



# 医学免疫学 实验原理和技术

主 编 储以微 陆 青



Medical Immunology  
Experimental Principles  
and Techniques

非  
外  
借

 復旦大學 出版社



# 医学免疫学 实验原理和技术

主 编 储以微 陆 青

编 者 (按姓氏笔画排序)

汪路曼 张伟娟 陆 青

邵红霞 林玉丽 徐 薇

储以微

 復旦大學 出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学实验原理和技术/储以微,陆青主编. —上海:复旦大学出版社, 2020.4  
ISBN 978-7-309-14843-5

I. ①医… II. ①储… ②陆… III. ①医学-免疫学-实验 IV. ①R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2020)第 019676 号

医学免疫学实验原理和技术

储以微 陆青 主编

责任编辑/贺琦

复旦大学出版社有限公司出版发行

上海市国权路 579 号 邮编: 200433

网址: fupnet@fudanpress.com <http://www.fudanpress.com>

门市零售: 86-21-65642857 团体订购: 86-21-65118853

外埠邮购: 86-21-65109143

上海春秋印刷厂

开本 787 × 1092 1/16 印张 9.5 字数 209 千

2020 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

ISBN 978-7-309-14843-5/R · 1785

定价: 48.00 元

---

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社有限公司发行部调换。

版权所有 侵权必究

## 前 言

免疫学是医学与生命科学中的一门基础性和支柱性前沿学科,在医学基础和临床应用中具有关键作用。免疫学发展日新月异,得益于其研究方法和技术的不断创新,而新型免疫学技术的不断涌现,又带动了免疫学及其相关学科的理论及研究突破。利用基因敲除小鼠发现 Toll 样分子及功能,以及利用抗体技术研制抗 CTLA4 和抗 PD-1 抗体治疗肿瘤取得可喜成果,分别获得了 2011 年度和 2018 年度诺贝尔生理或医学奖,证明技术推动了理论研究和转化应用。因此,全面了解免疫学经典和新型实验技术,将有助于加深对免疫学理论知识的掌握,以及开展免疫学相关研究,这正是编写《医学免疫学实验原理和技术》的目的所在。

本书共 14 章,基本涵盖了医学免疫学研究所需实验原理和技术,包括免疫细胞分离、纯化、表型和功能检测;抗体制备、酶免疫分析技术、荧光免疫分析技术、化学发光免疫分析技术、免疫组化技术、免疫印迹技术、免疫沉淀技术和流式细胞术等现代常用检测技术;另设章节介绍免疫疾病动物模型制备技术,以及经典的凝集和沉淀反应等,为研究者提供专业免疫学研究方法。相较于已有的医学免疫学实验教材,本书注重于免疫学研究原理和技术的创新性和实用性,侧重介绍实验原理、具体操作步骤、可能难点和破解技巧。本书内容新颖全面,简明易懂。适用于基础医学、临床医学、公共卫生学、药学以及护理学的本科生,也适用于从事免疫学及相关研究的研究生、科研工作者以及临床检验、免疫生物治疗科等临床科室工作人员,有助于快速和系统地掌握免疫学经典和先进技术,更好地在实践中应用。

本书编者是由一支在实验教学中授课经验丰富,在一线研究中全面掌握免疫学实验研究原理和技术的年轻教师队伍组成,主要成员均有在海外学习和研究经历。本书是责编及全体编写人员共同努力、通力合作的结果,在此表示衷心感谢。由于免疫学发展日新月异,新技术不断涌现,编写内容难免存在疏漏之处,恳请读者批评指正,以利于我们今后再版时不断完善与提高。

储以微

2019 年 12 月

# 目 录

<b>第一章</b>	<b>巨噬细胞分离和功能测定</b> .....	1
	第一节 腹腔巨噬细胞的分离和纯化 .....	2
	第二节 巨噬细胞吞噬功能检测 .....	4
	第三节 经典活化的巨噬细胞和替代活化的巨噬细胞 .....	6
<b>第二章</b>	<b>树突细胞分离和功能测定</b> .....	10
	第一节 树突细胞的分离和纯化 .....	11
	第二节 小鼠骨髓前体细胞培养树突细胞 .....	13
	第三节 树突细胞功能检测 .....	14
<b>第三章</b>	<b>B 细胞分离和功能测定</b> .....	18
	第一节 B 细胞的分离和纯化 .....	18
	第二节 B 细胞亚群和细胞分子标记 .....	25
	第三节 B 细胞功能检测 .....	27
<b>第四章</b>	<b>T 细胞分离和功能测定</b> .....	37
	第一节 T 细胞的分离和纯化 .....	38
	第二节 T 细胞功能检测 .....	41
<b>第五章</b>	<b>抗体制备</b> .....	47
	第一节 多克隆抗体制备 .....	47
	第二节 单克隆抗体制备 .....	53
	第三节 应用举例：制备抗 NP 抗体 .....	58
<b>第六章</b>	<b>酶免疫分析技术</b> .....	61
	第一节 概述 .....	61
	第二节 酶联免疫吸附试验 .....	62





