

狗外周血内自然 E 玫瑰花形成细胞类别的探讨

王润田 王惠芬

(河北医学院)

医学研究,特别是器官移植研究,常用狗作实验模型,需要了解其细胞免疫状态。有些研究者提出,用与人或与豚鼠红细胞的自然 E 玫瑰花(以下简称 E 花),形成试验,检测狗外周血 T 淋巴细胞^[2,3,6];但另一些研究者报告,狗外周血非淋巴白细胞也能与这两种红细胞形成 E 花,认为用该法检测狗外周血 T 淋巴细胞不可靠^[4,6]。

本文用酸性非特异酯酶(ANAE)加过氧化物酶(Peroxidase)染色(以下简称 A + P 染色),在 E 花涂片上,以形态学与细胞化学结合的方法,显微镜下直接鉴别成花细胞的类别。澄清上述矛盾,慎重评价狗淋巴细胞 E 花试验的价值。

一、材料和方法

(一)狗外周血白细胞制剂 用健康成年狗肝素抗凝新鲜外周静脉血按如下方法制备三种白细胞制剂,最后各用汉克斯(Hanks')液悬成 5×10^6 细胞/毫升备用。

1. 全血白细胞制剂(简称全白) 用低渗溶红细胞法制备。狗血 0.3 毫升,加双蒸水 18 毫升,混匀 30 秒,立即加 4.5% 氯化钠溶液 4.5 毫升。离心去上清,沉淀用汉克斯液洗两遍,即得全白细胞。

2. 密度梯度离心制备单个核细胞丰富的白细胞制剂(简称梯度分离): 狗血 1—2 毫升,汉克斯液稀释 1—2 倍,加于 2 毫升“淋巴细胞分离液”(上海试剂二厂产,比重 1.077)上,勿使两液混合。2000 转/分,离心 30 分钟,红细胞及大部分多核白细胞沉于底层。两液相接界面层的白细胞即为单个核细胞丰富的白细胞,取出,用汉克斯液洗三遍。

3. 去粘附白细胞制剂(简称去粘附): 将梯

度分离的白细胞(约 $3-8 \times 10^6$ 个细胞)用 6 毫升含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基作介质,置直径 8.5 厘米的清洁玻璃皿内,37°C 孵育 1 小时。收获未粘附白细胞,汉克斯液洗两遍。

(二)红细胞悬液 分别取健康人“O”型静脉血和豚鼠心血,肝素抗凝,艾氏保存液 4°C 保存不超过一周。试验当天汉克斯液洗三遍,最后各悬成 3×10^8 细胞/毫升。

(三)E 花试验 取如上制备的狗外周血白细胞制剂各 0.5 毫升,分别与等量的人或豚鼠红细胞悬液混匀。放 37°C,20 分钟,500 转/分,离心 5 分钟,4°C 放置 30 分钟。加 0.1 毫升灭活吸收的小牛血清后轻悬起细胞,涂片,自然干燥。

(四)A + P 染色 将上述自然干燥后之 E 花涂片,用缓冲冷丙酮——福尔马林液,4°C 固定 30 秒。水轻洗,干后置 ANAE 染色液(六偶氮付品红 3 毫升, M/15 PH 7.6 PB 44.5 毫升, 2% α -醋酸萘酯 1.25 毫升)内 37°C 1 小时^[1]。水冲洗,干后用 2% 甲基绿复染 30 分钟。水冲洗,干后用过氧化物酶染液(0.3% 无亚硝基铁氰化钠的联苯胺液与等量新配 1/500 H_2O_2 混合)室温染 3—5 分钟。水冲洗,干后封片镜检。

(五)镜检判断标准

1. 红细胞着棕黄色。结合 3 个以上红细胞的狗白细胞为 E 花形成细胞。

2. 白细胞的核着绿色。单核细胞 ANAE 强阳性,胞浆呈强而弥漫的暗红色。多核白细胞 ANAE 阴性,过氧化物酶阳性,胞浆呈黄棕色。淋巴细胞过氧化物酶阴性,其中 ANAE 阳性者,胞浆可见一个或几个暗红色点。核形态

