

细胞内无显著性差异,它究竟归于哪一种同工酶,本文未做详细研究,有待进一步探讨。

文献报道^[3],由于肿瘤组织的迅速生长和旺盛的无氧酵解,肿瘤细胞的LDH同工酶M亚基含量增加,H亚基含量减少。本实验则发现L 615小鼠脾淋巴细胞以M²亚基为主的LDH同工酶带增多和以H亚基为主的同工酶带减少较明显。这种变化的原因是由于肿瘤细胞基因表达发生改变所致,还是由于转录后化学修饰发生变化所致,有待进一步研究。

有人报道^[4],小鼠LDH基因突变可以导致LDH同工酶等电点增高;本实验的结果是白血病患者LDH同工酶等电点与正常细胞相同,所以推测白血病患者细胞的LDH基因可能没有发生突变,LDH同工酶的变化可能是通过其它机制。

另外,实验还发现,白血病患者细胞浸润脾脏高达80%以上,而且两种小鼠同工酶酶谱也不同;但胸腺几乎不被浸润(细胞形态及同工酶酶谱在两种小鼠间基本相同),说明本实验所

用小鼠其白血病患者细胞浸润组织器官具有选择性,这与文献报道^[5]一致。

摘 要

用高分辨力的等电聚焦技术分析615和L 615小鼠胸腺及脾淋巴细胞LDH同工酶,表明两种小鼠胸腺淋巴细胞同工酶酶谱相同,具有相同等电点的条带含量无显著性差异;而两种小鼠脾淋巴细胞同工酶酶谱不同,某些具有相同等电点的同工酶带含量有显著或极显著性差异。

参 考 文 献

- [1] 吴鹤玲等, 1983, 遗传学实验和技术, pp. 158—159, 262, 高等教育出版社。
- [2] Klose, J. et al., 1975, *Biochem. Genet.*, 13:707—712.
- [3] 房世荣等, 1987, 中华血液学杂志, 8: 141—147.
- [4] Charles, D. T. et al., 1981, *Biochem. Genet.*, 19:831—837.
- [5] Bird, C. C. et al., 1972, *Br. J. Cancer*, 26:373—380.

一个能封闭造血祖细胞对重组人IL3反应 的单克隆抗体—HI98

陈 璋 沈德诚 杨希峰 孙同哲 卞钟元 汤美华 段世利 苏月来

(中国医学科学院血液学研究所)

造血调节分子的研究是当前十分活跃的领域,四种集落刺激因子(CSF): IL3(多能CSF)、GM-CSF、G-CSF、M-CSF都已有重组产品,在临床试用亦已显示可喜的结果^[1]。但是,相应因子受体的研究进展缓慢。由于在造血细胞表面受体含量甚微,很难制备抗体,而天然配体的亲和力一般较差,使研究受体十分困难。目前研究比较清楚的受体只有M-CSF受体。我们曾报道一个与粒、单核细胞分

化抗原反应的单克隆抗体(单抗)HI 98,又称HIM 1^[2]。因其相应抗原分布特殊, Lewis (1989)报道HI 98单抗能特异性抑制¹²⁵I-重组人IL3与KG 1靶细胞的结合,而不影响¹²⁵I-重组人GM-CSF, ¹²⁵I-重组人G-CSF和¹²⁵I-IL4与相应靶细胞的结合^[3],提示HI 98可能是一种抗人IL3受体相关分子的单抗。这一设想曾引起今年维也纳第四届人类白细胞分化抗原会议中一些专家的重视。本文报告用生物

学试验进一步证实 HI 98 能特异性抑制重组人 IL 3 对造血细胞的刺激作用。目前国际尚无类似单抗报道。

材料与 方法

HI 98 单抗制备与鉴定方法 HI 98 单抗是用外周血单个核细胞免疫 BALB/c 小鼠的脾细胞与 NS₁ 进行细胞融合获得的^[2]。用羟基磷灰石层析法纯化单抗^[4]。间接免疫荧光技术与免疫酶标技术, 见文献^[5]。白血病细胞均来自初诊患者外周血或骨髓, 标本中白血病细胞占 70% 以上。