<b>第十四章</b>	<b>凝集和沉淀反应</b> .....	138
	第一节 抗原抗体反应 .....	138
	第二节 应用举例：免疫比浊法测定人血清 IgG 浓度 .....	142

## 巨噬细胞分离和功能测定

单核-巨噬细胞系统是机体固有免疫系统中重要的细胞成分,包括血液中的单核细胞和组织中固定或游走的巨噬细胞(macrophage,  $M\phi$ )。单核细胞从骨髓释放入血,穿越血管内皮细胞,进入组织后分化为巨噬细胞。定居在不同组织中的巨噬细胞有不同的命名,例如肝脏的库普弗细胞、肺脏的肺巨噬细胞、神经组织的小胶质细胞、骨髓的破骨细胞等。结缔组织、淋巴结和脾脏中也广泛分布着巨噬细胞。

巨噬细胞可非特异性吞噬异物、细菌、衰老和突变的细胞等,参与维持机体内环境的稳定、抗感染与抗肿瘤免疫。此外,巨噬细胞在特异性免疫应答的诱导与效应中也具有十分重要的调控作用。在免疫应答的起始阶段,巨噬细胞作为抗原呈递细胞(antigen presenting cell, APC)摄取和处理抗原,以抗原肽-MHC II类分子复合物的形式将抗原呈递给辅助T细胞,启动Th1型特异性免疫应答;在免疫应答的效应阶段,活化后的巨噬细胞趋化到病灶周围,以更有效地吞噬细菌、杀伤靶细胞。

病原体感染时,巨噬细胞通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)识别病原微生物保守的病原体相关模式分子(pathogen-associated molecular pattern, PAMP),进而,其表面MHC II类分子和共刺激分子表达上调,释放多种细胞因子(如IL-1、TNF、IL-12和IL-23)和趋化因子(如MIP、MCP-1等),参与免疫应答的起始和调控。单核-巨噬细胞系统功能失调可引起多种疾病。

巨噬细胞的吞噬功能很强,其吞噬作用由细胞表面不同的受体介导。例如凝集素样受体识别微生物表面的糖基;玻连蛋白受体识别凋亡相关分子;补体受体通过C3bi或C3d与抗原-抗体复合物结合;FcR通过抗体Fc段与表达相应抗原的靶细胞(如肿瘤细胞和病原体)结合,增强巨噬细胞对靶细胞的吞噬能力(即ADCC作用)。细胞因子等可通过调节巨噬细胞表面受体的表达影响巨噬细胞的吞噬和杀伤功能。此外,抗体可增强巨噬细胞的吞噬和杀伤功能,称为抗体的调理作用,此时抗体与靶细胞表面抗原特异性结合,抗原-抗体复合物通过抗体的Fc段与巨噬细胞表面的Fc受体(FcR)结合,促进巨噬细胞对靶细胞的吞噬和杀伤作用。

在巨噬细胞的相关研究中,单核-巨噬细胞的分离和纯化是研究单核-巨噬细胞功能和特性的起始环节。实验中常用的原代巨噬细胞包括腹腔巨噬细胞和骨髓来源的巨噬细胞。本章介绍巨噬细胞的分离、纯化、活化及相关功能检测。



## 第一节 腹腔巨噬细胞的分离和纯化

分离人单核-巨噬细胞主要用 Percoll 离心法从人外周血中获得。分离小鼠巨噬细胞可选取不同组织器官来源,其中以小鼠腹腔巨噬细胞取材最为方便,应用广泛。

下面以小鼠腹腔巨噬细胞的分离为例进行介绍。未经刺激的小鼠腹腔中可得到 $(2\sim 3)\times 10^6$  个的腹腔细胞,其中静止状态的巨噬细胞占 $50\%\sim 70\%$ 。如果先将一些刺激物注入小鼠腹腔,几天后收集腹腔细胞,则可以得到大量炎性巨噬细胞[每只小鼠为 $(1\sim 2)\times 10^7$  个]。

小鼠的腹腔细胞除含有巨噬细胞外,还含有少量淋巴细胞和粒细胞。单核-巨噬细胞具有很强的黏附能力,可黏附在塑料或玻璃表面,而淋巴细胞无此特性,因此可借助贴壁法将单核-巨噬细胞和淋巴细胞分开,纯化巨噬细胞。此法所分离的单核-巨噬细胞纯度较低,但方法简单,常用于巨噬细胞的初步纯化。需注意的是,贴壁法纯化巨噬细胞快捷简单,但可能诱导巨噬细胞活化。

