

淋巴细胞抑裂素的理化性质及生物活性研究

江水 金以丰 张鹤云 王石泉 汤国枝 邵启祥¹

(南京大学生物化学系, 南京 210093; 镇江医学院免疫室, 212001)

摘要 本文以猪胸腺为原料, 经超滤、Biogel P-4凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-25离子交换层析、Sephadex G-10过滤、HPLC分离等步骤, 得到分子量小于3000的多个组分, 对其中二个组分测定了N端序列。该抑裂素除可抑制Con A刺激的淋巴细胞对³H-TdR的掺入之外, 体内可抑制机体对异源蛋白的免疫应答反应, 延迟异体移植皮肤的存活时间, 还可抑制大鼠同种异体心肺联合移植引起的排斥反应。鉴于抑裂素具有种族非专一性, 组织专一性, 非细胞毒和作用可逆性等特点, 用于治疗自身免疫性疾病, 皮肤移植和器官移植时作为抗排异药有很大潜力。

关键词 淋巴细胞抑裂素; 淋巴细胞转化; 皮肤移植; 心肺异位移植; 玫瑰花结形成试验

淋巴细胞抑裂素 (lymphocyte chalone) 是从淋巴细胞中分离得到的具有抑制淋巴细胞分裂, 从而抑制机体免疫反应的自身调节因子。

1960年 Bullough 和 Laurence^[1]发现细胞可能生成一种起负调节作用的内源性抑制物, 它能专一地阻断细胞生长周期, Bullough 将这种抑制剂定名为 Chalone即抑裂素。它具有组织专一性、种族非专一性、作用可逆性和非细胞毒这四大特征。

由于各实验室分离抑裂素的来源、方法和纯度都不一样, 因此关于抑裂素的化学性质报道很不一致, 但至今未见有关抑裂素纯组分的报道。本文以猪胸腺为原料, 通过超滤、凝胶过滤、离子交换层析、HPLC分离等步骤, 得到了几个有活性的多肽组分, 并对其N端序列进行了测定。

淋巴细胞抑裂素不仅对淋巴细胞转化和IL-2的产生有明显抑制作用^[2], 体内能抑制动物的免疫功能, 而且能降低对异源蛋白的应答反应, 延长异体移植皮肤的生存时间, 延长移植心脏的存活时间, 提示淋巴细胞抑裂素作为一种免疫抑制剂有很大的应用潜力。

1 材料和方法

1.1 材料

猪胸腺, 南京肉联厂; Balb/c雄性小鼠, 由南京医科大学动物中心提供; 昆明种小鼠, 由南京大学动物房提供; SD和Wistar雌性大鼠, 由中科院

上海动物中心提供。Biogel P-4, Serva公司; DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-10, Pharmacia公司; 24孔和96孔培养板, Corning Co. Ltd USA; RPMI 1640培养基, Gibco Co. Ltd; 刀豆凝集素Con A, 日本第一化学药品株式会社; ³H-TdR, 上海原子能研究所; 小牛血清(NCS), 浙江轻工业研究所; 胸腺素(Thymic hormone)为江苏泰州生化药厂产品(分子量<13,000)其余试剂均为分析纯或优级纯试剂。

超滤器 Amicon DC-2, HPLC, HP1050 VY-DOC, AC-18反相柱, 蛋白质测序仪, Beckman Co. Ltd, IF-3200型气相测序仪。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量测定 按Lowry的Folin酚法测定^[3], 并以牛血清白蛋白为标准。

1.2.2 淋巴细胞抑裂素的提取、分离、纯化 按李梅^[2]方法进行。

1.2.3 HPLC分离

柱温: 室温

流动相 A 0.01% 三氟乙酸(TFA)水溶液

流动相 B 0.01% CH₃CN水溶液

梯度: 0~5 min A 100%; 5~20 min B 0%~5%; 22~25 min B 5%~100%。

1.2.4 淋巴细胞的转化(淋转)^[4] 取3~4周龄Balb/c雄性小鼠胸腺细胞进行试验, 观察抑裂素对Con A刺激的同位素掺入(以每分钟计数cpm

值表示)。免疫抑制率% = (对照 cpm - 样品 cpm / 对照 cpm) × 100%。

1.2.5 脚垫试验 昆明鼠 26只,一半注射生理盐水,一半注射抑制素 1 mg / 200 μl,隔日一次(ip.)共 2周,用游标卡尺量出小鼠后脚掌厚度,然后在一只脚垫皮下注射 40 μl ConA 溶液 (2 mg / ml),另一只注射生理盐水,24 h 后量出两只脚掌厚度之差。

