

图 2 流动相中甲醇浓度(C)与各组份容量因子(k)的关系

- | | |
|--------|--------|
| 1.扑热息痛 | 4.非那西汀 |
| 2.咖啡因 | 5.扑尔敏 |
| 3.阿司匹林 | |

3. HP LC法与药典法测定样品含量无显著差异($P > 0.05$)。但药典法测定结果比HPLC法要低6%左右,作者认为这可能与药典法操作繁杂、干扰因素较多、样品可能丢失有关。

4. 稳定性实验结果表明样品在24h内测定变化不大,8h和24h的测定值与0h比,经检验其间无显著差异($P > 0.05$)。

结语:

使用HPLC法测定复方扑尔敏片剂中

各组份的含量,分离度好,操作简便,结果准确。

参 考 文 献

- [1] 陈新谦主编. 新药药理学. 第十二版. 人民卫生出版社, 212
- [2] 北京市药品检验所编印. 北京市药品标准汇编. 1974年. 191
- [3] 安登魁主编. 药物分析. 第二版. 人民卫生出版社. 1935. 246~249

噻唑蓝比色法检测环孢霉素A和氢化考地松对小鼠的淋巴细胞和巨噬细胞的作用

首都医学院微生物学免疫学教研室(北京 100054) 陈哲生 孙明杰 刘振龙

摘要 本文报道噻唑蓝(MTT)比色法检测环孢霉素A和氢化考地松对小鼠的淋巴细胞和巨噬细胞的作用。结果表明,环孢霉素A对小鼠淋巴细胞的抑制作用强于巨噬细胞;氢化考地松

对两种细胞都有抑制作用。因此,MTT比色法不仅用来研究免疫增强剂,而且还可用于免疫抑制剂,即免疫抑制剂的筛选。

关键词 环孢霉素A 氢化考地松

MTT 生物调变剂

环孢霉素A(cyclosporinA)和氢化考地松(Hydrocortison),对免疫活性细胞有抑制作用,是目前临床上常用的免疫抑制剂(又称生物调变剂Biological Response modifiers, BRMs)。

本文首次报道噻唑蓝(MTT)比色法检测环孢霉素A和氢化考地松对小鼠的淋巴细胞和巨噬细胞的作用。

材料和方法

一、材料

环孢霉素A(北京药厂)氢化考地松(北京药厂);噻唑蓝(MTT)(Sigma公司)十二烷基硫酸钠(SDS)(BRL公司);淋巴细胞分离液(上海试剂厂);RPMI 1640培养液(苏格兰FIOV厂)。

二、方法

1. 分离细胞

(1) 小鼠淋巴细胞的分离 昆明系小鼠(本院动物室),摘除眼球,肝素抗凝,收集末梢静脉血,加入淋巴细胞分离液,低速离心,吸取淋巴细胞层离心三次,淋巴细胞计数,4℃保存在RPMI1640培养液中待用。

②小鼠腹腔巨噬细胞的分离

昆明系小鼠(本院动物室),腹腔注射灭菌的4%淀粉盐水溶液2ml,三天后处死,无菌取出腹腔液,低速离心,用RPMI1640洗三次,细胞计数,4℃保存在RPMI1640培养液中待用。

2. MTT比色法

(1) 溶液的配制

①配5mg/mlMTT的PBS(pH7.2)溶液,保存在4℃冰箱。

②配制10%SDS双蒸水溶液。

(2) MTT比色法

将小鼠淋巴细胞(3×10^7 /ml)或腹腔巨噬细胞(1.8×10^8 /ml)0.2ml 分别分装于无菌试管中,每2管为一组,除细胞对照组外,其

余各组分别加入环孢霉素A(400μg/ml)100ml,或氢化考地松(5mg/ml)50μl或100μl。37℃孵育2小时后,每管加入20μl(5mg/ml)的MTT,轻轻振荡后,再在37℃下孵育2小时,然后每管加入10%SDS200μl,轻轻振荡后,37℃孵育过夜。721G光电比色计测量OD570值。

