

巨噬细胞电泳实验的实践与应用

施永德

唐镇生

(上海第一医学院生物物理教研组) (上海第一医学院华山医院神经病学研究室)

细胞电泳是一个研究细胞表面结构和功能的生物物理学方法^[1], 早在本世纪二十年代已开始应用本技术, 但在这漫长的时间里, 细胞电泳发展较慢。最近由于细胞免疫学的进展, 发展了一项新技术——巨噬细胞电泳实验(简称 MEM)。这是一项生物物理、生物化学与细胞免疫学间的综合性实验。

原理及历史

MEM 实验的起源, 要追溯到 1964 年 David 的巨噬细胞移动抑制实验(简称 MMI 实验)的建立和发展, 他发现致敏淋巴细胞与特异抗原接触以后, 就会释放一种使巨噬细胞移动受抑制的淋巴素类物质(简称 MIF), 抑制了巨噬细胞的移动。人们考虑到, 当巨噬细胞移动受到抑制时, 也一定伴随着细胞表面电荷的变化。后来证明, 当致敏淋巴细胞与抗原相接触后, 能释放一种巨噬细胞表面负电荷下降的生物活性物质, 称为巨噬细胞电泳减缓因子(简称 MSF), 使巨噬细胞电泳显著地减缓。这样巨噬细胞是否减缓就可作为淋巴细胞对抗原反应的一个客观指标。由于 MEM 较 MMI 实验简易而又迅速, Field 最早(1970)用 MEM 实验来诊断肿瘤, 继之由 Pritchard 证实, 以后逐步地扩展到临床免疫研究中。我们自 1974 年应用本实验诊断肿瘤与脑瘤, 取得了较好的结果。

本实验中淋巴细胞释放 MSF 的原理, MSF 是一个还是几个、与 MIF 是一类物质还是两类物质、与 MMI 实验的关系等细节问题尚未完全明了, 有待进一步研究。

操作方法

MEM 实验操作步骤有抗原的制备、淋巴细

胞的分离、豚鼠巨噬细胞分离, 将抗原与以上两种细胞混合于 199 培养液中温培, 使淋巴细胞释放 MSF 并作用于巨噬细胞表面, 使巨噬细胞表面负电荷下降, 这种负电荷下降的程度, 最后通过巨噬细胞电泳率测量而反映出来。实验中选用什么作为抗原, 将因实验目的不同而异, 其余操作步骤是共同的, 现将这些共同的操作步骤简述如下。

1. 淋巴细胞的分离

一般分离淋巴细胞有明胶法、甲基纤维素法及非可法。目前国内通用的是非可法。分离人的淋巴细胞时, 将比重 1.078 的非可-泛影葡胺(Picoll-Urografin)溶液注入试管, 上面徐徐加入用 199 培养液稀释 1 倍的去纤维蛋白原血液, 经离心, 则红细胞、中性白细胞、单核细胞沉于管底, 而淋巴细胞呈云雾状悬浮于非可-泛影葡胺溶液与血清 199 培养液的界面间, 吸出该云雾状层液体, 离心, 用 199 培养液洗 3 次, 即得较纯的淋巴细胞。通常在 5—10 毫升血液中, 可回收 $1-4 \times 10^6$ 个白细胞, 经涂片观察, 淋巴细胞在白细胞中的百分率占 80—90% 以上, 总数与该百分率相乘即得纯淋巴细胞数。立即用伊红染色, 不受染, 表示淋巴细胞具活性。本实验要求淋巴细胞数在 1×10^6 个以上。分离人与动物及不同动物品种间的淋巴细胞时, 所用非可-泛影葡胺溶液的比重稍有差异, 要经过细心摸索, 选用适合的比重, 方能得到纯净而丰富的淋巴细胞。用含 10% 自身血清的 199 培养液于 4℃ 中保存, 3 天内淋巴细胞活力不受损。

2. 豚鼠巨噬细胞分离

成年豚鼠于实验前 4—12 天, 腹腔注射灭菌石蜡油 15—20 毫升, 实验时击毙动物, 用 Hank's 液将腹腔渗出液洗出, 离心, 弃上清液

及石蜡油层,沉淀物主要为巨噬细胞,再用 Hank's 液洗 2—3 次,最后用 199 培养液稀释成 10% 的细胞悬液,经 200 伦 X 光照射,即可供实验用。由于渗出液细胞中除巨噬细胞外,尚有 10—20% 豚鼠的淋巴细胞,为了避免温培时豚鼠淋巴细胞与被测对象的淋巴细胞间的交叉反应,须经 X 光照射,此剂量已足以抑制豚鼠淋巴细胞的反应性,但巨噬细胞承受 MSF 的功能不受影响。

