小鼠腹腔巨噬细胞的快速提取及培养

范仕郡,刘 鑫,黄 敏,王 宁,郑 江 (第三军医大学西南医院中心实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 建立一种小鼠腹腔巨噬细胞快速提取的方法,为细胞实验提供便捷。**方法** 用生理盐水灌洗小鼠腹腔,分离获取小鼠腹腔巨噬细胞,转入高糖 DMEM 培养液中培养。采用台盼蓝染色计算存活率,瑞氏染色计算纯度,倒置显微镜观察细胞形态。**结果** 获得较高纯度的巨噬细胞,具备巨噬细胞的形态特征。**结论** 本方法是一种简便实用的提取小鼠腹腔巨噬细胞的方法。

[关键词] BALB/c 小鼠;巨噬细胞;提取;培养;鉴定

[中图分类号] Q813.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0130-02

Establishment of a rapid method for the isolation of murine peritoneal macrophages

FAN Shi-jun, LIU Xin, HUANG Min, WANG Ning, ZHENG Jiang (Central Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a rapid method for the isolation of murine peritoneal macrophages. **Methods** Abdominal lavage was performed with NS and the peritoneal macrophages was purified from the lavage, which was later transferred into high glucose DMEM culture medium. Cell viability was measured via the typan blue staining. Purity was observed via Wright's stain. **Results** High purity macrophages with typical morphology were obtained. **Conclusion** A simple and realistic method was set up for the isolation of murine peritoneal macrophages.

Keywords: BALB/c mice; macrophage; extraction; culture; identification

巨噬细胞是一类重要的天然免疫细胞,来源于外周血中的单核细胞,具有吞噬降解细菌、释放炎症介质、介导炎性细胞趋化、抗原提呈等活性,在抗感染、抗肿瘤免疫中发挥着非常重要的作用[1-2]。因此研究巨噬细胞的功能,对于深入理解机体免疫防御和免疫调节机制具有重要意义。获取原代细胞是体外研究巨噬细胞功能的重要方法。巨噬细胞在肺、肝、脑等实质器官以及腹腔等空腔部位以不同的形式分布。国内外已有不少文献报道从多种组织器官中成功分离和纯化巨噬细胞[3-5]。然而在实质脏器中的巨噬细胞,往往受到环境介质中各种理化和生物刺激因素的影响,已发生炎性活化或产生了定向分化,为其体外研究造成了干扰。而腹腔中存在大量静息状态的巨噬细胞,且腹腔中细胞种类较少简单,易于分离,是获取巨噬细胞的常用部位[6-9]。目前有关腹腔巨噬细胞的分离方法较为复杂,且操作耗时较长。本方法在既往文献报道基础上,对小鼠腹腔巨噬细胞提取方法加以改良,建立了一种更为简便实用的小鼠腹腔巨噬细胞的提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料及实验设备

实验用材料及试验设备有:8 周龄 BALB/c 雌性小鼠(由北京华阜康生物科技股份有限公司提供)、生理盐水、胶头滴管、75% 乙醇、眼科剪、眼科镊、10 mL 一次性注射器、50 mL 离心管、台盼蓝、瑞氏染液、奥林巴斯 IX71 倒置显微镜、奥林巴斯 E400 显微镜、细胞培养箱等。

1.2 实验方法

1.2.1 实验准备 将眼科剪、眼科镊、胶头滴管高压灭菌;离心管辐照消毒;BALB/c 小鼠 3 只禁食 8 h;实验前将超净台紫外线消毒 30 min。

1.2.2 细胞提取 将小鼠脱颈椎处死,并浸入 75% 乙醇中 10 s。然后取出小鼠,沥干,将其仰卧于不锈钢方盘上。用注射器吸 6 mL 生理盐水液注入腹腔中,轻揉小鼠腹部 2 min,使液体在腹腔内充分流动。用眼科镊提起下腹皮肤,使动物微倾向一侧。剪开腹部皮肤后在肌肉层剪 1 个小口,用胶头滴管将腹腔液吸出转入离心管中。每只吸出量约为 4 ~ 5 mL。

1.2.3 细胞培养 在 4 ℃条件下,将收集的腹腔灌洗液在 1 000 r/min条件下离心 10 min,去上清,加入高糖 DMEM 细胞培养液用细胞计数板计数。显微镜下(10 × 100 倍)计数巨噬细胞。调整细胞浓度至所需,接种至细胞培养瓶,37 ℃培养箱孵育 4 h,充分贴壁后,弃上清,除去非粘附细胞再加入高糖 DMEM 细胞培养液,放回培养箱中培养备用。

2 结果

2.1 台盼蓝染色、瑞氏染色结果

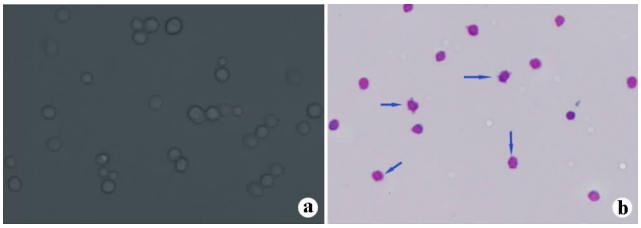
分别用台盼蓝染色计数(图 1a)、瑞氏染色计算纯度(图 1b)。台盼蓝染色后,3 min 内,镜下分别计数活细胞和死细胞。死细胞被染成蓝色,而活细胞呈无色透明状。细胞活力(%) = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数) × 100% >

doi:10.11659/jjssx.11E014005

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81171781)

