

构和培养前的心肌细胞基本相似。培养4和5日的部分心肌细胞出现Z线变形、肌节不完全等变性变化,部分心肌细胞仍具较正常结构。

用培养的人胚心肌细胞制备病理模型,宜在培养后1、2和3日内进行。

### 参 考 文 献

- [1] Burrow M. T., 1912, *München Med Wochr.*, 59: 1473.  
 [2] Cavanaugh M. W., 1955, *J. Expil. Zool.*, 128: 573.  
 [3] Harary I. et al., 1960, *Science.*, 131: 1674.  
 [4] Vahouny G. Y. et al., 1970, *Science*, 167: 1616.  
 [5] 李连达等., 1982, 细胞生物学杂志 4(3):6.  
 [6] Chang T. D. et al., 1972, *Circ Res* 30: 628.  
 [7] Halbert S. P. et al., 1973, *Life Science.*, 13: 969.

- [8] Thompson A. et al., 1977, *J Mol Cell Cardiol.*, 9: 945.  
 [9] 李连达等., 1982, 细胞生物学杂志 4(4): 29.  
 [10] Wollenberger A., 1964, *Circulation Res* 14 & 15:supple 11, 1184.  
 [11] Goshima K. et al., 1969, *Expil Cell Res.*, 56: 387.  
 [12] Ohata I. et al., 1977, *Japanese Circulation J.* 4: 539.  
 [13] 李连达等., 1980, 心肌细胞培养 中医研究院西苑医院 p 48 & 32.  
 [14] 王治荣等., 1986, 细胞生物学杂志 8(1): 27.  
 [15] Halle W. et al., 1970, *Am J. Cardiol.*, 25: 292.  
 [16] Ikemoto N, et al., 1968, *J. Cell Biol.* 39: 620.  
 [17] Robinson P. B. et al., 1980, *J. Mol Cell Cardiol.*, 12: 493.  
 [18] Masson-Pevet M. et al., 1976, *J. Mol Cell Cardiol.*, 8: 747.

## 人外周血淋巴细胞长期冻存后结构和功能的研究

徐婉燕 郑斯涌 江希明 \*赵露珊 \*章崧英  
 (杭州大学生物系) \* (浙江省中医院)

自从六十年代提出小鼠和人淋巴细胞短期低温保存方法以来,吸引了许多学者从事这方面的研究,期望能在不改变免疫学活性和生理功能的前提下,改进冻存淋巴细胞的方法,以提高冻存的效果,和延长冻存时间。

已经证实,短期冻存的淋巴细胞能用于花环试验<sup>[1,2]</sup>;细胞介导的免疫反应:如对各种有丝分裂原的应答反应<sup>[3,4]</sup>、混合淋巴细胞反应<sup>[5]</sup>和细胞毒试验<sup>[5]</sup>;和组织分型试验<sup>[6]</sup>等。Scheiwe(1981)<sup>[7]</sup>曾将冻存淋巴细胞用于临床输注,亦取得良好的治疗效果。

迄今,国内外对冻存淋巴细胞的方法和冻存细胞的形态结构、生理功能和免疫学反应能力等全面和比较系统的研究尚不多见。本文采用肝素和ACD抗凝的人外周血淋巴细胞,对

不同的低温保护剂进行优选对比,通过对冻存人外周血淋巴细胞进行多项免疫活性、生理生化功能的检测和超微结构的观察,以建立较好的长期冻存人外周血淋巴细胞的技术方法,为冻存淋巴细胞用于细胞免疫试验提供依据,亦为冻存淋巴细胞用于临床免疫治疗指出前景。

### 材 料 和 方 法

#### 1. 淋巴细胞的分离

肝素或ACD抗凝的助血员(年龄25—34岁)O型外周血(杭州市中心血站提供),用淋巴细胞分离液(比重1.077)分离得到淋巴细胞(PBL),配成10<sup>7</sup>细胞/毫升的淋巴细胞悬液。

#### 2. 淋巴细胞的冻融

将淋巴细胞悬液分成3组:

## 1) 新鲜对照组

2) DMSO + ABS 组: 淋巴细胞悬浮在含 10% DM-SO 和 40% ABS (人 AB 型血清) 的 RPMI 1640 液内 (含 100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素、 $25 \times 10^{-3}$  mol/L Hepes)。

