



# 带有 Fc 受体和绵羊红血球 (SRBC) 受体的双重标志淋巴细胞的研究

余新生 洪锦心 田培坤 张前进 刘燕雯  
(上海市肿瘤研究所免疫学、细胞生物学研究室)

淋巴细胞亚群的研究是免疫学研究中一个重要方面,已经显示淋巴细胞有T淋巴细胞、B淋巴细胞、K细胞等亚群<sup>[1-3]</sup>,这些细胞表面都有特征性表面标志<sup>[4-6]</sup>。近年亦注意到有些淋巴细胞表面不但有T淋巴细胞表面特征,亦同时有B细胞或K细胞表面特征<sup>[7-9]</sup>,这些称为双重标志淋巴细胞。

本实验用接有兔抗鸡红血球(CRBC)抗体的CRBC及SRBC作标记细胞与淋巴细胞进行混合 Rosette 试验(简称 E-EARFC),显示了在正常人和各种肿瘤病人周围血淋巴细胞中带有 Fc 受体和 SRBC 受体的双重标志细胞(简称 E-EARFC 双标志细胞),并研究了该淋巴细胞表面受体对热处理,胰酶处理的敏感性和细胞表面受体对抗体的亲和力。

## 材 料 方 法

**一、淋巴细胞来源:** 取人体周围血淋巴细胞。血标本来源中,正常人是实验室工作人员或献血员,肿瘤病人为确诊后未经放疗、化疗病人,仅白血病人人为治疗中的病人。

**二、淋巴细胞分离:** 肝素抗凝周围血,经Hanks液稀释1倍后,用Ficoll—泛影酸葡甲胺(比重 $1.077 \pm 0.001$ )梯度离心分离出淋巴细胞,用Hanks液洗两次后计数,稀释至 $1 \times 10^6$ /毫升浓度待用。

**三、ERFC方法:** 已另有详述<sup>[10]</sup>。

**四、EA-RFC方法:** 用CRBC作为标记细胞。

**1. 兔抗鸡红血球抗体制备:** 用鸡红血球与Freund完全佐剂混合,免疫家兔取得抗血清,然后用硫酸铵沉淀法及DEAE-cellulose(或用Sephadex G-200)分部收集富于IgG部分,浓缩后放在低

温冰箱待用。

**2. 鸡红血球致敏:** CRBC用Hanks液洗三次后配成1%浓度,悬液内含适当稀释度兔抗鸡红血球抗体(加入的抗体浓度是使CRBC凝集的亚凝集浓度的两倍稀释度),37℃温育30分钟后用Hanks液洗两次,再用Hanks液配成1%浓度。

**3. EA-RFC的形成:** 取0.2毫升淋巴细胞( $2 \times 10^5$ 细胞)加0.2毫升致敏过的1%CRBC,37℃温育15分钟,离心5分钟,4℃放两小时,取出用0.2%戊二醛固定,涂片,干后染色,观察时有3个CRBC围上的淋巴细胞作为EA-RFC阳性细胞(即有Fc受体的淋巴细胞)。

**五、E-EA混合RFC方法:** 方法已另有详述<sup>[11]</sup>。简述如下:

取0.2毫升淋巴细胞悬液( $2 \times 10^5$ 细胞)同时加入洗过的1%SRBC 0.2毫升及已致敏的1%CRBC(混合以后操作方法同上述四)。在用显微镜计数时,每个淋巴细胞上同时有3个CRBC和3个SRBC围上者为带有E-EA双重标志的淋巴细胞(即同时有Fc受体及SRBC受体的淋巴细胞),称E-EA双标志细胞(图1)。

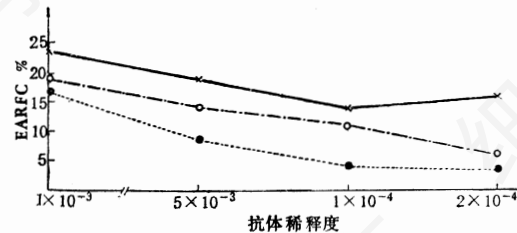


图1 EARFC数值与致敏CRBC的不同抗体浓度的关系

×——× 正常人    ○——○ 肝癌病人  
●——● 白血病人

**六、观察 37℃ 温育对 E—EA 双标志细胞影响:** 分离所得淋巴细胞悬液在 37℃ 温育 30 分钟, 然后用 37℃ Hanks 液洗两次, 再进行 E—EARFC 试验, 同时进行 E—RFC 及 EARFC 测定, 作为对照。

