

# 大鼠羊水与 RBL-2H3 肥大细胞共培养后脱颗粒的检测

安 峰, 陈玉川, 郭 薇

(中山大学中山医学院法医病理学教研室, 广东 广州 510080)

**摘 要:**【目的】探讨大鼠羊水与 RBL-2H3 肥大细胞共培养后是否有脱颗粒现象发生。【方法】取大鼠不同稀释度的羊水与大鼠来源的 RBL-2H3 肥大细胞系共培养, 用酶联免疫法测定不同时间样品上清的组胺、自发释放的组胺和总组胺, 计算组胺释放率。对细胞用阿利新蓝染色, 计算脱颗粒指数。用流式细胞仪测定 RBL-2H3 细胞 Annexin V 标记后的阳性细胞率。【结果】与不同稀释度的羊水共培养后, 细胞的组胺释放率有显著差异, 组胺的释放和羊水浓度正相关。阿利新蓝染色后计算的脱颗粒指数与组胺释放率测定结果一致。细胞 Annexin V 标记后的阳性率在羊水刺激后明显上升, 进一步证明了脱颗粒的发生。【结论】羊水中的物质可以通过直接作用导致 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒, 为羊水栓塞时肥大细胞脱颗粒机制的研究提供了一定的实验依据。

**关键词:** 栓塞; 羊水; 细胞脱颗粒; 组胺; 肥大细胞

中图分类号: R542.21 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2003)01-0026-04

## Analysis of Degranulation After Cultivation of RBL-2H3 Cell with Rat Amniotic Fluid

AN Feng, CHEN Yu-chuan, GUO Wei

(Department of Forensic Pathology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of rat amniotic fluid on the degranulation function of RBL-2H3 cell. 【Methods】 RBL-2H3 cells were cultivated with different dilutions of rat amniotic fluid. The histamine from the supernatants, the spontaneously released histamine and the total histamine were all determined by ELISA. The percentage of histamine release was calculated from these data. The RBL-2H3 cells were stained with alcian blue, then degranulation index was calculated after counting the positive cells. The percentage of Annexin V positive cells were also obtained by flow cytometry analysis. 【Results】 RBL-2H3 cells released histamine in a concentration-dependent manner upon challenge with rat amniotic fluid, the level of histamine was directly correlated with the concentration of rat amniotic fluid. Degranulation index was 23 %, and the percentage of Annexin V positive cells increased upon the stimulation with rat amniotic fluid. The results of degranulation index and the percentage of Annexin V positive cells were all in accord with the percentage of histamine release. 【Conclusion】 Rat amniotic fluid may induce degranulation of RBL-2H3 cell in a direct way. This fact supports the postulate that degranulation is involved in amniotic fluid embolism.

**Key word:** embolism; amniotic fluid; cell degranulation; histamine; mast cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003,24(1):26~29]

羊水栓塞是产科严重并发症之一, 它起病急、病情凶险、死亡率高, 往往造成死者家属对医疗工作的误解而引发医疗纠纷。传统观念认为其发生

机理是羊水成份进入人体造成机械性阻塞所致。近几年来, 有许多学者提出羊水栓塞和过敏有关, 认为羊水栓塞的发生是由于羊水作为外来抗原刺

收稿日期: 2002-09-04

基金项目: 教育部培养经费资助项目(2000)

作者简介: 安 峰(1973-), 男, 山西临汾人, 博士生。

激机体的肥大细胞脱颗粒,释放过敏介质引起一系列的病理反应,其主要依据是:①羊水栓塞的临床表现和过敏反应极其相似;②羊水栓塞时血液中的过敏介质如白介素、前列腺素等明显上升,肺组织及血液中的类胰蛋白酶水平也明显上升。但是,到目前为止,认定过敏的发生还缺少足够的实验证据。对过敏的发生机制也有争议,有一部分学者认为这种过敏反应是IgE依赖性的I型过敏反应<sup>[1]</sup>,而另一部分学者则认为是IgE非依赖性的过敏样反应<sup>[2]</sup>。RBL-2H3细胞是由美国Barsumians小组研究获得、来源于大鼠的细胞系,它是一种粘膜型的肥大细胞<sup>[3]</sup>,现在已经被广泛应用于脱颗粒研究,因而我们选择它为研究对象,观察在羊水抗原的刺激下细胞是否发生以释放组胺为代表的脱颗粒反应。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物与仪器

180~240 g SD怀孕大鼠,胎龄21 d左右。RBL-2H3细胞为本室保存。EMEM培养基为GIBCOBRL公司产品。组胺测定试剂盒为Coulter公司产品。Annexin V-Fluos staining kit购自美国罗氏公司。小牛血清为杭州四季青公司产品。流式细胞仪为Coulter公司EPICS Elite ESP型。