Percoll 是一种经聚乙烯吡咯烷酮(PVP)处理的硅胶颗粒,经高速离心后形成一个从管底到液面密度逐渐递减的连续密度梯度,将单个核细胞悬液轻轻叠加在液面上,低速离心后,便得到 4 个细胞层。表层为死细胞残片和血小板;底层为粒细胞和红细胞;中间有 2 层,上层富含巨噬细胞,下层富含淋巴细胞。使用该方法也可纯化出所需的巨噬细胞。对于巨噬细胞纯度要求严格的实验,还可采用磁珠分选或流式细胞仪分选。

### 【材料与试剂】

- (1) 小鼠(6~8 周龄)。
- (2) 无菌巯基乙酸肉汤或 4% 淀粉肉汤。
- (3) DMEM-20: 含有 20% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。
- (4) DMEM-10: 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。
- (5) DMEM-0: 无血清的 DMEM 培养基。
- (6) Percoll 细胞分离液(密度 1.113 g/L)。
- (7) 75% 乙醇、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值 7.4)、台盼蓝染色液、无菌剪刀、镊子、小鼠固定板、15 ml 离心管。

### 【实验流程】

#### 1. 小鼠腹腔巨噬细胞分离

- (1) 消毒小鼠腹部,腹腔注射 2 ml 无菌巯基乙酸肉汤或 4% 淀粉肉汤。3~4 d 后颈椎脱位处死小鼠。
- (2) 如收集静息状态的腹腔巨噬细胞,不注射肉汤,直接从此步骤开始。放血处死小鼠(可减少腹腔中的红细胞),将小鼠浸入 75% 乙醇中浸泡消毒 3~5 min。
- (3) 固定小鼠,剪开腹部皮肤,暴露腹膜。
- (4) 用注射器沿腹中线注入 5 ml PBS,同时从两侧用手轻轻揉压小鼠腹膜 5 min,注意此时针头不宜拔出。



(5) 针头轻轻挑起腹壁,小鼠微倾向一侧,使腹腔中液体集于针头下,将腹腔灌洗液吸取入针管内。小心拔出针头,把腹腔灌洗液注入干净的离心管中。

(6) 收集的腹腔灌洗液于4℃下250g离心10min,去上清液。PBS洗涤细胞2~3次,弃上清液。

(7) 取2ml的DMEM-10重悬腹腔巨噬细胞,取10μl细胞悬液使用台盼蓝染色法检测细胞活力,调整细胞至合适浓度备用。

## 2. 贴壁法纯化巨噬细胞

(1) 用DMEM-20调节巨噬细胞浓度。以 $(2\sim4)\times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>巨噬细胞的密度将巨噬细胞接种到玻璃或塑料培养皿(瓶)中。37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养1~2h或过夜。

(2) 摇晃培养皿(瓶),然后充分吸弃未贴壁细胞。加入DMEM-0洗涤细胞3~4次。

(3) 加入适量含EDTA的胰酶消化液,37℃消化贴壁细胞15~30min,吸弃消化液,加入适量DMEM-10。

(4) 吸管吹打收集贴壁的巨噬细胞,加入离心管中。250g离心10min,去上清液。

(5) 适量DMEM-10重悬巨噬细胞,取10μl细胞悬液使用台盼蓝染色法检测细胞活力,调整巨噬细胞至所需浓度备用。

## 3. Percoll离心法纯化巨噬细胞

(1) 用DMEM-10重悬细胞,调整浓度为 $(2\sim5)\times 10^7$ 个/ml。

(2) 在15ml离心管中加入7mlPercoll和6mlPBS。室温下21000g离心40min,以形成连续的Percoll梯度。

(3) 轻轻地将细胞悬液加到形成的梯度上,离心机的加速和降速速度均设置为最低档,4℃下1000g离心20min。

(4) 用吸管仔细吸去顶层不透明带的细胞(该层为死细胞、碎片和少量血小板)。用新的离心管收集第二层细胞,其中含70%~90%巨噬细胞。

(5) 洗涤并计数纯化的巨噬细胞,以台盼蓝染色法检测细胞活力,调整细胞至合适浓度备用。

### 【注意事项】

(1) 雄性小鼠肠壁脂肪多,不利于腹腔灌洗液的收集;选择6~8周雌性小鼠较好。

(2) 在收集腹腔灌洗液时,操作应小心,避免刺破血管或肠壁。

(3) 增加洗涤次数可提高巨噬细胞的纯度。

(4) 小鼠腹腔巨噬细胞与培养皿黏附牢固,可用专用橡皮细胞刮子收集贴壁细胞。

(5) 1h贴壁法耗时短,但会损失部分黏附力弱的巨噬细胞。过夜培养可提高巨噬细胞获得率,并且使用20%~40%的小牛血清可以减少淋巴细胞的黏附。

(6) 此法可用于分离豚鼠或兔腹腔巨噬细胞。此时选用600g左右的豚鼠或3kg左右的兔腹腔注射巯基乙酸肉汤或淀粉肉汤,豚鼠用量为20ml、家兔用量为50ml。收集腹腔灌洗液细胞时,向豚鼠腹腔注入20~40ml、兔腹腔注入50~70ml预冷的PBS或DMEM-0。



