DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.01.003

5名电离辐射事故患者外周血T细胞T细胞抗原受体、T细胞分化抗原决定簇-3效应的研究

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 文中报道了5名事故性急性骨髓型放射病患者照后2.5和3.5年外周血T淋巴细胞T细胞受体(TCR)基因,TCR、T细胞分化抗原决定簇-3(CD_3)表达与TCR/CD_3复合物功能的辐射效应。发现5名患者于照后2.5年,2名(5.2 Gy和2.4 Gy,55岁)于照后3.5年外周血T细胞应答抗CD_3单抗刺激而增殖的能力尚未完全恢复;经同时用IL-2和抗CD_3单抗刺激,增殖能力比单用抗CD_3单抗刺激有所增强;后2名的外周血TCR、CD_3阳性细胞百分率一直低于正常对照和其他患者;并见一患者出现DNA重排杂交带型。本文并从TCR/CD_3在介导T细胞抗原刺激反应中的作用,电离辐射对TCR/CD_3复合物的影响,后果和意义等方面进行了讨论。

关键词 辐射,电离;辐射损伤/急性病;受体,抗原,T-细胞;抗原表达

中图法分类号 R818.71

在成熟T淋巴细胞表面,T细胞抗原受体(TCR)与T细胞分化抗原决定簇-3(CD_3)以非共价键结合成TCR/CD_3复合物,共同构成介导T细胞抗原刺激和传递刺激信号的功能单位[1]。不仅如此,在细胞间粘附、细胞因子分泌等与T细胞功能相关的活动中,TCR/CD_3复合物亦发挥十分重要的辅助和调节作用[2~3]。近年研究发现,TCR具有很高的辐射敏感性,受电离辐射的患者外周血TCR发生明显畸变,畸变频率与受照剂量成正比[4]。因此,在T淋巴细胞功能的辐射效应中,TCR/CD_3复合物是十分重要的研究对象和材料。与离体照射后T细胞功能辐射生物学效应研究相映照,本文报道一起^{60}Co辐照事故的5名急性放射病患者[5],照后3.5年外周血T细胞TCR、CD_3及TCR/CD_3在基因、表达和功能方面辐射效应的研究结果。

1 材料与方法

1.1 T细胞激活增殖功能测定

常规方法分离正常人与患者外周血单个核细胞(PBMC),调整细胞浓度为1×10^6/ml,取100 μl细胞悬液于96孔培养板内,同时加入100 μl抗人T淋巴细胞CD_3单克隆抗体(IgG_1,上海长海医院免疫室提供),设无刺激对照,三复孔 37℃ 5%CO_2饱和湿度刺激培养72 h,终止培养前6~12 h加入50 μl ^{3}H-TdR(1.8×10^4 Bq)。多头细胞收集细胞于49"玻璃纤维纸上,充分干燥,常规微量法液闪测量计数。

1.2 外周血TCR、CD_3阳性细胞百分率测定

PBMC用冷Hanks液洗1~2次,调整细胞浓度约为5×10^6/20 μl,分别加入等量饱和浓度的抗人T细胞TCR(α/β)单克隆抗体(1/100稀释)(WT.31 IgG_1,荷兰Nijmegen大学医院Tax,WTM博士提供)和1/100稀释的抗人T细胞CD_3单克隆抗体,混匀,4℃孵育45~60 min,冷Hanks液洗3次,加等量1∶50稀释的FITC标记二抗(单抗鼠Sigma)混匀,4℃孵育45~60 min,冷Hanks液洗3次,调细胞悬液体积约为200 μl。同样制备条件,一抗以鼠IgG替代作为非特异性对照。EPICS-V型流式细胞仪(美国Coulter公司)计数5 000以上个细胞,计算阳性细胞百分率。

1.3 T细胞TCR基因的Southern blot分析[6]

1.3.1 TCR基因cDNA载体质粒的扩增、DNA抽提、纯化、鉴定及^{32}P随机引物标记: 人T细胞TCR、cDNA转化质粒由加拿大Torontor大学医学生物物理系Mark,TW博士惠赠。该TCRα链cDNA探针(PY-14,Jurkat cDNA)含全部α链的V.D.J和C片段,cDNA被克隆进pUC-18质粒的EcoRI克隆位点。分别接种转化E.coli菌于氨苄抗性的琼脂半固体和液体LB培养基中克隆后扩增。扩增菌液经含1 mg/ml溶菌酶的SET液(10 mmol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA)和STET液(10 mmol/L Tris-HCl,0.1 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.5% Triton X-100,pH7.8)处理,饱和酚/氯仿(2∶1)及氯仿/异戊醇(24∶1)抽提。收获的质粒DNA上