集落形成试验 CFU-GM 实验采用下列培养体系: 靶细胞(胎儿骨髓细胞或脐带血单个核细胞) 1×10^5 个/ml, 新生牛血清(NBS) 20%, 人 AB 型血清 10%, 琼脂(Difco) 0.3% 和 IMDM 培养基(Gibco) 适量, 用人胎肌浸液或重组人 IL3 或 GM-CSF 作条件培养基。实验孔中加入 HI 98 小鼠腹水或单抗纯品 IgM, 对照孔用培养基或 IgM 类的无关单抗代替 HI 98, 实验在 24 孔塑料培养板(Costar)中进行, 0.5 ml/孔, 均一式三孔, 在饱和湿度下, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱 10 天, 计数每孔生长的集落数。大于 50 个细胞皆为一集落, 计算三孔平均集落数。

BFU-E 试验 在 Peiper(美国 Alabama 大学)协助下完成, 重组人 IL3 和重组人 GM-CSF 由 Peiper 惠赠, 实验孔加 HI 98 单抗, 设无关抗体对照组和无抗体阳性对照。

抑制率计算:

抑制率% =

$$\frac{\text{阳性对照孔集落} - \text{HI 98 实验孔集落数}}{\text{阳性对照孔集落数}} \times 100\%$$

HI 98 对 FDC-P 1 细胞的直接作用 将具有小鼠 IL3 受体的小鼠 IL3 依赖细胞系 FDC-P 1 细胞洗三次, 分别与 HI 98 或 IgM 类型无关抗体 HIT4(100 ug/ml) 4℃ 培养过夜, 离心除去游离抗体后, 再悬浮于含 10% NBS, 不含 IL3 的 RPMI 1640 培养基中, 分种于 96 孔塑料培养板(Costar)中, 5×10^4 个/孔细胞, 再置 37℃, 5% CO₂ 培养 24 小时, 加入 0.2 μ ci/孔 ³H-TdR(中国原子能科学研究所), 6 小时后收集, 于 β 液体闪烁仪(Beckman)测每分钟脉冲数(CPM), 试验均一式 3 份, 取 CPM 均数。

HI 98 对小鼠 IL3 诱导 FDC-P 1 细胞增殖能力的影响 将用上述方法预处理的 FDC-P 1 细胞悬浮于

含有 IL3 条件上清的培养基中, 再分别加入 HI 98 单抗或无关单抗 HIT4(100 μ g/ml), 于 37℃、5% CO₂ 培养 24 小时后, 加入 ³H-TdR、0.2 μ ci/孔, 掺入 6 小时, 收集测定同上。小鼠 IL3 来自 WEHI-3 细胞培养上清。

亲和层析法测 HI 98 抗原分子量 将经羟基磷灰石层析纯化的 HI 98 单抗与溴化氰活化的 Sepharose 4 B (Pharmacia) 偶合, 装柱、洗脱游离抗体。用慢粒白血病病人的粒细胞膜蛋白提取液上柱多次, 洗涤柱子后用 pH 2.3, 0.02 M 的硫酸甘氨酸缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 透析、超滤(Amicon)浓缩至 40 μ l 左右。并用扁桃腺和胸腺细胞经同样方法提取作对照。用 5—15% 梯度 SDS-PAGE 垂直板电泳分析 HI 98 抗原分子量, 用银染法显示蛋白带。

结 果

1. HI 98 单抗的生物学特征

HI 98 属于 IgM, 与人外周血中 90% 粒细胞、72% 单核细胞和 56% 骨髓细胞起反应, 不与淋巴细胞、血小板、胸腺细胞、扁桃体和脾脏细胞反应。只与粒单细胞系反应。结果见表 1。

表 1 HI 98 单抗对细胞系的反应性

细胞系	HI98 ⁺ 细胞%	细胞系	HI98 ⁺ 细胞%
髓细胞系		B 细胞系	
KG 1	49	NALM-6	0
HL 60	>90	REH	0
K 562	60	BJAB	0
U 937	>90	Daudi	0
T 细胞系		J1JOYE	0
MOLT-4	0	P3HR-1	0
CEM	0		
HPB-ALL	0		

免疫组化测定表明 HI98 与肠和肾小管上皮细胞及组织中的吞噬细胞有交叉反应, 而与体内其他 15 种组织无反应。HI98 单抗能结合人和家兔补体^[2], 能识别粒细胞表面一个 56 KD 的多肽分子(图 1), 而对照的扁桃腺或胸腺细胞提取液不显示任何沉淀带。

