

文章编号:1009-0002(2003)01-0023-02

研究报告

逆向溶血斑法检测小鼠睾丸间质细胞睾酮的分泌

吴国华, 朱宝长

(首都师范大学 生物系, 北京 100037)

摘要: 用逆向溶血斑法检测单个小鼠睾丸间质细胞睾酮的分泌, 为进一步研究单个睾丸间质细胞的结构和功能提供一种有效的途径。结果表明, 分泌睾酮的睾丸间质细胞周围形成空斑, 空斑面积随睾酮分泌增加而增大。说明只要获得抗体, 逆向溶血斑法就可以检测任何细胞的分泌物。

关键词: 逆向溶血斑法; 睾丸间质细胞; 睾酮

中图分类号: Q579.11

文献标识码: A

Detection of testosterone secretion from individual leydig cells using reverse hemolytic plaque assay

WU Guo-hua, ZHU Bao-chang

(Department of Biology Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract: A reverse hemolytic plaque assay (RHPA) was used to detect testosterone secreting cells in a mixed leydig cell culture and to provide an effective access to research their structure and function. Results show that plaques form around the testosterone secreting cells. Testosterone increases, and the zones of hemolysis also increase. The reverse hemolytic plaque assay can be used to detect any cell secretion for which an antibody is available.

Key word: reverse hemolytic plaque assay; leydig cell; testosterone

以往激素的检测都是在整体水平上进行的, 通常采用放射免疫分析、酶联免疫法^[1]等, 都必须经过样品处理, 获取含有激素的溶液, 然后进行测定。虽然从宏观上可以了解机体激素分泌大小, 但不能有效地把激素分泌与特定地单个细胞结合起来。

本实验采用逆向溶血斑法 (reverse hemolytic plaque assay, RHPA)^[2] 从单个细胞水平上检测小鼠睾丸间质细胞睾酮的分泌, 根据溶血斑直径大小可以判断睾酮分泌量的多少。该方法简单明了, 最大的优点在于把激素分泌与单个细胞联系起来, 而且保持了细胞的活性, 可以结合免疫组织化学、电镜技术等进一步研究细胞的结构和功能。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199培养基购自GIBCO公司; 蛋白A、多聚赖氨酸、睾丸

酮抗体购自Sigma公司; 绵羊红细胞购自北京大学医学部; 补体取自兔耳静脉。

1.2 小鼠睾丸间质细胞的制备

睾丸采自2~3月龄小鼠, 参照Manduti等的方法进行处理: 睾丸在新鲜PBS液中清洗3~4次, 剥离被膜, 在平皿中用镊子将睾丸组织拔散, 后用铜网筛过滤, 1500 r/min离心5 min, 沉淀物用M199培养液稀释至 1×10^6 /ml, 台盼蓝染色计算细胞存活率 (>95%)。

1.3 绵羊红细胞与蛋白-A的偶联

1 ml蛋白A (0.5 mg/ml生理盐水)与10 ml三氯化铬 (0.1 mg/ml生理盐水)混合, 然后加入1 ml聚集的除血浆的绵羊红细胞。30℃水浴1 h, 离心除三氯化铬。最后, 偶联蛋白-A的绵羊红细胞与赖氏细胞混合。

1.4 涂板培养

1.4.1 载玻片小室的制备 包被有多聚赖氨酸的载玻片上粘上两条双面胶, 间距为20 mm, 然后将盖玻片覆盖在双面胶上。

1.4.2 混合细胞涂片 用M199将偶联有蛋白A的绵羊红细胞与睾丸间质细胞稀释, 然后通过毛吸作用使混合细胞平铺在载玻片上。

1.4.3 细胞培养 将载玻片放入34℃二氧化碳培养箱中培养45 min后, 用M199冲去未贴壁的细胞, 加睾丸酮抗体培养3 h

收稿日期: 2002-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39970553)

作者简介: 吴国华 (1976-), 硕士研究生。E-mail: wuchina@yeah.net

左右,加入补体培养1 h。

2 结果与讨论

离体培养的睾丸间质细胞分泌睾酮,经免疫反应与睾酮抗体结合,加入补体时睾丸间质细胞周围的绵羊红细胞破裂,就会形成溶血空斑(图1)。

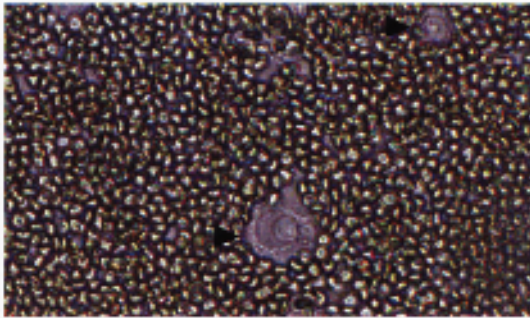


图1 未经hCG刺激的睾丸间质细胞周围形成的溶血斑

在培养过程中,经hCG刺激的睾丸间质细胞睾酮分泌的量增多,形成的溶血斑就越大。随机从hCG刺激的赖氏细胞和对照组中测量溶血斑的最大直径,比较两者在不同培养时间形成溶血斑的平均大小(图2),从图中看出,根据溶血斑大小可以半定量的测出睾酮分泌多少。

本实验虽然步骤简单,但是抗体、补体等加入的量需要根据自己实验的实际情况进行摸索。我们采用现有的抗原加入偶联有蛋白A的绵羊红细胞,然后设计几组不同浓度的抗体补体,分别加入几组离心管中,最后选出溶血现象最明显的一组作为自己的实验条件。

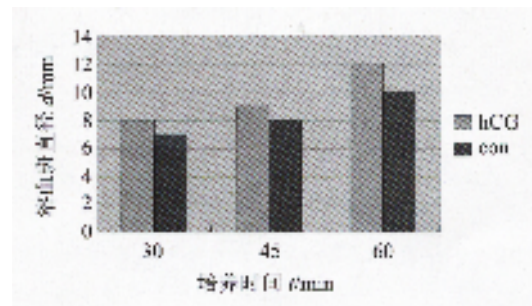


图2 hCG刺激与对照组溶血斑大小示意图

使用RHPA法可以直观地在显微镜下检验单个细胞的激素分泌水平,由于它不对细胞构成任何影响,因此以单个细胞为对象,连续应用逆向溶血斑和免疫组织化学及原位分子杂交技术对同一细胞的分泌功能与结构进行对应性研究,避免了以往组织细胞化学和生物化学研究中常见的结构与功能难以对应的脱节现象,从而使单个细胞分泌功能与其免疫组化等结构能在同一个细胞上统一起,目前国内外均未见同类报道。

参考资料

- [1] 朱立平. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京:人民军医出版社, 2000.322
- [2] Jimmy D, Neill L, Stephen Frawley Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay[J]. Endocrinology, 1982, 1135
- [3] Manduti C, Chauvin MA, Hartmann DJ, et al. Interleukin-1 α as a potent inhibitor of gonadotropin action in porcine Leydig cells[J]. Biol Reprod, 1992, 46:1119
- [4] Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells[J]. Endocr Rev, 1996, 17:221