

用自由流式电泳法分离及分析 不同活性状态 T、B 淋巴细胞*

黎燕 唐佩弦 江飞子 徐元基
(军事医学科学院基础医学研究所)

由于淋巴细胞各亚群在造血调控中占有重要的地位^[1,2,3], 分离取得纯度较高、数量较大又保持生物活性的 T、B 淋巴细胞亚群对于进一步研究淋巴细胞在造血中的作用是极为重要的。本实验利用自由流式电泳法^[4,5], 根据细胞表面所带电荷基团数量和性质的差异, 分离出不同活性的淋巴细胞亚群, 同时进行了某些特性的分析。

材料和方法

1. 动物 LACA 种系成年小鼠。
2. 电泳缓冲液 三乙醇胺 2.10 g/L; 甘氨酸 18.0 g/L; 蔗糖 10.26 g/L; 葡萄糖 2.0 g/L; 醋酸钾 0.39 g/L; 用醋酸将 pH 调至 7.3—7.4, 离子强度 900 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 渗透浓度 302—308 mOsm。电极缓冲液: 三乙醇胺 11.20 g/L, 醋酸钾 0.4 g/L; 用醋酸将 pH 调至 7.3—7.4; 离子强度 2800—3100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。
3. 样品制备 用含 5% FCS-Eagle 培养液制备脾细胞悬液, 铜网过滤, 离心 1500 转/分 10 分钟, 洗 2—3 遍, 逐步将细胞转移至电泳缓冲液中, 最后将细胞浓度调至 20—40 $\times 10^6/\text{ml}$ 。
4. 电泳原理 实验应用西德 Bender & Hobein Elphor Vap-11 型自由流式电泳仪^[6]。细胞样品以 7—8 ml/hr 流速注入 0.5 $\times 100 \times 4500$ mm 的直立式电泳室中, 电泳室内电场强度 100—104 V/CM, 230—240 mA。电泳缓冲液自上而下以 600—700 ml/hr 流速通过电泳室。细胞在电泳室内受到垂直向下的作用力的同时, 又受到电场水平方向电极的吸引力。在两个力的作用下, 根据不同细胞表面所带电荷基团的性质及数量的差异, 各类细胞在电场中以不同的泳动偏转角 (β) 泳动, 在电泳室内形成了各类细胞自己的泳动路线 (图 1)。在电泳室终端有 90 个横行排列的微小出口,

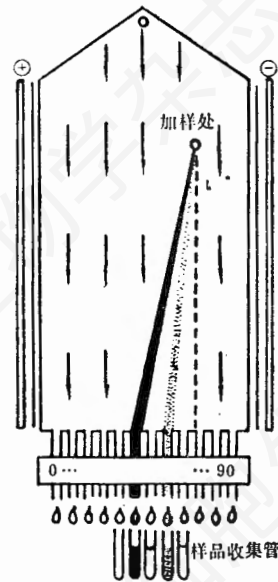


图 1 电泳分离基本原理图

出口处有 90 根收集试管可以将各类细胞分别收集起来, 供分析使用。整个分离过程是在 $6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下进行的。

5. T、B 细胞鉴定 使用抗小鼠 Thy 1,2-FITC 抗体 (Miles); 兔小鼠 IgG-FITC 抗体 (北京生物制品所); 抗小鼠 IgG, M, A-FITC 抗体 (Zymed Laboratories), 对分离后各类细胞做荧光染色检查^[7]。同时在 Philips 505 型扫描电子显微镜下观察细胞表面结构变化。

