

人体 B 淋巴细胞表面膜免疫球蛋白 和 EB 病毒受体的测定和比较

孙曼钧 姚曾序

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

人体 B 淋巴细胞表面带有多种标志, 如表面膜免疫球蛋白(SmIg), C_3 受体, Fc 受体, EB 病毒受体等。近年来根据这些表面标志, 建立了多种相应的检测方法, 其中常用的有 EAC—花环法测定 C_3 受体, 免疫荧光法测定 SmIg, Fc 受体等。由于 C_3 受体和 Fc 受体不仅在 B 淋巴细胞表面有, 也见于其他淋巴细胞亚群, 因此以这两种受体的存在作为鉴定 B 淋巴细胞的标志, 特异性较差。SmIg 的检测一般用多价抗 Ig 抗体或单价抗 IgM 抗体作免疫荧光测定。由于 B 淋巴细胞表面的 Fc 受体能与聚合的 IgG 或抗原—抗体 (IgG 型) 复合物的 Fc 端相结合, 而且在其他亚群的淋巴细胞表面也有 Fc 受体存在, 为此不少学者建议最好改用抗 $F(ab)_2$ 抗体作为 SmIg 的探针。人的 B 淋巴细胞表面的 EB 病毒受体, 由于检测过程繁琐, 又需要特异的抗 EB 病毒血清, 因而未能作为常用的检测手段。但是 Greaves 和 Brown (1975)^[1] 认为此种受体的检测是鉴别人的 B 淋巴细胞的可靠的标志。鉴于 SmIg 和 EB 病毒受体在检测 B 淋巴细胞方面所各具有的特殊性质, 以及其检测结果是否可以类比, 因此我们平行地进行了以抗人 $F(ab)_2$ 抗体结合羊红细胞花环形成试验测定 SmIg 的同时, 以间接膜免疫荧光法测定 EB 病毒受体。本文报道了两种方法的测定条件及结果的比较。

材料和方法

人 IgG $F(ab)_2$ 及其抗血清的制备

人 IgG $F(ab)_2$ 的纯化主要参考 Stanworth 和 Turner 的方法^[2]。溶解于醋酸缓冲液中的 IgG 以每

100 毫克加 3 毫克胃蛋白酶 (上海东风试剂厂生产), 混合后在 37℃ 水浴中缓慢搅动 18 小时。随后经 1N NaOH 把消化物的 pH 调至 8.0, 并对 pH8.0 的硼酸缓冲液透析后, 装 Sephadex G-150 柱 (120×2.5 厘米), 用上述硼酸缓冲液洗脱, 流速 18 毫升/小时, 分管收集。取蛋白含量较高并经 Garvey 方法^[3] 检测为 $F(ab)_2$ 部分的各管, 合并后冰冻干燥, 冰箱保存。制备抗血清是每只兔子一次免疫 2 毫克 $F(ab)_2$ 蛋白 (在 0.5 毫升硼酸缓冲液中) 和相同量福氏完全佐剂的乳化物。8 周时间共免疫 5 次。抗体效价为 1:80—1:160 (稀释抗血清)。上项抗血清经 33% 硫酸铵沉淀两次, 透析平衡后上入 IgG 亲和层析柱, 用 0.01M HCl 洗脱。浓缩后冰箱保存备用。

人 $F(ab)_2$ 抗体致敏羊红细胞 (以下称 SRBC)

经 0.9% NaCl 溶液洗 3 次, 用同一溶液配成 5% 悬液。CrCl₃·10H₂O 溶液的配制用两种方法。新鲜的 CrCl₃ 溶液是在实验前用 0.9% NaCl 溶液配制成 0.1% 的浓度, 再以 1N NaOH 调 pH 至 5.0, 室温静置 1 小时后备用。另一种是“成熟”的 CrCl₃ 溶液。1% CrCl₃ 液用 1N NaOH 将 pH 调至 5.0, 每周调节 pH 值 3 次, 连续 3 周。实验前稀释 10 倍后备用。纯化的抗 $F(ab)_2$ IgG 按最适蛋白量稀释。在室温中将 0.1 毫升抗体加到 0.2 毫升 SRBC 悬液中, 边加边摇动混合, 随即加入 0.1 毫升 CrCl₃ 溶液 (新鲜的或“成熟”的), 边加边摇动 5 分钟。然后加 pH7.2 的磷酸缓冲液至 10 毫升使反应中止。洗 3 次后, 将致敏的 SRBC 配成 1% 悬液置 4℃ 备用。

