DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.057
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0369-02

技术方法

哮喘致敏小鼠模型的建立及脾脏 $CD4^+$ T 细胞的分离

Establishment of sensitized asthma model in mice and $CD4^+$ T lymphocyte isolation from spleens

程晓明,王长征,李淑平,钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 建立一种可靠的哮喘致敏小鼠模型及分离脾脏 $CD4^+$T 细胞。方法 采用卵蛋白致敏的方法建立模型,运用 panning 法分离 $CD4^+$T 细胞。结果 此模型小鼠肺组织呈现典型的哮喘样病理改变,其外周血、支气管肺泡灌洗液(BALF)中嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)显著高于正常对照组($P<0.01$)。$CD4^+$T 细胞纯度经流式细胞术(FCM)检测,纯度达 97.3%。结论 此方法建立的模型及分离的 $CD4^+$T 细胞可用于哮喘的实验研究。

建立哮喘动物模型及分离高纯度的 $CD4^+$T 细胞是实验研究哮喘发病机制的重要前提。本实验就小鼠致敏模型的建立及其脾脏 $CD4^+$T 细胞的分离方法进行介绍。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及材料

1.1.1 淋巴细胞分离液 将 9% ficoll 400 溶液(Sigma 公司)和 33.9%泛影葡胺溶液按比例混合,调比重至 1.090。

1.1.2 尼龙毛柱的制备 称取 80mg 尼龙毛,将其细致撕匀后装入 2ml 一次性注射器内,柱高约 4 cm。用 Hanks 液充分浸湿尼龙毛柱,使其内不留气泡,高压灭菌消毒。使用前用预温至 37 ℃的 RPMI 1640(含 10%胎牛血清,Fetal calf serum,FCS)洗柱后封闭下端出口。

1.1.3 $CD8^+$单克隆抗体(Monoclonal antibody,mAb)包被平皿的制备 取若干个聚苯乙烯平皿,将 $CD8^+$mAb 溶液(北京邦定公司)100μl 加入平皿中,并加入 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.5)3 ml,混匀,室温下无菌放置 40 min,磷酸盐缓冲液(PBS,pH7.2)漂洗,加入含 1% FCS 的 PBS,室温下无菌孵育 15 min,PBS 漂洗,4 ℃保存备用。

1.2 实验动物及分组

4~6 周健康 BALB/c 小鼠 40 只,雌雄不限,体重 16~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供。将小鼠随机分为两组,A 组为正常对照组,以生理盐水代替鸡卵清蛋白(Ovalbumin,OVA,GradeⅡ,Sigma 公司)致敏和激发小鼠;B 组为致敏模型组,给予 OVA 致敏和激发。

1.3 致敏小鼠模型的建立

分别于第 1 天、第 13 天经小鼠腹腔注射 OVA 10μg 和氢氧化铝凝胶($Al(OH)_3$)20 mg 混合液;第 25 天时,将每只小鼠单独置于 5 L 密闭容器中,以 1% OVA 进行雾化吸入激发,使小鼠暴露在 OVA 气雾中 20~30 min 直至出现哮喘样发作为止,持续 6 d。由 402 型超声雾化器(上海合力医用器械厂)提供雾化动力。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870946)

作者简介:程晓明(1973-),女,安徽省淮南市人,博士研究生,医师,主要从事哮喘方面的研究。电话:(023)68755320

收稿日期:2000-08-19;修回日期:2000-12-08

1.4 外周血、支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中嗜酸性粒细胞百分比(percentages of eosinophils,EOS%)计数及肺组织标本留取

1.4.1 外周血及 BALF 中 EOS% 计数 各组小鼠各 14 只最后一次激发 24 h 后,经腹腔麻醉,行气管切开,收集 BALF 5ml,针刺心脏取血约 0.5~0.8 ml。将全部液体离心,收集沉淀细胞,加入红细胞裂解液去除红细胞。用 EOS 计数液行 EOS 计数。

1.4.2 肺组织标本留取 打开未经支气管肺泡灌洗的各组各 6 只小鼠胸腔,观察肺脏的大体改变,剪取部分肺组织,经 10%甲醛固定后切片,行 HE 染色。

1.5 $CD4^+$T 细胞的分离及鉴定

1.5.1 $CD4^+$T 细胞的分离 打开小鼠腹腔,无菌取出脾脏放入冷 Hanks 液中,将其捻碎并滤过 100 目无菌钢网,收集脾细胞悬液加入到淋巴细胞分离液中,2 000 g 离心 30 min,沿管壁轻轻吸出中间灰白色细胞层,重悬于含 10% FCS 的 RPMI 1640 溶液中;按每 1×10^8 个细胞加入尼龙毛柱中,37 ℃,5%CO_2 孵箱中孵育 1 h;打开下端出口,使 T 细胞悬液以 40~60 滴(Drop,d)/min 流出,用 RPMI 1640 溶液反复洗柱至洗脱液达 6~8 ml,将细胞悬液按每 1×10^7 个加入 $CD8^+$mAb 包被的聚苯乙烯平皿中,并加入 RPMI 1640 溶液 2 ml,混匀,4 ℃作用 70 min,每 20 分钟轻轻旋摇 1 次,沿平皿壁吸取细胞悬液并用 RPMI 1640 溶液轻洗 2 次,2 000 g 离心 10 min,收集的细胞悬液即 $CD4^+$T 细胞。经台盼蓝计数,细胞存活率>89%。

