

察到粘菌 (*Slime mold Dictyostelium Discoidium*) 发育过程中细胞膜上糖蛋白的种类及数量均有明显改变。此外, 用鸡胚视网膜神经细胞^[9]也得到类似结果。因此, 可以认为人胎肝细胞对凝集素凝集效应的改变也是反映胚胎发育过程中质膜上糖蛋白(或糖脂)的衍变。近年来, 大量工作证明癌变细胞出现反分化(de-differentiation)现象, 所以肿瘤细胞易被凝集素凝集, 是否也是这一现象的特征之一, 是值得注意的。

表 4 不同胎龄人胎肝细胞的凝集效应*

胎 龄**	ConA 浓度 $\mu\text{g/ml}$		
	500	60	30
4	未测定	##	未测定
5	##~##	##	##
6	##~##	##	##~+
7	##	+	+
8	+	未测定	未测定
成 人	+	±	-

* 37℃保温 30 分钟。

** 胎龄按胎儿坐高(头顶到坐骨结节的高度)确定。

小 结

本文报道的八种实验动物肿瘤细胞及一株

人肝癌细胞均在低浓度(30微克/毫升) ConA 及 PHA 中明显凝集, 这和文献报道的一般规律相一致。三种人胚胎细胞也和文献报道的动物胚胎细胞的结果类同, 而且随着胎龄的增长, 分化的成熟, 凝集程度也逐渐减弱, 八个月胎龄的肝细胞其凝集强度已接近于正常成人肝细胞。腹水型肿瘤细胞比较实体型的更易凝集, 这可能表示细胞之间相互接触可能影响细胞表面膜的性能。

参 考 文 献

- [1] Aub, J. C. et al. 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 50: 613.
- [2] Nicolson, G. L. 1976. *Biochim. Biophys. Acta.*, 458: 1.
- [3] Moscona, A. A., 1971. *Science* 171: 905.
- [4] Fox, T. D. et al. 1971. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 244.
- [5] Nicolson, G. L. and Lacorbiere, M., 1973. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 1672.
- [6] Glimelins, B. et al. 1974. *Int. J. Cancer*, 14: 314.
- [7] Weiser, M. M., 1972. *Science*, 177: 525.
- [8] West, C. M. and Mc Mahon, D., 1977. *J. Cell Biol.*, 74: 264.
- [9] Mintz, G. and Glasser, L., 1978. *J. Cell Biol.*, 79: 132.

人 体 巨 噬 细 胞 的 研 究

V. 单核细胞-巨噬细胞的 HLA-DR 抗原及其在淋巴细胞体外增殖反应中的作用*

张友会 黄亚玖**

(中国医学科学院肿瘤研究所)

对小鼠的主要组织相容性复合体(H-2系统)的大量研究证明, 除关系到同种异体移植植物被排斥的 H-2D 和 H-2K 之外, 在这两个位点之间还有一个与免疫反应密切联系的 I 区。它由五个亚区组成, 所编码的抗原称为 Ia 抗原。H-2D 和 H-2K 抗原见于所有有核细

胞的表面, 而 Ia 抗原仅存在于某些细胞, 如 B 淋巴细胞和巨噬细胞的表面。巨噬细胞的 Ia 抗原在免疫反应诱导阶段巨噬细胞与 T 细胞相互作用中是极为重要的^[1]。在人类主要组织相容

* 本工作在美国圣地亚哥 Scripps 研究所完成。

** Scripps 研究所分子免疫室。

性复合体中的 HLA-DR 位点所编码的抗原 (DR 抗原) 相当于小鼠的 Ia 抗原^[2]。本文报道用抗 DR 的单克隆抗体 (以下简称单抗) 确定 DR 抗原在单核细胞和巨噬细胞表面的存在和分布, 并研究 DR 抗原在淋巴细胞对抗原作用的增殖反应中所起的作用。

材料与方 法

一、供血者

由实验室工作人员自愿提供静脉血 30—50 毫升。供血者先经 PPD 和 SK-SD 皮试, 于 48—72 小时呈现阳性反应者作为实验对象。

二、抗原、有丝分裂原及抗体

PPD (Connaught Lab.), 1TU = 0.00002 毫克; SK-SD (Lederle Lab.), 每支含 25,000 单位; ConA (Calbiochem), 每支含 250 毫克。

单抗: Q513, 为抗人 HLA-DR 抗原非多态部分的特异抗体; NAMB1 为抗人 β_2 -m 的特异抗体; 138 和 376.96S 为抗人恶性黑色素瘤的特异抗体; P3 为 Balb/c 小鼠骨髓瘤分泌的免疫球蛋白。这些单抗 (除了 P3) 都是用杂交细胞瘤技术制备并经过鉴定的高度特异性抗体。实验中或用杂交瘤的培养上清, 或用杂交瘤腹水并经过提纯 (氯化铵沉淀及 DEAE 离子交换层析)。

