

正常小白鼠外周血 E-玫瑰花环形成试验方法研究*

孙范五 祝水芬

(浙江人民卫生实验院)

机体细胞免疫的检查方法可分为体内法与体外法两大类。E-玫瑰花环形成试验为体外法,系非特异性免疫测定。由于T淋巴细胞膜表面具有与绵羊红细胞结合的受体,因此能与绵羊红细胞非特异性结合,形成玫瑰花环,或称红细胞花瓣形成细胞,简称ERFC。根据E-玫瑰花环形成率,可以间接判断机体细胞免疫能力,故目前已广泛应用于临床作为测定人群免疫状态的指标。

1964年,基耳伯格(Zealberg)^[6]首先发表了用玫瑰花状反应(rosette formation)测定能与抗原结合的淋巴细胞的方法。此后,国内外在这方面做了不少工作,方法也进行了改进^[2,4]。然而应用E-玫瑰花结试验来测定小白鼠免疫状态的报道却很少,从小白鼠外周血测定E-玫瑰花结的报道更少见。因为在不少实验研究中,很需要建立这方面的方法,为此,我们用本院繁殖的正常小白鼠外周血进行了E-玫瑰花结试验方法的探讨。现介绍如下。

材 料 和 方 法

(一) 淋巴细胞分离液的配制

分离淋巴细胞的方法很多,本实验系用比重梯度离心法分离。但由于动物血液中淋巴细胞比重与人有所差异,因此淋巴细胞分离液(简称分离液)的比重也应随着改变。我们配制了三种比重分别为1.078、1.085、1.090的分离液进行摸索。所用试剂为上海试剂二厂出品的40%聚蔗糖溶液(Polysucrose solution,商品名为Ficoll)。上海南昌制药厂出品的60%泛影葡胺注射液(Injectio Meglumini Diatrizoici),比重为1.357。上述所配制的这种分离液,起着支持和保护淋巴细胞的作用。不同比重分离液所需该两种试剂的量,可按下列公式计算配制:

$$dm = \frac{d_1 V_1 + d_2 V_2}{V_1 + V_2}$$

dm ——混合液的比重

V_1 ——甲液的体积

V_2 ——乙液的体积

d_1 ——甲液的比重

d_2 ——乙液的比重

(二) 分离淋巴细胞

* 本文经李洸主任的审阅,特此致谢。

1. 采血: 取体重为 20—22 克的小白鼠股动脉血 0.7—0.9 毫升, 放入等体积含有肝素、pH7.3 左右的 Hanks 液中^[1]。混匀后, 将稀释的血轻轻加到不同比重的 1.5—2.0 毫升分离液上, 使两层液体的界面不相混合, 放置片刻。

2. 离心: 把上述溶液放入水平式离心机中, 以每分钟 3500 转的速度离心 20 分钟。离心后分为四层, 上层为 Hanks 液及血浆层, 此层与分离液液面交界处有一呈云雾状层混合带, 即淋巴细胞层。云雾状层之下为淋巴细胞分离液, 底层主要为红细胞。

3. 清洗: 吸取云雾状层, 用 pH 7.2—7.4 的 Hanks 液洗涤 3 次, 每次以每分钟 3500 转速度离心 20 分钟。最后一次剩下 0.2—0.3 毫升细胞悬液, 计算细胞数, 最后稀释成 10^6 细胞/每毫升, 用作玫瑰花结反应。

(三) 绵羊红细胞(简称 SRBC)

绵羊静脉采血, 用血球保存液按 1:1 的比例混匀, 置 4℃ 冰箱中可保存二周。临用时取保存的绵羊红细胞 2—3 毫升, 用 pH 7.2—7.4 的 Hanks 液洗涤 3 次。每次以每分钟 2500 转速度离心 10 分钟。最后按压积体积计算, 用 Hanks 液配成 1% SRBC 悬液, 供 E-玫瑰花结测定用。

(四) 吸收灭活小牛血清

取 2 毫升灭活小牛血清, 加入洗过的压积绵羊红细胞悬液 1 毫升, 混匀, 于 37℃ 温箱中放置 30 分钟。然后离心沉淀, 取上清液, 放冰箱内保存备用。

(五) E-玫瑰花结反应

取上述分离的淋巴细胞 0.1 毫升、1% SRBC 悬液 0.2 毫升、吸收灭活小牛血清 0.1 毫升混匀, 置于 37℃ 水浴中 10—15 分钟, 然后以每分钟 500 转速度离心 5 分钟, 置 4℃ 冰箱过夜。次日取出沉淀管, 吸弃上清液, 留下约 0.1—0.2 毫升沉淀物。加入 2.5% 戊二醛 2 滴, 摇匀, 放置 4℃ 冰箱内 20 分钟以上, 然后涂片, 瑞氏染色, 镜检计数。计算 100 个淋巴细胞中的玫瑰花结形成率。淋巴细胞结合 3 个以上羊红细胞者为阳性 E-玫瑰花结。

