

淋巴细胞亚群的研究

姬云堂 译

李连奋 汪义和 汪震 校

成都军区后勤部军事医学研究所

一九七九年二月

目 录

人类T淋巴细胞亚群（与人脑异种抗血清反应）的鉴定.....	（ 1 ）
活性E玫瑰花结试验——与迟发性皮肤变态反应的关系.....	（ 6 ）
人血中介导病毒感染靶细胞的抗体依赖的细胞	
细胞毒性作用的单核细胞（I）.....	（ 11 ）
一、材料和方法.....	（ 12 ）
二、结果.....	（ 15 ）
三、讨论.....	（ 20 ）
人血中介导病毒感染靶细胞的抗体依赖的细胞	
性细胞毒性作用的单核细胞（II）.....	（ 29 ）
一、材料和方法.....	（ 29 ）
二、结果.....	（ 31 ）
三、讨论.....	（ 37 ）
淋巴细胞介导的细胞溶解机制的研究.....	（ 43 ）
一、材料和方法.....	（ 44 ）
二、结果.....	（ 45 ）
三、讨论.....	（ 51 ）
甲胎蛋白和人类淋巴细胞亚群.....	（ 56 ）
人外周T淋巴细胞抗原的鉴定.....	（ 63 ）

人类T淋巴细胞亚群 (与人脑异种抗血清反应)的鉴定

摘要: 兔抗人胎脑血清经过适当吸收后, 仍与人的T—淋巴细胞的一个亚群发生反应。这种反应性T淋巴细胞的分布因检查的器官而不同: 外周血淋巴细胞的23%; 扁桃腺淋巴细胞的5%; 胸腺淋巴细胞的阳性率不到1%。这种活性细胞用植物血凝素(PHA)或商陆(PW)刺激后不会变形, 但用同种异体细胞刺激至少可以出现很弱的转化。

T衍生的肿瘤细胞(得自一例急性T—淋巴瘤细胞性白血病患者, 两例Sezary氏综合征患者, 五例慢性T—淋巴细胞性白血病患者中的三例)和抗人胎脑血清为阴性反应。相反, 另外两例慢性T—淋巴细胞性白血病患者白血病的细胞出现阳性, 说明只有一种T—淋巴细胞的亚群发生了增生。

好几种动物的T细胞和脑组织都具有共同的抗原结构。Reif氏首先指出Thy1同种异体抗原存在于小鼠的脑中。以后的研究证实, 异种抗脑血清中含有与T细胞的非种属特异性和种属特异性抗原的抗体, 对这些共同抗原决定簇的明确的化学性质的资料已经看到的很少。抗脑的异种血清能抑制许多T淋巴细胞功能, 如在体外与绵羊红血球的自发反应, 移植物抗宿主反应。未经吸收的抗脑组织的异种血清除特异性的抗T细胞外, 还含有对干细胞、肝、红细胞以及肿瘤抗原的抗体。

对人应用抗脑组织的血清鉴定T细胞分化而来的淋巴细胞有些资料是阳性, 有些为阴性。这些相矛盾的资料可以由我们所发现的抗脑组织血清仅能识别淋巴细胞的一个亚群来部分的得到解释。本文报告了和兔抗人胎脑血清发生反应的人类淋巴细胞亚群的鉴定。

方 法

抗人胎脑血清的制备和吸收: 自孕期21周的胎儿取得大脑, 用磷酸盐缓冲盐水磨碎并与Freund's完全佐剂乳化。免疫家兔注射背部几个部位间隔14天, 第二天免疫后7天, 第一次放血分出血清用于全部试验。

抗人胎脑组织血清(Antiserum to human brain简称ABS), 56℃加热30'灭活补体, 用人A B型红血球连续吸收三次, 正常成人的肝吸收三次, 正常人血清用免疫旦白(Ig)链结合于葡聚糖4 B上进行吸收。再进一步用已证实的慢性B淋巴细胞性白血病的淋巴细胞吸收2小时。

抗外周T细胞血清的制备(anti-T serum): 有些实验室用的是兔抗T细胞异种血清。用伴性遗传性无丙种球蛋白血症的实际上即无B细胞的儿童的淋巴细胞制备抗循环的淋巴细胞血清。用 $20-40 \times 10^6$ 个细胞静脉注射免疫家兔, 14天后用相同细胞数加强免疫。加强免疫后七天放血, 吸收的方法同上述ABS, 但需用慢性淋巴细胞性白血病的B细胞吸收七次, 以便除去B细胞的反应的抗体。这种经过吸收的血清在间接免疫荧光敏感度水平上对T细胞显示特异性反应, 它和各种来源的正常淋巴细胞的反应性(见表1)。

表1 ABS和不同器官的正常淋巴细胞的反应性

	ABS ^a	抗T血清 ^a %	表面Ig ^b
外周血淋巴细胞 (10个人的平均数)	23 ^c	78 ^c	12
胸腺细胞 (3人平均数)	≤ 1	95	< 1
扁桃腺淋巴细胞 (4)人平均数)	5	50	48

(1) 间接免疫荧光法检查。

(2) 直接免疫荧光法检查。应用抗 μ 、 γ 、 α 、 β 、 κ 、 λ 链的单价特异血清, 结果以 κ 和 λ 阳性细胞总数来表示。

(3) 表面Ig阳性细胞和ABS血清反应阳性细胞或者双标记试验中抗T血清反应阳性的细胞之间没有重叠。

和ABS反应的淋巴细胞确认, 细胞毒试验: 用二步细胞毒检验法检验正常周围血的淋巴细胞。取倍比稀释的血清0.01ml加入经Ficol—Hypaque梯度离心自血液纯化的 7.5×10^6 /ml的淋巴细胞悬液0.01ml, 置 $37^\circ\text{C} 30'$ 。用含2%胎牛血清的Hank's液0.3ml洗后加入预先经过正常人白细胞充分吸收的正常兔血清0.01ml作为补体来源, 再置 $37^\circ\text{C} 30'$ 。用台盼兰拒染法(Trypan blue exclusion)检查活细胞的百分比。

