



免疫生物学中的几个细胞生物学问题*

姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从六十年代发现了胸腺功能和两类淋巴细胞(T、B细胞)以及淋巴细胞的免疫功能(包括抗体由B淋巴细胞产生)等事实被明确以来,免疫学从原来作为医学的一个部分进而转为与生物科学相结合的发展阶段,免疫学与遗传学、分子生物学、细胞生物学和发育生物学相密切结合,成为当代生物科学中一个极为活跃的领域,可称为免疫生物学或近代免疫学。

在这一阶段中,人们对免疫生物学的一些基本问题的了解有了飞跃的发展,如关于抗体结构功能和抗体的多样性,淋巴细胞的多样性以及各种免疫活性细胞的结构与功能,免疫系统的个体发育和系统发育等等。免疫学之所以取得这样大的进展,有些是与长期艰苦的实践分不开的,如对于各类免疫球蛋白分子氨基酸排列顺序、空间构象及其抗原结合点的研究就是如此。有些是和某些理论概念和假设的提出所带来的推动相联系的,如Burnet提出的细胞无性繁殖系(克隆)选择学说,从生物学角度说明了抗体产生的多样性,排除了长期单纯从化学角度认为抗体的专一性由抗原决定的直接模板学说的错误,展开了淋巴细胞个体发育、分化和功能的研究,推动了整个细胞免疫和分子免疫的研究。又如抗体分子本身被发现是很好的抗原,其轻、重链的可变区和恒定区都有抗原性,机体不光对外部抗原起反应,对内部抗原也能起反应,Jerne在研究这种抗个体型抗体的基础上,把免疫系统比作神经系统,提出了网络学说,对于研究免疫反应的调控,免疫活性细胞的相互作用和识别等重大问题都有很大的推动。此外,近代免疫学的进展与各种免

疫学研究的实验动物模型如裸鼠、组织相容基因不同纯系小鼠(同类系小鼠)的应用;与各种新技术如空斑技术、细胞表面同位素标记技术、体细胞遗传技术、器官培养和淋巴细胞克隆分离技术、淋巴细胞亚群分离技术、DNA重组技术以及淋巴细胞杂交瘤技术等的发展和运用都是有密切联系的。

在讨论免疫生物学的某些问题以前,有必要对整个免疫系统的组成作简要的说明。

一、免疫系统

免疫系统主要是由T淋巴细胞、B淋巴细胞、巨噬细胞以及抗体和其他免疫效应分子所组成。整个系统的功能是识别,它既能识别可溶性抗原,也能识别颗粒性抗原(包括细胞抗原),既能识别外来的细胞和分子,也能识别自己的细胞和分子。因此,免疫系统是一个很好的识别系统,而且由于其细胞组成,特别是淋巴细胞,是一个流动的细胞群体,细胞通过在流动中或在次级淋巴器官的微环境中短暂接触交换信息,达到对免疫反应的促进、抑制和调控,这是一个很特殊的、很复杂的识别系统。

据Jerne的资料,脊椎动物的总细胞数的5%是淋巴细胞,约为神经细胞数的几百倍。人的免疫系统中约有 2×10^{12} 淋巴细胞,其中T、B细胞各占一半,总重量近一公斤,相等于肝脏的重量。除脑以外,各种组织、间液中均有存在,每秒有100万个新的淋巴细胞产生。一个小鼠约有 10^9 淋巴细胞。一个物种在一定时期能

* 本文是在1979年3月9日上海市免疫学学会成立大会上的发言

识别抗原的抗体可变功能区的数目可以称为这个物种的抗体库或识别库，在人和小鼠大约是 $10^7(10^6 - 10^8)$ 。鉴于由一个淋巴细胞产生的抗体其可变区都是相等的，由这个细胞所形成的克隆所合成的抗体也都有相同的可变区。假定人的抗体库是 10^7 ，那么 10^{12} B细胞中可以有 10^7 克隆，平均克隆的大小约为 10^5 细胞。 10^{12} T细胞在功能上也可分为许多亚群，有人认为T细胞亚群相当于B细胞的克隆。

