

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)14-1324-02

## 游离血红蛋白抑制淋巴细胞转化功能的研究

骆 群<sup>1</sup>, 张献清<sup>2</sup>, 刘景汉<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 解放军总医院输血科, 北京 100853, <sup>2</sup> 第四军医大学西京医院输血科, 陕西 西安 710033 )

## Immunosuppressive effect of free hemoglobin on lymphocyte transformation function

LUO Qun<sup>1</sup>, ZHANG Xian-Qing<sup>2</sup>, LIU Jing-Han<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Blood Transfusion, PLA General Hospital, Beijing 100853, <sup>2</sup>Department of Blood Transfusion, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To study the immunosuppressive effect of free hemoglobin on lymphocyte transformation function. METHODS: Using two-way mixed lymphocyte reaction (MLR), cell culture and incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR), we added free hemoglobin (FHb) at different concentrations to the reaction system and raised the concentration of antigen presentation cells (APC) with normal APC concentration MLR as negative control and cyclosporin-A (CsA) as positive control. The ratio of the above factors in suppressing MLR was calculated. RESULTS: The suppressive effect of FHb increased with its concentration. When the concentration of APC in the system was twice that of the normal, the suppressive effect of free hemoglobin became weaker. CONCLUSION: Free hemoglobin may suppress MLR by disturbing the APC function. We can use this method to study the immunomodulation of large volume blood transfusion.

**【Keywords】** lymphocyte culture test, mixed; hemoglobins; antigen-presenting cells

**【摘要】** 目的: 研究游离血红蛋白(FHb)对淋巴细胞转化的抑制作用。方法: 利用双向混合淋巴细胞反应(MLR)技术、细胞培养技术、及<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶(<sup>3</sup>H-TdR)掺入法, 将FHb按不同浓度比例加入MLR体系, 及增加抗原呈递细胞(APC)浓度, 以正常APC外周血单个核细胞(PBMC)的MLR为阴性对照, 以环孢菌素A为阳性对照, 计算上述因素对MLR的抑制率。结果: 随着FHb浓度的增加, 其抑制MLR的作用增强( $P < 0.01$ )。两倍APC情况下可以明显减弱FHb对MLR的抑制作用( $P < 0.05$ )。结论: FHb可通过干扰APC的呈递功能而抑制MLR, 可以应用此方法来解释及证实大剂量输血致受者外周血的FHb增加从而对机体产生的免疫调节作用。

**【关键词】** 淋巴细胞培养试验 混合 血红蛋白类 抗原呈递细胞

**【中图分类号】** R457.1 **【文献标识码】** A

收稿日期 2005-02-28; 修回日期 2005-04-30

作者简介 骆 群(1967-)男(汉族)安徽省合肥市人, 博士生(导师刘景汉)。Tel. (010) 69639434 Email. luqun@public.bta.net.cn

## 0 引言

输血可延长患者移植肾的存活期<sup>[1]</sup>, 也可增加肿瘤患者术后肿瘤复发及外科手术患者的术后感染率<sup>[2,3]</sup>。输注红细胞制品尤其是库存时间较长者在受血后游离血红蛋白含量增高<sup>[4]</sup>, 游离血红蛋白是否会对机体的免疫状态产生影响尚无报道。我们利用在混合淋巴细胞反应体系中加入游离血红蛋白, 并改变APC细胞的数量, 研究其对淋巴细胞的转化增殖的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人淋巴细胞分离液, 密度为  $1.077 \pm 0.002$  (Amersham Biosciences 公司); 96孔培养板 (Cellstar 公司); RPMI 1640 培养基 (Gibco 公司); 健康献血者外周血 12 人份 (6 对), 每份 20 mL, 10 g/L 游离血红蛋白, 利用低渗或加热煮沸方法获得; 人 AB 血清, 选择多人份 AB 血型全血, 经按正常血清制备方法获得; <sup>3</sup>H-TdR (北京原子能研究院); 环孢菌素 A (CsA, 瑞士 Novartis 医药公司); 5417R 型高速台式冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司生产; 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, Forma 公司生产; 1450 型液闪仪, 美国 MICROBETA 公司生产。