三、淋巴细胞对抗原作用的体外增殖反应

取肝素抗凝静脉血加入血浆凝胶 (plasmagel), 在 37℃ 下放置半小时。吸出上层富含白细胞的血浆, 转入 50 毫升离心管, 用注射器及长针头向管底缓慢注入淋巴细胞分离液 (LSM, Bionetics), 35 毫升富含白细胞血浆加 10 毫升 LSM。以 1800g 离心 20 分钟。吸出界面上的细胞, 用含 5% 小牛血清的 HBSS 洗三次, 再用完全培养液 (RPMI 1640, 含 10% 小牛血清、0.3% 谷氨酰胺、50 微克分子 2ME 以及双抗) 重新混悬, 得 PBMNC 悬液。用台盼蓝拒染法计数活细胞并将细胞浓度调节到 1×10^6 /毫升。向 U 形孔底微量培养板 (Limbro) 孔穴内种入 PBMNC 悬液 0.1 毫升, 在 5% CO₂ 孵箱过夜。次日向孔穴内加入 50 微升抗原: PPD, 5 和 10TU; SK-SD, 1:100。用 ConA (5—10 微克) 作为对比。用完全培养液将各孔液量补足至 0.2 毫升。在同样条件下继续培育 5 天。终止培养前 16—18 小时, 向各孔加入 ³H-TdR (New England Nuclear) 1 微居。用 NASH II 型

收获器收获各孔细胞于玻璃纤维滤纸上, 烘干后加闪烁液 (New England Nuclear, Formula-963) 4 毫升, 用液闪仪 (Beckman) 计数 cpm。每一剂量的抗原 (或有丝分裂原) 做三个平行孔, 取其平均值。

四、去除和获取单核细胞

置一部分 PBMNC 于 50 毫升塑料培养瓶, 在 5% CO₂ 孵箱 (37℃) 内培育过夜。将不贴壁细胞转入 50 毫升离心管, 离心 (1200rpm, 10 分钟), 细胞沉渣再用完全培养液混悬, 作活细胞计数并调节细胞浓度至 1×10^6 /毫升 (NA)。贴附于瓶壁的单核细胞继续在完全培养液中培养, 供做放射免疫沉淀; 或用 24 毫克分子利多卡因或凝胶海绵从培养瓶壁获取单核细胞, 供做直接玫瑰花形成试验。所获得的细胞, 88% 能吞噬乳胶颗粒。

五、放射免疫沉淀及 SDS-PAGE

1. ³H-葡糖胺内标细胞糖蛋白 取培养一周左右的单核细胞或巨噬细胞 (详后), 倾去培养液, 更以含糖量低 (通常量的 1/40) 的 RPMI-1640, 其中含葡萄糖 5 毫克/100 毫升, 丙酮酸钠 10 微克分子, 小牛血清 5% 和 ³H-葡糖胺 (Radiochemicals, 20—40 居/微克分子) 1 毫居, 继续培养。培养中定时取一定量培养上清测定其放射性, 以观察同位素参入情况。24—48 小时后, 倾出培养液, 用 HBSS 洗贴壁细胞 3 次。加细胞溶解剂 5 毫升 (Tris 10 毫克分子, NaCl 150 毫克分子, CaCl₂ 1 毫克分子, MgCl₂ 1 毫克分子, NP-40 0.5%, pH8.0), 置 4℃ 30 分钟。转入离心管, 离心 (3000rpm, 10 分), 留上清, 即为 NP-40 提取物。取 10 微升测放射性, 以确定 ³H-葡糖胺的参入量。

2. 制备放射免疫沉淀物 (1) 包被抗体。用 NET 缓冲液 (NaCl 150 毫克分子, EDTA-Na₂ 5 毫克分子, Tris 50 毫克分子, NaN₃ 0.02%, NP-40 0.25%, 卵清蛋白 1 毫克/毫升, pH7.4) 制备 10% 的 PAS-4B (Pharmacia), 平衡过夜。取 Fisher 小管, 加 10% PAS-4B 100 微升, 单抗 2—5 微升, 在 4℃ 下旋转 2—4 小时。沉渣用 NET 洗 4 次, 最后用 NET 100 微升混悬, 即为 Ab-PAS-4B。(2) 免疫沉淀。向 100 微升 Ab-PAS-4B 加入 NP-40 提取物 (cpm 约为 1×10^6), 在 4℃ 下旋转 2—4 小时。沉渣用 NET 洗 10 次, 再用 PBS (pH7.4) 洗三次。即为 Ag-Ab-PAS-4B。(3) 洗脱免疫复合物。用样品缓冲液 (Tris 3.75 克, SDS 10.0 克, 加水至 100 毫升, 用 HCl 调 pH 至 6.8) 1 毫升加甘油 0.5 毫升, 0.05% 溴酚蓝 0.1 毫升, 2ME 0.1 毫升, 加水至 5 毫升配成洗脱