膜免疫荧光染色法: 用间接免疫荧光法, 用双层罗丹明结合牛IgG(简称SARG), 是由羊抗兔IgG血清提纯出来的。这种结合物是经过人的IgG固相以及人的淋巴细胞吸收的。我们实验室应用的作为检查悬液中的活细胞膜的荧光法, 以及为了确认标记细胞的罗丹明结合物的方法, 前已报导过。不管是否预先曾用正常兔血清培养过的正常淋巴细胞都不能被SARG所染色。除非另有说明, 一般都是应用1:4稀释的ABS, 因为该血清与正常血中淋巴细胞的滴度曲线的最高终点是1:16。

为了确定正常血液当中和ABS反应的淋巴细胞的来源进行了双标记试验: (1) 第一步用荧光素结合人IgG浓度为1—2mg/ml用以对淋巴细胞染色作为B细胞的标志, 或者用荧光标记山羊抗人Ig的血清, 这种血清和绵羊或兔的Ig不起交叉反应。将细胞洗三次后再用ABS和SARG按上法染色; (2) 淋巴细胞与ABS血清混合置 $4^\circ\text{C} 30'$ 。冲洗再

用SARG染色,将细胞洗三次并试验和绵羊血球形成玫瑰花结或“活性”玫瑰花结的能力。另一方面形成玫瑰花结或“活性”玫瑰花结的淋巴细胞是经过Ficoll Hypaque梯度离心纯化,红血球溶解后用ABS和SARG染色的淋巴细胞。

各种细胞群:自血液、淋巴结、扁桃腺细胞分离淋巴细胞的方法前已报导。胸腺细胞得自进行心脏外科手术的2—14岁病人。

外周血的淋巴细胞用非特异性的有丝分裂原〔植物血凝素(PHA)或商陆(P.W)]刺激或者用同种异体细胞按照Sasportes等人方法进行刺激,在培养3天和5天后分别检查氟胸腺嘧啶最大摄取量。

从两株已确定的B组细胞系来的(Daudi and Raji)淋巴母细胞试验了和ABS的反应性。取自各种血液病的肿瘤细胞用间接免疫荧光进行了研究。增生性细胞带有T或B细胞的选择性膜标记的特性已报告过。4例患B细胞分化的慢性淋巴细胞性白血病(ALL,这些病例的母细胞缺少可见的B和T细胞膜的标志)和1例患急性骨髓细胞性白血病(AML);8名病人患有T细胞淋巴增生性病,是用E玫瑰花结试验和用抗循环血中T细胞血清或抗胸腺细胞血清检查出来的。这组病人包括1例T—衍生的ALL,两例Sezary氏综合症,5例T衍生的CLL。后面病例的特征只有用别处已经报导过的特殊的血液学和免疫学方法才能查出。

结 果

吸收试验:在细胞毒试验中未吸收的ABS和所有外周血淋巴细胞以及慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的细胞都发生反应。用人的红细胞、肝、血清和Ig吸收后,CLL的细胞不发生反应,仅只25%的外周血淋巴细胞被杀死,然而用更敏感的间接免疫荧光技术75%血中淋巴细胞以及两例证明是B细胞性慢性淋巴细胞性白血病患者几乎全部细胞仍然是阳性。

ABS进一步用慢性淋巴细胞性白血病的B细胞吸收两次,这时对正常淋巴细胞的细胞毒检查为阴性,但用间接免疫荧光染色检查10个不同个体血,平均有23%淋巴细胞仍为阳性,其滴度可达1:16(14—30%的范围)。细胞悬液中的单核细胞是根据相差显微镜下形态学标准确定的。两个试验中,涂片用过氧化酶染色不象是属于单核细胞丛的阳性细胞,以后的实验用1:4稀释的ABS作荧光检查。

ABS对淋巴细胞亚群的特异性:两种不同的双标记实验方法用于外周血淋巴细胞的检查,首先用荧光试剂(抗-Ig或IgG凝聚物)使淋巴细胞染色以便确认B淋巴细胞,以后再用和罗丹明结合的ABS反应。ABS染色的细胞和B细胞两者之间没有发现重叠现象。

反应细胞属于T细胞,是用玫瑰花结试验直接检测出来的。淋巴细胞和ABS及SARG预先培育后,试验自发玫瑰花结形成细胞观察ABS阳性的RFC;进一步试验将RFC用Ficoll—Hypaque梯度分离后,用ABS及SARG染色,1/3 RFC是阳性反应。

似类的一些试验是用所谓“活性”玫瑰花结形成细胞做的,这些试验被ABS染色的不到1%。

反应的T淋巴细胞的百分比因T淋巴细胞的来源和应用的纯化方法而不同,在4个不同个体扁桃腺中发现阳性细胞的平均数为5%,在3个试验中用尼龙浓缩的外周血T淋巴细胞和ABS反应的阳性率平均为13%。

ABS和活化的淋巴细胞的反应性: (表2)在含有PHA或PW中培养3天的细胞用ABS或抗外周血T细胞血清染色。在PHA试验中85%的细胞大部分是已转化的大细胞,他们当中仅只1—2%ABS阳性,而90%是抗T细胞血清阳性。大部分未能转化的的小淋巴细胞是T细胞,因为仅只5%是lg阳性的B淋巴细胞,而90%和抗T淋巴细胞血清发生反应。35%未转化的的小淋巴细胞和ABS仍然是阳性反应。在PW试验中,26%的巨型转化细胞具有B细胞特征,76%是抗T细胞血清阳性而仅只1%和ABS阳性。相反在其余的小淋巴细胞当中27%可被ABS染色。用照射过的同种异体的细胞刺激的淋巴细胞培养5天后进行研究,87%的母细胞被抗T血清染色和仅是少数的小淋巴细胞被ABS染色。

表2 ABS和被刺激的淋巴细胞的反应性

	ABS ^a	抗T血清 ^a %	表面lg ^b
PHA刺激的血中淋巴细胞			
大细胞 (85%)	1	90	3
小细胞 (15%)	35	90	5
PW刺激的血中淋巴细胞			
大细胞 (41%)	1	76	25
小细胞 (59%)	27	56	6
用同种异体细胞刺激血淋巴细胞			
大细胞 (50%)	7	87	8
小细胞 (50%)	7	67	3