巨噬细胞在免疫反应中已被证明有重要作用。这类细胞主要分布于脾脏和腹腔，其次是淋巴结、肝和肺，但没有类似淋巴细胞的统计资料。小鼠脾脏以含有 10^8 淋巴样细胞计算，其中5%是巨噬细胞；小鼠腹腔中单核细胞约有 6×10^6 ，其中60—90%是巨噬细胞。

除了以上三类免疫活性细胞以外，抗体、抗个体型抗体和各种免疫效应分子，包括许多T淋巴细胞和巨噬细胞产生的免疫促进因子和抑制因子，也是免疫系统的主要组成，与各类免疫活性细胞组成一个网络、调节和保持着整个机体的内部免疫稳定状态。

二、免疫生物学研究中的几个主要问题

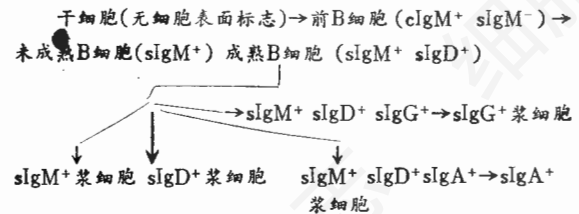
免疫生物学的范围很广，这里只能从细胞生物学的角度谈几个问题，将不包括抗原抗体结构功能等分子免疫学方面的问题。

1. 淋巴样细胞的分化和功能

淋巴系统的个体发育研究说明淋巴样细胞的干细胞最早导源于胚胎早期的卵黄囊，以后由胚胎肝，最后由骨髓产生淋巴样细胞和骨髓样细胞，由前者分化成T、B淋巴细胞，后者分化为单核细胞及粒细胞，由单核细胞再分化为巨噬细胞。鉴于淋巴细胞表面分化抗原的发现和—些其他细胞表面受体研究以及细胞分离技术的发展，人们可以开始研究淋巴样细胞从一个单一的干细胞分化为不同细胞谱系的全过程。这不但对淋巴样细胞的分化本身，而且对整个细胞分化问题的了解都具有很大意义。

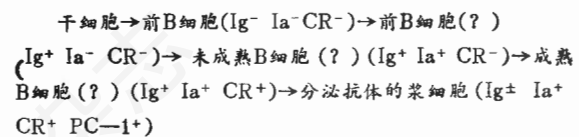
(1) B淋巴细胞分化 在哺乳动物，对B淋

巴细胞分化的了解没有象对T淋巴细胞那样多。近年，应用胚胎肝、脾和骨髓的器官培养，结合各类免疫球蛋白的免疫荧光鉴定技术等方法，可以看到小鼠B淋巴细胞的分化大致有如下过程：



从干细胞转为前B细胞时，先在细胞质内产生IgM (cIgM)，以后转为细胞表面IgM (sIgM)阳性的未成熟B细胞，再转为细胞表面同时存在IgM和IgD的成熟B细胞。从成熟B细胞可以分化为产生IgM和IgD的浆细胞，也可经过细胞表面同时出现三种免疫球蛋白的细胞，再分化为产生IgG和IgA的浆细胞。这后一部分分化是在抗原存在和其他免疫活性细胞协助的条件下进行的。

假使除免疫球蛋白外，我们同时分析细胞表面的其他抗原标志（如免疫相关抗原Ia）或受体（如补体受体CR），那么从干细胞到成熟的浆细胞，细胞表面抗原或受体的出现也是按阶段依次产生的：



在B细胞分化中其他表面标志或受体变化的研究还处在开始阶段，许多受体的出现与消失和细胞功能的关系，和细胞成熟程度的关系都还很少了解。在12天小鼠胚胎已有前B细胞的出现，到16—17天时，可以看到IgM表面膜荧光阳性的未成熟B细胞。在胚胎肝和成年的骨髓中都可以发生从前B细胞到未成熟B细胞的转变，而成熟B细胞和浆细胞的产生是在淋巴结和脾脏中进行的。