液。取 100 微升洗脱液与 Ag-Ab-PAS-4B 充分混合, 置沸水浴内 1—2 分钟。

3. SDS-PAGE 及荧光自显影 按文献报道的方法^[3]进行 SDS-PAGE。电泳使用固定电流 (30 毫安), 持续 4—5 小时。电泳毕, 取出凝胶板, 经 0.5% Commasie 蓝染色, 乙酸(10%)—甲醇(20%)脱色和水洗后任其自干。再用 DMSO 处理两次, 各 30 分钟。再浸泡于含 20% PPO 的 DMSO 内 45 分钟。用自来水冲洗 1 小时, 烘干机烘烤 2 小时 30 分。用 X 光胶片在 -70℃ 条件下引荧光自显影(auto blurography)。用已知分子量的蛋白的泳动距离为标准, 估计 NP-40 提取物中有关物质的分子量。

六、直接玫瑰花形成试验^[4]

取 4℃ 保存于 Alsever 液中不超过一周的 SR-BC, 洗涤后用等渗盐水配成 20% 悬液。取 0.3 毫升 SRBC 悬液于试管内, 离心 (1200rpm, 5 分) 弃上清。向细胞沉渣 (约 50 微升) 先后加入单抗及 0.1% CrCl₃ (溶于生理盐水) 各 50 微升。充分混匀, 室温下置 5 分钟。离心 (转速同前) 并洗涤细胞三次。用等渗盐水 2.5 毫升制成 2% SRBC (已经单抗包被) 悬液。用兔抗小鼠 Ig 处理 SRBC, 如出现肉眼可见之红细胞凝集现象, 说明包被抗体成功。

按前述方法获取培养了不同时间的单核细胞或巨噬细胞 (详后)。经台盼蓝拒染计数后, 用 RPMI-1640 配成 0.5—1×10⁶/毫升细胞悬液。向圆底孔微量培养板孔穴内按 1:1 或 2:1 比例加入 SRBC 悬液和单核细胞或巨噬细胞悬液。离心 (700rpm, 2 分) 后向孔内加入 0.5% 甲苯胺蓝 (生理盐水溶液) 一滴。用滴管轻轻混匀后吸一滴置载物玻片上, 加盖玻片, 在显微镜下计数玫瑰花形成细胞的百分数。细胞周围的 SRBC ≥ 5 时定为玫瑰花形成细胞。除单核细胞、巨噬细胞外, 还选用 HLA-DR 抗原阳性细胞 (Raji) 和阴性细胞 (K562) 为对照。

七、巨噬细胞提供抗原

用斑蝥酒精提取液在前臂皮肤引起水泡^[5]。48 小时后取出泡液。根据巨噬细胞含量, 向 U 形孔底微量培养板种入适量皮泡液, 使每孔巨噬细胞数为 1×10⁵。加完全培养液使每孔液量为 0.2 毫升。在 5% CO₂ (37℃) 孵箱内过夜。次日吸出上清, 用 HBSS 洗涤各孔一次。加入抗原 (或有

丝分裂原) 50 微升及完全培养液 0.15 毫升, 在 5% CO₂、37℃ 下孵育 1 小时。吸出上清, 用 HBSS 洗涤各孔三次以除去游离的抗原 (或有丝分裂原)。粘附于孔底的巨噬细胞至此已结合有抗原 (或有丝分裂原), 是为 mφ-Ag。加入 NA (1×10⁶/毫升 0.1 毫升及完全培养液 0.1 毫升, 在同样条件下继续培养 5 天。按前法, 用 ³H-TdR 的参入测定淋巴细胞的增殖情况。

八、抗 HLA-DR 单抗的阻断作用

1. 按方法“三”所述测定淋巴细胞对抗原 (或有丝分裂原) 作用的增殖反应。除抗原 (或有丝分裂原) 外, 另加不同稀释度的单抗 (纯化 Ig) 20 微升。

2. 按方法“四”获得 NA 悬液。从皮泡液获得巨噬细胞。以 NA 1×10⁵、巨噬细胞 1×10⁵、PPD10TU 和单抗 (杂交细胞瘤培养上清) 50 微升, 共同种入培养小孔内。5 天后测 ³H-TdR 参入量。

3. 按方法“七”测定巨噬细胞提供抗原的能力。在巨噬细胞与抗原 (或有丝分裂原) 预培 1 小时过程中另加有单抗 (杂交细胞瘤培养上清) Q513 (或 NAMB、138、P3) 50 微升 (mφ $\left\{ \begin{array}{l} \text{Ag} \\ \text{Q513} \end{array} \right.$); 或者, 巨噬细胞与抗原 (或有丝分裂原) 预培 1 小时, 经洗涤 3 次后再加单抗 50 微升 (mφ-Ag, Q513)。其余步骤同方法“七”。

结 果

一、淋巴细胞在体外对抗原作用的增殖反应及其对巨噬细胞的依赖性

对结核杆菌的侵犯, 人体能产生特异性细胞免疫反应。这可用 PPD 皮试检测出来, 亦可用体外淋巴细胞对 PPD 的特异性增殖反映出来。一般来说, 这两个反应, 一个体内, 一个体外, 是极为相关的。我们选择 PPD 皮试阳