1.5.2 $CD4^+$T 细胞纯度鉴定 采用流式细胞术(Flow cytometry,FCM)鉴定 $CD4^+$T 细胞纯度[1]。

1.6 统计学分析

各组结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间比较采用非配对 t 检验。

2 结果

2.1 小鼠致敏模型的肺组织病理改变

致敏组小鼠的肺脏与正常对照组小鼠的肺脏相比体积明显增大,表面肿胀,有多处形状不规则的暗红色充血区。切面有白色泡沫状渗出物,并可见明显的血管断面。肺组织切片 HE 染色可见支气管及血管周围有大量的炎性细胞浸润,以 EOS 为主,肺间质及肺泡腔内也可见 EOS 浸润。细小的支气管

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

内可见粘液栓。气道上皮多处断裂,基底膜明显增厚且形态不规则。细支气管平滑肌发生肥厚性增生。

2.2 外周血及 BALF 中 EOS%

2.2.1 外周血 EOS% 致敏组小鼠外周血 EOS%(11.0±2.7)与正常对照组(0.7±0.5)比较显著增高($P<0.01$)。

2.2.2 BALF 中 EOS% 正常对照组小鼠 BALF 中几乎没有 EOS(0.0±0.01),致敏组小鼠 BALF 中 EOS%(21.9±4.4)与正常对照组比较显著升高($P<0.01$)。

2.3 $CD4^+$T 细胞纯度鉴定结果

经 FCM 检测,$CD4^+$T 细胞的纯度为 97.3%,见图 1。

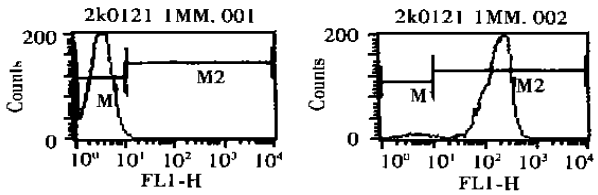


图 1 FCM 检测 $CD4^+$T 细胞纯度

3 讨论

本实验建立的 BALB/c 小鼠致敏模型病理表现为:肺脏明显水肿,细、小支气管内有多量的粘液栓,气道上皮断裂、脱落,基底膜增厚,支气管及肺血管周围有以 EOS 为主的大量炎性细胞浸润,与哮喘的病理学特点相似;同时,此模型小鼠外周血及 BALF 中 EOS% 显著增加,与哮喘患者外周血及 BALF 中 EOS%的改变一致,说明此模型可用于哮喘的实验研究。

Panning 法又称洗淘法。它是运用抗原与抗体相结合的原理进行细胞分离的一种方法,具有简便,经济、细胞完整性好等特点。国外在 90 年代早、中期即将这种方法广泛用于实验中。随着科学技术的不断进步,目前国外用于分离细胞的方法主要是磁珠分离法[2]和流式细胞仪法[3],但其造价昂贵,在国内并不能普遍开展,故运用 Panning 法分离细胞仍不失为一种高效、经济的方法。本实验用 Panning 法分离的 $CD4^+$T 细胞经 FCM 检测,纯度高,完全可用于进一步的实验研究。

关键词:哮喘;模型;小鼠;$CD4^+$T 细胞
中图法分类号:R-332;R562.25 文献标识码:B

参考文献:

[1] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,1998.180-183.
[2] Holmes B J, MacAry P A, Noble A, *et al*. Antigen-specific $CD8^+$T cells inhibit IgE responses and interleukin-4 production by $CD4^+$T cells[J]. Eur J Immunol, 1997, 27(10):2 657-2 665.
[3] Denkers E Y, Scharton-Kersten T, Barbieri S, *et al*. A role for $CD4^+$ NK1.1+T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of $CD8^+$ effectors function against intercellular infection[J]. J Exp Med, 1996, 184(1):131-139.

(编辑 陈聪连)

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)03-0370-02

胰肾一期联合移植手术方法探讨

Exploration on operation methods in simultaneous pancreas-kidney transplantation

杨彤翰[1],张银甫[2],杨唐俊[2],梁 平[1],李 靖[1],左国华[1],杨清浩[2],冯嘉渝[2] (第三军医大学附属新桥医院:[1]肝胆外科;[2]泌尿外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨胰肾一期联合移植手术方法中有关问题。方法 采用原位低温灌注,整块切除的方法切取供胰。将供胰移植于病人的右侧髂窝,供肾移植于左侧髂窝,供体十二指肠与受者的膀胱侧侧吻合。结果 5 例病人中,3 例术后胰腺及肾脏功能满意,未使用胰岛素,进正常饮食,血糖一直在正常范围,肾功能良好,至今已分别生存 20 月、14 月、11 月。其余 2 例中,1 例因排斥反应,于术后第 47 天死于急性心功能衰竭。另 1 例因血栓形成,于术后第 33 天切除移植胰腺,但肾功能良好。结论 胰肾联合移植是治疗Ⅰ型糖尿病伴肾功能衰竭的有效方法之一。

胰肾联合移植术用于治疗糖尿病性肾病,国外开展较早,而国内则少有临床应用的报道[1]。我院于 1998 年 12 月 15 日开始至今共实施 5 例,结合文献复习,本研究就术中有关问题进行重点讨论。

作者简介:杨彤翰(1947-),男,山东省莱州市人,教授,主要从事胰腺移植方面的研究,发表论文 28 篇。电话:(023)68755114-74606

收稿日期:2000-10-10;修回日期:2001-02-05

1 临床资料

1.1 一般资料

男 3 例,女 2 例,年龄 41~53 岁,平均年龄 48.4 岁。糖尿病史 18~24 年,空腹 C 肽 1.01~2.2 μg/L,均长期使用胰岛素治疗。每日用量 36~50 单位,空腹血糖仍在 13~32 mmol/L 范围内波动,尿糖 ++~ +++之间。BUN 12.8~26.3 mmol/L,Cr 581~939.2 mmol/L。术前接受腹膜透析者 3 例,血液透析 2 例,透析

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