维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0436－04

大鼠骨髓巨噬细胞的分离,纯化,培养以及鉴定

李 静,王亚平

(重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:为深入研究骨髓巨噬细胞的生物学功能,探索一种简便的骨髓巨噬细胞的分离,纯化和培养的方法。方法:分离获取大鼠骨髓细胞,在60%DMEM培养液,20%马血清,20%(v/v)L_{929}培养上清的诱导条件下进行体外贴壁培养,6～7天时获得纯度较高的贴壁细胞。采用倒置显微镜下观察生活状态、Wright's染色光镜观察、电子显微镜观察检测贴壁细胞形态学;酸性磷酸酶及非特异性酯酶染色测定细胞内酶的表达;吞噬鸡红细胞及墨汁颗粒实验检测其吞噬功能;免疫细胞化学染色观察细胞表面标志等生物学技术鉴定培养的贴壁细胞性质。结果:获得高纯度的巨噬细胞,且具有良好的吞噬功能,并且具备巨噬细胞的形态特征,特有的水解酶类及特有的表面标志－CD_{68}。结论:本法是一种简易实用的体外分离、纯化、培养骨髓巨噬细胞的方法。

【关键词】骨髓巨噬细胞;分离;纯化;鉴定

【中国图书分类法分类号】R32.43 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－09－24

Methodology of separation, purification, cultivation and identification of rat bone marrow macrophage

LI Jing, et al

(*Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the biological functions of bone marrow macrophage (BMM Φ) and to establish the methodology of separation, purification, cultivation and identification of BMM Φ. *Methods*: Using the techniques of anchorage－dependent culture of separated rat bone marrow cell (rBMC) in DMEM culture media (contain 20% horse serum, 20% (v/v)L_{929} conditioned media) in vitro, a lot of purified anchor cells were obtained, and these cells were identified with specifically biological marker of macrophage, such as 1, morphological*observation*: invert phase contrast microscopy, light and electron microscopy; 2, enzyme cytochemistry: acid phosphatase (ACP), α－acetic acid naphthol esterase (α－ANE); 3, phagocytic experiment: phagocytosis of chicken erythrocytes and prepared Chinese ink; 4, immunocytochemistry: surface specific antigen of macrophage (CD_{68} stain). *Results*: The cells were purified having functional satisfactory macrophage according to morphological observation, enzyme cytochemistry, phagocytic experiment and immunocytochemistry. *Conclusion*: This is a simple and easy method for separation, purification, cultivation and identification of rat marrow macrophage.

【Key words】 Bone marrow macrophage; Separation; Purification; Identification

巨噬细胞是机体的重要防御细胞。大量研究已证明[1,2],巨噬细胞在吞噬与清除异物和衰老死亡细胞、分泌生物活性物质,调节血细胞生成与参与免疫应答等方面发挥着广泛的生物学作用。深入研究巨噬细胞的生物学功能不仅能阐述诸多生理与病理生理学机理,而且对临床相关疾病的治疗也有重要价值。深入探讨巨噬细胞生物学功能的前提或核心问题是如何获得高纯度、高活性的巨噬细胞。尽管国内外不少文献报道[3,4]已能从多种组织和器官中分离、纯化巨噬细胞,但这些方法十分繁琐、复杂,且所需时间较长,耗资较大。为研究一种既简便又经济的巨噬细胞分离与纯化的方法,我们通过诱导骨髓细胞分化,成功的建立了骨髓巨噬细胞的分离、纯化、培养和鉴定方法,为研究巨噬细胞的生物学功能奠定了基础。

作者介绍:李 静(1973－),女,讲师,硕士,
主要研究方向:血细胞发生及其调控机理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 大鼠骨髓细胞(rat bone marrow cell, rBMC)

8～12 周龄 Wistar 大鼠,雄性和雌性各半,体重 200～250g(重庆医科大学实验动物中心提供)。断头处死,消毒条件下,取出完整股骨,用 7 号针头在股骨的两端打孔,RPMI－1640 培养液冲出全部骨髓细胞,过 4 号针头制成单细胞悬液,离心洗涤后,计数 BMC 数,调整细胞至所需浓度。