表 1 抗原及有丝分裂原引起的淋巴细胞体外增殖

刺激物	剂 量	cpm* ± S. E.		
		PBMNC	NA	NA + Mφ
PPD	10 TU	27,844 ± 4,219	4,119 ± 2,369 (85.3)**	78,879 ± 6,306
PPD	5 TU	19,932 ± 2599	3,257 ± 447 (83.7)	72,921 ± 3,676
SK-SD	1:100	58,968 ± 4,059	○*** (100)	— [△]
ConA	10 微克	93,877 ± 1,681	84,500 ± 3341 (10)	—

* 1×10⁵ 细胞每分脉冲数。

*** cpm 低于对照。

** 括号内为 cpm 下降百分数。

△ 未测。

性者, 取其 PBMNC, 在体外观察其对 PPD 的增殖反应。预备实验结果(未列出)表明:

- (1) PPD 的剂量比皮试剂量要大 5—10 倍;
- (2) 完全培养液中含 2ME 是必需的, 无 2ME 则细胞增殖反应微弱;
- (3) 在其他条件相同的情况下, U 形孔底培养板比平底培养板的增殖反应强得多。后来的正式实验均采用了上述条件。表 1 所列结果说明, 在上述实验条件下 PPD 在体外具有很强的促有丝分裂作用。我们以前的作业已证明, 多克隆有丝分裂原(如 PHA、ConA)对淋巴细胞的作用, 需单核细胞—巨噬细胞参与^[6]。本工作证明, 抗原引起的淋巴细胞增殖也依赖于巨噬细胞。PBMNC 去除单核细胞后(NA), 对 PPD 和 SK-SD 引起的细胞增殖显著减弱, 但对 ConA 的反应影响甚微。若向 NA 中加入得自皮泡的巨噬细胞,

不但可使增殖反应完全恢复, 而且 ³H-TdR 的参入量更多。

二、巨噬细胞向淋巴细胞提供抗原

从以上结果可以断定, 淋巴细胞有赖于巨噬细胞的辅佐方能对抗原作用起增殖反应。那么, 巨噬细胞究竟如何发挥作用? 我们检查了巨噬细胞提供抗原的能力。从表 2 第 III 项可以看出, 巨噬细胞确有向淋巴细胞提供抗原 PPD, SK-SD) 和 ConA 的能力。三次洗涤应已将游离的可溶性抗原洗净, 在此条件下发生的细胞增殖必然是由结合于巨噬细胞表面的抗原(即 Mφ-Ag)所致, 巨噬细胞以某种方式将抗原提供给淋巴细胞。表 2 第 I 项是 NA、mφ、Ag 同时被加入培养孔穴内, 没有巨噬细胞与抗原(或 ConA)的 1 小时预培养和 3 次洗涤。与第 III 项相比, 其 cpm 分别高出 37%

表 2 巨噬细胞提供抗原以及抗 DR 单抗的作用

刺激物 (剂量)	cpm*±S. E.				
	I. NA + Mφ + Ag	II. NA + Mφ + Ag + Q 513	III. NA + Mφ - Ag	IV. NA + Mφ Ag Q 513	V. NA + Mφ - Ag + Q513
PPD (10 Tu)	89,496 ± 7,149	27,724 ± 1,634 (69.1)**	56,609 ± 5,849	21,308 ± 2,780 (62.4)	2,015 ± 187 (95.2)
PPD (5 Tu)	83,537 ± 5,202	18,256 ± 3,790 (78.2)	52,212 ± 4,247	21,025 ± 2,381 (59.8)	2,268 ± 0 (95.7)
SK-SD (1:100)	69,584 ± 6,144	19,468 ± 1,528 (72.1)	52,659 ± 10,751	18,256 ± 3,790 (65.4)	5,165 ± 0 (90.2)
ConA (10 微克)	55,902 ± 3,676	—	46,854 ± 4,870	33,562 ± 1,528 (28.4)	25,620 ± 4,208 (45.4)

* 同表 1。

** 同表 1。

(PPD)、25%(SK-SD)和 16%(ConA)。

三、单核细胞和巨噬细胞表面的 DR 抗原

大约 70% 的外周血单核细胞和 45% 的皮泡巨噬细胞, 经玫瑰花形成试验证明, 其表面有 HLA-DR 抗原存在。单核细胞在体外培养, 随培养时间的延长, 其 DR⁺ 细胞的百分率有下降趋势。但是, 即使培养 10 天, 仍有相当多的 DR⁺ 单核细胞。表 3 是有代表性的实验结果。Raji 细胞为 DR⁺B 细胞株, 阳性率达 90%, 为阳性细胞对照。用 376.96S 和 P3 包被的羊红细胞作玫瑰花形成试验, 阳性

