

- 2 井上千也,小野晃. 喷雾热分解法による水酸アパタイトの合成. 窯業協会誌, 1987; 95 (8): 759—763
- 3 Anon. LKB 仪器选用指南. 1985, p. 11
- 4 Majumder K, Ramesh N. A new polymer supported packing material as a substitute of Hydroxylapatite; Purification of Topoisomerases. *chromatographia*, 1987; 24: 400—402
- 5 杉原久夫, 佐藤苍, 户高航等. 缩合リン酸化合物カウのリン酸カルシウムの生成. 石膏と石灰, 1987; 210: 34—42
- 6 Kadoya T, Isobe T, Ebihara M *et al.* A new spherical hydroxyapatite for high performance liquid chromatography of proteins. *J Lig Chrom*, 1986; 9 (16): 3543—3557

人单个核细胞亚群化学发光的研究*

张学军

(上海医科大学华山医院皮肤科, 上海 200040)

关键词 化学发光, T 细胞, B 细胞, 单核细胞, 单个核细胞

人外周血淋巴细胞化学发光 (Ly-CL) 测定已相继报道^[1,2]。然而常规分离的淋巴细胞中包括 T 细胞、B 细胞和少数单核细胞, 均为外周血单个核细胞 (PBMC)。研究 PBMC 亚群细胞在 Ly-CL 中所作贡献有无差别, 对 Ly-CL 测定的实际应用价值有重要意义。本文从人 PBMC 中分离 T 细胞、B 细胞和单核细胞, 比较这些细胞的化学发光特性。

1 材料与方 法

1.1 试剂 刀豆蛋白 A (ConA), 购自 Sigma 公司。植物血凝素 (PHA), 购自广州医学工业所。葡萄球菌蛋白 A (SPA), 购自武汉生物制品所。酵母多糖和 luminol 均购自 Sigma 公司。酵母多糖临用前用正常人血清调理, 制成调理酵母多糖 (OZ)。EM-H 培养基, 内含的 Eagle 培养基和 Hepes 分别购自 GIBCO 和上海生化所。淋巴细胞分离液为上海试剂二厂产品, 比重 1: 0.77。其余试剂均为分析纯。

1.2 细胞分离 参照文献进行^[3,4]。简言之, 正常人肝素抗凝血分离 PBMC 后, 用 EM-H 培养基稀释细胞, 倾入无菌平皿, 37℃ 30min, 轻取未粘附细胞, 再用橡皮轻刮, 收集单核细胞。未粘附细胞过尼龙毛柱, 回收 T 细胞和 B 细胞。上述细胞均置 4℃ 保存备用。

MGG 染色检查 PBMC 和单核细胞纯度, PBMC 中淋巴细胞 94% ± 1.5%, 单核细胞 6% ± 2%, 粒细胞 1% ± 0.5%; 单核细胞中纯度 ≥ 92%。ANAE 染色检查

T 细胞纯度 ≥ 96%, 免疫荧光测定 Smlg 检查 B 细胞纯度 ≥ 81%。台盼蓝检查化学发光测定前的细胞活力均 ≥ 95%。

1.3 细胞化学发光测定 参照前文^[1]。37℃ 循环水使 FT-632 生物化学光度计 (北京核仪器厂) 样品室温度稳定在 37 ± 0.5℃。取 2 × 10⁶/ml 细胞悬液 1ml, 加 luminol 0.2ml (终浓度 0.1mol/L), 37℃ 培育 10min, 测细胞自发性化学发光 (本底) 1min。加 ConA 或 PHA, SPA 和 OZ (终浓度分别为 75mg/L, 100mg/L, 75 mg/L 和 350mg/L), 分别连续测定 PBMC 化学发光 (PBMC-CL), T 细胞化学发光 (T-CL), B 细胞化学发光 (B-CL) 和单核细胞化学发光 (Mo-CL) 的化学发光强度 5—15min。结果取自 4 份标本的纯峰值 (纯峰值 = 峰值 - 本底)。

2 结 果

2.1 PBMC-CL 与 T-CL, B-CL 和 Mo-CL 比较

在细胞、luminol 和 ConA 浓度相同的情况下, PBMC-CL, T-CL, B-CL 和 Mo-CL 所表达的化学发光动力学特征基本相同, 但化学发光强度明显不同 (图 1)。

