

日本七鳃鳗类淋巴细胞的分离及细胞学特征

刘岑杰 刘欣 吴毓 马飞 王继红 李庆伟*

(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029; 辽宁师范大学城市与环境科学学院 大连 116029)

摘要: 为分离纯化并鉴定日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 血液中的类淋巴细胞, 采用 Ficoll 密度梯度离心法分离出单个核细胞层, 并得到分离单个核细胞层的最佳分离液比重为 1.092。利用流式细胞仪对分离到的单个核细胞层细胞进行分选, 根据细胞的前向光及侧向光散射特征成功分选出类淋巴细胞, 分选效率为 95.68%, 每毫升外周血可分离纯化得到类淋巴细胞 2.4×10^6 个。通过透射电镜观察七鳃鳗类淋巴细胞, 细胞为圆形或椭圆形, 细胞表面有突起、无微绒毛, 胞质内含有板状嵴线粒体、粗面内质网、游离核糖体和液泡等。淋巴细胞异质性实验结果表明, 日本七鳃鳗血液白细胞中尚未发现 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞的分化。

关键词: 日本七鳃鳗; 类淋巴细胞; 流式细胞分选; 细胞异质性

中图分类号: S965.116 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)01-82-06

Separation and Cytological Character of Peripheral Blood Lymphocytes in Japanese Lamprey

LIU Cen-Jie LIU Xin WU Yu MA Fei WANG Ji-Hong LI Qing-Wei*

(School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029;

School of Urban and Environmental Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: To isolate and purify peripheral blood lymphocyte-like cells from the arctic lamprey, *Lampetra japonica*, centrifugation on Ficoll-Paque was performed and a uniform population of leucocytes containing lymphocyte-like cells with the mixture of Ficoll-Urografin solution at proportion of 1.092 was yielded. With the FSC and SSC character of the cells on flow cytometer, lymphocyte-like cells were separated successfully, and the purity was 95.68%. About 2.4×10^6 lymphocyte-like cells could be purified from 1 ml peripheral blood. Under TEM, lymphocyte-like cells were round or ellipse in shape without microvilli. There were mitochondria with cristae, rough endoplasmic reticulum, dissociated ribosomes and vacuoles in the cytoplasm. Lymphocyte differentiation analysis revealed that there was no evident differentiation of T and B lymphocytes in the leucocytes of *L. japonica*.

Key words: *Lampetra japonica*; Lymphocyte-like cells; Cytometry; Cell heterogeneity

属于圆口纲的七鳃鳗是迄今为止所知道的脊椎动物亚门中最古老的物种之一, 因此, 七鳃鳗不仅是研究脊椎动物起源与进化的关键物种, 与其他动物类群相比, 它更适合用作为外群, 在比较认识脊椎动物基因组组成、基因结构、基因加倍、新基因产生和基因功能的分化, 特别是在认识脊椎动物适应性免疫应答的起源与进化等方面都有极为重要的意义。20 世纪

80 年代初期 Fujii 首次报道了日本七鳃鳗 (*Lampetra japonica*) 存在与有颌类脊椎动物淋巴

基金项目 国家重点基础研究发展计划项目 (No. 2007CB815802), 国家高技术研究发展计划项目 (No. 2007AA09Z400);

* 通讯作者, E-mail: liqw @263.net;

第一作者介绍 刘岑杰, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物细胞生物学; E-mail: liucenjie @163.com。

收稿日期: 2007-06-08, 修回日期: 2007-11-13

细胞形态上相似的细胞^[1]。我国学者文兴豪等于 1997 年对日本七鳃鳗的全血细胞进行了显微、亚显微研究,也证实其有类淋巴细胞存在^[2]。2002 年, Mayer 等人,在海七鳃鳗 (*Petromyzon marinus*) 的前肠组织中,分离出一类淋巴细胞,其体积比哺乳动物的淋巴细胞略小,结构上,有一个浓缩染色质的细胞核,胞质中有相关的细胞器结构^[3]。作为适应性免疫的重要免疫细胞,七鳃鳗类淋巴细胞的存在,是研究其免疫进化的重要基础。要研究七鳃鳗的免疫机制,获得足够数量、纯度高的淋巴细胞是基本条件。国外学者较早报道了鱼类血液中淋巴细胞的有效分离技术^[4],国内也有分离草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)^[5]、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*)^[6] 和真鲷 (*Pagrosomus major*)^[7] 淋巴细胞的研究报道。有关日本七鳃鳗血液中类淋巴细胞的分离纯化及细胞异质性分析目前尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料 日本七鳃鳗采自黑龙江省松花江流域同江地区,选取健康、体表完整的个体 10 尾,置于水温 10 的水缸中充气饲养,观察 7 d,证实无病后用于实验。

