DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.008

论著

文章编号:1000-5404(2003)04-0298-03

LDH检测BALB/c小鼠CTL活性的初步研究

马巧玉,王宇明,郝 飞 (第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立一个简便易行的动物模型及细胞毒性T细胞(CTL)检测体系,为HCV感染中CTL作用研究奠定理论基础。方法 用SP2/0作为靶细胞,LDH检测HCV核心区多肽免疫BALB/c小鼠的CTL活性。结果 HCV核心区多肽免疫BALB/c小鼠后,可用LDH检测其CTL活性,CTL活性可被CPA10(5~23位氨基酸)增强及被CPA9(39~74位氨基酸)抑制。结论 LDH可稳定检测BALB/c小鼠的CTL活性。

关键词:乳酸脱氢酶;细胞毒性T细胞;BALB/c小鼠
中图法分类号:R392.11;R446.63;R512.630.3 文献标识码:A

A study of the specific cytotoxic T cell of BALB/c mice detected by LDH

MA Qiao-yu, WANG Yu-ming, HAO Fei (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a simple animal model and the cytotoxic T cell(CTL) detecting system for the studies of the effects of CTL on HCV infection. Methods The CTL activity in BLAB/c mice immunized by polypeptides in the core region of HCV was detected with lactic dehydrogenase (LDH) by using SP2/0 cells as the target cells. Results CTL activity in BIAB/c mice immunized by polypeptides in the core region of HCV could be detected with LDH. The activity could be enhanced by CPA10(5~23 aa) but inhibited by CPA9(39~74 aa). Conclusion CTL activity in BLAB/c mice can be detected stably by LDH.

Key words: lactic dehydrogenase; cytotoxic T cell; BIAB/c mice

自1989年Choo等[1]人发现丙型肝炎病毒(HCV)基因组以来,有关HCV感染已引起广泛关注。在丙型肝炎发病机制方面,有关细胞毒性T细胞(CTL)作用最受关注。已知CTL属于$CD8^+$ T细胞,当其表达受体(TCR)与靶细胞的HCV抗原特异性结合后,在MHC-I类抗原介导下,可对靶细胞发挥溶解杀伤作用。CTL是执行细胞免疫反应的主要效应细胞,在清除病毒感染和阻止感染慢性化中起关键作用。特别是CTL可能在决定HCV感染结果中起重要作用。本实验以不同剂量的HCV多肽免疫BALB/c小鼠,在不同条件下用乳酸脱氢酶试剂检测被免疫小鼠细胞毒性T细胞(CTL)活性,以寻求一个检测CTL适宜条件,为有关CTL的其它研究,建立一个简便、有效的方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 LDH试剂盒 购自德国宝灵曼公司。

1.1.2 PRMI1640细胞培养基 购自美国GIBCO公司。

1.1.3 小牛血清 由本校试剂中心提供,用前56℃×30 min灭活补体。

1.1.4 不完全福氏佐剂 由本校免疫学教研室惠赠。

1.1.5 HCVC/E2区质粒转染小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0) 华西医科大学肝炎研究所惠赠。

1.1.6 BALB/c小鼠 由本校实验动物中心提供。

1.1.7 HCV核心区多肽CPA9、CPA10 由我室制备[2]。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫BALB/c小鼠 称取HCV核心区多肽CPA9 1 600 μg,CPA10 1 000 μg,分别加入超滤水300、200 μl,不完全福氏佐剂500 μl、300 μl,用2只注射器双向推注0.5 h至乳化,将实验的BALB/c小鼠随机分为4组,每组3只,后足皮下分别注射CPA9 25、50、100 μl、CPA10 50 μl,每2周注射1次,共3次。同时设立正常对照组注射生理盐水,无任何处理的空白对照组(每组2只BALB/c小鼠)。

1.2.2 确定靶细胞 用HCV C/E2区质粒转染的同源BALB/c小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0作为靶细胞,经Western blot法及免疫组化证实上述质粒转染成功并可在传代SP2/0细胞中稳定表达。

