

参 考 文 献

- [1] Graham, C. F. 1977. In "Concepts in Mammalian Embryogenesis" (M. I. Sherman, ed MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 315-397).
- [2] Martin, E. R. 1980. *Science* 209:768-776.
- [3] 从笑倩, 姚鑫. 1983. 实验生物学报, 第16卷第1期 第93-99页。
- [4] 藏本博行. 1975. 引自“人癌细胞培养”[日]. 大星章-菅野井夫主编. 吴政安, 王永潮, 李申德译. 科学出版社. 1979年版, 第63-67页。
- [5] O'Neill, J. P., et al. 1977. *Mutat. Res.* 45: 91.
- [6] Stewart, C. 1980. *J. Embryol. Exp. Morph.* 58:289-302.
- [7] Littlefield, J. W. 1964. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 29:161.
- [8] Strickland, S. 1981. *Cell*, 24:277-278.
- [9] Rousset, J. -P., et al. 1983. *Develop. Biol.* 96:331-336.
- [10] 徐卫明, 宋秋宝, 姚鑫. 1984. F9“无能”胚胎癌细胞与小鼠胸腺细胞融合产生分化细胞. 未发表资料。

人外周血B淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖特性

马祥瑞 汪 涛 王洪云

(苏州医学院 放射医学系)

近年来建立的淋巴细胞集落培养技术,无疑地将促进人们对于淋巴细胞的了解。J. Radnay 等^[1]于1979年用双层琼脂培养技术,以Pokeweed为丝裂原,获得人外周血B淋巴细胞集落。Izaguirre 等^[2]将B淋巴细胞悬液接种到含有 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 受照射的自身或同种T淋巴细胞、20% T淋巴细胞条件培养基和0.8%甲基纤维素的培养体系内,用Pokeweed作丝裂原,也培养出人的B淋巴细胞集落。本文将介绍以脂多糖(LPS)、小鼠红细胞(MRBC)及牛血清白蛋白(BSA)为丝裂原,用单层琼脂培养技术,研究人外周血B淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖情况。

材 料 与 方 法

在无菌条件下,采集健康献血员的肝素抗凝静脉血,用淋巴细胞分离液进行分离,获得单核样细胞悬液。用RPMI-1640培养液稀释成一定浓度的细胞悬液。将其分成五组,分别加入适当浓度的LPS($20 \mu\text{g}/\text{ml}$, sigma), 0.5%MRBC, 5%BSA, LPS+0.5%MRBC和LPS+5%BSA。然后制成含0.3%琼脂(日本琼脂粉)培养体系,分装到有机玻璃培养皿(直径1cm,容积0.2ml)内,并置于密封的、含CO₂的潮湿空气中37℃培养。在不同的时间间隔内镜检,进行集落计数。实验观察时间:前三组在接种后第2、

6、8、10天;后二组则在接种后第2、4、6、8、天。

为比较研究人外周血B淋巴细胞增殖的动力学,我们按照苏燎原等^[3]建立的实验方法,用Eagle's和RPMI-1640培养液进行B淋巴细胞培养。接种后第7天收获。在收获前18小时注入³H-TdR ($1.2 \mu\text{Ci}/\text{培养瓶}$)。培养细胞收获到49型滤膜(上海产)上。用国产FJ353型双道液体闪烁计数器测量各组的³H-TdR掺入率(epm)。

在预实验中曾选用三种细胞浓度,虽然各实验组的集落计数均随培养时间延长而增多,但以每个培养皿内含 0.75×10^5 细胞的浓度最宜。

集落划记标准:凡由30个或30个以上的细胞组成的细胞团,都记为一个集落。

结 果

实验中曾检验过10名健康献血员的外周血B淋巴细胞在琼脂培养基内增殖情况。献血员的各实验组的各个观察点都设有5个平行样品。各组的实验结果为10名献血员的平均值。液体培养实验:每个人的各观察点仅有3个平行样品。各组的实验结果也是10名献血员的平均值。分别介绍如下:

(一) 集落计数

在LPS、0.5%MRBC和5%BSA分别作用

下, 各组集落计数结果, 经统计学处理, 差异非常显著(表1)。

在 LPS+0.5%MRBC 和 LPS+5%BSA 的协同作用下, 集落计数结果, F 检验, 各组间差异非常显著(表2)。

上述结果表明: 各实验组的第6天集落数

最高(图1)。LPS、0.5%MRBC 和 5%BSA 组的第6天集落计数经 F 检验, 差异显著。LPS+0.5%MRBS 和 LPS+5%BSA 组的第6天集落数经 t 检验, 差异非常显著(表3、4)。

(二) 液体培养结果

Eagle's 液和 RPMI—1640 液分别培养

表1 接种后不同时间各实验组B淋巴细胞集落计数(10例均值)

