

## 基于巨噬细胞实时分析的内毒素检测评价技术研究

赵婧华, 庄朋伟, 张艳军\*, 郝存江

天津中医药大学, 天津 300073

**摘要:** **目的** 建立一种基于体外巨噬细胞实时分析的快速、敏感的热原检测技术, 为内毒素, 即脂多糖 (LPS) 的检测提供新的方法。 **方法** 体外培养人源性巨噬细胞 THP-1, 利用倒置相差显微镜观察 LPS 对巨噬细胞形态变化的影响, 然后采用实时细胞分析仪 (RTCA) 实时监测不同质量浓度的 LPS 对巨噬细胞形态变化的影响。 **结果** LPS 质量浓度  $\geq 10$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 可以引起细胞形态变化, 实时细胞分析系统可以通过细胞指数 (CI 值) 实时反映这种形态变化, 并且随着剂量的变化, CI 值也呈剂量相关性变化。 **结论** 实时细胞分析系统可以实时监测 LPS 对巨噬细胞的影响, 为体外检测 LPS 提供了一个新的方法。

**关键词:** 内毒素; 实时细胞分析; 巨噬细胞; 形态变化

**中图分类号:** R **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2013) 04 - 0 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.

## Measurement of endotoxin through real-time monitoring morphological changes of macrophages

ZHAO Jing-hua, ZHUANG Peng-wei, ZHANG Yan-jun, HAO Cun-jiang

Tianjin university of traditional Chinese medicine, Tianjin 300073, China

**Abstract: Objective** This article is to establish a rapid, sensitive pyrogen detecting technology based on real-time analysis of macrophages. It provides a new method for detecting endotoxin, that is lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Culture human-derived macrophages (THP-1) *in vitro*, and observe the impact of LPS on morphological changes of macrophages by using inverted phase contrast microscope. Then monitor the impact of different mass concentrations of LPS on morphological changes of macrophages using real-time cell analyzer (RTCA). **Results** When the mass concentration of LPS is greater than or equal to 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS can cause cell morphology changes. Real-time analysis system can reflect this morphological changes through CI value, and with the changes of the dose, the CI value also shows a dose-dependent changes. **Conclusion** Real-time cell analysis system can monitor the impact of LPS on macrophages every time, so a new method of detecting LPS *in vitro* is provided.

**Key words:** endotoxin; real-time cell analysis; macrophages; morphological changes

细菌内毒素, 即热原, 又称脂多糖 (LPS) 是革兰阴性细菌细胞壁的主要组成物质<sup>[1-3]</sup>, 具有多种生物学活性, 它是临床静脉输液发热反应的直接诱因之一, 严重危害患者的健康及生命安全。因此控制进入人体内毒素的含量, 是减少临床上热原反应的必要措施。目前, 应用广泛的内毒素检测方法包括家兔热原试验和细菌内毒素试验, 但是这两种方法均存在很多不足的地方, 适用性不强。本实验新引进的实时细胞分析仪 (RTCA) 是基于电子监测的生物分析过程, 通过微电子将分子和细胞生物学结合起来, 当细胞或蛋白的生物学状态改变时, RTCA

会自动检测出细胞附近感应器的电子特性的改变, 然后这些模拟的电子信号被转换为数字信号, 用于处理及分析。其主要优点包括: 无标记检测; 实时监测; 自动测量; 安装、操作、控制方便; 高信息量; 高灵敏度和准确性; 应用范围广泛。鉴于此, 本文使用 RTCA 仪, 实时监测 LPS 对巨噬细胞细胞指数 (CI 值) 的影响, 以期探索新的体外检验热原的方法。

### 1 材料

#### 1.1 细胞

THP-1 单核细胞株, 购自 ATCC。

收稿日期: 2013-05-06

基金项目: 重大新药创制项目 (2010ZX09102)

作者简介: 赵婧华 (1986—), 女, 河北廊坊人, 硕士研究生, 研究方向为中药注射剂的不良反应研究。Tel: 15122131318 E-mail: zhaojh09@163.com

\*通信作者 张艳军 Tel: 13820188818 E-mail: zyjsunye@163.com

## 1.2 药品

LPS(Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111: B4), Sigma 公司。LPS 的配制: 按 1 mg/mL 溶解于 PBS 中, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过后分装, 贮存于  $-20$   $^{\circ}\text{C}$  备用, 临用时再稀释至所需浓度。