1.2.3 免疫BALB/c小鼠CTL功能检测 取出培养的SP2/0细胞,0.25%胰酶消化后,用含2%小牛血清(BS)的1640培养液稀释细胞至5×10^4/ml,按100 μl/孔加入96培养板,置于37℃、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770682)
作者简介:马巧玉(1963-),女,浙江省义乌县人,博士,主治医师,主要从事丙型肝炎免疫发病机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754475-8008
收稿日期:2001-09-09;修回日期:2002-06-20

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

5% CO_2 孵箱过夜。次日处死 CPA9、CPA10 免疫的 BALB/c 小鼠及对照组小鼠, 将脾脏置于 100 目筛网上研磨, 分离细胞, 将细胞悬液 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加 1640 培养液混匀, 按上述条件再次离心, 去上清。吸去 96 孔培养板中 1640 培养液, 加入含 2%BS 的新鲜 1640 培养液 100 μl。计数上述脾细胞后用含 2%BS 的 1640 培养液调整细胞浓度, 使效靶细胞比分别为 20∶1、50∶1、100∶1、200∶1 及 10∶1、20∶1、40∶1、60∶1, 每种细胞浓度 50 μl/孔×3 孔加入上述含靶细胞 SP2/0 的 96 孔培养板。用含 2%BS 的 1640 培养液调配 CPA9、CPA10 至 20 μl/ml 浓度, 50 μl/孔加入上述含脾细胞 SP2/0 的培养板, 将培养板放入培养箱中孵育 4 h 后取出, 移 100 μl/孔上清至另一清洁 96 孔培养板, 加入配制好的 LDH 反应液 100 μl/孔, 在 25 ℃下避光保存 20 min, 用酶标仪 490 nm 检测。

2　结果

2.1　免疫 BALB/c 小鼠

注射 CPA9 50 μg 组、100 μg 组, CPA10 100 μg 组, BALB/c 小鼠健康状态良好, 无意外受伤及死亡; 注射 CPA9 200 μg 组 BALB/c 小鼠死亡 1 只, 受伤 2 只, 做放弃处理。

2.2　免疫 BALB/c 小鼠 CTL 功能检测

实验组 BALB/c 小鼠取出脾脏后, 肉眼观察其形态、大小、色泽与对照组小鼠脾脏无明显差异, 光镜下观察脾细胞形态, 实验组与对照组亦无明显差异, 在各组 BALB/c 小鼠 CTL 活性检测中, 部分结果显色太过而超出酶标仪最大检测范围或超过高对照值, 予以剔除。

将上述各组同效靶比之 3 孔平均后按下述公式计算:

$$细胞毒性(\%)=\frac{实验值-低对照值}{(高对照值-低对照值)}\times 100$$

计算结果见表 1、表 2。

表 1　CPA9 免疫 BALB/c 小鼠 CTL 活性(%)

Tab 1　CTL activity in BALB/c mice immunized by CPA9(%)

	Group	
	20∶1	50∶1
100 μg	23.03±8.89 *	48.03±9.58 *
50 μg	34.14±0.61	63.94±1.12
Control	39.45±0.22	68.08±3.32
Negative control	38.37±0.10	67.41±1.59

*: $P<0.05$ *vs* Control and Negative control

表 2　CPA10 免疫 BALB/c 小鼠 CTL 活性(%)

Tab 2　CTL activity in BALB/c mice immunized by CPA10(%)

	Group			
	10∶1	20∶1	40∶1	60∶1
CPA10	9.07±2.31 *	21.29±3.56 *	43.77±7.03 *	56.74±2.80 *
Control	7.51±1.97	9.16±1.44	15.76±6.12	24.69±7.56
Negative control	6.47±2.36	8.40±2.88	13.60±3.19	19.79±4.77

*: $P<0.05$ *vs* Control and Negative control

上述 CPA9 免疫 BALB/c 小鼠 CTL 活性的检测结果去除效靶比为 200∶1、100∶1 各组结果(显色太过而超出检测范围), 剩余效靶比为 60∶1、50∶1、40∶1、20∶1、10∶1 各组 CTL 检测结果经单因素方差分析, 正常和空白对照组 CTL 活性无显著差异, 注射 CPA9 50 μg、效靶比为 20∶1、50∶1 各组 CTL 活性与空白、正常对照组无显著差异, 注射 CPA9 100 μg, 效靶比为 20∶1、50∶1 的 2 组 BALB/c 小鼠 CTL 活性明显低于空白及正常对照组($P<0.05$), 注射 CPA10 100 μg 的各组 BALB/c 小鼠 CTL 活性明显高于空白及正常对照组($P<0.05$)。