3) 甘油 + ABS 组: 淋巴细胞悬浮在含 10% 甘油和 40% ABS 的 RPMI 1640 液内。

将上述 2)、3) 组淋巴细胞悬液分装在安瓿内, 每支 1 毫升, 含  $5 \times 10^6$  细胞, 按郑斯涌<sup>[8]</sup>法将样品以每分钟约降温 1  $^{\circ}$ C 到  $-80^{\circ}$ C 后, 冻存在液氮内, 分别在 10、20、40 和 365 天时取出样品,  $37^{\circ}$ C 水浴复温, RPMI 1640 (含 10% ABS) 洗涤后悬浮至原液量。

## 3. 细胞回收率和存活率

血球计数板测定细胞的回收率。台盼兰染色法计数存活率。

## 4. 淋巴细胞转化试验

$10^6$  细胞用 PHA 刺激,  $37^{\circ}$ C 培养 52 小时, 加入  $^3\text{H-TdR}$  1 微居里, 继续培养 20 小时, 收集细胞, Ys-A 型液体闪烁仪中测定 cpm。样品一式三份。

## 5. E 和 ME 花环

E 花环参见 Merker<sup>[9]</sup>方法。ME 花环参见 Leciv-

ero<sup>[10]</sup>方法。

6. 酸性  $\alpha$ -醋酸萘酯酶 (ANAE) 活性

淋巴细胞进行 ANAE 显色 (参见 Yang<sup>[11]</sup> 方法), 镜检 100 个淋巴细胞, 计算 ANAE 的阳性率。

## 7. 乳酸脱氢酶同工酶 (LDH) 电泳分析

参见翁醒华<sup>[12]</sup>方法, 采用 7% 分离胶。扫描记录显色的凝胶带, 计算 LDH 各同工酶占总活性的百分比。

## 8. 淋巴细胞超微结构的观察

淋巴细胞用戊二醛和锇酸固定, Epon 812 包埋, 超薄切片, 醋酸铀柠檬酸铅染色, H 600 电镜观察。

## 结 果

## 1. 细胞的回收率与存活率

肝素和 ACD 抗凝人外周血淋巴细胞, 液氮内冻存 1 年, 不论冻存介质中含有的低温保护剂种类, 解冻后仍具有很高的细胞回收率 ( $>92.1\%$ ), 细胞的存活率也在  $87.0-96.6\%$  之间。结果见表 1, 表 2。

表 1 冻存人外周血淋巴细胞的回收率 (%)

冻存天数	肝素血			ACD 血		
	n	DMSO	甘 油	n	DMSO	甘 油
10	8	89.0 $\pm$ 6.3	96.3 $\pm$ 1.2	6	100	99.3 $\pm$ 0.5
20		98.6 $\pm$ 1.3	96.5 $\pm$ 1.0		97.5 $\pm$ 2.7	95.9 $\pm$ 2.7
40		97.6 $\pm$ 1.6	96.8 $\pm$ 0.7		100	95.6 $\pm$ 3.3
365		92.5 $\pm$ 5.8	92.1 $\pm$ 3.4		97.5 $\pm$ 1.2	92.5 $\pm$ 4.0

1)  $\bar{x} \pm S.E.$

2) 新鲜对照细胞的收获率为 100%

表 2 冻存人外周血淋巴细胞的存活率 (%)

冻存天数	肝素血			ACD 血		
	n	DMSO	甘 油	n	DMSO	甘 油
10	8	97.2 $\pm$ 0.3	92.5 $\pm$ 2.1	6	96.7 $\pm$ 1.1	96.3 $\pm$ 1.4
20		95.7 $\pm$ 2.3	96.2 $\pm$ 2.0		97.9 $\pm$ 1.0	96.2 $\pm$ 1.1
40		98.2 $\pm$ 0.4	94.8 $\pm$ 1.0		98.1 $\pm$ 0.9	96.8 $\pm$ 0.8
365		96.6 $\pm$ 0.6	88.7 $\pm$ 2.6		95.0 $\pm$ 1.4	87.0 $\pm$ 2.3

1)  $\bar{x} \pm S.E.$

2) 新鲜对照: 肝素血淋巴细胞: 99.1 $\pm$ 0.3

ACD 血淋巴细胞: 98.8 $\pm$ 0.8

表3 低温保护剂和冻存时间对 PHA 诱发的人淋巴细胞转化能力的影响 ( $\bar{x} \pm S.E$ )