2. HI98 抑制胎肌浸液刺激的人 CFU-GM 集落形成实验

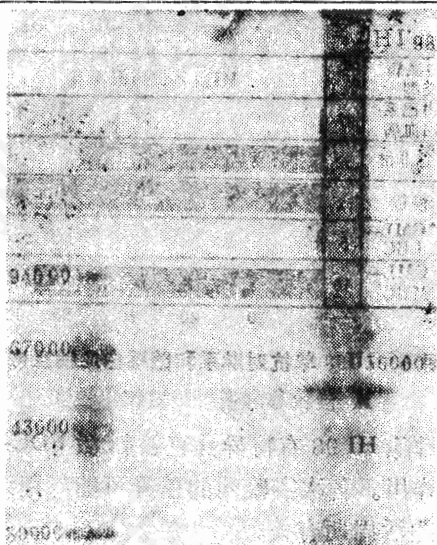


图1 HI98抗原SDS-PAGE电泳图

通过不同来源造血祖细胞形成CFU-GM集落的实验,观察纯化的HI98 IgM对造血的影响。结果显示,在人胎肌浸液刺激体系中加入HI98 Ig能使CFU-GM集落形成数明显减少,当加入100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HI98单抗时其平均抑制率为 $75.4 \pm 19.2\%$ (50%—100%), HI98的抑制效果与其在培养体系中的浓度呈依赖关系。用相同IgM类型抗肝炎核心抗原单抗HIHBC₁A₅作对照,未见明显抑制作用(表2)。

表2 HI98单抗对胎肌浸液刺激CFU-GM集落形成的抑制作用

实验 序数	CFU-GM 形成抑制率(%)		
	HI98 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	HI98 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	HIHBC ₁ A ₅ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
1	100		
2	87.3	28.6	16.7
3	73.9	65.2	21.7
4	65.9	40.9	
5	50.1	50.9	
平均抑制率(%)	75.4 ± 19.2	46.4 ± 15.5	19.2 ± 3.5

3. HI98只能特异性抑制IL3诱导的CFU-GM和BFU-E集落形成

在CFU-GM和BFU-E实验体系中分别用

重组人IL3或重组人GM-CSF代替胎肌浸液,同时加入不同稀释度的HI98腹水液,观察集落形成,结果(图2和图3)明确显示HI98单抗只能特异性抑制IL3纯品诱导的CFU-GM和BFU-E集落形成,而不抑制GM-CSF的作用。HI98腹水对IL3诱导CFU-GM集落形成的最高抑制率为47%,对BFU-E的最大抑制率为62%,其抑制效应与剂量相关,在1:1000稀释时仍有明显抑制作用。在与此形成鲜明对比的GM-CSF诱导的CFU-GM和BFU-E实验中HI98的最大抑制率分别为6%和3%。这一关键性生物学实验进一步证实了HI98的结合实验的结果。证明HI98可能是抗人IL3受体相关分子的单抗。

4. HI98单抗对小鼠IL3的刺激作用没有明显影响,表明IL3受体可能存在种间差异

在测定小鼠IL3依赖细胞系FDC-P1细胞对IL3刺激的反应中,加入HI98单抗纯品,观察FDC-P1细胞的反应性。如表3所示,HI98(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对小鼠IL3活性没有明显抑

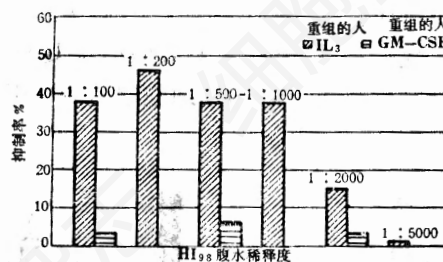


图2 HI98单抗对CFU-GM集落形成的抑制作用

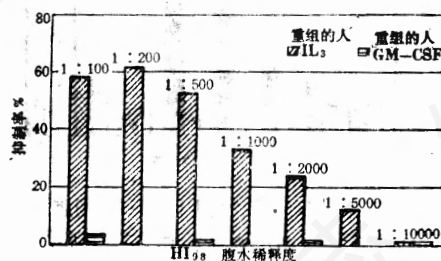


图3 HI98单抗对BFU-E集落形成的抑制作用

制作用。因而 HI 98 对人和小鼠 IL3 作用于相应靶细胞的影响明显不同,提示 IL3 受体可能与 IL3 因子一样有明确的种间差异。

表 3 HI98 单抗对小鼠 IL3 依赖细胞系 FDC-p1 增殖的影响

体系中 加入	单抗预处理		
	-	HI98	HIT4
HI 98	-14.0±4.9	-23.0±1.1	-23.6±5.3
HIT 4	+25.8±12.0	+32.8±18.5	+21.5±11.1