人体外周血 B 淋巴细胞 SmIg 花环形成试验

人外周血用血液保存液稀释一倍 (RPMI 1640 内含 10 单位肝素/毫升, 5% 小牛血清, 2.5mM EDTA)。在比重为 1.073 的聚蔗糖—泛影葡胺液中以 2000 转/分离心 20 分钟, 分离出的白细胞层用不含肝素的上述溶液洗 3 次。如有残余红细胞再以 0.83% 氯化胺去除, 分离出的淋巴细胞在培养瓶内放 37℃ 培养箱中 1 小时, 去除着壁的巨噬细胞。0.1 毫升上述细胞 (200 万细胞/毫升), 加 0.1 毫升兔抗人 IgG $F(ab)_2$ 抗体致敏的 SRBC 在 4℃ 混合后, 1000 转/分离心 5 分钟。轻摇使沉淀细胞松散。在计数花环时每个样品至少计数 200 个以上细胞, 并以结合三只以上 SRBC

的淋巴细胞作为阳性细胞。所计数的淋巴细胞总数除以阳性细胞数为阳性细胞百分率。

EB 病毒抗血清的制备

培养 7 天的 B95-8 细胞上清液先经 3000 转/分离心 20 分钟, 取上清液, 再经 20000 转/分离心 2 小时。沉淀物加以原体积 1/40 的磷酸缓冲液, 冲匀后 -20℃ 保存。以 0.2 毫升上述浓缩的病毒悬液加等量福氏完全佐剂的乳化物作为免疫每只家兔的一次剂量, 每周一次, 共免疫 4 次。所得到的抗血清再经人脐带血淋巴细胞吸收 4 次。

EB 病毒受体测定

聚蔗糖——泛影葡胺液分离的淋巴细胞 400 万/毫升与 0.5 毫升浓缩的 B95-8 病毒悬液混合后放 4℃ 3—4 小时, 不时摇动。随后经冰冷的 pH7.2 磷酸缓冲液洗 3 次, 加 0.5 毫升抗 EB 病毒抗血清再放 4℃ 2—3 小时, 再以上述缓冲液洗 3 次。最后加荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 标记的羊抗兔 IgG 在 4℃ 放置 2—3 小时染色, 缓冲液洗 3 次, 以甘油——磷酸缓冲液混匀的细胞滴于载片上, 复以盖片后用 D. P. X. Mountant 油封盖片四周。在 ML-2 型落射光荧光显微镜下观察膜荧光细胞数, 同时以可见光作同视野内细胞计数。每个样品计数 200 个细胞。

结果和讨论

致敏 SRBC 的最适抗体浓度

SRBC 经 CrCl_3 溶液处理后能使抗人 F(ab)_2 抗体蛋白分子包被在血球表面, 通过 B 淋巴细胞表面的 SmIg 分子与致敏的 SRBC 形成花环^[4,5]。采用这种检测方法鉴定人 B 淋巴细胞, 要能够取得稳定可靠的结果, 必须选择合适的致敏 SRBC 的抗体蛋白浓度。我们把兔抗人 F(ab)_2 抗体以 0.9% NaCl 溶液稀释成 1、10、25、50、100、250、1000 和 2000 微克等不同的蛋白浓度, 分别致敏 SRBC, 观察抗体蛋白浓度对形成花环细胞百分率的影响。如图 1 所示, 在 10 微克到 100 微克之间形成花环的阳性细胞百分率随着蛋白浓度的递增而上升。特别是在 10—20 微克之间更为显著。100 微克之后, 蛋白浓度虽然继续增加, 但形成花环的阳性细胞百分率稳定在 18—20% 左右。这一结果表明, 花环形成的合适抗体蛋白浓度以选择在 100—200 微克为宜。因此在本实验中均选用 200 微克抗体蛋白作为致敏上述 SRBC 的标准浓度。