(1) 间接免疫荧光法。

(2) 直接免疫荧光法: 应用抗 α 、 γ 、 $\alpha\delta$ 、 κ 和 λ 链的单价特异性, 结果以 κ 和 λ 阳性淋巴细胞的总数来表示。

ABS与淋巴母细胞系细胞及白血病细胞的反应性: ABS对两个淋巴母细胞系以及B细胞性慢性淋巴细胞性白血病, 非T及非B急性淋巴细胞性白血病或急性骨髓细胞性白血病的患者的白细胞不能染色。在T细胞衍生的恶性肿瘤病人组中, Sezary症或T细胞性急性淋巴细胞性白血病的细胞也和ABS不发生反应。两例T细胞性慢性淋巴细胞性白血病病人的大部分增生细胞(>80%) 和ABS是阳性反应, 而另外三例T细胞性慢性淋巴细胞性白血病人的细胞则无反应。

讨 论

与在啮齿类动物中得到的阳性结果相反, 一些研究者用人脑免疫家兔未能引出抗T

细胞的抗体。根据脑能吸收兔抗人T细胞的抗体的吸收试验,间接证明人脑和T细胞之间有交叉反应。Greaves和Brown氏自6只用人脑免疫的家兔中有3只得到特异性抗T细胞抗体。他们强调为了证实这种反应需要敏感的间接免疫荧光方法,他们的血清对胸腺细胞和2/3的循环T细胞反应很微弱,而对正常血液中另1/3的淋巴细胞明显染色,这些明显染色的阳性细胞可能就相当于本研究所确认的T淋巴细胞亚群。

被ABS所证实的T淋巴细胞亚群具有如下特性,它约占血中T淋巴细胞的1/3,这些T细胞属于RFC群但不属于能够形成A—RFC亚群。反应细胞大部分都能被尼龙滤过所阻留,这种T淋巴细胞亚群仅占扁桃腺T淋巴细胞的10%,而在胸腺中根本没有。血液T淋巴细胞由于PHA或PW刺激转化成的母细胞和ABS没有明显反应,看来ABS阳性细胞对PHA或PW即使有反应也是很微弱的,大概是淋巴细胞在转化过程中失去了和ABS的反应性。相反,在被同种异体淋巴细胞活化的细胞中和ABS反应细胞占的百分比相当低(7%)。在这些观察中,最明显的就是ABS和胸腺细胞根本没有反应性,因为在啮齿类动物的脑和胸腺都有Thyl抗原,也许还有附加的抗原决定簇。其次就是这些否定的结果和早先用抗人脑血清得到的结果不一致,这些矛盾可能是由于我们吸收应用的是早期放血的,或者由于我们免疫所用的人脑是人胎脑,因为人胎脑中沒有thyl抗原。

解释肿瘤细胞和抗脑血清的反应性时,必须慎重,因为这些抗血清可能含有干细胞和各种肿瘤细胞相关抗原的抗体。我们用不同类型的增生细胞得到的结果,进一步证实ABS仅和T淋巴细胞的一个亚群发生反应。患有各种恶性T细胞衍生的病人的增生性细胞(Sezary's综合症,T衍生的急性淋巴细胞性白血病,T细胞性慢性淋巴细胞性白血病5例当中的3例),以及非T细胞衍生的白血病细胞同样和抗血清没有发生反应。相反自两例患有T衍生性慢性淋巴细胞性白血病患者所有增生细胞都得到阳性结果。这一发现为这些T细胞增生的同源性提供了第一个线索,虽然小鼠和人的T淋巴细胞亚群的各种功能已经勾划出来了,但和ABS发生反应的T淋巴细胞亚群的功能特性现在仍不清楚。初步资料说明,阳性反应的细胞在PHA刺激下不能转化,但对同种异体细胞有很弱的反应性。同质的T淋巴细胞群发现于白血病患者或者提供一个有益的模型,以便说明能够和ABS反应的这些淋巴细胞的真正功能。

译自 The Journal of Immunology Vol.116No4.

April 1976 (英文) 姬云堂译 李连奋校

附:本文所用缩写字注释

ABS: 抗人脑血清。

SARG: 羊抗兔IgG血清。

CLL: 慢性淋巴细胞性白血病。

ALL: 急性淋巴细胞性白血病。

FRC: 玫瑰花结形成细胞。

AML: 急性骨髓样白血病。

PHA: 植物血凝素。

PW: 商陆。

活性E玫瑰花结试验—与迟发性皮肤变态反应的关系

摘要：外周血液活性T淋巴细胞亚群，其特性是快速与羊血球形成玫瑰花结（5分钟），用于检查曾被微生物抗原作皮肤试验的正常人，活性玫瑰花结形成细胞（简称A—RFC）明显增高的全都是迟发性皮肤变态反应阳性者。反之，皮肤试验阴性者没有显示出A—RFC明显的增高。和T细胞总数，较长时间（50'）才与羊血球形成玫瑰花结，或是用免疫荧光法测定表面免疫球蛋白的B细胞没有相同的特性。在时间上A—RFC和迟发性皮肤变态反应（DCH）显示出相平行的关系，但不表现在强度上。这一结果表明体内T淋巴细胞亚群在生物化学特性上的根据，以及看到A—RFC属于免疫活性细胞。

免疫系统从功能上可分为两个主要部分：B淋巴细胞的体液免疫系统（不依赖胸腺的）和T淋巴细胞免疫系统（依赖胸腺的）。近年来由于实验技术的进展，发现每一细胞型表面具有特有的标志，用于T细胞和B细胞的分类和计数，从而促进了淋巴细胞亚群的研究。外周循环的B淋巴细胞表面有免疫球蛋白，补体的受体，抗原抗体复合物以及凝聚的免疫球蛋白G（IgG）。人类T淋巴细胞计数可用抗胸腺细胞血清免疫荧光法；也可用能与羊红血球（SRBC）形成玫瑰花结的方法。Wybran及其同工最近测定T淋巴细胞亚群具有对羊红血球高度亲和力的受体，这些孕育5'后和羊红血球自发形成玫瑰花结的淋巴细胞不同于孕育60'形成玫瑰花结的T细胞总数（T—RFC），这种快速结合的淋巴细胞称做活性玫瑰花结形成细胞（Active Rosette—Forming cell简称A—RFC），应用其他人建立的体外和体内的技术检测外周循环血液的A—RFC的百分率，Wybran氏及其同工认为可以反映病人的细胞免疫状况。对照观察许多例的T—RFC检查结果不一定能反映机体的免疫状况。

