

变剂在小鼠脾脏细胞和大麦细胞中最终诱发 SCE 的效应是一致的。

参 考 文 献

- [1] Kihlman, B. A. et al., 1982, *Sister Chromatid Exchange*, ed. by Wolff, S., pp. 243—256. Wiley, New York.
- [2] Plewa, W. J. et al., 1982, *Chemical Mutagens, Principles And Methods For Their Detection*, ed. by Hollaende, A. et al., pp. 401—420. Plenum New York.
- [3] Takehisa, S., 1982, *Sister Chromatid Exchange*, ed. by Wolff, S. pp. 87—147. Wiley, New York.
- [4] Takehisa, S. and N. Kanaya., 1983, *Mutation Res.*, 124:145—151.
- [5] Takehisa, S, et al., 1988, *Mutat. Res.*, 197:195—205.
- [6] Scott, B. R. et al., 1978, *Mutat. Res.*, 49:203—212.
- [7] Dohn, D. R. et al., 1981, *Drug & Metab. Rev.*, 12:119—157.
- [8] Bauknecht, Th. et al., 1977, *Hum. Genet.*, 35:209—307.
- [9] Miller, J. A., 1970, *Cancer Res.*, 30: 559—579.
- [10] Ames, B. N. et al., 1975, *Mutat. Res.*, 115:177—213.
- [11] Wolff, S. and P. Perry., 1974, *Chromosoma.*, 43:341—353.
- [12] Schwartzman, T. B. and F. Cortes., 1977, *Chromosoma.*, 62:119—133.
- [13] Kihlman, P. A. and E. Kronborg., 1975, *Chromosoma.*, 51:1—10.
- [14] 张自立、董广元, 1982, *遗传学报*, 9(5): 357—362.

自然杀伤细胞和甲状腺细胞膜上的神经节苷脂的研究

陈哲生 李林立* 郑思华 卢辉章** 孙明杰 曹忠正

(首都医学院微生物学免疫学教研室)

自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)是一类非特异性杀伤肿瘤细胞的杀伤细胞,而且在体内分布较广、裸鼠体内也有NK细胞的存在,并有较广的抗瘤谱,尤其对淋巴瘤和白血病的瘤细胞杀伤能力最强。NK细胞杀伤靶细胞首先必须与靶细胞接触,然后融合释放穿孔素(perforin),发挥杀伤作用^[1]。

Adams等1956年发现甲状腺机能亢进病入血清中存在一种自身抗体,称长效促甲状腺素(long acting thyroid stimulator, LATS),后人又相继发现其他刺激抗体,现统称为甲状腺刺激抗体(Thyroid stimulating antibody, TsAb)。TsAb与甲状腺细胞膜上的受体相结合,发挥刺激作用^[2]。

神经节苷脂(ganglioside)是许多动物细胞膜上成份之一,是含有不同唾液酸的酸性糖脂,具有不同的生物学功能。神经节苷脂是近年来引人注目的课题。

本文报道霍乱肠毒素对NK细胞和甲状腺细胞膜上神经节苷脂影响的研究结果。

材 料 和 方 法

一、NK效应细胞

1. 动物 CBA 纯系小鼠, 年龄 8 周龄。
2. 瘤细胞株 小鼠 Moloney 淋巴瘤株(YAC-1), 红细胞系的白血病细胞株(K 562) (材料均来自瑞典, 卡诺林斯卡医学院免疫系), 两株瘤细胞培养在 RPMI 1640 培养基内(内含 10% 胎牛血清和青、链霉素)。
3. 霍乱肠毒素 B 亚单位(sigma 公司)。
4. 自然杀伤细胞活性的测定 人和小鼠淋巴细胞的分离^[3]。靶细胞的同位素标记^[3]。50 μ l 的 ⁵¹C, 标记的靶细胞与 100 μ l 的效应细胞, 按比例混合(人的效应细胞数: 靶细胞数 = 2: 1;