冻存天数	肝素血			ACD 血		
	n	DMSO	甘油	n	DMSO	甘油
10	8	37753 ± 4562 (p > 0.5)	41520 ± 2884 (p > 0.5)	6	36980 ± 4674 (p > 0.2)	32540 ± 3117 (p > 0.1)
20		34922 ± 5366 (p > 0.3)	23664 ± 2019 (p < 0.01)		36327 ± 4770 (p > 0.2)	30115 ± 3644 (p > 0.1)
40		28092 ± 2085 (p < 0.02)	23936 ± 3252 (p < 0.02)		25933 ± 3102 (p < 0.05)	20795 ± 2438 (p < 0.05)
365		24983 ± 3290 (p < 0.02)	22335 ± 3074 (p < 0.01)		21306 ± 8425 (p < 0.05)	10820 ± 3701 (p < 0.01)

新鲜对照: 肝素血淋巴细胞 41706 ± 4442  
ACD 血淋巴细胞 48746 ± 9543

2. 淋巴细胞的转化能力

用表3可见, 冻存淋巴细胞的 PHA 应答能力与新鲜对照相比较, 有所下降。在冻存10和20天时, 细胞的参入量与新鲜对照组没有显著差异(p > 0.05); 冻存40天和1年时, 与新鲜对照相比较, 有显著差异(p < 0.05); 从冻存40天起, <sup>3</sup>H-TdR 参入量已经稳定(p > 0.05)。同样, 未用 PHA 刺激的冻存淋巴细胞自发转化也有相同的变化, 见图1。肝素抗凝血淋巴细胞冻存后的淋转能力稍优于 ACD 血。DMSO 的防冻作用优于甘油。

3. E 和 ME 花环

除部分 ACD 血淋巴细胞冻后 ME 花环形

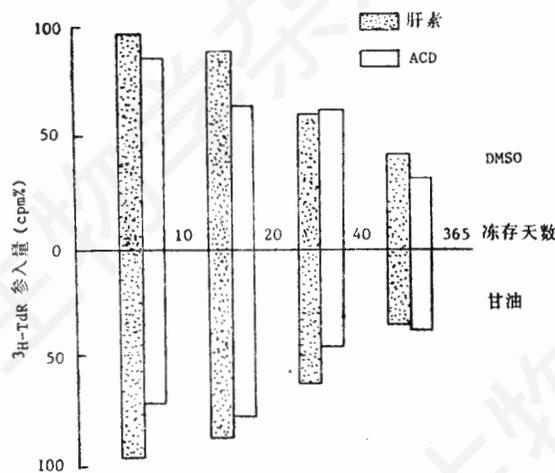


图1 不同抗凝剂对冻存淋巴细胞 <sup>3</sup>H 参入量的影响(自发转化, 新鲜对照组 cpm% = 100)

成率稍有下降外, 其余各组淋巴细胞的 E 和 ME 花环形成率均与冻前组无显著差异(p > 0.05)。见图2, 图3。

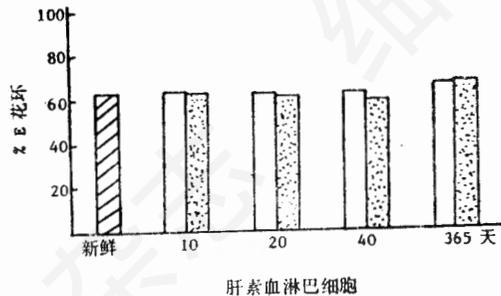
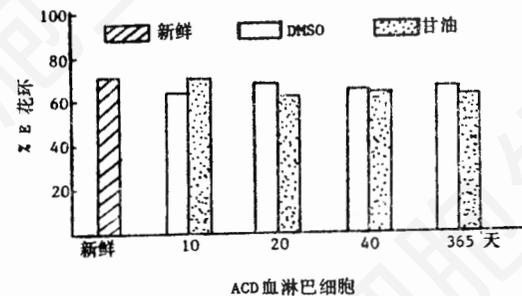


图2 新鲜和冻存淋巴细胞的 E 花环形成率

4. ANAE 活性

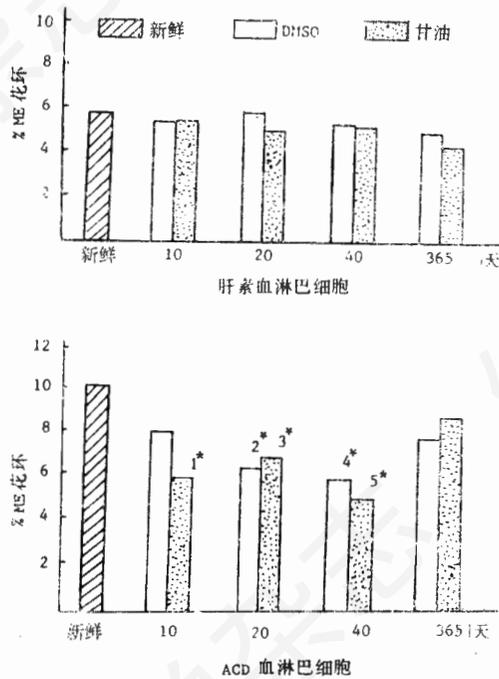
表4显示了冻存淋巴细胞的 ANAE 阳性率仍在正常范围, 与新鲜对照组没有统计上的差异(p > 0.05)。

