

人淋巴样细胞培养 基础

(译刊)



宁波市医学科学研究所

1983年12月

人 淋 巴 样 细 胞 培 养 基 础

J LESLIE GLICK 著

黄可泰 刘 奎 李清华 黄全荣 姚永金
徐 元 李慧萍 何耕兴 毛昭娣 童慎境
常敏毅 黄兆宏 孙鹤年 译

目 录

前言	(1)
序	(2)
第一部分 概观	(3)
第 1 章 建株细胞系的生物学特征	(3)
简史	(3)
细胞在长期培养中的变异	(4)
病毒感染	(11)
免疫学方面	(13)
遗传学应用	(18)
第 2 章 细胞培养环境	(20)
无离子水	(20)
营养物的利用	(21)
血清的要求	(25)
温度的调节	(28)
P H调整	(28)
气体的利用	(30)
第二部分 培养技术	(32)
第 3 章 消毒技术	(32)
二个方面	(32)
无外来污染的细胞培养液	(33)
第 4 章 细胞悬浮培养的维持	(39)
取样	(39)
细胞计数	(39)
倍增时间的计算	(40)
纪录卡片保存	(40)
培养估价	(41)
培养细胞维持	(41)
培养问题处理	(42)
第 5 章 支原体感染的控制	(42)
处理方案	(43)

第6章	长期淋巴样细胞系的传代	(45)
	分离白细胞.....	(45)
	培养细胞的传代.....	(45)
	加入E B病毒.....	(45)
	细胞系的建成.....	(46)
第7章	短期淋巴样细胞培养的传代	(47)
	制备尼龙纤维过滤柱.....	(47)
	制备白细胞富集血浆.....	(47)
	分离淋巴细胞.....	(48)
	制备条件培养基.....	(48)
	估价淋巴母细胞的形成.....	(48)
第8章	克隆过程	(49)
	淋巴样细胞系.....	(49)
	骨髓瘤细胞.....	(49)
第9章	低温保存的苏复	(50)
	保存.....	(50)
	复苏.....	(51)
第10章	细胞培养的交叉污染	(52)
	问题的延伸.....	(52)
	研究情况.....	(53)
	附录.....	(55)
第11章	染色体玻片标本的制备	(56)
	有丝分裂细胞的制备.....	(56)
	玻片标本的制备.....	(57)
第12章	H L A分型	(57)
	分型板的制备.....	(57)
	细胞毒性试验.....	(80)
第13章	E B病毒试验	(60)
	E B V外壳抗原.....	(61)
	E B V核抗原.....	(61)
第14章	B和T细胞花结试验	(62)
	红细胞花结.....	(62)
	红细胞—抗体花结.....	(63)
	红细胞—抗体—补体花结.....	(63)
第15章	表面免疫球蛋白的检测	(64)
	免疫珠试验.....	(64)

(刘奎译)

前 言

十分欣慰地向从事细胞培养的科学界介绍由 J. Leslie Glick 博士著《人类淋巴样细胞培养的基础》一书，此书对淋巴母细胞系的培养有重要参考价值，此外，也适用于其他细胞系和培养问题，尤其在免疫学、遗传学、病毒学和分子生物学等方面更具有参考价值。

1966年，Les Glick 在 R P M 研究所，是参加 George E. Mooze 建立动物和人类白细胞系工作的一批科学家中的重要成员，以后他们从健康供血者建立一些细胞系，在另外研究机构的帮助下，向外传送成千上万的淋巴母细胞系以用作科学研究。自从 Mooze 和他的同事首次从外周血淋巴细胞建立细胞系以来，他们现在能够从数百名患白血病、遗传缺陷病和大多数 HLA 单型的个体建立细胞系。这些值得注意的基因库，现在大部份编入美国马里蓝 Rockville ATCC 和美国新泽西州 Camden 医学研究所。

这本书不是对有关的论题作评论，而是把基础、理论和应用进行严谨的综合。每一章的实验室操作部分依次叙述的技术内容，大量地点点滴滴搜集于研究机构的出版物，并包括作者任 BuffaJo 生物医学公司领导时，若干年教授淋巴样细胞培养教程的内容。例如，第 2 章“细胞培养环境”中，包括至今为止多方面搜集的 PH 控制和水制备的资料，消毒技术，记录卡片和细胞维持，支原体控制，以及低温冻存，构成了每天维持培养的内容。作为一种分析问题的范例对如何操作进行了介绍，生物学特征的最后部分，再次讨论实例方法和交叉污染检测的原理。细胞鉴定技术的描述包括：染色体制备，HLA 分型，EB 病毒测定，花结形成和表面抗原。因此，虽然读者能从每一章的基础部分受益，但作为一本手册，科学和技术工作者都在那里对淋巴细胞培养的许多实验室问题得到解答。

Ben W Papezmastez 博士

(黄可泰译)

序

本书是由我同同事一起，于1973年在纽约 Buffalo 生物医学联合公司首次组织一系列实验组后的自然产物，实验组计划教习生物医学研究者如何培养人类淋巴样细胞，我们很快发觉，不同基础的医学博士、理学博士、技术人员和学士毕业生们，很有兴趣学习培养淋巴细胞。

人类淋巴样细胞系容易从未稍血中建立，在许多培养单位中无限地传播，它们有比较短的群体倍增时间，可在体外人工培养一大批有体内淋巴细胞特征的细胞。从而，人类淋巴样细胞技术学已在所有主要的生物医学研究学科中应用，包括生物化学、遗传学、免疫学、药理学、生理学和病毒学。

在过去几年里，用人类淋巴样细胞系工作的研究者很快的增多，很少或无组织培养经验的研究者们，需要去掌握培养的淋巴细胞，而们他的大多数人仅有肤浅的血液学基础，这本书是专门为他们而编写的。