表 3 用单抗包被的羊红细胞作直接玫瑰花形成试验

受测细胞	玫瑰花形成细胞(%)			
	Q513	NA	MB1	376.96S P3
受试者甲				
外周血单核细胞				
1天	65	85	2	4
8天	48	86	3	2
10天	36	84	1	1
皮泡巨噬细胞				
当天	45	95	1	2
1天	40	85	1	1
受试者乙				
外周血单核细胞(当天)	70	86	5	3
皮泡巨噬细胞(当天)	46	85	4	5
B 淋巴细胞株(Raji)	90	95	3	2
髓细胞白血病细胞(K562)	3	7	3	3

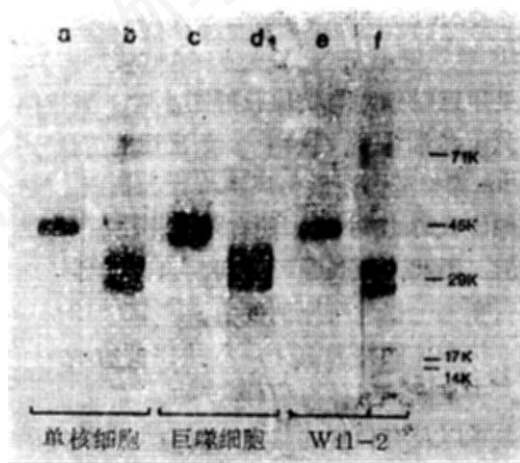


图 1 SDS-PAGE 凝胶板放射自显影图

率极低，为阴性抗体对照。单核细胞和巨噬细胞的 β_2m 均为阳性。

用免疫沉淀结合 SDS-PAGE 和荧光自显影进一步证实了 DR 抗原在单核细胞和巨噬细胞上的存在。从自显影图(图 1)可见，外周血单核细胞(图 1b)和皮泡巨噬细胞(图 1d)同 B 细胞株 W11-2(图 1f, 阳性对照)一样，均显示出分子量约为 28K 和 34K 两条清晰带，相当于 DR 抗原的轻链和重链(电泳在还原条件下进行，使 DR 分子的两条链分开)。细察之，巨噬细胞的 DR 重链在电泳谱上由两条带组成，而单核细胞的 DR 只有一条。造成这一差别的原因尚未查明。图 1a、c、e 是用单抗 NAMB1 沉淀的产物，3 种细胞均为阳性。 β_2m 以非共价键与 HLA-A、B、C 分子结合在一起，经抗 β_2m 单抗沉淀后，在还原条件下也彼此分开。但因 β_2m 分子上不含糖， 3H -葡萄糖胺不能被标上，故在自显影图上未显现出来。在 45K 附近的沉淀带为 HLA-A、B、C 分子。

四、抗 HLA-DR 单抗的阻断作用

证明了单核细胞和巨噬细胞上的 DR 抗原后，我们进一步观察了抗 DR 单抗对淋巴细胞的增殖反应有何影响。先用杂交细胞瘤培养上

清，发现 Q513 对 ConA 引起的淋巴细胞增殖有明显的抑制作用(表 4)。后用 Q513 的腹水纯外 Ig 也观察到淋巴细胞对抗原 PPD 的增殖反应受到阻断。阻断效应与单抗的稀释度成反比(图 2)。P3 虽也引起了 cpm 的下降，但并不

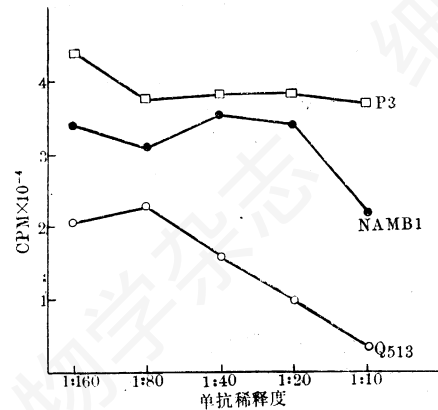


图 2 抗 DR 单抗对 PPD 引起的淋巴细胞体外增殖的特异阻断作用

反应细胞: PBMNC
单抗: 纯化 Ig, 20 微升

不显著，说明 Q513 的作用是特异的。但值得注意的是，抗 β_2m 的 NAMB1，尤其是在高浓度下，也引起了同位素参入的明显减少。至此，已证明抗 DR 单抗对 ConA 和 PPD 引起的淋巴细胞增殖有明显的抑制作用，但仍不知道抗 DR 单抗的作用靶子就是单核细胞或巨噬细胞表面的 DR 抗原。这是因为在 PBMNC 中有 DR⁺ 的 B 细胞，而且某些被活化的 T 细胞也有 DR 抗原。为明确这一点，又用皮泡巨噬细胞进一步实验。在巨噬细胞与抗原预孵