1. 试验中 HI98 和 HIT4 单抗均为 Ig 纯品, 终浓度为 100 µg/ml。

2. 结果显示为单抗对 5% WEHI-3 上清刺激 FDC-P₁ 细胞增殖影响的百分率(%), “-”表示抑制, “+”表示刺激。表中数据为三次实验的平均数。

5. HI 98 对 FDC-P₁ 细胞的直接刺激作用

富含小鼠 IL3 受体的 FDC-P₁ 细胞在与 HI 98 单抗在 4 °C 培育过夜后经洗涤, 除去游离 HI 98, 再培养在不含 IL3 的培养基中, 观察细胞增殖与 DNA 合成。与未经 HI 98 处理的实验孔相比, 在 8 次实验中 6 次显示 FDC-P₁ 细胞 ³H-TdR 掺入明显增加, 但无关抗体对照也有一定刺激作用(图 4)。表明小鼠 IgM 可能有非特异性刺激 FDC-P₁ 细胞增殖的作用, 但

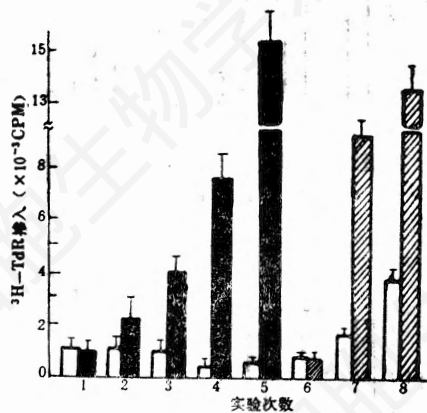


图 4 HI98 单抗对 FDC-P₁ 细胞增殖的直接作用

□ 对照
■ HI98 腹水(1:50)预处理
▨ HI98 Ig 纯品 100 µg/ml 预处理

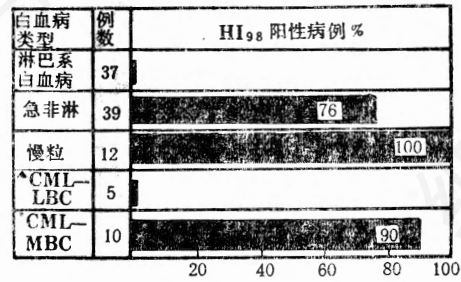


图 5 HI98 单抗对淋系和髓系白血病反应性

▲ 慢粒急淋变 * 慢粒急粒变

也不排除 HI 98 有特异性直接刺激 FDC-P₁ 细胞的作用。各次实验间的差异可能与靶细胞所处的生活周期有关。

6. HI 98 抗原在白血病细胞表面的分布

不同类型白血病细胞表达 HI 98 抗原的情况(图 5)。76% 急非淋白血病患者白血病细胞可与 HI 98 反应, 阳性细胞数在 20—90%, 个体差异很大。而 37 例淋巴细胞白血病无一例表达 HI 98 抗原。几乎全部慢性粒细胞白血病(慢粒)患者的白血病细胞与 HI 98 反应, 近 60—90% 细胞呈 HI 98 荧光染色强阳性。在慢粒急粒变时, 表达 HI 98 抗原阳性白血病细胞减少, 而在急淋变时白血病细胞转为 HI 98 阴性。

