

情况下我们都得到了厌氧的钼-铁蛋白针状晶体,其中最大晶体宽4—6 μ ,长约200 μ ;只有在用谷胱甘肽处理后所形成的晶体呈簇状(图3)但在显微镜下观察,仍为针形。这些实验结果使我们对钼-铁蛋白可形成晶体的条件有了进一步的了解。遗憾的是这些大量的工作都没有得到预期的结果。这说明所使用的方法、条件还不足以影响钼-铁蛋白分子之间的关系,使晶型得到改变,另一个可能的原因是少量的遇氧后的钼-铁蛋白阻止晶型的改变。钼-铁蛋白结晶过程中所出现的晶癖,有待今后工作中消除。

参 考 文 献

- [1] Mertensen, L. E.: *Biochim, Biophys. Acta*, **127**, 18, 1966.
- [2] Bulen, W. A. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **56**, 979, 1966.

- [3] Dalton, H. et al.: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 231, 1972.
- [4] Bui, P. T. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **61**, 1021, 1968.
- [5] 中国科学院植物研究所七室:《植物学报》1973年,15期,281页。
- [6] Davis, B. J.: *Annals, N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.
- [7] Layne, E.: *Methods in Enzymology*, Vol. **III**, (Ed. Colowick S. P. et al.), Acad. press, N. Y. 450, 1957.
- [8] Shah, V. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 445, 1973.
- [9] Zeppezauer, M. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 564, 1968.
- [10] 森田,雄平:蛋白质、核酸、酶 **19**, 1049, 1974。
- [11] Mcpherson, A.: *Methods of Biochem. Anal.*, **23**, 249, 1976.
- [12] Fenna, R. E., et al.: *J. Mol. Biol.*, **84**, 231, 1974.
- [13] Burns, R. C., et al.: *Biochim, Biophys. Acta*, **305**, 445, 1973.
- [14] 辽宁省林土所:《应用微生物》,1974年,1期1页。
- [15] Mcpherson, A.: *Biol. Chem.*, **251**, 6300, 1976.

[本文于1980年2月5日收到]

同种免疫核糖核酸在体外传递抗 S180 免疫活性的细胞免疫反应研究

洪长福 俞 慧

(浙江人民卫生实验院医学微生物免疫研究室)

丁仁瑞 张统文 查士隼

(杭州大学生物系)

大量研究表明,给予肿瘤免疫动物的淋巴细胞可将特异移植免疫反应传递给未曾处理的动物。输入从肿瘤免疫动物淋巴组织中抽提的RNA或经RNA孵育的脾细胞,亦同样能使动物获得抗该肿瘤的免疫性^[1-4]。

本实验室采用带瘤小鼠淋巴组织提取免疫RNA,用全血白细胞肿瘤细胞混合培养试验方法,在体外使正常小鼠淋巴细胞转变成为对肿瘤S180特异的致敏淋巴细胞。兹将此实验结果介绍如下:

材 料 和 方 法

1. S180 肉瘤肿瘤细胞悬液的制备

取接种10天左右的S180肉瘤,弃去坏死部分,将瘤块剪碎成糊状,加入适量生理盐水(1:5)在玻璃匀浆器中制成细胞匀浆。自然沉淀后,上清完整细胞计数为 1×10^7 /毫升。每毫升肿瘤细胞加50微克丝裂霉素C,37℃温浴1小时。用Hank's液洗二次,备用。

2. 免疫核糖核酸的制备

取制得的细胞匀浆于小白鼠前肢腋下接种0.2毫升/每克,7天后拉颈处死剖取脾脏,置于冰或液氮中保存。参照热酚法^[5]略加改进,提取RNA,将它置于75%乙醇中,-20℃保存。RNA制品 $E_{260}/E_{280} \geq 2$,蛋白质低于2%,DNA含量低于5%。

