

# E玫瑰花形成与猪淋巴细胞内 cAMP 水平的变化

## ——影响因素

管远志 石 镜 谢少文

(中国医学科学院基础医学研究所)

### 摘 要

为进一步研究E玫瑰花形成后淋巴细胞内环-磷酸腺苷(cAMP)的变化规律,观察了淋巴细胞与绵羊红血球(SRBC)膜碎片和完整SRBC作用后cAMP的上升情况,结果发现前者的cAMP水平上升幅度远大于后者,而且cAMP的上升幅度与所用的SRBC细胞膜的浓度以及玫瑰花百分率呈正相关的趋势。还发现,玫瑰花形成后,淋巴细胞内的cAMP水平于1分钟内即上升,10分钟达到高峰,8小时左右降至对照水平。

近年来有些研究者发现用升高细胞内cAMP水平的药物如异丙基肾上腺素、氨茶碱等处理淋巴细胞后,E玫瑰花的形成受到抑制,提示E玫瑰花形成与淋巴细胞内cAMP水平有一定关系<sup>[1,2]</sup>。但是,E玫瑰花形成过程对淋巴细胞内cAMP水平有无影响,国际上尚未见报道。为了初步探讨玫瑰花形成的生物学意义,本实验室于1979年开始用猪血淋巴细胞进行了试验,发现淋巴细胞与SRBC形成玫瑰花之后,cAMP含量高于对照<sup>[3]</sup>。为了肯定这一结果的可靠性,并探讨cAMP水平变化的规律,我们从以下几方面作了更深入的研究:1.用SRBC细胞膜代替完整红血球与淋巴细胞作用,观察淋巴细胞内cAMP水平的变化,以证明cAMP增多的现象发生在淋巴细胞内,并观察cAMP水平的上升幅度与SRBC细胞膜的量之间的关系。2.用酶处理SRBC改变其与E受体的亲和力,以观察玫瑰花形成率与cAMP水平上升的关系。3.玫瑰花形成后,淋巴细胞内cAMP水平变化的时间曲线。

## 一、材料和方法

**1. 猪外周血淋巴细胞的制备** 参考 Escajadillo<sup>[4]</sup> 的方法,猪年龄为9—12个月。新鲜猪血用柠檬酸钠抗凝,聚蔗糖-泛影葡胺(F/H)细胞分离液分离。淋巴细胞纯度>80%,存活率>95%。

**2. SRBC 悬液的制备** 4℃保存的SRBC,临用前经Hanks液洗3遍,配成所需浓

度。

**3. 木瓜蛋白酶及胰蛋白酶处理 SRBC** 分别参照 Escajadillo<sup>[5]</sup> 和 Takeshi Kitao<sup>[6]</sup>的方法进行。处理后的 SRBC 用 Hanks 液配成所需浓度, 1 小时内使用。

**4. SRBC 细胞膜的制备** 将经过洗涤的压积 SRBC 加蒸馏水使之裂解, 4℃ 10000rpm 离心 30 分钟后, 弃去上清, 沉淀物即为红血球的膜片。用 Hanks 液配成含破碎红血球数为  $8 \times 10^{10}$ /毫升、 $4 \times 10^{10}$ /毫升以及  $2 \times 10^{10}$ /毫升的悬液。

**5. 淋巴细胞与完整 SRBC (经酶处理的或未经酶处理的) 作用** 按照本研究室的方法<sup>[3]</sup>进行。细胞内 cAMP 的提取参照 Albano 的方法<sup>[7]</sup>。

**6. 玫瑰花形成后 cAMP 水平变化的时间曲线的测定** 在 10 个小瓶内各加淋巴细胞悬液( $2 \times 10^7$ /毫升) 0.1 毫升和经木瓜蛋白酶处理的 SRBC ( $2 \times 10^9$ /毫升) 0.1 毫升, 分别于玫瑰花形成后的 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30 分钟以及 1, 4, 8 小时提取 cAMP 进行测定(样品制备方法同前)。

