

甲酰寡肽引发的外周血白细胞的化学发光

郭 佐 陈 宜 张

(第二军医大学生理教研室神经科学实验室, 上海 200433)

陈 杞

徐 仁 宝

(第二军医大学放射医学研究室) (第二军医大学病理生理教研室)

提 要

在有发光剂鲁米诺存在的条件下, 甲酰寡肽可以引起外周血白细胞的化学发光反应, 其强度依赖于甲酰寡肽和鲁米诺的浓度, 其动力学随测定时温育温度的不同而呈单峰型或双峰型。

关键词 化学发光, 甲酰寡肽, 鲁米诺, 外周血白细胞

甲酰寡肽 (fMLP, 甲酰基甲硫氨酰亮氨酸苯丙氨酸) 是由细菌产生的一种化学趋化因子, 对吞噬性细胞 (如巨噬细胞、多形核中性粒细胞) 有很强的刺激作用, 它除了引起吞噬性细胞趋化运动外, 还能直接引发这些细胞的“呼吸爆发 (respiratory burst)”, 所产生的活性氧可导致化学发光 (chemiluminescence, CL)。已经证明 fMLP 的作用是通过细胞膜上相应受体的介导而进行的^[1]。由于 fMLP 分子结构清楚, 成分比酵母多糖 (zymosan)、活化血清、调理的细菌等刺激剂单纯, 又由于吞噬性细胞是一种容易得到的实验材料, 因此它们已成为研究吞噬性功能的较为理想的模型。作者观察了 fMLP 引发外周血白细胞 (PWBC) CL 的动力学过程, 并分析了其中的一些影响因素, 以便为使用该模型提供实验基础。

材 料 和 方 法

1. 试剂

(1) fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine) (Sigma), 先用少量二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 再用磷酸缓冲液 (PBS) 稀释

至 $1 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, $0-4^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 鲁米诺 (luminol, 5-amino-1,2,3,4-tetrahydrophthalazin-1,4-dione, Lum) (Merck), 用 DMSO 溶解后再用 PBS 稀释至 $1 \times 10^{-2} \text{mol/L}$, $0-4^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

(3) 磷酸缓冲液 (PBS): NaCl 0.14mol/L , KCl 2.7mmol/L , Na_2HPO_4 5.8mmol/L , KH_2PO_4 1.5mmol/L , MgCl_2 0.49mmol/L , CaCl_2 0.9mmol/L , 葡萄糖 1.0mmol/L , pH7.4, $0-4^{\circ}\text{C}$ 保存。

(4) 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的磷酸缓冲液 (F-PBS): 同 PBS, 但不含 MgCl_2 和 CaCl_2 。

(5) 溶红细胞溶液: NH_4Cl 156mmol/L , NaHCO_3 10mmol/L , EDTA-Na_2 0.15mmol/L , $0-4^{\circ}\text{C}$ 保存。

2. 方法

(1) PWBC 制备:

Sprague-Dawley 大鼠 (体重 $150-250 \text{g}$, 雌雄不拘) 断头取血, 加 $1:2500$ 肝素 0.1ml 抗凝, $1500 \times g$ 离心 5min , 弃去上清, 轻轻吸取上清与红细胞沉渣之间的白色膜状物, 用 F-PBS 洗涤一次, 加入 10ml 溶红细胞溶液, 室温

静置 8min 后, $1500 \times g$ 离心 3min, 沉渣用 F-PBS 洗二次, 最后用 PBS 重新混悬细胞, 使细胞浓度约 $1-3 \times 10^6$ 细胞/ml。

(2) CL 测定

在部分遮光的暗室中进行。测定仪器为液体闪烁计数仪: A. 由 FJ-353 型 (西安二六二厂) 改制; B. FJ-2108 (西安二六二厂), 均工作于单光子测量方式。反应系统的体积为 1ml。先将细胞悬液分装于容量为 5ml 的液闪瓶中, 加入 Lum, 放置 5min 以上, 然后迅速加入 fMLP, 振荡混匀, 立即放入液闪仪中计数。以加入 fMLP 作为 0 时, 每 10 秒计数一次, 观察 CL 的变化。以 6 秒内的计数 (CP6S) 作为 CL 的单位。

