

RNA 聚合酶参与的以双链 DNA 为模板的 RNA 体外合成,但却抑制热变性单链 DNA 为模板的 RNA 合成。我们的实验结果表明,模板构象的不同,精胺对其影响也很不相同。在一定精胺浓度范围内,无论用哪种聚合酶进行体外转录,精胺对以天然 DNA 为模板的转录有明显的激活作用,而对以变性 DNA 和  $M_1$  DNA 为模板的转录影响较小。尽管两种聚合酶的模板专一性不同,但是,精胺影响转录的效应却是相似的。这说明精胺的作用主要与 DNA 模板的构象有关,而与聚合酶的关系不大。

从表 1 看出,以双链 DNA 为模板时,1—5mM 的精胺对这两种聚合酶所参与的转录反应的影响截然不同,除了反应条件不同外,这种差异似乎与聚合酶有一定关系。但是,有必要指出,在大肠杆菌 RNA 聚合酶体外转录系统中,当精胺浓度高于 1mM 时,透明的反应液变成微弱的乳白色,这说明,由于精胺的作用,出现了 DNA 或核苷酸类物质的团聚,这样便降低了反应系统的转录能力,致使放射性掺入减少。

值得注意的是,多胺与肿瘤的发生及其临

床诊断密切相关<sup>[7,11,12]</sup>,因此,多胺影响生命过程的作用机理有待深入研究。

本所生化试剂厂王淑娟、刘中昌帮助提取 RNA 聚合酶 II,谨此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Sakai, et al.: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 17, 15, 1976.
- [2] Tabor, C. W. et al.: *Annual review of biochemistry*, 45, 285, 1976.
- [3] Wallace, H. M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 652, 345, 1981.
- [4] Abraham, A. K. et al.: *Trends in biochemical Sciences*, 6, 106, 1981.
- [5] Abraham, A. K. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 5, 143, 1968.
- [6] Samson, F. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 425, 125, 1976.
- [7] Olli, Janne, et al.: *Biochem.*, 14, 3589, 1975.
- [8] Roeder, R. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 65, 675, 1970.
- [9] 郝检林等:《实验生物学报》, 15(1), 71, 1983.
- [10] 韩玉琨等:《遗传》, 3(4), 11, 1931.
- [11] 虞愷:《中华肿瘤杂志》, 3, 228, 1981.
- [12] 焦炳华:《生命的化学》, 3(4), 5, 1983.
- [13] Goyens, M. H.: *J. Theor. Biol.*, 97, 577, 1982.

[本文于 1983 年 2 月 8 日收到]

# 异种动物免疫 RNA 对小鼠脾淋巴细胞 cAMP 和 cGMP 的影响

赵 富 清

(海军军医学校生化教研室,南京)

从免疫宿主的淋巴样细胞中提取的免疫核糖核酸 (iRNA), 能在体内外传递特异的免疫反应,使正常淋巴细胞转变为对特异抗原起反应的效应细胞。但是 iRNA 的作用机制目前还不十分清楚。经 iRNA 致敏后淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的变化,目前也尚未见报道。为探讨 iRNA 的作用机制,本实验用异种动物 iRNA 使小鼠脾淋巴细胞致敏,然后测定致敏淋巴细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的变

化。还作了细胞介导细胞毒性实验,发现 iRNA 引起淋巴细胞内环型核苷酸水平的改变;这种改变与其传递细胞免疫功能有一定关系。

## 一、材料与方法

1. 实验动物 LACA 纯种小白鼠,雄性,18—22 克,2—3 月龄。山羊,雄性,3 岁。

2. 药品 DNase、DNA 钠盐(英国)Pronase (Merck)、聚乙酰硫酸钾盐 (PVS)(德国),DL-

亮氨酸-4,5- $^3\text{H}$ 比活性(54ci/mM)(上海原子能研究所),抗 cAMP 血清和抗 cGMP 血清(四医大生化教研室), $^3\text{H}$ -cAMP 比活性 20—30ci/mM、 $^3\text{H}$ -cGMP 比活性 22ci/mM (北京原子能研究所)。3'-5'-cAMP、3'-5'-cGMP 铵盐、RNaseA (上海生化所)。