1.2 试剂 采血抗凝管购自南昌市赣达医疗器械有限公司;通用型细胞分离液 LTS113 为天津市灏洋生物制品公司产品;RPMI 1640 液体培养基为 GIBCO BRL 公司产品;Giemsa 染液、瑞氏染液及台盼蓝为 Solarbio 公司产品;MTT、DMSO、植物凝集素 (PHA)、金黄色葡萄球菌蛋白 A (SPA) 为 Sigma 公司产品;其余试剂均为市售纯度最高的产品。

1.3 试剂配制 不同比重的细胞分离液:将通用型细胞分离液 LTS113 (比重 1.113) 按厂商说明书要求加不同体积比的 PBS (100 mmol/L, 无 Ca、Mg 离子, pH 7.2), 配成比重为 1.077、1.080、1.085、1.092、1.110 的细胞分离液。0.2% 的台盼蓝染液:用上述的 PBS 配制^[8]。淋巴细胞 RPMI 1640 培养液:先配制成不完全 RPMI 1640 培养液,使用前加入 20% (体积分

数) 灭活小牛血清,加入青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[9]。PHA 和 SPA 均用不完全 RPMI 1640 培养液配制成 1 mg/ml 的溶液,过滤除菌后分装, -20 下保存。福尔马林-丙酮固定液 (pH 6.6):称取 100 mg KH_2PO_4 和 20 mg Na_2HPO_4 ,先溶解于 30 ml 水中,然后加入 45 ml 丙酮和 4% 甲醛 25 ml,充分混合后,调 pH 至 6.6,置 4 冰箱中保存。副品红溶液:称取 4 g 副品红加入到 100 ml 2 mol/L HCl 中,水浴溶解过滤后置 4 冰箱中保存。六偶氮副品红溶液 (临用前配制):取 4% 亚硝酸钠溶液 3 ml,慢慢滴入 3 ml 副品红溶液中,边滴边摇,充分振荡 1 min。2% -醋酸萘酯溶液:称取 2 g -醋酸萘酯溶于 100 ml 乙二醇单甲醚中,置 4 避光保存。ANAE 孵育液 (临用前配制):取 100 mmol/L, pH 7.6 磷酸盐缓冲液 89 ml,加入染色缸中,缓缓加入六偶氮副品红液 6 ml,充分混匀后再慢慢滴入 2% -醋酸萘酯溶液 2.5 ml,充分混匀后,调 pH 至 6.1。2% 甲基绿染色液:取甲基绿 2 g,溶解于 100 ml 热蒸馏水中,溶解后 4 保存备用^[10]。

1.4 外周血白细胞的分离 七鳃鳗外表消毒后,断尾取血,抗凝管收集血液,加 2 倍体积 Hank's 液稀释。取不同比重的分离液各 3 ml,分别置于离心管中,用移液器取稀释血液 4 ml,沿管壁缓缓的叠加到淋巴细胞分离液界面上。水平转头离心 15 min (20 , 1 200 r/min)。用微量移液器小心吸取中间白膜状单个核细胞层到 1.5 ml 离心管中,加 5 倍体积以上的 Hank's 液重悬洗涤细胞,然后 1 300 r/min 离心 10 min 收集细胞。将其重悬于适量 Hank's 液中再洗涤 1 次,定量加入 Hank's 液重悬混匀细胞^[6]。通过改变分离时的离心温度、速度、时间,及洗涤细胞时的离心温度、速度、时间,以此来确定最佳分离条件。

