

白细胞黏附抑制试验测定银屑病特异性转移因子活性

高迎春¹,王冬青²,王晓娟³(1.西北工业大学生命科学院,西安 710072;2.第四军医大学西京医院皮肤科,西安 710032;3.第四军医大学口腔医院药剂科,西安 710032)

摘要:目的 测定银屑病特异性转移因子(psoriatic transfer factor, PTF)的免疫活性。方法 利用四氮唑盐-白细胞黏附抑制实验,分别测定 PTF在不同浓度 PTF或银屑病角蛋白下的黏附抑制指数及免疫特异性。结果 PTF表现明显的白细胞黏附抑制作用,此作用与 PTF/角蛋白浓度呈正相关,且具有抗原特异性。结论 白细胞黏附抑制试验是体外评价 PTF的免疫活性简单易行的方法。

关键词:银屑病特异性转移因子;四氮唑盐-白细胞黏附抑制

中图分类号:R915.4;R967 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)01-0020-03

Determination of Psoriatic Transfer Factor Activity by Leucocyte Adherence Inhibition Assay

GAO Ying-chun¹, WANG Dong-qing², WANG Xiao-juan³ (1. Faculty of Life Science, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; 2. Dermatology of Xi Jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Pharmacy of Dental Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Determination of Psoriatic Transfer Factor immunity activity. **METHODS** Methylthiazolyl Tetrazolium-Leucocyte Adherence Inhibition Assay(MTT-LAI) was applied to determine the LAI index and immunologic specificity of Psoriatic Transfer Factor (PTF) at different PTF concentration or different Psoriatic Keratinose concentration. **RESULTS** PTF showed apparent LAI action which showed a positive correlation with PTF or Psoriatic Keratinose concentration and antigenic specificity. **CONCLUSION** LAI assay was a simple, easy method for evaluation of immunity activity of PTF in vitro.

KEY WORDS: psoriatic transfer factor; MTT-LAI

自从20世纪50年代发现了白细胞裂解透析液具有转移特异性免疫能力以来,转移因子得到了广泛的研究及应用。用细胞免疫的体外测定方法对其加以鉴定已有不少报道^[1-3]。但由于试验方法条件要求较高,影响因素较多,且操作方法不一,使结果重现性较差。因此,建立快速、简便和灵敏的活性检测方法对评定特异性转移因子效能的高低及质量的控制都具有十分重要的意义。四氮唑盐-白细胞黏附抑制试验(MTT-LAI)为一较成熟的检测特异性转移因子生物学活性的免疫学方法。笔者采用银屑病皮损角蛋白免疫猪,取脾脏及淋巴结制备银屑病特异性转移因子(PTF),选用MTT-LAI法,观察PTF对小鼠白细胞黏附抑制的影响。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 银屑病特异性转移因子的制备 用健康的经银屑病皮损角蛋白免疫的猪脾脏和淋巴结为原料,经清洗,去脂肪等杂质,切细后加入灭菌生理盐水,用匀浆机研磨,使细胞破裂,装入灭菌的盐水瓶里,密封置于-20℃的冰柜里冷冻。冻透后,在常温下用流动的自来水解融。如此反复3次。解融的料浆在无菌的条件下,加入等体积的生理盐水,搅拌均匀后,

用微孔过滤器过滤,所得滤液通过0.8 μm滤膜以后,再用7000分子量截流值的超滤器超滤,得提取物液体。经过低温冷冻干燥得到无菌粉末,再加入微晶纤维素作为辅料分成胶囊剂。每粒含多肽3 mg,核糖100 μg。批号:20050314。取内容物适量,加水制成每1 mL含1 mg多肽的溶液。

1.1.2 银屑病皮损角蛋白(特异性抗原)的提取 收集银屑病住院患者的鳞屑,-86℃冻存备用。制备参照文献^[4-5]的方法进行,用紫外分光光度计进行蛋白定量,用时稀释成5 mg·mL⁻¹。

