



“免疫”核糖核酸对热处理后的人淋巴细胞恢复花环的作用

邵国英 徐荣婷 陈诗书

(上海第二医学院 上海市免疫研究所)

人胸腺细胞和外周 T 淋巴细胞表面带有绵羊红细胞受体, 故能与绵羊红细胞形成玫瑰花环。近年来相继发现用胰蛋白酶^[1]或加热 45℃处理^[2]可以使 T 淋巴细胞失去与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力。Mendes 等^[3]进一步证实加热 45℃处理的 T 淋巴细胞经转移因子、胸腺素或正常人血清的可透析成分处理, 可部分地恢复玫瑰花环形成, Valdimarsson 和 Mcquire^[4]亦证明粗制转移因子制剂能使胰蛋白酶处理后的 T 淋巴细胞部分地恢复玫瑰花环。这些事实提示不同的免疫促进剂在体外对人为的失去玫瑰花环形成能力的 T 淋巴细胞有部分地恢复作用。本文报告用正常人白细胞“免疫”核糖核酸(iRNA)在体外对加热处理的正常人外周血 T 淋巴细胞恢复玫瑰花环的初步结果。

材料和方法

1. 正常人白细胞“免疫”核糖核酸用联合抽提法制备

制剂中 RNA 含量为 $48.33 \pm 4.72\%$, DNA 含量为 $4.31 \pm 2.53\%$, 蛋白质含量为 $2.76 \pm 0.32\%$, 糖原含量为 $42.92 \pm 9.92\%$, 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示五条区带, 相当于 4S, 8S, 9S, 15S 和 20S^[5]。

2. 正常人外周血 T 淋巴细胞的分离及加热处理

肝素抗凝血用 Hanks 液(pH7.4)作等量稀释后, 用聚蔗糖—泛影葡胺(比重 1.077)按常规方法分离淋巴细胞。淋巴细胞经 Hanks 液洗涤两次并校正到细胞浓度为 4×10^6 /毫升。取出上述淋巴细胞悬液 0.1 毫升留作玫瑰花环自然形成率, 其余淋巴细胞悬液置 45℃恒温水浴加热 1 小时, 然后置 45℃恒温箱平衡的离心机 2000 转/分离心 10 分钟, 弃去上层液, 沉淀的淋巴

细胞用 45℃预热的 Hanks 液洗涤两次, 再用室温的 Hanks 液校正到原体积, 即为加热处理的淋巴细胞悬液。经苔盼蓝染色, 90%以上的淋巴细胞不着色。

3. 加热处理的淋巴细胞与白细胞 iRNA 保温

按照 Mendes 等人^[3]的保温条件, 即取加热处理的淋巴细胞悬液 0.1 毫升, 加用 Hanks 液溶解的白细胞 iRNA 0.1 毫升(200 微克)混匀置 4℃冰箱保温一小时, 然后经 1000 转/分离心 5 分钟去上清液, 沉淀的细胞经 Hanks 液洗两次并校正到原体积。以不含 iRNA 的 Hanks 液与加热处理的淋巴细胞保温作为对照。

4. 玫瑰花环形成试验

未经加热处理的、经白细胞 iRNA 保温后的和与 Hanks 液保温后的淋巴细胞悬液分别加入 1% 绵羊红细胞悬液 0.1 毫升, 混匀后经 37℃水浴保温 10 分钟, 即以 500 转/分离心 5 分钟, 并置 4℃冰箱 1 小时, 吸去上清液, 沉淀细胞轻轻混匀后加入 0.8% 戊二醛—缓冲生理盐水 1 滴, 混匀后于 4℃冰箱固定 30 分钟。以 500 转/分离心 5 分钟, 弃去上清液加入 56℃灭活的小牛血清 1 滴, 轻轻混匀后吸出全部细胞制成两张涂片。血片用瑞氏染液—磷酸缓冲液(pH6.2)和 1% 氧化美蓝双重染色, 油镜计数 1000 个淋巴细胞中形成玫瑰花环的细胞数(以粘附 4 个或 4 个以上绵羊红细胞的淋巴细胞作为花环形成细胞)。结果以花环形成的百分数表示。