表 4 抗 DR 单抗对 ConA 作用的阻断

剂量 (微克)	实验一*		实验二*	
	无	Q 513 [△]	无	Q 513
5	28,846 ± 3,733	13,216 ± 2,176 (54.2)**	137,016 ± 12,872	69,799 ± 4,005 (49.1)
10	18,255 ± 3,790	3,734 ± 376 (79.2)	158,950 ± 22,265	89,850 ± 3,416 (43.5)
15	3,719 ± 487	1,291 ± 317 (63.3)	115,866 ± 12,595	33,040 ± 4,728 (71.5)

[△] 杂交细胞瘤培养上清 25 微升/孔。

* 实验一用平底孔培养板，实验二用 U 形孔培养板。

** 括号内为抑制百分率。

时,若有 Q513 存在(预孵后充分洗涤巨噬细胞), $^3\text{H-TdR}$ 的参入减少了 60% (参看表 2 第 III、IV 项)。在同样条件下, ConA 引起的参入也下降了 28%。若抗原先与巨噬细胞预孵育, 洗涤巨噬细胞后再加入 Q513 (在此条件下, Q513 存在于尔后的实验全过程), PPD 所致之增殖受抑更著, 达 90% 以上(表 2 第 V 项)。在另一次实验中, 除 Q513 外, 还用了 NAMB1 和 P3。在同样实验条件下, 仅 Q513 对淋巴细胞增殖有阻断作用(表 5), 说明 Q513 作用的特异性。

讨 论

本文采用迟发超敏反应的体外模型——淋巴细胞对抗原作用的增殖反应, 研究巨噬细胞与淋巴细胞在免疫诱导阶段的相互作用。我们首先阐明了这一反应对巨噬细胞的依赖性。实验证明, NA 对 PPD 和 SK-SD 的反应很弱, 若回加巨噬细胞, 淋巴细胞的增殖重现(表 1)。这一结果与文献已有的报道^[7-10]一致, 然而, NA 对 ConA 的反应仍然完好, 说明抗原与 ConA 比较, 更依赖于巨噬细胞。以前的工作已经证明^[6], ConA 引起的淋巴细胞增殖对巨噬细胞的依赖性比 PHA 大。故就对巨噬细胞的依赖程度而言, 抗原 > ConA > PHA。在回加巨噬细胞的实验中, cpm 比 PBMNC 更高。这可能由于加回去的巨噬细胞占细胞总数的 50%, 远比 PBMNC 中的单核细胞量(通常为 10—15%)为多。此外, 有一部分 cpm 可能是所谓的同基因混合淋巴细胞反应(SMLR)^[11]造成的。在 SMLR 中, B 细胞和巨噬细胞均可刺激同基因的 T 淋巴细胞增殖。我们在其他实验中也发现过这种现象(待发表)。

我们以前曾证明, 人巨噬细胞能将 PHA 和 ConA 提供给淋巴细胞, 但要求高浓度的(50%)巨噬细胞^[6]。本研究也使用了同样浓度的巨噬细胞做提供抗原的实验。在此条件下, 巨噬细胞确能提供抗原, 但是, 经巨噬细胞提

供抗原(NA + M ϕ - Ag, 表 2 III)所引起的 $^3\text{H-TdR}$ 参入量不及 NA + M ϕ + Ag(表 2 I)。我们是用巨噬细胞与抗原预孵 1 小时, 把抗原结合到巨噬细胞上。这是一般常用的方法^[12]。Geha 等报道^[9]以破伤风类毒素为抗原, 与巨噬细胞预孵 18 小时, 能有效地将抗原提供 T 细胞。因此, 延长预孵时间, 也许能更好地阐明巨噬细胞提供抗原的能力。

抗 DR 的特异抗体, 过去主要有两个来源。一是同种异体血清(经产妇、接受过多次输血者以及有计划的免疫), 经血小板反复吸收

表 5 抗 DR 单抗阻断作用的特异性

实 验 条 件	单 抗*			
	Q 513	NAMB	138	P 3
NA + M ϕ - Ag	10,962 ± 1,283	8,335 ± 70	7,330 ± 332	8,284 ± 953
NA + M ϕ $\left\{ \begin{array}{l} \text{Ag} \\ \text{单抗} \end{array} \right.$	5,924 ± 666 (46)**	10,043 ± 1,106	7,254 ± 672	8,362 ± 546
NA + M ϕ - Ag + 单抗	1,614 ± 368 (85.3)	13,378 ± 2,456	7,722 ± 379	8,390 ± 524

