

# 脐血淋巴细胞表型分析与自然杀伤细胞活性

陈旭芳 贾廷珍

为了探讨脐血淋巴细胞免疫学特点及其移植时, GVHD 或 GVHR 发病率低且程度轻的免疫机理, 本研究用 APAAP 法和 LDH 释 放法分别对足月正常分娩新生儿脐血进行淋 巴细胞表型分析和自然杀伤细胞活性测定, 并 与健康成人外周血象相比较, 以期为脐血在 放射病、肿瘤及血液病临床应用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料与试剂: APAAP 法淋巴细胞亚群检测

作者单位: 100083 北京医科大学第三医院肿瘤与放射  
病科

试剂盒(军事医学科学院基础医学研究所); 淋巴细胞 分离液(中国医学科学院血液学研究所); K<sub>562</sub> 细胞株 为本室液氮冻存并传代培养。

**1.2 标本:** 采集健康产妇分娩的足月正常新生儿脐 血及健康成人外周血, 置于 40℃ 或室温, 于 12 小时 内用淋巴细胞分离液分离出 MNC。

**1.3 淋巴细胞表型分析:** 将分离出的 MNC 制成  $3 \times 10^6 / ml$  的细胞悬液, 用离心涂片机(LTP-A 型)涂片, 室温干燥 2 小时后备用。标本染色按试剂盒说明, 但略 有改良(检测 CD<sub>4</sub> 表型时, 加入一~三抗后温育时间 各步均延长至 40~60 分钟。加入底物后 37℃ 温箱显色 5~15 分钟, 苏木素复染液复染 30~50 秒)。标本观察 用普通光学显微镜, 油镜下计数 400 个 MNC, 算出阳 性细胞百分率。

#### 1.4 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)活性

1.4.1 效应细胞: 肝素抗凝血4ml用生理盐水稀释1倍, 转入已加入2ml淋巴细胞分离液的10ml刻度离心管中,  $1800r \cdot min^{-1}$ 离心20分钟, 吸取MNC并用生理盐水洗涤2次, 用10%牛血清RPMI 1640制成 $5 \times 10^6/ml$ 的细胞悬液。

1.4.2 靶细胞: 取传代培养24~48小时的K<sub>562</sub>细胞, 用生理盐水洗涤2次, 台盼蓝拒染试验测定细胞活力, 应达98%以上, 制备 $5 \times 10^5/ml$ 的靶细胞悬液。

1.4.3 NK细胞活性测定: 实验设NK细胞效应管(效、靶细胞各100μl)、NK细胞对照管(效应细胞与培养液各100μl), 以1%NP-40(Nonidet P<sub>40</sub>, Fluka AG)破坏靶细胞作最大释放管、最小释放管(靶细胞与培养液)、培养液(200μl)对照管, 分别加入Eppendorf管中, 37℃孵育24小时,  $3000r \cdot min^{-1}$ 离心3分钟, 各管取上清液100μl分别置于96孔平底酶标板反应孔中, 调室温至20℃, 加入LDH底物液100μl/孔, 立即用DG3022型酶联免疫检测仪, 选择490nm波长, 测定各

$$NK\text{-A}(\%) = \frac{\text{效应管 A 值} - \text{对照管 A 值}}{\text{最大释放管 A 值} - \text{最小释放管 A 值}} \times 100\%$$

附表 脐血和成人外周血淋巴细胞表型及NK细胞活性( $\bar{x} \pm s$ )

样本	样本数		CD <sub>3</sub>	CD <sub>4</sub>	CD <sub>8</sub>	CD <sub>4</sub> /CD <sub>8</sub>	CD <sub>16</sub>	NK-A
	表型	NK						
脐血	27	22	50.0 ± 12.4*	40.1 ± 12.4	13.8 ± 4.3*	3.2 ± 1.5*	16.9 ± 6.2*	17.8 ± 12.4*
成人血	24	17	70.3 ± 8.7	40.7 ± 7.1	27.0 ± 5.5	1.6 ± 0.4	11.9 ± 6.3	40.8 ± 21.6

注: \* 脐血与成人血比较,  $P < 0.01$

### 3 讨论

脐血与成人外周血淋巴细胞表型分析的结果表明, 两者有显著差别。脐血中T淋巴细胞的比例显著低于成人血, 这一结果与有些文献报道比较一致<sup>[1~3]</sup>。本室研究结果显示脐血T细胞中以CD<sub>4</sub><sup>+</sup>亚类为主, 因其CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比值显著高于成人外周血, 文献报道脐血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞具有诱导抑制活性, 而几乎没有辅助功能<sup>[4]</sup>。以后的研究证实, 恰是CD<sub>4</sub><sup>+</sup>亚类中的CD<sub>45</sub>RA<sup>+</sup>细胞能诱导CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的抑制活性<sup>[5]</sup>。脐血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>45</sub>RA<sup>+</sup>T细胞的比例较高<sup>[2,3]</sup>, 是未经抗原刺激的天然T细胞(native T cell, T<sub>n</sub>)。可见, 脐血T细胞CD<sub>4</sub><sup>+</sup>亚类比例偏高将有利于发