实际上这是一本手册，分成三个部分。第一部分提出这个领域的概况。另两个部分讨论培养技术和生物学分析方法。总的愿望是写一本通俗易懂的技术书，供给希望开始去运用它的读者。

并十分感激我的同事A. Dutton等诸位，在编写这本手册过程中受到他们的指点和帮助，技术学描述的许多方面是由于他们尽力的促进。并也需要向大力合作的B. Papeimastez致意，1969年，为了发展包括培养淋巴细胞的应用技术的目的，我们成立了生物医学系统联合公司。最后，我应该向人类淋巴样细胞技术学的发现者Geozge Mooze感谢。15年前，在纽约Buffalo RPM研究所，使我认识到这门兴起的技术学。

J. Leslie Glick

(黄可泰译)

第一部分

第1章 建株细胞系的生物学特征

简史

造血研究的主要目的是使人骨髓瘤和人外周的细胞在高度分化状态长期培养时，能继续增殖。自从 Iwakata 等由人外周血首次建株了淋巴样细胞系以来，这项工作得到了很大的进展。Iwakata 建株的这株细胞系被称做 RPMI 6416，它来源于急性骨髓细胞白血病患者。

Iwakata 博士曾是 RPM 研究所 Grace 博士实验室的客籍研究员。正是由于他对工作非常耐心，才使得人淋巴样细胞培养的研究工作得以开展。他没有象别人一样抛弃那些看来似乎是垂死的培养细胞，相反，却把上述患者的白细胞在培养基中维持了1个半月。此后，这些细胞便开始增殖了。

当时，G. E. Moore 博士是 RPM 研究所的所长。为了建成千百株可长期培养的人淋巴细胞系，他立即开始了一个应急计划。这些细胞现在称做淋巴样细胞系或称做淋巴母细胞系。Moore 博士亲自负责并建成了许多淋巴样细胞系。至今，这些细胞系仍被世界各国所采用。在1967年，Moore 等人首次报导由正常人外周血建立人淋巴样细胞系获得成功。Moore 的实验室也设计出了连续培养和分批悬浮培养生长淋巴样细胞系的方法。其容量从每培养瓶10ml直到1000升以上。

碰巧，Pulvertaft 和 Epstein 与 Barr 在 Iwakata 等报导他们的发现的同一年（1964

年），也各自报导了伯基特淋巴瘤细胞系的建成。尽管伯基特淋巴瘤细胞系是来源于活组织，但与 RPM 研究所从外周血获得的淋巴样细胞系有很多共同点。以后又发现绝大部分人淋巴样细胞系，无论是来自于伯基特淋巴瘤患者，也无论是来自于白血病患者或来自于正常人，都具 B 细胞（即来自于骨髓的淋巴细胞）的特征。而且，几乎所有的人 B 淋巴瘤细胞系都有 E. B 病毒基因。这不仅意味着 E. B 病毒可能是伯基特淋巴瘤的病因，而且还有人报导说：这种病毒引起传染性单核白血球增多症。在 E. B 病毒和淋巴样细胞系之间的特殊关系正在被继续研究。

尽管绝大部分淋巴样细胞系相当于 B 细胞，但也有少数几个细胞系被描述为 T 细胞（即来自于胸腺的淋巴细胞）。Foley 等人在1965年首次从患急性淋巴母细胞白血病患者的外周血中建株了人 T 细胞系。然而，一直过了许多年以后，这株 CCRF—CEM 细胞系才实际上描述为 T 细胞系。Miuowada 等，在1972年报导了 MOLT 细胞系，并把它说成是第一个人 T 细胞系。和 CCRF—CEM 相同，MOLT—1，MOLT—2，MOLT—3 和 MOLT—4 也都由急性淋巴母细胞白血病患者的外周血建株的。

最近又建株了几株具第三种淋巴细胞指征的淋巴样细胞系。这些细胞系全都来源于急性淋巴母细胞白血病患者。它们既不具 B 细胞的特征，也不具 T 细胞的特征，而被归于 null 细胞系。

细胞在长期培养中的变异

本章的其余部分着重描述人淋巴样细胞系和有关的造血细胞系的特征。下面的章节专门讨论有关的方法学问题。

开始培养和建株

由外周血血黄层建立连续的淋巴样细胞系并不比由其它各种不同组织建立细胞系来得容易。首先,人淋巴样细胞系建株成功的比例一般在5%到50%之间变化。它取决于实验人员的经验、血液操作的方式,和细胞培养开始的规模。其次,从开始予培养到建立永久的细胞系之间时间相当长。这段时间平均40—70天,很少短于2周,甚至长达6个月。最后,即使用人白细胞进行培养,所建株的造血细胞系不是B细胞类型的细胞系是极少的。

Moore氏建立淋巴细胞培养的技术来源于从外周血加工大量白细胞的设计。他常由同一个献血员的500ml外周血分离出血黄层,并同时开始一打细胞培养。每50ml培养液含 $5-10 \times 10^6$ 个白细胞,这些白细胞被悬浮在补加20%胎牛血清的RPMI1640培养基中。24小时培养后,活细胞数下降到80—90%。在第一周内,补加20%的新鲜培养基。如果第二周,细胞数下降到 0.5×10^6 个细胞/ml,则将二瓶培养细胞混合,并以新鲜的培养基去替换培养液中50%—80%的培养基。再下一周,给培养细胞补加10—20%的新鲜培养基,或经离心后,加上80%培养液的上清液和20%的新鲜培养基。细胞浓度再调节到最终浓度为 $0.5-1.0 \times 10^6$ 个细胞/ml。很少,为了建株再合并由同一献血员来源的二瓶培养细胞。

