

# 一种简易的小鼠单相混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定法

张宗梁

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

1964年Bain等首次报道了两个遗传上无亲缘关系的人体淋巴细胞在体外一起培养能相互刺激引起淋巴细胞的转化反应,而同卵孪生个体淋巴细胞的混合培养却不能发生这一效应<sup>[1]</sup>。鉴于科学工作者们对这一现象的重视,在人体,小鼠和大鼠等实验动物中开展了深入的MLR研究,大大推动了免疫遗传学,细胞免疫学,肿瘤免疫学等基础科学的进展。今天,MLR技术已成为基础免疫学和临床研究不可缺少的研究工具。

如将两种不同品系小鼠淋巴细胞在体外一起培养,遗传上相同的一类T淋巴细胞会对另一品系淋巴样细胞表面“非我”的外源性抗原决定簇产生转化和增殖反应,我们把这种淋巴细胞转化和增殖反应称为体外混合淋巴细胞反应。形成混合淋巴细胞反应必需具备两个基本条件,一是淋巴样细胞表面要有刺激决定簇(stimulatory determinants)或称淋巴细胞激活决定簇(lymphocyte activating determinants即Lads)的表达。二是反应T淋巴细胞对外源性刺激决定簇具有识别和反应的能力。混合淋巴细胞群体中这两大特征可通过单相MLR来验证。单相MLR是把两种遗传背景不同细胞群体中的一种细胞,事先经X-射线照射或用丝裂霉素C处理,以抑制其细胞的DNA合成和分裂,从而测定另一品系T淋巴细胞对这些不能分裂的刺激细胞表面刺激决定簇所引起的淋巴细胞转化和增殖反应。我们把这种反应称为单相混合淋巴细胞反应。因此,单相MLR反应的强弱反映了反应T淋巴细胞转化与增殖的强弱。

目前国外检测MLR最多见的是采用微量

小井板培养细胞,随后用同位素测定MLR反应的强弱,这是需要应用自动或半自动样品收集仪来操作的,大大限制了MLR的普遍应用。由于我们实验室的需要,我们建立了较为简易的<sup>125</sup>IUdR测试塑料小管内小鼠脾脏细胞单相混合淋巴细胞反应的方法。

## 材 料 和 方 法

### (一) 动物

纯系C57BL/6J(H-2<sup>d</sup>)雌小鼠,鼠龄2月,BALB/C(H-2<sup>d</sup>)雌小鼠,鼠龄5.5月,均系本所动物房繁育。每次实验每组动物至少3只,取自同窝。

### (二) 脾脏细胞制备

小鼠断颈髓处死,无菌条件下取出脾脏,在冰浴条件下以内含5%灭活小牛血清的Hanks液洗净后,用锋利眼科手术剪刀剪碎,并以玻璃压板小心挤压制成单细胞悬液。用NH<sub>4</sub>Cl溶液(NH<sub>4</sub>Cl 0.155M,Na<sub>2</sub>EDTA 0.1mM, KHCO<sub>3</sub> 0.01M)处理脾细胞以破碎红细胞。以含5%小牛血清Hanks液洗涤3次后,将脾细胞悬浮于RPMI-1640培养液中,内含5%小牛血清,100单位青霉素/毫升,100微克链霉素/毫升,2×10<sup>-2</sup>MHEPES,5×10<sup>-5</sup>M二巯基乙醇,2mM谷氨酰胺。用锥虫蓝染色证明,90%以上为活的淋巴样有核细胞。

### (三) 刺激细胞的X-射线照射

将2.5×10<sup>7</sup>/毫升脾细胞悬液分装于玻璃瓶,以1,500伦琴X-线照射处理(电压200KV,电流15毫安,0.2毫米铝板,照射距离16厘米,照射时间53秒)。

### (四) MLR的测定

将不同比例的刺激细胞与反应脾细胞,以及不同细胞总数的反应细胞与刺激细胞置于含有1.0毫升RPMI-1640培养液,经乙醇处理与紫外线消毒的I号聚苯乙烯小管(上海塑料九厂生产)内,在含5%CO<sub>2</sub>

\* 小鼠脾细胞体外X-射线处理由中国科学院上海药物研究所张振兴同志协助,刘国良,王珏,肖远康,韩谨南同志参加部分工作谨志谢意。

37℃温箱中培养。分别在3、4、5天后换以新鲜培养液,加入本实验室合成并经纯化的0.1毫升<sup>125</sup>IUdR(0.1微居里)进行标记。在上述条件下再培养16小时,去上清液,加入0.1或0.2毫升(4-8×10<sup>7</sup>/毫升)经10,000RX-射线照射的小鼠艾氏腹水癌细胞作为载体细胞,洗涤3次,以防止在洗去细胞外同位素时反应细胞的丢失。所有实验均一式3管,在NE8312同位素自动测试仪上测定每分钟脉冲数(CPM),实验结果以平均土S.E.表示。