讨 论

我们获得了一种抗粒单细胞分化抗原的单克隆抗体, 命名为 HI 98 (又名 HIM₁), 属于 IgM 类, 识别粒细胞表面 56 KD 分子, 与 90% 以上粒细胞、72% 单核细胞和 56% 骨髓细胞反应, 与一些上皮细胞有交叉反应。能抑制胎肌浸液诱导的人 GM-CFU 集落形成, 最大抑制率可达 75%。由于胎肌浸液中调节造血因子复杂, 进一步改用基因重组的 IL3 和 GM-CSF 纯品诱导 GM-CFU 和 BFU-E 集落形成试验, 观察 HI 98 的作用特异性。结果明确显示 HI 98 只能抑制人 IL3 的刺激作用, 对 GM-CSF 的作用没有任何影响。GM-CFU 和 BFU-E 试验表明 HI 98 作用于十分原始的造

血祖细胞。因此,生物学试验进一步验证了今年维也纳会议上 Lewis 报告的结果:他们在筛选国际 157 个抗粒细胞单抗中发现仅有一个编号为 M₁₄₁(即 HI 98)单抗有明显封闭 IL3 与相应靶细胞 KG 1 表面 IL3 受体的结合反应。而对重组人 GM-CSF、G-CSF 和 IL4 与相应靶细胞的结合没有影响。提示 HI 98 单抗的特异性可能是针对人类 IL3 受体。HI 98 对小鼠 IL3 反应体系没有明显抑制作用,表明人和小鼠 IL3 受体亦存在种间差异。

众所周知 IL3 在调节造血中起着十分重要的作用,它调节着从多能干细胞到粒单系统细胞的分化、成熟和功能表达。在 EPO 等其他因子参与下又可调节其他造血细胞的分化与成熟。因此研究 IL3 的反应性是十分重要的。目前已知 M-CSF 受体是 c-fms 癌基因产物,各种因子受体与细胞癌变的关系是当前极具竞争性的研究领域。因此 HI 98 单抗为研究人类 IL3 受体提供了重要的工具,为研究一些造血系统疾病的发病机制提供了新的可能性。

我们还初步对 103 例白血病患者细胞表面 HI 98 抗原表达情况进行了研究,发现 76% 急非淋、100% 慢粒患者白血病细胞表达 HI 98 或 IL3 受体,为今后深入比较研究正常与恶变造血细胞表达 IL3 受体的质与量及其与细胞恶变的关系打下基础。对 IL3 受体在造血调节中的作用将有新的认识。

摘 要

本文报道一种抗髓系细胞分化抗原单抗 HI98,属于 IgM,与 90% 以上人外周血粒细胞,72% 单核细胞和 56% 骨髓细胞反应。与一些上皮细胞有交叉反应。HI 98 单抗能抑制胎肌浸液诱导的人 GM-CFU 集落形成,最大抑制率达 75%。用基因重组的 IL3 和 GM-CSF 纯品研究证实 HI 98 单抗只能特异性地抑制 IL3 诱导的 GM-CFU 和 BFU-E 集落形成,而对 GM-CSF 诱导的 GM-CFU 和 BFU-E 集落形成没有影响。因而生物学试验的结果与 Lewis 在今年维也纳会议上报告的 IL3 结合抑制试验结果完全一致,表明 HI 98 单抗的特异性是针对人类 IL3 受体,是一个抗 IL3 受体抗体,在国内外尚未见报道。为研究人 IL3 受体的基因调控及其与造血细胞增殖、分化、癌变之间的关系和造血因子间的相互作用提供了一个重要的工具。

参 考 文 献

- [1] 陈 璋, 1989, 中华血液学杂志, 10(1): 48。
- [2] 沈德诚等, 1989, 中华血液学杂志, 10(7): 350。
- [3] Lewis, a. j. et al., 1989, *Tissue antigen*, 33(2):227。
- [4] Stanken, L. H., et al., 1985, *J. Immunol Method.*, 76:157。

电离辐射对内皮细胞分泌 TXA₂ 和 PGI₂ 的影响

盛民立 朱涵能 沈立刚 季小蓉 金慰芳

(上海医科大学放射医学研究所)

出血是电离辐射后的主要症状之一,也是主要致死原因之一⁽¹⁾。血管壁特性的改变和血液凝固系统的变化对于病理性出血起着重要作用。内皮细胞作为分隔血液和内皮下结构的屏障,是防止出血的第一道防线,在研究辐射损

伤造成的出血机理上是具有重大意义的。

本实验通过血管内皮细胞的培养^(5,6)直接测定培养细胞中 PGI₂ 和 TXA₂ 的含量,并观察辐射前后的差别,以探求辐射损伤出血的原因。