

leakage rate, and performance of diabetic mice in the water maze test were taken as indicators. Our results show APP 64 peptide, 29 peptide and 11 peptide all showed effects in stimulating SY5Y cell growth, and improving performance of animals in the water maze test. The conclusion is that the neurotrophic action of soluble APP is lodged at the N terminus; APP 11 peptide is the shortest fragment that can preserve the neurotrophic action. This discovery will help towards further unraveling the structure-function relationship of APP.

**Key words:** APP N-terminus fragments    APP 11 peptide    Neurotrophic effect

## 人 NK 细胞克隆化培养条件的初步探讨\*

张彩

田志刚

(山东省医学科学院基础医学研究所 山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250062)

NK 细胞是机体十分重要的细胞群体,是机体天然免疫的主要承担者。它几乎参与了免疫系统的发生、发展及效应等重要环节的调节过程。其来源于骨髓,能促进造血细胞的发育分化,预防异基因骨髓移植的移植物抗宿主反应,促进骨髓植入和造血重建<sup>[1,2]</sup>。因此,NK 细胞的基础及其临床应用研究已成为近年研究的热点<sup>[3]</sup>。NK 细胞的克隆化培养技术是进行 NK 发育、识别机制及其功能研究的基础。我们对人外周血 NK 细胞进行了初步纯化,并对其克隆化培养的条件进行了初步摸索,现报告如下。

### 材料与amp;方法

#### 1. 主要试剂及设备

小鼠抗人 CD3 单抗,小鼠抗人 CD56 单抗,本室自制腹水,离子交换层析纯化,纯度 > 95%;小鼠抗人 CD3-FITC/CD56-PE, Pharmingen 公司;FITC 标记羊抗小鼠 IgG,北京挚诚生物技术研究所;rhIL-2,新鲜兔血清,本室自制;丝裂霉素 C,日本协和发酵工业株式会社;PHA,广州医工所;PMA, Sigma 公司;流式细胞仪 FACSscan, Becton Dickinson 产品;荧光显微镜, OLYMPUS。

#### 2. NK 细胞的纯化

取健康人外周血,用淋巴细胞分离液常规分离单个核细胞(PBMC),以 rhIL-2 1000u/ml 诱导培养 7-10 天,使 NK 细胞的数量得以扩增后,用补体依赖的细胞毒法去除 T 细胞,即将细胞与鼠抗人 CD3 单抗作用,

4℃30 分钟,加新鲜兔血清(1:2 稀释)37℃作用 1 小时,用淋巴细胞分离液分离活细胞,并经流式细胞仪(FACS)鉴定为 CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK 细胞。

#### 3. 淋巴细胞条件培养液(LCM)的制备<sup>[4]</sup>

用 PHA 5μg/ml, PMA 5ng/ml 及丝裂霉素 C 25μg/ml 处理后的 PBMC(0.5 × 10<sup>6</sup>/ml)刺激另一个体的 PBMC(2.5 × 10<sup>6</sup>/ml)2 小时,将细胞洗四次,重悬于含 10% FCS 的 RPMI1640, 37℃培养 40 小时,收集上清, 0.22μm 滤膜过滤备用。

#### 4. NK 细胞的克隆化培养

首先制备饲养细胞,即常规分离同种异体或自身的外周血单个核细胞,用丝裂霉素 C(25μg/ml)或阿糖胞苷(5-20μg/ml)或经 γ 射线照射(3000rad)抑制其增殖后,洗涤,调细胞数至 1 × 10<sup>6</sup>/ml,加至 96 孔板, 1 × 10<sup>5</sup>/0.1ml/孔。上述纯化的 NK 细胞经有限稀释至每 ml 含 5 个或 10 个细胞,加至含饲养细胞的 96 孔板, 0.1ml/孔,相当于每孔含 0.5 个或 1 个细胞,培养液为 RPMI1640(Gibco 公司),内含 20% 新生小牛血清、rhIL-2 100u-200u/ml(终浓度)和/或 PHA 10μg/ml 及 10% 的淋巴细胞条件培养液(LCM)。隔天换液,并及时补充 rhIL-2、PHA 及 LCM,每周补充新鲜的饲养细胞。观察克隆形成情况,选择单个克隆孔,待细胞长至足够数量,收集细胞,适当稀释后置 Φ35mm 带方格刻度的培养皿(Nunc, Inc.),镜下计数,计算每个克隆所含细胞数,并用间接免疫荧光法鉴定 NK 细胞表型。