1.2 L_{929} 培养上清(L_{929} conditioned media, L_{929}－CM)制备

L_{929} 细胞株(本校肝炎研究所提供)在含 10% 小牛血清,青链霉素(100U/ml)的 RPMI－1640 培养液中常规培养 3 天,收集上清液,离心,－20℃ 冰箱保存备用。

1.3 大鼠骨髓巨噬细胞的分离、培养

取大鼠骨髓细胞(rBMC),用含 20% 马血清,20% L_{929}－CM(v/v)的 DMEM 培养液调整细胞浓度为 1×10^6/ml,按 4ml/孔接种于无菌六孔塑料培养板中(先在培养板孔内放置 2.5cm×2cm 的长方形血盖片),置 37℃、含 5% CO_2 培养箱中培养 4 天,换液去除悬浮细胞,继续加入同种培养液培养 3 天后,可见培养板底部血盖片上逐步铺满了椭圆形的细胞。

1.4 培养细胞的形态学检查

1.4.1 倒置显微镜观察 在种植 BMC 后的 1～4 天分别观察贴壁细胞形态。

1.4.2 光学显微镜检查 取已铺满细胞的血盖片,清水冲洗去掉表面的悬浮细胞,晾干后进行 Wright's 染色,光学显微镜下观察。

1.4.3 电子显微镜检查 用橡皮刮将血盖片上的细胞刮下,离心洗涤后,用 2.5% 戊二醛固定。按常规方法制备半薄切片、超薄切片,H600 型透射电子显微镜观察、摄片。

1.5 细胞吞噬功能检测

1.5.1 墨汁吞噬试验[5] 待贴壁细胞铺满皿底时,在培养体系中加入 10% 墨汁 0.05ml,培养箱中孵育 3h,取出血盖片,用等渗液洗去悬浮的墨汁颗粒,晾干,Wright's 染色,镜下计数 200 个细胞,计算其吞噬率及吞噬指数。

1.5.2 鸡红细胞吞噬试验[6] 待贴壁细胞铺满皿底时,在培养体系中加入鸡红细胞悬液 0.1 ml,培养箱中孵育 1～3.5h,取出血盖片,用等渗液洗去浮在上面的红细胞,晾干,Wright'染色。油镜下计数 200 个细胞,记录吞有鸡红细胞的细胞数,并鉴定吞噬级别、吞噬指数、吞噬率。

1.6 细胞的酶化学检测

1.6.1 酸性磷酸酶染色[7] 按 Gomori 硫化铅染色法进行,阳性反应为棕黄色或棕黑色颗粒或片块状沉淀,定位于细胞胞浆中。光镜下每张载片计数 200 个细胞,计数 5 张载片,求出阳性率。

1.6.2 α－醋酸萘酚酯酶染色(α－ANE)[5] 细胞浆内有棕黑色沉淀为酯酶阳性,浆内无沉淀者为阴性。光镜下每张载片计数 200 个细胞,计数 5 张载片,求出阳性率。

1.7 免疫细胞化学检测 CD_{68} 表达

采用 SP 免疫细胞化学法检测细胞表面标志 CD_{68} 的表达。并设置不加一抗的阴性对照。阳性细胞染色位于细胞膜,呈棕黄色颗粒状。在光镜下每张载片计数 300 个细胞,计算 CD_{68} 表达阳性细胞。

1.8 实验数据的统计学处理

所获实验数据均输入计算机,经 SAS 统计软件进行直线相关回归分析,方差分析和 t 检验。

2 结 果

2.1 培养细胞的形态学观察

培养 48h 后,可观察到呈椭圆形、三角形或不规则形的贴壁细胞,胞浆丰富,6～7 天时,细胞贴满培养板底的血盖片,细胞呈星形,有许多伪足和突起。

Wright's 染色光镜观察,可见细胞形状多样,界限清楚,有钝圆形突起。胞浆丰富,富含颗粒及少许空泡。核为卵圆形、肾形或不规则形,偏居于细胞的一端,着色较深,异染色质颗粒分散在核内或依附在核膜的内面,有 1～2 个核仁(图 1)。