孔的吸光度(A), 每分钟测定1次, 连续10分钟, 算出各管吸光度变化均值后, 再计算NK细胞活性(NK-A)。

1.5 统计方法: 用t检验分析比较脐血与成人外周血的淋巴细胞表型及NK细胞活性。

### 2 结果

从附表中看出: 脐血CD<sub>3</sub><sup>+</sup>及CD<sub>8</sub><sup>+</sup>淋巴细胞百分率显著低于成人外周血( $P < 0.01$ ), 脐血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>细胞百分率与成人血比较差异无显著性( $P > 0.05$ ), 脐血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比值显著高于成人血( $P < 0.01$ )。表明脐血中T淋巴细胞(CD<sub>3</sub><sup>+</sup>)相对较低, 但其中的辅助/诱导细胞(CD<sub>4</sub><sup>+</sup>)亚类的比例较大, 而杀伤/抑制细胞(CD<sub>8</sub><sup>+</sup>)比例较小。脐血中CD<sub>16</sub><sup>+</sup>淋巴细胞百分率明显高于成人血( $P < 0.01$ ), 而NK细胞活性却显著降低( $P < 0.01$ )。

挥其免疫抑制活性, 这也许是脐血造血干、祖细胞移植时, GVHD发病率偏低且程度轻的一个原因。

有文献报道脐血CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞中, 杀伤效应细胞群(CD<sub>11a</sub><sup>bright</sup>CD<sub>8</sub><sup>+</sup>)显著降低, 抑制细胞群(CD<sub>11a</sub><sup>dull</sup>CD<sub>8</sub><sup>+</sup>)却显著高于成人血<sup>[3]</sup>, 当遇到异体抗原刺激时, 脐血T细胞产生扩增应答过程中几乎没有反应毒性T细胞<sup>[6,7]</sup>。这些特点加之本研究显示脐血T细胞亚类比例较低, 可能是脐血移植时GVHD发生率减少、程度减轻的另一个原因。

NK细胞表达CD<sub>16</sub>和CD<sub>56</sub>表型, 为非T非B的大颗粒淋巴细胞。本研究发现脐血CD<sub>16</sub><sup>+</sup>淋巴细胞的比例显著高于成人血, 提示脐血可能

是 NK 细胞的良好来源。NK 细胞是参与 GVHD 的效应细胞,本实验结果显示脐血 NK 细胞活性较低,这为解释脐血移植 GVHD 少且轻的临床现象可能提供了一点免疫学依据。

脐血来源丰富、采集方便,并含有较丰富的造血干、祖细胞和较高水平的造血活性物质,将在放射病、肿瘤及血液病的临床应用中有着十分广阔前景。

### 参 考 文 献

- 1 Foa R, Giubellino MC, Fierro MT, et al. Immature T-lymphocytes in human cord blood identified by monoclonal antibodies: a model for the study of the differentiation pathway of T cells in humans. *Cell Immunol*, 1984, 89: 194.
- 2 Rabian HC, Lesage S, Gluckman E. Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplant*, 1992, 9 suppl 1: 64.
- 3 Han P, Hodge G, Story C, et al. Phenotypic analysis of

functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol*, 1995, 89: 733.

- 4 Yachie A, Miyawaki T, Nagaoki T, et al. Regulation of B cell differentiation by T cell subsets defined with monoclonal OKT<sub>4</sub> and OKT<sub>8</sub> antibodies in human cord blood. *J Immunol*, 1981, 127: 1314.
- 5 Morimoto C, Letvin NL, Distasco JA, et al. The isolation and characterization of the human suppressor induce T cell subset. *J Immunol*, 1985, 134: 1508.
- 6 Rusdon G, Ganddy J, Broxmeyer HE. Enhanced proliferation and diminished cytotoxicity of cord blood T cells in allogeneic mixed lymphocyte culture. *Exp Hematol*, 1992, 20: 723.
- 7 Risdon G, Gaddy J, Stehman B, et al. Proliferative and cytotoxic response of human cord blood T lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol*, 1994, 154: 14.

(收稿:1996-10-03 修回:1997-01-28)