本文 1999 年 8 月 17 日收到,2000 年 1 月 4 日接受。

\* 本项目受国家自然科学基金资助(No. 39870729)。

### 5. NK 细胞表型的鉴定

流式细胞法:收集细胞,100 $\mu$ l/孔,加入小鼠抗人 CD3-FITC/CD56-PE 单抗,终浓度为 5 $\mu$ g/ml,置 4 $^{\circ}$ C 30 分钟,用 PBS 洗两次,流式细胞仪分析,计算阳性细胞百分率。

间接免疫荧光法:细胞先加入鼠抗人 CD3 或 CD56 单抗,5 $\mu$ g/ml,置 4 $^{\circ}$ C 30 分钟,用 PBS 洗两次,再加 FITC 标记羊抗小鼠 IgG(1:10 稀释),100 $\mu$ l/管,用 PBS 洗两次后,荧光显微镜下计数荧光阳性细胞的比例。

## 结 果

### 1. NK 细胞纯化的效果

外周血单个核细胞经 rhIL-2 诱导后,CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞的比例由 5% - 10% 升至 50% 左右;经 CD3 单抗和兔补体处理后,NK 细胞的比例提高至 70% - 80%。而 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>T 细胞所占比例由 50% 降至 10% 左右。图 1 为处理前后 FACS 检测结果。

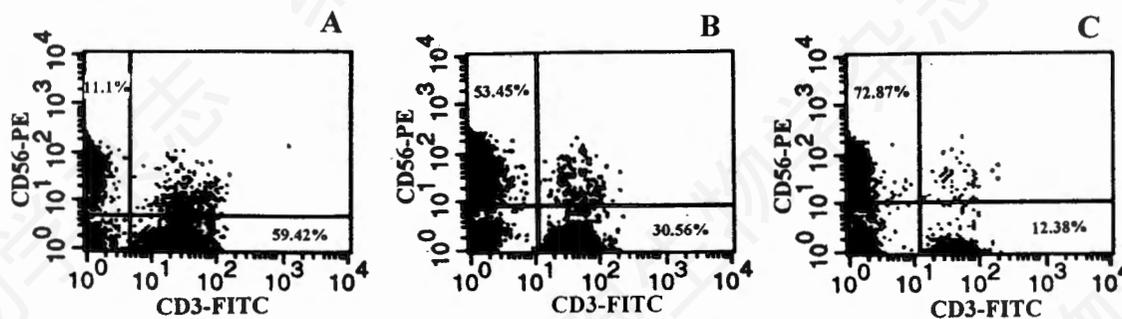


图 1 IL-2 诱导及去除 T 细胞后 NK 和 T 细胞比例的变化

A. 诱导前 B. IL-2 诱导的活化杀伤细胞 C. 经抗 CD3 单抗处理的 LAK 细胞

### 2. 饲养细胞抑制剂的选择

不同抑制剂抑制饲养细胞后,在 rhIL-2 200u/ml、PHA 10 $\mu$ g/ml、NK 细胞 0.5 个/孔条件下,获得 NK 细胞克隆的情况见表 1。由于  $\gamma$  射线照射条件不方便,且价格较贵,我们选择丝裂霉素 C(25 $\mu$ g/ml)作为饲养细胞的有效抑制剂。

表 1 不同饲养细胞抑制剂对 NK 细胞克隆化培养的影响

	阿糖胞苷	丝裂霉素 C	$\gamma$ 射线
克隆率 (%)	6.25	10.42	12.50
细胞数/克隆	2400 - 3600	7820 - 18900	6890 - 19950

### 3. NK 细胞克隆化培养的效果观察

如表 2 所示,共对 6 个供血者的 NK 细胞进行了六次克隆化培养,均用同种异体或自身的外周血单个核细胞经丝裂霉素 C(25 $\mu$ g/ml)作用 2 小时,抑制其增殖活性后,作为饲养细胞。设不同培养条件:培养液分别含 rhIL-2