结 果

为了观察细胞表面电荷数量变化能否反映

* 本研究得到了徐海超教授、陈德蕙副教授、甘阳生、张贺秋等同志的帮助, 特此致谢。

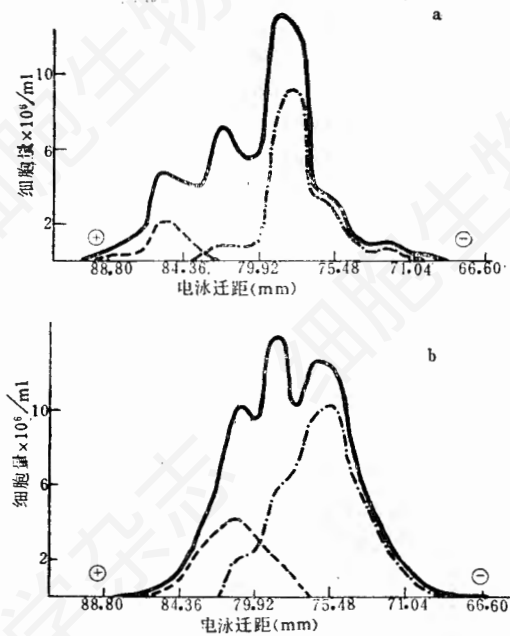


图 2 正常脾细胞(b)和经 ConA 作用的脾细胞(a)电泳分布

——脾细胞；---抗 Thy 1,2-FITC 阳性反应细胞；----抗 IgG, M, A-FITC 阳性反应细胞。

细胞活性状态的变化,小鼠腹腔注射刀豆蛋白 A(ConA) 200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 72 小时后取脾,作脾细胞电泳(实验均重复三次以上)。图 2 结果表明:经 ConA 作用的脾脏 T、B 细胞在电场中的分布(图 2 a)同正常脾脏 T、B 细胞(图 2 b)比较,有明显不同。将以上结果用 Bartels(1979)^[8]的数学解析公式处理后,可以看到(图 3 b):正常脾脏中的三个高斯分布图形,每个高斯图形代表一个淋巴细胞亚群。图 3 a 表明,在 ConA 作用下, T₁ 亚群向正极泳动加快,在 T₁ 亚群附近异乎寻常地出现了一个亚群——T₅, 这个亚群在正常脾淋巴细胞电泳中从不出现,其电泳速率也最快。同时可见 B₁ 亚群电泳速率加快, B₂ 亚群的电泳速率则减慢。

在扫描电镜下看到经 ConA 作用的 T 细胞表面超微结构明显改变;表面微绒毛减少,出现乳头状突起(图 4)。

小鼠腹腔注射美洲商陆 PWM 100 $\mu\text{g}/\text{只}$

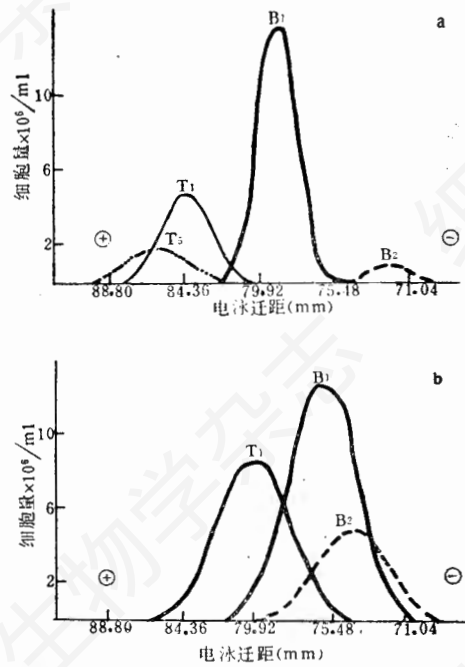


图 3 经数学解析后正常脾细胞各淋巴细胞亚群(b)和 ConA-脾细胞中各淋巴细胞亚群(a)在电泳后的高斯分布图形

T₁, T₅, B₁, B₂ 代表淋巴细胞亚群。

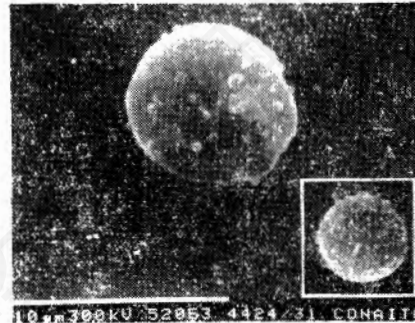


图 4 腹腔注射 ConA 72 小时后,小鼠脾 T 淋巴细胞(抗 Thy1, 2-FITC 阳性细胞)的扫描电镜观察($\times 5200$)。

右下角为正常小鼠脾 T 淋巴细胞(抗 Thy 1,2-FITC 阳性细胞)($\times 5000$)。

72 小时后,取其脾细胞作电泳,观察 T、B 细胞电泳分布的变化。结果(图 5)表明:脾细胞在电场 75 mm 泳距处的峰值明显增高。将此结果经数学解析后,可以从若干个高斯图形中看到:在 PWM 作用下 T₁ 亚群向正极泳动速率加快。PWM 和 ConA 作用相似,在 T₁ 亚群附近也出