3. 温培

淋巴细胞、巨噬细胞及抗原的混合温培方法,有单步法与双步法。单步法是:实验管中加入淋巴细胞 0.5×10^6 个以上,巨噬细胞 7×10^6 个及抗原(一般 10—100 微克)于 1.6 毫升的 199 培养液中,23℃ 温培 2 小时,温培过程中淋巴细胞与抗原相接触,即释放 MSF 并作用于巨噬细胞表面;对照管中仅加淋巴细胞和巨噬细胞,不加抗原,因此在温培过程中,淋巴细胞不释放 MSF。两管温培后,进行巨噬细胞电泳测量。

双步法则首先将上述同量淋巴细胞与抗原一起放在 199 培养液中温培,让淋巴细胞与抗原作用并释放 MSF 于上清液中,然后离心除去淋巴细胞,取其上清液再与上述相同量的巨噬细胞一起温培,这时上清液中 MSF 与巨噬细胞表面充分发生作用。对照管中无抗原,其余材料及步骤与实验管相同,同样经两次温培。最后分别测定巨噬细胞电泳率。

单步法的优点是时间短,步骤少。双步法的优点是在进行巨噬细胞电泳测量时,在细胞电泳装置的整个视野见到的几乎都是巨噬细胞,不受淋巴细胞的干扰。同一淋巴细胞样品,同时用这两法进行温培,其结果几乎一致,但双步法更为明显。

4. 巨噬细胞电泳测量

我们应用自制的方形玻璃毛细管式细胞电泳装置^[1]。细胞电泳小室是一个横截面积为正方形的玻璃毛细管,内腔横截面积为 1×1 毫米²,长度为 50 毫米,每次仅需 0.05 毫升的细胞悬液。电压梯度 6 伏特/厘米,电流约 1 毫安,

在 25℃ 室温中进行测量,在静止层深度分别测量实验管与对照管中各 10 个巨噬细胞往返通过 33 微米距离所需的秒数,并求出平均值,若 $t_{\text{实}}$ = 实验管电泳时间, $t_{\text{对}}$ = 对照管电泳时间,则巨噬细胞电泳减缓率 = $\frac{t_{\text{实}} - t_{\text{对}}}{t_{\text{对}}} \times 100$ 。

巨噬细胞电泳有一定的误差,我们通过 46 只豚鼠,共 289 次测定的电泳率分析,发现人工操作误差为 2.84%,豚鼠间个体差异为 9.3%,不同电压条件引起误差为 2.6%,各个不同月份间平均差异为 4.6%。为此强调本实验应用同鼠巨噬细胞,在相同电压条件下,同批实验内,以最短的时间,紧接完成对照管与实验管的细胞电泳测量,并将这两个测定值进行比较和计算,这样就把实验误差下降到仅仅是操作误差的水平(即 2.84%),又根据豚鼠间个体误差较大的事实,如将几个豚鼠的巨噬细胞合在一起进行温培和电泳测量的方法,必然会增加实验误差,影响实验准确率。

应 用

巨噬细胞电泳实验是一项检查淋巴细胞对抗原识别和反应能力的体外实验。整个实验中,涉及抗原是怎样对淋巴细胞表面发生作用,淋巴细胞怎样释放 MSF 类物质,MSF 类物质怎样作用于巨噬细胞表面,在巨噬细胞表面及其内部引起什么变化等一系列生物物理、生物化学及免疫学的基本问题,其应用范围十分广泛,为临床免疫诊断提供了一项有效工具。由于本实验是由 MMI 实验引伸出来,因此它能起到 MMI 实验的作用,又因本实验比 MMI 简便、快速、准确、更受人们欢迎。虽然本实验的历史不长,但在应用上已显出良好的前景。

1. 诊断恶性肿瘤及肿瘤抗原的鉴别

MEM 实验发展较快的原因之一,与本技术在诊断恶性肿瘤上有强吸引力是分不开的。最近发现恶性肿瘤病人的淋巴细胞与人脑碱性蛋白(即致脑炎因子,简称 EF)接触以后,释放 MSF,使巨噬细胞电泳显著减缓,而正常人及非肿瘤病人几乎没有这种效应。后来又发现,从