**7. 淋巴细胞与 SRBC 细胞膜作用** 参考 Taniguchi 的方法<sup>[8]</sup>, 将淋巴细胞 ( $2 \times 10^7$ /毫升) 0.1 毫升与 SRBC 细胞膜悬液 0.05 毫升在小瓶内混合, 37℃ 水浴 5 分钟, 再置 4℃ 冰箱内 25 分钟, 然后提取 cAMP 进行测定(方法同前)。

**8. cAMP 的放射免疫测定** 根据徐英杰<sup>[9]</sup> 等方法改良。将 <sup>3</sup>H 标记 cAMP 和标准品 cAMP (或样品) 各 100 微升在试管内混合, 加入乙酰化试剂 8 微升使之乙酰化以提高与抗 cAMP 抗体的亲和力。再加入兔抗 cAMP 血清 100 微升, 0°—4℃ 水浴 4 小时后, 用醋酸纤维微孔滤膜分离结合的和游离的 cAMP, 将膜片置闪烁瓶内作固相测定(Beckmen LS 7000 型液闪仪)。

**9. E 玫瑰花形成百分率的测定** 按照 Smith 等的方法进行<sup>[10]</sup>。

本项研究中 cAMP 的上升值, 用实验减对照的差值来表示。制样和测定的总误差为 4—7% ( $CV = \frac{SD}{\bar{x}}$ )。

## 二、结 果

淋巴细胞与未经酶处理的 SRBC 作用后, cAMP 的上升值为  $0.52 \pm 0.78$  pmol/ $10^6$  细胞; 与含有  $8 \times 10^{10}$ /毫升裂解红血球的 SRBC 细胞膜作用后, cAMP 的上升值为  $3.12 \pm 2.22$  pmol/ $10^6$  细胞。两者有显著的差异 (*t* 检验,  $P < 0.05$ , 图 1)。

淋巴细胞分别与含裂解红血球浓度为  $8 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$  和  $2 \times 10^{10}$ /毫升的 SRBC 细胞膜作用后, cAMP 的上升值分别为  $2.26 \pm 1.22$ 、 $1.24 \pm 0.94$  和  $0.66 \pm 0.52$  pmol/ $10^6$  细胞 ( $P < 0.01$ , 表 1)。

淋巴细胞与经木瓜蛋白酶处理的、未处理的及经胰蛋白酶处理的三种 SRBC 作用, 玫瑰花形成率为  $48 \pm 13\%$ 、 $24 \pm 9\%$  和  $8 \pm 5\%$ ; cAMP 的上升值分别为  $3.82 \pm 3.64$ 、 $1.72 \pm 2.42$  和  $0.70 \pm 1.98$  pmol/ $10^6$  细胞。玫瑰花形成率之间和 cAMP 上升值之间均有显著差异(随机区分组方差分析  $p < 0.05$ , 表 2)。

共观察了 5 只猪的淋巴细胞形成玫瑰花后 cAMP 水平变化的时间曲线(图 2)。尽管这 5 只猪的 cAMP 上升值的水平各不相同, 但上升的起始时间(1 分钟以内), 达到高峰的时间

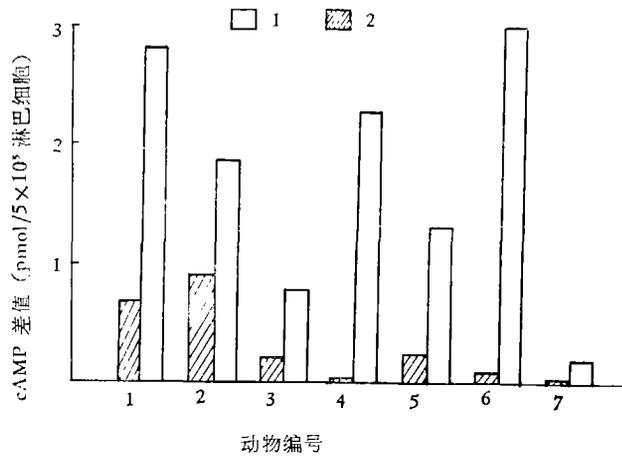


图 1 猪淋巴细胞分别与完整 SRBC 及高浓度 SRBC 细胞膜作用后 cAMP 上升幅度的比较 (1. 与高浓度 SRBC 细胞膜作用的, 2. 与完整 SRBC 作用的)