## 第二节 巨噬细胞吞噬功能检测

鸡红细胞是有核细胞,较易辨别,可作为巨噬细胞吞噬功能检测的靶细胞。实验时将待测巨噬细胞与适量的鸡红细胞混合,置 37 °C 孵育一段时间,使巨噬细胞吞噬鸡红细胞,然后离心取细胞沉淀制成细胞涂片,染色镜检,观察吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞,计算吞噬百分率和吞噬指数。

巨噬细胞吞噬细菌的检测原理同上,只是用细菌代替鸡红细胞。不同之处在于该实验用 FITC 荧光素标记细菌。经 FITC 荧光素标记的细菌与巨噬细胞混合,待巨噬细胞吞噬完成后,洗出游离的 FITC 标记细菌,通过流式检测巨噬细胞吞噬细菌的荧光值反映巨噬细胞的吞噬功能。

若要进一步区分被巨噬细胞吞噬的细菌和黏附于巨噬细胞表面的细菌,可联合运用 EB 染料进行染色。其原理是 EB 不能进入巨噬细胞,被吞噬的细菌不能被 EB 着色,荧光显微镜下或流式检测呈现 FITC 的绿色荧光;但 EB 可进入黏附于巨噬细胞表面的细菌,荧光检测时 FITC 的绿色荧光激发 EB 染料,使其发出红色荧光。由此可以区分巨噬细胞内吞的细菌(绿色荧光)和黏附于巨噬细胞表面的细菌(红色荧光)。

### 【材料与试剂】

#### 1. 巨噬细胞吞噬鸡红细胞

- (1) 鸡红细胞悬液。
- (2) 待测巨噬细胞(可经不同刺激剂处理)。
- (3) PBS、0.8%戊二醛、姬姆萨染液、香柏油、载破片、水浴箱、离心机、光学显微镜。

#### 2. 巨噬细胞吞噬 FITC 标记的细菌

- (1) 热灭活的细菌。
- (2) FITC 荧光素,0.1 g/L。
- (3) 含 5%(体积比)胎牛血清的 PBS,冰上预冷。
- (4) 1.5 ml 离心管、水浴锅、水平摇床、荧光显微镜。

### 【实验流程】

#### 1. 巨噬细胞吞噬鸡红细胞

(1) 取适量的鸡红细胞,用 PBS 洗涤 2~3 次,每次 500 g 离心 5 min,然后用 PBS 配制 5%(体积比)的鸡红细胞悬液。

(2) 取  $10^6$  个经不同条件处理的待测巨噬细胞,用 PBS 稀释至终体积 1 ml,加入 5%鸡红细胞悬液[含  $(5\sim 6)\times 10^6$  个鸡红细胞],置 37 °C 水浴中孵育 15~30 min,每隔 5 min 混匀细胞。

(3) 500 g 离心 10 min,去上清液,保留约 50  $\mu$ l 液体。

(4) 用剩余的液体将细胞沉淀混匀,取细胞悬液制备细胞涂片,以 0.8%戊二醛固定 5 min,待干燥后加姬姆萨染色 0.5~1 min。

(5) 涂片干燥后加香柏油于油镜下观察,计数 100 个巨噬细胞,记录其中吞噬有鸡红细



胞的巨噬细胞,结果用吞噬百分率表示,即100个巨噬细胞中吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞数目;或者用吞噬指数表示,即平均每个巨噬细胞吞噬的鸡红细胞数目。

## 2. 巨噬细胞吞噬 FITC 标记的细菌

第一步:使用 FITC 标记细菌。

(1) 将对数生长期细菌置室温下  $12\ 000\ g$  离心  $10\ min$ ,弃上清液,调整细菌浓度至  $2 \times 10^8$  个/ml。

(2) 加入  $1\ ml$  FITC 重悬细菌, $25\ ^\circ C$  避光孵育  $30\ min$ ,期间不时振荡混匀。

(3) 加入  $10\ ml$  PBS, $4\ ^\circ C$  下  $6\ 000\ g$  离心  $5\ min$ ,洗涤细菌,去除游离的 FITC,重复洗涤  $2\sim 3$  次,直至上清液中不含 FITC。

(4) 加入适量 PBS 重悬细菌, $60\ ^\circ C$  热灭活  $60\ min$ 。

(5) 加入  $10\ ml$  PBS, $4\ ^\circ C$  下  $6\ 000\ g$  离心  $5\ min$ ,洗涤细菌,调整细菌浓度至  $2 \times 10^8$  个/ml,此即 FITC 标记的细菌。

