

干扰素功能表达机理

Ⅱ 2'-5'P₃A₃ 对人淋巴细胞天然杀伤的增强作用

田培坤 林桃珍 洪锦心 张前进 吴虹燕 余新生

(上海肿瘤研究所)

刘新垣 郑宏大 姜艳春 姚曼华

(中国科学院上海生物化学研究所)

天然杀伤(NK)细胞是 1975 年发现的^[1]。它在肿瘤免疫防御系统中有很重要的作用,可能是机体防御系统的第一道防线,是免疫监视受重视的一个机理^[2]。干扰素是活化 NK 的一个关键信号^[3]。有关干扰素本身对 NK 的增强作用,报道也不少^[4-6]。根据 Senik 等人的报道^[7],干扰素对 NK 的激活分为两个步骤,第一步是它与细胞膜结合,第二步是充分发挥作用的步骤,此时要有 RNA 及蛋白质的生物合成相配合,否则仍然不起作用。经干扰素作用的细胞能产生 2'-5'三聚腺嘌呤核苷酸(2'-5'P₃A₃), 2'-5'P₃A₃ 有许多重要的生物功能,包括对免疫系统的作用,但对 NK 活性的作用尚未见报道。本实验对 2'-5'P₃A₃ 能明显增强淋巴细胞 NK 活性作了详细报道。

材料与方 法

正常人外周血淋巴细胞(PBL), 分别加入不同浓度的 2'-5'P₃A₃ (中科院生化所合成)作效应细胞, ¹²⁵IUdR (中科院原子能研究所生产)标记的 K 562 细胞(人白血病细胞株,对 NK 敏感)作靶细胞,进行细胞毒试验。

K 562 细胞培养于 RPMI-1640 完全培养液(RPMI-1640 培养液内加 2mM 谷氨酰胺, 25 mM HEPES 缓冲液, 10% 灭活小牛血清)。

1. ¹²⁵IUdR 标记 K 562 细胞

每 1 × 10⁶ K 562 细胞/4 ml 中加入 12 μl 1 mM-5 FUdR (SERVA) 及 15 μCi ¹²⁵IUdR, 在 37℃ 温浴 6—8 小时, 然后用 Hanks 液洗三次, 以去除游离的 ¹²⁵IUdR, 计数, 用 1640 完全培养液配成实验所需浓度的 K 562 细胞悬液。一般, 每个细胞可标记上 1—2 脉冲/分(cpm)。

2. 用 Ficoll-Hypaque 进行密度梯度离心正常人

肝素抗凝全血, 取得单个核细胞后, 加 1640 完全培养液, 放入培养瓶中, 在 37℃ 贴壁 45 分钟, 除去巨噬细胞, 所得 PBL 用完全培养液稀释至实验所需浓度, 作为效应细胞。

3. 天然杀伤活性的测定

本实验除了特别说明的实验条件外, 天然杀伤活性测定如下:

效靶比为 100:1, 总体积为 0.4 ml, 于 37℃ 培养 16 小时, 取出后离心 15 分钟(转速 2000 转/分), 弃去上清液, 加入 0.1 ml 0.5% 胰酶(DIFCO)及 0.1 ml 0.005% DNase(SIGMA), 置 37℃ 温浴 30 分钟, 然后加入 0.8 ml Hanks 液, 摇匀, 离心 15 分钟(2000 转/分), 吸取上清液测定。

4. 杀伤率计算

$$\text{杀伤率} \% = \frac{\text{测定(cpm)} - \text{自然释放(cpm)}}{\text{标记(cpm)} - \text{自然释放(cpm)}} \times 100$$

结 果

1. 2'-5'P₃A₃ 对正常人 PBL 的 NK 活性增强作用

为模拟生理状态, 便于今后应用于临床, 将 2'-5'P₃A₃ 与 PBL 同时加入靶细胞中, 于 37℃ 持续作用 16 小时, 测其 NK 活性, 所得结果用杀伤率(%)表示, 结果见表 1。

从表 1 可以看出, 在进行试验的 14 例中有 9 例 PBL 的 NK 效应因 2'-5'P₃A₃ 的作用而明显增强, 说明 2'-5'P₃A₃ 对正常人 PBL 的 NK 活性是有促进作用的, 尤其是 PBL 本身的 NK 效应相对较低者更为显著, 有的甚至可提高杀伤率二倍左右。

