

技术与方法

中性红染色后细胞对凝集素的反应性

许凤浩 刘在贵

(滨州医学院生物化学教研室, 山东滨州 256603)

提 要

中性红染色后的小鼠胸腺细胞、肝、脾和肾细胞, 人扁桃体细胞, 以及体外培养的不同肿瘤细胞(HL60, K562, Molt-4, MLA 和 L1210) 都能够被凝集素凝集。除小鼠肝细胞和肾细胞外, 它们的凝集特征都与红细胞的凝集特征相同。不同来源的细胞, 其对凝集素的反应性不同, 其中, 以肿瘤细胞对凝集素的反应最敏感。结果说明, 中性红染色法可以作为用凝集素初步检测一些无色细胞表面凝集素受体变化的一种简便方法。

关键词 凝集素, 凝集素检测法, 肿瘤细胞, 凝集素受体

正常细胞恶变后, 细胞膜表面结构明显改变, 其对凝集素的亲和力也明显改变^[1]。人的消化道腺癌和其周围组织对凝集素有明显不同的亲和力^[2], 小细胞肺癌, 伯金氏淋巴瘤也表达着特异的凝集素受体^[3]。但是, 研究肿瘤细胞膜凝集素受体时经常使肿瘤细胞破碎, 且操作复杂, 如果能在不破坏肿瘤细胞整体结构的前提下, 找到一种简便直观的检测方法, 对于研究肿瘤细胞的变化必有帮助。红细胞具有天然红色, 对凝集素反应灵敏, 操作观察简便, 早已用于凝集素的分离纯化工作^[4]。但是大多数肿瘤细胞和组织细胞没有颜色, 不能在肉眼直接观察其凝集反应。1987年 Wang 等报道, 中性红染色的小鼠淋巴瘤细胞能够用于同工凝集素的分离纯化, 并且具有独到的特异性^[5]。我们据此研究了不同组织细胞的中性红染色法, 并探讨了凝集素对染色细胞的凝集作用, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

中性红: 北京化工厂, 76014; PHA-P: 北星生物制品公司; ConA: Difco; 肿瘤细胞系: HL60, K562, Molt-4 和 L1210; 人扁桃体: 外科手术摘除的扁桃体; 小白鼠: 昆明种小鼠; RPMI-1640: Sigma。

1.1 肿瘤细胞的培养和制备 将肿瘤细胞分别置于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中 (Gln 2mmol/L, 青霉素 100 μ g/ml, 链霉素 100 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养至对数生长期, 500r/min \times 5min 离心取沉淀, pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次后备用。

1.2 不同组织细胞的制备 取小鼠眼静脉血, pH7.2 PBS 洗净; 同时取小鼠胸腺、脾、

肝和肾脏以及人的扁桃体,分别洗净,机械性挤压分离细胞,自然沉淀去除大的组织块后,用 Tris-NH₄Cl 溶液溶解残留的红细胞, pH 7.2 PBS 洗净备用。

1.3 细胞的固定和染色 将上述制备好的细胞分别用 1% 的戊二醛溶液室温固定 1h, 然后用 0.1mol/L 甘氨酸溶液 4℃ 终止固定 20 min, PBS 洗涤 3 次,调细胞密度至 10⁸/ml, 然后每毫升细胞悬液加 12.5μl 2% 的中性红染液,室温摇动染色 15—30s, 离心沉淀, PBS 洗涤 3 次备用。

1.4 凝集活性的检测 在“V”型血凝板中加凝集素 (PHA 500μg/ml 或 ConA 200μg/ml) 每孔 100μl, 连续等倍稀释, 然后每孔加入不同染色细胞 20μl, 混匀后室温静置 90 min 观察结果。阴性对照孔加入与凝集素含量相同的牛血清白蛋白。除小鼠肝肾细胞外, 其它细胞凝集时均呈片状沉降在板底, 不凝时呈点状沉淀在板底, 小鼠肝肾细胞的凝集特征正好与此相反。

1.5 凝集活力的比较 以同一凝集素在相同含量时, 能够引起细胞明显凝集的最大稀释倍数的一半作为该种凝集素对该种细胞的凝集活力, 然后根据凝集活力大小比较不同细胞对同一凝集素的反应性。

2 结 果

2.1 中性红染色细胞的特征

中性红能够使各种所用组织细胞迅速染色, 但染色后细胞的形态、色泽和自然沉淀状态受染色时间的影响。染色时间太短, 细胞着色浅, 染色时间太长, 细胞着色深, 但易自发聚集成团, 并有部分细胞悬浮不易沉降。表 1 是每毫升小鼠胸腺细胞悬液用 12.5μl 2% 中性红染液染色不同时间的细胞形态、色泽和自然沉淀状态的变化。

在上述条件下, 染色 15~30s, 绝大部分细胞均为鲜红色, 且不易退色, 特别是小鼠胸腺细胞和脾细胞, 呈鲜亮的玫瑰红色, 其自然沉淀状态与红细胞完全相同, 但小鼠肝细胞和肾细胞

