DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.06.028

技术与方法

两种方法对血管内皮细胞回收率影响的比较*

杨映波 王正国 (第三军医大学大坪医院创伤急救科) 630042

本文比较了明胶沉降法和 Percoll 密度梯度一步分离法对血管内皮细胞(VEC)回收率的影响,以探寻更加适合于从外周血中获取有活力 VEC 的实验方法。

1 材料与方法

取健康胎儿脐带 20 根,以酶消化法常规获取人脐静脉 EC。将 EC 浓度调至 1.4×10^5/ml。实验分为两组:(1) 明胶沉降组(A 组):取 EC 液 3.0ml,加入 3%明胶液 1.0ml。室温静置 30min 后,分别于从上至下的 0.5ml、2.0ml 处和底部采液 0.5ml,混匀后计数。(2)Percoll 分离组(B 组):取 EC 液 3.0ml,从其底部加入 Percoll 液(密度为 1.050)1.0ml。离心(400×g,30min)后,分别从上层、Percoll 交界面和底部取液 0.5ml,混匀后计数。每一标本计数 3 次,取其平均值作为细胞数。在明胶沉降组中,将上、中层 EC 之和作为回收细胞数,将下层 EC 作为丢失细胞数;在 Percoll 分离组中,以中层 EC 为回收细胞数,而将上、下层细胞数之和作为丢失细胞数。由此分别求得两组的细胞回收率和丢失率。

2 结果

明胶沉降 30min 后,下层 EC 数明显高于上、中层($P<0.01$);Percoll 密度梯度一步分离后,中层 EC 数明显高于上、下层($P<0.01$)。A 组的细胞丢失率明显高于 B 组($P<0.01$);B 组的细胞回收率明显高于 A 组($P<0.01$,附表)。

附表 两种方法对 VEC 回收率的影响

组别	例数	上层 EC	中层 EC	下层 EC	EC 总数	回收 EC 数	丢失 EC 数	回收率(%)	丢失率(%)
A 组	10	9.1±2.3	12.5±5.5	32.8±5.7**	54.4±12.7	21.6±6.9	32.8±5.7△△	39.7±0.04	60.3±0.04△△
B 组	10	5.8±3.2	48.2±5.7**	3.4±1.9	57.4±7.7	48.2±5.7△△	9.2±4.0	84.0±0.06△△	16.0±0.05

注:** 表示该值与同组内的另外两层 EC 数相比有非常显著差异($P<0.01$)。
△△ 表示该值与另组的对应值相比有非常显著差异($P<0.01$)。

3 讨论

Percoll 是一种新型梯度介质。其粘度较低,易形成等渗状态,对细胞无毒。尤其适合于细胞分离。有关 VEC 分离的实验方法中多采用一定密度的 Percoll 溶液。

最近,Samaden 等[1]采用彩色密度标记珠直观地测得 VEC 的密度为 1.050,并采用这个密度的 Percoll 分离液成功地从病人外周血中分离出了可供体外培养的有活力的 VEC。

但是,这一实验方法尚有待改进。因其需血量大(30ml);采血前需造成病人前臂损伤;而且成功率不高。这些都是在临床推广应用中的障碍。

明胶沉降红细胞是 Samaden 实验方法中的组成部份之一。最近有研究提示,明胶沉降

* 国家自然科学基金资助课题

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

可能降低白细胞的回收率[2]。但明胶沉降是否也会降低 VEC 的回收率，目前尚未见文献报道。

本文以人脐静脉 EC 为材料，比较了明胶沉降法和 Percoll 密度梯度一步分离法对 EC 回收率的影响。实验结果表明：明胶沉降组的 EC 回收率为 39.7±0.04%，而 Percoll 分离组的回收率为 84.0±0.06%。此结果提示，采用 Percoll 密度梯度一步分离法可能更加适合于外周血中分离有生长活力的 EC。

关键词 细胞分离；人脐静脉内皮细胞；明胶沉降法；Percoll 密度梯度一步分离法

参考文献

1. Samaden A, Piovella F, Almasio P, et al. Isolation and growth of human endothelial cells from peripheral blood by PVP-silica density gradients. Boll Soc It Biol Sper, 1985; 61: 957
2. Segal AW, Fortunato A, Herd T. A rapid singal centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and monohuclear cells on continuous density gradients of Percoll. J Immuno Meth, 1980; 32: 209

（收稿：1992-04-09；修回：1992-06-28）

用 BPV-1 抗血清对尖锐湿疣的检测

叶庆偷 唐书谦 钟白玉 （第三军医大学西南医院皮肤科）630038

乳头瘤病毒广泛分布于自然界，它们有高度的种特异性，可引起人和多种动物的良性上皮瘤（疣或乳头状瘤）[1]。临床上由于某些生殖器疣如宫颈扁平型尖锐湿疣表现不典型[2]，常需作病原学检查来证实，一般多用人乳头瘤病毒（HPV）抗血清作免疫组化染色。为观察牛乳头瘤病毒（BPV）抗血清的效果，我们用 ABC 技术检测了尖锐湿疣等免疫组化学反应，现报道如下：

1 材料与方法

尖锐湿疣 44 例，为近 1 年的门诊患者，另取临床及病理确诊的寻常疣 16 例、脂溢性角化 11 例的保存蜡块作对照。均为 Bouin 液固定，常规石蜡包埋，作 4μm 切片，脱蜡至水。经含 3%过氧化氢的甲醇去除内源酶，1∶20 正常羊血清处理以消除非特异性反应。加 1∶100 兔抗 BPV 血清（BPV-1，DAKO）4℃过夜，加生物素标记的羊抗兔血清 37℃ 40min，再加 AB 复合物 37℃ 30min，DAB 显色，苏木素复染胞核，脱水透明，树胶封片后镜检。BPV 阳性者即表示该处有乳头瘤病毒存在，表现为核内有棕色颗粒状沉淀物[3]。

2 结果

尖锐湿疣 44 例，BPV 阳性 24 例（54.5%），寻常疣 16 例，阳性 11 例（68.8%），脂溢性角化 11 例均为阴性。BPV 染色阳性的胞核均位于表皮上 1/3，成群集聚，多在凹空细胞中。

3 讨论

乳头多瘤空泡病毒科（Papovaviridae）由乳头瘤病毒属与多瘤病毒属所组成，每属有它本身的共同抗原，用该抗原制备的抗血清，只对该属病毒特异性地发生反应[4]。通常所用的 HPV 抗血清是用人跖疣病毒免疫兔所制备的，用直接免疫荧光和 PAP 或 ABC 免疫组化染色，可同其他种属动物的乳头瘤病毒起阳性交叉反应，而不与人多瘤病毒 BK、鼠多瘤病毒及猴病毒 SV-40 起反应[1]。国外报道用 HPV 抗血清免疫组化染色，检测尖锐湿疣，阳

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