3　讨论

3.1　BALB/c 小鼠的免疫接种

注射 CPA9 200 μg 组 3 只 BALB/c 小鼠 1 死 2 伤, 可能与 CPA9 剂量过大致小鼠不能耐受有关, 注射 CPA9 50 μg 组小鼠 CTL 活性经单因素方差分析与对照组差异无显著性, 而注射 CPA9 100 μg 组小鼠 CTL 活性较对照组明显降低, 注射 CPA10 100 μg 组小鼠 CTL 活性明显增强。因此, 注射 BALB/c 小鼠 HCV 核心区多肽剂量以 100 μg/只为宜。

3.2　靶细胞培养、传代、冻存

我们确定了转染 HCV C/E2 区质粒的 SP2/0 细胞为靶细胞, 该细胞为贴壁的 BALB/c 小鼠肿瘤细胞, 生长旺盛, 应及时传代、冻存, 以免细胞老化脱落。SP2/0 细胞冻存时, 将冻存管放入异丙醇中浸泡, 再置于 −80 ℃冰箱中, 可基本保证细胞悬液的温度以 1 ℃/min 的速度均衡下降。

3.3　CPA9 免疫 BALB/c 小鼠 CTL 测定

SP2/0 细胞应吸入 96 孔培养板过夜, 使细胞贴壁, 检测 CTL 活性前换新鲜培养液; 将培养液中 BS 调至 1%~2%减少其在检测中的影响; 加入 LDH 反应液后, 避光保存时间与温度有关, 温度高则显色时间较短。实验中效靶比为 200∶1 的各组、100∶1 的对照组均显色过深不能检测, 因此效靶比应以≤100∶1 为宜。

3.4　建立 LDH 检测 HCV 核心区多肽免疫 BALB/c 小鼠 CTL 活性体系的意义

近 10 年来, 有关 HCV 感染方面研究有很多发现, 虽然 HCV 感染引起肝细胞损伤的机制尚不明确, 但许多研究证实免疫反应在介导肝细胞损伤中起重要作用, 许多慢性 HCV 感染者肝内及外周血中有 HCV 特异性 CTL 存在[3,4], 有这种 CTL 的患者病毒血症较低, ALT 较高, 肝组织损伤亦较严重, 证实 CTL 在 HCV 感染中可能对清除病毒, 引起肝损伤起关键作用。

Saito 等近年来关于 HCV 感染中 CTL 作用的报道很多, 其中 HCV 核心区(1~191 位氨基酸)CTL 表位研究显示: CTL 可识别 2~9、41~49、88~96、81~100 位氨基酸, 还可识别 35~44、90~98、131~140、177~185 位氨基酸, 另有显示 28~37、111~130、161~180 位氨基酸为 CTL 表位[5,6]。我们选择已制备的多肽 CDA9、

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

CAP10(39~74、5~23位氨基酸)作为实验用多肽。

目前,进行HCV感染中CTL活性检测的各项研究报道均用经典的^{51}Cr释放试验,靶细胞有EB病毒转化B原始淋巴细胞(B-LCL)、人类293细胞、小鼠BALB/3T3细胞、猴CDS1细胞、黑猩猩外周血单个核细胞及BALB/c小鼠SP2/0细胞等[7],试验动物除公认的黑猩猩外,应用最多的为BALB/c小鼠,由于BALB/c小鼠为纯系小鼠,遗传基因基本一致,用SP2/0作为靶细胞,可保证与效应细胞同源性[5]。^{51}Cr释放试验虽有应用成熟、检测准确等优点,但是^{51}Cr为放射性元素,操作、保存不当可引起放射性污染及放射性损伤,且放射性衰变保存时间有限;而用乳酸脱氢酶试剂检测CTL活性则有价格便宜、便于保存、操作简便、无放射性污染等优点,此检测方法通过被免疫的效应细胞(CTL)攻击被免疫或被感染的靶细胞,造成靶细胞损伤或死亡,释放LDH,用此试剂检测LDH含量判断CTL活性[8]。由于合成HCV核心区多肽价格昂贵,因此各组BALB/c小鼠数量有限,但阴性和正常对照组小鼠CTL活性极为接近,经单因素方差分析,条件一致各组间均无显著性差异,说明用此试剂检测BALB/c小鼠CTL具有方法稳定,结果可靠的特点。在实验动物方面,虽有公认的黑猩猩做为研究HCV的动物模型,但价格昂贵、数量有限,广泛应用有困难,因此,我们建立了以SP2/0做为靶细胞,LDH检测HCV核心区多肽免疫BALB/c小鼠的CTL活性的实验动物模型,为下一步研究及其它HCV感染中CTL作用研究奠定基础。

