

氟碳代血液对猴和豚鼠血淋巴细胞转化的影响

丁训诚 刘春芳 王根发 袁正丽 (上海市劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003)

提要 应用猴和豚鼠的全血加 PHA 体外培养, 以 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 作掺入实验, 用淋转指数 (LTI) 比较输注 PFE 后, 机体细胞免疫功能的变化. 结果表明, 猴静注 PFE 后 1.5 h, 血淋巴细胞数即降低, 注后 24 h 恢复. 同时可见 LTI 升高, 并以注后 24 h 的 LTI 最高, 72 h 后即恢复. 豚鼠在交换自身血量 50% 后第 7 d 时 LTI 最高为 292, 其后 15 d 基本恢复, 说明在该实验条件下, 未见 PFE 对机体淋巴细胞转化有持久的影响.

关键词 氟碳代血液; 淋巴细胞转化; 植物血凝素; $[^3\text{H}]\text{胸腺嘧啶核苷}$ 掺入; 猴; 豚鼠

氟碳乳剂 (perfluorocarbon emulsion, PFE) 已接近临床实用阶段, 为了实现代替血

液, 应了解 PFE 对机体免疫功能的影响. 全氟三丙胺 (FC-43) 或全氟萘烷 (FDC) 乳剂对机体产生抗体的能力有暂时性的抑制, 注后 10 d 内基本恢复正常⁽¹⁾. 目前, 淋巴细胞在机体免疫中所起的作用日益受到重视, 认为淋巴细胞对植物血凝素 (PHA) 的反应在一定程度上反映细胞免疫功能⁽²⁾. 因此, 输注 PFE 后, 研究细胞免疫功能的变化, 无疑地对它在临床的应用以及选择更合适的全氟碳化合物作为

1981年11月10日收稿 1982年3月16日修回

PFE 将会有所帮助。本文以猴和豚鼠的外周血液进行全血培养,应用 $[^3\text{H}]$ 胸腺嘧啶核苷(TdR)参入DNA的方法,观察淋巴细胞转化过程中DNA的合成,评价PFE对机体细胞免疫功能的影响。

材 料 和 方 法

实验动物及实验方法 体重 $5.5 \pm (\text{SD})$ 0.5 kg恒河猴(*rhesus monkeys*) 4只(3♀, 1♂),以5-6 ml/min的速度iv infusion PFE 60 ml/kg。氟碳乳剂由上海第一医学院附属中山医院药剂科提供。在注前及注后1.5, 24, 72 h以及7 d分别取血样,检查血常规及淋转试验。

豚鼠体重 250 ± 50 g 8只,♂♀各半,匀分2组。由心脏抽出自身50%血量(全血量以体重7%计算),立刻从耳缘静脉注入等量PFE,称换血组;注入等量生理盐水,称对照组。在换血前及换血后第3,7,11和15 d,分别取血样。

全血淋巴细胞转化试验⁽³⁾ 从猴静脉或豚鼠心脏抽血2 ml,注入灭菌肝素抗凝管,摇匀。另取体积12 ml灭菌玻璃小瓶4只,2瓶各加含20%小牛血清的1640培养液(RPMI 1640, pH 7.4, 含青霉素100 U/ml,链霉素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)5.0 ml, PHA 0.1 ml(广州医药工业研究所生产)。在培养猴血时,其中含PHA 500 μg ,培养豚鼠血时,则用PHA 250 μg 。另2瓶并作为对照,仅加1640培养液(含20%小牛血清)5.0 ml。上述4瓶,各接种肝素抗凝全血0.3 ml,在37°C培养72 h。终止培养前6 h,每瓶注入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 2 μCi (上海原子核研

究所产品,放射比度37Ci/mmol),仍置37°C,继续参入6 h。终止培养后离心(3000 $\times g$, 10 min)弃上清液,加6 ml蒸馏水,打匀,约放置2 min,使RBC破碎。立刻加入3.5% NaCl溶液2 ml,再次离心(3000 $\times g$, 10 min),倾出上清液。用5.0 ml生理盐水将沉淀移于具有抽滤装置的49型玻璃纤维滤膜上过滤。再用5% TCA和EtOH各5 ml先后洗涤膜片,抽滤之。滤膜经80°C烘20 min后装入测量井,加闪烁液(0.5% PPO, 0.05% POPOP二甲苯溶液)5.0 ml,用YSJ-78型全自动液体闪烁计数器测定cpm。每个血样被参入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 的放射性计算即反映DNA合成。实验数据按cpm/0.3 ml血/min表示核酸合成能力。

