DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.02.029

表 1 两组脾组织各区域内 MΦ 吞噬碳粒分布表

组织区域	注射碳粒后的时间				
	3 h○	1 d	6 d	14 d	28 d△
红 髓☆	++	++	++	+++	++
边缘区	+++++	+++++	+++	+++	+++
动脉周围林巴鞘	-	-	-	-	-
滤泡冠	-	-	+	++	+
生发中心	-	-	-	+ ※	+

☆: 红髓中的碳粒主要存在于脾索内;○: 多数碳粒以游离状态存在于边缘窦和红髓窦中,少数被 MΦ 吞噬;△: 移植组 MΦ 内的残存碳粒较假手术组多;※移植脾组织生发中心内的 MΦ 略多于假手术组。

3 讨论

移植脾组织内大量的巨噬细胞,能吞噬清除抗原颗粒物质如衰老变性的红细胞和有荚膜的肺炎球菌等[2]。为此,本实验用碳粒混悬液经尾静脉注射后直接观察巨噬细胞吞噬碳粒的特点,进一步证实了下列问题:① 巨噬细胞吞噬的场所在脾脏的边缘区和红髓 注射后 3 h,大部分碳粒聚集在边缘区,形成碳粒环,少部分在红髓 此时,少数巨噬细胞浆内可见吞噬的碳粒,24 h达吞噬高峰,第 14天红髓和边缘区吞噬碳粒的巨噬细胞数大致相等。这说明移植脾组织的边缘区也是滞留、捕获抗原的首要部位,其内的巨噬细胞同原位脾一样对外来物质的刺激反应迅速,吞噬机能旺盛。② 移植脾组织内吞噬碳粒的巨噬细胞和原位脾内巨噬细胞有相似的移行规律。首先是在边缘区和红髓(3~24 h),然后在淋巴滤泡冠部(6 d左右),再依次到生发中心周边及中央(6~14 d),与 Katani等[3]报道正常脾的基本情况一致。这种移行是否与递呈抗原或传递抗原信息有关,或是受某种化学介质的驱使,尚待进一步证实。③ 移植脾组织内巨噬细胞清除碳粒比原位脾缓慢。第 28天,假手术组巨噬细胞吞噬的碳粒大部分已被清除,移植脾组织虽有清除,但残存量仍多于原位脾。这可能是巨噬细胞消化清除碳粒时需要的营养(如氧等)增多,而血供又相对不足,致其清除迟缓。

关键词 脾脏;自体移植;巨噬细胞
中图法分类号 R656

参考文献

1 Westermann J, Past R. Autotransplantation of the spleen in the rat: donor leukocytes of the splenic fragment survive implantation to migrate and proliferate in the host. Cell Tissue Res, 1997, 187(2): 357
2 Haklar G, Demirel M, Peker O, *et al*. The functional assessment of autotransplanted splenic tissue by its capacity to remove oxidatively modified erythrocytes. Clin Chim Acta, 1997, 258(2): 201
3 Katani M, Matsuno K, Miyakamak, *et al*. Migration of macrophages from the marginal zone to germinal centers in the spleen of mice. Anat Record, 1985, 212(2): 172

(收稿: 1998-02-24;修回: 1998-11-30)
(编辑 张大春)

细胞生长抑制测定 TGF-β1 生物活性

Measuring bioactive TGF-β1 by cell growth inhibition

李 勇* 韩本立 李 昆 王会信** 龙建银** (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆, 400038

提 要 目的: 选择检测转化生长因子 β1(Transforming growth factorβ1, TGFβ1)的灵敏可靠的方法。方法: 用水貂肺上皮细胞(CCL-64)作为抑制细胞,结合^{3}H-TdR掺入法和 MTT法,对照标准含量之 TGF-β1,分别对上述方法性能进行了比较。结果: ^{3}H-TdR掺入法较 MTT法灵敏度高,稳定性好。结论: ^{3}H-TdR掺入法测定 TGFβ1活性,简便实用,经济可靠,适于推广使用。

