

分光光度定量溶血法检测大鼠脾脏 抗体生成细胞活性

冉新泽 阎永堂 魏书庆

(第三军医大学防原医学教研室, 重庆 630038)

摘要 本文建立了分光光度定量溶血法检测大鼠脾抗体生成细胞活性的实验手段, 并对其影响因素进行了探讨。大鼠脾细胞经 DU-7HS 分光光度仪自动扫描, 最佳吸收波长为 413nm, 且随免疫脾细胞量的增加 ($2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$), 吸光度值相应提高, 呈正相关 ($r = 0.997$); 补体浓度 (1:5—1:40 稀释) 呈负相关 ($r = -0.982$); 绵羊红细胞浓度则随加入量的增加 (0.2%—1.0%), 介导溶血反应明显上升。此方法简便准确、灵敏度高、重现性好, 可作为免疫功能检测的一个重要指标。

Jerne 等 1963 年首先报道了空斑形成细胞 (Plaque Forming Cell, PFC) 的测定技术^[5], 此后被广泛应用于对机体辐射免疫效应^[3]和分析免疫调节机制^[6]的研究。但由于方法较繁、观察较困难、实验重复性不甚理想, 因而致力于该技术方法学的改进, 已成为一个十分重要的研究课题。近年来, 一些学者创立了用分光光度法来测定小鼠抗体细胞形成反应的技术^[4,7], 但尚未见有大鼠的资料报道。由于大鼠是常用的实验对象之一, 我们在小鼠测定方法的基础上^[4]进行改良, 于 1991 年 1—10 月建立了一个较为满意的大鼠脾脏抗体细胞形成反应定量溶血的分光光度测定方法 (Spectro-photometric quan-

titation of haemolysis, QHS), 并于 1992 年 2—4 月做了补充实验。现报告如下。

材料和方法

(一) **动物** 大鼠, 本校实验动物所饲养繁殖的封闭群 Wistar 品系, 15—16 周龄, 体重 180—220g。豚鼠, 350—400g, 雄性, 作为新鲜血清补体的来源。

(二) **细胞保存液** 葡萄糖 2.05g, 柠檬酸三钠 0.80g, 氯化钠 0.42g, 双蒸水加至 100.00ml。上述成份混匀后于 8 磅压力下, 经 15 分灭菌, 4℃ 冰箱保存备用。

(三) **绵羊红细胞悬液制备** 无菌抽取健康

绵羊颈静脉血 5ml, 置于含玻璃珠的三角瓶中摆动去除纤维蛋白后, 加入前述细胞保存液 10ml, 摇匀后置 4℃ 冰箱内保存, 保存期限一般为 2 周。

(四) 动物免疫 取绵羊红细胞悬液 5ml, 用 0.15mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 洗涤 3 次 (每次 2000r/分, 5 分, 弃上清), 最后用生理盐水 5ml 稀释后进行细胞计数, 调整细胞浓度为 2×10^9 /ml (或按所要求配制)。实验前 4 天每只大鼠腹腔注射 0.5ml (即 1×10^9 红细胞) 进行免疫。另设未用绵羊红细胞免疫的正常鼠作溶血对照组。

(五) 补体的制备 实验当天用 1% 戊巴比妥钠溶液按 25mg/kg 麻醉豚鼠, 抽取心血 5ml, 置 4℃ 冰箱 60 分后, 2500r/分离心 5 分, 分离出血清, 取 0.9ml 血清加 0.1ml 浓缩绵羊红细胞混匀, 放 4℃ 冰箱 60 分以上再离心取上清液, 用 Hank's 溶液做 1:20 稀释, 或根据要求稀释成不同比例。

般选用 5×10^6 /ml 作为脾细胞悬液终浓度。

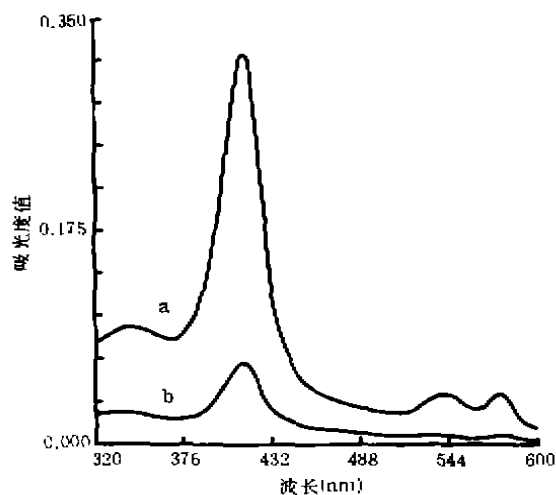


图 1 大鼠脾细胞的吸收光谱

(图中线 a 为致敏组, 线 b 为未致敏组, 适用下图)

(六) 脾细胞悬液制备 大鼠经绵羊红细胞免疫 4 天后断颈活杀, 取出脾脏放入含有 5ml 磷酸盐缓冲液的匀浆器内匀浆, 经 200 目尼龙网或 4 号针头滤过制成单细胞悬液并进行细胞计数, 最后按不同需要调整细胞浓度。本实验一