## 1.3 主要试剂

RPMI-1640 培养基 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (澳洲); 青霉素-链霉素 (GIBCO 公司); 谷氨酰胺、PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) 均购自 sigma 公司; 二甲基亚砷 (DMSO) 由 Biomol 公司生产, 华美生物工程公司北京分公司提供。

## 1.4 主要仪器

RTCA 仪 (罗氏); Forma 3110  $\text{CO}_2$  恒温培养箱 (Thermo 公司); DC300F 倒置相差显微镜 (Leica 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养及诱导

将 THP-1 单核细胞接种在含 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺、1% 的双抗 (青霉素和链霉素配制) 的 1640 培养基里, 置  $37$   $^{\circ}\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$ , 湿度恒定在 60%~70% 的孵箱内培养, 2~3 d 换一次液, 采用直接向培养瓶中加入新鲜培养液的方法换液, 一周左右离心一次, 将培养状态良好的细胞用于实验, THP-1 细胞经过 40 ng/mL PMA 诱导 24 h 后变为贴壁的巨噬细胞。

### 2.2 基于实时细胞分析系统监测不同细胞接种密度对细胞增殖的影响

打开 RTCA 细胞分析仪软件, 选择 3 个板子分开控制选项, 点击进入, 选择其中一块板子, 对板子的布局, 各孔细胞名称, 接种数量, 作用时间等进行编辑。先做消除本底实验: 向 16 孔中加入 150  $\mu\text{L}$  全培, 1 min 检测 1 次, 只检测 1 次。然后取出板子, 吸去里面的全培, 加入提前配好的 7 个密度

的巨噬细胞, 分别为  $16\times 10^5$ 、 $8\times 10^5$ 、 $5\times 10^5$ 、 $4\times 10^5$ 、 $2\times 10^5$ 、 $1\times 10^5$ 、 $0.5\times 10^5/\text{mL}$ , 150  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , PMA 诱导质量浓度为 40 ng/mL, 并设 2 个空白对照孔。15 min 检测 1 次, 监测 72 h。

### 2.3 LPS 对巨噬细胞形态变化的影响

取正常生长的 THP-1 细胞, 以  $5\times 10^5/\text{mL}$  的细胞密度接种于 12 孔板, PMA 为 40 ng/mL, 每孔 1 mL, 置 5%  $\text{CO}_2$ 、 $37$   $^{\circ}\text{C}$  培养箱贴壁培养 24 h, 弃去全部培养液, 加入质量浓度为 1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及 1 ng/mL、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS, 同时设空白对照孔, 继续孵育 30 min、1 和 2 h, 然后在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

### 2.4 基于实时细胞分析的 LPS 对巨噬细胞的影响

打开 RTCA 细胞分析仪软件, 选择 3 个板子分开控制选项, 点击进入, 选择其中一块板子, 对板子的布局, 各孔细胞名称, 接种数量, 作用时间等进行编辑。先做消除本底实验: 向 16 孔中加入 150  $\mu\text{L}$  全培, 1 min 检测 1 次, 只检测 1 次。然后取出板子, 吸去里面的全培, 种入含有 40 ng/mL PMA 密度为  $5\times 10^5/\text{mL}$  的细胞, 每孔 150  $\mu\text{L}$ , 30 min 检测一次, 检测 24 h 后, 吸出上清, 加入提前配好的 7 个不同浓度的 LPS, 即 1、10、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1、10、100 ng/mL 及 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 并设 2 个空白对照孔。5 min 检测 1 次, 继续作用 4 h。

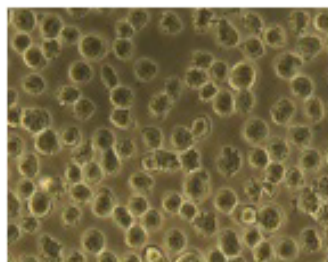
## 3 结果

### 3.1 THP-1 细胞诱导后形态的变化

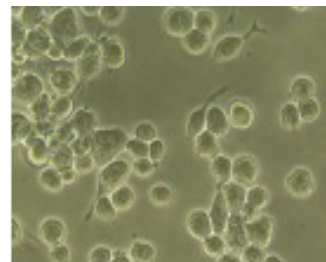
用 PMA 诱导 24 h 后, 细胞贴壁, 有的伸出伪足, 形态变大, 见图 1。