1.5 细胞计数 取 1 滴细胞悬液与 1 滴 0.2% 台盼蓝染液混合均匀,加入血球计数板上,按公式:细胞密度 (细胞数/ml) = (4 个大方格内的细胞总数/4) $\times 10^4 \times 2$ (稀释倍数),进行计算。同时台盼蓝染色进行细胞活力检测,死细胞可

被染成蓝色,活细胞不着色,按公式:活细胞百分率 = 活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$,计数 400 个白细胞,计算出活细胞的百分率。

1.6 类淋巴细胞的流式细胞仪分选 将通过密度梯度离心得到的单个核细胞层的细胞离心,用 100 mmol/L 的 PBS 洗涤 2 次后重悬,吹打均匀后调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。用 FACS Vantage SE 分选型流式细胞仪(美国 BD 公司),根据仪器手册设置好各项参数,安装分选器,使用标准荧光球来调试最佳滞后时间(delay time)和驱动(drive)值。将上述单个核白细胞用常规方法进行分析,细胞经前向光散射特征(FSC)和侧向光散射特征(SSC)在二维 Dot-Plot 图中划出类淋巴细胞区,然后对其进行分选预实验,如显示良好的分离效果,则进行大批量的分选。收集完后测定类淋巴细胞的含量,计算回收率、细胞纯度,用台盼蓝测定细胞活率,瑞氏染色观察形态。

1.7 类淋巴细胞的透射电镜观察 将分选后的类淋巴细胞离心后,去除上清液,细胞团用 2.5% 的戊二醛固定,按常规方法制成透射电镜样品,在 JEM-2000EX 型透射电镜下观察并拍照。

1.8 类淋巴细胞的 ANAE 染色 取细胞悬液涂片,自然干燥。然后将涂片用冷的福尔马林-丙酮固定液固定 5 min,用水冲洗后室温下干燥。将干燥好的涂片放入孵育液中,37 $^{\circ}$ C, 2 h。取出涂片立刻在自来水下冲洗,用 2% 甲基绿染色液将涂片复染 2 min,再用自来水冲洗晾干,观察计数^[10]。

1.9 类淋巴细胞的转化实验 流式细胞仪分选后的类淋巴细胞马上通过离心(1 300 r/min, 10 min)收集细胞。用 RPMI 1640 培养液(含 20% 小牛血清)调整细胞浓度至 5.0×10^6 个/ml。细胞移入 96 孔培养板中,T 淋巴细胞转化实验组加入 PHA 作为刺激剂,浓度分别为 20、60、80、100、120、160、200 及 260 μ g/ml;B 淋巴细胞转化实验组加入 SPA 作为刺激剂,浓度同上;另设不含诱导素的对照组,每个浓度均设 3 个重复孔。将培养板放入 18 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养

箱中培养。68 h 后,每孔加入 50 μ l 浓度为 5 mg/ml 的 MTT,继续培养 4 h。培养结束后,加入 150 μ l DMSO,震荡 5 min,酶标仪测定 570 nm 的 OD 值。结果用刺激指数 SI 表示,SI = 实验孔的 OD 均值/对照孔的 OD 均值^[11]。

2 结果

2.1 外周血单个核细胞的分离纯化

2.1.1 全血细胞的观察 采用 Gemsa 染色法在 100 倍光学显微镜下观察日本七鳃鳗的全血细胞,初步从形态上能够区分出红细胞、类淋巴细胞、单核细胞、血栓细胞和粒细胞。红细胞数量占血细胞总数的 90% 以上,为圆形或椭圆形,一侧凹陷,似豌豆状,大小不均,直径 7~15 μ m,表面光滑,有一细胞核。类淋巴细胞是白细胞中数量最多的一种,圆形或椭圆形,直径 6~8 μ m 左右,核较大,位于细胞中央,周围包被一层薄细胞质。单核细胞近似椭圆形或梨形,体积较大,10 μ m 左右,细胞表面有凸起。粒细胞不规则形,6~10 μ m 左右,表面有伪足。各类细胞的数量及形态的结果与 Fujii^[11] 及文兴豪^[2] 的报道一致。