结果与讨论

1. 不同温度时 fMLP 引发 PWBC 的 CL 动力学

在 $15-37^{\circ}\text{C}$ 范围内, fMLP (浓度 $> 1 \times 10^{-8}\text{mol/L}$) 均可引发 PWBC 的 CL (图 1)。CL 曲线一般可见两个峰: 第一个峰约在 20sec 至 3min 之间 (一般在 2min 之内), 强度迅速上升和下降, 较其它刺激物 (如 Zymosan、PHA、肿瘤促进剂 PMA、A23187、内毒素、调理的细菌等) 引发的 CL 要快^[2-7]; 第二个峰在 4—15min 时, 变化较缓慢, 持续时间较长, 可达 60min 以上。随测定时细胞的温育温度不同, 两个峰叠

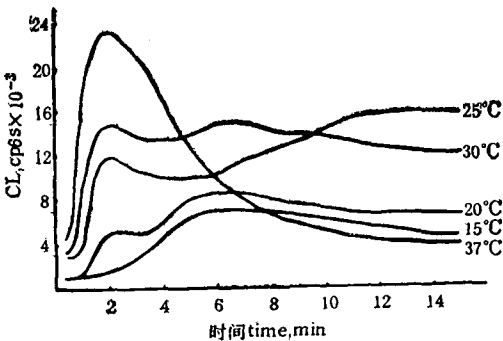


图 1 不同温育温度时 fMLP 引发的 PWBC 的 CL 反应动力学
Fig. 1 Kinetics of fMLP-induced chemiluminescence of peripheral leukocytes at different incubation temperature

强度发生变化: 37°C 时, 仅有第一个峰, 呈单峰型; 温度降低时, 出现第二个峰, 第一个峰逐渐降低; 至 15°C 时, 第一个峰基本消失, 又呈单峰型。此温度依赖性现象可以用来解释一些作者所报告的 CL 反应动力学的差异^[8,9]。

2. fMLP 浓度对 CL 的影响

在其它条件不变的情况下, 给予 $1 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 、 $1 \times 10^{-7}\text{mol/L}$ 与 $1 \times 10^{-8}\text{mol/L}$ 三种不同浓度 fMLP 来引发 CL。结果表明, $1 \times 10^{-8}\text{mol/L}$ 的 fMLP 便可引发 CL, 但 CL 强

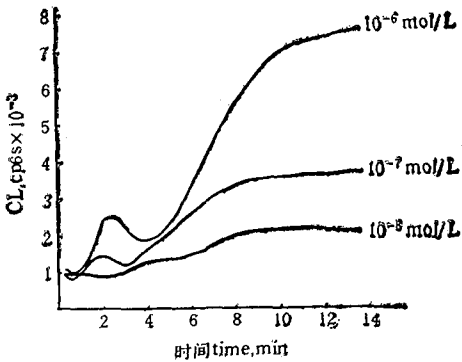


图 2 不同浓度的 fMLP 引发的 PWBC 的 CL 反应动力学
Fig. 2 Kinetics of chemiluminescence of peripheral leukocytes induced by fMLP of different concentrations

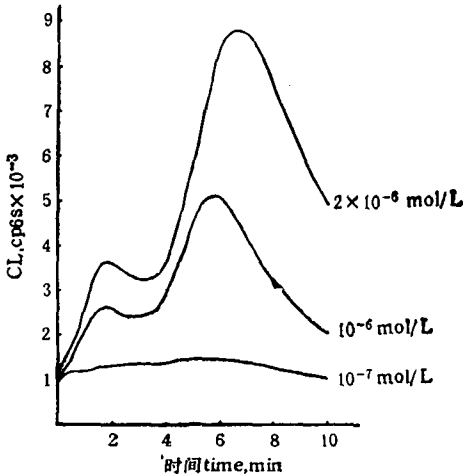


图 3 不同浓度的 Lum 对 fMLP 引发的 PWBC 的 CL 反应动力学的影响
Fig. 3 Effects of luminol in different concentrations on kinetics of chemiluminescence of peripheral leukocytes induced by fMLP

