

淋巴细胞化学发光

张学军

(安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032)

提 要

本文概要介绍淋巴细胞化学发光 (LY-CL) 的细胞学基础, LY-CL 的生物化学基础, 激活 LY-CL 的物质, LY-CL 与淋巴细胞活化关系以及 LY-CL 测定技术在生物学、医学中的应用。

关键词 淋巴细胞, 化学发光, 活性氧基

1978 年 Wrogemann 等^[1]首次报道小鼠胸腺细胞受 Con A 或钙离子载体 A 23187 刺激后, 产生化学发光 (CL) 反应, 实验提示这种 CL 主要由 T 淋巴细胞所致。他们认为, 淋巴细胞化学发光 (LY-CL) 测定可以监测淋巴细胞早期激活, 将成为研究淋巴细胞活化、淋巴细胞与巨噬细胞相互作用以及快速测定淋巴细胞活性的敏感方法。此后, 许多学者又相继证实了不同动物的 LY-CL 现象^[2,3], 并将这种测定方法用于实验生物学与医学的研究工作中。

一、淋巴细胞化学发光的细胞学基础

实验证明, 小鼠胸腺细胞 CL 主要与胸腺中 T 淋巴细胞有关, 并非胸腺中巨噬细胞所致, 因为来自骨髓的巨噬细胞受 Con A 刺激后所产生的 CL 动力学曲线, CL 强度以及对过氧化氢酶 (CAT) 的敏感性上明显不同于胸腺细胞 CL^[4]。Wrogemann 等深入研究胸腺细胞 CL 和巨噬细胞关系时发现, 小鼠胸腺细胞在无血清培养基上培养 5—20 小时后, 对 Con A 刺激所产生的 CL 强度比未培养胸腺细胞高 10—20 倍。在培养过程中, 胸腺中淋巴细胞与巨噬细胞有多种接触, 如胸腺中淋巴细胞聚集在巨噬细胞周围, 形成花结。如果除去巨噬细胞, 余下的胸腺淋巴细胞可产生明显的 CL。另外,

适当培养的胸腺细胞上清, 也加强淋巴细胞的 CL。因此, 他们认为, 淋巴细胞此时所获得产生明显 CL 能力主要依赖于巨噬细胞的存在。

Mookerjee 等^[5]进一步证实上述结论。将新鲜胸腺细胞除去粘附性细胞之后隔夜培养, 这种胸腺细胞并不能获得产生 CL 能力。用密度离心方法将胸腺细胞分成 4 个部分, 结果发现, 第 4 部分的未成熟小淋巴细胞单独隔夜培养并不能获得很强 CL 能力。而将含有较多巨噬细胞的第 1 和第 2 部分加至第 4 部分培养后, 能使后者获得较强 CL 能力; 第 3 部分为中等大小的胸腺细胞, 单独培养也能获得较强的 CL 能力。这些结果表明, LY-CL 与淋巴细胞的成熟程度有关, 淋巴细胞在分化成熟过程中获得产生 CL 能力, 同时依赖于巨噬细胞的存在。

然而, 淋巴细胞成熟后, 其 CL 的产生并不依赖巨噬细胞。Peterhans 等发现, 用碳基铁清除脾细胞中粘附细胞后, 余下的细胞用仙台病毒刺激, 所产生的 CL 强度基本上与未除去粘附细胞的脾细胞相同。用细胞毒方法除去脾细胞中 Ig⁺ 细胞或 T 细胞, 结果证明脾细胞中的 T 细胞和 B 细胞都具有产生 CL 能力。Peerless 等^[6]用 Con A 刺激尼龙毛分离的人 T 细胞也证实人 T 细胞具有产生 CL 能力。

NK 细胞与肿瘤细胞接触后是否产生 CL, 至今仍有争论。早先研究表明, 人外周血 NK 细胞与靶细胞接触的短时间内, 能产生 CL。但后来一部分试验未能重复。Storkus 等^[9]认为, NK 细胞与靶细胞相互作用中产生的 CL 是由污染的单核细胞造成, 因为用 Percoll 分离的 NK 细胞与靶细胞接触后, 不产生 CL。Pahad^[6]则提出由肿瘤细胞活化了 NK 细胞后释放某种因子触发污染的单核细胞产生 CL。因此, NK 细胞 CL 问题仍有待深入研究。

二、淋巴细胞化学发光的生物化学基础

已经发现, 用非特异性活性氧基 (OR) 清除剂, 如苯甲酸钠、乙醇、叠氮钠等能抑制小鼠胸腺细胞 CL, 表明 LY-CL 与淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后 OR 生成有关^[7]。