第二步:巨噬细胞吞噬 FITC 标记的细菌。

(1) 用 PBS 调整巨噬细胞浓度至  $2 \times 10^7$  个/ml, $1.5\ ml$  离心管中加入  $0.1\ ml$  细胞悬液。

(2) 用 PBS 调整单细菌悬液至  $2 \times 10^8$  个/ml。

(3) 在上述含巨噬细胞的塑料试管中,加入  $0.1\ ml$  细菌悬液(每管  $2 \times 10^7$  个细菌)。

(4) 加入  $50\ \mu l$  预冷的血清,再加入 PBS 至终体积  $1\ ml$ ,盖紧管盖,置于  $37\ ^\circ C$  水平摇床上慢速摇动  $20\sim 30\ min$ ,使巨噬细胞充分吞噬 FITC 标记的细菌。

(5)  $4\ ^\circ C$  下  $250\ g$  离心  $5\ min$ ,弃上清液。加入冰预冷的 PBS 混匀细胞,重复洗涤细胞  $2\sim 3$  次,以彻底除去胞外未被吞噬的 FITC 标记的细菌。

(6) 用冰预冷的含  $5\%$  胎牛血清的 PBS 重悬巨噬细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。

(7) 加入 EB 调整终浓度为  $50\ \mu g/ml$ ,混匀。

(8) 立刻取  $10\sim 20\ \mu l$  细胞悬液滴在载玻片上,置荧光显微镜下观测。记录  $100$  个含细菌的巨噬细胞,鉴别被巨噬细胞吞噬的细菌(绿色荧光)和黏附于巨噬细胞表面的细菌(红色荧光)。

(9) 计数  $100$  个巨噬细胞,计算吞噬百分率(吞噬细菌的巨噬细胞/巨噬细胞总数  $\times 100\%$ )。

### 【注意事项】

(1) 实验时应掌握好吞噬时间,若时间过长,红细胞被消化和杀伤;若时间太短,吞噬会不充分。

(2) 巨噬细胞与鸡红细胞孵育时,每隔  $5\ min$  混匀细胞,使巨噬细胞充分吞噬鸡红细胞。

(3) 细胞涂片密度应适度,过密时细胞重叠影响结果判断,过少时则影响计数。

(4) EB 染色后应立即进行观测,随着时间的延长,EB 会缓慢进入巨噬细胞,使内吞的细菌呈现为红色,但所需时间较长。

(5) 巨噬细胞和 FITC 标记细菌的最佳比例需通过预实验确定,一般为  $1 : (10\sim 200)$ 。

(6) 巨噬细胞和 FITC 标记细菌的最佳吞噬时间是实验成功的关键因素之一,可在  $1\ h$



内每隔 10~15 min 连续取点进行监测。

### 第三节 经典活化的巨噬细胞和替代活化的巨噬细胞

根据巨噬细胞不同的分化程度、活化状态以及外界激活因子的差异,巨噬细胞呈现出复杂的异质性。经典活化的巨噬细胞(classically activated macrophage, M1 型巨噬细胞)和替代活化的巨噬细胞(alternatively activated macrophage, M2 型巨噬细胞)是在形态、表型、代谢特征及生物学行为等方面存在显著差异的 2 类巨噬细胞。

M1 型巨噬细胞可被诸如 IFN- $\gamma$ 、LPS、GM-CSF、TNF- $\alpha$  等炎症刺激和细胞因子激活,为经典的巨噬细胞激活。其中,IFN- $\gamma$  在免疫应答早期来自天然免疫的 NK 细胞和 NK T 细胞,免疫应答后期则主要来自活化的抗原特异性 Th 细胞。

经活化后,M1 型巨噬细胞体积增大、溶酶体增多、代谢旺盛,产生呼吸暴发,消耗氧的同时释放大量的活性氧中间体(reactive oxygen intermediate, ROI)和活性氮中间体(reactive nitrogen intermediate, RNI),抗感染及抗肿瘤效应显著增强。M1 型巨噬细胞具有强大的抗原呈递能力,表达高水平的 MHC-II 和 CD80、CD86 共刺激分子。同时,M1 型巨噬细胞分泌 IL-8、CXCL-10、MIP-1、CCL-5 等,可趋化中性粒细胞、树突细胞(DC)、NK 细胞和(或)T 细胞;分泌 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等参与炎症反应;上调一氧化氮合酶(iNOS)合成 NO,有效杀灭病原体;合成多种基质蛋白酶如 MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-9 和 MMP-12 降解胶原等细胞外基质。

