



细胞免疫学检测

讲课教师 季育华

<http://www.shsmu.edu.cn/>



1

免疫细胞分离技术

2

免疫细胞表面标志检测技术

3

免疫细胞功能检测技术

4

细胞因子与黏附分子检测技术



上海交通大学医学院



第一节 免疫细胞分离技术



上海交通大学医学院



人外周血(peripheral blood)白细胞分离

❖ 一、原理(principle):

红细胞/白细胞比例不同(600~1000): 1, 密度不同, 沉降速度不同。

❖ 二、方法(method):

1、自然沉降法

(直立静置RT30~60min, 紧贴红细胞层上的白膜层)

2、聚合物加速沉降法

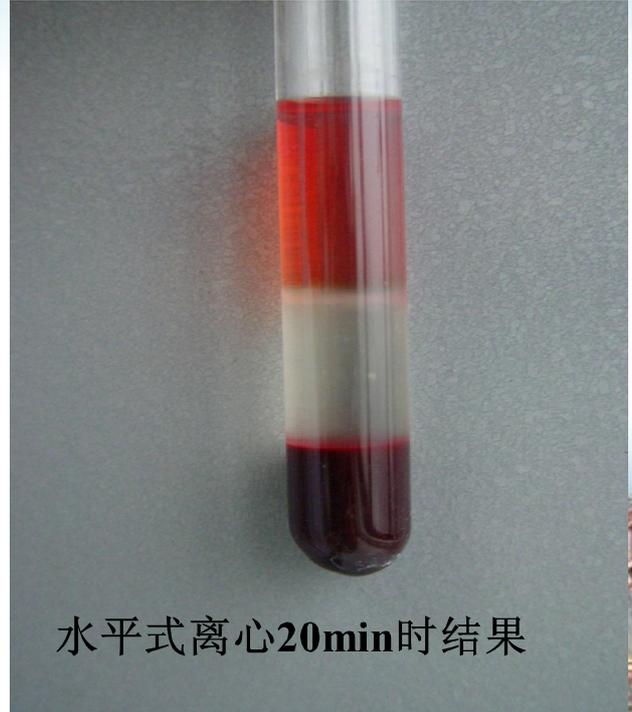
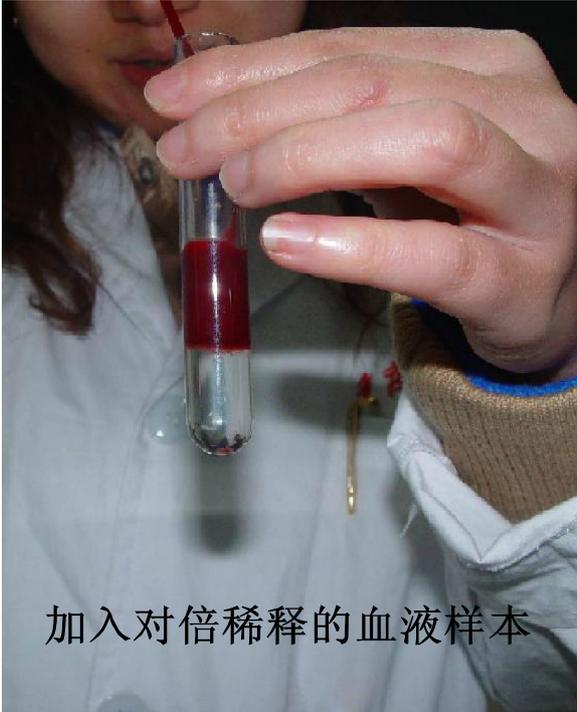
(加某些高分子物使RBC凝集成串加速沉降, 如明胶)



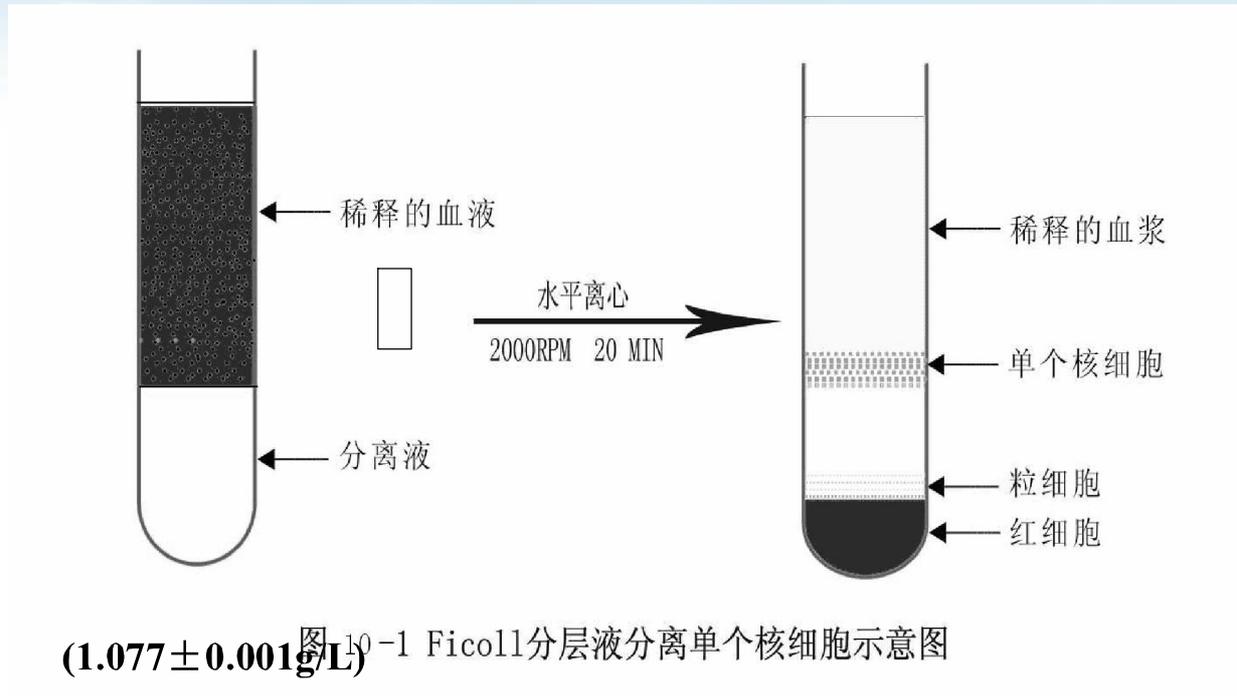
上海交通大学医学院



人外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 的分离



聚蔗糖-泛影葡胺(ficoll-hypaque)



- 分离人外周血淋巴细胞以密度为 $1.077 \pm 0.001 \text{g/L}$

Percoll混悬液(处理过的硅胶颗粒)

原液密度(density)为
1.135g/L+等量PBS, 高速离心
(centrifugation)

由下而上的逐减的连续密度梯
度(density gradient)

淋巴细胞纯度98%, 单核细胞
纯度78%

流程长, 步骤繁, 成本高

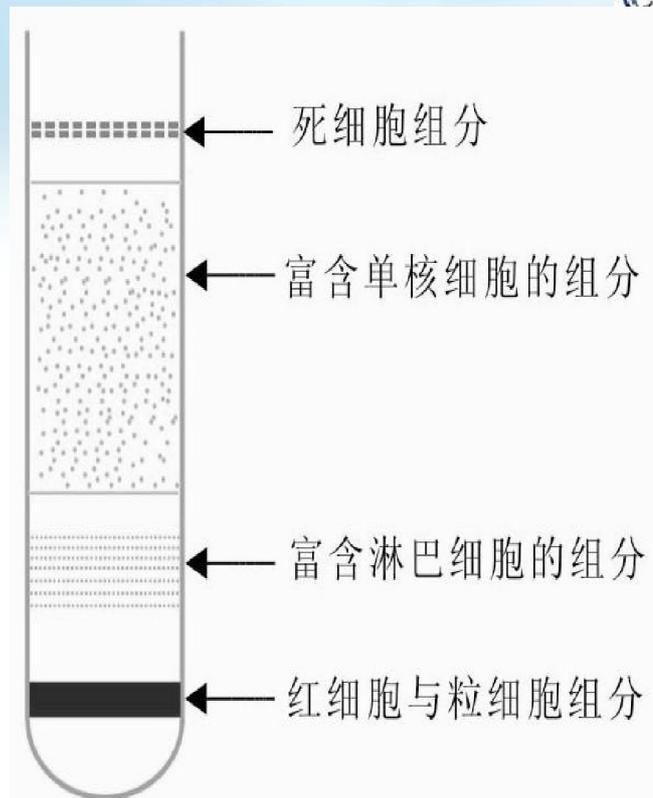


图 10-2 Percoll分层液
分离单个核细胞示意图



人外周血淋巴细胞(亚群)的分纯(purification)

