

参 考 文 献

- [1] 夏镇澳, 1980, 生物科学动态 2: 13—18.
- [2] Butenko, R. G., 1979. *Int. Rev. Cytol.*, 59: 323—373.
- [3] Cocking, E. C., 1977. In "Plant growth regulation", 281—285.
- [4] Fowke, L. C. and O. L. Gamborg, 1980. *Int. Rev. Cytol.*, 68:9—51.
- [5] Power, J. B., 1977. In "The molecular biology of plant cell", 418—428.
- [6] Schieder, O. and I. K. Vasil 1980. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. 11B, 21—46.
- [7] Vasil, I. K. and V. Vasil, 1980. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. 11B, 1—20.
- [8] 陈季楚, 1981, 细胞生物学杂志 3, 11—140.
- [9] 黄祥辉, 1981, 植物生理学通讯, 1, 22—30.
- [10] Robenek, H. and Peveling, E., 1977, *Planta*, 136: 135—145.
- [11] Gidding, T. H. et al, 1980, *J. Cell Biol.*, 84: 327—339.
- [12] 中国科学院上海植物生理研究所, 1978, 植物组织和细胞培养, 第十四章 209—303.
- [13] Cooke, R. and Meyer, Y., 1981, *Planta*, 152: 1—7.
- [14] Fowke, L. C. et al., 1979, *Planta*, 144: 341—347.
- [15] 夏镇澳, 1979, 植物生理学通讯 3, 58—65.
- [16] Szabados, L. et al., 1981, *Planta*, 151: 141—145.

天 然 杀 伤 (NK) 细 胞

R. B. Herberman, MD

导 言

除免疫细胞毒 T 细胞、巨噬细胞和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) K 细胞以外, NK 细胞最近也被认为是细胞毒效应细胞家族中的成员。它们能对肿瘤细胞和其它一些类型的靶细胞起反应, 象是淋巴细胞的一个小的亚群, 具有一套特殊的细胞表面标志和形态学特征。

正常个体淋巴细胞对肿瘤细胞和培养的肿瘤细胞株的细胞毒效应, 最初是在寻找带瘤个体淋巴细胞对自身肿瘤的或相同组织和病因类型肿瘤的特异细胞毒活性研究过程中认识到的。在那些研究中, 人们设想正常个体淋巴样细胞将会是无反应的, 可以起基线对照的作用, 可是一些正常对照淋巴细胞对某些靶细胞的细胞毒, 实际上都超过了带瘤个体的淋巴细胞。这些异常的对照反应最初被认为是由于体外的人为现象, 不过后来证明大部分或所有这种反应性都是由 NK 细胞引起的。这些发现使得有必要重新评价癌瘤病人细胞的细胞毒反应, 以便从更特异的免疫效应细胞中区别出 NK 细胞的活性。

近几年, 一些实验室对人类和啮齿类的 NK 细胞已作了广泛的研究, 其中一些结果将概括在这里。有关天然细胞介导的细胞毒性和 NK 细胞更详细的情况, 读者应查阅最近的一些综述和这一课题的书。

方 法

对 NK 细胞活性的一些早期观察, 特别在人体中, 是用长期细胞毒性试验 ($^{125}\text{IudR}$ 释放试验或目测微量细胞毒性试验) 做的。为了详细地弄清 NK 细胞的特性和迅速得到定量的资料, 许多研究者已经改用短期 (通常 4 小时) ^{51}Cr 释放试验。靶细胞悬液用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 标记, ^{51}Cr 很容易进入细胞并与细胞内蛋白质共价结合。在 37°C 4 小时试验过程中, 大多数或所有的标记物都留在存活的、未受损细胞的内部, 而在细胞溶解或细胞表面膜遭受较大损害时, ^{51}Cr 则释放到介质中。因此, 介质中 ^{51}Cr 的量就表示所溶解的细胞数量。这种短期试验的主要条件是要求不断提供对迅速溶解相当敏感的一种靶细胞。就临床研究而言, 许多研究者现在使用的是来自慢性骨髓样白血病 (CML) 病人胸膜