M2 型巨噬细胞则可由 IL-4、IL-13、IL-10、免疫复合物、糖皮质激素等活化。经活化后,M2 型巨噬细胞上调甘露糖受体(mannose receptor, MR)、清道夫受体(scavenger receptor, SR)、Fc $\gamma$ RII 和某些趋化因子(MDC/CCL22、PARC/CCL18、TARC/CCL17、AMAC-1 等)的表达,释放抑炎因子 IL-1Ra/IL-1F3、Ym1、Ym2、RELMa、IL-10 和 TGF- $\beta$  等,抗原呈递能力较低,不产生 NO,通过合成细胞外基质、上调精氨酸酶(arginase)合成多胺,参与纤维细胞增殖、血管生成等,参与伤口愈合和组织修复等过程。M2 型巨噬细胞还进一步分为多种亚型,如 IL-4 或 IL-13 诱导的 M2a 型,免疫复合物及部分 TLR 配体诱导的 M2b 型,IL-10、糖皮质激素或开环甾体类激素诱导的 M2c 型。

在常规巨噬细胞亚型鉴定的实验中,通过检测巨噬细胞分泌的细胞因子、趋化因子、代谢相关的酶主要包括 iNOS、精氨酸酶以及细胞表面分子等,区分 M1 型和 M2 型巨噬细胞。上述分子 mRNA 水平检测使用实时 PCR 的方法,细胞因子、趋化因子蛋白水平检测使用 ELISA 试剂盒或流式细胞术检测。iNOS 和细胞表面分子蛋白水平检测可使用流式细胞术,精氨酸酶的活性则通过分析其代谢物进行检测。M1 型和 M2 型巨噬细胞的检测方法类似,本节将以 M1 型巨噬细胞为例,介绍巨噬细胞活化和表型检测的实验方案。

#### 一、M1 型巨噬细胞活化

静息状态的巨噬细胞体积小,几乎无杀伤活性。M1 型巨噬细胞在机体抗感染、抗肿瘤中具有重要作用。下面介绍的方法将巨噬细胞的活化分为致敏和激活 2 个阶段。经 IFN-



$\gamma$  等致敏后,巨噬细胞进入一种无杀伤活性的中间阶段,然后加入 LPS 等激活剂,经过一段时间(48~72 h)诱导后,可检测到巨噬细胞对病原体、靶细胞的杀伤或所产生的活性氧介质和活性氮介质。

### 【材料与试剂】

- (1) 静息状态小鼠巨噬细胞。
- (2) DMEM-10: 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基。
- (3) 小鼠重组 IFN- $\gamma$ 。
- (4) 大肠埃希菌 LPS, 浓度 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , DMEM-10 配制。
- (5) PBS(pH 值 7.4)、24 孔细胞培养板。

### 【实验流程】

(1) 用 DMEM-10 调整待活化巨噬细胞的浓度为  $4 \times 10^5$  个/ml。在 24 孔板中,每孔分别加入 1 ml 细胞悬液。

(2) 实验分组: 设置对照组、IFN- $\gamma$  组、LPS 组、IFN- $\gamma$ +LPS 组,每组 2 个或 3 个复孔。

(3) 在 IFN- $\gamma$  组和 IFN- $\gamma$ +LPS 组中,每孔加入终浓度为 2 U/ml 的 IFN- $\gamma$ ,置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 4 h,诱导巨噬细胞致敏。

(4) 弃上清液,加入 1 ml PBS,洗涤巨噬细胞,重复洗涤 2 次,每孔加入 1 ml DMEM-10 培养基。

(5) 在 LPS 组和 IFN- $\gamma$ +LPS 组中,每孔加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 LPS。置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 1 h,诱导巨噬细胞活化。

(6) 弃上清液,加入 1 ml PBS,洗涤巨噬细胞,重复洗涤 2 次,IFN- $\gamma$ +LPS 组中即为活化的巨噬细胞,加入 1 ml DMEM-10 备用。

### 【注意事项】

- (1) 根据需要调整巨噬细胞的起始用量,在 6 孔板或 96 孔板中进行活化。
- (2) 由于巨噬细胞对内毒素非常敏感,所用试剂和培养基应不含内毒素。
- (3) 根据巨噬细胞是否预先接触过某些活化因子、巨噬细胞的来源以及检测巨噬细胞功能时所采用的方法等,诱导巨噬细胞活化的最佳方案需相应调整。
- (4) 不同批次 IFN- $\gamma$ 、LPS 刺激巨噬细胞的最佳浓度应根据预实验确定。
- (5) 细胞内、外的多种因子(如 TNF- $\alpha$ )可作为已致敏巨噬细胞的激活信号,这些分子均可替代 LPS。
- (6) 此方法也可用于炎性巨噬细胞的活化,活化后的炎性巨噬细胞能更有效地杀伤病原体和肿瘤细胞。

