

- [7] Sordahl, L. A. et al.: 1971, The Mitochondrion, In: Methods in Pharmacology, Vol. 1, New York, 247—286.
- [8] 张龙翔等, 1982, 生化实验方法和技术, 第一版, 北京, 人民教育出版社 221—224.
- [9] Shlofer, M. et al.: 1980, *Basic Res. Cardiol.*, 75 (4): 555—571.
- [10] Nayler, W. G.: 1980, In: Biomed. Clin. Aspects of Coenzyme Q, Vol. 2, Elsevier/North-Holland, 409—425.
- [11] Kawasaki, T. et al.: 1981, In: Biomed. Clin. Aspects of Coenzyme Q Vol. 3, Elsevier/North-Holland Biomed. Press., 337—348.
- [12] Katagiri, T. et al.: 1981, *Ibid*, 349—359.
- [13] Ohhara, H. et al.: 1981, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13 (8): 741—752.

动物淋巴细胞体外转化反应稳定性因素的探讨

(一) 影响家兔 T 淋巴细胞转化反应因素的研究

王文新 赵月梅

(兰州医学院病理生理学教研室)

淋巴细胞转化反应(简称淋转)是机体细胞免疫机能状态的重要指标之一,在临床方面已被广泛应用^[1-3]。为了能在实验动物中建立常规的测定方法,获得较好的可复性和稳定性,并能客观地反映机体细胞免疫功能状态,我们对家兔淋转体外培养诸影响因素的条件进行了较系统的观察研究,初步判明其影响因素。实验结果总结如下。

材料与方 法

一、血 样

从健康家兔耳缘静脉取血,每毫升全血加入 15~20 单位肝素。

二、淋巴细胞转化反应的方法

采用微量全血培养方法^[1]。将肝素化全血 0.1 毫升,置于含植物血凝素 (PHA) 133 微克/毫升营养液 (广州医药工业研究所生产,批号 81066。配制成 0.1% 浓度,即 0.1 毫升含有 100 微克)和含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 液 3 毫升小瓶中,每毫升营养液加入青—链霉素各 100 单位,用 5.6% NaHCO₃ 调至 pH 7.4,置于 37℃ 温培育(为后述方便,将此种营养液称为基础营养液)68~72 小时。终止培养后,将培养物先移至离心管内,经 1000 转/分离心 10 分钟后弃去 2/3 上清液,加入低渗盐水至原液量,再置于 37℃ 温育,使大部分红细胞溶解,经 1000 转/分离心 10 分

钟全弃上清液。然后用冰醋酸—甲醇混合液悬浮,经 1500 转/分离心 10 分钟,全弃上清液。上述步骤再重复一次。弃上清液留适量将细胞悬浮,用滴管移至玻片上使之自然散开,待干后用 Wright-Giemsa 染色。将每一标本在油镜下计数 200 个淋巴细胞,并算出淋巴细胞母细胞(包括染色体型及过渡型)的百分比,即为淋巴细胞转化率。

三、动物编组

影响淋转诸因素的条件,包括小牛血清含量和 PHA 含量的变化,营养液不同 pH 值以及不同血量等四个方面进行观察研究。为此,将动物分为四大组,每组选健康家兔 10 只。对一种影响因素,每次实验取一只家兔外周血进行比较,而不同量度值设复管 3 瓶,取其均值为一次实验数据。

结 果

一、不同小牛血清含量对淋转的影响

将基础营养液中小牛血清含量分别改为 5%, 10%, 15%, 20% 和 25% 等五种,各加入 0.1 毫升同一只家兔外周血进行培育。从图 1 可以看出,含 5% 及 10% 其转化率只有 20.2 ± 3.96% 或 20.0 ± 4.16%, 而含量为 15% 和 20% 时,则转化率分别增至 43.6 ± 3.48% 及 52.0 ± 1.84%, 但当含量增加到 25% 时,其转化率反而仅为 29.9 ± 5.28%。分别经统计学处