2. 2'-5'P₃A₃ 是作用于效应细胞来提高

本实验曾受到上海细胞所王球达工程师、国际妇婴保健院同位素室、上医附属妇产科医院同位素室大力协助, 在此表示感谢。

表 1 2'-5'P₃A₃ 对正常人 PBL 的 NK 活性增强作用

例 数	PBL + 2'-5'P ₃ A ₃		
	0	1μM	10μM
1	26.1	27.3	34.9*
2	16.9	19.6	23.0*
3	30.0	45.3*	42.2
4	37.4	44.5*	47.5*
5	31.2	38.1*	40.3*
6	27.4	30.6	30.9
7	12.1	37.1*	18.7
8	34.0	42.5	39.2
9	47.2	47.0	47.5
10	37.0	41.2	37.6
11	21.1	51.0*	34.4
12	33.8	58.9*	54.8*
13	59.6	62.7	61.4
14	30.5	52.8*	52.4*

表中所列数据为 2'-5'P₃A₃ 及 PBL 与靶细胞于 37℃ 持续作用 16 h 所得杀伤率%。

*表示 2'-5'P₃A₃ 明显增强 PBL 的 NK 活性, 以单独 PBL 的 NK 活性为对照, P < 0.05。

NK 效应的, 并非作用于靶细胞

2'-5'P₃A₃ 增强的 NK 效应是通过增强 PBL 的杀伤力还是通过降低靶细胞对 PBL 杀伤的抵抗力来达到的呢? 或者两者都有作用呢? 为了弄清这一问题, 实验将 2'-5'P₃A₃ 单独短期处理 PBL, 然后用 Hanks 液洗三次, 以去除残余的 2'-5'P₃A₃, 测该 PBL 的 NK 活性, 并与同例 PBL 在 2'-5'P₃A₃ 长期持续作用下的 NK 效应进行对照。实际另将 2'-5'P₃A₃ 单独短期处理的靶细胞, 然后用 Hanks 液洗三次, 以去除残余的 2'-5'P₃A₃, 以该细胞为靶细胞, 测正常人 PBL 的 NK 效应, 并与同例 PBL 在 2'-5'P₃A₃ 长期作用下的 NK 活性进行对照, 结果见表 2、表 3。

从表 2 看出, 将 PBL 先用 2'-5'P₃A₃ 于 37℃ 短期处理后洗去作细胞毒效应细胞, 它的 NK 效应与 2'-5'P₃A₃ 及淋巴细胞同时加入靶细胞实验组中的 NK 效应相差不显著。从表 3 看出, 用 2'-5'P₃A₃ 短期处理靶细胞, 而不处理 PBL, 所得 NK 效应与 PBL 本身的 NK 活性

表 2 比较 2'-5'P₃A₃ 短期(暂时)与长期(持续)处理 PBL 时的 NK 活性差异

	PBL + 2'-5'P ₃ A ₃					
	0	0.1 μM	0.33 μM	1 μM	3.3 μM	10 μM
L	24.9	30.1	33.4	38.6	39.2	40.0
LW ₁ h		29.6	31.4	37.1	39.1	37.1
LW ₂ h		28.7	31.0	39	47.3	38.2
LW ₃ h		31.6	32.4	40.3	40.0	36.5

L 表示 PBL 与 2'-5'P₃A₃ 同时加入靶细胞中。LW₁h 表示 2'-5'P₃A₃ 处理 PBL 1 h 后洗去。LW₂h 表示 2'-5'P₃A₃ 处理 PBL 2 h 后洗去。LW₃h 表示 2'-5'P₃A₃ 处理 PBL 3 h 后洗去。表中所列数据为三次实验的 PBL 于 37℃ 作用靶细胞 16 h 的杀伤率%平均值。

表 3 比较 2'-5'P₃A₃ 短期(暂时)处理靶细胞与长期(持续)处理 PBL 时的 NK 活性差异

	PBL + 2'-5'P ₃ A ₃					
	0	0.1 μM	0.33 μM	1 μM	3.3 μM	10 μM
L ₁	60.6	63.1	61.8	56.7	65.3	68.9
TW ₁ h ₁		42.4	37.2	46.1	59.5	43.6
L ₂	48.0	42.3	42.6	44.8	50.6	50.2
TW ₁ h ₂		32.8	38.6	36.0	29.5	46.1

L₁、L₂ 表示二例 2'-5'P₃A₃ 及 PBL 同时加入未经 2'-5'P₃A₃ 处理的靶细胞实验。TW₁h₁、TW₁h₂ 表示二例 2'-5'P₃A₃ 处理靶细胞 1 h 后洗去, 加入 PBL, 但不加 2'-5'P₃A₃ 的实验。表中所列数据为 PBL 于 37℃ 作用靶细胞 16 h 的杀伤率%

相比反略有下降。由此说明 2'-5'P₃A₃ 促进 PBL 的 NK 效应是通过增强 PBL 的杀伤力来达到的, 而非通过降低靶细胞对 PBL 杀伤的抵抗力来达到的。

