



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310108976.2

[43] 公开日 2005年6月1日

[11] 公开号 CN 1621838A

[22] 申请日 2003.11.28

[21] 申请号 200310108976.2

[71] 申请人 上海第二医科大学附属瑞金医院
地址 200025 上海市卢湾区瑞金二路197号

[72] 发明人 周同 胡庆沈 陈玉英

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
代理人 薛琦

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

[54] 发明名称 一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法，其特征在于该方法采用低照度荧光图像分析检测法。本发明通过荧光双标记染色和荧光图像分析，对树突状细胞在离体肾组织中的分布进行了定性、定量和定位检测，从而为探讨特异性免疫反应在肾炎尤其肾小管间质病变中的作用，以及进一步阐明肾脏免疫病理机制提供新的依据或研究思路。

1、一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法，其特征在于该方法采用低照度荧光图像分析检测法。

2、如权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于该方法用于离体肾组织中树突状细胞分布的定性、定量和定位检测。

3、如权利要求 1 所述的检测方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

1) 离体肾组织进行免疫荧光双标记染色；

2) 低照度荧光图像采集；

3) 荧光图像分析处理。

4、如权利要求 3 所述的检测方法，其特征在于所述的免疫荧光双标记染色的过程中选用的一抗为抗 CD1a 抗体和抗 CD80 抗体。

5、如权利要求 4 所述的检测方法，其特征在于该抗 CD1a 抗体为以体积比为 1：200 稀释的羊抗人多克隆抗体。

6、如权利要求 4 所述的检测方法，其特征在于该抗 CD80 抗体为以体积比为 1：200 稀释的鼠抗人单克隆抗体。

7、如权利要求 3-6 任一权利要求所述的检测方法，其特征在于所述的免疫荧光双标记染色的过程中选用的二抗为以体积比为 1：200 稀释的抗小鼠 IgG-FITC 和抗山羊 IgG-RPE。

8、如权利要求 3 所述的检测方法，其特征在于所述的低照度荧光图像采集是通过多功能全自动显微镜及数码照相机来完成。

9、如权利要求 3 所述的检测方法，其特征在于所述的荧光图像分析处理是采用 KS400 图像分析处理系统来完成。

一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法

技术领域

本发明涉及一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法。

背景技术

树突状细胞系由美国学者 Steinman 等于 1973 年首先发现，因其成熟时具有特殊的树突状外型而得名。树突状细胞是机体中功能最强的专职抗原递呈细胞，广泛分布于除脑和睾丸以外的所有器官、组织，但含量极少。其既能直接激活初始型 T 淋巴细胞，启动早期特异性免疫应答；又能诱导免疫耐受，已成为免疫学及相关领域的研究热点(Turley SJ. Dendritic cells: Inciting and inhibiting autoimmunity. *Curr Opin Immunol.*2002, 14(6):765-770)。新近研究证实，在炎症或病损状态下，未成熟期树突状细胞可由黏附分子选择素介导下，从血循环迁移至外周炎症组织，并具有极强的抗原内吞和加工处理能力，但其激活初始 T 细胞的能力较弱；成熟的树突状细胞表达丰富的与抗原递呈有关的 MHC- II 类分子(如 HLA-DR)、共刺激分子 CD80 与 CD86、LFA-3 和 CD40 等，通过这些共刺激分子的介导，树突状细胞和 T 细胞结合并有效地激活初始 T 细胞，产生免疫炎症反应。近年对肾脏疾病免疫病理机制已引起高度重视，并注意到淋巴细胞、单核巨噬细胞以及肾小管上皮细胞等免疫炎症细胞以及相关致炎因子和介质，在肾脏疾病发生发展中起重要作用，然而对树突状细胞及其诱导的特异性免疫反应在肾脏疾病机制中的作用尚缺乏研究。原因之一是由于目前缺乏能有效鉴定树突状细胞的组合性标记检测

方法。

另一方面,近年来国内外对组织细胞如树突状细胞荧光共定位多数是在激光扫描共聚焦显微镜下完成(Bell D, Chomarat P, Broyles D, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*, 1999, 190(10):1417-1426)。其中荧光标记是细胞生物学和分子生物学研究中最常用的检测方法,通常使用荧光显微镜可以观察样本中特殊荧光标记的强弱和分布特征,但无法进行数据分析和量化检测。故树突状细胞在外周组织尤其肾组织中分布尚缺乏定量分析手段。