1.2.6 植皮试验^[5] 取 C57小鼠作受体手术前 4 h 腹腔注射抑制素 0.5 mg / 0.5 ml,以戊巴比妥钠 (130 mg / 20 ml 生理盐水)按 0.1 ml / 10 g 体重进行麻醉,背部去毛,切除直径 0.8 cm 皮肤圆片,同时将 Balb / c小鼠背部直径 1 cm 的去毛皮片植于其上,以石膏绷带固定,术后 24 h 及 d6 再腹腔注射一次抑制素,7 d 后拆除绷带,记录皮片存活情况,再继续观察 7 d。

1.2.7 大鼠同种异体心肺联合移植 按陈忠华方法^[7]进行。

2 结 果

2.1 淋巴细胞抑制素的分离

淋巴细胞抑制素的分离参考李梅的方法^[2],猪胸腺加水匀浆后,酸性抽提,纱布过滤去沉淀,滤液在 80°C 加热 30 min,离心上清液以截止分子量 10 000 的膜超滤,滤液再经截止分子量为 3 000 的膜过滤,滤液浓缩后供 Biogel P4凝胶分离。

2.1.1 Biogel P4凝胶分离 共得 1~ 5 五个组分,活性测定结果见表 1。

Tab 1. Inhibition effect of fractions from Biogel P-4 Chromatography on lymphocyte mitogenic response ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	Concentration of chalone(μg/ml)	cpm	Inhibition rate(%)
RPM I 1640 medium			
(Background)	-	1542± 162	-
thymic hormone	10	3862± 274	- 150. 5
1	10	878± 284	43. 1
2	10	680± 268	55. 9
3	10	1395± 208	9. 5
4	10	750± 70	- 13. 6
5	10	2082± 149	- 35. 0

从表中结果判断 4,5 峰主要具免疫促进作用,免疫抑制活性主要在 1 峰和 2 峰两个部分中。以活性最高的峰 2 作进一步分离。

2.1.2 DEAE-Sephadex A-25层析 将峰 2 浓缩后上 DEAE-Sephadex 柱分离,层析柱以 0.02 mol/L, pH 7.5 的 PBS 平衡,上样后收集峰 I, II

再用含 0.5 mol/L NaCl 的 PBS 洗脱可得峰 III, 三个峰浓缩后进行淋转测活, 峰 I 和峰 II 浓度为 10 mg / ml 时抑制率分别为 52% 和 61%。以峰 II 再作进一步纯化。

2.1.3 Sephadex G-10层析 层析柱为 F1' 88 cm, 峰 II 上样以蒸馏水洗脱, 得 a, b, c 三个洗脱峰。以淋转测定活性主要在峰 a 和峰 b 中, 10 μg / ml 即可抑制淋转 68.45% 和 85.72%, 以峰 b 作进一步纯化。

2.1.4 HPLC高效液相色谱 以 Sephadex G-10 层析所得峰 b 进行 HPLC C-18柱分析, 得到 5 个洗脱峰, 见图 1

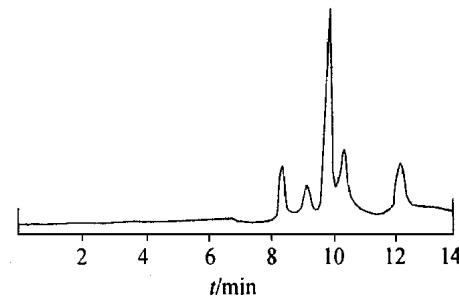


Fig 1. HPLC of pool-b from Sephadex G-10 chromatogram

峰 b 经 HPLC 分离后得到 5 个峰, 将 5 个峰分别浓缩后进行淋转测活, 表明 5 个峰均有活性, 结果见表 2。

Tab 2. Inhibition effect of fractions from HPLC on lymphocyte mitogenic response ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Groups	chalone of concentration (μg / ml)	cpm	Inhibition rate (%)
RPM I 1640 medium (control)		3475± 871	-
P1	10	1920± 70	44. 8
P2	10	1353± 290	61. 1
P3	10	1380± 36	60. 3
P4	10	1563± 92	55. 0
P5	10	1235± 164	64. 5

