

可见核膜小孔(图Ⅱ-A), 细胞核剖面可见双层核膜与核膜小孔(图Ⅱ-B)。线粒体的断裂面与剖面可见内、外限膜与嵴(图Ⅲ-A)。肾细胞的刷状缘清晰可见(图Ⅲ-A)。心肌(图Ⅲ-B), 骨骼肌(图Ⅲ-C)横断面, 可见肌丝呈六角点阵排列。肝细胞的胆小管及微绒毛亦清晰可见(图Ⅲ-D、E)。

参考文献

- [1] Hall, C. E.: A low temperature replica method for electron microscopy. *J. appl. physics*, 21, 61—62 (1950).
[2] Meryman, H. T.: Replication of frozen liquids by vacuum evaporation. *J.*

appl. Physics, 21, 68 (1950).

- [3] Steere, R. L.: Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 45—60 (1957).
[4] Moor, H., Mühlenthaler, K., Waldner, H., Fry-Wyssling, A.: A new freezing ultramicrotome. *J. biophys. biochem. Cytol.* 10, 1—13. (1961).
[5] Bullivant, S., Ames, A.: A simple freeze-fracture replication method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 29, 435—447 (1966).
[6] 吴玉薇、鲁崎唔、傅广礼: 一种简易冰冻断裂装置及其实验方法 《生物化学与生物物理进展》, 第1期, 46—48, (1979).

重建型“B”小鼠模型及其鉴定*

李绍康 顾琪

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

“B”小鼠指的是体内缺乏成熟的胸腺依赖性淋巴细胞即T细胞的小鼠。这种小鼠无法产生细胞免疫反应及其它与T细胞有关的反应, 因而得到广泛的应用。新生去胸腺小鼠与天然无胸腺裸鼠(Nude mice)都可以称为“B”小鼠。若把断奶小鼠的胸腺摘除后, 以致死剂量X—射线全身照射, 同时用正常小鼠骨髓重建其造血系统, 就产生了另一类“B”小鼠模型, 可称重建型小鼠^[1,2]。鉴定“B”小鼠有多种手段, 如检查在胸腺依赖性抗原刺激下不产生抗体现象, 同种或异种皮肤移植, 以及抗淋巴细胞表面标志的抗血清的膜荧光反应和细胞毒反应等^[1,3]。由于“B”小鼠对肿瘤移植缺乏排斥能力, 往往用于研究肿瘤^[4,5]。此外, “B”小鼠还经常用来研究淋巴细胞亚群之间的协作关系和淋巴细胞分化等免疫学基础课题^[6,7,8]。本文报道我们建立的重建型“B”小鼠模型, 几种鉴定手段, 以及在肿瘤和免疫学研究中的初步应用。

材料和方法

(一)实验动物

C57BL小鼠和津白小鼠。本所动物房供应。

(二)动物肿瘤

1. 大鼠肿瘤 BERH-2。系由二乙基亚硝胺诱发的大鼠原发性肝细胞肝癌的移植型大鼠实体瘤^[9]。

2. 大鼠肿瘤 Walker-256。中国科学院上海药物所提供。

(三)抗Thy1血清及抗体

1. 抗Thy1血清: 参照Golub的方法^[10], 用小鼠脑组织免疫家兔获得。在有补体存在时, 抗血清0.1毫升可杀伤 2×10^7 胸腺细胞, 但不杀伤骨髓细胞。