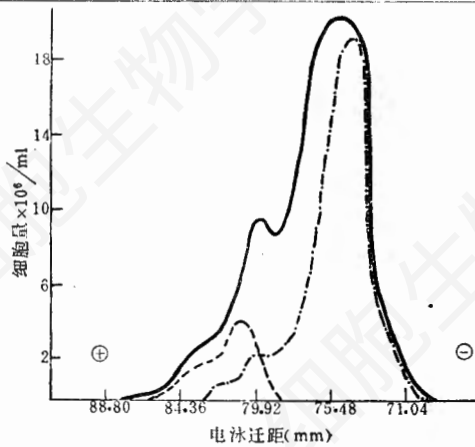


图5 PWM-脾细胞电泳分布
 ——脾细胞；---抗Thy 1,2-FITC阳性反应细胞；-·-·-抗IgG-FITC阳性反应细胞。

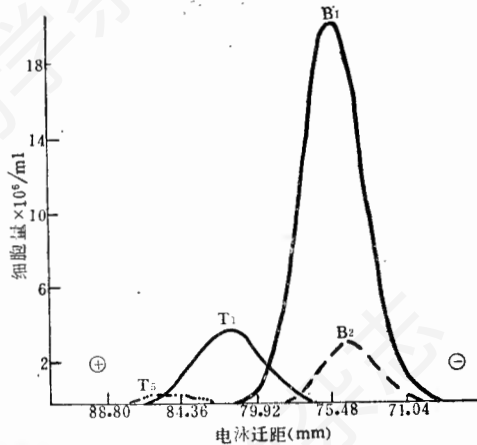


图6 经数学解析的PWM脾淋巴细胞亚群的高斯分布。

T₁, T₅, B₁, B₂, 代表细胞亚群。

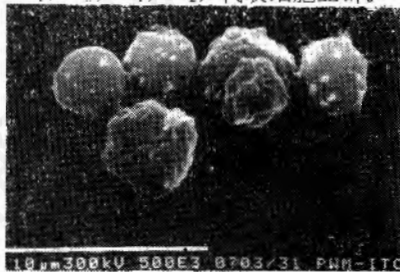


图7 PWM小鼠脾T淋巴细胞(抗Thy1,2-FITC阳性细胞)的扫描电镜观察(×5000)。

现T₅亚群峰；B₁亚群数量增多，峰值增高；B₂亚群电泳速率稍有加快(图6)。

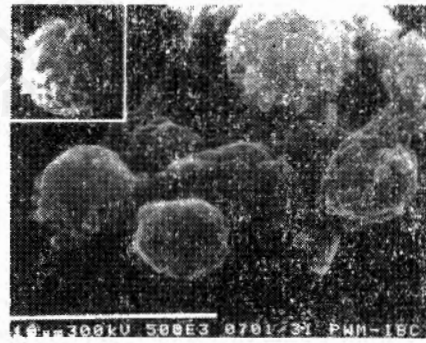


图8 PWM小鼠脾B淋巴细胞(抗IgG-FITC阳性细胞)的扫描电镜观察(×5000)。
 左上角为正常小鼠脾B淋巴细胞(抗IgG-FITC阳性细胞)(×5000)。

扫描电镜下观察经PWM作用的T、B淋巴细胞：T细胞表面出现皱折和大的伪足(图7)。B细胞表面出现皱折和大的伪足，有些细胞表面的伪足内收，胞体趋于圆球形，或呈完全圆球形，胞体明显大于正常对照(图8)。

