

在满江红叶片组织的分离制片中, 可以看到表皮细胞(图版: 6、7)被分离下来; 满江红鱼腥藻也被分离出来, 并可以清楚地看到它们具有异型胞和营养胞(图版: 5)。看来叶腔膜已破, 而藻被释放出来(满江红鱼腥藻生活在满江红背叶片的基部的共生腔中, 共生腔由叶腔膜包围)。从分离的整体叶肉细胞看, 发现它们具有两种类型: 一种是与普通绿色植物的一样, 具有叶绿体的叶肉细胞; 另一种是细胞中间有一个直达对面的洞, 就像市场上出售的面包圈(dough-nut), 我们称它为环状叶肉细胞(*Annular mesophyll cell*)(图版: 1、2、3、4)。以下把这种细胞简称为AM细胞(AM cell)。AM细胞中含有丰富的叶绿体, 且这里的叶绿体比非环状叶肉细胞中的饱满; 通过变化显微镜的焦距可以看到洞的四壁含有致密物质(图版: 1)。这种细胞迄今尚未见报道, 是一个值得探讨的问题。

Seto 和 Nasu(1975)<sup>[8]</sup>报导过细满江红(*A. filiculoides lamark*)的气孔有两个保卫细胞, 而羽叶满江红(即复瓦状满江红)只有一个。气孔的保卫细胞是由表皮细胞特化而成, 细胞内没有发育完好的叶绿体。一般认为表皮细胞没有发育完好的叶绿体, 只有少数发育不成熟小的质体。我们所观察的表皮细胞和气孔的保

卫细胞(图版: 6, 7)与以上所说是一致的。气孔只有一个保卫细胞。而我们看到的另一种环状细胞(图版: 1、2、3、4)是叶肉细胞, 其中含有丰富的发育完好的叶绿体。这种细胞大约占总叶肉细胞的15%左右, 可见这个比例是很可观的。那么, 这种特殊结构的AM细胞的功能是什么呢? 推测它可为细胞增加表面积, 有利于物质的交换, 提高代谢强度。AM细胞内壁的致密物质可能是由于代谢旺盛和频繁的物质交换而沉积的同化物。但这仅系推测, AM细胞的功能究竟如何还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Sircar, S. M., 1935. *J. Roy. Microbiol. Soc.* III 55: 238—244.
- [2] Kawamatu, S., 1965. *Cytologia*, 30: 80—87.
- [3] Peters, G. A. et al., 1978. *New Phytol.*, 80: 583—593.
- [4] Hill, D. J., 1977. *New Phytol.*, 78: 611—616.
- [5] Neumüller, M. and Bergman, B., 1981. *physiol. Plant*, 51: 69—76.
- [6] 段续川, 1959. 植物学报, 8 (1): 1—14.
- [7] 段续川, 1962. 植物学报, 10 (4): 285—291.
- [8] Seto. K. and Nasu, 1975. *Bull. Osaka Mus. Nat. Hist.*, 29: 51—60.

## 小鼠 B 细胞的不同分化阶段对淋巴 细胞杂交瘤形成的影响

### 1. 从脾细胞中去除抗原特异性 B 细胞及前浆细胞后对阳性杂交瘤形成率的影响

沈国良 刘尔翔 吴安然

(中国医学科学院基础医学研究所 世界卫生组织免疫研究和培训合作中心)

自开创小鼠淋巴细胞杂交瘤技术以来<sup>[1]</sup>关于 B 细胞的哪一个分化阶段参与融合并形成具有分泌抗体功能的杂交瘤, 至今没有定论。由

于 B 细胞分化各个阶段尚无统一标准, 同时由免疫母细胞转变成浆细胞的过程中尚有多种形态表现<sup>[2]</sup>, 从而给统一认识带来困难。本文拟

根据 B 细胞的表面有无特异性 Ig(sIg) 以及是否分泌特异性抗体, 将 B 细胞受抗原刺激后的分化过程分为抗原特异性 B 细胞(sIg<sup>+</sup>, 不分泌抗体), 前浆细胞(sIg<sup>+</sup>, 分泌抗体)及浆细胞(sIg<sup>-</sup>, 分泌抗体)三个阶段。用抗原特异性玫瑰花技术从脾细胞中除去抗原特异性 B 细胞及前浆细胞(但基本上保留浆细胞)以后, 再与骨髓瘤细胞融合, 并与未经处理的脾细胞的融合结果进行比较, 观察浆细胞在淋巴细胞融合中所起的作用, 作为了解这三种不同分化阶段的 B 细胞与阳性杂交瘤形成的关系的第一步。

