DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.030

用^{3}H-TdR 4 小时释放法检测自然杀伤细胞活性

黄晋生 刘为纹 袁爱力 张方信 (第三军医大学西南医院消化科) 630038

自然杀伤细胞(Natural Killer Cells,NK)活性是反应机体细胞免疫功能的重要指标之一。国内应用较多的检测方法为^{125}I-尿嘧啶核苷(^{125}I-UdR)18h 释放法和^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)18h 释放法。这两种方法均需要较长时间孵育,而且由于长时间孵育需要无菌操作,给检测工作带来很多不便。为缩短实验时间,简便操作,我们将^{3}H-TdR 释放法的孵育时间缩短为 4h,取得较满意的结果。

1 材料与方法

1.1 ^{3}H-TdR(上海原子能研究所生产)胰酶(Difco 公司生产)

1.2 靶细胞的标记

取传代 1～2d 的 K562 细胞,调整细胞浓度至 1×10^6/ml,加入^{3}H-TdR 3.7×10^4 B_q,置于 37℃水浴中,15min 振摇一次,标记 4h,RPMI-1640 培养液洗 3 次后,调整细胞浓度至 1×10^5/ml,用锥蓝染色检查细胞活力>95%,标记率可达 0.5～1.0 cpm/细胞。

1.3 效应细胞的制备

按本室常规[1]。

1.4 ^{3}H-TdR 4h 释放法

将^{3}H-TdR 标记的 K562 细胞悬液(1×10^5/ml) 0.1ml 和上述效应细胞悬液($2.5\sim5.0\times10^6$/ml) 0.1ml 加于 96 孔培养板上,自然释放对照用 RPMI-1640 培养液代替效应细胞悬液,终体积 0.2ml,每组 3 个复孔,37℃ 5% CO_2 孵箱孵育 4h,届时每孔加 3%的胰酶 10μl,继续孵育 30min,30min 后每孔加 50μl 冷 Hanks 液中止反应,然后用多头细胞收集器收集细胞于 49 型玻璃纤维滤纸上,烘干后将膜片置于闪烁瓶内,加闪烁液后用自动液闪仪检测 cpm 值, 自然释放率平均为 4.83%(0.07%～10.98%)。NK 细胞活性按下列公式计算:

$$\text{NK 细胞活性\%}=\left(1-\frac{\text{实验组 cpm 均值}}{\text{自然释放组 cpm 均值}}\right)\times100$$

2 结果

2.1 ^{3}H-TdR 4h 释放法与 18h 释放法的比较

3 次实验共 4 例献血员同时用^{3}H-TdR 4h 释放法和 18h 释放法测定 NK 细胞活性,结果见附表。

附表 ^{3}H-TdR 4h 释放法与 18h 释放法的比较

	4h		18h	
No	E/T=50	E/T=25	E/T=50	E/T=25
1	34.33	17.60	30.22	13.74
2	35.19	30.34	50.55	43.41
3	42.42	26.06	61.63	46.12
4	27.83	18.65	43.09	34.68
$\bar{x}$	34.94	23.09	46.37	34.68
s	5.97	5.97	13.19	14.68

注:效应细胞/靶细胞(E/T)

2.2 健康献血员及肿瘤病人的 NK 细胞活性

15 例健康献血员的 NK 细胞活性(用终浓度 0.15%的胰酶处理)E/T=50 时,均值±标准差为 40.80±15.12;E/T=25 时为(31.95±15.22);12 例肿瘤病人的 NK 细胞活性在 E/T=25 时为 13.25±7.65,显著低于健康献血员相同效靶比的 NK 细胞活性(31.95±15.22)($P<0.01$)。

3 讨论

国内用^{3}H-TdR 释放法检测自然杀伤细胞活性时多采用 18h 孵育法,其用时较长的主要原因是考虑孵育时间短时所测杀伤活性值较低,但我们发现,用 4h 孵育,终浓度为 0.15%的胰酶处理后所测杀伤活性值较 18h 孵育法低、但已可达到较高水平,15 例健康献血员用^{3}H-TdR 4h 释放法所测自然杀伤细胞活性在 E/T=50 时, 均值±标准差为 40.80±

