

- gulation. J Comp Chem, 1995, **16** (4): 512~ 516
- 12 Zehfus M. Improved calculations of compactness and a reevaluation of continuous compact units. Proteins: structures, functions, and genetics, 1993, **16**: 293~ 300
 - 13 Eisenstein M, Shariv I, Koren G *et al.* Modeling supramolecular helices: Extension of the molecular surface recognition algorithm and application to the protein coat of the tobacco mosaic virus. J Mol Biol, 1997, **266** (1): 135~ 143
 - 14 Perrot G, Maigret B. New determinations and simplified representations of macromolecular surfaces. J Mol Graph, 1990, **8**: 141~ 144
 - 15 Sanner M F, Olson A J, Spehner J-C. Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. Biopolymers, 1996, **38** (3): 305~ 320
 - 16 Cossi M, Mennucci B. Analytical first derivatives of molecular surfaces with respect to nuclear coordinates. J Comput Chem, 1996, **17** (1): 51~ 73
 - 17 You T, Bashford D. An analytical algorithms for the rapid determination of the solvent accessibility of points in a three-dimensional lattice around a solute molecule. J Comput Chem, 1995, **16** (6): 743~ 757
 - 18 Lee B, Richards F M. The interpretation of protein structures: estimations of static accessibility. J Mol Biol, 1971, **55**: 379~ 400
 - 19 Richards F M. Areas, Volumes, Packing and protein structure. Annu Rev Biophys Bioeng, 1977, **6**: 151~ 176
 - 20 Connolly M L. Analytical molecules surface calculation. J Appl Cryst, 1983, **16**: 548~ 558
 - 21 Connolly M L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. Science, 1983, **221** (4612): 709~ 713

22 Connolly M L. Molecular surface triangulation. J Appl Cryst, 1985, **18**: 499~ 505

23 Dietrich A, Maigret B. Program for the visualization of inorganic crystals. J Mol Graph, 1991, **9**: 85~ 90

Representation for the Molecular Surface. CAI Wen-sheng, SHAO Xue-guang¹⁾, PAN Zhong-xiao, ZHANG Mao-Sen (*Department of Applied Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;* ¹⁾ *Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China*).

Abstract A new method for the representation of smooth molecular surface was proposed. The embracing surface, which started from a triangular mesh built on an ellipsoid embracing the whole molecular surface, is deflated stepwise until all the triangles will stick the surface of the molecule. This method can be easily used to get the cavity of the protein.

Key words molecular surface, surface area, volume, molecular graphics, molecular recognition

一种改进的分离嗜中性白细胞的方法^{*}

贝 玲 胡天惠 沈 恂

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 报道一种从全血中分离嗜中性白细胞的方法. 人血经过葡聚糖沉降, 淋巴细胞分离液梯度分离, 特殊分离液的洗涤和红细胞的溶胀后, 得到了嗜中性白细胞. 经瑞特氏染色和台盼蓝染色证明细胞纯度与存活率均在 95% 以上. 以化学发光和细胞色素 c 还原法证明了细胞的高活力与膜受体的完整性. 与国外的分离方法相比较, 该方法简便易行, 且分离效果好, 是一种高效、经济的分离方法.

关键词 嗜中性白细胞, 分离提纯, 呼吸爆发

学科分类号 Q2-33

嗜中性白细胞属于小吞噬细胞, 约占体内白细胞总量的 70%, 在人体内起着吞噬外来细菌及异物, 抵御疾病的重要作用. 因此, 对嗜中性白细胞的研究在基础及临床上都有着重

要意义. 然而, 从全血中分离嗜中性白细胞却存在一定困难: 由于嗜中性白细胞的密度与红

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39670205).

