

T 细胞亚群 CD4 测定方法的研究

韩梅 吕平¹⁾ 何其华 袁兰 马士良 陶家平

(北京医科大学医药卫生分析中心, 北京 100083)

摘要 为比较外周血 T 淋巴细胞亚群 CD4 不同测定方法的差别, 以流式细胞术为定量手段, 测定了猴外周血中三种不同方法处理后 CD4 的表达。结果表明: 先标后溶法——先用异硫氰荧光素标记的单克隆抗体 (FITC-CD4 McAb) 标记后, 再加入红细胞溶解液溶掉红细胞的处理方法, 结果基本等同于传统的淋巴细胞分离法, 但样本用量仅为传统方法的 1/5, 且操作简单。激光共焦显微术的形态学研究也证实: 先标后溶法与淋巴细胞分离法相似, 其细胞膜表面荧光标记清晰, 优于先溶后标法。

关键词 T 淋巴细胞, CD4, 流式细胞术, 激光共焦显微术

学科分类号 R371

淋巴细胞膜上标志分子的定量测定是分子生物学和分子免疫学研究的热点之一, 但不同的样品处理方法和标记法结果差别很大。为了寻找方便的和更节省样本的处理方法, 进行了下列的方法学探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

动物: 健康广西猴 (恒河猴亚种) 外周血, 肝素抗凝。

试剂: 异硫氰荧光素标记的单克隆抗体 (FITC-CD4 McAb), 本校免疫系单抗室产品; 人淋巴细胞分离液: 比重 1.077 ± 0.002 , 上海试剂二厂产品; 红细胞溶解液: KHCO_3 1.0 g, NH_4Cl 8.3 g, EDTA-Na_2 37 mg, 加纯净水至 1 L; 洗液: $\text{PBS} + 0.1\% \text{ Na}_3\text{N} + 2\%$ 小牛血清。

仪器: 流式细胞仪: 美国 BD 公司 FACScan 型, 氩离子激光器, 激发光波长 488 nm, 分析软件为 lysys II; 激光共焦显微镜: 德国 Leica 公司 TCS-NT 型, 激发光波长 488 nm, 发射光波长为 BP530/30。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞仪定量测定: 肝素抗凝血, 以下列方法之一处理后, 经流式细胞仪监测分析, 阳性峰细胞荧光强度作为淋巴细胞表面 CD4 分子的表达量。

a. 先溶后标法^[1]: 肝素抗凝血 200 μl , 加入红细胞溶解液 1~2 ml, 待样品透明后 1~3 min 内离

心 2 000 r/min, 4 min. 用 PBS 1~2 ml 洗一次, 加抗体 FITC 标记小鼠抗人 CD4 McAb, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 后加洗液 1~2 ml, 离心, 加 0.5~1 ml 洗液使细胞悬起, 上机。

b. 先标后溶法: 肝素抗凝血 200 μl , 加抗体 FITC 标记小鼠抗人 CD4 McAb, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 后, 加入红细胞溶解液 1~2 ml, 待样品透明后 1~3 min 内离心 2 000 r/min, 4 min. 用洗液 1~2 ml 洗一次, 加 0.5~1 ml 洗液使细胞悬起, 上机。

c. 淋巴细胞分离法: 肝素抗凝血 1.0 ml, 加 Hanks 液 1.5 ml 稀释, 用淋巴细胞分离液常规分出淋巴细胞层, 加抗体 FITC 标记小鼠抗人 CD4 McAb, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 后加洗液 1~2 ml, 离心, 加 0.5~1 ml 洗液使细胞悬起, 上机。

1.2.2 激光共焦显微镜形态学观察

经上述方法处理后的样品, 将一滴滴在载玻片上, 盖上盖玻片, 20 倍显微镜下选定一个细胞做断层扫描, 每个样本细胞各做六幅光切图, 取膜与胞内荧光反差最大的一幅照相。

2 结果

2.1 流式细胞仪定量测定结果

以表达 CD4 分子的阳性率和各样本峰形作为比较各方法的指标, 结果如表 1 和图 1。

¹⁾ 北京医科大学基础医学院免疫系, 北京 100083。

Tel: (010) 62092437, E-mail: hfil@mail.bjmu.edu.cn

收稿日期: 1999-04-26, 修回日期: 1999-09-05

表 1 猴外周血淋巴细胞亚群 CD4 分子的阳性率

	先溶后标法	先标后溶法	淋巴细胞分离法
CD4 分子阳性率	25.32% $\pm$ 1.39% ¹⁾ (n = 6)	36.78% $\pm$ 1.18% (n = 12)	36.36% $\pm$ 0.55% (n = 6)

