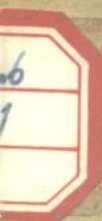


实验细胞免疫学进展



实验细胞免疫学进展

第一集

T 细胞 E 玫瑰花试验

谢少文 主编

参加第一次细胞免疫玫瑰花试验小型工作座谈会人员编写

中国医学科学院情报研究所
豫北医专生物寄生虫教研室

1980.7.

前 言

在今天国内免疫学书刊比较多的时期,我们认为还很有必要再出一本有关细胞免疫学实验方面的书。大家都很清楚,细胞免疫虽然在理论上取得了一定的发展,但其在临床的实际应用上仍居于初步阶段。许多人认为:体外细胞免疫学方法的常规应用,尚缺乏可靠的基础;主要是因为用血量较大,在短期内必须完成实验,至今尚缺乏阳性与阴性对照,而且方法步骤又不统一,重复性较差。有的方法依赖于显微镜下计数,不容易排除主观上的因素。

要解决这些困难,我们认为只有在总结前人经验的基础上,邀几个有工作经验单位的一些同志在一起将同一份标本进行实验比较,才能深入发现问题;再经过详细的讨论研究提出改进意见,可能找到较为可行的方法,而后试用于临床。

本书中的内容都是针对解决这个目标而收集的。有不少文章报道了自己工作中的经验,加上少数比较性的结果及评价,特别是提出今后进一步研究的措施及程序,以期今后不断共同努力下使玫瑰花这个比较最常用的方法,提高到大多数实验室中都可以做到有参考价值的一个方法。

本书另一个特点是将国内外有关玫瑰花试验的文献比较全面的收集在一起,以供参考。特别是中文文献,都附有中国医学科学院情报研究所的藏书号,需要参考书者可以得到复制的材料。我们希望这样一类进展,会受到国内基础免疫学及临床免疫工作者的重视,并且对其他体外方法也进行如此同类的研究与比较,来促进我国细胞免疫学不断地进展。

谢 少 文

1980年7月

参加第一次细胞免疫玫瑰花试验 小型工作座谈会全体人员名单

谢少文	(中国医学科学院)
吴蔚	(中国人民解放军军事医学科学院)
张庆福	(新乡地区医院、中华医学会河南新乡分会)
易有年	(湖南医学院)
孔繁华	(中国人民解放军军事医学科学院)
王凯华	(山东师范学院)
王蕙芬	(河北新医大)
王翠英	(山东省千佛山医院)
石镜	(中国医学科学院)
陈璋	(中国医学科学院血液学研究所)
程一樵	(遵义医学院)
章翰	(武汉医学院)
康伦	(山东省人民医院)
戴顺志	(中国医学科学院情报研究所)
张敏六	(豫北医专)
楼凤冈	(豫北医专)
高树声	(豫北医专)
安康	(新乡地区防疫站)
焦懿卿	(汲县二院)

玫瑰花试验科研组联络处:

河南汲县豫北医专生物寄生虫教研室

目 录

论文报告

测定T细胞玫瑰花各类试验的初步评价	(1)
影响E玫瑰花试验的技术因素	(6)
六项细胞免疫试验的比较	(25)
猴红细胞玫瑰花结试验在鉴定人类淋巴细胞上 的意义	(41)
T细胞29℃玫瑰花试验：对卵巢恶性肿瘤病人 免疫状态的评价	(51)
短期内冷冻保存淋巴细胞的玫瑰花实验	(58)
用活跃玫瑰花试验来检测抗肿瘤免疫核糖核酸 (I -RNA) 的生物活性	(66)

简 报

①人类肿瘤抗原激活活性玫瑰花试验诊断肿瘤 的临床应用	(73)
②血栓闭塞性脉管炎患者E—玫瑰花试验的反应	(81)

综 述

国内 T 细胞 E 玫瑰花试验的概况	(83)
T 淋巴细胞与环一磷酸腺苷	(105)
人类及某些动物淋巴细胞的 E 玫瑰花试验	(119)
“活跃”玫瑰花试验的某些进展	(135)

报 导

细胞免疫 E 玫瑰花试验小型工作座谈会概况	(148)
-----------------------------	---------

一九八〇年细胞免疫 小型工作座谈会建议

淋巴细胞 E — 玫瑰花试验统一流程	(158)
--------------------------	---------

附 录

T 细胞 E 玫瑰花试验文献索引	(162)
------------------------	---------

文献符号说明:

- 1 中文索引号
- (1) 外文索引号
- ① 本文后的参考文献号

测定T细胞玫瑰花各类试验的初步评价

谢少文

(中国医学科学院)

自从T细胞玫瑰花试验出现之后,在临床上的应用已有十年的历史。在这个试用阶段,国内外已有许多报道。有的认为对非特异免疫是有测定价值,有的则采取否定的态度。因此,目前对这类试验作一个分析是有意义的。但因为报告非常之多,我们只能选一些国内有关资料,加以分析,供同志们工作中的参考。

1、现在应用最广的是总数玫瑰花结(Et)。大多数国外报道正常人在是50—70%之间,大致可以代表周围血中T细胞的百分数。由于各种影响因素对它作用较少,因此比较可靠。但其最大缺点是敏感性不太够。在肿瘤病人,一般要到晚期,才能表现出T细胞功能的缺陷。但对诊断先天性细胞免疫的缺陷,是有肯定意义的。

2、其次是活性玫瑰花试验(Ea)。Wybran^(3,4)第一个提出Ea方法,它认为方法比较敏感,可比Et早一些出现。它可能反映T细胞的功能,现在试用一个Et与Ea的比较报道,进行分析^①,从表I可见以下的结果:

(1)在本实验中正常人的结果接近国外常见的数字,但正常人中也有一半没有达到平均的水平(Ea 29%、Et 63%)。

表 I Ea与Et在各类肝炎中的表现

肝炎病人的分组	例数	Ea		Et	
		<29 %	均值	<52 %	均值
正 常 人	52	25	29 %	22	63 %
急 性 肝 炎	29	22	21	19	50
慢 性 迁 延 型	21	17	20	15	45
慢 性 活 动 型	6	4	26	4	48

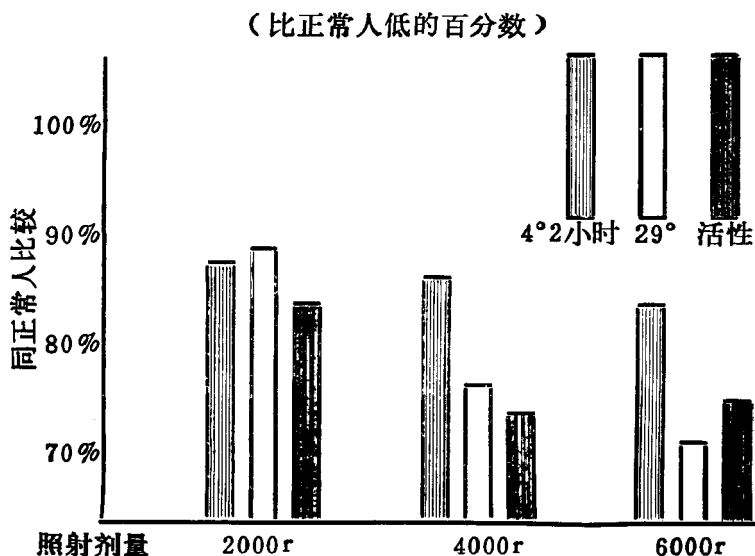
(2) 三类肝炎病人的两种玫瑰花, 都比正常人要低, 但在三者之间, 差别不大。

(3) 在肝炎病人中, 特别是非特异细胞免疫, 在一般低反应之外, 仍有部分病人反应正常, 这个结果的意义, 尚不清楚。但使分析结果增加了困难。

3、在29℃进行T玫瑰花结的百分数⁽³⁴⁶⁾。由于Ea受各种条件的影响很大, 因而有人提出在29℃进行玫瑰花试验。West 第一个提出本试验, 在国内也有一些报道。其中之一¹⁶⁰, 列于图一。

从图一可见在接受放射后, 病人的三类玫瑰花试验都显示出低反应。其中Et减少较少, 而Ea及E29℃则几乎相等。豫北医专的实验¹⁸⁸基本上同意这样的意见。看来E29℃由于温度条件比较容易控制, 可能是值得进一步研究的对象。