本文研究的目的在于探讨健康成人体内T细胞A—RFC亚群和其他淋巴细胞亚群相比在动力学上的特点。为此，我们检测了应用微生物抗原引起迟发性皮肤变态反应后外周循环血液中淋巴细胞亚群的变化，在那些曾经做过皮肤试验的人群当中我们发现迟发性变态反应阳性者的外周循环血液中A—RFC的数量和百分率都有升高。

材 料 和 方 法

研究对象：这次研究的志愿者是健康成人，年龄19~52岁。全是美国军事医学传染病研究院的工作人员。用纯旦白衍生物（PPD）试验的人群，主要是猴子饲养人员，他

们处于感染结核病的危险当中,并且都被列入该院结核管理范围之内,他们是隐性的结核病人,每三个月用中间强度PPD皮试一次。淋巴细胞取自4名对第二强度PPD反应阴性中的3人,在试管内用PPD对淋巴细胞进行刺激,但没有发生转化现象(M.S. Ascher,未发表材料)。作为土拉伦斯皮肤试验的人群是在曾经接种过土拉伦斯活菌苗的基础上挑选的;4人是在进行研究前2、6、15、15年接种过的;4人当中有3人查出土拉伦斯凝集抗体,效价在1:80或更高,另外1人的效价低于1:20;没有接种过菌苗的人其效价低于1:20。

皮肤试验和实验设计:皮试抗原用中等强度的PPD结核菌素(5单位/0.1ml, Parke-Davis, Detroit, Mich. 1批),第二强度PPD结核菌素(250单位/0.1ml, Connaught 实验室, Ltd. Toronto, Canada. 批号15024-1), Foshay土拉伦斯皮试抗原(1:1,000 希释酚杀死的无毒菌苗,由Dr Henry Elgelsdch USAMRII供给)。皮试抗原注射于前臂掌侧皮内,于24'、48'、72小时读取结果,将红斑和硬化范围进行记录,如硬化直径在5 mm以上可以认为属于阳性结果。

受试者皮试前连续两天和试验的当天采血,以建立每个人三天的淋巴细胞亚群的正常值。皮试后从那些受检者在第1~4天和第7天采血,进行白血球分类计数检查。每个受试者在皮试后用下面叙述的方法检测T细胞和B细胞的百分率,以便和他自己的三天正常值相比较。对所有受试者顺序观察每天在正常范围内的变化,求出共同标准差A—R F C是2.6%, T—R F C是5.6%, B淋巴细胞是3.4%(变异数一致性测验 one-way analysis of variance)。所有以后的观察和三个正常平均值的标准差相差在0.01水平时被认为有统计学上的意义,对B细胞和T细胞的绝对数进行了检查,但因和百分比值紧密的相平行,而在文中未加叙述。

淋巴细胞分离:空腹静脉血收集在无菌的含有防腐剂的肝素(15单位/ml)的真空管中,用生理盐水1:1希释外周血的淋巴细胞分离用分层法将全部希释血液置入等量的Ficoll-Hypaque中,远沉400×G室温下30'。收集淋巴细胞层,用10毫升HEPES的Hank's缓冲液(pH7.2)洗三次,最后浓缩成为 3×10^6 个细胞/ml,用台盼兰排除试验鉴定活细胞数,应多于95%。

绵羊血球:每周采取羊红血球,保持新鲜,用Alsever's液希释成50%血球悬液保存于4℃,应用当天取一部分用HEPES缓冲Hank's液洗后调整浓度至试验所需。

胎牛血清:胎牛血清(Fetal Calf serum简称FCS. Renheis. Armour. Lot m 27904)加热灭活56℃60',再用SRBC在37℃和4℃吸收。用于检查活性玫瑰花结时,胎牛血清还要再用人血球于37℃和4℃进行吸收。

活性玫瑰花结形成细胞(A—R F S):每次试验取 3×10^6 细胞/ml淋巴细胞混悬液0.25ml,胎牛血清0.25ml,37℃水浴30',水浴后加入羊红血球0.25ml(调整浓度为 12×10^7 羊红血球/ml,使最终浓度为40个羊红血球/1个淋巴细胞),将标本远沉200×G室温下5',立即加入1滴Toluidine blue,立即用9吋巴斯德滴管轻轻的迅速上下吸吹四次小团块。为了避免混匀小团块的悬液拖延时间,每次仅只操作六个试管。立即将细胞混悬液放入血球计算池,在放大100倍下检查。如有三个以上的羊红血球吸附在表面

的淋巴细胞即可认为是A—R F C。每一样品计数不得少于200个淋巴细胞。每一标本重复三次,同法计算每一样品的标准差。

总数玫瑰花结细胞 (Total rosette-forming cells简称T—R F C): 取等量的 (0.25ml) 淋巴细胞混悬液和小牛血清, 置37℃水浴10', 再加入0.5%羊红血球悬液0.25ml。然后200×G室温下远沉5', 放置室温60'。细胞团的混匀和检查三次如上所述。

免疫荧光染色: 外周B淋巴细胞计数用涂片免疫荧光检查表面免疫球蛋白(S—Ig)的方法。特异性的兔抗人各种免疫球蛋白重链的多价血清, (IgG、IgA、IgM) 用异硫氰酸荧光素标记, 1:10稀释后应用。取淋巴细胞混悬液(10^8 /ml) 0.1ml加入荧光标记抗血清0.1ml置4℃30'; 细胞用磷酸盐缓冲液(pH7.4)洗三次, 用AO spencer荧光显微镜检查, 每一标本计算200个淋巴细胞。

