

- [2] O'Riordain, D. S., et al., 1995, *Arch. Surg.*, 130:165-170.
- [3] Zapata-Sirvent, R., et al., 1986, *Arch. Surg.*, 121: 116-122.
- [4] Ptak, W., et al., 1992, *Cell. Immunol.*, 144: 95-99.
- [5] Kobayashi, M., et al., 1993, *Immunol. Cell. Biol.*, 71: 181-188.
- [6] Suzuki, F., et al., 1988, *Immunol. Lett.*, 19: 33-38.
- [7] Decker, D., et al., 1996, *Surgery.*, 119 (3):316-322.
- [8] Miller-Graziano, C. L., et al., 1990, *J. Trauma.*, 30(S12):S86-S94.
- [9] Quattrocchi, K. B., et al., 1992, *J. Neurosurg.*, 77: 694-699.
- [10] 梁华平等, 1996, 解放军医学杂志, 21(1): 32-34.

EFFECTS OF SERUM, MACROPHAGES, SUPPRESSOR T CELLS FROM TRAUMATIZED MICE ON CONTRASUPPRESSOR T CELLS

LIANG Hua Ping Wang Zheng Guo ZHU Pei Fang GENG Bo LUO Yan XU Xiang
(Research Institute of Surgery, Daping Hospital,
Third Military Medical University, Chongqing 400042)

ABSTRACT

Changes of contrasuppressor T cells (Tcs) proportion and function in traumatized mice were studied, and effects of serum, macrophages, suppressor T cells (Ts) posttrauma on Tcs cells from normal mice were investigated. The results showed that the percentage of vicia villosa lectin (VVL) positive (VVL⁺) cells in splenocytes from traumatized mice was transiently decreased, while contrasuppressive activity of Tcs was obviously depressed in the cell culturing system measuring T lymphocytes transformation, interleukin 2 (IL-2) and IL-2 receptor (IL-2R). Serum, macrophages, Ts cells from traumatized mice in vitro showed suppressive effect on contrasuppressive activity of normal Tcs cells (in the cell culturing system measuring T lymphocytes transformation, IL-2 and IL-2R) at various degrees, serum from traumatized mice on day 4 in vivo had no significant effect on percentage of VVL⁺ cells in splenocytes from normal mice, but markedly decreased contrasuppressive activity of Tcs cells. It is suggested that trauma may result in changes of Tcs proportion and activity, and serum, macrophages, Ts posttrauma are involved in mediating the suppression of Tcs cells function.

Key words: Trauma Contrasuppressor T cells Serum Macrophages Suppressor T cells

This work was supported by national natural science foundation of China (No. 39400136).

实验技术

实验性肾炎鼠肾小球巨噬细胞的分离与鉴定*

蔡松敏 李惊子 王海燕

(北京医科大学第一医院、北京医科大学肾脏病研究所 北京 100034)

巨噬细胞(MΦ)在实验动物和人类增殖性肾小球肾炎发病过程中的作用正受到人们的重视^[1]。MΦ可产生中性蛋白酶、活性氧代谢产物

*本课题获国家自然科学基金(39070389)及卫生部“九五”攻关基金资助。

和一氧化氮,直接损伤肾小球固有细胞和基底膜。它还可以产生多种细胞因子如白介素(IL)-1、肿瘤坏死因子、转化生长因子等,参与肾小球炎症进程。由于M Φ 在正常肾小球内很少,体外不能分裂增殖,因此常取外周血或腹腔灌洗得到M Φ 进行研究,直接从炎症肾小球内提取M Φ 目前国内尚未开展。为进一步在细胞和分子水平研究M Φ 在肾小球炎症时的作用,我们根据M Φ 的特性,成功地分离了实验性肾炎时肾小球内浸润的M Φ 并加以鉴定。

材料和方法

一、动物模型

采用大鼠加速型抗基底膜(GBM)肾炎模型,参照Boyce等^[2]方法加以改进,其主要步骤简述如下:

1. 大鼠GBM的制备 提取SD大鼠GBM成分,磷酸盐缓冲液(PBS)调成10mg/ml。

2. 抗大鼠GBM血清的制备 采用SD大鼠GBM(10mg/次,1次/2周)加完全弗氏佐剂充分乳化后于雄性新西兰白兔(2.5kg)背部多点皮下注射,共5-8次,间接免疫荧光法测定其血清效价在1:64以上,含免IgG12.16g/L。最后一次免疫后第十天颈动脉放血取血清,56℃,30分钟灭活补体。

3. 大鼠加速型抗GBM肾炎模型制作 取雄性SD大鼠12只,体重150-200g,模型组和正常组各6只。将4mg正常免IgG(购自军事医学科学院,批号9704)与等量完全弗氏佐剂充分乳化后于模型组大鼠背部皮下多点注射进行预免疫,6天后尾静脉注射免抗鼠GBM血清(1ml/100g体重),置代谢笼留尿,分别于24及72小时用丽春红S法测24h尿蛋白量,以24h尿蛋白量>100mg/100克体重认为模型制作成功。部分肾组织切片进行HE、PASM-MASSON复染,冰冻切片进行羊抗免IgG(购自军事医学科学院,批号96011)免疫荧光检查、电镜检查。