**1.2 方法** 按文献[5]方法进行, 取 6 对 O 型经枸橼酸钠-枸橼酸-葡萄糖(ACD)抗凝外周血 20 mL, 分别用无菌生理盐水等体积稀释。先向试管中加入人淋巴细胞分离液, 再沿试管壁轻轻滴加稀释后的人外周血, 二者比例约为 1:2 (V/V), 以 2000 r/min 离心 20 min, 吸取中间的白膜层, 即外周血单个核细胞 (PBMC) 层, 放于无菌生理盐水中洗涤, 以 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀打匀, 用无菌生理盐水洗涤。再次以 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀重悬于含 100 mL/L 人 AB 型血清的 RPMI 1640 培养基中, 留取部分密度为  $1 \times 10^9$ /L 的 PBMC 样本, 而大部分制成浓度为  $2 \times 10^9$ /L 的 PBMC 细胞加入 RPMI 1640 培养基中, 置 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37°C 细胞培养箱培养 1 h。取上层细胞制成去 APC 的浓度为  $1 \times 10^9$ /L 的 PBMC, 加入含 100 mL/L AB 血清的 RPMI 1640 培养基中, 用培养基将下层贴壁细胞轻轻吹打下来,

制成含 2 倍 APC 的密度为  $1 \times 10^9/L$  的 PBMC, 置于 100 mL/L AB 型血清的 RPMI1640 培养基中。将两人份 PBMC 混合后接种于 96 孔 U 型培养板, 每孔加入 100  $\mu$ L, Fhb 组分别使每孔浓度达到 2, 4, 8 g/L。阳性对照孔加入 CsA 终浓度为 100 nmol/L。置 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37°C 细胞培养箱培养 6 d。培养结束后, 掺入 <sup>3</sup>H-TdR 37 kBq/孔, 继续培养 12 ~ 16 h, 将细胞收集到纤维素膜上, 晾干后加闪烁液, 测定  $\gamma$  射线强度 (cpm)。加样孔的排列如下 (每组 3 个复孔): 以正常 APC 的一对 PBMC 的 MLR 为阴性对照组, CsA 组为阳性对照 (正常 APC), 实验组为血红蛋白组, 浓度分别为 1, 2, 4, 8 g/L, 同样分组方法将 APC 增加到 2 倍, 另将去除 APC 的两人份 PBMC 加入同一孔反应, 同时培养并检测。抑制率  $(1 - \text{cpm 实验}/\text{cpm 未抑制}) \times 100\%$ 。

统计学处理: 采用 SPSS8.0 软件分析, 组内采用方差分析, 各 Fhb 组组间进行成对 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 APC 对双向混合淋巴细胞反应的影响** APC 组和 2 倍 APC 组 CsA 阳性对照抑制率 (%) 分别为  $98.6 \pm 9.4$  和  $98.2 \pm 10.2$ , 对照组正常 APC 组 cpm 值为 10430, 2 倍 APC 组 cpm 值为 16609, 反应良好, 增加 APC 数量, 双向淋巴细胞反应性增强; 未加 APC 组 cpm 值为 1009, 说明在无 APC 存在的情况下, 双方淋巴细胞彼此无反应性。

**2.2 Fhb 对双向混合淋巴细胞反应的影响** 正常 APC 与 2 倍 APC 两大组中, 组内差异有显著性意义, Fhb 浓度为 4 g/L 组与 1 g/L 组的抑制率相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 8 g/L 组与 1 g/L 组的抑制率相比有十分显著的差异 ( $P < 0.01$ )。组间 Fhb 浓度为 8 g/L 时 2 倍 APC 组当与正常 APC 组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ )。说明随 Fhb 浓度的增加, 其对混合淋巴细胞反应的抑制作用增强 (Tab 1)。