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

15.12%；E/T＝25 时为 31.95±15.22%；因此我们认为用^{3}H-TdR 释放法检测自然杀伤细胞活性时可采用 4h 孵育法。12 例肿瘤病人自然杀伤细胞活性在 E/T＝25 时为 13.25±7.65%，显著低于健康献血员相同效靶比的 NK 细胞活性(31.95±15.22)($P<0.01$)。此结果符合肿瘤病人免疫功能低下的一般规律。

关键词 杀伤细胞；天然；胸腺嘧啶核苷分析

参考文献

1. 黄晋生 刘为纹 晋华源。胃癌及慢性萎缩性胃炎患者自然杀伤细胞活性的观察。第三军医大学学报 1988；10(增刊)：109

(收稿：1991-09-11；修回：1992-01-18)

高效液相色谱—电化学检测法测定心肌组织中的儿茶酚胺

朱珠 陈兆珍 (第三军医大学训练部中心实验室) 630038

儿茶酚胺(CAs)包括肾上腺素(A)，去甲肾上腺素(NA)及多巴胺(DA)，是人体含量极微而又具有重要生理活性的激素和神经递质，为生理学及临床医学上重要研究对象。测定这些物质国内外曾有报道用高效液相色谱(HPLC)、气质联用、放射免疫和酶免疫等分析方法[1,2]，但这些方法分别存在操作手续麻烦，价格昂贵等缺点。近几年兴起的 HPLC—电化学检测分析法，具有快速、简便、灵敏、能同时测定 CAs 及其代谢产物的优点，是目前比较理想的检测方法[3]。本实验采用反相离子对色谱—电化学检测分析方法，以 D-樟脑-β-磺酸为离子对试剂[4]，生物样本处理简单，较好的测定了这类化合物。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters HPLC(810 系列)，配备 510 泵，U6K 进样器，460 电化学检测器。

1.2 试剂

去甲肾上腺素(NA)、肾上腺素(A)、多巴胺(DA)均由本校烧伤研究所提供。甲醇、乙腈为色谱纯，其余试剂为分析纯，实验用水为超纯水(经 Millipore 超纯水器净化)。

1.3 色谱条件

色谱柱：waters Bondpark C_{18}柱(3.9mm×30cm)。流动相：每 1000ml 流动相中含 D-樟脑-β—磺酸 10mmol/L，KH_2PO_4 0.05mol/L，Na_2.EDTA 0.1mmol/L，甲醇 100ml，乙腈 20ml。5mol/L NaOH 调 pH 为 3.5 左右。流量：1.0ml/min，检测灵敏度：10nAFS，进样体积：50μl，工作电压：+0.65V。

1.4 样本采集

麻醉条件下活体取狗心肌组织，加入 0.1mol/L 高氯酸冰浴中制成匀浆(1mg 组织加 20μl 左右)，在 18 000 转/min，4℃离心 20min，取上清液进样分析。

2 结果

2.1 实验色谱图：

图 1 为混合标样分离色谱图，从图中可以看出 NA、A、DA 都达到基线分离。

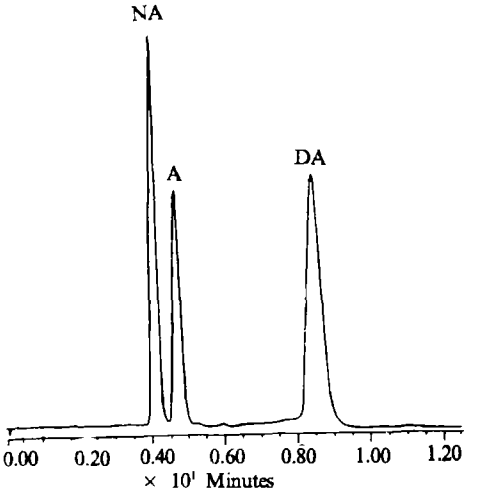


图 1 CAs 混合标准液色谱图

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