- ❖ 人外周血单个核细胞（**PBMC**）主含淋巴细胞, 但混有单核细胞、粒细胞、红细胞和血小板等。淋巴细胞的分纯：
 - （一）红细胞的去除（**0.83%**氯化铵、蒸馏水）
 - （二）血小板的去除（离心、洗涤）
 - （三）单核、粒细胞的去除（黏附去除，羧基铁粉吞噬）
 - （四）淋巴细胞亚群的分离★



上海交通大学医学院



淋巴细胞亚群的分离

❖ 分离依据:

- 1、淋巴细胞不同亚群其细胞表面标志 (specific membrane molecule/surface marker)
- 2、淋巴细胞不同亚群其细胞分化抗原 (antigen of cluster differentiation ; CD)

❖ 分离方法:

❖ 1、

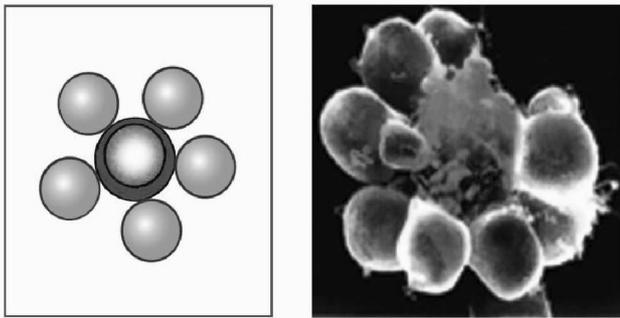


图10-4 E花环试验结果示意图



上海交通大学医学院



Precipitation of E rosette

- ❖ Erythrocyte Rosette forming cell; ERFC

The surface of T lymphocyte contains the receptor (CD₂) of sheep erythrocyte, which is called E receptor for short. T lymphocytes can form E rosette with sheep erythrocytes by its E receptor.

- ❖ Lymphocytes + SRBC, centrifugation-----

T lymphocytes(底) / B lymphocytes (界面)