CrCl_3 浓度对花环形成的影响

抗体蛋白分子所以能包被在 SRBC 表面, 是因为被 CrCl_3 溶液处理后的这种细胞表面膜发生了有利于抗体蛋白分子与之结合的变化。因此 CrCl_3 溶液也是花环形成的一个重要因素, 而合适的 CrCl_3 浓度和配制方法应该是稳定花环形成的必要条件。我们把两种不同方法配制的 CrCl_3 溶液分别以 0.2%、0.1%、0.01%、0.001% 和 0.0001% 的浓度处理前述的一定量的 SRBC, 观察对花环形成的影响。实验所得结果是, 新鲜配制的 CrCl_3 溶液在 0.2% 浓度时引起致敏的 SRBC 自凝, 0.1% 浓度组的形成花环阳性细胞率在 18% 左右, 符合一般人外周血中 B 淋巴细胞百分率的应有范围, 如 CrCl_3 浓度降至 0.01% 时, 花环形成的百分率下降至 7.4%。相反在 0.001% 和 0.0001% 两种浓度组又见形成花环细胞百分率上升的现象 (18—20%)。根据 Goding (1976)^[6] 的报道, 在 CrCl_3 浓度为 0.1% 时, SRBC 的蛋白结合率占总蛋白量 (100 微克/毫升) 的 77%, 在 CrCl_3 溶液浓度分别降到 0.01% 和 0.001% 时, 蛋白结合率则降低至 20% 和 2.9%。分析本实验结果所以产生上述现象, 可能是由于 CrCl_3 溶液过度稀释后, 造成抗体蛋白分子极少能结合到 SRBC 表面, 几乎和未用 CrCl_3 处理的 SRBC 相似, 因而花环形成细胞百分率上升可能反映了 T 淋巴细胞所形成的 E-花环的干扰。使用“成熟”的 CrCl_3 溶液在 0.2% 和 0.1% 两种浓度和新鲜配制的 0.2% 浓度一样也产生自凝现象。0.01% 浓度时花环形成的阳性细胞稳定在 20% 左右。另两种浓度相似于新鲜配制的 CrCl_3 溶液组。据此, 在实验中既可用新鲜配制的 0.1% 浓度, 也可使用“成熟”法配制的 0.01% 浓度的 CrCl_3 溶液。

由于我们在实验中注意到使用合适的抗体蛋白浓度和 CrCl_3 浓度, 因此 SmIg 测定的结果稳定在 15—20% 之间 (表 1)。这一测定结果不仅和 Haegert^[7] 用花环法测定人外周血 SmIg 阳性细胞百分率相似, 而且和 Bachl^[8] 报道的

表 1 用两种表面标志分别测定人外周血中 B 淋巴细胞结果的比较

标本号	测定标志	
	SmIg	EB病毒受体
1	20.8%	20.5%
2	15.3%	15%
3	19.4%	24.4%
4	19%	22%
5	18.5%	20%
6	22.5%	26.5%
7	18.7%	22.5%
8	21.5%	25%
9	15.7%	18%
10	20%	22%
平均值 S.D	19.5±5.36%	21.6±11.7%

用抗轻链血清——FITC 荧光法测定人外周血阳性百分率也十分近似。

用免疫荧光间接法观察淋巴细胞表面的 EB 病毒受体

在人的淋巴细胞亚群中，只有 B 淋巴细胞和所占数量很少的无表面标志细胞 (Null 细胞) 表面具有 EB 病毒受体^[9]。为了确证在本实验中荧光显微镜下所见的有膜荧光反应的细胞主要是 B 淋巴细胞，排除非特异荧光反应的可能性，除实验组外，同时还进行了 4 组对照

实验。其结果如表 2 所列。对照 1 组和 2 组的染色反应结果分别为阴性和阳性，这表明所用的抗 EB 病毒血清的特异性，其中不存在抗人淋巴细胞表面膜其他抗原成分的抗体。对照 3 组的结果进一步支持了上述的判断。对照 4 组则表明，对 EB 病毒通过受体所附着的 B 细胞表面，在没有特异性抗体存在的条件下，实验所用荧光标记抗体是没有直接的附着作用的。因此从表 1 所列 4 组对照实验的结果可以表明，实验组的膜荧光反应是特异性的，即凡是有这种荧光反应的细胞主要为 B 淋巴细胞，但不排除少数无表面标志细胞。

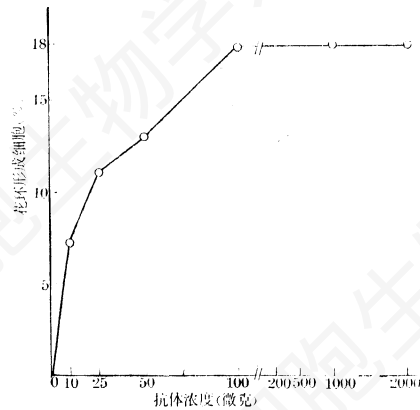


图 1 致敏的羊红血球抗体蛋白浓度与形成花环百分数的关系

表 2 人外周血 B 淋巴细胞表面 EB 病毒受体的测定

组别	实验组	对 照 组			
		1*	2	3	4
染色程序	细胞 + 病毒 + 兔抗病毒抗血清 + 荧光标记羊抗兔 IgG	细胞 + 病毒 + 经病毒吸收的兔抗病毒抗血清 + 荧光标记羊抗兔 IgG	细胞 + 病毒 + 经人外周血淋巴细胞吸收的兔抗病毒抗血清 + 荧光标记羊抗兔 IgG	细胞 + 兔抗病毒抗血清 + 荧光标记羊抗兔 IgG	细胞 + 病毒 + 荧光标记羊抗兔 IgG
观察结果	阳性	阴性	阳性	阴性	阴性