2.1.2 外周血单个核细胞的分离效果 用配制的 5 种不同比重的分离液分离日本七鳃鳗血细胞。从图 1 可见,只有当分离液比重为 1.092 以上时,在血浆与分离液交界处可以观察到单个核细胞层。经光镜检验,在分离液比重为 1.092 时,单个核细胞层中含大量的类淋巴细胞(75%~90%)、少部分的单核细胞(10%~25%)、极少部分的血栓细胞和个别的红细胞,分离液层中无任何细胞,粒细胞层紧贴在压积的红细胞层上,呈一层很薄的白膜。用比重低于 1.092 的分离液进行细胞分离,发现单个核细胞层不明显,有时看不到细胞层,镜检单个核细胞数量也很低。而用比重为 1.110 的分离液分离细胞时,发现单个核细胞层明显,镜下类淋巴细胞及粒细胞数量均增多,分离液中也有相当数量的粒细胞。由此可见,日本七鳃鳗类淋巴细胞的比重大约为 1.092 左右。

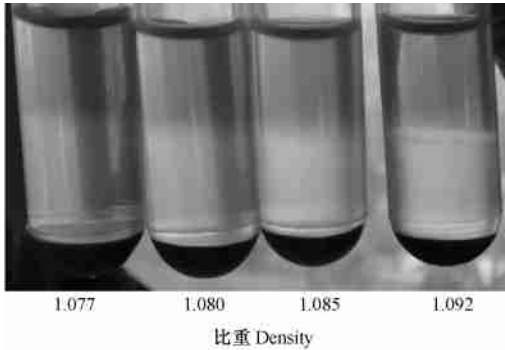


图 1 4 种不同比重分离液的分离效果

Fig. 1 The separation of lymphocyte-like cells by four different proportion separation liquid

箭头所指处为单个核细胞层。

Monocytes layer was shown by an arrow.

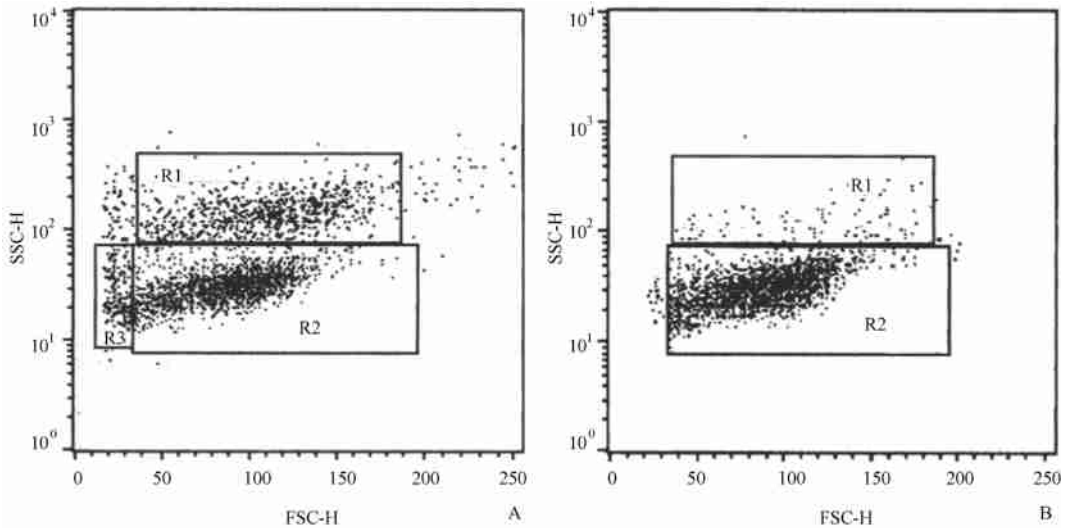


图 2 流式细胞仪分选纯化类淋巴细胞

Fig. 2 Lymphocyte-like cells sorted by FACS

A. 分选前; B. 分选后; R1: 粒细胞; R2: 类淋巴细胞; R3: 单核细胞。

A. Before separation; B. After separation; R1: Granulocytes; R2: Lymphocyte-like cells; R3: Monocytes.

圆形或椭圆形,直径约 7~9 μm;细胞表面有突起、无微绒毛,胞质较少,内含有少量颗粒和液泡;细胞核形状规则,直径约 6~7 μm,呈椭圆形或蚕豆形,位于细胞中央,核中异染色质块明显,靠近核膜或呈块状散在核中(图 3)。若在 10 万倍条件下观察,细胞质中可见到少量线粒体,体积较小,呈杆状或椭圆形,板层状嵴结构清晰,胞质内还可见粗面内质网片段、游离核