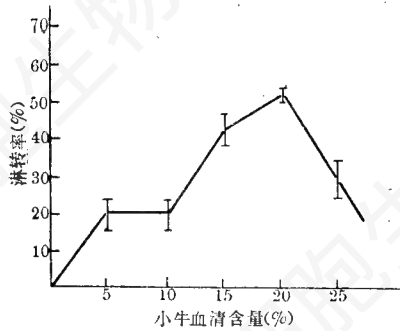


图 1 不同小牛血清含量对淋转影响的比较

理并与含 20% 相比, P 值 <0.05 或 <0.001 , 均有非常显著性差异。

二、不同 PHA 含量的影响

在基础营养液中分别加入 80, 100, 120, 133, 150, 170, 200 和 230 微克/毫升的 PHA 等八种不同剂量, 然后再各加入同一只家兔 0.1 毫升外周血进行培育比较。结果见图 2。当 PHA 含量每毫升营养液为 133 微克时转化率最高, 而含量减少或增加时其淋转率均降低。经统计学处理 PHA 含量为 80 微克, 100 微克, 120 微克, 150 微克, 170 微克, 200 微克和

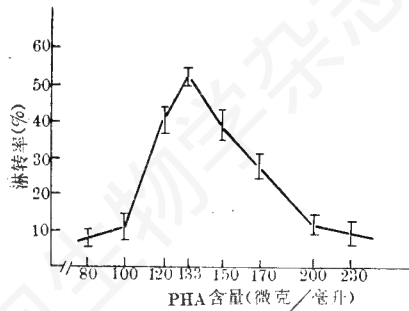


图 2 不同 PHA 含量对淋转的影响

230 微克/毫升同 133 微克/毫升相比, P 值均 <0.001 , 有非常显著性差异。

三、营养液不同 pH 对淋转的影响

将基础营养液 pH 值用 5.6% NaHCO_3 分别调至 7.0、7.2、7.4, 和 7.6 四种, 然后各加入同一只家兔外周血 0.1 毫升进行培育比较。从表 1 可以看出, pH 7.0 与 7.2 时, 其转化率

最低, 而 pH 7.4 时, 转化率达到较高水平。经统计学处理 pH 7.0 和 7.2, 7.4 同 pH 7.6 相比, $p < 0.05$ 或 < 0.001 有非常显著性差异。(见表 1)

表 1 营养液不同 pH 对淋转的影响

组别	例数	淋巴细胞转化率均数 ± 标准误 (%)	P 值
(1)pH7.0	10	40.8 ± 2.04	(1)与(3)比, $p < 0.001$
(2)pH7.2	10	41.3 ± 4.15	(2)与(3)比, $p < 0.05$
(3)pH7.4	10	52.0 ± 1.84	
(4)pH7.6	10	48.9 ± 2.99	(4)与(3)比, $p > 0.50$

四、不同血量对淋转的影响

将基础营养液加入同一只家兔外周血, 但每培养瓶血量分别加入 0.03 毫升, 0.1 毫升和 0.2 毫升以上进行培育比较。实验表明, 血量 0.03 毫升和大于 0.2 毫升其转化率均转低, 同血量 0.1 毫升相比, P 值 < 0.001 , 均有非常显著性差异(见表 2)。

表 2 不同血量对淋转的影响

组别	例数	淋巴细胞转化率均数 ± 标准误 (%)	P 值
(1)血量 0.03 毫升	10	29.0 ± 5.65	(1)与(2)比, $p < 0.001$
(2)血量 0.1 毫升	10	52.0 ± 1.84	
(3)血量 0.2 毫升	10	45.5 ± 3.29	(3)与(2)比, $p < 0.001$

