

中性粒细胞吞噬功能试验预染色法的探讨

王地英, 刘玲霞(苏州大学附属常州肿瘤医院检验科, 江苏常州 213001)

【摘要】 目的 建立预染色法中性粒细胞吞噬功能试验, 探讨血细胞计数仪进行测定的可行性。**方法** 通过对吞噬前细菌进行预染色, 使细菌容易辨认而提高试验准确性。观察不同时间中性粒细胞吞噬试验的形态学变化、细胞数量变化及不同的时间血细胞计数仪测定中性粒细胞的结果, 并进行比较分析, 确定测定时间。**结果** 不同孵育时间中性粒细胞吞噬细菌的形态不同, 细菌清晰、易认; 1 h 后显微镜法的中性粒细胞吞噬率健康对照组(58.4±20.5)%, 2 型糖尿病组(48.5±19.8)%, 肿瘤组(51.1±21.4)%; 仪器法的中性粒细胞吞噬率, 健康对照组(55.6±17.0)%, 2 型糖尿病组(46.4±15.6)%, 肿瘤组(47.5±16.1)%。**结论** 显微镜计数法和血细胞分析仪法的结果密切相关, 可以为临床应用。

【关键词】 中性粒细胞; 吞噬功能; 预染色

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.23.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2960-02

Study on pre-staining method of neutrophil phagocytosis function test WANG Di-ying, LIU ling-xia (Department of Clinical Laboratory, Changzhou Tumor Hospital of Suzhou University, Jiangsu 213001, China)

【Abstract】 Objective To establish the Pre-staining method of neutrophil phagocytosis function test, and to explore the feasibility of determination by blood count instrument. **Methods** Pre-stained of bacteria of phagocytosis was used to identify the bacteria easily and improve the test accuracy. The morphological changes of neutrophils, cell number changes and the results of neutrophil from blood counter analyzer were observed in different time and analyzed comparatively for making the time of determination. **Results** Passing different incubation time, neutrophils morphology were different, the bacteria were clear, and it was easy to be recognized. After one hour, microscopy neutrophils phagocytosis rates were normal control group(58.4±20.5)%, type 2 diabetes group(48.5±19.8)%, tumor group(51.1±21.4)%. Instrument neutrophils phagocytosis rates were normal control group(55.6±17.0)%, type 2 diabetes group(46.4±15.6)%, tumor group(47.5±16.1)%. **Conclusion** After incubation 1 hour, blood count of instrument neutrophils phagocytosis rate is closely related($r=0.989$) with microscope notation, which can applied in clinic.

【Key words】 neutrophils; phagocytosis; pre-staining

中性粒细胞吞噬功能是机体免疫功能的重要组成部分, 在多种疾病的发生、发展中起着重要的作用^[1]。中性粒细胞吞噬功能试验是一经典的免疫学功能试验, 除用于常规免疫功能检测外, 还用于 2 型糖尿病(T2DM)、肿瘤、肾脏、感染等疾病的研究^[2-3]。中性粒细胞吞噬功能试验方法以显微镜计数法最为经典, 但因细胞内吞噬的细菌难以辨认造成工作效率低下、结果准确性差。四氮唑兰法的影响因素也较多, 不利于建立规范化操作规程。后续的改良方法有氧消耗法、流式细胞仪计数法、化学发光法、¹⁴C-葡萄糖标记法等, 但因细胞分离复杂、测定时间长、仪器要求高而不易推广应用^[4-5]。作者在工作中建立了中性粒细胞吞噬试验预染色法, 方便、简单、准确。既可以进行传统显微镜计数, 也可以进行仪器测量, 有利于规范化操作。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2011 年 7 月份 20 名健康体检者为对照组, 男 12 名, 女 8 名。选择本院同期糖尿病患者(符合 T2DM 防治指南诊断标准)20 例为 T2DM 组, 男 13 例, 女 7 例。选择本院 2011 年 7~9 月住院肿瘤患者 20 例为肿瘤组, 其中胃癌 14 例, 直肠癌 3 例, 肝癌 2 例, 白血病 1 例。