而荧光图像分析,其特点为可精确测定细胞的几何参数如面积周长等,亦能测定细胞组分的数量密度和分布面积密度,并可就荧光显色的光强度作定量分析。该方法是通过多功能全自动显微镜进行荧光共定位测量,可进行精确的定性、定量和定位检测,并能获得真实高分辨率彩色图像。但目前该方法尚未应用于树突状细胞在外周组织尤其肾组织中分布的检测。

因此,有关树突状细胞在离体肾组织,特别是在肾炎肾组织中的分布状况、定量测定、相应作用以及与疾病关系,迄今尚不清楚,有必要加以研究。

发明内容

本发明的目的为解决上述课题,提供一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的新方法。

本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法,其特征在于该方法采用低照度荧光图像分析检测法。

该方法可用于离体肾组织中树突状细胞分布的定性、定量和定位检测。

本发明的方法包括下列步骤：

- 1) 离体肾组织进行免疫荧光双标记染色；
- 2) 低照度荧光图像采集；
- 3) 荧光图像分析处理。

其中，在上述的免疫荧光双标记染色的过程中选用的一抗为抗 CD1a 抗体和抗 CD80 抗体。

所述的抗 CD1a 抗体可选用以体积比为 1：200 稀释的羊抗人多克隆抗体。

该抗 CD80 抗体可选用以体积比为 1：200 稀释的鼠抗人单克隆抗体。

相应的，在上述的免疫荧光双标记染色的过程中选用的荧光二抗可以为以体积比为 1：200 稀释的抗小鼠 IgG-FITC 和抗山羊 IgG-RPE。

另外，所述的低照度荧光图像采集是通过多功能全自动显微镜和数码照相机来完成。

所述的荧光图像分析处理是采用 KS400 图像分析处理系统来完成。

本发明方法中的荧光双标记染色选用的 CD1a 和 CD80 双表型，是目前确认的人类树突状细胞相对特异性标志，而 CD80 的出现则标志着树突状细胞处于成熟阶段。而本发明使用的多功能全自动显微镜有其可进行精确的定性、定量和定位检测，并能获得真实高分辨率彩色图像的独特优点。首先，利用该显微镜特有的三色荧光滤色片，同时可观察和获得样本的真彩色荧光图像，真实反映出样本中荧光标记的实际情况。若荧光较弱可以通过单通道分别采集红、绿或蓝色荧光图像，再组合成真彩色图像。碰到极弱的荧光也可借用共聚焦显微镜方法，通过不同的荧光滤色片分别采集各单色荧光图像，再经过伪彩色图像编码组合成模拟彩色图像。结合荧光图像和透射光原图，可以精确显示荧光共定位的确切部位，且荧光强度可通过灰度值和参考标准值比较，进行精确的定量分析。其次，KS400 图像分析系统，界面良好，

适合于不同研究目的的编程和操作。操作者可以方便地通过阴影校正、对比度增强来改善像质，并选取合适的灰度阈值分割开所测细胞组分，形成计算机便于处理的二值图，再经去除碎片等图像画面整理后，然后进行模式识别对样本中所测细胞组分作出几何形态学测量、荧光强度测量以及定位分析，最后获得检测分析的数值。

故本发明通过荧光双标记染色和图像分析，对树突状细胞在离体肾组织中的分布进行了定性、定量和定位检测，从而为探讨特异性免疫反应在肾炎尤其肾小管间质病变中的作用，以及进一步阐明肾脏免疫病理机制提供新的依据或研究思路。

附图说明

图 1 为树突状细胞在离体正常肾组织中的分布荧光图像照片（×200）。

图 2 为树突状细胞在离体肾炎肾组织的肾小管间质中的分布荧光图像照片（×200）。

具体实施方式

实施例 1

步骤 1 免疫荧光双标记染色：

(1) 离体肾组织石蜡切片二甲苯 3-5ml 脱蜡（15 分钟，15 分钟，45 分钟）。

(2) 依次加入 100%，95%，85%（体积百分比）酒精 5ml，每步 10min，去酒精，加双蒸水 3-5ml，10 分钟后弃水。

(3) PBS（pH7.4）洗 3 次，每次洗 5 分钟。

(4) 0.3%（重量百分比）BSA（牛血清白蛋白+PBS）封闭 20 分钟，37°C 或室温。

(5) 滴加 1: 200(体积比)稀释的一抗(鼠抗人 CD80 单抗, 购自 BD 生物科学公司;羊抗人 CD1a 多抗, 购自 Stanta Cruz 生物技术公司), 均 $50\ \mu\text{l}$ /片, 4°C 过夜。