表 1 游离血红蛋白对双向混合淋巴细胞反应的抑制率

Tab 1 Effect of Fhb on suppression rate of two-way MLR

(n = 6, %, $\bar{x} \pm s$ )		
Fhb (g/L)	Normal APC	Twice APC
1	7.8 ± 5.3	5.3 ± 4.7
2	21.1 ± 6.5	16.4 ± 6.1
4	42.3 ± 8.9 <sup>a</sup>	36.1 ± 11.1 <sup>a</sup>
8	56.8 ± 12.3 <sup>b</sup>	45.1 ± 13.6 <sup>bc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 1 g/L; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs normal APC.

## 3 讨论

在双向混合淋巴细胞反应体系中, 从外周血分离的单个核细胞中含有 3% ~ 5% 的单核细胞, 具有抗原提呈功能, 称为 APC, 递呈与自身 MHCII 类分子结合的异体抗原完成双识别, 刺激 CD4 + 细胞, 诱导其增殖并分泌 IL-2 等细胞因子, 通过自身反馈作用不断增殖, 诱导 CD8 + 细胞活化并发生增殖, 由于 T 细胞的增殖时可以利用 <sup>3</sup>H 标记的胸腺嘧啶, 从而可以了解 T 细胞转化功能及免疫状态。无 APC 的混合淋巴细胞反应很弱, 说明在没有 APC 的提呈抗原时, T 淋巴细胞无增殖, 而两倍 APC 的淋巴细胞增殖反应的 cpm 值是正常 APC 的 1.6 倍。加入 Fhb 后, 由于其可被 APC 吞噬清除, 削弱提呈对方淋巴细胞不同于己方某种抗原的能力, 因此此体系中加入 Fhb 势必减弱 APC 的正常提呈功能。随着 Fhb 浓度的加大, APC 提呈功能被抑制, 淋巴细胞转化率下降达 50%。此时如将 APC 细胞数加到两倍, Fhb 对混合淋巴细胞反应的抑制率下降, 说明两倍 APC 可以明显减弱 Fhb 对混合淋巴细胞反应的抑制作用, Fhb 确实干扰了 APC 的提呈功能而影响淋巴细胞的反应性。从临床输血的实践看, 库存血上清液的 Fhb 质控标准为不超过血液总血红蛋白的 1%, 约 < 2 g/L。无论自体或异体血液, 由于外周血红细胞含有各胞龄的红细胞, 随着保存期的延长其中衰老红细胞会破裂溶血, 从而超过机体利用结合珠蛋白清除 Fhb 的能力<sup>[4]</sup>, 血浆中势必存在过剩的 Fhb。我们的实验研究表明, Fhb 会明显影响 APC 的提呈功能, 抑制淋巴细胞的转化功能, 从而导致 CD8 + 细胞的杀伤功能受到明显的抑制, 机体特异性的抗肿瘤能力及抗感染能力下降。而新鲜血由于保存期短对受者的免疫抑制作用较小。

## 【参考文献】

- [1] Jovicic-Pavlovic S, Lezaic V, Simic S, et al. Effect of donor-specific blood transfusion on the outcome of kidney transplantation [J]. *Srp Arh Celok Lek*, 2003, 131(11-12): 449-453.
- [2] Rui JA, Zhou L, Liu FD, et al. Major hepatectomy without blood transfusion: Report of 51 cases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004; 117(5): 673-676.
- [3] Vamvakas EC, Blajchman MA. Prestorage versus poststorage white cell reduction for the prevention of the deleterious immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusion [J]. *Transfus Med Rev*, 2000, 14(1): 23-33.
- [4] Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing [J]. *Transfus Med Rev*, 2002, 16(1): 46-60.
- [5] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 第 2 版, 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 398-400.