5. LDH 同工酶谱

新鲜和冻存淋巴细胞 LDH 同工酶谱均以

表 4 新鲜和冻存淋巴细胞的 ANAE 阳性率(%)

冻存天数	肝素血			ACD 血		
	n	DMSO	甘油	n	DMSO	甘油
10	8	79.4±1.7	77.8±1.2	6	81.7±1.4	83.6±1.7
20		81.2±0.7	79.2±1.2		79.9±2.4	80.1±1.0
40		80.0±1.1	81.3±1.1		81.2±2.0	78.6±1.3
365		74.8±1.3	76.2±2.2		76.7±3.4	76.5±3.8

1)  $\bar{x} \pm S.E.$ 2) 新鲜对照: 肝素血淋巴细胞 75.3±0.9  
ACD 血淋巴细胞 82.8±0.9图 3 新鲜和冻存淋巴细胞 ME 花环形成率 \*1—5,  $p < 0.05$ 

LDH<sub>3</sub> 成份含量最高, 其顺序为 LDH<sub>3</sub> > LDH<sub>2</sub> > LDH<sub>4</sub> > LDH<sub>1</sub> > LDH<sub>5</sub> (表 5)。

### 6. 淋巴细胞的超微结构

冻存一年的淋巴细胞仍保持完好的超微结构, 尤以 DMSO 作保护剂的细胞, 超微结构保护效果最好: 细胞质膜和核膜完整, 细胞和胞核轻度皱缩, 胞内无冰穴, 染色质正常, 细胞内有少量线粒体, 嵴结构清晰, 基本上具有正常淋巴细胞的形态结构。但也有很少量的遭受冷冻损伤的细胞, 核膜局部破裂, 细胞质内

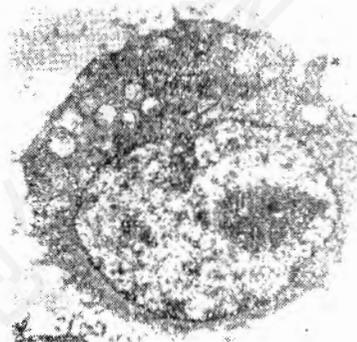


图 1 冻存 40 天的淋巴细胞电子显微镜照 × 6,000

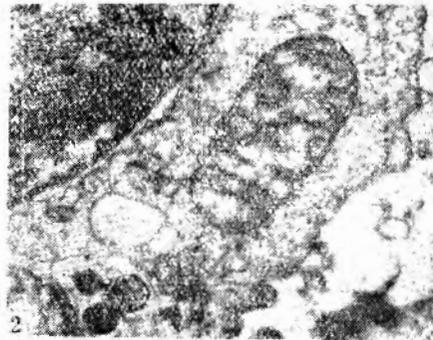


图 2 冻存一年的淋巴细胞电子显微镜照 × 30,000

的线粒体膨胀, 形态模糊等, 冻伤严重的细胞呈现出破裂、溶化。见图片 1—2。

### 讨 论

冷藏于 4 °C 的人外周血淋巴细胞, 10 天时, 几乎全部融化死亡。深低温状态下, 可以明显延长细胞的保存期限, 淋巴细胞以含 10% DMSO 和 40% ABS 的 RPMI 1640 液作为冻存