上海交通大学医学院

❖ 2、黏着性（理化）：

B淋巴细胞易黏附聚酰胺纤维（尼龙纤维）表面，而T淋巴细胞则不易附着～

（例）尼龙棉柱分离 — 直接流出的是T淋巴细胞。

❖ 3、免疫学：用特异性抗体并使其固相化，捕获具特定膜抗原的细胞～

（例）1、亲和板结合分离

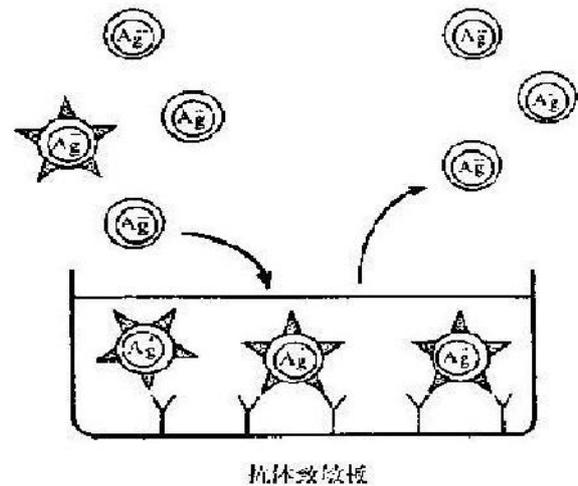
（affinity ～）

2、免疫磁珠分离

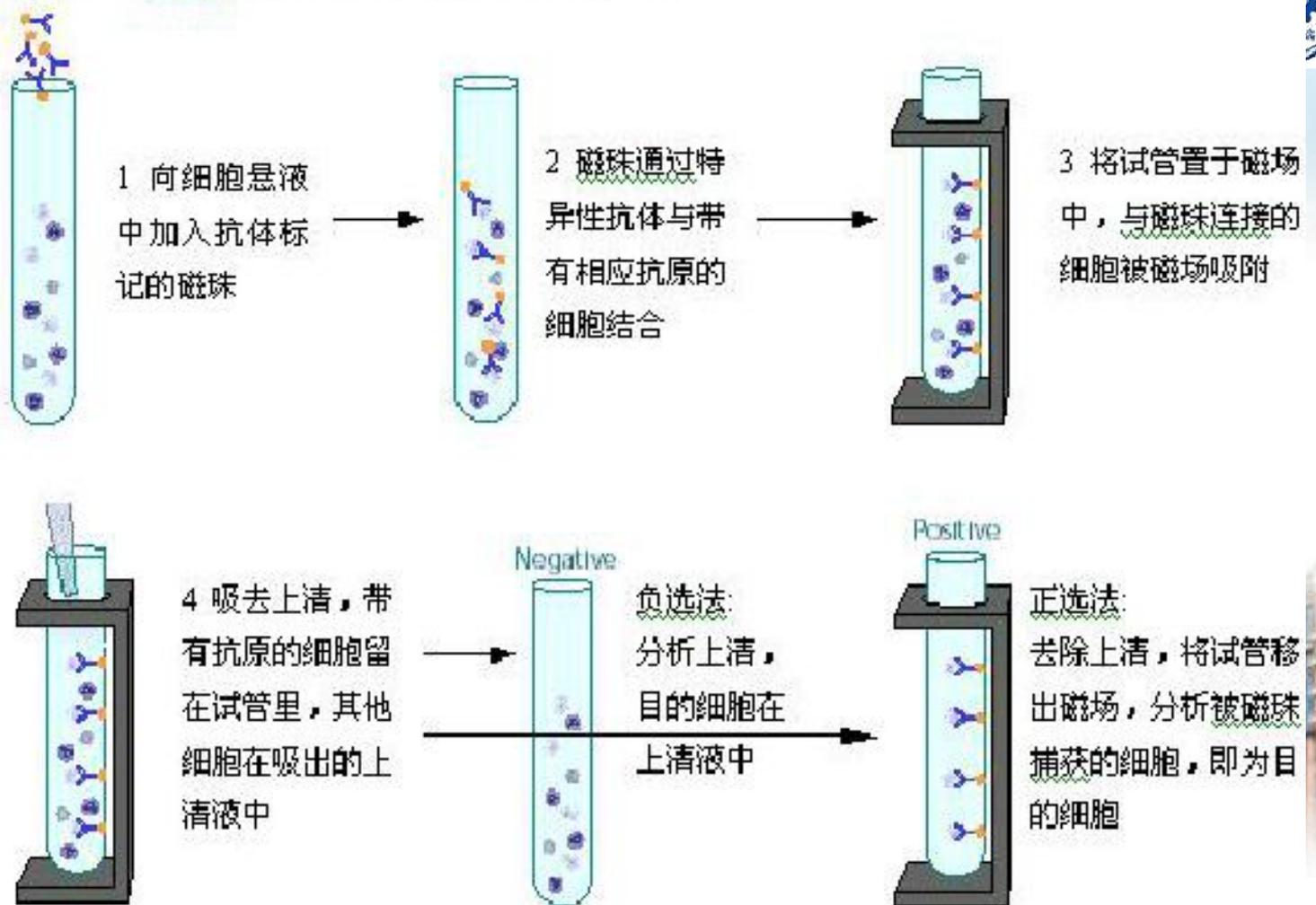
（immunomagnetic beads）

3、流式细胞术分离

（FCM）

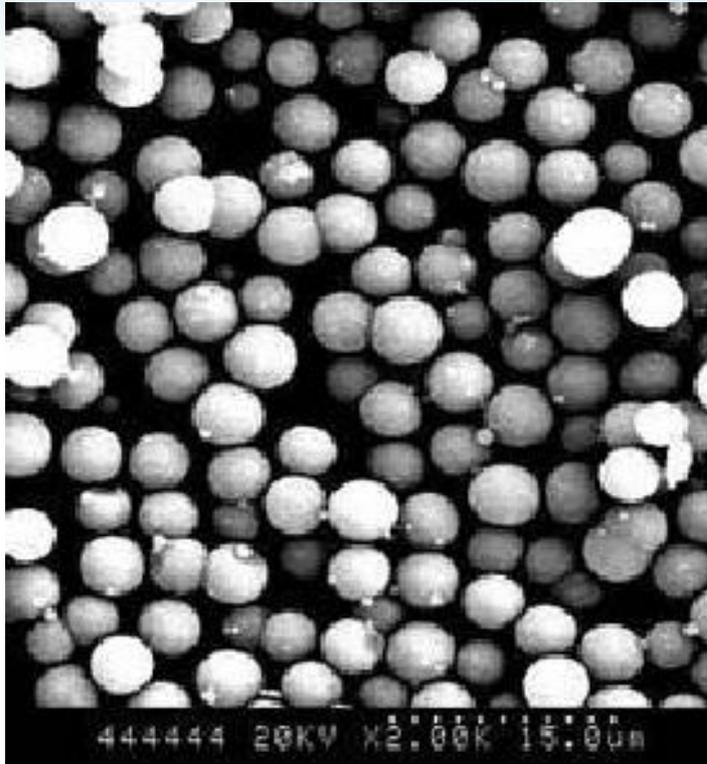


BD™ IMag 细胞分离工作原理. (图 1)





磁性微珠 (magnetic beads):



磁性微珠是以金属离子为核心，
外层均匀包裹高分子聚合体的
固相颗粒。

磁性微珠上既可标记针对某种细
胞表面抗原的特异性抗体（直
接法）；也可标记羊抗鼠IgG抗
体(间接法)，使分离细胞的范
围大大扩大



- ❖ 正选 (positive selection) 法：
磁珠结合的细胞就是所要分离获得的细胞
- ❖ 负选 (negative selection) 法：
磁珠结合不需要的细胞，游离于上清液的细胞为所需细胞
- ❖ 一般而言，负选法比正选法的磁珠用量大



上海交通大学医学院



❖ 评价(evaluation):

- ❖ ①免疫磁珠分离法具有高纯度（80~99%），高得率（90~95%）、高细胞活性（99~100%）的特点，仅次或相当于流式细胞仪（FACS）的分选效率。
- ②与FACS 相比，本方法操作简单、省时、经济；可用做FACS分选前的预分离，以减少FACS所用时间。
- ③另外连续两次过柱分选可进一步提高分选细胞纯度，通常可达95—99%。



上海交通大学医学院



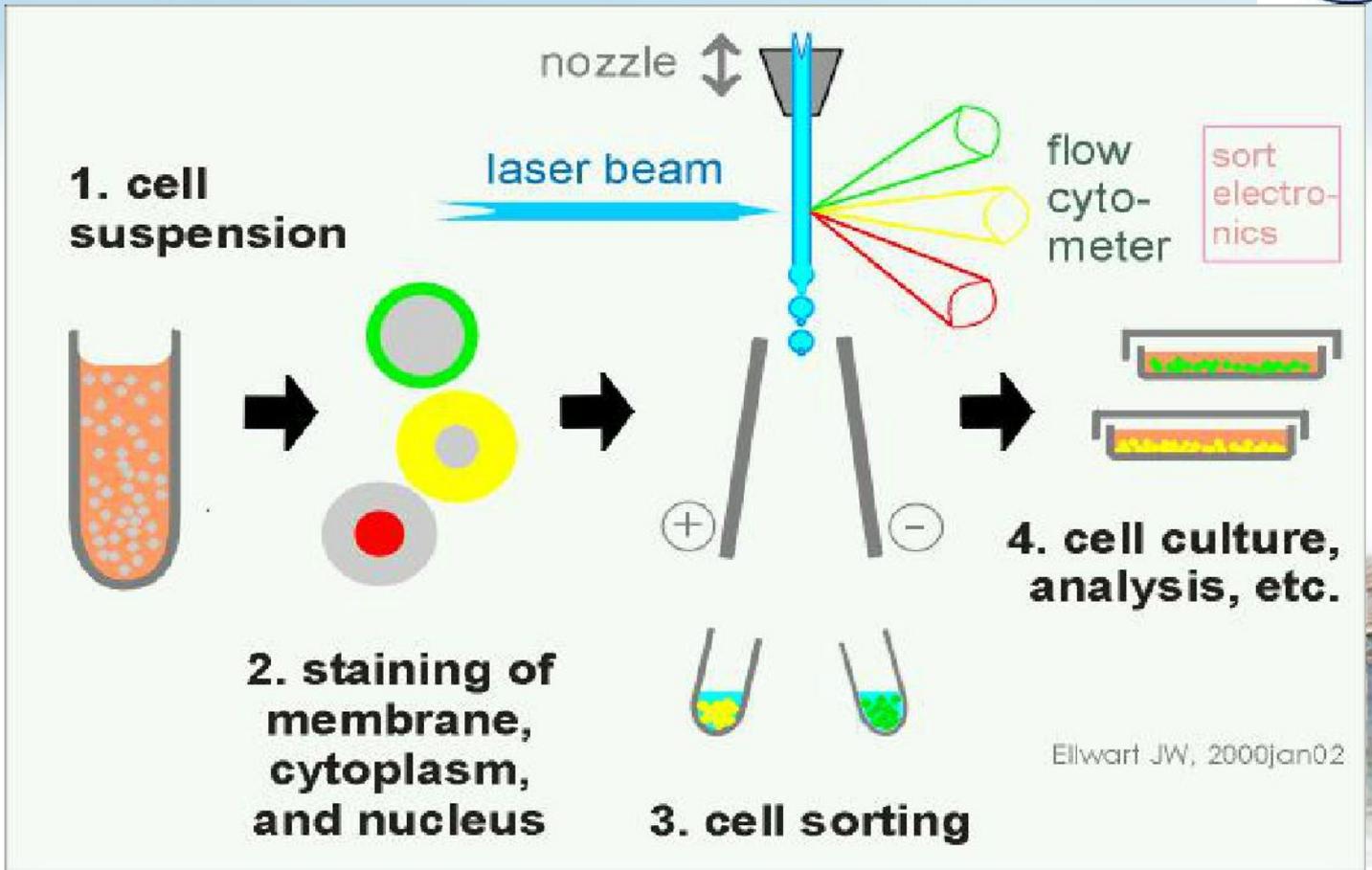
注意事项 (Attentions)

- ❖ 如果分离细胞用作培养，全过程在超净台中完成。
- ❖ 分离柱一般只能一次应用，再用时分离效率降低。
- ❖ 抗体包被磁珠和死细胞常有非特异性结合，因而分选前应去除死细胞；上分离柱前，充分振荡混悬细胞，打散细胞团块。
- ❖ 用分离柱分选，应用真空抽滤水，减少水中气泡，使分离柱不被气泡阻滞