(6) PBS (pH7.4) 洗 3 次, 每次洗 5 分钟。

(7) 滴加 1: 200(体积比)稀释的荧光二抗 (抗小鼠 IgG-FITC 和抗山羊 IgG-RPE, Jackson 公司), 均 $50\ \mu\text{l}$ /片, 37°C 孵育 1 小时。

(8) PBS (pH7.4) 振荡洗涤 45 分钟。

(9) 擦干后荧光专用封闭液封片。

(10) 采用 PBS 代替一抗作阴性对照。

步骤 2 低照度荧光图像采集:

使用德国蔡司公司(ZEISS)的多功能全自动显微镜(Axioplan 2 imaging)和数码相机 (AxioCam, 分辨率 3900×3090 像素)。样本置于显微镜特有的扫描载物台上, 由计算机控制样本沿 X、Y 轴向移动, 每个样本选取有代表性的 4—5 个视野, 选用特有的三色荧光激发滤色片进行观察。CD1a 阳性染色以红色荧光为主, CD80 阳性染色以绿色荧光为主, 二者双标记共定位阳性染色为黄色荧光, 表现后者荧光染色的细胞即为所测的树突状细胞。随后通过数码相机实时采集真彩色的荧光图像输入至 KS400 图像分析处理系统。

步骤 3 荧光图像分析处理:

使用德国蔡司公司的 KS400 图像分析处理系统和 KS400 图像分析处理软件 (Ver 3.0 版), 依次调出存盘的荧光图像, 进行阴影校正和对比度增强, 改善图像像质, 然后根据共定位双标记荧光的颜色进行阈值分割, 把识别的树突状细胞二值化, 二值图像经整理后进行特征提取, 经模式识别后, 测量

共定位阳性染色树突状细胞的分布面积、数量及密度。所有测量结果转换成 Excel 数据文件，作进一步分析处理。

应用实施例

一、对象和方法

1. 研究对象

本研究 133 例肾炎患者均为 2000 至 2001 年间瑞金医院肾内科收治住院病人，其中男 54 名，女 79 名，平均年龄（ 37.3 ± 5.47 ）岁。所有患者均采用经皮肾活检术，离体肾组织标本常规石蜡固定切片，进行光镜（包括 HE、PAS、Masson 和 Jones 染色）、免疫荧光和电镜检查。根据临床表现和病理确定诊断。133 例患者分别为 IgA 肾病 33 例、局灶节段硬化性肾小球肾炎 10 例，轻微病变 7 例，局灶或弥漫增生性肾炎 6 例，微小病变 4 例、膜性肾病 2 例、狼疮性肾炎 35 例和急慢性间质性肾炎 36 例。此外 10 例正常人肾组织作为对照。

2. 实验方法

按上述实施例 1 的方法。

3. 统计学处理

应用 SAS 6.04 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验和 Spearman 等级相关分析， $P < 0.05$ 差异有显著性。

二、结果

1. 树突状细胞在肾组织中分布

低照度荧光显微镜（多功能全自动显微镜）观察下，正常肾组织中基本未见树突状细胞分布或仅见极细小且淡染的双染色颗粒（如图 1 所示）。而肾炎肾组织中树突状细胞的分布面积、数量和密度均显著增多，均 $P < 0.01$

(具体结果见表1)。

表1 正常和肾炎肾组织中树突状细胞分布面积、数量和密度比较

	双染细胞总面积 (mm ²)	双染细胞总数 (个)	双染细胞密度 (个/mm ²)
正常组(n=10)	309.5±208.8	59.8±40.2	628±424
肾炎组(n=133)	3826.5±1067.6*	686.1±201.7*	7744±2170*

与正常组比较, * $P<0.01$

2. 树突状细胞在肾炎肾组织中分布的特点

在肾炎肾组织中, 树突状细胞主要分布于肾小管、肾间质和肾血管, 以肾小管间质分布最多(见图2), 而肾小球基本未见树突状细胞。

3. 树突状细胞在肾炎肾小管间质分布的变化

根据肾小管间质病变(指肾小管萎缩、间质纤维化和炎细胞浸润)程度, 将肾炎病例分为3组: 轻度组(病变范围 $<20\%$, $n=63$); 中度组(病变范围 $20\sim 50\%$, $n=44$); 重度组(病变范围 $>50\%$, $n=26$)。经观察, 树突状细胞在肾炎肾小管间质的分布面积、数量和密度, 随肾小管间质病变程度加重而明显增多, 且病变重度组又显著大于轻度组和中度组患者, 均 $P<0.001$ (见表2)。此外上述树突状细胞分布状况与肾小管间质病变程度呈正相关, r 分别为0.438、0.439、0.437, 均 $P<0.01$ 。

