

研究工作

猪胸腺激素对淋巴细胞 DNA 复制和转录的刺激作用*

金以丰 徐贤秀 汤国枝 朱家珍 张鹤云

(南京大学生物系分子生物学研究室)

胸腺激素可促进 T 细胞成熟分化, 调节免疫细胞功能, 因而在免疫中起重要作用^[1]。T 细胞在成熟过程中, 将出现 L_{yt} 1, 2, 3 及绵羊红血球受体等表面标志^[2]和 TDT^[3]。

本研究以 ³H-TdR 和 ³H-Leu 掺入试验观察猪胸腺激素 PTH 和 DNA 复制及蛋白质合成的关系, 以玫瑰花结及 TDT 为标志研究 PTH 在 T 细胞成熟中的作用。

一、材料和方法

1. PTH 制备 按文献[4]。

2. 胸腺细胞 取 20 天以内的仔猪胸腺, 制备细胞, 悬于 RPMI-1640 (含 10% 小牛血清) 中。

3. 骨髓细胞 取 2—2.5 月龄的豚鼠骨髓细胞, 经淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂) 分离, 悬于 RPMI-1640 (含 10% 小牛血清) 中。

4. 同位素掺入试验 1×10^7 胸腺细胞, 48 小时培养后, 撤去原有培养液, 加入 1 毫升新鲜的 RPMI-1640 (如掺入 ³H-Leu, 则用不含亮氨酸的 RPMI-1640, 其中含 ³H-TdR 或 ³H-Leu $1 \mu\text{Ci}$; 37°C 培养, 膜片法制样, 液体闪烁计数器上测定。

5. TDT 活力测定 参考 Barton 等^[5]方法, 但以冻融代替超声破碎细胞; 12,000rpm 离心 15 分钟, 制得的酶粗提液直接用于酶活力测定。反应引物为 oligo (dA)₁₀, 37°C 反应 1 小时, 点样 10 微升于硝酸纤维素膜上, 经 5% 三氯醋酸固定, 1N 盐酸洗三次, 烘干, 测定 ³H-dGTP 掺入的 cpm。每小时催化 1×10^{-8} mole ³H-dGTP 掺入到引物分子上的酶量为一个酶单位。酶单位/10⁸ 细胞为比活。

6. 活性玫瑰花结测定 按文献[6]。

二、结果和讨论

1. PTH 对 ³H-TdR 和 ³H-Leu 掺入的影响

胸腺细胞悬液中加入 PTH (2.5 微克/毫升), 对 ³H-TdR 和 ³H-Leu 的掺入均有促进作用 (图 1)。

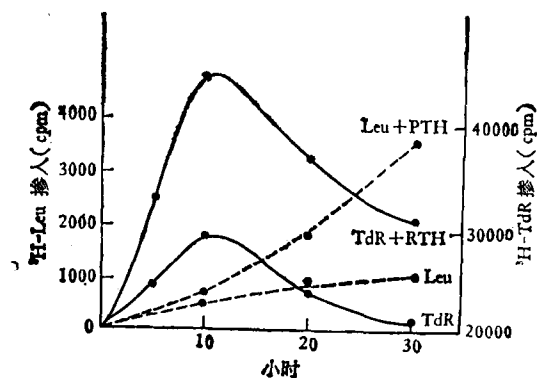


图 1 PTH 对 ³H-Leu 和 ³H-TdR 掺入的促进作用

PTH 2.5 μg , 1×10^7 细胞, 37°C

³H-Leu 及 ³H-TdR 各 $1 \mu\text{Ci}$

³H-TdR 掺入高峰在第 10 小时, 前 10 小时为上升阶段, 10 小时以后, 可能由于该体系中混有 DNase 作用, 致使 ³H-TdR 掺入逐渐下降。³H-Leu 加 PTH 组在第 30 小时掺入急剧上升, 而不加 PTH 的对照组, 至 30 小时已不再上升。由图 1 可见, DNA 合成高峰出现在蛋白质合成高峰之前。

PTH 对 DNA 和蛋白质合成的促进作用

* 该研究中的部分工作由中国科学院科学基金资助。
文内缩写及代号: TDT——末端脱氧核苷酸转移酶;
PTH——猪胸腺激素, ³H-TdR——³氢-胸腺嘧啶核苷;
³H-Leu——³氢-亮氨酸。

