的作用下,每1×10^6个脐血MNC中分离纯化的CD34^+细胞可以扩增出约3×10^6的CD1a^+细胞;而1×10^6个MNC贴壁2 h后细胞数约为1×10^5,诱导分化后可获得0.5×10^5的CD1a^+细胞。可见,前者扩增DC的效率明显高于后者。

2.3 DC刺激同种T细胞增殖反应

从脐血CD34^+细胞和贴壁细胞分化而来的DC,按不同比例,即1∶100、1∶50、1∶10与同种T淋巴细胞混合培养,均可以产生明显的增殖效应。1∶10时刺激效果最为明显,细胞^{3}H-TdR的掺入率分别为(3 883±176)%和(3 266±201)%,两组比较无显著性差异,但两组分别与对照组CPM值(316±112)和(297±76)比较有显著性差异。说明脐血CD34^+细胞和贴壁细胞诱导分化形成的DCs均能刺激同种异体T细胞增殖反应,有较强的抗原提呈能力。

3 讨论

研究表明,在细胞因子作用下,外周血CD34^+单核细胞,以及骨髓、脐血和G-CSF动员后的外周血CD34^+细胞均可以在体外诱导分化为DC。外周血来源方便,制备简单经济,所以采集肿瘤患者自体外周血单核细胞诱导生成DC已用于临床试验治疗。但是肿瘤患者经过放疗、化疗后常会出现骨髓抑制和外周血白细胞减少,难以从外周血中获得足量DC满足临床需要。脐血来源广泛、采集方便,免疫原性弱,同时富含造血干祖细胞和单核细胞两种DC的前体细胞,有可能成为DC的较好的组织来源。

我们的实验结果表明,脐血CD34^+细胞在细胞因子GM-CSF+TNF-α+FL+SCF+IL-4作用下,以及单核细胞在GM-CSF+IL-4+TNF-α作用下,诱导生成的细胞均具有典型的DC形态特征,表达高水平的DC分化抗原CD1a,以及MHCⅡ类抗原递呈分子HLA-DR和CD80共刺激分子,并具有刺激同种异体T细胞增殖的能力。

可见我们从人脐血两种前体细胞中诱导扩增出的细胞均具有良好刺激活性的DCs,脐血是DC理想的来源。脐血分离CD34^+细胞诱导分化可获得更大量的DC,而单个核细胞2 h贴壁细胞诱生DC则更简单经济,我们可根据不同目的对其进行选择。

关键词:胎血;树突细胞;细胞因子
中图法分类号:R329.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity[J]. Ann Rev Immunol, 1991, 9: 271-296.
[2] Timmerman J M, Czerwinski D K, Davis T A, *et al*. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients[J]. Blood, 2002, 99(5): 1517-1526.
[3] Mackensen A, Herbst B, Chen J L, *et al*. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated *in vitro* from CD34^+ hematopoietic progenitor cells[J]. Int J Cancer, 2000, 86(3): 385-392.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2003)13-1205-02

技术方法

细胞培养法应用聚乙二醇提高沙眼衣原体检测灵敏度初探

Preliminary study on the increased detective sensitivity to Chlamydia trachomatis by using polyethylene glycol in cell culture

刘官信,韦 红,吴仕孝 (重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所,重庆 400014)

提 要:目的 探讨聚乙二醇(PEG)提高沙眼衣原体(CT)细胞培养灵敏度的方法。方法 使用含有PEG的生长培养基增殖CT标准株,用碘染色法检测CT。并对100例新生儿肺炎鼻咽部标本CT进行检测。结果 用含7%PEG的生长培养基培养增殖的CT是不含PEG生长培养基的1.5~2.5倍。用于临床检测新生儿肺炎鼻咽部标本,包涵体数目明显增多。结论 在CT细胞培养中应用PEG,可提高检测CT的灵敏度。含7%PEG的生长培养基最适合增殖CT。