表 1 染色时间对细胞的影响

特征	染色时间			
	10s	30s	60s	120s
细胞形态	完整	完整	部分聚集	聚集
细胞色泽	淡红	鲜红	暗红	紫红
沉淀状态	点状沉淀	点状沉淀	块状沉淀 部分漂浮	大块状 沉淀

呈紫灰色, 易退色, 且自然状态下呈片状沉降在“V”型板孔底部。

2.2 染色后小鼠不同组织细胞对 PHA-P 的反应性

为了比较染色后小鼠不同组织细胞对 PHA-P 的反应性, 我们将小鼠脾、胸腺、肾、肝和红细胞在同一块凝集板中同时用 PHA-P 进行了检测, 结果这五种细胞对凝集素都有反应, 只是反应特征和反应性大小不同。其中小鼠脾、胸腺细胞和红细胞的表现特征相同, 均为无凝集反应时呈点状沉淀, 有凝集反应时呈片状沉淀。而小鼠肾和肝细胞的表现特征则与此相反, 它们自然沉淀时呈片状, 凝集时呈缩小的点片状。

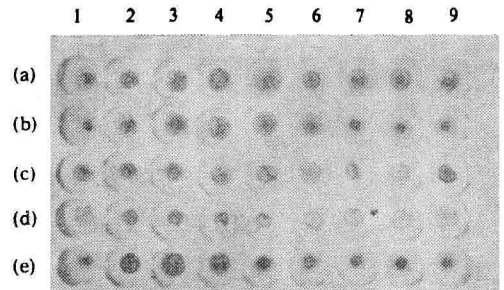


图 1 染色后小鼠不同组织细胞的凝集特征及对 PHA-P 的反应性

(a) 行为胸腺细胞; (b) 行为脾细胞; (c) 行为肾细胞; (d) 行为肝细胞; (e) 行为红细胞

从反应性大小来看, 小鼠胸腺细胞对 PHA-P 的反应最敏感 (稀释度 > 1:32), 其次是脾细胞 (1:16), 再次是红细胞 (1:4), 肾细胞的反应性最差。

2.3 不同肿瘤细胞和人扁桃体细胞对 ConA 的反应性

体外培养的肿瘤细胞和人扁桃体细胞都与

红细胞的凝集特征相同。但是，它们对 ConA 的反应性不一样，HL60 和 MLA 对 ConA 的反应性最大，其次是 Molt-4 和 L1210，再次是 K562，反应性最小的是人扁桃体细胞，结果示于表 2。

表 2 肿瘤细胞和人扁桃体细胞对 ConA 的反应性

细 胞	凝 集 力
HL60	256
L1210	128
K562	64
Molt-4	128
MLA	256
人扁桃体细胞	32

3 讨 论

中性红染色的小鼠不同细胞和不同的肿瘤细胞以及人扁桃体细胞都能够用于凝集素的检测，这说明中性红染色法是可行的。

凝集活性检测时，需要完整分散的细胞。因

此，任何能够制备成完整分散的无色细胞，都有可能用中性红染色法进行凝集检测。

中性红染色的小鼠胸腺细胞、脾细胞和红细胞的凝集特征相同，提示这些细胞膜表面具有类似的结构。小鼠肝细胞和肾细胞的凝集特征与前述细胞的表现相反，可能是由于其组织起源不同所致。

对 ConA 的反应性肿瘤细胞大于人扁桃体细胞，提示肿瘤细胞对 ConA 的亲合力发生了变化，该结果与文献 [6] 报道一致。

本院科研处李治淮处长对本工作给予了大力支持和帮助，特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Nicolson GL. *Exp Cell Res*, 1984; 150: 3
- 2 Bur M, Franklin WA. *Am J Pathol*, 1985; 119: 279
- 3 Miyauchi T *et al. Gann*, 1982; 73: 581
- 4 Barondes SH. *TIBS*, 1988; 13: 480
- 5 Wang WC, Cummings RD. *Analy Biochem*, 1987; 161: 80
- 6 孙册. *中华医学杂志*, 1986; 10: 597

不受纤维蛋白溶酶原干扰的脂蛋白 (a) 酶联免疫吸附测定法

汪俊军 庄一义 朱建民 许平

(南京军区南京总医院全军医学检验中心生化科, 南京 210002)

提 要

实验证实脂蛋白 (a) 和纤维蛋白溶酶原之间具有免疫同源性，据此建立了不受 Pg 干扰的酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 Lp(a)。a. 根据 Lp(a) 含有 apo(a)、apoB 两种抗原位点，设计了抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apoB 法；b. 抗 apo(a) 经 Pg 亲和层析柱吸附处理后的抗 apo(a)-Lp(a)-酶标抗 apo(a) 法。同时以火箭电泳为参考，经比较后，方法间相关性良好。

关键词 脂蛋白 (a)，纤维蛋白溶酶原，酶联免疫吸附法，免疫同源性

脂蛋白 (a) [Lp(a)] 和低密度脂蛋白 (LDL) 结构相似，均含有载脂蛋白 B (apoB)，但 Lp(a) 还含有一个独特的 apo(a) 成分，通

过二硫键和 apoB 相连，apo(a) 的分子量从