上海交通大学医学院

流式细胞术 (Flow cytometry, FCM)





荧光激活细胞分离仪原理 (principle) (fluorescence activated cell sorter, FACS)

- 细胞经荧光染色后，通过高速流动系统，细胞排成单行，逐个流经检测区。
- 当细胞从流动室喷嘴处流出时，超声振荡搅动液流，使液流断裂成一连串均匀小滴，每小滴内最多含一个细胞（其中只有百分之几的液滴中含细胞）。
- 细胞经激光照射产生荧光和散射光，信号经计算机系统处理，分辨细胞的类型。如识别的是所需的细胞时（如T细胞），使液滴瞬即感应阳电荷、阴电荷或不带电荷，使所需的细胞在电场偏转下进入不同的收集管。



上海交通大学医学院



■ 评价 (evaluation) :

- ①用**FACS**分离细胞准确快速、纯度高、回收率高，能保持细胞活力，并可在无菌条件下进行。
- ②仪器昂贵，极少用于常规，而多数仅作为研究的手段



上海交通大学医学院



吞噬细胞 (phagocytosis) 分离

- ❖ Phagocytes ---- mononuclear ~
macrophage
neutrophil、eosinophil、basophil
- ❖ 分离 (Separation) :
 - Mononuclear ~ 参照Percoll分层液法
 - Macrophage 斑蝥敷贴 (诱发无菌性皮炎)
 - Other ~ 很少分纯



上海交通大学医学院



树突状细胞 (Dendritic cell)

- ❖ Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen presenting cell (APC) known, which have numerous specialized features that make them extremely efficient at capturing and presenting antigen and activating T cells and mediating immune response.

树突细胞是体内功能最强的专职抗原提呈细胞，可将抗原特异性地提呈给T淋巴细胞而产生抗原特异性免疫应答。



上海交通大学医学院



树突状细胞 (Dendritic cell) 制备

- ❖ DCs can be generated, in vitro, from many different samples of human beings.
- ❖ DCs only constitute 0.5~1.0% of the peripheral blood mononuclear cells.
- ❖ DCs can be generated from monocytes/MΦ
+ IL-4 and GM-CSF
- ❖ Identifying DCs by CD marker



上海交通大学医学院



1 免疫细胞分离技术

2 免疫细胞表面标志检测技术

3 免疫细胞功能检测技术

4 细胞因子与黏附分子检测技术



上海交通大学医学院



第三节 免疫细胞功能检测 (Assays for immunocytes)

- 一、功能简介
- 二、测定方法



上海交通大学医学院



T lymphocytes

- ❖ 外周血中T细胞占淋巴细胞总数的**65%~70%**
- ❖ 来源于骨髓干细胞（胚胎期为卵黄囊和胎肝，Bone-marrow stem cells），在胸腺中发育和分化。
- ❖ 分化成熟（be derived）后离开胸腺进入外周免疫器官的胸腺依赖区定居。
- ❖ 淋巴细胞再循环(recycle)（血液—组织—淋巴—血液）



上海交通大学医学院



T细胞亚群 (Subset)

- ❖ 根据TCR不同分为 $\gamma \delta$ T细胞和 $\alpha \beta$ T细胞
- ❖ 根据表面标志和分化抗原的不同, $\alpha \beta$ T可分为CD4⁺和CD8⁺ T细胞
- ❖ CD4⁺ T细胞根据其分泌的细胞因子和介导的功能在分为Th1和Th2
- ❖ CD8⁺ T细胞依据其功能不同分为细胞毒性 (cytotoxicity) T细胞和抑制性 (suppression) T细胞
- ❖ NK 1.1⁺ T细胞专一识别脂类 (lipid) 抗原、非MHC限制



上海交通大学医学院



Type-I /2 T helper (Th1, Th2)

- ❖ Th1细胞主要分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- β ，介导细胞免疫
- ❖ Th2细胞主要分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10，介导体液免疫
- ❖ Th1和Th2是一对重要的调节(regulation)细胞，同时又互为抑制(inhibition)细胞，二类细胞的相互平衡(balance)与否直接影响(influence)机体的免疫功能





T-cytotoxic cells, Tc/CTL (1)

- ❖ CD8⁺T细胞
- ❖ 免疫应答的主要效应(effect)细胞
- ❖ 特异性杀伤靶细胞(target cells)
- ❖ 在肿瘤免疫和抗病毒感染的免疫中发挥重要作用
- ❖ 功能发挥受MHC I类限制



上海交通大学医学院



T_c/CTL (2)

- ❖ 除细胞毒效应外，CTL还可分泌一系列细胞因子，调节 (regulation) 免疫功能；也分泌趋化性 (tend to) 细胞因子如IL-8、IP-10 (IFN inducible protein 10)、MIP-1 (巨噬细胞炎症蛋白) 等，介导炎症反应 (inflammatory reaction)。
- ❖ 依据CTL分泌细胞因子的不同可分为T_c1和T_c2。