**3. 试剂和仪器** 闪烁液 0.4%ppo-0.01% popop的二甲苯液,淋巴细胞分离液(比重 1.077  $\pm$  0.002) (上海试剂二厂),Tris-HCl 缓冲液(10mM Tris-HCl-1mM MgCl-0.3M NaCl pH 7.4)。液体闪烁计数器 FJ-2100 型(西安二六二厂)。

#### 4. 方法

(1) 肿瘤宿主系统 用小鼠腹水型 S-180 肉瘤细胞在成年昆明种小鼠腹腔内连续传代。实验小鼠每只腹腔内接种 2—4  $\times 10^6$  个活细胞,接种后 7—11 天备用。

(2) 免疫动物及 iRNA 提取 无菌条件下,取出带瘤小鼠腹水,加生理盐水混匀,离心 200  $\times g$  3—5 分钟,弃去上清液及沉淀层底部的红细胞,再将沉淀瘤细胞悬于生理盐水中,同法离心洗涤三次。然后,将瘤细胞悬液乳化于等体积的完全福氏佐剂中,用以免疫正常山羊。第一次免疫注射是在山羊四肢皮下及双侧颈部淋巴结附近皮下,各点分别注射 8  $\times 10^7$  个活瘤细胞。7天后,在原各注射点再注射 S-180 肉瘤细胞 4  $\times 10^7$  个。从第二次免疫注射开始在腹腔内注射活瘤细胞 8  $\times 10^7$  个。以后每隔一周(同第二次一样)进行加强免疫注射一次。第四次注射时,从颈静脉抽血,作环状沉淀实验,对流免疫电泳、扩散试验,可出现明显的沉淀线。间隔两周后,同法再进行一次加强免疫注射。在末次免疫注射后 7 天,颈动脉放血致死,可发现脾脏、肠系膜淋巴结及全身外周淋巴结明显增大。迅速取出脾脏及上述各处淋巴结,剪碎后立即放在 -20 $^{\circ}\text{C}$  的 80% 酒精中。参照文献 [1] 用 pH5 热酚法以氯仿除蛋白,即刻提取 iRNA。制备所得的 iRNA 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  的 80% 酒精中。此法 iRNA 产量一般为 3—4mg/克湿组织。其紫外光谱吸收扫描呈典型的核酸吸收

峰形; $A_{260}/A_{280}$ 、 $A_{260}/A_{230}$  比值均  $>2$ ; 聚丙烯酰胺电泳图谱除见有 28S、18S 和 4S 集中的、较窄的 RNA 染色带外,在 4—18S 之间还分布多条较浓的 RNA 区带,表明提取的 iRNA 保持了高分子性。检测表明各批淋巴组织提取的 iRNA 中含 DNA 0.4—1.0%、蛋白质 0.2—0.6%。“正常”RNA 与 iRNA 来源相同(即未经肿瘤免疫山羊 RNA)。

(3) 用 iRNA 致敏小鼠脾淋巴细胞 正常纯种 LAcA 小鼠,放血致死,无菌条件下取出脾脏,冰浴中用玻璃匀浆器轻轻压挤后,按文献 [2] 的方法,用淋巴细胞分离液迅速分离出脾淋巴细胞。瑞氏染色分类计数,其中淋巴细胞数  $>95\%$ ,台盼兰检测活细胞一般为 96—98%。实验组和对照组各管分别加入淋巴细胞 3  $\times 10^7$  个。实验组各管再加 iRNA 500  $\mu\text{g}$ 。对照一组加 Tris-HCl 缓冲液,对照二组加“正常”RNA 500  $\mu\text{g}$ ,对照三组加经 RNase 消化的 iRNA 500  $\mu\text{g}$ ,平行管一式三份。混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$  孵箱中分别温育 0、5、10、15、30、45 和 60 分钟。