二、肾小球M Φ 的分离

根据文献^[3]及我们的预实验,发现注射抗大鼠GBM血清后72h,肾小球内浸润的M Φ 达高峰,故在此时处死大鼠,无菌条件下取双肾,4℃分离肾小球。方法:将肾皮质先用柔力挤压通过140目(孔径0.11mm)的筛网,0.01mol/L,pH7.4的PBS冲洗,再通过80目

(0.216mm)的筛网,在220目(0.070mm)筛网上收集肾小球,3000rpm,5min离心,RPMI-1640液(以下简称1640液)洗3次,然后接种于含10%胎牛血清的1640液的培养瓶中,37℃,5%CO₂孵育箱中孵育20h。吸去肾小球,1640液洗3遍,0.05%胰蛋白酶消化贴壁细胞,使其游离,或用刮匙刮下细胞,收集的细胞用1640液再洗2次,细胞计数板进行细胞计数,调所需细胞浓度,进行有关实验。

三、肾小球M Φ 活性测定及鉴定

收集的细胞用0.02%台盼蓝拒染试验检测活性,非特异性脂酶染色及兔抗鼠CD68单克隆抗体(购自DAKO公司)细胞免疫化学法鉴定M Φ 纯度。细胞免疫化学法简述如下:将消毒处理过的盖玻片置于肾炎鼠肾小球的培养皿中一起孵育,巨噬细胞就贴壁于盖玻片上,4%多聚甲醛(预冷)固定,30分钟后PBS冲洗,3'×3次;甲醛-过氧化氢(0.3%)灭活内源性过氧化酶,15',PBS 3'×3次;2%BSA,37℃,30'封闭;抗CD68单克隆抗体(1:1000),37℃,1h,PBS 3'×3次;Biotin标记的羊抗兔抗体(1:200)37℃,30',PBS 3'×3次;Avidin-HRP(1:300)37℃,45',PBS 3'×3次;DAB显色5-10'清水冲洗;苏木素5-10'核染色,清水冲洗,盐酸-氨水脱色。将盖玻片反置于载玻片上,树脂封片。

结 果

一、动物模型

1. 注射抗GBM血清后,大鼠尿蛋白排出量见表1。

表1 肾炎鼠24h尿蛋白量(mg/24h)

	第24h	第72h
模型组 (n=6)	306.7±216.0*	690.3±194.0***
正常组 (n=6)	13.7±5.6	13.9±5.3

*P<0.05,**P<0.01与正常组比较,*P<0.01与第24小时比较。

2. 肾组织学检查 注射抗基底膜血清后72小时,肾脏大体标本见肾脏体积略增大,表面可见“蚤咬样”出血点。免疫荧光检查:模型组大鼠冰冻切片示免IgG荧光抗体沿肾小球毛细血管壁呈连续的线样沉积(图版图1)。光

镜检查示肾小球直径增大,细胞数(85.4 ± 12.5 个/每个肾小球)较正常(48.9 ± 11.5 个/每个肾小球)明显增多, $P < 0.05$,毛细血管内血栓形成(图版图 2)。电镜检查示肾小球毛细血管和间质内巨噬细胞浸润,基底膜损伤。

二、肾小球 M Φ 计数及鉴定

本实验条件下,每 6 只鼠可分离得到 $2-3 \times 10^6$ 个细胞。分离的巨噬细胞经台盼蓝染色鉴定其活性 $> 98\%$,非特异性脂酶染色示 M Φ 纯度 $> 95\%$,抗 CD68 单克隆抗体细胞免疫化学法阳性率 $> 95\%$ (图版图 3,4)。

讨 论

国内外许多学者发现肾小球内 M Φ 的浸润与肾脏疾病的严重程度和预后密切相关^[4,5],X 线照射或抗 M Φ 抗体消耗血循环中的 M Φ 可减轻实验动物蛋白尿,再输入 M Φ 又可加重肾损伤^[5]。病理切片免疫组化法可发现 M Φ 在肾小球内浸润的程度、部位与肾损伤的关系,都是通过间接的方法来证实。本实验成功地从炎症状态下的肾小球中分离浸润的 M Φ 并进行体外培养,观察 M Φ 的炎症效应,能比较直接反映 M Φ 在肾小球炎症中的作用,为将来临床更好地治疗肾小球疾病提供实验依据。

本实验所采用的动物模型,在抗 GBM 血清注射后 72 小时,肾小球内 M Φ 浸润达高峰,临床呈现大量蛋白尿,此时分离肾小球,使 M Φ 游离并贴壁,可得到最多数量的 M Φ ,便于进行

有关的细胞或分子生物学研究。

M Φ 具有多种功能特点,如吞噬功能,膜表面 Fc 受体,非特异性脂酶染色阳性等,以往都是利用这些特点鉴定 M Φ ^[5],但这些均非特异性,与其他白细胞有重叠现象。我们根据存在于 M Φ 的特异分化抗原 CD68,使用细胞免疫化学法,结合非特异性脂酶染色加以鉴定 M Φ ,使结果更为可靠。