渗出物的K562培养细胞株。大多数正常人在效靶比例为50:1或更高时,引起 ^{51}Cr 释放百分率很高。就小鼠NK活性的研究来说,多数研究者现在使用YAC-1细胞株(一株建自可移植性淋巴瘤的培养细胞株)。这株细胞对正常供体淋巴细胞迅速的致溶解作用极为敏感。虽然通常组织培养细胞株对NK活性的敏感性要比体内传代的肿瘤细胞高,但某些小鼠和大鼠腹水型淋巴瘤业已被用为良好的靶细胞。

正如下面所要讨论的,NK细胞与介导ADCC的K细胞属于抗肿瘤细胞的淋巴细胞同一亚群,实际上这两种细胞群可能是相同的。所以同时进行ADCC试验以确定这两种细胞毒活性之间的确切关系是重要的。ADCC试验通常用的是靶细胞特异的IgG抗体来致敏 ^{51}Cr 标记的靶细胞。具有IgG分子Fc受体的淋巴样细胞能结合到抗体覆盖的靶细胞上。带有Fc受体($\text{Fc}_\gamma\text{R}^+$)的细胞和靶细胞适当的结合导致在37°C迅速致溶解。好几种类型的细胞都带有 Fc_γR ,包括T细胞亚群、B细胞和单核细胞或巨噬细胞。能够引起抗体覆盖的靶细胞溶解的 $\text{Fc}_\gamma\text{R}^+$ 细胞类型取决于靶细胞的类型。虽然不同类型的 $\text{Fc}_\gamma\text{R}^+$ 细胞都可以使作为靶细胞的某种红细胞溶解,但唯有淋巴细胞亚群的K细胞才可以迅速地溶解哺乳类有核的靶细胞(通常指肿瘤细胞)。因此,大多数实验室在进行ADCC试验来测定K细胞活性时都使用肿瘤细胞株。临床研究上使用最多的靶细胞是用异种(通常指家兔)抗体覆盖的人的Chang氏肝细胞株或小鼠淋巴瘤。

大多数人体NK细胞和K细胞活性试验用的是肝素化外周血通常经Ficoll-Hypaque梯度离心分离出来的单核细胞。人脾脏细胞具有类似的活性,而淋巴结、扁桃腺或胸腺细胞对通常的靶细胞则几乎测不到活性。在用小鼠和大鼠所做的研究中最常用的是脾脏细胞,但同人类一样,外周血淋巴细胞也有良好的活性。淋巴结细胞显示出不同程度的反应性;胸腺细胞通常无反应活性。

为了定量测定那些经细胞分类或别的处理后的细胞毒活性,以单一效靶细胞比例来比较各部分的细胞毒性通常是不够要求的,因为细胞毒性剂量反应曲线在高比例时峰值呈平台状态,而在低比例时相当陡斜。正确比较具有类似细胞毒性斜率的不同细胞样品,适当的方法是计算溶解单位。在剂量反应曲线线性部分中,产生一定溶解百分率(通常为20—30%)所需的细胞数称为1个溶解单位。在试验中溶解单位/ 10^7 细胞的计算提供了不同淋巴细胞样品间专一活性的定量的、相对的比较。总的溶解单位(溶解单位/ 10^7 细胞 \times 某一部分的细胞数)表示未分类过的细胞活性在不同的亚群中是如何分布的。

NK细胞的特征及其与K细胞的关系

根据早期细胞分类的研究,NK细胞象是null细胞,即缺乏T细胞或B细胞标志特征的细胞。可是按照T淋巴细胞形成E玫瑰花的最适条件来分析,又发现大多数人的NK细胞对红细胞(E)受体具有低亲和力。人NK细胞为T细胞系的成员,是通过用抗T细胞特异血清加补体处理后使细胞毒活性实际消失而证实的。然而在无胸腺小鼠中也发现了高水平的NK活性,这又似乎支持NK细胞的非T细胞性质。但是最近的报道已经表明,用高浓度抗Thy1血清加补体处理,或反复处理,就消除了这种小鼠细胞中大部分的NK活性。此外,应用抗Thy1单克隆抗体和荧光激活细胞分离器可以从无胸腺小鼠或常用小鼠实实在在地选择出部分NK细胞。这样看来,某些小鼠NK细胞具有低密度Thy1抗原,而且这些效应细胞是与T细胞有关的世系,也许是前胸腺细胞或胸腺不依赖性T细胞。