* 李秀兰同志参加部分工作。张宗梁和王珏同志协助测定淋巴细胞转化。王球达和林国妹同志协助重建造血系统。特此感谢。

2. 抗Thyl抗体: 根据脑细胞吸附-酸解离技术, 从兔抗小鼠胸腺细胞抗血清中分离得到^[11]。

(四) “B”小鼠

按Hudson及Hay的方法^[2]略有改变。

1. 摘除胸腺: 用巴比妥麻醉断奶小鼠后, 从喉部往后剪开胸前皮肤, 打开胸腔, 暴露胸腺。立即用细镊子夹出两片胸腺, 并尽快缝合, 以避免发生气胸。

2. X-射线处理: 摘除胸腺后约1个月的小鼠断食1天, 然后用X-射线作一次全身照射。剂量率65R/分, 焦距40厘米, 总剂量800R。

3. 骨髓细胞的分离、处理及转输: 均在无菌条件下操作。先剥离正常小鼠股骨, 分离骨髓细胞。然后将细胞悬液与抗Thyl血清及豚鼠血清一起在37℃温育30分钟(每 2×10^7 细胞加0.1毫升抗血清和0.1毫升豚鼠血清)。在照射的当天, 在受照射小鼠尾静脉注射骨髓细胞, 剂量为每鼠 1×10^7 细胞/0.5毫升。

4. 饲养条件: 重建小鼠饲养在普通饲养室中, 但笼具和食料均经消毒处理, 饮水含新霉素100毫克/升, 四环素62500单位/升。

(五) 肿瘤接种

1. 大鼠BERH-2移植肝癌: 将 $1 \times 1 \times 3$ 毫米大小瘤组织块用套管塞入照射后2—4周的津白小鼠腋窝皮下。

2. 大鼠Walker-256: 用Hank氏液配制1:1的瘤组织悬液, 在照射后1个月的C57BL小鼠鼠蹊部皮下注射, 每鼠0.5毫升。

(六) 依赖补体的抗血清细胞毒

小鼠脾脏(或胸腺、肠系膜淋巴结)细胞悬液用Tris-NH₄CL缓冲液破坏红血球, 洗涤两次, 计数并检查死细胞率。反应管内置 2×10^6 细胞(0.1毫升)及抗Thyl血清(0.1毫升), 混匀后加新鲜或冻存的豚鼠血清(0.1毫升)作补体, 充分摇匀, 置37℃温育20分钟, 其间摇动一次。用锥虫兰排除试验检查死细胞率。

(七) 淋巴细胞转化试验

参照张宗梁等同位素参入法^[12]。反应管内放置 2.5×10^6 脾细胞(0.2毫升)及2.5毫微克刀豆蛋白(ConA), 在培液中温育48小时(37℃)后, 加0.1 μ Ci的5-¹²⁵碘脱氧尿嘧啶核苷(¹²⁵IUdR)继续温育16小时。细胞洗涤两次, 在NE8312自动测试仪上计数, 并根据下式求得刺激指数:

$$\text{刺激指数(S.I.)} = \frac{\text{实验管脉冲数(CPM)}}{\text{正常对照管脉冲数(CPM)}}$$

结 果

(一) 重建型小鼠存活情况

鉴于经致死剂量照射的小鼠一般都在10天之内死于造血功能的衰竭, 我们取照射后两周存活的重建型小鼠数为计算存活率的指标, 其结果如表1所示。

表1 重建型小鼠存活情况

照射—重建 日 期	试验动物数	存活动物数	存活率(%)
78.3. 15	36	29	80.6
78.5. 4	22	17	80.0
78.6. 7	40	12	30.0*
78.11.30	45	34	75.6
总 计	143	92	64.3

* 处于台风前夕, 天气骤热, 气压很低, 引起大批死亡。

为了观察长期存活情况, 将一组重建型小鼠留养了两个月以上。照射—重建后30天及60天的存活率分别为84.6%(11/13)及69.2%(9/13)。

(二) 重建型小鼠脾脏T细胞的检测及肿瘤移植

1. 细胞毒试验: 兔抗Thyl血清的细胞毒反应表明, 重建型小鼠脾脏细胞中即使有T细胞, 也是为数极少的(表2)。

2. 淋巴细胞转化试验: 在ConA刺激下, 重建型小鼠脾细胞的¹²⁵IUdR参入量接近空白对照值, 与照射对照组和正常对照组相比有极

显著差异($P<0.001$)(表3)。ConA是对T细胞专一的致有丝分裂原,此结果证明该种小鼠脾脏缺乏T细胞。

表2 抗Thy1血清对小鼠脾细胞的依赖补体的细胞毒反应

实验日期	动物数	细胞来源	细胞死亡率(%)	差异显著性
78.4.24	4	重建小鼠	2.0 ± 1.5	$P<0.001^*$
	4	正常对照	25.4 ± 2.4	
78.7.10	3	重建小鼠	3.9 ± 0.8	$P<0.001$
	3	照射对照	23.4 ± 0.3	

