

实验室常用动物淋巴细胞的 自然玫瑰花结试验

微生物学教研室 顾克洲 吴清明 朱圣禾

人类T淋巴细胞与绵羊红细胞在适当条件下可形成自然玫瑰花结,该试验已应用于临床,作为检测细胞免疫功能的方法之一。人淋巴细胞也能与小鼠或猴红细胞形成自然玫瑰花结,被认为是B淋巴细胞或其亚群的标志^(1,2)。多种哺乳动物淋巴细胞与异种动物红细胞在试管内也有形成自然玫瑰花结的特性,并可分别表示动物T或B淋巴细胞的免疫功能状态^(3,4)。

免疫学研究,诸如疫苗免疫效果的观察,治疗药物对免疫功能的影响和微生物对免疫器官的作用等,往往需要制备适当的动物模型,而这些动物血标本是否能进行自然玫瑰花结试验,以及正常指标如何,也应有所了解。本文测定了实验室常用动物淋巴细胞与异种动物红细胞形成玫瑰花结的百分率,作为用动物模型研究免疫学问题的一项数据。

材 料 和 方 法

一、动物淋巴细胞制备:(1)采取外观正常的家兔、豚鼠、大鼠和小鼠血液各9份,绵羊血5份。兔血取自耳静脉,豚鼠、大鼠和小鼠自心脏采血,小鼠每2只合并为1份,羊1只在半年内自颈静脉采血5次。每份血量1.5ml,加肝素(每ml血用肝素30单位)抗凝。(2)淋巴细胞分层液为比重1.079的聚蔗糖—泛葡葡胺,每沉淀管($0.4 \times 7.0\text{cm}$)中置0.6ml。(3)每份动物抗凝血分装于4支盛有分层液的沉淀管中,取血0.3ml沿管壁轻加于分层液上层,水平离心

机2000rpm离心20分钟。(4)吸取雾状白细胞层以Hanks液洗3次,末次离心后去上清液,沉淀物进行细胞计数,以台盼兰染色检查细胞活力在90%以上。(5)每管细胞悬液0.05ml,细胞数约 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。

二、动物红细胞制备:5种动物的红细胞按常法取血,洗涤,以生理盐水配成0.5%悬液。

三、自然玫瑰花结试验步骤:于每份动物的4支淋巴细胞悬液管中加入灭能小牛血清0.05ml,再分别加异种动物红细胞悬液0.1ml,混匀。置37℃水浴10分钟,500rpm离心5分钟后放冰箱中过夜,次日取出,弃上清液,留下的0.05ml沉淀物中加1滴1%戊二醛,置冰箱内20分钟取出,轻振后涂片,干后瑞氏染色,计数玫瑰花结形成百分率⁽⁵⁾。

结 果

所试的实验室几种常用动物淋巴细胞与异种动物红细胞均能形成自然玫瑰花结,其百分率平均值见图1。淋巴细胞/红细胞在豚鼠/兔的玫瑰花百分率均值最高,为 $20.1 \pm 2.1\%$,其次为兔/羊,均值 $17.4 \pm 3.7\%$ 。兔/豚鼠为 $15.9 \pm 5.3\%$,羊/小鼠为 $13.5 \pm 4.5\%$,兔/大鼠为 $11.4 \pm 2.9\%$ 。兔淋巴细胞除与小鼠红细胞形成玫瑰花百分率较低,仅 $5.4 \pm 1.8\%$ 外,其余均较高。百分率最低是羊/兔,平均为 $2.6 \pm 1.9\%$ 。每份血标本玫瑰花形成百分率见图2。

讨 论

人及动物淋巴细胞与异种动物红细胞形成自然玫瑰花结的能力广泛存在。人淋巴细胞与羊红细胞形成玫瑰花结是T细胞的特性之一, Felsburg测定所有迟发型变态反应阳性者的活性玫瑰花形成率均明显上升⁽⁶⁾。人的T淋巴细胞也能结合狗或马的红细胞形成玫瑰花结⁽³⁾。自然玫瑰花结也可作为人B细胞的标志, Bertoglie证实人B淋巴细胞能与小鼠红细胞结合形成玫瑰花结⁽¹⁾。Pellegrino通过实验指出, 人外周血淋巴细胞中能与猴红细胞形成玫瑰花结的也是B细胞⁽²⁾, 但有人对这类淋巴细胞系属T细胞或B细胞尚持不同看法⁽⁴⁾。

