

在不同分化阶段的典型性协同表达方面的知识也很贫乏,因此必须研究预示不同细胞谱系的不同的受体组。首先必须分离出受体并与最近的膜环境一起研究其特征(分离出作为传递信号的功能单位,即载有受体的区域);其次,应研究细胞外部的微环境,以便了解信号分子的一些性质。

应确切证实质膜是由不同的功能单位组成的异质结构。我们自己的实验是支持质膜是异

质的观点的。下一步应把带有A型细胞分化受体的质膜区参入到另一谱系(B型)的完整细胞中去。因而,决定性的实验应是在A型分化受体以其适宜的启动分子激发之后,把B型细胞转变成A型细胞。

(赵季英、夏邦颖译自 *Differentiation* Vol 8, No. 2 123—132 1977
刘黎校)



小牛胸腺素 F₅ 提取和活性测定方法的改进及其性质的研究

刘士廉 许成素 崔莲仙 杨桂珍 张淑珍

(中国医学科学院基础医学研究所)

孙芝琳 孙泽芳

(四川医学院、生化教研组)

前 言

胸腺对机体免疫特别是细胞免疫的演化、成熟和功能调节作用的研究是当代免疫学的一个重大进展。1972年 Goldstein 等从小牛胸腺中成功地提纯了具有生物活性的多肽,命名为胸腺素(Thymosin)^[1]。胸腺素 F₅(Thymosin Fraction 5 即第五步提取得到的半纯品,以下简称 F₅),在先天性无胸腺鼠^[2],去除胸腺成熟鼠^[2,3],有严重自家免疫反应的 NZB 小鼠^[2,4],带瘤小鼠^[5,6,7],以及由酪蛋白诱发的淀粉样变性症的小鼠中^[8],具有诱导 T 细胞分化和加强免疫功能的作用。在患先天性免疫缺陷患者及免疫功能下降的肿瘤患者中试用,显示有提高 T 细胞数值和恢复免疫功能的作用^[9-12]。

鉴于胸腺素有上述调节细胞免疫的重要作用 and 当前我国实验室、生产单位的具体条件限制,我们对原作者的提取方法做了简化和改进,

对所得产品作了一些生物化学和免疫化学的分析,并采用新生儿脐带血建立了一个体外检测活性的 E 玫瑰花结方法,前已做过初步报道^[13],现将全文报告如下。

材 料 和 方 法

一、胸腺来源:

取新生小公牛胸腺,剥离周围结缔组织,新鲜使用或于 -20℃ 冷藏,备用。

二、提取纯化步骤:

由小牛胸腺组织中提取纯化胸腺素 F₅ 的流程见图 1,除加热步骤外均在 0—4℃ 下进行。

称小牛胸腺 1500 克,加冷生理盐水 4500 毫升,辛醇 22.5 毫升(最终浓度为 0.5%),用高速打碎机匀浆 3 分钟,1500×g 离心 30 分钟,上清液用四层纱布过滤,去除脂肪,此为第 1 组份(F₁)。置滤液于沸水浴中搅拌加热,至 80℃ 后立即置冰浴中冷却至 4℃,1500×g 离心 30 分钟,取上清液,此为第 2 组份(F₂)。

加硫酸铵达 25% 饱和度，搅拌 1 小时，用纸浆漏斗抽滤，得清亮淡黄色滤液，此为第 3 组份(F₃)。用 20% HAC 调至 pH4，再加硫酸铵达 50% 饱和度，搅拌 1 小时，1500 × g 离心 30 分钟，取沉淀，用少量 -15℃ 丙酮洗至呈白色粉末，真空减压干燥除去丙酮，得干燥粉末约 10 克，此为第 4 组份(F₄)。取 2 克 F₄，加少量(小于 Sephadex G-150 柱床体积的 3%) 0.1M pH 8.4 Tris-HCl 缓冲液溶解，搅拌 30

分钟，4000 × g 离心 30 分钟，取上清液，过 Sephadex G-150 柱，用 0.02M pH7.2 的磷酸缓冲液洗脱，流速为每小时 15 毫升，每管收集 5 毫升，测 276mμ 光密度值(OD270mμ) 得 4 个洗脱峰，收集第 3 峰，并浓缩至一定体积，过 Sephadex G-25 柱，用蒸馏水洗脱去盐，流速为每小时 9 毫升，每管收集 3 毫升，得两个 OD276mμ 洗脱峰，收集第 1 峰，冷冻干燥得白色粉末，即为第 5 组份(F₅)。

