

超滤法提取正常大白鼠外周血及脾脏转移因子的研究*

孙范五 祝水芬

(浙江省人民卫生实验院)

早在1940年兰兹泰纳(Landsteiner)等就首次发现了细胞免疫的转移现象。1949年劳伦斯(Lawrence)¹⁾成功地以人的外周血白细胞转移了人对结核菌素的延迟超敏反应,接着1955年又继续发现了活的外周血白细胞的提取物能够转移人对结核菌素的延迟超敏反应,并将它命名为转移因子(Transfer Factor)。简称“TF”。在美国1973年专门进行了一次转移因子主要特性和临床应用的科学讨论²⁾,1978年底又召

开了一次转移因子的国际会议¹⁾。目前,国内

* 顾敬明同志参加部份实验工作,紫外光谱图由本院仪器分析室协助测定,一并致谢!

- 1) Lawrence. H. S. 1949. The Cellular Transfer of Cutaneous Hypersensitivity to Tuberculin in Man. Proc. Exp. Biol-Med. **71**: 516—522.
- 2) Kirkpatrick. C. H. et al. 1974. Workshop on Basic Properties and Clinical Applications of Transfer Factor Held at the Arizona Medical Center. Tucson, Arizona, February 16—17. 1973. Cell Immunol. **10(1)**: 165—168.

外许多实验室已进行了不少工作，也有不少综述报道。国内在动物方面，较多的是从恒河猴的外周血及脾脏提取转移因子，并进行了理化特性、生物活性及临床应用等方面的测定。为了科研工作的需要，我们采用超滤法²⁾从大白鼠的外周血白细胞和脾脏分离提取转移因子。现报道如下：

材 料 和 方 法

(一) 外周血及脾脏的处理

从正常大白鼠腹股沟动脉取血，肝素抗凝。在 0°C 条件下以 3500 转/分离心 20 分钟，弃去上层血浆。然后用 1% 冰醋酸溶液与血细胞沉淀按体积 1:0.8 之比破坏红细胞，继后以 3500 转/分离心 30 分钟，弃去上层液，沉淀用生理盐水洗涤 2 次，最后以 2 倍与沉淀体积的灭菌生理盐水稀释至 10^9 细胞/毫升。低温冰冻，流水溶解，如此冻溶 10 次以上，镜检白细胞已全部裂解，再在 0°C 条件下以 4000 转/分离心 30 分钟，弃沉淀。上清液用上海轻工业研究所制造的 CS-1 实验型微孔膜超滤器，以 5 个大气压/每平方厘米的氮气进行超滤，即可获得转移因子的滤液。脾脏的处理方法基本与外周血相似，不同的是将取下的脾脏除去脂肪组织，称计脾脏组织重量，然后加适量生理盐水溶液用 8000 转/分电动捣碎 30 秒钟，在 0°C 条件下用 3500 转/分离心 30 分钟，弃去上清液。沉淀物再用生理盐水离心洗涤 2 次。以下的步骤与外周血处理相同。

(二) 转移因子理化性质的测定

1. 紫外光吸收特性 将血、脾 TF 溶液，以日本岛津 UV-210 全自动双光束紫外光分光光度计扫描测定。所测得紫外光吸收光谱（见图 1、2），外周血 TF 在波长 240 毫微米 ($m\mu$) 处有低峰，在 269.5 毫微米 ($m\mu$) 处有高峰。其在 260 毫微米 ($m\mu$) 处的紫外光密度 E_{260} 与其在 280 毫微米 ($m\mu$) 处的紫外光密度 E_{280} (E_{260}/E_{280}) 的比值范围波动在 1.422—1.475 之间。脾 TF 在 238 毫微米 ($m\mu$) 处有低峰，在 267 毫微米 ($m\mu$) 处有高峰。其 E_{260}/E_{280} 的比值范围波