上海交通大学医学院



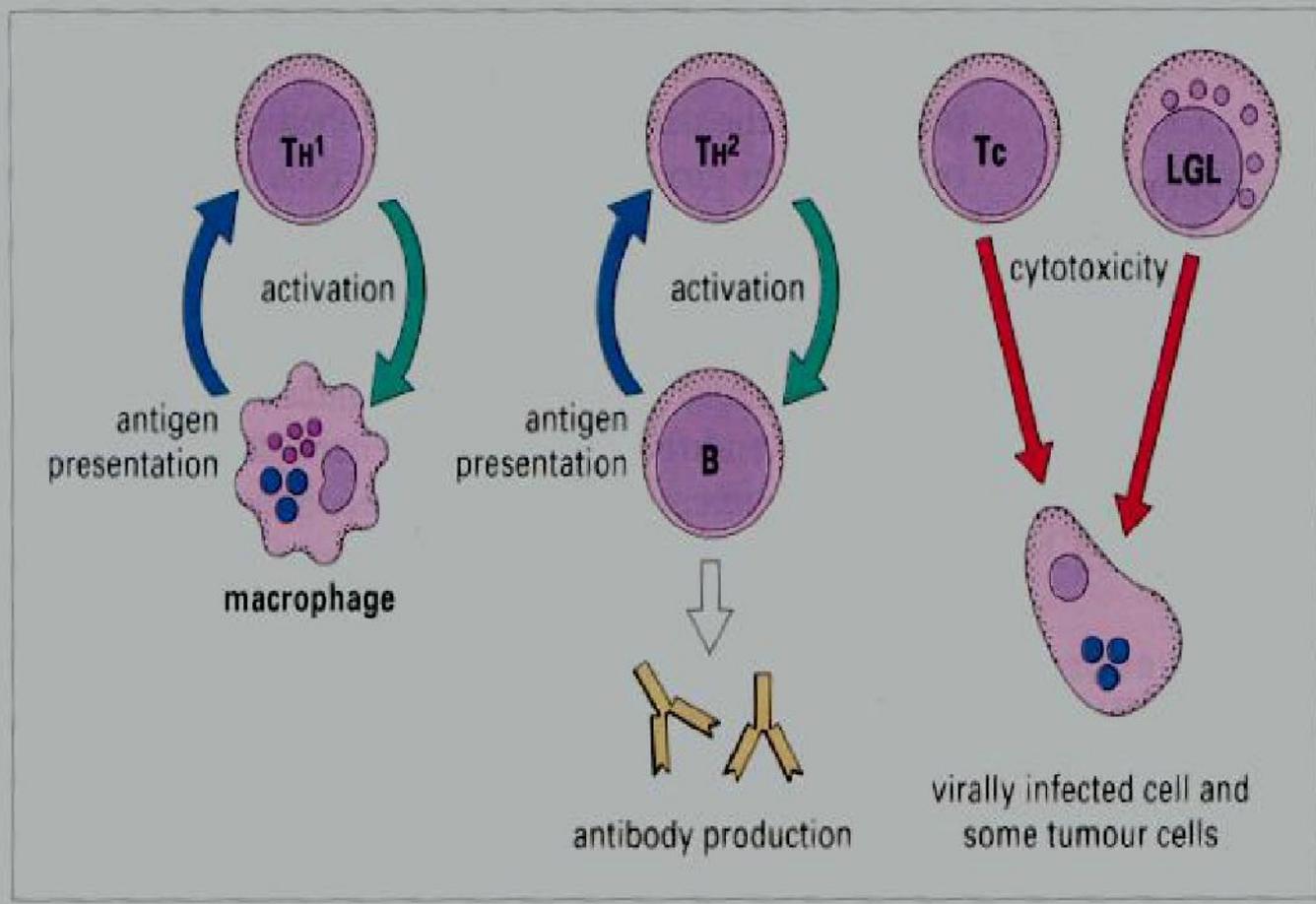
T-suppression cells, Ts

- ❖ 通过过继转移实验 (passive transfer test) 加以确认 (confirm)。
- ❖ 可能 (may be) 作为单独的功能细胞群体存在
- ❖ 多年来未能找到Ts特有 (specific~) 的表面标志 (surface marker)。



上海交通大学医学院

Functions of lymphocytes





B淋巴细胞的分化成熟 (be derived)

骨髓干细胞—前B细胞—未成熟B细胞—成熟B
细胞—激活B细胞—浆细胞 (plasma cells)
经过Ig基因重排、活化、转录最终表达BCR。
(B-cell-receptor complex, BCR)



上海交通大学医学院



前 (pro/pre) B细胞

- ❖ 细胞浆出现 μ 链，并诱导轻链的重排 (rearrange) ；
- ❖ 不表达BCR
- ❖ 不具有任何已知的生物学功能

BCR (B-cell-receptor) :

B-cell surface immunoglobulin and its associated signalling molecules, CD79a and CD79b.



上海交通大学医学院



未成熟 (immature) B细胞

- ❖ μ -替代轻链 (SL) —preBCR —细胞质IgM —膜IgM
- ❖ 膜IgM是B细胞分化成熟中首先出现的BCR，也是未成熟B细胞的表面标志
- ❖ 此时B细胞具有识别 (recognition) 抗原的能力，但还不能介导免疫应答
- ❖ 处于抗原敏感期，受到相应刺激后会导致细胞凋亡 (apoptosis)，是B细胞自身免疫耐受 (immunological tolerance) 的重要机制





成熟 (mature) B细胞

- ❖ 细胞浆和细胞膜都表达IgM和IgD
- ❖ 能识别抗原(recognition of antigen), 介导特异性免疫应答
- ❖ B细胞此时完成在骨髓中的分化和成熟



上海交通大学医学院



活化 (active) B细胞和浆细胞

- ❖ 无抗原刺激时，B细胞在外周免疫器官中仅存活7~10天
- ❖ 当受到抗原刺激时，B细胞可被活化并增殖和分化，进入激活状态
- ❖ 最终向浆细胞分化
- ❖ 浆细胞大量合成和分泌Ig，BCR数量减少



上海交通大学医学院



B细胞亚群 (Subset)

❖ 为异质性群体，显示不同的功能和标志，依据CD5将B细胞分为B1和B2。

(一) B1细胞：

CD5⁺，主要识别非蛋白质抗原，如细菌脂多糖。无须Th细胞辅助，可直接介导对非胸腺依赖抗原的免疫应答，产生特异性抗体为低亲和力，不产生免疫记忆细胞



上海交通大学医学院



(二) B2细胞:

CD5⁻, 主要识别蛋白质抗原

在Th细胞辅助下, 被完全激活并介导对胸腺依赖抗原的免疫应答, 产生特异性抗体



上海交通大学医学院



Other immune cells

- ❖ NK (natural killer) 细胞
- ❖ 单核吞噬 (mononuclear phagocyte) 细胞
- ❖ 粒细胞 (granulocytes)
- ❖ 肥大 (mast) 细胞



上海交通大学医学院



NK细胞

- ❖ 大颗粒淋巴细胞、裸细胞（naked~）
- ❖ 来源于骨髓造血干细胞
- ❖ 参与细胞免疫
- ❖ 在肿瘤免疫、抗病毒感染中起重要作用
- ❖ 细胞表面标志较少：CD2，CD16，CD56，CD69



上海交通大学医学院



mononuclear phagocyte

- ❖ 血液中——单核细胞 (mononuclear ~)
- ❖ 组织中——巨噬细胞 (macrophage, $M\Phi$)
- ❖ 来源于骨髓干细胞，发育成单核细胞后，进入血流分布于各种组织器官，并有不同命名
- ❖ 非特异免疫功能 (non-specific~)
- ❖ 特异性 (specific) 免疫功能 (免疫调节、抗原递呈, antigen-presenting)



上海交通大学医学院



Different denomination Of mononuclear phagocyte

- ❖ Blood — mononuclear cells
- ❖ General tissue — macrophage, $M\Phi$
- ❖ Connective tissue — tissue cells
- ❖ Liver — Kupffer's cell
- ❖ Lung — alveolar cells
- ❖ Skin — Langerhan's cell
- ❖ Nervous system — micro-glia cells
- Abdomen — abdomen(腹腔) $M\Phi$



上海交通大学医学院



Markers of mononuclear phagocyte

- ❖ 成熟的单核吞噬细胞表达MHC I 类和II类分子，协同刺激(co-stimulatory)分子 (CD40、B7)
- ❖ CD1, CD2, CD14, CD64, CD32, CD16, CD23, CD35 (C3b受体) 和CR3 (C3bi受体)



上海交通大学医学院



树突细胞 (Dendritic cell, DC)

- ❖ 由骨髓中髓样前体细胞分化而来，DC成熟经历2个阶段：
 - ❖ 1) 经血流迁徙到外周组织和器官，此时MHC和B7分子的表达水平很低，无功能，但可以吞噬和吞饮抗原
 - ❖ 2) 这些细胞经输入淋巴管进入局部淋巴结，分化为成熟DC，但不再具有吞噬活性。





DC 的组织分布和命名

- ❖ 淋巴样器官：T细胞区（并指状DC）和B细胞区（滤泡DC）
- ❖ 非淋巴样器官：皮肤和黏膜（朗罕细胞）、器官（间质DC）
- ❖ 循环体液：血液（血液DC）、淋巴液（隐蔽细胞）



上海交通大学医学院



DC的生物学功能

- ❖ 向T细胞递呈抗原（CD1, CD40, MHC）
- ❖ 参与天然免疫和T细胞亚群的分化
- ❖ 诱导免疫耐受：淋巴样DC
- ❖ 调节免疫应答（抑制T细胞增殖）
- ❖ 向B细胞递呈抗原（滤泡DC）



上海交通大学医学院



Granulocyte and Mast cells

- ❖ Granulocyte来源于BM (bone marrow) , 参与特异和非特异免疫应答, 在炎症中发挥作用, 主要分布于血液
- ❖ 肥大细胞主要分布于黏膜和结缔组织中 (血液中即嗜碱性粒细胞) , 表达Fc ϵ R, 在IgE作用下发生脱颗粒反应, 参与I型变态反应。
- ❖ 主要标志: MHC, B7, CD40, CD40L



