

研究工作

抗体包被瘤细胞膜引发人血多形核白细胞化学发光

康 建 安天义 陈晓琳 初俊杰

(沈阳军区总医院, 沈阳 110015)

提 要

用抗体包被 K562 细胞膜碎片 (Ab-M) 刺激人血多形核白细胞 (PMN) 产生化学发光, 对其发光动力学及活性氧代谢特征进行了比较, 结果表明 Ab-M 引发 PMN 发光动力学与酵母多糖不同。用秋水仙碱干扰 PMN 膜结构完整性可抑制其发光产额, Ca^{2+} 可促增 PMN 发光, 提示 PMN 氧代谢的调控与 Fc 受体和 Ca^{2+} 动员有关; 活性氧系 PMN 实施细胞毒效应的重要物质。

关键词 多形核白细胞, 化学发光, 细胞膜, 抗体, 活性氧

人血多形核白细胞 (PMN) 受抗体包被肿瘤细胞刺激后, 产生特异性免疫应答^[1], 许多作者证实这种非吞噬性免疫杀伤系 PMN 膜免疫球蛋白之可结晶片断 (Fc) 受体介导产生的抗体依赖性细胞毒 (ADCC) 效应, 一般认为 PMN 产生的 ADCC 伴氧依赖性, 与细胞呼吸爆发有关。为澄清 Fc 受体对 PMN 呼吸爆发的调控作用。本文用抗体包被 K562 细胞膜 (Ab-M) 引发 PMN 活性氧释放——产生化学发光, 以探讨 PMN 氧依赖性 ADCC 作用及其物质基础。

1 材料与 方法

1.1 仪器与试剂 SHG-1 型生物化学发光仪 (上海技术监督局实验工厂); 鲁米诺 (氨基苯二酰肼)、酵母多糖、过氧化氢酶 (CAT) 均为 Sigma 产品; 叠氮钠为 Emerck 产品; 右旋糖酐为 Pharmacia 产品; 二甲基呋喃 (DMF) 为 Fluka 产品; 超氧化物歧化酶 (SOD) 为甘肃夏河生物制剂厂产品; 其他为国产分析纯。

1.2 瘤细胞膜分离 人红白血病细胞株 (K562) 于 RPMI 1640 (USA, Gibco), 10%

胎牛血清中培养, 将 1×10^8 K562 细胞用 Hank 平衡盐溶液 (HBSS) 洗涤 3 次, 低渗盐水 -20°C 冻融, 随后超声破碎 5min, 以 $200 \times g$ 离心 5min 除去未破细胞, 再经 $10000 \times g$ 离心 60min, 取上层液用作粗提膜碎片, 用改良 Lowry 法^[2] 调蛋白浓度为 3mg/ml , 于 -20°C 保存。

1.3 抗血清制备与膜包被 按常法免疫家兔 (K562 细胞 1×10^7), 两周后追加免疫一次, 末次免疫后 10d 放血, 分离血清后于 56°C 灭活 30min, 分装 1ml, 于 -20°C 冻存, 膜包被取细胞膜与抗血清按 5:1 比例混匀, 置 37°C 培育 30min。

1.4 PMN 分离 取人新鲜外周血 10ml, 用淋巴细胞分离液除去单个核细胞, 下层细胞加 3% 右旋糖酐 3ml, 颠倒混合, 37°C 水浴静置 45min, 取上层 PMN 悬液以 HBSS 洗两次, 少量红细胞用 0.83% 氯化铵低渗破溶, 调细胞数 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 台盼蓝拒染率 $\geq 95\%$ 。

1.5 PMN 化学发光测量 反应总体积 0.5ml, 取 PMN 悬液 0.2ml 置测量管内, 加

入附加物 0.1 ml, 终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 鲁米诺, 37°C 预培育 15min, 测样品本底空白。然后加 Ab-M 0.05 ml 启动反应, 每间隔 1min 记录 6s 发光脉冲 (cp6s) 至 30min 终止, 每一样品平行测定两次。