**七、观察胰酶对 E—EA 双标志细胞影响:** 1. 取一部分淋巴细胞, 直接加入胰酶(最后浓度 0.20%), 37℃ 处理 30 分钟后用 Hanks 液洗两次, 然后进行 E—EARFC 测定, 同时用处理过的淋巴细胞进行 ERFC 和 EARFC 作为对照, 操作方法同前。2. 另取一部分淋巴细胞经 37℃ 加热, 洗涤后(同六、处理)再用胰酶处理, 进行 E—EARFC 测定。

**八、观察不同稀释度抗体致敏的 CRBC 对 E—EARFC 影响:** 采用各种不同稀释度抗体( $1 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $2 \times 10^{-4}$  稀释度)致敏 CRBC, 然后分别进行 E—EARFC 测定, 同时测定 E—RFC 及 EA—RFC 作为对照。

**九、观察淋巴细胞的天然细胞毒性与 E—EA 双**

**标志细胞数量的关系:** 在进行 E—EA 双标志细胞实验的同时, 测定了一些正常人及肿瘤病人淋巴细胞的天然细胞毒性及 PHA 刺激下细胞毒性作用, 观察 E—EA 双标志细胞数量与细胞毒性关系。测定淋巴细胞细胞毒的方法基本同前介绍<sup>[10]</sup>, 但在淋巴细胞分离后, 先将培养管置于 37℃、40 分钟以上, 以除去有细胞毒性作用的单核吞噬性细胞, 然后再进行微量细胞毒实验。

## 实验结果

**一、正常人与肿瘤病人周围血液中 E—EA 双重标志淋巴细胞及 ERFC, EARFC 值的对照:** 在本文的实验系统中, 正常人周围血淋巴细胞有 2%~14% 是带有 Fc 受体及 SRBC 受体的双重标志细胞, 而在肿瘤病人仅为 1~8%(表 1)。

表 1 肿瘤病人周围血液中 E—EA 双重标志淋巴细胞及 ERFC、EARFC 值

	E—RFC		EA—RFC		E—EARFC	
	%±S.D	P 值 与正常人相比	%±S.D	P 值 与正常人相比	%±S.D	P 值 与正常人相比
正常人(74)①	62.19±6.37	—	23.5±4.25	—	6.73±2.15	—
肿瘤病人(115)②	54.40±9.74	<0.001	19.59±6.04	<0.001	4.81±1.63	<0.001
肝癌(30)	53.47±10.51	<0.001	18.65±4.88	<0.001	4.7±1.44	<0.001
白血病(13)	47.46±10.24	<0.01	19.19±6.80	<0.005	3.67±1.64	<0.001
鼻咽癌(8)	56.38±6.76	<0.025	22±5.90	>0.2	4.13±1.85	<0.005
肺癌(14)	56.14±6.00	<0.005	22.25±5.75	>0.2	5.25±1.37	<0.05
乳癌(9)	62.00±7.30	>0.5	20.89±5.09	>0.05	6.00±1.51	>0.2
食道癌(12)	59.21±9.11	>0.1	21.50±6.68	>0.1	6.71±3.53	>0.5
淋巴肉瘤(9)	47.74±8.39	<0.001	16.89±3.38	<0.001	5.28±1.44	>0.05

① 括号内为检测的例数, 以下各表同。

② 本表的各组织类型肿瘤病人都包括在 115 例中, 但 115 例中尚有 20 例不属于本表所列各种肿瘤。

我们的实验显示, 就群体而论肿瘤病人(115 例)淋巴细胞上有 SRBC 受体及 Fc 受体的双标志细胞数量比正常人(74 例)显著低, 但正常人和肿瘤病人的数值有一定的重叠区。如果从肿瘤的组织类型来看, 乳腺癌、食道癌、淋巴肉瘤病人双重标志淋巴细胞数量接近正常人, 而肺癌、肝癌、白血病及鼻咽癌病人周围血淋巴细胞中双重标志细胞则显著少于正常

