DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.003
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0005-03

论著

异种单个核细胞在体内分布及定植研究

吴 军,刘志刚,张 宁,陈希炜,周立新,易绍萱,王锡华,姜 庆 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要 目的:研究异种单个核细胞在机体内的分布及定植特点,为细胞疫苗的研究和改进提供理论基础。方法:经兔外周动、静脉输入^{99m}TC标记处理和未处理的人单个核细胞,用单光子发射计算机断层仪(Single photon emission computed tomography, SPECT)扫描并做图像分析及用γ-记数仪测定放射量。结果:异种单个核细胞主要定植在肺、肝、脾及骨髓,而胸腺、淋巴结、肌肉、肠壁等其它脏器定植极少;不同途径输入的异种单个核细胞对以上分布特点无明显影响,而不同的预处理对异种单个核细胞的分布特点有影响。结论:异种单个核细胞在体内的定植具有一定的组织器官特异性,不同脏器血管内皮细胞对"扣押"异种细胞的机制可能不同。

关键词 异种单个核细胞;定植;单光子发射计算机断层仪
中图法分类号 R392.12 文献标识码 A

Homing and distribution of human mononuclear cells in rabbits

WU Jun, LIU Zhi-gang, ZHANG Ning, CHEN Xi-wei, ZHOU Li-xin, YI Shao-xuan, WANG Xi-hua, JIANG Qing (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To investigate the features of homing and distribution of human mononuclear cells in rabbits to provide theoretical basis for research and improvement of cellular vaccine. Methods: Both single photon emission computed tomography (SPECT) and γ-counting were used to trace ^{99m}TC-labeled human mononuclear cells and unlabeled ones in rabbits. Results: Human mononuclear cells possessed an organ-specific binding capacity to some endothelial cells in several organs such as the lungs, spleen, liver and bone marrow. Moreover, the mechanisms underlying the interaction between human mononuclear cells and the endothelial cells in above four might be distinctive. Conclusion: The distribution of human mononuclear cells in rabbits is fairly tissue-specific. The vascular endothelial cells of different organs might have different mechanisms of inhibiting the human mononuclear cells.

Key words human mononuclear cell; homing; SPECT

如何诱导免疫耐受以克服器官移植排斥反应是当代免疫学界所面临的难题。在各种免疫耐受诱导手段中,细胞疫苗是颇有前景的一种。不论是异体,还是异种,细胞疫苗进入机体后将运行至一定的部位,并与那里的细胞相互作用,从而引起一定的反应。那么,细胞疫苗在体内,尤其是在异种体内定植在何处?有何意义?这是一个尚未有答案的问题。若能了解异种细胞在体内的运行、定植,必将有助于我们理解细胞疫苗的作用,有助于我们研究、改造疫苗,使之更好地符合我们的设计要求。为此,本研究采用SPECT扫描技术,动态地、定量地观察人单个核细胞在体内的分布、定植。

1 材料与方法

1.1 动物

家兔,体重1.5~2 kg,由第三军医大学动物所提供。

1.2 仪器与试剂

SPECT(GE公司,USA),γ-计数仪(国营二八六厂),^{99m}TC

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2)
作者简介:吴 军(1962-2),男,江苏省南京市人,硕士,教授,主要从事移植免疫方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752688
收稿日期:1999-09-29;修回日期:1999-11-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(中国原子能研究所)，淋巴细胞分离液（购于华美公司），鼠抗人 HLA-ABC 单克隆抗体(购于军事医学科学院)，生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体、ABC 试剂盒(购于 Promega 公司)。

1.3 方法

1.3.1 人外周血单个核细胞(h-PMC)分离方法[1]及细胞的处理

将健康成年男性献血员的抗凝血缓慢滴加至淋巴细胞分离液液面上，离心后吸取单个核细胞悬液层，加 PBS(0.01 mol/L，pH 7.0)洗涤 3 次后制成单个核细胞悬液。该细胞悬液分别做短波紫外线照射（UVC-IRR）、2%多聚甲醛和 CD_3 单克隆抗体预处理。

1.3.2 外周血红细胞分离 将 1 ml 3.8% EDTA 溶液中加 4 ml 血，离心，去上清，加生理盐水 7 ml 摇匀，离心去上清后加 1 ml 生理盐水制成细胞悬液备用。

1.3.3 ^{99m}TC 标记人外周血单个核细胞(h-PMC)及红细胞

1.3.3.1 h-PMC 的标记 将特制的 ^{99m}TC-硫胶体液加入 h-PMC 悬液中，混匀，置于 37℃水浴中轻摇保温 1 h 后，加 3.8%柠檬酸钠继续保温 1 h，然后在 2 000 r/min 离心条件离心 5 min，加预温 37℃生理盐水，混匀，在相同条件下离心 5 min，弃上清，并重复 3 次后制成细胞悬液备用。