## 二、M1 型巨噬细胞表型检测

活化后的 M1 型巨噬细胞表型可通过检测细胞因子、趋化因子、iNOS 和细胞表面分子进行鉴定。上述分子的 mRNA 水平可使用实时 PCR 方法检测,蛋白水平的变化可用 ELISA、流式细胞术等方法检测培养上清液中细胞因子、趋化因子的含量,用特异性抗体对细胞表面分子进行标记后采用流式细胞术检测。ELISA 见第六章。以下介绍采用流式细



胞术检测 M1 型巨噬细胞的表面分子。

直接法流式细胞术检测时,利用荧光标记的特异性抗体直接与待测巨噬细胞表面相应抗原分子结合,经洗涤去除游离荧光抗体后,流式检测细胞表面标记的荧光抗体种类和强度,鉴定巨噬细胞及其分化阶段。直接法流式细胞术操作简便,结果准确,同一细胞群可用多种抗体同时测定,但需注意这些抗体必须标记不同的荧光。实验过程中需同时设同型抗体对照组,并加入等量荧光标记的同型对照抗体;还需设细胞自发荧光对照管,其中只有待测细胞,不加入任何抗体。碘化丙啶(PI)只能使死细胞着色,利用这一点可排除死细胞对结果的干扰。

间接法流式细胞术检测时,先将细胞与未标记的特异性一抗混合,洗去未结合游离一抗后,再加入荧光标记的二抗,与细胞表面已结合的一抗特异性结合,使待测细胞标上荧光。本方法通用性好,一种荧光标记二抗可与多种一抗联合使用,但由于二抗一般为多克隆抗体,非特异性荧光背景较强,所以实验操作中应设置阴性或阳性对照组。另外,由于间接法流式细胞术检测时洗涤步骤增多,细胞易丢失,细胞数较少的标本应特别注意。

单核-巨噬细胞表达高水平的 FcR,进行间接法流式细胞术检测时,为避免 FcR 引起的非特异结合影响实验结果,建议尽量选用荧光标记的一抗,采用直接法检测巨噬细胞表型;或者采用荧光标记的  $F(ab')_2$  作为二抗,减少 FcR 的非特异结合。

### 【材料与试剂】

#### 1. 直接法流式细胞术检测巨噬细胞的表型

- (1) 待测细胞悬液。
- (2) 阻断抗体(如正常小鼠 IgG),浓度 1 g/L。
- (3) 荧光素标记的单克隆抗体: FITC-CD11b, PE-F4/80, APC-CD86。
- (4) 荧光素标记的同型对照抗体。
- (5) PBS, pH 值 7.2~7.4。

#### 2. 间接法流式细胞术检测巨噬细胞的表型

- (1) 待测细胞悬液。
- (2) 阻断 IgG,浓度 3 g/L(如二抗来源于羊,则用正常羊血清 IgG 作为阻断抗体)。
- (3) 未标记一抗(如大鼠抗小鼠 CD11b、F4/80、CD86)。
- (4) 荧光标记的  $F(ab')_2$  二抗(如一抗为大鼠抗小鼠,则荧光标记二抗选用抗大鼠 IgG)。

### 【实验流程】

#### 1. 直接法流式细胞术检测

- (1) 调整待测细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml,在每支试管中加入 1 ml 细胞悬液。
- (2) 每管加入  $4 \mu\text{l}$  阻断抗体,  $4^\circ\text{C}$  孵育 10 min,阻断非特异性 FcR 结合。
- (3) 加入适量荧光标记的单克隆抗体,终浓度为  $5 \mu\text{g/ml}$ ,避光冰上放置 15 min。
- (4) 每管加入 3 ml PBS, 200 g 离心 5 min,弃上清液,洗去未结合的游离抗体。
- (5) 重复洗涤细胞 2~3 次,弃上清液。
- (6) 加入  $500 \mu\text{l}$  PBS,混匀细胞,  $4^\circ\text{C}$  避光待检(上机前加入适量 PI,排除死细胞的干扰)。



## 2. 间接法流式细胞术检测

(1) 调整待测细胞浓度为  $2 \times 10^7$  个/ml, 在每支 1.5 ml 离心管中加入 50  $\mu$ l 细胞悬液 ( $1 \times 10^6$  个细胞)。

(2) 加入 0.5  $\mu$ l 阻断 IgG, 4  $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

(3) 加入适量的未标记一抗(终浓度 5  $\mu$ g/ml)混匀, 4  $^{\circ}$ C 孵育 15 min。设置同型对照组, 加入等量的同型对照一抗。