Braganza等报道多种哺乳动物的淋巴细胞与异种动物红细胞在体外混合后, 能聚集成玫瑰花结, 这种玫瑰花可由动物的T细胞或B细胞形成。豚鼠淋巴细胞中与兔红细胞形成玫瑰花结的是T细胞。兔淋巴细胞与大鼠红细胞、大鼠淋巴细胞与兔红细胞、小鼠淋巴细胞与兔红细胞均能形成自然玫瑰花结, 并证实这些淋巴细胞均为B细胞, 花结形成百分率达23.9~29.1%⁽⁵⁾。本文对实验室常用动物羊、兔、豚鼠、大鼠和小鼠的淋巴细胞与红细胞进行了交叉玫瑰花形成试验, 这些动物淋巴细胞与异种动物红细胞都能形成玫瑰花结。除豚鼠/兔、大鼠/兔、小鼠/兔、兔/大鼠与豚鼠/小鼠花结形成百分率均值低于Braganza报道者外, 其余均较高。各种动物的自然玫瑰花结外形相似, 清晰易辨。但是, 各种动物的花结形成细胞系T淋巴细胞抑或B淋巴细胞, 尚需进一步证实。

人和某种哺乳动物的淋巴细胞与自身红细胞可形成少量自身玫瑰花结, 但证实豚鼠、大鼠和狗的淋巴细胞则无此现象。

影响自然玫瑰花结试验的因素很多, 如淋巴细胞分层液的比重、淋巴细胞和红细胞的比例、缓冲液中有无钙镁离子、是否加小

牛血清、操作时室温和离心参数等^(4,8)。人类玫瑰花结试验的正常值范围各家报道不一, 这与各实验室的试验条件与操作方法有关。我们虽力求操作条件一致, 并以戊二醛固定涂片以便复查⁽⁸⁾, 但从图2看, 同种动物各个体间形成自然玫瑰花结百分率有差异, 同一只羊的几次采血测定中, 花结形成率也不同。除机体免疫力在不同时期可有一定波动外, 技术问题亦不能排除。章谷生等检查同一个体在4个月内的活性E花结和总数E花结百分率均可波动在9~10%之间⁽⁸⁾。由于所形成的玫瑰花结不甚稳定, 在37℃下容易解离, 机械振摇可使之分散。因此, 操作时的温度、使沉淀细胞再悬浮的振摇强度和定量滴加各种试液等都应严格控制。而且动物淋巴细胞的自然玫瑰花结试验最适条件与人类淋巴细胞是否相同, 亦应进一步探索。

本结果说明实验室常用动物淋巴细胞可进行自然玫瑰花结试验, 其形成百分率豚鼠/兔、兔/羊、兔/豚鼠较高, 羊/小鼠与兔/大鼠次之, 羊/兔最低, 测定这些数据可能用于动物模型T淋巴细胞或B淋巴细胞免疫功能的指标。

小 结

绵羊、家兔、豚鼠、大鼠和小鼠等几种实验室常用动物的淋巴细胞与异种动物红细胞在体外能形成自然玫瑰花结, 可分别表示动物T或B淋巴细胞的免疫功能状态。玫瑰花结的数据可用作以动物模型研究免疫学问题时的参考。

参 考 文 献

1. Bertoglie J, et al: Mouse Red Cell Rosette Formation by Subpopulations of Human Lymphocytes. Clin Exp Immunol 27(1): 172, 1977
2. Pellegrino M A, et al: Rosette Formation of Human Lymphoid Cells with Monkey Red Blood Cell. (下转第38页)