表 I 淋巴细胞与三种浓度的 SRBC 细胞膜作用后 cAMP 的上升值 (实验减对照的差值)

标本编号	cAMP 差值 (pmol/10 <sup>6</sup> 细胞)		
	SRBC 细胞膜浓度		
	8×*	4×	2×
1	2.50	0.56	0.26
2	0.96	0.46	0.30
3	3.84	2.50	1.36
4	1.76	1.40	0.70
$\bar{x} \pm SD$	2.26 ± 1.22	1.24 ± 0.94	0.66 ± 0.52
P		<0.01	

\* 表示该浓度的悬液中含裂解红血球 8×10<sup>10</sup>/毫升。

表 2 淋巴细胞与经木瓜蛋白酶处理的, 未处理的和经胰蛋白酶处理的 SRBC 作用后, cAMP 的上升值(实验减对照的差值)及玫瑰花百分率

标本编号	cAMP 差值 (pmol/10 <sup>6</sup> 细胞)和玫瑰花百分率					
	SRBC 种类					
	木瓜蛋白酶处理的		未处理的		胰蛋白酶处理的	
1	0.70	57%	0.30	30%	0.20	10%
2	1.64	56%	0.34	26%	0.04	12%
3	3.20	62%	0.60	38%	0.54	19%
4	2.44	62%	1.24	28%	0.94	9%
5	4.04	41%	1.34	16%	0.64	5%
6	4.00	36%	0.70	20%	2.30	3%
7	2.00	27%	1.66	8%	0.00	3%
8	12.40	42%	7.60	28%	1.00	6%
$\bar{x} \pm SD$	3.82 ± 3.64	48 ± 13%	1.72 ± 2.42	24 ± 9%	0.70 ± 1.98	8 ± 5%
P			<0.05			

(10 分钟)以及降至对照水平的时间(约 8 小时)是完全一致的。

在实验中还发现,猪淋巴细胞内 cAMP 的含量以及与 SRBC 作用后, cAMP 水平的上升幅度均有很大的个体差异。SRBC 内 cAMP 含量极微 ( $0\text{pmol}/5 \times 10^7\text{SRBC}$ )。