表2 三组病例肾组织中树突状细胞的分布面积、数量和密度比较

	双染细胞总面积 (mm ²)	双染细胞总数 (个)	双染细胞密度 (个/mm ²)
轻度组(n=63)	1349.7±416.7	260.5±47.5	2848±848.1
中度组(n=44)	3467.7±1430.4*	668.2±275.6*	7041.4±2904.7*

重度组 (n=26)	7988.7±5428.8* [△]	1539.3±1046.0* [△]	16222.2±11024.7* [△]
------------	-----------------------------	-----------------------------	-------------------------------

与轻度组比较, * $P < 0.001$; 与中度组比较, [△] $P < 0.001$

三、结论

上述实验研究发现双染色阳性细胞即树突状细胞在正常肾组织中分布极少; 进一步发现, 树突状细胞在肾炎肾组织中分布, 以肾小管间质部位为主, 且其分布状况与小管间质病变的严重程度密切相关, 提示树突状细胞在肾小管间质迁移聚集, 可能是肾小管间质病变发生乃至进展的重要参与因素。进一步推测, 肾炎时树突状细胞可趋集于肾小管间质部位并被激活, 继而有效地激活 $CD4^+$ T 细胞, 及相应释放大量促炎和抗炎因子, 从而启动和/或促进了局部免疫病理反应及组织损伤。

综上所述, 本发明利用荧光图像分析法, 对树突状细胞在离体肾组织中分布定位进行了检测。利用和借鉴该方法, 同样也可对其他各类拟作荧光标记的组织 and 细胞, 进行定性、定量和定位分析检测。

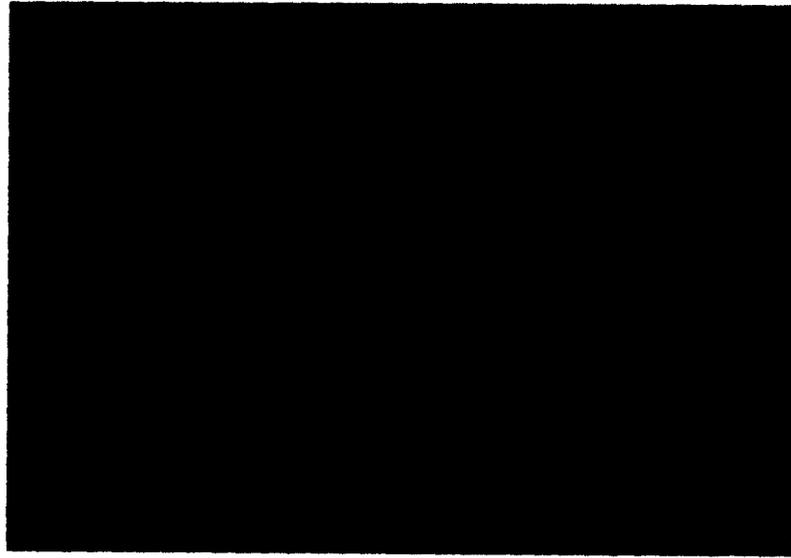


图 1



图 2

专利名称(译)	一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法		
公开(公告)号	CN1621838A	公开(公告)日	2005-06-01
申请号	CN200310108976.2	申请日	2003-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学附属瑞金医院		
申请(专利权)人(译)	上海第二医科大学附属瑞金医院		
[标]发明人	周同 胡庆沈 陈玉英		
发明人	周同 胡庆沈 陈玉英		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	薛琦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种在离体肾组织中检测树突状细胞分布的方法，其特征在于该方法采用低照度荧光图像分析检测法。本发明通过荧光双标记染色和荧光图像分析，对树突状细胞在离体肾组织中的分布进行了定性、定量和定位检测，从而为探讨特异性免疫反应在肾炎尤其肾小管间质病变中的作用，以及进一步阐明肾脏免疫病理机制提供新的依据或研究思路。