2.2 类淋巴细胞的流式细胞仪分选 为尽可能多地获取类淋巴细胞,采用比重为 1.110 的分离液分离得到的单个核细胞层细胞用流式细胞仪进行了分选实验。FSC 及 SSC 可将日本七鳃鳗单个核细胞大致分为 3 个区域(图 2:A);分选前的细胞中类淋巴细胞约占 64.46%,粒细胞约占 26.78%,单核细胞约占 8.11%。分选后,类淋巴细胞比例上升到大约 95.68%(图 2:B)。经多批次大量分选后的统计数字表明,采用本方法可从每毫升外周血中纯化得到 2.4 ×10⁶ 个类淋巴细胞。

2.3 类淋巴细胞的透射电镜观察 分选后的类淋巴细胞在 1 万倍透射电镜下观察,细胞为

糖体等。

2.4 类淋巴细胞异质性分析

2.4.1 类淋巴细胞的 ANAE 染色观察 日本七鳃鳗类淋巴细胞经 ANAE 法染色后,细胞核染成深绿色,细胞质为淡黄绿色,未见局限性棕红色或深棕色阳性颗粒。说明其类淋巴细胞呈 ANAE 阴性反应(图 4)。

2.4.2 类淋巴细胞的体外转化 日本七鳃鳗

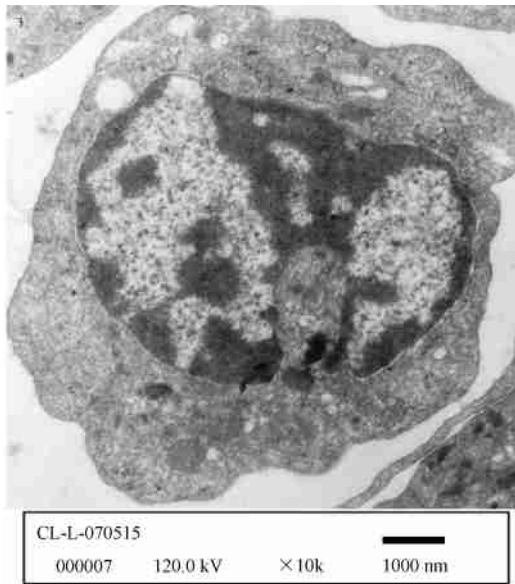


图3 日本七鳃鳗类淋巴细胞透射电镜照片 ($\times 10\ 000$)

Fig. 3 The lymphocyte-like cell of *L. japonica* under transmission electron microscope

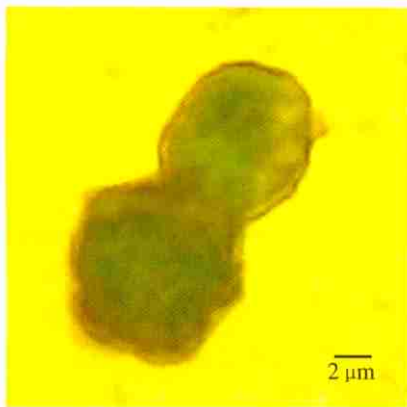


图4 日本七鳃鳗类淋巴细胞的 ANAE 染色

Fig. 4 The cell heterogeneity of the lymphocyte-like cells as revealed by ANAE

100 \times 油镜下观察。Under 100 \times oil lens.