4、稳定玫瑰花试验(Es)。Galili⁽¹¹⁹⁻¹²³⁾提出了正



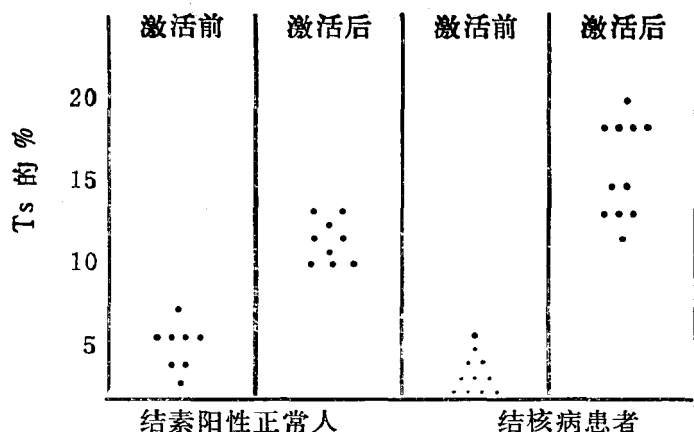
图一 照射后各类玫瑰花结数的比较

常人T淋巴细胞在37℃很少同羊红细胞形成玫瑰花结，而慢性活动性肝炎病人的T细胞则形成较高。这个工作已在国内得到证实¹⁹¹，而且又证明在白血病、麻疯等其他病人中，也有类似的升高。

在这方面，林飞卿氏等还有一些发展，即在37℃用植物血凝素及抗原作用于淋巴细胞后，Es有所升高，而Ea与Et则无变动，结果可见图二。

从图二来看，国外对于特异性玫瑰花试验⁽¹⁰⁷⁾又用另外一个方法加以初步证实。

5、特异性玫瑰花的形成。自从玫瑰花试验建立以来，它一直被认为是T细胞的特异性膜的标志，而祇是一个非特异



图二 Es对结核菌素的反应

性细胞免疫测定方法之一。Felsburg在1976年⁽¹⁰⁶⁾、1977年⁽¹⁰⁷⁾首次提出可利用抗原加到有免疫的人淋巴细胞后，可使Ta的百分数有所增高。这就为特异性玫瑰花试验创造了一个条件。国内在这方面，也有所报道²¹⁸。王凯华同志最近将这个方法和其他常用的淋巴细胞转化、移动抑制试验及粘附抑制试验、体外特异性试验进行比较¹⁴，结果可见，不论是从特异性或敏感性来讲，特异性玫瑰花试验都不比其他三种方法差。例如特异性玫瑰花的敏感性与淋转不相上下，而特异性则较高。相反，粘附抑制试验的特异性与特异玫瑰花相似，而敏感性较低。移动抑制试验则在两个方面都不如特异玫瑰花。因此，如果特异玫瑰花试验能够得到稳定下来，又能使其重复性更好，那么这个试验在今后的临床应用中，可能有更广阔的前途。

6、双重标志玫瑰花试验。1973年已有人观察到，正常人周围血液中有—小群淋巴细胞（2%—4%）具有对羊红细胞及致敏红细胞相结合的能力。也就是说它们具有E受体以及Fc受体。从方法学来讲，它可能同时测定T、B及无双标志的细胞（Null cell），在白血病人血液中，这类细胞有不同程度的升高②。

但是这个试验可能尚有问题。文献材料同我们自己的初步试验指出，在双重标记时，淋巴细胞与羊红细胞结合的能力有所减低。因此，在现在条件下，单用双标法作为T细胞的计数，可能较低，值得注意。

7、小结。在体外细胞免疫方法中，T细胞的E_t玫瑰花试验方法简便，不需要复杂的仪器，所用时间也较短，试剂也比较单纯。但在过去一段时间里，可能由于方法中各个环节掌握不严，结果比较混乱，不易重复。在另一个方面，方法的变种又有多种多样。因此，我们认为：在细致地总结过去国内外的经验后，努力严格执行必要的规程，以后再加以改进，使这个广泛应用的方法发挥其最大的作用。一方面对其规律有所了解，同时要更好发展其在临床上及实验动物中的应用。希望大家为达到这两个目的而努力。