* 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

Sepharose 4 B 层析柱，用 TN_2E（(10 mmol/L Tris-HCl，200 mol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，pH8.0)液洗脱，去除 RNA。纯化后的质粒 DNA 经 EcoRI 酶切，0.9%琼脂糖胶电泳鉴定后用于^{32}P 随机引物标记。标记盒购自美国 Bethesda Research Laboratory(BRL)，按操作说明书进行操作。Southern

1.3.2 人 PBMC 总 DNA 抽提、酶切、电泳分离及尼龙膜的 Southern 转移：10^7/ml 个 PBMC 用 TE 液(10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA，pH7.6)重悬于 Eppendoff 管中，用 0.2%的低溶点胶凝聚包被细胞，含2 mg/ml 蛋白酶 K 的裂解液，50℃消化2～3 d。用 TE 和 PMSF(苯甲基磺酰氟)液洗涤后，内切酶37℃消化8～12 h，消化后的含样本 DNA 的胶块在 1%琼脂糖凝胶，1×TBE(0.09mol/L Tris-硼酸，0.002mol/L EDTA，pH8.0)电泳液低压电泳过夜。电离分离的 DNA 胶块经变性等处理，在20×SSC(3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 枸橼酸三钠($2H_2O$))缓冲液中，利用 Southern 转移装置将 DNA 转移至尼龙膜上，经固定等处理的尼龙膜可直接用于杂交，或－40℃低温保存。

1.3.3 样本 DNA 与标记探针 cDNA 的 Southern 印迹杂交：置尼龙膜于杂交管内，加入15～20 ml预杂交液(0.5 mol/L $Na\text{-}PO_4$缓冲液，pH7.2 7%SDS，1 mmol/L EDTA，0.1 mg/ml 变性鲑精 DNA)，65℃杂交炉内预杂交4～5 h，加入经变性处理的^{32}P 标记探针，65℃杂交过夜。用含0.1%SDS 的0.1×SSC 缓冲液漂洗杂交膜至本底计数小于5次/s 为止。将杂交膜用保鲜膜包被，固定膜于增感屏上，国产 X 光－80℃压片2～7 d。

2 结果

2.1 抗 CD_3单抗刺激的 T 细胞增殖

抗 CD_3单抗可模拟抗原经由细胞表面 TCR/CD_3复合物介导激活 T 细胞。电离辐射后，细胞表面 TCR/CD_3复合物的损伤和恢复程度直接影响其介导 T 细胞抗原激活的能力，进而影响 T 细胞功能。由于辐射的损伤和破坏作用，在照后2.5年，5名患者外周血 T 细胞应答抗 CD_3单抗刺激发生增殖的能力尚未完全恢复，辐射剂量效应仍十分明显。在照后3.5年，受照剂量小的患者 T 细胞抗 CD_3单抗刺激的增殖能力恢复明显，而受照剂量为5.2 Gy(患者 A)和受照剂量仅为2.4 Gy 但照时年龄为55岁(患者 D)的两名患者，T 细胞增殖能力虽有所恢复，但仍分别只有正常对照的34%和57%。考虑到增加细胞表面刺激位点可增强T细胞的增殖能力[7]，对患者外周血T细胞同时用 IL-2＋抗 CD_3单抗两种刺激物进行刺激，结果与单一抗 CD_3单抗刺激的效果相比，患者 T 细胞的增殖能力均有不同程度的增强。见表1。

2.2 外周血 TCR/(α/β)及 CD_3阳性细胞百分率

单色间接免疫荧光分析法患者外周血 TCR 及 CD_3阳性细胞百分率的分析结果表明，在照后2.5和3.5年，患者 A 和 D 外周血 TCR、CD_3阳性细胞百分率仍低于正常对照及其他患者，其他患者(除1名数据缺乏外)在照后3.5年外周血 TCR 及 CD_3阳性细胞百分率基本恢复到正常对照范围。见表2。

表1 受照后2.5和3.5年患者外周血 T 细胞对抗-CD_3单抗的激活和增殖反应(计数/min)

Tab 1 Activiting and proliferating response to anti-CD_3 mAb for peripheral blood T cell exposed persons at 2.5 and 3.5 years respectively after radiation (counts/min)

