

• 论 著 •

小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴定*

张淑莉¹, 张 琪², 景晓红¹

(1. 西安医学院医学技术系检验中心, 陕西西安 710021; 2. 陕西省核工业 417 医院, 陕西西安 710600)

摘要: 目的 探讨小鼠腹腔诱导和提取巨噬细胞的简便方法。方法 以 5% 淀粉肉汤刺激诱导小鼠产生炎性腹腔巨噬细胞, 分离获取小鼠腹腔巨噬细胞, 在含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中培养, 显微镜观察细胞形态, 台盼蓝染色鉴定细胞活力, 体内吞噬鸡红细胞测定其吞噬率、吞噬指数, 瑞氏染色、免疫细胞化学染色鉴定细胞纯度。结果 获得高纯度、高细胞活性的巨噬细胞, 具备巨噬细胞的形态特征。结论 该研究采用的方法简单实用, 可提取大量巨噬细胞。

关键词: 小鼠; 巨噬细胞; 提取; 鉴定**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.012**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2015)02-0174-03

Extraction and identification of mouse peritoneal macrophages*

Zhang Shuli¹, Zhang Qi², Jing Xiaohong¹(1. Testing Center, Department of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China;
2. 417 Hospital of Nuclear Industry in Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710600, China)

Abstract: Objective To explore a simple method for inducing and extracting of mouse peritoneal macrophages. **Methods** 5% starch broth was used to stimulate inflammatory peritoneal macrophages in mice. Mouse peritoneal macrophages were isolated and cultured in RPMI1640 containing 10% serum. The cell morphology was observed by microscope. Trypan blue staining was used to identify the cell viability. In vivo phagocytosis of chicken red blood cell phagocytosis rate, phagocytic index determination were detected. Wright's staining, Immunocytochemical staining were used to identify the cell purity. **Results** High purity, high activity of macrophages were obtained, which also had the morphological characteristics of macrophages. **Conclusion** The method in this study is simple and could extract a large number of macrophages.

Key words: mice; macrophage; extraction; identification

巨噬细胞是主要的免疫调节和免疫应答细胞, 广泛存在于机体各种组织中, 具有抗感染、抗肿瘤和参与免疫应答、免疫调节等生物学功能^[1-2]。尽管国内外已有文献报道能从多种组织和器官中分离、纯化巨噬细胞^[3-4], 但这些方法大多操作复杂, 对技术要求较高。因此, 如何从组织器官中分离、纯化获得高纯度、高活性的巨噬细胞, 如何选择适当的细胞提取及鉴定方法是体外细胞培养的研究热点。本研究以小鼠腹腔巨噬细胞为研究对象, 用淀粉刺激诱导小鼠腹腔产生炎性细胞, 再贴壁培养腹腔液, 并进行鉴定和功能检测, 旨在探讨这一方法培养巨噬细胞的可行性。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康小鼠 10 只, 体质量 18~22 g, 雌性, 出生 6~8 周龄, 由第四军医大学实验动物中心提供。**1.2 仪器与试剂** RPMI1640 培养液(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 和 10% 胎牛血清), 无血清 RPMI1640 培养液, 5% 淀粉肉汤, 5% 鸡红细胞悬液, 瑞氏染液, 台盼蓝染液, 非特异性酯酶染色剂。超净工作台, 二氧化碳培养箱, 倒置显微镜, 高速低温冷冻离心机, 牛鲍计数板, 24 孔塑料培养板等。

1.3 方法

1.3.1 5% 鸡红细胞悬液制备 鸡腋下静脉采血保存于 Alsever 液中, 血液与 Alsever 液的体积比为 1:4, 置 4 ℃冰箱保存, 2 周内使用。临用前以无菌生理盐水洗涤 3 次, 每次离心弃上清液(2 500 r/min, 10 min), 最后用生理盐水配成 5% 的