### 3.2 基于实时细胞分析系统监测不同细胞接种密度对细胞增殖的影响

将密度为  $16\times 10^5$ 、 $8\times 10^5$ 、 $5\times 10^5$ 、 $4\times 10^5$ 、 $2\times 10^5$ 、 $1\times 10^5$ 、 $0.5\times 10^5/\text{mL}$  的用 40 ng/mL PMA 诱导的



诱导前的 THP-1 细胞



THP-1 巨噬细胞

图 1 倒置相差显微镜下 PMA 诱导前后 THP-1 细胞的形态变化

Fig. 1 Morphological changes of THP-1 cells before and after PMA induce under a inverted phase contrast microscope

THP-1 细胞接种于 RTCA 细胞仪中, 150  $\mu\text{L}$ /孔, 于 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养 72 h 后, 结果显示, 细胞以  $5 \times 10^5/\text{mL}$  密度接种, 生长状态良好, 可以用于后续实验, 见图 2。

### 3.3 LPS 对巨噬细胞形态变化的影响

通过倒置相差显微镜观察, LPS 为 1  $\text{pg}/\text{mL}$  时, 细胞形态没有明显变化, LPS 为 10  $\text{pg}/\text{mL}$ 、1  $\text{ng}/\text{mL}$ 、

1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞形态的变化显著, 且随着浓度的增加、时间的推移, 细胞形态贴壁及变形更显著, 见图 3。

### 3.4 基于实时细胞分析的 LPS 对巨噬细胞的影响

实验结果显示, 1  $\text{pg}/\text{mL}$  LPS 刺激巨噬细胞后对其 CI 值变化没有影响, 浓度大于 1  $\text{pg}/\text{mL}$  LPS 刺激巨噬细胞后其 CI 值有明显变化, 见图 4。

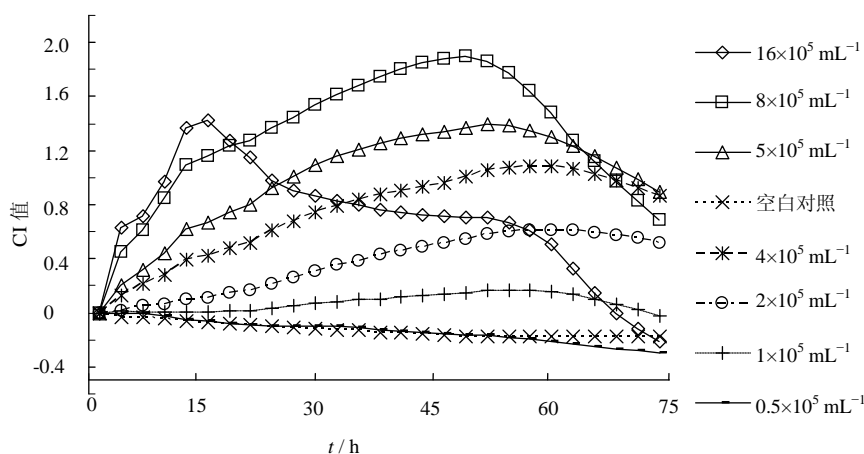


图 2 细胞不同接种密度对巨噬细胞增殖的影响

Fig. 2 Impact of different cell seeding density on the proliferation of macrophages

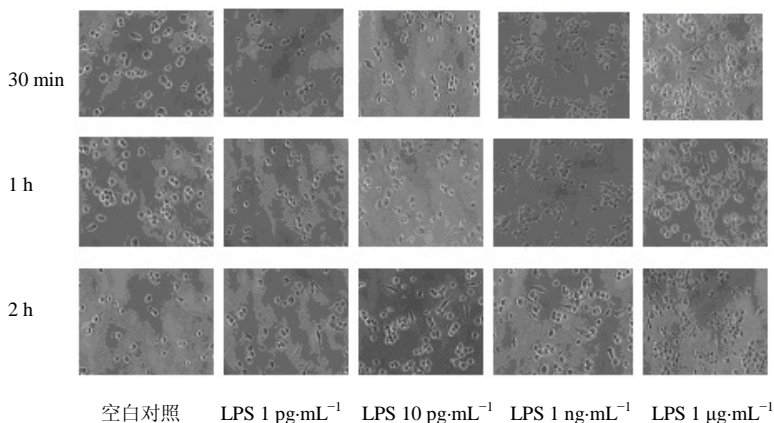


图 3 LPS 对巨噬细胞形态变化的影响

Fig. 3 Impact of LPS on morphological changes of macrophages

## 4 讨论

各国药典记载的热原检测方法主要包括家兔热原检查和细菌内毒素检查法 (常被称作鲎试验法)。家兔热原检测法的优点是能反映热原引起哺乳动物的升温过程, 能检测出细菌内毒素的致热源, 还能检测出非细菌内毒素的致热源<sup>[4]</sup>。缺点是只能给出

