

• 论 著 •

淋巴细胞分离液对 T 细胞阳性花环和非 T 细胞 阳性花环计数结果影响的研究*

姚伯程¹, 王怡云², 魏 敏²

(1. 甘肃省医学科学研究院分子生物学研究中心 730050; 2. 甘肃省肿瘤医院检验科, 兰州 730050)

摘 要:目的 探讨单克隆抗体 SPA 红细胞花环法(McAb-A-E 法)检验 T 淋巴细胞亚群时,淋巴细胞分离液对阳性花环细胞计数结果以及非 T 淋巴细胞阳性花环计数结果的影响。方法 选择淋巴细胞分离液法分离的单个核细胞(PBMC)和不加任何物质的抗凝血用自然沉降法分离的混合细胞,用 10 倍量稀释液洗涤 1 次。两种细胞用 McAb-A-E 直接法进行样本对照,并作统计学处理。结果 对 20 例临床标本用两种不同方法制取单个核细胞悬液的实验对照研究,2 组 CD3⁺ ($t = -4.197, P = 0.000$)、CD4⁺ ($t = -5.177, P = 0.000$)、CD8⁺ ($t = -4.240, P = 0.000$)、CD4⁺ / CD8⁺ ($t = -1.958, P = 0.095$) 进行比较,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 3 组结果差异有统计学意义,均为 $P < 0.001$ 。CD4⁺ / CD8⁺ 结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);2 组非 T 淋巴细胞阳性花环比较($t = -5.638, P = 0.000$),差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论 淋巴细胞分离液分离的 PBMC 细胞,用 10 倍量的稀释液洗涤 1 次,细胞表面黏附的黏稠淋巴细胞分离液是无法全部除去的,其对实用 McAb-A-E 直接法实验的影响是使阳性花环淋巴细胞计数结果偏高,相对的阴性淋巴细胞计数结果偏低。

关键词: T 淋巴细胞亚群; 细胞计数; 研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0001-02

The influence of lymphocyte isolation liquid to T cell and non-T cell positive rosette

Yao Bocheng¹, Wang Yiyun², Wei Min²

(1. Molecular Biology Research Center; Medical Science Institute of Gansu 730050, China;

2. Department of Clinical Laboratory, tumor hospital of Gansu province, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To study the influence of Lymphocyte Isolation Liquid to T cell and non-T cell positive Rosette. Methods To select the peripheral blood mononuclear cell(PBMC) separate from lymphocyte isolation liquid, and the natural separate hybrid cells without anticoagulation. The two kind's cell were washed once with 10 times liquefier of washing one time. The two cells with practical McAb A E. and the results were analyzed. Results From 20 cases sample, two kinds separate methods the results of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 3 results show statistic change($P < 0.001$), and the CD4⁺ / CD8⁺ showed no statistic change($P > 0.05$). non-T cell Rosette Formation results in two group showed statistic change($t = -5.638, P = 0.000$). Conclusion The methods of using lymphocyte isolation liquid separate PBMC cell, then washes with one time with 10 time cannot separate the cell surface lymphocyte separating medium. And this will cause lymphocyte positive rosette counting result to be high, the relative negative rosette lymphocyte counting result is low.

Key words: T-lymphocyte subsets; cell count; research

对外周血淋巴细胞进行检测,依据其阳性率,判定总 T 细胞、T 辅助细胞(Th)、T 杀伤细胞(Tc)亚群、B 淋巴细胞、NK 细胞等的分布和变化,用于判断人体的免疫功能。有助于预防保健、疾病诊断、治疗和预后。目前常用的方法有流式细胞仪法、免疫荧光法、AP-AAP 桥联酶免疫法、金黄色葡萄球菌 A 蛋白(staphylococcal protein A, SPA)花环法。SPA 花环法有红细胞花环法和菌花环法之分^[1]。SPA 红细胞花环法即 McAb-A-E(A 代表 SPA, E 为 Erythrocyte 代表红细胞)法。因其应用单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)而又叫单克隆抗体 SPA 红细胞花环法,简称 McAb-A-E 法,分为直接法和间接法^[2-3]。McAb-A-E 直接法因主要试剂——冻干抗体致敏红细胞花环试剂具有特异性强、敏感、稳定性好、有效期长、使用方便的特点,不需使用特殊仪器,仅需普通光学显微镜即可,且实验结果可保存 2 个星期,二十多年来被临床医学实验室和相关研究单位广泛应用。尽管 McAb-A-E 直接法具备很多优点,但是,实验所用细胞是要经过淋巴细胞分离液分离的 PBMC 细胞。高黏稠性的淋巴细胞分离液在洗涤液洗涤后是否彻底除去,是否对抗原-抗体花环细胞形成有影响、对计数结果有影响,为探讨这一问题作如下研究。