1956年我国汤飞凡教授首次用鸡胚卵黄囊培养沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis, CT)获得成功。10年后细胞培养成功。此法特异性高,一直被认为是诊断CT的"金标准",且能检出病人是否存在活的病原体,可作为疗效的判断,但其敏感性较低。聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)是常用的细胞融合诱导剂,用于CT的培养中可增加CT包涵体数目,从而提高培养检测的敏感性。我们对PEG在CT培养的作用及最佳作用浓度进行了初步研究,报告如下。

1 资料和方法

1.1 标本采集

CT标准株B/TW-5(2×10^8 IFU/ml),由我室保存。选择我院住院的新生儿肺炎患儿的鼻咽部拭子共145例,置入0.5 ml衣原体运输保护液[0.2 mol/L蔗糖-磷酸盐缓冲液(2SP)],含3.3%胎牛血清,链霉素50 μg/ml,万古霉素50 μg/ml,洗片刻后弃去。4 ℃转运到实验室,24 h内接种或贮存于-70 ℃待接种。

作者简介:刘官信(1950-),男,重庆市人,主管技师,主要从事细胞培养方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)63632756-3546

收稿日期:2002-12-30;修回日期:2003-04-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 单层细胞的培养[1]

将细胞培养瓶中生长良好的McCoy细胞(小鼠细胞,北京眼科研究所),用0.02% EDTA消化,加入RPMI1640培养液(含10%胎牛血清,10 mg/ml庆大霉素,万古霉素100 μg/ml)吹散后分装于装有直径为12 mm圆形盖玻片的平底培养管中,细胞浓度为(1~2)×10^5/ml,36 ℃,0.5% CO_2条件下培养48 h,使之长成均匀融合的细胞单层。

1.3 标本接种

接种前将标准株B/TW-5室温融化后用吸管反复吹打使上皮细胞破碎。将原液进行稀释,使每管中每玻片上含有10个包涵体。弃去细胞单层中的培养液,将0.5 ml标本接种至单层细胞中,室温下3 000 r/min离心1 h,孵育2 h后弃培养液。在每管中加入生长培养基(RPMI1640培养液,含10%胎牛血清,放线菌酮2 μg/ml,100 μg/ml丁胺卡那霉素,万古霉素100 μg/ml),36 ℃,5% CO_2孵育72 h,超声波破碎(400 W/2 s,间隔3 s,共4次)后盲传2代。每批实验均设正常单层细胞对照。

1.4 使用PEG培养CT

将标准株B/TW-5原液进行稀释,使每管中每玻片上含有10个包涵体。单层细胞培养和接种步骤同前。在上述生长培养基中加入35%PEG(MW,3 350,杂交瘤级,Sigma),使PEG浓度分别达到3.5%、7.0%、10.5%、14%和17.5%。每种浓度均作复孔。检测不同浓度PEG对CT包涵体数目的影响。

1.5 碘染色鉴定

弃去培养液,用PBS轻轻冲洗2次,以无水甲醇固定细胞15 min后,Jones碘液染色20~30 min,小心取出玻片,将其倒扣在1∶1碘甘油中。在40×10显微镜下观察被染细胞中有棕黑色包涵体为阳性。计数包涵体数目。若每高倍镜视野包涵体数目大于100个,计数5个视野求其平均值。

1.6 临床标本的检测

对100例新生儿肺炎鼻咽部拭子标本进行细胞培养,每一份标本分做2份,一份采用常规培养,另一份用含7%PEG的生长培养基。培养方法同上。碘染色后计数包涵体。

1.7 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

2.1 碘染色鉴定

McCoy细胞在36 ℃,5%CO_2条件下生长48 h后,长成均匀融合的细胞单层,适合接种CT。接种后24~72 h CT形成的包涵体含有糖原,可被碘染成棕黑色。显微镜下,CT棕黑色包涵体位于细胞浆内,细胞核被挤到一旁,见图1。