在胚胎发育过程中，IgM首先出现是一个

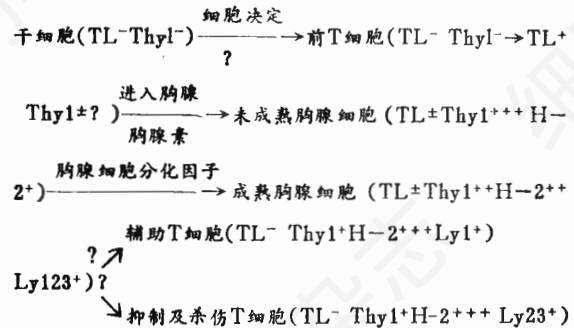
普遍规律，在14天鸡胚的腔上囊中已有IgM表面阳性细胞，IgG要在出生时才看到，IgA出现的时间更晚。

至于在整个B细胞分化过程中是由哪些因子来控制的？在哺乳动物中有没有象鸟类中的腔上囊素一类物质？为什么IgM最先表达？是否反映了Ig的系统发育问题？为什么几类免疫球蛋白同时在淋巴细胞表面出现？IgD在这里是否起着调控作用？在B细胞分化过程中还发现了基因的重新排列问题，即编码免疫球蛋白的V基因和C基因在胚胎细胞和肝细胞中都是分开存在的，在B细胞分化过程中才联合在一起，这种染色体变化究竟发生在B细胞分化的哪个阶段？有什么诱导因素？以上这些问题都还很不清楚，需要深入研究。

(2) T淋巴细胞的分化 小鼠T淋巴细胞的分化与胸腺有密切的关系。从骨髓来的干细胞或前T细胞大约在怀孕第11天迁入胸腺原基，在这一微环境中与胸腺上皮细胞相接触，并通过激素的作用成为未成熟的胸腺细胞。这些细胞在14—16天鼠胚的胸腺中可以找到。以后在一些免疫活性因子的作用下转为成熟胸腺细胞，再分化为有免疫功能的T细胞，离开胸腺到周围血流中去。

鼠类T细胞表面有许多同种异体抗原标志，如TL抗原（胸腺细胞白血病细胞抗原，是一种早期分化抗原），Thy1抗原（θ抗原）和Ly抗原等等，都是胸腺细胞、T细胞及其亚群的分化抗原。这些分化抗原除淋巴细胞外，其他组织很少存在，是淋巴细胞表面的特殊分化，参与淋巴细胞的专一功能。此外，有些T细胞还有一些其他免疫活性细胞也有的表面标志，如Fc受体、Ia抗原、Ig类似决定簇等。在研究T细胞分化不同阶段的细胞表面标志时，可以应用血清学和免疫荧光的方法。近年也有应用牛血清白蛋白密度梯度法分离未成熟的和成熟的胸腺细胞，未成熟的细胞在体外可进行人工诱导分化，从而了解分化过程细胞表面标志和功能的变化；也有应用“B”小鼠模型来

研究不同T细胞亚群的功能分化及其表面标志的稳定性。综合各方面的研究，T淋巴细胞的分化大致有以下过程；



这里有很多问题还没有肯定，例如前T细胞在进入胸腺之前是否已有TL及Thy1抗原的部分表达？T细胞的成熟是否只能在胸腺的微环境中进行，还是有些可以在胸腺外的地方成熟？在离体实验中证明巨噬细胞是产生胸腺细胞分化因子的细胞，能使未成熟的胸腺细胞转为成熟，此时H-2抗原增加，TL抗原减少，并能在混合淋巴细胞反应中表现有免疫功能，但是体内T细胞分化是否也由巨噬细胞的免疫活性因子所控制？从成熟胸腺细胞分化为辅助T细胞和抑制——杀伤T细胞又是受哪些因子或细胞相互作用所调节的？T细胞表面其他标志如Ia抗原和与抗原结合的识别受体等在分化过程哪一阶段出现？同T细胞亚群的功能分化有何关系？在T细胞分化过程细胞表面抗原的消长如H-2抗原增加，Thy1抗原减少的规律等等都是当前正在深入研究的课题。

(3) 巨噬细胞的分化 在骨髓的原始干细胞产生骨髓样干细胞，由后者再分化为单核细胞及巨噬细胞。整个这一分化过程以及细胞表面标志的变化还很少系统的研究。已知巨噬细胞表面有各种受体和抗原，如Fc受体，淋巴因子(MIF, MSF)受体，Ia抗原等等，但它们和巨噬细胞发育分化的关系，巨噬细胞是否象T、B淋巴细胞一样有不同亚群，有不同的免疫功能等问题也都是当前基础免疫学研究中比较活跃的一个方面。