NK细胞的另一种表面标志是 Fc_γR 。在人NK细胞表面很容易测到 Fc_γR ,去尽 $\text{Fc}_\gamma\text{R}^+$ 细胞的一些步骤导致NK活性的实际消失。小鼠和大鼠的NK细胞虽然最初看来象是缺乏 Fc_γR ,经用更敏感的去尽 Fc_γR 步骤时,就去除了二分之一以上NK溶解单位。在所研究的每一种种属动

物的NK细胞都发现有Fc_γR,使NK细胞和介导ADCC的K细胞之间的关系又成为问题。一种可能的解释是,NK活性由体内结合着天然抗体“武装的”K细胞所产生的,或由对靶细胞起反应的K细胞所产生,这些靶细胞在体外试验期间被分泌的抗体所包被。可是我的实验室和其他实验室的深入研究未能证实IgG参与天然细胞介导的细胞毒性。尽管如此,NK细胞和K细胞看来是相同的淋巴细胞亚群,并具有许多共同的特征。根据对NK活性敏感的一些靶细胞能抑制ADCC的实验来看,NK和ADCC活性可能是由相同细胞介导的;也许是这些细胞能通过Fc_γR与抗体覆盖的靶细胞相互作用,或通过单独的“NK受体”与靶细胞相互作用,从而产生细胞毒效应。

几乎在所有的NK细胞研究中,效应细胞都是按其功能特征来确定的,因为这些细胞并未显示特有的表面标志。不过Timonen等最近发现,与NK敏感的靶细胞相结合从而形成了结合体的大多数人淋巴细胞,是大颗粒淋巴细胞(LGL_s),它具有锯齿形细胞核,在细胞质中存在显著的嗜天青颗粒。

已经有可能用不连续的Percoll密度梯度离心来富集LGL_s。最近我们应用这个步骤较好地表明了人NK细胞的特性,发现大部分NK或ADCC活性存在于含有75—85%LGL_s的部分,而在外周血淋巴细胞中这些部分则只占10—20%。相反,在含有大部分为小-中型淋巴细胞部分实际上已经不显示NK或ADCC活性。这个步骤至少可以靠得住地把NK和ADCC活性增强5倍。LGL_s担负细胞毒活性的可能性得到一些实验观察的支持,即约50%LGL_s能与K₅₆₂细胞形成结合体,而且形成结合体的LGL_s大多数具有杀伤贴壁靶细胞的能力。此外在应用粘附于免疫复合物单层来检测时,还发现几乎所有的LGL_s都含有Fc_γR。

因此人的NK_s看来具有一种特有的形态。ADCC活性与LGL_s相关为NK和ADCC活性属相同细胞性质的设想提供了进一步的证据。

大鼠脾脏和外周血中的NK细胞也象是LGL_s,并可按用于人NK细胞的类似步骤来加以富集。相反,小鼠脾脏或外周血中测不到LGL_s,也尚未发现能把小鼠NK细胞与别的淋巴细胞相区分的任何形态学特征。

天然细胞毒性的特异性

天然细胞毒性的特异性是一个要考虑的重要问题。大多数有关啮齿类动物NK细胞的早期研究使用的是白血病或淋巴瘤靶细胞,最初以为只有这些细胞是对NK活性敏感的。可是人NK细胞的许多观察开始是在癌的单层细胞株进行的,这样的资料提示NK细胞实际上也许有范围广泛的反应性。这一点经用各种不同的细胞对NK活性易感性的深入研究业已得到证实。一些肉瘤和癌,包括某些人原发性肿瘤和细胞株在内,都对NK活性是敏感的。通常体外肿瘤细胞株对NK细胞的致溶解作用较敏感,但某些体内肿瘤细胞也有同样的敏感性。此外,尽管最初似乎认为NK反应性只局限于同种靶细胞,但是已经发现小鼠和大鼠NK细胞对某些人细胞株也有活性;不过人NK细胞对啮齿类动物靶细胞的反应性通常是较少见的。也有人指出NK活性不限于肿瘤细胞范围,某些正常类型细胞对NK细胞的致溶解作用也有些敏感性。

