

## 人脐静脉内皮细胞表面血型 ABO 抗原、 HLA 抗原、CD 抗原表达特性

吴金鹭 盛民立

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

血管内皮细胞代谢功能十分活跃,其表面能合成和释放多种物质<sup>[1]</sup>,这些物质可通过体内不同途径发挥作用。其中,内皮细胞所合成和表达的抗原成份,目前认为参与和调节着整个机体的免疫应答反应过程。此外,有些学者亦已逐步注意到细胞表面某些抗原表型改变及异常表达与临床某些疾病有一定关联<sup>[2-3]</sup>。

已有文献报道体外培养的人内皮细胞具有表达血型 ABO 抗原、HLA 抗原和 CD 抗原特性<sup>[4-7]</sup>,但国内这方面工作开展甚少。因此,本文旨在通过 10 例人脐带静脉内皮细胞原代和传代培养观察,运用 ABC 免疫酶标技术,研究上述细胞抗原表达特性,以探讨内皮细胞免疫学功能及其病理生理意义。

### 材 料 和 方 法

#### 一、内皮细胞来源

正常足月娩出胎儿脐带 10 例,0.1% I 型胶原酶(Sigma)消化分离静脉内皮细胞,用含内皮细胞生长因子(本室制备)250 微克/毫升配制的 20% 正常小牛血清——199 培养液(日本制药株式会社)调节细胞密度至  $2 \times 10^4$ /孔,种于 24 孔板玻片上( $1 \times 1 \text{ cm}^2$ ),置 5%  $\text{CO}_2$  温箱静置培养。

#### 二、红细胞和 T、B 淋巴细胞来源

上述 10 例脐带血用肝素抗凝,一部分血样本固定、涂片后,作为血型抗原检测的阳性对照细胞。另一部分用 Ficoll-Hypaque 分层液经梯度——密度离心和 AET-E 花环试验,分离出 T 和 B 淋巴细胞,固定、涂片,作为 HLA 和 CD 抗原检测的阳性对照细胞。

#### 三、人脐静脉内皮细胞培养观察与鉴定

倒置相差显微镜下,观察细胞生长状态,用因子

ⅧR:Ag PAP 法鉴定细胞。

#### 四、人脐静脉内皮细胞表面抗原测定(ABC 法)及阳性染色判断标准

玻片培养细胞经 2% 戊二醛固定。ABC 法参照 Hsu 等人报道<sup>[8]</sup>,以有特异性褐色颗粒沉积为阳性反应。

阴性对照用玻片培养的 Balb/c 3T3 细胞代替内皮细胞,PBS 代替一抗试剂。

(抗红细胞 A 抗原血清,抗红细胞 B 抗原血清系上海中心血站研制。鼠抗人 HLA-ABC 抗原单抗、鼠抗人 HLA-DR 抗原单抗、鼠抗人 CD<sub>4</sub> 抗原单抗、鼠抗人 CD<sub>8</sub> 抗原单抗系北京军事医学科学院基础医学研究所研制。)

#### 五、图像分析

经 ABC 法染色细胞片置 Q 520 自动图像分析仪检测(Carmbridge),测量框内的平均细胞数为 50 个,抗原染色强度以积分光密度值(IOD)表示。

### 结 果

#### 一、人脐静脉内皮细胞形态学观察与鉴定结果

培养的内皮细胞呈短梭形,彼此紧密相嵌,形成单层。经因子 ⅧR:Ag PAP 法染色,胞浆内有特异性褐色颗粒反应,鉴定为阳性细胞。

#### 二、10 例脐带血血型鉴定和脐静脉内皮细胞表面血型 A、B 抗原检测结果

用血凝法鉴定,其中 5 例与抗红细胞 A 抗原血清发生反应,判定为 A 型血;2 例与抗红细胞 B 抗原血清发生反应,判定为 B 型血;1 例与抗红细胞 A、B 抗原血清均发生反应,判