## 方 法

### 一、区分前浆细胞及浆细胞的方法

#### 1. 醛化血球的低 pH 抗原偶联法

(1) 按 Walker, S. M. [3]改良法醛化绵羊红细胞(SRBC)。

#### (2) 低 pH 直接偶联抗原法

按 Ling, N. R. 等人[4]的方法偶联抗原, 但作如下改变, 10%醛化绵羊红细胞 2 ml, 离心去上清液, 加入 4 ml 0.1M pH 4.4 的醋酸缓冲液及 0.5 ml OA (卵清蛋白, Sigma, No. A-5503)抗原液 (8 mg/ml) 充分混匀后, 分装 4 支试管, 37°C 水浴内放置 10 分钟, 再在微型震荡器上震荡 2 分钟, 然后又放 37°C 水浴, 再震荡。如此反复二小时, 然后用 0.15 M pH 7.2 PBS 液洗二次, 集中四管细胞悬浮在 0.1%牛血清蛋白-pH 7.2 PBS 液中, 鉴定合格后配成一定浓度 ( $6 \times 10^8$ /ml 及  $1 \times 10^8$ /ml), 此即为 OA-醛化 SRBC, 4°C 贮存备用。

#### 2. 免疫小鼠脾细胞悬液的制备

无菌取经 OA 连续加强免疫 4 次的小鼠脾脏, 制成 10 ml BSS-细胞悬液(置冰浴), 自然沉降 8 分钟后取 8-9 ml 置于另一离心管, 用冷 BSS 补充至 10 ml。混匀后取出 1 ml, 分装两支试管, 每支 0.5 ml, 于 1000 r. p. m (冰浴)离心 5 分钟, 去上清液, 轻击管底将细胞打匀, 然后加入 0.5 ml 灭菌双蒸水, 震荡 8 秒钟, 立即加入 0.5 ml 的 1.8%灭菌盐水, 混匀后 1000 r. p. m (冰浴)离心 5 分钟, 去上清液, 每管加入 0.4-0.5 ml RPMI 1640, 将两管细胞集中, 分散均匀后计数活脾细胞数。

#### 3. 区分前浆细胞及浆细胞

按 Bankert 和 Wolf [5]的方法原理, 取上述去红细胞后的  $10^6$  活脾细胞与 0.1 ml OA-醛化 SRBC ( $1 \times 10^8$ /ml)混匀, 置冰浴 5 分钟后, 摇匀并在冰浴中于 800 r. p. m 离心 5 分钟, 然后用悬腕旋转法将细胞层层剥离分散, 再在冰浴中重复上述离心及分散细胞一次。然后用 RPMI 1640 液补足至 0.6 ml, 摇匀后取出 0.3 ml (含  $5 \times 10^5$  脾细胞)于另一小试管, 再依次加入 0.1 ml 经 SRBC 吸收过的豚鼠血清(补体), 约 0.05 ml 50~60%的用成熟的三氯化铬液致敏的 OA-SRBC, 0.05 ml 用 BSS 适当稀释的免抗鼠 Ig 血清。充分混匀后注入 Cunningham 氏玻片小室中, 用腊封口, 置 37°C 孵箱中 2 小时后在显微镜下检测空斑(即单纯空斑, 代表浆细胞, 见图 1)及玫瑰花-空斑(简称联合空斑, 代表前浆细胞, 见图 2)数。