人。进一步分析 E—EA 双标志细胞减少的可能因素来看也不尽一致(表 2)。例如在肝癌病人中有 25 例双标志淋巴细胞数低于 5%, 而这 25 例中有 9 例 ERFC 减少(即 SRBC 受体减少), 有 10 例 EA—RFC 下降(即带 Fc 受体减少), 有 1 例 ERFC 及 EARFC 都下降, 有 5 例两者都不下降。

**二、E—EARFC 及 EARFC 与抗体稀释度**

表 2 E—EA 双标志细胞低下与 ERFC 和 EARFC 的关系

	E—EA 值低于 5%例数	仅ERFC下降 者①	仅EARFC下 降者②	ERFC、EARFC 都下降者③	ERFC、EARFC 都不下降者④
肝 癌	25	9	10	1	5
白 血 病	11	2	4	4	1
肺 癌	8	1	—	2	5

① ERFC 下降者标准是比正常人平均值低 10%。

② EARFC 下降者标准是比正常人平均值低 5%。

③ 此类标准为 ERFC 比正常人平均值低 10%，同时 EARFC 亦比正常人平均值低 5%。

④ 此类标准为 ERFC 及 EARFC 值与正常人平均值相似，或下降不足①及②标准者。

表 3 E—EARFC 与抗体浓度关系

	ERFC	抗 体 稀 释 度							
		$1 \times 10^{-3}$		$5 \times 10^{-3}$		$1 \times 10^{-4}$		$2 \times 10^{-4}$	
		EARFC	E—EARFC	EARFC	E—EARFC	EARFC	E—EARFC	EARFC	E—EARFC
正常人 (4)	60.75 ±5.11	22.75 ±1.78	6.6 ± 0.96	18.25 ±2.59	4.38 ± 0.41	14.5 ±3.64	3 ± 0.71	16 ±3.39	1.88 ± 0.41
白血病 人(4)	50.63 ±16.07	16.25 ±5.7	5.5 ± 1.5	7.75 ±2.78	4.13 ± 0.2	3.75 ±2.38	4 ± 2.25	3.25 ±2.51	1.5 ± 0.74
肝癌病 人(4)	50.38 ±6.85	18.5 ±4.03	4.63 ± 1.78	14 ±1.22	2 ± 0.71	11.63 ±1.85	1.38 ± 0.61	5.5 ±3.6	1 ± 0.61

的关系：从表 3、图 2 和图 3 可见，不论是正常人或肿瘤病人较稀的抗体致敏 CRBC 后与淋巴细胞形成的 E—EARFC 及 EARFC 都随着抗体稀释度的增加而下降，在  $2 \times 10^{-4}$  抗体

稀释度时能测到的双标记细胞量都小于 2%。

三、37℃ 加热及胰酶处理对 E—EARFC 的影响：淋巴细胞如仅在 37℃ 加热 30 分钟，并洗两次，对 E—EARFC 影响不显著（见表 4）。但淋巴细胞如用胰酶处理 30 分钟，不论是否经过加热处理都显著影响 E—EARFC（表 5、6、7），而加热处理的淋巴细胞并不显著影响胰酶对淋巴细胞的作用（表 8）。

