

- [3] 邵介薇、高素梅, 甲₂巨球蛋白对辐照细胞的保护效应, 细胞生物学杂志, 1990, 12(4): 180—183。
- [4] Enghild, Jan. J., Salvesen G., Brew K & Nagase H. *J. Biol Chem* 1989, 264: 8779
- [5] Goutner A., Simmler, M. C., Tapon J & Roserfeld C. *Differentiation* 1976, 5, 171.
- [6] 邵松生等, 中华放射医学与防护杂志, 1988, 4, 271。
- [7] Miyanaga, O. *Immunology*, 1982, 47: 351.
- [8] Milton, J. N. *Immunology*, 1971, 20, 205
- [9] Chase P. S. *Cell Immunol*, 1972, 5, 544
- [10] Hellström I. *Transplant Proc.*, 1971, 3, 1221.
- [11] Grayzel, A. I. *Cell Immunol*, 1975, 18, 210.

人淋巴细胞经冻存复苏后 DNA、RNA 和蛋白质的合成代谢*

郑斯涌 金玉米** 胡晓明 徐婉燕
(杭州大学生物系)

长期冻存的人外周血淋巴细胞, 可为临床免疫检测及生物工程提供同一来源的细胞。近20年来, 对淋巴细胞冻存复苏后的免疫活性、细胞增殖能力和生理生化特性开展了大量研究工作^[1,2]。

经历长期冻存的淋巴细胞, 在复苏后不仅要求细胞成活, 而且还应具备转化和增殖能力。同位素掺入和放射自显影技术是研究细胞内核酸和蛋白质合成代谢过程的有效方法之一, 可以动态地示踪核酸和蛋白质的前体在细胞内的掺入部位及其相对数量。本实验采用检测 ³H-TdR, ³H-UR 和 ³H-Leu(亮氨酸)掺入量及其定位, 研究冻存前和冻存1年的淋巴细胞, 在复苏后其 DNA、RNA 和蛋白质的合成强度和合成部位上的差异, 为探索冻存技术和机理提供实验资料。

材料和方法

一、淋巴细胞的分离和冻融

O 型静脉血采自 27—35 岁的健康供血者, 以 ACD (NIH-A) 为抗凝剂, 淋巴细胞分离液分离得到淋巴细胞。

将来自同一供血者的淋巴细胞分成三组:

1. 新鲜对照组 淋巴细胞悬浮在 10% 人 AB 型血清 (ABS) 的 RPMI-1640 液内。细胞浓度为 5×10^6 个/毫升。

2. 冻存组 淋巴细胞悬浮在含 10% 二甲基亚砜和 40% ABS 的 RPMI-1640 液内, 细胞浓度与新鲜对照组相同。将细胞悬液分装于安瓿内, 每支 1 毫升。以每分钟降温 1℃ 的速率降至 -80℃ 后, 投入液氮内冻存。分别在冻存 10、20、40 和 365 天时取出样品, 37℃ 水浴内复温样品, 以含 10% ABS 的 1640 液洗涤后, 重新悬浮至原液量。

3. 冷冻致死组 除了在细胞悬液内不加入二甲基亚砜外, 其余的操作均与冻存组相同。

二、细胞回收率和存活率

血球计数板计数细胞的回收率。台盼蓝拒染法测定存活率。

三、放射性同位素测量

在 10 毫升培养瓶内, 各组淋巴细胞各加入 PHA 50 微升 (上海医学化验所产品), 37℃ 培养 52 小时后, 分别加入 ³H-TdR/ μ Ci (放射性比强度 43.3 Ci/mmol/L), ³H-UR 2 μ Ci (比强度 20 Ci/mmol/L), 或 ³H-Leu 5 μ Ci (比强度 57 Ci/mmol/L) (同位素均为上海原子核研究所产品)。继续培养 20 小时后, 液体闪烁计数仪测量 cpm, 样品一式 3 份。冻存各组的同位素测量结果, 仍按冻前的细胞数计算。

四、放射自显影

取新鲜与冻存 1 年的淋巴细胞按上法培养, 分别加入 ³H-TdR, ³H-UR 或 ³H-Leu 后, 继续培养 1 至 4 小时后, Hanks 液清洗凉干于载玻片上。甲醇-冰醋酸 (3:1) 固定, 核 4 乳胶 (中科院原子能所产品) 涂胶,

* 国家自然科学基金项目。

** 现在解放军总医院。

自显影 15 天后显影定影, Giemsa 液染色。光镜观察时以含 10 个以上银盐颗粒的细胞为标记阳性细胞。计数 100 个细胞, 计算细胞标记百分率。

结 果

一、回收率和存活率

冻存 10 至 365 天的各组淋巴细胞, 回收率均大于 90%, 存活率都在 95% 以上。冷冻致死组无存活的细胞(表 1)。

表 1 冻存人外周血淋巴细胞的回收率和存活率(%)

冻存天数	回收率	存活率
新鲜对照	100	100
10	100	96.7
20	97.5	97.9
40	98.5	96.1
365	90.5	95.2

表 2 冻存对人淋巴细胞的 $^3\text{H-TdR}$, $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 掺入量的影响