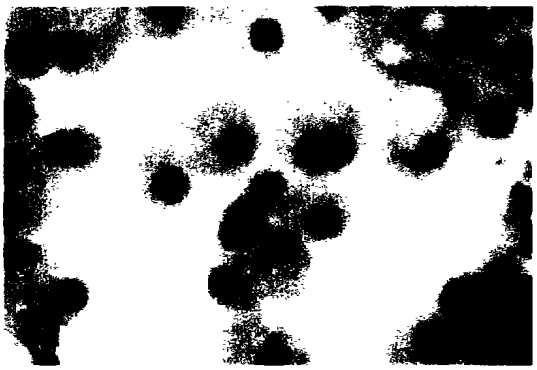


图 1 骨髓巨噬细胞(瑞氏染色,×400)

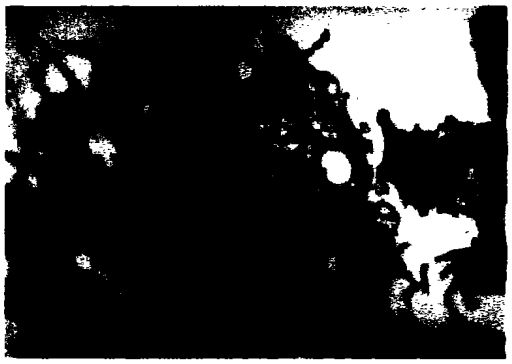


图 2 骨髓巨噬细胞(×600)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 3 骨髓巨噬细胞墨汁吞噬实验(×400)



图 4 骨髓巨噬细胞鸡红细胞吞噬实验(瑞氏染色,×1000)



图 5 骨髓巨噬细胞 ACP 染色阳性(×400)



图 6 骨髓巨噬细胞 α-NAE 染色阳性(×1000)

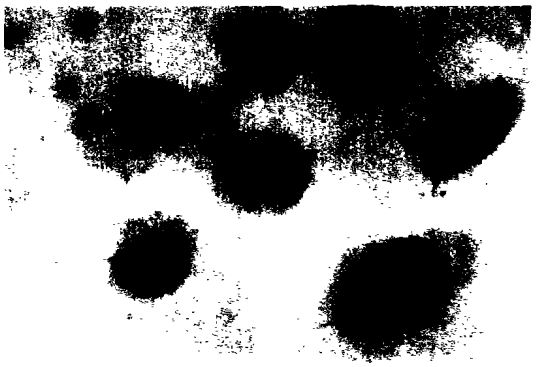


图 7 骨髓巨噬细胞 CD_{68} 阳性表达(ICC,×400)

电子显微镜下可见细胞外形不规则,细胞表面有许多微皱褶、不规则的微绒毛和少数球形隆起,细胞核呈卵圆形或马蹄形,异染色质呈小块状,多沿核膜内面分布。细胞质丰富,内有大量溶酶体,线粒体,吞噬颗粒,游离核糖体和少量内质网等(图 2)。

2.2 培养细胞的鉴定

将培养生长 7 天的细胞作吞噬试验,发现其对墨汁颗粒及鸡红细胞均有很强的吞噬作用:酸性磷酸酶及非特异性酯酶的阳性率也很高:巨噬细胞特异性的表面抗原 CD_{68} 的表达也呈阳性反应(表 1、2,图 3～7)。

表 1 培养细胞的吞噬功能检测

	吞噬率(%) ($\bar{x} \pm s$)	吞噬指数 ($\bar{x} \pm s$)
墨汁吞噬试验	93.67±0.58	207±19.00
鸡红细胞吞噬试验	86.20±1.92	129.40±14.91

表 2 培养细胞的 ACP,α-ANE,和 CD_{68} 表达

	酸性磷酸酶染色(ACP)	非特异性酯酶染色(α-ANE)	CD_{68} 免疫细胞化学染色(CD_{68} ICC)
阳性率(%) ($\bar{x} \pm s$)	88.67±0.58	85.67±1.58	83.67±1.53

