

• 检验技术与方法 •

流式细胞术检测人外周全血中 Th17 细胞的方法探讨

程 成, 杨玉华, 王均乐

(南京医科大学附属南京儿童医院检验科, 江苏南京 210008)

摘 要:目的 探讨用全血标本直接检测 Th17 细胞。方法 对外周全血和外周血单个核细胞(PBMC)检测 Th17 细胞进行了比较,并采用了 6 种不同浓度的佛波酯(PMA)和 3 种不同培养时间对全血进行刺激培养。结果 用全血直接培养检测 Th17 细胞的结果与提取 PBMC 后检测的结果接近。全血检测 Th17 细胞最适宜的刺激培养条件为:PMA 终浓度为 200 ng/mL,培养 6 h。结论 全血检测 Th17 细胞的方法简单适宜,为临床上对 Th17 细胞的进一步研究提供了便利。

关键词:Th17 细胞; 流式细胞术; 佛波酯

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)17-2118-02

Mosmann 等^[1]根据分泌细胞因子的不同,将 CD4⁺T 细胞分为 Th1 和 Th2 两个亚群。近年又发现了与 Th1 和 Th2 的功能及表型不同、以分泌 IL-17 为特征的一个新的独立的 CD4⁺T 细胞亚群,被称为 Th17 细胞。随着 Th17 细胞在炎症反应和自身免疫疾病中的重要调节作用逐渐被揭示,流式细胞术检测 Th17 细胞在科研及临床工作中的应用已越来越广泛^[2]。目前最为常用的检测人外周血中 Th17 细胞的方法是先从肝素抗凝的全血中分离出外周血单个核细胞(PBMC),用佛波酯(PMA)和离子霉素等试剂刺激培养,经流式抗体染色后,再用流式细胞仪检测其比例^[3]。用 PBMC 检测会减少全血中除 PBMC 以外的细胞对实验结果的影响,但步骤比较繁琐,而且需要的血量比较大(3 mL 以上),特别不适用于儿童。笔者尝试直接用外周全血代替 PBMC,这样不仅用量非常小,而且操作简洁、快速,有利于临床应用。另外,PMA 的刺激浓度是细胞培养成功与否的关键。目前针对刺激 PBMC 的 PMA 浓度报道较多,差异也较大,大概范围在 25~300 ng/mL 之间^[3-7],但对于全血应该用什么浓度的 PMA 去刺激才能达到最佳效果还需要进一步探讨。针对以上问题,本研究对外周全血和 PBMC 检测 Th17 细胞这 2 种方法进行了比较。另外,还采用了 6 种不同浓度的 PMA 和 3 种不同培养时间对全血进行刺激培养,以期找出针对外周全血的最佳的 PMA 刺激浓度和培养时间,从而更加准确和灵敏地检测出全血中 Th17 细胞的比例。

1 资料与方法

1.1 一般资料 南京医科大学附属南京儿童医院健康职工 12 例(男 9 例,女 3 例),各采集空腹静脉血 10 mL,肝素抗凝,1 h 内进行检测。

1.2 仪器与试剂 PMA、离子霉素、高尔基抑制剂(Golgistop)均购自 Sigma 公司,抗人 CD3APC 抗体、抗人 CD8aFITC 抗体、PE 标记的抗人 IL-17A 抗体购自 eBioscience 公司,Fixation/Premeabilization 溶液、Prem/Wash 缓冲液、流式细胞仪购自 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 PBMC 重悬液和全血的培养 分别取 12 份标本的 PBMC 重悬液 100 μ L 和全血 100 μ L 加至 15 mL 离心管中,每管分别加入 100 μ L 的完全 RPMI-1640,再加入 PMA 和离子霉素工作液,调整反应体系中 PMA 和离子霉素的终浓度分别为 200 ng/mL 和 1 μ g/mL,充分混匀。开盖,然后将标本放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。1 h 后,加入 Golgistop,终浓度为 0.7 μ L/mL,培养 6 h 后检测。

1.3.2 3 个不同刺激时间外周全血的培养 从 12 份标本中随机选取 1 份标本,分别向 3 根 15 mL 离心管中加入 100 μ L 全血,其余步骤同 1.3.1,分别培养 3、6、9 h。