结 果

这项研究之前, 检查60个正常男性成人作为对照组, 以便求得外周循环淋巴细胞三种亚群正常值基线。其平均百分比±标准差是: A—R F C = 28.1 ± 3.3 ; T—R F C = 66.7 ± 5.5 ; S—Ig = 29.3 ± 4.0 。对20例采血一周没有发现他们的淋巴细胞亚群每天有明显的变化。

我们首批检查A—R F C用中等强度的PPD作皮肤试验, 共7人, 已知其中4人对中等强度的PPD是阳性3人是阴性, 如所期望的那样, 证实4例皮肤迟发性反应是阳性, 另外3例是阴性。然而两组的A—R F C都表现了明显的升高, 皮试阳性组的A—R F C在1~2天内上升达高峰, 而皮试阴性组A—R F C上升要晚一天才达高峰。T—R F C的百分率表现不相一致的变化表明和受检者的敏感性没有连系。该组受试者没有测定B细胞。对中等强度PPD表现为阴性的三例以后用第二强度PPD复查, 三例全都变成迟发性皮肤变态反应阳性。说明先用5单位结核菌素对这些敏感者引起迟发性变态反应的强度不够。

我们进一步希望查明真正PPD阴性的人, 对中等强度PPD为阴性的9例受检者, 再进一步用第二强度的PPD以及他们的淋巴细胞动力学进行检查, 9人当中有5人迟发性变态反应阳性, 4人阴性, 仅只在阳性组的A—R F C前三天出现明显的升高。研究过程中T—R F C和B细胞的百分比在任何一个皮试组均未看到具有重要意义的变化。

第三项研究是应用土拉伦斯抗原进行的。四名曾经接种过土拉伦斯菌苗的受试者, 对土拉伦斯抗原皮试是阳性反应, 而五名未曾接种过菌苗的人皮试为阴性。皮试阴性组的A—R F C表现明显上升, 而阴性组却没有上升。同样, T细胞总数和B细胞的百分比都没有看到相一致的变化。

讨 论

一些报告证实病人的A—R F C水平降低是由于细胞调节免疫功能低下。本文研究的结果表明: 用皮试抗原刺激健康人的细胞免疫调节系统以后, A—R F C有明显的上

升, 这些结果也证实了Wybran氏及其共同工作者和yu氏的发现: A—RFC 虽然是总数玫瑰花结细胞 (T—REC) 的一个亚群, 但可以不依赖于T—RFC 的变化, A—RFC 和T—RFC 的细胞表面膜是有区别的, 这就有力的支持了A—RFC 是T淋巴细胞中性质不同的一个亚群。

许多关于T细胞和B细胞临床方面的研究, 对T—RFC 和B细胞总数进行了评价, 相对的较少注意淋巴细胞亚群A—RFC 方面, 可能或者是由于这方面的试验技术上的困难。由于进一步关于A—RFC 的研究所积累的证据表明, 循环的A—RFC 百分率密切的反应了病人细胞免疫的程度。发现有些病人虽然他们的T—RFC 可能是正常范围, 但A—RFC 水平表现明显降低时, 仍然可以认为属于细胞免疫调节功能低下, 当这类病人应用转移因子治疗以后, 在出现临床的和免疫学的效果的同时, 也证明A—RFC 有所上升, 这些病人A—RFC 上升时, 淋巴激活素、游走抑制因子(MIF) 和迟发性变态反应也发生相应的反应; 对比看来, 体液免疫缺陷的病A—RFC 水平正常。另外一些观察认为表现在肿瘤病人的T细胞功能降低不一定反应在T—RFC 上面, 但能被反应在循环的A—RFC 水平上。

近年来一些研究者报告A—RFC 降低出现在系统性红斑狼疮, 慢性marihuana吸食者, 正在进行利福平 (rifampin) 治疗的结核病人, 乙醇中毒性肝硬化病人, 所有这些临床情况, 据已有的资料报告, 经过检测至少一种或几种细胞免疫调节功能有所下降, 试验当中A—RFC 的变化与T—RFC 无明显关系。

结核菌素PPD和杀死的土拉伦斯菌是通常被选作研究用的两种皮肤试验抗原, PPD 选用因为是一种适于表现临床皮肤试验特性的抗原, 而且许多人在自然条件下已经接触过这种抗原并具有敏感性, 土拉伦斯被选用是因为自然条件下对这种微生物很少接触。因而使我们对土拉伦斯菌素阴性反应能够完全相信, 在USAMRIID 实验室工作的全体人员因为他们已经进行过土拉伦斯活菌苗接种, 对土拉伦斯已有敏感性, 所以可用于这次试验, 土拉伦斯皮试抗原是安全的, 并能有效的引起曾经接种过菌苗的人发生阳性反应。土拉伦斯的研究中发现, 仅只应用常用剂量的土拉伦斯抗原引起DCH阳性反应的人A—RFC 出现上升。在PPD研究中A—RFC 升高者当中有三例对常规中等剂量的PPD (5单位) 没有出现皮试阳性。他们对结核菌素看来是敏感的, 因为他们对250单位PPD表现阳性反应。可以认为: A—RFC 是高度敏感的, 比较用低剂量的PPD对分枝杆菌抗原先前已经致敏性测定的一种较好的指标。虽然PPD皮试后, A—RFC 上升表现出免疫学的特异性, 但是A—RFC 试验用于临床结核病的诊断可能是过分敏感了, 因为大量的人群已经被分枝杆菌致敏过。在我们的PPD研究的人群中, 研究证实16名中有12名应用第二强度的PPD皮试后出现DCH阳性A—RFC 升高证明他们对分枝杆菌是原先致敏的。在我们的志愿者中对PPD致敏占高度优势的情况和Bardana及其同工的报告相一致。用定性和定量抗体结合方法证明广泛的存在对分枝杆菌结核病的体液抗体。两名志愿者我们曾用白色念珠菌素进行皮试后48小时DCH阳性反应A—RFC 百分比明显升高, 但在文中未加叙述。

