

巯基乙酸盐诱导急性腹膜炎模型的建立及鉴定

张家赫^a

^a 天津医科大学第一临床医学院, 天津, 中国

ARTICLE INFO

Keywords:

巯基乙酸盐
急性腹膜炎
巨噬细胞
TNF- α
ELISA
Transwell

ABSTRACT

本实验采用 3% 巯基乙酸盐 (thioglycollate, TG) 腹腔注射诱导小鼠无菌性腹膜炎, 在约 48 h 后给予脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 二次刺激, 并通过腹腔灌洗获得炎性细胞及上清。实验以腹腔灌洗液离心后细胞沉淀作为炎性细胞募集的直观观察指标, 采用双抗体夹心 ELISA 检测上清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 并使用 MCP-1 建立 Transwell 趋化梯度评价腹腔细胞迁移能力。现有结果显示, TG+LPS 实验组可见较明显细胞沉淀, TNF- α ELISA 中实验组 OD450 为 0.941, 高于空白及两个对照; 0–100 pg/mL 标准范围线性拟合良好 (R^2 约为 0.993)。Transwell 显微镜图像可观察到结晶紫阳性迁移细胞, 但不同组起始细胞数未严格归一且可追溯视野数量不完全一致, 因此迁移结果以代表性图像和定性比较为主。本实验由模型建立、炎症因子检测和细胞迁移功能评价构成一条连续证据链, 可用于理解 TG 诱导腹腔炎症及 LPS 进一步激活巨噬细胞的实验逻辑。

实验信息

学号 2024193112

年级 2024 级

院系 第一临床医学院

专业 临床医学 (儿科学, “5+3” 一体化)

实验时间 2026 年 9 月 15 日—2026 年 9 月 17 日

1. 引言

急性腹膜炎可由感染、化学刺激或其他损伤因素引发, 其共同特征之一是局部先天免疫反应迅速启动并伴随炎性细胞募集。单核细胞和巨噬细胞既能参与外源性刺激的识别与清除, 也能够通过分泌细胞因子、趋化因子以及调节其他免疫细胞活动参与炎症反应。因此, 建立稳定、可重复的实验性腹膜炎模型, 有助于观察炎性细胞募集并进一步研究巨噬细胞的活化与功能变化。

巯基乙酸盐 (thioglycollate, TG) 腹腔注射是获得炎性腹腔巨噬细胞的经典方法。既往标准化方法中常以约 1 mL 3% TG 腹腔注射诱导无菌性腹腔炎症, 数日后通过腹腔灌洗回收富集的炎性腹腔细胞; 与未经刺激的腹腔细胞相比, TG 处理能够显著提高可回收炎性巨噬细胞数量。[2]

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌外膜的重要组成成分, 可经 CD14、MD-2 和 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 组成的识别体系启动信号转导。TLR4 下游可激活 MyD88 依赖和非依赖通路, 并进一步启动 NF- κ B 及 MAPK 等信号网络, 促进 TNF- α 等促炎介质的表达和释放。[3] 因此, 在 TG 募集腹腔炎性细胞后给予 LPS 二次刺激, 并检测 TNF- α , 可从细胞因子释放层面反映炎症细胞的进一步活化。

除炎症因子分泌外, 定向迁移也是单核-巨噬细胞系统的重要功能。单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1, 又称 CCL2) 主要通过 CCR2 介导单核细胞及巨噬细胞趋化, CCL2/CCR2 轴在炎症部位的单核细胞募集过程中具有重要作用。[4] Transwell 体系可在多孔膜两侧建立趋化梯度, 通过观察穿膜细胞评价其迁移能力。

本实验将三次课堂实验整合为一个连续研究过程: 首先以 TG 腹腔注射诱导无菌性腹膜炎并募集腹腔炎性细胞; 随后以 LPS 进行二次刺激并获取腹腔灌洗液; 最后分别通过 TNF- α ELISA 和 MCP-1 Transwell 实验, 从炎症因子释放和迁移功能两个方面评价腹腔炎性细胞的活化状态。实验目的在于掌握小鼠腹腔注射与腹腔灌洗等基本操作, 理解 TG-LPS 炎症模型的建立逻辑, 并学习使用 ELISA 和 Transwell 方法对模型进行功能性鉴定。[1]

2. 材料与方法

2.1. 实验动物、分组与主要试剂

实验使用 3 只小鼠, 分别设为对照 1 组、对照 2 组和实验组。主要试剂包括 PBS、3% TG、LPS、RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、MCP-1、TNF- α ELISA 检测试剂、4% 固定液及 0.1% 结晶紫染液等。主要器材包括注射器、离心管、离心设备、酶标板与酶标仪、Transwell 小室、载玻片及光学显微镜等。[1]

Table 1

实验动物、分组与主要试剂

组别	首次腹腔处理	约 48 h 后刺激
对照 1 组	PBS 1 mL	PBS 200 μ L
对照 2 组	PBS 1 mL	LPS 200 μ L
实验组	3% TG 1 mL	LPS 200 μ L