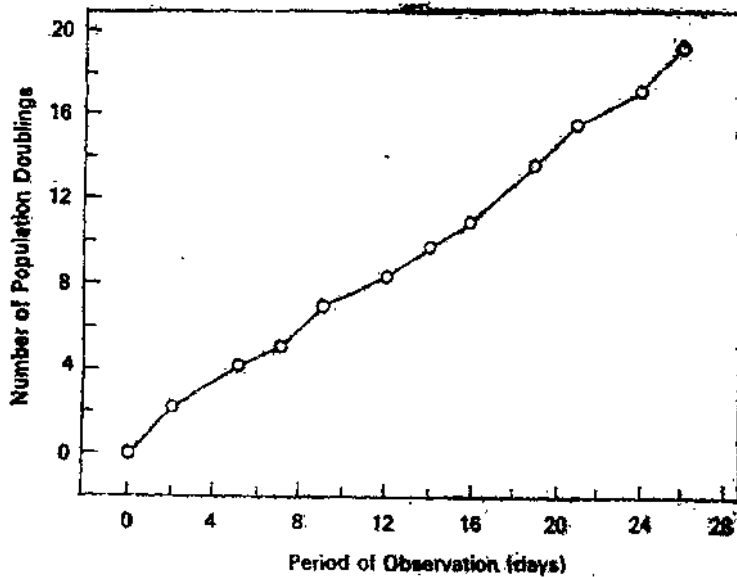
如果形成了自由浮动的细胞团块且细胞数倍增,同时培养液PH下降,就可认为淋巴样细胞系已被建株。一个真正建株的细胞系能以对数增长的速度无限制地增加它后代的数目。

几年前, Glate及其同事发展了一种由少量的人血建立淋巴样细胞系的简便技术。将PHA加到最初的白细胞培养液中,培养液的体积为10ml,细胞浓度为 $1-3 \times 10^6$ 个单核细胞/ml,培养基为补加20%胎牛血清的RPMI1640培养基。在加入PHA后,有20—80%来源于正常献血员的培养细胞经过通常潜伏期后建成起细胞系。而不加PHA,来源于正常献血员的培养细胞显然不会建成起细胞系。

诱导人淋巴样细胞系建立的最普遍的做法是用EB病毒去影响最初培养细胞。这是由三个实验室在1980年后各自发现的。以后又弄清楚至少25—50%的非伯杰特淋巴样细胞系产生病毒颗粒。在电子显微镜下,这些病毒颗粒是和EB病毒一致的。最近的研究指出:只要用能传染EB病毒的淋巴细胞培养液的滤液去影响0.1毫升肝素抗凝的全血,在二周内就可建立起淋巴样细胞系。B95—8培养细胞比绝大多数EBV—阳性的人淋巴细胞系释放出更多的胞外可传染的EB病毒。

本实验室结合了PHA法和EBV法,由少量的白细胞建立人淋巴样细胞系。这一方法最适用于血样必须贮藏12hr以上,才能开始最初细胞培养的情形。Moore以前报导说:如果要使细胞培养建立起来,需要在收集血液的4小时内开始原代培养。我们将在第6章中叙述我们现在采用的技术,表1—1和图1—1说明了PHA和EBV联合使用的效率。

如表1—1所指示的那样,当血样贮藏了12个小时再开始细胞培养时,只有这些细胞同时受PHA和EBV的影响才能最终建立细胞系。图1—1表示,一个新建株的细胞系ABS0802的细胞速率。在26天内,细胞的数目增加了19倍。这表明细胞倍增时间为32hr左右。以后的分析指出:ABS0802只由B细胞系所组成。



由于可溶性PHA一般仅刺激T细胞的核酸合成，所以用PHA处理后，结果却产生B细胞系是耐人寻味的。然而，不溶性的PHA（例如结合在琼脂糖珠上的PHA）却既不能刺激T细胞又不能刺激B细胞。据推测，PHA在B细胞系建株中的可能作用是由于它优先附着在外周血白细胞中的T细胞上，和诱导生成T细胞因子，这种因子能够刺激B细胞。

细胞增殖和不死性

一旦人淋巴样细胞系建成，它就能永远存活。一个健康的细胞系，不管它是属于B细胞，还是属于T细胞；也不管它是来自于正常人，还是来自于淋巴样组织增生患者或恶性造血紊乱患者；一般都每1—2天细胞倍增一次。在绝大多数的情况下，细胞倍增时间在24—36小时之间变化。但也有一些细胞系的倍增时间不到20小时。还有一些细胞系的倍增时间却在40小时以上。

建株的细胞系通常维持在RPM11640或RPM11629培养基中，并补加5—20%胎牛血清。而10%胎牛血清应用最广泛。马血清可用来代替胎牛血清，为此有人提出把RPM1培养基转换成FM04培养基。另一方面，

通常情况下，小牛血清不如胎牛血清效果好。

1%的人血清可促进培养的淋巴样细胞的生长，效果和10%胎牛血清相同。然而，利用1%人血清时也有些问题须注意。正如在第二章中所述的那样，当血清数量降低时，培养基的缓冲能力也随之下降。特别是培养细胞量少时，更应仔细的管理或培养在CO₂箱中。相反，如果培养基中含有相当多的胎牛血清，在这种条件下培养人淋巴样细胞时，差

不多总是培养在普通的、没有专门气体环境的孵箱中。

为了长期培养人淋巴样细胞系，这些细胞可培养在静止的小瓶中，或培养在一面朝上的平底瓶中。这些细胞通常不粘附在培养瓶上。培养细胞液体积在10—300毫升之间。当体积超过300毫升时，需要不断的搅动，才能使培养细胞增殖。转瓶可适用于25毫升—4升的体积。这些转瓶一般二侧有耳，里面悬挂着一根磁棒，当它受到一个外加的，马达推动的或电子控制的磁场的作用时，瓶内的悬浮液就不断搅拌。即使体积超过1000升，转瓶原理的变更仍是能使培养细胞能被不断搅动。连续悬浮培养人淋巴样细胞使我们能把几株细胞系维持了近十年。在这段时间内，每个细胞系已倍增了2000—3000次。