组别 时间 (天)	LPS 组		0.5%MRBC 组		5%BSA 组	
	范 围	$\bar{X} \pm S$	范 围	$\bar{X} \pm S$	范 围	$\bar{X} \pm S$
2	66—83	75.6±6.1	83—106	96.2±8.5	52—69	62.0±6.8
6	106—186	160.2±32.7	104—140	116.4±14.5	120—142	131.4±8.0
8	83—101	89.4±7.1	65—78	72.4±5.6	65—100	75.0±16.1
10	61—90	77.0±11.0	38—56	42.4±8.7	71—84	77.0±6.2
统计学处理	p<0.01		p<0.01		p<0.01	

表2 接种后不同时间两实验组B淋巴细胞集落计数(10例均值)

组别 时间 (天)	LPS+0.5%MRBC 组		LPS+5%BSA 组	
	范 围	$\bar{X} \pm S$	范 围	$\bar{X} \pm S$
2	60—89	74.4±9.5	31—61	48.9±10.7
4	85—128	104.7±14.4	64—94	79.0±9.5
6	130—175	150.0±16.2	85—128	110.8±20.9
8	75—136	97.0±23.5	75—126	97.4±16.5
统计学处理	p<0.01		p<0.01	

7天后, B淋巴细胞的 ^3H —TdR 掺入率, 经 t 检验, 差异非常显著(表5)。

(三) 细胞形态检查

在 LPS、0.5%MRBC 和 5%BSA 作用下, B淋巴细胞集落多为致密型(图2)。在含 0.5%MRBC 和 5%BSA 的琼脂培养皿内, 可

表3 三实验组第六天的集落数比较

组 别	范围	$\bar{x} \pm S$	P
LPS 组	106—186	160.2±32.7	<0.05
0.5%MRBC 组	104—140	116.4±14.5	
5%BSA 组	120—142	131.4±8.0	

见到少数大而圆的细胞。将琼脂培养皿内的培养物洗涤后, 离心沉淀, 制成涂片, 经非特异

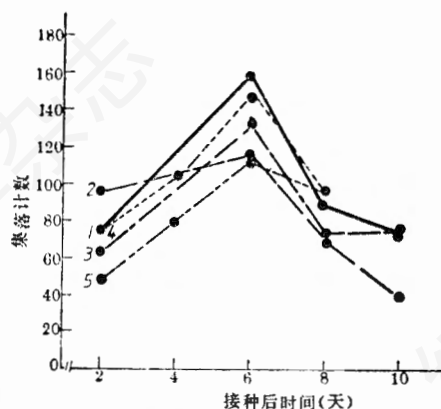


图1 不同丝裂原作用下人血B淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖情况

1——LPS 组 2——0.5%MRBC 组
3——5%BSA 组 4——LPS+0.5%
MRBC 组 5——LPS+5%BSA 组

表4 两实验组第六天B淋巴细胞集落数比较

组别	范围	$\bar{X} \pm S$	P
LPS + 0.5% MRBC组	130—175	150.0 ± 16.2	<0.01
LPS + 5% BSA组	85—128	110.8 ± 20.9	

表5 人外周血B淋巴细胞液体培养七天后³H-TdR掺入率(10例均值cpm)

组 别		范 围	$\bar{X} \pm S$	P
Eagle's 培养液	LPS 组	120—181	156.0 ± 24.9	<0.01
	LPS + 5% BSA	409—885	528.2 ± 193.5	
RPMI 1640 培养液	LPS 组	141—221	182.8 ± 36.0	<0.01
	LPS + 5% BSA	203—384	340.6 ± 79.3	

(含LPS或LPS + 5% BSA的2毫升培养液内加0.2毫升全血)

讨 论

本实验根据丝裂原与细胞膜受体的性质, 选用脂多糖、小鼠红细胞、牛血清白蛋白三种物质作为B淋巴细胞的丝裂原^[2,5,6]。用单层琼脂培养技术, 来比较研究人外周血B淋巴细胞的增殖规律。

在三种物质作用下, 集落数以LPS组最高。而LPS + 5% MRBC和LPS + 5% BSA协同作用时, 前者的集落多于后者。五组实验结果均显示出接种后第六天的集落数为峰值。第八天已明显下降。这不同于B淋巴细胞在液体环境中的生长规律, 也不同于人外周血T淋巴细胞集落的生长规律^[4]。而与J. Radnay等的观察结果相一致。在两种不同的培养环境中B淋巴细胞对LPS的反应性不同, 是由于半固体琼脂培养基能给B淋巴细胞提供良好的支架作用, 便于细胞的移行与相互接触, 促使其分裂增殖。在这方面我们与Jean-Pierre · Farcet和Ugo Testa的看法是一致的^[7]。

五组实验的形态学检查表明: 在三种物质作用下, 人外周血B淋巴细胞在琼脂培养皿内增殖良好, 都能形成完整致密的细胞团。细胞涂片经非特异性酸性酯酶染色, 96%的细胞为阴性。这些都说明: 以LPS为丝裂原, 用单层琼脂培养技术研究B淋巴细胞的特性与功能是适合的。不过目前一般人认为LPS对人外周血B淋巴细胞的作用较弱。这一点在我们的液体培养实验中也得到证实。