各种恶性肿瘤如子宫颈癌、乳癌、胃癌、肺癌、支气管癌、肝癌等组织中提取的碱性蛋白,对恶性肿瘤病人的巨噬细胞电泳减缓作用更为显著,更能把肿瘤病人与正常人及非肿瘤病人之间区别开来。我们设想,是否从恶性脑瘤组织中提取的碱性蛋白作为抗原,会对各种恶性肿瘤和

脑瘤的诊断有更强的抗原性。为此我们则从恶性脑胶质瘤中提取碱性蛋白,将手术切除的新鲜胶质瘤用生理盐水洗去血液,剥去周围组织、切碎在低温冰箱(-40℃)中保存或立即抽提。抽提时先用蒸馏水制成匀浆,高速离心,沉淀重复捣碎、离心,沉淀物冰冻干燥即得干粉。然后

表 1 不同作者巨噬细胞电泳实验诊断肿瘤的结果

作 者	正 常 人		肿 瘤 病 人		所用抗原
	例数	减缓率(%)	例 数	减缓率(%)或结果	
Field et al: <i>Lancet</i> 2, 1337, 1970.	38	-0.9—3.6	56	8.2—29.9 *	EF
Caspary et al: <i>Br. Med. J.</i> 2, 613, 1971.	19	0.4—6.6	47	14.3—23.9 *	EF
		0.1—4.9		11.6—22.5 *	CaBP
Pritchard et al: <i>Lancet</i> 2, 627, 1972.	24	-1.8—3.3	48	13.2—29.1 *	EF,CaBP
Pritchard et al: <i>Br. J. Cancer</i> 27, 1, 1973.	26	-2—3	73	13—29 *+	EF,CaBP
Field et al: <i>Br. J. Cancer</i> , 28 (Suppl), 208, 1973.	196	<5, <2—3	464	463阳性 *	EF,CaBP
Pritchard et al: <i>Br. J. Cancer</i> , 28 (Suppl), 229, 1973.	26	-2—3.4	72	13—30 *	EF,CaBP
	12	-2—4	47	20—40 +	
Goldstone et al: <i>Clin. Exp. Immunol.</i> , 14, 469, 1973.	11	-6—1	13	10—28 +	CaBP
Lewkonja et al: <i>Br. J. Cancer</i> , 30, 532, 1974.	11	-2—7	17	1—15 *	CaBP
Preece et al: <i>Clin. Exp. Immunol.</i> , 18, 543, 1974.	18	-1—5	30	5—20 +	EF
	13	-1—11	36	9—39	CaBP
本文作者:《肿瘤防治简报》1975年,第3期,第24页。	18	平均 0.05 -6—12	7	平均 17.7 (9—30)	GBP
				平均 20.0 (14—28)	
		平均 1.8 -5—4	10(脑瘤)	平均 17 (1—27)	GBP
				平均 23 (1—39)	
本文作者:《肿瘤防治简报》1976年,第2期,第26页。	55	0.6±2.8 -5—6	43	平均 16.0±7.7 (6—30)	GBP
			69(脑瘤)	平均 16.5±7.6 (6—40)	
Rawlins et al: <i>Br. J. Cancer</i> , 34, 613.	29	<6	45	95% 阳性 (>6)	EF

* 单步法, + 双步法, EF 人脑碱性蛋白, CaBP 全身性恶性肿瘤碱性蛋白, GBP 恶性脑胶质瘤碱性蛋白

将此干粉反复用氯仿、甲醇混合液(2:1=V:V)振摇、捣碎和抽滤,达到去脂目的。最后将残渣溶于5倍蒸馏水中,在pH 2.6—3.0区间提取碱性蛋白,离心收集上清液,进行蛋白定量,分装入安瓿,冰冻干燥,即得碱性蛋白结晶。每克胶质瘤干粉可得结晶15毫克左右。该蛋白结晶呈白色或淡黄色,极易溶于水,在280毫微米处有一强的紫外吸收峰。每批抗原使用前,先

经病理诊断为癌肿的病人淋巴细胞的检验,证实对巨噬细胞有明显的电泳减缓作用,而对健康人淋巴细胞没有这种作用,方开始使用。每个病人试验管中加入碱性蛋白的量是30微克。

我们进行了55例正常人的MEM实验,其减缓率几乎为零,平均为0.6±2.8%,以平均值加减两个标准差为正常范围,即-5—6%,我们把超过6%者定为阳性结果,正常人中仅1人