染色体的稳定性和克隆效率

大多数人淋巴样细胞系的染色体为二倍体，数目为46或48左右。即使偶然会遇到多倍体，但异常染色体模式数目很少少于45或多于47。由正常人血液建株的B细胞系倾向于在开始培养的一、二年内保持原先的二倍体核型。此后，会出现细微的染色体变异。染色体模式数目稳定在46，而核型却变成了

假二倍体。来源于正常人的细胞系变成染色体三体的情况并不罕见。这是因为一个染色体组与另一个染色体组的一个染色单体合并的结果。来源于非恶性造血紊乱如传染性单核白血病患者的B细胞系或来源于非造血恶变如黑色素瘤患者的B细胞系也倾向于发展成假二倍体核型。

相反,来源于各种造血恶变患者的B细胞系,大多数最终倾向于表现亚二倍体核型或超二倍体核型。来源于白血病、淋巴瘤和骨髓瘤患者的细胞系在培养几年后,很少保持正常染色体模式数目。特别是伯杰特淋巴瘤细胞系大多数呈现异常染色体模式数目。

来源于急性淋巴细胞白血病患者的细胞系在建株后不久就很快呈现异倍体。这无疑是由于它恶性的功能而不是因为它们来源于造血细胞。例如MOLT-4F具有接近4倍体的核型。Null细胞系也起源于急性淋巴白血病患者,也呈现明显的异倍体核型。

表1-2总结了Moore氏实验室所获得的数据。试图对各种来源的人淋巴样细胞系的染色体、克隆和它的生长模式方面做出相关。对来源于非造血恶变个体的16个细胞系进行了研究。尽管有许多核型是假二倍体,但所有的16个细胞系都具有正常染色体模式数目——46条染色体。当把它们放在琼脂培养基中培养时,所有的16个细胞系呈现低的克隆效率(形成克隆的细胞不到6%),并且没有一个克隆可用肉眼直接看到。

对来源于各种淋巴瘤、骨髓瘤和白血病患者的14个细胞系也进行了研究。其中只有6个细胞系具正常染色体模式数目。在6个细胞系当中有5个细胞系呈现低的克隆效率。另一个细胞系的克隆效率为18%,但和上述的5个细胞系一样,仅产生在显微镜下才可见的克隆。除这6个细胞系外的8个细胞系全具有异常染色体模式数目,并产生除显微镜下可见的克隆外,还产生肉眼可见的克隆。在这8个细胞系中,有4个细胞系克

隆效率达12—36%。还有4个细胞系的克隆效率超过60%,并仅产生肉眼可见的克隆。

从表1-2可以看出:当在培养基中稀释各种细胞系时,细胞在悬浮培养中所需的最小细胞浓度与细胞的克隆效率成反比。总的来说,那些来源于造血恶变患者的淋巴样细胞系具异常染色体的模式数目,且具高的克隆效率。同时也能在悬浮培养中,在细胞浓度稀释到很低时,继续增殖。稀释的倍数可比来源于正常人的细胞系增殖所需的最低浓度还低5—50倍左右。

以下的发现可证明正常的细胞系不同于恶变细胞系的结论。所有的能在稀释到非常低的细胞密度时仍能增殖的细胞系,在接种到射线照射过、具免疫抑制的年轻小鼠时,能形成肿瘤。和来源于造血恶变患者的所有细胞系相反,当一些来源于正常人的细胞系注射到具免疫抑制的小鼠时,却不会出现肿瘤。

但在评论来源于正常人的淋巴样细胞系和来源于造血恶变患者的淋巴样细胞系的不同点时,不应绝对化。例如:一些来源于白血病患者的细胞系保持正常染色体模式数目。并且也具低的克隆效率。另一方面,一些来源于正常人的细胞系却在某些免疫缺乏的实验动物上形成肿瘤。事实上,把新鲜的外周血白细胞注射进免疫抑制的仓鼠中能引起浸润性的淋巴肿瘤。EBV-阳性的人淋巴样细胞系已由这些肿瘤组织建株。还有证据指出:甚至来源于新生婴儿的EBV-阴性的外周血白细胞也可在几种免疫抑制的动物上形成肿瘤。然而至今还没有得到由这些肿瘤组织建成的细胞系。

不同细胞系的特征

外周血的大部分淋巴细胞是T细胞,而已建成典型淋巴样细胞系却仅含B细胞。B细胞系缺乏小的成熟的淋巴细胞,相反,却是由淋巴母细胞即大淋巴细胞所组成。其平均细胞直径为12 μ m,在10—18 μ m之间波

表1-1 PHA和EBV对来源于同一个体的人淋巴样细胞样建株的联合作用

培养细胞 号 码 ^a	加入物质 ^a		结 果	果	细胞系名称
	0天	3天	52天	150天	
A	PHA	无	—	死亡	—
B	PHA	无	—	死亡	—
C	PHA	EBV	建株	生长	ABS0802
D	PHA	EBV	建株	生长	ABS0801
E	无	EBV	—	死亡	—
F	无	无	—	死亡	—

注：a：每10毫升培养液含 1×10^6 个白细胞/毫升，悬浮培养在 25cm^2 的塑料培养瓶中。培养基为RPMI1640 + 20% FBS。所有的培养细胞来源于12小时之前取的同一个血样，并同日开始培养。

b：见第6章有关PHA和EBV的细则。

表1-2 不同来源的人淋巴样细胞系的生长特征

细胞系	染色体模式	克隆效率		液体培养所需的最小细胞密度 ^c (cells/ml)	在鼠中形成肿瘤的能力 ^d
		CFC ^a %	克隆大小 ^b		
正常人					
10	正常	< 6	u	5000 - 10,000 ^e	不能 ^f
非恶性造血紊乱					
5	正常	< 6	u	—	—
非造血恶变					
1	正常	< 6	u	3000—5000	不能
造血恶变					
5	正常	< 6	u	—	—
1	正常	12—36	u	—	—
3	异常	12—36	M和u	600—1000	能
1	异常	12—36	M和u	300—600	能
4	异常	> 60	M	100—200 ^g	能