5. 反玫瑰花环试验

吸取 1% 绵羊红细胞 0.1 毫升, 加入白细胞 iRNA 0.1 毫升(200 微克), 混匀后在 4℃冰箱保温 1 小时, 以 1000 转/分离心 5 分钟弃去上清液, 用 Hanks 液洗涤两次并校正到原体积, 然后与加热处理的淋巴细胞悬液 0.1 毫升混合, 以后的处理与 4 相同。

6. 白细胞 iRNA 的酶处理

称取核糖核酸酶(中科院生物化学研究所药厂出品), 脱氧核糖核酸酶(Sigma 药厂出品)和胰蛋白酶

(新疆伊利肉联厂生化制药厂出品)各4毫克,分别溶于1毫升的Hauks液中,于上述酶溶液中各加入Hanks液溶解的白细胞iRNA1毫升(含4毫克)。在37℃水浴中保温1小时。用氯仿去尽酶蛋白。取酶处理后的白细胞iRNA0.1毫升与加热处理后的淋巴细胞悬液0.1毫升混和,再以上述方法4观察其对玫瑰花环形成的影响。

结 果

1. 白细胞 iRNA 对加热处理的淋巴细胞形成玫瑰花环的作用

加热处理的淋巴细胞与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力及白细胞 iRNA 保温后该淋巴细胞玫瑰花环恢复的作用总结于表1及图1。

表1 不同批号的白细胞 iRNA 对加热处理的淋巴细胞玫瑰花环的恢复作用

实 验 次 数	1	2	3	4	5	6	7	均数±标准差
阴性玫瑰花环形成对照 %	1.4	4.4	0.6	1.0	0.8	0.8	4.1	1.87±1.53
用不同批号的白细胞“免疫”核糖核酸保温后玫瑰花环形成 %	77-7-5	3.7	6.2	5.8	9.4	1.1	3.7	5.44±2.65 $P<0.05^*$
	77-7-5 (去糖原的)	5.8	6.3	5.4	5.6	1.3	2.4	4.97±2.15 $P<0.01$
	77-8-5	7.8	6.3	3.0	2.4	0.9	1.5	4.54±3.16 $P<0.05$
	77-4	2.0	16.4	3.3	11.8	2.2	2.2	6.3±5.25 $P>0.05$
	76-4	9.1	9.1	2.5	4.0	4.0	2.2	5.7±2.96 $P<0.01$
	77-3	4.6	13.6	4.4	11.5	1.4	4.5	7.05±4.1 $P<0.01$
	77-6-23	5.2	6.4	2.0	5.0	2.1	5.9	4.56±2.69 $P<0.01$

* 为与阴性对照进行配对统计学处理的结果。

由表1可知加热处理的外周血淋巴细胞与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力明显消失。阴性玫瑰花环形成对照项所列七次实验的花环百分数变动在0.6—4.4%之间,平均为1.87±1.53%。这个数值远较自然花环百分数(自然花环在我们实验条件下平均为35%)为低。但加热处理的淋巴细胞与白细胞 iRNA 保温后其花环形成率比对照管升高2.4—2.7倍。在7批白细胞 iRNA 制剂中(每批约由3000克健

康人外周血白细胞制成)的实验数据,除一批缺乏统计学显著性外,其余六批增加花环形成率均具有统计学明显差别意义。说明白细胞 iRNA 在体外能使加热处理的淋巴细胞部分地恢复玫瑰花环形成的能力。

2. 不同浓度白细胞 iRNA 对加热处理淋巴细胞形成玫瑰花环的影响

为了观察白细胞 iRNA 浓度对加热处理淋巴细胞恢复玫瑰花环的影响,把同一份加热处理的淋巴细胞分成若干管并分别与50、100、150、200和300微克的白细胞 iRNA 保温。三次实验的结果如图2所示。加热处理的淋巴细胞玫瑰花环形成率随加入白细胞 iRNA 的量(在一定范围内)而增加。说明加热处理淋巴细胞恢复玫瑰花环的能力与加入的白细胞 iRNA 的浓度呈现一定的剂量关系。

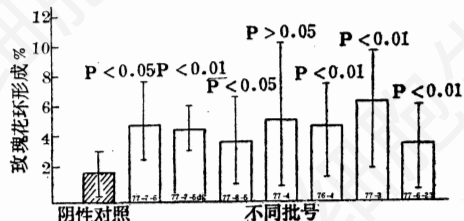


图1 不同批号的白细胞 iRNA 对加热处理淋巴细胞形成玫瑰花环的作用

表 2 白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞保温和白细胞 iRNA 与加热处理的淋巴细胞保温对玫瑰花环恢复的比较

