

## 参 考 文 献

- [1] Gallico GG, et al., 1984, *New Engl J Med.*, 311(7):448.
- [2] Eisinger M, et al., 1980, *Surgery.*, 88: 287.
- [3] Green H, et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76 (11):5665.
- [4] 王文正等, 1985, 第二军医大学学报, 6 (6):339.
- [5] 王伟等, 1988, 第二军医大学学报, 9 (2):116.
- [6] 普里斯特著, 刘权章译, 医学细胞遗传学和细胞培养, 科学出版社, 1985, p 348.

## 超薄层等电聚焦电泳对白血病小鼠胸腺和脾淋巴细胞脱氢酶同工酶的分析

云 昇

(内蒙古医学院第一附院内科)

舍 英

(内蒙古医学院中心研究室)

应用等电聚焦技术分析白血病细胞乳酸脱氢酶同工酶, 对于了解白血病细胞代谢及基因突变可能具有一定意义, 而过去有关报道极少。本文采用这种技术对正常纯系小鼠 615 和在此品系所建立的可移植性白血病小鼠 L 615 胸腺及脾淋巴细胞进行了乳酸脱氢酶(LDH)同工酶研究, 以探索患白血病动物淋巴细胞脱氢酶同工酶的变化。

## 材 料 和 方 法

## 一、实验动物

正常纯系小鼠 615 和可移植性白血病小鼠 L 615 各 30 只(中国医学科学院血研所提供); 体重 18—20 克, 6—8 周龄。

## 二、胸腺、脾淋巴细胞的分离及样品制备

乙醚麻醉, 挖右眼球放血后脱臼处死小鼠, 取胸腺及脾脏, 生理盐水洗净血污, 置于干净玻璃板上, 用细玻璃棒轻轻挤压, 使其释放出淋巴细胞。去掉剩余的结缔组织包膜, 收集挤压出的细胞, 用生理盐水将其稀释成细胞悬液, 然后将此悬液滴加在淋巴细胞分离液上面(此分离液由上海生物制品厂提供, 20℃时  $d = 1.077 \pm 0.002$  克/ml), 用 1500 转/分离心 15 分钟, 吸取淋巴细胞层, 如有红细胞污染, 可重复分

离 3—4 次, 用 2 ml 生理盐水洗涤 4 次, 最后得到分离纯化的淋巴细胞。取少量细胞涂片做姬姆萨—瑞氏染色、过氧化酶染色和糖原染色。调整细胞浓度大约为  $6 \times 10^6$ /ml, 然后冻融 5 次。用 1000 转/分, 离心 5 分钟, 取上清液做样品。

## 三、等电聚焦电泳

1. 仪器 稳流稳压电泳仪、电泳槽(圆盘及平板, 都带有绝缘冷却系统)、pH 计、光密度扫描仪。

2. 超薄层等电聚焦电泳 凝胶厚为 0.7mm, 凝胶浓度  $T = 8\%$ , 交联度  $C = 3\%$ , 兼性离子载体 Ampholine(pH 3.5—10.0, 瑞典 LKB 产品)在凝胶中的浓度为 2%。聚焦电泳在 0℃—4℃的环境下进行, 开始时用恒流, 即 0.5 mA/cm 凝胶, 当电压逐渐上升到 600 V 时改为恒压 600 V, 再继续电泳到电流为 0 时停止电泳。将凝胶放入乳酸脱氢酶染色液中<sup>[1]</sup>孵育 1 小时(37℃温箱内), 最后扫描定量。

3. 测凝胶 pH 梯度和同工酶带的等电点 凝胶有效长度为 10 cm, 将其从阳极到阴极等分 20 份, 每份加脱气双蒸水 1 ml, 搅碎凝胶, 于室温下过夜(一直在负压的抽气罐内), 然后用小型玻璃电极测 pH 值, 以凝胶长为横座标, 每段凝胶的 pH 值为纵座标, 绘 pH 曲线(图 1)。按照下列公式求各同工酶带在染色前迁移距离, 在 pH 曲线上找出相应的 pI 值。

$$\text{同工酶带染色前迁移距离} = \frac{\text{染色后同工酶带迁移距离}}{\text{染色后胶长}} \times \text{染色前胶长}$$