及胞浆酶反应是判断白细胞类别的依据。

二、结 果

(一) 成花细胞的类别 A+P 染色后的狗外周血白细胞制剂 E 花涂片, 油镜下可清楚区分单核、多核及淋巴三型白细胞。发现三者均能与人或豚鼠红细胞形成 E 花, 两种 E 花(人 E 和豚鼠 E 花)外观相似。本文以豚鼠 E 花显微照片示成花的狗外周血三型白细胞(见图 1)。

(二) 狗外周血淋巴细胞制剂纯度与其 E 花率的关系 本文所用的三种狗外周血白细胞制剂, 实际上可看成是三种纯度不同的狗外周血淋巴细胞制剂。将这些制剂的 E 花涂片经 A+P 染色后, 至少各计数 100 个白细胞的类别及 E 花率, 结果(见表 1)。

由表 1 可见, 淋巴细胞制剂的 E 花率, 随其纯度增加而减少。提示在成花率高的淋巴细胞制剂中, 可能有大量非淋巴白细胞成花。

(三) 梯度分离制剂成花细胞中三型白细胞比例 目前作外周血淋巴细胞 E 花试验, 一般均采用梯度分离制剂。为查明狗非淋巴白细胞对这种制剂 E 花成花率干扰程度, 以 12 份梯度分离的狗外周血白细胞制剂的 E 花涂片, A+P 染色后至少各计数 100 个成花细胞中三型白细胞各占的比例, 结果(见表 2)。

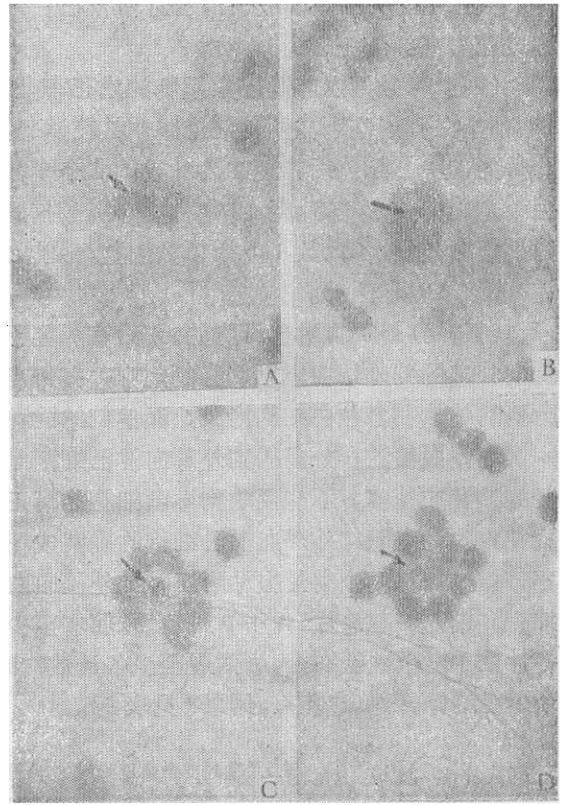


图 1 成花的狗外周血三型白细胞

A. 成花的 ANAE 阳性淋巴细胞, 胞浆有一暗红色酯酶反应点; B. 成花的 ANAE 阴性淋巴细胞, 胞浆无酯酶反应; C. 成花的单核细胞, 胞浆呈强而弥漫的酯酶反应; D. 成花的多核白细胞, 核分叶, 胞浆过氧化物酶阳性。

由表 2 可见成花细胞中多数是非淋巴白细

表 1 三种白细胞制剂的白细胞分类计数及 E 花率(均值±标准差%)

白细胞分离方法	标本数	白细胞分类计数			E 花 率	
		淋 巴	单 核	多 核	人 E	豚鼠 E
全 白	11	29.6±11.8	7.3±2.4	63.1±11.5	43.2±13.2	35.2±10.8
梯 度 分 离	12	72.7±14.9	13.0±5.4	14.3±14.3	26.8±10.8	23.5±9.8
去 粘 附	10	91.8±5.4	3.6±2.5	4.6±3.2	16.8±8.7	13.1±7.8
F 检 验		p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