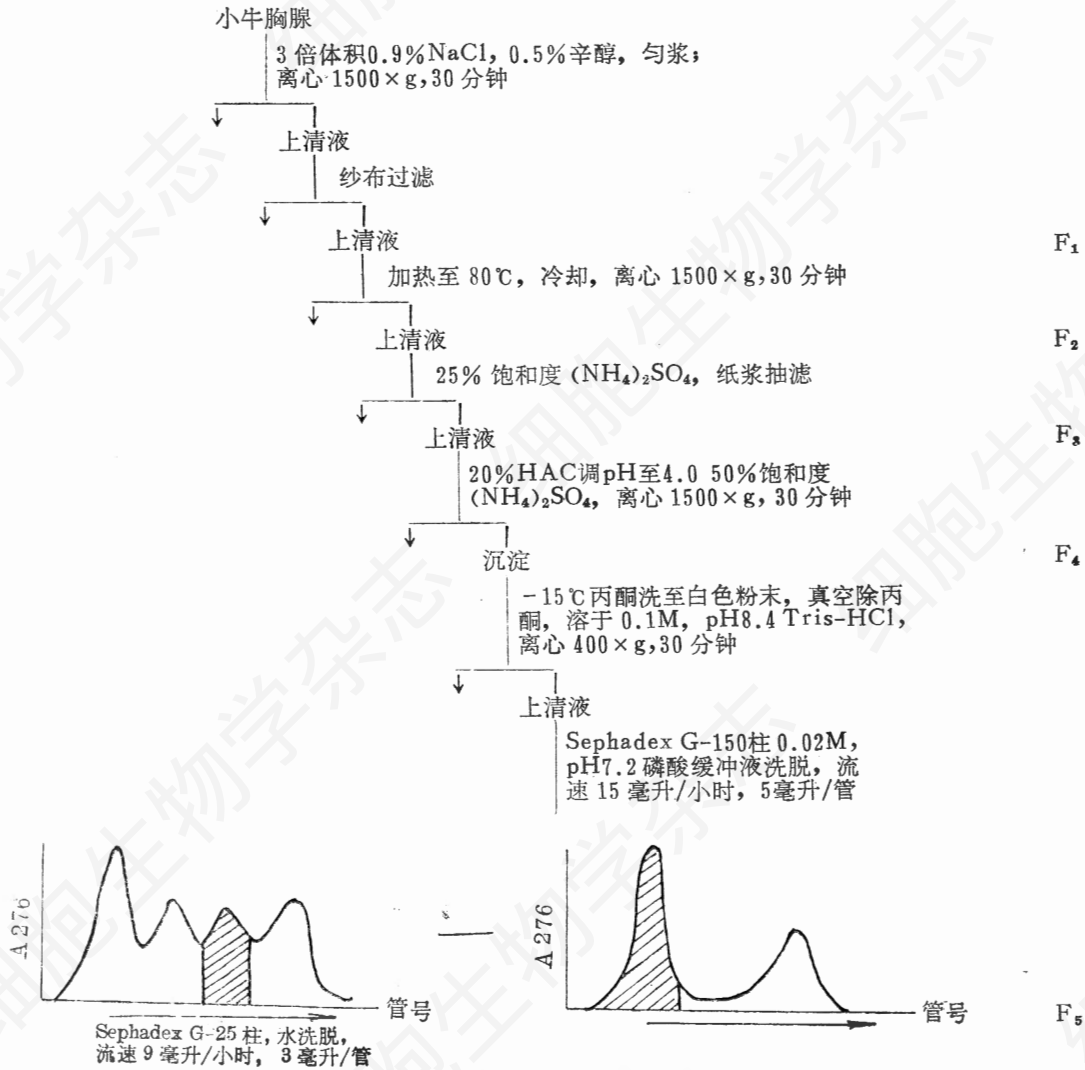


图 1 “胸腺素 F₅”分离提取流程示意图

三、胸腺素 E 玫瑰花结生物活性测定法

取适量新鲜新生儿脐带血，基本按本组微

量 E 玫瑰花结法^[14]进行处理，最后制得每毫升含 8 × 10⁵ 淋巴细胞 pH7.2 无钙镁 Hanks 生理盐水的白细胞悬液。取 0.5 毫升白细胞悬

液,加入胸腺素 F_0 (使最终浓度为 0.44—2.00 毫克干粉/毫升), 37°C 保温 10 分钟,加 1% 绵羊红血球 0.05 毫升(淋巴细胞:绵羊红血球 < 1:50), $200\times g$ 离心 5 分钟,置 4°C 冰箱过夜。次晨吸弃上清液,留残液一滴,轻轻悬起细胞,加 0.6% pH7.2 戊二醛一滴,固定 10 分钟,再加 1:4 稀释的姬姆萨染液一滴染色 15 分钟后读数,计算 200 个淋巴细胞内的玫瑰花结形成细胞百分数(SRFC%)。