超过6%；43例恶性肿瘤平均减缓率为 $16.0 \pm 7.7\%$ ，阳性率达94%；69例脑瘤平均为 $16.5 \pm 7.6\%$ ，阳性率为90%；对神经系统器质性疾病有交叉现象，对非神经系统、非肿瘤性疾病几乎无交叉。说明自恶性肿瘤组织中提取的碱性蛋白，对诊断恶性肿瘤及脑瘤也是一个有效的抗原。我们的结果与其他作者的结果相比是一致的（见表1）。

国外将从恶性肿瘤组织中提取的碱性蛋白，用 Sephadex G50、75 分离和纯化，发现具抗原活力部分是分子量为16,000—18,000的蛋白质。对氨基酸组成作了分析，碱性氨基酸所占比例很高，全部氨基酸中色氨酸仅占0.3%，但该基团十分重要，若用2-羟基-5-硝基溴苯（2-Hydroxyl-5-nitrophenyl-bromide）封闭，则活力丧失；用胰蛋白酶和酸水解断裂的肽片中，只有含色氨酸者具有抗原活力；若代替色氨酸或色氨酸的两侧基团加以改变，均大大影响其活力。由于致脑炎因子（EF）与肿瘤碱性蛋白间存在着共同的抗原簇，初步证明可能是：苯丙-丝-色-甘-丙-谷-甘-谷氨酰胺-精的结构有关，故恶性肿瘤病人淋巴细胞能与两者起反应，但与后者更强。可见，MEM实验不仅是可供诊断肿瘤的一个方法，而且也是一个深入研究和鉴定肿瘤抗原和其他抗原的有效指标。

2. 淋巴细胞对抗原的反应性及其影响因素的研究

当致敏淋巴细胞与抗原接触以后，即释放MSF类物质，使巨噬细胞电泳减缓，其减缓率即反映了淋巴细胞对抗原的识别力和反应性。根据这一原理 Smith 等人，用健康成人淋巴细胞与纯化结核菌素接触，即使巨噬细胞电泳显著减缓，而孕妇则显示这种减缓率有明显下降，而白血病病人则完全丧失，充分地反应了这三者淋巴细胞对结核菌素反应性上的区别。Smith 还探讨了1.06—1.10不同比重的淋巴细胞亚株对结核菌素的反应性，发现比重1.070—1.080间的淋巴细胞反应性最强，其次是1.080—1.090，其他比重的均为无效。可见本实验是一个检验淋巴细胞对抗原反应性的较好的方法。

应用本方法，还可以观察影响淋巴细胞反应性的各种因素，Ford 等人在人血清中分离到 α_2M 的巨球蛋白，它能阻断淋巴细胞与抗原起反应，因而使巨噬细胞电泳减缓作用丧失或下降。他们还研究了T淋巴细胞表面上这种球蛋白的受体的性质。其他一些作者从不同角度探讨了一些药物、激素如胸腺素、前列腺素、转移因子、5-羟色胺及其他叫噪衍生物类物质对淋巴细胞反应性的影响。这不仅有助于对这些药物和激素的作用原理的阐明，而且对研究淋巴细胞免疫功能也有一定的意义。

3. 肾脏及器官移植

机体淋巴细胞膜上存在着标志个体特征的组织相容性抗原，当某个体淋巴细胞与另一个体的淋巴细胞接触时，它们之间就要互相识别和反应，即释放MSF类物质，同样使巨噬细胞电泳减缓，而同卵双胞胎的淋巴细胞接触，完全不显示任何巨噬细胞电泳减缓作用。Shenton 等人测试了一系列肾供者与受者淋巴细胞间的双向反应对巨噬细胞的减缓作用，发现其减缓率大者移植后果差，减缓率近于零者移植效果好。因此本实验具有评价肾脏、皮肤及器官移植的作用（*Tissue Antigen* 5, 246, 1975.）。

4. 临床免疫诊断

应用MEM实验开展临床免疫诊断，目前已报道的疾病有恶性肿瘤、脑瘤、神经系统器质性疾病、多发性硬化、重症肌无力、肉瘤样疾病、麻疹、内源性哮喘、系统性红斑狼疮的诊断及鉴别诊断，还有甲状腺及胸腺手术或切除后的动态观察，还有绵羊中 Scrapie 病的快速诊断等（*IRCS, J. Med. Sci.*, 3, 583, 1975.）。