然而, 用特异性 OR 清除剂研究 LY-CL 中参与的 OR 类型的结果不尽一致。Mookerjee 等^[7]发现, 低浓度的超氧化物歧化酶 (SOD) 不能抑制小鼠胸腺细胞 CL, 只有高浓度 SOD 才起抑制作用。然而, Ekejindu 等^[2]研究狗的 LY-CL 时, 未发现 SOD 对 LY-CL 有抑制作用。同时, 他们还发现, CAT 能增强狗的 LY-CL, 这与早期报道的关于 CAT 能抑制小鼠胸腺细胞 CL 的 65% 的结果相反。我们最近研究证明, 人外周血 LY-CL 均可受到 CAT 和 SOD 的抑制, 甘露醇、L-组氨酸等 OR 清除剂也均可抑制人 LY-CL, 钙离子通道阻断剂也能抑制人 LY-CL。由此提示, 人 LY-CL 与淋巴细胞受刺激后急骤产生 H_2O_2 、 O_2^- 、 $\cdot OH$ 和 1O_2 等 OR 有关; 人 LY-CL 依赖于淋巴细胞内钙离子浓度的增加^[8]。

有关 LY-CL 的确切机制尚不清楚。Wong 等^[9]推测, 刺激物与淋巴细胞上受体结合, 导致 NADPH 氧化酶活化, 葡萄糖消耗增加, 一磷酸己糖旁路活性加强, 驱动产生 OR, 它可能类似于巨噬细胞、单核细胞和粒细胞的呼吸爆发。正是由于这些 OR 产生双阴性氨基酞盐离子, 随着它从激发态变成基态, 散射出光, 同时由于发光增强剂 Luminol 氧化作用的转换, 使光信

号加强。

Hume 等^[10]研究表明, Con A 激发的小鼠胸腺细胞可以分成两部分——葡萄糖依赖性和非依赖性 CL。葡萄糖依赖性 CL 与糖酵解或戊糖旁路氧化过程中产生 H_2O_2 、 O_2^- 等有关; 葡萄糖非依赖性 CL 可能与脂氧合酶途径活化有关, 通过水解脂类中间物质的方式, 产生含羰基脂肪酸产物, 进一步分解成 $\cdot OH$ 等 OR 参与 CL。Kolbueh-Braddon 等^[11]研究仙台病毒激发小鼠胸腺细胞 CL 机理时发现, 用封闭线粒体电子传递物质——抗霉素 A 能完全抑制胸腺细胞的基本氧耗, 但加仙台病毒后, 仍诱导产生 CL, 表明病毒诱导细胞的氧摄取, 无疑是非线粒体的。因此, O_2^- 等产生应看作是非线粒体氧耗的结果, 有可能同吞噬细胞一样, 被跨浆膜的 NADPH 氧化酶还原成 O_2^- 。

三、激活淋巴细胞化学发光的物质

Con A、花生凝集素 (PNA)、麦胶蛋白 (WGA)、蓖麻蛋白 I 和 II (Ricin I、II)、大豆凝集素 (SBA)、美洲商陆 (PWM)、天门冬属豌豆 (APL)、Lima 豆凝集素等均能激发小鼠胸腺细胞 CL。但在一定浓度范围内, CL 强度有所不同, WGA 最强, Ricin II 和 SBA 次之, 其次 Con A、APL 和 PWM, 而 PHA、PNA、Ricin I 和 Lima 豆凝集素最弱。同时也发现, 某种凝集素激发 CL 能力并不与引起凝集作用的能力相关联^[7]。Grumow 等^[12]用 WGA、Con A、PHA 和 PWM 激发人外周血单个核细胞所产生的 CL 强度变化也与上述结果相同。

抗原诱导 LY-CL 能力与抗原性质有关。Wong 等^[9]用流感病毒抗原和白色念珠菌变应素激发人外周血单个核细胞 CL 表明, 流感病毒抗原能激发明显的 CL, 而白色念珠菌变应素则不能激发 CL。动物实验也表明, LY-CL 能力的获得具有抗原特异性, 因为用牛血清白蛋白-Luminol 偶联剂作刺激物, 所激发的脾细胞 CL 强度要比未接受免疫小鼠脾细胞的 CL 强度高 5 倍以上^[13]。

激发 LY-CL 的物质与淋巴细胞结合可能是一种受体结合关系。用 Con A 激发小鼠胸腺细胞 CL 前,加入竞争性结合 Con A 的物质 α -甲基甘露糖苷,能完全抑制 CL 产生。Karsanova^[14]也证明,免疫复合物和 Con A 只激发 Fc 受体和 Con A 受体阳性的脾细胞产生 CL,而这两种受体阴性的脾细胞不能激发产生 CL。同时还发现,只有完整的抗小鼠免疫球蛋白才能激发脾细胞 CL,而免疫球蛋白的水解片段 Fab 或 F(ab)² 只能激发相当微弱的 CL。