1 材料与方法

1.1 试剂 (1)McAb-A-E 试剂:冻干抗体致敏红细胞花环试剂——McAb 血球试剂, WuT3 0.5 mL, 批号:20060101; McAb 血球试剂, WuT4 0.5 mL, 批号:20060101; McAb 血球试剂, WuT8 0.5 mL, 批号:20060101, 均由卫生部武汉生物制品研究所生产,并按说明书配制。(2)无钙、镁 Hank's(汉克平衡盐溶液)液:pH7.0~7.4, 分析纯(AR)试剂,双蒸水配制。该实验中没有加酚红指示剂。(3)淋巴细胞分离液:淋巴细胞分离液(生化试剂)250 mL, 批号:050606, 由中国医学科学院血液学研究所提供。

1.2 器材 水平式离心机(离心半径 22 cm)为 LDZ5-2 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);显微镜为 OLYMPUS CH 型(日本)。

1.3 方法 应用实用 McAb-A-E 直接法对人外周血中的淋巴细胞表面抗原 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺ / CD8⁺ 进行检测。待检标本一分为二,一半用于自然沉降分离白细胞,一半用于淋巴细胞分离液法分离单个核细胞。选择淋巴细胞分离液法分离的 PBMC,用 10 倍量稀释液洗涤 1 次。淋巴细胞分离液分离的单个核细胞层细胞悬液 0.4~0.5 mL,加入 5 mL 洗涤

* 基金项目:甘肃省科学事业费资助项目(QS041-C33-30)。

液中,用滴管轻轻吹吸混匀,保证洗涤时的稀释倍数不小于 10 倍。以离心半径 22 cm($4\times 10^6\sim 6\times 10^6$)/mL,离心 6~10 min,弃上清液,尽量沥干残留液体,加 20%新生小牛血清的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 液,配成($4\times 10^6\sim 6\times 10^6$)/毫升 PBMC 悬液备用。不加任何物质的抗凝血用自然沉降法分离的混合细胞,用 10 倍量稀释液洗涤 1 次。自然沉降 20~60 min 后的抗凝血上层血浆和白细胞的混合细胞悬液 0.4~0.5 mL,加入 5 mL 洗涤液中,用滴管轻轻吹吸混匀,以离心半径 22 cm 400~600 r/min,离心 6~10 min,弃上清液,尽量沥干残留液

体,加 20%新生小牛血清的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} Hank's 液配成($4\times 10^6\sim 6\times 10^6$)/mL PBMC 悬液备用。

1.4 统计学处理 计量资料采用($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计软件进行配对 t 检验统计学分析,检验两法结果的统计学意义。

2 结 果

对 20 例临床标本用两种不同方法制取单个核细胞悬液的实验对照研究,见表 1。

表 1 淋巴细胞分离液对 T 细胞阳性花环和非 T 细胞花环计数结果影响的对比研究($\bar{x}\pm s$)

项目	自然沉降细胞 10 倍量稀释液洗涤 1 次	分离液细胞 10 倍量稀释液洗涤 1 次	t 值	P 值
CD3 ⁺ (%)	62.10±13.93	70.85±12.04	-4.197	0.000
CD4 ⁺ (%)	29.40±11.26	36.35±11.06	-5.177	0.000
CD8 ⁺ (%)	34.70±12.02	39.75±12.42	-4.240	0.000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	0.92±0.41	0.98±0.37	-1.758	0.095
非 T 细胞阳性	0.30±0.57	3.60±2.46	-5.638	0.000

3 讨 论

本组结果中,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 3 组结果的 P 值均小于 0.001,差异有统计学意义($P<0.001$);而 CD4⁺/CD8⁺ 的 P 值大于 0.050,差异无统计学意义($P>0.050$)。即淋巴细胞分离液分离的单个核细胞与无淋巴细胞分离液分离的细胞,在相同条件下用 10 倍量稀释液洗涤 1 次,采用实用 McAb-A-E 直接法的新方法程序和步骤同时检验 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 比值,淋巴细胞分离液分离细胞的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 高于无淋巴细胞分离液分离细胞的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺;两者的 CD4⁺/CD8⁺ 比值检验结果差异无统计学意义。说明细胞在浸入黏稠的淋巴细胞分离液时,细胞表面黏附有淋巴细胞分离液,用 10 倍量的稀释液洗涤 1 次并不能彻底洗净。