### 1.2 羊水收集

SD大鼠乙醚麻醉,并在局麻辅助的条件下,开腹全部切除子宫,在无菌的条件下抽取全羊水,依次稀释2倍和4倍。

### 1.3 细胞培养和分组

复苏RBL-2H3细胞,加入10 mL含100 mL/L热灭活小牛血清的EMEM培养基,置37℃孵育,6 h后第1次换液,继续培养,2d传代1次,细胞密度约为 $1 \times 10^6$ /mL。以不加入羊水的细胞为组胺自发释放组,以加入全羊水、2倍和4倍稀释羊水的细胞为全羊水组、2倍稀释羊水组和4倍稀释羊水组。每1组又按孵育时间分为5 min、30 min、60 min各3组,每组样本数均为6份。羊水加入比例为1:2。

### 1.4 组胺的测定

严格按试剂盒要求进行。待细胞生长稳定后,选取对数生长期的细胞,用胰酶消化收集,PBS洗2次,消除自发释放的组胺,调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ /mL,重新悬浮培养于6孔板中,每孔培养体积

4 mL。先从每孔分别取细胞悬液200 μL和100 μL的组胺释放缓冲液(试剂盒自带)混合,37℃分别孵育5 min、30 min、60 min后,1 000 r/min,4℃离心5 min,收集上清,作为组胺自发释放组。再从每孔分别取细胞悬液200 μL和100 μL的全羊水、2倍稀释的羊水以及4倍稀释的羊水混合,37℃分别孵育5 min、30 min、60 min后,以1 000 r/min,4℃离心5 min,收集上清,作为全羊水、1:2羊水以及1:4羊水组。最后从每孔分别取细胞悬液200 μL和100 μL的组胺释放缓冲液混合,反复冻溶,制备细胞裂解液,以1 000 r/min,4℃离心5 min,收集上清,再稀释20倍作为检测细胞总组胺的样品。将以上收集的上清液每200 μL加入50 μL乙酰化缓冲液和50 μL乙酰化溶液混匀,取出50 μL乙酰化后的样品上清,依次加入已由组胺单克隆抗体包被好的96孔板中,每孔再加入200 μL ELISA工作液,4℃,350 r/min震荡下孵育2 h,常规洗板后,每孔依次加入200 μL底物(3 min内完成),封板,20℃,350 r/min震荡下孵育30 min,每孔依次加入50 μL反应终止液(3 min内完成),酶标仪测读,波长405 nm,以上操作时均同时有标准液和对照液,以及底物和羊水空白对照。

### 1.5 组胺释放率的计算和统计学处理

组胺释放率按照: $[(\text{样品组胺} - \text{自发释放组胺}) / (\text{总组胺} - \text{自发释放组胺})] \times 100\%$ 进行计算,数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用 $t$ 检验。

### 1.6 脱颗粒指数(DI)计算

按文献报道的方法<sup>[7]</sup>取组胺自发释放组孵育60 min的细胞和全羊水作用组孵育60 min的细胞各100 μL加入150 μL的阿利新蓝染液充分混和后滴入计数板,低倍镜检,计数9大格。按照: $[(\text{组胺自发释放组着色细胞数} - \text{羊水作用组着色细胞数}) / \text{组胺自发释放组着色细胞数}] \times 100\%$ ,计算阳性百分比。

### 1.7 Annexin V阳性率检测和统计学处理

取组胺自发释放组孵育60 min的细胞和全羊水作用组孵育60 min的细胞用PBS洗2次,按本室郭薇等<sup>[8]</sup>的方法,应用罗氏公司的Annexin V-Fluos staining kit试剂盒和流式细胞仪对细胞进行碘化丙啶(propidium iodide)和Annexin V双荧光染色测定,计数Annexin V阳性的细胞数。数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养

复苏后的细胞生长良好,呈梭状、椭圆状,细胞内可见颗粒状物(图1)。

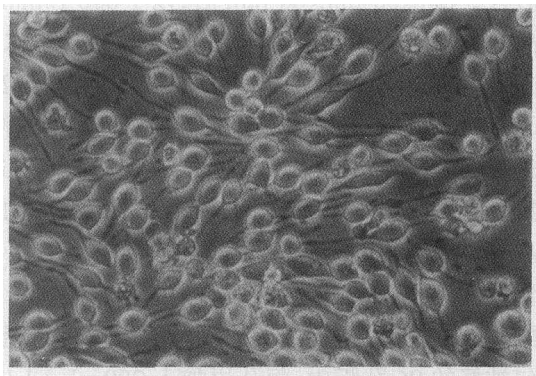


图1 培养在EMEM培养基中的RBL-2H3细胞

Fig.1 RBL-2H3 cells cultured in EMEM medium (200×)