定为AB型血;2例与抗红细胞A、B抗原血清均不发生反应,判定为O型血。

10例原代培养的脐静脉内皮细胞表面血型A、B抗原检测结果见表1。5例内皮细胞与抗红细胞A抗原血清呈阳性反应,为A抗原阳性细胞;2例与抗红细胞B抗原血清呈阳性反应,为B抗原阳性细胞;1例分别与抗红细胞A、B抗原血清呈阳性反应,为A、B抗原阳性细胞;2例分别与抗红细胞A、B抗原血清呈阴性反应,为A、B抗原阴性细胞。传代培养两周(4—5代)的内皮细胞,其表面血型抗原检测结果同上。各脐带内皮细胞表面血型A、B抗原检测结果,与自身A型或B型红细胞阳性染色结果一致。Balb/C3T3细胞和以PBS代替一抗的染色片均为阴性。

### 三、5例A型脐带血静脉内皮细胞表面HLA-ABC、HLA-DR、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>抗原检测结果

原代培养的脐静脉内皮细胞分别与抗HLA-ABC、抗HLA-DR、抗CD<sub>4</sub>、抗CD<sub>8</sub>单抗作用后均呈阳性反应,结果见表2。传代培养两周(4—5代)的内皮细胞,上述各抗原检测结果同上,与自身T、B淋巴细胞阳性染色结果一致。Balb/C3T3细胞和以PBS代替一抗的染色片呈阴性。

### 四、图像分析结果( $\bar{X} \pm SD$ )

脐静脉内皮细胞表面血型A抗原、HLA-ABC抗原、HLA-DR抗原、CD<sub>4</sub>抗原、CD<sub>8</sub>抗原图像分析结果详见表3。阴性对照片IOD值为0。

表1 10例人脐静脉内皮细胞表面血型A、B抗原检测结果

| 人脐静脉内皮细胞表面抗原 | 红细胞A抗原抗血清 | 红细胞B抗原抗血清 | 脐带例数 |
|--------------|-----------|-----------|------|
| 红细胞A抗原       | +         | -         | 5    |
| 红细胞B抗原       | -         | +         | 2    |
| 红细胞H抗原       | -         | -         | 2    |
| 红细胞A、B抗原     | +         | +         | 1    |

## 讨 论

### 一、利用内皮细胞表面抗原表达特性,作为细胞鉴定的免疫学指标

血管壁主要存在3种细胞——内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞。在内皮细胞原代培养取材时,经常会由于酶液浓度、温度和消化

表2 5例人A型脐带血静脉内皮细胞表面(HLA-ABC、HLA-DR、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>)抗原的检测

| 内皮细胞样本 | 抗HLA-ABC抗原单抗 | 抗HLA-DR抗原单抗 | 抗CD <sub>4</sub> 抗原单抗 | 抗CD <sub>8</sub> 抗原单抗 |
|--------|--------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 1      | +            | +           | +                     | +                     |
| 2      | +            | +           | +                     | +                     |
| 3      | +            | +           | +                     | +                     |
| 4      | +            | +           | +                     | +                     |
| 5      | +            | +           | +                     | +                     |

表3 5例人A型脐带血静脉内皮细胞表面红细胞A抗原、HLA抗原、CD抗原图像分析结果

| 人脐静脉内皮细胞表面抗原       | 平均积分光密度值(IOD)     |
|--------------------|-------------------|
| 红细胞A抗原             | 13960.15±8960.26  |
| HLA-ABC抗原          | 34371.25±20830.54 |
| HLA-DR抗原           | 23576.50±14473.24 |
| CD <sub>4</sub> 抗原 | 14073.38±2110.49  |
| CD <sub>8</sub> 抗原 | 13251.50±8241.71  |

时间掌握不当,而使血管壁过度消化,影响内皮细胞培养纯度。为了使培养的内皮细胞能与混杂在其间的平滑肌细胞、成纤维细胞相鉴别,目前常规采用因子ⅧR:Ag作为可靠的判别标准。本文认为,除上述因子ⅧR:Ag和活细胞形态学检查外,尚可根据内皮细胞与平滑肌细胞、成纤维细胞两者在细胞免疫学上的差别(成纤维细胞表面血型抗原和HLA抗原ABC法染色为阴性,平滑肌细胞也无上述抗原表达<sup>[4-5]</sup>,以检测培养内皮细胞纯度,并可