度很弱;随着 fMLP 浓度的增高, CL 也越来越强(图 2), 遂选用 $\geq 1 \times 10^{-6}$ mol/L 的浓度, 以取得显著的 CL 反应峰。

3. Lum 浓度对 CL 的影响

细胞的 CL 是极微弱的, 借助于发光剂 Lum, CL 被大大增强而易于检测。CL 的强度与 Lum 的浓度密切相关(图 3)。 1×10^{-7} mol/L 以下的浓度, CL 变化不明显; Lum 浓度增高, CL 也增强, 但基础计数也增高。实验中 Lum 浓度多选择 1×10^{-5} — 1×10^{-6} mol/L, 在此浓度下, 基础计数相对较低, 而 CL 变化又很明显。

细胞悬液中加入 Lum 以后, 可以观察到一个短暂的发光峰, 类似于 CL 的第一个峰, 但 2—3min 后便恢复至最初水平且保持相对稳定(此后数十分钟内均无显著变化)。为避免该现象对观察 fMLP 引发 CL 的干扰, 在实验中通常在加入 Lum 至少 5min 以后、待计数平稳时才加入 fMLP 引发 CL。

参 考 文 献

- 1 Smith C D, Verghese M W, Snyderman R. In: Konijn T M *et al.* eds. *Molecular mechanisms of desensitization to signal*, *Molecules* (NATO ASI Series, Vol. H6), Berlin: Springer-Verlag, 1987: 277
- 2 Schopf R E, Hoffmann D, Rehder M. In: Scholmerich J *et al.* eds, *Bioluminescence and chemiluminescence new perspectives*, Chichester: John Wiley & Sons, 1987: 169
- 3 Meretey K, Antal M, Rozsnyay Z, *et al.* *Inflammation*, 1987; 11(4): 417
- 4 Jungi T W, Peterhans E. In: Scholmerich J *et al.* eds, *Bioluminescence and chemiluminescence new perspectives*, Chichester: John Wiley & Sons, 1987: 81
- 5 Heinrich D, Knigge K P. In: Scholmerich J *et al.* eds, *Bioluminescence and chemiluminescence new perspectives*, Chichester: John Wiley & Sons, 1987: 113
- 6 DeChatelet L R, Long G D, Shirley P S *et al.* *J Immunol*, 1982; 129(4): 1589
- 7 Anderson D C, Edwards M S, Baker C J. *J Infect Dis*, 1980; 141(3), 370
- 8 Brihem G, Stendahl O, Dahlgren C. *Infect Immun*, 1984; 45(1): 1
- 9 Palmblad J, Gyllenhammar H, Lindgren J A *et al.* *J Immunol*, 1984; 132: 3041

[本文于 1989 年 8 月 3 日收到]

FMLP-INDUCED CHEMILUMINESCENCE OF PERIPHERAL LEUKOCYTES FROM RATS

Guo Zuo Chen Yizhang

(Lab. of Neuroscience, Dept. of Physiology, Second military Medical University, Shanghai)

Chen Qi

Xu Renbao

(Dept. of Radiation Medicine) (Dept. of Pathophysiology)

ABSTRACT

With the help of luminol, fMLP could initiate in peripheral leukocytes a detectable luminol- and fMLP-concentration-dependent chemiluminescent response, which showed mono- or bi-modal kinetics according to different incubation temperatures during the measurement.

Key Words chemiluminescence, fMLP, luminol, peripheral leukocyte