100u/ml; rhIL-2 200u/ml; rhIL-2 200u/ml + PHA 10 $\mu$ g/ml; 均含 10% LCM。结果显示,每 96 孔板可获 4 - 16 个 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 克隆(由于细胞数量较少,用间接免疫荧光法鉴定,以 CD3 阴性、CD56<sup>+</sup> 细胞 > 95% 者为 NK 克隆),每个克隆的细胞数最多可达 2.35  $\times$  10<sup>4</sup>,存活约 3 - 5 周。经对不同培养条件下获得 NK 克隆情况的比较,我们认为,以 rhIL-2 200u/ml + PHA 10 $\mu$ g/ml + 10% LCM 较好,可获较高的克隆率和较多的细胞数量。由于细胞数量少,未进行 NK 细胞毒功能的测定。

## 讨 论

由于 NK 细胞仅占外周血单个核细胞的 5% - 10%,其在体外的扩增培养一直是个难题,高度纯化的 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK 细胞即使在大剂量 IL-2 存在下,仍难以增殖。多年来,许多免疫学者致力于寻找 NK 细胞的体外扩增和克隆化培养的有效方法,发现 NK 细胞的体外生

表2 人NK细胞的克隆化培养

接种细胞数/孔	培养条件	克隆率(%)	细胞数/克隆
0.5	rhIL-2(100u/ml)	4.17	2500-3400
0.5	rhIL-2(200u/ml)	6.25	2960-7900
0.5	rhIL-2(200u/ml) + PHA(10 $\mu$ g/ml)	12.50	7540-19820
1.0	rhIL-2(100u/ml)	6.25	2640-3850
1.0	rhIL-2(200u/ml)	8.33	3950-9800
1.0	rhIL-2(200u/ml) + PHA(10 $\mu$ g/ml)	16.67	7900-23500

长需要 IL-2 等细胞因子作为初始刺激剂及合适的饲养细胞以提供细胞密度的依赖性。NK 细胞克隆化培养的方法是从 T 细胞克隆培养中延续下来的,但其有效率明显低于 T 淋巴细胞。目前,国外 NK 细胞克隆化培养技术已逐渐成熟,并已建立起能长期传代培养的 NK 细胞系<sup>[5]</sup>,国内涉足此领域者尚少,使我国 NK 细胞的基础与应用研究受到限制。为此,我们对 NK 细胞克隆化培养的条件进行了初步的摸索,获得了一定数量的 NK 克隆,取得了一些经验。

关于饲养细胞抑制剂的选择,国外多用  $\gamma$  射线照射<sup>[6,7]</sup>。我们分别选用丝裂霉素 C、阿糖胞苷和  $\gamma$  射线照射作用于饲养细胞, $\gamma$  射线照射条件不方便,且价格较贵,而采用抑制细胞 DNA 合成的化疗药物,使饲养细胞不能增殖,但能提供被克隆细胞以细胞密度的依赖性,并能分泌某些促进细胞生长的刺激因子等。经比较,我们认为,选用丝裂霉素 C(25 $\mu$ g/ml)作用 2 小时效果较好。以同种异体或自身 PBMC 作为饲养细胞,未见明显差别。Hercend 等认为在 NK 细胞的克隆化培养过程中,除 IL-2 外,PHA 和 LCM 为较好的 NK 增殖的初始刺激剂,且可维持 NK 细胞的持续增殖<sup>[4]</sup>,但也有人认为 PHA 非 NK 增殖所必需。经不同培养条件比较,我们认为以 rhIL-2 200u/ml、PHA 10 $\mu$ g/ml 及 10% LCM 较好,可获得较多的 NK 克隆和细胞数。

我们正进一步改善实验条件,以提高克隆形成率,延长细胞存活时间,并对克隆的细胞进行功能和表型的鉴定,为 NK 细胞发育分化、识别机制、免疫调节功能及其临床应用的研究打下基础。

### 摘 要

为探讨 NK 细胞克隆化培养的条件,我们首先将人外周血单个核细胞经 rhIL-2 诱导,使 NK 细胞得以扩增后,去除 T 细胞,得到相对纯化的 NK 细胞。经有限稀释,在饲养细胞及 rhIL-2、PHA 及 LCM 等培养条件下,获得 NK 细胞的单个克隆并进行鉴定。结果表明,每 96 孔板可获 4-16 个 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 克隆,每个克隆的细胞数最多可达  $2.35 \times 10^4$ ,存活约 3-5 周。以丝裂霉素 C(25 $\mu$ g/ml)作为饲养细胞抑制剂,以 rhIL-2 200u/ml、PHA 10 $\mu$ g/ml 及 10% LCM 培养,可获得较多的克隆和细胞数。