2. 细胞识别和免疫活性细胞的相互作用

最初人们从切除胸腺看到了这个器官对抗体产生反应的影响,以后在用X-线致死剂量照射的小鼠中,有的单独用胸腺细胞或骨髓细胞重组,有的两类细胞一起重组,然后再用SRBC抗原刺激,发现只有在后一组小鼠中才看到了有强的抗体反应,说明抗体的产生需要有胸腺细胞和骨髓细胞的相互作用。免疫反应中的这一现象以后在半抗原的免疫实验中得到了进一步的阐明。半抗原小分子本身不能激发抗体形成,但能与已形成的抗体相结合。当半抗原与一个载体结合后免疫动物,则B细胞能识别半抗原,T细胞识别载体蛋白,由后者帮助专一B细胞转为抗体形成的浆细胞,这类T细胞称为辅助T细胞。这种两类不同免疫活性细胞彼此识别抗原分子的不同部分,进行相互作用后才能引起免疫反应,是一个经典的T、B淋巴细胞合作的例子。

现在知道,要将B淋巴细胞诱导分化为合成抗体的浆细胞需要有2个信号:(1)抗原或半抗原决定簇要与B细胞膜上的专一受体相结合,这是第一个信号。光有这个信号,特别是在没有巨噬细胞对大量抗原进行处理的情况下,也可以引起免疫麻痹。因此,需要有第二信号来触发B细胞成熟和向浆细胞分化。(2)这第二个信号对不同抗原情况不一样,对一些不依赖胸腺的抗原(如肺炎球菌多糖、内毒素等)不需要T细胞辅助就能产生抗体,一般认为在抗原的分子结构中两个信号一起提供了;而对另一些依赖胸腺的抗原,则需要T辅助细胞提供第二个信号。

T辅助细胞提供信号的机理还不完全了解,T细胞可以直接把信号送给B细胞,也可能间接通过巨噬细胞传递信号。

对于T依赖抗原的免疫反应要有T、B淋巴细胞和巨噬细胞三者一起参与合作的证据是最近六、七年内通过应用人工聚合多肽作抗原、同类系的纯种动物和细胞分离技术,进行体外抗体形成实验得到的资料。例如把同类

系小鼠的T、B淋巴细胞和有粘附特性的巨噬细胞分开,在体外做重组实验,发现光是T、B细胞合作不能产生抗体,必须要有特定Ia决定簇的巨噬细胞的参与(Ia决定簇相当于H-2复合体中I区J亚区的决定簇),而且抗Ia(J)抗体能抑制三类细胞的相互作用和抗体的产生。同类系小鼠相同Ia决定簇的巨噬细胞起促进抗体产生的作用,而不同Ia决定簇的巨噬细胞则不发生作用。所以这类实验不但为免疫反应中的细胞相互作用提供了证据,而且也为免疫反应的遗传控制提供了线索。

这里要顺便提一下,巨噬细胞在免疫反应中所参与的细胞间相互作用,除了刚才提到的体外抗体形成实验外,在肿瘤免疫方面也有类似的发现,巨噬细胞已被认为是一种抗癌细胞的免疫效应细胞。有证据说明效应淋巴细胞(T细胞)如不与巨噬细胞一起作用,单独不能抑制同系肿瘤细胞的生长。此外,体外实验证明激活的巨噬细胞对肿瘤靶细胞有非专一的细胞毒或细胞静止效应(抑制DNA合成)。我们实验室近年也看到带瘤动物脾脏细胞中具有对肿瘤靶细胞有细胞静止效应的细胞,并获得证据说明效应细胞是一类抑制巨噬细胞。

总之,免疫系统中三类免疫活性细胞的亚群及其相互作用,促进的和抑制的相互作用,是今天免疫生物学研究的一个重点。这种相互作用的实质涉及细胞之间通过表面受体发生的细胞识别,从而达到免疫反应的调控。

