

细胞继续生长。母细胞壁破裂过程中常看到它们的微纤丝结构(图版图5)。人参细胞的这些细微结构与假挪威槭悬浮培养细胞的细微结构非常相似^[3]。

二、不同来源的悬浮细胞的超微结构。无论根、还是茎诱导的愈伤组织,其30代的悬浮培养细胞,外观生长一致,内部结构上也无明显差异。但是根的培养细胞偶尔见到有六边形的结晶体(图版图6),而在茎的培养细胞内没有发现。我们观察生长在固体培养基上的人参愈伤组织细胞超微结构时,注意到生长缓慢的愈伤组织晶体大,生长迅速的愈伤组织晶体小,或者几乎看不到晶体^[4]。悬浮培养细胞也有类似情况。由于来源不同,悬浮细胞的生长速度也不同。根的悬浮细胞比茎的悬浮细胞生长慢,因此观察到晶体的可能性就大。可见,晶体的消长与细胞生长速度及代谢活动有关。人参晶体属于哪一类物质,有待进一步研究。

三、不同补加物对悬浮细胞形态及超微结构的影响。补加2,4-D或者补加吲哚丁酸,悬浮细胞都能良好地生长。补加2,4-D的培养液,细胞容易分散,生长速度较快,收获的细胞含水量大,干重与鲜重的比值较小。补加吲哚丁酸的细胞生长速度略低,而收获细胞的含水量小,干重与鲜重的比值较大(图1)。两

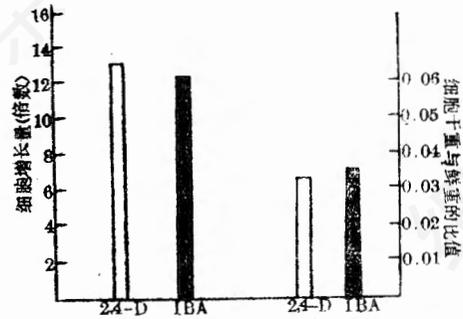


图1 补加2,4-D和补加IBA细胞生长量及干重与鲜重比值的比较

种处理细胞的总收获量接近,两种处理在细胞超微结构方面无显著差异。仅在补加吲哚丁酸的细胞中,观察到质体内含淀粉粒的数量比较多,淀粉粒之间排列紧密,形状不规则。质体的这种性质,可能影响细胞的含水量。这也许也是补加吲哚丁酸的细胞含水量小的原因之一。

参 考 文 献

- [1] 丁葆祖等, 1981. 细胞生物学杂志, 3(3): 27—30.
- [2] 中国科学院上海植物生理所细胞室编译, 1978. 植物组织和细胞培养. 上海科学技术出版社. 128—132.
- [3] Edited by H. E. Street., 1977. plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific publication. 167—176.
- [4] 丁葆祖等, 1983. 植物学报, 25(3):287—289.

产生抗人红细胞单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

卢伟成 马洁羽 沈建根

(浙江医科大学免疫研究室)

抗红细胞的单克隆抗体杂交瘤株已有不少报道。Kohler和Milstein^[1]首先制成抗绵羊红细胞的单克隆细胞株,嗣后Barnstale和Milstein等^[2]又报告了分泌抗人“A”型红细胞抗体的杂交瘤。Anstee等^[3]制备多株抗人红细胞单克隆杂交瘤株,并研究了红细胞表面分子结构。1981年葛锡锐等^[4]建立了抗北京鸭红血球单克隆抗体的杂交瘤细胞系,为我国单克隆抗

体的首篇报道。

本文采用淋巴细胞杂交瘤技术,以人红细胞为抗原,制备单克隆抗体,获得了持续分泌抗体的杂交瘤株,现将建株过程及与各类红细胞反应的初步结果作一报道。

材 料 和 方 法

1. 实验动物

采用BALB/C小鼠,6~12周龄,引自中国医科

院基础所免疫室。

2. 肿瘤细胞系

小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag 14(SP 2/0), 刘尔翔副教授馈赠。

3. 培养液

70% MEM 和 30% LH(水解乳蛋白), 加入 20% 小牛血清, L-谷酰胺和 100 单位/毫升青霉素与 100 微克/毫升链霉素。融合细胞用液为在上述培养液中加入 HAT 或 HT。