* Student氏t试验

表3 重建型小鼠脾细胞对ConA的反应

组别	空白对照组		ConA处理组	
	计数(CPM)	刺激指数	计数(CPM)	刺激指数
重建型小鼠	988	0.62 ± 0.06	1588	1.1 ± 0.1
	828		1788	
	885		1493	
照射对照	1263	0.81 ± 0.11	11504	8.0 ± 0.5
	963		13703	
	1311		10115	
正常对照	1355	—	12074	7.8 ± 0.7
	1632		11766	
	1450		10542	

3. 异种肿瘤移植:大鼠肿瘤BERH-2的移植,8例中有3例获得成功,而无论是照射对照小鼠,还是正常小鼠,均无一例成功(表4)。肿瘤在重建型小鼠体内的生长特性,与在

表4 重建型小鼠异种肿瘤移植情况

组别	长瘤个体数/总数	肿瘤	
		BERH-2	Walker-256
重建型小鼠		3/8	8/8
照射小鼠		0/5	0/7
正常对照		0/4	0/4

大鼠体内的情况相似,两周内无明显变化,第三周开始呈进行性生长。(图版图1)是接种后35天拍摄的带瘤小鼠,瘤重0.48克。瘤组织切片(图版图2)与供体瘤组织切片^[9]十分相似。大鼠Walker-256肿瘤在重建型小鼠体内接种的成功率达100%(表4)。(图版图3)是瘤组织切片。

(三) 利用重建型小鼠鉴定固相吸附的Thy1抗体

根据重建型小鼠淋巴组织中主要是B细胞的特点,进行了固相吸附的Thy1抗体的细胞毒试验,借以鉴定抗体的纯度。结果发现,这种抗体只对胸腺细胞起反应,而对重建型小鼠淋巴细胞几无杀伤作用(表5第1—3批抗体)。但我们也发现制备的第4批Thy1抗体,对重建型小鼠淋巴细胞有相当程度的杀伤作用,提示混有其它抗体成分。

表5 固相吸附兔抗小鼠Thy1抗体的细胞毒试验

抗体批号	靶细胞来源	细胞死亡率(%)
1	重建型小鼠脾脏及淋巴结	2.6
2		3.8
3		4.3
4		32.7
1	正常小鼠胸腺	95.0

讨 论

小鼠经受致死剂量全身照射后,淋巴细胞丧失活性及分裂能力。对于C57BL小鼠,700R的照射剂量足以达此要求^[13]。津白小鼠的致死剂量,根据我们的初步摸索,也不超过800R*。照射后的个体转输了正常骨髓细胞后,因造血系统得以重建而存活下来。但若预先摘除了胸腺,则无法重新产生T细胞,这种小鼠就是重建型“B”小鼠。我们用于重建的骨髓细胞,预先杀灭了可能混有的少量成熟的T细胞,因

* 对7只津白小鼠作800R一次全身照射的结果,除1只活到第20天外,其余全部在12天之内死亡。

而可称“超级B小鼠”(Super B mice)^[1]。从细胞毒反应,淋转试验及肿瘤移植等体内外指标看来,该种“B”小鼠基本上缺乏T细胞的反应。但从低水平的细胞毒效应(2.0—3.9%)以及略大于1的刺激指数来分析,似不能排除存在少量T细胞的可能性。这与Raff的观察一致^[14]。尽管可以分析多方面的原因,我们觉得胸腺摘除不全是其中值得探讨的原因之一。由于胸腺组织十分娇嫩,为了避免出血又不能用力过大,因而难免有时发生撕裂,或者没有全部摘除。我们注意到了这种可能性,每只“B”小鼠在解剖时,首先打开胸腔,仔细检查是否存在胸腺残余。但这种措施也并不能完全排除保留着肉眼难以觉察的细小组织碎片或少量胸腺上皮细胞的个别小鼠,混入“B”小鼠材料中的可能性。这是需要改进的一个重要环节。胸腺摘除术及检查胸腺残余工作若在解剖镜下进行,预计会有较好的效果。

