

生改变,很可能是蛋白上的可电离基团的质子化改变了生色团周围环境的平衡离子的分布,从而导致了吸收和圆二色谱的红移。

当 pH 值低于 3.7 时,紫膜悬浮液内开始出现兰色丝状聚合物,进而形成兰色颗粒状悬浮物,因此时散射较大,无法记录到真正的圆二色谱。但是当 pH 值恢复至中性时,光学活性可基本恢复。由此看来低 pH 值仅影响到紫膜蛋白上的可电离基团电荷数目的变化,而并不引起分子本身结构的破坏。

碱性对紫膜的影响如图 3a 和 3b 所示, pH 值在 7.0—9.0 范围变化时,吸收和圆二色谱基本都没有变化,表明光适应紫膜对碱性有相当的稳定性,并对埋藏其内的质子化 Schiff 碱键起了保护作用。

当 pH 从 9 升至 11.3 时,吸收峰略有兰移,圆二色谱的正负带略有下降,但此变化是可逆的,表明在此 pH 范围内仅涉及到膜蛋白分子的三级结构变化。当 pH 高于 11.3 时,则可见吸收峰很快下降,同时伴有 370nm 吸收峰的出现。紫外吸收亦发生了较激烈的变化。且圆二

色谱的正、负带也明显减小,趋于形成单个的正带,最后当 pH 升至 12.5 时,570nm 吸收峰基本消失,圆二色性也完全消失。和强酸的作用明显不同的是,强碱最后会导致紫膜蛋白结构的不可逆破坏。实验中 370nm 吸收峰的出现和圆二色性的全部丧失表明强碱不仅使 Schiff 碱键非质子化,而且使其完全暴露于水的环境中,从而失去了和蛋白分子的相互作用,致使紫膜分子完全丧失了光学活性。

本实验承邹惠君和六室离心机组同志协助,特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Becher, B. and Ebrey, T. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 1—6, 1976.
- [2] Becher, B. and Cassim, J. Y.: *Prep. Biochem.*, **5**, 161—178, 1975.
- [3] Jackson, M. B. and Sturtevant, J. M.: *Biochemistry*, **17**, 911—915, 1978.
- [4] Becher, B. and Cassim, J. Y.: *Biophys. J.*, **16**, 1183—1200, 1976.
- [5] Honig, B. and Ebrey, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 2503—2507, 1979.

[本文于1983年8月23日收到]

辐射对三种类型的淋巴细胞 DNA 及 RNA 合成能力的影响

刘克良 苏燎原 薛智谋 陶明山* 耿勇志

(苏州医学院放射损伤学教研室)

正常人外周血淋巴细胞,包含不同的亚群,分别执行细胞免疫、体液免疫及维持免疫平衡等重要功能。辐射损伤后免疫功能受抑制。利用同位素双标记技术^[1],以 ^3H -TdR 及 ^{14}C -UR 示踪,观察不同剂量 ^{60}Co - γ 线照射后,血中三种不同类型的淋巴细胞,在体外培养转化过程中 DNA 及 RNA 的合成能力,比较两种标记化合物在不同类型淋巴细胞中的掺入率;并依据辐射对三种不同类型淋巴细胞中, DNA 及 RNA 两种生物大分子合成的受抑程度,反映血

中三种类型淋巴细胞的辐射敏感性。

一、实验方法

正常人外周血 6 毫升,肝素抗凝,每份血分装 4 瓶, ^{60}Co - γ 线照射,距离 70 厘米,剂量率 75.9 拉德/分,分别照射 25、160、400 拉德三种剂量。培养在含三种不同分裂原的 RPMI1640 (日本)+13% 人 AB 血清及适量青、链霉素的

* 核物理学教研室。

培养液内,调 pH 至 7.2, 37℃ 培养 72 小时。双标同位素掺入 18—24 小时。每点均设两个平行样品,实验分三部分进行:

1. 每瓶 2 毫升上述培养液,加刀豆蛋白 A(ConA; Sigma) 60 微克,血 0.2 毫升,诱导 T 抑制细胞 (Ts)^[2],培养 48 小时后加 ³H-TdR 1.2 微居里及 ¹⁴C-UR 0.3 微居里(放比度分别为 19 Ci/mM, 53 mCi/mM) 继续培养 24 小时。