Patients	Exposure Dose(Gy)	Age(year)	Background	Stimuli	
				Anti－CD_3	rIL-2＋Anti-CD_3
A	5.2	26 (27)	226 (349)	1904 (462)	4023 (815)
B	4.1	47 (48)	268 (418)	2460 (1132)	8756 (2148)
C	2.5	22 (23)	376 (535)	9402 (1309)	7288 (2571)
D	2.4	56 (57)	209 (431)	2198 (780)	5977 (925)
E	2.0	35 (36)	281 (372)	5925 (1349)	8939 (2452)
Controls ($n=5$, $\bar{x}\pm s$)		38 (mean)	215±31 (463±69)	8364±1250 (1356±262)	10006±2350 (2343±270)

( ): The value for 3.5 years after irradiation

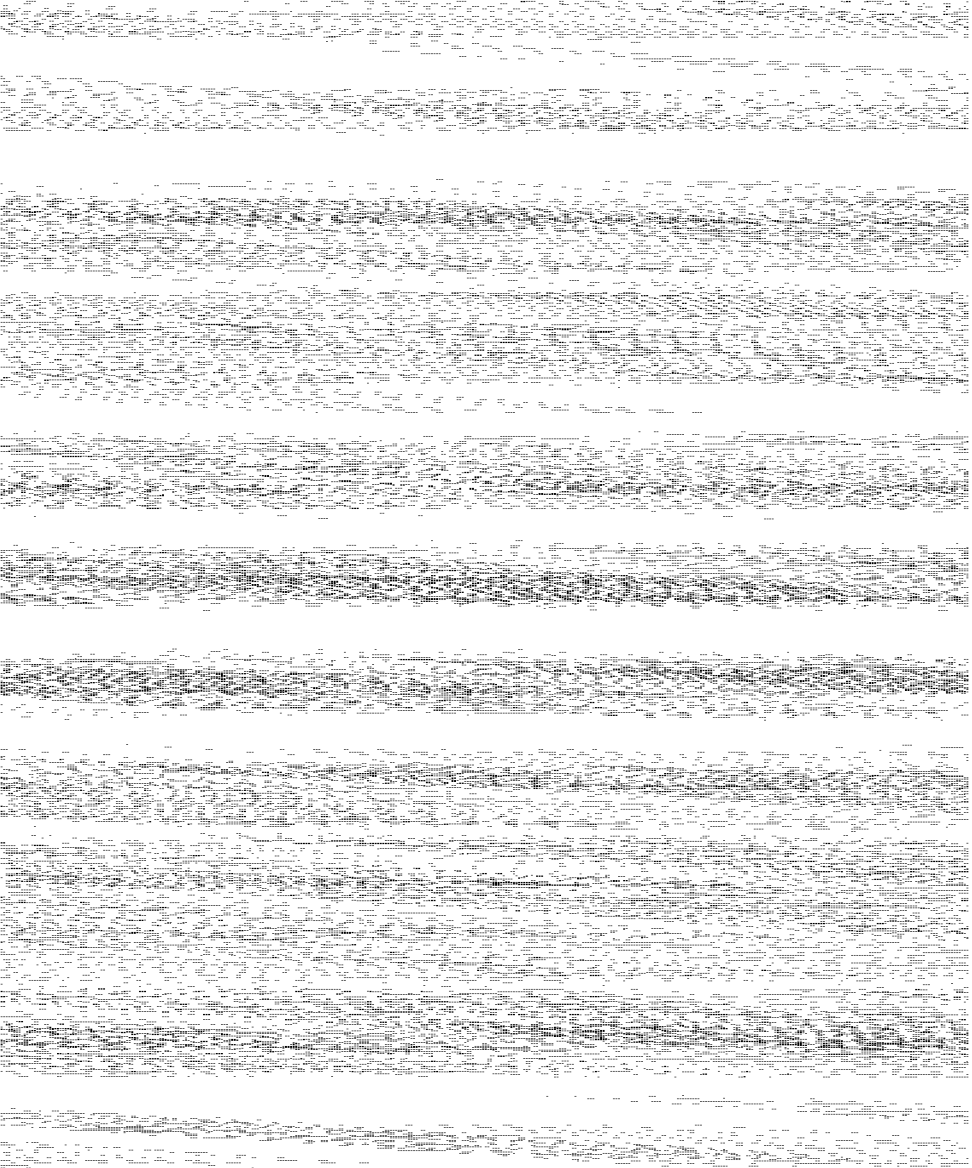
表2 受照后2.5和3.5年患者外周血 TCR(α/β)、CD_3阳性细胞百分率

Tab 2 Percentage of positive TCR(α/β), CD_3 cells in peripheral blood of exposed persons at 2.5 and 3.5 years postirradiation