结果

一、昆明系小鼠不同鼠龄的淋巴细胞的活性测定

不同鼠龄小鼠淋巴细胞的活性,其结果见图1。结果表明幼龄小鼠淋巴细胞活性差,随着鼠龄的增长,其淋巴细胞活性上升。本实验选用30天鼠龄的小鼠。

二、环孢霉素A和氢化考地松对小鼠淋巴细胞的作用

其结果见图2。图中显示两者对小鼠淋巴细胞都有抑制作用。氢化考地松(250μg)含量大于环孢霉素A(40μg),故前者抑制作用大于后者。

三、环孢霉素A和氢化考地松对小鼠巨噬细胞的作用

其结果见图3。氢化考地松(100μl)对小鼠巨噬细胞有明显抑制作用,而环孢霉素A(100μl)对小鼠巨噬细胞抑制作用不显著。

讨论

噻唑蓝比色法,简称MTT法。噻唑蓝在溶液中呈黄色,被活细胞摄取后,在细胞线粒体脱氢酶还原作用下成蓝紫色的结晶,经SDS溶解细胞后,在570nm下可测其光密度。代谢旺盛的细胞,还原MTT能力强,死的细胞和红细胞没有这种能力,而活化细胞比静止细胞还原作用强。因此,MTT法常用来研究细胞的活化,存活或增殖,可用来检测由各种丝分裂素活化的T细胞,B细胞,骨髓瘤细胞,T细胞瘤细胞、巨噬细胞样的瘤细胞、以及各种依赖IL-2的T细胞系细胞^[1,2]