A—RFC 反应的动态变化紧密的和DCH反应相平行。两者的反应高峰出现在24和

48小时，只有一人土拉伦斯菌素试验后72小时才出现最大范围的皮试硬结和A—RFC达高峰，另外三例应用中等强度的PPD皮试呈现阴性，而在第三天A—RFC全都出现高峰。然而多数A—RFC百分比上升和DCH反应的大小无明显关系，预备试验曾研究两例土拉伦斯皮试阳性者间隔6小时采血一次检查活性玫瑰花结形成细胞的数目，在皮试后12~24小时之间开始增多。用小白鼠试验，T淋巴细胞迅速的经过外周淋巴组织进行再循环，而B淋巴细胞再循环的速度很慢。如果这一现象出现在人的A—RFC群，将可帮助解释皮内注射试验抗原后或者是由于再循环，A—RFC进入循环而迅速出现。

我们的结果说明：循环的A—RFC增加有可能代表T细胞的免疫活性亚群。A—RFC数目低下表示细胞功能缺陷，而A—RFC数高于正常可以认为T细胞活性增强。

译自 The Journal of Immunology vol 116 No4 April p•110~1113 (英文)

姬云堂 译

人血中介导病毒感染靶细胞的抗体 依赖的细胞细胞毒性作用的单核细胞

(I) 效应细胞群的鉴定

摘要：用各种物理的和免疫学的技术分部人血单核细胞，产生的细胞亚群是根据其在抗单纯疱疹病毒抗体 IgG 参与下对单纯疱疹病毒感染的靶细胞溶解的能力来确定。同时进行了胶乳吞噬作用和表面标志的研究，以便根据吞噬作用的性质和它们的表面免疫球蛋白的存在以及对绵羊红血球，C₃ 或 IgG 的 FC 段任何一种受体的存在来确认多数效应细胞。

除去塑料粘附的或者碳酰铁粘附的单核细胞以后细胞毒性效应细胞活性不受影响或者稍微增强说明多数效应细胞不是古典的单核细胞。用除去玫瑰花结形成细胞的方法除去90%以上的T细胞后得到相似的结果。同样，当用尼龙纤维柱过滤单核细胞除去95%以上的B细胞时，效应细胞的活性一般没有变化。并且发现三例B细胞缺陷X伴性无丙球蛋白血症的患者其效应细胞的功能也是正常的。这些观察有力的说明效应细胞不是T细胞或B细胞。

然而，在含有5%未经分部的单核细胞的细胞亚群中常发现增加4—5倍的效应细胞。这种细胞亚群具有大量的只带有FC受体的非吞噬细胞（杀伤细胞）和不能检出表面标志的非吞噬细胞（无效细胞）。因为象在另一个相伴的报告中指出的，效应细胞表面FC受体在对HSV感染的靶细胞介导的抗体依赖细胞细胞毒性作用当中起着关键性的作用。在人血中多数单核效应细胞是一种杀伤细胞。

免疫学介导的病毒感染细胞的破坏在宿主防御病毒感染中可能具有重要的作用。由于对传染细胞的表面新出现的病毒特异性抗原开始反应，免疫的细胞溶解作用中止病毒的合成，新合成的具有传染性的病毒暴露于细胞外体液中的中和抗体。免疫的细胞溶解作用对于宿主限制病毒的蔓延具有特殊的意义。如象单纯疱疹病毒（HSV）能不经细胞外体液而经过细胞间桥直接由细胞到细胞传播。

病毒感染细胞的免疫溶解作用至少可由三种特殊的效应途径进行。一种是由抗体和补体引起的细胞溶解(4,5)，至少是对麻疹病毒感染细胞好象涉及到另一种补体链锁反应。第二种是由免疫淋巴细胞引起的感染细胞的溶解，这种细胞介导的细胞毒性机制在小白鼠抗几种病毒感染中已经表明是有效的，包括Sindbis病毒(7)，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(8,9)，以及肢体不全畸形病毒(10)。有作用的效应细胞仅出现于免疫动物的脾脏，已经一致地被确认为T淋巴细胞。人对病毒感染细胞的细胞介导的细胞毒性作

用也已经对若干病毒进行了描述,虽然在管内系统多数试验的效应细胞还没有更好的描述。人血液内对于风疹病毒的效应细胞已经指出是T细胞(16)。

第三种细胞溶解的机制,是抗体依赖细胞的细胞毒性(ADCC),是由IgG抗体和人血中单核白细胞联合参与下进行的。我们以及其他学者已经指出抗体依赖细胞的细胞毒性对经受I型或II型单纯疱疹病毒急性感染的靶细胞是有效的(17,19)。在合并的人血中介导这种反应的抗体属于免疫球蛋白的IgG部分(19)。急性感染两种其他动物疱疹病毒的靶细胞也已经表明对抗体依赖细胞细胞毒性的损害是敏感的(20,21)。由于近来发现HBV感染的靶细胞能早在感染后3小时,即在感染病毒子代出现之前可被ADCC所破坏(22),这就提示抗体依赖细胞细胞毒性作为宿主防御机制可能是很重要的。和细胞介导的细胞毒性对病毒感染的靶细胞的作用相反,最初的证据提示细胞毒性T淋巴细胞没有参与对HBV感染细胞的抗体依赖细胞的细胞毒性作用,其理由如下: a) 得自未经HBV免疫的供者的血中单核白血球和得自那些经过免疫的供者一样具有细胞毒的作用(17,19)。 b) 于脐带血中经常发现细胞毒效应细胞。

在本报告及其相关的资料中(24),我们证实在HSV抗体依赖细胞毒性反应中人血中多数具有活性的单核效应细胞是一种缺乏粘附作用的非吞噬细胞。它们缺乏可被发现的表面免疫球蛋白并缺少对绵羊红血球或补体的受体;然而它们具有对人IgG的Fc碎片的受体。因此这种效应细胞不是T细胞、B细胞或者古典的单核细胞,而是近来所描述的K细胞。

一、材料和方法

供血者:献血者为无复发性唇疱疹历史的健康成人。根据它们的血清最低稀释倍数(1/10)是否含有对HSV的中和抗体而分成免疫的和非免疫的两组。中和试验得到的结果由测定供血者1:100稀释血清对HSV感染细胞抗体介导的抗体依赖细胞细胞毒性所证实。如象早先的报告那样注意到两种抗体试验的结果非常一致(17,19,23)。