3. 主要组织相容性复合体(MHC)与免疫反应的遗传控制

在免疫学中,人血型ABO系统是一个最早研究的细胞表面遗传学的例子,这些抗原的生化及其遗传已有所了解。最近,在抗体结构功能的分析中,在细胞免疫复杂的调控和相互关系的研究中,免疫遗传研究都起了很大的作用。例如,近年遗传学、生化学和免疫学工作者合作搞MHC基因复合体(小鼠H-2系统和人HLA系统,是一类产生决定同种移植排斥反应的细胞膜抗原的复等位基因系统)及其表达

的研究就是一个很突出的例子。

最早提示免疫与遗传关系的线索是发现许多动物对抗原的免疫反应的个体差异很大。这一问题一直到人工聚合多肽抗原和同类系小鼠、豚鼠用于研究后才得到解决。如一种豚鼠对DNP-PLL(多聚赖氨酸)有免疫反应能产生抗体,称为应答者,另一种豚鼠没有反应,不能产生抗体,称为无应答者。反应性是由一个显性基因控制的,杂交后按孟德尔定律遗传。Mc DeviH 在六十年代中期已把对一类多肽抗原起反应的小鼠免疫反应基因(Ir基因)定位到第17号染色体H-2复合体的I区,后者是MHC基因组的一个组成部分。Ir基因的产物就是免疫相关抗原或Ia抗原。根据现有的资料,Ir基因的功能包括(1)免疫反应的控制,如上节中提到的对胸腺依赖抗原的免疫反应的控制。(2)抗体专一性的控制。(3)B细胞克隆类型的控制。

在免疫反应的控制中,Ir基因是通过控制细胞间的相互关系,亦即巨噬细胞与T细胞关系以及T、B淋巴细胞间的相互关系发生作用的;而且是通过由Ir基因编码的、存在于细胞表面的Ia抗原以及一些具有Ir基因决定簇的免疫活性因子如抑制因子、辅助因子来实现的。取得这些结果的实验都是利用不同同类系豚鼠或小鼠对某些合成抗原有不同的反应,将应答品系和无应答品系杂交,取其F₁子代,用有关抗原免疫,分离免疫T细胞,在体外分别用经抗原脉冲处理的亲代和F₁代的巨噬细胞研究T细胞接触抗原的情况,从而分析Ir基因对巨噬细胞—T细胞相互作用的影响。实验发现巨噬细胞表面对应的Ia分子能把抗原的某一部分联结起来,聚焦定位,给予T细胞,通过两者的直接接触,激活一定的T细胞克隆。

在T—B细胞合作中,也要有相同Ia分子的T、B细胞的相互作用。T细胞表面Ir基因的表达尚未有直接证明,但有证据说明小鼠激活的T细胞能产生抗原专一的抑制因子和辅助因子,能用抗原—葡聚糖珠分离,不含有Ig的轻、重链决定簇,分子量3—5万。例如,从耐受小

鼠胸腺、脾脏细胞的超声滤液可提取抑制因子。抑制因子有H-2的I-J区决定簇,而辅助因子有H-2的I-A区决定簇。这些因子抑制或促进了B细胞的激活和增殖以及向浆细胞的转化。

除抗体形成方面近年发现的Ir基因对mφ-T-B细胞相互作用的影响外,在细胞介导的溶解,病毒感染细胞的溶解以及对肿瘤细胞的溶解中都发现有H-2基因复合体所产生的抗原的参与。这类现象统属于细胞相互作用的遗传限制性,是MHC基因复合体对免疫反应控制的核心问题。对于这类限制性的细胞识别机理,目前有各种假设,如双重识别机制等,均在深入探讨中。

当然,免疫生物学中还有很多其他的研究课题,特别是比较免疫学,或者是免疫系统的系统发生问题,近年也有很多开展。例如人们发现MHC方面H-2和HLA抗原都有分子量11,000左右的β₂M链,其氨基酸顺序和免疫球蛋白的r₁重链有一定的同源性,可能说明Ig的C区在演化过程来源于MHC,或者它们两者是同源的;在无脊椎动物中对原始的体液反应、细胞免疫反应也有很多有趣的发现等等,这里不再多述。