考虑到在形成集落过程中细胞间的协作关



图2 B淋巴细胞在三种不同的培养基内, 培养7天时形成的集落
a. LPS组; b. 0.5% MRBC组;
c. 5% BSA组

性酸性酯酶染色检验, 0.5% MRBC组的阳性率为4% (1—7%); 5% BSA组阳性率为1%; LPS组的非特异性酸性酯酶染色涂片中仅有个别细胞浆淡染, 呈浅棕色。琼脂培养皿内培养物压片HE染色欠佳, 集落淡染, 单个细胞染色良好, 为圆形的小淋巴细胞。

液体培养7天后, 离心沉淀, 制成涂片, 干燥后用Wright's染色液染色。油镜检查, 可见到典型的浆细胞、过渡细胞和小淋巴细胞。

系,五组实验均采用含有巨噬细胞的单核样细胞悬液。我们用的 RPMI-1640 培养液含有 15% 的人 AB 型血清。J. Brochier^[8]认为在 RPMI-1640 培养液中加入 AB 型血清,有利于 B 淋巴细胞增殖研究,加入 15% 胎牛血清,则有利于浆细胞成熟研究。我们的实验结果也表明,在含有 15% AB 型血清的琼脂培养基内 B 淋巴细胞仅能增殖。在各实验组的压片中未能找到浆细胞。上述细胞形态学差异反映出培养环境能直接影响 B 淋巴细胞的增殖与分化。

Izaguirre 等^[2]提出接种后第三天就有明显的集落形成,而我们发现在接种后第二天就有较多的典型集落出现。这与种植细胞密度高和 B 淋巴细胞增殖速度快有关。但在 B 淋巴细胞集落形成过程中,是否存在两个或两个以上的 B 淋巴细胞同时增殖而形成一个集落的可能性?是值得探讨的。

此外, Jean-Pierre Farcet 等^[7]曾提出在琼脂培养基上形成的细胞集落不能表示定向祖细胞的特性。Winkelstein 等用表面球蛋白研究证明 B 淋巴集落形成细胞是成熟的 B 淋巴细胞。因此,琼脂培养基上的 B 淋巴集落形成细胞必定服从于淋巴细胞的增殖规律。所以我们的各实验组的集落计数峰值均出现在接种后的第六天。到第八天时已明显下降,当然不排除营养物质不足及细胞活动产物的影响。

小 结

为研究人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内的增殖能力,选用 LPS、0.5% MRBC 和 5% BSA 作为丝裂原,和单层琼脂离体培养技术。比较研究人外周血 B 淋巴细胞在琼脂培养基内形成集落的能力。结果表明:在上述三种丝裂原单独或协同作用下, B 淋巴细胞集落形成良好。接种后第六天集落计数最高,第八天已明显下降。琼脂培养物离心沉淀后,制作的涂片中 96% 以上的细胞为 B 淋巴细胞。

参 考 文 献

- [1] J. Radnay., I. Goldman & L. A. Rozenszajn, 1979, *Nature*, 278:351-353.
- [2] C. A. Izaguirre., M. D. Minden., et al., 1980, *Br. J. Cancer*, 42:430-437.
- [3] 苏燎原等。1977。生物化学与生物物理进展, 3:14-16。
- [4] 马祥瑞, 汪涛等。1982。苏州医学院学报, 2:42-46。
- [5] Sudhir Gnpta & Rodert A. Good, 1980. *Seminars in Hematology* 17(1) 1-29.
- [6] 宗庭益等主编。1980。免疫学基础与临床, 安徽科学技术出版社。p 11-12。
- [7] Jean-Pierre Farcet & Ugo Testa, 1982, *Exp. Haematol.* 10(2):172-177.
- [8] J. Brochier & Lethichy, 1978, in "Human Lymphocyte differentiation: its application to cancer", p 69-70. Edited by B. Serru & C. Rosenfeld.

兔发育过程中乳酸脱氢酶—A、B 基因位点的活性*

刘吉祥 赵国印 王田福

(武汉军区军医学校)

乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, 简称 LDH; EC 1.1.1.27, L-乳酸:NAD⁺氧化还原酶) 是糖酵解途径中的一种重要的酶。Meyerhof (1919) 首先发现此酶, Neidlands^[1] (1952) 证明了它的不均一性, 为后来的同工酶研究开创了

良好的开端。Markert 等^[2] (1959) 用电泳法将牛 LDH 结晶分离出 5 条均具有催化活性的区

* 本工作承华中师范学院生物系刘秉正教授、蔡亚娜副教授和河南医学院牛富文副教授指导, 本校刘加林同志提出宝贵意见, 特此致谢。