

网络出版时间:2013-06-20 16:22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130620.1622.029.html>

SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖试验 最佳条件的筛选

刘宸铄, 刘 芳, 杨鸣琦

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**探讨磺酰罗丹明 B 法(Sulforhodamine B, SRB)检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖反应的最佳条件。**【方法】**体外培养鸡外周血 T 淋巴细胞, 选用 SRB 法对淋巴细胞含量(1×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 和 1×10^7 mL^{-1})、ConA 质量浓度(5.0, 7.5, 10.0, 12.5 和 15.0 $\mu\text{g/mL}$)、培养时间(36, 48, 60 h)3 个因素进行组合设计培养 T 淋巴细胞, 每个组合设 3 个重复, SRB 显色后用酶标仪在 492 nm 波长处测量 OD_{492} 值, 计算刺激指数(Stimulation index, SI), 筛选 SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖的最佳条件。**【结果】**SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖试验的最佳条件为: 淋巴细胞含量 1×10^6 mL^{-1} , ConA 质量浓度 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 培养时间 48 h。**【结论】**确定了体外培养鸡外周血 T 淋巴细胞增殖的最佳 ConA 质量浓度、培养时间及淋巴细胞含量, 证实用 SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖结果可靠, 是切实可行的淋巴细胞数量与活性检测方法。

[关键词] 鸡; 外周血 T 淋巴细胞; 细胞增殖; 磺酰罗丹明 B 法

[中图分类号] R446.63; S858.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)07-0015-04

Screening the optimum SRB assay for chicken peripheral T-lymphocytes proliferation

LIU Chen-shuo, LIU Fang, YANG Ming-qi

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The optimal experiment conditions for SRB assay in chicken peripheral T-lymphocyte proliferation were investigated. **【Method】**The technology of cell in vitro culture to the peripheral T-lymphocyte of chicken was used. Three major factors which affect the proliferation, including the concentration of cell (1×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , and 1×10^7 mL^{-1}), the ConA density (5.0, 7.5, 10.0, 12.5 and 15.0 $\mu\text{g/mL}$), and the cell culture time (36, 48 and 60 h), were studied. The SRB assay and micro-plate reader with a wavelength of 492 nm were also performed. Meanwhile, the stimulation index was calculated. **【Result】**The optimal selection of SRB was: culture for 48 h, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ ConA and 1×10^6 mL^{-1} cell concentration. **【Conclusion】**The determinate concentration of cell, ConA density and cell culture time were obtained. It shows that SRB assay is a reliable practical method to analyze the number of lymphocyte and detect their activity.

Key words: chicken; peripheral T-lymphocyte; cell proliferation; SRB assay

[收稿日期] 2012-09-27

[基金项目] 农业部“948”引进项目(2009-Z45(2))

[作者简介] 刘宸铄(1986—), 女, 陕西延安人, 在读硕士, 主要从事动物病理学研究。E-mail: chunshi20@126.com

[通信作者] 杨鸣琦(1963—), 男, 陕西扶风人, 教授, 硕士, 硕士生导师, 主要从事动物病理学研究。E-mail: xbdnqm@163.com

磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B, SRB) 法是美国国家癌症研究院(NCI)推荐的一种抗癌药物筛选方法,该方法发明于 1990 年,具有快速、经济、灵敏的特点^[1],其测量结果不受时间影响,如今已广泛应用于细胞数量与活性的检测。SRB 是一种蛋白质结合染料,粉红色,可溶于水,与经三氯乙酸(TCA)固定后的细胞蛋白质中的碱性氨基酸结合呈现出明亮的粉红色^[2],并可稳定一段较长的时间^[3],其颜色变化与活细胞蛋白成正比^[4],可以此来判断细胞的数量与活性。目前,国内关于 SRB 法检测淋巴细胞增殖试验的报道尚不多见,也未曾见到 SRB 法检测鸡外周血淋巴细胞最佳条件的研究。本试验对 SRB 法检测鸡外周血淋巴细胞增殖试验的最佳条件进行探索,旨在为 SRB 法检测 T 淋巴细胞增殖能力的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 6 周龄健康伊莎褐蛋公鸡,购自咸阳市武功县某孵化场。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640 (GIBCO)、SRB (SIGMA)、新生小牛血清 (GIBCO)、刀豆蛋白 A (ConA, SIGMA)、淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程研究所)。