四、生物化学分析

1. 胸腺素 F_0 的主要化学成份的鉴定:测蛋白质含量按 Lawry 法^[15],测 DNA 含量按二苯胺法^[16],测磷含量按 Fiske—Subbarow 法^[17]。

2. 胸腺素 F_0 的聚丙烯酰胺凝胶电泳行为:按应启龙简化之方法^[18]略加修改进行测定,采用的凝胶柱含 10% 的单体,交联度为 1%,电极液为 0.025M pH9.0 硼砂缓冲液,电泳时稳流,每柱 2 毫安,泳动时间以作标记之溴酚兰不泳动出胶柱为度,约 1 小时。

3. 胸腺素分子量的测定:按 Hooper 等凝胶法^[19]略加修改进行,胶柱的单体浓度为 15%,交联度为 2%,含 0.1% SDS,电极液为含 0.1% SDS 的 pH6.8, 0.1M 磷酸缓冲液,电泳时稳流,每柱 7—8 毫安,泳动约 7 小时,胶柱用考马斯亮兰 R250 染色。

4. 胸腺素 F_0 的凝胶聚焦电泳:采用应启龙简化的胶柱上等电聚焦法^[20]略加修改进行,胶柱含 7.3% 单体,交联度为 3.8%,两性介质为 3%。以 0.5% 硫酸溶液为正极液,0.5% 氢氧化钠溶液为负极液,电泳时稳压在 250V,电泳 8 小时结束,即固定染色或行 pH 测定。

五、免疫化学分析

1. 抗血清制备:用 F_0 及 F_1 免疫家兔,抗原 0.5 毫升含蛋白质约为 0.4—1.2 毫克,加 Freund's 全佐剂 0.5 毫升乳化,于家兔双后足底皮内注射。10—14 天后强化免疫,于双侧

腋窝淋巴结内注射抗原 0.5 毫升,以后每两周强化一次。用 F_0 免疫时,一般强化 1—2 次即可获得免疫分析鉴定用的抗血清。 F_1 免疫时,则需 5—7 次强化注射,末次免疫后 7 天采血,加 NaN_3 至 1/5000,置 4°C 备用。

2. 免疫分析鉴定方法:为免疫电泳法^[21]及交叉免疫电泳法^[22]。

结果和讨论

1972 年 Goldstein 等^[1]所报道的提取分离胸腺素 F_0 的方法中,需要有超速离心机、高速离心机等设备,并需用大量丙酮。在我国目前一般的研究机构及生产单位中,因条件的限制,这些方法均不能推广使用,因此我们在分离小牛胸腺素时,一开始即着眼于提取方法的简化,目的在使一般生化实验室有可能自己制备,并为成批生产打下基础,对 Goldstein 等法^[1]所作的改进是逐次取消了超速离心、高速离心和丙酮沉淀等步骤,得到的产品与原著者报告的基本一致,从而使提纯过程明显缩短和简化。1975 年 Hooper 等也报道以超滤技术代替超速离心等步骤,但目前我国自产超滤装置及超滤膜尚不能满足该项技术要求,故本文报告的改进的方法,对在国内开展胸腺素的研究和临床试用可能有一定意义。

用本文报告的方法,2 克的 F_0 经 Sephadex G-150 柱层析,可得 4 个洗脱峰,其第 3 峰再经 Sephadex G-25 柱脱盐,得 2 个洗脱峰,其第 1 峰为不含核苷酸,无机磷的有刺激淋巴细胞活性的蛋白质类产品。产量约为每公斤胸腺得 F_0 200—250 毫克。

基于我们先前多次观察到的,新生儿脐带血淋巴细胞与绵羊红血球结合成玫瑰花结的百分率明显低于正常或成年人^[23]的现象,我们用新生儿脐带血 E 玫瑰花结法测定胸腺素生物活性,大量实验结果证明,这一方法较之用免疫缺陷患者血清有来源易得,测定方便,重复性好的优点,表一为 15 批胸腺素 F_0 活性的测定结果。