(4) 测定 cAMP 和 cGMP 水平 参照 David [3] 报道,按预定时间从孵箱中取出培养管,搅匀,迅速放入 -10 $^{\circ}\text{C}$  的 80% 酒精中冷却终止反应。然后,用浓 HCl-无水乙醇液 [HCl: EtOH = 1:60 (V/V)] 提取细胞内 cAMP 和 cGMP,并用丙酮-琥珀酸酐-三乙胺酰化剂酰化样品,真空干燥后,按文献 [4,5] 方法进行放射性免疫测定。回放实验证明回收率都在 94—100%。

(5) 细胞介导细胞毒性实验 使用两种腹水型肿瘤细胞(即 S-180 和 H<sub>22</sub>),按  $^3\text{H}$ -Leu 标记肿瘤细胞释放法和  $^{51}\text{Cr}$  标记肿瘤细胞释放法 [6-8],各管分别加入淋巴细胞 3  $\times 10^7$  个,实验组加 iRNA<sub>S-180</sub> 500  $\mu\text{g}$  或 iRNA<sub>H<sub>22</sub></sub> 500  $\mu\text{g}$ ,对照一组单独加淋巴细胞,对照二组加“正常”RNA 500  $\mu\text{g}$ ,对照三组加经 DNase (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 消化的 iRNA 500  $\mu\text{g}$ ,对照四组加经 RNase (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 消化的 iRNA 500  $\mu\text{g}$ ,对照五组加经 Pronase (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 消化的 iRNA 500  $\mu\text{g}$ ,各管再加 PVS 10  $\mu\text{g}$ ,混匀,平行管一式三份,置 37 $^{\circ}\text{C}$  温

育 60 分钟。然后,用 Tris-HCl 缓冲液离心洗涤二次,再悬浮于含 20% 小牛血清的 1640 介质中,加 S-180 或 H<sub>22</sub> 瘤细胞膜抗原 0.1mg,混匀后 37℃ 温育 7 小时,前者再加入  $1 \times 10^5$  个 <sup>3</sup>H-Leu 标记的 S-180 瘤细胞,后者再加入  $1 \times 10^5$  个 <sup>3</sup>Cr 标记的 H<sub>22</sub> 瘤细胞。各管中淋巴细胞与靶细胞之比为 300:1;充分混匀后低速离心  $50 \times g$  3 分钟,置 37℃ 孵箱中继续培养(前者 36 小时,后者 24 小时)。取出各管后充分混匀,离心  $500 \times g$  10 分钟。前者取 100 $\mu$ l 上清液点在 49 型玻璃纤维滤纸片上,烘干后置 0.3ml 闪烁液中测量放射性。后者取 0.5ml 上清液直接测量放射性。沉淀的细胞台盼兰试验发现淋巴细胞存活率一般在 60% 以上。

二、结果与讨论

1. 由表 1 和表 2 可见,“正常”RNA 与小鼠脾淋巴细胞温育 10 分钟时,cAMP 增加到对照值的 309.6% ( $P < 0.01$ ),10 分钟后 cAMP 含量逐渐减少,温育 60 分钟 cGMP 无明显变化。iRNA 与小鼠脾淋巴细胞温育后 5 分钟 cAMP 明显增加,15 分钟时达最高峰,增加到对照值的 277.1% ( $P < 0.01$ );温育 30 分钟时 cGMP 含量出现一个高峰,增加到对照值的 308% ( $P < 0.01$ )。说明 iRNA 或“正常”RNA 与小鼠脾淋巴细胞温育后,对细胞内 cAMP 和 cGMP 含量都有一定的影响。再用各时间点的 cGMP/cAMP 比值换算成对照值的百分数作图