2. 每 2 毫升培养液内加植物血凝素(PHA; 上海产) 160 微克,血 0.1 毫升,激活 T 细胞,培养 54 小时,加 ³H 0.6 及 ¹⁴C 0.15 微居里,继续培养 18 小时。

3. 每瓶 2 毫升培养液内加脂多糖 (LPS Difco) 40 微克及葡聚糖硫酸盐 200 微克,血 0.2 毫升,促 B 细胞分裂转化^[3],培养 48 小时,加 ³H-TdR 1.2 及 ¹⁴C-UR 0.3 微居里,继续培养 24 小时。

培养结束后,以滤膜法收获细胞^[4],用国产 FJ 2100 型液闪测量仪测定。样品测量数据按 ³H、¹⁴C 分别在 I、II 道的测量效率换算^[4]。每份血样中 ³H、¹⁴C 掺入的 cpm 即分别反映 0.1 毫升血被 PHA 激活、0.2 毫升血分别被 ConA、

LPS 激活的三种不同类型的淋巴细胞,在体外培养转化时 DNA 及 RNA 的合成能力。以对照作为 100%,均用相对百分数表示各组双标示踪剂的掺入率作统计分析。

二、实验结果

不同剂量 γ 线照射对 7 例正常人外周血三种类型的淋巴细胞中 DNA 及 RNA 合成能力的影响,结果见表 1。

由表 1 可见,照射后三种类型淋巴细胞的 ³H 及 ¹⁴C 掺入率均随照射剂量加大而明显降低。经反正弦函数转换,按完全随机设计方差分析, F 检验 $P < 0.01$, 即三组间的差异非常显著。直线回归分析,相关系数 r 各为 -0.91 , -0.92 及 -0.94 。T 检验 $P < 0.05$ (图 1)。

D_0 值: PHA 诱导 T 细胞为 487.8rad, ConA 诱导的 T 抑制细胞为 394.7 rad, LPS 诱导的 B 细胞为 620.3 rad。其中 T 细胞的 D_0 值略高于国外报道 400 rad 的 D_0 值^[5]。

进一步实验观察 14 例人血受照射后分别被 ConA、LPS 激活转化时 ³H-TdR 及 ¹⁴C-UR 掺入的放射性结果见表 2。

表 1 不同剂量照射后三种类型的淋巴细胞内 ³H-TdR 及 ¹⁴C-UR 掺入的放射性相对量
(7 例平均百分数±标准差)

剂 量 (rad)								
分裂原	对照	25		160		400		P*
	³ H、 ¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	
PHA	100	81.7±16.7	79.4±17.4	62.7±10.6	59.4±9.5	47.4±5.7	41.6±6.7	<0.01
ConA	100	83.1±9.6	83.1±9.3	57.1±14.8	62.4±13.1	40.9±13.2	43.8±7.7	<0.01
LPS	100	84.2±8.0	84.1±8.3	65.3±12.4	66.2±8.9	57.7±6.9	64.6±11.7	<0.01

* P 值为各剂量组与对照组比较(下同)。

表 2 不同剂量 γ 线照射后的人血淋巴细胞分别被 ConA、LPS 激活转化时 ³H-TdR 及 ¹⁴C-UR 掺入的放射性相对量 (14 例平均百分数±标准差)

剂 量 (rad)								
分裂原	对照	25		160		400		P
	³ H、 ¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	³ H	¹⁴ C	
ConA	100	82.1±10.5	84.9±12.0	56.6±12.0	59.9±10.8	42.0±9.9	44.2±6.7	<0.01
LPS	100	81.4±11.4	78.0±16.5	63.4±12.1	64.0±14.8	54.3±7.5	58.2±14.4	<0.01