1.3.3.2 红细胞的标记 将分离的红细胞中加入新配制的 0.1%氯化锡生理盐水，混匀置 37℃水浴中 5 min，然后用生理盐水洗涤并制成细胞悬液。

1.3.4 细胞注射途径及 SPECT 扫描图像采集 将标记好的细胞从兔耳缘静脉或股动脉注射，并在注射同时采集动态图像，每隔 10 min 后再采集静态图像，至 3 h，对图像进行定性定量分析。

1.3.5 各主要脏器放射性测定 动物在 SPECT 检测完毕后处死，取胸腺、心、肝、脾、肺、肾、淋巴结、骨髓及肌肉组织。将切下的组织称重，每个标本重量 100～400 mg，放入小试管中，γ-计数仪测出每个标本的相对放射量。

1.3.6 免疫组化检查兔组织中 h-PMC 表面标志阳性细胞

取胸腺、心、肝、脾、肺、肾、淋巴结及骨髓做石蜡包埋和组织切片，用 HLA-ABC 单克隆抗体，检测人源性单个核细胞在组织中的分布。

2 结果

不同注射途径对单个核细胞在异种（人-兔）体内定植特点的影响。我们在对 10 只动物的观察中发现，不论是经外周动脉、还是经外周静脉输入 h-PMC 在体内不会影响这些细胞在各脏器的相对定植量，见图 1。

单个核细胞经 UV-IRR 及 2%多聚甲醛预处理后，机体内各脏器的相对定植量与未处理者全然不同，脾脏成为预处理后细胞的主要定植地，见图 2。但用 CD3 抗体的异种单个核细胞与未处理者在体内的分布基本一致。

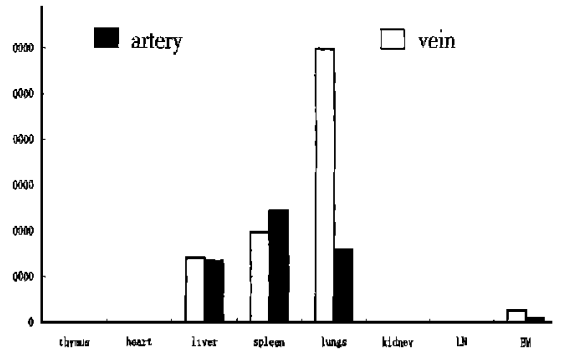


图 1 外周动、静脉输入异种细胞在体内相对定植量

Fig 1 Relative quantification of xeno-cell homing in body via peripheral either artery or vein

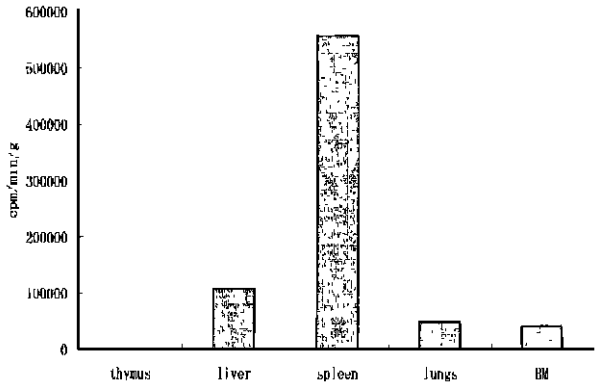


图 2 h-PMC 经 UVC-IRR 处理输入兔体内后的相对定植量

Fig 2 Relative quantification of UVC-treated h-PMC homing in rabbit

为了排除由于各脏器血流量及储血量的不同可能造成人单个核细胞在家兔体内分布量的差异，我们设计了两个实验来排除此可能性。一是将人红细胞输入家兔体内，结果显示人红细胞在兔体内主要分布于血流量大的肝、肾和脾，而非肺、脾、肝。从而排除了单个核细胞在肝、脾、肺等组织脏器中的非特异性地被吸附。二是进行了细胞贴壁实验。即为了证实异种单个核细胞在各脏器组织中的贴附具有特异性，并产生一定的粘附力，而非血流量所致，我们将 ^{99m}TC 标记的 h-PMC 静脉输入家兔体内后，进行组织灌注(100 cm 水柱压力)。结果显示 h-PMC 在兔体内也主要分布于肺、脾、肝，从而排除了因某些未知因素导致细胞在器官局部停留对测试结果的影响。