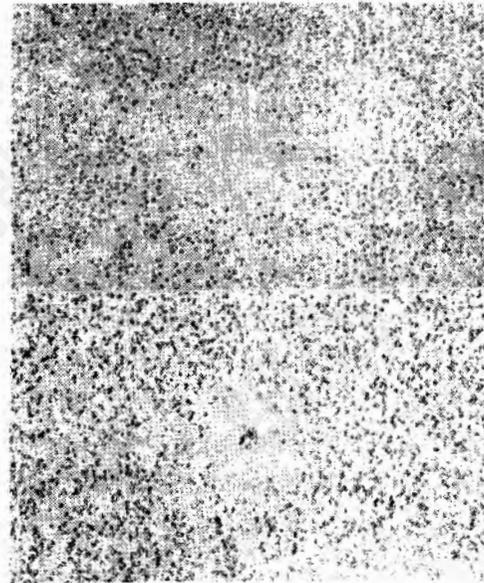


图 1 单纯空斑, 代表浆细胞(SIg<sup>-</sup>, 分泌抗体) (上图)

图 2 玫瑰花-空斑, 代表前浆细胞(SIg<sup>+</sup>, 分泌抗体) (下图)

### 二、带有特异性表面 Ig 的 B 细胞的去除及鉴定

按 Walker S. M. 等人[6]的方法, 但作若干重要改变, 简述如下:

无菌取脾制成 10 ml BSS-S-细胞悬液 (BSS-S, 平衡盐溶液 Blanced Salt Solution + 5% 小牛血清) 轻吹混匀后直立静置 8-10 分钟, 取出 8-9 ml 置于另一离心管中, 混匀, 再分至 4 支试管中, 每管 1.2 ml。于 800 r. p. m 离心 8 分钟去上清液后, 轻击管底, 每管加入 0.6 ml Tris-NH<sub>4</sub>Cl (Tris 1.03 克, NH<sub>4</sub>Cl

3.735克加蒸馏水至500ml,用1N HCl调节pH至7.2)用滴管轻吹均匀,在20℃水浴中处理10分钟,其间摇动试管2~3次,而后每管加入5ml冷BSS-S液,混匀,于1000 r. p. m离心8分钟去上清液,然后各管加入1ml冷BSS-S,轻轻吹打细胞,将4管细胞集中,混匀后计数活脾细胞数。

取上述去红细胞后的活脾细胞分置两支试管,每管 $2 \times 10^7$ 细胞,800 r. p. m离心5分钟,去上清后每管加入0.5ml冷BSS-S,然后每管再加入0.35ml OA-醛化SRBC( $6 \times 10^8$ /ml)。将细胞轻轻吹打分散,在冰浴预冷5分钟,摇匀后根据实验需要按下列三种不同的玫瑰花形成条件分别继续进行:①500 r. p. m离心3分钟(冰浴)→悬腕旋转分散细胞→500 r. p. m离心3分钟(冰浴)→悬腕旋转分散细胞。②800 r. p. m离心5分钟(冰浴)→悬腕旋转分散细胞→800 r. p. m离心5分钟(冰浴)→悬腕旋转分散细胞。③800 r. p. m离心8分钟(冰浴)→悬腕旋转分散细胞→800 r. p. m离心8分钟(冰浴)→冰浴30分钟→悬腕旋转分散细胞。然后各管加入5~6ml冷BSS-S,并分别移至二支装有2ml比重为1.090的泛影葡胺-聚蔗糖分层液的离心管液面上,按Walker等人<sup>[6]</sup>的方法,在冰浴中以3500 r. p. m(2000g)离心15分钟,取界面细胞用4~5ml BSS-S洗一次后集中悬浮在BSS中,此即为去掉有特异性表面Ig的B细胞(包括抗原特异性B细胞和前浆细胞)后的其余脾细胞。

去除效果鉴定:

将上述两管( $2 \times 10^7$ 脾细胞 +  $2 \times 10^8$  OA-醛化SRBC/管)细胞在玫瑰花结试验结束后,加入RPMI<sub>1640</sub>,补足至4ml(准量),混匀后取出0.1ml(含 $5 \times 10^5$ 脾细胞)。同样,将分离完毕后的其余脾细胞也取出 $5 \times 10^5$ 个,按同样条件同时用单层空斑技术测定间接空斑数,比较用分层液分离前后单纯空斑(即浆细胞)及联合空斑(前浆细胞)数的变化情况。