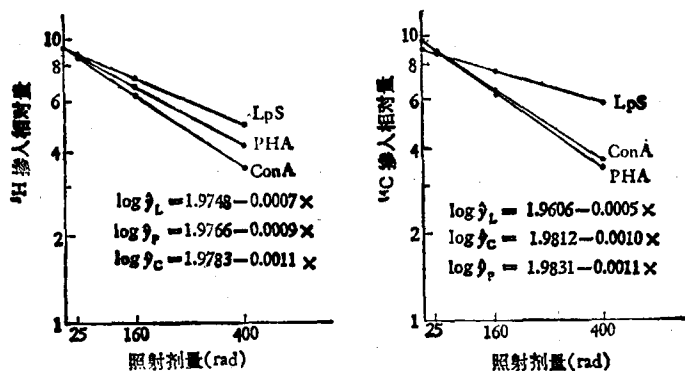


图1 γ 线照射剂量与血中三种类型的淋巴细胞内 DNA 及 RNA 合成的关系
以照射剂量(X)为自变量, ^3H 及 ^{14}C 掺入的放射性相对百分数的对数 ($\log \hat{y}$) 为倚变量的直线回归方程(下同)

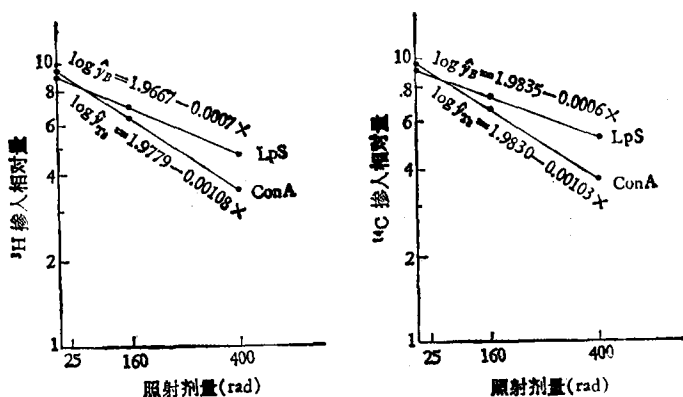


图2 γ 线照射剂量与 T、B 细胞中 DNA 及 RNA 合成的关系

由表 2 可见, 淋巴细胞分别被两种不同的分裂原激活转化时, ^3H 及 ^{14}C 的掺入量, 亦随照射剂量的增加而下降。统计处理 F 检验 $P < 0.01$, 表示随受照射剂量的增加, 两种淋巴细胞中 DNA 与 RNA 合成受抑也越明显。直线回归分析, 在 Ts 及 B 细胞中的双标掺入率亦与受照射剂量密切相关(图 2)。

14 例正常人血中 Ts 与 B 淋巴细胞的辐射敏感性比较: D_0 值 T 抑制细胞 $\langle ^3\text{H} \rangle$ 为 394.7 rad, $\langle ^{14}\text{C} \rangle$ 为 421.6 rad。B 细胞 $\langle ^3\text{H} \rangle$ 594.8, $\langle ^{14}\text{C} \rangle$ 714.2 rad。B 细胞 D_0 值与 T 抑制细胞 D_0 值之比为 1.51 (^3H), 1.69 (^{14}C)。实验亦表明, 人血淋巴细胞受照射后, 离体培养转化过程中, T 抑制细胞内 DNA 及 RNA 合成机能比 B 细胞内的对辐射更为敏感。

三、讨 论

血液受照射后, DNA 及 RNA 在不同淋巴细胞中的合成率, 随照射剂量增加而下降的趋势基本一致。与以往用双标记法测淋转时获得的剂量效应曲线是符合的^[6]。亦与 ^{14}C -缬氨酸掺入淋巴细胞蛋白质中的照射受抑结果相吻合^[7]。因细胞中 DNA 的复制与 RNA 及蛋白质的合成密切相关^[8]。实验见到, 7 例正常人血受不同剂量 γ 线照射, 在不同分裂原诱导的三类淋巴细胞中, 分别反映 DNA 及 RNA 合成的 ^3H 及 ^{14}C 掺入率虽然均随照射剂量加大而降低, 但受抑程度不同, 如 400 rad 照射, PHA 诱导的 T 细胞 DNA 合成相当于对照的 47.4%; ConA 诱导的 T 抑制细胞为对照的 40.4%; LPS