1.1.3 小鼠白细胞悬液的制备 取BALB/c小鼠5只,眼静脉放血,无菌取出脾脏,Hank's液洗3次,用无菌铜网轻轻压碎制成细胞悬液,用1640培养液洗3次(1500 r·min⁻¹离心15 min),然后每只鼠脾脏加3 mL无菌蒸馏水破坏红细胞,再加3.6%氯化钠1 mL调整渗透压,混匀后用200目尼龙网过滤,滤液1500 r·min⁻¹离心5 min,再分别用0.9%氯化钠溶液和1640培养液各洗1次,收集细胞,用1640培养液调整细胞浓度为1.0×10⁶~3.0×10⁶ mL⁻¹,备用。

1.1.4 其他材料 普通转移因子胶囊(第四军医大学西京医院免疫科,每粒含多肽3 mg,核糖100 μg。批号20050321),取内容物适量,加水制成每1 mL含1 mg多肽的

溶液。BALB/c小鼠,4周龄,雄性,体重 18~22 g(由本校动物中心提供,合格证号:SCXK(军)2002-005)。RPMI 1640培养基(Gibco公司)。胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)。四氮唑盐用前配制成 5 mg·mL⁻¹母液(MTT,美国 Sigma公司)。二甲基亚砜(华美生物制品公司)。BM III 酶联免疫仪(北京新技术应用研究所)。紫外分光光度计(美国 BECKMAN DU530)。

1.2 银屑病特异性转移因子体外活性实验方法

1.2.1 不同银屑病皮损角蛋白浓度下的实验 实验共分 5 批次。每批次将来自同一小鼠的脾白细胞悬液 100 μL 分别加入无菌微孔板的 5 个孔中,然后各孔中再分别加入 50 μL 银屑病特异性转移因子和 1,2,5,10,20 μL 银屑病皮损角蛋白。另设一孔仅加入 100 μL 脾白细胞悬液作为对照孔。最后用 1640 液将各孔总量补齐到 200 μL。加样完毕后,将微孔板置于 5% CO₂ 孵育箱中 37℃ 培养 2 h,轻轻弃去上清,向各孔内加入 180 μL 不含胎牛血清的 1640 液和 20 μL 的 MTT 溶液,再培养 4 h,离心微孔板(1 000 × g,15 min)后轻轻弃去上清,每孔再加入 200 μL 二甲基亚砜,室温放置 15 min 后用酶联检测仪在波长 570 nm 下测定 A 值。按下述公式计算黏附抑制指数(LAI 值): LAI = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值) / 对照组平均 A 值 × 100%。

1.2.2 不同 PTF 浓度下的实验 共分 5 批次,每批次将来自同一小鼠的脾白细胞悬液 100 μL 分别加入无菌微孔板的 3 个孔中,然后分别加入 5 μL 银屑病皮损角蛋白和 10,20,50 μL 银屑病特异性转移因子。另设一孔仅加入 100 μL 脾白细胞悬液作为对照孔。最后用不含胎牛血清的 1640 液将各孔总量补齐至 200 μL。加样完毕后的操作同前并计算 LAI 值。

1.2.3 PTF 在不同抗原下的实验 共分 5 批次,每批次将来自同一小鼠的脾白细胞悬液 100 μL 分别加入无菌微孔板的 4 个孔中,于各孔中再分别加入 50 μL 银屑病特异性转移因子,随后再于各孔中分别加入 5 μL 银屑病皮损角蛋白及谷胱甘肽-S 转移酶(GST)、酪氨酸酶相关蛋白 1(TRP1)、牛血清白蛋白(BSA)等无关蛋白。又设 1 孔加入 100 μL 脾白细胞悬液,加入 5 μL 银屑病皮损角蛋白,50 μL 普通转移因子作为对照孔,另设一孔仅加入 100 μL 脾白细胞悬液作为对照孔。最后用不含胎牛血清的 1640 液将各孔总量补齐至 200 μL。加样完毕后的操作同前并计算 LAI 值。

2 结果

2.1 银屑病特异性转移因子的活性

在银屑病特异性转移因子浓度相同的条件下,随银屑病皮损角蛋白浓度的增加,其白细胞黏附抑制作用亦加强,利用 SPSS 软件进行方差分析, $P < 0.01$ 。但在高浓度银屑病皮损角蛋白(100 μg·mL⁻¹)下,反而下降。结果见表 1,表 2。

银屑病特异性转移因子在银屑病抗原存在下具有白细胞黏附抑制作用。而且在银屑病皮损角蛋白浓度相同的条件下,随银屑病特异性转移因子浓度的增加,其白细胞黏附抑制作用亦增加,利用 SPSS 软件进行方差分析, $P < 0.01$, 结果见表 3,表 4。