4. 免疫

取正常人 B 型红细胞, 1000 转/分离心 10 分钟, 洗涤三次, 以 10% 的悬液 0.5 毫升免疫 BALB/C 小鼠, 共 3 次, 其中腹腔 2 次(间隔 2 周), 末次为尾静脉注射, 3 天后杀鼠取脾细胞进行融合。

5. 细胞融合方法^[5]

在细胞融合前一天, 接种 BALB/C 成年小鼠腹腔巨噬细胞于 Falcon 培养板上, 一只小鼠约种 2 块 24 孔板, 以普通培养液培养一天。

免疫小鼠脾脏剪碎, 压出脾细胞, 取 10^8 的脾细胞与 $0.5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^7$ 的 SP 2/0 骨髓瘤细胞混合于 50 毫升 Conring 塑料离心管中, 1000 转/分离心 5 分钟, 弃去上清液, 用手指弹击管底使沉淀混匀, 逐滴加入 0.8 ml 分子量为 4000 的 50% PEG, 在 1 分钟内加完。加时轻轻摇动离心管。在 37℃ 水浴中静置 90 秒后, 于 2 分钟内加入 15 毫升无血清培养液, 终止 PEG 融合反应。1000 转/分离心 5 分钟, 弃去上清液加 2 倍 HAT 培养液 24 毫升, 最后将混合细胞分别加入已有培养细胞的二块 24 孔培养板中, 每孔 0.5 毫升, 使培养孔中 HAT 浓度稀释为 1 倍, 放入 7% CO₂ 培养箱中培养。

6. 杂交瘤的选择及单克隆化

按照刘尔翔介绍的方法进行^[5]。

7. 检测方法

血球凝集试验, 按常规方法进行。

8. 杂交瘤染色体检查

按常规方法制备骨髓瘤 SP 2/0 细胞、杂交瘤细胞及正常 BALB/C 染色体标本。骨髓瘤或杂交瘤细胞, 在培养 24 小时后, 加入秋水仙素, 使每毫升培养液中的最终浓度为 0.4 微克, 继续培养 6 小时, 1500 转/分离心得细胞, 低渗处理, 甲醇冰乙酸固定, 染色和摄影。

9. 体内传代

石蜡油注入 BALB/C 和 C₅₇BL × BALB/C 杂种一

代小鼠(浙医大动物室繁殖)腹腔内, 每鼠 0.5 毫升, 8~10 天后接种杂交瘤 5×10^5 细胞。肿瘤后 10 天左右取腹水测定抗体。杂交瘤 2×10^5 细胞接种入上述两种小鼠腋窝皮下, 长出实体瘤后, H.E 切片观察。

结 果

1. 人红细胞免疫的小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合结果

共进行两次细胞融合试验。一次试验由于技术上的原因未获得融合细胞。另一次试验, 48 孔中有 14 孔形成阳性杂交瘤, 阳性率为 29.1%。持续分泌抗体的杂交瘤为 2 孔, 占 4.2%(表 1)。定名为 ZMC₄ 的杂交瘤株, 一直保持着分泌抗体的能力。

表 1 融合试验结果

培养细胞孔数	血凝试验结果				产生单克隆抗体的细胞株数	
	测定孔数	阳性		持续阳性		
		孔数	%	孔数		%
48	48	14	29.1	2	4.2	2

2. 杂交瘤的单克隆化培养

融合细胞自 24 孔板移至小瓶培养。增殖后, ZMC₄ 杂交细胞作有限稀释培养, 103 孔长出细胞, 每孔作抗体测定, 阳性率为 100%, 其中单克隆孔数为 24 孔, 占 12.5%(表 2)。取单克隆孔中的阳性杂交瘤扩大培养, 进行第二次有限稀释法单克隆化培养。