激活的B细胞为对照的57.5%。图1中亦反映出,DNA及RNA的合成,在三种类型的淋巴细胞中均随照射剂量的增加而下降。但以ConA诱导的T抑制细胞掺入下降最明显。另外在14例人血实验中见到,400rad照射后,T抑制细胞的DNA及RNA合成率分别相当于对照组的42.0及44.2%;B细胞则分别为54.3及58.2%。表明T_H细胞的两种核酸合成受抑程度大于B细胞。结合以往实验^[7]可以认为,人血受照射后,不同类型的淋巴细胞在离体培养转化中,T抑制细胞的核酸及蛋白质合成的受抑程度均大于B细胞。由此可见,T_H细胞的辐射敏感性应高于B细胞。淋巴细胞受照射后,若细胞内三种大分子物质合成明显受抑时,势必不同程度影响三种类型淋巴细胞的功能。

Tsokos等曾观察到辐射对ConA激活的T_H细胞免疫机能的抑制作用随照射剂量增加而下降。T_H细胞具有较高的辐射敏感性^[2,9]。辐照后核酸及蛋白质合成的受抑程度可反映出不同类型淋巴细胞的损伤程度。其中以T抑制细胞损伤最明显。正常人体中T抑制细胞保持一定的占有比例,在协调平衡维持正常免疫反

应中起重要作用。T_H细胞的数量或功能改变,可导致免疫功能失调甚至致病。也可能是辐射损伤细胞免疫导致免疫失调的重要一环。但血中免疫细胞是一个庞大的群体,其中主要是T及B细胞亚群。它们既相互协助,又相互制约。实验用双标记法,仅反映了三种类型的淋巴细胞内两种核酸合成机能的改变情况。今后还需从更多方面探讨各亚群受辐射损伤后的变化,进一步揭示辐射对淋巴细胞的损伤实质。

参 考 文 献

[1] 苏燎原等:《生物化学与生物物理进展》,2,14,1982。
[2] Tsokos, G. C. et al.: *Immunology*, 47(1), 85, 1982。
[3] 苏燎原等:《中华微生物学和免疫学杂志》,6,346,1982。
[4] 苏燎原等:《核技术》,3,88,1979。
[5] Duncan, W. et al.: *Clinical Radiobiology*, p. 66, 1977, Edinburgh, London and New York。
[6] 苏燎原等:《遗传学报》,8(3),216,1981。
[7] 刘克良等:《辐射研究与辐射工艺学报》,2(1),56,1984。
[8] 太田行人等:《细胞构造と機能II》,岩波書店1978年,205页。
[9] Barton, F. et al.: *Cell. Immunol.*, 44(1), 169, 1979。

[本文于1983年7月20日收到]

小资料

常用凝胶电泳缓冲液配制

(一)

Tris-醋酸(TAE)	0.04M Tris-醋酸,	
	0.002M EDTA	
配制五十倍贮存液1升	Tris 碱	242g
	冰醋酸	57.1ml
	0.5M EDTA(pH8.0)	100ml
Tris-磷酸(TPE)	0.08M Tris-磷酸,	
	0.008M EDTA	
配制十倍贮存液1升	Tris 碱	10g
	85% 磷酸(比重1.679mg/ml)	15.1ml
	0.5MEDTA(pH8.0)	40ml
Tris-硼酸(TBE)	0.089M Tris-硼酸盐	
	0.089M 硼酸	
配制十倍贮存液1升	Tris 碱	54g
	硼酸	27.5g
	0.05M EDTA (pH8.0)	20ml
	25% 聚蔗糖(400号)	

(二)

点样缓冲液必具有高密度可使样品顺利进入点样孔中;同时还含有一种或多种染料来揭示电泳的进行程度。

I 型	6 倍缓冲液	0.25% 溴酚蓝
		0.25% 二甲苯蓝
		40%(w/v)蔗糖
	4℃保存	
II 型	10 倍缓冲液	0.25% 溴酚蓝
		0.25% 二甲苯蓝
	室温保存	
III 型	6 倍缓冲液	0.25% 溴酚蓝
		0.25% 二甲苯蓝
		30% 甘油
	4℃保存	
IV 型	6 倍缓冲液	0.25% 溴酚蓝
		40%(w/v)蔗糖
	4℃保存	