表5 人外周血淋巴细胞LDH相对百分含量

		%					
	n	冻存天数	LDH <sub>1</sub>	LDH <sub>2</sub>	LDH <sub>3</sub>	LDH <sub>4</sub>	LDH <sub>5</sub>
新鲜对照	3	0	13.8±0.9	23.6±0.2	36.5±1.8	22.2±2.4	3.9±1.3
冻存组							
肝素血							
DMSO	3	10	16.7±4.1	31.1±2.1	38.7±2.1	12.5±1.1	1.0±0.5
	3	20	12.8±1.1	29.3±1.8	37.2±1.1	17.2±1.5	3.5±2.3
	3	40	14.1±0.8	23.8±1.5	32.6±1.7	19.4±0.7	10.1±3.0
甘油	3	10	11.7±0.1	25.6±1.2	35.9±1.9	21.3±1.5	5.5±0.9
	3	20	13.4±0.6	21.5±1.1	32.3±0.3	19.3±0.3	13.5±1.4
	3	40	13.8±2.5	27.1±1.5	36.9±0.9	19.5±0.7	2.7±1.5
ACD血							
DMSO	3	10	12.6±2.7	21.3±2.6	31.9±1.6	19.7±1.6	14.5±5.6
	3	20	11.5±2.4	24.4±2.6	35.4±3.8	19.7±2.6	10.8±5.1
	3	40	13.1±0.5	24.4±1.4	35.7±1.8	20.2±0.2	6.6±3.3
甘油	3	10	13.9±1.1	27.1±1.5	34.3±2.4	19.7±0.6	10.4±3.1
	3	20	12.3±3.4	30.1±5.1	33.8±4.1	17.7±3.9	6.1±2.3
	3	40	13.3±1.6	24.9±1.1	37.5±1.4	19.3±1.0	50.1±1.4

$\bar{x} \pm S.E.$

液, 在液氮内长期冻存, 不但可保持其存活和免疫、生理功能, 超微结构也保持完好。

冻存淋巴细胞中的酶活性变化是检定细胞冻存后生理活性的一项指标。实验结果表明, 细胞内的酶分子对冷冻比较稳定, 在LDH的测定中, 冻存的和新鲜的人淋巴细胞具有相同的酶谱:  $LDH_3 > LDH_2 > LDH_4 > LDH_1 > LDH_5$ , 和 Blatt<sup>[13]</sup>、杨惠新<sup>[14]</sup>的报道相一致。我们认为在人淋巴细胞中LDH<sub>5</sub>成份含量较少, 微量检测时不易显示。另外, LDH<sub>5</sub>成份泳动率慢, 实验时应避免使用浓缩胶, 以免LDH<sub>5</sub>的丢失。有的文献报道<sup>[15]</sup>, 人外周血淋巴细胞内缺乏LDH<sub>5</sub>, 可能与电泳方法不一有关。

本文实验中采用肝素和ACD二种血液抗凝剂, 所得的淋巴细胞经过冻存后所测定的各项免疫、生理和形态指标大致相仿, 只有在淋转率的测定中, 肝素血细胞的<sup>3</sup>H-TdR参入量在冻存各时期可较ACD血细胞高出10—15%, 效果优于后者, 鉴于目前血站采血时, 大多数用ACD抗凝, 这样, 从全血中分离出淋巴细胞后, 剩余的红细胞、血浆等成份可以作为成份输血综合利用, 提高了血液的综合利用价值。

因此, 从ACD抗凝血获得大量的淋巴细胞以供长期冻存之用, 有其实际意义。

### 摘 要

从肝素和ACD抗凝血中分离的淋巴细胞, 用DMSO或甘油作为低温保护剂, 保存在液氮内, 在冻前和冻后10、20、40和365天时分别检测细胞的功能活性。当冻存液内含10% DMSO和40%人AB血清时, 冻存效果最好。冻存一年时, 淋巴细胞的回收率和存活率均大于92.5%。冻存细胞的E和ME花环形成率、ANAE阳性率、LDH同工酶谱和细胞超微结构与冻前相比, 均无明显变化, 冻存细胞的淋转能力虽在冻存初期有所下降, 以后就处于稳定状态。

### 参 考 文 献

- [1] Ichino, Y. et al., 1985, *J. Immunol. Meth.*, 77: 283-290.
- [2] Karpovitch, X. L. et al., 1980, *Cryobiology*, 17: 12-17.
- [3] Birkeland, S. A. 1980, *J. Immunol. Meth.*, 35: 57-67.
- [4] Pusztai-Markos, ZS. et al., 1984, *Cryobiology*

- logy, 21: 427-434.
- [5] Callery, C. D. et al., 1980, *J. Immunol. Meth.*, 35: 213-223.
- [6] Perry, V. P. et al., 1975, *Cryobiology*, 12: 386-396.
- [7] Scheiwe, W. M. et al., 1981, *Cryobiology*, 18: 344-354.
- [8] 郑斯涌等, 1985, 制冷学报, 3: 48-54.
- [9] Merker, R. et al., 1979, *Clin. Exp. Immunol.*, 38: 116-126.
- [10] Lecivero, G. et al., 1981, *Clin. Exp. Immunol.*, 45: 185-190.
- [11] Yang, T. J. et al., 1979, *Immunology*, 38: 85-95.
- [12] 翁醒华等, 1985, 杭州大学学报(自然科学版), 12: 381-385.
- [13] Blatt, J. et al., 1982, *Blood*, 60: 491-494.
- [14] 杨惠新等, 1983, 上海免疫学杂志, 3: 335-339.
- [15] 吕占军等, 1985, 中华血液学杂志, 6: 224-226.

