维普资讯 http://www.cqvip.com

小鼠腹腔巨噬细胞的分离纯化

组织胚胎学教研室 郭瑞清* 祝彼得

提 要 本文报告一种血清被覆培养瓶分离纯化小鼠腹腔巨噬细胞的方法，可以得到高纯度、高活性的巨噬细胞，且基本上保持分离前的生物学特性。实验中纯化的巨噬细胞未经任何诱导剂刺激

关键词 巨噬细胞；分离；鉴定
中图分类号 Q954.6332

巨噬细胞是参与免疫反应的重要细胞成份，它在处理、传递抗原及抗感染、抗肿瘤等方面发挥着重要作用[1-2]。欲精确地研究巨噬细胞的复杂功能，首要的工作是分离纯化巨噬细胞。分离纯化巨噬细胞的方法有多种，但多存在不尽人意之处[2-4]。本文报告一种血清被覆培养瓶分离纯化巨噬细胞的方法。

材料与方法

1. 动物 C57BL/bJ雌性小鼠，8—12周龄，体重18—24g。

2. 酸性磷酸酶（ACP）作用液 参考张氏方法[6]。含醋酸巴比妥缓冲液6ml，3.3%硝酸铅0.38ml，蒸馏水32ml，3.2%β—甘油磷酸钠4ml，0.6%硫酸镁10ml，混匀后用0.1N盐酸调至PH5.6。

3. 小鼠腹腔巨噬细胞的分离纯化

（1）10ml灭活新生小牛血清加入培养瓶，晃动数次，使血清被覆整个瓶底，置4℃冰箱过夜，用前用1640培养液洗三次。

（2）小鼠腹腔渗出细胞（Peritoneal Exudate Cell，PEC）的收集：颈椎脱臼处死小鼠，75%酒精消毒后，剪开腹壁皮肤，暴露腹膜，腹腔注入冰冷1640培养液10ml，轻揉腹壁50次，用注射器轻轻回抽腹腔液，洗涤两次后调整细胞浓度至1×10^7/ml。

（3）取调整后的细胞悬液2ml，加入血清被覆后的培养瓶，然后加18ml1640培养液（含10%小牛血清），混匀后置37℃、含5%二氧化碳、饱和湿度的培养箱内孵育1.0h。

（4）弃去非贴壁细胞，用1640培养液轻轻漂洗，直至非贴壁细胞全部洗去，加入10 mlEDTA-2Na(4℃，40min)，用吸管吸取培养瓶中溶液冲洗瓶的底部，使贴壁细胞脱落，回收细胞悬液，离心洗涤三次（1500r/min），计数并调整至所需浓度。

4. 小鼠腹腔巨噬细胞存活率、纯度及回收率

（1）小鼠腹腔巨噬细胞存活率：取分离纯化前后的腹腔巨噬细胞悬液各0.5ml，加等量0.4%胎盘兰染液，死亡细胞染成淡兰色。计数200个细胞，计算巨噬细胞存活率。存活率即200个细胞中活细胞的百分率。

（2）小鼠腹腔巨噬细胞纯度：取分离纯化前后的腹腔巨噬细胞涂片分别作瑞氏染色和酸性磷酸酶组织化学染色。计数200个细胞，分别计算瑞氏染色和酸性磷酸酶组化染色两种方法所得巨噬细胞纯度（公式①，②）：

$$①\text{巨噬细胞纯度}=\frac{\text{巨噬细胞数}}{\text{细胞总数}}\times100\%$$

$$②\text{巨噬细胞纯度}=\frac{\text{ACP阳性巨噬细胞数}}{\text{细胞总数}}\times100\%$$

（3）小鼠腹腔巨噬细胞回收率：

* 组织胚胎学研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

$$回收率=\frac{分离后巨噬细胞总数}{分离前巨噬细胞总数}$$

5. 腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞，参考文献方法[6]。把巨噬细胞和鸡红细胞混悬液加入相同规格的塑料培养皿中，置37℃二氧化碳培养箱中孵育30 min，生理盐中漂洗、冷风吹干，瑞氏染色后油镜计数，分级标准及计算方法同文献。

实验结果

1. 分离前后腹腔巨噬细胞含量、存活率及回收率（表1）

平均每只小鼠腹腔可收集1.01±0.16×10^7个细胞。分离后巨噬细胞纯度为95.4±2.2%。其存活率为96.0±1.8%。回收率平均为29.8%。

表1 分离前后小鼠腹腔巨噬细胞的纯度、存活率、回收率

	X10⁷cells/鼠		纯度(%)		存活率(%)		回收率(%)	
	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$
分离前	9	1.01±0.16	9	52.0±4.5	14	84.4±7.4		—
分离后		—	10	95.4±2.20	12	96.0±1.8	9	29.8±3.8

