

[5] Berry, 1978. The CO_2 concentrating function of C_4 photosynthesis: A biochemical model. Proceeding of the Fourth International Congress on Photosynthesis.

P. 120.

[6] W. M. Laetsch, 1971. In Photosynthesis and Photorespiration. (ed.) by M. D. Hatch et al, P. 323.

激活 T 细胞的培养上清液对肝癌细胞毒性作用的电镜观察

林学颜

(卫生部武汉生物制品研究所细胞工程室)

概 论

致有丝分裂素刺激的 T 淋巴细胞释放出一组可溶性因子称为淋巴因子, 其中的细胞毒因子称为淋巴毒素(Lymphotoxin, LT)^[1-3], 在体外有毁坏靶细胞的性能^[4,5]。最近, Onozaki 等人⁽⁶⁾已经报告, 人的大单核细胞或巨噬细胞衍生的白细胞介素-1(IL-1)是几种肿瘤细胞的细胞毒因子, 本研究为了避免由大单核细胞衍生的 IL-1 的混淆效应, 用 E-玫瑰花环阳性的血液淋巴细胞与植物血凝素一起培养而制备激活 T 细胞的培养上清液。通常用于体外细胞毒试验的靶细胞为 L-929 和 HeLa 细胞^[8-8]。

Russel 和 Rosenau 等人曾应用电子显微镜研究淋巴毒素对 L-929 细胞的作用^[9,10], 但是在体外淋巴毒素杀伤大鼠肝癌细胞的电镜图像尚未见报告。在本研究中, 我们经多次实验发现, 在体外大鼠肝癌细胞对激活 T 细胞培养上清液的细胞毒效应敏感, 致使形态改变, 活细胞数明显降低, 电镜图像指出当肝癌细胞与激活 T 细胞培养上清液一起培养后, 细胞浆内有明显的空泡形成并有灶性细胞膜溶解现象。

材 料 和 方 法

激活 T 细胞培养上清液制备

应用含肝素钠的注射器抽取静脉血液, 加等量 Hank's 平衡盐溶液缓慢地加于 Ficoll-Hypaque(密度为 1.077 g/ml)液上层, 然后在室温 400 g 离心 35 分钟, 吸取两液界面单个核的细胞, 用无血清培养液

(RPMI 1640)洗 2 次, 并再悬浮于含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 调整细胞数量为 2×10^6 个细胞/ml, 加等量用 2,5-Aminoethylisothiouromium bromide(AET) 处理的 0.5% 绵羊红细胞悬浮液⁽¹⁵⁾, 混合物置于 37℃ 水浴箱 20 分钟, 每 5 分钟混和一次, 离心 200 g, 10 分钟, 然后置 4℃ 45 分钟, 轻轻地抖动细胞团, 把细胞悬浮液如上述加于 Ficoll-Hypaque 上层, 收集底层玫瑰花环细胞, 用 0.38% NH_4Cl 溶解 RBC, 上清重复洗一次, 然后以 RPMI 1640 培养液(含 10% 小牛血清)将淋巴细胞浓度调至 5×10^6 细胞/ml, 加 PHA-P, 置 37℃ 含 5% CO_2 培养箱中培养 4 天^[3,7,11-14], 离心收集上清液并用 0.2 μm 滤器过滤, 滤液贮存于 -80℃。

靶细胞

大鼠肝癌细胞株(H-4-II-E)由美国 ATCC(American Type Culture Collection)提供, 大鼠肝癌细胞以 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)含 10% 小牛血清, 制成细胞悬液, 浓度为 2×10^6 细胞/ml, 0.5 ml 加于培养孔中, 置 37℃ 培养 48 小时, 细胞生长成单层片状时, 用作激活 T 细胞培养上清液的靶细胞。

