维普资讯 http://www.cqvip.com

③ 105—108

重庆医科大学学报 1993年第18卷第2期

粘附培养的人单核巨噬细胞之酶活性及吞噬功能的观察

R329.26

组胚教研室 汪维伟 赵 玲 陆 明

摘 要 本文观察了粘附培养的人单核巨噬细胞的琥珀酸脱氢酶（SDH）、α-萘酚醋酸酯酶（ANAE）、过氧化酶（PO）等酶活性及其鸡红细胞吞噬率之差异。结果培养前粘附细胞的SDH、ANAE活性均高于不粘附细胞（$P<0.01$和0.05）。粘附细胞培养24、48h后仍粘附的细胞和悬浮细胞间酶活性差异均无显著性。培养48h的粘附和悬浮细胞之PO活性均低于培养24h的相同细胞（$P<0.01$）。上述各组细胞间鸡红细胞吞噬率均未见有统计意义的差异。这提示：在无人血清刺激时，单核巨噬细胞粘附能力的不同似乎与细胞分化成熟或功能活化状态有关

关键词 人单核巨噬细胞；粘附；吞噬；SDH；ANAE；PO 单核细胞，酶

中图分类号 R329、26

人周围血单核细胞在形态、功能等多方面表现出异质性[1]。单核细胞在玻璃和其它粘附面上粘附能力不同，在同一粘附面上也表现为粘附、不粘附和粘附后又脱离粘附面等[2]。本文拟观察在同一粘附面上，粘附培养后单核巨噬细胞的酶活性及吞噬功能的差异及其意义。

材料方法

单核细胞的分离培养 取10例正常人肝素抗凝血，淋巴细胞分离液分离出周围血单个核细胞（PBMC）。以10%小牛血清RPMI1640培养液（后同）配成3～5×10⁶/ml细胞悬液。取直径3cm玻璃培养皿，分别加入细胞悬液5ml，室温下粘附1h，收集悬浮的不粘附细胞（含大量淋巴细胞）。用胰酶和橡胶刮剥离一个培养皿的粘附细胞，主要为单核细胞（NSE阳性率为80～90%），其余培养皿各加入5ml培养液，37℃、5%CO_2培养，不换液。分别于第2、3、4d按上述方法收集培养后仍粘附和悬浮起来的细胞，存活率为80～97%，第4天存活率低于70%，弃之。

吞噬鸡红细胞试验 常规鸡翼下取血，配成

THE APPLICATION OF PCR TO DIABETES RESEARCH

Liu Xianjun, et al

Dept of Biochemistry

The polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify insulin gene fragment (1128bp) in human genomic DNA. The amplified product was directly cloned to MI3 vector, and DNA sequencing was carried out by Sanger dideoxy-mediated chain termination method. This is a simple and effective method for identifying mutations in the coding region of prepeptide, A chain, B chain and C peptide of insulin gene

KEY WORDS PCR; DNA sequencing human insulin gene; NIDDM

维普资讯 http://www.cqvip.com

5×10^6/ml细胞悬液。收集到的PBMC（组1）、粘附培养1、24、48h的粘附细胞（组2、4、6）和不粘附及培养后悬浮起来的细胞（组3、5、7），均用培养液配成5×10^6/ml细胞悬液。各取0.1ml于载玻片上，加入0.1ml鸡红细胞悬液。37℃水浴中30min后取出，载片空气干燥后瑞氏染色。

细胞化学 各组细胞做涂片，分别做SDH[3]、ANAE和PO[4]染色。

观察统计 油镜下计数200个细胞。计数鸡红细胞吞噬率[5]。三种酶均按酶活性强弱分阴性和阳性（+～卅）等五级统计，并计算出100个细胞的酶活性积分[4]。吞噬率和酶积分间的差异分别做H检验和方差分析。