* 本文在安徽医科大学工作期间完成并得到安徽省教委资助。

收稿日期: 1992-04-04 修回日期: 1992-07-27

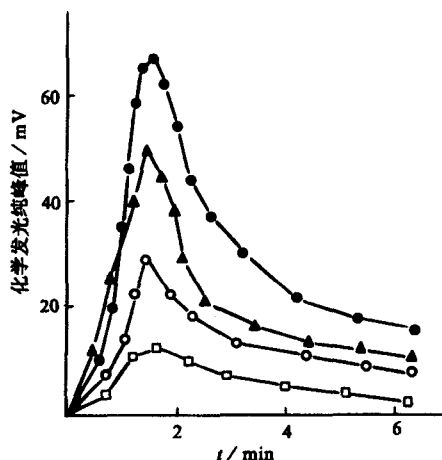


图1 ConA 诱导人外周血单个核细胞及其亚群 T 细胞、B 细胞和单核细胞化学发光动力学研究
●—●: T 细胞; ▲—▲: 单个核细胞;
○—○: B 细胞; □—□: 单核细胞

表1 ConA, PHA, SPA 和调理酵母多糖刺激人外周血单个核细胞及其亚群 T 细胞, B 细胞和单核细胞化学发光的比较

	浓度/($\mu\text{g/ml}$)	化学发光纯峰值/(mV)			
		PBMC	T 细胞	B 细胞	单核细胞
ConA	75	45.3 \pm 8.4	58.5 \pm 14.7	29.7 \pm 8.9 ¹⁾	12.5 \pm 3.7 ²⁾
PHA	100	20.4 \pm 6.6	37.3 \pm 9.2	13.8 \pm 9.1 ¹⁾	8.8 \pm 2.4 ²⁾
SPA	75	34.7 \pm 7.5	25.7 \pm 7.2 ³⁾	43.5 \pm 9.9	18.6 \pm 4.2 ⁴⁾
OZ	350	13.5 \pm 4.6 ⁵⁾	2.7 \pm 0.4 ⁵⁾	24.6 \pm 8.6 ⁵⁾	61.4 \pm 14.4

- 1) 与 T 细胞比, 有显著差异 ($P < 0.05$) 2) 与 T 细胞比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)
3) 与 B 细胞比, 有显著差异 ($P < 0.05$) 4) 与 B 细胞比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)
5) 与单核细胞比, 差异非常显著 ($P < 0.01$)

细胞、B 细胞和单核细胞产生化学发光的总和。但是, 单核细胞受 ConA 刺激后诱导的化学发光较弱, 而且单核细胞在 PBMC 中仅占 4%—8%, 因此对 PBMC-CL 所做贡献非常小, T 细胞和 B 细胞则是 PBMC-CL 的主要贡献细胞。

进一步比较 4 种刺激剂诱导不同亚群细胞化学发光, 表明 ConA, PHA, SPA 均诱导 T-CL, B-CL 和 Mo-CL。从而证实 Falck^[6]提出的有丝分裂原诱导 PBMC-CL 可能并不限于某一亚群细胞。同时也反映有丝分裂原诱导细胞化学发光不同于它们诱导 T 细胞或 B 细胞增殖反应那样具有选择性。然而, 本文也发现, 尽管不同有丝分裂原诱导不同亚群细胞化学发光强度有所差

2.2 4 种刺激剂诱导 PBMC-CL, T-CL, B-CL 和 Mo-CL 结果

由表 1 可见, ConA, PHA, SPA 和 OZ 均能程度不同地诱导 PBMC-CL, T-CL, B-CL 和 Mo-CL。ConA 和 PHA 诱导 T-CL 和 PBMC-CL 强度高于 Mo-CL 和 B-CL, 而 SPA 诱导 B-CL 强度高于 T-CL 和 Mo-CL。然而 OZ 诱导较强的 Mo-CL, 较弱的 PBMC-CL 和 B-CL, 非常微弱的 T-CL。

3 讨 论

PBMC 亚群化学发光研究较少。Peerless 等^[5]用尼龙毛柱分离法证明 ConA 诱导人 T-CL。本文用玻璃粘附法和尼龙毛柱分离法提取单核细胞, T 细胞和 B 细胞, 结果表明 ConA 不仅诱导 T-CL, PBMC-CL, 也诱导 B-CL 和较弱的 Mo-CL, 其化学发光动力学特征也基本相同。可以推测, 常规方法分离 PBMC 所做的 Ly-CL 测定中, 用 ConA 刺激后所诱导的化学发光是 T 细