表 2 结果显示 5 个峰均有明确活性, 但活性均低于分离前的样品峰 b。

2.2 蛋白质序列分析

经 HPLC 分离所得的 5 个峰中以 P3 的含量最高, P5 的含量虽低, 但分离的较好, 干扰较少, 活性也略高, 故而将 P3 和 P5 分别进行序列分析, 结果 P3 的 N 端序列为 Arg-Ser-Glu, P5 的为 Val-Ser。

2.3 抑裂素体外活性

所有用于活性检查的抑裂素均以 Sephadex G-10分离的峰 b为材料

2.3.1 抑裂素对异源蛋白应答反应的抑制 脚垫试验结果为:对照组动物两脚厚度之差为 2.85 ± 0.28 mm,抑裂素组为 2.23 ± 0.24 mm,经统计处理 P 值小于 0.01,差异十分显著。

Tab 3. Inhibition effect of chalone on rejection in heterotopic heart-lung transplantation

Groups	Description	Rejection time (d) of Stop time (d) of heart beat Survival time (d) of the recipient		
		Transplanted heart ($\bar{x} \pm s$)	of transplanted heart ($\bar{x} \pm s$)	the recipient ($\bar{x} \pm s$)
Control	Hair standing on end, without lustre, poor appetite, listlessness	3.80 \pm 0.84	8.2 \pm 1.30	13.20 \pm 2.59
Chalone	Appetite back to normal 3 days after operation, hair retaining lustre, showing great energy	9.02 \pm 1.64 ^{**}	19.60 \pm 5.50 ^{**}	30.00 \pm 1.58

$^{***} P < 0.01$

对照组大鼠在心肺移植手术后 3.8 d 就出现心率减慢等对心脏的排斥作用,抑裂素组至第 9.02 d 才出现排斥现象,对照组 8.2 d 移植心脏停止跳动,并在 13.2 d 死去,抑裂素组到 19.6 d 心脏才停止跳动,大鼠在第 30 d 结束试验时仍然存活,经统计抑裂素组与对照组的差异是十分显著的。动物的生存状况也有很明显差别,对照组动物耸毛,无光泽,弓背,食欲差,精神萎靡,体虚弱;抑裂素组动物在手术后 3 d,食欲恢复正常,毛不耸,有光泽,精神好。

3 讨 论

猪胸腺通过匀浆、超滤、Biogel P4凝胶分离 DEAE - Sephadex Sephadex-G10, 最后通过 HPLC C-18 反相柱分离得到 5 个组分。这 5 个组分均有抑制淋巴转化的活性,但活性均低于分离前 Sephadex G10 峰 b 的活性,因此推测这些组分之间可能有协同作用。至于表现最高活性需要全部 5 种成分或只需其中几种成分尚需研究,这对今后化学合成抑裂素将提供重要参考。我们选择了 5 种成分中含量和活性较高的 P3 和 P5 进行氨基酸序列测定,据前文^[2] 报道抑裂素的分子量在 1000 左右,但结果只能测出 N 端的 2-3 个氨基酸,是否因残留肽段与分析柱的亲和力下降而脱落导致测序不能进行尚待证实。

由于经过 HPLC 分离后的 5 个峰,活性反而比分离前的峰 b 降低,因此所有动物体内外实验均

2.3.2 抑裂素对小鼠植皮排斥反应的抑制 小鼠在手术后 7 d,拆除绷带,观察皮片存活情况,结果发现对照组皮片均干缩坏死,抑裂素组皮片仍存活并湿润柔软,9 d 后对照组皮片脱落,试验组在 14 d 试验结束时皮片仍未脱落。

2.3.3 大鼠心肺联合异位移植试验 试验结果见表 3

用峰 b 进行。动物体内实验不论从经典的脚垫试验到皮肤移植、心肺移植,抑裂素抑制免疫的效果都是十分显著的。据本文的结果推测,本抑裂素主要是抑制细胞免疫,对一些自身免疫性疾病如过敏性支气管哮喘、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合症等应有缓解作用,对皮肤移植、器官移植等可作为抗排异药。据报道^[8],抑裂素对白血病原始淋巴细胞有较强的杀伤作用,故在肿瘤治疗中可以用抑裂素初步治疗,使肿瘤细胞在体内达到同步(G1-S期),然后给予 S 期化疗药物可提高疗效,而抑裂素的作用对正常细胞是可逆的,可以很快摆脱其抑制,我们也观察到抑裂素可明显抑制引瘤动物肿瘤的生长,抑裂素是否还有刺激 NK 细胞生成的作用尚待研究。