### 三、杂交瘤方法

1. 小鼠免疫方法:取6周龄左右的Balb/c小鼠或昆明种小鼠,用OA完全福氏佐剂0.2ml(含0.8mg OA抗原)腹腔内注射,经基础免疫6~8周后,根据实验需要,按Stahli等人<sup>[7]</sup>的可溶性抗原高剂量连续加强免疫的办法,用OA腹腔内注射加强免疫。

2. 细胞融合方法:将分离除去抗原特异性B细胞和前浆细胞后的脾细胞与作为对照的未经分离的同一小鼠的脾细胞,以2:1的比例与骨髓瘤细胞NS<sub>1</sub>或P<sup>2</sup>/O细胞分别进行融合。每块24孔板的脾细胞数

均为 $4 \times 10^6$ ,骨髓瘤细胞数为 $2 \times 10^6$ ,融合剂为PEG [Merck, M. W. 1000, 用无血清RPMI<sub>1640</sub>配成50% (W/V)]0.4ml。按常规融合后分散在每孔含有 $1 \times 10^5$ 个正常Balb/C小鼠腹腔巨噬细胞的24孔板中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱内培养,并根据需要及时换HAT培养基。

### 3. 特异性杂交瘤的测定方法——ELISA方法:

按照刘尔翔等人<sup>[8]</sup>的方法提取小鼠IgG,鉴定并免疫家兔。

参照Pharmacia公司有关CNBr活化琼脂糖4B偶联蛋白的说明及沈翊菲<sup>[9]</sup>的有关方法步骤制备小鼠IgG的亲层析柱,并用兔抗鼠IgG全血清过柱、洗脱、浓缩并鉴定经亲和层析分离获得的兔抗鼠IgG全血清中的特异IgG。

参照Wilson, M. B等人<sup>[10]</sup>的方法,用过碘酸钠法制备辣根过氧化物酶与上述经亲和层析提取的兔抗鼠IgG结合物,再经过结合物滴定、抗原滴定而建立ELISA测定特异性杂交瘤所分泌的抗体的方法。

## 结 果

### 一、不同条件下形成的玫瑰花,经用1.090分层液(2ml, 3500 r. p. m离心15分钟)分离前后,前浆细胞及浆细胞的数量变化:

三只昆明种小鼠经OA完全佐剂基础免疫6周后,用OA腹腔连续加强免疫4天(剂量分别为0.2, 0.4, 0.4, 0.4mg/天),然后分别取脾细胞按下列三种不同的条件形成玫瑰花,并用单层空斑技术测定分离前后脾细胞中前浆细胞和浆细胞的数量变化,结果如表1。

由此结果可知,三种不同条件下形成的玫瑰花,经用上述同一条件分离后,可将已形成玫瑰花空斑的前浆细胞分离除去,同时可将浆细胞基本保留下来。玫瑰花形成条件③是原作者<sup>[6]</sup>采用的条件,考虑到改变后的条件②与条件③相比,浆细胞的存留率很接近,但②可以省去冰浴30分钟这一步,这对分离后的脾细胞用于融合十分有利,同时鉴于玫瑰花形成条件①虽然浆细胞存留率高,但恐因离心速度小,时间短,有可能部分前浆细胞未能形成玫瑰花而存留下来,所以在正式分离融合实验时,采用玫瑰花形成条件②,而不采用条件①或③。

表 1 玫瑰花形成条件不同时, 经用 1.090 分层液分离前后前浆细胞及浆细胞的数量变化

玫瑰花形成条件	前浆细胞		浆细胞		浆细胞存留率 (%)
	$1 \times 10^6$ 脾细胞		$1 \times 10^6$ 脾细胞		
	分离前	分离后	分离前	分离后	
① 500 r. p. m 离心 8 分钟 (冰浴)→悬浮 →重复一次	113	0	226	207	91
② 800 r. p. m 离心 5 分钟 (冰浴)→悬浮 →重复一次	148	0	330	260	80
③ 800 r. p. m 离心 8 分钟 (冰浴)→悬浮 →800 r. p. m 离心 8 分钟 (冰浴)→冰浴 30 分钟→悬浮	118	0	286	218	76