1.2 材料 (1)染色金黄色葡萄球菌。普通肉汤培养金黄色

葡萄球菌 24 h, 取对数生长期菌液 100 mL, 高压灭菌。细纱布滤除大菌块, 滤液离心沉淀, 沉淀物用与适量的结晶紫(革兰染色用)预染 5 min。染色的沉淀物加生理盐水稀释, 再离心沉淀, 重复 3 次。取最终的沉淀物用生理盐水配制成合适浓度菌液(显微镜下, 细菌密集均匀分布即可), 用肝素抗凝管分装, 每管 50 μ L, 冷藏备用。(2)Olympuscx-31 显微镜。(3)DIANA-5 血细胞分析仪。(4)瑞氏染液。

1.3 原理 参照《全国临床检验操作规程》^[6], 但对吞噬前的金黄色葡萄球菌, 用结晶紫进行预染色, 使中性粒细胞内吞噬该细菌易于观察, 用显微镜准确计数 100 个中性粒细胞, 记录吞噬细菌的细胞数和吞噬的细菌数。吞噬率 = 100 个中性粒细胞中吞噬有细菌的细胞数, 吞噬指数 = 每个中性粒细胞所吞噬细菌的平均数。同时中性粒细胞吞噬细菌后, 细胞溶酶体释放溶菌酶, 杀灭细菌的同时也造成细胞自溶, 其数量下降, 以中性粒细胞自溶比例代表中性粒细胞的吞噬功能。用血细胞计数仪准确计数吞噬前后中性粒细胞数, 计算出中性粒细胞的吞噬率。

1.4 显微镜计数法 取含菌小试管放 37 $^{\circ}$ C 温浴 10 min。每管加新鲜血液 200 μ L, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 温浴。5 min 后制片, 瑞氏染色。随机计数 100 个中性粒细胞, 记录吞噬细菌的细胞数和

吞噬的细菌数。

1.5 血细胞仪计数法 采用 DIANA-5 血细胞分析仪。取含菌小试管放 37 ℃ 温浴 10 min。每管加新鲜血液 200 μ L, 混匀, 细胞计数仪计数中性粒细胞数。37 ℃, 1 h 后重复计数。中性粒细胞吞噬率 = $[1 - (1 \text{ h 后中性粒细胞数} / \text{吞噬前中性粒细胞数})] \times 100\%$ 。

1.6 吞噬细胞形态观察和细胞计数 血液和细菌混合样本, 37 ℃ 孵浴。每隔 5 min 制片观察中性粒细胞的吞噬效果及其形态变化。对血液和细菌混合样本, 37 ℃ 温浴。在不同时间进行细胞计数, 观察中性粒细胞的变化规律。

1.7 统计学处理 全部数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行对比分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 中性粒细胞吞噬细菌形态学观察 不同时间中性粒细胞

吞噬细菌的形态不同。5 min, 中性粒细胞吞噬细菌紫红色菌体明显易认, 细胞核肿胀, 细胞内细菌多少不一, 中性粒细胞形态基本正常。10 min, 中性粒细胞吞噬大量细菌, 核形态模糊, 胞浆渗出, 部分中性粒细胞破裂, 形态改变并肿胀。15 min, 细胞核模糊, 细胞内充满细菌, 细胞出现破裂。20 min, 细胞明显破碎。30 min, 细胞明显减少, 中性粒细胞完全破碎, 已无典型形态。

2.2 中性粒细胞吞噬试验过程中白细胞计数观察 血液和预染色细菌混匀后, 37 ℃ 孵浴, 在不同时间进行血细胞计数, 结果显示中性粒细胞数和白细胞总数随时间延长而不断下降。

2.3 不同病例组中性粒细胞吞噬功能 T2DM 组、肿瘤组的中性粒细胞吞噬功能显著低于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 显微镜计数法和血细胞仪法密切相关 ($r = 0.989$)。见表 1。