在表 1 中我们采用了市售的胸腺素注射液(泰州生化厂),作为阳性参考,因为它的分离方法和本文 Biogel P4 凝胶分离前的步骤是一样的,只是我们在截止分子量 10000 的膜超滤后,再加了一步截止分子量 3000 的膜超滤。已知胸腺素注射液是从猪胸腺中分离的一个分子量 10000 以下的多肽混合物,虽然用淋转方法或玫瑰花结法测活,表现为免疫促进作用。但临幊上却表现具有免疫双向调节的作用,一方面表现为可提高机体的免疫功能,增强抗感染能力,治疗原发性免疫缺陷病,另一方面还具有对系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合症、慢性活动性肝炎等自身免疫病良好的治疗效果,显示胸腺中免疫促进成分与免疫抑制成分并

存,而免疫抑制成分在 MW < 3000的组分中活性最高,较低浓度即表现淋转的完全抑制,而 MW < 3000的部分,主要表现为免疫促进,故而本项研究均从 MW < 3000的组分中分离低分子量的抑裂素。

抑裂素在胸腺中的含量是很低的,因此倚靠提取是很难得到足够的量进行应用的,本文的目的是纯化抑裂素,搞清楚其序列,由于它的分子量在1000左右,可以用化学方法合成一系列肽段,研究其最短的活性肽段,为合成新的免疫抑制剂提供依据。但实验结果却指出经 HPLC纯化后的单一组分,活性远低于其分离前的混合组分,暗示表现最高抑制活性需要二种或二种以上成分的协同作用。因此还需要进一步深入研究,找出最佳组合。再分别研究这些成分的结构,和产生协同作用的机理。

参考文献

1 Bullough W S, Laurence E B. The epidermal mitotic activity in

the mouse. *Proc Roy Soc*, 1960, B151: 517

- 2 李梅,金以丰,等. 胸腺淋巴细胞抑裂素的分离及其性质的研究. *生物化学杂志*, 1997, 13(4): 464
- 3 Lowry O H. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265
- 4 张辉华,陈慰峰. 胸腺肽对成熟T细胞功能的调整作用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1985, 5(4): 217
- 5 Wrigley C W. Gel electrofocusing. In *Methods in Enzymol*. Acad. Press, New York, 1971, 559
- 6 Billingham R E and Medawar P B. The technique of free skin grafting in mammals. *J Exp Biol*, 1951, 28: 385
- 7 陈中华,李锦文,夏穗生.改进的大鼠心脏肺叶异位移植术. *中华器官移植杂志*, 1985, 6(3): 123
- 8 Attallah A M, Houck J C. Cytotoxic effects of splenic ultrafiltrates upon leukaemic lymphocytes. *Br J Cancer*, 1975, 32: 693

Studies on the Properties and Bioactivity of Lymphocyte Chalone

Jiang Shui, Jin Yifeng, Zhang Heyun, Wang Shiqian, Tang Guozhi, Shao Qixiang¹

Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093; Immunology Laboratory, Zhenjiang Medical College, Zhenjiang, Jiangsu 212001

Abstract A partially purified low molecular weight lymphocyte chalone was obtained from porcine thymus by Biogel P-4, DEAE-sephadex A-25 and Sephadex G-10 chromatography. When the partially purified lymphocyte chalone was further separated by HPLC, five peaks were collected. All the five components were active in suppression of mitogen response, but their activities were lower than those partially purified lymphocyte chalone. The partially purified chalone had the capacity to repress the response to heterogenous protein Con A estimated by pad test. Chalone could also markedly prolong the survival period of MHC nonmatched grafted skin in mice from 9 days to 14 days. The results of an experiment of heterotopic heart-lung transplantation were exiting. Wistar rats were treated with chalone for two weeks. The transplant operation took place on day 8. Chalone markedly prolonged the survival time of the transplanted heart increased from 8.2 days of the control group to 19.6 days. On day 30, the final day of the experiment, rats in the test group were still alive, but those in the control group already died on 13.2 days. Because of its low molecular weight and species nonspecificity, the lymphocyte chalone isolated from porcine thymus could hopefully be used as an immunosuppressant in the treatment of autoimmune diseases and in prolonging allograft survival, such as in skin, heart, liver, or kidney transplantation.

Key words Lymphocyte chalone; Skin graft; Mitogen response; Heterotopic heart-lung transplantation