注：^aCFC指形成克隆的细胞（每平皿上加1000个细胞）

^bu指微小克隆（10—100个细胞），M指大克隆（>1000个细胞）

^c指在悬浮培养中，细胞增殖所需的最小细胞浓度

^d4周龄小鼠，照射600拉德，24小时后每小鼠接种 10×10^6 个细胞

^e仅检测了10个细胞系中的4个细胞系

^f仅检测了10个细胞系中的2个细胞系

^g仅检测了4个细胞系中的2个细胞系

动。几个建株的T细胞系和Null细胞系的细胞更小，平均直径为8—12 μ m。

和体内情况相反，在体外增殖的B细胞系几乎全部含EBV基因组。并可表达EB病毒的核抗原。绝大部分B细胞系中的少数细胞也表达EB病毒壳抗原，甚至能产生EBV颗粒。一个例外的例子是：建立B细胞系不一定要用EBV感染，由无EBV的活组织切片也建成了B细胞系。这个细胞系连痕量的EBV也没有。无EBV的B细胞系也可由急性淋巴白血病患者的外周血建立。这些无EBV的B细胞系能够增殖，可能反映了它的恶性病变的起源。

和B细胞相反，T细胞系和Null细胞系都不是用EB病毒感染的方法建成的。一般说来，T细胞系和Null细胞系起源于造血恶变，主要来自于一种专门的疾病——急性淋巴细胞白血病。然而也有一种例外。

Morgan等发现：在专门的环境条件下，骨髓和外周血细胞在开始原代培养后1—2周，能在体外不断增殖。这些细胞或来源于正常人，或来源于各种白血病患者（急性淋巴细胞白血病患者除外）。每批原代培养细胞仅含 6×10^5 个细胞。这些细胞被培养在装有1.5毫升生长培养基的试管中。诱导对数生长的秘密在于培养基中含有特异性的生长因子。这种因子是用PHA培养正常外周血T细胞三天后收集的一种条件培养基。当把这种因子加到试管里的培养细胞中，就发生T细胞选择生长，在经过了开初一段的延迟期以后，T细胞每24—48小时倍增一次，直到细胞密度达到 1×10^6 个细胞/ml为止。然后，这些细胞再稀释到每管 1×10^5 个细胞，只要特异性的生长因子存在，T细胞就继续增殖。和来源于急性淋巴细胞白血病患者、可长期传代的T细胞系一样，Morgan氏培养的T细胞系也缺乏EBV基因。但不同的是Morgan氏T细胞系的增殖严格地依赖于特异性的生长因子。

表1—3和表1—4比较了B细胞系、T细胞系和Null细胞系的一些性质。例如：来源于正常人的B细胞系都含有EBV基因而不同于来源于淋巴瘤或淋巴细胞白血病患者中的一个偶然发生的B细胞系。又如：来源于急性淋巴细胞白血病患者T细胞系不同于那些依赖生长因子才能不断增殖的T细胞系。只有那些依赖于生长因子才能不断增殖的细胞系才能在不到二周的延迟期内建株。

表1—4列出了B细胞系、T细胞系和Null细胞系彼此互相区别的细胞标记。检测这些标记的方案将在下面的章节中叙述，正如前述，EBNA即EB病毒核抗原仅能在B细胞系中检出。表面免疫球蛋白，包括IgM，IgG和IgA差不多全仅在B细胞系中表达。绝大多数细胞系仅表达这三类免疫球蛋白中的一种，通常表达IgM，其次是IgG，最后是IgA。

表1—4 B细胞系、T细胞系和Null细胞

标记类型	系的细胞标记		
	存在标记		
	B	T	Null
EBNA ^a	+	0	0
表面免疫球蛋白	+	0	0
EAC花结	+	±	0
EA花结	+	±	0
E花结	0	+	0
高TdT活性 ^b	0	+	+
MLR刺激 ^c	+	0	+

注：a EBNA=EBV核抗原

d TdT=末端脱氧核糖转移酶

c MLR=混合淋巴细胞反应刺激能力。

关于免疫球蛋白的讨论在以后的章节中继续进行。

表1—4中的玫瑰花结试验对描述B细胞系、T细胞系和Null细胞系的特征是非常有用的。E花结是由结合到T细胞上的羊红细胞所组成。但羊红细胞不和B细胞以及Null

细胞结合。在某些T细胞系中,形成E花结细胞的百分数会在延长培养时逐渐减少。E_A花结是由红细胞抗体复合物所组成,它可和B细胞、单核细胞、多形核白细胞以及一些T细胞相结合。它用来检测免疫球蛋白F_c受体。一些B细胞系,如RPMI1788似乎缺少F_c受体。此外Null细胞系更全是F_c受体阴性。EAC花结是由红细胞抗体补体复合物所组成。可用来检测补体C₃的受体。一些T细胞系如MOLT-4F,它开初表现缺少C₃受体,但在延长培养时,可逐渐获得EAC花结形成的能力。

另二项用作描述B细胞系、T细胞系和Null细胞系特征的试验说明如下:第一种试验是检测末端脱氧核苷酸转移酶活性(TdT)。这种酶在缺乏模板时促使DNA链延长。脱氧核糖核苷是在寡脱氧核糖核苷起始物的3'端或在多聚脱氧核糖核苷起始物的3'端聚合的。在正常人的胸腺中以及在急性淋巴细胞白血病患者的外周血细胞中,TdT的活性是相当高的。即使在PHA刺激后,正常人成熟的T细胞也不具如此高的TdT活性。