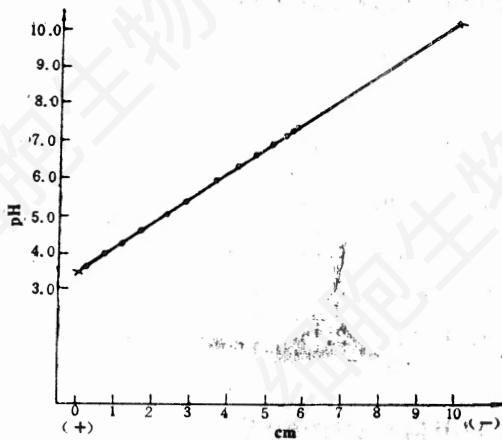


图1 凝胶pH梯度曲线

4. 盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳后再聚焦电泳先用中性pH——不连续系统<sup>[1]</sup>分离胸腺淋巴细胞LDH, 可以分出5条带, 分别取下5条带的凝胶, 搅碎后用样品进行等电聚焦电泳。

结 果

**一、胸腺和脾淋巴细胞的分离纯度及细胞组成** 细胞分离后涂片, 做常规染色及组织化学染色, 光镜观察, 计数200个细胞, 淋巴细胞分离纯度在98%以上。正常小鼠和白血病小鼠胸腺淋巴细胞形态一样, 过氧化酶及糖原染色都呈阴性; 而脾淋巴细胞的形态差别极大, 正常615小鼠脾淋巴细胞大都是胞体小、胞核致密的成熟分化细胞, 过氧化酶和糖原染色都是阴性; 白血病L615小鼠脾淋巴细胞只有10—15%为胞体小、核致密的成熟细胞, 其余85—90%是胞体大、核疏松的幼稚型细胞, 过氧化酶染色阴性, 糖原染色呈强阳性。

**二、胸腺淋巴细胞LDH同工酶** 两种小鼠胸腺淋巴细胞可分出12条同工酶带(图2中的Th), 其具有相同等电点的同工酶带扫描值无显著性差异( $p > 0.05$ , 表1)。

**三、脾淋巴细胞LDH同工酶** 615小鼠有10条带, L615有9条带(图2中的SP), 两种小鼠脾淋巴细胞LDH同工酶酶谱不同, 除第3、4和9带外, 其它具有相同等电点的同工酶带扫描值有显著或极显著性差异(表2)。

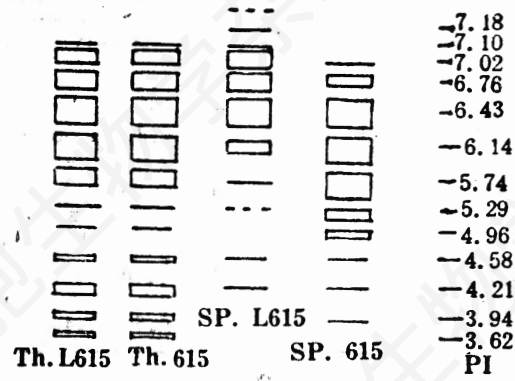
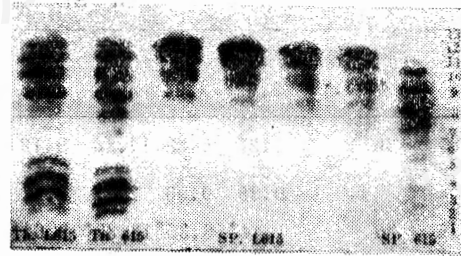


图2 615和L615小鼠胸腺(Th)、脾(SP)淋巴细胞LDH同工酶

**四、同工酶带产生人工假象的检测** 用含1%、2%和3% Ampholine的凝胶近阳极、近阴极加样和将样品混合于凝胶溶液, 结果同工酶带的数量和等电点都没有改变。如果在LDH同工酶显色的孵育液中不加底物(即乳酸钠), 酶反应呈阴性。根据上述实验结果可以认为本实验无人工假象及杂质。