表 1 iRNA 和“正常”RNA 对小鼠脾淋巴细胞内 cAMP 水平影响的时间过程

| 温育时间<br>(分) | iRNA            |      |       | “正常” RNA        |      | P 值   |
|-------------|-----------------|------|-------|-----------------|------|-------|
|             | cAMP 水平 (Pmole) |      | P 值   | cAMP 水平 (Pmole) |      |       |
|             | $\bar{x}$       | SE   |       | $\bar{x}$       | SE   |       |
| 0           | 23.51           | 4.17 | <0.05 | 16.68           | 2.35 | <0.05 |
| 5           | 27.36           | 4.10 | <0.01 | 23.94           | 3.51 | <0.01 |
| 10          | 24.48           | 3.46 | <0.01 | 29.94           | 5.20 | <0.01 |
| 15          | 30.51           | 3.94 | <0.01 | 26.95           | 5.16 | <0.05 |
| 30          | 26.30           | 4.89 | <0.01 | 21.54           | 4.06 | <0.05 |
| 45          | 20.91           | 2.79 | <0.05 | 18.63           | 3.48 | <0.05 |
| 60          | 14.03           | 3.41 | >0.05 | 11.73           | 2.55 | >0.05 |
| 对照          | 11.01           | 0.98 |       | 9.67            | 0.84 |       |

注: 1. 表 1 是 3 次实验的结果,每次平行管一式三份。2. cAMP 水平以  $3 \times 10^7$  个淋巴细胞表示。3. 显著性检验以单独淋巴细胞组为对照。

表 2 iRNA 和“正常”RNA 对小鼠脾淋巴细胞内 cGMP 水平影响的时间过程

| 温育时间<br>(分) | iRNA            |      |       | “正常” RNA        |      |       |
|-------------|-----------------|------|-------|-----------------|------|-------|
|             | cGMP 水平 (Pmole) |      | P 值   | cGMP 水平 (Pmole) |      | P 值   |
|             | $\bar{x}$       | SE   |       | $\bar{x}$       | SE   |       |
| 0           | 0.67            | 0.16 | >0.05 | 0.67            | 0.13 | >0.05 |
| 10          | 0.51            | 0.12 | >0.05 | 0.62            | 0.09 | >0.05 |
| 15          | 0.57            | 0.11 | >0.05 | 0.58            | 0.10 | >0.05 |
| 30          | 2.03            | 0.16 | <0.01 | 0.58            | 0.10 | >0.05 |
| 45          | 0.50            | 0.14 | >0.05 | 0.56            | 0.08 | >0.05 |
| 60          | 0.46            | 0.11 | >0.05 | 0.49            | 0.09 | >0.05 |
| 对照          | 0.66            | 0.05 |       | 0.57            | 0.08 |       |

注: 1. 表 2 是 3 次实验的结果,每次平行管一式三份。2. cGMP 水平以  $3 \times 10^7$  淋巴细胞表示。3. 显著性检验以单纯淋巴细胞组为对照。

(图1),由图可见淋巴细胞与“正常”RNA 温育时,cGMP/cAMP 比值在 60 分钟内波动不明显。而经 iRNA 温育的淋巴细胞,cGMP/cAMP 比值 30 分钟时显著增高,相当于“正常”RNA 同一时间点的 282.9%,说明 cGMP 水平增高。

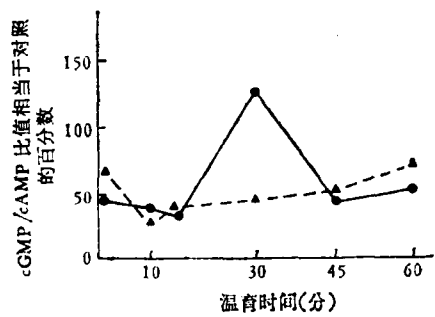


图1 iRNA 和“正常”RNA 对小鼠脾淋巴细胞内 cGMP/cAMP 比值的影响  
▲-----▲“正常”RNA ●---● iRNA

2. 为了证明 cAMP、或 cGMP 水平的变化是否与 iRNA 完整结构有关,用经 RNase 处理 (RNase25μg/iRNA5mg) 的 iRNA500μg 与 3×10<sup>7</sup> 个小鼠脾淋巴细胞一同温育不同的时间,测定发现经 RNase 消化后,iRNA 对细胞内 cAMP