1.1.3 主要仪器 全自动酶标仪, RT-2100C, 深圳雷杜生命科学股份有限公司;倒置显微镜, OLYMPUS-CKX41SF; 二氧化碳培养箱, SANYO-MCO15AC;台式低速离心机,湘仪 TD24-WS。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制 (1)RPMI-1640 营养液。参考文献[5]及试剂说明书配制,过滤除菌,分装,4℃保存,临用前加入体积分数 10% 犊牛血清和青霉素、链霉素各 100 IU/mL。

(2)肝素溶液。将 1 g 肝素钠溶于 100 mL 灭菌生理盐水,121℃ 高压灭菌 15 min,小瓶分装,4℃保存,备用。

(3)ConA 溶液。用完全 RPMI-1640 营养液,将 ConA 粉剂配成质量浓度 100 μg/mL 的溶液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌分装后于 4℃保存,备用。

(4)4 g/L SRB 溶液。称取 0.8 g SRB,溶于 200 mL 体积分数 1% 的乙酸中,室温保存。

1.2.2 鸡外周血淋巴细胞悬液的制备 参考文献[6]的方法,无菌心脏采鸡血 10 mL,加入 0.4 mL 肝素抗凝,置超净工作台内,再加入 10 mL PBS 缓冲液,

混匀后平分为 4 管,将每管血液小心重叠于等体积的淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min,吸取白色淋巴细胞层,移入新的无菌离心管,用 PBS 缓冲液洗涤 2 次,每次 2 000 r/min 离心 10 min,6 g/L 台盼蓝染色计数,活细胞数应在 95% 以上。用完全 RPMI-1640 培养液调整淋巴细胞含量为 1×10^5 , 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 和 1×10^7 mL⁻¹。

1.2.3 淋巴细胞体外转化增殖最佳条件的筛选 设计淋巴细胞含量、ConA 质量浓度、培养时间 3 个因素,试验分为试验组、空白组 and 对照组,其中试验组是将上述不同含量淋巴细胞悬液加入 96 孔培养板中,每孔 100 μL,同时加入含不同质量浓度 ConA (5.0, 7.5, 10.0, 12.5 和 15.0 μg/mL) 的完全 RPMI-1640 培养液 100 μL,空白组每孔加完全 RPMI-1640 培养液 200 μL,对照组每孔加不同含量淋巴细胞悬液 100 μL 和不含 ConA 的完全 RPMI-1640 培养液 100 μL。每个组合均设 3 个重复。将 96 孔板置于体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中,于 39℃、饱和湿度条件下分别培养 36, 48, 60 h。

1.2.4 SRB 显色法^[7] 取上述各处理 96 孔板,置于超净工作台内,向细胞培养孔中轻柔加入 50 μL 经 4℃预冷的 800 g/L 三氯乙酸,静置 5 min 后,在 4℃冰箱中放置 1 h,去离子水冲洗 5 次除去 TCA,室温干燥后向每孔中加入 100 μL SRB,室温静置 30 min 后弃去染液,并用体积分数 1% 的乙酸冲洗 5 次,室温干燥后每孔加入 10 mmol/L Tris 溶液 100 μL,振荡 10 min 后用酶标仪测定 OD₄₉₂ 值^[8]。SRB 结果用刺激指数(SI)表示:

$$SI = \frac{\text{试验组 OD}_{492} \text{ 值} - \text{空白组 OD}_{492} \text{ 值}}{\text{对照组 OD}_{492} \text{ 值} - \text{空白组 OD}_{492} \text{ 值}}$$

1.3 数据处理

试验数据以“平均值±标准差”表示,采用 Excel 2003 计算刺激指数,并用 SPSS17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析,采用 LSD 法对最佳组合与其他各组合进行比较。