利用“B”小鼠研究移植肿瘤始于1962年^[4],研究淋巴细胞亚群在重建免疫反应方面的作用,也在1968年以后广泛开展^[6,7]。近年有人在重建型“B”小鼠对绵羊红血球的反应体系中,证实了小鼠T细胞的亚群Ly1细胞和Ly23细胞在体外试验中所发现的特种功能,即前者是辅助细胞,后者是抑制细胞。此后他们又发现,若Ly1细胞与Ly23细胞分别在重建型小鼠体内维持半年,各自仍具有辅助和杀伤功能,从而有力地证明,T细胞的这两个亚群是从同一类干细胞沿不同路线分化的^[8,15]。也有人利用重建型小鼠作为B细胞来源,制备小鼠B细胞特异性抗原(MBLA)的抗血清^[16,17]。我们在这方面的工作将另行报道。本文初步报道大鼠肿瘤BERH-2及Walker-256在重建型小鼠体内得以进行性生长的现象,表明该种小鼠的异种肿瘤排斥能力很差,可以为肿瘤研究提供模型。对固相吸附的Thy1抗体的成功鉴定,为使用这类抗体提供了条件。在带瘤动物脾脏细胞静止效应试验^[12]中,用这种重建型小鼠接种艾氏腹水瘤后,其脾脏细胞对相应的

瘤细胞仍有显著的细胞静止效应,提示效应细胞不大可能是T细胞。这类工作为重建型“B”小鼠在肿瘤免疫研究中的应用提供了例证。

摘 要

用摘除胸腺,致死剂量X-线全身照射后转输骨髓细胞的办法,获得了重建型“B”小鼠。此种小鼠缺乏T细胞的各种免疫反应。其脾脏细胞不为抗Thy1抗血清和补体所杀伤,对ConA的刺激无应答反应。因此,大鼠BERH-2肝癌和Walker-256瘤在这种小鼠体内的移植,都获得了成功。利用重建型小鼠的淋巴细胞主要是B细胞的特点,对于抗Thy1抗体的纯度作了鉴定。

参 考 文 献

- [1] McConnell, I., 1976. Cell interactions in the allergic response, in *The Immune System*, pp. 133—134, Blackwell Scientific Publications.
- [2] Hudson, L. and F. C. Hay, 1976. in *Practical Immunology*, pp. 233—234, Blackwell Scientific Publications.
- [3] Miller, J. F. A. P., 1962. Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 156:415—428.
- [4] Martinez, C., A. Dalmaso and R. A. Good, 1962. Acceptance of tumor homografts by thymectomized mice. *Nature*, 194: 1289—1290.
- [5] Rygaard, J. and C. O. Povlsen, 1969. Heterotransplantation of a human malignant tumor to “nude” mice. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 77:758—760.
- [6] Miller, J. F. A. P. and G. F. Mitchell, 1968. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus of thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 128: 801—820.
- [7] Mitchell, G. F. and J. F. A. P. Miller, 1968. Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated

- mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes., *J. Exp. Med.*, 128: 821—837.
- [8] Cantor, H. and E. A. Boyse, 1977. Lymphocytes as models for study of mammalian cellular differentiation. *Immunological Rev.*, 33: 105—124.
- [9] 强家熾, 季闻行, 孙兰英及徐永华, 1978. 大鼠移植性肝癌(BERH-2)的研究。I、建株, 形态和超微结构及甲胎蛋白的研究。实验生物学报, 11: 87—96.
- [10] Golub, E. S., 1971. Brain-associated θ antigen: reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells. *Cell. Immunol.*, 2: 353—361.
- [11] Bins, H., J. Lindenmann and H. Wigzell, 1974. Cell Bound receptors for alloantigens on normal lymphocytes. I. Characterization of receptor carrying cells by the use of antibodies to alloantibodies. *J. Exp. Med.*, 139: 877—887.
- [12] 张宗梁, 王珏, 王球达及姚鑫, 1979. 肿瘤宿主免疫状态。Ⅱ、带 Ehrlich 实体瘤小鼠脾脏细胞在体外对肿瘤细胞的细胞静止效应的动态观察。实验生物学报, 12: 13—27.
- [13] Coppel, R. L. and G.F. Mitchell, 1975. Studies on accessory cells in the adoptive antibody response to sheep erythrocytes in mice. *Cell. Immunol.*, 18: 411—423.
- [14] Raff, M. C., 1970. Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. *Immunol.*, 19: 637—650.
- [15] Cantor, H., F. W. Shen., and E. A. Boyse., 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: After immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J. Exp. Med.*, 143: 1391—1401.
- [16] Raff, M. C., S. Naei., and N.A. Mitchison, 1971. Mouse specific bone marrow-derived lymphocyte antigen as a marker for thymus-independent lymphocytes. *Nature.*, 230: 50—51.
- [17] Lamelin, J. P., B. Lisowska-Bernstein, A. Matter, J. E. Ryser., and P. Vassalli, 1972. Mouse thymus-independent and thymus-derived lymphoid cells. I. Immunofluorescent and functional studies. *J. Exp. Med.*, 136: 984—1007.

文摘

癌细胞的诱导分化

专一性诱导物质的发现给研究细胞分化提供了一个有利的工具。诱导正常细胞分化的诱导物能否引起癌细胞正常分化? 近年来, 以色列 Sachs 教授为首的实验室对不同来源的髓性白血病作了广泛的研究。发现未成熟的正常髓细胞分化为巨噬细胞和粒细胞需要巨噬细胞——粒细胞诱导物(MGI)。而髓性白血病细胞亚株 $Fc^+C_3D_3$ 同样也能被这种 MGI 蛋白诱导物诱导形成具有免疫球蛋白 Fe 部分和补体(C3)成分的表面膜受体, 能合成和分泌溶菌酶, 最终分化为成熟的巨噬细胞和粒细胞, 失去其恶性生长的性质。髓性白血病细胞被 MGI 诱导形成的粒细胞在行为上完全象正常粒细胞。此外, 还有一种 $Fc^+C_3D^-$ 髓性白血病细胞亚株, 被 MGI 诱导也能形成 Fc 和 C3 的表面膜受体, 分泌溶菌酶。但诱导率比 $Fc^+C_3D^+$ 细胞低得多, 且不能被诱导分化为成熟的粒细胞或巨噬细胞。第三种细胞亚株 $Fc^-C_3D^-$, 既不能被诱导形成 Fc 和 C3 的膜受体, 或合成溶菌酶, 也不能分化为成熟细胞。然而这三种细胞株的母细胞均在动物体可引起髓性白血病。MGI 对这三种髓性白血病细胞株诱导能力的不同, 可能反映着不同细胞株本身遗传物质的差异。染色体分带技术证明, 这三种细胞的染色体均缺乏完全正常的双倍体分带。 $Fc^+C_3D^+$ 细胞能被 MGI 诱导进行正常分化, 似乎只是一种正常分化的表型, 而不是一种完全正常的基因型。另外, 也发现 $Fc^+C_3D^+$ 和 $Fc^+C_3D^-$ 细胞间存在着特殊染色体的差别。髓性白血病 $Fc^-C_3D^-$ 细胞株其染色体 2 的片段丢失; 而在 $Fc^+C_3D^+$, $Fc^+C_3D^-$ 或淋巴样白血病却未发现丢失。从一个染色体 2 片段丢失, 但带有一个正常染色体 12 和二一个转位染色体 12 片段的 $Fc^-C_3D^-$ 细胞株得到的 $Fc^+C_3D^+$ 突变体, 其仍保持异常染色体 2, 而丢失一个正常染色体 12 或其中一个转位染色体 12。结果表明, 染色体 2 和 12 除了带有控制髓性白血病细胞分化的诱导基因外, 还载负着控制髓性白血病细胞恶性生长的基因。这些资料支持癌细胞分化控制的多基因学说。这些基因控制恶性生长和分化以及基因表达取决于这些不同基因之间的平衡。