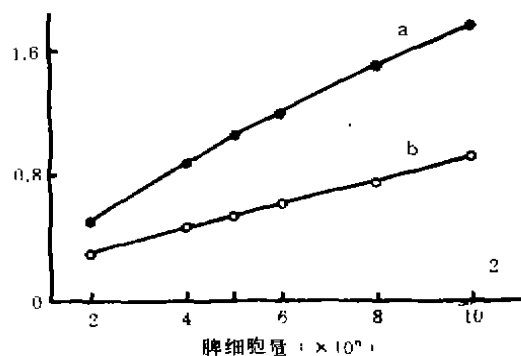


图 2 大鼠脾细胞量对介导溶血反应的影响

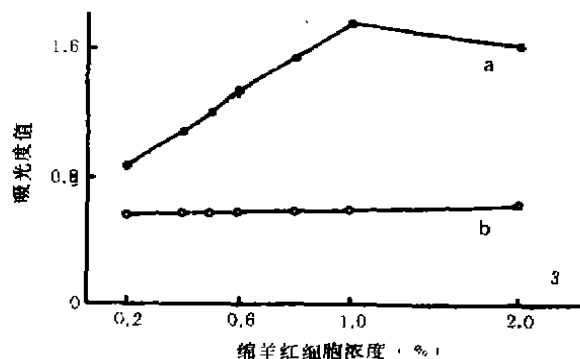


图 3 绵羊红细胞浓度对大鼠介导溶血反应的影响

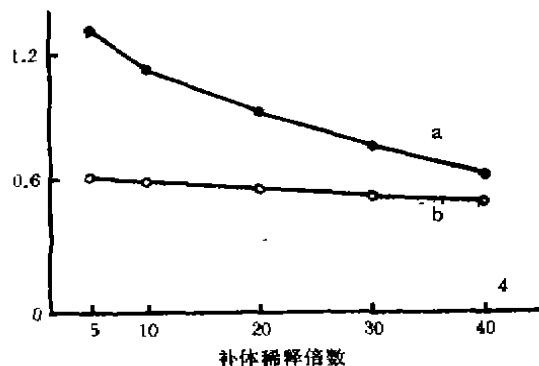


图 4 补体的不同稀释比例对大鼠介导溶血反应的影响

响

(七) QHS 反应操作程序 取脾细胞悬液、0.5% 绵羊红细胞悬液和 1:20 的补体溶液各 1.00ml, 混匀后作为实验管, 对照管不加补体而加 Hank's 溶液 1.00ml, 每个样品做 3 个复管。样品放置 37℃ 水浴中孵育 60 分, 终止后 2500r/分离心 5 分, 取上清液 1.00ml 加生理盐水 2.00ml 稀释后用 Beckman DU-7HS 紫外可

见光自动扫描分光光度仪测出吸光度(Absorbance, A)值(若A值偏高时可进一步稀释)。将实验管减去对照管测定值,以A值/5×10⁶脾细胞表示结果。最后由Hewlett Packard-2671型打印机打印荧屏显示的结果。

结 果

(一)波长的选择 实验用0.5%绵羊红细胞和5×10⁶脾细胞进行反应,在1:20补体的参与下,经DU-7HS紫外可见分光光度仪于波长320—600nm范围内进行自动扫描,得吸收光谱(见图1)。可见最佳吸收波长为413nm,但致敏组A值为0.3178,不致敏组仅0.0664。实验还见到,无论是实验样品、对照样品或以不加补体的对照管为对照直接测实验样品时,尽管A值各不相同,但最大吸收峰均在413nm处。

(二)免疫脾细胞量对QHS反应的影响(见图2)

图2显示,定量溶血的分光光度法可准确地反映出大鼠脾脏抗体生成细胞含量的变化。随着免疫脾细胞量的增加,介导溶血反应相应提高,且呈现出较好的线性关系变化。对4批实验结果进行统计学处理后发现,浓度(C)与吸光度(A)有高度相关性(r=0.997),其回归方程A=0.2498+0.1557C。而不致敏组QHS反

应值则显著降低。

(三)绵羊红细胞浓度对QHS反应的影响

绵羊红细胞悬液经0.15mol/L磷酸盐缓冲液洗涤3次按其压缩体积配成不同的浓度,与定量的大鼠脾脏抗体生成细胞(5×10⁶)及经稀释的补体(1:20)一起作用,其结果(见图3)表明,随着加入绵羊红细胞量的增加,介导溶血反应明显上升,但当加入量过多(2.0%)时,QHS反应反而受抑制。而与未经过绵羊红细胞免疫的大鼠脾细胞作用时,各浓度组QHS反应基本无变化。

(四)补体浓度对QHS反应的影响 不同补体浓度对大鼠脾抗体细胞介导溶血反应是不同的,其补体的含量直接影响着QHS反应(见图4),当补体稀释比例较小时,其A值较高,但血清耗费量大,故改为较大稀释比例(1:20以下)时,也达到较为满意的反应要求,经统计学处理,补体浓度与A值呈高度负相关(r=-0.982),回归方程A=1.3622-0.0192C。而未致敏的大鼠,补体的含量对QHS反应不明显。