2 结果与分析

2.1 鸡外周血 T 淋巴细胞的分离

在倒置显微镜下对鸡外周血淋巴细胞悬液中的淋巴细胞进行计数,表明其中活细胞数达 98% (> 95%),因此可以对此淋巴细胞悬液进行稀释。

2.2 SRB 法测定 T 淋巴细胞体外转化增殖的最佳条件

对淋巴细胞含量、ConA 质量浓度、培养时间 3 个

因素进行鸡外周血淋巴细胞增殖试验,结果见表 1。

表 1 鸡外周血 T 淋巴细胞增殖试验刺激指数(SI)的统计结果
Table 1 Stimulation index(SI) of peripheral T-lymphocyte proliferation

培养时间/h Time	ConA 质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ConA density	淋巴细胞含量/ mL^{-1} Cell density					
		1×10^5	1×10^6	2.5×10^6	5×10^6	7.5×10^6	1×10^7
36	5.0	1.003 ± 0.195	0.736 ± 0.112	0.775 ± 0.269	1.230 ± 0.399	1.113 ± 0.401	1.129 ± 0.081
	7.5	1.349 ± 0.323	0.806 ± 0.286	0.607 ± 0.118	0.802 ± 0.246	0.609 ± 0.201	0.617 ± 0.211
	10.0	1.275 ± 0.194	0.762 ± 0.273	0.483 ± 0.119	0.748 ± 0.212	0.358 ± 0.162	0.604 ± 0.227
	12.5	1.062 ± 0.281	0.788 ± 0.075	0.608 ± 0.063	0.822 ± 0.168	0.893 ± 0.232	0.733 ± 0.186
	15.0	1.049 ± 0.324	0.595 ± 0.096	0.318 ± 0.043	0.715 ± 0.294	0.809 ± 0.293	0.926 ± 0.349
48	5.0	0.922 ± 0.075	$2.119 \pm 0.115^{**}$	1.231 ± 0.095	0.551 ± 0.077	1.198 ± 0.096	0.476 ± 0.044
	7.5	0.651 ± 0.193	1.657 ± 0.298	0.783 ± 0.040	0.601 ± 0.153	0.684 ± 0.256	0.585 ± 0.075
	10.0	0.642 ± 0.020	1.600 ± 0.425	0.774 ± 0.174	0.628 ± 0.024	0.745 ± 0.256	0.592 ± 0.142
	12.5	0.630 ± 0.036	0.807 ± 0.074	0.867 ± 0.136	0.583 ± 0.052	0.665 ± 0.039	0.557 ± 0.016
	15.0	0.692 ± 0.119	1.639 ± 0.265	1.135 ± 0.119	0.874 ± 0.153	0.876 ± 0.105	0.787 ± 0.048
60	5.0	0.819 ± 0.293	0.905 ± 0.117	0.768 ± 0.273	0.759 ± 0.151	0.542 ± 0.170	0.633 ± 0.128
	7.5	1.058 ± 0.222	1.117 ± 0.061	0.792 ± 0.156	0.634 ± 0.249	0.809 ± 0.225	1.018 ± 0.235
	10.0	0.891 ± 0.128	1.086 ± 0.099	0.871 ± 0.085	0.183 ± 0.042	0.878 ± 0.182	0.681 ± 0.106
	12.5	0.752 ± 0.174	0.796 ± 0.090	0.666 ± 0.118	0.284 ± 0.050	0.826 ± 0.179	0.893 ± 0.244
	15.0	0.477 ± 0.115	0.469 ± 0.079	0.242 ± 0.094	0.282 ± 0.081	0.744 ± 0.165	0.765 ± 0.153

注: ** 表示与其他各处理相比差异达极显著水平($P < 0.01$)。
Note: ** indicates extremely significant difference($P < 0.01$) from other treatments.

