

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。

细胞生长于培养瓶中的小盖玻片上, 传代后第二天取出染色。

2. 对照细胞: 人脑膜瘤细胞、正常人成纤维细胞、人胚肾上皮细胞和人胚心肌细胞, 均为短期体外培养。

以上细胞在进行固定前均经磷酸缓冲盐水(PBS)洗1次。

二、抗血清

1. 兔抗人 GFAP 抗血清, 系由 Eng 博士赠送。抗原系自人多发性硬化斑块分离的 GFAP, 分子量 41,000 至 45,000, 免疫兔得到抗血清。

2. 羊抗兔 IgG 抗血清, 由本所免疫室提供。

3. 过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(PAP), 丹麦 DAKO 公司产品。

4. 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 抗血清, 北京生物制品研究所产品。

三、固定

曾用两种不同的固定方法, 固定后用 PBS 冲洗。

1. 4%多聚甲醛^[4], 固定2小时。

2. 4%中性甲醛, 固定2小时。

四、染色

1. PAP法^[5]

(1) 处理细胞膜: 用过下述二种方法:

甲. 1% Triton X-100, PBS 配制, 处理30分钟。

乙. 1% 盐酸酒精(70%酒精), 处理10分钟后进入70%酒精。

(2) 第一抗体: 1:250—1:500 兔抗人 GFAP 抗血清, 曾试过室温过夜, 37℃ 30分钟或4℃冰箱过夜。

(3) 第二抗体: 1:20 羊抗兔 IgG 抗血清, 室温或37℃, 30分钟。

(4) 第三抗体: 1:50—1:100 PAP, 室温或37℃, 30分钟。

(5) 显色: 曾用过北京化工厂和美国 Sigma 厂生产的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB), 其剂量及过氧化氢浓度见文献^[5]。

为减轻非特异着色, 用过两种方法:

甲. 在加第一抗体前, 用1:20正常羊血清室温下处理切片10分钟。

乙. 在第一和第三抗体的稀释液中, 按1%体积加入正常羊血清。

2. 间接法

第(1); (2)两步同 PAP 法, 第(3)步用1:40酶标羊抗兔, 在室温或37℃下处理30分钟。不用第三抗体, 显色及其后处理同 PAP 法。

五、对照

1. 抗血清对照, 以1:250—1:500的正常兔血清代替第一抗体。

2. 细胞对照, 用上述对照细胞代替胶质瘤细胞。

结 果

一、染色方法

固定以4%多聚甲醛2小时效果最好, 4%中性甲醛效果较差。细胞用1% Triton X-100处理30分钟, 或用1%盐酸酒精处理10分钟均可, 但以前者为佳。未经此步处理的细胞, 染色为阴性。PAP法较间接法的非特异着色浅, 将正常羊血清按1%浓度加入第一、三抗体中则效果更好。环境温度对结果产生明显影响。加第一抗体后, 以4℃冰箱过夜的效果最好; 室温下因温度波动较大, 结果常不理想; 37℃时非特异吸附明显加重。第二、三抗体处理时, 室温较37℃为好。第一、二、三抗血清的最适稀释度分别为1:250, 1:20, 1:50, 不同厂家的 DAB 显色效果差别很大, 北京化工厂的 DAB 能产生明显的非特异着色。