* 北京职工医院。

** 北京宣武医院。

鼠的效应细胞数:靶细胞数=1000:1)。在共育前,效应细胞预先于不同浓度的霍乱肠毒素B亚单位混合,在37℃ CO₂的孵箱中,共育30分钟、60分钟、120分钟和180分钟,用RPMI 1640液洗了3次,台盼蓝染料测定效应细胞活性后,再与相应浓度的靶细胞在37℃ CO₂的孵育箱中共育3小时,离心5分钟,取上清液50 μl在自动α测定仪(LKB)中测定⁵¹C的cpm。按下面公式计算出NK细胞的活性。

$$\text{NK 细胞活性 \%} = \frac{\text{实验管 cpm} - \text{自发释放管 cpm}}{\text{最大释放管 cpm} - \text{自发释放管 cpm}} \times 100\%$$

二、甲状腺细胞

1. 标本来源

宣武医院外科提供。手术切除甲亢病人的甲状腺组织块,共10例。福尔马林固定,石蜡包埋、连续切片(5-6 μm)。

2. 主要材料

霍乱肠毒素(北京生物制品鉴定所);
辣根过氧化物酶(西德)标记霍乱肠毒素,按文献[4]制备。

TsAb的标准品——LATS-B(WHO)英国医学研究委员会赠。由Bangham制备,每安瓿含0.015单位;
甲状腺刺激素(天津医学院药厂);
神经节苷脂(Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型, Sigma);
羊抗兔IgG和兔抗辣根过氧化物酶的抗体(军事医学科学院微生物流行病学研究所)。

3. 结合物制备

(1.) 酶-抗酶抗体复合物的制备

辣根过氧化物酶和兔抗辣根过氧化物酶抗体复合物制备,按文献[4]方法稍加改良。

(2) LATS-B和神经节苷脂复合物(Ⅱ型)的制备,

LATS-B和神经节苷脂充分混合,4℃过夜,高速离心5分钟。

4. 免疫组织化学法[5]

(1.) 霍乱肠毒素(cholera toxin, CT)探针试验:酶标记CT用直接免疫组织化学法染甲状腺标本。

(2) 实验组: LATS-B和甲状腺刺激素(TSH)分别处理甲状腺标本,然后用间接免疫组织化学法染甲状腺标本。

(3) 竞争试验

A. CT对TsAb的竞争 CT预先处理甲状腺标本,然后用TsAb(LATS-B)对甲状腺标本进行间接免疫组

织化学法染色。

B. TSH对TsAb(LATS-B)的竞争 TsH预先处理甲状腺标本,然后用TsAb(LATS-B)对甲状腺标本进行间接免疫组织化学法染色。

C. 神经节苷脂对TsAb(LATS-B)的阻断 TsAb(LATS-B)和神经节苷脂复合物的上清液处理甲状腺标本,用间接免疫组织化学法染色。

(4) 对照试验

A. 取代试验 正常人血清或正常羊(兔)血清取代TsAb和TsH,对甲状腺标本进行免疫组织化学法染色。

辣根过氧化物酶取代酶标记物或酶-抗酶抗体,对甲状腺标本进行免疫组织化学法染色。

B. 内源酶试验 单独用对二氨基联苯胺(DAB)显色。

5. 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定TsAb(LATS-B)。

神经节苷脂溶液(Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型1 mg/ml)分别包被聚苯乙烯塑料板(天津玻璃厂,40孔),每孔0.2 ml,4℃过夜,弃去,用pH 7.4磷酸缓冲液洗3次,依次用TsAb(LATS-B),酶标记羊抗人IgG包被,其步骤同常规ELISA法。

结 果

一、霍乱肠毒素B亚单位对NK细胞活性的影响

本文选用霍乱肠毒素B亚单位4种浓度, (B₁ = 1 μg/ml; B₂ = 2 μg/ml; B₃ = 5 μg/ml; B₄ = 10 μg/ml)和4个不同时间(30'、60'、120'和180'),来探讨对人和小鼠的NK细胞杀伤靶细胞作用的影响。结果显示,在30分钟时,霍乱肠毒素B亚单位对人和小鼠的NK细胞杀伤靶细胞有抑制作用,随着浓度的升高而抑制作用加强。但在同一浓度下,随着时间的延长,抑制作用下降或不增强,见图1和图2。

二、甲状腺细胞膜上的神经节苷脂研究

1. 免疫组织化学法试验,结果见表1

实验结果说明,甲状腺细胞膜上存TsH和TsAb的受体,并且存在神经节苷脂(GM₁)。竞争实验组说明,外来的神经节苷脂可以完全阻断TsAb与甲状腺细胞结合,但CT或TsH

