DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.03.006

猪脾淋巴细胞抑素的提取及其作用机制的研究

训练部生化教研室　陈鸿书　彭家和

自从1960年 Bullough① 从表皮细胞中发现组织特异的有丝分裂抑制物以来，相继在脊椎动物的十多种组织中发现这类物质，称为抑素②，由于抑素在组织中的含量少，又容易失活，给研究工作带来一定困难。已有的实验结果表明，抑素是一种小分子的蛋白质或多肽，有的结合有碳水化合物③。抑素不仅可能是正常情况下控制细胞增殖的重要物质，而且还发现某些肿瘤细胞内抑素的含量减少④，提示某些肿瘤细胞的增殖失去正常控制可能与此有关。因此进一步阐明抑素的化学结构及其作用原理，在理论和实践上都有一定意义。

淋巴细胞抑素可以从淋巴结，脾脏及胸腺等淋巴样组织中提取⑤⑥。本文是报导猪脾淋巴细胞抑素的提取，及用〔^{3}H〕-TdR和〔^{3}H〕-Urd掺入实验，观察抑素对植物血凝素（PHA）转化的淋巴细胞中DNA和RNA合成的影响。

材料和方法

从猪脾提取淋巴细胞抑素所用的超速离心机为MSE 40-TC。凝胶层析洗脱液用Unicam Sp8-100紫外分光光度计测量在280nm的吸收峰，掺入实验所用的〔^{3}H〕-TdR及〔^{3}H〕-Urd为上海原子核研究所出品，〔^{3}H〕-TdR是^{3}H标记甲基，24C/mM，以生理盐水稀释成20μC/ml，〔^{3}H〕-Urd为21.8C/mM，以生理盐水稀释成20uC/ml。闪烁液为PPo 4克，PoPoP 0.6克，萘110克，二氧六环加至1000毫升，测量仪器为国产FJ-353型双道液体闪烁计数器。

1．淋巴细胞抑素的提取：

所有操作在10°C按Lanfant⑦的方法进行。在屠宰场从刚杀死的猪体上摘下脾脏立即放入冰桶中备用：先将脾脏放置在冰块上仔细剥去包囊及纤维束后，放入三倍容量的丙酮中，用组织捣碎机制成匀浆，置于10℃水浴中振荡16小时，以砂心漏斗过滤，沉淀部分再以三倍容量丙酮制成匀浆并过滤之，重复此操作一次，最后将所得沉淀在10℃以下进行真空干燥，磨碎后过筛制成丙酮粉，置-10℃冰箱保存。

将丙酮粉溶于15倍容量的重蒸水中，用组织捣碎机制成匀浆，置10℃水浴中振荡20小时进行提取，悬液以45000×g的速度离心90分钟，回收上清液即为含抑素的部分，最后用6号砂心漏斗过滤后，清液置—10°C冰箱保存备用。此脾提取液可用于〔^{3}H〕-TdR及〔^{3}H〕-Urd掺入实验，或用葡聚糖凝胶层析或聚丙酰胺凝胶电泳进一步分离提纯。

2．凝胶层析：上述提取液用Sephad x G-75装成的3×70厘米凝胶柱进一步分离，柱套管温度为10°C，洗脱液为pH6.8，0.005M磷酸钠缓冲液，流速为0.45毫升/分钟。

3．聚丙酰胺凝胶电泳：凝胶层析洗脱液在280nm有明显吸收峰的部份继续用聚丙酰胺凝胶电泳进行分离，采用不连续凝胶系统，成层胶长1厘米，T3.1%，pH6.7，分离胶长7.5厘米，T15.1%，pH8.9，电极缓冲液pH8.4。

4．〔^{3}H〕-TdR掺入实验：

正常人的静脉血加肝素抗凝，于37℃直立静置1—2小时，待红血球沉降后吸取富含白细胞的血浆层并稍吸取些红血球，移入另

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

一试管中，混匀成细胞悬液供培养之用。

每个培养瓶内加入含20%小牛血清的199培养液2毫升，PHA适量，青霉素100单位/毫升，链霉素100微克/毫升及细胞悬液0.2毫升。实验分为两组，实验组的每个培养瓶中加0.2毫升脾提取液，对照组不加脾提取液，而以0.2毫升培养液代替，置37°C孵育56小时后每瓶加入〔^{3}H〕-TdR40微升（相当于0.8微居里），继续培养16小时终止培养。