表1 胸腺素 F₅ 对新生儿脐带血 E 玫瑰花结形成的影响*

批号	制备时间 [≠]	制备方法	“胸腺素 F ₅ ”用量 (毫克[干重]/毫升)	SRFC %		
				对照	加“胸腺素 F ₅ ”	提高 %
1	1973年	Goldstein 等 1972 年法	1.50	25	36	44
2	1973年	Goldstein 等 1972 年法	0.90	9	24	167
3	1976年	删去超速离心步骤	0.80	5	34	580
4	1976年	删去超速离心步骤	0.74	5	32	540
5	1976年	删去超速离心步骤	0.80	5	24	380
6	1976年	删去超速离心步骤	0.72	5	23	360
7	1976年	删去超速离心步骤	0.76	10	26	160
8	1976年	删去超速离心步骤	2.00	6	15	150
9	1976年	删去超速离心步骤	0.60	9	28	211
10	1977年	删去超速离心步骤	0.66	7	40	471
11	1977年	再删去高速离心步骤	0.44	25	46	84
12	1977年	再删去高速离心步骤	1.52	25	43	72
13	1977年	再删去高速离心步骤	0.80	10	26	160
14	1977年	再删去高速离心步骤	0.80	10	37	270
15	1977年	再删去大量丙酮沉淀步骤	0.46	25	43	72

* 每次活性测定时,均做剂量活性曲线,所列用量为毫克/毫升(以 F₅ 重量表示)为得到最高 SRFC% 的浓度。

≠ 制备胸腺素 F₃ 或 F₄ 的时间。由 F₃ 或 F₄ 制成 F₅ 均在 1977 年。

胸腺素 F₅ 生物活性大小可根据反应系统中胸腺素的用量来表示。小牛胸腺素 F₅ 是一种比较稳定的物质,在 -17℃ 冷藏约 4 年之久的 F₅ 纯化后,仍保持有生物活性。同一年限制备的各批 F₅ 所得 E 玫瑰花结百分数与提高率不尽一致,这可能与脐血的个体差异,实验条件,不同批胸腺组织有关。

胸腺素 F₅ 可使不成熟的 T₀ 分化为成熟的 T₁ 细胞^[24], 可使典型的玫瑰花结增高^[25], 可使外周血的活性 T 玫瑰花结增高^[26]。在我们测定活性的过程中,也见到典型的玫瑰花结有明显增加的现象,由于胸腺素 F₅ 与脐血淋巴细胞在 37℃ 温育短短的 10 分钟就表现出更多的羊红细胞受体,推测它们并不需要 RNA 或蛋白质的合成,或可能是一种去抑制或激活的作用机制。

胸腺素 F₅ 在 pH 9.0 的聚丙烯酰胺凝胶柱上的电泳行为(见图 2)。可见到染色深浅及迁移率不同的十几条色带,在凝胶柱的正极端,显示有两条染色深而宽的分子量小的区带。

以胰岛素、溶菌酶、人珠蛋白及卵清蛋白

等为标准,测得我们简化法制得的 F₅ 的分子量范围在 15000 以下,其等电聚焦结果(如图 3)大部分区带的 PI 值在 5.0 以下,与 Goldstein 等人报告基本一致^[27]。

以 F₅ 制备抗血清,应用免疫交叉免疫电泳检查 F₅ 产品显示出多条沉淀带,明显者在八条以上,其中牛血清蛋白质含量较多(见图 5)。

用胸腺素 F₅ 制备抗血清时,需要 3 个月左右的强化才能获得较高效价可用于实验的抗血清,这提示 F₅ 中所含蛋白质的抗原性较弱。F₃ 及 F₅ 经免疫交叉电泳或免疫电泳分析,至少含有 3—5 种电