鸡红细胞悬液。

1.3.2 5% 淀粉肉汤制备 蒸馏水 100 mL, 加入牛肉膏 0.3 g, 蛋白胨 1.0 g, 氯化钠 0.5 g, 可溶性淀粉 5 g, 加热助溶, 再煮沸灭菌, 置 4 ℃冰箱保存。**1.3.3 小鼠腹腔巨噬细胞的诱导** 乙醇消毒小鼠腹部皮肤, 向每只小鼠腹腔注射 5% 淀粉肉汤溶液 1 mL, 每天 1 次, 连续 3 d。**1.3.4 小鼠腹腔液巨噬细胞的收集** 将小鼠颈椎脱臼处死, 浸入 75% 酒精溶液消毒 2~3 min。取出小鼠, 置于无菌纸上, 腹面向上固定小鼠, 无菌条件下打开小鼠腹腔, 用眼科镊提起下腹部皮肤, 用剪刀沿腹中线剪开一小口, 暴露腹膜, 注意勿伤及腹膜壁, 向腹膜腔注射预冷的不含小牛血清的 RPMI1640 培养液 5 mL, 轻柔小鼠腹部 5 min 后, 用吸管反复冲洗腹膜腔灌洗液 2 次, 回收灌洗液。**1.3.5 贴壁、纯化培养巨噬细胞** 将回收的灌洗液注入干净的离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 连续离心 2 次, 弃上清液。所得细胞沉淀用预冷 RPMI1640 培养液洗涤, 将沉淀细胞再加入预冷 RPMI1640 培养液重悬细胞, 以常规方法计数细胞, 用预冷培养液调整腹腔细胞浓度至 2×10^6 /mL。将细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 1 mL 每孔, 置于 37 ℃、5% 二氧化碳饱和湿度的培养箱中静置培养, 使巨噬细胞贴壁, 孵育 2~4 h 后, 轻摇培养板, 弃培养上清液, 用 37 ℃ 预温的 RPMI1640 培养液轻轻冲洗培养孔 1~2 次, 充分弃去非黏附的淋巴细胞和

* 基金项目: 西安医学院质量工程检验实验示范中心支持项目(XYZL2010-18); 西安医学院校级科研基金大学生科研项目(11DXS11)。

作者简介: 张淑莉, 女, 实验师, 主要从事检验医学实验教学与实验室管理研究。

其他细胞，获得贴壁细胞即为单层的巨噬细胞。

1.3.6 瑞氏染色 取 1 滴腹腔液滴加于洁净载玻片上，制备涂片，自然干燥，瑞氏染色后将干燥好的涂片置光学显微镜下观察。先用低倍镜观察涂片体尾交界处细胞薄厚分布及染色情况，再用(10×100)油镜计数细胞。

1.3.7 台盼蓝染色 取巨噬细胞悬液 0.5 mL，滴加等量 0.4% 台盼蓝染液置于 Eppendorf 管中，混匀，取 1 滴染色的细胞悬液滴加入牛鲍计数板中，静置 2~3 min 待细胞下沉后，将计数板置显微镜下计数：3 min 内计数 200 个细胞，并用活细胞占计数细胞的百分比表示其活力。

1.3.8 巨噬细胞体内吞噬功能检测 取巨噬细胞悬液 0.5 mL，加入 5% 鸡红细胞悬液 0.1 mL，混匀，在 37 °C、5% 二氧化碳饱和湿度的培养箱中静置孵育 30 min，每 10 min 摆 1 次。1 000 r/min 离心 5 min，取细胞沉淀物滴加于洁净载玻片上，每片加 0.5 mL，制成涂片，晾干，瑞氏染色后在光学显微镜下观察，每张涂片计数时重复 3 次取平均值。油镜(10×100)下观察计数 200 个巨噬细胞，同时记录被吞噬的鸡红细胞总数。吞噬百分率(%)= 吞噬鸡红细胞的巨噬细胞数/200×100%，吞噬指数= 被吞噬鸡红细胞数/200。

1.3.9 细胞的酶化学检测 采用非特异性酯酶(NSE)染色法， α -醋酸萘酚酯(α -ANE)^[5] 酶对培养 3~5 d 的细胞染色，以 10% 甲醛生理盐水固定，甲基绿水溶液复染，甘油明胶封片。

2 结 果

2.1 培养细胞的形态观察 巨噬细胞贴壁培养 24 h 后，用显微镜可观察到细胞形态多样，呈圆形、椭圆形、梭形、不规则形，体积较大，胞浆丰富，周围可见少许伪足。培养 3~7 d 后巨噬细胞体积明显增大，周围伪足明显增多。见图 1。

