_3抗原量随照射剂量增加而增多，这两者之间似乎存在一定联系。细胞表面CD_3数量的减少一方面与射线对CD_3分子的直接破坏损伤有关，另方面亦可能因细胞照射后TCR的损伤和缺陷导致不能与CD_3分子在胞浆内装配成TCR/CD_3复合物，造成大量CD_3分子在胞浆堆积，而细胞表面CD_3分子却减少。我们在急性放射引起TC基因的重排（另文报道）。TCR基重排的结果必然会有TCR表达和缺失或缺陷，表明TCR的辐射损伤确与受照细胞表面CD_3分子减少有关。

参考文献

1 Allison JP, Lanier LL. Structure, function and serology of the T cell antigen receptor complex. Ann Rev Immunol, 1987,5:503

2 Clevers H, Alarcon B, Wileman T, et al. The T cell receptor/CD_3 complex: a dynamic protein ensemble. Ann Rev Immunol,1988,6:629

3 Deist FL, Thoenes G, Corado J, et al. Immunodeficiency with low expression of the T cell receptor/CD_3 complex. Effect on T lymphocyte activation. Eur J Immunol,1991,21:1641

4 夏寿萱. 分子放射生物学. 北京：原子能出版社，1992:244

5 Doskow JR, Wilkinson CD_3-γ, -δ-ε-ζ-η. T cell receptor-α and -β transcripts are independently regulated during thymocyte ontogeny and T cell activation. Immunology,1992,77:465

6 Letourneur F, Mattel M, Malissen B. The mouse CD_3-γ-δ and -ε genes reside within 50 kilobases on Chromosome 9, whereas CD_3-η maps to chromosome 1, band H. Immunogenetics,1989,29:265

7 Wegener AMK, Letournew F, Hoeveler A, et al. The T cell receptor/CD_3 complex is composed of at least two autonomous transduction modeles. Cell,1992,68:83

8 Arnaiz-Villena A, Timon M, Rodriguez-Gallego C, et al. Humman T-Cell activation deficiencies. Immunol Today, 1992,13(7):259

9 Ohashi PS, Mak Tak W, Van Den Elsn P, et al. Reconsititution of an active surface T_3/T cell antigen receptor by DNA transfer. Nature,1985,316:606

（收稿：1994-10-28；修回：1994-11-10）

The changes of CD_3 antigen expression in human T-cells resulting from ionization radiation

Min Rui, Cheng Tianmin, Luo Chengji, Meng Xiangshun, Ding Zhenghai, Yang Rujun, Chen Qi (Department of Radiation Medicine, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract Human T-cells were irradiated *in vitro* and the CD_3 antigen expression and its distribution in the irradiated cells were determined with flow cytometry, immunocytochemistry and immunoelectromicroscopy in different time intervals after exposure. It was found that CD_3 antigen expression was decreased on the cell surface but increased in the cytoplasm along with the increase of radiation dosage, the percentage of CD_3 positive cells was slowly increased and the free CD_3 in the irradiated cells were increased alogn with the increase of radiation dosage. The analytic findings of double positive cells to CD_3 and CD_4 were essentially similar to those of single positive cells to CD_3. It was also found that double negative cells to CD_3 and CD_4 were increased along with the increase of radiation dosage but decreased along the prolongation of exposure time.

Key words radiation, ionizing; T lymphocytes; antigen expression

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net