

用碘六醇分离啮齿动物腹腔渗出细胞的方法

方 政

(南通医学院寄生虫学教研室 南通市 226001)

摘要 碘六醇 (Iohexol) 是一种新型的无离子含碘化合物。它能溶解于水、惰性强,无细胞毒性,且能高压消毒,为一种理想的细胞分离液。本文描述了利用等渗的碘六醇不连续密度梯度液从 Wistar 大鼠和 BALB/C 小鼠腹腔渗出细胞中分离出纯度较高的中性粒细胞(分别为 97% 和 98%);嗜酸性粒细胞(97% 和 83%);巨噬细胞(98% 和 97%)。细胞活性均在 96% 以上。是一种较好的细胞分离方法。

关键词 碘六醇,腹腔渗出细胞,中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,巨噬细胞

要分离提纯各种形态结构完整、具有活力的细胞需要有一种理想的细胞分离液。由于碘六醇具有惰性强、粘滞性小、无细胞毒性、分离范围广等特点^[1-4],性能优于目前使用的其他细胞分离液,故受到国际上许多学者的重视。本文试用碘六醇不连续密度梯度液从啮齿动物腹腔渗出细胞 (PEC) 中分离中性粒细胞 (Neu)、嗜酸性粒细胞 (Eos) 和巨噬细胞 (M ϕ),取得了较满意的效果。

1 材料与方 法

1.1 培养液和分离液

1.1.1 TGD 含 0.1% 明胶,0.003% 脱氧核糖酸(进口分装)的台氏液。

1.1.2 MFD 含 10% 小牛血清(中科院上海细胞生物研究所),0.003% 脱氧核糖核酶的 基础培养基 (MEM, J.R. Scientific) 培养液。

1.1.3 MEM 每毫升含 10 单位肝素的基础培养基培养液。

以上培养液每 100 毫升加 1000 单位青霉素、10000 单位链霉素。0.22 微米滤膜过滤除菌,4℃ 贮存备用。

1.1.4 碘六醇 [5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-tri-iodo-N,N'-bis(2,3-dihy-

droxypropyl) isophthalamide] (Nycomed, Oslo, Norway) 用 TGD 配制成各梯度液: 10% (密度=1.059), 12% (1.069), 14% (1.080), 16% (1.091), 18% (1.102), 20% (1.113) 22% (1.124), 24% (1.134)。各密度用比重计测量 (20℃ 时)。

1.2 PEC 的提取

1.2.1 富含 Neu 和 M ϕ 的 PEC 取正常 BALB/C 小鼠和 Wistar 大鼠,每只腹腔分别注射酪蛋白。18 小时和 48 小时后鼠腹腔分别注入含肝素的 MEM,取灌洗液离心,沉淀用 MFD 洗数次后制成细胞悬液。

1.2.2 富含 Eos 的 PEC 用液体石蜡分别注入小鼠和大鼠腹腔,48 小时后取 PEC。另取小鼠人工感染日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*),42 天后腹腔注射豚蛋白胨,再过 48 小时取细胞悬液,方法同上。

1.3 各种细胞的分离与测定 用不同梯度的碘六醇稀释液 2 毫升依次从高密度到低密度缓缓注入 15 毫升离心管。上加 2 毫升经过洗涤的细胞悬液,3000rpm,45 分钟离心。然后用细长嘴吸管小心吸取各界面细胞悬液,离心去上清,取沉淀 MFD 洗 2 次后用瑞氏染液和 May-Grünwald 染液分别染色,作分类计数。同时用

表1 碘六醇不连续密度梯度液分离两种鼠腹腔渗出细胞

| 分离液界面 | 细胞来源 | Lym(%)* | Mφ(%) | Eos(%) | Neu(%) |
|--------|------------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| 10/12% | BALB/C | 3±1** | 97±1 | 0 | 0 |
| 12/14% | Wistar BALB/C | 2±1 4±1 | 98±1 96±2 | 0 0 | 0 0 |
| 16/18% | Wistar BALB/C | 0 0 | 62±4 3±1 | 30±3 83±4 | 8±2 14±2 |
| 18/20% | Wistar BALB/C | 0 0 | 1±1 1±1 | 97±1 1±1 | 2±1 98±1 |
| 20/22% | Wistar BALB/C | 0 0 | 1±1 2±1 | 3±1 5±2 | 96±2 93±2 |
| 22/24% | Wistar | 0 | 0 | 3±1 | 97±1 |

* Lym: 淋巴细胞; ** X + S.E. 重复四次。

台盼蓝染色作细胞活性测定。

2 结果

大小鼠腹腔注射酪蛋白 18 小时后 PEC 中均含较多的 Neu, 而 48 小时后则富含 Mφ。注射液体石蜡及感染血吸虫后可诱导产生较多的 Eos。(结果未列出)。

用不同密度梯度分离液分离鼠 PEC 结果(见表 1)。经过多次的实验发现小鼠的 Mφ 主要在 10/12% 和 12/14% 界面,大鼠 Mφ 则存在于 12/14% 界面。细胞活性分别可达 97% 和 98%;在 16/18% 和 18/20% 界面分别可得到较纯的小鼠和大鼠 Eos, 细胞活性各自为 96% 和 99%;而 Neu, 小鼠主要在 18/20% 和 20/22% 界面、大鼠在 20/22% 和 22/24% 界面, 细胞活性为 99% 和 98%。

