

## 羧甲基变性半纤维素对 T 细胞活性和免疫细胞量的影响

范秀容、冯作化 (武汉大学生物系微生物学教研室免疫组, 武汉 430012)

**提要** T细胞在体外加羧甲基变性半纤维素(CMMHC)培养 19 h, EaRFC%的增高率可达 20%左右; T细胞经胰酶处理后加 CMMHC 培养, E受体恢复显著加快; 在淋巴细胞转化试验(同位素法)中, CMMHC 可使 cpm 值增高 40%左右, 而本身无丝裂原作用; 表明它可增强 T细胞活性和应答能力。小鼠 ip CMMHC 可使外周血和腹腔免疫细胞量增加 60%以上。

**关键词** 羧甲基变性半纤维素; T-淋巴细胞; 细胞免疫性; 近交 Balb/c 小鼠

羧甲基变性半纤维素(carboxymethyl-

modified hemicellulose, CMMHC)是南京林产工业学院木材化学教研室研制的一种抗癌新药。我们在前文<sup>(1)</sup>报道了该药可促进巨噬细胞的功能。为了进一步研究 CMMHC 对免疫功能的影响, 我们以体外试验观察了 CMMHC 对 T 淋巴细胞的调节作用; 以动物试验观察了 CMMHC 在体内对免疫细胞量的影响; 并对 CMMHC 的作用机理进行了探讨。

### 材料与 方法

**材料** 人外周血, 由武汉军区总医院血库和湖北医学院第一附属医院血库取志愿献血者

外周血, 肝素抗凝。近交 Balb/c 小鼠, 湖北省医学科学院实验动物室提供, 体重  $17.7 \pm SD$   $0.8$  g, 不分♀♂。CMMHC 注射液, 南京林产工业学院木材化学教研室赠, DS(羧甲基取代度) =  $0.3732$ ,  $10$  mg/ml。氢化可的松, 湖北制药厂产品。胰酶 (trypsin), PHA-M, RPMI 1640 营养液、TC 199 营养液, 均为 Difco 产品。[ $^3\text{H}$ ]TdR, 中科院上海原子核研究所产品, 比度  $1517$  GBq/mmol, 用无菌生理盐水稀释成  $2.96$  MBq/ml。

**胰酶处理的人外周血淋巴细胞(HPBL) Ea 花环恢复试验** 方法详见文献(2)。

**正常 HPBL 的活性 E 花环形成细胞%(EaRFC%)增高试验** 取分离的 HPBL( $2 \times 10^6$ /ml)悬液  $0.2$  ml, 与经 RPMI 1640 营养液(含 10%小牛血清)稀释的 CMMHC  $0.8$  ml(对照管加营养液)混匀, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  培养箱培养  $19$  h, 洗涤后测定 EaRFC%, 取三管均值。

**淋巴细胞转化试验** 将 RPMI 1640 营养液(含 20%小牛血清)稀释的 CMMHC 和/或 PHA-M  $0.4$  ml 分别加入各培养管(对照组加营养液), 然后均加入淋巴细胞( $2 \times 10^6$ /ml)悬液  $0.1$  ml, 置  $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  培养箱培养。细胞终止培养前  $16$  h, 每管加入 [ $^3\text{H}$ ]TdR  $0.07$  MBq/ $25 \mu\text{l}$ 。细胞终止培养后, 用 49 型玻璃纤维滤纸、水泵抽滤, 按文献(3)的方法处理, 国产 FJ-353 双道液闪计数器计数, 结果以 cpm/ $2 \times 10^5$  细胞(三管均值)表示。

**小鼠体内给药方法** 将 Balb/c 小鼠按体重均匀分成 3 组, 生理盐水组, CMMHC 高剂量组( $5$  mg/鼠)/d, 和 CMMHC 低剂量组( $0.5$  mg/鼠)d。每日 ip( $0.5$  ml/鼠)一次, 连续  $7$  d, d 8 测定免疫细胞量。