* 病毒吸收的抗病毒血清：0.1 毫升浓缩的 B95-8 病毒和 0.5 毫升抗病毒血清混合，37℃ 30 分，5000 转/分离心 20 分钟的上清液。

两种表面标志测定结果的比较

在建立了以上两项检测条件的基础上, 我们随机抽取 10 例献血员外周血, 用花环法和膜荧光法对每份样品同时作 SmIg 和 EB 病毒受体的测定和阳性细胞百分率计数。表 1 结果表明, 用花环法测得的人外周血 SmIg 阳性的 B 淋巴细胞平均为 19.1% (15.3%—21.5%) \pm S.D. 5.36%。利用膜荧光法测得有 EB 病毒受体的 B 淋巴细胞平均为 21.6% (15%—26.5%) \pm SD 11.7%。两项结果经统计学处理 $P > 0.05$, 表明无明显差异, 而且存在相关性 ($r = 0.88$, $T_r < 0.01$)。至于从表 2 所列的每份样品检测阳性细胞百分率看, 用 EB 病毒受体作为检测 B 淋巴细胞的手段其结果稍高于用 SmIg 测定的结果, 很有可能是由于少数无表面标志细胞存在的缘故。

本实验表明, 利用 EB 病毒受体和 $F(ab)_2$ 抗体致敏 SRBC 形成花环来检测人外周血 B 淋巴细胞, 其结果是可以互为印证的。两种方法都是目前测定 B 淋巴细胞较可靠的手段, 但

后者实验过程时间短, 而且不需要荧光显微镜设备, 所以更为可取。

参 考 文 献

- [1] Greaves M. F. & Brown. 1975. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 3: 514—524.
- [2] Stanworth D. R. & Turner M. W. 1978 in "Hand Book of Experimental Immunology." (D. M. Weir ed) 6: 19—20.
- [3] Garvey, J. S., et al. 1977. in "Methods in Immunology" (Garvey, J. S. eds) pp. 256—264.
- [4] Parish C. R. et al. 1978. *J. Immunol. Method.*, 20: 173—183.
- [5] Parish C. R. et al. 1974. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 178: 47—63.
- [6] Goding J. W. 1976. *J. Immunol. Method.*, 10: 61—66.
- [7] Haegert D. G. et al. 1976. *J. Immunol.*, 116: 1426—1430.
- [8] Bach J. F. 1978. in "Immunology" (Bach J. F. ed) pp. 75.
- [9] Eirrhorn et al. 1978. *Cell. Immunol.*, 35: 43—58.

细胞松弛素 D 用于鉴别正常细胞与肿瘤细胞的初步探讨

章 静 波

(中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物室)

细胞松弛素 (Cytochalasin) 是一类真菌的代谢产物^[1], 迄今已发现有十余种。由于它们具有广泛的细胞生物学效应, 颇为人们所重视。在殊多的生物活性中, 细胞松弛素 B (Cytochalasin B, 简称 CB) 可诱发恶性细胞形成多核细胞, 而不诱发正常细胞形成多核细胞这一特性吸引了细胞学家, 尤其是肿瘤细胞生物学家的注意^[2-5]。迄今对 CB 的作用研究得较多, 对其余几种代谢产物作用的研究较少。我们曾经报道国产细胞松弛素 D (Cytochalasin D, 简称 CD) 也具有诱发长期培养的人体食管癌 ECa-109 细胞系形成多核及排核作用^[6]。然而, CD

的这种细胞生物学特性是否亦如 CB 一样, 对于恶性细胞具有普遍性? 对于正常细胞是否也可诱发出多核细胞及排核现象? 也就是说 CD 对于恶性细胞及正常细胞的作用有否不同, 从而用以作为鉴别正常细胞与肿瘤细胞的一种工具? 为探索上述问题, 我们选用了多种恶性细胞及正常二倍体细胞, 以及原代培养细胞, 在 CD 作用下进行了比较, 现将结果报道如下:

材 料 与 方 法

一、细胞素 (株) 及原代培养

(1) 人体食管癌 109 细胞素 (简称 ECa 109 细