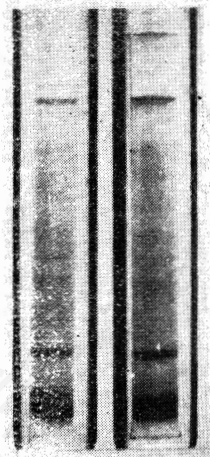


图 2 F₅ 的聚丙烯酰胺电泳分析图谱

左侧为按本文制备法的 F₅, 右侧为除未用超速外其余步骤均按 Goldstein 等 1972 年法所得产品

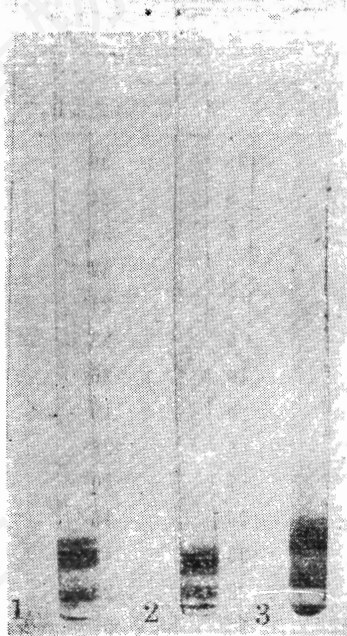


图3 胸腺素 F_5 凝胶聚焦电泳图
自左向右

1. 删去超速离心步骤的 F_5 样品；
2. 删去超速、高速离心步骤的 F_5 样品；
3. 删去超速、高速离心、丙酮沉淀制备的 F_5 样品。

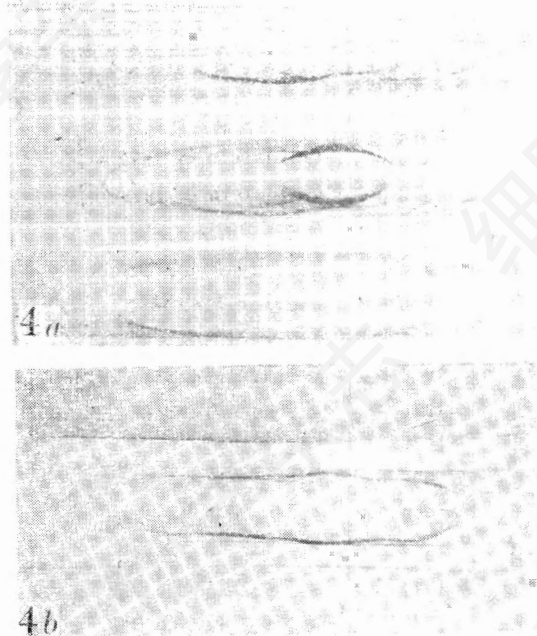


图4 胸腺素 F_5 与 F_6 免疫电泳图

- a. 抗原：上孔加第11批胸腺素 F_5 ，中孔加同量第11批胸腺素 F_5 和牛血清(1:1)1微升，下孔加第9批胸腺素 F_5 ，抗体槽为抗胸腺素 F_5 血清。
- b. 抗原：上孔加第8批胸腺素 F_5 ，中孔加第14批胸腺素 F_5 ，下孔加牛血清(1:1)1微升，抗体槽为抗胸腺素 F_5 血清。