* 杂交细胞瘤培养上清。

** 同表 4。

去除了抗 HLA-A、B、C 的抗体。二是用 B 细胞纯化的 DR 抗原 P^{23,30} 免疫家兔获得抗 DR 异种血清^[13]。前者针对 DR 抗原的多态性部分, 因此, 必需选用具有抗血清所针对的 DR 表型的细胞。这给实验带来许多困难。同种异体抗 DR 血清能抑制抗原(破伤风类毒素^[9]和 PPD^[14])刺激淋巴细胞增殖, 已有报道。抗 P^{23,30} 异种血清是针对 DR 抗原的共同决定簇的, 使用起来比同种异体血清方便。Breard 等^[10]证明, 可溶性抗原(破伤风类毒素、PPD 等)在没有巨噬细胞参与下, 不能引起 T 细胞增殖, 回加巨噬细胞使增殖反应正常; 若事先用抗 P^{23,30} 抗血清加补体处理巨噬细胞, 则不能支持 T 细胞对抗原的反应。这说明, 淋巴细胞对抗原作用的增殖反应, 需有 DR⁺ 的巨噬细胞参与方能实现。本研究应用抗 DR 单抗, 具有高度的均一性和特异性, 来源便利。Q513 是用 B 细胞株(Victor)免疫 Balb/c 小鼠后, 将

其脾细胞与 P3-X63-Ag8 骨髓瘤细胞融合后经过两次克隆化而得的杂交细胞瘤。血清学和免疫化学鉴定表明, 它所分泌的单抗是针对 DR 抗原非多态性部分的特异抗体^[15]。以此 DR 单抗为重要工具, 我们用两种不同方法证明, 人单核细胞和巨噬细胞具有由 HLA-DR 位点编码的 DR 抗原。一是依靠 DR 单抗的高度特异性, 把细胞表面的 DR 抗原选择性地沉淀下来, 然后运用 SDS-PAGE 和荧光自显影确定 DR 的组分和分子量, 并与已知的 DR 抗原比较。这一免疫化学方法确定无疑地证明 DR 抗原在单核细胞、巨噬细胞上的存在。这同 Mckinney 等用抗 P^{23,30} 免疫沉淀 ³⁵S-蛋氨酸内标的 DR 抗原所得结果^[16]是一致的。我们用 ¹²⁵I-SPA 结合试验也得到了同样的结果^[17]。另一方法是把纯化的 DR 单抗包被到羊红细胞上, 以玫瑰花形成表明 DR 的存在及其分布情况。我们的结果表明, 外周血单核细胞 DR⁺ 的占约 70%, 这与 Albrechtsen 用补体介导细胞毒法所得结果^[18]近似。但随着在体外培养时间的延长, DR⁺ 单核细胞的比例下降。造成这一改变的原因, 还不明了, 但它似乎说明 DR 抗原的出现和存在不是固定不变的。皮泡巨噬细胞 DR⁺ 的百分率比单核细胞的低, 其原因也有待探寻, 但也可说明单核细胞——巨噬细胞系的 DR 抗原处于动态, 只不过我们尚不掌握其规律而已。

确定了 DR 抗原的存在之后, 我们便合乎逻辑地进而探讨了它在巨噬细胞与淋巴细胞相互作用中扮演什么角色。仍以 DR 单抗为工具, 我们不仅观察到 Q513 对淋巴细胞(PPD 和 ConA)的体外增殖有明显的抑制作用, 而且证明它是通过与巨噬细胞上的 DR 抗原结合而实现的。这说明巨噬细胞表面的 DR 抗原关系到巨噬细胞能否将抗原和有丝分裂原提供给淋巴细胞。在本文引用的文献报道中, 没有那一篇如此明确地阐明巨噬细胞 DR 抗原在提供抗原或有丝分裂原中的作用。换言之, 致敏淋巴细胞不但需识别相应的外来抗原, 还需能够识

别自身的 DR 抗原, 方能发生特异性细胞增殖。HLA-DR 位点上的基因决定着宿主对抗原起反应的能力, 是通过它所编码的巨噬细胞 DR 抗原实现的。然而, 不能排除其他 DR⁺ 细胞也参与作用的可能性, 因为, 当 DR 单抗的作用不限于巨噬细胞时, 它的阻断效应更强(比较表 2 IV、V 两项)。这些 DR⁺ 细胞可能包括 B 细胞和在淋巴细胞活化过程中出现的 DR⁺T 细胞^[19,20]。这些细胞在淋巴细胞增殖中的可能作用有待进一步探讨。

结 语

人外周血淋巴细胞在体外对可溶性抗原能起增殖反应。它需有巨噬细胞的参与方能最大限度地表现出来。巨噬细胞能将抗原提供给淋巴细胞, 这一过程与其表面的 DR 抗原有密切联系, 抗 DR 单抗不仅显示出 DR 抗原的存在, 而且能显著地阻断巨噬细胞向淋巴细胞提供抗原, 抑制后者增殖。

参 考 文 献

- [1] Schwartz, R.H., et al. 1978. *Immunological Review* 40: 153-180.
- [2] Ferrone, S., et al. 1978. *Contemp. Top. Mol. Immunol.* 7: 239-281.
- [3] Laimmli, U.K. 1970. *Nature* 227: 680-682.
- [4] Francesco, I., et al. 1979. *J. Immunol. Meth.* 29: 101-109.
- [5] 张友会, 姚津生. 1978. 中华医学杂志 58: 603-607.