转化生长因子 β1(Transforming growth factor, TGFβ1)是一种多功能细胞生长调节蛋白[1],它参与了胚胎的发育、损伤组织的修复、肿瘤的发生和发展等生理病理过程,是目前众多学科的研究热点[2]。因此,研究和探索 TGFβ1生物活性测定方法具有重要的意义。本研究以细胞生长抑制法为基础,分别对^{3}H-TdR

* 李 勇,男,31岁,主治医师,讲师,博士
** 军事医学科学院基础医学研究所 北京, 100000

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

和 MTT测定方法的灵敏性、稳定性进行了比较,其检测结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

水貂肺上皮细胞株(CCL-64):引自美国 ATCC细胞保藏中心,军事医学科学院基础所陆应麟研究员惠赠; RPMI1640培养基培养、人 TGFβ1标准品购自 Promega公司,^{3}H-TdR原液(1 mCi/ml,放射比强度 25 Ci·mmol^{-1}·L^{-1}),中国原子能研究所,MTT试剂盒购自 Promega公司。

1.2 方法[3]

1.2.1 CCL-64细胞培养　常规复苏细胞,待细胞生长贴壁后换新鲜含 10%小牛血清的 1640培养液,选择生长旺盛,细胞形态好的对数生长期 CCL-64细胞用于 TGFβ1活性测定(下称测活)。

1.2.2 ^{3}H-TdR掺入测定法　用测活培养液(RPMI1640+2%小牛血清),将待测样品液(标准 TGFβ1)倍比稀释(1∶1、1∶2、1∶4、1∶8),取各稀释液 50μl分别加于 96孔板(三孔重复),同时收获对数生长期 CCL-64细胞,以 10^5/ml的细胞密度重悬于测活培养液中,按每孔 50μl接种于已加入待测样品的 96孔板中,设置空白对照孔(CCL-64细胞+测活液),于 37℃、5% CO_2条件下培养 48 h,培养结束前 6 h每孔加入^{3}H-TdR 0.5μCi,至 48 h弃培养液,D′Hank液洗涤 2次,以 0.25%胰酶、0.2% EDTA消化分散细胞后,用多通道细胞收获仪(浙江东浦仪器厂)将 CCL-64细胞收获于玻璃纤维滤纸上,烤箱内烤干滤纸后,分放于测闪瓶,加入 5 ml闪烁液,于β-液体闪烁仪(LKB-1217)上测定共^{3}H-TdR掺入量(Bq)。

其生长抑制率计算按下式进行:

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{\text{对照孔平均 Bq}-\text{实验孔平均 Bq}}{\text{对照孔平均 Bq}}\times 100\%$$

采用抑制百分数对稀释倍数的对照值作图,计算样品中的 TGFβ1相对浓度[4]。

1.2.3 MTT测定法　(参阅试剂盒说明书)CCL-64细胞悬液调整至 1×10^5/ml,接种于 96孔板(50μl/孔),同时加入倍比稀释的 TGFβ1标准品和测活培养液(50μl/孔),于 37℃,5% CO_2中孵育 48 h,每孔加入 15μl染色液,继续孵育 4 h,加入 100μl终止反应液,室温下过夜,于酶联仪(Bio-Rad450)570 nm处测定每孔 D_λ值,细胞生长抑制率按下式计算:

$$\text{抑制率}(\%)=\frac{\text{对照孔平均 }D_\lambda-\text{实验孔平均 }D_\lambda}{\text{对照孔平均 }D_\lambda}\times 100\%$$

2 结果

2.1 ^{3}H-TdR和 MTT方法灵敏性比较

以标准品人 TGFβ1定量倍比稀释的对数为横坐标,分别以^{3}H-TdR和 MTT方法所得 CCL-64细胞生长抑制率(Bq%、D_λ%)为纵坐标作图,见两法所得结果一致,均反映了 CCL-64细胞生长抑制与 TGFβ1量的负相关性。以直接回归法求得各自函数方程:

^{3}H-TdR法: Y= 99.9004- 0.8630X

MTT法: Y= 58.0339- 0.5864X

两方程回归系数分别为 0.8630和 0.5864,经回归系数假设检验证实二者差异显著($P<0.05$),说明^{3}H-TdR方法较 MTT灵敏度高。

2.2 ^{3}H-TdR和 MTT方法稳定性比较

将定量的标准品人 TGFβ1(1.5 ng/ml、4.5 ng/ml)分别用两法测定,以其抑制率理论计算值(Ŷ)、实际测定值(Y)和实际 TGFβ1含量计算值(X)见表 1,依表计算^{3}H-TdR误差率较 MTT法低。

表 1　^{3}H-TdR和 MTT方法测定 TGFβ1活性稳定性比较

	1.5 ng/ml			4.5 ng/ml		
	Ŷ	Y	X	Ŷ	Y	X
^{3}H-TdR	98.6059	98.567	1.545	96.0169	96.048	4.463
MTT	57.1543	57.258	1.322	55.3951	55.475	4.364

3 讨论

TGFβ测定方法一般分为生物学、免疫学和放射受体测定法[3]。生物学测定法是通过 TGFβ刺激或抑制敏感细胞株增殖、调节细胞基质形成、抗原表达程度来确定其活性和含量,该方法灵敏度高,比较真实反映了 TGFβ生物活性特点,直观、可靠。一般常用大鼠肾成纤维细胞软琼脂克隆法和 MV-1-Lu水貂肺上皮细胞(CCL-64)生长抑制法[5,6],所结合的^{3}H-TdR和 MTT法理论依据分别是: MTT法主要原理是线粒体琥珀酸脱氢酶能催化四甲基偶氮唑盐(MTT)形成蓝色甲　,其形成量与细胞数量和功能状态呈正相关,用酶联仪在 570 nm处测定 D_λ值可以反映甲　形成量,亦反映细胞的增殖量及状态。^{3}H-TdR方法基于细胞增殖周期中 DNA、RNA合成增加,^{3}H-TdR能被作为原料摄入细胞,测定细胞内^{3}H-TdR放射量,反映了细胞增殖情况,从而计算出抑制率与 TGFβ活性含量的关系。

免疫学测定法基于 TGFβ是蛋白质这一特点,用单抗或多克隆抗体结合 ELISA或放射免疫测定法,一般操作简便,专一性强,且能区别不同亚型 TGFβ的存在[7,8],该方法所反映的是全部 TGFβ的情况,不能客观显示活性 TGFβ的量,且不够稳定。放射受体测定法基于受体-配体结合的原理,测定包括潜活形式在内的各型 TGFβ,极具专一性,但有接触同位素及重复性差等缺点[9]。

本研究选用水貂肺上皮细胞(CCL-64)生长抑制法测定活性 TGFβ1,并将其^{3}H-TdR掺入法与 MTT法进行了比较,证明^{3}H-TdR方法较 MTT法灵敏度高、稳定性好,经济实惠,易于在 TGFβ1检测方法中推广。

(本文得到第三军医大学医学统计学教研室尹全焕教授

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

的指导和帮助,特此致谢!)

关键词 肺上皮细胞;转化生长因子;^{3}H-TdR法;MTT法

中图法分类号 R446.1

参考文献

1 Roberts A B, Sporn M B. The transforming growth factor-beta. In: Sporn M B eds. Peptide growth fatcors and their receptors. Berlin: Springer Verlag, 1990. 417~419

2 李 勇,韩本立. TGFβ与器官移植.国外医学:创伤与外科基本问题分册,1995,16(4):196

3 虞冠华,许祥裕,丁树标.转化生长因子β的测定.上海免疫学杂志,1995,15(2):116

4 龙建银,王会信,张宏权.人转化生长因子β_1 cDNA在COS-7细胞中的表达.生物化学杂志,1995,11(4):396

5 Rizzino A. Soft agar growth assays for transforming growth factors and mitogenic peptides. Methods Enxzymol, 1987, 146: 341