2 结 果

2.1 Ab-M 引发 PMN 发光动力学特征

图 1 显示 Ab-M 与酵母多糖引发 PMN 发光动力学特征比较。Ab-M 引发 PMN 发光延迟期小于 1min, 平均峰时 6min, 较酵母多糖明显前移, 但发光强度较弱。

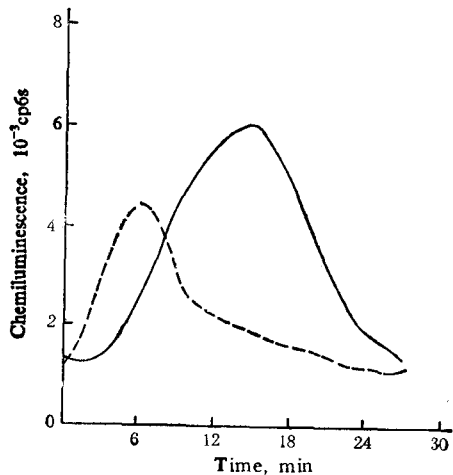


图 1 两种刺激物引发 PMN 发光动力学特征的比较
Fig. 1 Characterization of kinetics of PMN CL induced by Ab-M or zymosan

实线示酵母多糖; 虚线示 Ab-M

Solid line indicates zymosan; dotted line indicates Ab-M

2.2 细胞膜与抗血清对 PMN 发光的引发效应 膜用量为 $200 \mu\text{g}$, 不同用量抗血清对 PMN 发光强度显示 $20 \mu\text{l}$ 抗血清为最佳用量, 超出此用量 PMN 发光强度减弱。正常 AB 血清亦呈类似曲线, 见图 2。

未经抗体包被的细胞膜所引发发光强度较弱。固定抗血清用量 $20 \mu\text{l}$, 不同浓度细胞膜对 PMN 发光的影响见图 3。

2.3 Ab-M 诱发 PMN 活性氧代谢特征 用不同自由基清除剂和抑制剂对 PMN 呼吸爆

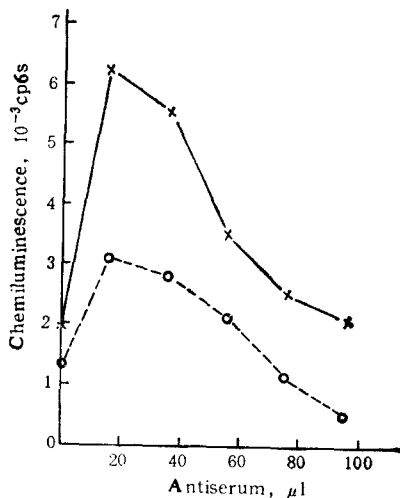


图 2 抗血清及正常血清对 PMN 发光的影响

Fig. 2 Effect of antiserum and normal AB serum on PMN CL

实线示抗血清; 虚线示正常血清

Solid line indicates antiserum; dotted line indicates normal AB serum

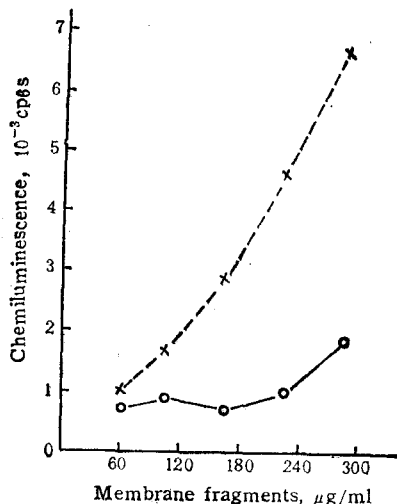


图 3 细胞膜浓度对 PMN 发光的影响

Fig. 3 Concentration-dependence of PMN CL to membrane fragments

实线示未包被抗体膜; 虚线示抗体包被膜

Solid line indicates membrane coated without antibody; dotted line indicates membrane coated with antibody