表 2 杂交瘤 ZMC₄ 有限稀释法单克隆化培养的结果

杂交瘤细胞株	克隆化的情况				血凝试验结果	
	分种孔数	多克隆孔数	单克隆孔数	单克隆 %	阳性单克隆孔数	阳性 %
ZMC ₄	192	79	24	12.5	24	100

3. 杂交瘤分泌抗体对各种哺乳类动物及人 ABO 型红细胞的作用

血凝试验测定的结果表明, ZMC₄ 杂交瘤上清液与猴、狗、羊、大鼠和豚鼠红细胞不起反应, 稀释度在 1:2 时仍为阴性结果。ZMC₄ 上清

液与A、B和AB型人红细胞发生血凝反应,而不与O型起反应。ZMC₄在杂种鼠产生的腹水与30例A型红细胞的几何平均滴度为12130,

与30例B型红细胞的几何平均滴度为6807,与10例AB型红细胞的几何平均滴度为13304,与30例O型红细胞均不凝集(表3)。

表3 杂交瘤 ZMC₄ 细胞株培养上清液和腹水与人及各种哺乳类红细胞的血凝反应

抗体来源 稀释度	ZMC ₄ 培养上清液								ZMC ₄ 腹水 (均值)				小鼠抗人B型红细胞免疫血清	正常小鼠血清	
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	未稀释	1:6807	1:12130	1:13304			1:128
人															
ABO	A	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	+++		+		++	-
	B	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	+++	+			++	-
	AB	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	+++		+		++	-
	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
猴		-	-	-	-	-	-	-	-						
狗		-	-	-	-	-	-	-	-						
羊		-	-	-	-	-	-	-	-						
大鼠		-	-	-	-	-	-	-	-						
豚鼠		-	-	-	-	-	-	-	-						

ZMC₄上清液经A型红细胞吸收后,不与A型红细胞凝集,也不与B、AB型红细胞起反应。用B型红细胞吸收,也发生类似情况。

4. 杂交瘤抗体分泌的动态观察

融合细胞培养上清液首次测到血凝反应阳性的细胞数为130左右。随细胞的增多滴度逐渐上升。表4显示了分泌抗体的阳性杂交瘤细胞出现和消失的动态变化,融合后第11天在25孔中测到1孔阳性,13天时12孔阳性,到达高峰,但随后有些杂交瘤细胞逐渐丧失分泌抗体的能力。最后只获得二株持续分泌抗体的

表4 融合试验中分泌抗体阳性杂交瘤的出现与消失

测定时间(融合后天数)	9	11	13	15	18
孔数	9	11	13	15	18
测定孔数	1	25	31	29	48
阳性孔数	0	1	12	4	4

杂交瘤株。

ZMC₄株以 3×10^5 细胞接种于培养瓶中,24小时上清液的血凝滴度在1:32~1:128之间。ZMC₄细胞在体外传代100代以上,抗体分泌能力未见衰退。液氮冻存后复苏仍保持原有的抗体分泌水平。

5. 杂交瘤分泌抗体类型的测定

用PEG浓缩10倍的ZMC₄上清液与Miles公司生产的兔抗鼠IgG亚类抗血清作琼脂双扩散试验,24小时、48小时、72小时未见任何沉淀线,而与中国医科院基础所免疫室制备的兔抗鼠IgM抗血清作用,24小时出现沉淀线。实验证明ZMC₄杂交瘤分泌抗体属IgM类型。

6. 杂交瘤细胞染色体分析

SP2/0小鼠骨髓瘤染色体众数为67,BALB/C小鼠染色体数为40,杂交瘤ZMC₄染色体众数为106。相隔半月作两次ZMC₄染色体检测,未发现数目有明显改变。

7. 杂交瘤的体内接种

将 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 的 ZMC_4 细胞接种到预先注射 0.5 毫升石蜡油的 BALB/C 小鼠腹腔内, 生成腹水, 腹水量为 2.0 毫升~4.0 毫升。如将杂交瘤细胞接种于前臂腋窝中, 长成 2~3 克实体瘤。

ZMC_4 瘤细胞能在 BALB/C \times $C_{57}BL$ 的杂交小鼠(棕灰色)体内生长。接种于腹腔中生成腹水, 接种于皮下长成实体瘤, 经病理切片证实为恶性肿瘤。