类淋巴细胞经 PHA、SPA 刺激培养后用 MTT 法检测,结果用刺激指数 SI 表示(表 1)。经双样本 t -检验分析,各浓度组的刺激指数与对照组的刺激指数之间无显著差异 (P 值均 > 0.05)。说明 PHA 与 SPA 在日本七鳃鳗类淋巴细胞的转化增殖中作用不显著。

表 1 不同浓度 PHA、SPA 刺激下类淋巴细胞的刺激指数

Table 1 The different SI values of lymphocyte-like cells stimulated by PHA and SPA

PHA ($\mu\text{g/ml}$)	刺激指数 SI	SPA ($\mu\text{g/ml}$)	刺激指数 SI
0	1.00 ± 0.018	0	1.00 ± 0.006
20	1.03 ± 0.014	20	1.00 ± 0.014
60	1.00 ± 0.009	60	0.97 ± 0.026
80	0.96 ± 0.032	80	0.94 ± 0.023
100	1.01 ± 0.022	100	0.97 ± 0.017
120	0.93 ± 0.030	120	1.04 ± 0.052
160	0.98 ± 0.009	160	1.10 ± 0.046
200	0.98 ± 0.012	200	1.04 ± 0.025
260	1.00 ± 0.012	260	0.99 ± 0.007

3 讨论

目前, Ficoll 密度梯度离心法是分离动物全血中单个核细胞的常用技术,但是,分离不同属动物的单个核细胞使用分离液的比重也多有不同,如人 (*Homo sapiens*) 以 1.077 为最佳,小鼠 (*Mus musculus*) 为 1.088,马 (*Equus caballus*) 为 1.090,鲤鱼为 1.085^[6],牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*) 为 1.083^[12]。比重为 1.113 的细胞分离液是市售的通用型细胞分离液,可根据使用说明添加不同量的磷酸缓冲液配制所需要的比重。本研究共配制 5 个比重梯度,发现比重为 1.092 的分离液可有效地分离日本七鳃鳗外周血单个核细胞,由此得出日本七鳃鳗类淋巴细胞的比重约为 1.092 左右。在研究中发现,其他因素如外周血液的黏稠度、离心力、离心时间、环境温度都会影响分离单个核细胞的数量和纯度。通过实验得出,用二倍 Hank's 液稀释的抗凝血比等倍稀释的抗凝血能减少红细胞的污染;室温下离心与 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心相比,也能减少红细胞的污染;延长离心时间可在不损失类淋巴细胞数量的基础上减少粒细胞的含量等等。此法分离的单个核细胞纯度高且数量大,可以满足进一步研究的需要。

流式细胞术的发展使得淋巴细胞亚群的鉴定和分离纯化增加了一个新的途径。流式细胞仪能够快速分析几万个细胞的 FSC、SSC 以及荧光信号等多个参数,具有快速、灵敏、准确及

重复性好等特点。利用流式细胞术分析血液标本中淋巴细胞亚群的方法很多,常用的有 CD45/SSC 设门和 FSC/SSC 设门法^[13]。FSC/SSC 设门方法由于没有考虑细胞的生物学特性,容易受到多种因素如细胞碎片、有核红细胞、单核细胞、小的粒细胞等的干扰,无法将具有相同光散射特性的淋巴细胞和干扰杂质准确区别开来^[14]。但是,由于七鳃鳗类淋巴细胞表达的类 CD45 基因与哺乳类的 CD45 同源性较低,人的 CD45 单克隆抗体不能识别七鳃鳗的类 CD45^[15],所以无法采用 CD45/SSC 设门这一更准确的方法来进行分选。在本分选实验中,由于优化了密度梯度离心分离方法,可以最大可能地去除细胞碎片、有核红细胞的污染。另外,采用降低待分选细胞浓度,定时调整分选参数以及准确划分类淋巴细胞区等措施,经 FSC/SSC 设门分选后,在光镜下染色计数只发现极少量单核细胞和粒细胞(小于 5%)。这个结果说明,FSC/SSC 设门法在本实验中基本满足分选的需要。

高等脊椎动物的淋巴细胞分为两大类群: T 细胞和 B 细胞。从系统发生看,最低等的脊椎动物(七鳃鳗)已经进化出现类淋巴细胞,然而其淋巴细胞的异质性如何?是否也存在 T、B 淋巴细胞两大类群?这都是免疫进化研究的重要问题,目前尚无定论。在哺乳动物中,T 细胞和 B 细胞的超微结构有细微的不同;T 细胞表面有突起但无微绒毛,而 B 细胞的表面有微绒毛^[16]。在日本七鳃鳗的类淋巴细胞亚群中,我们没有发现带有微绒毛的细胞类型。另外,其类淋巴细胞的 ANAE 染色结果也没有出现类似高等脊椎动物 T 细胞所具有的阳性棕红色反应颗粒。在细胞免疫学研究中,PHA 可作为 T 淋巴细胞的激活剂,促使 T 细胞应答转化后增殖;SPA 可以激活 B 细胞复制 DNA,但对 T 细胞不起作用,淋巴细胞的激活与否,使用 MIT 比色法来检测,方法简便可靠^[17,18]。因此,用 PHA 与 SPA 做刺激剂,可以分别激活 T、B 淋巴细胞的转化而分裂,借以检测淋巴细胞的异质性。日本七鳃鳗外周血类淋巴细胞经 PHA、SPA 刺