已经知道NK细胞具有相当广泛范围的反应性之后,接着就产生了这样的问题,即究竟是一种NK受体对所有易感的靶细胞不加区别地起反应,还是有各种不同的NK受体对靶细胞上一系列可能存在的抗原具有特异性。有几方面的证据是支持后一种可能性的。许多有关的资料是通过冷靶抑制试验获得的。这种试验包括把不同的未标记的靶细胞加到效应细胞和⁵¹Cr标记的靶细胞的混合物中,能与介导标记靶细胞溶解的NK细胞相互作用的细胞就竞争地抑制了⁵¹Cr的释放。在这样的研究中使用不同的标记靶细胞时,发现有不同形式的抑制作用;有些细胞能很强烈地抑制某种靶细胞溶解,但对别的靶细胞几乎没有抑制活性。此外,不同品系小鼠的NK细胞对某些种靶细胞的反应

中有较大的差异,而对另外一些种类的靶细胞又不存在差别。还有鉴于小鼠NK细胞和体内细胞介导的抗骨髓作用之间存在显著的平行关系,看来NK细胞很可能特异地识别遗传决定的Hh组织相容性抗原。

NK细胞中存在识别不同靶细胞的异质性能的直接证据,是来自对单层靶细胞选择性吸附后的人NK细胞的研究。在一次这样的研究中,把7例正常人外周血淋巴细胞(PBLs)与NK易感的5种不同细胞株的单层细胞温育,然后测试非粘附细胞对每种靶细胞所残留的细胞毒性。结果发现,实际上对吸收过的每种细胞株的所有反应性都可以被去掉;可是有5例正常人选择性吸收过的细胞对不止一种别的靶细胞仍有很大的反应性。这些资料似乎证实,NK细胞能识别靶细胞上种种特异性抗原,而且也证实NK细胞的识别结构是克隆分布的。

影响NK和K细胞活性水平的一些因素

小鼠和大鼠NK细胞和K细胞的活性水平是依照一种特有的年龄相关模式出现的。反应活性开始出现于3—4周龄,5—10周龄时达到峰值,随后下降到低水平;在不同品系中NK细胞和K细胞活性水平也有很大的差异。人体中的NK细胞活性其年龄相关的因素并不这么清楚,甚至有些脐带血的样品也发现有活性。正常人的反应水平有相当大的差别,其中一些业经表明是受HLA表型的影响。

确定NK细胞和K细胞活性与年龄相关的遗传差异的机制,以及环境因素是否可能影响这些活性,都成为使人深感兴趣的问题。最初所得到的一些线索是,小鼠经注射各种病毒、免疫佐剂(如BCG或C.P)或对NK活性易感的一些肿瘤细胞之后,都能使反应性出现、快速和有利的增强。发现Poly I:C(一种有效的干扰素诱导剂)能显著促进大鼠NK活性,从而提出了这样的可能性,即干扰素也许在激活NK细胞中起主要作用。已发现各种干扰素诱导剂都能增强小鼠NK活性,在注射干扰素本身的

3小时内就已导致NK活性的升高。小鼠脾脏细胞与Poly I:C或干扰素温育后,也能引起NK活性明显增加。用人NK细胞和K细胞也做了类似的观察:把Poly I:C用于一些病人,两天后引起细胞毒性水平的增加;人PBLs与三种不同的干扰素制品温育1小时或18小时,引起了大多数供体NK细胞和K细胞活性的增加。为干扰素所介导的这些效应已在小鼠和人体的研究中得到证实,即用抗干扰素抗体能消除干扰素制品或Poly I:C的增强效应。另外,在人体研究中表明,抗干扰素抗体引起NK和ADCC活性水平下降到自发水平以下。这样的一些资料提示,干扰素可能在这些效应细胞的自发激活方面,或者至少在维持它们的活性中起着重要的作用。

在上述研究过程中,关于干扰素是否确实是在增强细胞毒活性中起作用的分子仍旧受到关注,因为在所有这些制品的总蛋白中抗病毒物质实际上还不到1—10%。为了更明确干扰素的作用,最近我们用纯的人白细胞干扰素做了一些实验。将人的淋巴细胞与这种均质的蛋白于37℃温育1小时,引起NK活性明显的增强,从而证实了干扰素对NK活性的正调节作用。