参 考 文 献

① 上海第一医学院、华山医院资料 1979年

② 程一樵等：具有T细胞和B细胞双重表面标志的淋巴细胞—D细胞；《医药参考资料》细胞免疫玫瑰花试验座谈会专辑，中华医学会河南新乡分会 p.65

影响E玫瑰花试验的技术因素

易有年

张敏六

(湖南医学院)

(豫北医专)

淋巴细胞(简称Lc)的E花环试验已成为鉴定人T淋巴细胞最常用的方法。由于此法操作简便易于推广,国内外很多实验室都已将其列为检测人体细胞免疫的基本方法之一。但因方法本身仍不很稳定,以致在临床应用中,常造成结果紊乱。七十年代初期,早期的研究资料提示正常人外周血Lc中约有10—30%可与绵羊红细胞(简称为SRBC)形成E花环,但随着对实验条件的日益了解,E花环形成率已提高到50—80%^(1,2)。然而,各实验室的方法虽大同小异,而所得结果却相差很大。一般认为技术上很少的差别可能是引起结果差异的主要原因。现就国内外的资料及我们的体会,对各种技术因素的影响,初步分析讨论如下。

一、绵羊红细胞:

1. 来源: Steel(1974)^(3,10)曾用4只绵羊红细胞分别与5例健康成人血和1例脐血Lc进行实验,发现不同的绵羊不但形成E花环的百分率不同,而且受操作时温度的影响情况也不一样。Steel认为绵羊的个体差异是一个很重要的技术可变因素,是否与动物的血型有关,值得研究。国内,307医院¹⁰⁰用同一血标本分别与6只绵羊的RBC进行实验,发现结

合率在20—48%之间波动。Wybran(1976)⁽³⁸⁰⁾发现作实验的6只羊中有一只的RBC能鉴别癌症患者和正常人的Lc。

2. 保存：国外大多数实验室采用 Alsever 溶液（也有用 A. C. D. 溶液的），保存于 4℃ 冰箱中，使用 1 至 2 周。若保存时间超过 4—6 周，SRBC 易凝集或溶血。

国内有些实验室（哈医大微生物学教研组⁸⁸、北京市肿瘤研究所）认为保存时间以不超过 2 周为好，但也有的实验室发现保存 10 天结合率即下降，湖南医学院微生物学教研组则发现保存 20 天以内，结合率相差不明显，但保存 44 天者，结合率明显下降至 39.4%。

表 1 国内关于 SRBC 保存时间对 E 花环形成的影响资料

单 位	保 存 日 数	E 花 环 (%)
江西医学院 ¹⁵⁵	2天	55.4 ± 6.7
	10天	39.1 ± 5.3
豫北医专	12小时	60
	3天	52
	10天	40
湖南医学院	1 天	62.5
	12天	63.6
	19天	62.0
	9 天	58.0
	16天	55.6
	44天	39.4

从上述资料可见SRBC的来源和保存的时间对E花环试验有一定的影响,故作此实验时最好选定一只绵羊作为SRBC的来源。SRBC保存的时间以一周左右为宜。

二、淋巴细胞悬液的制备:

1. 血标本的抽取和保存温度

抽血时使用不同的抽血器械和抗凝剂,可影响E花环的形成率。Steel (1974)⁽³¹⁹⁾曾比较肝素抗凝、EDTA抗凝及去纤维蛋白法,发现肝素抗凝法比EDTA法高3—4%,EDTA法比去纤维蛋白法高3—4%,但这种差别无统计学重要性。

Djeu (1976)⁽⁹⁰⁾报道用不同的抽血器和抗凝剂采血,对E花环形成的影响(表2)。

表2 不同抽血器和抗凝剂对E花环形成的影响

	普通注射器		真空负压抽血器	
	肝 素 (不加防腐剂)	肝素加苯醇	肝 素 (不加防腐剂)	肝素加苯醇
E花环(%) (均值)	51.5 ± 1.8	44.5 ± 4.3	44.2 ± 4.3	40.8 ± 4.7

豫北医专⁷²曾用双草酸盐作抗凝剂,与肝素抗凝对比,发现E花环%稍有差别。肝素抗凝的胎儿血,均值为50.4 ± 9.7%,而双草酸盐(海拉氏—保尔氏)抗凝则为52.4 ± 5.9%。Hoffman等(1976)^①认为肝素可使E花环形成减低,故用量不可太多。