发中活性氧生成影响的比较, 结果见表 1。

2.4 膜通透性及 Ca^{2+} 对 PMN 发光的影响 秋水仙碱 $5 \mu\text{g/ml}$ 作用于 PMN 膜微

管蛋白,其发光产额减低,加入 Ca^{2+} $2\mu\text{mol/L}$, 发光强度与无 Ca^{2+} 的 HBSS 对照比较其增强 42%。以秋水仙碱对照,浓度为 $200\mu\text{g/ml}$ 的 SOD 可使 PMN 发光强度减少 37%。EGTA 对 PMN 发光具有明显抑制作用(见表 2)。

表 1 不同附加物对 PMN 化学发光的影响
Table 1 Effect of various additions on chemiluminescence (CL) during PMN respiratory burst

附加物 ¹⁾ Addition	浓 度 Concentration	发光强度(%) intensity (%)	
		酵母多糖 Zymosan	抗体-膜 Ab-M
秋水仙碱 Colchicine	$5\mu\text{g/ml}$	79.9	46.3
SOD	$200\mu\text{g/ml}$	97.8	85.4
CAT	$100\mu\text{g/ml}$	158.2	128.1
二甲基呋喃 DMF	$1\mu\text{mol/L}$	44.3	73.2
叠氮钠 Azide	1mmol/L	21.7	22.5
硫脲 Thiourea	2mmol/L	10.1	8.5
甘露糖 Mannose	40mmol/L	59.0	66.3
蛋氨酸 Methionine	10mmol/L	82.3	91.5

1) 所有附加物以终浓度表示。

All additions are given in final concentrations.

表 2 Ca^{2+} 对 PMN 发光的影响
Table 2 Effect of Ca^{2+} on PMN chemiluminescence (CL)

附 加 物 Addition	浓 度 Concentration	发光强度 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) CL response	
		含 Ca^{2+} with Ca^{2+}	不含 Ca^{2+} without Ca^{2+}
秋水仙碱 Colchicine	$5\mu\text{g/ml}$	5244 ± 486	1627 ± 203
钙螯合剂 EGTA	$2\mu\text{mol/L}$	2786 ± 341	482 ± 59
HBSS	—	4318 ± 393	3035 ± 287

用 Ca^{2+} $2\mu\text{mol/L}$ 等当量中和 EGTA,其发光强度较无 EGTA 对照减低 8%,但显著高于自身对照。游离 Ca^{2+} 仅在一定浓度范围与 PMN 发光呈正相关,浓度过高则减低发光强度(见图 4)。

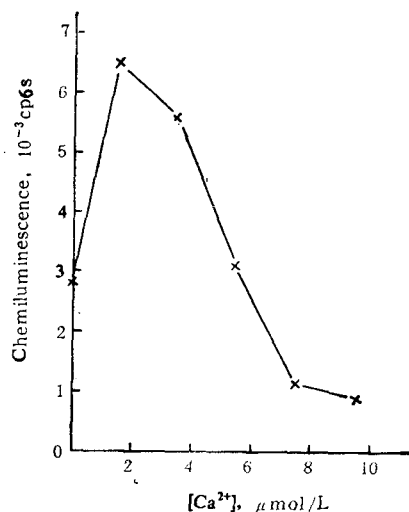


图 4 Ca^{2+} 对 PMN 化学发光的量效曲线
Fig. 4 Dose-response curve of PMN CL for calcium

3 讨 论

PMN 介导 ADCC 杀伤机制系细胞膜 Fc 受体与 Ab-M 结合后激活 NADPH 氧化酶,以骤增氧自由基作为实施细胞毒效应的物质基础。本实验用化学发光分析来自爆发反应中活性氧生成动力学,结果表明 Ab-M 引发 PMN 呼吸爆发与酵母多糖不同,其发光延迟期小于 1 min,最大峰时为 6 min,较颗粒性活化剂引发峰时明显前移,但发光强度较弱,提示 NADPH 氧化酶对不同膜活化剂的应答活力以及激活途径不同。