(4) 每管加入 500~800  $\mu$ l PBS, 500 g 离心 3 min, 弃上清液, 洗去未结合的游离一抗。

(5) 每管加入适量荧光标记的抗 F(ab')<sub>2</sub> 段二抗(终浓度 5  $\mu$ g/ml), 混匀, 避光冰上放置 15 min。

(6) 每管加入 500~800  $\mu$ l PBS, 500 g 离心 3 min, 弃上清液, 洗去未结合的游离荧光二抗。

(7) 重复洗涤细胞 2~3 次, 弃上清液。

(8) 加入 200  $\mu$ l PBS, 混匀, 4  $^{\circ}$ C 避光待检。

### 【注意事项】

(1) 所有荧光抗体的最适工作浓度需根据预实验确定。

(2) 如进行双标或多标染色, 可同时加入几种标记不同荧光的抗体。

(3) 样品中含有红细胞, 如新鲜分离的骨髓细胞或脾细胞, 则需在加入抗体前先裂解红细胞。

(4) 荧光抗体染色后应充分洗涤, 注意混匀和离心速度, 减少细胞团块和碎片。

(5) 已标记的细胞可在 4  $^{\circ}$ C 保存 4 h, 如需延长保存时间, 可用甲醛固定, 此时每管加入终浓度为 2% 的甲醛, 避光、4  $^{\circ}$ C 固定 15 min, 洗涤后待检。

## 主要参考文献

1. 储以微. 医学免疫学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2015.
2. 曹雪涛. 免疫学技术及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
3. 周光炎. 免疫学原理[M]. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2018.
4. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11: 723 - 737.
5. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, et al. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function [J]. Nat Immunol, 2016, 17: 34 - 40.
6. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [J]. Immunity, 2014, 41: 49 - 61.

(张伟娟)

## 树突细胞分离和功能测定

美国科学家 Steinman 和 Cohn 于 1973 年首次在小鼠脾脏中发现了一类具有树枝突起形态的细胞,因其成熟时似树突样突起而命名为树突细胞(dendritic cell, DC)。DC 由骨髓中髓样干细胞和淋巴样干细胞分化而来,其存在于淋巴组织、血液和非淋巴组织中,如皮肤、肠道。DC 成熟后的树突样突起大大增加了 DC 捕获抗原的能力,是目前所知抗原呈递功能最强的一类细胞。DC 作用主要是启动特异性免疫应答,其最大的特点是可以刺激初始 T 细胞活化和增殖,因此 DC 是适应性 T 细胞免疫应答的启动者,在免疫应答中占据了独特的地位。对 DC 的研究有助于理解机体免疫应答从非特异性免疫应答过渡到特异性免疫应答是如何发生和调控的,对各类疾病的发生、发展具有重要的研究意义。

DC 主要分为 2 类:经典 DC (conventional DC, cDC) 和浆细胞样 DC (plasmacytoid DC, pDC)。cDC 主要由骨髓中髓样干细胞和淋巴样干细胞分化而来,根据其分布位置不同可分为以下几类:①淋巴样组织中的 DC,主要存在于淋巴组织,如脾脏边缘区的边缘区 DC;滤泡生长中心的滤泡细胞等。②非淋巴样组织中的 DC,如在表皮上皮部位的朗格汉斯细胞;在肠道间质中的间质 DC 等。③体液中的 DC,主要是指在血液中游走的 DC。DC 的表面分子主要有 CD11c 以及 MHC II 分子、共刺激分子(CD80 和 CD86 等)、黏附分子(CD40 等)。cDC 的形态相较于 pDC 偏大。cDC 主要功能是诱导针对特异性抗原的特异性免疫应答并维持自身耐受,其作用主要是加工处理抗原,通过表面 MHC 将处理后的抗原呈递给 T 细胞,同时上调其表面共刺激分子的表达,从而刺激初始 T 细胞活化增殖,启动 T 细胞免疫应答。

pDC 因其形态与浆细胞相似而得名,可以来源于骨髓中髓样干细胞,也可以来源于淋巴样干细胞,其主要的模式识别受体是 TLR7 和 TLR9,表面分子有 PDCA-1、CD11c、B220,而 MHC II 分子和共刺激分子(CD80 和 CD86 等)表达较低。pDC 形态相对 cDC 较小,主要功能是参与抗病毒感染。病毒、细菌来源的非甲基化 CpG 或者内源性抗核抗体刺激 pDC 分泌大量的 I 型干扰素,并激发相应的 T 细胞应答。

此外,根据 DC 的功能特点还可以将其中具有负向调节免疫应答、维持自身免疫耐受的一类 DC 归结为调节性 DC,其主要通过分泌 IL-10 细胞因子发挥负向调节 T 细胞活化的功能,维持机体自身免疫耐受。

目前研究表明,DC 作为功能最强大的专职抗原呈递细胞,其在激活特异性免疫应答中扮演了重要的角色。在稳态情况下,DC 主要处于非成熟状态,其主要功能是识别和摄取抗原,高表达 Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)、甘露糖受体(MR),以及趋化因子受体