表 1 甲状腺细胞的免疫组织化学的实验结果

组	CT 探针组	实验组	竞争实验组		对照
			CT 和 TSH 对 TsAb	神经节苷脂对 TsAb	
结果	阳性	阳性	部分阻断	完全阻断	阴性

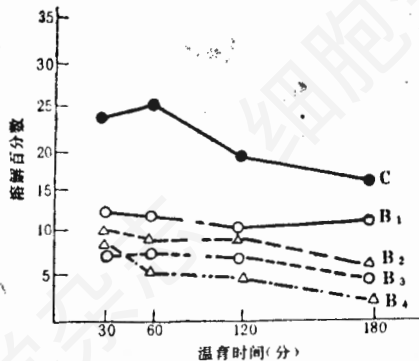


图 1 不同浓度霍乱肠毒素 B 亚单位对小鼠脾脏细胞 NK 活性的影响

(C = 对照, B = 霍乱肠毒素 B 亚单位, B₁ = 1 μg/ml, B₂ = 2 μg/ml, B₃ = 5 μg/ml, B₄ = 10 μg/ml)

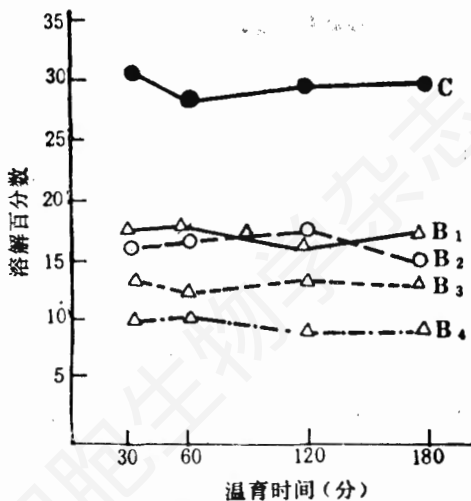


图 2 不同浓度霍乱肠毒素 B 亚单位对人体周围血淋巴细胞 NK 活性的影响。

C = 对照, B = 霍乱肠毒素 B 亚单位, B₁ = 1 μg/ml, B₂ = 2 μg/ml, B₃ = 5 μg/ml, B₄ = 10 μg/ml。

只能部分阻断 TsAb 与甲状腺细胞结合。

2. ELISA 法直接证实 TsAb(LATS-B)能与混合的神经节苷脂(Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型)结合。

“Ⅴ型为钙盐, N-乙酰神经氨酸含量为 30%;

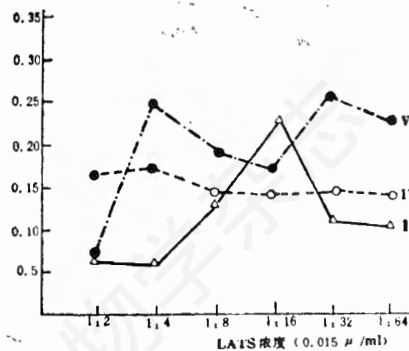


图 3 LATS-B 结合神经节苷脂Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型的曲线

Ⅳ型中 N-乙酰神经氨酸含量为 32%, 无游离酸, Ⅱ型为粗提物, 此三型均从牛脑中提取”。

因此, 同一浓度的神经节苷脂(Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型)与 TsAb(LATS-B)结合量不同。

讨 论

霍乱肠毒素是一种酶, 由多个亚单位分子组成, 借助二硫键相连, 分别称为 A 亚单位和 B 亚单位。A 亚单位是酶活性部位, B 亚单位是结合部位。目前公认, 霍乱肠毒素的特异性受体是膜上 GM₁ 神经节苷脂, 通过 B 亚单位与膜上 GM₁ 神经节苷脂碳水化合物部分相结合^[6]。

本文实验结果指出, 霍乱肠毒素 B 亚单位预先处理 NK 效应细胞, 并与 NK 细胞膜上 GM₁ 神经节苷脂结合, 就能阻断人或小鼠 NK 效应细胞对相应靶细胞的杀伤作用, 而且在 30 分钟内完成。随着霍乱肠毒素 B 亚单位浓度增大, 抑制作用增强。因此, 可以设想, NK 效应细胞膜上 GM₁ 神经节苷脂, 参与识别靶细胞的作用。