2.2 PEG浓度对CT包涵体数目的影响

CT在单层McCoy细胞中生长40~72 h经碘染色后在40×10倍光学显微镜观察,并计数包涵体数目。无PEG组包涵体数目平均为12,3.5%PEG组可达到14,7%PEG组达到40,10.5%可达到58,14%PEG组可达到70,17.5%可达到80。

2.3 临床标本结果

对100例新生儿肺炎患儿鼻咽拭子进行CT培养。7%PEG生长培养基可检出25例阳性,无PEG组检出23例。PEG组较无PEG组可多检出2例阳性。对这23例阳性标本进行包涵体计数见表1。PEG组包涵体数目是无PEG组的1.5~2.5倍。

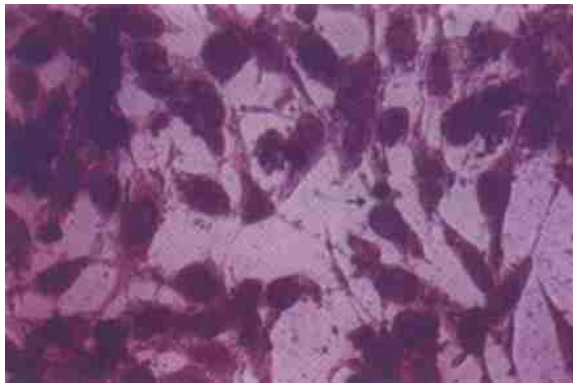


图1 细胞培养沙眼衣原体包涵体 (碘染色×400)

表1 7%PEG在临床标本沙眼衣原体培养中的作用

包涵体数目/玻片	标本数目	平均包涵体数($\bar{x}\pm s$)		增长倍数	P值
		PEG组	无PEG组		
1~10	3	8.33±1.53	3.33±1.53	2.5	<0.05
11~100	18	52.60±27.50	26.90±21.90	1.9	<0.05
101~1000	2	135.00±21.20	92.50±17.70	1.5	<0.05

3 讨论

新生儿CT肺炎是常见的新生儿疾病[1]。检测时通常选择鼻咽部拭子做标本进行CT培养,其中CT含量较少,培养灵敏度低。用含有PEG的生长培养基可提高包涵体的数目。国外学者报道用35%PEG的培养液可使CT包涵体数增加5倍[2],Ngan等[3]报道7%PEG可提高包涵体数2~6倍,我们用7%PEG也产生了相似的结论(1.5~2.5倍)。然而,PEG浓度>10.5%对McCoy细胞会产生细胞毒作用,表现为细胞融合增多,颗粒增加,且PEG浓度越大,毒性作用越明显。因此,7%PEG是最佳浓度,它既可提高包涵体数目,又不至于对细胞产生太大的毒性作用。

我们用7%PEG检测了100例新生儿肺炎鼻咽拭子标本,发现普通培养可检出23例阳性标本,使用PEG组较普通培养方法多检出2例阳性。且使用PEG的阳性标本中包涵体数目的增加使发现包涵体更为容易,从而提高了检测弱阳性的能力。

关键词:细胞培养;聚乙二醇;沙眼衣原体;衣原体肺炎
中图法分类号:R374.$^+$1;R446.5 文献标识码:B

参考文献:

[1] 吴仕孝,沈 犁,刘官信. 母婴垂直传播沙眼衣原体的聚合酶链反应及测序研究[J]. 中华儿科杂志,1997,35(6):283-285.

[2] Mohammed N R, Hillary I B. Improves method for isolation and growth of Chlamydia trachomatis in McCoy cells treated with cycloheximide using polyethylene glycol[J]. J Clin Pathol, 1985, 38(9): 1052-1054.

[3] Ngan C C, Ling A E, Chan R K. The effect of polyethylene glycol (PEG) on the isolation of Chlamydia trachomatis in H-1 Hela cells[J]. Pathology, 1997, 29(1): 76-78

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net