## 二、用抗原特异性玫瑰花方法, 分离除去小鼠脾细胞中抗原特异性 B 细胞和前浆细胞后对阳性杂交瘤形成率的影响

经 OA 完全福氏佐剂基础免疫一个半月以后的 Balb/c 小鼠, 用 OA 抗原分别以 0.2、0.4、0.4、0.4 mg/天腹腔内注射连续加强免疫 4 天后取脾细胞, 用抗原特异性玫瑰花形成技术, 分离除去脾细胞中抗原特异性 B 细胞及前浆细胞, 然后分别与 NS<sub>1</sub>(实验组 1, 2)或 SP<sup>2</sup>/O(实验组 3)细胞进行融合, 并用 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤孔, 三次实验结果总结如表 2。

用二因素方差分析测定有关的三个 F 值, 结果是: 未分离与分离后融合实验之间  $F = 20.21, p < \%_{00}$ , 说明有非常显著的差异, 而各实验组之间  $F = 0.2526 < 1, p > 25\%$ , 说明实验组之间无显著差异, 交互  $F = 1.7524, p > 5\%$ , 说明三个实验组对处理(即分离)的反应是一致的。

表 2 用抗原特异性玫瑰花形成方法, 分离除去小鼠脾细胞中抗原特异性 B 细胞及前浆细胞对阳性杂交瘤形成率的影响

实验组别	未分离融合实验			分离后融合实验		
	总杂交瘤孔数	阳性杂交瘤孔数	特异性效率 (%)	总杂交瘤孔数	阳性杂交瘤孔数	特异性效率 (%)
1	23	12	52.17	13	2	15.38
2	6	3	50.00	8	1	12.50
3	11	7	63.64	8	0	0
合计	40	22		29	3	
平均			55.00%			9.29%

$$\text{特异性效率} = \frac{\text{阳性杂交瘤数}}{\text{总杂交瘤数}} \times 100\%$$

## 讨 论

Andersson 等人<sup>[11]</sup>用速度沉降法和有丝分裂原 LPS 等体外激活淋巴细胞的方法, 认为 B 母细胞能与骨髓瘤细胞融合并形成分泌 Ig 的杂交瘤, 而处于静止状态的小淋巴细胞不能形成杂交瘤。Clafin 等人<sup>[12]</sup>发现, 获得阳性杂交瘤的最适时间在空斑形成细胞高峰前一天, 这提示融合实际可能发生在“前浆细胞”阶段。Köhler<sup>[13]</sup>、Shulman<sup>[14]</sup>、Stahli<sup>[7]</sup>和 Lake<sup>[15]</sup>等人认为分泌 Ig 的细胞即空斑形成细胞才是参与融合并形成有分泌抗体功能的杂交瘤细胞。所有这些作者在进行这些实验和分析其结果时, 均未能将分泌抗体的浆细胞和前浆细胞加以区分。当用抗原特异性玫瑰花技术分离除去抗原特异性 B 细胞及前浆细胞以后, 用保留有 80% 浆细胞的脾细胞进行融合时, 杂交瘤的特异性效率从未分离时平均 55% 下降到分离后平均 9.29%。假定浆细胞是参与融合并形成有分泌功能的杂交瘤的, 那么经分离后融合形成的 29 个杂交瘤中应有  $29 \times 55.0\% \times 80\% = 20$  个阳性杂交瘤, 而实际上只有 3 个。由此实验结果分析: 浆细胞(sIg<sup>-</sup>, 分泌 Ig)参与融合并形成具有分泌抗体功能的杂交瘤的可能性很小。Paslay, J. W. 等人<sup>[16]</sup>证实, 最高增殖期的脾细胞融合后形成的杂交瘤最多, 认为参

与融合的细胞是激活后的增殖期细胞,而不是最后阶段的浆细胞。这与我们的结果相一致,至于是前浆细胞还是抗原特异性B细胞参与融合形成具有分泌抗体功能的杂交瘤,仍有待进一步实验证实。