结 果

各组单核巨噬细胞之PO产物呈深蓝色小颗粒；ANAE产物为暗红色弥散细粒；SOH产物为深蓝色较大颗粒。ANAE和PO均可分阴性和阳性（+～卅）五级，SDH无阴性细胞，阳性细胞亦可分四级。各组细胞三种酶的活性见表1～3。

表 1　各组细胞的ANNE活性

组别		分级 −	+	++	+++	++++	积分（$X\pm S\bar{x}$）
培养前	①PBMC	14.6	25.0	27.7	24.0	8.7	187.4±9.3
	③粘附	11.7	18.5	26.9	30.0	12.9	213.9±5.5
	②不粘附	16.0	24.0	29.5	21.3	9.1	182.9±7.2
培养一天	④粘附	11.3	16.3	26.3	30.7	13.9	216.8±7.8
	⑤悬浮	13.1	19.2	26.3	27.8	13.3	209.6±3.6
培养二天	⑥粘附	10.2	16.1	26.3	32.4	14.7	225.0±3.0
	⑦悬浮	11.8	15.0	26.5	29.1	17.1	224.2±4.9

注：⑦与①、③，⑥与①，③，④与⑤，②与③比较，P值均<0.01
⑥与①、③，④与①，②与①比较，$P<0.05$

表 2　各组细胞的PO活性

组别		分级 −	+	++	+++	++++	积分（$X\pm S\bar{x}$）
培养前	①PBMC	29.9	23.7	24.2	18.0	4.4	141.7±7.1
	②粘附	31.4	20.3	22.7	22.2	6.2	156.3±7.0
	③不粘附	35.8	18.3	21.0	19.1	5.6	136.3±8.2
培养一天	④粘附	34.1	23.5	20.2	18.8	5.8	144.1±12.9
	⑤悬浮	39.3	29.1	17.6	14.1	4.7	120.7±11.1
培养二天	⑥粘附	47.3	26.6	14.0	9.6	2.8	95.1±13.2
	⑦悬浮	52.0	26.1	12.5	6.1	1.2	80.5±9.6

注：⑦与①、②、③、④，⑥与①、②、④比较，P值均<0.01
⑦与⑤，⑥与③比较，P值均<0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3　　各组细胞的SDH活性

组别		分级 +	++	+++	++++	积分 ($X\pm S_{\bar{x}}$)
培养前	①PBMC	35.0	36.7	23.5	4.8	198.1±6.5
	②粘附	25.7	33.5	32.7	8.6	225.2±5.4
	③不粘附	33.4	35.1	25.5	5.8	203.9±5.8
培养一天	④粘附	28.2	29.5	32.7	9.5	223.5±4.9
	⑤悬浮	29.2	32.8	30.7	7.8	218.4±5.6
培养二天	⑥粘附	25.1	28.1	34.7	12.0	233.6±1.1
	⑦悬浮	26.6	27.5	32.5	13.3	232.6±1.9

注：①与⑦，⑥，④，②，③与④、⑦比较，P值均<0.01
③与②、④，①与⑤比较，P值均<0.05

表中可见：①粘附细胞培养后，SDH、ANAE的活性有所增加，而PO活性则降低，但仅培养48h后粘附细胞的PO活性低于培养前及培养24h的粘附细胞有统计意义（$P<0.01$）。②培养前粘附细胞的ANAE和SDH活性均强于不粘附细胞，P值分别<0.01和0.05。而这两种细胞间PO活性的差异无显著性。③粘附细胞在培养24、48h后仍粘附的细胞与悬浮细胞间三种酶活性的差异均无显著性。④培养24、48h的悬浮细胞间，仅PO活性降低有统计意义（$P<0.05$）。

