

小鼠小肠粘膜淋巴细胞的分离及鉴定

★ 吴皓¹ 林洪生¹ 水野海腾¹ 肖诚² 赵林华³ 吕诚³ 裴迎霞¹ 祁鑫¹ 吕爱平³

(1 中国中医研究院广安门医院 北京 100700;

2 中日友好医院临床研究所 北京 100029;

3 中国中医研究院基础所 北京 100700)

关键词:分离方法;粘膜免疫;肠固有层淋巴细胞;肠上皮内淋巴细胞;肠集合淋巴结淋巴细胞

中图分类号:R 392.12 文献标识码:A

肠道粘膜免疫越来越得到广大免疫科学工作者的重视,在中药治疗免疫性疾病机制中得到应用^[1]。人体粘膜是机体与外界相隔的最大屏障,面积大于 400 m²。粘膜接触大量抗原,是病原体入侵的最大门户。粘膜内和粘膜下含有大量弥散的淋巴细胞,其数量相当于脾脏细胞总数。粘膜免疫细胞不仅数量多,而且还有其独特性质,在粘膜免疫中有重要作用。

粘膜免疫系统包括三种基本淋巴细胞成分。一种是分布在各种粘膜上皮细胞内的淋巴细胞,叫上皮内淋巴细胞(IEL),其中以 CD₈⁺ 的 T 淋巴细胞为主。第二种是散在于粘膜系统中各固有层的淋巴细胞(LPL),固有层也含有各种表型的 T 及 B 细胞。第三种是集合淋巴结(PP 结)中的淋巴细胞。它们的组成及功效都不同。

目前对粘膜免疫的研究已成为免疫学研究的热点之一,但国内相关报道很少。粘膜免疫各组成成分细胞分离纯化过程较复杂,影响了粘膜免疫研究的广泛开展,本文参考国外方法^[2,3],在以往使用的各种淋巴细胞分离纯化技术的基础上进行了改进,摸索出一套快速、高效、稳定的粘膜免疫淋巴细胞提取方法,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 动物

BALB/C 雌性小鼠,16~18 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。

1.2 试剂及器材

D-Hanks 液:NaCl 8.00 g, KCl 0.40 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.08 g, KH₂PO₄ 0.06 g, NaHCO₃ 0.35 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

消化液:在 D-Hanks 液中加入 1 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L DTT。

Percoll 使用液的配制:Percoll 原液为 Amersham 公司产品。Percoll 原液与 15 mol/L NaCl 溶液按体积比 9:1 混合,制成 100% 等渗 Percoll; 100% 等渗 Percoll 与 0.15 mol/L NaCl 按体积比 7:

3 混合,制成 70% 等渗 Percoll。

胶原酶 1 640 培养液的配制:在 1 640 培养液中加入 0.1% II 型胶原酶。

1.3 分离步骤

1.3.1 取出小肠并冲洗 脱颈处死小鼠,开腹,立即取出从幽门至回盲部的全部小肠,仔细剥离肠系膜和脂肪。用 20 mL 注射器(侧开口,保护肠壁)吸取含 5% NCS 的 D-Hank's 液冲洗肠腔,尽量将肠内容物冲洗干净。冲洗过的小肠置于盛有少量 D-Hank's 液的平皿中以保持湿润。

1.3.2 分离 PP 结 肉眼观察 PP 结,测量其直径,记录个数,并用眼科弯剪剪下 PP 结,置于盛有 D-Hank's 液的平皿中,4℃ 备用。

1.3.3 翻转小肠 将冲洗过的小肠置于盛有少量含 5% NCS D-Hank's 液的平皿中以保持湿润,用细塑料绳穿过肠腔,用缝合线将小肠回盲部结扎紧,翻转小肠使粘膜面向外。

1.3.4 分离 IEL 翻转后的小肠用含抗生素的 D-Hank's 液洗 2 次,置于 37℃ 预热的盛有 15 mL 消化液的 50 mL 离心管中。将离心管放入恒温箱中,于 37℃ 孵育 40 分钟。取出离心管充分振荡,用 300 目的尼龙网滤过消化液。消化液过滤后离心 1 分钟(1 000 r/min),去除上清,加入含 5% NCS 的 1 640 培养液,调整体积至 5.4 mL,再加入 100% percoll 至 9 mL,充分混匀后成为 40% 细胞-percoll 混悬液,用巴氏毛细吸管在试管底部轻轻加入 1 mL 70% percoll,使两层液体间形成清晰的界面,制成 percoll 梯度分离液。离心(600 g, 25℃)20 min。收到 40% 与 70% percoll 界面间的细胞,用含 5% NCS 的 1 640 培养液洗 3 次,即为 IEL。可进行台盼蓝染色和镜检。

1.3.5 分离 LPL 预热的离心管中加入含有 0.1% II 型胶原酶的 1 640 培养液 10 mL。将经过消化液消化振荡后的小肠移入离心管中,放入恒温箱中,于 37℃ 孵育 40 分钟。取出离心管充分振荡,用 300 目的尼龙网过滤。滤液离心 1 min(1 000 r/min),去除上清,加入含 5% NCS 的 1 640 培养液,

调整体积至 5.4 mL,再加入 100% percoll 至 9 mL,充分混匀后成为 40% 细胞-percoll 混悬液,用巴式毛细吸管在试管底部轻轻加入 1 mL 70% percoll,使两层液体间形成清晰的界面,制成 percoll 梯度分离液。离心(600 g, 25 °C) 20 min。收到 40% 与 70% percoll 界面间的细胞,用含 5% NCS 的 D-Hank's 培养液洗 3 次,即为 LPL。可进行台盼蓝染色和镜检。