正常小鼠脾脏 RNA 制备与上述方法相同。

3.进行“免疫”RNA 的蔗糖密度梯度离心

用 RNA 酶水解抗 S180 肉瘤免疫 RNA，然后做蔗糖密度梯度离心。

4.全血白细胞与抗 S180 肉瘤免疫 RNA 体外温育及全血白细胞混合培养试验^[5]：

取正常小鼠股动脉血，肝素抗凝。将溶于 Hank's 液 (HBSS) 中的抗 S180 肉瘤免疫 RNA 1.0 毫克与 0.2 毫升全血白细胞混匀，37℃ 温育 30 分钟。对照组分三个①全血白细胞 + HBSS (不加免疫 RNA)；②全血白细胞 + 核糖核酸酶处理过的免疫 RNA；③全血白细胞 + 未免疫动物的 RNA (温育后)。对照组和实验组的白细胞用 Hank's 液洗一次，再悬浮于 RPMI-1640 培养液 (含 10% 灭活小牛血清，1% L-谷氨酰胺及 100 单位/毫升青霉素和 100 微克/毫升链霉素) 中，加用丝裂霉素 C 处理过的 S180 肉瘤细胞 2×10^5 /每管，温育于 37℃。每个样品均做两个以上平行管。培养 48 小时后每管加入 2 微居里的 ³H-胸腺嘧啶核苷 (比度 14 ci/mM)，再继续温育 16—18 小时。然后将细胞移入离心管，离心 7 分钟。除去上清液，用 0.9% 生理盐水洗一次后，用 0.24% 盐水破坏红细胞，再

用 0.9% 生理盐水洗一次。最后以 10% 三氯醋酸沉淀蛋白质，核酸。每个样品沉淀物加 88% 甲酸 0.2 毫升，双氧水 0.1 毫升混匀，置 85℃ 水浴消化 1 小时。

将获得的细胞消化液加入闪烁液 (0.6% ppo, 0.05% popop 甲苯溶液) 5 毫升和乙二醇乙醚 3 毫升。

从每个样品平行管计算出每组的 cpm (计数/分) 的平均值及标准差。实验结果以淋巴细胞刺激指数 SI 来表示。

SI = 全血白细胞加肿瘤细胞的 cpm - 全血细胞不加肿瘤细胞的 cpm / 全血白细胞不加肿瘤细胞的 cpm

结 果

1. 正常小鼠全血白细胞在与同种抗 S180 肉瘤免疫 RNA 温育后，在混合全血白细胞肿瘤细胞培养中即呈现对 S180 肉瘤细胞特异细胞免疫反应。表 1 是各次实验的数据。从表 1 可以看出，经抗 S180 肉瘤免疫 RNA 处理过的全血淋巴细胞刺激指数显著高于未经免疫 RNA 处理的全血淋巴细胞指数 ($p < 0.001$)，而用正常 RNA 作同样处理的淋巴细胞，和未经 RNA

表 1 同种免疫 RNA 在体外传递抗 S180 免疫活性的细胞免疫反应

试 验 细 胞	淋巴细胞转化的放射性脉冲/每分 (cpm)		SI	p
	不加肿瘤细胞培养	加 S180 肉瘤细胞培养		
正常白细胞	283.25±116.62	292.55±196.7	-0.1419	
正常白细胞+抗 S180 免疫 RNA	301.67±167.30	698.27±522.97	1.3147	p<0.001(f = 40)
正常白细胞+正常 RNA	260.67±192.11	340.25±186.33	0.3053	p<0.3, (f = 22)
正常白细胞+用 RNA 酶处理过的 抗 S180 免疫 RNA	433.25±159.4	681.5 ±352.82	0.5730	p<0.1 (f = 24)
带 S180 肉瘤小鼠白细胞	273.25± 97.76	1100.6 ±617.87	3.0278	p<0.01(f = 23)

注：显著性测验以正常白细胞为对照

处理的全血中的淋巴细胞相比较，其刺激指数无显著差异 ($p < 0.7$)，说明同种免疫 RNA 能传递细胞免疫反应。

2. 抗 S180 肉瘤免疫 RNA 蔗糖密度梯度离心，可将其分离成三个主要区带峰 (图 1)，与文

献报道一致。文献认为这三个峰分别是 4—6s 16—18s 和 23—28s，传递免疫活性部分是中间区带峰 (16—18S) 组份。

3. 抗 S180 肉瘤免疫 RNA 经 RNA 酶处理后，再经蔗糖密度梯度离心证明：12—28s RNA

变成小分子(4—6s)(图2),其传递特异性淋巴细胞转化反应的能力消失。与无RNA处理的全血白细胞比较,淋巴细胞刺激指数无显著增高(表1)