各组细胞的鸡红细胞吞噬率在5.75～8.16%之间，其差异无显著性。被吞噬的鸡红细胞大多数轮廓清楚，仅少数被部分消化。

讨　论

对单核细胞的异质性，有人认为可能反映了血中存在不同的功能亚群，但更多学者认为是细胞分化程度或功能状态不同的表现。在单核细胞分化过程中，大多数细胞内酶的活性逐渐增强，而PO活性则降低。故一般认为酶活性的强弱能反映单核细胞的分化程度或活化状态[1,2]。本文观察了粘附状态不同的单核巨噬细胞的三种酶活性及吞噬功能的差异，结果：粘附的单核细胞培养后，SDH、ANAE活性趋于增强，PO活性则降低；培养前粘附细胞的ANAE和SDH活性均高于不粘附细胞，这提示粘附细胞可能较不粘附细胞更成熟或功能更活跃；而粘附细胞培养后仍粘附和悬浮起来的细胞间，三种酶的活性及吞噬率的差异均无显著性，表明两者的成熟或功能状态较接近。粘附状态不同的几组细胞间，均未见到酶活性及吞噬率的完全阴性或阳性的差异，仅表现为强弱或多少的变化。这与单核细胞分化成熟过程中的变化相似，故单核细胞粘附能力的差异可能与细胞分化或功能活化状态有关。

表1中可见，粘附细胞培养后，ANAE +++和++++的阳性细胞数增加，故积分也提高了，但其阴性细胞数并无明显变化。而单核细胞在体外极少分裂[2]，不会有新生细胞补充。为什么在相同条件下，ANAE阴性细胞不转变为阳性呢？笔者认为这可能与培养液中缺乏刺激这些细胞分化的因素有关。

单核细胞在体外的分化有赖于培养液中人血清的存在，马或牛血清仅能提供有限的分化条件[3]。尚不清楚人血清中有什么激活单核细胞的物质。本文为尽可能排除其它因素的影响，仅用10%小牛血清。结果表明，

维普资讯 http://www.cqvip.com

在无人血清刺激时，粘附能力不同的几组单核巨噬细胞之三种酶的活性有一定改变，但其鸡红细胞吞噬率却未见明显变化。这可能提示单核细胞吞噬作用亦须某些活性物质的激活，而本实验培养液中缺乏这些物质。但是否有检测方法或其它因素的影响，尚待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 汪维伟，等．国外医学 临床生物化学及检验分册 1988；6:7

[2] Zembaia M, et al. Human Monocytes Academic Press 1989, Page 27

[3] 陈啸梅，等．组织化学手册 人民卫生出版社 1982；224

[4] 汪维伟，等．解剖学报 1991；22:120

[5] 陶义训．等．临床免疫学检验 上海科技出版社1983；117

[6] Kataoke M, et al. Exp Hematol 1984, 12:183

（收稿日期1992-10-27）

THE OBSERVATION ON THE ENZYMATIC ACTIVITY AND PHAGOCYTIC FUNCTION IN THE ADHERENT AND CUITURED HUMAN MONONUCLEAR PHAGOCYTES

Wang Weiwei, et al

Dept · of Histology and Embryology

We studied the difference of the enzymatic activity, including Succinic dehydrogenase(SDH), α-Naphthol acetate esterase (ANAE)and Peroxidase(PO), and the ratio of phagocytic chicken red blood cells in the adherent and cultured human mononuclear phagocytes. The results showed: the enzymatic activity of SDH and ANAE in adherent cells were stronger than tne nonadherent cells before the cells were cultured ($P<0.01$ and 0.05) . When the adherent cells had been cultured for 24/48 hours, the difference of the enzymatic activity between the still adhered cells and detached cells did not have any statistic significance. The PO activity of the adherent cells and detached cells cultured 48 hours were lower than the same cells cultured 24 hours ($P<0.01$) . The difference of the ratio of phagocytic chicken red blood cells had not shown any statistic significance among the cell groups described above. It indicates that when there was no the stimulation of human serum, the difference of adherent capacity in mononuclear phagocytes seems to be responsible to the condition of their differentiation and maturation or their functional activation.

KEY WORDS Human mononuclear phagocytc; Adherence; Phagocytosis; SDH; ANAE; PO