¹⁾ $P < 0.01$ (先溶后标法与先标后溶法、淋巴细胞分离法比较)。

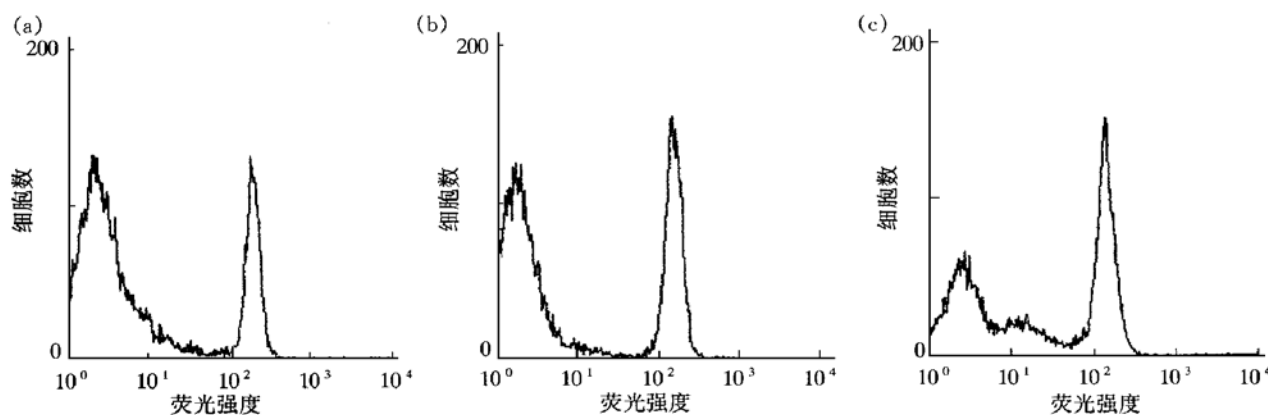


图 1 猴外周血淋巴细胞亚群 CD4 分子的流式细胞测定结果图

(a) 先溶后标法; (b) 先标后溶法; (c) 淋巴细胞分离法。

表达 CD4 分子的阳性率的结果, 使用 SAS 统计软件包采用 t 检验进行分析, 可见: 先标后溶法和淋巴细胞分离法无显著差异, 结果均在正常值范围。先溶后标法结果与先标后溶法和淋巴细胞分离法相比均有显著降低。

从流式细胞测定结果荧光分布组方图峰形看, 三种方法峰形都较好, 阴性峰和阳性峰可明显分开, 阳性峰峰形规整、为单一狭窄而对称的正态峰位。

2.2 激光共焦显微镜形态学观察结果

激光共焦显微镜形态学观察结果见图 2 (见图版 I)。

从图 2 可见: 图 2a 膜标记不清楚, 胞内也有荧光标记呈现; 而图 2b 和图 2c 荧光呈环状, 膜标记清晰, 胞内无荧光。

3 讨 论

利用溶红细胞法检测外周血中 T 淋巴细胞膜标志分子的方法, 其结果与常规淋巴细胞分离法相同, 但所用样本量仅为常规方法的 1/5, 且操作较简单。因而特别适用于样本量少和大批量的检测。

在溶红细胞法检测外周血中 T 淋巴细胞膜标志分子的方法中, 红细胞溶解与免疫荧光标记的先后为关键步骤。红细胞溶解的过程可使: a. 淋巴细胞膜上的抗原与抗体的结合力下降 (流式细胞仪测定结果 CD4 阳性率降低证实); b. 细胞膜的通透

性增加 (从图 2 可看出, 先标后溶法可观察到胞内也有荧光, 而淋巴细胞分离法却无胞内荧光证实)。为避免红细胞溶解的影响, 我们采用了先标后溶法, 用单抗先进行免疫荧光标记, 待抗原和抗体结合后再溶红细胞, 可防止溶红细胞液对细胞膜上标志分子和细胞膜通透性的影响。

这三种方法的结果, 从峰形上看都较好, 峰形规整, 阳性峰为单一狭窄、对称的正态峰位, 与理论峰形一致^[2]。

此方法学的探讨将有助于淋巴细胞上众多其他的膜标记分子的免疫荧光法测定。

参 考 文 献

- 1 章 宇, 杜蓓娜, 吴根诚, 等. 吗啡和电针对术后淋巴细胞增殖反应和 T 细胞亚群的影响. 中国免疫学杂志, 1997, 13 (2): 119~122
Zhang Y, Du L N, Wu G C, et al. Chin J Immunol, 1997, 13 (2): 119~122
- 2 Knapp W, Dorken B, Rieber E P, et al. Leucocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens. New York: Oxford University Press. 1989. 16

Study on Method of Determining CD4 on T Lymphocyte. HAN Mei, LÜ Ping¹⁾, HE Qi-Hua, YUAN Lan, MA Shi-Liang, TIAO Jia-Ping (Medical and Healthy Analytical Center, Beijing Medical University, Beijing 100083, China;
¹⁾ Department of Immunology, Beijing Medical

University, Beijing 100083, China).