关键词: NK 细胞 克隆培养

### 参 考 文 献

- [1] Moretta L et al., 1994, *Advances in Immunology*, **55**: 341.
- [2] 田志刚等, 1997, 国外医学肿瘤学分册, **24**(3): 133.
- [3] 田志刚等, 1999, 中国免疫学杂志, **15**(3): 142.
- [4] Hercend TH et al., 1982, *J Immunol.*, **129**: 1299.
- [5] Gong JH et al., 1994, *Leukemia*, **8**: 652.
- [6] Ciccone E et al., 1990, *J Exp Med.*, **172**: 47.
- [7] Suzuki N et al., 1990, *J Exp Med.*, **172**: 457.

## STUDY ON CLONAL CULTURE OF HUMAN NK CELLS

ZHANG Cai TIAN Zhi Gang

(Shandong Cancer Biotherapy Center, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

### ABSTRACT

The clonal culture condition of human NK cells was explored. Human NK cells were expanded from peripheral blood mononuclear cells by cultured with 1000u/ml IL-2 and then purified by complement dependent cytotoxicity(CDC) method to removing T cells. By limited dilution, single NK cell was cultured with allo-PBMC or auto-PBMC(feeder cells) in medium containing rhIL-2, PHA and lymphocyte conditioned medium (LCM). Then cloned cells were collected and identified. Our results indicated that: 4-16 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK clones(containing  $2.35 \times 10^4$  cells at most) can be obtained in per 96-well plate. The best cultural condition is : Mitomycin C(25 $\mu$ g/ml) as a feeder cell inhibitor, 0.5 or 1 NK cell cultured with feeder cells in medium containing rhIL-2 200u/ml, PHA 10 $\mu$ g/ml and 10% LCM.

**Key Words:** NK cell Clonal culture

## 衣藻细胞玻璃化超低温保存技术的研究\*

项黎新 邵健忠

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

细胞的玻璃化超低温保存是 80 年代中后期兴起的新技术, 由于其具有操作简捷、对细胞损伤小等优点而倍受关注。但目前有关该技术的研究和应用主要见诸于动物和高等植物<sup>[1-4]</sup>, 藻类中尚未见报道。近年来, 随着藻类在医药、化工和生物技术等领域研究和应用的不断深入, 藻类的种质保存显得十分迫切。但目前有关该领域的研究还较少, 多数实验室采用反复传代的保种方法费时费力, 且易造成遗传突变。本文以衣藻为材料, 初步建立其玻璃化超低温保存方法, 以期为藻类的种质保存研究积累资料。

### 材料和方法

#### 1. 衣藻及其培养方法

野生型莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*), 引自中国农业科学院生物技术中心。参照 Harris 等方法<sup>[5]</sup>, 将衣藻接种于 TAP 培养基, 25℃ 光照培养, 光

照强度 4000Lx。

#### 2. 衣藻的玻璃化超低温冻存

(1) 保护剂 参照 Sakai 等配方并作改进<sup>[6]</sup>, 即 TAP 培养基附加 30% (W/V) 甘油、15% (W/V) 乙二醇、15% (W/V) 二甲亚砷和 0.5mol/L 蔗糖溶液。

(2) 保护剂处理时间对衣藻活性的影响 取对数生长期衣藻 5ml, 经离心浓缩后加 0℃ 预冷的保护剂 1ml, 置冰浴中分别脱水处理 2.5、5、7.5 和 10 分钟后, 离心洗去保护剂, 测定衣藻细胞的存活率, 同时设不加保护剂处理组为对照。

(3) 玻璃化冻存前预培养 取对数生长期衣藻 5ml, 经离心浓缩后, 加入含 0.25mol/L 蔗糖的 TAP 培养基, 光照培养 1 天, 再加含 0.5 mol/L 蔗糖的 TAP 培养基, 继续光照培养 1 天。

(4) 玻璃化冻存 预培养的衣藻经离心浓缩后

本文 1999 年 11 月 4 日收到, 2000 年 3 月 3 日接受。

\* 国家自然科学基金资助项目(39970589 号)。

胡群同志参加部分工作, 王君晖博士、毛树坚教授和钱凯先教授给予大力帮助, 谨致谢忱。