2. 鉴别巨噬细胞纯度的两种方法比较（表2）

实验表明酸性磷酸酶法和瑞氏染色法在鉴别腹腔巨噬细胞方面无明显差别。

表2 鉴定巨噬细胞纯度的两种方法比较

实验批次	酸性磷酸酶(ACP)	瑞氏染色
1	97	94
2	95	97
3	97	89
4	96	97
5	98	96
6	95	94
7	96	95
±s	96.3±1.1	94.6±2.8

3. 分离前后小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率、吞噬级别及吞噬积分的比较（表3）

结果显示，分离前后的巨噬细胞对鸡红细胞吞噬的基本生物学特性无明显改变。

讨论

分离纯化巨噬细胞的方法有多种，如密度梯度离心法、橡皮刮(Ruber Policeman)机械刮取、利多卡因药物消化及非连续密度梯度离心等[2-4]。在这些方法中，或是需要昂贵的特殊设备及药品，或是分离方法本身会影响所纯化巨噬细胞的生物学特性等，多有不尽人意之处。本文报告一种血清被覆培

表3 分离前后腹腔巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率、吞噬积分比较

	分离前		分离后		p值
	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	n	$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$	
吞噬率(%)	8	38.5±2.8	8	39.8±3.2	>0.05
吞噬级别(%)					
Ⅰ级	9	9.99±1.60	9	9.88±1.14	>0.05
Ⅱ级	9	14.18±0.80	9	14.76±0.80	>0.05
Ⅲ级	9	18.82±0.80	9	19.81±1.40	>0.05
吞噬积分		94.8±23.0		99.8±26.0	>0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

养瓶分离纯化巨噬细胞的方法，可得到高纯度、高活性巨噬细胞，且能保持分离前巨噬细胞的基本生物学特性。

在无血清的条件下，巨噬细胞只是被动粘附玻璃或塑料表面，这种粘附既不依赖温度，也不依赖二价阳离子。实验中发现在巨噬细胞混悬液中加入一定量小牛血清，可以促进巨噬细胞的粘附[4]。有学者认为，在有血清时，似乎可以防止巨噬细胞的被动粘附和促进其主动粘附，这种粘附有赖于温度和二价阳离子[4]。关于血清被覆后促进巨噬细胞粘附的机制至今不清。有人推测，血清中的一些负离子基质通过结合塑料表面而干扰了巨噬细胞的被动粘附，促进其选择性主动粘附，当加入乙二胺四乙酸二钠后，便破坏了血清的这种作用。从而有助于巨噬细胞脱离粘附表面。

代表巨噬细胞生物学特性的指标很多，不同作者往往有不同的选择[5]。本实验选用代表巨噬细胞运动活力的吞噬百分比和代表巨噬细胞内溶酶体消化功能活性的吞噬级别作指标，而吞噬积分代表巨噬细胞运动和消化活性的总功能[5]。实验表明，分离前后巨噬细胞的这三项功能活性无明显改变（$P>0.05$，表3）。以往的作者实验报告，大都是在实验前几天，腹腔内先注射一定的细胞诱导剂，然后制备腹腔细胞悬液[2-4]。如此分离的腹腔巨噬细胞是否能代表正常状态下的巨噬细胞，值得商榷。单核巨噬细胞系统是广泛存在于体内不同部位，具有异质性的细胞群体。不同来源的巨噬细胞及同一来源不同状态的巨噬细胞其溶酶体含量、吞噬能力、Fc受体活性及其分泌功能等均不完全相同[1,2]。本实验在未经任何刺激的状态下，进行小鼠腹腔巨噬细胞收集、分离和纯化，似乎可基本上代表正常状态下小鼠腹腔"常居"巨噬细胞的生物学特性及其功能。

参 考 文 献

[1] Nelson.D.S.Immunology of Macrophage. Academic Press 1976; 373

[2] Herbert, et al.Mannual of macrophage methodology, collection, characterrization, and function,Marcel Dekker Inc. 1981; 63

[3] Wood, et al.J.Immunol Meth., 1979; 28:117

[4] Katsuo, et al.J.Immunol.Meth., 1979; 28:117

[5] Simpon, et al.J.Immunol.meth.1979; 29:220

[6] 邓家栋，等. 血液学实验诊断，天津科学技术出版社. 天津，1983；146，409

（收稿日期 1990-02-22）

A SIMPLE METHOD FOR MACROPHAGE ISOLATION FROM MOUSE PERITONEAL EXUDATE

Guo Ruiqing et al.

Dept. of Histology and Embryology

Macrophages are important immuno-active cells.They are integral components in the specific or nonspecific immunologic responses, We report a method for separation of macrophages using serum-coated flasks. The high viability and highly purified acmacrophages can be obtained.There are no apparent differences in basic biological activity between isolated and original macrophages.No soimulus is used in our method

KEY WORDS Macrophage; Isolation; Determination