单独膜蛋白或抗血清对 PMN 化学发光均无明显促发作用,膜蛋白未经抗血清预先包被难引发 PMN 发光,说明 Ab-M 与 Fc 受体结合是调控呼吸爆发及特异性免疫应答的关键因素。抗血清对细胞发光有抑制作用,且在一定浓度范围呈线性,此与血清含其他抑制因子因素有关。但非包被膜抗体与 Ab-M 竞争结合 Fc 受体亦可能导致活性氧的生成减少。

已知 SOD 作为超氧化物阴离子的特异清除剂对许多活化剂引发的化学发光均有明显的抑制作用^[3]。本实验观察到在两种活化剂引发

发光反应中, CAT 可促增 PMN 化学发光, 此与该酶含血红素结构有关^[4]。SOD 抑制发光效率很小, Hafeman 认为在抗体依赖性爆发反应中细胞活化机制与其他活化剂引发机理不同; SOD 仅在活性氧浓度达致毒水平才显现该酶的清除作用^[5]。从本实验结果可见, Ab-M 引发 PMN 发光强度较酵母多糖弱, 除活性氧水平较低外, 由于 SOD 系生物大分子不能进入细胞内, 故胞内发光亦是影响 SOD 无效抑制的可能因素^[6]。

疏脉对发光抑制甚大, 提示羟自由基在发光成分中占较大比重, 但抑制环节是否还涉及细胞活化尚有待进一步探讨, 已知甘露糖对细胞活性氧生成及鲁米诺发光有明显抑制, 但其调控水平系磷酸戊糖旁路^[7]。叠氮钠抑制 PMN 发光则包括淬灭发光和选择性抑制髓过氧化物酶双重作用。

Ca^{2+} 作为第二信使可使磷脂酶 C, 磷脂酶 A_2 , 磷脂酶 D 及 Ca^{2+} /钙调蛋白激酶活化, 继而通过蛋白质磷酸化促增细胞呼吸爆发, 用螯合剂 EGTA 络合 Ca^{2+} 则明显减低细胞发光强度, 表明 Ca^{2+} 对呼吸爆发具有调控作用。以 Ca^{2+} 饱和 EGTA 时, Ca^{2+} -EGTA 复合物对 PMN 发光无明显影响, 发光强度与游离 Ca^{2+}

浓度仍呈线性, 揭示 EGTA 减弱 PMN 发光的作用机理与 Ca^{2+} 浓度降低密切相关, 螯合剂结构对细胞呼吸功能似无明显化学毒性。

秋水仙碱与微管蛋白结合后, 干扰膜结构完整性, 致使 Fc 受体与 Ab-M 结合能力降低而导致 PMN 发光产额明显减少。秋水仙碱改变膜结构的另一证据是膜通透性增强, 即 SOD 对细胞发光的抑制作用较无秋水仙碱对照显著增加, 进一步表明 PMN 发光存在细胞外和细胞内两种形式。由酵母多糖引发 PMN 发光对秋水仙碱的抑制不及 Ab-M 敏感, 此与非调理酵母多糖不直接作用于 Fc 受体有关。

用 Ab-M 引发 PMN 化学发光可估价 PMN 非吞噬性免疫杀伤功能, 对进一步探讨 Fc 受体介导的 ADCC 调控提供简单、重现的分析模型。

参 考 文 献

- 1 Clark R A, Klebanoff S J. *J Immunol*, 1977; **119**: 1413
- 2 康建, 初俊杰. 生物化学与生物物理进展, 1988; **15**: 147
- 3 Dahlgren C. *Agents Actions*, 1987; **21**: 104.
- 4 康建, 朱忠勇. 生物化学与生物物理进展, 1984; (5): 52
- 5 Hafeman D G, Lucas Z J. *J Immunol*, 1979; **123**: 55
- 6 康建等. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17**: 307
- 7 Rest RF et al. *J Leukocyte Biol*, 1988; **43**: 158

CHEMILUMINESCENCE OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES INDUCED BY ANTIBODY-COATED TARGET CELL MEMBRANE