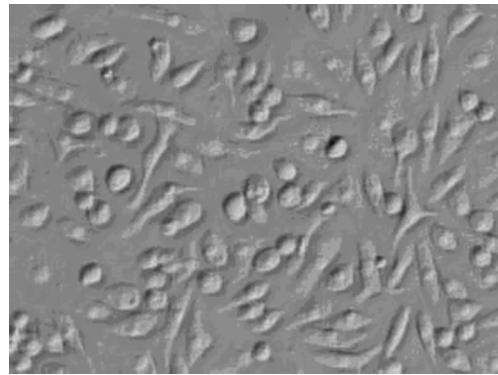


图 1 小鼠腹腔巨噬细胞光镜下的细胞形态(4×10)

2.2 瑞氏染色形态观察 油镜下可见巨噬细胞体较大，形状不规则，呈圆形、椭圆形或肾形，可见伪足和突起，胞浆丰富，淡蓝色，含有空泡和着色颗粒。胞核较小，呈卵圆形、肾形或不规则性，常偏于细胞一侧，具有典型巨噬细胞形态学特征。瑞氏染色结果显示巨噬细胞的纯度大于 98%。

2.3 台盼蓝染色形态观察 在台盼蓝染色下，活细胞拒染呈无色透明状，有折光性，而死细胞被染成明显的蓝色，体积略膨大。巨噬细胞活力=未被台盼蓝染色细胞总数/200 个巨噬细胞数×100%。台盼蓝染色结果显示巨噬细胞成活率大于 98%。

2.4 巨噬细胞体内吞噬功能检测结果 鸡红细胞吞噬率为 79%，吞噬指数 0.68。油镜下观察可见鸡红细胞呈椭圆形，具有椭圆形的细胞核，经瑞氏染色后胞浆呈粉红色，核呈紫蓝色，镜下可见小鼠腹腔巨噬细胞体积较大呈肾形、圆形或不规则形。巨噬细胞吞噬鸡红细胞可观察到有以下几种吞噬状态：1 个或多个鸡红细胞紧附于巨噬细胞表面，且部分已被吞入；1

个或几个红细胞已被吞噬细胞吞入，吞噬细胞的胞质中刚形成椭圆形的吞噬体；已吞噬多个鸡红细胞的巨噬细胞，胞浆内可见多个鸡红细胞，巨噬细胞核被挤压到一侧。见图 2。

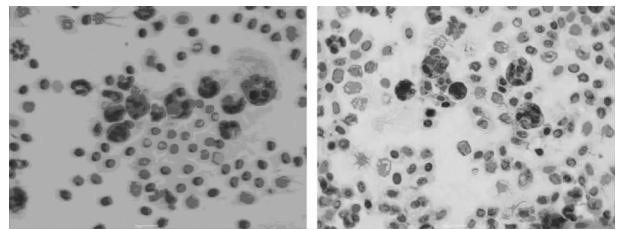


图 2 油镜下的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬鸡红细胞形态(10×100)

2.5 细胞的酶化学检测 酶活性部位为细胞浆内出现棕黑色弥散颗粒状沉淀为酯酶阳性，胞浆内无沉淀者为阴性。光学显微镜下计数 200 个细胞，阳性率达 83%。

3 讨 论

巨噬细胞是由血液中单核细胞分化而来，在正常情况下单核细胞可以从血液中移行到各种组织中，并分化成相应组织的巨噬细胞，如肺中肺泡巨噬细胞、骨组织中的破骨细胞、肝脏中的库普弗细胞、中枢神经组织中的小胶质细胞等。当组织发生损伤或炎性反应时，单核细胞可加速移行至损伤或炎性反应组织，分化成巨噬细胞，参与免疫防御。巨噬细胞参与清除机体组织在生长、发育、修复等过程中的衰老、凋亡及坏死细胞，对机体的生长发育、组织修复、内环境稳定起着至关重要的作用。巨噬细胞通过其吞噬功能可有效清除病原体，对机体抗感染起着重要作用，被广泛应用于体外免疫增强药物的非特异性免疫功能评价^[6]。

随着体外分离技术的发展，巨噬细胞的提取方法有多种，细胞来源有猪、兔、大鼠、小鼠等。由于研究目的不同，在体内提取细胞的部位也不同，如提取肺血管巨噬细胞、肾小球巨噬细胞、髓基质巨噬细胞、腹腔巨噬细胞等^[7-9]。本研究选择小鼠腹腔取材，小鼠腹腔内血管丰富，通过在腹腔内注射淀粉溶液后造成无菌炎症，血液中的单核细胞透过血管壁到腹腔内分化成巨噬细胞。这种方法取材方便、价格便宜，且获取的巨噬细胞为激活的巨噬细胞，体积大，周围有伪足，运动活跃，是研究巨噬细胞运动和吞噬功能的理想原代细胞。再利用巨噬细胞黏附能力强的特性取小鼠腹腔灌洗液，纯化巨噬细胞。本研究表明淀粉肉汤刺激小鼠可以获得高纯度、高活性的巨噬细胞，与相关文献报道一致^[10]。