抽出后的血标本,保存的温度和时间的影响:

Djeu⁽⁶⁶⁾证明全血在低温下保存可使E花环%下降(表8)。

表3 不同温度保存血标本的影响

血液标本放置的温度及时间	22℃30分钟	17℃20分钟
E花环(%)	51	38.5

用于稀释全血的液体的温度也有影响,北京医院检验科⁸⁴用22℃和3℃的Hanks液分别稀释同一血标本,经3℃Hanks液稀释者,结合率为42%,而22℃Hanks稀释者为33%。

豫北医专用同一血标本在4℃和18℃下保存不同时间,发现E花环的结合率随保存时间延长而下降(表4、5)

表4 血标本在不同温度下、保存不同时间的影响

保存温度	时间	4℃E花环(%)
抽血后立即试验		63
18℃	} 4小时	59
4℃		48
18℃	} 8小时	48
4℃		40
18℃	} 16小时	47
4℃		38
18℃	} 24小时	20
4℃		19

表 5 血标本在 4℃下保存 1—5 天的影响

天数	29℃花环(%)	4℃花环(%)
1	44	49
2	7	10
3	0	1~2
4	0	1
5	0	0

从上述资料可见血标本抽出后, 应保存在 20℃ 左右, 不应保存在低温下, 且最好能在 4 小时之内 进行试验。

2. 淋巴细胞的分离

虽然现在常用的方法是密度梯度离心法(用聚蔗糖/泛影钠或泛影葡胺配成比重为 1.077 的分离液), 但其他方法也还可使用。因为不论何种分离方法, 尚不能回收 90% 以上的 Lc, 必有些 Lc 将被丢失, 特别是在检测病人的血标本时, 丢失的部分可能是有重要性的, 故应考虑如何尽可能少丢失 Lc^②。

(1) 不同的分离方法对 E 花环形成的影响。

聚阳游子(DEAE—葡聚糖等)、聚蔗糖、葡聚糖等可使早期花环增强; 而聚阴游子、肝素、葡聚糖硫酸盐则可使 E 花环减少^①。Steel (1974)⁽³¹⁹⁾ 曾比较聚蔗糖/泛影钠分离法与明胶沉降法, 发现后者比前者所得花环要低 10—20%, 且明胶沉降法所得的细胞中常有很多 RBC 和粒细胞, 影响结果的观察。

考虑到用全血法作 E 花环试验可避免丢失某些 Lc, 湖南

医学院微生物学教研组最近用 4 例献血员的血研究了全血微量法(用 0.15 毫升肝素抗凝的血,加双蒸馏水破坏 RBC)¹⁵⁷、全血自然沉降法^⑧及比重 1.077 ± 0.002 的聚蔗糖/泛影葡胺 Lc 分离液(上海试剂二厂产品)分离,三种方法的效果比较,初步结果列于表 6。

表 6 不同分离方法对 E-花环形成的影响

	自然沉降法	全血微量法	密度梯度离心法
活性 E	19.4%*	16.5%	26.13%
总 E	58.3%	46.9%	63.6%

* 均为四例的平均值

从表 6 中可见,不论活性 E 或总 E 花环都是以密度梯度离心法所得的花环形成%最高,自然沉降法次之,全血微量法最低。但其中有一个因素应加以考虑,即密度梯度离心法分出的 Lc 较纯,故作花环试验时,可严格控制 Lc 与 SRBC 的比例,如活性 E 用 1:20,总 E 用 1:80,而另外二法,则则不好控制其比例。全血微量法的花环%最低,是否采用低渗破坏 RBC 时,对 Lc 活性也有影响,值得进一步研究。

(2) 用不同血量分离淋巴细胞对 E 花环的影响。

国外,一般每次试验用血量多为 5~25 毫升,Galili⁽¹²⁰⁾ 用 8 毫升, Silverman⁽³¹¹⁾ 用 15 毫升, Mutchnich⁽²⁴²⁾ 用 20 毫升。国内,一般用 1~2 毫升,也有用 0.2~0.5 毫升的。

豫北医专⁷²、江西医学院¹⁵⁵也曾研究过不同血量的影响(表 7)。