Patients	Age (year)	Exposure Dose (Gy)	TCR(α/β)	CD_3
A	26 (27)	5.2	48.80 (54.20)	42.63 (46.40)
B	47 (48)	4.1	70.14 (64.20)	58.74 (56.64)
C	22 (23)	2.5	ND (63.94)	ND (66.42)
D	56 (57)	2.4	43.35 (57.10)	47.59 (21.06)
E	35 (36)	2.0	69.62 (66.31)	61.53 (65.32)
Controls ($n=5$, $p\pm S_p$)	28 (mean)		68.32±9.60 (68.21±4.32)	70.14±5.60 (68.06±8.61)

( ): The value for 3.5 years after irradiation;
ND: Not detected

?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

7 闵 锐,程天民,罗成基,等.电离辐射对T淋巴细胞激活增殖能力的影响.中华放射医学与防护杂志,1994,14(4):229～232

8 彭新清.抗CD_3单抗对T细胞的作用.国外医学:免疫学分册,1993,16(5):318～322

9 Min R, Cheng TM, Luo CJ, et al. Effect of Radiation on T cell expression of CD_3, CD_{18}、CD_{25} and TCR. J Med Coll PLA,1994,9(1):66～69

(收稿:1994-10-28;修回:1994-12-02)

Study of the bioeffects of ionization radiation on TCR and CD_3 of peripheral T-cells in 5 cases with accidental exposure

Min Rui, Cheng Tianmin, Luo Chengji, Meng Xiangshun, Ding Zhenhai, Yang Rujun, Cheng Ji (Department of Raidation Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract TCR gene, TCR, CD_3 expression, the function of TCR/CD_3 complex and the links between each other of them of the peripheral T-cells in 5 cases of accidental exposure to ionization radiation were studied. It was found in 2 cases 3.5 years exposure, the capacity of proliferation of the peripheral T-cells in response to the stimulation of CD_3 monoclonal antibodies (CD_3 McAb) was not recovered. The proliferative capacity of T-cells was larger when IL-2 and CD_3 McAb were used combinedly as the stimulant. In other 2 cases, the percentage of the positive cells to TCR and CD_3 was consistently lower than the control and other cases and rearranged hybrid DNA bend was seen in one case. The effect of TCR/CD_3 on the reaction of the mediation of T-cell antigen stimulation and the effect, consequence and significance of ionization radiation on TCR/CD_3 complex were discussed.

Key words radiation, ionizing; radiation injuries; acute diseases; receptors, antigen, T-cell; antigen expression

胎脑黑质脑内移植治疗帕金森氏病的实验研究*

Experimental studies on the treatment of Parkinson's disease by intracerebral transplantation

杨 辉 蔡文琴** 张可成 (第三军医大学新桥医院神经外科) 630037

本实验在建立多种稳定、敏感的地高辛标记反义cRNA探针的基础上,应用核酸原位杂交、斑点杂交定量、免疫组化(ABC法)、免疫印迹检测及电镜观察等方法研究了胎脑黑质脑内移植后神经再生和突触重建的标志物——GAP－43、βAPP表达的变化,观察了胎脑黑质移植物对宿主纹状体内ENK、NPY、D_2R基因表达的调控,发现了移植物长期存活后与宿主发生神经整合的直接和间接证据,比较了不同移植部位的效果,结果如下:

(1)应用光电矩阵原理研制成功了经济实用、精确度比较高的RC－1型大鼠旋转自动计数仪。

(2)首先报道了GAP－43 mRNA在正常成年大鼠CNS中的分布,发现了更多的GAP－43 mRNA杂交阳性脑区,并确认GAP－43 mRNA在成年大鼠脊髓中有表达。

(3)应用GAP－43 mRNA和βAPP斑点杂交定量,结合TH免疫组化、免疫印迹研究及PD动物行为学变化,发现胎脑黑质移植物在宿主脑内有"发育延迟"现象。

(4)ENK、NPY、D_2R基因的过度表达能在被移植的胎脑黑质与宿主整合后正常化。

(5)PD鼠行为及神经功能恢复正常可能是长期存活的移植物对宿主实现神经再支配的结果。

(6)本实验结果表明胎脑黑质脑实质内移植的效果优于脑室内移植的效果,可能与该方式有利于移植物对宿主失神经支配病损区实现神经再支配有关。

关键词 黑质/移植;Parkinson病/治疗;胎脑黑质;脑内移植

中图法分类号 R745.7

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39370248

** 校基础部组织胚胎学教研室,630038

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