以正常兔血清代替第一抗体, 结果阴性。用上述方法染短期培养的人脑膜瘤细胞、成纤维细胞、胚胎肾上皮及心肌细胞, 均呈阴性反应。

二、胶质瘤细胞中 GFAP 的表现

光学显微镜下, BT 325 细胞中的 GFAP 被染成棕黄色, 存在于胞浆中, 在不同形态的细胞中表现不同。核不着色。

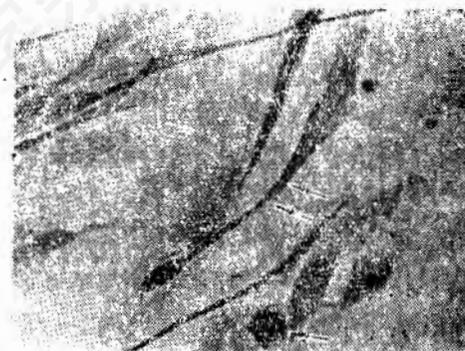


图1 小圆形细胞(←), 胞浆少, GFAP呈均匀浓染; 梭形细胞(↔), 胞浆较宽, GFAP呈纤维状, 突起顶部膨大成球形, 浓染。×800

小圆形细胞，胞浆少，GFAP呈均匀浓染(图1)。

双极细胞，细长的突起伸向两端，GFAP均匀浓染(图2)，但有时在高倍镜下呈细丝状。

棱形或纺锤形细胞，胞浆较宽，GFAP可呈细纤维状(图1、2)，沿细胞长轴走行，也可呈均质状，在细胞突起的顶端较浓。

星形，三角形或多角形细胞，胞体大，胞

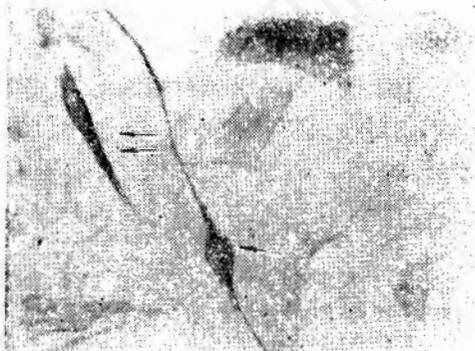


图2 双极细胞(←—)，细长的突起伸向两端，GFAP均匀浓染；纺锤形细胞(↔—)，GFAP呈均质状。×400

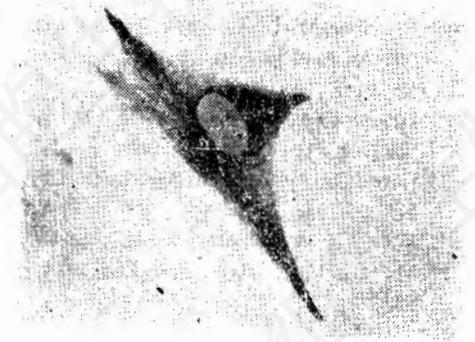
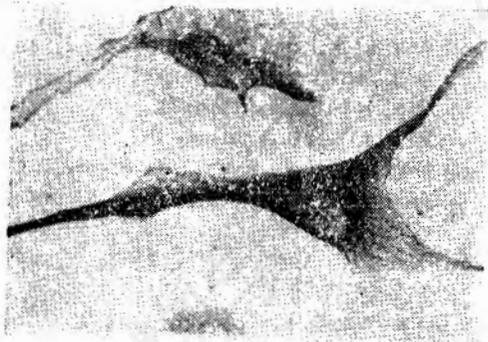


图3、4 三角形、多角形细胞，胞体较大，GFAP呈细纤维状，大多从核周向周边分布，但也有由一极到另一极的纤维，核为阴性。×800

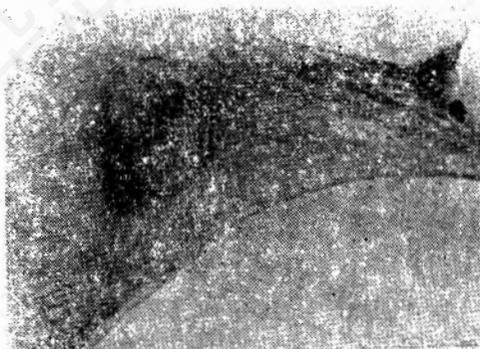


图5、6 大片状的单核或多核细胞，GFAP呈细线状纤维，排列疏松，多从核周向外呈放射状排列，核周较浓，核阴性。×800

浆丰富，GFAP呈细纤维状，大多从核周浓染区向周边分布，但也可由一极伸展到另一极(图3、4)。

大片状的单核或多核细胞，GFAP呈细线状纤维，排列疏松，多从核周向外呈放射状排列(图5、6)。

以上不同形态的细胞常在同一标本中同时出现。不同代的细胞未表现明显差别。

讨 论

免疫细胞化学技术中的一个重要问题是非特异性着色。第二抗体中的非特异成分能与细胞及背景结合，这时用间接法即被显色。而在PAP法中，这种非特异的抗体不能与第三抗体再结合，故不能被显示，从而大大减轻了非特异性着色^[6]。但PAP能与细胞表面的Fc受体结合。为了减少由此产生的非特异性着色，应加用正常羊血清将细胞表面的非特异结合部位封闭。因PAP法能对抗原的显示起放大作用，