收稿日期: 1997-05-28, 修回日期: 1997-09-15

细胞极为相近, 因此, 广泛应用的分离血细胞的密度梯度离心法很难将嗜中性白细胞与红细胞分开. 目前国内较常采用的血细胞分离液是由聚蔗糖与泛影葡甲胺制成的淋巴细胞分离液, 该分离液可有效地将单核及淋巴细胞与其他细胞分离, 但由于离心后嗜中性白细胞与红细胞混合沉降在离心管底部, 无法分离嗜中性白细胞. 国外虽有较细梯度的分离液, 如 Percoll (Pharmacia 产品), Histopaque (Sigma 产品) 等, 可以将嗜中性白细胞区带与红细胞区带分开一定距离, 但价格比较昂贵. 作者经过一段时间的摸索, 建立了一种简便快速高效的分离嗜中性白细胞的方法. 该方法的主要思路是: 先去除全血中绝大部分的红细胞, 利用密度梯度离心法将嗜中性白细胞与其他细胞分开, 再经过特殊分离液的洗涤和对残存红细胞的溶胀去除, 就得到了高纯度、高活性的嗜中性白细胞. 该方法的主要优点是: a. 改进: 先用葡聚糖沉降红细胞, 然后用淋巴细胞分离液离心分离, 克服了淋巴细胞分离液无法将嗜中性白细胞与红细胞分开的缺点, 成功地将淋巴细胞分离液用于分离嗜中性白细胞. b. 简便: 在每次离心后, 嗜中性白细胞都沉降在离心管底部, 故只需弃去上清液而无需长滴管吸取特定的分离层. c. 快速: 全部分离可在 1.5 h 内完成. d. 高效: 分离出的嗜中性白细胞, 浓度可以达到 10^7 个/ml, 细胞存活率可达到 95% 以上. e. 经济: 所使用的主要分离液淋巴细胞分离液价格便宜, 用于沉降红细胞的葡聚糖价格虽高, 但每次用量很少, 总的来说实验成本比使用进口分离液低得多.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

全血采自健康捐献者, 肝素抗凝, 淋巴细胞分离液为医科院天津血液所产品, 葡聚糖 (Dextran) T-500 为 Fluka 产品, 佛波豆蔻酸乙酯 (PMA) 与甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸 (fMLP) 为 Sigma 产品, 其余均为国产分析纯. PMA 与 fMLP 用二甲基亚砷 (DMSO)

配成 10 mmol/L 储液, 使用前用 Hank 氏平衡盐溶液 (HBSS) 稀释. 葡聚糖 T-500 用生理盐水配成 4.5% 的溶液, 115 °C 灭菌后使用. 分离中所用的特殊分离液是在 HBSS 中加入缓冲能力很强的 HEPES 和 Tris 以增强提取过程中对嗜中性白细胞的保护. 其配方如下: NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, $CaCl_2$ 1 mmol/L, NaH_2PO_4 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Tris 5 mmol/L.

1.2 方法

1.2.1 分离方法: 全血和葡聚糖溶液按 5:1 比例混匀, 4 °C 静置 40 min, 红细胞会逐渐沉降在容器底部, 上层清液呈透明微红色, 富含白细胞、血清. 吸取上清液, 按 3:1 比例轻轻铺在淋巴细胞分离液上层, 该分离液预先装在离心管内, 500 g 离心 15 min. 离心后管内液体中部有一白色雾状区带, 为单核细胞和淋巴细胞, 嗜中性白细胞和残存的少量红细胞沉降在管底. 弃去上清, 每个离心管内加 2 ml 特殊分离液漂洗一次, 振荡后 1 000 g 离心 3 min, 弃去上清, 每个离心管内用 2 ml 重蒸水振荡 20 s 后立即加入 1.8% NaCl 2 ml, 1 000 g 离心 3 min, 离心后可发现由于红细胞被溶胀, 上清微显红色, 以 HBSS 漂洗 1~2 次, 最后将细胞制成悬液.

1.2.2 检测方法: 对此方法提取的嗜中性白细胞, 使用瑞特氏染色法和台盼蓝染色法检验细胞的纯度和存活率, 用化学发光法和细胞色素 c 还原法检测其呼吸爆发能力, 从而判断嗜中性白细胞的活力.

a. 瑞特氏 (Wright's) 染色法: 瑞特氏染料可将嗜酸、嗜碱、嗜中性白细胞的细胞核染成不同颜色, 从而可在显微镜下加以区分. 取 1 滴细胞悬液, 加入 1 滴瑞特氏染料, 染色固定 5 min 后用清水洗去玻片表面的染料, 在显微镜下检测细胞纯度.