结 果

对外周血液淋巴细胞数的影响 从表1可见,猴iv PFE 1.5 h后,外周血的WBC总数即有明显升高。

同时,淋巴细胞数在注后1.5 h反而显著降低,而中性白细胞即是升高的,这些变化经24 h后基本恢复到注前水平。

对淋巴细胞转化率影响 4只猴在iv PFE前后,外周血液的淋巴细胞在体外培养过程中,加入 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 作参入实验的放射性测量结果见表2。由表2可知,各时间的对照并(PHA 0 $\mu\text{g}/5$ ml)cpm数值并不一致,故用淋转指数(LTI)⁽⁴⁾作为衡量PFE对淋巴细胞摄取 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 能力的影响,反映淋巴细胞转化程度的指标。猴iv PFE 60 ml/kg剂量下,24 h后LTI升高到140。72 h及7 d后, LTI恢复到注前水平。说明猴经iv PFE后,对

Table 1. Effect of perfluorocarbon emulsion on peripheral blood WBC, lymphocytes and neutrophils ($\bar{x} \pm \text{SD}$) * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

	0 h	1.5 h	24 h	72 h	7 d
WBC ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	9.6 \pm 1.4	14.7 \pm 2.2**	10.0 \pm 3.0*	9.6 \pm 1.8*	9.0 \pm 1.5*
Lymphocyte ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	2.5 \pm 0.3	1.4 \pm 0.2**	2.1 \pm 0.5*	2.8 \pm 0.3*	2.3 \pm 0.4*
Neutrophil ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	7.3 \pm 0.9	13.3 \pm 1.8**	7.9 \pm 2.0*	7.0 \pm 1.5*	6.9 \pm 0.9*

Table 2. Lymphocyte responses (cpm, $\bar{x} \pm SD$) to PHA in rhesus monkeys after iv perfluoro-carbon emulsion* $P > 0.05$

$$LTI = \frac{[^3H] \text{ TdR uptake (PFE)} - [^3H] \text{ TdR uptake (control)}}{[^3H] \text{ TdR uptake (control)}}$$

Time after infusion	PHA ($\mu\text{g}/5 \text{ ml}$)		LTI
	0	500	
0 h	438 \pm 151	22229 \pm 9722	67 \pm 8
1.5 h	137 \pm 9*	14525 \pm 2493*	106 \pm 29*
24 h	142 \pm 45*	20446 \pm 8611*	141 \pm 36*
72 h	454 \pm 178*	19121 \pm 4982*	68 \pm 12*
7 d	293 \pm 38*	16998 \pm 6578*	61 \pm 20*

PHA 刺激的 T-淋巴细胞转化反应有一过性的升高趋势, 但与注前相比, $P > 0.05$.

用豚鼠由心脏抽出自身 50% 血量, 再分别以等量 PFE 或生理盐水输注. 在换血后不同时间采血, 对 PHA 刺激的外周血 T-淋巴细胞转化反应, (见表 3). 由表 3 可知, 用 50% 换血豚鼠, 第 7 d 血淋巴细胞 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入的放射量与用生理盐水换血的对照豚鼠比较 LTI 分别为 292 和 77, $P < 0.05$. 而其余时间的淋转反应与对照相比, 均无显著差异. 结果提示, 豚鼠输注 PFE 后第 7 d 外周血 T-淋巴细胞的 DNA 合成被激活, 其余时间的淋转虽略高于对照, 但 $P > 0.05$, 为一过性激活反应.

讨 论

由于不同种族的动物淋巴细胞对 PHA 的敏感性差异较大⁽⁶⁾, 所以本文首先选择了

PHA 对猴和豚鼠血淋巴细胞转化的适宜浓度加以应用. 在适宜浓度 PHA 的刺激下, 血淋巴细胞利用 $[^3\text{H}]$ TdR 合成 DNA 增加, 此时, $[^3\text{H}]$ TdR 掺入 DNA 的放射性量可达 14,000 cpm 以上, 提示 DNA 加入量是适宜的 (表 1 和表 2). 此外, 我们还测定了空白对照 cpm < 25 , 未刺激 (不加 PHA) 对照 cpm < 600 , 自然掺入的 $[^3\text{H}]$ 放射性很低, 说明制作滤膜时, 细胞外的放射性已基本洗净, 滤膜样本可以反映 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入细胞的情况.