**小鼠腹腔细胞量测定** 用 TC 199 营养液洗出腹腔细胞, 收集  $5$  ml 左右(得率  $>90\%$ ), 计数后离心, 量取上清液容量, 计算腹腔细胞量。然后将腹腔细胞涂片, Giemsa 染色, 每片计数  $200$  个细胞和其中 M $\phi$  数、多形核细胞

数, %取三片均值, 由 %算出 M $\phi$  量和淋巴细胞量。

**小鼠外周血白细胞量测定** 剪尾取血涂片, Giemsa 染色, 每片计数  $200$  个白细胞, 其中淋巴细胞 %取三片均值。摘眼球取血, 以 1%草酸铵溶液稀释  $20$  倍, 每鼠  $2$  管, 溶解红细胞后计数, 取两管均值。算出淋巴细胞量及其他白细胞量。

**统计学处理** 体外试验采用配对  $t$  测验, 其中一些指标采用相关系数检验。体内试验采用  $t$  测验。

## 结 果

**CMMHC 对 EaRFC% 恢复的影响** 胰酶处理的淋巴细胞, 经体外培养后, EaRFC% 可自然恢复。从表 1 可见, 氢化可的松可显著抑制 EaRFC% 的恢复, CMMHC 可促进 EaRFC% 的恢复, 又可显著减弱氢化可的松的抑制作用。

Tab 1. Effect of carboxymethyl-modified hemicellulose (CMMHC) on the restoration of active E rosette forming cell% (EaRFC%) of trypsin-treated lymphocytes. ( $\bar{x} \pm SD$ ), \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  (compared with control), ††  $p < 0.05$  (compared with hydrocortisone group)

Culture time(h)	Group	n	EaRFC%
12	Control	11	$15.6 \pm 2.8$
12	CMMHC( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	11	$21.5 \pm 3.5^{***}$
16	Control	6	$18.3 \pm 3.1$
16	Hydrocortisone ( $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	6	$11.4 \pm 2.3^{***}$
16	Hydrocortisone + CMMHC( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )	6	$15.2 \pm 4.1^{**,\dagger\dagger}$

**CMMHC 对正常 EaRFC% 的影响** HPBL 不经胰酶处理, 直接加药培养  $19$  h, CMMHC 可使 EaRFC% 显著增高(11 例)。对照组 EaRFC% 为  $26.5 \pm 2.4\%$ , CMMHC 组( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )为  $32.2 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.01$ )。EaRFC% 增高率为  $21.7 \pm 9.1\%$ 。

**CMMHC 对淋巴细胞转化的影响** HPBL 经浓度为 1% (vol/vol) 的 PHA-M 刺激、培养 72 h, cpm 最高。当 PHA-M 的浓度为 0.2% 时(培养 72 h), cpm 值因 PHA 浓度降低而降低。CMMHC 可使淋巴细胞对低剂量 PHA 的应答显著增强, cpm 值显著增高(表 2)。cpm 值的增高率与正常 EaRFC% 的增高率成正显著的正相关关系:  $r=0.685$ ,  $p<0.05$ , 10 例。

当 PHA-M 浓度为 1%, 培养 56 h 时, cpm 值因缩短培养时间而显著降低。CMMHC 可使 cpm 值显著增高(表 2); 但 cpm 值的增高率与正常 EaRFC% 的增高率没有明显的相关关系:  $r=0.016$ ,  $p<0.05$ , 10 例。

CMMHC 可促进淋巴细胞对 PHA 的应答, 但 CMMHC 以同样浓度单独作用于淋巴细胞时, 不能引起淋巴细胞转化, cpm 值无明显变化( $p>0.50$ , 表 2)。

**Tab 2. Effect of CMMHC on transformation of lymphocytes. n=10, ( $\bar{x}\pm SD$ ), \*\*\* $p<0.01$  (compared with PHA group)**

Group	Culture time(h)	cpm	% of increase
Control	72	408±125	
CMMHC(1 µg/ml)	72	451±112	
PHA(0.2%)	72	20307±9275	
PHA(0.2%)			
CMMHC(1 µg/ml)	72	27595±12252***	37±17
PHA(1%)	56	28235±10196	
PHA(1%)			
CMMHC(1 µg/ml)	56	40708±15140***	44±16
PHA(1%)	72	60815±18724	