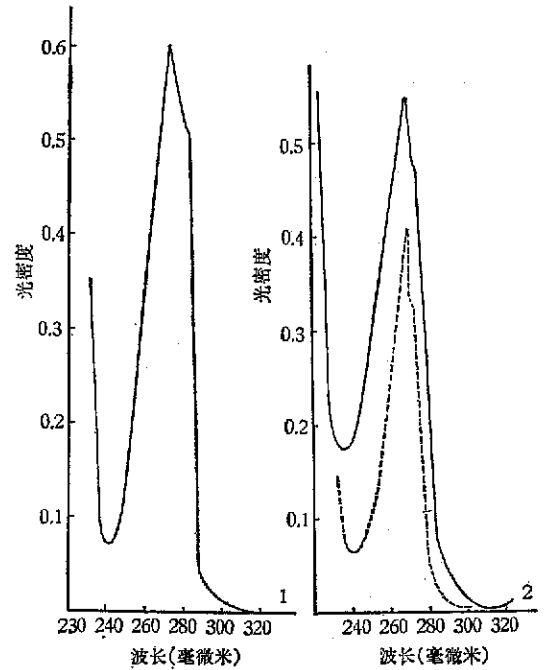


图 1. 正常大白鼠外周血 TF 紫外光吸收光谱
2. 正常大白鼠和人的脾脏 TF 紫外光吸收光谱
——鼠 ——人

动在 1.488—1.695 之间。

2. 蛋白质的测定 用磺基水杨酸 2—3 滴，加入 2—3 毫升大白鼠的脾或血 TF 提取液中，蛋白质反应为阴性。

3. 总氮测定 用凯氏定氮法测得外周血 TF 的总氮量为 36.3 毫克/100 毫升。脾 TF 的总氮量为 40 毫克/100 毫升。

4. 肽键含量 以总氮量相当于肽键含量的 16% 计算，平均脾 TF 为 250 毫克/100 毫升，外周血白细胞 TF 为 226.9 毫克/100 毫升。

5. 核糖测定 用二羟基甲苯试剂显色反应测定核糖含量，脾 TF 的核糖含量为 91.3 毫克/100 毫升，外周血白细胞 TF 的核糖含量为 63.7 毫克/100 毫升。

6. 干重 取脾、血 TF 提取液各 10 毫升，80°C 烘干，呈淡黄色粉末。脾 TF 干粉重为 1386

1) Kirkpatrick. C. H. 1979. Third International Symposium on Transfer Factor. Cell Immunol. 46: 184-186.

2) 李洗等: 1979 浙江人民卫生实验院院报 1.1—5。

表1 正常人脾 TF 与正常大白鼠 TF 比较

	紫外最高峰	紫外最低峰	E_{260}/E_{280}	总 氮*	多 肽*	核 糖*	干 重*
人脾 TF	269.3	237.0	1.7274	199.61	1247.6	105.0	1594
鼠脾 TF	269.5	237.5	1.4880—1.6950	40.0	250.0	91.3	1384
鼠血 TF	267.0	238.0	1.4220—1.4750	36.3	226.9	63.7	1256

* 单位为毫克/100 毫升。

毫克/100 毫升，外周血白细胞 TF 干粉重为 1256 毫克/100 毫升。

(三) 毒性及过敏性测定

1. 毒性试验 取本院繁殖的正常小白鼠 10 只，体重 10—20 克，随机分为 2 组，每组 5 只。实验组每只腹腔注射 TF 1 毫升，对照组每只腹腔注射生理盐水 1 毫升。饲养观察 3 天，两组小白鼠活动，进食情况均正常。3 天后拉颈处死，解剖观察，未发现胸、腹水，各脏器组织未发现出血点及异常。提示了本制剂无毒性。

2. 过敏试验 用体重 220 克左右豚鼠 5 只，每周皮下注射一次 TF，每只每次 0.5 毫升，共 3 次。与最后一次注射相隔 14 天后，每只静脉注射 TF 1 毫升。观察注射后 15 分钟内豚鼠的活动情况，未发现抓鼻、竖毛及痉挛等过敏体征。

讨 论

1972 年李伯德 (Liburd)¹⁾ 用球虫免疫大

白鼠后，用透析法提取的 TF 可以转移免疫反应。但对其理化特性、毒性试验尚少见报道。我们把用超滤法从大白鼠脾及外周血白细胞提取的 TF 与用同样方法从人脾提取的 TF 进行了比较，其结果见表 1。从表 1 可以看出，大白鼠脾脏 TF 的紫外吸收最高峰与最低峰同人脾 TF 相近，波形相似 (见图 1 和 2)。但其他各值都较人脾 TF 低。实验结果尚证明²⁾，大白鼠 TF 对因辐射所导致的免疫功能明显下降所起的保护作用与人脾 TF 相似。大白鼠脾 TF 与外周血 TF 的紫外光吸收最高峰及最低峰也极其相似。其余分析项目与人脾 TF 有差异，这可能是由于人与动物种属不同的关系。但这些都尚待进一步研究加以证实。

1) Liburd, E. M. et al. 1972. Transfer Factor in Rat Coccidiosis. Cell Immunol. 5: 487—489.

2) 孙范五等 1980 浙江人民卫生实验院院报 1.39—41。