表3 iRNA 体外传递细胞介导细胞毒性的效应

|         | 细胞毒性指数 (%) | P 值           |
|---------|------------|---------------|
| 正常淋巴细胞  | 4.4±1.7    |               |
| “正常”RNA | 5.7±2.1    | >0.05(f = 22) |
| iRNA    | 54.0±5.8   | <0.01(f = 28) |
| DNase   | 28.5±3.2   | <0.01(f = 24) |
| Pronase | 31.1±2.2   | <0.01(f = 24) |
| RNase   | 6.4±2.3    | >0.05(f = 19) |

注: 1. 显著性检验以正常淋巴细胞组为对照。 2. 均数 ±SE。 3. f 代表自由度。

或 cGMP 的影响消失。这说明完整分子 iRNA 才有活性。

3. 用 <sup>3</sup>H-Leu 及 <sup>51</sup>Cr 释放试验测异种 iRNA 传递细胞介导细胞毒性结果见表 3 和 4。表 3 证明异种 iRNA 体外致敏小鼠脾淋巴细胞对

S-180 肉瘤细胞,在效应细胞与靶细胞为 300:1 时具有明显的杀伤作用,并且 RNase 能使 iRNA 活性完全消失,但 iRNA 活性对 DNase 和 Pronase 具有抗性。因为实验用的 DNase 中含有一定的 RNase,故经 DNase 消化的 iRNA 细胞毒性参数降低。另外, Pronase 处理 iRNA 后,细胞毒性参数也有降低。这有两种可能:一是 iRNA 经 Pronase 消化后,在酚-SDS、氯仿等再次提取过程中,一部分 iRNA 被破坏了,二是 Pronase 制剂中或实验用的容器污染有少许 RNase。表 4 说明只有 iRNA<sub>H<sub>22</sub></sub> 才能使正

表4 iRNA 体外传递肿瘤特异性细胞介导细胞毒性的效应

|                                | 细胞毒性指数 (%) | P 值           |
|--------------------------------|------------|---------------|
| 正常淋巴细胞                         | 23.8±0.76  |               |
| “正常”RNA                        | 24.9±1.33  | >0.05(f = 12) |
| iRNA <sub>S-180</sub>          | 29.8±4.82  | >0.05(f = 16) |
| iRNA <sub>H<sub>22</sub></sub> | 42.7±0.20  | <0.01(f = 16) |

常小鼠脾淋巴细胞转变成对 H<sub>22</sub> 肿瘤细胞具有特异性毒性效应,而经 iRNA<sub>S-180</sub> 温育的淋巴细胞则对 H<sub>22</sub> 靶细胞无明显的毒性作用。因此,可以认为本文所用的 iRNA 是一种带有特异性免疫信息的 iRNA。

参 考 文 献

[1] Scherrer, K. D. et al.: *Biochem. Biophys. Res. comm.*, 7, 486, 1962.  
[2] Udupa, T. N. S. et al.: *J. Immunol., Meth.*, 33, 201, 1980.  
[3] David, G. et al.: *J. Immunol.*, 116, 696, 1976.  
[4] 陈南春等:《第四军医大学学报》, 1, 35, 1982。  
[5] 黄莉莉等:《第四军医大学学报》, 1, 37, 1982。  
[6] Wang, B. S. et al.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 9(2): 218, 1978.  
[7] 陈苏民:《第四军医大学学报》, 4, 389, 1980。  
[8] 陈苏民等:《第四军医大学学报》, 1, 7, 1980。

[本文于1983年4月12日收到]