由Roder和Duwe所报道的关于遗传调节小鼠NK活性,是一项非常使人感兴趣的发现。它表明beige点突变与NK活性有选择性的和严重的缺陷相关。接着我们发现beige小鼠还有些残留的NK活性,水平与低NK品系相似,而经干扰素处理beige小鼠的脾脏细胞则引起NK活性的一些增强。

尽管beige突变并不导致NK活性的完全丧失,但是与这种基因相关的选择性缺陷对于参与这种形式的细胞介导细胞毒性的机制可以提供一种重要的线索。小鼠beige突变引起的异常类似于人的色素缺乏易感性增高综合症(Chédiak-Higashi综合症)。我们最近与Roder和Fauci合作研究了患这种综合症病人的细胞,在以对NK高度易感的靶细胞株K562作4小时

测定时,显示出NK活性明显地受到抑制。正如beige小鼠的情况一样,这种缺陷看来对NK活性是有选择性的,而用干扰素预处理细胞或经较长时间测试后则活性有所增加。不过这种综合症病人NK反应性的缺陷远远地超过beige小鼠;另外引人注意的是,这种综合症伴随着淋巴细胞增生症的高发病率。观察到Chediak-Higashi病人的淋巴细胞在与环核苷酸、鸟苷一磷酸预温育能使NK反应回复到正常水平是有关NK活性缺陷的性质的一项重要线索。

NK细胞的体内作用

关于NK细胞有待解决的最重要的实际问题是它们在体内的作用。日益增长的证据表明,NK细胞可能在抗肿瘤生长以及在骨髓移植中的排斥中起着重要作用。为了获得NK细胞在体内迅速消除肿瘤细胞作用的更直接资料,我们曾检查了NK活性水平和小鼠破坏那些经静脉接种并以 $^{125}\text{TudR}$ 作预标记的肿瘤细胞的能力之间的相互关系。在具有高NK活性品系的幼鼠中,接种 $^{125}\text{TudR}$ 标记的瘤细胞后2—4小时测定不同的器官时,回收的放射性比在低NK活性品系中见到的有较大的下降。在所检查的不同器官中,肺中清除肿瘤细胞的程度与脾脏NK活性水平十分有关。从具有中等到高水平NK活性幼鼠的肺中回收的放射性比低NK活性品系中所见到的要小好几倍。这些发现使我们预期可从肺中分离到NK细胞;从剪碎的肺组织所制备的细胞悬液中确已可能检测到具有NK细胞特征的效应细胞。肺中测到的NK活性水平与脾脏相似,因而与肺在体内清除肿瘤细胞的程度也十分相关。肺中NK反应性和这一器官迅速排除肿瘤细胞能力的一致性提出了引人兴趣的可能,即NK细胞也许在抗肿瘤的转移中起着一种特别重要的作用。

与10—12周龄后小鼠NK活性下降的同时,这些动物在体内清除静脉接种的瘤细胞能力随之下降。用其它增强或减弱体外细胞反应性的方法处理小鼠,也引起体内反应性类似的

改变。这种体内试验与NK细胞对各种肿瘤细胞株的反应性密切相关,并与对NK活性敏感的一些正常细胞的反应性也密切相关。

现在特别重要的是要获得NK细胞可能在体内抗原发性肿瘤作用的资料。免疫监视理论原先的概念着重于免疫反应的主要作用是作为防御肿瘤的天然屏障,只是晚近有所改变,强调了胸腺依赖的免疫性与免疫监视的关系。正是这种改变激起了对免疫监视概念一系列的评论,甚至导致与免疫刺激相反的理论。很多注意力趋向于对免疫监视理论明显矛盾的两个事实:nude小鼠中肿瘤发生率相当低,以及切除胸腺的小鼠不发生某些肿瘤。尽管这些资料对修改了的免疫监视概念确实提出了挑战,因为根据这一理论胸腺依赖的免疫反应是有效地抗御肿瘤所必需的,可是它们并没有真正地影响到这一理论本身的基础。nude小鼠以及切除胸腺的新生小鼠和大鼠都具有高水平的NK和ADCC活性(为免疫监视提出了另一有效的可能机制),这一发现为已有的大多数体内资料提供了良好的解释。