**Tab 3. Effect of CMMHC on amount of immunocytes in mice.  $\bar{x}\pm SD$ , \*\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.01$  compared with saline group.**

CMMHC daily dose/mouse	Mice	Peripheral blood ( $\times 10^{-4}/ml$ )		Peritoneal fluid ( $\times 10^{-4}/mouse$ )	
		Lymphocytes	Other leukocytes	Mφ	Lymphocytes
0	11	104±25	239±87	389±133	207±72
5 mg	9	159±42***	373±91***	944±182***	359±79***
0.5 mg	9	205±53***	381±122***	688±255***	357±144***

**CMMHC 对小鼠免疫细胞量的影响** 两种剂量的 CMMHC 均可使小鼠外周血白细胞量和腹腔细胞量均显著增多。从表 3 可见, 在腹腔内, Mφ 和淋巴细胞量均显著增多; 在外周血中, 淋巴细胞量和其他白细胞量均显著增多。腹腔内多形核细胞则未见增多。对照组、低剂量组、高剂量组的腹腔多形核细胞分别为  $0.02\pm 0.05$ ,  $0.04\pm 0.02$ ,  $0.19\pm 0.34\%$ , 无显著差异( $p>0.05$ )。提示 CMMHC 不引起炎症、不引起趋化因子产生。

## 讨 论

本文通过体内外试验研究了 CMMHC 对 T 细胞活性和免疫细胞量的影响。结果表明, CMMHC 不是通过丝裂原样的作用, 而是通过一定的调节机理作用于 T 细胞, 增强 T 细胞活性。

T 细胞与绵羊红细胞(SRBC)结合和对 PHA 应答都涉及到细胞表面受体活性<sup>(4,5)</sup>和细胞代谢活性<sup>(6-8)</sup>。Ea 花环试验主要反映 E 受体结合能力, 淋巴细胞对低剂量 PHA 的应答, 也与受体结合能力密切相关。CMMHC 可使 EaRFC% 显著增高、淋巴细胞对低剂量 PHA 的应答增强, 而且两项指标的增高率成正相关, 表明 CMMHC 可使 T 细胞表面受体的结合能力显著增强、细胞免疫早期应答能力增强。

在淋转试验中; 淋巴细胞转化(DNA 合成)的高峰期是在 d 3(56-72 h)。但在此之前, 已有一些增殖速度较快、进入 S 期较早的细胞开

始合成 DNA<sup>(9)</sup>。当淋巴细胞经 1%PHA-M 刺激、培养 56 h 时, CMMHC 使 cpm 值显著增高, 表明该药可使细胞增殖速度加快、进入 S 期较早的细胞增多。

CMMHC 在体内不引起炎症, 在淋转试验中亦表明该药不能刺激淋巴细胞增殖。但该药却可使免疫细胞量显著增加, 提示 CMMHC 有可能主要是促进免疫细胞成熟过程中的分化增殖速度。

淋巴细胞经 1%PHA-M 刺激、培养 56 h 时, CMMHC 所致的 cpm 增高率与 EaRFC% 的增高率无相关。这表明 CMMHC 对 T 细胞的调节作用不是单纯与受体相互作用而增强受体结合能力, 促进细胞增殖速度提示该药可直接促进细胞代谢。T 细胞的 E 受体是处于不断的脱落和再生的过程中<sup>(10)</sup>, E 受体的再生涉及到细胞代谢和生物合成<sup>(8)</sup>。CMMHC 可促进胰酶处理后的淋巴细胞 E 受体的恢复, 提示 CMMHC 是通过促进细胞代谢而增强受体活性。

CMMHC 可促进巨噬细胞<sup>(1)</sup>和 T 细胞的活性、增加免疫细胞的数量, 还可以减弱氢化可的松的免疫抑制作用, 这对增强机体细胞免疫功能是十分有利的, 该药有可能成为一种应用范围较广的免疫调节药物。