3 讨论

为了获取较多的鼠腹腔渗出细胞,许多学者采用不同的方法来刺激动物^[5-9]。本文主要通过鼠腹腔注射诱导物——酪蛋白和液体石蜡刺激产生了较多的 Neu、Mφ 和 Eos。这种方法与寄生虫感染的刺激方法相比,具有操作方便、周期短、无感染危险性、效果好等优点。本实验中我们发现用注射液体石蜡和血吸虫感染小鼠的方式都能获取大量的 Eos, 它们之间无

显著性差异。

用碘六醇不连续密度梯度分离液分离细胞的结果表明 Wistar 大鼠和 BALB/C 小鼠三种细胞的密度大小排列为 Neu > Eos > Mφ。这和 Mehta 等^[9]用甲泛葡胺(Metrizamide)分离大鼠 PEC 以及 Raballino^[10] 等用 Ficoll-Hypaque 分离小鼠三种细胞时, Eos 密度大于 Neu 的结果不一致。但 Sanderson^[11] 等同样用甲泛葡胺分离细胞时发现人的 Eos 密度比 Neu 高;而在大鼠则相反, Neu 密度高于 Eos。James^[12] 等实验表明啮齿动物尤其是小鼠的 Eos 其颗粒比人的 Eos 要小和少,故密度较低。Watt^[13] 和 Burgess^[14] 等用 Percoll 分离小鼠细胞也发现小鼠的 Eos 密度低于 Neu。我们的实验结果也证明了这一点。

实验中我们还发现用碘六醇可以从啮齿动物 PEC 中分离出纯度高的各种细胞,但其中小鼠的 Eos 平均纯度只达到 83%,这可能与鼠龄以及分离前 PEC 中的 Eos 含量有关^[12]。如果 PEC 分离前预先进行初步提纯或改善碘六醇配制液和增加梯度可能会提高其分离纯度,这些还待于今后的改进。

用碘六醇分离各类细胞操作简便、细胞纯度高、活力强,适用于各种细胞免疫学和形态学的研究。相信今后这种新型的细胞分离方法在我国将会不断的得到推广和应用。

致谢 本文蒙徐亚雄副教授审阅及张弘、施健等老师多方帮助,深表谢意。

参 考 文 献

- 1 Ford, T. C. & D. Rickwood The separation of cell on iso-osmotic Nycodenz gradients. *Biochem. Soc. Trans.*, 1983, **11**: 273.
- 2 Rickwood, D., T. Ford & J. Graham Nycodenz: A new nonionic iodinated gradient medium. *Anal. Biochem.*, 1982, **123**: 23—31.
- 3 Kaneko S. S. Oshio, T. Kobayashi et al. Buoyancy and sedimentation of human X- and Y-bearing sperm. *Arch. Androl.*, 1987, **19**(3): 211—215.
- 4 Rickwood D. in *Centrifugation(2nd Ed): a practical approach* (Rickwood, D. Ed), 1984, 27—35. IRL Press, Oxford.
- 5 粕谷志郎,大友弘士。アタ回虫卵を使用したマウス好酸球の採取法ならびにその住血吸虫 schistosomula への付着,障害作用。寄生虫学杂志,1982,**31**: 461—469。
- 6 Chandrashekar R., U. R. Rao, D. Subrahmanyam et al. Immune reactions to exsheathed microfilariae of *Lisomosoides carinii*. *Ind. J. Med. Res.*, 1985, **81**: 260—268.
- 7 Lopez A. F., M. Strath & C.J. Sanderson IgG and complement receptors on purified mouse eosinophils and neutrophils. *Immunology*, 1981, **43**: 779—786.
- 8 Yamaguchi Y., Y. Hayashi, Y. Sugama et al. Highly purified murine interleukin 5(IL-5) stimulates Eos function and prolongs *in vitro* survival IL-5 as an Eosinophil chemotactic factor. *J. Exp. Med.*, 1988, **167**: 1737—1742.
- 9 Mehta(K., R. K. Sindhu, D. Subrahmanyam et al. IgE-dependent cellular adhesion and cytotoxicity to *Lisomosoides carinii* microfilariae-nature of effector cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, **48**: 477—484.
- 10 Rabellino E. M., G. D. Ross, H. T. K. Trang et al. Membrane receptors of mouse leukocytes II. sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation. *J. Exp. Med.*, 1978, **147**: 434—445.
- 11 Sanderson C. J. & T. A. Thomas A comparison of the cytotoxic activity of eosinophils and other cells by chromium release and time lapse microcinematography. *Immunology*, 1978, **34**: 771—780.
- 12 James S. L., R. W. Leid & A. Sher Purification of rodent eosinophils on discontinuous metrizamide gradients. *J. Immunol. Methods*, 1979, **27**: 373—382.
- 13 Watt S. M., A.W. Burgess & D. Metcalf Isolation and surface labeling of murine polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell. Physiol.*, 1979, **100**: 1—22.
- 14 Burgess A. W., K. M. Cruise, G. F. Mitchell et al. Preparation and surface labeling of murine eosinophils. *Exp. Hematol.*, 1980, **8**: 108—119.