5. MEM 实验原理的阐明

本实验虽积累了一些感性认识，要进一步上升为理性认识，还须进一步阐明抗原—淋巴细胞—MSF—巨噬细胞之间的内在关系与细节。Field 和 Pritchard 等为了阐明涉及淋巴细胞和巨噬细胞的蛋白质合成问题，都应用放线菌素D和嘌呤霉素进行研究，虽然他们强调的环节上有先后，但一致认为，以上两种蛋白质抑制剂均能阻断巨噬细胞的电泳减缓作用，说明

干扰了 MSF 的释放。Pritchard 还在淋巴细胞与抗原作用的上清液中分离到分子量为 8,000 和 20,000 的 MSF 类物质,认为 MSF 与 MIF 并不一样;而 Preece 却报道,他分离到分子量为 2,300 的 MSF,认为 MSF 与 MIF 相类似。我们相信,本实验原理的进一步阐明,将对淋巴细胞和巨噬细胞免疫功能的研究有很大的促进作用。

用。也可能在阐明本实验的原理过程中,更进一步扩大本实验的应用范围,或发现更为灵敏而有效的方法,以致代替本实验。

主要参考资料

- [1] 梁子钧、施永德:《生物化学与生物物理进展》,1976年,第1期,第54页。

[本文于 1977 年 7 月 1 日收到]

离子交换法精制辅酶 A 的新工艺

南京大学生物系生化教研室辅酶 A 研制组

无 锡 第 三 制 药 厂

辅酶 A (简称 CoA) 的分离精制早期是用氧化亚铜共盐沉淀法。此法得率低,工序繁杂,原料昂贵,而且含有有害物质,污染环境,损害健康,不宜大规模生产。随着科学技术的发展,一些新技术得到广泛应用。近年来,CoA 的精制采用了阴离子树脂分离法,DEAE-纤维素分离、葡聚糖凝胶——Sephadex G25 过滤法,亲和层析分离法等。后两种方法虽能得到高纯度的 CoA 产品,但不适用于大规模的工业生产,适用于大规模工业生产的还是阴离子树脂分离法。

我国的 CoA 生产是在文化大革命中开始的,采用的是上述经典方法。此法除有上述缺点外,产量亦甚低,远远不能满足需要。最近,建立了 PTA (磷酸转乙酰化酶)-紫外法测定 CoA,发现我国生产的 CoA 含量不高,仅有数批含量达到 50%,一般的为 20% 左右,最低仅含 11.66^[1],因此,建立一个提取 CoA 的有效方法是很需要的。

离子交换法在国内曾有报道^[2],但 GMA 树脂不易得到,而且它的粗丙酮粉纯度仅为 80 微米/毫克左右,我们筛选了二十多种阴离子树脂,发现国产树脂 714, 290, 330 和 717 对 CoA 都有较好的分离能力,由于 717 来源广,取材易,因此着重地进行了反复试验和扩大试验,同时对 714 树脂也进行了反复试验。为了提高纯

度,在 717 离子交换工艺分离 CoA 的基础上,又采用了大孔吸附剂脱盐代替 Ba(OH)₂ 沉淀阴离子的工艺,取得了较好的结果,产品纯度达到 50% 左右,得率达 52%。

一、材料和方法

1. 材料来源

717 阴离子树脂系无锡树脂厂产品;290 阴离子树脂系南开大学化工厂产品;714 阴离子树脂系上海产品;330 树脂由华北制药厂提供;769 活性炭系上海产品;大孔吸附剂¹⁾系华北制药厂产品;CoA 对照品系无锡第三制药厂最优产品。(磺胺法测定为 400 微米/毫克,后经 PTA-紫外法标定 CoA 为 208 微米/毫克,含量约为 50%);磷酸转乙酰化酶和乙酰磷酸二锂盐由本组制备;其他试剂与材料均为一般商品。

2. 分析方法

CoA 含量分析采用磷酸转乙酰化酶-砷酸解离法^[3]和磺胺乙酰化法^[4]。自由巯基的测定(还原效果的检查)采用硝普盐定量法^[5]。CoA 定性分析采用纸层析和纸电泳。

1) 大孔吸附剂是华北制药厂自己生产、自己使用的商品,他们称大孔吸附剂为“小白球”或“白球树脂”。这种树脂没有活性基团,不起离子交换作用。