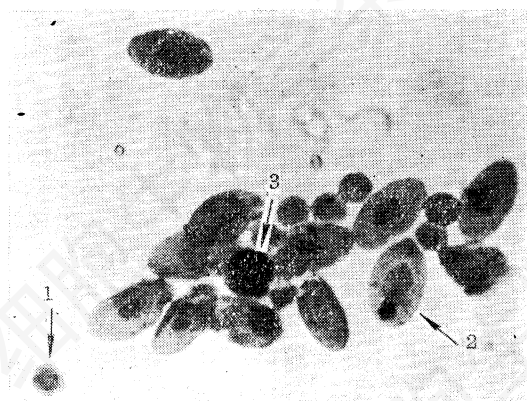


图 2 E—EA 双标志淋巴细胞 × 1000  
显微摄影

1. SRBC。
2. 为致敏的 CRBC。
3. E—EA 双标志淋巴细胞，在周围各有 3 个以上的 SRBC 及 CRBC 围着。

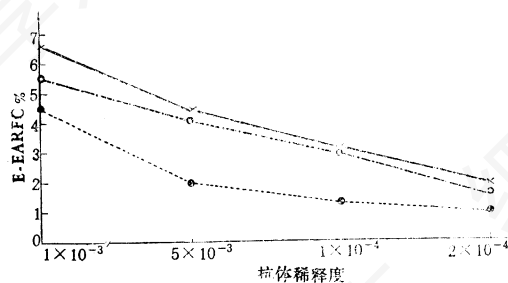


图 3 E—EARFC 数值与致敏 CRBC 的不同抗体稀释度的关系

- ×——× 正常人    ○——○ 肝癌病人  
●——● 白血病人

表 4 37℃加热对E—EARFC影响

	ERFC			EARFC			E—EARFC		
	处理前	处理后	P 值	处理前	处理后	P 值	处理前	处理后	P 值
正常人 (9)	60.33 ±5.93	54 ±11.56	>0.05	22.11 ±2.77	20.78 ±3.79	>0.5	6.06 ±1.30	6.11 ±1.54	>0.5
肝癌病人 (5)	60.1 ±5.94	53.8 ±10.78	>0.4	21.2 ±3.31	21 ±3.38	>0.5	5.5 ±1.26	4.7 ±1.16	>0.5
白血病人 (7)	43.14 ±12.45	33.14 ±15.57	>0.4	21.21 ±6.43	18.14 ±2.85	>0.5	4.79 ±1.39	4.29 ±1.46	>0.5

表 5 胰酶直接处理对E—EARFC影响

	ERFC			EARFC			E—EARFC		
	处理前	处理后	P 值	处理前	处理后	P 值	处理前	处理后	P 值
正常人 (9)	60.33 ±5.94	11.33 ±4.67	<0.001	22.11 ±2.77	8.56 ±3.17	<0.001	6.06 ±1.30	4.39 ±1.76	<0.005
肝癌病人 (5)	60.10 ±5.94	11.00 ±8.56	<0.001	21.00 ±3.38	18.40 ±3.62	>0.4	4.70 ±1.16	2.50 ±1.79	<0.05
白血病人 (7)	33.14 ±15.57	13.57 ±5.9	<0.01	18.14 ±2.85	11.43 ±4.89	<0.005	4.29 ±1.46	2.00 ±0.93	<0.01

表 6 淋巴细胞 37℃温育后的E—EARFC与37℃温育后再用胰酶处理的淋巴细胞E—EARFC的比较

	ERFC			EARFC			E—EARFC		
	温育后酶处理前	酶处理后	P 值	温育后酶处理前	酶处理后	P 值	温育后酶处理前	酶处理后	P 值
正常人 (9)	54 ±11.56	10.61 ±4.3	<0.001	20.78 ±3.79	9.39 ±3.06	<0.01	6.11 ±1.54	4.11 ±1.93	<0.005
肝癌病人 (5)	53.8 ±10.78	15.6 ±4.8	<0.001	21 ±3.38	1.84 ±3.62	>0.4	4.7 ±1.16	2.5 ±1.79	<0.05
白血病人 (7)	33.14 ±15.57	13.57 ±5.9	<0.01	18.14 ±2.85	11.43 ±4.89	<0.005	4.29 ±1.46	2 ±0.93	<0.01

表 7 37℃温育前E—EARFC与37℃温育后再用胰酶处理的E—EARFC比较

	ERFC			EARFC			E—EARFC		
	温育前	温育+酶处理后	P 值	温育前	温育+酶处理后	P 值	温育前	温育+酶处理后	P 值
正常人 (9)	60.33 ±5.93	10.61 ±4.30	<0.001	22.11 ±2.77	9.39 ±3.06	<0.01	6.06 ±1.30	4.11 ±1.93	<0.05
肝癌病人 (5)	60.10 ±5.94	15.60 ±4.80	<0.001	21.20 ±3.31	18.40 ±3.62	<0.005	5.50 ±1.26	2.50 ±1.79	<0.05
白血病人 (7)	43.14 ±12.45	13.57 ±5.90	<0.001	21.21 ±6.93	11.43 ±4.89	<0.025	2.00 ±0.93	2.00 ±0.93	<0.02

