聚乙二醇沉淀-补体消耗试验检测家兔循环免疫复合物

何礼芳 董奎微 谢佩蓉 冯庆和 陈 朴

（免疫研究室）

提 要

以牛血清白蛋白（BSA）为抗原，大剂量(250毫克/公斤体重)一次注入家兔耳静脉内，造成动物“一过性”血清病。隔日采集静脉血，分离血清于 -40℃冻存，在统一条件下用聚乙二醇沉淀-补体消耗试验检测家兔循环免疫复合物（CIC）的动态，并用CH_{50}试验平行测定血清中总补体量。实验结果表明：家兔于注射BSA抗原后第6天开始检出CIC，第10天达最高峰，第12天下降；血清中补体含量与此相反，第6天开始下降，第10天下降到最低水平，第12天后又逐渐回升。本法检测家兔急性实验性血清病CIC较为适用。

近年来，国内对免疫复合物病的研究正逐步深入开展。免疫复合物病的病理变化在实验动物模型上也得到证实。目前对CIC的检测方法很多，较为常用的检测方法有^{125}I-C_1q结合试验[1]，固相C_1q酶联免疫吸附法和Raji细胞放射免疫分析法等。这些方法均不甚简便易行。本文采用聚乙二醇沉淀-补体消耗试验（PEG-CC）[2][3]对家兔进行了CIC的动态观察和并用CH_{50}试验[4]平行测定总补体量，现报导如下。

材料与方法

一、本校动物所饲养的健康大耳白兔31只，平均体重3.1±1.2公斤。按Dixon[5]和Wilson[6]的方法，以BSA为抗原，大剂量(250毫克/公斤体重)一次注入家兔耳静脉内，造成动物“一过性”血清病。于注射抗原前及注射抗原后隔日（即第2、4、6、8、10、12、14、16天）采静脉血，分离血清小量分装于试管内，-40℃冻存备用。

二、聚乙二醇沉淀-补体消耗试验按Kristensen等[3]法加以改进，即取家兔血清标本0.3毫升，加入pH7.5 0.2M EDTA-Na_2 0.1毫升，放37℃水浴箱作用30分钟，加3.5%PEG（分子量为6000）1毫升，混匀，在4℃静置90分钟，PEG的最终浓度为2.5%，然后，以3000转/分，离心20分钟，沉淀物用2.5%PEG洗涤一次，弃尽上清，加pH7.4含钙、镁的巴比妥盐缓冲液（VBS）0.3毫升，混匀，放4℃过夜。次日加入100单位正常豚鼠血清40微升（补体），置37℃水浴箱内30分钟，取出0.2毫升用pH7.4VBS液作一系列倍比稀释，每管再加2%致敏绵羊红细胞（即4%绵羊红细胞悬液与32单位溶血素等量混合37℃15分钟）0.2毫升，与残留的补体反应30分钟（37℃），取出加入冷pH7.4VBS液2毫升终止反应，以3000转/分，离心5分钟，其上清液用721型分光光度计于545nm测定光密度值（OD），以pH7.4VBS液代替血清标本作对照管，同时测定观察补体消耗情况，用2%致敏绵羊红细胞作50%标准溶血管，以抗补体活性(CH_{50}溶血抑制率%)表示CIC含量，根据溶血反应求出补体的消耗率，用下式计算PEG沉淀的补体消耗率（PEG-CC%）。

$$\text{PEG-CC\%} = \left(1 - \frac{\text{试验管 } CH_{50} \text{ 单位}}{\text{对照管 } CH_{50} \text{ 单位}}\right) \times 100$$

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

三、血清总补体量的测定（CH_{50}试验）[4]：取冰冻于－40℃保存的家兔血清0.2毫升，用pH 7.4VBS液作一系列倍比稀释，每管加2%致敏绵羊红细胞0.2毫升，放入37℃水浴中30分钟，取出后加入冷VBS液2毫升，以3000转/分，离心5分钟，其上清液用721型分光光度计在545nm测溶血时所释放的血红蛋白量与当天配制的50%溶血标准管相比较，求出50%溶血的补体值。按下式计算血清中每毫升补体含量（单位）。

血清中每毫升补体含量（单位）

$$= \frac{1}{\text{血清用量}} \times \text{释稀倍数}$$

结　果

一、急性血清病家兔循环免疫复合物的动态变化：

我们应用PEG-CC试验检测了正常家兔的抗补体活性为19.26±25.06（$\bar{X}\pm S.D$，n=24），以抗补体活性（CH_{50}溶血抑制率%）表示CIC含量。急性血清病家兔抗补体活性的变化结果见表1，免疫后第2、4天无明显差异（$P>0.05$），免疫后第6、8、10、12天与免疫前相比CH_{50}溶血抑制率%相差非常显著（$P<0.01$），免疫后第16天开始恢复正常（$P>0.05$）。急性血清病家兔抗补体活性的动态关系结果见图1，循环内BSA-兔抗BSA复合物于注射抗原后第6天开始检出，第10天达最高峰，