## 克隆片段 DNA 用于测定 Epstein-Barr 病毒基因组拷贝数

赵德标

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

检测 Epstein-Barr 病毒(EBV)基因组数一般采用纯化的 EBV DNA 进行复性动力学试验<sup>[1]</sup>, 和纯化的 EBV DNA 经放射性同位素缺口翻译标记<sup>[2]</sup>或转录标记<sup>[3,4]</sup>后杂交试验。由于至今仍缺乏良好的 EBV 生产株, 从而使得分离和纯化 EBV DNA 相当耗时费力。但近来运用基因工程的方法可较为容易地获得 EBV 亚基因组片段。有人报道用 [<sup>32</sup>P] 标记的 EBV DNA 的限制性酶解克隆片段作为标准 DNA 检测正常或异常组织细胞中 EBV 基因组拷贝数<sup>[5]</sup>。也有人用 [<sup>32</sup>P] 标记的巨细胞病毒 DNA 限制性酶解片段检测尿液中的病毒<sup>[6]</sup>。我们实验室也曾应用克隆的 EBV DNA 酶解片段作为探针, 研究 EBV 基因组阳性细胞株中 EBV DNA 相对量<sup>[7]</sup>。本文探讨了用非标记的克隆片段作标准, 同时以标记的克隆片段 R 作探针, 通过 DNA 点杂交检测每个 H<sub>18</sub> 细胞中 EBV 基因拷贝数, 和 EBV 基因组中 EBV DNA Bam HI-W(W)片段拷贝数。

### 材料和方法

#### 1. 细胞 DNA 的提取;

所用的四株细胞, K<sub>562</sub>, Raji, H<sub>18</sub> 和 P<sub>3</sub>HR-I 都用 RPMI-1640 培养液培养。另加 20% 灭活的小牛血

清和 100 μg/ml 卡那霉素。

细胞 DNA 的提取按 Petterson 等人的方法<sup>[8]</sup>稍加修改。细胞在 1 mg/ml 蛋白酶 E, 0.5% SDS 和 1 × 10<sup>-3</sup> mol/L DTT 溶液中 37℃ 温育 3 小时, 用酚和氯仿分别萃取, 所得核酸液经透析后, 加热变性的 Rnase (1 mg/ml), 37℃ 再温育 3 小时, 再分别用酚和氯仿萃取, 以乙醇沉淀 DNA, 沉淀物溶于 TE 缓冲液 (10 × 10<sup>-3</sup> × mol/L Tris 1 × 10<sup>-3</sup> × mol/L EDTA pH 7.6), 再用 TE 透析, 所得 DNA 含量借光密度 (A<sub>260 nm</sub>) 定量。

#### 2. EDV DNA Bam HI-R(R)和W片段的制备;

参照 Maniatis 等人的方法<sup>[9]</sup>用碱变性法提取, CsCl 密度梯度超速离心纯化 R 和 W 片段分别与 pBR<sub>322</sub> 质粒重组的。将酶解, 琼脂糖电泳后鉴定为 W 或 R 片段的胶带切下 (图 1), 装入含有 Tris-醋酸缓冲液 (TAE; 0.04 mol/L Tris-醋酸-0.002 mol/L EDTA) 的透析袋中, 在 TAE 中电泳 1 小时, 再反向电泳 1 分钟, 吸出袋中 TAE, 过 DEAE-Sephacel 4 B 柱, 先用平衡液 (100 × 10<sup>-3</sup> × mol/L NH<sub>4</sub>Ac-10 × 10<sup>-3</sup> × mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 10 × 10<sup>-3</sup> mol/L EDTA) 平衡柱, 然后上样品, 再用洗脱液 (2 mol/L NH<sub>4</sub>Ac-10 × 10<sup>-3</sup> mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 10 × 10<sup>-3</sup> mol/L EDTA) 洗脱, 洗脱液用酚和氯仿分别萃取后, 用二倍无水乙醇沉淀 DNA, 沉淀物溶于 TE 中。