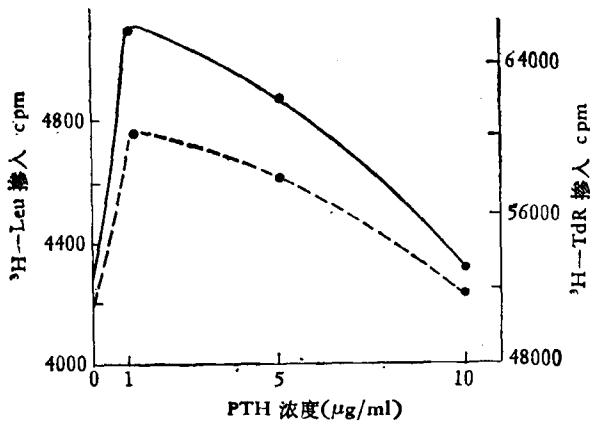


图2 PTH 浓度对 ^3H -Leu 及 ^3H -TdR 掺入的影响
 ^3H -Leu 及 ^3H -TdR 各 $1\mu\text{Ci/ml}$, 1×10^7 细胞, 37°C , 20 小时
 ----- ^3H -Leu 掺入, ——— ^3H -TdR 掺入

有一定范围, PTH 浓度过高, 即呈抑制作用。当细胞浓度为 1×10^7 /毫升时, 不论对 ^3H -TdR 或 ^3H -Leu 掺入, 当 PTH 浓度为 1 微克/毫升时, 促进作用最强, 超过此浓度时, 促进作用减弱(图 2), 达 25 微克/毫升时, 无促进作用。

在 PTH 促进淋巴细胞绵羊红血球受体生成时, 亦见类似现象, 初步推测, 这可能是由于 PTH 为部分纯化制剂, 其中除了胸腺激素外, 还混有与胸腺激素作用相反的抑制因子, 因此

随着 PTH 浓度升高, 抑制作用逐渐增强, 到达一定浓度后, PTH 的促进作用完全消失, 因而对 ^3H -TdR 及 ^3H -Leu 掺入和玫瑰花结的形成均无促进作用。

2. PTH 对丝裂霉素 C 抑制的部分恢复作用

已知丝裂霉素 C 可抑制 DNA 复制, 但对哺乳动物细胞 DNA 复制的抑制作用不完全^[7]。在本实验条件下, 丝裂霉素 C 浓度为 10 微克/毫升时, 对胸腺细胞 DNA 复制的抑制作用最强, 使 ^3H -TdR 掺入量降低了 2/3; 若加入 PTH (2.5 微克/毫升), 可部分恢复 ^3H -TdR 的掺入(图 3)。丝裂霉素 C 抑制了 DNA 复制, 也影响了蛋白质合成, 因而 ^3H -Leu 掺入下降, PTH 亦可使之部分恢复。

一般认为丝裂霉素 C 可使 DNA 断裂, 小牛胸腺的非组蛋白对 DNA 趋稳定作用, PTH 可能具类似功能。

3. PTH 在 T 淋巴细胞成熟中的作用

①丝裂霉素 C 和放线菌素 D 对绵羊红血球受体的影响, 关于胸腺激素诱导淋巴细胞绵羊红血球受体的机制, 至今尚无定论。有人认为受体出现十分迅速, 可能与新蛋白合成无关。

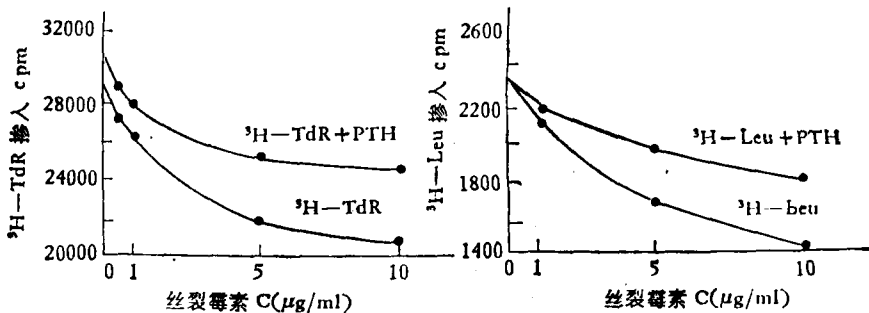


图3 丝裂霉素 C 对 DNA 复制和蛋白质合成的抑制及 PTH 的部分恢复作用
 PTH $2.5\mu\text{g/ml}$, ^3H -TdR 及 ^3H -Leu $1\mu\text{Ci/ml}$ 1×10^7 细胞 37°C , 20 小时

表 1 丝裂霉素 C、放线菌素 D 对 PTH 促进胸腺细胞玫瑰花结形成率的影响

	对照 (1)	PTH ($0.1\mu\text{g/ml}$) (2)	PTH ($0.1\mu\text{g/ml}$) + 丝裂霉素 C*			PTH ($0.1\mu\text{g/ml}$) + 放线菌素 D**		
			(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
均数士SD	44.5士1.8	68.1士5.6	63.8士9.2	58.5士8.9	64.8士6.6	41.4士1.6	52.0士2.6	46.6士3.9