[收稿日期] 2014-11-12 [修回日期] 2014-12-20

95%。瑞氏染色后,在镜下通过细胞形态计数巨噬细胞和细胞总数。巨噬细胞获得率(%)=巨噬细胞细胞总数/细胞总数×100% >90%。

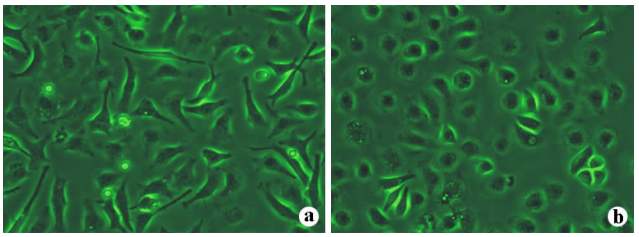


a:台盼蓝染色;b:巨噬细胞瑞氏染色,箭头指示为瑞氏染色后巨噬细胞

图 1 提取细胞台盼蓝染色、瑞氏染色(× 1 000)

2.2 细胞形态观察

培养 12 h 后,在倒置显微镜下可观察到细胞呈椭圆形、多角形或不规则形,部分贴壁(图 2a)。培养 24 h 后观察可以观察到细胞贴满培养瓶,大部分出现伪足。部分细胞伸展开并牢固粘附在培养瓶表面(图 2b)。



a:培养 12 h 后细胞形态;b:培养 24 h 后细胞形态

图 2 培养后细胞形态

3 讨论

在鉴定细胞方面,采用台盼蓝染色其原理是活细胞的胞膜结构完整,台盼蓝不能够进入胞内,不能着色。反之死细胞的细胞膜通透性增加,台盼蓝进入后被染成蓝色。因此,采用台盼蓝染色计数死细胞和活细胞非常简便快捷,是组织和细胞培养中经典的鉴定染色方法。瑞氏染液为中性染料,它使细胞核及胞浆着色。染液中含有缓冲液来调节酸碱度,因此细胞染色后,蓝色和红色都比较适中,细胞核、胞浆显色都非常清楚,是目前在细胞染色中最简单和常用的方法。在细胞的提取过程中要注意无菌操作,注意器械和实验环境的消毒。选用雌性小鼠是因其肠壁脂肪较少,方便腹腔液的收集。周龄较大的小鼠腹腔巨噬细胞数量较少,最好选用 6 ~ 8 周龄小鼠。

巨噬细胞广泛分布于体内,它不仅在非特异性免疫反应中发挥重要作用,而且也是机体特异性免疫中的一类关键细胞[10-11]。由于腹腔巨噬细胞多游离存在,易于获得,因此,许多实验室在进行基础或配合临床研究巨噬细胞功能及其与疾病的关系、或筛检免疫增强药物和探讨其作用机制时,往往选用小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象[12-13]。本方法在提取时,和其他方法一样,均是灌洗腹腔后,吸出含有巨噬细胞的灌洗液,然后离心培养。但传统方法中均采用淀粉肉汤、无菌液体石蜡等腹腔注射预刺激几天,以提高其获得率。预刺激处理一方面增加了操作的复杂程度,另一方面可影响分离巨噬细胞的静息特征。本方法实验前不需预刺激,减少了污染概率,大大缩短了细胞获取的准备时间,所得的巨噬细胞活力和获得率均大于 90%。因此,此方法是一种简便实用的小鼠腹腔巨噬细胞的提取方法,为巨噬细胞的相关实验研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Classen A, Lloberas J, Celada A. Macrophage activation: classical versus alternative[J]. Methods Mol Biol, 2009, 531(6): 29 - 43.

[2] Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, et al. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and Tcell immunity in pancreatic cancer[J]. Cancer Cell, 2012, 21(6): 822 - 835.

[3] Kitani H, Takenouchi T, Sato M, et al. A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells[J]. J Immunol Methods, 2010, 360(1 - 2): 47 - 55.

[4] Neng L, Zhang W, Hassan A, et al. Isolation and culture of endothelial cells, pericytes and perivascular resident macrophage-like melanocytes from the young mouse ear[J]. Nat Protoc, 2013, 8(4): 709 - 720.

[5] Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages[J]. Curr Protoc Immunol, 2008, 83(14): 1 - 14.

[6] Schon Hegrad MA, Holt PG. Improved method for the isolation of purified mouse peritoneal macrophages[J]. J Immunol Methods, 1981, 43(2): 169 - 173.

[7] 黄 琼, 李志场, 杏 芬, 等. 流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(2): 140 - 146.

[8] 张 华, 钟英英, 方廖琼, 等. 羊胎盘免疫调节因子对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(2): 70 - 72.

[9] 李海涛, 肖 丹. 鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养[J]. 现代生物医学进展杂志, 2008, 8(4): 638 - 639.

[10] Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm[J]. Nat Immunol, 2010, 11(10): 889 - 896.

[11] Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling[J]. J Pathol, 2013, 229(2): 176 - 185.

[12] Davies JQ, Gordon S. Isolation and culture of murine macrophages[J]. Methods Mol Biol, 2005, 290(8): 91 - 103.

[13] Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(6): 2568 - 2573.

(编辑:周小林)