表 2 各时间的对照并 cpm 数值不一致, 可能是由于技术上的误差, 在滤膜制作过程中只要残留极微量的 $[^3\text{H}]$, 就能出现计数值的较大变化, 所以, 滤膜法按我们的体会, 采用指数来表达结果较为合理. 猴 iv PFE 后 1.5 h, 淋巴细胞数明显降低 (表 1), 而 LTI 即有升高. iv 后 24 h, LTI 达到最高 (表 2). 豚鼠在换血后第 7 d, LTI 达到 292, 淋巴细胞的 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入放射性量为 107,057 cpm, 换血第 11 d 后 LTI 恢复到对照水平 (表 3), 说明 PFE 对淋巴细胞转化成母细胞有一过性刺激作用. 这一现象与输注 Fluosol-DA 后, 脾脏中淋巴母细胞的增多现象⁽⁶⁾是一致的, 但在本实验条件下未见 PFE 对机体淋巴细胞转化有持久的影响.

参 考 文 献

- 1 大柳治正、齐藤洋一、光野孝雄. 日本临床 1980 Aug; 3(4):174
- 2 Thong YH, Ferante A. *Clin Exp Immunol* 1979 Mar; 35(3):443
- 3 苏燎原、林兴成、刘克良、汪涛. 生物化学与生

Table 3. Lymphocyte responses (cpm, $\bar{x} \pm SD$) to PHA after exchange-transfusion of perfluoro-carbon emulsion in guinea pigs.* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

Time after exchange-transfusion	no PHA		PHA 250 $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$		LTI	
	saline	PFE	saline	PFE	saline	PFF
3 d	356 \pm 87	433 \pm 99*	38095 \pm 19327	42844 \pm 21197*	112 \pm 23	102 \pm 27*
7 d	654 \pm 199	362 \pm 26*	46638 \pm 15240	107057 \pm 48964**	77 \pm 19	292 \pm 35**
11 d	471 \pm 94	468 \pm 106*	26789 \pm 11534	46746 \pm 15026*	57 \pm 11	111 \pm 28*
15 d	334 \pm 82	373 \pm 88*	34964 \pm 17956	50948 \pm 18846*	103 \pm 32	146 \pm 18*

物物理进展 1977 年 6 月; (3):14

- 4 Thurman GB, Simms BG, Goldstein AL, Kilian DJ. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978 Sep; 44(3):617
5 Howard RB, Werner RP, Sleight DS. *Ibid* 1980

Aug; 55(1):146

- 6 Miller LM, Wesseler PE, Jones CS, Clark CL, *J Reticuloendothel Soc* 1976 Nov; 20(5):385

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Dec; 3 (4) : 283—286

EFFECT OF FLUOROCARBON BLOOD SUBSTITUTE ON PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE TRANSFORMATION IN MONKEYS AND GUINEA PIGS

DING Xun-cheng, LIU Chun-fang, WANG Gen-fa, YUAN Zheng-li

(Department of Toxicology, Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003)

ABSTRACT The effect of perfluorocarbon emulsion (PFE) on mitogen phytohemagglutinin (PHA)-induced proliferative responses of peripheral blood lymphocytes were examined in *rhesus* monkeys and guinea pigs. [³H]TdR incorporation were followed to reflect lymphocytes transformation. Responses to PHA of the peripheral blood lymphocytes of 4 monkeys from iv infusion of PFE (60 ml/kg) were insignificant comparing with the pre-infusion. But the lymphocyte transformation index (LTI) in 24 h after infusion of PFE were markedly elevated. Infusion of 7—10 ml

25% PFE resulted in a half-dilution of the blood volumes in guinea pigs. Peripheral blood lymphocytes were cultured on d 3, 7, 11, and 15 to determine the response to PFE by measuring the uptake of [³H]TdR. After d 7 of exchange-transfusion, LTI to PHA were significantly increased. This trend indicates that PFE stimulates cellular immune system.

KEY WORDS fluorocarbon blood substitute; lymphocyte transformation; PHA; [³H]TdR incorporation; monkey; guinea pig