上海交通大学医学院

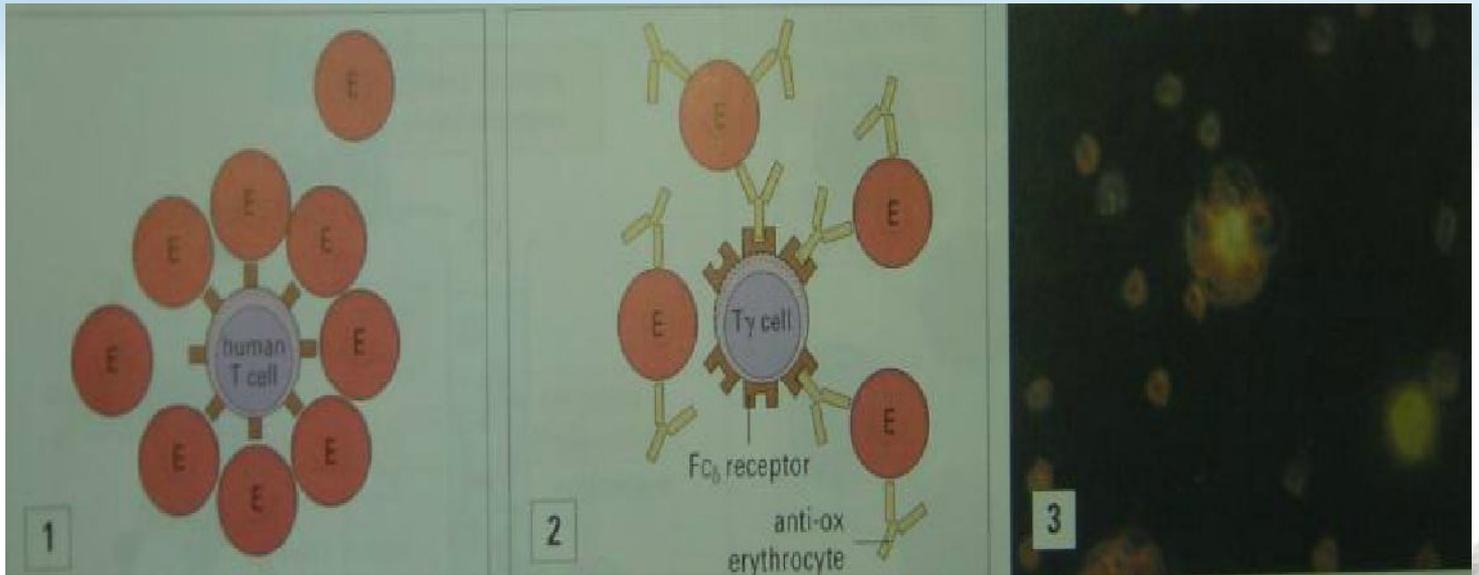


Assay for the surface markers of T lymphocyte

- ❖ T细胞表面标志 (Th, Ts, Ti)
- ❖ 抗体致敏细胞花环(E-rosette)法 (CD58受体)
- ❖ 免疫细胞化学法 (immunochemistry ~)
- ❖ 免疫荧光法 (immunofluorescent ~)
- ❖ T细胞亚群检测 (flow cytometry sorter, FCMS)