巨噬细胞的鉴定指标主要包括形态学、生物学功能、酶细胞性检查等。取小鼠腹腔灌洗液，提取细胞后进行台盼蓝染色、瑞氏染色进行鉴定，观察结果表明，本研究培养的贴壁细胞具有巨噬细胞的形态特征，可获得纯度大于 98% 活性高的巨噬细胞。巨噬细胞最重要的生物学特征是具有强大的吞噬能力，在鉴定中选用体内吞噬鸡红细胞实验来观察贴壁细胞的吞噬功能，研究结果显示贴壁细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率为 79%，吞噬指数 0.68。说明本研究培养的贴壁细胞具有强大的吞噬功能，进一步对贴壁细胞进行酶化学染色，结果显示贴壁细胞 NSE 染色阳性率为 83%。

综上所述，对小鼠腹腔巨噬细胞进行体外诱导，短时间培养后获得大量贴壁生长细胞，通过形态学观察、细胞活力测定、瑞氏染色、吞噬试验及酶化学检测，证实所培养贴壁细胞是高纯度、高活性的巨噬细胞。本研究所采用的巨噬细胞体外分离培养方法较为简单，易于操作且重复性较好，(下转第 178 页)

中体外循环时间越长,围术期 RBC 输注的风险越大,而主动脉夹闭时间越长,患者围术期输注 FFP 的风险也越大。

临床 FFP 输注主要用于补充患者体内凝血因子水平,纠正出血,PT 和 APTT 测定分别是外源性和内源性凝血系统较理想和常用的筛选试验,可作为相应凝血因子的定量试验,通常,其结果大于正常值的 1.5 倍可作为临床 FFP 输注的指征,然而,本研究并未发现 FFP 输注与患者术前 PT 和 APTT 时间的关系。另外,本研究却发现 FFP 输注与术前 Hb 水平具有相关性,分析其原因在于临床实践中,尤其是冠脉搭桥这种大型手术中,临床医生申请 RBC 时多与 FFP 等比例配合申请,以防止大量输注 RBC 而导致的稀释性凝血功能障碍,同时,大量研究已经证明体外循环过程对患者血液正常凝血状态的破坏^[5-6],因此 FFP 与悬浮 RBC 配合的预防性输注,在补充凝血因子的同时,可减少稀释性凝血因子缺乏和 PLT 破坏所导致凝血功能障碍发生的风险。然而,本研究中发现的 FFP 输注量与术前 PT、APTT 检测无明显相关性,这是否是临床滥用 FFP 的表现之一,这种 RBC 与 FFP 的配合性等比例输注是否真正有效,仍有待进一步研究。

On-pump CABG 患者围术期输注 PLT 量则与术前 PLT 计数明显相关,291 例患者中输注 PLT 的患者仅 36 例,术前 PLT 水平越高,患者输注 PLT 的风险就越小(B: -0.002; 95% 置信区间 -0.003~0.001),此外,本研究中 PLT 输注的影响因素还包括心功能分级,术前 Hb 水平和主动脉夹闭时间等。

血液是最宝贵的医疗资源之一,输血是疾病抢救和临床治疗中不可替代的重要手段,然而随着输血医学的发展,人们逐渐认识到输血作为治疗的同时,其导致的不良反应和负性作用不可忽视,如溶血反应、过敏性休克、输血相关急性肺损伤、输血相关疾病传播等^[7]。此外,越来越多的研究表明,血液在保存过程中发生了一系列的生物和物理变化,导致血液功能的改变,大量输注此类血液可导致机体免疫抑制,感染风险增高,炎症和肿瘤发生等^[8-11]。因此,加强临床用血管管理,推动临床合理用血是一项重要而艰巨的任务^[12-13]。目前,针对体外循环冠状动脉旁路移植手术的患者,国内并没有针对其输血量的参考和指南,本研究通过对 291 例 on-pump CABG 患者围术期输血情况的分析,探讨了 RBC、FFP 和 PLT 输注的主要影响因素,希望对此类患者的临床输血申请提供一定的参考,为输血科指导临床合理用血提供一定实验依据。