讨论

T、B淋巴细胞亚群的电泳特性可以反映它们的活性状态变化。用植物凝集素(ConA、PWM)刺激淋巴细胞时，它们的亚群表面所带电荷数量发生变化，以致在电泳中的分布出现变化。在ConA作用下，T₁和B₁亚群表面负电荷基团增多，于是电泳速率加快。B₂亚群表面负电荷基团数量减少，电泳速率即减慢。ConA和PWM都可使脾细胞电泳分布中出现一个表面负电荷基团数量最多，在电场中向正极泳动最快的亚群，它可能是ConA、PWM作用下T细胞中新的亚群表现型。它也可能是因ConA、PWM的刺激，由胸腺或其它淋巴器官迁移到脾脏中的一个表面带有Thy-1,2抗原标记的T细胞亚群。

自由流式电泳分离所得PWM作用的T、B细胞亚群，其表面超微结构变化似乎可以反映出被激活的T、B细胞所处的细胞周期状态。如被PWM活化的B细胞表面出现皱折和大的伪足，可能由于刺激了胞体内微管蛋白的合成，加强了细胞骨架而出现了大的伪足，这正符合

细胞活化后处于S期的状态。部分B细胞表面伪足趋于回收,胞体开始走向球形,这又符合由S期进入G₂期或正向M期过渡的细胞状态。T、B细胞被ConA、PWM活化后,表面形态的多样性,正表明细胞进入周期后处于不同的时期。细胞的周期状态与其表面电荷及电泳特性的关系,是值得进一步探索的。

参 考 文 献

- [1] 唐佩弦等。1981。生理学报, 33(2) 127—133。
 [2] 江飞子等。1983。中国细胞生物学学会 1983 年会议论文摘要汇编, 第 86 页。
 [3] 谭子兴等。1982。中国人民解放军军事医学科学院院刊, 2, 149—153。
 [4] 黎 燕等。中国细胞生物学学会 1983 年论

文摘要汇编, 第 96 页。

- [5] K. Zeiller et al: 1972, Electrophoretic distribution analysis of in vivo colony forming cells in mouse bone marrow. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd., 95—104.
 [6] Jilg. W et al: 1980, Radio-iodinated surface proteins of electrophoretically separated rat lymphocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd., 361 s 389—399 Marz.
 [7] B. B. Mishell and S. M. Shiigi: 1980, Modification and use of antibodies to label cell surface antigens. SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, San Francisco.
 [8] P. H. Bartels: 1979, Numerical evaluation of cytologic data of profiles. The International Academy of Analytical Quantitative Cytology. volum 1, March-April, P. 20—28.

超低温扫描电子显微镜原位观察法

黄 斌

(中国科学院遗传研究所)

我们用 Phillips 500 型扫描电子显微镜(荷兰 Phillips 电器公司产品)及其冰冻制样附件,观察了大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)、黑麦草(*Lolium multiflorum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、曼陀罗(*Datura innoxia*)及芍药(*Paeonia lactiflora*)不同发育时期的花药。

方法:从植株上取下新鲜花药,用导电胶固定在样品台上,迅速置于冰冻制样器液氮中速冻,再用金属针敲断花药并在其断面喷金。将样品迅速转入 Phillips 500 型扫描电子显微镜的低温样品台上(-194℃)进行观察,电压为 30 KV。以上操作均在真空条件下进行。这种方法的优点如下:

1. 操作简便,省时,不涉及任何固定、脱水过程,样品在液氮中速冻后即可观察。

2. 观察到常规切片难以观察到的现象。在六种植物的幼嫩花粉囊中有半液体状态的不定型填充物,这种填充物随花粉发育过程逐渐消失。禾本科三种植物,填充物在小孢子有丝分裂后消失,而双子叶植物则在小孢子有丝分裂前消失。也观察到药壁表皮细胞表面上由腊质构成的花纹。在常规扫描及透射电镜观察中,上述填充物及表面腊质往往随固定及脱水过程溶解或流失。

3. 能保持细胞表面及其相对位置的真实面目,能更准确地认识花粉的结构特征及其在花药中的相对位置。

因此超低温扫描电子显微镜原位观察法无疑为研究植物细胞和组织的表面结构及组织中游离细胞空间位置的优良手段。