讨 论

人外周血淋巴细胞体外培养方法甚多。为了获得较好的动物实验结果, 在本文研究中, 采用微量全血法测定家兔外周血淋巴细胞对致分裂原(PHA)的转化反应。其方法, 操作简便, 用量极少, 而稳定性好。文献报道中曾提出小牛血清不同浓度对人的淋巴细胞体外培养是有影响的^[4]。我们观察的结果同文献报道相一致。当小牛血清含量为 20% 时, 家兔外周血淋转率最高。而含量过低或过高时, 其淋转率均为低下。可见, 小牛血清含量太多对细胞培养是有毒性作用, 而含量太少由于刺激作用不够, 转化率又较低, 故要选择其适宜浓度。在实验中还发现混合牛血清比单头牛血清更佳。

关于 PHA 含量对淋巴细胞体外转化反应的影响,我们发现,对家兔而言以 133 微克/毫升的含量其淋转率最高,是适宜的浓度。可见,PHA 含量太低由于激发作用轻,致使转化率偏低,而含量太多可能因为引起红细胞发生明显凝集又影响淋巴细胞转化。这一结果同文献报道一致^[5], Trowell 氏认为 pH 波动范围较大,可以从 pH 6~pH 8.4^[6]。但我们发现,在没有 CO₂ 温箱的情况下以 pH 7.4 为宜,其转化率达到较高水平。这可能与机体正常血液酸硷度为 pH 7.4 这一因素有关。而 pH 7.0 和 pH 7.2 时,淋转率偏低。因此,营养液 pH 值在每次实验时就要固定在同一条件下进行培育,这对淋转的稳定性是有重要意义的。

在 3 毫升 RPMI 1640 营养液中,究竟加入多少血量适宜?能否以最低限度的血量而获得较好的实验效果?在我们实验研究中,0.03 毫升血量生长不好且转化率处于低水平状态,这同文献报道相吻合^[7]。但血量超过 0.2 毫升以

上转化率又有所降低。究其原因或是由于营养液中营养成份不足,或是由于细胞拥挤^[8],我们在选择血量与营养液两者之间比例时发现在 3 毫升营养液中取家兔血 0.1 毫升,其转化率最好。

参 考 文 献

- [1] 王文新等, 1979, 中华医学杂志, 59 (9): 539—542.
- [2] Catalona WJ., 1973. *Cancer*. 31: 65.
- [3] 柴君杰等, 1981, 中华流行病学杂志, 2(4): 251—252.
- [4] 中国医科院肿瘤研究所免疫室等, 1977, 肿瘤防治研究, 4: 55—56.
- [5] 上海二医基础部同位素室等, 1978, 生物化学与生物物理进展, 6: 6—10.
- [6] Trowell, O. A., 1965. *Histology and Physiology*. 2: 149.
- [7] 神谷贤二等, 1982, 日本小儿科学会杂志, 86 (1): 80.
- [8] Moorhead, J. FL. et al., 1967. *Immunol.* 99: 413.

胶质纤维酸性蛋白免疫细胞化学技术及其在体外培养胶质瘤中的形态表现

居 俐 王天佑 邵文钊 历俊华

(北京市神经外科研究所)

胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein 简称 GFAP)首先由 Eng 等人从含有丰富的纤维型星形细胞的多发性硬化斑块中分离出来^[1]。此后用组织化学及生物化学方法证明,这种蛋白质存在于正常星形细胞(主要是纤维型星形细胞)、反应性星形细胞及星形细胞瘤的胞浆中^[2],是星形细胞的一种标志蛋白。神经病理学家用它来识别星形细胞来源的肿瘤^[3]。通常用来显示细胞内 GFAP 的方法是免疫细胞化学法。它利用抗原、抗体反应的原理,具

有较高的特异性和灵敏性,但是染色结果常受很多因素影响。我们摸索了体外培养的胶质瘤细胞显示 GFAP 的免疫细胞化学染色方法,比较了某些实验条件,取得了较满意的结果。

材 料 和 方 法

一、培养细胞

1. 胶质瘤细胞:为时所建立的来源于人多形性胶质母细胞瘤的细胞系,代号 BT 325(资料待发表)。在 RPMI 1640 培养基及 20%小牛血清中,每 7 天传代一次,至今已 65 代。本实验采用第 51 代至 60 代。