细胞毒测定

大鼠肝癌细胞置 37℃ 培养 48 小时, 倾去培养液, 加入新鲜培养液与丝裂霉素 C(最终浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)置 37℃ 培养 30 分钟, 倾去丝裂霉素 C, 用无血清培养液洗细胞 2 次, 加不同稀释度的激活 T 细胞的培养上清液(用 DMEM 稀释)0.5 ml, 在 37℃ 培养 24 小时后, 弃去培养液, 加 0.25% 胰酶 0.2 ml/孔, 置 37℃ 3 分钟后加 DMEM 0.3 ml/孔, 用巴氏吸管轻轻吹吸混合, 吸取 10 μl 细胞悬液, 加等量 0.4% 台盼蓝溶液, 置血球计数室中计算活细胞数。

T 淋巴细胞不加 PHA-P 的培养上清液加入肝癌

细胞中如上述培养对照。

电子显微镜

上述大鼠肝癌细胞与淋巴毒素一起培养后, 倾去培养液, 用 2.5% Glutaraldehyde 缓冲液加 0.1 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.4, 固定 24 小时, 再以 Osmium tetroxide 固定后, 经不同浓度的酒精常规脱水, 并浸入于 Epon-Araldite, 然后进行超薄切片, Uranyl, Acetate lead Citrate 染色, 镜检, 拍照。

结果和讨论

肝癌细胞与激活 T 细胞培养上清液一起培养 24 小时后, 细胞浆收缩, 细胞与细胞之间相互脱离, 活细胞数减少, 激活 T 细胞培养液的浓度越高, 活的肝癌细胞数越低(见表 1),

但不加激活 T 细胞培养上清液的对照肝癌细胞浆延伸连接, 生长成片, 死亡细胞的百分率与激活 T 细胞培养上清液无关, 这说明大鼠肝癌细胞(H-4-II-E)对激活 T 细胞培养上清液敏感而导致细胞死亡。为了避免由大单核细胞所分泌的白细胞介素-1(Interleukin-1)有细胞毒效应的混淆, 我们用 E-玫瑰花环阳性的血液淋巴细胞加 PHA-P 刺激而制备激活 T 细胞培养上清液, 当大鼠肝癌细胞与激活 T 细胞培养上清液一起培养 48 小时后, 大多数细胞改变了形态, 细胞间相互解离并在光学显微镜下可以观察到在细胞浆内出现大量空泡(见表 2)。

通过电子显微镜检查, 对照的肝癌细胞显

表 1 激活 T 细胞培养上清液对肝癌细胞致死率效应

激活 T 细胞培养上清液稀释度	未稀释	1:2	1:4	对照
活的肝癌细胞数/ml	5.5×10^5	8.6×10^5	9.3×10^5	1.5×10^6
死细胞%	13.4	10.5	5.2	0

表 2 激活 T 细胞培养上清液对大鼠肝癌细胞的细胞毒效应

反 应 剂	细 胞 形 态	
	光学显微镜	电子显微镜
激活 T 细胞培养上清液(淋巴细胞与 PHA-P 共培育的上清液)	细胞浆收缩, 在细胞浆内出现许多小空泡	细胞内含许多空泡和次级溶酶体, 并可见破碎细胞残留下来的细胞膜, 线粒体肿胀伴有浆膜的絮状, 在胞浆膜内有空气泡形成
非激活 T 细胞培养上清液(无 PHA-P 刺激的淋巴细胞培养上清液)	正常	正常
丝裂霉素 C (0.1 μ g/ml)	正常	——

示出完整的细胞膜、细胞浆和细胞核(见图 1)。由激活 T 细胞培养上清液处理的肝癌细胞中含有溶酶体残余的浓密小体, 在胞浆内有大量的自身吞噬泡, 象类脂滴一样十分明显。线粒体肿胀, 其中含有浓密的絮状物形成, 指明某些细胞已经死亡, 并可见到破碎细胞膜的残留(见图 2)。这种现象证明肝癌细胞受了激活 T 细胞培养上清液的损伤(见表 1), 这是一种致死性的指征, 通过电镜所见到的空泡代表膨胀的内浆网、肿胀的线粒体和初级溶酶体, 在细胞之间的胞浆膜上有特殊的多灶性空泡形成