### 2.2 组胺释放率

大鼠羊水与RBL-2H3细胞共培养后,上清中组胺的检测结果显示,孵育相同时间后的组胺释放率随羊水浓度的不同差别显著(表1)。

表1 不同稀释度的大鼠羊水与RBL-2H3细胞共培养不同时间后的组胺释放率

Table 1 The percentage of Histamine release of RBL-2H3 cells cultivation with various dilutions of rat amniotic fluid for different period of time ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

| Groups              | Percentage of histamine release post cultivation |                               |                               |
|---------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|
|                     | 5 min  | 30 min                        | 60 min                        |
| Undiluted           | 9.97 ± 0.29 <sup>1),2)</sup>                     | 16.52 ± 0.18 <sup>1),2)</sup> | 21.13 ± 1.61 <sup>1),2)</sup> |
| 1:2 diluted         | 5.38 ± 0.20                                      | 10.61 ± 0.21 <sup>1)</sup>    | 12.82 ± 0.96 <sup>1)</sup>    |
| 1:4 diluted         | 4.42 ± 0.14                                      | 5.57 ± 0.11                   | 5.72 ± 0.24                   |
| Spontaneous release | 0.00 ± 0.00                                      | 0.00 ± 0.00                   | 0.00 ± 0.00                   |

1) Compared with 1:4 diluted amniotic fluid group of the same time interval  $P < 0.01$ ; 2) Compared with 1:2 diluted amniotic fluid group of the same time interval  $P < 0.01$

### 2.3 脱颗粒指数(DI)

根据上述1.6列出的公式计算孵育60 min组着色细胞百分比为23%,与组胺释放率测定结果一致。

### 2.4 Annexin V 阳性率比较

未发生脱颗粒的细胞 Annexin V 和碘化丙啶均低染,发生脱颗粒的细胞 Annexin V 高染,碘化丙啶低染。组胺自发释放组孵育60 min的细胞 Annexin V 染色阳性率为  $8.4\% \pm 0.5\%$ ,全羊水作用组孵育60 min的细胞 Annexin V 染色阳性率为  $24.5\% \pm 1.2\%$ ,二者差异有显著性( $P < 0.05$ )(图2)。

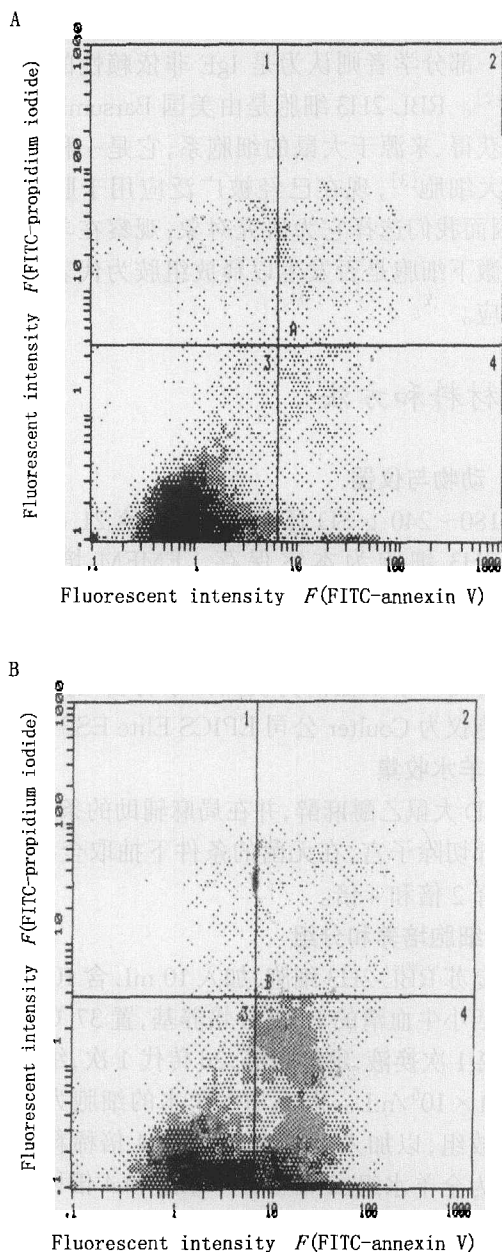


图2 流式细胞仪测定 Annexin V 阳性细胞比率

Fig.2 The flow cytometry analysis of Annexin V positive cells

A: normal RBL-2H3 cells (control); B: RBL-2H3 cells cultivated with undiluted rat amniotic fluid for 60 min