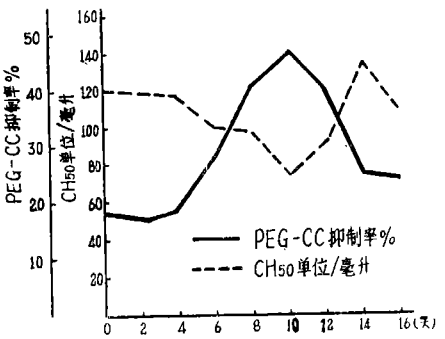


图1　急性血清病家兔血清补体含量和抗补体活性的动态关系

第12天开始下降，上述结果证明：CIC的检出与动物接受抗原刺激后的天数有关系。

二、急性血清病家兔血清中补体含量的变化：

家兔血清中总补体含量用CH_{50}试验检测，以CH_{50}单位/毫升表示结果。正常家兔血清总补体含量为118.35±40.4CH_{50}单位/毫升（$\bar{X}\pm S.D$，n=31）。急性血清病家兔血清补体含量的变化结果见表1，免疫后第2、4天无明显变化（$P>0.05$），免疫后第6、8天与免疫前相比血清总补体量下降显著（$0.05>P>0.01$），第10、12天下降最低（$P<0.01$），免疫后第14、16天血清中补体含量回升（$p>0.05$）。上述结果表明：由于CIC的形成消耗了大量补体，导致血清中总补体含量的降低。

表1　急性血清病家兔血清补体含量和抗补体活性的变化

BSA免疫后天数	补体CH50单位/毫升 $\bar{X}\pm S\cdot E$	P值*	PEG-CC抑制率% $\bar{X}\pm S\cdot E$	P值
免疫前	118.35±7.254		19.26±5.117	
免疫后2	116.35±7.606	>0.05	16.27±4.81	>0.5
免疫后4	114 ±8.267	>0.05	18.91±4.48	>0.05
免疫后6	99.94±8.465	0.05>P>0.01	28.21±4.20	<0.01
免疫后8	97.07±9.313	0.05>P>0.01	42. 1±5.21	<0.01
免疫后10	75.58±9.887	<0.01	48.61±5.33	<0.01
免疫后12	90.43±8.807	<0.01	40.77±3.96	<0.01
免疫后14	131.96±9.433	>0.05	29.54±5.42	0.05>P>0.01
免疫后16	108.36±9.547	>0.05	25.03±4.10	>0.05

*：t检验的P值。CH50试验 n=31；　PEG-CC试验 n=24

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨　论

用PEG沉淀法检测CIC是Digeon等提出[7]，利用低浓度的PEG在碱性溶液中沉淀血清中免疫复合物（IC）。最适的PEG浓度为2.5～3.5%，我们所用PEG的浓度为2.5%。本法具有简单、快速、无需特殊仪器等优点，是目前较为常用的方法之一，但敏感性和特异性不高且易受温度的影响。补体消耗试验是利用某些可溶性CIC可结合和消耗补体的性能，通过加入一定量的补体使血清中含有的IC和补体发生结合，观察溶血反应的程度，测定多余的补体活性来了解被检标本中是否存在CIC，以抗补体活性（CH_{50}溶血抑制百分率）表示CIC含量。

PEG-CC试验是将上述两种方法联合应用，先用低浓度（2.5%）的PEG沉淀血清中大分子可溶性CIC，然后，再用抗补体反应测定CIC含量。而CH_{50}试验是测定血清中补体的水平。应用PEG-CC试验检测急性实验性血清病家兔循环内免疫复合物较为适用，本文观察了24只实验家兔抗补体活性的动态变化，同时观察了31只家兔血清补体含量的变化。实验结果表明：循环内BSA-兔抗BSA复合物于注射抗原后第6天检出，第10天达最高峰，第12天开始下降。而血清总补体含量与此相反，注射抗原后第6天开始下降，第10天下降至最低水平，第12天后又逐渐回升，这与Cochrane的实验结果相一致。PEG-CC试验简便易行，重复性亦好，是一种适用于检测家兔实验性急性血清病CIC的方法，如能同时检测血清总补体含量，则更为适宜。

参　考　文　献

1. Zuber RH, et al: J of Immunology 1976; 116(1):232
2. Nielsen H, et al: Acta Pathal Microbiol, Scand Sect C, 1976;84:261
3. Kristensen E, et al: Cancer Immunol, Immunother 1980;9:31
4. 余贺等：临床免疫技术　第一版　p118，上海科学技术出版社，1982
5. Dixon FJ, et al: J Exp Med 1960; 113:899
6. Wilson CB: J Immunol 1970; 105:279
7. Digeon M, et al: J Immunol Method 1977; 16:165

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net