激后,SI 值均无显著提高,表明它们在日本七鳃鳗的类淋巴细胞转化中没有明显的作用。综合以上结果,我们认为在日本七鳃鳗的类淋巴细胞中可能尚未分化出 T、B 两大类群。当然,本实验仅仅从细胞形态和组织化学研究等侧面分析了七鳃鳗类淋巴细胞的异质性,最终的结论有待于进一步从分子水平进行证实。

参 考 文 献

- [1] Fujii T. Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. *J Morphol*, 1982, **173**(1): 87 ~ 100.
- [2] 文兴豪,张凯,李德雪等. 日本七鳃鳗血细胞显微及亚显微结构. *中国兽医学报*, 1998, **18**(6): 614 ~ 617.
- [3] Mayer W E, Uinuk-Ool T, Tichy H, et al. Isolation and characterization of lymphocyte-like cells from a lamprey. *PNAS*, 2002, **99**(22): 14 350 ~ 14 355.
- [4] Sakai D K. Separation of lymphocytes from the peripheral blood of rainbow trout goldfish. *Bull Jao Sci Fish*, 1981, **47**(10): 1 281 ~ 1 288.
- [5] 李亚南,王翼平,邵健忠. 草鱼淋巴细胞分离技术与形态的研究. *科技通报*, 1999, **15**(5): 333 ~ 336.
- [6] 丰培金,卢强,李蓬瑞等. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养. *中国兽医学报*, 2004, **24**(4): 369 ~ 371.
- [7] 孙修勤. 真鲷淋巴细胞的分离. *黄渤海海洋*, 2000, **18**(2): 47 ~ 50.
- [8] 冯怀亮. 哺乳动物胚胎工程. 长春: 吉林科学技术出版社, 1994, 306 ~ 319.
- [9] 张卓然. 实用细胞培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 25 ~ 27.
- [10] 朱辛为,李质馨,窦肇华等. T 淋巴细胞标记染色——ANAE 法的改进. *解剖学杂志*, 2003, **26**(3): 300 ~ 301.
- [11] 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 156 ~ 158.
- [12] 乌日琴,李军,张培军等. 牙鲆淋巴细胞转化反应和细胞免疫. *水生生物学报*, 2003, **27**(2): 127 ~ 131.
- [13] 张小彬,陆云飞,李三等. 流式细胞术分析乳腺癌前哨淋巴结淋巴细胞亚群的两种方法比较. *广西医科大学学报*, 2006, **23**(1): 18 ~ 21.
- [14] 王建中. 流式细胞术分析血液淋巴细胞免疫表型方法学研究. *中华检验医学杂志*, 2000, **23**(4): 203 ~ 206.
- [15] Uinuk-Ool T, Mayer W E, Sato A, et al. Lamprey lymphocyte-like cells express homologs of genes involved in immunologically relevant activities of mammalian lymphocytes. *PNAS*, 2002, **99**(22): 14 356 ~ 14 361.
- [16] 张媛,李玉谷,程树军等. 恒河猴胸腺的显微与超微结构观察. *华南农业大学学报*, 2002, **23**(1): 71 ~ 74.
- [17] 项蕾红,郑志忠,陈伟华等. 黑素细胞对同种异体淋巴细胞转化增殖的影响. *中国皮肤性病学期刊*, 2001, **15**(3): 149 ~ 150.
- [18] 耿波,梁利群,孙效文. 鲤鱼血淋巴细胞培养及染色体制备条件探索. *水产学杂志*, 2003, **16**(2): 32 ~ 34.