Abstract To investigate the differentiation of pre-preparation method to determine CD4 on T lymphocyte in blood, CD4 expression on T lymphocyte of monkey was determined by the flow cytometry as a quantitative analysis with three different pre-preparation methods. These results showed that (b) method (whole blood was labeled by FITC-CD4 McAb. Then red blood cells were dissolved by erythrocytolysis) was better (a) method (red blood cells were dissolved by erythrocytolysis in whole blood. Then it was labeled by FITC-CD4 McAb).

CD4 results with (b) method were equal to (c) method (traditional method of lymphocyte separated). But the volume of sample by (b) method only was 1/5 of (c) method. The pre-preparation of (b) method also was simpler than (c) method. Morphologic study by laser scanning confocal microscopy showed (b) method was similar to (c) method. Both of them had a clear fluorescent labeled on the cell membrane but not in the cell.

Key words T lymphocyte, CD4, flow cytometry, laser scanning confocal microscopy

科技部委托中国科学器材进出口总公司颁发化学试剂特供卡

中国科学器材进出口总公司受科技部委托, 承担改善化学试剂市场供应的工作, 现正举行为国内著名科学家建立化学试剂特供档案, 颁发化学试剂特供卡的活动。到目前为止, 按照科技部的要求, 已经为中国科学院化学部 106 位院士和生物学部 101 位院士, 以及中国工程院化工、冶金与材料工程学部 60 位院士和医药卫生工程学部 65 位院士建立了化学试剂特供档案, 并且用 EMS 寄送了化学试剂特供卡和通知信。此工作在科技界引起较大反响, 因此, 按照科技部的要求, 以及许多科学家的希望, 我们将进一步扩大化学试剂特供档案的建立范围, 第一步将再为 500 名科学家建立化学试剂特供档案并颁发化学试剂特供卡, 凡具有正教授或正研究员资格的科研人员, 我们将优先安排建立档案和颁发特供卡的工作。凡持有特供卡的科学家在我公司购买化学试剂将享受到如下的服务:

- 1、北京市内免费送货上门;
- 2、外地用户可享受邮政特快专递服务, 并免收国内快递费;
- 3、公司免收任何手续费;
- 4、及时订货, 按时交货, 不因我司责任拖延交货期;
- 5、无需预付货款或订金, 交货时付清。

此次活动无需您花费任何费用, 所有费用已由科技部承担。另外, 我公司将根据具体情况和您的要求, 派遣有关人员上门了解您的困难, 提出解决方案, 设法帮您解决。

凡希望得到化学试剂特供卡的科研人员, 可以把申请寄到我公司。地址如下:

中国科学器材进出口总公司
北京市东城区灯市口大街 75 号
邮编: 100006

申请中请写明: 姓名、单位、地址、电话、职称、您所取得的工作业绩以及从何期刊得到的信息。另外, 随信请附您职称证书的复印件, 以及所取得工作业绩的有关证明文件的复印件。

我公司为了改善化学试剂市场供应状况, 特组织成立化学试剂部专门负责代理国外主要化学试剂公司的产品, 现已有多家公司与我公司合作, 如 SIGMA、ALDRICH、FLUKA、ACROS 等等。若您需要我们的帮助, 请与我们联系, 我们将用热情的服务使您满意。联系方式:

电话: (010) 65272049; 传真: (010) 65272048

E-mail: xiangyu@csimc.com.cn

Yjxiong@csimc.com.cn

韩 梅等：“T细胞亚群 CD4 测定方法的研究” 一文 的图 2

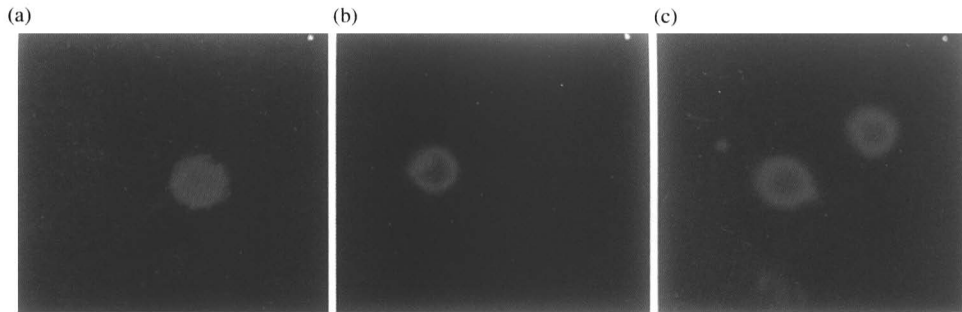


图 2 激光共焦显微镜形态学观察结果图
(a) 先溶后标法；(b) 先标后溶法；(c) 淋巴细胞分离法。