别, 但仍有一定倾向性。PHA 和 ConA 诱导较强 T-CL, SPA 诱导较强 B-CL。造成这种现象的机制尚不了解。一般认为, 诱导细胞化学发光的物质与细胞结合是一种受体结合关系^[6]。

OZ 是诱导吞噬细胞化学发光的常用刺激物, 诱导吞噬细胞化学发光的机理与调理和吞噬作用有关^[7]。本文实验发现, OZ 不仅诱导较强 Mo-CL, 也诱导 B-CL 和微弱的 T-CL。Mayanskii 等^[8]认为, OZ 诱导 Ly-CL 与 B 细胞上 CR1 有关。但 OZ 诱导微弱 T-CL 机理尚不清楚, 是否某些 T 细胞上存在 CR1 或本实验分离的 T 细胞中尚存在极少数非 T 细胞引起化学发光, 有待深入研究。

根据本文结果,我们认为,人外周血 Ly-CL 实质上是 PBMC-CL, 刺激物(包括有丝分裂原和其它受体刺激剂)诱导 PBMC 亚群化学发光可能均无选择性。因此,在用 Ly-CL 技术作为研究淋巴细胞活化,细胞毒机制,细胞间相互作用等指标时,应将 PBMC 进一步分离为 T 细胞, B 细胞和单核细胞,以避免细胞亚群间化学发光干扰。同时也应提出,由于有丝分裂原诱导 Ly-CL 时主要贡献细胞为 T 细胞和 B 细胞,单核细胞所做贡献很小;此外,我们最近研究发现, Ly-CL 与疾病状态下的淋巴细胞功能有密切关系^[9,10],因此; Ly-CL 测定仍可从整体上反映淋巴细胞氧化代谢活性或功能状态。

参 考 文 献

- 1 张学军, 刘 琰. 人外周血淋巴细胞化学发光测定的方法学研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 1990; **10**: 195
- 2 司传平, 刘 琰. 人外周血淋巴细胞化学发光测定的最佳实验条件探讨. 中国免疫学杂志, 1991; **7**: 49
- 3 张工梁. 分离 T, B 淋巴细胞的简易方法. 上海免疫学杂志, 1986年; **6**: 184
- 4 陶义训, 章谷生, 孙 萌. 临床免疫学检验. 上海: 上海科技出版社, 1983: 19-21
- 5 Peerless A G, Stiehm R E. Abnormal erythrocyte and lymphocyte chemiluminescence in chronic granulomatous disease. *Clin Immunol Immunopathol*, 1986; **38**: 1
- 6 张学军. 淋巴细胞化学发光. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17**: 430
- 7 Van Dyke K. Cellular chemiluminescence. Vol I. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1987: 93
- 8 Mayanskii A N. C₃ b-mediated chemiluminescence of human lymphocytes. *chemical Abstracts*, 1990; **112** (7): 556
- 9 张学军, 刘 琰, 杨 林. 肿瘤患者淋巴细胞化学发光测定意义的研究. 中华肿瘤杂志, 1992; **14**: 17
- 10 张学军, 刘 琰, 杨 森等. 淋巴细胞化学发光临床意义的初探. 免疫学杂志, 1991; **7**: 252
- 11 Phorbol ester translocation of protein kinase C in guinea-pig synaptosomes and the potentiation of Ca²⁺-dependent glutamate release. *Biochem Biophys Acta*, 1988; **970**: 157
- 12 Manev H, Costa E, Wroblewski J T *et al.* 著, 任民峰编译. 兴奋性氨基酸受体过度刺激和对抗其神经毒性的途径. 生理科学进展. 1991; **22** (2): 107
- 13 Pocock J M, Murphie H M, Nicholls D G. Kainic acid inhibits the synaptosomal plasma membrane glutamate carrier and allows glutamate leakage from the cytoplasm but does not affect glutamate exocytosis. *J Neurochem*, 1988; **50** (3): 745
- 14 McMahan H T, Barrie A P, Lowe M *et al.* Glutamate release from guinea-pig synaptosomes. *J Neurochem*, 1989; **53**: 71

(上接第 280 页)