表 8 胰酶直接处理及加热温育后用胰酶处理 E—EARFC 的比较

	ERFC			EARFC			E—EARFC		
	酶处理	温育+酶处理	P 值	酶处理	温育+酶处理	P 值	酶处理	温育+酶处理	P 值
正常人 (9)	11.33 ±4.67	10.61 ±4.80	>0.5	8.56 ±3.17	9.39 ±3.06	>0.2	4.39 ±1.76	4.11 ±1.93	>0.5
肝癌病人 (5)	11.00 ±8.56	15.60 ±4.80	>0.4	17.20 ±3.49	18.40 ±3.62	>0.4	2.60 ±0.80	2.50 ±1.79	>0.5
白血病人 (7)	12.85 ±5.29	13.57 ±5.90	>0.5	11.14 ±3.91	11.43 ±4.89	>0.5	2.60 ±0.56	2.00 ±0.93	>0.2

表 9 淋巴细胞细胞毒性与淋巴细胞表面标志关系①

	ERFC		EARFC		E—EARFC		NK 毒性②		PK 毒性③	
	%±S.D	P 值④	%±S.D	P 值④	%±S.D	P 值④	细胞毒指数	P 值④	细胞毒指数	P 值④
正常人 (22)	63.60 ±6.90	—	24.00 ±5.00	—	6.27 ±1.60	—	56.70 ±26.40	—	74.00 ±27.70	—
肿瘤病人 (20)	49.60 ±7.50	<0.001	17.50 ±7.00	<0.001	5.00 ±1.30	<0.01	59.60 ±25.30	>0.5	70.90 ±27.50	>0.5
白血病人 (8)	47.50 ±8.80	<0.001	16.38 ±4.80	<0.001	2.90 ±1.50	<0.001	55.00 ±29.20	>0.5	76.00 ±30.80	>0.5

① 靶细胞为中科院细胞生物学研究所提供的 7402 肝癌细胞株。

② NK 毒性为淋巴细胞天然细胞毒性。

③ PK 毒性为 PHA 刺激下淋巴细胞细胞毒性。

④ 各组与正常人相比较。

**四、淋巴细胞中 E—EA 双标志细胞与淋巴细胞细胞毒性的关系：**正常人、肿瘤病人淋巴细胞中 E—EA 双标志细胞与淋巴细胞细胞毒性关系的比较见表 9。虽然肿瘤病人和白血病人 E—EARFC 比正常人显著低，但细胞毒性都与正常人相似。

### 讨 论

自从在淋巴细胞群体中发现带 Fc 受体和带 SRBC 受体的双重标志细胞以来，比较深入的研究工作尚很少进行。如 Basten<sup>[14]</sup> 显示小鼠的各种淋巴细胞中亦有该类双重标志细胞，West<sup>[15]</sup> 等人报道在 ERFC 实验中的高亲和力的 ERFC 细胞不带 Fc 受体而低亲和力的 ERFC 细胞带有较多的 Fc 受体。Hallberg<sup>[16]</sup> 报道新生儿中带有 SRBC 受体及 Fc 受体的双重标志淋巴细胞数量显著低于正常成年人。

本文的研究涉及了带 Fc 受体和带 SRBC 受体双重标志淋巴细胞的一些生物学特性，及该类细胞在肿瘤患者与正常人之间的异同。

我们的实验显示了肿瘤病人周围血淋巴细胞中此类双重标志细胞显著低于正常人的数量，这可能提示肿瘤对机体免疫系统有一定影响，而使双重标志淋巴细胞减少。也有些肿瘤病人，如乳癌、食道癌、淋巴肉瘤病人周围血淋巴细胞中此类双重标志细胞并不显著低于正常人的数量，这可能提示该类肿瘤对机体免疫系统的影响并非涉及双重标志淋巴细胞的减少。从所得的实验数据亦表明引起肿瘤病人中双重标志细胞减少的途径是复杂的，初步看来有：