T 淋巴细胞总数/立方毫米 = 白细胞总数/

立方毫米 × 淋巴细胞百分率 × E-玫瑰花结百分率。

实验结果与讨论

(一) 不同比重分离液对分离小白鼠外周血淋巴细胞的影响

由于动物外周血中淋巴细胞的分离与人的稍有不同, 应用比重为 1.078 的分离液所得到的淋巴细胞数少, 尤其在小白鼠外周血本身量就少的情况下, 不能使淋巴细胞达到一定浓度, 对玫瑰花结形成率影响较大, 所以分别试了比重为 1.078、1.085、1.090 3 种不同比重的分离液分离淋巴细胞。结果表明, 经比重为 1.090 的分离液分离后, 上层血浆层基本无细胞成份, 界面云雾层含淋巴细胞较多, 经涂片、染色、95% 以上为淋巴细胞。在云雾层之下的淋巴细胞分离液层, 淋巴细胞极少。用比重为 1.090 的分离液所分离得到的淋巴细胞数比用比重为 1.078 的分离液所得到的高 2 倍多。所以, 在上述 3 种比重不同的分离液中, 以比重为 1.090 的分离液为好。

(二) 不同比重分离液对 E-玫瑰花结形成率的影响

上述 3 种不同比重分离液, 以比重为 1.090 者分离的淋巴细胞数多。那么对玫瑰花形成率有何影响? 为此, 又做了不同分离液对形成玫瑰花数的影响。其结果是比重为 1.078 的分离液所得的淋巴细胞形成玫瑰花结均数为 30% 左右。比重为 1.085 的为 33%。比重为 1.090 的为 43% 左右。

用 1.090 比重的分离液分离正常小白鼠外周血淋巴细胞作 E-玫瑰花结形成百分率的正常值, 共做了 60 只小白鼠, 波动范围在 32—65% 之间, 平均值为 43.5% 左右。

我们又将 5 只正常小白鼠外周血混合, 同时做 4 组平行样品所形成的玫瑰花结百分率, 其波动范围在 41.5—44%; 提示此方法有一定的稳定性。

(三) E-玫瑰花结数与 T 细胞的关系

德隆 (Dellon)^[3] 和赛姆伽 (Semgar)^[5] 曾

报道, E-玫瑰花结形成率尚不能如实反映机体细胞免疫机能的程度。这点, 从我们的实验结果中也可以看出(见表 1) 编号 2、3 的 E-玫瑰花结百分率相近, 但 T 淋巴细胞总数相差 1 倍多, E-玫瑰花结为 38% (编号 6) 者, 其 T 细胞总数并不比 E-玫瑰花结为 46% 的低(编号 5)

表 1 正常小白鼠 T 细胞总数与 E-玫瑰花结百分率的关系

编号	E-玫瑰花结 %	白细胞分类淋巴细胞 %	白细胞总数	T 细胞总数
1	41	82	6650	2236
2	46	78	4700	1686
3	48	72	10350	3577
4	53	69	8300	3035
5	46	75	3800	1311
6	38	80	6850	2082

这中间除了与淋巴细胞百分数有关外, 似与白细胞总数关系更密切。仍以编号 2、3 为例, E-玫瑰花结及淋巴细胞百分数都很相近, 但其 T 细胞总值差 1 倍多。主要因白细胞总数编号 2 仅 4700/立方毫米, 而编号 3 为 10350/立方毫米。综上所述, E-玫瑰花结形成百分率不能如实反映机体细胞免疫机能的程度, 只有求出每立方毫米血液中 T 淋巴细胞的总数, 才更能代表机体细胞免疫机能的程度。

(四) 羊红细胞保存天数对 E-玫瑰花结形成率的影响

绵羊红细胞放置冰箱中保存的时间长短, 对 E-玫瑰花结形成率是有一定影响的, 我们应用在冰箱中保存 27 天的羊红细胞, 做正常小白鼠外周血 E-玫瑰花结百分率, 其结果平均约

30% 左右, 比保存 2 周内的羊红细胞玫瑰花结形成率为 43% 的低。说明羊红细胞以保存 2 周内的较好, 保存时间过长, E-玫瑰花结形成率下降。

小 结

本文对正常小白鼠外周血 E-玫瑰花结形成实验的方法进行了摸索和探讨。认为淋巴细胞分离液的比重以 1.090 为宜, 用该法测定正常小白鼠外周血平均 E-玫瑰花结形成率为 43.5%, 方法重复性好。并证实必须求出每立方毫米血液中 T 淋巴细胞的总数, 才更能代表机体细胞免疫机能的程度。在影响因素方面, 实验结果表明, 绵羊红细胞以保存 2 周内为好, 久置后, 影响 E-玫瑰花结形成率。

参 考 文 献

- [1] 卫微所肿瘤免疫组: 1976 测定人体细胞免疫的几种方法介绍。浙江卫生实验院院报 2, 60—65。
- [2] Campbell, A. C. et al. 1979. A pen smear technique for assays of rosette-forming lymphocytes. *J. Immunological Methods*. 26: 4, 337—344.
- [3] Dellon, A. L. 1974. "Percent T Cells": An ambiguous reporting technique. *Lancet*. 1: 7860, 749.
- [4] Madsen, M. et al. 1979. A Methodological study of E-rosette formation using AET-treated steep red blood cells. *J. Immunological Methods*. 27: 61—74.
- [5] Sengar, D. P. et al. 1975. T-Rosettes in hemodialysis patients and renal allograft recipients. *Cell Immunol*. 20 (11). 92—97.
- [6] Zealberg, O. B. 1964. A Simple method for detection single antibody-forming cells. *Nature*. 202, 4938. 1231.