当把许多B细胞系和T细胞系的TdT活性进行比较时,T细胞系的TdT活性比B细胞系的TdT活性高出30—100倍。然而,所有的T细胞系都来源于急性淋巴细胞白血病的患者。来源于急性淋巴细胞白血病患者的Null细胞系也产生高TdT活性的抽提物。相反,来源于患这种病患者的B细胞系却和其它的B细胞系一样缺乏TdT活性。应该注意的是:表现TdT活性的细胞系在长期培养中会逐渐失掉这种性质。

还有一种试验是单向混合淋巴细胞培养试验。即让来自于一个个体的淋巴细胞失活,而与另一个未作任何处理的淋巴细胞混合培养。使淋巴细胞失活的方法或是用射线照射或是加入丝裂霉素C。这样处理后,淋巴细胞就不能合成DNA,但不损害它们在和未处理的淋巴细胞混合培养时,刺激未处理

的淋巴细胞的DNA合成的能力。不同来源的B细胞系的无活性细胞和Null细胞系的无活性细胞具有相当大的刺激能力。而来源于急性淋巴细胞白血病患者的T细胞系的无活性细胞却不是这样。

由外周血分离出一些偶然发生的白血病细胞。在同一细胞中,它们既具B细胞标记,同时又具T细胞标记。例如:最近发现来源于有毛细胞白血病患者的淋巴细胞中有相当高百分比的淋巴细胞既能和羊红细胞结合,又能与抗T细胞抗血清起反应。而且这些淋巴细胞中有许多细胞也含表面免疫球蛋白和F_c受体。这完全不同于通常的情况。在通常情况下,外周血淋巴细胞或者含B细胞标记或者含T细胞标记,但不会在同一细胞中含二种类型的标记。人淋巴样细胞系也很少有在同一细胞中具二种类型标记的细胞。如上所述,一些T细胞系将逐渐变得能形成EAC花结。

最近建株了一株白血病细胞系,最初,该细胞系既能形成E花结,又能形成EAC花结。然而,除C₃受体外,它不具任何其它B细胞标记。由同一个患者的外周血T淋巴细胞系也建成了,并且也表达C₃受体。

为建成非淋巴样细胞型的造血细胞系已作了许多努力。但结果差不多总是失败。然而,这种细胞系也有少数几个存活。其中,最早的一个是RPMI8226,它是在1966年由一个患多发性骨髓瘤患者的外周血建株的。开始把它认为是淋巴样细胞的一种表现型。然而和其它的淋巴样细胞系不同,它产生的免疫球蛋白不完整,即只产生入-轻链。在这一点上,RPMI8226与患者体内的成瘤浆细胞相同。

正如以后所证实的那样,RPMI8226缺少F_c和C₃受体位点,不能与羊红细胞反应,也无EB病毒。因此,RPMI8226不是B细胞系,不是T细胞系,也不是Null细胞系,而是由骨髓瘤细胞(或称做类浆细胞)组

表1-3

B细胞系、T细胞系和Null细胞系的性质

细胞系性质	正 常 人		ALL 患 者 ^b			OHM 患者 ^c	
	B	T	B	T	Null	B	T
不依赖生长因子 ^d	+	0	+	+	+	+	0
依赖生长因子 ^d	0	+	0	-	0	0	+
延迟期>14天 ^e	+	0	+	+	+	+	0
延迟期<14天 ^e	0	+	0	-	0	0	+
细胞团块	+	0	+	(+)	0	+	0
无团块	0	+	+	+	+	-	+
细胞直径10—18um	+	0	+	0	0	+	0
细胞直径8—12um	0	+	+	+	+	-	+
有EBV基因组	+	0	+	0	0	+	0
无EBV基因组	0	+	+	+	+	(+)	+
正常模式	+	+	0	-	0	(+)	+
异常模式	(+)	0	+	+	+	+	0
克隆效率>12%	-	-	-	+	-	+	-
克隆效率<6%	+	-	-	-	-	(+)	-

注: a += 阳性, 0 = 阴性, - 为没有数据, (+) 表示相当少的特殊类型的细胞系检测是阳性。

d ALL指急性淋巴细胞白血病

c OHM指其它的造血恶变

b 生长因子: 指刺激淋巴细胞的PHA条件培养基

e 延迟期: 指从开始原代培养到建立细胞系之间的时间。

成。它还保留能恶性转化的其它性质, 这包括: 接近三倍体的核型, 很高的克隆效率和注射进免疫抑制的小鼠体内可形成肿瘤。

K-562是另一种异常的造血细胞系。在经过详尽的描述后, 它也被归之于一种非淋巴样细胞的细胞型。该细胞系是1970年开始培养, 它来源于慢性骨髓性白血病患者的渗出液。它保持该病的特征, 即使培养好几年后, 仍保留小的费拉德尔菲亚染色体。这细胞系也保持近三倍体核型。

K-562细胞比大多数B细胞大。大约60%的细胞直径为14—17um。但它们的大小不一, 直径20—35um的占25%, 直径7—8um的占10%, 直径40—55um的占5%。可能这种不均一性反映了细胞类型的多样性。几乎

所有的K-562细胞能形成EA花结, 但形成E花结和EAC花结的细胞百分比很低。可是, 它又不同于真正的B细胞或T细胞所组成的细胞群。K-562细胞没有EB病毒, 也没有表面免疫球蛋白, 并且不和抗T细胞抗血清发生反应。

虽然K-562细胞有Fc受体, 但和单核细胞相反, 这些细胞不具吞噬作用。同时也和粒细胞不同, 这些细胞的过氧化酶阴性。在用邻硝基苯磷酸盐作为底物进行检测时, k-562细胞缺乏碱性磷酸酶活性。这是和新鲜的骨髓性白血病细胞一致的, 但是和新鲜的淋巴细胞白血病细胞不同, 同时也和长期培养的淋巴样细胞系不同。根据以上的检验和在这里未阐明的结果, 似乎k-562细胞是