与同样处理的无淋巴细胞分离液分离的细胞计数比较,淋巴细胞分离液分离细胞的 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 结果高于后者,但是两者的 CD4⁺/CD8⁺ 比值差异无统计学意义,说明 CD4⁺、CD8⁺ 结果虽然升高。但在适当范围内以一定的比例同时升高,因此,其比值并无显著变化,两者的差异无统计学意义。

本研究结果显示,淋巴细胞分离液分离的 PBMC 细胞,用 10 倍量的稀释液洗涤 1 次,细胞表面黏附的黏稠淋巴细胞分离液是无法全部除去的,其对实验的影响是使阳性花环淋巴细胞计数结果偏高,相对的阴性淋巴细胞计数结果偏低。

而在反应体系中掺入非淋巴细胞,提高实验计数的准确性和稳定性研究中,自然沉降分离细胞和淋巴细胞分离液分离细胞,两者之间比较差异无统计学意义,其原因是淋巴细胞分离液分离的细胞经过了孵育纯化和再洗涤过程,使得细胞表面黏附的淋巴细胞分离液得以充分除去,而此处的淋巴细胞是未经孵育纯化和再洗涤的 PBMC 细胞。

2 组非 T 淋巴细胞阳性花环计数结果的 P 值均小于 0.001,差异有统计学意义($P<0.001$)。自然沉降法非 T 淋巴细胞阳性花环细胞计数均值为 0.30,标准差为 0.59;淋巴细胞分离液法非 T 淋巴细胞阳性花环细胞计数均值为 3.60,标准差为 2.46。后者的非 T 淋巴细胞阳性花环细胞数均值是前者的 12 倍,而前者的标准差仅是后者的 1/4。

自然沉降法非 T 淋巴细胞阳性花环细胞数很少,以粒细

胞为主,单核细胞次之;淋巴细胞分离液法非 T 淋巴细胞阳性花环细胞数较多,绝大部分为单核细胞花环,粒细胞花环少。这进一步说明淋巴细胞分离液可以使单核细胞、粒细胞与抗体红细胞形成阳性花环。在镜下计数时,如果在细胞识别不良的情况下,单核细胞花环很容易被误认为淋巴细胞花环,会使阳性细胞花环计数结果偏高。

本研究结果说明,淋巴细胞分离液在分离细胞时,细胞要浸入到分离液中,细胞表面黏附有高黏度的分离液,用常规细胞洗涤法难以从细胞表面洗涤除去,或由于淋巴细胞分离液的黏稠性,或由于分离液影响细胞表面电荷改变,或由于不明的其他原因,都会对抗原-抗体花环细胞的形成有较大影响。

T 细胞亚群是机体免疫系统内功能最重要的一大群细胞,在正常机体内各 T 细胞亚群相互作用,维持机体的正常免疫功能。T 细胞的免疫调节作用主要由 CD4⁺、CD8⁺ 完成,CD4⁺ 协调细胞分化产生抗体,CD8⁺ 则抑制抗体的合成、分泌及 T 细胞的增殖,两者的稳定状态维持着机体的正常免疫应答^[4]。T 细胞亚群的检验标本从血液到胸水、腹水、肺泡灌洗液等,都广泛应用于临床医学诊断、预防和保健领域^[5]。因此,研究其检验方法的影响因素,对提高检验结果的准确性和稳定性有着重要的意义。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2005:381-384.
[2] 姚伯程.单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的方法.CN 200710018523.9[P].2009.12.12.
[3] 姚伯程.单克隆抗体 SPA 红细胞花环法检验淋巴细胞亚群的间接法.CN 200710199298.3 [P] 2008.07.16.
[4] 熊彪,邹龙宝.大肠癌患者外周血 T 细胞亚群和 NK 细胞活性检测的临床意义[J].国际检验医学杂志,2008,29(10):892-893.
[5] 莫扬,许小东.流式细胞术检测体液 T 细胞亚群的临床应用[J].国际检验医学杂志,2010,31(1):50-53.