1.3.3 6 种不同浓度 PMA 对外周全血的刺激培养 随机选取 1 份标本,分别向 6 支 15 mL 离心管中加入全血 100 μ L,每管加入 100 μ L 完全 RPMI-1640 和不同量的 PMA 工作液,然后加入离子霉素的工作液,此时 6 个反应体系中 PMA 的终浓度分别为 25、50、100、200、400、800 ng/mL,各管离子霉素的终浓度均为 1 μ g/mL,充分混匀,其余步骤同 1.3.1。

1.4 统计学处理 用 SPSS11.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料进行 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PBMC 和全血检测 Th17 细胞的方法比较 以全血制备 PBMC 后培养并以流式抗体染色,经流式细胞仪检测显示, Th17 细胞占总 T 细胞(CD3⁺)的百分比为(1.17 $\pm$ 0.58)%,而全血标本直接培养并以流式抗体染色后,测得 Th17 细胞占总 T 细胞(CD3⁺)的百分比为(1.16 $\pm$ 0.55)%,2 种检测方法对 Th17 细胞检测结果的差异没有统计学意义(*P*>0.05)。见图 1。

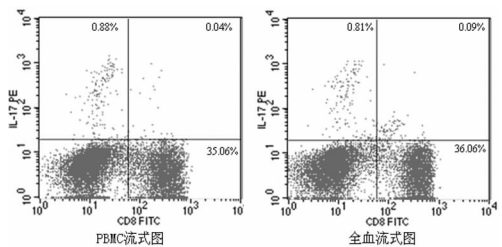


图 1 2 种不同方法的流式图(左上象限为 Th17 细胞)

2.2 6 种不同 PMA 浓度对全血刺激效果的比较 本研究采用的 PMA 浓度分别为 25、50、100、200、400、600 ng/mL,6 种不同浓度的 PMA 对全血进行刺激后,Th17 检测结果分别为 0.93%、1.16%、1.25%、1.91%、1.62%、1.43%。随着 PMA 浓度的升高,检测的 Th17 细胞比例逐渐升高,200 ng/mL 时达到顶峰,PMA 刺激效果最好,但随着浓度的再升高,Th17 细胞的比例有降低的趋势。

2.3 3 种不同培养时间对全血 Th17 细胞浓度的影响 将外周全血分别培养 3、6、9 h 后,Th17 的检测结果分别为 1.08%、2.01%、2.16%,培养 3 h 的标本 Th17 浓度最低,9 h 的标本 Th17 浓度最高,但与培养 6 h 的全血标本相比差别不大(*P*>0.05)。

3 讨 论

通常情况下, Th17 细胞处于静止状态, 所以很难检测到。笔者分别将 PBMC 标本和全血标本进行刺激培养后检测 Th17 细胞的比例, 发现这 2 种标本的检测效果接近。这表明可以用全血进行刺激培养来检测人体外周血中的 Th17 细胞。用全血直接进行刺激培养减少了提取 PBMC 的繁琐步骤, 而且用量很少, 只要 100~200 μ L 全血即可。这使得在做临床试验时标本的留取变得容易, 特别是对儿童来说, 标本的收集变得简单易行。

有丝分裂原是非特异性多克隆活化剂, 能使某群淋巴细胞中的所有克隆都被激活。PMA 是有丝分裂原的一种, 能与多种细胞膜糖基分子等促有丝分裂原受体结合, 促使细胞活化并诱导细胞分裂。T、B 淋巴细胞表面都有多种有丝分裂原受体, 淋巴细胞在体内外接受有丝分裂原的刺激后, 静止的淋巴细胞向母细胞转化, 这种转化过程对研究淋巴细胞功能变化甚为重要。在实践中, 常利用淋巴细胞对有丝分裂原刺激的反应性来评价机体的免疫功能状态。本研究发现, 对于全血标本来说 PMA 在 200 ng/mL 刺激的效果最好, 但如果再增加其浓度, 检测结果反而会会出现下降的趋势, 可能是因为在高浓度的 PMA 刺激下, Th17 细胞不能耐受其毒性作用而导致分泌 IL-17 的功能减退。