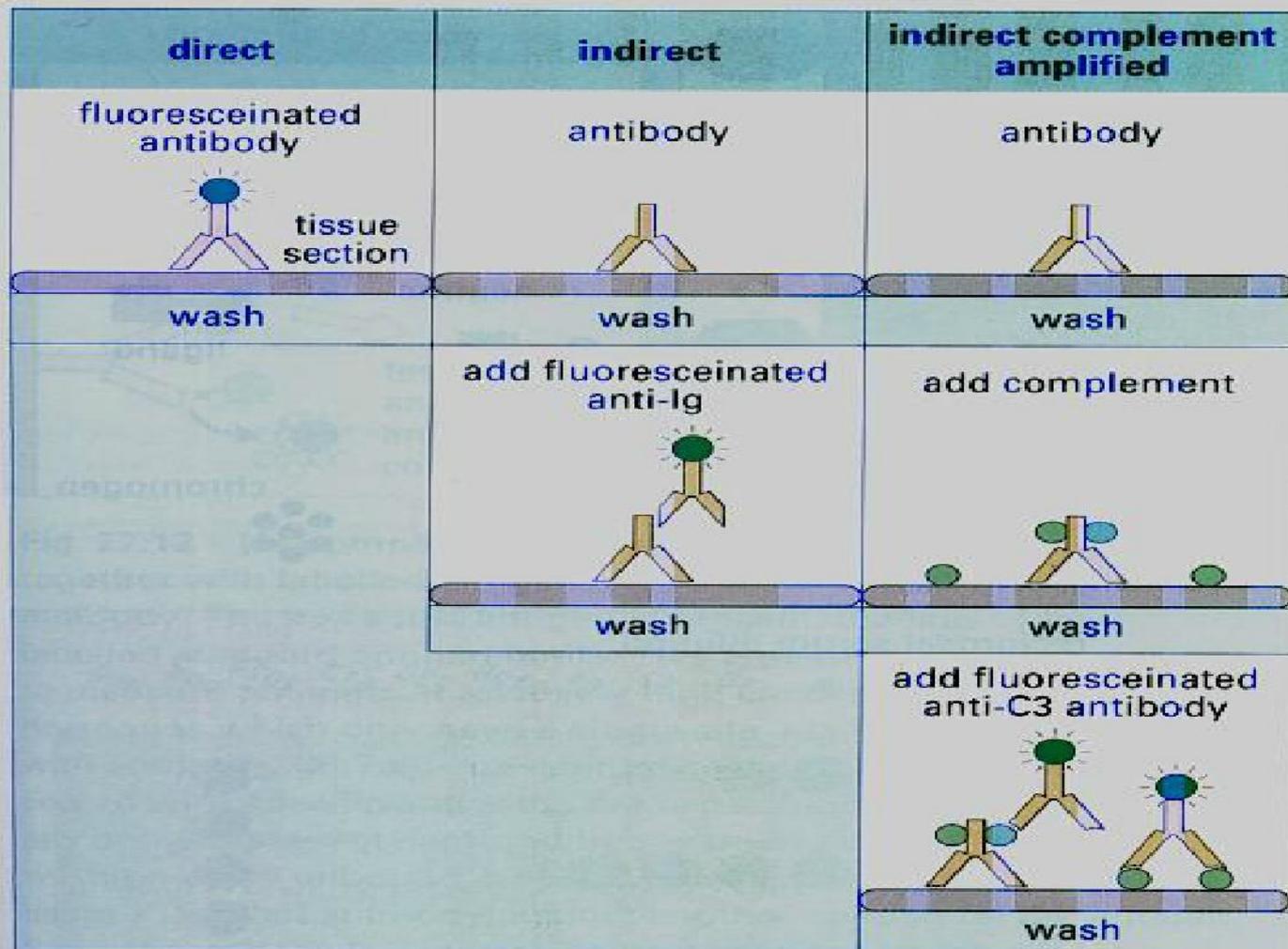


上海交通大学医学院

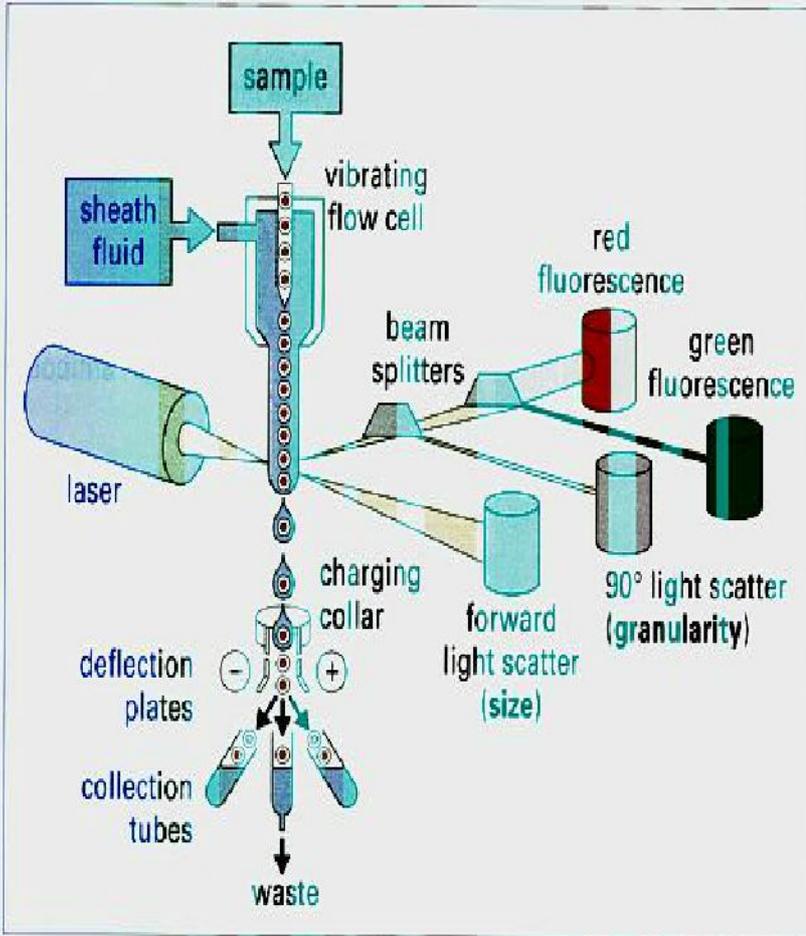


Erythrocyte Rosette forming Cell Test
reference value : Et $64.4 \pm 6.7\%$; Ea 20%~40%

Direct and indirect immunofluorescence



Fluorescence-activated cell sorter (FACS)



reference value:

CD3+T cells 61~ 85%

CD4+T cells)28~58%;

CD8+T cells 19~48%;

CD4+/CD8+ rate
 $1.66 \pm 0.33 (>1)$





Assay for the surface markers of B lymphocyte

- ❖ SmIgM (surface membrane ~)检测
- ❖ Fc受体(receptor)和补体(complement)受体的检测 (EAC花环)
sRBC+溶血素 (EA) +C (补体) -- EAC~
- ❖ B细胞亚群 (CD) 检测 (FACS)



上海交通大学医学院



Assay for the surface markers of NK cells

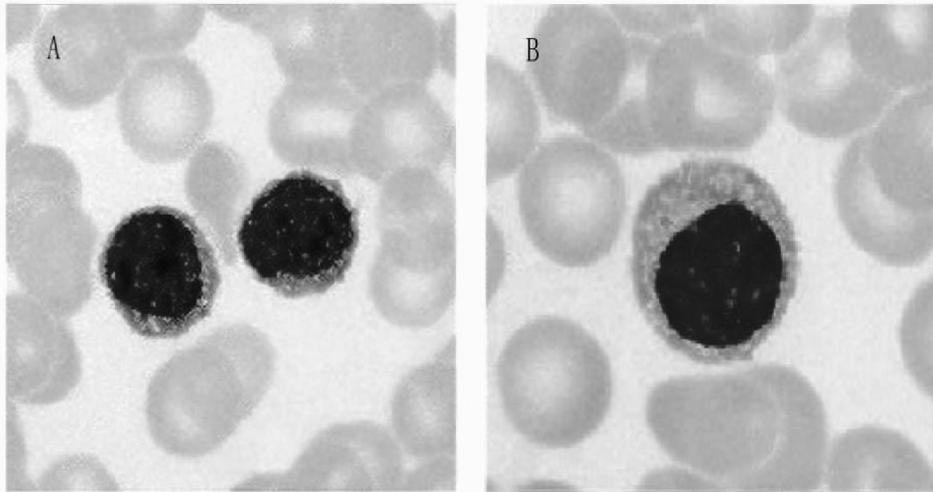
- ❖ Natural Killer (NK) cells express neither T cell nor B cell antigen receptors.
- ❖ CD16 and CD56 molecule are important markers of NK cells.
- ❖ ADCC (抗体依赖细胞毒性)
(antibody-dependent cellular cytotoxicity)



上海交通大学医学院



Assays of Cellular immune Tunction



A: 未转化细胞

B: 转化细胞

图 10-5 淋巴细胞转化的形态特征示意图



Lymphocyte Transformation Test

❖ Principle:

Antigens or mitogens (such as PHA and ConA) are incubated with T lymphocytes in culture medium, allowing stimulation of T lymphocyte activity to transform into lymphoblasts.

- ## ❖ Methods:
- morphologic counting
 - ^3H -thymidine incorporation
 - MTT colorimetry



上海交通大学医学院



❖ Lymphocyte proliferation rate:

Blast cell count

$$= \frac{\text{Blast cell count}}{\text{Small lymphocyte} + \text{Blast cell count}(200)} \times 100\%$$

❖ Reference value: $\sim 70\%$



上海交通大学医学院



^3H -thymidine incorporation

- ❖ ^3H 标记的胸腺嘧啶核苷 (^3H -TdR)+细胞培养液中, 转化淋巴母细胞的DNA合成增加, 增加的DNA中有 ^3H -TdR。检测培养后淋巴细胞内放射性核素量, 通过计算判断淋巴细胞的转化程度(SI)。
- ❖ SI (stimulating index) =
PHA刺激管cpm均值 / 对照管cpm 均值

★ (cpm指每分钟脉冲数)



上海交通大学医学院



MTT colorimetry

- ❖ 一种噻唑盐，化学名3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四唑 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)。
 - ❖ MTT作为细胞内线粒琥珀酸脱氢酶的底物参与反应，形成蓝黑色的甲
潜颗粒沉积于细胞内。
 - + 盐酸异丙醇/二甲亚砜 — 溶细胞，释放 — A570nm测吸光值，以刺
激指数 (SI) 判断淋巴细胞增殖程度。
- SI = 试验孔A570nm均值 / 对照孔A570nm均值



上海交通大学医学院



T cell-mediated cytotoxicity

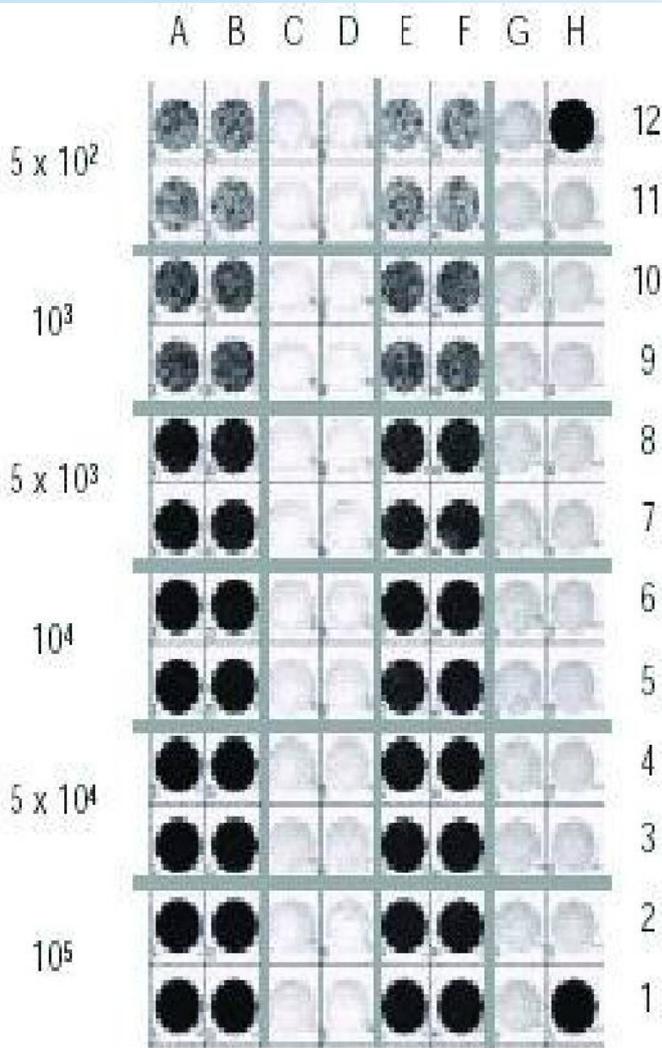
- ❖ T细胞介导的细胞毒性是细胞毒T细胞（CTL）的特性，即致敏的T细胞再次接触同抗原的靶细胞（target cell），可表现出对Target cell的破坏（裂解或凋亡）。
- ❖ Apoptosis is a highly ordered process in which cells are systematically disassembled.
- ❖ Morphology（凋亡小体）
Electrophoresis（DNA梯状图谱）
FACS or ELISA