### 参 考 文 献

1 冯作化、范秀容. 羧甲基变性半纤维素对小鼠腹

腔巨噬细胞的影响. 中华微生物学和免疫学杂志 1986; 6 : 318

- 2 刘庆良、章谷生、郑子颖. 人淋巴细胞的 E 花环. V. 用活性 E 花环试验筛选和评价细胞免疫增强剂. 上海免疫学杂志 1981; 1 (3) : 17
- 3 南京部队总医院临床医学实验科微生物室. 应用 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入淋巴细胞转化试验检查药物的免疫激发作用. 江苏医药 1978; 4 (10) : 45
- 4 Yu DTY. Human lymphocyte subpopulation: Early and late rosettes. *J Immunol* 1975; 115 : 91
- 5 Pierre AH, Richad IF. Characterization of the lymphocyte surface receptors for Con A and PHA. *Ibid* 1975; 114 : 710
- 6 Yu DTY. Human lymphocyte subpopulations: Giant SRBC rosettes. *Ibid* 1976; 116 : 1719
- 7 Florence B, Flemming K, Christoph W, Guy GB, Alain LDW. Lymphokine regulation of human lymphocyte proliferation: Formation of resting G<sub>0</sub> cells by removal of interleukin 2 in culture of proliferation T lymphocytes. *Cell Immunol* 1984; 86 : 337
- 8 Sheila CB, Vojislav SP, Robert AG. RNA and protein synthesis in spontaneous rosette formation by T lymphocytes. *J Immunol* 1975; 115 : 866
- 9 Jon RS, John SN. Synergistic effects on DNA synthesis of phytohemagglutinin or concanavalin A and lipopolysaccharide in human peripheral blood lymphocytes. *Ibid* 1975; 114 : 742
- 10 Sarmay G, Istvan L, Gergely J. Shedding and reappearance of Fc, C3 and SRBC receptors on peripheral lymphocytes from normal donors and chronic lymphatic leukaemia (CLL) patients. *Immunology* 1978; 34 : 315

*Acta Pharmacologica Sinica* 1987 Mar; 8 (2) : 169-173

## Effects of carboxymethyl-modified hemicellulose on activity of T lymphocytes and amount of immunocytes

FAN Xiu-Rong, FENG Zuo-Hua

(Dept of Biology, Wuhan University, Wuhan 430012)

**ABSTRACT** Carboxymethyl-modified hemicellulose (CMMHC) is a new antitumor

drug produced by Department of Wood Chemistry of Nanjing Forestry College. In

this paper, the effects of CMMHC on human T cells *in vitro* were studied by two experiments: Ea rosette formation and lymphocyte transformation. The results showed: (1) CMMHC 10  $\mu\text{g/ml}$  raised the Ea rosette forming cell% (EaRFC%) of lymphocytes by  $21.7 \pm 9.1\%$  ( $p < 0.01$ ), and accelerated the restoration of the EaRFC% of trypsin-treated lymphocytes; (2) CMMHC 1  $\mu\text{g/ml}$  enhanced the response of lymphocytes to low-dosage (0.2%, vol/vol) PHAM (cpm increased by  $37 \pm 17\%$ ,  $p < 0.01$ ), and accelerated the proliferation of lymphocytes; (3) CMMHC had no mitogenic effect on lymphocytes.

On d 8 after ip CMMHC, the immunocytes in peripheral blood and peritoneal

fluid of mice were collected. CMMHC raised the amount of lymphocytes (by 59–100%) and other leukocytes (by about 60%) in peripheral blood, and the amount of macrophages (by 70–140%) and lymphocytes (by about 70%) in peritoneal fluid, but the amount of peritoneal polymorphonuclear leukocytes showed no change ( $p > 0.05$ ), suggesting that CMMHC did not cause inflammatory reactions.

The results suggest that CMMHC augments cellular immunity by enhancing the number and activity of immunocytes.

**KEY WORDS** carboxymethyl-modified hemicellulose; T lymphocytes; cellular immunity; inbred Balb/c mice