种分化不全的粒细胞或是种增殖的骨髓性白血病细胞。

事实上,最近的研究证明:可用丁酸钠在K-562细胞的细胞质中诱导生成红细胞样的,产血红蛋白的颗粒。那些由细胞质排进培养液中的这种颗粒也表达表面血型糖蛋白A——人红细胞上的主要唾液酸糖蛋白。这一工作也为K-562的红细胞本质提供了证据。

Gallagher等也报导了非淋巴样细胞的造血细胞能在连续培养中生长。只要特殊的生长因子加到培养基中,那么无论何时培养急性骨髓性白血病患者的骨髓细胞或外周血白细胞,这些细胞都能无限制地增殖,这个因子是来自于人胚胎细胞培养的条件培养基。定名为HL-23的Gallagher氏的造血细胞培养不仅完全依赖这一因子进行细胞增殖,而且也完全依赖这一因子进行粒细胞的分化。

最近,按照补加类似的胚胎因子的方法,由另一个急性骨髓白血病患者建成了细胞系。然而,这一新细胞系——HL-60可以免加这种因子,并在不加这种因子时,表现过氧化酶阳性的细胞百分比仍很高。(即骨髓细胞百分比很高)。甚至这些细胞在不加上述因子的培养基中进行大规模的悬浮培养时,也不失去骨髓细胞的特征。在二甲亚砜及其有关化合物存在时,HL-60细胞能够分化成成熟的骨髓细胞(包括中性白细胞在内)。

刘奎译

病 毒 感 染

人淋巴样细胞培养液是很多病毒生长的极好的培养基,其应用于牛痘疫苗技术就是重要的例子。然而正如已经注意到的,大多数淋巴细胞系都已带有内源性病毒EBV。下面详细地叙述EBV和B细胞系的关系。

E—B病毒 (EBV)

EBV是一种疱疹病毒,于1964年在Burkitt淋巴瘤细胞系中发现,1966年此病毒从上述淋巴瘤细胞中分离,部分纯化,并且用电子显微镜作了鉴定。初步的细胞学和生物化学研究指示EBV是一种DNA病毒。1969年,Weinberg等从纯化的EBV中抽提和检测到DNA及各种蛋白质,从而确定了上述结论。

无论是检查病毒粒子,还是检查病毒抗原或是病毒基因组,EBV一般不能在周围血淋巴细胞中检测到,但是几乎所有的成人都有EBV抗体。显然,每一个人或在此时,或在彼时,实际上都感染过EBV。由于反复地看到已建立的淋巴细胞系常常产生EBV颗粒,由此得到结论,认为即使无法检出,必定有少数淋巴细胞带有EBV基因组,纵使细胞系中无外加的EBV,也有病毒产物出现。

无论病毒存在与否,几乎所有的B细胞系都表现出一种或多种EBV有关的抗原,尤其是EBV核心抗原(EBNA)。每一个B细胞还会有EBV基因组的多种拷贝,通常每一细胞有20至100份拷贝。在某些情况下,一个细胞系可达平均每个细胞1000份拷贝。这种EBV DNA与细胞染色体相联,虽然实际上它掺入细胞DNA的百分比是很小的。EBNA仅与含有EBV DNA的核的染色体相联,只有从这种核中,方可能抽提到EBNA。一般,每个细胞中EBV的数目越多,EBNA的量就越大。

从下列观察中间得到,B细胞被EBV感染必须在B细胞系建立之前,这几乎是一个普遍的规律。仅当外加的EBV存在时,才能从胎儿白细胞或无EBV者的周围血白细胞建立淋巴细胞系,无EBV者包括缺少抗EBV血清抗体的婴儿和成人,他们大约从未感染过EBV。在排除外源性EBV的对照实验中,建立了不至一种细胞系。随后揭示,与T细

胞不同, B细胞的表面有EBV受体。此发现解释了为什么当EBV抗体阴性的白细胞培养接触EBV时, EBNA在B细胞中表达而不在T细胞中表达。只有EBNA阳性的B细胞形成母细胞, 然后开始复制, 并长满盖过了T细胞。在起始的原代细胞培养中, T细胞是主要的细胞群, 而在传代细胞中, 仅仅只有B细胞。

当然, 有明显的证据表明, EBV不仅与Burkitt淋巴瘤的病原学有关, 还与鼻咽癌和传染性单核细胞增多症有关。EBV与传染性单核细胞增多症的因果关系, 有助于揭示B细胞的EBV转化的本质。

首先, 患传染性单核细胞增多症的病人, 有非常高的EBV抗体活性, 而这些病人在得此病之前, 其血清阴性, 或抗EBV的滴度相对较低。而且传染性单核细胞增多症患者的抗EBV抗体活性与IgM有关, 而健康志愿者血清的相应活性都与IgG有关。这一发现肯定了传染性单核细胞增多症血清中抗EBV抗体的出现, 乃是初次感染病毒的结果。

EBV作为传染性单核细胞增多症的病原体的证据, 还可以从直接用周围血淋巴细胞的研究中得到。健康人的淋巴细胞没有EBV的踪迹, 而传染性单核细胞增多症病人在急性期中, 0.5%~2.0%的B细胞群表现EBNA。从传染性单核细胞增多症的周围血白细胞建立淋巴细胞株, 只需一个月, 与从其他供体中建立淋巴细胞系比较, 这是一个很短的时间。EBV还可从传染性单核细胞增多症的淋巴细胞系中分离, 也能使脐带白细胞转化为淋巴样细胞系。传染性单核细胞增多症病人的咽喉洗涤液也能使脐带白细胞转化, 如不和外源性EBV接触, 脐带白细胞从不会形成细胞系。分析经病人咽喉洗涤液处理的细胞系, 可检测到EBV DNA和EBNA。