3. 2'-5'P₃A₃ 作用于 PBL 增强 NK 效应的时相效应

结果见图 1、图 2。

从图 1 看出, 2'-5'P₃A₃ 作用于淋巴细胞 40 分钟后即有较明显促进 NK 效应的作用。

从图 2 看出, 由于 2'-5'P₃A₃ 的作用, PBL 对靶细胞杀伤率在 8 小时内所达到的 53.6% 就相当于没有 2'-5'P₃A₃ 作用的 PBL 在 16 小时中对靶细胞的杀伤率的 44.2% 还略有提高,

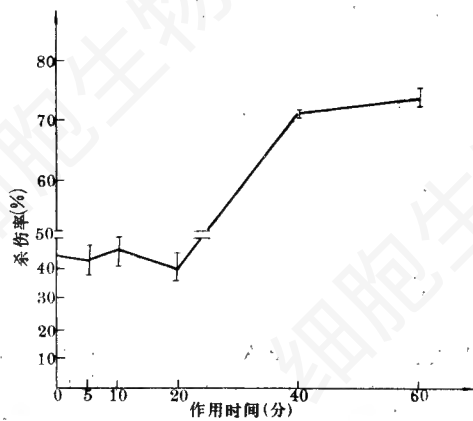


图1 2'-5'P₃A₃ 作用于PBL增强NK效应的时相效应(I)

1 μM 2'-5'P₃A₃ 处理PBL不同时间后,用Hanks液洗三次,然后将该PBL作为效应细胞加入靶细胞中,温浴16h。上图数据是两例实验结果的平均值。

表4 不同浓度2'-5'P₃A₃对靶(K562)的NK活性影响

实验	2'-5'P ₃ A ₃ (μM)	效(PBL):靶(K562)			
		3.3/1	10/1	33/1	100/1
实验一	0	14.7	23.1	32.0	36.8
	0.33	15	33.7	34.9	48.2
	1	24.1	29.8	36.7	44
	3.3	30.7	31.6	37.4	39.7
实验二	0	6.7	6.5	18.2	37.8
	0.33	8.3	3.5	17.3	44.6
	1	21.5	10.4	22.8	43.0
	3.3	15.4	21.4	31.7	40.8

不同浓度2'-5'P₃A₃加入不同比例的效(PBL):靶(K562)于37°C作用16h,测其NK活性,所得结果以杀伤率%表示。

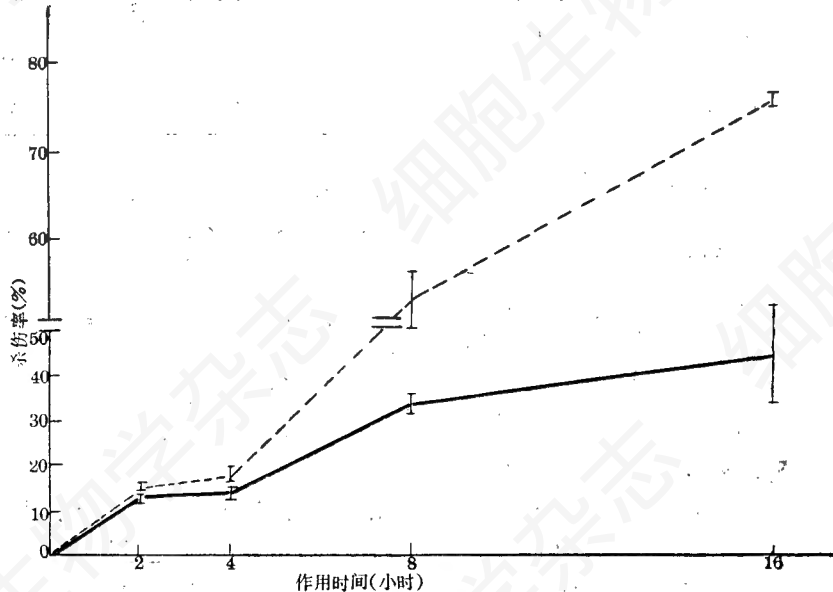


图2 2'-5'P₃A₃ 作用于PBL增强NK效应的时相效应(I)

——表示2'-5'P₃A₃不存在情况下,单独PBL的NK活性。

.....表示1 μM 2'-5'P₃A₃ + PBL的NK活性。上图数据是两例实验的平均值。

由此说明2'-5'P₃A₃能提前淋巴细胞杀死靶细胞的时间。

4. 2'-5'P₃A₃对不同效靶比的NK活性的影响

结果见表4。

从表4看出,与不经2'-5'P₃A₃处理的对照组相比,正常人PBL在2'-5'P₃A₃的作用下,相对较低的效靶比可达到相对较高的杀伤率%。

讨 论

本实验显示2'-5'P₃A₃对PBL的NK活性有明显的增强作用,尤其是PBL本身的NK效应相对较低时更为显著。但有的1 μM 2'-5'P₃A₃就能显示明显的NK活性增强作用,有的10 μM 2'-5'P₃A₃才能显示明显的增强作用,有的都不显示明显的增强作用,说明了PBL对2'-5'P₃A₃的敏感性有个体差异,实质上反映了