(图 2), 在这个变化过程中, 我们发现这些形成空泡的胞浆膜呈灶性消失。

摘 要

外周血液 E-玫瑰花环阳性的淋巴细胞由 PHA-P 刺激而产生无白细胞介素-1(Interleukin-1)的培养上清液, 在体外对大鼠肝癌细胞的杀伤效应敏感, 通过光学显微镜观察, 激活 T 细胞培养上清液引起肝癌细胞胞浆的收缩、分离。电子显微镜观察这些细胞显示出溶酶体残留的致密小体形成和线粒体肿胀, 细胞浆内以及贴

邻的细胞膜之间出现大量空泡。这种现象提示了激活T细胞培养上清液有侵袭肝癌细胞的特性,导致细胞溶解。

参 考 文 献

- [1] Granger, G. A., et al., 1978, *Cell. Immunol.*, 38: 388-402.
- [2] Hiserodt, J. C., et al., 1979, *J. Immunol.*, 123: 317-324.
- [3] Yamamoto, R. S., et al., 1978, *Cell. Immunol.*, 38: 403-416.
- [4] Rosenau, w., and C. D. Tsoukas, 1976, *Am. J. Pathol.*, 84: 580-596.
- [5] Gately, et al., 1976, *Cell. Immunol.*, 27: 82-93.
- [6] Onozaki, K., et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 3962-3968.
- [7] Granger, G. A., et al., 1980, In "Manual of Clinical Immunology second edition", pp. 267-274.
- [8] Green, L. M., et al., 1984, *J. Immunological Methods.*, 70: 257-268.
- [9] Russel, S. W., W. Rosenau, and J. C. Lee., 1972, *Am. J. Pathol.*, 69: 103-118.
- [10] Kobayashi, Y., et al., 1982, *J. Immunology.*, 128: 2714-2718.
- [11] Eileen, L., et al., 1984, *J. Immunol.*, 133: 3429-3436.
- [12] Bentwich, Z., et al., 1973, *Transplant Rev.*, 16: 29-50.
- [13] Greaves, M. F., et al., 1973, In "T and B lymphocytes; Origins, properties and Roles In "Immune Responses", American Elsevier, New York.
- [14] Hoffman, T., and H. G. Kunkel, In 1976, "In vitro Methods in cell mediated and tumor immunity" (B. R. Bloom and J. R. David, Eds), pp. 71, new York.
- [15] Falkoff, R. M., et al., 1982, *J. Immunol. Methods.*, 50: 39-45.

绒毛滋养层细胞直接制备染色体方法

陈园茶 马长俊 孙自国 *刘淑芳 **李立 ***谭晓菊

(四川省计划生育科研所组胚遗传室)

绒毛与胎儿是由同一个受精卵分化发育而成,它是胚胎的附属结构,因此其细胞染色体与基因组成同胎儿细胞是一致的。吸取绒毛比抽羊水细胞可提前八周左右进行遗传病的产前诊断,这样可以减少孕妇的精神负担,并可避免中期引产的并发症。

韩安国^[1]早在1973年已吸取绒毛进行产前性别预测,直至1984年Simoni等^[2]才报道100例绒毛细胞直接制备染色体方法。这一方法的最大优点,是其分裂来自绒毛的细胞滋养层细胞的自发分裂(Spontaneous Mitosis)在培养1小时后即可进行制片,因而可以避免

母体细胞污染。该文报道后立即受到普遍重视,认为这是一项开拓性工作,使产前诊断进入一个新领域。但以直接法作绒毛染色体制备是一个新问题。根据我们的经验要比羊水细胞制片难度大得多,例如分裂相少,染色体容易丢失且形态不佳,多呈弯曲和缩短,染色单体分开,G带的带纹不够清晰等。Perry等(1985)^[3]认为绒毛直接法显带质量不如羊水细胞,核型分析成功率为97%,依靠直接法技术可能难以

* 成都军区总医院。

** 自贡市计划生育科研所。

*** 万县地区计划生育指导所。