

一种微量巨噬细胞吞噬功能定量检测技术

程丽萍 陈广洁 朱云凤

(上海第二医科大学免疫教研组 200025)

单核巨噬细胞在机体免疫系统中起着相当重要的作用,其吞噬机能是反映单核巨噬细胞功能的主要指标之一。本文以小鼠腹腔来源巨噬细胞(PEC-M ϕ)培养于96孔培养板中,在微量板上直接用联苯胺氧化法^[1]定量测定M ϕ 吞噬抗体包被羊红细胞(EA)后胞内释放出的血红蛋白(Hb)量^[2],以反映M ϕ 吞噬功能。

材料与 方法

一、实验动物

Balb/c小鼠,由上海第二医科大学纯种动物房提供。

二、细胞培养液

采用含10%小牛血清的DMEM(SIGMA)培养液,小牛血清(NBS)由上海第二医科大学科技中心实验二室提供。

三、酶联免疫检测仪

国营华东电子管厂,配520 nm波长滤光片。

四、M ϕ 的收集及培养

小鼠腹腔内注入新鲜配制约1%淀粉液1 ml,48小时后颈椎脱臼处死,腹腔内注入DMEM培养液,轻摇后抽出灌洗液,重复一次,合并腹腔洗液,离心洗涤后即得富含M ϕ 的腹腔细胞。用含10%NBS的DMEM培养液调整细胞数为 0.8×10^5 个/ml,以每孔100 μ l加于96孔培养板中培养48小时。

五、调节因子对M ϕ 的作用

为检测不同条件下M ϕ 吞噬能力的变化,在吞噬试验前不同时间加入免疫调节因子,本实验采用人精液免疫抑制剂SF 1^[3-6](由本实验室提取)作为调节因子。

六、M ϕ 吞噬试验

1. SRBC(E)及抗体包被的SRBC(EA)的制备:新鲜SRBC洗涤后用生理盐水配成5% V/V的悬液,加入一定稀释度等量的溶血素(Ab)(上海生物制品所

生产)混匀,37℃水浴30分钟,取出后用生理盐水洗涤,恢复原体积,即成2.5% V/V的EA。

2. 吞噬试验:从CO₂培养箱内取出培养M ϕ 的96孔板,弃上清后,每孔加入2.5% V/V的EA,加盖后置于37℃水浴30分钟。洗去游离SRBC,并用0.45% NaCl低渗去除剩余的或粘附M ϕ 表面的SRBC。用生理盐水洗净后,每孔加入1%冰醋酸和0.1% SDS混合液50 μ l。镜下可见M ϕ 逐渐破坏,胞内SRBC相继溶胀,Hb释放于周围溶液中。

七、联苯胺氧化试验

于96孔板中每孔直接加入50 μ l 1%联苯胺冰醋酸和50 μ l 1%过氧化氢溶液混匀,置室温5—10分钟,待显色反应从蓝绿色转为稳定棕色后,加入10%冰醋酸50 μ l。将96孔板直接放在酶标检测仪上,以520 nm波长比色,得一吸光度A值,其A值反映了M ϕ 吞噬EA所释放Hb的量。

结 果

一、标准曲线

将SRBC洗涤后精确计数,然后倍比稀释。从各稀释度吸50 μ l放入96孔培养板中作联苯胺氧化试验,于520 nm比色测定。以SRBC数为横坐标,A 520 nm值为纵坐标,可制得一条标准曲线(见图1)。实验证明:SRBC数和A 520 nm值(Hb)成正比。

二、PEC-M ϕ 对不同稀释度Ab制备的EA吞噬能力变化

在吞噬试验中,EA的制备是以Ab作为调理素以促进M ϕ 对异物的吞噬,采用不同稀释度Ab制备EA,即反映不同剂量调理素的作用。实验证明,用微量法能很好反映M ϕ 对SRBC的吞噬随包被Ab的减少而降低(表1)。