* 丝裂霉素 C 浓度: (3)、(4)、(5) 分别为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

** 放线菌素 D 浓度: (6)、(7)、(8) 分别为 0.125、0.25、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

为了探讨这个问题,我们观察了丝裂霉素C和放线菌素D对 PTH 促进玫瑰花结形成率的影响(表1)。

表1中1—5组(均数)经方差分析,差异非常显著($P < 0.01$),进一步用Q检验法进行多重比较,PTH组和对照组相比,差异非常显著($P < 0.01$),说明 PTH 促进胸腺细胞绵羊红血球受体明显增加;若再加丝裂霉素C(3—5组),其玫瑰花结形成率和 PTH 组无显著性差异($P > 0.05$),提示绵羊红血球受体的产生与DNA复制间相关性不大。但由于丝裂霉素C不能完全抑制哺乳动物细胞DNA复制,因此不能确定该受体合成时无DNA复制。另外,如果在加PTH的同时再加放线菌素D(6—8组),将1,2,6,7,8五组(均数)进行方差分析,差异非常显著($P < 0.01$)。再用Q检验法进行多重比较,6—8组和2组(PTH组)间差异非常显著($P < 0.01$),而对对照组无明显差异($P > 0.05$),说明加放线菌素D后,PTH的促进作用明显下降。由此可见,绵羊红血球受体的合成与DNA转录有关。

②丝裂霉素C和放线菌素D对TDT的影响 TDT为T细胞特异性酶,在体内功能不明,但在T细胞发育的不同阶段可出现或消失,因此可作为T细胞发育阶段的标志。骨髓干细胞无TDT,当发育至前胸腺细胞时,TDT出现^[8]。PTH可促进骨髓干细胞发育,因此TDT明显升高,当将PTH加至骨髓细胞中,经过温育,TDT比活由 2.48 ± 0.37 提高到 17.41 ± 1.39 ,若再加丝裂霉素C或放线菌素D,PTH的促进作用受抑制,TDT比活分别下降31.8%($17.41 \pm 1.39 \rightarrow 11.87 \pm 2.22$)和65.6%($17.41 \pm 1.39 \rightarrow 5.98 \pm 0.57$),和PTH组相比差异非常显著($P < 0.01$), (图4)。说明TDT合成的刺激作用与DNA转录均有关。

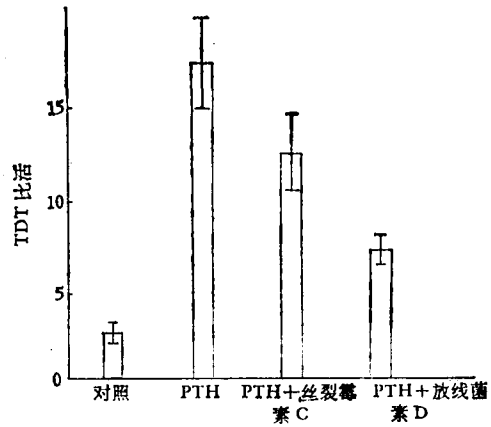


图4 丝裂霉素C、放线菌素D和PTH对TDT的影响

PTH: $0.1\mu\text{g/ml}$, 丝裂霉素C $1.0\mu\text{g/ml}$ 放线菌素D $0.25\mu\text{g/ml}$, 37°C , 20小时

由以上结果看出:① PTH促进T细胞DNA和蛋白质合成;② PTH促进T细胞发育,影响其发育早期的生化过程,可使骨髓细胞合成TDT酶,以致TDT水平升高;③ PTH也影响T细胞发育后一阶段,使T细胞进一步成熟而产生绵羊红血球受体;受体的合成与DNA转录有关,说明PTH促进绵羊红血球受体形成时有新蛋白合成。

参 考 文 献

- [1] Hooper, J. A., et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **249**, 125, 1975.
- [2] Ahmed, A., et al.: *Biology of Thymosin*, Ravan Press, New York, 1978.
- [3] Pazmino, N. H., et al.: *J. Exp. Med.*, **147**, 708, 1978.
- [4] 南京大学生物系分子生物学研究室:《医药工业》, 11期, 19页, 1981.
- [5] Barton, R., et al.: *J. Immunol.*, **116**, 462, 1976.
- [6] 中国医学科学院分院三室肿瘤免疫组:《肿瘤防治研究》,第1期, 1978.
- [7] Shatkin, A. J., et al.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **55**, 277, 1962.
- [8] Goldstein, A. L., et al.: *Rec. Pro. Horm. Res.*, **37**, 369, 1981.

【本文于1983年7月20日收到】