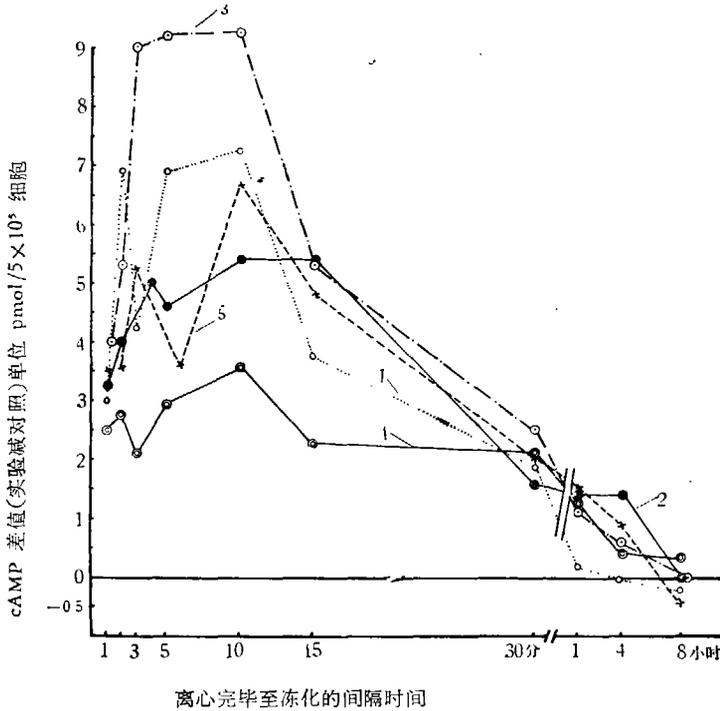


图 2 E-玫瑰花形成后猪淋巴细胞内 cAMP 上升的时间曲线

### 三、讨 论

淋巴细胞与 SRBC 细胞膜作用后, cAMP 水平明显升高。这证明玫瑰花形成后, cAMP 含量增多的现象发生在淋巴细胞内。当所用的 SRBC 细胞膜浓度改变以及玫瑰花形成率发生变化时,淋巴细胞内的 cAMP 水平上升幅度亦随之发生相应的变化,尽管有较大的个体差异,但这一趋势是肯定无疑的(提示 cAMP 的增加量与 E 受体和 SRBC 之间结合点的数量有关)。

淋巴细胞与 SRBC 形成玫瑰花之后, cAMP 的水平发生了有一定时间规律的变化,这一过程与 Smith 等<sup>[11]</sup>报道用植物血凝素 (PHA) 刺激淋巴细胞后 cAMP 水平变化的过程相仿。由于猪淋巴细胞与 SRBC 混合经 200 克离心后 1 分钟至 8 小时,玫瑰花形成率基本无改变,故可认为玫瑰花形成后淋巴细胞内 cAMP 含量的变化过程并不是玫瑰花形成率随时间的变化而造成的。

E 玫瑰花试验尽管已广泛应用多年,但其生物学意义至今仍是个体之谜<sup>[12,13]</sup>。有些研究者发现玫瑰花形成细胞的形态,对 PHA 等刺激的反应性及天然杀伤能力均有改变,提示 E 受体可能是有功能的<sup>[14-17]</sup>。我们的实验结果支持了这类假说,而且提示玫瑰花形成后淋巴细胞的功能改变有可能是与 cAMP 的第二信使作用有关系,从而为深入探讨 E 玫瑰花形成的生物学意

义提供了新的线索。

致谢：赖业馥同志为我们提供了<sup>3</sup>H 标记 cAMP 和标准 cAMP，徐英杰、刘伯春同志提供了免抗 cAMP 血清，谨此致谢。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Galant, S. P., et al., *J. Immunol*, **114**(1975), 512
- [ 2 ] Chisari, F. V., et al., *J. Exp Med.*, **140**(1974), 1122.
- [ 3 ] 石镜等, 自然杂志, **3**(1980), 6:478.
- [ 4 ] Escajadillo, C., et al., *Int. Arch. Allergy appl. Immun.*, **28**(1975), 261.
- [ 5 ] Escajadillo, C., et al., *Int. Arch. Allergy. appl Immun.*, **49**(1975), 325.
- [ 6 ] Takeshi, Kitao, et al., *J. Immunol*, **117**(1976), 310.
- [ 7 ] Albano, J. D. M. & Barnes, G. D., *Analytical Biochemistry*, **60**(1974), 130.
- [ 8 ] Tanguchi, N., et al., *Clin. exp. Immunol*, **24**(1976), 370.
- [ 9 ] 徐英杰等, 全国 cAMP 放射免疫测定学习班材料. 1980.
- [ 10 ] Smith, R., et al., *J. Immunol. Method*, **8**(1975), 175.
- [ 11 ] Strom, T. B., et al., *Progress in clinical Immunology* (Ed. Robert, S. Schwarts), 1977
- [ 12 ] Thaler, M. S., 医学免疫学, 肿瘤研究所免疫室译, 1977.
- [ 13 ] Howard, F. D., et al., *J. Immunol* (in press).
- [ 14 ] Polliack, A., et al., *J. Exp. Med.*, **140**(1977), 146.
- [ 15 ] Lin, P. S., et al., *Science*, **184**(1974), 1300.
- [ 16 ] Eva-Lotta Larsson, et al., *Eur. J. Immunol*, **8**(1978), 693.
- [ 17 ] Lopez-botet, M., et al., SRBC-rosette Formation Influences Several Immunological Functions of Human Teells, Unpublished dat.