b. 台盼蓝 (Trypan blue) 染色法: 活细胞排斥台盼蓝染料, 从而可在显微镜下区分活细胞和死细胞. 取 10 μ l 细胞悬液加入 10 μ l 台盼蓝, 在显微镜下检测细胞存活情况.

c. 化学发光法: 为进一步检验所提取细胞的膜表面完整性和细胞活力, 采用 fMLP 和 PMA 作为刺激物进行化学发光检验, 其中 fMLP 是与膜表面特异受体结合而引起细胞呼吸爆发, 而 PMA 则激活 PKC 引起呼吸爆发. 具体方法如下: 加入鲁米诺 (Luminol, 终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$) 的 5×10^5 个/ml 细胞悬液 5 ml 置于恒温 37°C 的暗室内 10 min, 加入 PMA 或 fMLP (终浓度为 100 nmol/L), 在自行研制的高灵敏度单光子计数型超微弱发光测量仪^[1]上观测刺激物加入前后化学发光的变化.

d. 细胞色素 c 还原法: 为了更直接探测细胞的呼吸爆发能力, 采用细胞色素 c 还原法^[2], 在紫外分光光度仪上进行测量. 具体方法是: 在 2×10^6 个/ml 细胞悬液中加入细胞色素 c (cytochrome c, 终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$), 在 37°C 恒温的暗室内以 PMA 刺激, 作用 1.5 h 后 10^4 g 离心 100 s, 取上清液置于 0°C , 测定 550 nm 处的吸光度或测定 500~600 nm 波长范围的光吸收.

2 结 果

2.1 使用该方法的分离效果

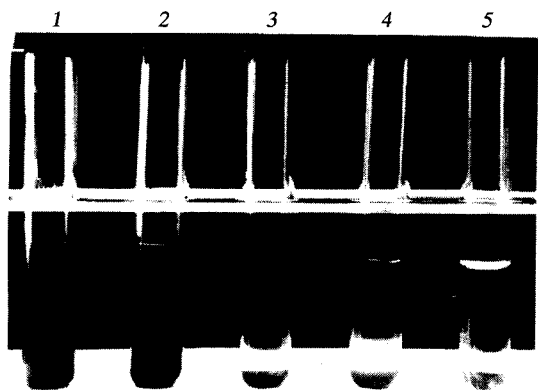


图 1 不同阶段的分离效果

1: 人血与葡聚糖混合物; 2: 人血与葡聚糖混合沉降 40 min; 3: 将 2 中的上清液轻铺在淋巴细胞分离液上; 4: 将 3 离心; 5: 最终分离出的白细胞悬液.

在用此方法分离的全过程中, 分别取不同

分离阶段的分离效果情况, 显示于图 1. 可以观察到, 在用葡聚糖混合全血沉降 40 min 后, 如管 2 所示, 绝大多数红细胞沉降在离心管底部, 将此时的上清液铺在淋巴细胞分离液上层并离心后, 管 4 内中部的白色雾状层为单核和淋巴细胞, 嗜中性白细胞和残余红细胞沉淀在管底. 用重蒸水溶胀残余红细胞后, 用 HBSS 漂洗, 可以得到如管 5 内的白色细胞悬液.

2.2 瑞特氏染色法

提取的细胞用瑞特氏染料染色在显微镜下观察, 其中嗜酸性白细胞的细胞核为粉红色, 嗜碱性白细胞核为深蓝色, 嗜中性白细胞核为浅蓝紫色, 多为二或三叶核, 有少数为杆状和四、五叶核. 嗜中性白细胞细胞直径约 $10 \mu\text{m}$ 左右, 近圆形, 纯度可达 95%.

2.3 台盼蓝染色法

提取的细胞经台盼蓝染色后在显微镜下观察, 在提取后 3 h 内存活率达到 95% 左右.

2.4 化学发光法

从超微弱发光仪上得到的化学发光变化曲线可以看到细胞在受到刺激物刺激后, 很快进入呼吸爆发状态, 化学发光迅速增强, 并且由 fMLP 引发呼吸爆发的速度明显快于 PMA, 这与前人的报道相符^[3]. 上述结果表明用这种方法分离提纯的嗜中性白细胞膜表面完整且活力很高. 为证明淋巴细胞分离液离心分离后, 离心管内雾状区带层 (是淋巴细胞) 以外的区带层中基本不含嗜中性白细胞, 吸取该部分液体进行化学发光实验, 发现加入刺激物后并无化学发光强度的变化, 证明嗜中性白细胞完全沉降在离心管底部. 化学发光结果见图 2.