讨 论

一些作者认为, 强抗原免疫产生的杂交瘤, 分泌抗体的百分率较高, 可达 10% 左右^[6]。本文应用的人红细胞抗原, 在 48 个培养孔中可测到 14 孔即 29.1% 的孔有抗体分泌阳性细胞, 持续分泌抗体的 2 孔占 4.2%。看来, 人红细胞抗原免疫产生杂交瘤可以获得较好的效果。简便又灵敏的测验方法, 对于在杂交瘤出现后尽快判断是否有抗体分泌以决定取舍至关重要。本文采用的血球凝集试验具有一定的稳定性和重复性, 特别适合于抗红细胞抗体的测定, 这就能较早地分辨分泌抗体的细胞群。对一些分泌抗体时间短暂的融合细胞也能显示其抗体存在的迹象。

在体内产生抗体的试验中, 用 $C_{57}BL \times$ BALB/C 第一代杂交系小鼠代替 BALB/C 纯鼠, 获得大量高效价的腹水抗体, 和巨大的实体瘤。杂交系小鼠适应性及抗疾病能力均强, 且易于繁殖, 因此, 适宜于制备单克隆抗体。

分泌抗体的阳性杂交瘤细胞, 常会转为阴性, 出现这种变化的原因很多, 丢失控制抗体生成的染色体是其中之一, 也可能由于进一步培养时不产生抗体的杂交细胞过渡生长, 成为培养中的占绝对优势的细胞。本实验对分泌或不分泌抗体的杂交瘤作了初步比较, 发现失去分泌抗体能力的杂交瘤细胞染色体大量丢失。如一株不分泌抗体的 ZMD_2 杂交瘤细胞, 其染色体数分别为 73, 78, 80, 88, 100 等不同数目, 而分泌抗体的 ZMC_4 杂交瘤细胞染色体众数为

106。显然, ZMD_2 在所丢失了的染色体中可能载有控制抗体生成基因的染色体。

ZMC_4 杂交瘤分泌的抗体不与猴、狗、羊、大白鼠和豚鼠的红细胞起凝集反应, 说明对人具有特异性。

在人红细胞表面具有多种血型抗原, ABO 型抗原是其中的一种。此外, 尚有 Rh、MNSs、Lewis 血型抗原及其它多种血型抗原, 这给抗人红细胞单克隆抗体带来复杂性。对 ABO 血型检测结果, “A”、“B”和“AB”型血凝均为阳性, “O”型为阴性, 提示 ZMC_4 单克隆抗体在“A”、“B”和“AB”血型红细胞上具有“O”型所缺乏的共同抗原。 ZMC_4 单克隆抗体(腹水)对 A 型和 AB 型的红细胞的凝集滴度超过对 B 型的红细胞的凝集滴度, 虽在统计学上 B 型与 A 型之间无明显差异 ($p > 0.05$), 但提示 A 型和 B 型的结构上似有相同的成份。Erskine^[7] 认为 A 型、B 型红细胞各由两种特异性的物质即 A 和 C 及 B 和 C 组成, C 为 A 型 B 型共有物质, 而 O 型无 C 特异性。 ZMC_4 单克隆抗体的作用部位是 A、B 型特异性抗原。或 H 物质、或 C 物质的问题, 尚待今后作进一步的分析和研究。

参 考 文 献

- [1] Kohler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495—497.
- [2] Barnstable, C. J. et al., 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens: new tools for genetic analysis. *Cell*, 14(1):9—20.
- [3] Anstee, D. J. and Edwards, W. W. 1982. Monoclonal antibodies to human erythrocytes. *Eur. J. Immunol* 12:228—232.
- [4] 葛锡锐等: 1981. 产生抗北京鸭红血球单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建立. *实验生物学报*, 14:213—215.
- [5] 刘尔翔: 1980. 细胞融合——淋巴细胞杂交瘤. *北京医学*, 2(4):245—248.
- [6] Kohler, G. and Milstein, C., 1976. Derivation of specific antibody-producing

(下转第 114 页)