Kang Jian An Tianyi Chen Xiaolin Chu Junjie
(General Hospital of Shenyang, PLA, Shenyang 110015)

ABSTRACT

Polymorphonuclear leukocytes (PMN) and soluble or particulate matter interact, to produce chemiluminescence (CL) which links to activation of the oxidative metabolism of the cells. While studying the characteristics of the CL induced by antibody-coated crude membrane fragments of K562 tumor cells, the result was observed that PMN were not triggered to a CL response in the absence of antibodies or the fragments. Furthermore, the fact that CL could be inhibited by colchicine which disturb the integrity of the PMN cytoskeleton, indicate that the cytoskeleton is linked to Fc receptor binding or signal tra-

nsduction. The luminol-enhanced CL was dependent on the presence of calcium and hydroxyl radicals were involved.

Key words polymorphonuclear leukocytes, chemiluminescence, membrane, antibody, active oxygen species

一个改进的下丘脑-垂体-甲状腺轴的数学模型

刘亦未

刘秉正

(白求恩医科大学三系, 长春 130021)

(东北师范大学物理系, 长春 130024)

提 要

提出一个改进的下丘脑-垂体-甲状腺轴的数学模型。该模型既考虑了此分泌调节系统各激素之间的激活和反馈作用, 也考虑了甲状腺激素与蛋白质结合的动力学过程。由该模型推导的结果与实验结果符合得很好。

关键词 下丘脑-垂体-甲状腺轴, 甲状腺激素, 模型

50 年代到 80 年代初, 有些人提出过几种关于甲状腺激素分泌的数学模型^[1-4], 但是这些模型都存在严重缺陷。刘秉正等^[5]在考虑了下丘脑-垂体-甲状腺轴这一内分泌系统各激素之间相互作用以及甲状腺激素与蛋白质的结合作用后, 曾提出一个较全面且合理的模型。经适当确定其中系数后, 其方程为:

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{1.94}{1 + 6.13x_3 + 2.9x_4} - 0.15x_1 \quad (1a)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \frac{0.072 + 0.00968x_1}{1 + 610x_3 + 179x_4 + 0.0106x_1 - 0.0174x_2} \quad (1b)$$

$$\begin{aligned} \frac{dx_3}{dt} = & 3.41 \times 10^{-5} + 4.16 \times 10^{-5}x_2 \\ & + 0.0195x_4 + 8.87 \times 10^{-7}x_3' \\ & - 0.183x_3 \end{aligned} \quad (1c)$$

$$\frac{dx_3'}{dt} = 0.00495x_3 - 1.16 \times 10^{-5}x_3' \quad (1d)$$

$$\begin{aligned} \frac{dx_4}{dt} = & 0.0019 + 0.00232x_2 + 3.50 \\ & \times 10^{-6}x_4' - 0.285x_4 \end{aligned} \quad (1e)$$

$$\frac{dx_4'}{dt} = 0.0228x_4 - 5.99 \times 10^{-6}x_4' \quad (1f)$$

式中 x_1, x_2, x_3, x_3', x_4 和 x_4' 分别表示促甲状腺释放激素 (TRH)、促甲状腺素 (TSH)、自由态三碘甲腺原氨酸 (FT_3)、结合态三碘甲腺原氨酸 (BT_3)、自由态甲状腺素 (FT_4) 和结合态甲状腺素 (BT_4) 的血浆浓度, x_1 的单位是 pg/ml, x_2 的单位是 μ U/ml, T_3 和 T_4 的单位都是 ng/ml, 时间的单位是 min。

上述模型能较好地说明一些实验结果, 但它存在一些缺点。在此基础上我们提出一个改进的模型, 得到了更好的结果。

1 改进的模型

模型(1)的主要缺点是: 虽然(1)中考虑了 TRH 对 TSH 分泌有不成比例增加的饱和效应(减敏作用)^[6], 但是(1c)和(1e)却没有考虑 TSH 对 T_3 和 T_4 分泌有类似的饱和效应, 而这也已为实验所证实^[7]。此外, 与大量实验曲线