通过分析不同的培养时间对 Th17 细胞比例的影响, 发现培养 9 h 的标本 Th17 细胞比例最高, 但和培养 6 h 的标本相比, Th17 细胞比例的差别不大, 从节省时间的角度考虑, 推荐选择培养 6 h 后检测。

值得注意的是, 影响流式细胞仪检测结果的因素较多, 比如本研究中提到的 PMA, 不同批号的试剂之间刺激效果可能不同; 相同批号的试剂随着时间的推移和冻融次数的增加刺激效果会减弱。因此, 本研究中关于 PMA 浓度和培养时间的探讨所得结论只是针对本研究的, 建议其他研究在正式进行试验之前重新探索, 建立新的条件。

Th17 细胞产生的 IL-17 作为一种炎症介质在机体中起到很大作用, 可以诱导一系列的细胞因子、趋化因子的表达, 介导

炎症细胞的局部浸润和组织损伤^[8]。本研究建立了全血检测 Th17 细胞的方法, 该方法简单适宜, 为临床上对 Th17 细胞的进一步研究提供了便利。

参考文献

- [1] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins[J]. J Immunol, 1986, 136(7): 2348-2357.
- [2] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(5): 337-348.
- [3] Bachmann M, Horn K, Rudloff I, et al. Early production of IL-22 but not IL-17 by peripheral blood mononuclear cells exposed to live *Borrelia burgdorferi*: the role of monocytes and interleukin-1[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(10): e1001144.
- [4] Jones GW, Stumhofer JS, Foster T, et al. Naive and activated T cells display differential responsiveness to TL1A that affects Th17 generation, maintenance, and proliferation[J]. FASEB J, 2011, 25(1): 409-419.
- [5] Dölff S, Quandt D, Wilde B, et al. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(4): R150.
- [6] Boniface K, Blumenschein WM, Brovont-Porth K, et al. Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN-gamma-producing cells with distinct properties from the Th1 lineage[J]. J Immunol, 2010, 185(1): 679-687.
- [7] Li J, Xiang X, Li W, et al. Change and significance of peripheral blood Th17 cells in patients with acute asthma[J]. J Central South Univ (Med Sci), 2010, 35(2): 129-133.
- [8] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. Immunity, 2004, 21(4): 467-476.

(收稿日期: 2012-04-12)

TCT 联合 HC2 在宫颈癌筛查中的临床应用

王金华¹, 宋光耀^{2△}, 刘英霞¹

(1. 大连市第二人民医院检验科, 辽宁大连 116012;

2. 大连市妇产医院病理科, 辽宁大连 116033)

摘 要:目的 探讨薄层液基细胞学检测方法(TCT)联合第二代杂交捕获(HC2)在宫颈癌筛查中的临床应用。方法 对照分析 785 例患者的 TCT、HC2 及组织学检查的结果。结果 TCT 诊断为非典型鳞状上皮细胞不能明确意义(ASC-US)、非典型鳞状细胞, 不排除上皮内高度病变(ASC-H)、鳞状上皮内低度病变(LSIL)、鳞状上皮内高度病变(HSIL)、鳞状细胞癌(SCC), 其组织学阳性率随病变程度的增加而升高; 与组织学结果比较, HC2 阴性符合率为 99.44%, 阳性符合率为 53.23%, 二者比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。TCT 与 HC2 联合时, 两种检测方法的结果一致时, 其与组织学结果的符合率更高。结论 TCT 与 HC2 联合应用, 可以提高宫颈癌及癌前病变筛查的准确率, 并可为后期诊治提高可靠依据。

关键词: 宫颈肿瘤; 薄层液基细胞学; 第二代杂交捕获法; 人乳头瘤病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)17-2119-03

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发生与人类乳头瘤病毒(HPV)感染密切相关。薄层液基细胞学检测方法(TCT)是目前国际上最先进的一种宫颈癌及癌前病变细胞学

检查技术, 现已广泛应用于宫颈癌变的筛查^[1]。第二代杂交捕获技术(HC2)由 Digene 推出, 其利用分子生物学技术在 DNA 水平直接检测高危型 HPV, 其临床敏感度很高, 在一定程度上

△ 通讯作者, E-mail: sgy5615@sohu.com。