培养结束后分别将每培养瓶中的上清液吸去，然后用离心法（3000转/分）分别用生理盐水洗沉淀二次及5%三氯醋酸溶液洗涤沉淀一次，以洗净自细胞外的^{3}H放射性。沉淀加0.5毫升5%三氯醋酸溶液置90℃水浴中15分钟提取DNA，离心后吸取无色透明的上清液0.2毫升加到10毫升闪烁液中测量每管的比活性，比较实验组和对照组掺入的〔^{3}H〕-TdR的比活性（以C代表），并按下式算出百分抑制率。

$$\text{抑制率（\%）} = \left(1 - \frac{C_{实验}}{C_{对照}}\right) \times 100$$

培养结束，从实验组及对照组中各取出一瓶作台盼兰（Trypan blue）排斥实验，先将培养瓶中的上层清液吸去，再摇匀成浓的细胞悬液，分别以实验组及对照组的细胞悬液1滴加0.1%台盼兰液1滴混匀，计数死亡的单核的细胞（被染色者）和活的单核的细胞（不被染色者）。

5. 〔^{3}H〕-Urd掺入实验：

培养条件和〔^{3}H〕-TdR掺入实验相同，培养液的用量仍为每瓶2毫升，加入每瓶中的细胞悬液为0.2毫升，实验组每瓶加猪脾提取液0.2毫升，对照组以0.2毫升培养液代替，置37℃孵育27小时后每瓶加入〔^{3}H〕-Urd50微升（相当于1微居里），继续培养6小时，然后按Mueller等⑧的方法测量〔^{3}H〕-Urd掺入到RNA中的放射性；吸去每瓶的上层清液，以生理盐水将瓶中的白细胞洗入离心管中，以3000转/分速度离心10分钟，吸去上清液，继续用10%三氯醋酸液洗沉淀两次，再用80%乙醇及1:1的乙醇—乙醚混合液分别各洗沉淀一次，以洗净白细胞外的^{3}H放射性和除去酸溶性及脂溶性物质，沉淀，置室温过夜干燥，溶于甲酸0.5毫升及H_2O_2 0.1毫升中，吸取0.2毫升液体加入10毫升闪烁液中，测量每管的比活性，比较实验组和对照组掺入〔^{3}H〕-Urd的比活性，并按前述公式计算出百分抑制率。

结　果

以新鲜猪脾为材料，按Lenfant等的方法提取淋巴细胞抑素，先制成丙酮粉，干粉用重蒸水在10°C提取20小时，继以45000×g离心90分钟，所得上清液经除菌处理后即为含抑素活性的提取液（以下简称脾提取液）。将脾提取液加到Sephadex G-75 3×70厘米的凝胶柱上进行层析，洗脱液在280nm检测其吸收峰，可以分离成七个部分（如图1），

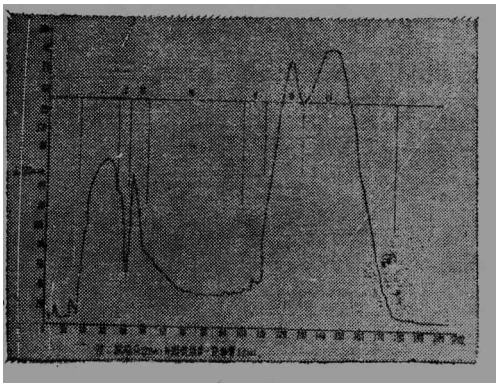


图1 猪脾提取液的SephadexG-75凝胶层析图谱

其中相当于大分子洗脱体积的部分有一个高大的吸收峰（Ⅰ），相当于小分子洗脱体积的部分，有两个高的吸收峰（图中分别标以Ⅵ和Ⅶ），用聚丙酰胺凝胶电泳对Ⅰ和Ⅵ部分进一步分离，Ⅵ部分不能再进一步分开，但Ⅰ部分可以被分成15个明显的区带（如图

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2）。

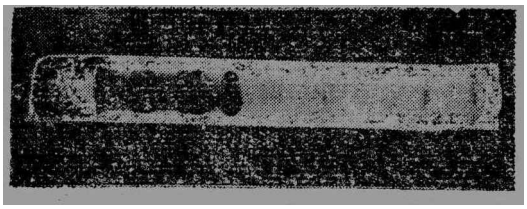


图2　凝胶层析的Ⅰ部分在聚丙酰胺凝胶上电泳的图谱

将脾提取液加入细胞培养液中，观察它对PHA转化的正常人淋巴细胞〔^{3}H〕-TdR掺入的影响，结果如表1。PHA加到含20%小牛血清的199培养液中孵育正常人外周血淋巴细胞时，能使静止的淋巴细胞转化，引起〔^{3}H〕-TdR的掺入，平均掺入率为7.22—16.26%，当在相同的培养液中加入0.2毫升脾提取液时，〔^{3}H〕-TdR的掺入明显受到抑制，掺入率只有0.35—1.31%，其抑制率达91.9—97.6%，说明猪脾提取液有抑制PHA转化正常人外周血淋巴细胞合成DNA的作用。用台盼兰作排斥试验，无论实验组或对照组均很少找到死亡细胞，说明猪脾提取液无细胞毒作用。