(五)样品重现性的测定 将大鼠脾脏匀浆制成单细胞悬液,调细胞终浓度为5×10⁶/ml,然后分做36份样品,在0.5%绵羊红细胞和1:20的补体参与下进行反应,观察其QHS实验方法本身的稳定性及操作者自身的误差,结

表1 同一大鼠脾脏36份样品的A值比较

样品管号	波长413nm时各样品A值结果 (A/5×10 ⁶)					
1—6	0.3669	0.3650	0.3637	0.3647	0.3689	0.3686
7—12	0.3716	0.3719	0.3737	0.3730	0.3707	0.3713
15—18	0.3753	0.3723	0.3746	0.3723	0.3731	0.3723
19—24	0.3731	0.3693	0.3690	0.3733	0.3760	0.3649
25—30	0.3647	0.3650	0.3633	0.3677	0.3711	0.3704
31—36	0.3693	0.3609	0.3731	0.3730	0.3740	0.3730
平均值±标准差:	0.3700±0.0038		变异系数:1.0270%			

果(见表1)。36份样品的平均值±标准差为0.3700±0.0038,变异系数仅1.0270%,若以

2倍标准误计算波动范围,A值为0.3688—0.3712,从全距看,A值为0.3609—0.3760,波

动仅 0.0151, 误差甚微。

讨 论

任何物质都有各自的吸收区域, 为了获得最大的灵敏度, 必须选择适宜的波长。本实验条件下, 大鼠脾细胞经 DU-7HS 紫外可见分光光度仪自动扫描显示最大吸收波长为 413nm (见图 1), 这和 Simpson^[7] 及钱氏^[2] 报道的小鼠结果基本一致, 而与高氏^[1] 报道的方法 (460nm 下比色) 有所不同。

本实验测定大鼠脾抗体生成细胞介导溶血反应中绵羊红细胞溶解后释放血红蛋白的量, 在 413nm 波长时测定血红蛋白的 A 值。结果发现, 随着免疫脾细胞量的增加 ($2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$), 介导溶血反应也相应提高 (但未用绵羊红细胞致敏的脾细胞介导溶血反应明显低于致敏组), 同时有较好的相关性变化 (见图 2), 且方法简便, 易于掌握, 加上用材料较少, 指标比较客观, 克服了 PFC 技术测定样品数量受限以及用肉眼观察等人为因素影响的不足, 重现性较好 (见表 1)。因此, 是检测免疫功能, 尤其在机体遭受放射损伤或创伤后免疫功能极度低下时一个较为理想的指标。

关于绵羊红细胞量的问题, 有些作者^[1,2] 选用 0.2% 的低浓度, 而我们用 0.5% 压缩体积的绵羊红细胞, 与鞠氏的报道^[4] 是一致的。作者认为, 绵羊红细胞用量过少, 不能反映出抗体生成细胞的最大吸收值, 但用量太多时, 不仅非特异性溶血干扰测定结果, 而且抗原抗体比例也将发生紊乱, 反而使反应能力降低; 而未经绵羊红细胞免疫者, 对 QHS 基本无反应 (图 3)。对于补体在大鼠脾抗体生成细胞介导溶血反应中的作用, 也是至关重要的。补体的含量直接影响着

QHS 反应的效果 (图 4)。作者曾将补体从 1:5 稀释到 1:160 后发现, 补体浓度高时, 溶血反应虽然较好, 但补体本身的 A 值也较高, 加上血清耗量大, 不太经济, 而浓度过低时, 反应又不明显。有作者报道用 1:10 补体^[2], 也有的用 1:30 补体^[4], 我们选用 1:20 稀释补体时, 同样达到了 QHS 反应的目的。但是, 补体和未致敏鼠脾细胞作用时, QHS 反应不明显。此外, 我们选用洗涤干净的绵羊红细胞预先吸附补体 (1:9), 以消除实验中补体血清的非特异性溶血, 从而使 A 值更加趋于准确。

参 考 文 献

- 1 高美华 曲云英 邱世翠 1989 液氮冷冻疗法对小白鼠抗体形成细胞的影响 上海免疫学杂志 9(1):21-22.
- 2 钱伯初 臧星星 戚宝凤等 1987 油菜蜂花粉及其内酯提取物对免疫增强作用的研究 营养学报 9(3):215-220.
- 3 鞠桂芝 范晓慧 刘树铮 1985 小鼠脾脏抗体形成细胞的辐射效应 中华放射医学与防护杂志 5(5):331-333.
- 4 鞠桂芝 刘树铮 齐进 1989 低剂量率低水平辐射对机体某些免疫功能的影响 中华放射医学与防护杂志 9(1):8-11.
- 5 Jerne NK. and AA. Nordin 1963 Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140(3565):405.
- 6 Mishell RI. and RW. Dutton 1967 Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exper. Med.* 126(3):423-442.
- 7 Simpson MA. and JJ. Gozzo 1978 Spectrophotometric determination of lymphocyte mediated sheep red blood cell hemolysis in vitro. *J. Immunol. Methods.* 21(1, 2):159-165.