作为内皮细胞鉴定的有效指标之一。

## 二、内皮细胞表面人类主要同种异型抗原——ABO、HLA 抗原表达特性

人类主要同种异型抗原——ABO 和 HLA 抗原是与临床器官移植免疫有关的体内主要二大抗原系统,且与临床肿瘤、自身免疫性疾病发生密切相关。

本文采用免疫酶标 ABC 法检测人脐静脉内皮细胞表面红细胞 A、B 抗原阳性,对照自身脐带红细胞表面血型抗原和血型鉴定结果,两者一致。因此认为,内皮细胞表面携带血型 A 或 B 抗原成份,其在个体中的分布与红细胞 A 或 B 抗原一致。在正常生理情况下,可反映体内血型抗原系统,但在肿瘤病理时,这种血型抗原表型会有变异或异常表达<sup>[9]</sup>。

关于内皮细胞表面 HLA 抗原表达特点,国外已有不少报道<sup>[1]</sup>。多数学者认为,正常人脐静脉内皮细胞具有表达 HLA-ABC 抗原,不表达 HLA-DR 抗原,但后者可在某些诱导剂作用下出现表达,并伴有 HLA-ABC 抗原表达增强。本文通过 5 例人脐静脉内皮细胞原代培养,用免疫酶标 ABC 法检测培养细胞表面 HLA-ABC、HLA-DR 抗原阳性,与自身阳性对照细胞结果相符,证实人内皮细胞表面携带 HLA 抗原。

## 三、内皮细胞表面 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 抗原表达特性

随着内皮细胞免疫学特性研究的不断深入,近几年国内外一些学者注意到内皮细胞表面的淋巴细胞分化抗原的表达倾向<sup>[6-7]</sup>。本文通过对 5 例原代培养的人脐静脉内皮细胞表面的 CD<sub>4</sub> 和 CD<sub>8</sub> T 淋巴细胞分化抗原的检测,证实有 CD 抗原表达特性,阳性染色结果与自身 T 淋巴细胞一致。但对于这些抗原分子的生物学功能,与血液淋巴细胞和白细胞之间的关系,以及在机体免疫应答调节中的作用则不清楚。目前临床已发现内皮细胞表面 CD 抗原表型改变与肿瘤、自身免疫性疾病发生有关,提示内皮细胞 CD 抗原在正常人体生理和病理中

的作用是不可忽视的。

## 四、体外短期传代培养的内皮细胞具有原代培养细胞的一般免疫学特征

本实验室已运用含内皮细胞生长因子的 20% 小牛血清——199 培养液能使人脐静脉内皮细胞维持体外较长期的传代培养,并保持细胞良好增殖状态和一般生物学特征。本文在细胞传代培养基础上,观察了体外培养两周(4—5 代)的人脐静脉内皮细胞表面血型抗原、HLA 抗原、CD 抗原表达,发现上述抗原 ABC 法染色强度与原代培养细胞相比无明显改变,抗原染色特点基本相同。因此认为,在稳定的体外培养系统中,短期培养细胞能保持原代细胞的免疫学特性,但随着体外反复传代培养和培养时间延长,是否会引起细胞抗原分子丢失而改变其免疫学特性,仍有待进一步研究。

## 摘 要

用人脐静脉内皮细胞体外培养方法和 ABC 免疫酶标技术,检测细胞表面抗原分布。结果表明:原代培养的 10 例人脐静脉内皮细胞,5 例红细胞 A 抗原阳性;2 例红细胞 B 抗原阳性;1 例红细胞 A、B 抗原均阳性;2 例红细胞 A、B 抗原均阴性。其中 5 例 A 型脐带血内皮细胞分别检测 HLA-ABC、HLA-DR、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 抗原均阳性,自动图像分析证实有上述抗原分子表达。此外,本文研究证明,体外培养两周的内皮细胞具有表达抗原的功能。实验结果提示:体外短期培养的内皮细胞能保持其一般生物学和免疫学特征,其表达的抗原分子可能参与和调节着机体的免疫功能。

## 参 考 文 献

- [1] Jaff, EA. et al., 1987, *Hum Pathol.*, 18: 234—239.
- [2] Maruyama. N. et al., 1987, *Appl. Pathol.*, 5: 246—252.
- [3] Bjerke, J. R et al., 1988, *Acta Dermato-Venereol*, 68: 306—311.