6 Van Zoelen E J J, Van Oostward T M J, De Last S W. PDGF-like growth factor induces EGF-potentiated phenotypic transformign of normal rat kidney cells in the absence of TGFβ. Biochem Biophys Res Comm, 1986, 141(3): 1229

7 Flanders K C, Roberts A B, Ling N, *et al*. Antibodies to peptide determinants in TGFβ and their applications. Biochem, 1988, 27(2): 739

8 Ksander G A, Gerhardt C O, Dadch J R, *et al*. A novel polyconal antibody (CL-B1/29) for immunoloculization of TGFβ in adult mouse. J Histochem Cytochem, 1990, 38(12): 1831

9 Boyd F T, Cheifetz S, Andres J, *et al*. Transforming growth factorβ receptors and binding proteoglycans. J Cell Sci, 1990, 13(Suppl): 131

(收稿: 1998-09-05;修回: 1998-12-29)

(编辑 刘 鹏)

改进压力放大器实现四路张力测定

Simultaneous four-channel tension measurement with improved pressure amplifier

曹利飞* (第三军医大学基础医学部高原医学研究室)重庆,400038

刘福玉 (第三军医大学基础医学部病理生理学教研室)重庆,400038

提 要 目的:利用高灵敏度、线性好的肌张力传感器,实现离体血管或组织的四路张力同步监测。方法:用倍率开关设定或改变增益输出幅值,分别对四块压力板定标。结果:四路张力同步测量,线性度好,灵敏度高。结论:通过改进压力放大器,可实现四路张力同步测定,简便、可靠。

基础医学教学、科研或临床工作中,压力传感器与压力放大器(即载波放大器 Carrier amplifier,常称压力板)配套后,通常用于测量动、静脉血压、心室内压、颅内压、膀胱压、胃肠压等压力变化[1~3]。但用八道生理记录仪和四道生理记录仪中的配件 AP-601G、AP-601G、AP-621G和 AP-630G四块压力板,同时监测四段离体血管或组织平滑肌张力的报道甚少。由于压力板型号不同,即使采用相同的高灵敏度、高线性度的 JH-2A肌张力传感器与之连接后,仍存在信号不匹配与非线性的矛盾。为解决这个问题,我们通过压力板增益放大级与传感器灵敏度匹配原理的分析,找到不同型号压力板与 JH-2A传感器匹配方法,达到四块压力板灵敏、线性、稳定可靠地同步测量离体血管或组织平滑肌张力的目的,为科研工作的完成节约了时间和经费。

1 改进思路

压力板接入 JH-2A传感器存在的问题:四块压力板分别用于血压测量时,传感器灵敏度被增益系数或倍率开关设定的匹配范围,限制在 27~50μV/cmHg或 100~1000μV/cmHg内。本实验欲利用四块压力板插入四道内,同步测定 0~10 g张力,但 JH-2A传感器灵敏度高达 4 000μV/g,远远超出上述测定压力的匹配范围。若将 JH-A传感器直接接入压力板,按下测量键 MEAS,用 2 g砝码悬挂于 JH-2A传感器上定标,则出现 200 mmHg/DIV以上数值;悬挂 4 g砝码,压力板输出信号幅值却不能等量增加至 400 mmHg/DIV。此外,压力和张力在数值与单位上,还存在如何合理等效的问题。

解决方法:① 块压力板中,AP-601C和 AP-630G设有倍率开关。在 JH-2A传感器接入后,调试时,可将它们的 K205和 S201倍率开关分别由"×1"搬向"×10"位置便可实现匹配。当用 2 g砝码定标时,将记录纸上达 2 g/cm(也可根据实验需要

* 曹利飞,男,51岁,高级实验师

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