

实验有直观的电泳图谱及扫描图谱,可看出修复率明显大于25%。因此两个实验室测定的修复率的差异,可能反映了不同细胞亚株间修复能力的差异。

在电泳图谱及扫描图谱中,可看到未加 EndoV 的对照组在凝胶前沿约 1 kb 处有一个明显的 EB 染色区,如果在电泳前先用 RNAase 短暂处理样品,该峰即消失,表明此染色区为残存 RNA。经 EndoV 处理后的样品中该峰亦消失,说明在我们的 EndoV 制品中含有 RNA 酶活力。

本文应用碱电泳法测定 EndoV 引起的单链断裂,与经典的碱性蔗糖密度梯度离心和碱洗脱方法比较,其特点在于(1)不需同位素标记细胞 DNA,从而可用于测定直接取自人体

的细胞标本;(2)直观性好,损伤及修复程度在电泳图谱上清晰可见,加以激光扫描更可直接看到 DNA 分子分布的改变;(3)可定量测定,从而能获得有关损伤程度的最直接参数。因此本法值得推广应用。

参 考 文 献

- [1] Friedberg EC. DNA Repair. W. H. Freeman & co., New York, 1985; 175—184.
- [2] Komura J, et al., 1989, *Photochem Photobiol.*, 49: 149.
- [3] 严涛等, 1990, 生物化学杂志, 6 (4): 382.
- [4] Freeman SE, et al., 1988, *Photochem Photobiol.*, 47: 159.
- [5] Vijg J, et al., 1984, *Mutation Res.*, 132: 129.

实验技术

肥大细胞与肺成纤维细胞共育方法*

郑 晖 钱仲棠

(湖南医科大学病理学教研室 长沙 410078)

近年来,肥大细胞(mast cell, MC)对成纤维细胞生长的影响受到人们的关注^[1]。MC与成纤维细胞共育方法为研究其影响的重要手段。我们取腹腔MC与同源动物肺成纤维细胞(lung fibroblast, LFB)共育,观察MC对LFB生长的影响,方法基本稳定,国内尚未见报道。现介绍如下。

材 料 与 方 法

一、动物

成年 Wistar 大鼠和出生不超过 1 天的 Wistar 乳鼠(本校动物中心提供)。

二、试剂及配制

1. RPMI-1640 细胞培养液: RPMI-1640(日本日水制药株式会社)含 15% 小牛血清, 1×10^5 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, 用 7.4% NaHCO_3 调 pH 至 7.4 ± 0.1 。

2. 胰蛋白酶(上海进口分装), 用 D-Hank's 液配成 0.25% (原代培养用) 和 0.05% (传代用) 溶液。

3. 无 Ca^{2+} , Mg^{2+} Tyrode's 液。

4. 肥大细胞分离液, 取比重 1.120 的 40% Ficoll 液; 用比重为 1.077 的淋巴细胞分离液(均为上海试剂二厂产品)调整其比重至 1.080。

三、方法

1. 腹腔 MC 分离纯化 参照吴谦介绍的方法^[2]。

* 国家自然科学基金资助课题。

取成年 Wistar 大鼠, 无菌条件下腹腔内注入 4 ml D-Hank's 液, 轻揉腹部, 收集腹腔冲洗液(如偏红色, 表明混入红细胞, 不能使用)。4℃离心, 1000 r/min, 10 min, 弃上清, 将细胞悬液缓慢沿管壁加入肥大细胞分离液液面上, 使两者形成界面。4℃离心, 4000 r/min, 15 min, MC 沉于管底, 用冷 Tyrode's 液离心清洗 2 次(4℃, 1000 r/min, 10 min)。以 RPMI-1640 培养液悬浮 MC, 涂片作甲苯胺蓝、番红 O 染色, 确认为 MC, 计算其纯度并计数。