下列措施对于增进分离融合实验的可靠性是至关重要的:①用Tris-NH<sub>4</sub>Cl于20℃处理10分钟的办法去掉脾细胞中的红细胞,而不是用分层液分离的方法<sup>[6]</sup>,不仅简单、易行,而且效果更好,②醛化血球改用8%戊二醛,减低了非特异性粘附的倾向<sup>[4]</sup>,③玫瑰花形成及其后的分离过程均在冰浴中进行,因在37℃时非特异性粘附及去除能力大为增强<sup>[4]</sup>,这将使部分浆细胞被非特异粘附而被去掉,所以不能反映出脾细胞中这两种细胞的本来面目。因醛化以后的红细胞离心时更易下沉,为了保证脾细胞与OA-醛化血球形成玫瑰花时能有更多的机会均匀地接触,本实验以增加细胞浓度、分管离心的办法减少总液量,同时用快速调至所需速度(800 r. p. m)的办法来减少玫瑰花形成试验时因细胞沉降速度不同而可能引起的分层现象。即使这样,也难以保证每一个有抗原特异性表面Ig的细胞都能与三个以上的OA-醛化SRBC形成玫瑰花。经过分层液分离后仍会有少量带有特异性表面Ig的细胞未被沉淀而存留。这也许就是经过分离以后的融合实验中仍有9.29%特异性杂交瘤的原因。④分离融合实验整个流程需5.5~6.0小时,融合前的整个流程中血清的存在(BSS-S)对于保持脾细胞的活力是极重要的。⑤考虑到温度和时间对杂交瘤形成的影响,在作分离和未分离脾细胞对比融合实验时,要同时融合,即未分离融合实验也放在分离实验完成以后再作。另外,尽量作相同的温度处理。且在结果处理时不以共有多少个阳性孔来衡量分析分离前后的融合差别,而是以特异性阳性率进行比较,这样就可以避免因融合前及融合过程中可能发生的条件

差异所造成的实验误差,使实验结果能真正反映出脾细胞中不同分化阶段的B细胞与骨髓瘤细胞融合并形成具有分泌特异性抗体的能力。

### 参 考 文 献

- [1] Kohler, G., and Milstein, C. 1975 *Nature* 256: 495—497.
- [2] 北京医学院主编,基础和临床免疫学,1981, 31—32.
- [3] Walker, S. M., and Weigle, W. O. 1979 *Cellular Immunol.* 46: 170—177.
- [4] Ling, N. R., Stephens, G. Bratt, P., and Dhaliwal, H. S. 1979 *Molecular Immunol.* 16: 637—642.
- [5] Bankert, R., and Wolf, B. 1973 *J. Immunol.* 111. 1790—1799.
- [6] Walker, S. M., Meinke, G. C., and Weigle, W. O. 1979 *Cellular Immunol.* 46: 158—169.
- [7] Stahli, C., Stahelin, T., Miggiano, V., Schmidt, J., and Haring, P. 1979 *Hybridoma Technology with Special Reference to Parastitic Disease* 53—61.
- [8] 刘尔翔,淋巴细胞杂交瘤技术方法简介。(广东省微生物学会杂交瘤学习班资料)。
- [9] 王世中主编,免疫化学技术,1980, 34—39.
- [10] Wilson, M. B., and Nakane, P. K. 1978 *International Conference on Immunofluorescence and Related Staining Techniques* 6th Vienna 215—235.
- [11] Andersson, J., and Melchers, F. 1978 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81. 130—193.
- [12] Claflin, J. L., and Williams, K. 1978 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81: 107—109.
- [13] Kohler, G. and Shulman, M. 1978 *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 143—148.
- [14] Shulman, M., and Kohler, G. 1979 *Cells of Immunoglobulin Synthesis*. Edited by Benvenuto Pernis, Henry J. Vogel. Academic press 275—293.
- [15] Lake, P., Clark E., Knorshidi, M., and Sunshine, G. 1979 *Eur. J. Immunol.* 9: 875—886.
- [16] Paslay, J. W., and Roozen, K. J. 1981 *Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridoma*. Edited by Hämmerling, G. J. et al., Elsevier/North-Holland Bio Medical Press Amsterdam. 551—559.