兔组织表面标志阳性人单个核细胞的检测：取兔胸腺、心、肝、脾、肺、肾、淋巴结及骨髓做组织切片，以免疫组织化学方法检测人源性单个核细胞。结果显示在肺、肝、脾及骨髓中发现较多的 HLA-Ⅰ类抗原阳性细胞，而肾、淋巴结及胸腺等其它脏器发现极少。

3 讨论

细胞在体内的定植将受诸多因素的影响，如血流量、细胞表面粘附分子等。那么，异种单个核细胞的定

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

植状况呢?我们的结果首次显示,未经处理的异种单个核细胞主要是位于肺、脾、肝和骨髓,而淋巴结、胸腺、肠壁、肾脏等定植极少。这一定植分布不受血流量影响,且细胞定位牢固,在 100 cm 水压条件下灌注血管不脱落,说明异种单个核细胞与内皮细胞的粘附紧密。不论从动脉,还是静脉输入细胞,均不影响该细胞的定位,上述结果揭示异种单个核细胞在上述部位的定植具有一定的组织器官特异性。

另一方面,我们发现,输入处理后的细胞,则异种单个核细胞的分布有所改变,即原本的相对定植量顺序是肺、脾、肝、骨髓,但经 UV 照射或 2%多聚甲醛短暂固定后,脾脏成为最主要的定植场所,其次是肝脏,在肺脏的定植显著降低。这一变化说明,异种单个核细胞在肺血管内定植所依赖的分子是对紫外线和多聚甲醛敏感的。与此相反,紫外线照射和多聚甲醛固定反而增加了异种单个核细胞对脾和肝脏血管内皮的粘附。既往研究表明,UV 照射对 ICAM-1 的表达具有双重性,即通过 IL-1 促进 ICMA-1 表达增强,又可通过 DNA 的损伤作用,使 ICMA-1 以后的表达降低[3]。本实验在 UV 照射后即刻输入,说明肺脏对单个核细胞的扣押可能不主要取决 ICAM-1/ LFA-1。此外,多聚甲醛的固定是细胞膜表面的分子运动受抑制[4],这种分子运动的受限使肺脏不能有效粘附异种单个核细胞,而脾脏和肝脏几乎不受此影响。提示不同脏器血管内皮细胞对扣押异种细胞的机制可能有所不同。

有趣的是,既往的研究表明,肝脏在免疫耐受诱导中可能起到相当重要的作用,脾脏是体内最大的淋巴器官之一,而骨髓是除胸腺外的另一主要中枢淋巴组织。因此,细胞疫苗若能通过外周血管途径抵达这些重要的淋巴组织,传递必要的信息,那么,用细胞疫苗诱导免疫耐受是完全可能的,我们的实验为此提供了理论基础。

结论,异种单个核细胞在体内主要定植于肺、肝、脾和骨髓,此定植具有一定的组织器官特异性;各脏器对扣押异种单个核细胞的机制可能不同。

参考文献

[1] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 153—176.
[2] 夏宗勤. 实验核医学与核药学[M]. 上海:同济大学出版社, 1989. 168—267.
[3] Krutmann J, Gerwe M. Involvement of cytokine, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression[J]. J Invest Dermatol, 1995, 105(Suppl 1):675—705.
[4] McCormick C J, Craig A, Roberts D, *et al*. Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of plasmodium falciparum-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells[J]. J Clin Invest, 1997, 100(10):2521—2529.

(编辑 张大春)

文章编号: 1000-5404(2000)01-0007-01

经验与短篇

特发性血小板减少性紫癜患者血清促血小板生成素水平测定

Serum levels of thrombopoietin in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura

宫立众[1], 张茂宏[2], 徐从高[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院血液内科, 重庆 400038; [2] 山东医科大学附属医院血液病研究室, 济南 250012)

促血小板生成素 (TPO) 具有促进巨核细胞增殖和血小板生成的作用。为了探讨 TPO 在特发性血小板减少性紫癜(ITP)发病中的作用和用于治疗 ITP 患者的可能性,我们检测了 30 例 ITP 患者血清 TPO 水平,现报道如下。

作者简介: 宫立众(1967. 7), 男, 河北省巨鹿县人, 博士, 讲师, 主治医师, 主要从事造血干细胞移植难治血液病治疗方面的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023)68755395

收稿日期: 1999-02-08; 修回日期: 1999-09-20

1 材料与方法

1.1 临床资料

30 例 ITP 患者均符合诊断标准[1]。男 6 例,女 24 例,平均年龄 29.7 岁(17~71 岁)。30 例正常对照为平均年龄 30.2 岁(16~65 岁),男 6 例,女 24 例,为一个月内未服用药物,无家族及血液系统疾病史的正常查体者。

(下转 11 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net