NK 的异质性。

干扰素对 NK 的激活并非直接, 其中要有 RNA 及蛋白质的生物合成相配合^[7]。而 2'-5' P₃A₃ 对 NK 的增强作用由实验显示只需要作用于 PBL 40 分钟就能明显显示, 这似乎与干扰素激活 NK 要有 RNA 及蛋白质生物合成相配合有某种联系。

本实验还显示了 2'-5' P₃A₃ 能提前 PBL 杀伤靶细胞的时间, 并能缩小一定的效靶比例。这些现象似乎反映了 2'-5' P₃A₃ 有可能提高了 PBL 的有效杀伤成分, 增强了 PBL 的杀伤力。

有的肿瘤病人, 尤其是转移性肿瘤病人的 NK 活性相对较低^[8], 2'-5' P₃A₃ 如能使 NK 效应较低的肿瘤病人增强其 NK 效应的话, 那就更

富有实际意义, 这是我们感兴趣的问题, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Herberman R. B. et al. 1975 *Int. J. Cancer* 63:230
- [2] Herberman R. B. et al. 1978 *Adv. Cancer Res.* 27:305
- [3] Bloom B. R. 1980 *Nature* 284:622
- [4] Gidlund M. et al. 1978 *Nature* 273:759
- [5] Lipinski M. et al. 1979 *Eur. J. Immune* 10: 226
- [6] Einhorn S. et al. 1978 *Int. J. Cancer* 22: 405
- [7] Senik A. et al. 1980 *Scad. J. Immune* 12: 51
- [8] Bloom B. R. et al. 1982 *Springer Semin. Immunopathol.* 4:397

昆虫体内脂肪体细胞核 DNA 含量的细胞光度法测定

关 雪 辰

(中国科学院动物研究所)

昆虫脂肪体与哺乳动物的肝脏有相似的功能。它是营养物的贮存场所, 又是代谢和合成各种血蛋白、卵黄蛋白的中心。(Wyatt, 1975; Chen T. T. 1979)^[1]。1981年 K.K. Nair 等^[2]曾研究东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 成虫脂肪体细胞核 DNA 在发育中的变化, 表明成虫羽化后不同发育天数的脂肪体核 DNA 量差异很大, 而且随着昆虫的发育核内 DNA 分布趋向较高倍体。1979年 Irvine 也同样证明蝗虫成虫脂肪体核明显地有多倍体。蝗虫成虫脂肪体核 (Lauverjat 1977; Couble 等 1979) 不进行有丝分裂, 但现已知有 DNA 复制而导致增加多倍性。

是否所有昆虫脂肪体细胞都产生核的多倍化? 有关脂肪体 DNA 含量的资料表明: 沙漠蝗 *Schistocerca gregaria* 成虫脂肪体细胞发生多倍化 (Pinamonti 等 1966), 而在红椿 *Pyrrhocoris apterus* (Machat 1969) 和丽蝇 *Calliphora* 幼虫 (Przce, 1969) 都没有多倍化。我们采用 Feulgen 染色法对蓖麻蚕末龄幼虫、预蛹及蛹、粘虫和柞蚕蛹脂肪体细胞核 DNA 含量进行了细胞光

度测定, 以了解昆虫体内脂肪体细胞核 DNA 含量的变化。

材 料 与 方 法

蓖麻蚕取自广东, 一化性柞蚕取自河南, 粘虫取自北京郊区。解剖昆虫, 取其脂肪体及其睾丸, 加生理盐液匀碎, 作成单层细胞载片标本。置 Carnoy 液中固定, 再按常规进行 Feulgen 染色。采用 XFG-01 型显微分光光度计测量, 波长选用 545 毫微米。为校正细胞核 DNA 分布不均匀, 采用一波长二区域法测定 (G. L. Wied 1970)。

结 果 与 讨 论

一、蓖麻蚕蛹期脂肪体细胞的形态

蓖麻蚕蛹脂肪体为淡黄色条带状。脂肪体组织分布于整个身体内, 穿入大部分器官。大部分脂肪体储藏在腹部, 与肠道紧密联结。使脂肪体作为肠道吸收后接受营养的最先组织。

蓖麻蚕脂肪体油红染色片为本室陈进生先生协助制作, 表示感谢。