实 验 次 数	1	2	3	4	5	6	均数±标准差
阴 性 对 照 %	3.6	7.5	9.4	5.3	9.4	5.3	6.75±2.18
白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞保温后对加热处理淋巴细胞玫瑰花环形成的%	3.7	5.1	9.4	7.9	12.6	10.4	8.18±3.31 $P>0.05$
白细胞 iRNA 先与加热处理的淋巴细胞保温, 其恢复玫瑰花环的 %	7.2	9.3	17.6	13.1	16.6	12.6	12.23±4.07 $P<0.01$

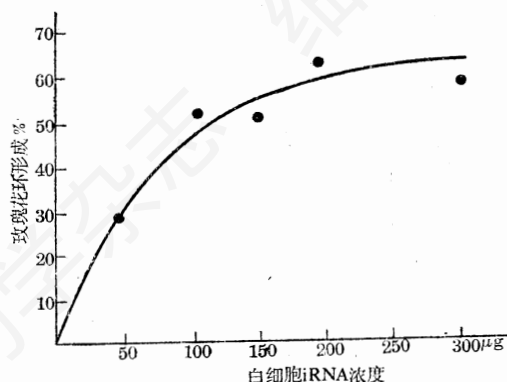


图 2 不同浓度白细胞 iRNA 对加热处理的淋巴细胞形成玫瑰花环的影响

图中各点为减去阴性对照值后的净增加值

3. 白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞保温对加热处理淋巴细胞恢复玫瑰花环的影响 (反玫瑰花环试验)

把相同浓度的白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞作同样的保温, 然后以此红细胞与加热处理的淋巴细胞一起作用并观察其玫瑰花环的恢复作用, 六次实验的结果如表 2 和图 3 所示。

从表 2 和图 3 的结果说明白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞温育, 对加热处理的淋巴细胞玫

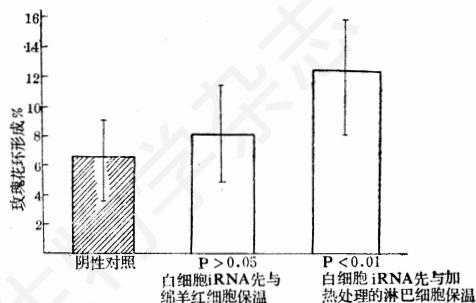


图 3 白细胞 iRNA 与绵羊红细胞温育后对加热处理淋巴细胞恢复玫瑰花环形成的影响

瑰花环的恢复无明显的作用, 与阴性对照进行配对的统计学处理 $P>0.05$ 。相反, 同一份加热处理的淋巴细胞经白细胞 iRNA 温育, 其玫瑰花环的恢复有明显的增加, 统计学处理 $P<0.01$, 达到非常显著的差别。这就说明白细胞 iRNA 对加热处理淋巴细胞恢复玫瑰花环的作用是通过淋巴细胞的。

4. 白细胞 iRNA 经酶处理后对加热淋巴细胞形成玫瑰花环的影响

经核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、胰蛋白酶处理后的白细胞 iRNA 对加热处理的淋巴细胞玫瑰花环的恢复有不同的影响。三次实验的结果如表 3 所示。

表 3 白细胞 iRNA 经 RNase, DNase 和胰蛋白酶分别处理后对加热处理的淋巴细胞玫瑰花环的影响

实 验 次 数	1	2	3	均 数
阴 性 对 照 %	6.8	4.8	2.8	4.8
RNase 处理的 iRNA 恢复加热处理淋巴细胞玫瑰花环 %	9.3	4.1	5.1	6.16
DNase 处理的 iRNA 恢复加热处理淋巴细胞玫瑰花环 %	12.7	6.6	6.3	8.53
胰蛋白酶处理的 iRNA 恢复加热处理淋巴细胞玫瑰花环 %	13.0	6.6	5.8	8.46
白细胞 iRNA 恢复加热处理淋巴细胞玫瑰花环 %	16.6	8.4	7.4	10.8