C型病毒

动物致癌病毒如C型RNA肿瘤病毒, 能

感染人淋巴样细胞系。实际上, 从正常人的周围白细胞建立的NC-37细胞系, 已用作供灵长类RNA肿瘤病毒SSV生长的基质。感染SSV的NC-37细胞, 在收获病毒之前, 一直在100—200升体积中培养, 这样大的体积是为了使病毒长得够多, 以便能分离到它的主要结构蛋白质, 这些蛋白质经纯化, 用于免疫学研究和牛痘疫苗的发展。

对病毒致肿瘤性的特殊兴趣, 是由于内源性C型病毒有时可能在各种造血系肿瘤病人的淋巴样细胞中表达, 在新鲜的白血病和淋巴瘤中, 有这种病毒的可靠证据。从短期培养的白血病骨髓细胞, 分离并鉴定了C型病毒颗粒。

由Gallagher等从急性骨髓性白血病患者所建立的粒性白细胞系, 亦产生C型病毒, 这种病毒, 定为HL-23病毒, 实际上是两种不同病毒的混合物, 与灵长类致肿瘤病毒SSV和狒狒内源性病毒(BEV)有关。HL-23也从这种病人的新鲜细胞中分离到。此病毒可使许多细胞系感染和转化。

上述研究促使研究者去探索人淋巴样细胞系中内源性C病毒的证据。较早的一个报导指出, 在培养基中去除精氨酸会导致逆转录酶活性, 并在几种淋巴细胞系中出现C病毒, 这些细胞系是从Burkitt淋巴瘤和白血病人中建立的。另一个实验室所做的工作则指出, 无论在培养液中有或没有精氨酸, 在人淋巴样细胞系中, 自然地出现致肿瘤病毒的机会相对是稀少的, 仅有一份关于13株细胞试验的报据说有C型病毒存在的证据。然而, 另一个实验室最近在一种人组织细胞淋巴瘤细胞系中, 分离到一种C型病毒。

其他病毒和干扰素

病毒感染人淋巴样细胞系的其他研究, 包括用单纯疱疹病毒(HSV), 呼肠孤病毒, 流行性腮腺炎病毒, 新城鸡病毒, 水泡性口炎病毒, 和仙台病毒。鉴于上述疱疹病毒EBV感染淋巴样细胞的讨论, 注意到H-

SV与EBV的不同作用，是很有意思的。一俟病毒感染之后，HSV抑制细胞合成DNA，引起染色体畸变，并使细胞溶介。

人淋巴样细胞系能产生自身的和病毒诱导的干扰素，产率视各种细胞系的反应性而不同，但与细胞供者的健康状况无关。干扰素的活性可经测定已用过的培养基而决定，干扰素的活性与它减少病毒如VSV对细胞的病理作用的能力成正比。在人淋巴细胞培养中试验过的多种病毒中，新城鸡病毒和仙台病毒是特别有效的干扰素合成诱导剂。干扰素产物的富集，可以通过在培养基中加入5-溴脱氧尿嘧啶或用白细胞干扰素作为原体而达到。

免疫学方面

早期，要大量建立淋巴样细胞系的动力是以它们在临床应用，包括免疫治疗的应用为基础的。例如，大规模培养人淋巴样细胞用作产生抗淋巴细胞抗体的刺激物，将细胞给动物注射后，它们的血清球蛋白组分，在体外对人淋巴样细胞有特异性细胞毒性，用于器官移植病人可明显地延长移植接受的期限。

George Moore的梦想之一，是希望培养的淋巴细胞对控制癌症有效。这起源于早期的工作，患恶性肿瘤的病人之间，互相移植肿瘤细胞，10到12天后，已免疫的病人的白细胞注射到提供肿瘤细胞的病人。在某些病例，经过这种免疫治疗，可有部份或明显的缓解。Moore指出，如将培养淋巴细胞在体外用病人自己的肿瘤细胞免疫后用注射，将会更有效。他们给终末期癌症患者注射同源或异源的培养淋巴细胞，在少数注射了大量同源淋巴细胞的病人中，可得到明显的缓解。

如欲将培养淋巴细胞或淋巴细胞产物常规应用于临床，就有必要弄清楚长期培养中淋巴细胞的免疫行为，这个领域内一定会有明显的进展。

HLA抗原

鉴别不同的人淋巴样细胞系的一个方法，是检查HLA抗原型式。HLA抗原是人组织相容性抗原，对决定组织移植物的接受或排斥有帮助。HLA抗原在许多细胞表面表达，但大都从淋巴细胞检测，所以，一般HLA是指白细胞抗原。

HLA抗原分型由基因控制，属于四个紧密联结的基因位点，位于二个称为C6的染色体上。这四个位点称为HLA-A，HLA-B，HLA-C和HLA-D。在常染色体C6上，它们的次序是HLA-A—HLA-C—HLA-B—HLA-D。在每一个位点都可表达任何一个等位基因，已鉴定的HLA-A至少有20个不同的等位基因，HLA-B有20个，HLA-C有5个，HLA-D有6个（表1—5）。

表1—5 HLA系统

HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D
A 2	B 5	Cw 1	Dw 1
A 2	B 7	Cw 2	Dw 2
A 3	B 8	Cw 3	Dw 3
A 9	B 12	Cw 4	Dw 4
A 10	B 13	Cw 5	Dw 5
A 11	B 14		Dw 6
A 28	B 18		
A 29	B 27		
A w 19	B w 15		
A w 23	B w 16		
A w 24	B w 17		
A w 25	B w 21		
A w 26	B w 22		
A w 30	B w 35		
A w 31	B w 37		
A w 32	B w 38		
A w 33	B w 39		
A w 34	B w 40		
A w 36	B w 41		
A w 43	B w 42		