表 2 梯度分离制剂成花细胞中三型白细胞比例(均值±标准差%)

E 花类别	标本数	淋 巴	单 核	多 核
人 E	12	33.5±16.8	40.4±15.3	26.1±19.3
豚鼠 E	12	26.3±13.8	40.3±14.6	33.4±21.5

表 3 狗外周血非淋巴白细胞成花率(均值±标准差%)

细胞类别	标本数	人 E	豚鼠 E
多核白细胞	11*	55.6±22.3	44.9±16.1
单核细胞	12**	78.9±12.8	67.5±13.1

* 全白标本; ** 梯度分离标本。

胞,淋巴细胞仅占30%左右,提示非淋巴白细胞成花率高。

(四) 狗外周血非淋巴白细胞的成花率 以11个全白制剂分别与两种红细胞作E花试验,涂片经A+P染色后,至少各计数100个多核白细胞,得其E花率;对12个梯度分离制剂同样处理后,至少各计数100个单核细胞,得其E花率,结果(见表3)。

(五) 狗外周血淋巴细胞的成花率 鉴于梯度分离的狗外周血淋巴细胞制剂中,有相当比例的单核和多核白细胞污染,而他们的成花率又高,显然这样分离的狗外周血淋巴细胞制剂的E花成花率,不能反映狗淋巴细胞的真正成花率。为查明狗外周血淋巴细胞的确实成花率,对全白、梯度分离及去粘附三种狗外周血白细胞制剂的E花涂片,A+P染色后,前者至少各计数100个淋巴细胞,后者至少各计数200个淋巴细胞,得其E花率,结果(见表4)。

表4 狗外周血淋巴细胞成花率(均值±标准差%)

分离方法	标本数	人 E	豚鼠 E
全白	11	11.4±5.2	9.7±5.1
梯度分离	12	11.7±6.3	8.2±4.8
去粘附	10	12.0±6.9	8.5±5.5
平均		11.7±5.7	8.6±4.6
F 检验		P>0.05	P>0.05

(六) 狗外周血淋巴细胞的 ANAE 反应及其与成花淋巴细胞的关系 取狗血7份,梯度分离后分别与人及豚鼠红细胞作E花试验,涂片经A+P染色后,每份标本1.至少计数300淋巴细胞的ANAE反应,得出ANAE阳性与ANAE阴性淋巴细胞的比例;2.至少计数200个ANAE阳性和100个ANAE阴性淋巴细胞,分别得出它们的E花率;3.计算成花淋巴细胞中ANAE阳性与ANAE阴性的比例结果(见表5)。

表5 狗外周血淋巴细胞的 ANAE 反应及其与成花淋巴细胞的关系*

ANAE 反应	占淋巴细胞	E 花 率		占成花淋巴细胞	
		人 E	豚鼠 E	人 E	豚鼠 E
阳 性	71.7±8.3	11.6±5.2	8.9±4.0	95.6±3.9	94.6±6.1
阴 性	28.3±8.3	1.9±2.1	1.1±1.1	4.4±3.9	5.4±6.1

* 7个梯度分离标本的结果;均值±标准差%。

三、讨 论

关于狗外周血淋巴细胞能与人或豚鼠红细胞形成E花,已有数篇报道^[2-4,6-8]。但各家报告的成花率很不一致,与人红细胞者高至38%^[8],低至5%^[4,7];与豚鼠红细胞者高至34%^[8],低至3.3—9.5%^[6]。本文结果,狗外周血淋巴细胞与人红细胞成花率为11.7±5.7%,与豚鼠红细胞为8.6±4.6%。

目前作外周血淋巴细胞E花试验,一般均采用梯度分离的外周血淋巴细胞制剂。文献报道,梯度分离的狗外周血淋巴细胞制剂中,有许多多核和单核细胞污染^[5-7]。我们用此法分离,单核及多核白细胞污染率平均分别为13%和