2.2.1 淋巴细胞含量对 T 淋巴细胞增殖的影响

本试验设计的淋巴细胞含量为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ mL^{-1} ,当细胞含量为 1×10^6 mL^{-1} 时,淋巴细胞增殖的刺激指数(SI)总体较高;当细胞含量低于 1×10^6 mL^{-1} 时,细胞数量不足;当细胞含量高于 1×10^6 mL^{-1} 时,细胞数量过多,相互抑制增殖。

2.2.2 培养时间对 T 淋巴细胞增殖的影响 本试验结果表明,在相同的培养条件下,48 h 的培养效果优于 36 和 60 h,其原因可能是培养时间过短时,淋巴细胞增殖少,转化慢;而培养时间过长时,细胞数量过多,增殖受到抑制。

2.2.3 ConA 质量浓度对 T 淋巴细胞增殖的影响

本试验共设计了 5 个 ConA 质量浓度,在最优的淋巴细胞含量和培养时间条件下,当 ConA 质量浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,刺激指数(SI)值最高;随着 ConA 质量浓度的升高,SI 值总体呈下降趋势,其原因可能为高质量浓度的 ConA 可导致细胞死亡,但其机理尚不清楚。

由表 1 可知,鸡外周血 T 淋巴细胞体外培养的最佳条件组合为:淋巴细胞含量 1×10^6 mL^{-1} ,ConA 质量浓度 5.0 $\mu\text{g/mL}$,培养时间为 48 h。在该条件下,T 淋巴细胞的刺激指数为 2.119 ± 0.115 。

3 讨 论

淋巴细胞增殖是指利用抗原或丝裂原在体外与淋巴细胞共同培养^[9],引起细胞内新的 DNA 合成及细胞分化,以增加效应淋巴细胞的数量。淋巴细胞增殖效果反映了机体细胞的免疫状态,是评价机体免疫能力的一个指标。影响淋巴细胞增殖试验的因素主要包括淋巴细胞含量、丝裂原含量以及培养时间等,其中细胞含量在一定范围内与 OD 值有较强的正相关性,细胞含量过高或过低均不能准确反映细胞的代谢情况,且因动物种属和细胞种类的不同,要求接种时细胞悬液中的细胞含量也不同。活化 T 细胞的有丝分裂使具有相同抗原特异性的细胞克隆得到扩增,因而大大增强了对特定抗原的免疫应答。ConA 作为丝裂原,只能刺激 T 细胞的增殖,其可与细胞膜表面受体相结合而活化细胞,ConA 的质量浓度和活性是测定淋巴细胞增殖反应的关键因素。T 细胞被刺激后,其有丝分裂活性经体外培养 48~72 h 后即可被检测到,因此许多学者在进行淋巴细胞增殖试验时常培养 48~72 h。确定上述因素在淋巴细胞增殖试验中的最佳值,可使试验结果能更充分地反映机体细胞的免疫状态。

目前,检测淋巴细胞增殖能力的方法主要有

^3H -TdR 渗入法、流式细胞法、MTT 法等。 ^3H -TdR 渗入法特异性强、灵敏度高、稳定性好,但由于操作繁琐,且存在放射性污染等问题,无法得到广泛应用。流式细胞法精确、敏感、特异性强,但所需设备价格昂贵,因此应用不如 MTT 法广泛。MTT 法操作简便、经济、快速,重复性好^[10],是细胞生物学及相关研究领域中常用的一种细胞活性及生长增殖分析方法,但该方法也存在一些不足,如 Formazan 的生成受到作用时间的影响,所以测定样品的 OD 值多随时间而变化,因此会增加试验误差^[11];对于悬浮细胞,MTT 染色后需加入二甲基亚砷(DMSO)溶解方能比色^[12],操作步骤繁琐,且试验中使用的试剂(如 DMSO 等)有一定毒性。近年来,许多学者研究了 MTT 法检测淋巴细胞增殖的最优条件^[13]。杨发龙等^[14]研究表明,MTT 法检测鸡外周血淋巴细胞增殖反应的最佳条件为:ConA 质量浓度 $15\text{ }\mu\text{g/mL}$,淋巴细胞含量 $1\times 10^7\text{ mL}^{-1}$,培养 48 h。赵世云等^[6]研究表明,MTT 法检测猪外周血 T 淋巴细胞增殖反应的最佳条件为,用 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ConA 刺激 $2\times 10^6\text{ mL}^{-1}$ 细胞。郭松林等^[15]研究表明,MTT 法检测鸭外周血 T 淋巴细胞的最好条件为:ConA 质量浓度为 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$,培养 66 h。吴建设等^[16]研究表明,全血法检测鸡淋巴细胞转化试验的最佳条件为:ConA 质量浓度 $45\text{ }\mu\text{g/mL}$,培养 56 h。