(下转第 6 页)

注 本文所用之缩写

PPD, 结核菌素纯化蛋白衍生物; SK-SD, 链激酶——链道酶; ConA, 刀豆蛋白 A; DMSO, 二甲基亚砷; 2ME, 2-巯基乙醇; HBSS, Hanks 平衡盐液; PBMNC, 外周血单个核细胞; NA, 非粘附细胞; mφ, 巨噬细胞; ³H-TdR, 氚-胸腺嘧啶核苷; TU 毒性单位; SDS-PAGE, 十二烷基钠聚丙烯酰胺电泳; SPA, 葡萄球菌蛋白 A; PAS-4B, 蛋白 A 葡聚糖 4B; Ag, 抗原; Ag-Ab-PAS-4B, 与 PAS-4B 结合的抗原抗体复合物; Ab-PAS-4B, 经抗体包被的 PAS-4B; SRBC, 羊红细胞; β₂m, β₂ 微球蛋白。

生质体分裂率达20%。如果培养基中只加入天门冬酰胺,增加细胞分裂数的比例超过三种混合液,并发现丝氨酸(浓度2—1mM)对原生质体有毒害。可见加入一些多胺等有机物可促进细胞分裂,对一些难以培养成功的原生质体值得借鉴。

原生质体的培养进展较快,自1971年 Nagata 等人培养烟草叶肉原生质体成植株以来,已有17种高等植物原生质体培养成再生植株,从高等植物草本到低等植物地钱类均有。成功例子对乔木的原生质体培养亦有报道。但尚未见到主要作物如禾谷类、棉花等成功的例子。这些作物原生质体分裂率较低,须加强研究以争取早日突破。

参 考 文 献

- [1] 罗士韦, 1980. 自然杂志, 1979 年鉴, 1. 54-72.
- [2] 钱迎倩, 1977. 植物学报, 9(4): 297-305.
- [3] 李文安, 1979. 植生通讯, 3: 50-57.
- [4] 上海植物生理研究所细胞生理室, 1973. 植物学报, 15(2): 285-307.
- [5] 植物生理所细胞杂交组, 1977. 遗传学报, 4(3): 233-247.
- [6] Watts, J. W. et al. 1974. *Ann Bot* 38: 667-671.
- [7] Constable, F. 1975. In "plast Tissue culture methods" Gamborg O. L. matter L. R (eds) OHawa Mational Rescarck Councel of canda 11-12.
- [8] Deka, C. et al. 1976. *M. G. G.* 165(4): 239-242.
- [9] Donn, G. 1978. *Z. Pflanzenphysiol* 86: 65-67.
- [10] Edward. 1979. *Plant Sci Lett.* 14: 145-154.
- [11] Larkin, P. T. 1976. *Planta.* 128: 213-216.
- [12] Haghese, B. G. 1978. *B. P. P.* 172(1.2): 67-77.
- [13] 黄祥辉等, 1980. 植物生理学报, 6(2): 207-211.
- [14] 王辅德, 1981. 植生通讯, 1: 59-60.
- [15] Raj, B. J. M. Herr 1970. *Exptl Cell Res.* 64: 479-480.
- [16] Glimelius K. et al. 1974. *Physiol. Plant.* 30: 564-569.
- [17] Taiz, L. R. L. Jones 1971. *Planta.* 101: 95-100.
- [18] 黄瑞心等, 1980. 实验生物学报, 14(1): 15-21.
- [19] Galston, A. W. et al. 1980. 北京国际分子生物学会文摘.
- [6] 张友会等, 1981. 中华医学杂志(即将发表).
- [7] Hersh, E. M. and Harris, J.E. 1968. *J. Immunol.* 100: 1184-1194.
- [8] Cline, M.J. and Swett, V.C. 1968. *J. Exp. Med.* 128: 1309-1325.
- [9] Geha, R.S., et al. 1979. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 76: 4038-4041.
- [10] Breard, J., et al. 1979. *Cell. Immunol.* 45: 108-119.
- [11] Stouwe, V. 1977. *J. Exp. Med.* 146: 1809-1814.
- [12] Rosenthal, A.S., et al. 1976. in "Immunobiology of the Macrophage" (ed. D. S. Nelson), Academic Press, pp 131-160.
- [13] Humphreys, R.E., et al. 1976. *J. Exp. Med.* 144: 98-112.
- [14] Bergholtz, B.O., et al. 1978. *Scand. J. Immunol.* 8: 63-73.
- [15] Quaranta, V., et al. 1980. *J. Immunol.* 125: 1421-1425.
- [16] McKinney, T.K., et al. 1980. *Exp. Hematol.* 8: 709-716.
- [17] Ng, A.K., Zhang, Y.H., et al. 1981. *Cell. Immunol.* (待发表)
- [18] Albrechtsen, D. 1977. *Scand. J. Immunol.* 6: 907-912.
- [19] Ko, H.S., et al. 1979. *J. Exp. Med.* 150: 246-255.
- [20] DeWolf, W.C., et al. 1979. *J. Immunol.* 122: 1780-1784.

(上接第 43 页)