免疫缺陷或免疫受压抑人群中肿瘤发生率可供利用的资料也引起了对免疫监视作用的争论。在若干免疫性受抑制的情况下,某些类型肿瘤的发生率,特别是网状内皮系统肿瘤发生率明显增加。可是在与免疫抑制有关的其他疾病中,如麻风病人则未观察到癌瘤发生率的上升。这一差异或许与疾病的不同效应有关,也可能与免疫抑制影响NK和ADCC活性及其它可能的防御机制有关。因此在不同的条件下仔细评价这些效应细胞功能的水平,以便确定它们当中任何一种效应细胞是否与这些病人中肿瘤发生率相关将是十分重要的。

对免疫监视概念其它主要的挑战是,与病毒诱发的肿瘤抗原性相反,自发肿瘤常常测不到抗原性,因此自发肿瘤或许对免疫系统的控制不敏感。已经有许多工作发现,在体外出现的肿瘤细胞其抗原性不比体内肿瘤的抗原性强;曾预期到体内免疫系统对弱的或不存

瘤相关抗原的肿瘤有所选择。不过几乎所有否定的证据,都是通过检测抗移植以及通常与免疫T细胞活性相关的其它免疫反应所设计的一些步骤获得的。假使正如本文所提出的,在免疫监视中有NK细胞和K细胞作用的话,那么提出抗原性和抗肿瘤生长等问题就必须依据检

测这种功能以及免疫T细胞介导细胞毒性的功能所设计的方案。

王球达译自 In: The Lymphocyte eds.
by Sell, KW, & Miller, WV. p 33—43.
NY. Alan R. Liss, Inc. 1981. 姚曾序校



黄地老虎颗粒体病毒的研究

III. 黄地老虎颗粒体病毒的酶联免疫分析

石玉瑚 吴祖银

(新疆农科院微生物研究所, 乌鲁木齐)

邱并生 徐绍华 王小凤 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

黄地老虎颗粒体病毒(*Agrotis segetum granulosis virus* 简称 AsGV)已在防治黄地老虎的危害上获得成功,其杀虫率达95%以上,具有无残毒、用药少、经济简便和长效等优点^[1]。我们已对AsGV在黄地老虎细胞中的超微结构,AsGV的包涵体,病毒粒子的分离提纯及其形态结构作了报道^[2-3]。酶联免疫法是近年来发展起来的一种新的血清学技术,具有特异性强,灵敏度高,操作简便等优点,既适用于昆虫病毒潜伏性感染,病毒复制和区分昆虫病毒的种属关系等理论研究,也可以作为实际应用中的残毒分析,产品剂量标准化及田间普查的一种定性定量的监测手段。但是与植物病毒和其他动物病毒比较,ELISA法在昆虫病毒方面的工作不多^[4-8]。

本文用ELISA的双抗体夹心法分析了AsGV侵染黄地老虎幼虫后不同时期各组织内的AsGV的含量,并用酶联免疫组化进行定位测定。

材 料 和 方 法

(一) 抗原制备 感染AsGV的黄地老虎幼虫的病虫体,用1.5体积的蒸馏水浸泡腐败,匀浆过滤,以2,000转/分10分钟与10,000转/分30分钟的差速离心,2次10—70%(V/V)的甘油梯度离心(3,200转/分40分钟)和1次10—70%(W/V)的蔗糖梯度离心(8,000转/分50分钟),获得纯化的AsGV包涵体,试验细节和纯度检查参见前文^[3]。

(二) 兔抗AsGV包涵体血清的制备及其IgG的提纯 用提纯的AsGV包涵体免疫家兔,1毫升(3毫克)抗原加等量的Freund全佐剂乳化后,肌肉注射,每次注射间隔一星期,共注射3次,末次注射后3周采血,抗血清效价经试管沉淀法测定为1:1024。

从抗血清中用33%饱和度的硫酸铵粗提IgG,用DEAE-纤维素(DE-32)纯化^[9]。

(三) 标记抗体的制备和测定 采用过碘酸盐氧化法把辣根过氧化物酶标记到抗AsGV的IgG上用双抗体夹心法测定抗原^[9]。

新疆农科院微生物所严民范同志参加实验工作,文中电镜照片系由中国科学院微生物所技术室拍摄,一并在此致谢。