参考文献

[1] Assmann A, Benim AC, Guel F, et al. Pulsatile extracorporeal cir-

(上接第 175 页)

是一种快速实用的小鼠腹腔巨噬细胞的分离方法。

参考文献

- [1] 徐远义,黄允宁,常越,等.多抗甲素诱导小鼠腹腔巨噬细胞对癌细胞杀伤增强机制的研究[J].免疫学杂志,2006,22(4):396-398.
- [2] 黄琼,李志,杨杏芬,等.流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能[J].中国药理学与毒理学杂志,2007,21(2):140-146.
- [3] 秦凤华,谢蜀生.小鼠骨髓基质巨噬细胞系的建立及鉴定[J].科学通报,1998,43(2):178-184.
- [4] 郭瑞清,祝彼得.腹腔巨噬细胞培养上清液对小鼠血发生的影响[J].解剖学报,1992,23(3):300-304.
- [5] 谢锦玉.现代细胞化学技术及其在中医药中的应用[M].1 版.

culation during on-pump cardiac surgery enhances aortic wall shear stress[J].J Biomech,2012,45(1):156-163.

- [2] Rinder CS, Bohnert J, Rinder HM, et al. Platelet activation and aggregation during cardiopulmonary bypass[J]. Anesthesiol, 1991, 75(3):388-393.
- [3] Kumar AB, Suneja M, Bayman EO, et al. Association between postoperative acute kidney injury and duration of cardiopulmonary bypass: a Meta-Analysis[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2012, 26(1):64-69.
- [4] Anderson AJ, Barros N, Costa MA, et al. Predictors of mortality in patients over 70 years-old undergoing CABG or valve surgery with cardiopulmonary bypass[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2011, 26(1):69-75.
- [5] Chan AK, Leaker M, Burrows FA, et al. Coagulation and fibrinolytic profile of paediatric patients undergoing cardiopulmonary bypass[J]. Thromb Haemost, 1997, 77(2):270-277.
- [6] Williams GD, Bratton SL, Riley EC, et al. Coagulation tests during cardiopulmonary bypass correlate with blood loss in children undergoing cardiac surgery[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1999, 13(4):398-404.
- [7] 刘景汉,汪德清.临床输血学[M].北京:人民卫生出版社,2011:397-399.
- [8] Hod EA, Brittenham GM, Billote GB, et al. Transfusion of human volunteers with older, stored red blood cells produces extravascular hemolysis and circulating non-transferrin-bound Iron [J]. Blood, 2011, 118(25):6675-6682.
- [9] Hod EA, Spitalnik SL. Harmful effects of transfusion of older stored red blood cells: Iron and inflammation[J]. Transfusion, 2011, 51(4):881-885.
- [10] Benson D, Beck AW, Schluterman M, et al. Accumulation of pro-cancer cytokines in the plasma fraction of stored packed red cells [J]. J Gastrointest Surg, 2012, 16(3):460-468.
- [11] 魏超,庄远,汪德清.RBC 保存时间与功能变化的研究进展[J].中国输血杂志,2013,26(11):1152-1155.
- [12] Shander A, Van Aken H, Colomina MJ, et al. Patient blood management in Europe[J]. Br J Anaesth, 2012, 109(1):55-68.
- [13] 张彪,姜晶梅.国内部分地区用血合理性评价系统综述[J].中华医院管理杂志,2011,27(8):622-626.

(收稿日期:2014-11-20)

北京:中医古籍出版社,1998:24-26.

- [6] 张华,钟英英,方廖琼,等.羊胎盘免疫调节因子对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响[J].中国生化药物杂志,2005,26(2):70-72.
- [7] 李静,王亚平,刘发威,等.大鼠骨髓巨噬细胞的分离,纯化,培养以及鉴定[J].重庆医科大学学报,2003,28(4):436-439.
- [8] 陈秀芳,金丽琴,吕建新,等.蝉拟青霉对大鼠腹腔及肺泡巨噬细胞的激活作用[J].中国病理生理杂志,2002,18(6):94-97.
- [9] 胡庭俊,程富胜,陈灵然,等.黄芪多糖对小鼠免疫细胞信号转导相关分子的影响[J].畜牧兽医学报,2005,36(6):616-619.
- [10] 高鹏,石磊,张润玲.小鼠腹腔巨噬细胞的提取与鉴别方法探讨[J].中国医学检验杂志,2004,5(5):400-402.

(收稿日期:2014-11-18)