**五、LDH同工酶带的等电点** 根据实验所测得的数据绘pH曲线(图1), 通过此曲线确定两种小鼠淋巴细胞同工酶等电点, 其范围在pH 3.62—7.20内。

**六、等电聚焦LDH同工酶带归属** 用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳后再聚焦电泳证实LDH-1、-2、-3分别是等电聚焦的第1、2、3带, LDH-4是第5、6带, LDH-5是第7—11带(图3)。这与文献报道一致<sup>[2]</sup>, 即LDH

表 1 615 和 L 615 小鼠胸腺淋巴细胞 LDH 同工酶扫描值比较

		M±SD (1-13, 阳极至阴极扫描值)													
鼠别	例数	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		pI	3.62	3.94	4.21	4.58	4.96	5.29	5.74	6.14	6.43	6.76	7.02	7.10	7.18
615	30		1.27 ± 0.38	5.58 ± 0.96	13.86 ± 2.27	9.12 ± 2.11	0.16 ± 0.04	1.31 ± 0.61	7.28 ± 1.50	13.99 ± 2.70	18.74 ± 4.74	15.41 ± 4.10	12.23 ± 2.82	1.05 ± 0.38	0
L 615	30		1.44* ± 0.26	6.35* ± 1.16	13.37* ± 2.10	9.61* ± 2.56	0.15* ± 0.04	1.32* ± 0.22	6.02* ± 1.84	13.82* ± 2.28	17.11* ± 2.15	16.26* ± 2.91	13.30* ± 2.05	1.25* ± 0.46	0

\*p>0.05

表 2 615 和 L 615 小鼠脾淋巴细胞 LDH 同工酶扫描值比较

		M±SD (1-13, 阳极至阴极扫描值)													
鼠别	例数	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
		pI	3.62	3.94	4.21	4.58	4.96	5.26	5.74	6.14	6.43	6.76	7.02	7.10	7.18
615	30		0 ± 0.35	1.60 ± 0.82	3.50 ± 0.82	1.75 ± 0.56	2.01 ± 0.49	7.16 ± 1.52	19.16 ± 2.73	22.17 ± 3.03	24.93 ± 2.98	14.49 ± 2.30	3.23 ± 0.32	0	0
L 615	30		0	0**	3.40* ± 0.59	1.87* ± 0.46	0**	0**	5.71** ± 1.68	18.11** ± 2.22	25.77** ± 2.38	19.53** ± 2.17	23.38** ± 2.68	1.96** ± 0.54	0.64** ± 0.20

\*p>0.05 \*\*p<0.01

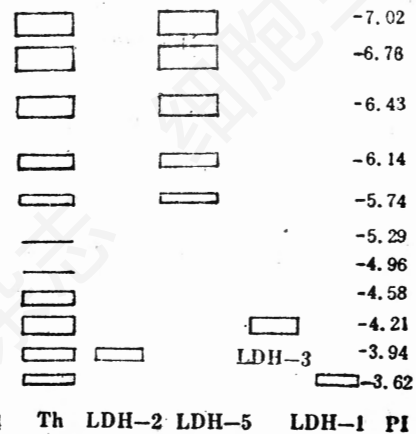


图 3 LDH 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦的对应关系

(Th, 胸腺; LDH-1、-2、-3、-4、-5 分别是其等电聚焦的图形)

在等电聚焦后从阳极到阴极 1—11 带分别是 H<sub>4</sub>、H<sub>3</sub>M<sup>1</sup>、H<sub>2</sub>M<sub>2</sub><sup>1</sup>、K、HM<sub>3</sub><sup>1</sup>(可以分出两条带)、M<sub>1</sub><sup>1</sup>、M<sub>1</sub>M<sub>2</sub><sup>2</sup>、M<sub>2</sub>M<sub>3</sub><sup>2</sup>、M<sub>1</sub>M<sub>3</sub><sup>2</sup>、M<sub>2</sub><sup>2</sup>。在 M<sub>2</sub><sup>2</sup> 的近阴极端还可分出 1—3 条很弱的带。