上海交通大学医学院



PBMCs added per well



❖ A and B: 检测标本
(刺激后的待测细胞)

❖ C and D: 阴性对照

❖ E and F: 特异性对照

❖ G and H: 背景对照

❖ H1 and H12: 阳性对照

检测模式和结果示意图

上海交通大学医学院





Enzyme-linked immune spot, ELISPOT

❖ 酶联免疫斑点法:

用抗原包被固相载体, + (刺激原- 待检细胞)

分泌的抗体-固相抗原结合(使细胞吸附于固相) + 酶标二抗
+底物显色, 镜下计数着色斑点。

应用: 检测抗体分泌细胞和其分泌抗体的量

特点: 稳定、特异; 定性、定量。



上海交通大学医学院



Skin test in vivo

- ❖ 正常机体对某种抗原建立了细胞免疫后，如用相同的抗原做皮肤试验时，常出现阳性的迟发型超敏反应。本试验不仅可以检查受试者是否对某种抗原具有特异性细胞免疫应答能力，而且可以检查受试者总体细胞免疫状态。



上海交通大学医学院

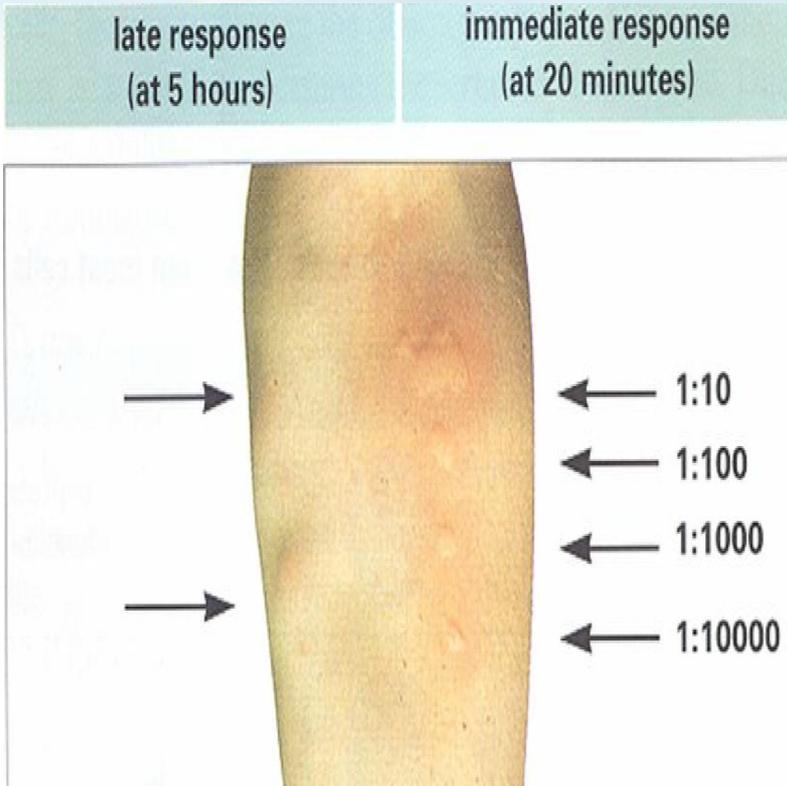


- ❖ B细胞功能减低或缺陷，可表现为体内Ig 和血型抗体量下降或缺如，患者对外源性抗原的应答能力减弱或缺如，仅产生极低或不能产生特异性抗体。故临床定量测定受检者血清中各种Ig量和相应血型抗体可判断B细胞功能，也是诊断体液免疫缺陷的重要指标。反之，如血清中一种或多种Ig或轻、重链片段异常增高，表明B细胞产生Ig的功能异常增高。



上海交通大学医学院

Skin test in vivo



Intradermal injection

Immediate ~ (within 20 min)

Late ~ (at 4-12 hours)

Delayed ~ (24-48 hours)



Assays for Phagocyte function

Phagocyte function:

指吞噬细胞的吞噬活力 —

趋化 (chemotaxis)

吞噬 (taken into~)

胞内消化 (digest)



上海交通大学医学院



Chemotaxis of leucocyte

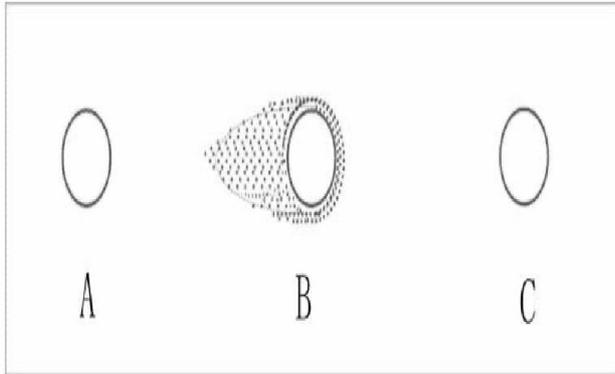


图 10-6 白细胞趋化运动示意图

Chemotactic index
(CI) = 趋化移动距离 (A) / 自发移动距离 (B)

趋化指数与细胞的定向移动能力呈正相关

(琼脂糖凝胶平板法)



吞噬 (Phagocytic) 和 杀菌 (bactericidal) 功能测定

白细胞+细菌——共同温育，涂片，染色镜检，
计算吞噬率和杀菌率。

吞噬率 (phagocytic rate) % =

吞噬细菌的白细胞数 / 计数的白细胞数 $\times 100\%$

杀菌率又称吞噬指数 (phagocytic index) % =

含着色菌体的白细胞数 / 计数的白细胞数 $\times 100\%$

Others: 溶菌法、NBT还原法、化学发光法等



上海交通大学医学院



T细胞表面标记和亚群检测意义

- ❖ 1、用于T淋巴细胞总数的计算
- ❖ 2、判定T淋巴细胞的活化程度
- ❖ 3、了解 $CD_3/CD_4/CD_8$ 细胞分布正常与否，尤其 CD_4/CD_8 的比值是否下降、倒置？
- ❖ T淋巴细胞是机体极其重要的一群免疫细胞，参与并维持宿主的细胞免疫功能。其检测助于判断宿主的细胞免疫状态，助于多种疾病的辅助诊断和发病机理的探明以及疗效的评价等。



上海交通大学医学院



B细胞表面标记和亚群检测意义

- ❖ 1、检测B淋巴细胞的成熟度和产生不同抗体细胞的分布。
- ❖ 2、了解产生免疫球蛋白B细胞种类和数量的变化，提示增殖、缺陷或恶性？
- ❖ B细胞是机体唯一能产生抗体的细胞，其参与并维护宿主的体液免疫防御功能。



上海交通大学医学院



NK、吞噬细胞检测意义

- ❖ NK细胞为自然杀伤细胞，即不受细胞表面MHC限制，能直接杀伤效应细胞。具广谱的抗肿瘤、感染（胞内寄生）和免疫调节。
- ❖ Phagocyte胞质具多种酶，通过氧化或非氧化途径杀灭病原体，抗感染。若其功能低下，助扩散、慢性肉芽肿形成和反复感染~。



上海交通大学医学院



谢 谢



上海交通大学医学院