14%。为获得较纯的狗外周血淋巴细胞制剂,埃泽(Esser)^[4]及惠特克(Whitacre)等^[7]用羧基铁后再梯度分离,所得狗外周血淋巴细胞制剂纯度分别为80%和91.4%。采用梯度分离后再粘附玻璃,纯度平均91.8%。看来一步梯度分离较难获得高纯度狗外周血淋巴细胞制剂。本实验证明,狗外周血多核和单核细胞也可与人及豚鼠红细胞形成E花。这与科拉柯克(Krakowka)等^[6]的发现及埃泽等的推断相一致。从本实验发现,狗外周血多核白细胞与人红细胞成花率平均为55.6%,与豚鼠红细胞为44.9%;单核细胞与这两种红细胞的成花率分别为78.9%和67.5%,远比淋巴细胞者高。因此,若不鉴别成花细胞的类别,则狗外周血淋巴

细胞制剂的 E 花成花率, 可因非淋巴白细胞污染而升高。而用梯度分离的狗外周血淋巴细胞制剂, 非淋巴白细胞的污染率与比尔(Beall)等^[2]及科拉柯克等的结果相近, 成花率也与之相近; 污染率较埃泽等的低, 成花率也较之为低。由此推测, 用梯度分离测得狗外周血淋巴细胞制剂 E 花成花率较高的报道^[3,9], 可能是有非淋巴白细胞污染较多的结果。

由于狗外周血中三型白细胞都能与人或豚鼠红细胞形成 E 花, 而非淋巴白细胞又难从外周血淋巴细胞制剂中彻底去除, 因此找到一种清楚辨认成花细胞中三型白细胞的方法, 对于查明淋巴细胞确实成花率, 就成了一个迫切问题。用 A + P 染色, 能清楚辨认成花细胞中三型白细胞, 为这方面的研究提供了一个可行的方法。三种分离方法所得的狗外周血白细胞制剂中淋巴细胞的成花率一致 ($P > 0.05$), 说明了本染色方法鉴别狗外周血三型白细胞的可靠性。

近年来许多报道认为 ANAE 阳性反应是小鼠和人 T 淋巴细胞的一个标志。经过初步观察, 狗外周血 ANAE 阳性淋巴细胞平均为 $71.7 \pm 8.3\%$; 成花淋巴细胞中 94% 以上是 ANAE 阳性。但结合人和其它动物外周血中 T、B 细

胞比例来看, 即使这些成花的狗外周血淋巴细胞是 T 细胞, 可能也不是全部 T 细胞。是否为 T 细胞的一个亚群, 有待研究。因此, 目前似不宜用这种 E 花试验作为检测狗外周血 T 淋巴细胞水平的方法。

参 考 文 献

- [1] 孙国贤等, 1981, 淋巴细胞酸性 α -醋酸萘酯酶测定法及其应用的初步探讨. 中华医学检验杂志 4: 76—78.
- [2] Beall, G. N., et al., 1974, Canine lymphocytes that form rosettes with human red blood cells. *J. Surg. Res.* 17: 330—337.
- [3] Bowles, C. A., et al., 1975, Rosette formation by canine peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 114: 399—402.
- [4] Esser, R. E., et al., 1977, Rosette formation by canine leukocytes with human erythrocytes. *Transplantation* 24: 223—225.
- [5] Kay, R. G., et al., 1973, A method for the isolation of lymphocytes from dog blood. *Transplantation* 16: 250—252.
- [6] Krakowka, S., et al., 1977, Rosette formation assays in dogs: Lack of specificity of E rosettes for T lymphocytes. *Infect. Immun.* 17: 73—77.
- [7] Whitacre, C. C., et al., 1975, A technique for separation of canine lymphocytes and their use in the lymphocytotoxic, blastogenic, and rosette assays. *Transfusion* 15: 346—350.
- [8] Zander, A. R., et al., 1975, Surface markers on canine lymphocytes. *Transplant. Proc.* 7: 369—373.