### 实验结果

#### (一) MLR 的细胞比例与浓度选择

重复试验证明,以C57BL/6J为反应细胞(R),BALB/C 1500R为刺激细胞(S),按1:1的比例(表1),反应4天(96小时)能获得最大的MLR反应(表2)。因此,我们应用上述R与S细胞,以1:1的比例,每小管细胞总数分别为2.0×10<sup>6</sup>,3.0×10<sup>6</sup>,4.0×10<sup>6</sup>,5.0×10<sup>6</sup>,6.0×10<sup>6</sup>,7.0×10<sup>6</sup>和8.0×10<sup>6</sup>,反应4天,选择最适细胞总数。多次重复试验证明,细胞总数为5.0×10<sup>6</sup>(即反应细胞2.5×10<sup>6</sup>,刺激细胞2.5×10<sup>6</sup>)为最适宜的细胞浓度(图1)。这与我们以前选择2.5×10<sup>6</sup>细胞来测定致分裂原诱导的脾脏淋巴细胞转化反应,抗肿瘤细胞静止效应,以及T淋巴细胞介导的对<sup>125</sup>IUdR标记的肿瘤细胞的细胞毒性反应的条件是基本一致的<sup>[2,3]</sup>。

#### (二) MLR 的反应时间选择

应用上述各种细胞浓度动态观察了培育72,96,120小时后的MLR动态变化,以选择合宜的MLR温育时间。四次重复试验一致显示,本实验系统体外培养96小时(4天),能

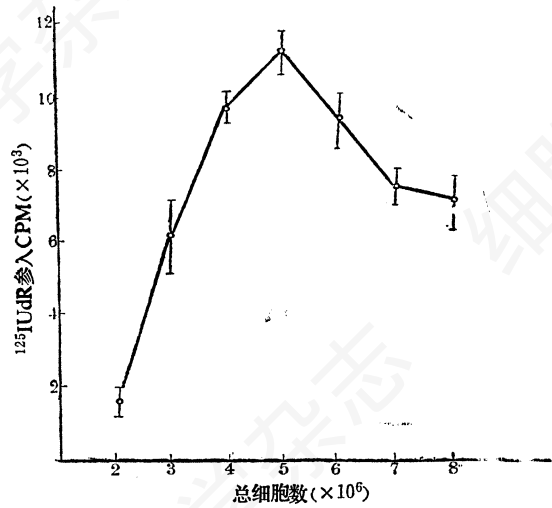


图1 不同浓度的小鼠脾脏细胞对MLR试验的影响 获得最高的MLR(表2)。这与Herberman实验室采用MLR培育时间为4天是一致的<sup>[4]</sup>。如表2所示,细胞浓度较低,如2.0×10<sup>6</sup>总浓度的条件下,无论是反应72,96,120小时都不能引起足够量的<sup>125</sup>IUdR参入,看来这与细胞量过少有关。已有报告指出<sup>[5]</sup>,引起MLR必需有存活的刺激细胞与反应细胞之间的接触。因此,细胞量太少不能使R与S之间相互接触,从而就不能引起MLR T淋巴细胞克隆的增殖。MLR反应72小时在3.0×10<sup>6</sup>以上的细胞浓度对<sup>125</sup>IUdR的参入有逐渐增加的趋势,这表明MLR效应已经开始或正在发展,反应达96小时其MLR达最高值,6.0×10<sup>6</sup>,7.0×10<sup>6</sup>和8.0×10<sup>6</sup>实验组的MLR反应增长率与其浓度相对较低的前三组(3.0×10<sup>6</sup>,4.0×10<sup>6</sup>,5.0×10<sup>6</sup>)相比较,有明显下降的

表1 MLR试验中反应细胞与刺激细胞比例的选择(<sup>125</sup>IUdR参入CPM)

R/S	0.5/1	1/1	2/1	4/1	反应细胞* 对照
<sup>125</sup> IUdR CPM	5461±444	11075±628	3366±153	3850±120	608±77
S.I.**	9.0	18	5.5	6.3	1.0

\* 反应细胞(R)为C57BL/6J,每组均固定为2.5×10<sup>6</sup>,刺激细胞(S)为BALB/C1500R; 反应细胞对照为2.5×10<sup>6</sup>C57BL/6J×2.5×10<sup>6</sup>C57BL/1500R