血单核细胞(MC),由Ficoll—Hypaque梯度离心法从加肝素的静脉血中分离出MC。然后为了进一步细胞分部,或为了研究ADCC效应细胞活性、对胶乳的吞噬作用、和表面标志而分成数等分。MC的制剂通常含有少于5%的多形核白细胞。用台酚蓝检查活性细胞数应在98%以上。

胸腺细胞。胸腺组织来自三名因先天性心脏缺损而进行手术的儿童。用剪刀剪碎然后用23号针头吹打分散细胞,并且用RPMI 1640培养液洗三次。对于效应细胞和表面标志研究的制剂存活的细胞应在95%以上。

单核细胞对塑料的粘附:为了测定ADCC效应细胞是否吸附于塑料表面。用含有10%加热灭活胎牛血清的Eagle氏最基本培养液将MC稀释成 $3 \times 10^6/\text{mL}$ 接种3 mL于25Cm²塑料的细胞培养瓶中。将培养瓶轻轻摇动5秒钟后放置于含有95%空气5%CO₂的潮湿的环境中37℃孵育90分钟。经轻摇瓶子5秒钟后未被粘附的细胞被倾出。然后再用3 mL温热的培养基冲洗,振摇再倾出,重复数次。每次未粘附的单核细胞合并。并

鉴定ADCC效应细胞的活性。

碳酰铁处理单核细胞：用含10%胎牛血清的基础培养液（简称MEM）稀释MC。10 mL细胞液（含 5×10^7 单核细胞）与125mg碳酰铁粉一并加入15mL带盖的塑料离心管中。将管子置入37℃水浴孵育20分钟，每20—30秒钟用手倒转一次。然后悬液铺于Ficoll—Hypaque梯度离心沉淀⁽¹⁹⁾。收获在界面的未粘附铁的MC，洗两次，然后检测效应细胞活性和胶乳吞噬作用。这些细胞存活达95%以上。对照的单核细胞除了不加入铁粉外在相同的条件下进行处理。

MC在尼龙纤维柱的分部。使用的方法为Greaves和Brown描述的方法⁽²⁷⁾。37℃让MC吸附于尼龙柱30分钟。然后洗脱未吸附细胞，洗一次检查效应细胞活性、胶乳吞噬作用、以及表面标志。这些细胞存活应超过95%。

除去E玫瑰花结形成细胞。绵羊血球和MC玫瑰花结形成是在12×75mmPyrex玻璃管内，将1%绵羊血球悬液（ 2×10^8 /mL）0.3mL和含有50%热灭活胎牛血清RPMI 1640培养液稀释的MC 0.3mL（ 2×10^6 /mL）混合。然后离心沉淀（400×G 3分钟）并于室温培育90分钟。成团的细胞轻轻的制成悬液并于4℃用Ficoll—Hypaque梯度离心沉淀30分钟，收集界面的单核细胞（除净了玫瑰花结形成细胞），用HBSS洗两次，然后检查效应细胞功能，胶乳吞噬作用和表面标志。

以胶乳吞噬和表面特征标记单核细胞：为了标记单核细胞，将单核细胞用含有20%加热灭活胎牛血清的RPMI 1640调整到 5×10^6 /mL的浓度然后于37℃与1.1μ胶乳珠混合培育30分钟，单核细胞通过一层未稀释的胎牛血清离心沉淀除去过剩的胶乳珠。成团的单核细胞调整浓度到 5×10^6 /mL，然后对胶乳吞噬和表面标志评价如下：

1. 胶乳阳性细胞（单核细胞）：摄入3个以上胶乳珠的单核细胞被认为是阳性。最少应检查200个细胞。
2. 表面免疫球蛋白。为了计数携带表面免疫球蛋白的单核细胞，应用一种与异硫氰酸盐荧光素相结合的山羊抗人Fab抗血清，其异硫氰酸盐荧光素与蛋白质比例为10μg/mL。结合物稀释成1/50，然后再取0.1mL加入0.1mL的MC中，置4℃30分钟后，细胞通过胎牛血清离心沉淀，再悬浮于PH7.2含有0.1%叠氮钠的PBS中，检查以前保存于4℃。显示表面免疫荧光的胶乳阴性细胞百分率用标准的方法进行显微镜检查。每制剂最少检查200个胶乳阴性的细胞。
3. Fc受体：带有表面Fc受体胶乳阴性单核细胞的百分率用间接免疫荧光法进行检测。用含有0.2%叠氮钠的PBS稀释MC，取0.1mL与等量的加热凝聚的IgG（2.0mg/mL）混合，于室温培育30分钟。然后悬液以400×G离心沉淀5分钟，细胞团块混悬于0.1mL 1/30稀释的异硫氰酸盐荧光素结合的山羊抗人IgG的Fc片段的抗血清。室温培育30分钟后，通过胎牛血清洗涤细胞，再混悬于含0.2%叠氮钠的PBS中，用显微镜检查其表面免疫荧光。由Fc受体形成的荧光反应的大小和形态与表面免疫球蛋白是有区别的。在其表面具有2个以上荧光聚合物胶乳阴性细胞被认为是Fc受体阳性。最少应当计算200个胶乳阴性的细胞。对照制剂，除了IgG凝聚物外以相同条件制备。每次试验均设对照。一般表明对照少于1%由抗Fc试剂着染的细胞。

4. E玫瑰花结形成细胞(RFC): 每一MC群的RFC总数按照以前报告的方法进行检测。具有3个以上吸附上红血球的胶乳阴性细胞被认为阳性。每批制品至少检查200个细胞。

5. 补体玫瑰花结形成细胞(C-RFC)具有C₃表面受体的单核细胞以0.1mL单核细胞加0.1mL 2.5%由补体包裹的致敏红血球(EAC)悬液于37℃ RPMI 1640培养液中孵育30分钟来确认。然后以玫瑰花结形成细胞报告的方法检查每一单核细胞群的补体玫瑰花结形成细胞的百分率。EAC试剂的制备方法是用1mL 5%红血球悬液和1mL适当稀释度(1/120)纯化兔抗红血球的IgM进行致敏,随后加入经适当稀释的(1/5)预先经过红血球在4℃吸收的新鲜小鼠血清于37℃孵育30分钟。单核细胞不和EAC(IgM致敏的红血球但未暴露于补体)形成玫瑰花结。