表1　猪脾提取液对人的转化淋巴细胞〔^{3}H〕-TdR掺入的影响

组　别	样品数	每瓶DNA提取液放射性计数(cpm)*	〔^{3}H〕-TdR 0.8μC放射性计数(cpm)	平均掺入率(%)	平均抑制率(%)
实验一：					
对　照	3	89852±5547	552595	16.26	92.1
实　验	3	7244±3749		1.31	
实验二：					
对　照	3	81476±7083	574955	14.71	97.6
实　验	3	1983± 760		0.35	
实验三：					
对　照	5	41476±7631	574955	7.22	91.9
实　验	6	3332±1175		0.58	

注① *$\bar{X}\pm SD$

② 实验组每瓶培养液加脾提取液0.2毫升（每毫升含蛋白质3.1毫克）

〔^{3}H〕-Urd掺入实验的结果如表2，细胞培养到27小时加入〔^{3}H〕-Urd继续孵育6小时终止培养，对照组中〔^{3}H〕-Urd的掺入率为1.8%，有明显的〔^{3}H〕-Urd掺入，说明PHA转化淋巴细胞的作用在培养到27—31小时这段时间有RNA的合成。但在培养液中同时加入脾提取液的实验组中，〔^{3}H〕-Urd的掺入显著被抑制，掺入率仅0.1%，抑制率达94.6%，说明猪脾提取液对PHA转化的淋巴细胞在培养27—31小时的RNA合成有明显抑制作用。

表2　猪脾提取液对人的转化淋巴细胞〔^{3}H〕—Urd掺入的影响

组　别	样品数	每瓶RNA提取液放射性计数(cpm)*	〔H^3〕-Urd 1μC放射性计数(cpm)	平均掺入率(%)	平均抑制率(%)
对　照	3	5815±477	323738	1.8	94.55
实　验	3	316± 67		0.1	

注　*$\bar{X}\pm SD$

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨　论

抑素是脊椎动物组织中普遍存在的细胞有丝分裂抑制物，它在生物学上的主要特征是只对产生它的组织起作用，有明显组织特异性而无种的特异性，其作用是可逆的，目前证明抑素主要对细胞周期的两个阶段起作用，大多数抑素是抑制DNA的合成，阻止细胞从G_1期过渡到S期，称为G_1抑素，还有的抑素是阻止细胞从G_2期进入M期，称为G_2抑素，上述猪脾提取液在离体能抑制PHA转化的正常人外周血淋巴细胞合成DNA，说明此提取液具有G_1抑素活性。用Sephadex G-75柱对脾提取液进行凝胶层析，可以分离成含蛋白质的7个部分，即图1所示的Ⅰ—Ⅶ，此层析图谱和Lenfant等用Sephadex G-75柱分离小牛脾提取液的结果相似，他们证明Ⅰ和Ⅵ部分具有高度抑素活性，其抑制〔^{3}H〕-TdR掺入到淋巴细胞 DNA 中的效力比粗的脾提取液为强。我们用聚丙酰胺凝胶电泳对具有高度抑素活性的Ⅰ部分进一步分离，可分成15个明显的区带。这些结果初步证明用Sephadex G-75进行凝胶层析，继用聚丙酰胺凝胶电泳可以分离得纯度较高的抑素。

淋巴细胞抑素抑制PHA转化淋巴细胞的机制目前尚不清楚。用免疫学的方法已经证明淋巴细胞膜上有PHA的受体，PHA和受体相作用就引起一系列代谢变化，终于在48—72小时导致DNA的合成增加，从而引起细胞分裂⑦，Mueller等⑧证明，在离体培养人外周血的淋巴细胞时，在培养开始的几小时虽有缓慢的RNA合成，但合成很快减弱。若在培养基中加入PHA，则于24小时后RNA的合成明显增加，同时蛋白质的合成也增加，到36小时RNA的合成达到高峰，此时 DNA开始合成，到48小时明显升高，另外也有人证明若在培养基中加入放线菌素D阻断RNA的合成时，DNA的合成即受到抑制，由于RNA的合成是在DNA合成前的12小时发生，这些结果提示PHA转化正常人的淋巴细胞合成DNA之前，先有一个激活某些基因的过程，转录某些RNA，进而合成某些酶或蛋白质因子，为DNA的复制准备条件。我们的实验得到类似结果，当用加有PHA的培养液培养正常人的外周血淋巴细胞时，培养到27—33小时这段时间〔^{3}H〕-Urd的掺入率为1.8%，说明有RNA的合成。但若在培养液中同时加入脾细胞提取液时，RNA的合成受到明显抑制，〔^{3}H〕-Urd的掺入率仅为0.1%，抑制率达94.6%，这些结果提示淋巴细胞抑素对淋巴细胞DNA合成的抑制作用，可能是由于抑制了某些RNA的转录，从而使某些参与引发DNA复制的酶或蛋白质因子不能合成所致，但抑素是通过什么途径抑制RNA的转录过程的，尚有待进一步阐明。