三、SF 1对M ϕ 吞噬能力的影响

于吞噬试验前3小时加入不同剂量SF 1,

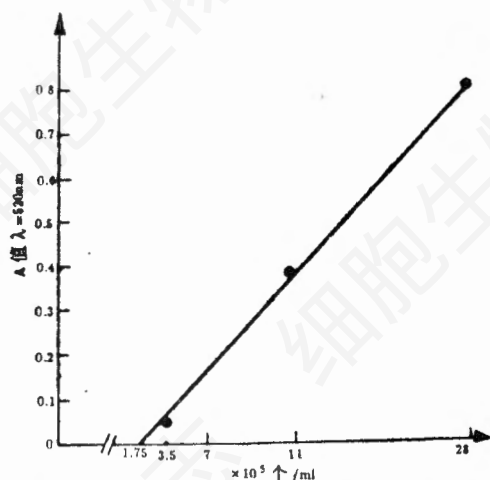


图 SRBC 数与 A 520 nm 吸光值之间的关系

表 1 PEC-M ϕ 对不同稀释度 Ab 制备 EA 的吞噬变化

	制备 EA 的 Ab 稀释度			
	1:2500	1:3000	1:4000	1:5000
联苯胺试	1.13 $\pm$	0.69 $\pm$	0.528 $\pm$	0.34 $\pm$
验 A 值	0.16	0.08	0.23	0.14

表 2 SF₁ 对 PEC-M ϕ 吞噬的影响 (A 值)

	SF ₁ 的不同剂量				
	对照	20 μ l	30 μ l	40 μ l	50 μ l
联苯胺试	0.69 $\pm$	0.47 $\pm$	0.35 $\pm$	0.26 $\pm$	0.17 $\pm$
验 A 值	0.08	0.07	0.19	0.04	0.07

注 吞噬 AE 中的 A 作 1:3000 稀释

从联苯胺氧化试验后的吸光度 A 值变化可见 SF 1 具有明显的抑制作用^[7,8], 并随 SF 1 量的增加, 吸光度 A 值逐渐下降(表 2)。

讨 论

单核巨噬细胞吞噬功能检测常以显微镜下目测法计数吞噬细菌或 RBC 数^[9], 或用同位素标记吞噬物后, 再作同位素测试^[10]。前者客观性差且操作费时, 而后者又需一定的仪器设备, 一般实验室不易开展。我们采用联苯胺氧化法是根据 CROSS-FURTH 法的原理改进而成。由于 Hb 具有过氧化物酶的作用, 它

可使 H₂O₂ 分解产生新生态氧, 在酸性溶液中使联苯胺氧化成蓝绿色衍生物, 最后转成稳定的棕色。根据颜色变化可用分光光度计($\lambda = 520 \text{ nm}$)比色定量^[1]。我们将吞噬试验后的 M ϕ 用酸和 SDS 处理, 使吞噬细胞内的 SRBC 相继溶胀释放 Hb, 即可进行联苯胺氧化法而取得吸光度值, 其值高低可作为 M ϕ 吞噬功能的定量指标。此法稳定, 简便, 客观, 细胞用量少, 并且联苯胺氧化法直接在 96 孔板上进行, 直接在国产酶标仪上比色测定, 简化了操作, 减少了实验误差。由于孔数明显增多, 所以在同一块板上可观察多种因子对 M ϕ 的作用, 使复杂而不易稳定的细胞实验同步化。但是细胞培养受到许多因素影响, 每批 M ϕ 吞噬功能可能存在差异, 以及计数上可能存在的误差, 所以本实验需设自身对照。

本技术利用诱导后 PEC-M ϕ 作为细胞来源, 操作简便, 不需特殊条件, 易为一般实验室所接受, 为免疫调节剂的体外实验研究提供了较为稳定而方便的方法。

摘 要

利用 96 孔细胞培养板作小鼠腹腔 M ϕ 培养, 观察其对抗体包被羊红细胞 (EA) 的吞噬能力, 并以冰醋酸和 SDS 混合液破坏 M ϕ , 同时使胞内红细胞溶胀, 释放 Hb, 然后在微量板上直接作联苯胺氧化试验, 在国产酶标仪上以 520 nm 波长比色。其吸光值高低可作为 M ϕ 吞噬功能的定量指标。用该检测系统可同时进行各种免疫调节因子的功能研究, 是一个较理想的体外实验技术。

参 考 文 献

- [1] 湖南医学院第二附属医院检验科, 1983, 临床生化检验, pp. 201—203.
- [2] 朱云凤等, 1990, 上海第二医科大学学报, 10: 333.
- [3] 朱炳法等, 1988, 上海免疫学杂志, pp. 209.
- [4] 程丽萍等, 1991, 生殖与避孕, 11: 19—22.