目前,尚未见 SRB 法检测淋巴细胞最佳条件的报道。不管是对贴壁细胞还是对悬浮细胞进行计数,SRB 法所测得的 OD 值与细胞实际数目均有良好的相关性^[17],且 SRB 法的稳定性优于 MTT 法^[18],甚至培养 7 d 后,用 SRB 法测得的 OD 值仍无明显变化。因此,SRB 法特别适合于大规模的细胞计数。

4 结 论

本研究确定了用 SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖反应的最佳条件,为 SRB 法检测 T 淋巴细胞增殖能力的应用奠定了基础。本研究确定的 SRB 法检测鸡外周血 T 淋巴细胞增殖的最佳条件为:淋巴细胞含量 $1\times 10^6\text{ mL}^{-1}$,ConA 质量浓度 $5.0\text{ }\mu\text{g/mL}$,培养时间 48 h。

[参考文献]

[1] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(13): 1107-1112.

[2] Voigt W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity [J]. Methods Mol Med, 2005, 110: 39-48.

[3] Pauwels B, Korst A E C, de Pooter C M J, et al. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for *in vitro* chemoradiation studies [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2003, 51: 221-226.

[4] Kubota T, Takahara T, Nagata M, et al. Colorimetric chemosensitivity testing using sulforhodamine B [J]. Surgical Oncology, 1993, 52(2): 83-88.

[5] 郭振环, 王哲慈, 马 霞, 等. 硫酸化多糖复方对鸡脾脏和外周血淋巴细胞增殖的影响 [J]. 江苏农业学报, 2010, 26(5): 1015-1019.

Guo Z H, Wang Z C, Ma X, et al. Effects of sulfated polysaccharide prescriptions on chicken splenic and peripheral lymphocyte proliferation [J]. Jiangsu Jour of Agr Sci, 2010, 26(5): 1015-1019. (in Chinese)

[6] 赵世云, 赵新新, 苏华荔, 等. 猪外周血 T 淋巴细胞增殖反应 MTT 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 35-38.

Zhao S Y, Zhao X X, Su H L, et al. Development of MTT assay for the detection of peripheral blood T cell proliferation of swine [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2010, 37(12): 35-38. (in Chinese)

[7] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening [J]. Nature Protocol, 2006, 1: 1112-1116.

[8] Papazisis K T, Geromichalos G D, Dimitriadis K A, et al. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay [J]. Immunological Methods, 1997, 208: 151-158.

[9] 黄其春, 杨小燕, 林淑慧, 等. 银杏叶提取物对肉仔鸡淋巴细胞增殖及细胞因子水平的影响 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(14): 23-26.

Huang Q C, Yang X Y, Lin S H, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on lymphocyte proliferation and the level of cytokines in broiler chicks [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(14): 23-26. (in Chinese)

[10] 谭卫东, 金 红, 罗弟祥, 等. 抗肿瘤药物筛选中 MTT 法和 SRB 法的比较 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(3): 17-22.

Tan W D, Jin H, Luo D X, et al. Comparison of MTT with SRB assays *in vitro* anticancer drug screening [J]. Natural Product Research and Development, 1999, 11(3): 17-22. (in Chinese)

[11] Wu F Y, Liao W C, Chang H M. Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two(MTT and SRB) cell viability assay [J]. Life Sci, 1993, 52(22): 1797-1804.

[12] 周思朗, 屈艳妮, 张 健, 等. SRB 法与 MTT 法细胞计数应用比较 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(17): 2615-2620.

Zhou S L, Qu Y N, Zhang J, et al. Comparison between SRB way and MTT way applying to count cells in cells culture [J]. China Journal of Modern Medicine, 2005, 15(17): 2615-2620. (in Chinese)