Ekejindu 等^[2]还发现,狗外周血淋巴细胞用 PHA 刺激产生 CL 后,再用 Con A 刺激又会产生一个高于 PHA 刺激的 LY-CL 峰值 1/3 的另一个峰值,而先用 Con A 刺激后再用 PHA 刺激则无此现象发生。他们推测,这可能是由于两种不同的有丝分裂原刺激不同的淋巴细胞所致,或者是淋巴细胞上 Con A 受体比 PHA 受体多,以致用 Con A 初次激活的淋巴细胞完全封闭了 PHA 的再次激活。

关于外源性凝集素是否选择性地激发不同淋巴细胞亚群 CL 问题尚无定论, Falck 等^[15]指出,外源性凝集素都能激发人 LY-CL,它不限于某一特定的细胞亚群。

四、淋巴细胞化学发光与细胞活化关系

如前所述,LY-CL 主要反映淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后的 OR 产生。目前认为,OR 对于淋巴细胞的早期活化起着重要作用^[13]。淋巴细胞有丝分裂早期需必要的氧化步骤,例如,OR 活化鸟苷酸环化酶,而此酶的活化在细胞分化和增殖方面必不可少。OR 还能将无活性的转运载体转换成活性形式,例如,OR 在转换邻近 SH 基团 S—S 键方面起作用,可将无活性葡萄糖载体的单体转换成活性的二聚体。

用 LY-CL 方法证明,体内免疫接种后抗原刺激淋巴细胞氧化代谢加强。Wong^[9]认为,OR 在激活特异性免疫反应中起作用,OR 可由淋巴细胞产生,也可由单核细胞产生,其作用方式可能是:①过氧化作用改变抗原提呈,②

过氧化作用改变效应或辅助细胞功能。

Mookerjee 等^[4]详细研究小鼠胸腺细胞增殖与 LY-CL 关系表明,胸腺内小淋巴细胞在巨噬细胞协同作用下,分化成熟,表现出既对 Con A 刺激产生良好的 DNA 合成能力,又有良好的 CL 能力,二者之间存在明显平行关系。这些表明,OR 可能以某种方式参与淋巴细胞早期活化过程,提示 LY-CL 可能与淋巴细胞活化有关。因此,LY-CL 被看作是淋巴细胞转化的一种早期现象或与淋巴细胞早期激活有关。

LY-CL 是否与淋巴细胞增殖反应存在相关性,Grumow 等^[12]研究 12 例健康人淋巴细胞稳定性 E 花结形成,细胞增殖和 LY-CL 三者关系,结果表明三者无一致关系,其原因可能与有丝分裂原性质有关。因为 WGA 是 LY-CL 的有效刺激物,而诱导 ³H-TdR 的掺入能力相当弱;PWM 能激发较弱的 LY-CL 和较高的 ³H-TdR 掺入量,但几乎又不能诱导稳定性 E 花结形成。间接实验结果也表明,LY-CL 与淋巴细胞增殖之间可能不存在必然联系,因为在进行小鼠增殖细胞试验时,培养物中加 CAT 以清除 H₂O₂ 形成,然而并不影响 ³H-TdR 的掺入^[16]。

五、淋巴细胞化学发光的应用

虽然 LY-CL 的确切生物学意义尚不清楚,但它至少能反映淋巴细胞受抗原或有丝分裂原等刺激后氧化代谢活性以及 OR 生成的能力。目前,LY-CL 测定技术主要用于研究淋巴细胞活化,淋巴细胞与病毒相互作用,淋巴细胞杀伤机制等。

根据小鼠胸腺细胞在分化成熟过程中获得 CL 能力依赖于巨噬细胞协同作用的机制,Mookerjee 认为,LY-CL 是研究淋巴细胞与巨噬细胞相互协同作用的有效手段。Peterhans 等通过小鼠脾细胞 CL 测定,研究仙台病毒、流感病毒对淋巴细胞作用的机制。结果发现,病毒触发小鼠脾细胞 CL 是由于病毒包膜棘突糖蛋白与脾细胞膜相互作用的结果。后来他们进一

步研究病毒与淋巴细胞受体关系,证明仙台病毒的融合蛋白是诱导脾细胞 CL 的主要成分,而神经氨酸酶为次要成分,并用电镜技术证实了病毒与淋巴细胞上受体结合关系。为此,他们认为,LY-CL 测定技术是研究病毒与淋巴细胞受体相互作用的非常敏感的途径^[16]。