本文只着重谈了关于淋巴样细胞的个体发育分化,免疫反应中各类细胞的相互作用和识别以及免疫反应的遗传控制三个问题。我们认为这三个方面都是在生物科学研究中具有普遍意义的问题,即细胞分化,细胞表面和识别以及细胞结构功能的遗传控制问题。利用免疫系统细胞来研究这些问题的趋势已愈来愈明朗,因为淋巴细胞的体外培养,克隆技术,大量繁殖都已解决,巨噬细胞的分离培养也正在解决,这些细胞表面有各种受体,并随发育阶段而变化,受体的存在和功能又受MHC基因控制,整个免疫系统的信息和功能在小鼠已涉及到5个染色体和几十个基因位点,在细胞分化过程中还发现了基因的重组问题,不同生理功能的细胞亚群间又有着复杂的相互关系和反馈

调节。凡此种种，再加上各种实验动物模型和体内外细胞功能重组的实验条件的确立等等，都使应用免疫活性细胞来研究上述问题比起其他生物学材料更为合适。

免疫学在最近二十多年的发展大大借助于

其他生物科学的理论和技术，形成了免疫生物学这一新的学科领域，我们相信，今后免疫生物学中一些基本问题的阐明，必将反过来推动整个生物科学的前进。

染色体非组蛋白及其对真核细胞 基因转录的调节

韩 玉 珉

(中国科学院生物物理研究所)

近十年来，有关真核生物细胞核生物化学的研究最显著的发展之一，是对染色体非组蛋白(简称 NHP)的重要性给予了充分肯定。现已知道，染色体非组蛋白是相当不均一的，它含有许多有关细胞核代谢的酶类，如RNA、DNA聚合酶等，但人们最感兴趣的是它们含有能控制基因表现的蛋白。人们已从许多真核生物中分离出了 NHP，并与 DNA、组蛋白一起进行体外染色质重组实验，以期了解 NHP 对 DNA 或染色质特异性转录活性的调节作用。

一、染色体非组蛋白的制备

染色质的制备和组成：制备 NHP 一般是从染色质开始的，分离染色质的方法基本上是除去动物组织细胞的细胞质和可溶性的核成分，然后得到核蛋白复合物。通常分两步进行：首先用适当的含盐缓冲液匀浆动物组织，经过滤除去未破裂的细胞和膜碎片，用低速离心收集粗制细胞核沉淀，再通过蔗糖密度梯度离心制备纯净的细胞核；其次是用适当的含盐缓冲液破碎细胞核，经高速离心，除去可溶性核成分，制备染色质。

染色质包括四种主要成分，即 DNA、组蛋白、非组蛋白和少量的 RNA。DNA 含量随细胞种类的不同而有变化。DNA 的含量约占染色

质重量的 30—40%，若把它作为 1，其它三种成分的含量与之相比较，从表 1 可以看到，在不同生物和不同细胞中，组蛋白与 DNA 的比率大约是 1:1，而 NHP 的变化甚大。

染色体非组蛋白的制备：迄今为止，得到

表1 染色质的化学组成

来 源	DNA	RNA	组蛋白	非组蛋白
鼠 肝	1	0.04	1.15	0.95
猪 小 脑	1	0.13	1.6	0.5
鸡红细胞	1	0.02	1.08	0.64
牛 胸 腺	1	0.05	0.89	0.21
Hela 细胞	1	0.05	1.08	0.7

NHP 还是比较困难的，因为它不易溶解，很容易与 DNA、组蛋白形成复合物，给分离造成许多困难。尽管如此，还是报道了许多纯化制备 NHP 的方法。(1) 用稀酸处理染色质，去除组蛋白，然后用酚或 SDS 溶解，离心除去 DNA，也可用牛胰脱氧核糖核酸酶水解 DNA，抽提出 NHP。(2) 为避免用强酸强碱处理染色质，可采用高浓度的盐(NaCl)溶液或“高浓度盐(NaCl)——尿素溶液”(近中性 pH)抽提染色质，通过超离心或凝胶过滤除去 DNA，再通过离子交换层析，把组蛋白与 NHP 分开。常用的树脂是 Bio-Rex 70(阳离子树脂)，NHP