Kohn 等用甲状腺机能亢进病人的淋巴细

胞与不产生 Ig 的小鼠骨髓瘤细胞进行异源性融合, 所建立的单克隆株可以产生抑制, 刺激和混合三型抗体。刺激性抗体经体内外试验证实有刺激作用, 是针对甲状腺细胞膜上神经节苷脂。TsAb 的活性也受到神经节苷脂的抑制^[7,8]。

免疫组织化学试验结果指出, 甲状腺细胞膜上有 TsH 和 TsAb(LATS-B)受体; CT 能与甲状腺细胞膜结合, 说明膜上存在 GM₁ 神经节苷脂。神经节苷脂预先处理 TsAb(LATS-B), 能完成阻断 TsAb(LATS-B)与甲状腺细胞结合。ELISA 法证实 TsAb(LATS-B)能与混合的神经节苷脂(Ⅱ、Ⅳ和Ⅴ型)相结合。

本文结果提示, 我们的结论与 Kohn 等观点一致。但是, CT 和 TsH 仅能部分阻断 TsAb(LATS-B)与甲状腺细胞膜结合, 说明 TsAb 膜受体是很复杂的, GM₁ 神经节苷脂不是唯一的成份。

摘 要

本文对 NK 效应细胞和甲状腺细胞膜上的神经节苷脂进行了研究, 采用同位素标记法, 免疫组织化学法和 ELISA 法。结果说明, 霍乱肠毒素 B 亚单位预先处理, 人或小鼠的 NK 效应细胞, 就能抑制对相应靶细胞杀伤作用,

随着 B 亚单位浓度增大, 抑制作用增强。霍乱肠毒素能与甲状腺细胞膜结合。神经节苷脂预先与 TsAb(LATS-B)结合, 就能完全阻断 TsAb(LATS-B)与甲状腺细胞膜结合。体外实验(ELISA 法)证实 TsAb(LATS-B)能与混合的神经节苷脂相结合。但是, CT 和 TSH 仅能部分阻断 TsAb 与甲状腺细胞膜相结合, 说明 TsAb(LATS-B)的膜受体是很复杂的, GM₁ 神经节苷脂不是唯一的成分。

参 考 文 献

- [1] Nose, M, et al., 1987, *Scand. J. Immunol.*, 25:149.
- [2] Adams. D. D., 1981, *Vitam Horm*, 38: 119—203.
- [3] Hansson, M. et al., 1978, *J. Immunol.*, 121(1):6.
- [4] 郭春祥, 1983, 上海免疫学杂志, 3(2):97.
- [5] Sinclair, R. R. et al., 1984. *Anch pathol LabMed*, 108:345.
- [6] Vine, H. L. et al., 1986, An overview of toxinsneceptor interaction in pharmacology of Bacterial toxins, ed, by Dorner. P. etal., pp 31—76. pergamon phess.
- [7] Kohn, L, D., 1984. *Monoclonal antibodies and The thyrotropin receptor*, ed by Greaves. M. F, pp 203—231. Chapman and Holl london.
- [8] 陈哲生, 1986, 国外医学(内分泌分册), 3: 145.

名词讨论

体 视 学 (Stereology)

stereology 目前有两种译法: 体视学和立体学。Stereo 有立体、体视等含意, 因此从字面上译, 两种译法均可。stereology 其内含是要从二维结构定量推论或阐明三维结构。“体视”的中文含意原指双眼同时观察天然物体时能判定其远近深度的立体视觉效应。由双目的体视效应, 从角度稍异的位置拍摄二维照片, 通过有关仪器(如体视比较仪, stereocomparagraph 等)即可产生三维感觉。。可见“体视”本身具有或包含从平面重构或推断三维的含意, 恰与 stereology 的内含相吻合。与“立体”有关的学科及名词很多, 如: 立体几何、立体化学、立体物理学、立体声、立体战争等。这里“立体”直接指三维, 并不包含从二维推论或重构三维的含意。若将 stereology 译为“立体学”, 易使人们将其研究内容理解为上述与“立体”有关的各种内容。可见用“立体学”不能很好地反映出 stereology 的学科特点, 因此译为“体视学”较“立体学”恰当。

(第一军医大学病理解剖教研室 申 洪)