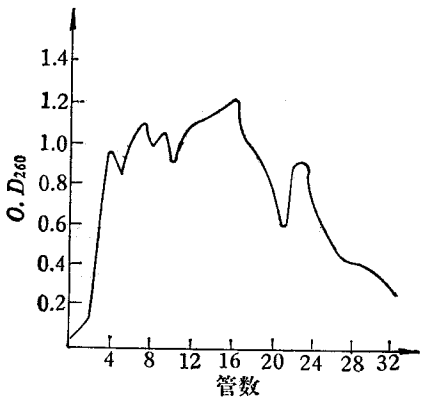


图1 抗S180肉瘤免疫RNA蔗糖密度梯度离心,从左到右被分成(轻到重)三个主要成分4—6s, 12—18s, 23—28s。

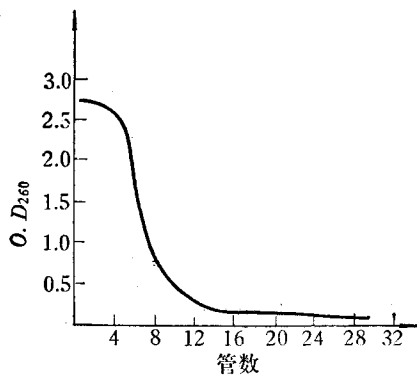


图2 用RNA酶水解抗S180肉瘤免疫RNA蔗糖密度梯度离心

讨 论

1974年 Decker 等^[5]使用混合淋巴细胞肿瘤细胞反应法检定免疫RNA的传递免疫反应。我们参照他们的方法,采用全血白细胞反应法,简化了一些操作步骤,证明了同种抗S180肉瘤

免疫完整的RNA大分子,在体外能使正常小鼠淋巴细胞转变成肿瘤特异的致敏淋巴细胞。当同种抗S180肉瘤免疫RNA经RNA酶预先处理后, RNA被酶分解成小分子RNA时,传递细胞免疫活性即消失。由此可见RNA是传递细胞免疫反应活性成份,而大分子RNA的完整性,是传递免疫活性所必需的。

我们的实验中,抗S180肉瘤免疫RNA处理正常小鼠全血白细胞中的淋巴细胞刺激指数范围从0.5到4.9,可能与每次实验RNA本身的活性、个体差异以及实验处理过程中RNA,有不同程度降解和失活有关。

我们用热酚法抽提的免疫RNA,包括细胞中的全部RNA组份。最近有很多工作证明有传递活性的组份只占全部RNA中的一小部分^[6-7]。为进一步探索免疫RNA作用机制和提高传递活性效应,需对免疫RNA进一步纯化。

我们实验的结果,也进一步支持了“信使”的假设,即抗原信息储存于免疫淋巴细胞中的RNA中;免疫RNA作为一个信使,将免疫信息传递给淋巴细胞,故保持免疫RNA的完整性是必要的。这为免疫RNA的临床免疫治疗提供了实验依据。

本文承江希明教授、李洸副总技师指导和审阅,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 江希明:《浙江肿瘤通讯》,1979年,2期,1—8页。
- [2] 王球达,叶庆炜:《上海实验生物研究所1969—1972研究工作成果汇编》,28—31页。
- [3] Alexander, P. et al.; *Nature*, **213**, 519, 1967.
- [4] Pilch, Y. H. et al.; *Cancer*, **26**, 630, 1970.
- [5] Decker, P. J. et al.; *Surg. Forum.*, **25**, 114, 1974.
- [6] Kern, D. H. et al.; *Cell Immunol.*, **24**, 58, 1976.
- [7] Singh, I. et al.; *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 505, 1977.

【本文于1980年4月4日收到】