Meretey 等^[17]用 PHA 激发人外周血单个核细胞 CL 方法,研究组织胺对淋巴细胞作用,结果发现组织胺能抑制 CL。他们认为,这种抑制效应可能与组织胺抑制淋巴细胞增殖反应 CL 相同,推测由淋巴细胞上 H₂ 受体所介导。这种实验结果有可能为研究免疫调节物质对淋巴细胞作用开辟一条新途径。

LY-CL 测定已被看作是测定淋巴细胞活性的一种新指标。Bird 等^[18]利用 Con A 诱导小鼠胸腺细胞 CL 技术检测淋巴细胞活性,证明急性非特异性炎症能改变胸腺细胞功能,并且发现急性非特异性炎症小鼠血清中有一种分子量在 500—2000 道尔顿的物质,将它与正常小鼠胸腺细胞一起培养,能大大加强胸腺细胞 CL 强度。

LY-CL 也是研究细胞杀伤机制的一种重要手段。动物实验表明,NK 细胞在杀伤靶细胞过程中也产生 CL。已经证实,人 NK 细胞 CL 测定与同位素标记方法测定 NK 细胞活性的结果具有高度相关性^[19]。因此,可以用 NK 细胞 CL 测定代替传统的同位素标记方法来检测 NK 细胞功能。

LY-CL 测定还局限于实验性研究,临床应用较少。1986 年 Peerless^[3]首次报道了疾病状态下人 T 细胞 CL 测定结果。在慢性肉芽肿患者不仅中性粒细胞 CL 减弱,而且用 Con A 刺激尼龙毛提纯的 T 细胞所产生的 CL 强度也明显低于正常人,其意义尚不清楚。杨森等^[20]最近研究银屑病患者多形核白细胞及淋巴细胞的 CL 变化时发现,银屑病患者多形核白细胞 CL 明显增强,而 LY-CL 减弱,提示这类疾病中淋巴细胞氧化代谢活性减弱以及生成 OR 的能力下降,可能与淋巴细胞本身功能不足有关。

评价 细胞 CL 测定是近几年来兴起的一

项比较敏感的新技术。各种吞噬细胞的 CL 已证明反映它们的氧化代谢活性和功能,但 LY-CL 的生物学意义尚未完全明确。目前认为,LY-CL 与淋巴细胞受抗原或有丝分裂原等刺激后氧化代谢迅速加强,OR 急骤产生有关。由于 OR 在淋巴细胞活化早期起重要作用,另外淋巴细胞受抗原或有丝分裂原刺激后数分钟内出现 CL 反应,LY-CL 被看作是淋巴细胞早期激活的一种现象。因此,研究 LY-CL 与淋巴细胞活化和功能的关系,将有助于阐明 LY-CL 的生物学意义及应用价值。

LY-CL 测定技术具有简单、快速、敏感性强,重复性好、无需同位素参与及细胞培养等优点,不仅可以作为监测淋巴细胞早期激活的参数,而且可望成为一种新的淋巴细胞功能指标。

参 考 文 献

- 1 Wrogemann K et al. *Eur J Immunol*, 1978; 8: 749
- 2 Ekejindu G O C et al. *Vet Immunol Immunopathol*, 1985; 11:175
- 3 Peerless A G et al. *Clin Immunol Immunopathol*, 1986; 38:1
- 4 Mookerjee B K et al. *J Leukocyte Biol*, 1984; 35:427
- 5 Storkus W J et al. *J Leukocyte Biol*, 1986; 39: 547
- 6 Pohajdak B et al. *J Immunol*, 1984; 133:2430
- 7 Mookerjee B K et al. *Immunol Commun*, 1980; 9:653
- 8 张学军等,第二届全国自由基生物学及自由基医学学术会议论文摘要汇编,重庆,1989: 64
- 9 Wong L S, Kiel J. *Immunol Invest*, 1985; 14:503
- 10 Home D A et al. *Biochem J*, 1981; 198:661
- 11 Kolbueh-Braddon M K et al. *Biochem J*, 1984; 222:541
- 12 Grumow R et al. *Allerg Immunol (Leipzig)*, 1985; 32:123
- 13 Wong L S, Kiel J. *Immunol Commun*, 1984; 13: 285
- 14 Karsonova M I et al. *Mol Genel Mikrobiol Virusol*, 1985; 9:36
- 15 Falck P. *Stud Biophys*, 1984; 100:83
- 16 Peterhans E et al. *Virology*, 1983; 128:366
- 17 Meretey K et al. *Agents Actions*, 1983; 13:237
- 18 Bird J et al. *Agents Actions*, 1984; 15:356
- 19 松渡忠男他,临床病理,1984;32: 150
- 20 杨森等,全国首届中青年皮肤科医师学术研讨会资料汇编,西安: 1989: 49

[本文于 1989 年 10 月 4 日收到]