1. 淋巴细胞中带有 Fc 受体的 T 淋巴细胞减少。
2. 带 Fc 受体的淋巴细胞中同时带有

SRBC受体的细胞减少。

3. 上述两类细胞都不减少但淋巴细胞表面的Fc受体或SRBC受体与标记细胞(即致敏的CRBC和SRBC)结合的亲和力降低。所以用目前使用的混合玫瑰花结(混合RFC)不能显示该类细胞。

4. 上述1、2两类细胞同时减少。

在进行的E-EARFC双标志细胞的一些生物学功能的实验中,有一些现象值得注意。用稀释度较高的抗体致敏CRBC时,显示正常人和肿瘤病人的E-EA双标志细胞数量都显著下降,表明E-EA双标志细胞中的Fc受体有相当一部分对抗体亲和力是较低的,但有少部分(小于2%)对抗体有较高的亲和力。曾有报道提示B淋巴细胞上的Fc受体对抗体亲和力较低<sup>[12]</sup>。我们亦注意到与E-EARFC实验同时进行的EARFC试验中,在用稀释度较高的抗体致敏的CRBC时,正常人EARFC下降的程度小于肝癌病人和白血病人,提示正常人EARFC淋巴细胞中可能有较多的高亲和力的Fc受体。

在本实验系统中淋巴细胞经37℃处理30分钟后并不影响E-EA双标记的数量,表明E-EA双标志淋巴细胞上的Fc受体和SRBC受体对热有一定稳定性。

淋巴细胞用胰酶处理后的实验中表明,E-EA双标志细胞可以分为表面受体对胰酶敏感和表面受体能对抗胰酶两个不同部分。因此胰酶处理后所显示的E-EA双标志细胞数量比胰酶处理前要低得多。值得注意的是肝癌病人淋巴细胞经胰酶处理后EARFC(即带Fc受体细胞)的减少量小于正常人和白血病人。这是否意味着肝癌病人淋巴细胞中带Fc受体的淋巴细胞有相当一部分能对抗胰酶?由于我们分析的病例还不多,有待于进一步研究。

Lobo曾报道<sup>[13]</sup>人体周围血中B淋巴细胞Fc受体对胰酶敏感,Pang<sup>[12]</sup>等也认为K细胞的Fc受体是對抗胰酶的,B淋巴细胞Fc受体不能对抗胰酶。从我们的结果来看,E-EA

双标志细胞中Fc受体类型可能有两类,一类是为B细胞Fc受体,另一类为K细胞Fc受体。这样提示了E-EA双标志细胞可能是具有相同表面标志而功能并不相同的一个群体。如果确是这样,那么我们所进行的淋巴细胞细胞毒性作用与E-EA双标志细胞数量之间不能得出平行关系就不难理解了。在本实验的基础上如把淋巴细胞功能实验与表面受体检测更进一步结合起来,我们相信可以更深入了解E-EA双重标志细胞的本质,及肿瘤对这些细胞的影响。

## 小 结

本实验显示正常人周围血淋巴细胞中带有Fc受体及SRBC受体的双重标志淋巴细胞的数量显著高于肿瘤病人。提示肿瘤的存在可能对此类细胞有一定影响,但影响途径是复杂的。在所进行该双重标志细胞的一些生物学功能实验来看,此类细胞的受体在我们的实验条件下对37℃处理有一定的稳定性,用胰酶处理及用不同稀释度抗体致敏的CRBC实验显示此类双重标志细胞的不均一性,提示该类细胞虽然细胞表面标记相似,但功能或有差异。

## 参 考 文 献

- [1] Jondal, M. et al. (1972) *J. Exp. Med.*, 136: 207.
- [2] Froland, S. S. et al. (1974) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 47: 124.
- [3] Melewicj, F. M. et al. (1977) *J. Immunol.*, 118: 567.
- [4] Brown, G. et al. (1974) *Eur. J. Immunol.*, 4: 302.
- [5] Bloom, R. R. & David, J. R. Evaluation of in vitro methods for characterization of lymphocytes and macrophages. In: *In vitro Methods in Cell Mediated and Tumor Immunity* Bloom, B. R. & Pavid, J. R. Academic Press New York (1976).
- [6] Papamichail, M. et al. (1971) *Lancet* II 850.
- [7] Shavach, E. et al. (1974) *Proc. Nat.*