讨 论

用等电聚焦电泳分析 615 和 L 615 小鼠胸

腺及脾淋巴细胞 LDH 同工酶, 可以分出 5 条以上的同工酶带, 其等电点在 3.62—7.20 范围内。用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳后再聚焦电泳, 以及排除产生同工酶带人工假象的可能性等实验证实 LDH 等电聚焦后各同工酶的归属, LDH 等电聚焦后的第 4 带(文献上称为肾脏丰富型带, 即 K<sup>[2]</sup>), 其含量在两种小鼠脾淋巴

细胞内无显著性差异,它究竟归于哪一种同工酶,本文未做详细研究,有待进一步探讨。

文献报道<sup>[3]</sup>,由于肿瘤组织的迅速生长和旺盛的无氧酵解,肿瘤细胞的LDH同工酶M亚基含量增加,H亚基含量减少。本实验则发现L 615小鼠脾淋巴细胞以M<sup>2</sup>亚基为主的LDH同工酶带增多和以H亚基为主的同工酶带减少较明显。这种变化的原因是由于肿瘤细胞基因表达发生改变所致,还是由于转录后化学修饰发生变化所致,有待进一步研究。

有人报道<sup>[4]</sup>,小鼠LDH基因突变可以导致LDH同工酶等电点增高;本实验的结果是白血病细胞LDH同工酶等电点与正常细胞相同,所以推测白血病细胞的LDH基因可能没有发生突变,LDH同工酶的变化可能是通过其它机制。

另外,实验还发现,白血病细胞浸润脾脏高达80%以上,而且两种小鼠同工酶酶谱也不同;但胸腺几乎不被浸润(细胞形态及同工酶酶谱在两种小鼠间基本相同),说明本实验所

用小鼠其白血病细胞浸润组织器官具有选择性,这与文献报道<sup>[5]</sup>一致。

### 摘 要

用高分辨力的等电聚焦技术分析615和L 615小鼠胸腺及脾淋巴细胞LDH同工酶,表明两种小鼠胸腺淋巴细胞同工酶酶谱相同,具有相同等电点的条带含量无显著性差异;而两种小鼠脾淋巴细胞同工酶酶谱不同,某些具有相同等电点的同工酶带含量有显著或极显著性差异。

### 参 考 文 献

- [1] 吴鹤玲等, 1983, 遗传学实验和技术, pp. 158—159, 262, 高等教育出版社。
- [2] Klose, J. et al., 1975, *Biochem. Genet.*, 13:707—712.
- [3] 房世荣等, 1987, 中华血液学杂志, 8: 141—147.
- [4] Charles, D. T. et al., 1981, *Biochem. Genet.*, 19:831—837.
- [5] Bird, C. C. et al., 1972, *Br. J. Cancer*, 26:373—380.

## 一个能封闭造血祖细胞对重组人IL3反应的单克隆抗体—HI98

陈 璋 沈德诚 杨希峰 孙同哲 卞钟元 汤美华 段世利 苏月来

(中国医学科学院血液学研究所)

造血调节分子的研究是当前十分活跃的领域,四种集落刺激因子(CSF): IL3(多能CSF)、GM-CSF、G-CSF、M-CSF都已有重组产品,在临床试用亦已显示可喜的结果<sup>[1]</sup>。但是,相应因子受体的研究进展缓慢。由于在造血细胞表面受体含量甚微,很难制备抗体,而天然配体的亲和力一般较差,使研究受体十分困难。目前研究比较清楚的受体只有M-CSF受体。我们曾报道一个与粒、单核细胞分

化抗原反应的单克隆抗体(单抗)HI 98,又称HIM 1<sup>[2]</sup>。因其相应抗原分布特殊, Lewis (1989)报道HI 98单抗能特异性抑制<sup>125</sup>I-重组人IL3与KG 1靶细胞的结合,而不影响<sup>125</sup>I-重组人GM-CSF, <sup>125</sup>I-重组人G-CSF和<sup>125</sup>I-IL4与相应靶细胞的结合<sup>[3]</sup>,提示HI 98可能是一种抗人IL3受体相关分子的单抗。这一设想曾引起今年维也纳第四届人类白细胞分化抗原会议中一些专家的重视。本文报告用生物