小　结

（一）用新鲜猪脾在10°C按Lenfant等的方法先制成丙酮粉，继以重蒸水提取，经45000×g离心，可得到具有淋巴细胞G_1抑素活性的提取液。该提取液置于—10℃冰箱保存，2月内仍保持其活性。

（二）用Sephadex G-75柱进行凝胶层析和用聚丙酰胺凝胶电泳，可以从猪脾提取液中分离出纯度较高的淋巴细胞抑素。

（三）淋巴细胞抑素在抑制DNA复制之前12小时，对某些RNA的合成有显著抑制作用，提示淋巴细胞抑素对DNA复制的抑制作用，可能是由于抑制了某些RNA的转录，从而使某些参与引发DNA复制的酶或蛋白质因子的合成被抑制。

参考文献

1. Bullough,W.S. et al;Proc. R. Soc;Series B.151:517,1960

2. Bullough, W.S.: Biol. Rev.37:307,1962

3. Thornley, A.L.et al. :Int. J, Biochem. 6:313,1975

4. Bullough, W.S.: Chalones and Cancer, in Growth Kinetics and Biochemical Regu-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

临床医学

《胆道振荡治疗仪》

治疗胆道术后残余结石

第一附属医院肝胆外科　蔡忠军　杨可桢　侯大和　冯春兰
黄志强审阅

手术后胆道结石残留是胆道外科中的一个常见而难于处理的问题，也是胆道再次手术的重要原因①。对于局限于某一侧或某一叶的肝胆管结石，如伴有胆管狭窄或肝组织萎缩时可行肝部份切除，常能收到较好的效果①，但是对于较分散而深在的肝胆管结石，特别是在第2级或第3级胆管以上的结石多是手术无法达到的部位，很难取出；有时在手术探查时在没有胆汁充盈的情况下，结石可以暂时搁浅于较深在的肝胆管内，术后胆汁充盈又可下降至主要肝管或肝外胆道，因而仍需再次手术，给病人增添了更多的痛苦。多年以来，对于胆道残余结石，国内外进行了不少研究，多用溶石、气囊套取、或钳取等方法。在日本则利用纤维内窥镜钳取结石，亦取得较好的效果。我国广大医务工作者开展了中西医结合排石疗法，也取得可喜成绩。

为探索胆道残留结石的非手术治疗问题，自1976年4月我们与重庆大学动力系的同志们一道，在反复研究人体肝胆道解剖生理特点和原发性胆管结石的成因、成份等基础上，从流体力学的基本规律出发，应用射流技术的原理，在体外反复模拟、测压和计算等试验后，研制成功《胆道振荡治疗仪》，1977年用于临床，经过二年多的临床应用和改进，对治疗胆道残留结石获得了良好的效果。

一、《胆道振荡治疗仪》工作原理

《胆道振荡治疗仪》有液压及电子二型，其原理是根据胆道弹性解剖结构的生理学特点及胆道动力学的可变性，利用射流液体弹性波的原理，将通过射流而产生的脉动液体压力以音速的速度射入胆道，使胆管发生机械性的被动性的扩张与收缩的动力响应②。实验证明：射流波速在一钢性管道中约为1000米/秒，在软性管道如胆总管约为5—6米/秒，其进口压力可达200—800 mmH_2O，

lation of Normal and Malignant Cells (edit. Benjamin Drewinko et al) P.77 Baltimore, The Williams & Wilkins Company 1977
5. Houck, J. et al.: Science 173:1139, 1971
6. Attallah, A. M. et al.: Exp. Cell Res. 93:283, 1975
7. Lenfant, M. et al.: Bichim. Biophys. Acta 451:106, 1976
8. Mueller, G. C. et al.: Ibid 114:100, 1966
9. Howard, R. et al.: Physiol. Rev. 57:421: 1977

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net