- [5] 程丽萍等, 1992, 生殖与避孕, 12: 50—53.
[6] 朱炳法等, 1988, 中国免疫学杂志, 4: 194.
[7] 朱云凤等, 1991, 中国免疫学杂志, 7: 114.
[8] James K, et al., 1984, Immunology Today, 5: 357.

- [9] Blackstock R, et al., 1988, Cellular Immunol., 114: 174.
[10] Fisher DG, et al., 1981, Manual of methodology, pp. 259—269.

人生长素基因工程细胞 C-4 系的无血清培养液培养*

李云宝 孙燮均 姚曾序

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

C-4 工程细胞是整合有人生长素(hGH)和小鼠金属硫蛋白(mMT)启动子融合基因的二氢叶酸还原酶缺陷型 CHO 细胞(CHO dhfr⁻), 在重金属镉离子或锌离子的作用下, 能够表达并分泌 hGH。虽然 hGH 的大肠杆菌表达系统的研究进展很快, 且已用于规模生产, 但此工程细胞仍是一个用以探讨哺乳动物细胞表达系统一些基本问题的较理想模型, 而在无血清培养条件下, 则可以排除细胞周围环境中一些未知因素的干扰, 有利于实验结果的分析。

材料和方法

一、工程细胞 C-4 系的培养

该细胞系是由中国科学院动物研究所沈孝宙教授实验室筛选和建立的。按照该实验室方法用氯化镉(0.25 μmol)作为基因表达的诱导剂。最初使用的培养液为 RPMI 1640 加 10% 新生小牛血清(NCS)。在降低培养液血清含量过程中, 基础培养基换用 IMDM(GIBCO 产品)。细胞在 5% CO₂ 培养箱中培养, 温度 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 一般每周传代一次。

二、无血清培养液 CBSF-II 的成分

基础培养为 IMDM(GIBCO 产品), 添加运铁蛋白 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 胰岛素 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 乙醇胺 5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ (以上均 Sigma 产品), 硒酸 0.1 nmol/ml(分析纯, 本所细胞工程组赠予)。另外增添脯氨酸 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (第二军医大学药系产品), 谷氨酰胺 0.3 mg/ml(GIBCO 产品), Hepes 3.6 mg/ml(GIBCO 产品)。培养液的配制使用超纯水(17 megohm-cm), 配制好的无血清培养液为 pH 7.2。

三、hGH 的检测

采用 ABC(Avidin-Biotin-peroxidase)方法, 在 96 孔培养板上进行。hGH 抗体(本所基因工程组制备)的包被浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 生物素(Sigma 产品)化 hGH 抗体(本所基因工程组制备)浓度为 15 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, streptavidin peroxidase(Sigma 产品)的工作稀释度为 1:1000, 反应底物用四甲基联苯胺(上海医科大学生化教研室产制), 以 2 mol H₂SO₄ 终止反应。检测用酶联免疫检测仪(华东电子管厂产品), 其他如常规。每次测定 C-4 细胞培养液中 hGH 含量时, 均同时用纯化的不同浓度的 hGH(本所基因工程组制备)作为阳性对照, 绘制定量反应曲线, 用于测定条件培养液中 hGH 含量的标准。

结 果

一、细胞从含血清培养液至无血清培养液的适应过程

采用逐渐降低血清含量的方法, 整个适应过程见图 1。在培养液血清含量由 20% 降至 1% 和由 0.5% 降到 0.2% 时, C-4 细胞生长均见停滞。此时在培养液中添加一定量添加成份, 嗣后又将培养基 RPMI 1640 换为 IMDM, 两次克服了细胞生长停滞现象。在这种无血清培养液(CBSF-II)中能够长期传代。呈悬浮生长的 C-4 细胞(图 1), 经液氮冻存后复苏, 可以直接在 CBSF-II 中培养传代, 不再需要适应过

* 本文系中国科学院上海细胞生物学研究所郭礼和教授负责的“七五”国家重点科技项目中的部分工作, 得到该项目基金的资助。