2.5 细胞色素 c 还原法

嗜中性白细胞受到刺激后进入呼吸爆发状态会产生大量超氧阴离子 O_2^- 而促使细胞色素 c 还原, 在 550 nm 处出现较强吸收峰. 用这种方法提取的嗜中性白细胞经 PMA 刺激后离心的上清液在 550 nm 出现强吸收峰, 表明细胞具有极高的活力, 可以在受刺激后迅速进入呼吸爆发状态, 这与化学发光检测结果也相符合. 结果见图 3.

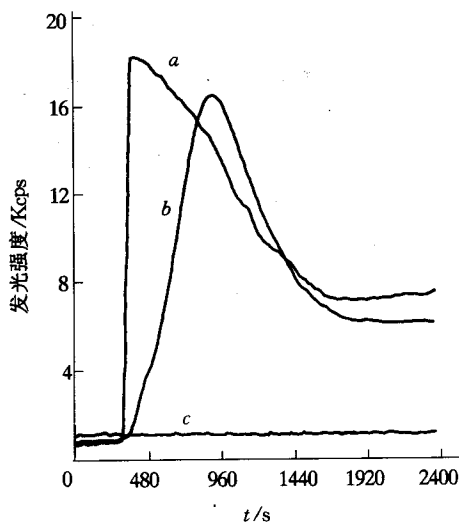


图2 化学发光检测结果

a: 以 fMLP 为刺激剂的细胞在刺激前后的化学发光变化; *b*: 以 PMA 刺激的细胞的化学发光变化; *c*: 取图 1 中管 4 的雾状层以外的层带用 PMA 刺激的化学发光变化情况, 所有刺激物的加入时间均为 300 s, 三种情况下细胞和 luminol 浓度均相同。

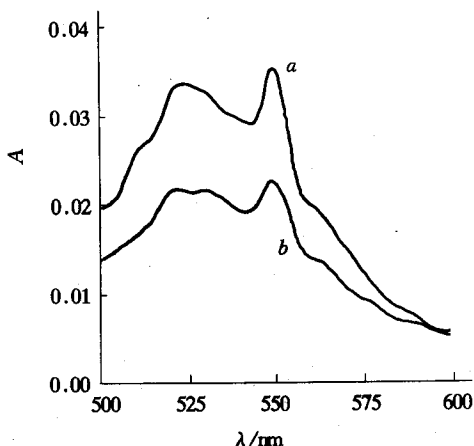


图3 细胞色素 c 还原法结果

a: 提取的嗜中性白细胞加入 PMA 刺激后对细胞色素 c 的还原情况; *b*: 对照组, 是嗜中性白细胞与细胞色素 c 在无刺激物情况下混合 1.5 h 后的情况。

3 讨 论

嗜中性白细胞作为主要的吞噬细胞, 其作用机理已引起越来越多的科研工作者的重视。目前对嗜中性白细胞的吞噬及呼吸爆发的信号转导通路的研究因其在抗炎药物的设计、器

官移植时的排异等方面的意义而成为国际医学界研究的热点之一, 国内也正在积极开展这方面的工作。而研究成果的可信性很大程度上取决于所用的嗜中性白细胞的活性与纯度。国外对嗜中性白细胞的分离纯化多采用成品的梯度分离液, 价格昂贵, 且对血的新鲜程度要求较高。Ferrante 等^[4]曾报道将全血放置的时间越长, 使用细梯度分离液分离嗜中性白细胞区带中混入的杂细胞越多。本文所述的方法采用国产的淋巴细胞分离液替代进口分离液, 且达到相同的分离效果, 对全血的放置时间限制比较宽, 作者曾对采集 18 h 后的全血进行分离, 一样达到了较高的纯度。当然, 由于嗜中性白细胞的寿命较短, 血源应尽量保持新鲜。