提高了灵敏度,故应尽量减轻第一抗体的非特异结合。对此,我们采取了两种方法:(1)对第一抗体作高度稀释,(2)将此步反应在4℃冰箱中进行。PAP的分子较大,分子量约400,000道尔顿,不易穿透细胞膜。用非离子去污剂Triton X-100处理细胞膜后,效果比较满意。PAP法的染色效果还决定于PAP的制备三种抗血清的稀释度是否适当、以及DAB的质量。我们曾用自制的PAP,取得了相似的效果。

BT 325系来自胶质母细胞瘤,即恶性星形细胞瘤;经多次检查,GFAP均为阳性,而各种对照细胞则为阴性,说明该细胞系具有星形细胞的特点。为了进一步证明这一方法的特异性,我们还对一些人脑瘤标本的石蜡切片用双氧水甲醇处理后作GFAP染色,发现星形细胞瘤多为阳性,神经细胞、少枝胶质细胞、正常室管膜细胞、血管成分以及非星形细胞来源的肿瘤均为阴性。

GFAP在肿瘤细胞中的表达随分化状态而改变^[2]。恶性度高的星形细胞瘤,在分化较好的区域,GFAP染色可为阳性,而分化差的区域则为阴性。体外培养的星形细胞瘤经多次传代,有些细胞系可由GFAP阳性转变为阴性^[7]。GFAP在星形细胞内可呈均质状存在,也可呈纤维状,这些纤维在电镜下为纤维束,每根纤维直径为8—10毫微米,属于中等纤维(Intermediate Filaments),为细胞骨架结构的一种^[2]。

本文所报告的各种形态的星形细胞,是细胞分裂后逐步成熟的各阶段。圆形细胞常成双存在,两个并列的圆形细胞可同时伸出突起,说明是分裂后的一对细胞。梭形及小多角形细胞附近有时可见到相似的细胞相伴存在。在这一过程中,GFAP由均质状渐变为纤维状。此后细胞呈大片状,伴有纤维状的GFAP。Duffy

等人^[8]在缩时电影的配合下,证实了上述过程,并认为大片状细胞进一步演变即成为多突起的星形细胞。在BT 325细胞中,有些细胞具有小而紧密的胞体,胞质少,突起细长。胞体及突起中的GFAP以均质浓染为主,间或有纤维。突起的数目多为2个(即双极细胞),间或有3个或4个。这些可能是来自大片状细胞,并可逐渐变圆,进入分裂期。我们未见典型的多突起星形细胞,这可能与该细胞系经过多次传代,且来源为一恶性肿瘤有关。

以上结果表明,用免疫细胞化学技术显示GFAP,可以做为研究星形细胞生物学特性的一种形态指标。病理情况下星形细胞GFAP的变化,将是我们进一步研究的内容。

注:本文所用GFAP抗血清系美国Stanford大学Lawrence F. Eng博士赠送,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Eng, L. F., Vanderhaeghen, J. J., Bignami, A. and Gerstl, B., 1971; *Brain Res.*, 28: 351—354.
- [2] Eng, L. F., and DeArmond, S. J., 1980, in "Advances in Cellular Neurobiology" (Fedoroff, S. and Hertz, L. eds.), Vol. 3, pp. 145—171, Academic Pr.
- [3] Deck, J. H. N., Eng, L. F., Bigbee, J. and Woodcock, S. M., 1978, *Acta Neuropath. (Berl.)*, 42: 183—190.
- [4] 陈啸梅等, 1982, 组织化学手册, 20页, 人民卫生出版社。
- [5] Sternberger, L. A., et al., 1970, *J. Histochem. & Cytochem.* 18: 313—315.
- [6] Sternberger, L. A., 1979, *Immunocytochemistry*, 2nd Ed., pp 104—170, John Wiley & Sons.
- [7] Diserens, A. C., Tribolet, N., Martin-Achard, A., Gaide, A. C., Schnegg, J. F. and Carrel, S., 1981, *Acta Neuropath. (Berl.)*, 53: 21—28.
- [8] Duffy, P. E., Huang, Y. Y. and Rapport, M. M., 1982, *Exp. Cell Res.*, 139: 145—157.