1.3.6 分离 PP 结淋巴细胞 用机械挤压的方式从剪下的 PP 结中分离出淋巴细胞。用 300 目的尼龙网过滤。并进行台盼蓝染色和镜检。

1.3.7 形态学观察与细胞检测 细胞分离后我们将消化液消化后及胶原酶消化后的小肠进行了形态学观察,置备了 HE 染色的切片。又用流式细胞计数仪和免疫荧光抗体对所分离的细胞进行了检测。经上述分离纯化步骤,每只小鼠可获得 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 LPL,活力 > 90%。消化液消化后小肠绒毛的上皮细胞层绝大部分分离脱落,但固有层保持完整。胶原酶消化后可见固有层解离。流式细胞计数结果,LPL 中 CD_8^+ 细胞 40% ~ 50%,与文献资料相同。

1.4 小肠粘膜淋巴细胞的检测

FITC 标记的抗小鼠 CD_3 单抗(ebioscience 公司产品,购自晶美公司)用量参照产品说明书。用 D-Hank's 调整所分离的淋巴细胞浓度为 5×10^6 个/mL,按 $10^6/\mu\text{L}$ 细胞量加入荧光抗体,室温下避光 40 分钟,之后用生理盐水洗一遍,上流式细胞仪检测。收集 4 000 个细胞用于数据分析。

肠粘膜解离程度的形态检查:取振荡后的小鼠回肠,用 10% 甲醛固定,经石蜡包埋、切片和 HE 染色,于普通光镜下观察。

2 结果

2.1 淋巴细胞的获取数量及活力

经上述分离纯化步骤,每只鼠可获得 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 个 IEL, $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个 LPL 及 $3 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ 个 PP 结淋巴细胞,活力 > 90%。

2.2 LPL 中以 CD_3^+ T 细胞的含量

流式细胞仪检测结果显示,用上述方法获得的 IEL 中, CD_3^+ T 细胞的含量为 $(91.13 \pm 4.61)\%$ ($n = 6$)。IPL 中, CD_3^+ T 细胞的含量为 $(63.99 \pm 3.59)\%$ ($n = 6$)。PP 结中, CD_3^+ T 细胞的含量为 $(39.62 \pm 9.58)\%$ ($n = 6$)。

2.3 小鼠小肠粘膜的解离程度

经消化液振荡消化后,小鼠小肠绒毛粘膜上皮除肠隐窝处外,基本与固有层分离,有些部位甚至完全脱落。同时粘膜固有层及淋巴小结保持完整。胶

原酶消化后可见固有层解离而粘膜肌层保持完整。

3 讨论

肠粘膜三种淋巴细胞性质和变化是粘膜免疫研究的重要内容,因此 3 种淋巴细胞的分离也成为了粘膜免疫学中的基本研究方法。在 3 种粘膜淋巴细胞中,IEL 和 LPL 的分离过程相对较复杂,影响因素也较多。IEL 与上皮细胞紧密相邻,位于上皮细胞。LPL 位于肠粘膜上皮细胞基底膜下的粘膜固有层中。上皮细胞基底膜与固有层解离程度对于 IEL 及 LPL 的获取有很大影响。一方面上皮层的过度解离有可能造成固有层的破坏,从而导致上皮内淋巴细胞内混入固有层淋巴细胞而使固有层淋巴细胞的分离数量的减少;另一方面,上皮细胞及基底膜解离不足则会造成胶原酶分离的固有层淋巴细胞中混入上皮内淋巴细胞。因此,获取上皮内淋巴细胞时消化的时间很重要,根据我们的反复实验,认为消化时间在 40 分钟能得到较好的效果。对分离 IEL 及 LPL 和 DTT 的 D-Hank's 消化液,分离 LPL 时,采用含有 0.1% II 型胶原酶的 1 640 培养液,提高了效率同时保护了消化下来的细胞。小肠粘膜的组织形态学切片显示,消化液消化振荡后,肠上皮细胞层基本解离同时固有层相对保持完整。胶原酶消化后可见固有层解离而粘膜肌层保持完整。在暴露粘膜面时,我们首先剪去了 PP 结,以避免 PP 结的淋巴细胞经胶原酶消化后混入 LPL 中。因玻璃毛较难买到,在淋巴细胞的纯化过程中,我们未采用玻璃毛吸附法,而是在不连续密度梯度离心之前用 300 目的尼龙网进行过滤,也可去除大量粘液。流式细胞仪检测结果显示,用上述方法获得的 IEL 中, CD_3^+ T 细胞含量将近 90%,LPL 中 CD_3^+ T 细胞含量 60% 左右,PP 结中 CD_3^+ T 细胞含量 60% 左右,与国外文献报道相似。肠粘膜淋巴细胞提取常因过程复杂且耗时长而影响活力,我们的提取步骤较为简单,在过程中注意保持低温,且在一些步骤中加入了 5% ~ 10% 的新生牛血清,因此取得了良好分离效果。此分离纯化技术稳定性较高,为粘膜免疫的研究提供了可靠的方法。

参考文献

- [1] 周桂琴,肖诚,周静,等. 桂枝汤对痹证(胶原诱导免疫性关节炎)小鼠肠粘膜免疫系统中 CD_4^+ 、 CD_8^+ T 淋巴细胞及 SigA 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24: 336
- [2] Guy-Grand D and Vassalli P. The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells[J]. Eur. J. Immunol, 1974, 4: 435
- [3] Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, et al. Two gut intraepithelial CD_8^+ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation[J]. J Exp Med, 1991, 173: 471

(收稿日期: 2005-06-23)