人IgG的烷化还原: 1gm Cohn I部分(Miles Laboratories, Elkhart, Ind)溶于50mL PBS。用PBS充分透析以后,加入2-巯基乙醇使最终浓度为0.1M。在室温搅拌溶液三小时。然后在4℃氮气环境中加入10%以上克分子量的碘醋酸胺,搅拌溶液1小时。然后用PBS充分透析。

人IgG的聚合: 根据Dickler和Kunkel氏的方法制备加热聚合天然的或烷化还原IgG。超速离心和均化作用以后,聚合物以小装量保存于-70℃。临用前在4℃用800×G离心沉淀5分钟以除去最大的聚合物。将上清液调至适当的蛋白浓度。

IgG聚合物的特异性: 天然的和烷化还原的两种IgG聚合物用上述计数Fc受体阳性细胞的间接免疫荧光的方法测定它们对外周血MC或胸腺细胞的结合能力。天然IgG聚合物对4名正常供血者的15—20%的血中单核细胞发生结合。相反烷化还原聚合物对这些细胞的结合少于1%。胸腺细胞悬液显示用两种聚合物试剂其阳性细胞均少于1%。

病毒株: 全部研究采用连续在Chang肝细胞(CL)传代的I型HSV的VR₃株。

靶细胞: I型HSV感染的⁵¹Cr标记的CL细胞按照以前叙述的方法制备(19),但细胞从单层上除去用0.05胰蛋白酶—0.02% EDTA处理而不用玻璃珠物理的方法除去。进行抗体依赖细胞的细胞毒性试验时,用直接荧光抗体试验(22) 80—90%的靶细胞显示出单纯疱疹病毒细胞膜抗原。

抗体依赖细胞的细胞毒性效应细胞活性: 为确定效应细胞的活性,在塑料组织培养管中取适当数量的MC和 2×10^4 ⁵¹Cr标记的靶细胞以及抗体混合,使其最终量为1mL。抗体的来源是由10名单纯疱疹病毒血清阳性的供血者合并的加热灭活血清,采用最终稀释度1/200。在1/100,000稀释可以检出淋巴细胞依赖抗体(LDA)的活性。单核细胞参与下最大的细胞毒性高达稀释度1/1000。自六名HSV阴性血清供者合并的加热灭活的血清作为对照。感染的靶细胞培养物,单核细胞和人的血清置于含95%空气和5% CO₂的潮湿环境中37℃培养6小时,测定培养的上清液中同位素的释放量作为靶细胞损伤的指数(19)。由ADCC释放的同位素量计算如下: 特异性释放百分率 = $[(C-D)/(R-B)] \times 100$ 。其中C = MC和LDA阳性血清存在时靶细胞释放的百分率; D = MC和LDA阴性血清存在时靶细胞释放的百分率; R = 三次反复冻溶后靶细胞释放的百分率; B = 靶细胞仅6小时培育后释放的基本百分率。效应细胞和靶细胞的比例(E:T)为30:1

时D一般是3—10%。在较低的E:T比例时接近零。R是85—90%细胞结合的标记。B平均7%，它由培育在相同条件下未感染的CL细胞表明大约为“漏出量”的一半。除少数外，下面的试验数值都是三次试验的平均数±平均数的一个标准误。

二、结 果

塑料的吸附：使血单核细胞吸附到塑料的细胞培养瓶上，然后检查未吸附的单核细胞（平均相当于73%原始细胞群）和未分部的单核细胞的ADCC活性（表1）。对研究的五例献血者未吸附在塑料上的单核细胞保留有未分部单核细胞的细胞毒活性。在所试的全部E:T比例均显示了效应细胞活性的轻度增强。也观察到在HSV阳性血清和阴性血清供者之间效应细胞活性没有明显区别。虽然未吸附的和未分部的单核细胞群的胶乳吞噬细胞数在此未被计数。我们从其他实验中发现，塑料吸附方法一般能除去血单核细胞的80—95%胶乳阳性的单核细胞。因此表1的资料指出多数对HSV感染靶细胞的ADCC效应细胞是不吸附在塑料上的，并且表明它不是一种单核细胞。

碳酰铁处理：两例供者血单核细胞用碳酰铁粉处理。对铁未吸附的MC与吸附铁的MC分开。铁粉在一层Ficoll—Hypaque离心沉淀移去。用这种方法总的细胞回收率约为55%。如表2所示，未吸附铁的MC与未分部的MC相比胶乳阳性细胞的百分率有明显的降低。相反，未吸附铁单核细胞的ADCC效应细胞活性等于或稍高于未分部的细胞。虽然试验的例数很少，但资料表明ADCC效应细胞是一种非吞噬细胞，因而不是一种古典的单核细胞。

表1 未分部和塑料未粘附MC的ADCC效应细胞对HSV感染的靶细胞活性

供血者	免疫情况	细胞	特异性释放%（效应细胞：靶细胞）					
			30:1		10:1		3:1	
S.S	+ ^a	未分部	53.5	2.1	34.9	3.2	16.1	0.9
		未粘附	63.2	1.7	38.4	0.8	17.3	0.5
S.G	+	未分部	72.9	1.9	36.0	1.2	14.3	0.2
		未粘附	75.6	1.6	58.1	1.0	26.5	0.8
K.G	- ^b	未分部	67.9	0.6	34.0	0.5	14.0	0.5
		未粘附	69.9	2.5	40.9	2.1	26.6	0.5
P.F	+	未分部	58.4	2.4	43.2	2.0	13.8	1.1
		未粘附	63.6	5.6	48.4	1.6	19.2	2.2
D.W	-	未分部	60.1	4.6	31.8	3.5	13.4	1.1
		未粘附	63.6	3.6	38.4	4.0	16.4	1.1

a：HSV阳性血清供者

b：HSV阴性血清供者