3 讨 论

粒细胞与单核巨噬细胞起源于粒-单核系造血祖细胞(CFU-GM),CFU-GM 在体外培养体系中可形成粒细胞集落(CFU-G),巨噬细胞集落(CFU-M)或粒细胞与巨噬细胞的混合集落(CFU-GM)。造血祖细胞在体外形成集落的性质取决于培养体系中所含造血生长因子的种类与活性。巨噬

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞集落刺激因子(M－CSF)是造血祖细胞增殖分化为巨噬细胞的必不可少的造血生长因子,它主要成纤维细胞分泌产生。L_{929}细胞是建株于小鼠皮下结缔组织达到成纤维细胞株、实验证明[8]。小鼠L_{929}细胞的培养上清液中富含有较高活性的M－CSF。本实验以L_{929}细胞的培养上清液作为M－CSF的来源,用于体外诱导骨髓造血细胞向巨噬细胞分化的细胞因子。结果表明在体外培养体系中加入20%(v/v)的L_{929}细胞培养上清液能在短时间内获得大量巨噬细胞样的细胞,由于培养体系不适合其它细胞生长,因而其它各系细胞逐步死亡,经两次换液去除悬浮细胞后,最终可获得大量纯化的骨髓巨噬细胞样细胞。此方法操作简单,结果稳定,重复性好,在一般具有细胞体外培养条件的实验室内都可进行培养,且耗资较少。

巨噬细胞的鉴定指标主要包括形态学检查、生物学功能检查、酶细胞化学检查和免疫学标志检查。通过L_{929}细胞培养上清液诱导生成的贴壁细胞是否是巨噬细胞?我们进行了倒置显微镜活细胞观察;光、电镜形态观察。观察结果证明培养的贴壁细胞具有巨噬细胞的形态学特征。巨噬细胞最主要的生物学特性是具有强大的吞噬能力,我们在鉴定中选用墨汁吞噬实验和鸡红细胞吞噬实验来观察贴壁细胞的吞噬功能。研究结果显示贴壁细胞吞噬墨汁和吞噬鸡红细胞的百分率分别达93.67%和86.2%,这说明培养的贴壁细胞具有强大的吞噬功能。我们又进一步选用巨噬细胞鉴定的标志性酶对贴壁细胞进行酶化学染色,实验结果表明,贴壁细胞酸性磷酸酶(ACP)的阳性率达88.67%,非特异性酯酶染色(α－ANE)的阳性率达85.67%。细胞表面分化抗原——CD_{68}是巨噬细胞表面特异的分化抗原,我们通过SP免疫细胞化学对贴壁细胞进行染色,结果证明:83.67%的贴壁细胞CD_{68}染色是阳性反应。

综上所述,本研究采用L_{929}细胞培养上清液作为M－CSF的来源,对骨髓造血祖细胞进行体外诱导,培养体系能在短时间内获得大量的贴壁生长型细胞,通过形态学观察、吞噬实验、细胞酶化学和免疫细胞化学技术鉴定,所培养的贴壁细胞是高纯度、高活性的骨髓巨噬细胞。本方法操作简便,结果稳定,且不需要特殊的设备条件,为研究巨噬细胞的生物学功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 邱立波.巨噬细胞与造血[J].生理科学进展,1994;25(2):172－174.

[2] 王亚平,王 勇,王莎萍,等.巨噬细胞与造血调控关系的研究[J].中国免疫学杂志,1997;13:15－19.

[3] 秦凤华,谢蜀生.小鼠骨髓基质巨噬细胞系的建立及鉴定[J].科学通报,1998;43(2):178－184.

[4] 郭瑞清,祝彼得.腹腔巨噬细胞培养上清液对小鼠血发生的影响[J].解剖学报,1992;23(3):300－304.

[5] 谢锦玉.现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用[M].第1版,北京:中医古籍出版社,1998;24－26.

[6] 刘秀珍.造血祖细胞培养技术实验手册[M].第1版,北京:北京出版社,1993;160－161.

[7] 李家增,王鸿利,韩忠朝.血液实验学[M].第1版,上海:上海科学技术出版社,1997;67－68.

[8] Aggarwala BB. Human Cytokines[M]. Blackwell Scientific Publication, 1991.