- [4] Jaffe, E. A. et al., 1973, *J. Clin. Invest.*, 52: 2745—2756.
- [5] Jaffe, E. A. et al., 1975, *J. Immunol.*, 115: 730—733.
- [6] 盛民立等, 1988, 第一届全国分子生物物理学术大会.
- [7] Jaffe, E. A. et al., 1989, *J. Immunol.*, 143: 3961—3966.
- [8] Hsu, S. M et al., 1981, *J. Histochem Cytochem.*, 29: 577.
- [9] 张宏等, 1991, 中华肿瘤杂志, 3: 165—167.

## 凝集素及其受体相互作用对人红细胞变形性的影响\*

董 群 苏雅娴 李田勋\*\* 文宗耀\*\*

(北京医科大学细胞生物教研室 100083)

研究红细胞变形性,无论在理论研究还是临床实践中均具有重要意义。它对于认识不同因素如外界物质、细胞膜及骨架、不同病理状态等对细胞结构及功能的影响有一定帮助,也为深入研究不同因素对细胞作用的机制及某些疾病的诊断提供线索和依据。

激光衍射法(Ektacytometry)是70年代以来兴起的一种测量红细胞变形性的方法<sup>[1]</sup>。同其它方法相比,此法具有用血量少(50 $\mu$ l全血)、迅速直观等优点。人们采用激光衍射技术已经对某些病理情况下,如遗传性球形红细胞<sup>[2]</sup>、镰刀型贫血、非稳定性血红蛋白失调等的红细胞变形性,以及红细胞膜变形性<sup>[3]</sup>、骨架蛋白对膜变形性的影响<sup>[4]</sup>等进行了研究。但采用激光衍射法研究配体与受体作用对红细胞变形性的影响尚未见报道。

本文采用激光衍射仪,研究了两种不同凝集素伴刀豆蛋白A(ConA)及麦胚凝集素(WGA)作用前后,红细胞变形性的改变,从而为进一步研究配体与受体相互作用对细胞结构及功能的影响提供直接依据。

### 材料与方 法

激光衍射仪由北京医科大学物理教研室与北京地测仪器厂共同研制。

溶液渗透压用美国 Advanced Wide Range Osm-

ometer 3 WZ 型渗透压测量仪测量。

人新鲜红细胞来自北京红十字血液中心。伴刀豆蛋白A及麦胚凝集素均为美国Sigma公司产品。其余试剂均为分析纯。

#### 一、样品制备

1. 对照组:以PBS(0.12 mol/L NaCl, 0.02 mol/L  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.005 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=7.4, 295 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ )清洗红细胞3次。然后将红细胞悬浮于5 ml 15%PVP液中(PVP,聚乙烯吡咯烷酮,加0.02 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.005 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,再加NaCl调整渗透压至295 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ ),细胞浓度约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 。

2. 加ConA组:清洗后红细胞分别加入3个试管中,以等渗PBS稀释至5 ml,使红细胞浓度约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ ,加入ConA溶液使终浓度分别为10、30、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,混匀,作用10 min,离心去上清液,洗3次。以15%PVP等渗液稀释至 $2 \times 10^7/\text{ml}$ ,备用。

3. 加ConA及D-葡萄糖组:如2.进行。加ConA清洗后,再加D-葡萄糖溶液使其在ConA浓度为10、30、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的3管中,终浓度分别为0.5、1.5、2.5 mmol/L,作用10 min,清洗2次,以15%PVP等渗液稀释细胞至 $2 \times 10^7/\text{ml}$ ,备用。实验中同时以红细胞单纯加D-葡萄糖组作为对照。

4. 加WGA组:分两管,如2.进行, WGA终浓度分别为0.05、0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

5. 加WGA及N-乙酰葡萄糖胺组:分两管,如

1.\* 国家自然科学基金资助项目。本实验得到北医大生物物理教研室于桂芬及徐家鸽老师的指导,特表感谢。

2.\*\* 北京医科大学物理教研室。