2.2. TG 诱导急性腹膜炎模型

对 3 只小鼠完成分组标记。固定小鼠后暴露腹部, 常规消毒, 在下腹部选择合适位置进行腹腔注射。对照 1 组 and 对照 2 组分别注射 PBS 1 mL, 实验组注射 3% TG 1 mL。注射过程中注意避免进针过浅形成皮下液体隆起, 并尽量避开腹腔重要脏器。处理后将小鼠继续饲养, 约 48 h 后进行后续刺激和取材。[1] TG 诱导炎性腹腔细胞的思路与经典腹腔巨噬细胞获取方法一致。[2]

2.3. LPS 二次刺激与腹腔灌洗

约 48 h 后, 对照 2 组与实验组分别腹腔注射 200 μL 、浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS, 对照 1 组注射等体积 PBS。刺激 15 min 后观察并记录动物状态, 随后按课堂实验流程完成处置与腹腔取材。

以 75% 乙醇处理体表后暴露腹部, 向腹腔内注入约 2 mL PBS, 轻柔按摩腹部约 1 min, 使腹腔细胞充分进入灌洗液; 随后回收约 1 mL 腹腔灌洗液至对应标记的离心管。灌洗液按课堂设定离心 5 min 后分离上清和细胞沉淀。观察各组离心后管底细胞沉淀及样本外观并拍照记录; 上清用于 TNF- α ELISA, 细胞沉淀用于后续 Transwell 实验。[1]

2.4. TNF- α 双抗体夹心 ELISA

采用双抗体夹心 ELISA 检测腹腔灌洗液上清中的 TNF- α 。TNF- α 标准品设置 0、3.125、6.25、12.5、25、50、100 和 200 pg/mL 共 8 个浓度, 每一浓度设置双孔。样品及标准品加入酶标板后, 依照课堂实验流程完成特异性抗体反应、洗板、酶结合物反应及 TMB 显色; 加入终止液后, 于 450 nm 读取各孔吸光度 (OD450)。[1]

标准品 OD 值以零标准进行背景校正。根据标准品浓度与校正 OD450 绘制标准曲线。由于 200 pg/mL 标准点已进入明显的高浓度非线性/平台区, 本实验结果处理采用 0–100 pg/mL 范围进行线性拟合, 并以决定系数 R^2 评价拟合质量。样品结果结合本组空白进行比较和换算。

2.5. Transwell 趋化实验

离心所得细胞沉淀以无血清 RPMI 1640 培养基重悬。Transwell 下室加入 2.5 mL 含 10% FBS 及 20 ng/mL MCP-1 的培养液, 建立趋化梯度; 上室加入各组腹腔细胞悬液。对照 1 组和对照 2 组分别加入 1 mL 细胞悬液。由于实验组回收细胞明显较多, 课堂实际操作中实验组取 200 μL 细胞悬液并加入 800 μL 无血清 RPMI 1640 补足至 1 mL 后加入上室。该处理能够降低实验组细胞负荷, 但并不等同于经过细胞计数后的严格起始细胞数归一化。

培养约 4–6 h 后取出 Transwell 膜, 以 4% 固定液固定约 30 min, 再以 0.1% 结晶紫染色约 20 min。洗去多余染液后, 用湿润棉签轻轻擦除膜上表面未穿膜细胞, 剪取膜并铺于载玻片, 在光学显微镜下观察膜下表面的结晶紫阳性迁移细胞并拍照记录。MCP-1/CCL2 具有促进单核细胞谱系细胞趋化迁移的经典作用, 因此可作为本实验下室趋化刺激。[4]

2.6. 数据处理原则

ELISA 标准曲线以 TNF- α 浓度为横坐标、背景校正后的 OD450 为纵坐标进行线性拟合。9/1 组最终采用的样品身份映射为: 空白 0.119、实验组 0.941、对照 1 组 0.189、对照 2 组 0.207。后续结果部分据此报告各组 OD450 并进行 TNF- α 水平解释。

Transwell 结果仅使用可追溯的原始显微镜照片。存在明显反光、严重细胞聚团或无法可靠区分单细胞的视野不用于制造精确单细胞计数; 考虑到对照 1 组仅保留 2 个可追溯视野、且三组起始细胞数并未通过计数严格归一, 本实验以后续代表性显微图和定性/半定量比较为主, 并将这些因素作为讨论中的实验局限。

致谢

感谢基础医学探究实验课程教师对实验流程和结果分析方法的指导。

声明

- 资金支持: 不适用。
- 利益冲突: 作者声明不存在利益冲突。
- 动物实验说明: 本实验为课程教学实验, 动物操作按课程实验室既定教学流程与教师指导完成; 本报告不单独主张独立伦理审批编号。
- 数据可得性: 本文讨论的数据均包含在正文与图表中。

参考文献

- [1] 天津医科大学《基础医学探究实验》课程资料. 羧基乙酸盐诱导急性腹膜炎模型的建立及鉴定: 实验指导、课件与课堂实验流程. 2026.
- [2] Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;83:14.1.1-14.1.14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>
- [3] Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.* 2004;113(2):153-162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x>
- [4] Semple BD, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(3):459-473. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.240>