表3的结果说明,白细胞 iRNA 经 RNase 处理后其恢复玫瑰花环的效应明显的消失,其作用只有酶处理前白细胞 iRNA 的 22%,而 DNase 或胰蛋白酶处理后其恢复玫瑰花环的能力尚达处理前白细胞 iRNA 的 60%。此实验说明我们制剂中恢复玫瑰花环的作用的主要成分是 RNA,而且其作用要求有一定完整分子结构的 RNA。

讨 论

我们的实验表明,正常人白细胞 iRNA 在体外能使加热处理的淋巴细胞部分地恢复玫瑰花环的作用,这种作用在一定范围内与白细胞 iRNA 浓度有关,它的作用不是通过绵羊红细胞,而是通过淋巴细胞产生的,核糖核酸酶能够消除白细胞 iRNA 的这种作用。

Mendes 等人^[3]已经证明转移因子,胸腺素在体外对加热处理的淋巴细胞有部分恢复玫瑰花环的作用,并认为这两种制剂中存在着绵羊红细胞“可溶性”受体。后者既可直接结合到加热处理的淋巴细胞表面,也可先结合到绵羊红细胞表面,这两种作用均可使加热处理的淋巴细胞恢复玫瑰花环。我们的实验结果说明白细胞 iRNA 不同于转移因子和胸腺素,它不存在绵羊红细胞可溶性受体,因为白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞温育后无恢复加热处理的淋巴细胞形成玫瑰花环的作用。从白细胞 iRNA 需要通过淋巴细胞发挥作用以及 T 淋巴细胞表面的绵羊红细胞受体的本质属蛋白质^[2],是否白细胞 iRNA 中含有合成这种绵羊红细胞受体所需的信息核糖核酸,从而诱导加热处理的淋巴细胞合成这种受体,这是一个有待进一步研究的问题。一个有趣的现象是我们的结果在许多方面与牛满江等人用小鼠或小牛肝 RNA 诱导某些肿瘤细胞合成一些正常肝细胞所特有的蛋白质和酶类的结果相似^[6-8]。例如他们看到肝 RNA 诱导正常肝特有的蛋白质和酶类的程度与 RNA 浓度有关,用 RNase 处理肝 RNA 使其诱导作用消失。国内也有人

用正常鼠肝 RNA 在体外诱导肝癌细胞的葡萄糖代谢酶谱向正常酶谱转化^[9],以及直接分离正常肝信息核糖核酸在体外诱导人肝癌细胞和小鼠肝癌细胞合成血浆白蛋白^[10]的报道。虽然我们所用的体外实验条件并不与上述作者所用的完全相同,但从结果的相似性以及临床报道,应用白细胞 iRNA 治疗流行性乙型脑炎、病毒性心肌炎、慢性乙型肝炎患者中,33 例玫瑰花环低于正常值的病人有 91% 的病例恢复到正常值^[11-14],说明在整体情况下白细胞 iRNA 也具有恢复玫瑰花环的作用。最近 Sell 和 Mendelsohn^[15]在分析 iRNA 的作用机理时首先提到的是 iRNA 传递信息密码的问题,这些使我们设想在白细胞 iRNA 中存在着诱导淋巴细胞产生绵羊红细胞受体的信息。也可能白细胞 iRNA 具有非特异的诱导物的作用,它们进入淋巴细胞后插入到 RNA 分子中起着起动因子的作用^[16],从而使失去绵羊红细胞受体的淋巴细胞重新合成这种受体。所以进一步研究白细胞 iRNA 的这种作用是很有意义的。