\*\* MLR刺激指数(S.I.) =  $\frac{\text{试验组 CPM}}{\text{反应细胞对照组 CPM}}$

表 2 MLR 最适时间的选择\*(<sup>125</sup>IuDR 参入 CPM)

总细胞数	培育时间(小时)	72	96	120
	2.0 × 10 <sup>6</sup>	445 ± 65	1540 ± 508	446 ± 79
	3.0 × 10 <sup>6</sup>	2162 ± 238	6192 ± 1001	1126 ± 765
	4.0 × 10 <sup>6</sup>	3484 ± 198	9652 ± 334	2959 ± 1360
	5.0 × 10 <sup>6</sup>	6672 ± 330	11075 ± 628	5250 ± 875
	6.0 × 10 <sup>6</sup>	7047 ± 309	9147 ± 754	4218 ± 439
	7.0 × 10 <sup>6</sup>	6923 ± 492	7239 ± 468	1852 ± 222
	8.0 × 10 <sup>6</sup>	7968 ± 1015	6963 ± 725	1867 ± 47

\* 反应细胞(R)C57BL/6J, 刺激细胞(S)BALB/C 1,500R

趋势, 这些实验组 MLR 增长率的降低或许与该条件下细胞密度过大等因素有关。MLR 反应 120 小时在本实验系统中均一致地低下, 是否是因为 MLR T 淋巴细胞是生存短暂的细胞和/或淋巴样细胞分泌的可溶性抑制因子所致<sup>[5]</sup>, 尚待研究阐明。

### (三) 刺激细胞与反应细胞的选择

为了在 C57BL/6J 与 BALB/C 两纯系小鼠中选择出适宜的反应细胞和刺激细胞, 分别将 C57BL/6J 与 BALB/C 小鼠脾细胞经 1,500 R 剂量的 X-射线照射, 作为刺激细胞, 再分别用未经照射的 C57BL/6J 与 BALB/C 小鼠脾细胞作相应的反应细胞进行 MLR 试验。重复四次的实验结果指出, 以 BALB/C 为刺激细胞, C57BL/6J 为反应细胞能获最大的 <sup>125</sup>IuDR 参入。如表 3 所示, MLR 试验组以 C57BL/6J 为反应细胞, BALB/C 为刺激细胞, 反应 72 小时所引起的 <sup>125</sup>IuDR 参入量是 BALB/C 作反

应细胞, C57BL/6J 为刺激细胞 MLR 值的 2.3 倍; MLR 反应 96 小时, 前者 <sup>125</sup>IuDR 的 CPM 值是后者的 4.5 倍。这些实验数据是我们 MLR 试验中选择 C57BL/6J 作为反应细胞, BALB/C 作为刺激细胞的依据。表 3 还指出, Con A 诱导的 C57BL/6J 小鼠 T 淋巴细胞增殖反应在 72 小时的参入值为 14315 ± 767, 这其实是 Con A 对杀伤 T 淋巴细胞, 协助 T 淋巴细胞, 延缓型超敏反应 T 淋巴细胞以及混合淋巴细胞反应 T 淋巴细胞诱导的转化反应<sup>[6]</sup>。换言之, Con A 诱导的几乎是各种类型的 T 淋巴细胞的增殖反应。而在我们实验中温育 96 小时 MLR 的 <sup>125</sup>IuDR 的参入值为 11075 ± 628, 这说明 MLR 反应中 DNA 合成的绝对水平是颇高的。本实验条件下反映出 Con A 诱导的 T 淋巴细胞转化与 MLR 在最适时间上有先后之别(前者为 48-72 小时, 后者为 96 小时)估计是作用机理的不同所致<sup>[5,7,8]</sup>。

表 3 MLR 刺激细胞与反应细胞的选择\*(<sup>125</sup>IuDR 参入 CPM)

培 育 小 时	反应细胞与刺激 细胞的组合	C57 BL/6J × BALB/C 1,500R	BALB/C × C57BL/6J, 500R	C57 BL/6J × C57BL/6J 1,500R Con A**	C57BL/6J × C57BL/6J 1,500R
	72		6672 ± 330	2847 ± 230	14315 ± 767
96		11075 ± 628	2427 ± 91	4811 ± 506	608 ± 77

\* 每塑料小管内总细胞数为 5.0 × 10<sup>6</sup>(R:S = 1:1), 2.5 × 10<sup>6</sup>C57BL/6J 与 BALB/C 小鼠脾细胞经 1500R X-射线照射后, <sup>125</sup>IuDR 参入 CPM C57BL/6J 1500R = 234 ± 41 BALB/C 1500R = 335 ± 7