参考文献:

[1] Choo Q L, Kao G, Weiner A J, *et al*. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne NonA, NonB viral hepatitis genome[J]. Science, 1989, 244: 359—362.

[2] 郝 飞,宋 霞. 合成肽与重组抗原检测丙型肝炎病毒抗体的对比研究[J]. 中华传染病杂志, 1995, 13(2): 69—72.

[3] 宋志强,郝 飞,刘国栋,等. 丙型肝炎病毒体外感染人胎肝细胞的初步研究[J]. 中华传染病杂志, 1999, 17(4): 224—227.

[4] Helson D R, Marousis C G, Daivs G L, *et al*. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C[J]. J Immunol, 1997, 158(3): 1473—1481.

[5] Tokushige K, Wakita T, Pachuk C, *et al*. Expression and immune response to hepatitis C virus core DNA-Based vaccine constructs[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 14—20.

[6] Lau J Y N. Mechanisms of hepatic toxicity Ⅳ N. Pathogenetic mechanisms involved in hepatitis C virus-induced liver disease[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 1): G1217—1220.

[7] Saito T, Sherman G J, Kurokohchik, *et al*. Plasmid DNA-based immunization for hepatitis C virus structural proteins: immune responses in mice[J]. Gastroenterology, 1997, 12(4): 1321—1330.

[8] Yokozawa T, Miyamura K, Fujino R, *et al*. Gelatin beads as platforms for targeting molecule and anti-Fas antibody: two major properties of cytotoxic T lymphocytes[J]. Exp Hematol, 2000, 28(10): 1129—1136.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2003)04-0300-01

成人肾母细胞瘤11例报告

Report of 11 cases of adult nephroblastoma

叶 锦,靳风烁,江 军,李黔生,朱方强 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

肾母细胞瘤罕见于15岁以上成人,称成人肾母细胞瘤。我院自1970—2000年共收治11例,报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组男8例,女3例。年龄平均25.6岁。左肾7例,右肾4例。临床表现为肉眼血尿9例,腰腹部包块7例,腰腹痛3例。肿瘤直径为5~22 cm,平均12 cm。均经B超及静脉肾盂造影诊断为肾肿瘤。10例行CT检查,1例行肾动脉造影检查。按NWTs-3分期:Ⅰ期3例,Ⅱ期4例,Ⅲ期4例。

1.2 治疗方法

11例均行肾肿瘤根治性切除术。术后分别行化疗、肾床放疗和/或双肺预防性放疗。本组化疗方案为环磷酰胺、阿霉素和长春新碱联用。放疗剂量为1 000~4 500 cGy。

2 结果

术后病理检查确诊。Ⅰ期3例,2例行术后化疗及肾床放疗,分别无瘤生存10年及8年;另1例术后行单纯化疗,4年后死于双肺转移。Ⅱ期4例,术后均接受化疗及肾床放疗,1例无瘤生存9年;另3例分别生存25、16、13个月,死因为双肺转移。Ⅲ期4例,术后均接受化疗、放疗及双肺预防性放疗,生存期为3年、12月、12月及6个月,死因为肺转移或肺、脑转移。预后良好组织型(FH)3例,预后不良组织型(UH)8例。3例无瘤生存

(下转304页)

作者简介:叶 锦(1975—),男,湖南省湘潭市人,硕士,医师,主要从事泌尿系肿瘤方面的研究。电话:(023)68757344

收稿日期:2002-03-05;修回日期:2002-05-28

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