摘 要

正常人外周血 T 淋巴细胞经 45℃ 处理 1 小时,失去与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力。这种淋巴细胞用正常人白细胞“免疫”核糖核酸(iRNA)4℃ 保温 1 小时,可以部分地恢复与绵羊红细胞形成玫瑰花环的能力。玫瑰花环恢复的程度在一定范围内与所用的白细胞 iRNA 浓度有关。白细胞 iRNA 经核糖核酸酶处理后其恢复玫瑰花环的能力明显降低,但脱氧核糖核酸酶或胰蛋白酶处理后对恢复玫瑰花环的作用很少影响,若白细胞 iRNA 先与绵羊红细胞温育,再以此红细胞与加热处理的淋巴细胞在 4℃ 温育 1 小时,未见玫瑰花环的恢复作用,提示白细胞 iRNA 的这种作用是通过淋巴细胞来实现的。对白细胞 iRNA 恢复加热处理的淋巴细胞的作用机理进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Wbran, J. et al., 1972 *J. Clin. Invest.*, 51:2537—2543.
- [2] Galile, U. & M. Schlesinger., 1976 In "lymphocytes and Their Cell Membranes". Michael Schlesinger. pp.129—139.
- [3] Medes, N. F. et al., 1975 *Cell. Immunol.* 17:560—566.
- [4] Valdimarsson H. & R. L. McGuire., 1977. *Clin. Exp. Immunol.* 29:261—265.
- [5] 陈诗书: 生物化学与生物物理学报 1980 12(2): 147—152.
- [6] Niu, M. C. et al., 1961 *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47:1689—1700.
- [7] Niu, M. C. et al., 1962 *Proc. Nat. Acad.*

Sci. 48:1964—1969.

- [8] Niu, M. C. et al., 1964. *Fed. Proc.*, 23: 317.
- [9] 顾建人等 1966, 中华医学杂志 52:209—223.
- [10] 李文裕等: 1978, 实验生物学报 11:109—120.
- [11] 上海传染病总院等: 1976, 中华内科杂志 6:372.
- [12] 上海第二医学院附属瑞金医院传染病科等 1978, 上海医学 (4):17—19.
- [13] 上海第二医学院附属第三人民医院等 1979, 上海医学 2(6):62.
- [14] 上海第二医学院附属第三人民医院等 1979, 中华医学杂志 59:256.
- [15] Sell, S. & J. Medlesohn, 1978. *Arch. Path & Lab. Med.* 102:217—222.

⁶⁰钴 γ 线对骨髓、脾脏造血细胞 DNA 和 RNA 合成能力的影响

苏燎原 汪涛 马祥瑞 刘克良 林兴成 王洪云 冯纪辛*

(苏州医学院放射损伤基础教研室)

骨髓及淋巴组织是主要的造血器官。造血细胞不断地、周期性地地进行着细胞繁殖和分化,以便陆续补充外周的血细胞,是保持生命活动的重要过程。

电离辐射损伤机体,造血系统是最敏感的器官之一,在一定程度上决定着放射病的发生和发展过程。因此研究造血细胞的增殖分裂情况及其辐射效应对了解造血系统的受损机制是有裨益的。

材 料 和 方 法

一、标本采取

1. 人体骨髓穿刺,取出骨髓液不超过 1 毫升,以肝素抗凝。
2. 豚鼠骨髓细胞悬液: 杀死体重 200 克左右的豚鼠,取出股骨,用 10 毫升 Eagle 培养液冲出骨髓细胞,相继通过 6½、4 号注射针头,使细胞充分散开,进行计数。
3. 豚鼠脾细胞悬液: 剪去豚鼠脾脏的边缘包膜及中间的韧带,脾脏置于盛少许 Eagle 培养液的培

养皿中,用弯背小剪刀挤压出脾细胞,经过 6½、4 号针头,制成单细胞悬液,进行计数。

二、照射条件

⁶⁰ 钴治疗机,距离 50 厘米,剂量率 32 拉德/分。

人骨髓液 0.3 毫升置小玻璃瓶内分别照射 5、10 拉德,另取 0.3 毫升作自身对照。

豚鼠的骨髓液及脾脏细胞置小玻璃瓶内,溶液深度不超过 4 毫米,每个样品分为四份进行照射。剂量: 0、50、100、200 拉德。

三、细胞培养及渗入

人骨髓 0.3 毫升加 2 毫升 Eagle 培养液,再加 ³H-TdR (胸腺嘧啶核苷) 1.2μCi (微居里)、¹⁴C-UR (尿嘧啶核苷) 0.3μCi, 37℃ 培养 4 小时。

豚鼠的骨髓及脾细胞 2×10⁶ 个/毫升,每瓶 2 毫升培养液,加 ³H-TdR 0.6μCi、¹⁴C-UR 0.15μCi, 每个照射剂量的同一样品设置 4—5 个平行样品,37℃ 培养 4 小时。

四、收获细胞

每瓶加 6 毫升蒸馏水低渗破坏红细胞,将溶液转

* 周有宁、薛智谋同志参加部分工作。