摘 要

采用大鼠加速型抗基底膜肾炎模型。在注射抗 GBM 血清后 72 小时,肾炎鼠出现大量蛋白尿,取肾,使肾组织通过不同孔径的筛网收集肾小球,接种于塑料培养瓶温育 20 小时后,单个核细胞游离并贴壁。台盼蓝拒染试验检测其活性 $> 98\%$,抗 CD68 单抗细胞免疫化学法及非特异性脂酶染色鉴定 M Φ 纯度 $> 95\%$ 。

关键词:巨噬细胞 肾小球肾炎

参 考 文 献

- [1] Tesch, G.H. et al., 1997, *Nephrology*, 3: 501-507.
- [2] Boyce, N.W. et al., 1989, *Kidney Int.*, 35: 778-782.
- [3] Tipping, P.G. et al., 1988, *Immunol Cell Biol.*, 66: 147-151.
- [4] Nikolic-Paterson, D.J. et al., 1994 (Suppl), *Kidney Int.*, S79-S82.
- [5] Main, I.W. et al., 1992, *Semin Nephrol.*, 12: 395-407.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GLOMERULAR MACROPHAGES IN EXPERIMENTAL GLOMERULONEPHRITIS

CAI Song Min LI Jing Zi WANG Hai Yan
(First Teaching Hospital of Beijing Medical University,
Institute of Nephrology, Beijing Medical University)

ABSTRACT

Rat model of accelerated anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis was adopted. Seventy-

two hours after the injection with anti-GBM serum, extensive proteinuria was present and the rats' kidneys were removed. Glomeruli were isolated using a sterile sieving technique and cultured in plastic tissue culture flasks. The viability of adherent cells emigrated from glomeruli were over than 98%, the purity of Macrophages were over than 95% which identified by non-specific esterase staining and anti-CD68 monoclonal antibody cell immunohistochemistry.

Key words: Macrophages Glomerulonephritis

This work was granted by the National Natural Science Foundation of China (39070389) and the Ninth Five-Year Scientific and Technological Foundation of the Ministry of Public Health.

银染 PCR-SSCP 方法检测胃癌微小卫星 DNA 不稳定性

郭文 张亚历 邱红明 吴保平 张立力 周殿元
(第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 广州 510515)

微小卫星是散布于整个基因组内的 DNA 简单重复序列,虽然在个体之间存在明显的差异,但在遗传学上具有高度的保守性,突变率极低^[1]。近年来国外的研究资料显示,微小卫星 DNA 不稳定性 (Microsatellite instability, MIN) 与肿瘤及一些癌前病变密切相关^[2~7],因此,检测 MIN 在临床上具有重要意义。自从 1995 年 Schlegel 等报道了非同位素聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 为基础的 MIN 检测方法以来^[8],近两年该法已用于多种临床肿瘤的检测,国内尚无这方面的研究报告。本文以胃癌 MIN 检测为例,重点介绍 PCR 单链构象多态性 (Single-strand conformation polymorphisms, SSCP) 检测 MIN 方法。

材料与 方法

一、组织标本

取外科切除、石蜡包埋、经组织病理学确诊的胃癌组织标本 30 例,其中高、中分化腺癌 12 例,低分化腺癌 18 例。同时取每例病人的正常切缘粘膜组织作为对照。

二、主要试剂和仪器

试剂主要有:蛋白酶 K、dNTP、Tag 酶购自 Sangon (加拿大)公司,N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)为 SIGMA 产品,丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺为国产分析纯。所用的主要仪器为 Hema 480 PCR 扩增仪, Multiphor I 型多用电泳系统 (Pharmacia)。

三、组织消化

1. 取 5 μ m 石蜡组织切片 3-6 片于洁净的载玻片上;
2. 切片 60 $^{\circ}$ C 烘烤化蜡 30min 后,浸泡于盛有二甲苯的竖式缸中分别脱蜡 2 次,各 5min;
3. 依次置无水乙醇中浸泡 3 次,各 2-3min;
4. 取出晾干后,用保安刀片将组织刮入 1.5ml Eppendorf 管中,注意刮入肿瘤组织时,先于显微镜下定位,去除出血、坏死和非瘤组织;
5. 加入 50mmol/L Tris (pH8.0)-蛋白酶 K (200 μ g/ml) 消化液 100 μ l,短暂离心后,37 $^{\circ}$ C 温育过夜;
6. 煮沸 8min,10000rpm 离心 10min,取上清,置 -30 $^{\circ}$ C 保存。

四、PCR 扩增

选用四种热点部位的微小卫星 DNA 标志进行检测,包括第 2 号染色体 2 个标记位点 (D2S123 和 D2S119),第 5 号和 17 号染色体各 1 个标记位点 (分别为 D5S107 和 D17S250)。引物参照文献设计^[1],由加拿大真达基因公司协助合成,其序列如下:

D2S123①5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' 扩增片段为 197-227bp
②5'-GGACTTTCACCTATGGGAC-3'
D5S107①5' GATCCACTTTAACCCAAATAC-3' 扩增片段为 133-155bp
②5' GGCATCAACTTGAACAGCAT-3'