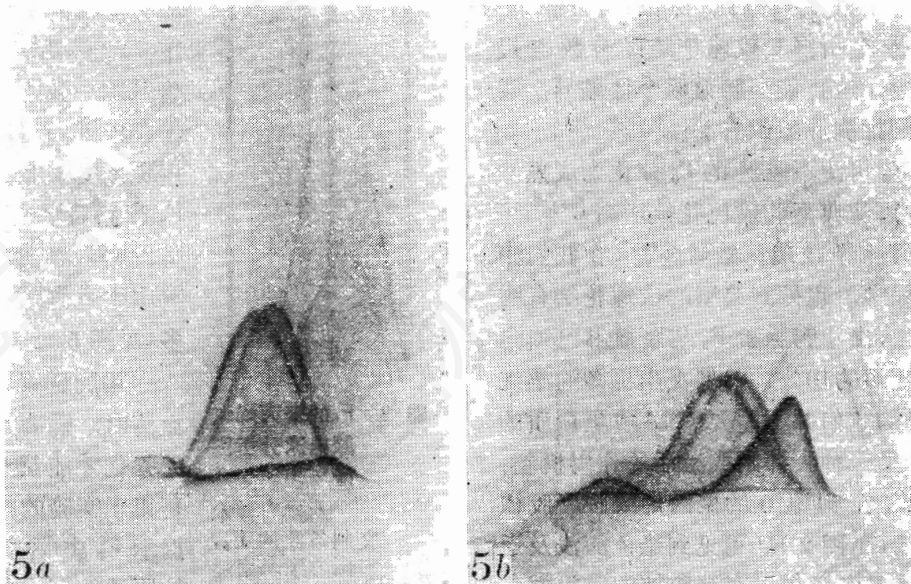


图5 胸腺素 F_5 交叉免疫电泳图

- a. 抗原孔加第9批胸腺素 F_5 ，以含适量抗 F_5 血清的琼脂制抗体板。
- b. 同上条件，但抗原孔加第9批胸腺素 F_5 加上1:1牛血清1微升。

泳迁移率较牛血清白蛋白为快, 抗原性较弱的成份(见图4、5), 这与聚丙烯酰胺凝胶电泳分析的结果一致。

在本实验条件下, 胸腺素 F_3 与抗 F_3 血清免疫电泳出现了5—7条沉淀带, 沉淀带出现较慢且较弱。牛血清与 F_3 抗血清对照实验未见有沉淀带。证明经进一步分离纯化后已除去了原含量较多的牛血清蛋白质部分, 我们认为免疫电泳分析, 不需要特殊设备, 方法简便, 较易掌握, 且具有特异性, 因此, 该方法可以考虑作为纯度检定的一个参考指标。

从以上生物活性, 生物化学以及免疫化学分析所得到的结果中, 我们认为本文报道的改进方法所获得的胸腺素 F_3 是一组有生物活性的, 抗原性弱的多肽。该方法为制备 F_3 供初步临床试用或作进一步深入研究的材料提供了比较简便易行的条件。

小 结

本文对Goldstein等人分离提纯小牛胸腺素 F_3 的方法进行了改进和简化。简化后的步骤不需要使用超速和高速离心机以及大量丙酮沉淀, 从而使提取流程明显缩短。所得制品的生物化学性质与原作者基本一致, 主要组分为分子量在15000以下的多肽。免疫分析显示胸腺素 F_3 抗原性很弱, 免疫电泳结果说明产品基本不含牛血清白蛋白。应用人新生儿脐带血淋巴细胞所建立体外测定胸腺素生物活性的玫瑰花结法, 较之其他作者应用免疫缺陷患者外周血的方法具有来源易得、简便易行的优点。

参 考 资 料

- [1] Goldstein, A. L. et al., 1972, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 1800.
- [2] Thurman, G. B. et al., 1975, *Transplant. Proc.*, 7, 299.
- [3] Bach, J. F. et al., 1971, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 2734.
- [4] Dauphinee, M. J. et al., 1974, *ibid* 71, 2637.
- [5] Ziblatt, M. et al., 1970, *ibid* 66, 1170.
- [6] Hardy, M. A. et al., 1971, *Transplant. Proc.*, 3, 926.
- [7] Khais, B. A. et al., 1973, *Cancer*, 28, 288.
- [8] Scheinberg, M. A. et al., 1976, *J. Immunol.*, 116, 156.
- [9] Wara, D. W. et al., 1975, *New Engl. J. Med.*, 292, 70.
- [10] Wara, D. W. et al., 1976, *Pediatrics*, 57, 643.
- [11] Goldstein, A. L. et al., 1976 *Med. Clin. North Am.*, 60, 591.
- [12] Schafer, L. A. et al., 1976, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 277, 607.
- [13] 刘士廉等. 生物化学与生物物理学报. 1978年第10卷第四期第413页。
- [14] 中国医学科学院分院 三室免疫组, 输血及血液学 1977年第一期第46页。
- [15] Lawry, O. H. et al., 1951, *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
- [16] *Methods in Enzymology*, III, P. 80.
- [17] *Methods in Enzymology*, III, P. 844.
- [18] 刘培楠等编, 仪器分析及其在分子生物学中的应用 1978年第三册第297页 科学出版社。
- [19] Hooper, J. A. et al., 1975, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 249, 125.
- [20] 刘培楠等编, 仪器分析及其在分子生物学中的应用 1978年第三册第330页 科学出版社。
- [21] Grabar, P. et al., 1953, *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193.
- [22] Laurell, C. B. 1966, *Annal. Biochem.*, 15, 45.
- [23] 中国医学科学院分院, 三室免疫组, (未发表资料)。
- [24] Goldstein, A. L. et al., "Biological Activity of Thymic Hormones," D. W. Van Bekkum, P. 173-197.
- [25] Kaufman, D. B. et al., 1977, *Immunol. Commu.*, 6, 423.
- [26] Wybran, J. et al., 1975, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 249, 300.
- [27] Goldstein, A. L. et al., 1978, *J. Reticuloendo. Soc.*, 23, 253.