拍摄普通眼底和放置滤色片的眼底相各1张,以资对比及排除“假荧光”现象。按前述方法注射荧光素钠液。在荧光眼底摄影时,当荧光素液开始注射后,即应将照相机上所附的计时器开启,便可自动计时。在注射后约8秒钟时,开动连续摄影装置。通常检查20分钟结束。若行裂隙灯荧光眼底检查时,需由助手用秒钟计时。在整个检查过程中,随时注意患者有无不适反应。

体 会

荧光素眼底血管造影术已把眼底病的诊断方法,从眼底镜下形态学的静态观察发展为循环动力学的动态研究,使眼底血循环的微细结构清晰地显现出来,从而观察到不少原来只有在病理学检查时才能发现的细小病变。通过荧光眼底照相机将造影过程作快速连续摄影,获得清晰度高的照片,经分析得出正确结论,并可取得资料,永久保存。但由于照相机等设备昂贵,一时尚难普遍推广。根据现有条件,将裂隙灯或检眼镜,装上合适的滤光片系统,用以直接进行眼底检查,则是简便易行的。对于眼底较大的病变和晚期荧光的观察以及在眼底周边部的病变或屈光间质不够透明而不宜作荧光摄影的病例,均可采用此检查法。在我们检查的中心性浆液性视网膜病变的病例中,发现有的造影时在眼底后极部出现荧光渗漏点,并逐渐扩大、增强,表现为视网膜神经上皮脱离(见图1);有的病例,在动脉期其病灶区出现荧光,并呈泡样隆起,但未见渗漏点,表明为“色素

上皮脱离型”。又如1例糖尿病性视网膜病变患者,曾作荧光眼底摄影(见图2),在颞上及颞下枝血管间的后极部网膜上可见许多大小不等的荧光斑点,边界清楚,是为微动脉瘤,并可见浅在的小片状网膜出血。半年后复查,在裂隙灯荧光眼底检查时,发现视网膜上的微血管瘤数目明显增多,并见到一些闭塞的小血管和树枝状的新生血管,说明病变较前有所发展。

然而,只作荧光眼底检查不作摄影记录也有其局限性。由于荧光素在血管中循环速度很快,短暂的变化肉眼难于立即觉察到。而且,眼底微循环的改变只能在照片上显示出来,不通过仔细读片,显然是无法辨认的。

机体对荧光素有很好的耐受性。荧光素不参加体内代谢分解,也不与组织牢固结合。静脉内注射10%荧光素钠溶液是安全的。进入体内的荧光素大部分通过肾脏随尿液排出,其余经胆道排出。故对有肝肾疾患者要慎用。据报道,最常见的副作用是恶心和呕吐,其它尚有荨麻疹、哮喘及低血压,个别严重者可发生休克、意识丧失和呼吸停止等。本文15例中仅1例在注射后1分钟出现恶心感。为防止意外,仍应作好必要的准备。目前多采用在常规注射荧光素钠以前,先用荧光素钠稀释液静脉注射以作药物过敏试验。也有人用皮肤划痕试验。此外,尚需备一些急救药品及器械,做到有备无患,保证此项新技术得以顺利开展。(图见插页第4页)

(王 竞执笔)

(上接第11页)

- J Immunol 115(4):1085, 1975
3. Braganza C M, et al: Lymphocyte Erythrocyte Rosettes as Indicators of the Heterogeneity of Lymphocytes in a Variety of Mammalian Species. Cell 4(2): 103, 1975
4. 章翰等:人类及某些动物淋巴细胞的E玫瑰花试验,实验细胞免疫学进展第一集,第119~135页,1980
5. 吴清明等:体外细胞免疫试验方法探讨——I. 微量E—玫瑰花试验,浙江医科大学学报8(2): 67, 1979

6. Felsburg P T, et al: The Active E Rosette Test: Correlation With Delayed Cutaneous Hypersensitivity. J Immunol 116(4): 1110, 1976
7. Sandilands G, et al: Auto Rosette Formation by Human Thymocytes and Lymphocytes. Lancet 2(7845): 27, 1974
8. 章谷生等:人淋巴细胞的E—花环——I. E—花环形成的条件与不同年龄人群的正常值. 医学科研资料 8: 1, 1978