

技术与方法

白细胞粘附抑制试验的³H-亮氨酸标记法

——转移因子抗原特异活性的鉴定

江 虹

(第四军医大学生化教研室,西安)

1972年 Halliday^[1]首次报告了白细胞粘附抑制(LAI)试验。1978年第一次国际LAI会议肯定了这是一种体外检测细胞免疫反应的方法,具有快速、简便、特异性强等优点。但因为形态学观察,其准确性和可靠性受到限制。1980年 Tsang^[2]及其他人相继报告了LAI试验的⁵¹Cr标记法,进一步提高了实验的准确性。但因为⁵¹Cr半衰期较短, γ 射线对人体外照射较强,其应用受到限制。本文报道我们用建立的³H-亮氨酸标记的LAI法,结果表明它既有同位素实验的优点,又弥补了⁵¹Cr标记的不足之处。

一、材料和方法

1. 免疫山羊 用小鼠H₂₂腹水型细胞免疫雄性山羊(一岁左右)。经皮试、活检及外周血淋巴细胞的体外细胞介导细胞毒试验,证明山羊已致敏。

2. 羊脾转移因子(TF)的制备 匀浆-透析法^[3]制备免疫羊脾及正常羊脾TF,用SP8—100型紫外分光光度计扫描,以最高吸收峰(251nm)处8.0 ABS 定为一个TF单位(U)。

3. 小鼠H₂₂抗原的提取 LACA 纯种雌性小鼠(6—8周龄)腹腔接种 1×10^7 H₂₂细胞,八至十天后,取腹水癌细胞基本按Tsang^[2]的方法提取H₂₂抗原。用pH 7.4的PBS四倍稀释癌细胞,高速匀浆至90%的细胞破碎,12000g离心30分钟,取上清液置-20℃,24—48小时后取出解冻,1000g离心30分钟,取上清用Lowry,氏法测定蛋白质含量,分装于小瓶内,-20℃保

存待用。

4. LAI 试验 为减少非特异的粘附抑制,提高实验准确度,参照Tsang^[2]及藤沢武彦^[4]的方法,将分离出的淋巴细胞进行LAI试验。

① 分离淋巴细胞 取肝素抗凝的正常人新鲜全血,用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)分离淋巴细胞。第一次离心分离出的血浆留以做备用。

② 标记淋巴细胞 取 1×10^7 淋巴细胞,取2ml含5%自体血浆(分离淋巴细胞时留取)的无亮氨酸RPMI 1640液悬浮,加入10微居里³H-亮氨酸(中国科学院原子能所,比放射性2ci/mM),37℃温育3—4小时,用含2mmole亮氨酸的生理盐水洗两次,洗去未掺入的³H-亮氨酸。

③ 温育淋巴细胞 取洁净闪烁瓶,每瓶加入 1×10^6 淋巴细胞,用含5%自体血浆、2mM亮氨酸的RPMI 1640液培养,培养体积为一毫升,依实验设计要求加或不加TF及抗原,37℃温育120分钟。

④ 收获粘附细胞 温育结束,倾去悬浮未粘附细胞,用弯头滴管吸尽剩余液体。80℃20分钟(或37℃过夜)烘干瓶底的粘附细胞,加入0.3ml闪烁液(PPO—POPOP—二甲苯),液体闪烁计数器计数一分钟。

5. 资料处理 复管数为2—3,变异系数控制在5%以下。

$$\text{粘附抑制指数}(AI) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: 对照组(只加细胞)的 cpm 均数。

B: 实验组(细胞加抗原或细胞加 TF 或细胞加抗原和 TF) 的 cpm 均数。

以个别比较 t 检验, 鉴定 TF 的抗原特异活性。

二、结果与讨论

1. 细胞代谢需要亮氨酸, 因此, ^3H -亮氨酸自然释放后有再利用的可能。为抑制再利用, 常用含高浓度非标记亮氨酸的介质培养, 并采用预释放的方法, 致使代谢池中未合成肽链的 ^3H -亮氨酸释出, 细胞经洗涤, 再用于试验。为确定本实验预释放的必要性, 我们设计了有无预释放条件的比较。在加入 TF 和抗原的条件下, 实验结果表明有预释放组与无预释放组无显著差异 ($P > 0.05$)。为缩短实验周期, 提高细胞存活率, 取无预释放条件。