阴性或者阳性的定性结果; 灵敏度低、重复性差、费用高、使用活体动物实验等<sup>[5]</sup>。因为种属不一样, 家兔不能完全反应人体的发热情况, 也不能定量测量。细菌内毒素检测法优点是快速、简便、经济、标准化、可定量, 如今在很大程度上替代了家兔热原检测法, 但鲎是一种远古生物, 由于过分不合理

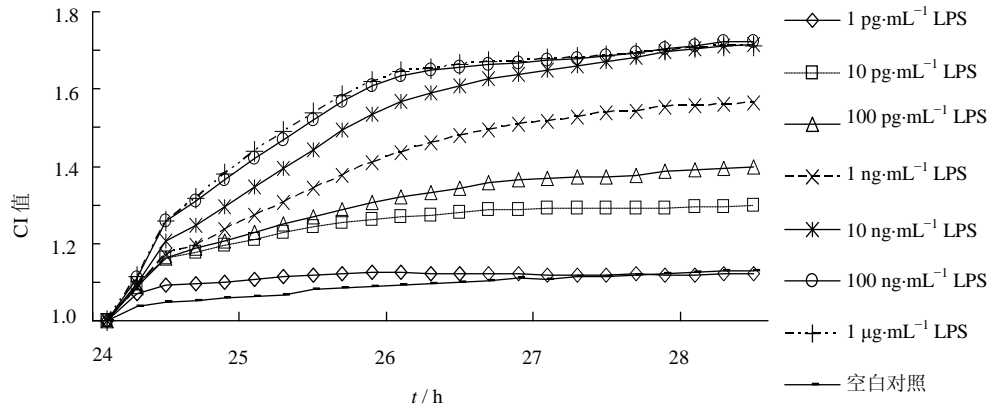


图4 基于实时细胞分析的LPS对巨噬细胞的影响

Fig. 4 Impact of LPS on macrophages based on real-time cell analysis

利用导致其已经濒临灭绝<sup>[6]</sup>。本研究探索了一种新的体外人源巨噬细胞检测热原的方法,引入国外先进仪器 RTCA 细胞实时分析系统。首先在光学显微镜下观察不同浓度 LPS 对巨噬细胞形态的影响,结果显示,1 pg/mL LPS 对巨噬细胞形态没有影响,浓度为 10 pg/mL、1 ng/mL、1 μg/mL 时细胞形态的变化显著,且随着浓度的增加、时间的推移,细胞形态贴壁及变形更明显。然后使用细胞实时分析系统检测了浓度为 1 pg/mL 到 1 μg/mL LPS 对巨噬细胞 CI 值的影响,结果显示浓度大于 1 pg/mL 的 LPS 就可以被 RTCA 仪检测到,此方法既可以定性也可以半定量检测内毒素的含量,与倒置相差显微镜下观察细胞形态的变化趋势相一致。体外人源巨噬细胞检测法是一种将内毒素直接作用于人源细胞的一种生物学反应,更具有说服力,所以本研究建立的方法值得进行下一步更深层次的研究,比如此方法是否同样适用于 LPS 以外的热原,从而完善体外检测内毒素的方法。

参考文献

[1] Otto Holst, Artur J. Ulmer, Helmut Brade, *et al.* Biochemistry and cell biology of Bacterial endotoxins [J].

*FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1996, 16(2): 83-104.

[2] ET Rietschel, T Kirikae, FU Schade, *et al.* Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function [J]. *FASEB Journal*, 1994, 8(2): 217-225.

[3] Rietschel ET, Brade H, Holst O, *et al.* Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification [J]. *Current Topics in Microbiology and immunology*, 1996, 216: 39-81.

[4] 沈娟,武向锋,王文俊,等.家兔细菌内毒素致热的灵敏度变化研究 [J]. *解放军药学报*, 2009, 25(5): 441-443.

[5] Daneshian M, Guenther A, Wendel A, *et al.* In vitro pyrogen test for toxin or immunomodulatory drugs [J]. *J Immunol Methods*, 2006, 313(1/2): 169-175.

[6] Nakagawa Y, Maeda H, Murai T. Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2002, 9(3): 588-597.