2. MC 与 LFB 共育 用本室分离纯化的 LFB 做共育实验。取 24 孔板, 分 3 组, 每组 8 孔, 每孔 1 ml。第 I 组接种纯化的 LFB (1.5×10^4 细胞/ml); 第 II 组接种纯化的 LFB (1.5×10^4 细胞/ml), 于培养第 3 天加入 MC (1.5×10^4 细胞/ml); 第 III 组仅接种 MC (1.5×10^4 细胞/ml)。置 CO₂ 培养箱中培养(37℃, 5% CO₂), 每天观察各组细胞生长情况, 视其生长快慢更换培养液, 但应注意第 II 组加 MC 后 5 天内不能换液, 以防 MC 丢失。

结 果

1. 本法分离的 MC 纯度可达 85%。

2. 第 I 组未加 MC 的 LFB 呈单层贴壁生长, 边缘呈放射状向外扩展。

3. 第 II 组 MC 与 LFB 共育 1 天, 可见 MC 粘附于 LFB 表面(胰蛋白酶消化后两者分开), 细胞周围可见异染颗粒, 台盼蓝染色不着色。共育 8 天, MC 仍保持活性, 可见未脱颗粒的 MC, 胞质内积聚颗粒(图 1), 细胞深染, 颗粒密集, 不能分辨单个颗粒; 脱颗粒的 MC(图 2), 细胞内颗粒较稀疏, 清晰可见单个颗粒, 细胞外可见少量异染颗粒, LFB 生长较第 I 组迅速, 细胞数目显著增加, 共育 3 天时(相当于 LFB 培养第 5 天), 细胞数目由原来的 1.5×10^4 细胞/ml 增至 4.5×10^5 细胞/ml, 且呈多层(图 3), 相差显微镜观察可见重叠生长的 LFB(MC 对 LFB 生长的影响另文报道)。未加 MC 的 LFB 于培养第 5 天细胞数由 1.5×10^4 细胞/ml 增至 1.6×10^5 细胞/ml, 细

胞数目明显低于加 MC 组。

4. 第 III 组于培养第 3 天 MC 浮于培养液中, 台盼蓝染色着色, 表明 MC 已失去活性。

讨 论

本文结果表明 MC 在体外不能单独存活, MC 与 LFB 共育不仅可保持 MC 的活性, 且可促进 LFB 生长。与文献报道一致^[3]。

本实验的关键为 MC 的分离与纯化。为获得纯度较高且完整(即未脱颗粒)的 MC, 分离液的比重十分重要, 因淋巴细胞分离液比重为 1.077, 与 MC 分离液比重 1.080 非常接近。因此, 配制必须准确, 每次使用前均应校正比重。为尽量减少分离纯化过程中 MC 脱颗粒, 腹腔冲洗液收集后的操作应在 4℃下进行, 所用试剂应不含 Ca²⁺、Mg²⁺, 4℃保存。MC 悬液制成后应尽快加入至纯化的 LFB 中, 以免置体外时间过长而丧失活性。

MC 与 LFB 共育后, 更换培养液时须特别注意, 因不是所有 MC 均与 LFB 粘附在一起, 一部分 MC 仍悬浮于培养液中, 且有活性。因此应根据悬浮 MC 的多少采用不同的方法。如悬浮 MC 较多, 又必须换液时, 可将液体吸入离心管离心(4℃, 1000 r/min, 10 min)去上清, 将沉淀细胞仍接种于原培养孔中, 再加入新培养液; 如悬浮 MC 不多, 可将培养板静置 2—3 min, 然后用小吸管轻轻将培养液吸出, 尽可能减少 MC 丢失。

参 考 文 献

- [1] Levi-schoffer, F, Kupietzky A, 1990, *Exp cell Res.*, 188: 42—45.
- [2] 吴 谦等, 1981, 上海免疫学杂志, 4: 29—31.
- [3] Dayton ET, et al, 1989, *J. Immunol.*, 142: 4047—4051.