2. 在仅有细胞和培养介质的条件下, 选择不同的细胞密度实验, 结果见图 1, 以每管细胞数对 cpm 做曲线, 呈正比关系。图 1 表明在 $0.5-4 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞浓度范围内, 粘附率不变, 即在此范围内, 细胞密度对粘附率没有影响。

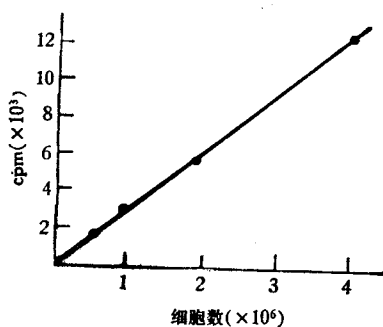


图 1 细胞密度对粘附率的影响

3. Halliday^[5] 指出, 在 LAI 试验中, 添加血清是必要的, 它可防止非特异性的粘附抑制效应, 并可阻止某些酶对粘附抑制因子的破坏。为此, 探讨了本实验条件下的最适血浆浓度, 结果见图 2, 在约 5% 血浆浓度条件下粘附抑制效应较稳定, 若浓度过高, 血浆蛋白的非特异粘附抑制, 掩盖了 TF 介导的抗原特异的粘附抑制。

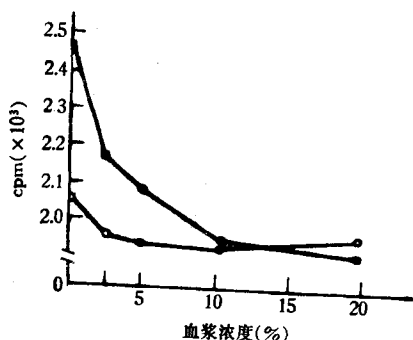


图 2 血浆浓度曲线

●—●对照 ○—○ $\text{TF}_{\text{H}_{22}} + \text{Ag}_{\text{H}_{22}}$

4. 实验观察了 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 几个时间点的粘附抑制效应, 图 3 提示, 1.5—2.0 小时为最适温育时间。

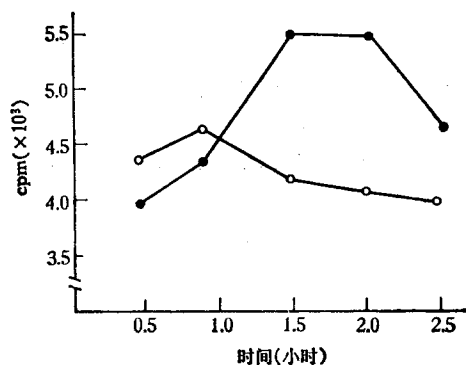


图 3 温育时间曲线

●—●对照 ○—○ $\text{TF}_{\text{H}_{22}} + \text{Ag}_{\text{H}_{22}}$

5. 固定 TF 浓度 ($10^{-4}\text{U}/\text{ml}$), 选择所需抗原的最适浓度。结果见图 4, $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 为最适抗原浓度。由于肿瘤抗原的多变性, 复杂性, 故每次所提抗原效应不完全一致, 所以每次提取的抗原, 均需做剂量曲线, 从中选出最适剂