冻存天数	$^3\text{H-TdR}$		$^3\text{H-UR}$		$^3\text{H-Leu}$	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
新鲜对照	40816±3800	100	237144±30342	100	9930±873	100
10	38242±4833 (p>0.2)	93.7	220004±22218 (p>0.1)	92.8	8300±837 (p<0.01)	83.6
20	37664±4941 (p>0.2)	92.3	219268±28072 (p>0.1)	92.5	8780±1078 (p<0.05)	88.4
40	27455±3213 (p<0.05)	67.3	220889±11442 (p>0.1)	93.1	9010±506 (p<0.05)	90.7
365	23009±8728 (p<0.05)	56.4	122801±33583 (p<0.01)	51.8	7610±1144 (p<0.01)	76.6

1. n = 6
2. cpm: $\bar{X} \pm S.E.$
3. P 值: 各组与新鲜对照组相比较
4. %: 各以新鲜对照组为 100%, 与各组相比较

表 3 $^3\text{H-TdR}$, $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 在淋巴细胞内的标记百分率(%)

冻存天数	部 位	$^3\text{H-TdR}$	$^3\text{H-UR}$	$^3\text{H-Leu}$
新鲜对照	细胞质	6.0±1.8	45.2±8.0	42.7±8.6
	细胞核	43.5±4.6	14.3±4.8	10.8±4.4
365	细胞质	3.5±1.2	37.1±8.8	36.4±5.2
	细胞核	34.0±10.6	11.2±4.6	9.1±3.6

1. %: $\bar{X} \pm S.D.$
2. n = 6

二、同位素的掺入量

各组淋巴细胞的同位素掺入量见表 2。冻存 10 天时, $^3\text{H-TdR}$ 、 $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-Leu}$ 的掺入量分别达到新鲜对照组的 93.7%、92.8% 和 83.6%。比较冻存 20 天与冻存 10 天的测量结果, 经统计处理, 并无明显差别。冻存 40 天

时, 只有 $^3\text{H-TdR}$ 的掺入量明显下降。冻存 1 年时, 这三种同位素的掺入量才显著降低, 分别降为新鲜时对照组的 56.4%、51.8% 和 76.6%。这表明冻存 1 年后的淋巴细胞合成 DNA、RNA 和蛋白质的功能虽已减低, 但仍维持一定的水平。冷冻致死组未能测出这三种同位素的掺

入。

三、放射自显影图象的观察

在新鲜淋巴细胞的放射自显影涂片中,观察到 $^3\text{H-TdR}$ 掺入后的显影颗粒,绝大部分位于细胞核,标记率为43.5%,仅有少量在线粒体内,标记率为6.0%,细胞膜上未见到银粒。 $^3\text{H-UR}$ 标记的淋巴细胞,在细胞质与核内都可见到银粒的沉着,但主要分布在细胞质内,标记率共达59.5%。 $^3\text{H-Leu}$ 掺入后,主要分布在细胞质内,细胞膜及细胞核内仅有少量,见表3。

冻存1年组的观察,见细胞稍有皱缩,除极少数细胞变形,细胞质在一端突出外,绝大多数细胞的形态正常。3种同位素掺入后,在涂片中的银粒数量稍低于对照组。

冷冻致死组的淋巴细胞,绝大多数已破裂,极个别不破碎的细胞内,没有见到银粒沉着。

小 结

冻存1年时的人外周血淋巴细胞对DNA、RNA和蛋白质的代谢功能仍相当旺盛,三种前体物的掺入部位也无改变,细胞回收率及存活率也极高,结合我们以前的工作^[3],说明所采用的冻存技术和冻存液成分是合适的。

低温刺激和低温保护剂对冻存淋巴细胞有一定的损伤^[4]。随着冻存时间的延长,3种标记物的掺入量大体平行地缓慢下降。DNA合成量先下降,然后RNA和蛋白质代谢功能才下降,提示它们的代谢过程,对深低温保存的

敏感性并不完全一致。只要冻存措施合适,可以减轻细胞的损伤,经培养后,其功能可以基本上恢复至冻前水平。

摘 要

本实验采用同位素掺入和光镜放射自显影技术,研究新鲜未经冻存、冻存1年和冷冻杀伤的人外周血淋巴细胞,对 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-亮氨酸}$ 的掺入量进行测量。并观察其掺入部位,以反映淋巴细胞经过冻存不同时间后,它们的DNA、RNA和蛋白质的合成强度和合成部位。

实验结果表明,冻存1年的淋巴细胞,复苏后的回收率和存活率均在90%以上。PHA刺激后的 $^3\text{H-TdR}$ 、 $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-亮氨酸}$ 的掺入量,虽比冻存前降低,但仍相当活跃,保持较高水平。 $^3\text{H-TdR}$ 集中在细胞核, $^3\text{H-UR}$ 和 $^3\text{H-亮氨酸}$ 除分布在细胞质外,在核内也有一定数量。表明在合适的冻存条件下,长期深低温冻存的淋巴细胞,能保持较高的DNA、RNA和蛋白质合成代谢水平。

参 考 文 献

- [1] Mc Gann, L. E. et al., 1988, *Cryobiology*, 25:178-185.
- [2] 徐婉燕等, 1987, 细胞生物学杂志 3:125-130.
- [3] Zheng Siyong et al., 1987, *Low Temperature Medicine*, 13:9-12.
- [4] Venkataraman, M. et al., 1986, *Cryobiology*, 23:199-208.

中国细胞生物学学会通知

中国细胞生物学学会第五次全国大会1992年第四季度将在杭州召开。主要内容有:(1)专题学术讨论会(征集论文摘要的专题见本期封二)(2)改选理事会,成立第四届理事会(3)宣布第二次青年论文奖结果(参加评奖办法见本期插页4)。具体日期、地点,收费办法将另行通知。