\*\* Con A 每管加入量为 5μg

## 讨 论

(一) 目前国外普遍应用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷测定培养于微量小井板中的单相 MLR<sup>[9]</sup>。近来, Ting 等应用<sup>125</sup>IUdR 技术测定 MLR 反应<sup>[10,11,12]</sup>, 克服了应用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷中的某些烦杂手续。但是, 他们都应用自动和半自动微量细胞收集仪, 收集小井中 MLR 细胞进行同位素测试。本文介绍了<sup>125</sup>IUdR 技术测定塑料小管内的 MLR 反应, 不仅实验证明本方法灵敏, 操作简易, 细胞用量不多, 易于重复, 而且这种试验可在没有自动和半自动微量收集仪的实验室内应用。

(二) Meo 在测定小鼠脾脏 MLR 试验中应用 2.5% 的热灭活人 AB 型血清以避免小牛血清引起的非特异转化。鉴于采取 AB 型人血清不及小牛血清方便, 我们应用经选择的 5% 小牛血清观察它对培养 96 小时以后小鼠淋巴细胞非特异转化的影响。结果指出,  $2.5 \times 10^6$  C57BL/6J 1,500R 的 CPM 为  $234 \pm 41$ , 而  $2.5 \times 10^6$  C57BL/6J  $\times$   $2.5 \times 10^6$  C57BL/6J 1500R 的 CPM 也仅为  $608 \pm 77$ , 这与刺激细胞 BALB/C 1,500R 诱导 MLR C57BL/6J  $\times$  BALB/C 1,500R 的 CPM 值  $11075 \pm 628$  相差 18 倍! 提示我们所使用的 5% 灭活小牛血清并没有显示它对 MLR 反应的非特异干扰。相反, 选用合宜的小牛血清作 MLR 试验看来是比较方便和可行的。

(三) MLR 试验的一般机理, 胸腺依赖的 T 淋巴细胞介导的 MLR, 是由同种异基因刺激细胞触发了 MLR T 淋巴细胞的增殖和细胞毒性 T 淋巴细胞(CML)的产生<sup>[13]</sup>。现代实验揭示, 刺激细胞诱导的 T 淋巴细胞增殖等一系列复杂反应是由 B 淋巴细胞和巨噬细胞表面的 Lads 对 T 反应细胞的刺激所致。与人类的 Lads 系统不同, 小鼠的 Lads 是由二个染色体上的基因所控制的。即除了第 17 对染色体上 H-2 系统中 I 区 MLR 位点基因之外还受第 1 对染

色体上 M 位点基因所控制, 其基因产物能刺激 T 淋巴细胞的增殖反应。目前已在 20 种纯系小鼠中证明有四种类型的 M 位点(或 MIs 位点的等位基因 a, b, c, d 四型(或以 MIs<sup>a</sup>, MIs<sup>b</sup>, MIs<sup>c</sup>, 和 MIs<sup>d</sup> 表示), 它们与引起 MLR 有关<sup>[14]</sup>。鉴于我们应用的 C57BL/6J (H-2<sup>d</sup>) 与 BALB/C (H-2<sup>d</sup>) 两种纯系小鼠其 M 位点的等位基因都属于 MIs<sup>b</sup>, 因此在我们实验系统中所反映的单相 MLR 反应的强弱主要是由 H-2 系统 I 区编码的, 诱导 MLR 反应的决定簇 Lads 所引起的差异。

对于 MLR 反应细胞的本质研究最早是 Schwartz 用抗 T 淋巴细胞血清来证明的<sup>[15]</sup>, 以后 Piguet 与 Vassal 进一步证明了上述结论, 即 MLR 效应细胞是 T 淋巴细胞<sup>[16]</sup>。但是, MLR 的 T 淋巴细胞是可以诱导 B 淋巴细胞的增殖<sup>[5,17]</sup>。实验证明, 小鼠 MLR 的诱导或产生必需有同种异基因巨噬细胞的存在, 因为从反应细胞群体中排除巨噬细胞, 所清除的 MLR 效应不能为纯系巨噬细胞所重组<sup>[18]</sup>。

(四) MLR 的用途 MLR 试验不仅在免疫遗传学, 移植免疫学领域得到普遍应用。近年来, MLR 技术在肿瘤免疫学, 细胞免疫学研究中的应用也越来越多。例如, 在肿瘤与宿主相互关系中可以通过 MLR 试验揭示带瘤小鼠脾脏抑制巨噬细胞与血清因子对 T 淋巴细胞功能的抑制<sup>[12]</sup>。实验指出, 肿瘤与其产物也能够对 MLR 效应产生显著抑制, 但是这种抑制作用可以通过加入 1—10% 的腹腔巨噬细胞来予以逆转<sup>[10,12]</sup>。Klimple 等应用 BCG 激活的抑制巨噬细胞研究了 MLR 反应抑制的机理, 他们指出, MLR 反应的抑制效应发生在“协助” T 淋巴细胞水平<sup>[19]</sup>。MLR 技术还用来揭示巨噬细胞对 T 淋巴细胞的抗原递送, 以及抗原识别的遗传控制机理<sup>[18,20]</sup>。可以相信, MLR 试验将在今后免疫学的各领域里得到更为广泛地使用。