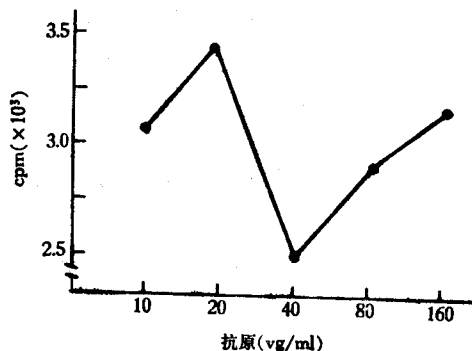


图 4 抗原剂量曲线

表 1 粘附抑制指数 (AI) 及显著性检验

实验次数	AgH ₂₂	AgC ₅₇	TFH ₂₂	AgH ₂₂ + TFH ₂₂	AgC ₅₇ + TF _n	AgH ₂₂ + TFH ₂₂
1	2.15	2.68	-5.08	-0.61	4.92	13.52
2	2.03	-1.47	-3.06	-3.71	-0.47	16.87
3	-3.25	1.37	-6.13	2.12	-0.27	7.55
4	1.71	0.59	1.87	-0.80	0.69	7.89
5	-0.62	7.46	0.97	-6.63	-0.18	13.86
$\bar{x} \pm S_E$	0.40 ± 1.04	2.13 ± 1.49	-2.29 ± 1.60	-1.91 ± 1.51	0.94 ± 1.02	11.92 ± 1.81
P 值				>0.05	>0.05	<0.01

注: AgH₂₂: PBS 法提取的 LACA 小鼠 H₂₂ 抗原。

AgC₅₇: 同法提取的 C₅₇ 小鼠肺癌抗原。

TFH₂₂: AgH₂₂ 免疫山羊之羊脾 TF。

TF_n: 正常山羊之羊脾 TF。

P 值: 均为加 TF 和 Ag 组与仅加 Ag 组的比较。即: AgC₅₇ + TFH₂₂ 组与 AgC₅₇ 组。

AgH₂₂ + TF_n 组与 AgH₂₂ 组。 AgH₂₂ + TFH₂₂ 组与 AgH₂₂ 组。

量。

6. 固定抗原浓度 (40 μg/ml), 选择 TF 的最适浓度。结果见图 5。10⁻⁴U/ml TF 为最适 TF 浓度, TF 的此种剂量依赖现象与其他人^[6]的资料相符。

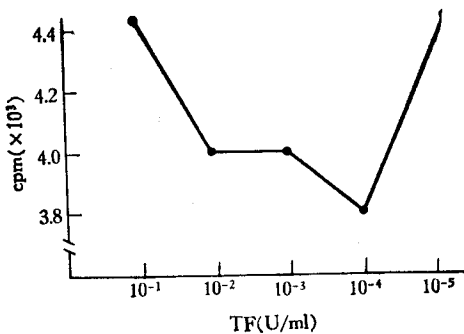


图 5 TF 剂量曲线

7. 选择 LAI 试管法^[7], 作为³H-亮氨酸 LAI 试验的方法学对照。取同一份血样, 平行做 LAI 的³H 亮氨酸法与 LAI 试管法, 结果表明, 两个试验相关非常显著 ($P < 0.01$)。从理论上讲, 试管法在整个实验过程中有两次抽样, ³H 法只有一次, 避免了一次抽样误差, 所以 ³H 法更为精确。

8. 建立了³H-亮氨酸法的最适条件之后, 我

们利用对 TF 抗原特异活性的鉴定来阐明此法的可靠性和敏感性。从表 1 可以看出, 仅 AgH₂₂ + TFH₂₂ 组有粘附抑制效应, 即 TF 仅能转移相应抗原的信息, 介导特异的粘附抑制效应。

目前 TF 已应用于临床, 但大量制备及特异活性体外检测, 仍未很好解决。本文介绍³H-亮氨酸白细胞粘附抑制试验, 提供了一个检测 TF 抗原特异活性的体外方法, 为 TF 应用过程中供体的选择、不同受体用量的确定、及疗效的判断提供了一个指标, 也为探讨 TF 的作用机制, 提供一个方法。

本研究在苏成芝教授和万芷芳副教授的指导下完成, 特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Halliday W. J. et al.: *Intern. J. Cancer.*, **9**, 477, 1972.
- [2] Tsang, P. H. et al.: *J. Immunol. Meth.*, **36**, 119, 1980.
- [3] 钱微等: 《第四军医大学学报》, **2**, 113, 1980.
- [4] 藤沢武彦ほか: 临床免疫, **13**, 720, 1981.
- [5] Halliday W. J.: *Cancer Res.*, **39**, 558, 1979.
- [6] Wilson, G. B. et al.: *J. Labera & Clin. Med.*, **93**, 800, 1979.
- [7] Grosser, N. et al.: *Cancer. Res.*, **35**, 2571, 1975.

[本文于 1982 年 12 月 10 日收到]