表 1 在不同银屑病皮损角蛋白浓度下的 LAI 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 LAI at different concentration of psoriasis skin keratin (C_{PSK}) ($n=5, \bar{x} \pm s$)

角蛋白浓度 /μg·mL ⁻¹	LAI 值
5	6.8 ± 2.65
10	18.62 ± 3.71
25	40.48 ± 5.71
50	56.2 ± 4.44
100	32.48 ± 7.24

表 2 LAI-角蛋白浓度方差分析表

Tab 2 ANOVA tab of the LAI- C_{PSK}

	离差和	自由度	均方差	F	P
组间	7329.850	4	1832.462	72.936	0.000
组内	502.484	20	25.124		
合计	7832.334	24			

表 3 在不同 PTF 浓度下的 LAI 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 LAI at different concentration of PTF (C_{PTF}) ($n=5, \bar{x} \pm s$)

PTF 浓度 /μg·mL ⁻¹	LAI 值
10	10.82 ± 2.50
20	23.40 ± 4.93
50	40.48 ± 5.72

表 4 LAI-PTF 浓度方差分析表

Tab 4 ANOVA tab of LAI- C_{PTF}

	离差和	自由度	均方差	F	P
组间	2216.164	2	1108.082	52.591	0.000
组内	252.836	12	21.070		
合计	2469.000	14			

2.2 银屑病特异性转移因子生物学活性的特异性

在相同的银屑病转移因子浓度和相同的抗原浓度的条件下,银屑病转移因子的白细胞黏附抑制作用表现出抗原特异性,利用 SPSS 软件进行方差分析, $P < 0.01$, 结果见表 5,表 6。

表 5 PTF 在不同的抗原下的 LAI 值 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab 5 LAI at different antigens ($n=5, \bar{x} \pm s$)

抗原	LAI 值
角蛋白	40.48 ± 5.72
谷胱甘肽-S 转移酶	2.68 ± 1.06
酪氨酸酶相关蛋白 1	2.20 ± 0.86
牛血清白蛋白	2.92 ± 0.35
普通转移因子	17.34 ± 1.90

表 6 LAI-不同抗原方差分析表

Tab 6 ANOVA tab of LAI-different antigens

	离差和	自由度	均方差	F	P
组间	5493.290	4	1373.322	179.266	0.000
组内	153.216	20	7.661		
合计	5646.506	24			

3 讨论

根据本实验结果,笔者认为银屑病转移因子在体外确有免疫调节活性,其活性强度与自身浓度及相应的抗原浓度有

关,并具有特异性抗原依赖性,提示特异性转移因子较普通转移因子在临床应用上更具针对性。但在高浓度银屑皮损角蛋白($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)下,可能是因为角蛋白是用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素溶液溶解,在高浓度时对白细胞造成损伤,白细胞黏附作用反而下降,提示特异性抗原的定量研究对确定特异性转移因子临床剂量等问题有一定的指导意义。实验结果中出现的不同批次间 MTT-LAI 实验的 LAI 值变异较大,可能与各个批次提取的脾白细胞的数量及个体差异有关。

REFERENCES

- [1] CHEN Z Y, WANG G Y, YANG M, *et al.* A simple and fast method for lymphocyte proliferation test [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2000, 21(5): 245-246.
- [2] YANG M, WANG G Y, LIU X P, *et al.* A Preliminary study on

the activity of gastric carcinoma specific transfer factor [J]. Shanghai J Immunol(上海免疫学杂志), 1999, 19(4): 219-220.

- [3] YAO G N, ZHANG H Y, JIN F, *et al.* Determination of the specific immunological activity of anti-HBV TF for injection by mouse leukocyte adhesion inhibition test [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2000, 21(1): 22-24.
- [4] LI C X, LIU Y F, LIU Y F. The preparation of keratin affinity chromatography column [J]. J Forth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 1994, 15(3): 231-232.
- [5] LAN F H, ZHANG L, ZHANG X D, *et al.* Extract keratin from cultured human keratin cell [J]. J Forth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 1999, 20(1): 78-79.

收稿日期: 2006-01-23