## 3 讨论

近年来,大量国内外学者<sup>[5]</sup>提出羊水栓塞发生时可能有肥大细胞脱颗粒机制的参与,肥大细胞可以由特异性抗原通过 IgE 介导激活,也可以由非特异性触发剂诱发脱颗粒<sup>[6]</sup>,在激活以后脱颗粒释放多种细胞介质参与过敏的发生。我们提取了大鼠的羊水和 RBL-2H3 肥大细胞共培养,以观察羊水对肥大细胞脱颗粒的影响,试图为羊水栓塞时肥大细胞的脱颗粒的发生机制提供一定的依据,RBL-2H3 肥大细胞与腹腔肥大细胞相比应用于脱颗粒实验时有以下优点:易于获得、容易培养、重复性好和低耗等。在本实验中我们将羊水和细胞直接共同培养,以观察是否有脱颗粒现象的发生,我们选用组胺的释放为主要标准。组胺是肥大细胞释放的原发性介质,在肥大细胞受到刺激后很快释放。

试剂盒提供的 96 孔板上包被有抗组胺单克隆抗体,待测样品中的组胺和试剂盒提供的组胺-碱性磷酸酶偶合物竞争和抗体的结合位点,组胺由于分子太小不足以完全占据抗体的结合位点,因此在结合前必须先乙酰化。乙酰化的组胺和组胺-碱性磷酸酶偶合物竞争抗体有限的结合位点,孵育完后洗去未结合的组分,加入底物 pNPP 检测结合上的酶量,其显色强度和样品中的组胺呈反比关系。我们选用组胺释放率作为衡量组胺释放的指标,因为组胺释放率排除了自发释放组胺的影响,更为客观。经过检测和计算,我们发现和羊水共培养后,RBL-2H3 肥大细胞在 5 min、30 min、60 min 的组胺释放率和羊水抗原的浓度呈剂量依赖关系,为正相关,证明羊水中的物质可以诱导 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒。

我们通过形态学观察计算了脱颗粒指数,这个指数来源于 HBDT 方法<sup>[7]</sup>,该方法对脱颗粒强度判定具有很好的特异性、灵敏度和重复性,实用简便可靠。本实验计算全羊水作用组细胞孵育 60 min 的脱颗粒指数,结果为 23%,和对应的组胺释放率结果相符。Annexin V 是参与细胞胞吐过程的蛋白,1999 年 Demo<sup>[8]</sup>首次报道用 Annexin V 来标记脱颗粒的肥大细胞,Annexin V 和细胞表面的分泌颗粒发生特异性的结合,本室郭薇等<sup>[9]</sup>成功利用它测定了肥大细胞在 I 型过敏反应时的脱颗粒。本实验检测了组胺自发释放组孵育 60 min 的细胞 Annexin V 阳性率和全羊水作用组孵育 60 min 的

细胞 Annexin V 阳性率,二者差异明显,和组胺释放率结果相平行,进一步证明了细胞脱颗粒发生。本实验证明:在体外,羊水可以直接刺激 RBL-2H3 肥大细胞发生脱颗粒反应,RBL-2H3 细胞没有经特异性 IgE 的致敏,与以往文献<sup>[10]</sup>报道的由 IgE 介导的 RBL-2H3 肥大细胞脱颗粒相比,在强度和速度上都较弱,羊水的直接刺激类似于非特异性触发剂导致的脱颗粒反应。本实验不能排除羊水栓塞时 IgE 介导的 I 型过敏机制的存在,相关研究还需进一步继续。

#### 参考文献:

- [1] Benson M D. Nonfatal amniotic fluid embolism: three possible cases and a new clinical definition[J]. Arch Fam Med, 1993,2(9):989.
- [2] Clark S L, Hankins G. Amniotic fluid embolism: analysis of the national registry[J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 172(4 Pt 1):1158.
- [3] Benburg J A. Basophil and mast cell lineages *in vitro* and *in vivo* [J]. Blood, 1992, 79(4):846.
- [4] Gary D V, Hankins M D. Acute hemodynamic and respiratory effects of amniotic fluid embolism in the pregnant goat model[J]. Am J Obstet Gynecol, 1993, 168(4): 1113.
- [5] Michael D, Benson M D. Amniotic fluid embolism, anaphylaxis, and tryptase[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996, 175(3 Pt 1):737.
- [6] Yoseph A. Mast cells in innate immunity[J]. Immunol Rev, 2000, 173(1):131.
- [7] Gilbert H S, Ornstein L. Basophil counting with a new method using alcian blue[J]. Blood, 1975, 46(1):279.
- [8] Demo S D, Masuda E, Rossi A B, *et al.* Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytometric Annexin-V binding assay[J]. Cytometry, 1999, 36(4):340.
- [9] 郭薇,陈玉川,刘水平,等.一种定量检测肥大细胞脱颗粒的新方法[J].上海免疫学杂志,2002,22(1):39.
- [10] Reiko T, Yoshiro S, Hideharu I, *et al.* Effect of an ectokinase inhibitor, k252b, on degranulation and Ca<sup>2+</sup> signals of RBL-2H3 cells and human basophils[J]. J Immunol, 1997, 159(2):964.

(编辑 黄小延)