在分离过程中还使用了缓冲能力较强的特殊分离液以加强漂洗过程中对嗜中性白细胞的保护, 这也有有效的提高了嗜中性白细胞最终的获得率。对提取细胞的纯度和存活率分析, 则采用了传统的瑞特氏染色法和台盼蓝染色法, 多次检验其纯度和存活率均在 95% 以上。而对细胞活力的检测, 则根据嗜中性白细胞呼吸爆发产生大量超氧阴离子的特点, 以 PMA 为刺激物, 用灵敏度与可靠性较高的化学发光法和细胞色素 c 还原法进行测定, 多次实验均获得一致的结果。为了检测细胞膜受体的完整性, 采用了与特异膜受体结合的刺激剂 fMLP 检验细胞的呼吸爆发能力, 一样得到了很好的结果, 再次证明了该方法的可靠性。

总之, 这种提取方法在多次重复使用中证明是一种简单、高效、快速、经济的分离方法。该方法的建立, 为对嗜中性白细胞的进一步深入研究奠定了良好基础。

致谢 感谢本所李景福老师和张同存博士的热情指导。

参 考 文 献

- 1 沈 恂, 傅世禧, 张月敬等 (Shen X, Fu SM, Zhang YJ *et al*). 生物系统超弱发光的探测: 绿豆、大鼠血液和 3T3 细胞的发光. 生物物理学报 (Acta Biophysics Sinica), 1988, 4 (2): 98~103

2 O'Brien P J. Methods in Enzymology. Orlando: Academic Press, 1984. 370~ 377

3 Wymann M P, Deranleau D A, Baggiolini M *et al.* The onset of the respiratory burst in human neutrophils. J Biol Chem, 1987, **262** (25): 12048~ 12053

4 Ferrante A, Thong Y H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the hypaque-ficoll method. J Immunol Methods, 1980, **36** (2): 109~ 117

A Modified Method for Separating Neutrophils From Human Blood. BEI Ling, HU Tianhui, SHEN Xun (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract A modified method for separating neutrophils from whole blood was reported.

Neutrophils was obtained by dextran sedimentation, centrifuged with lymphocytes separating solution, special separating medium washing and erythrocyte depletion. The purity and viability were proved to be both about 95% by Wright's stain and Typan blue respectively. Both the chemiluminescence method and cytochrome c reduction method proved the high activity and the integrity of the membrane receptor of the neutrophils. Compared with other method, this method is more simple and easier to handle, which suggests that it is a efficient and economic method for separating neutrophils.

Key words neutrophil, separation, respiratory burst

流式细胞术检测胃癌前病变 DNA 及 p21, p53 含量*

齐凤英 段惠军 刘庆银
(河北医科大学病理解剖教研室, 石家庄 050017)

左连富 刘江惠 郭建文
(河北省肿瘤研究所, 石家庄 050011)

摘要 应用流式细胞术和免疫荧光技术, 对 80 例胃癌前病变细胞中 DNA 含量, ras p21 和 p53 蛋白进行定量检测, 探讨其在胃癌前病变中, 作为癌变早期标志物的临床意义. 检测结果发现, 胃癌前病变的 DNA 异倍体率随不典型增生病变的分级增高而增加, ras p21 和 p53 蛋白的表达量亦随胃癌前病变不典型增生程度的加重而增高. DNA 异倍体和 ras p21 表达阳性的胃癌前病变出现的癌变率显著增高, 提示可能是癌变早期的分子标志物.

关键词 胃癌前病变, DNA 含量, 流式细胞术

学科分类号 Q2-33

肿瘤的发生、发展是与细胞本身的基因改变密切相关的, 研究证明, 癌基因的激活和抑癌基因的失活、突变以及基因蛋白的过量表达直接参与了细胞的恶性转化^[1]. 本文应用流式细胞术和免疫荧光技术对胃癌前病变细胞 DNA 含量和 ras p21, p53 蛋白表达进行定量检测, 探讨其在癌变过程中的重要作用和病理形态学特征的关系.

1 材料和方法

1.1 标本来源

采用胃镜活检的胃粘膜组织和术后的胃癌旁残端胃粘膜组织, 经病理诊断证实为癌前病

* 河北省卫生厅资助项目 (94001).
收稿日期: 1997-06-10, 修回日期: 1997-10-24