## 参 考 文 献

- [1] Bain, B., et al. 1964. *Blood* 23: 108—116.
- [2] 张宗梁, 王珏, 王球达, 姚鑫, 1979, 实验生物学报 12: 13—29.
- [2] 张宗梁, 王珏, 王球达, 刘国良, 姚鑫 1980 实验生物学报 13: 155—165.
- [4] Fernbach, B. R., et al. 1977. *Transplantation* 21: 381—386.
- [5] Oppenheim, J. J., et al. 1976. *Prog. Allergy* 20: 65—194. (Karger Basel).
- [6] Watanabe, T., et al. 1977. *Eur. J. Immunol.*, 7: 603—609.
- [7] Lucas, D., et al. 1977. In D. Lucas (eds) *Regulatory mechanisms in lymphocyte activation*, pp, 76—89. Academic Press, New York.
- [8] Cerottini, J. C., et al. 1974. *Adv. Immunol.*, 18: 67—132.
- [9] Meo, T., 1979. In *Immunological Methods*. Edited by Lefkovits, I., and B. Pernis, pp, 227—239.
- [10] Ting, C. C., et al. 1979. *J. Immunol.*, 123: 801—807.
- [11] Ting, C. C., et al. 1980. *Int. J. Cancer* 25: 243—249.
- [12] Ting, C. C., et al. 1980. *J. Immunol.*, 124: 1039—1044.
- [13] Bach, F., 1976. In D. H. Katz, and B. Benaceffaf (eds) *The role of production of the histocompatibility complex in immune response*. pp, 103—129. Academic press, New York.
- [14] Festenstein, H., 1978. In *The immune system a course on molecular and cellular basis of immunity*. pp, 249—260. Blackwell Scientific Publications.
- [15] Schwartz, M. R., 1968. *Science* 160: 1014—1017.
- [16] Piguet, P. F., et al. 1972. *J. Exp. Med.*, 136: 962—967.
- [17] Vischer, T. L., 1972. *Clin. Exp. Immunol.*, 11: 523—534.
- [18] Oehler, J. R., et al. 1977. *J. Immunol.*, 119: 1785—1789.
- [19] Klimple, G. R., et al. 1980. *J. Immunol.*, 124: 350—357.
- [20] Rosenwasser, L. J., 1979. *J. Immunol.*, 123: 1141—1144.

## 染色质核小体的电镜制片方法\*

高 奇 蓉

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

自从发现真核细胞染色质普遍存在着核小体结构以来, 对于核小体结构的研究已取得了重大的进展<sup>[1]</sup>。许多研究者运用电子显微镜直接观察核小体。

有人用核酸酶消化核或染色质, 再经蔗糖密度梯度离心或柱层析分离, 分别观察分离得到的单个核小体颗粒以及它们的寡聚体的形态<sup>[2]</sup>。也有人用 NaCl 或胰蛋白酶适当处理染色质<sup>[3]</sup>; 甚至简单地将胀破的核直接离心到铜网上<sup>[4]</sup>, 观察串珠状的核小体纤维。还有人观察由组蛋白和 DNA 重组形成的核小体<sup>[3-5]</sup>。根据不同的制备方法, 在电镜下, 或可以看到单个的核小体颗粒, 或看到串珠状的核小体链, 核小体颗粒直径一般为 75—100 Å, 颗粒间连

接丝直径为 20—30 Å。

要在电镜下呈现出清晰的染色质核小体结构, 掌握样品的电镜制片方法是很重要的。本文就我们的工作实践, 着重对核小体样品的电镜制片方法作一扼要介绍。这一方法包括: (1) 碳膜铜网的制备, (2) 取样, (3) 固定, (4) 染色, (5) 投影等步骤。

## 一、碳膜铜网的制备

常用的样品支持膜有塑料膜、碳膜和喷碳的塑料膜。喷碳的塑料膜既牢固又容易制备, 但一般较厚, 直径仅为 20—30 Å 的、核小体颗粒间

\*有关的工作曾得到王幽兰先生的指导, 文章中的线图由乔以刚同志绘制, 谨致谢意。