我们曾报道用MTT法检测各种生物调变剂的作用,并指出MTT法显示的细胞活性

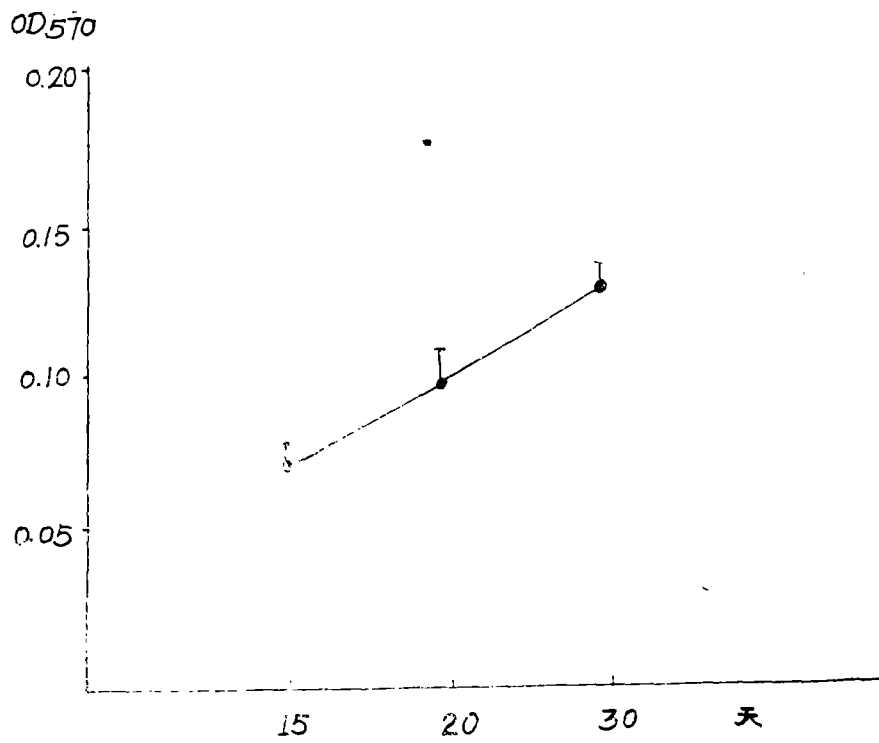


图1 同一品系不同鼠龄的小鼠淋巴细胞的活性

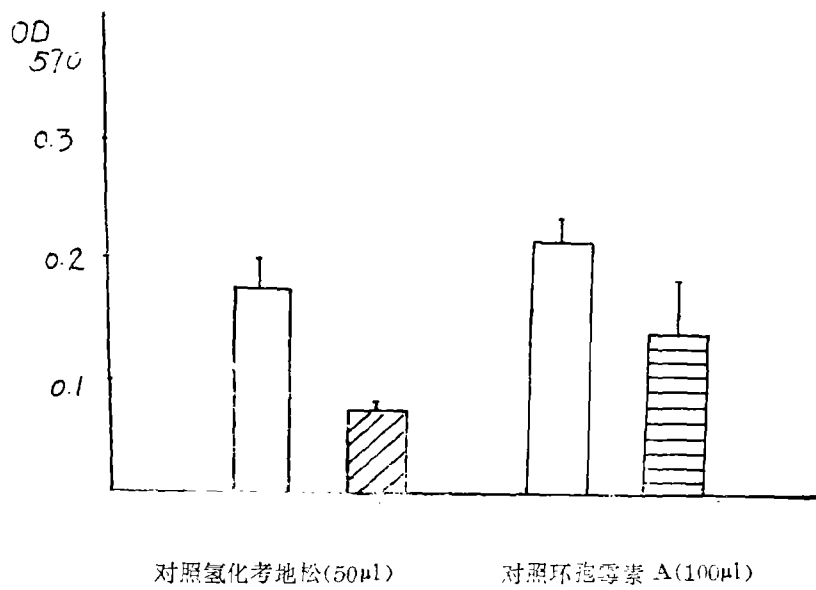


图2 氢化考地松(50µl)和环孢霉素A(100µl)对小鼠淋巴细胞的作用

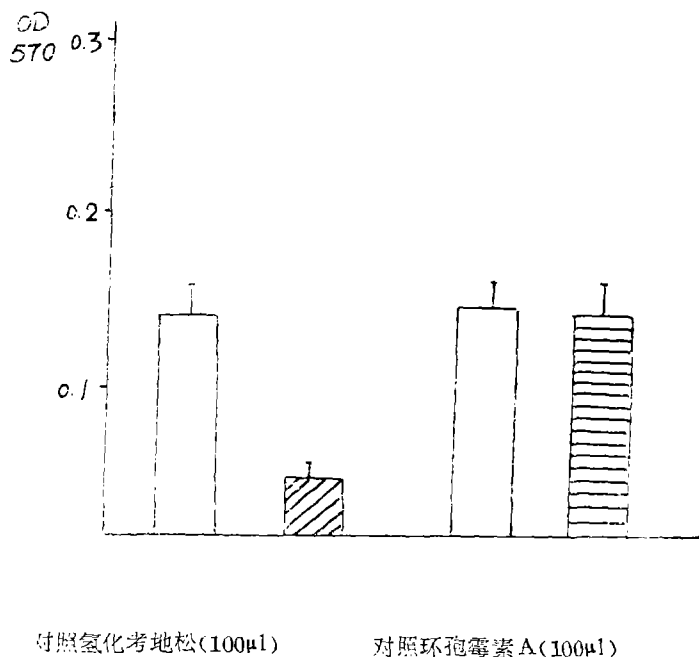


图3 氢化考地松(100μl)和环孢霉素A对小鼠巨噬细胞的作用

与CAMP的胞内浓度相关^[4]。

近年来使用的环孢霉素A是一种强有力的杀伤T_H细胞的免疫抑制剂。它是一种不溶性的霉菌代谢产物,在细胞周期的Go—G₁,能选择性地穿透抗原致敏的T细胞进而抑制Ⅱ型RNA多聚酶,从而阻断IL—2活化淋巴细胞,导致IL—2的合成降低,继而影响效应细胞与分化成熟和克隆增殖。但是,它对休止期T细胞无毒性作用^[3]。

我们实验结果阐明,环孢霉素A在同一浓度不仅对小鼠末梢淋巴细胞有明显抑制作用,对小鼠的巨噬细胞无作用。支持上述看法。

氢化考地松是一种皮质类固醇的免疫抑制剂。其作用机理:①抑制抗原递呈细胞活性,降低IL—1和HLA的Ⅱ类抗原的表达,②抑制T细胞活化,导致IL—2和IFN—γ的合成分泌减少,③抑制T_H细胞的分化成熟,

从而降低移植局部的淋巴细胞聚集。⁽²⁾

同样,我们实验结果证明,氢化考地松对小鼠淋巴细胞和巨噬细胞都有明显的抑制作用。证明上述观点。

因此,我们认为MTT比色法检测细胞抑制功能,是可行的。这样为临床检测各种生物调变剂对细胞的抑制作用,寻找到一种定量简便,经济,重复性好的方法,即为筛选免疫抑制剂提供了一种良好的方法。

参 考 文 献

1. Mosman T. J. Immunol. Meth, 1983, 65: 55.
2. Campling BG. etal. Br. J Cancer, 1991, 63:75.
3. Roitt. I. Essential Immunology: transplantation 5th Ed. Blackwell Scientific publication, 1989, 215
4. 陈哲生等.上海免疫学杂志, 1992, 5: 209.