表 1 各组不同方法中性粒细胞吞噬试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	显微镜法吞噬率(%)	吞噬指数	仪器法吞噬率(%)
健康对照组	20	50.2 ± 6.9	58.4 ± 20.5	23.2 ± 22.6	55.6 ± 17.0
T2DM 组	20	57.0 ± 12.0	48.5 ± 19.8	17.5 ± 16.4	46.4 ± 15.6
肿瘤组	20	63.9 ± 10.5	51.1 ± 21.4	18.2 ± 14.4	47.5 ± 16.1

3 讨 论

Rigby 和 Deleo^[7] 研究表明, 金黄色葡萄球菌对中性粒细胞具有特殊的诱导能力, 金黄色葡萄球菌是中性粒细胞吞噬功能试验的合适菌种。金黄色葡萄球菌经 100 ℃ 加热 30 min 灭活并进行预染色, 细菌着色明显, 能较好地激发中性粒细胞的吞噬功能, 菌体大而明显, 容易辨认, 提高了显微镜法的准确性。细菌经高压灭菌预染色后分装, 不仅具有生物安全作用还可以明显提高结果重复性。

通过不同时间段的细胞吞噬效果和形态观察, 发现随着时间的变化, 中性粒细胞形态也发生变化并造成自溶, 吞噬细菌数变化明显。选择 37 ℃ 孵浴 5 min, 能较好控制中性粒细胞形态和吞噬细菌的数量, 结果重复性好。通过形态学的动态观察, 发现吞噬细菌后 30 min, 中性粒细胞开始出现自溶、破坏等。仪器动态计数发现, 中性粒细胞吞噬细菌后发生自溶, 随时间而增加白细胞数与中性粒细胞数计数不断下降。经过 1 h 孵浴后, 中性粒细胞数下降不再明显, 比较孵浴前后血细胞仪的中性粒计数结果, 以中性粒细胞的下降数表示中性粒细胞因吞噬细菌被破坏的数量, 并计算吞噬率。显微镜计数法和血细胞分析仪法的结果密切相关 ($r = 0.989$), 可以为临床应用。

中性粒细胞吞噬率健康对照组大于 T2DM 组及肿瘤组。Shurtz-wirski 等^[1] 的研究表明, T2DM 患者中性粒细胞吞噬功能下降, 但体外实验时经乙酸肉豆蔻佛波醇 (PMA) 刺激后, 释放 H_2O_2 快速、明显, 当中性粒细胞和自身血浆孵浴后, T2DM 组的成活率低于健康对照组。葛才保等^[8] 通过对细胞外三磷酸腺苷 (eATP) 研究发现, T2DM 因 eATP 不足导致细胞膜转运障碍, 进而导致中性粒细胞等多细胞功能障碍。肿瘤患者中性粒细胞吞噬功能下降, 可能与机体逆境生理相关, 缺氧逆境可以明显抑制中性粒细胞的吞噬功能^[9]。最新研究揭示地塞

米松类糖皮质激素也可以导致中性粒细胞吞噬功能下降, 老年自身免疫性疾病患者也会造成中性粒细胞吞噬功能的下降^[10-11]。中性粒细胞吞噬功能试验为一经典免疫学试验, 在多种疾病的研究中具有重要的作用, 建立预染色中性粒细胞吞噬功能试验, 吞噬用金黄色葡萄球菌经高压灭菌、结晶紫预染色、多次洗涤, 基本消除了细菌中含有的 eATP 影响, 为上述 eATP 不足理论建立了 eATP 纠正试验的方法学。

参考文献

- [1] Shurtz-Swirski R, Sela S, Herskovits AT, et al. Involvement of Peripheral Polymorphonuclear leukocytes in oxidative stress and inflammation in type 2 diabetic patients [J]. Diabetes Care, 2001, 24(1): 104-110.
- [2] Muniz Junqueira MI, Pecanha LM, de Silva-Filho VL, et al. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2003, 10(6): 1096-1102.
- [3] Kristal B, Shurtz-Swirski R, Tanhilevski O, et al. Epoetin-alpha: preserving kidney function via attenuation of polymorphonuclear leukocyte priming [J]. Isr Med Assoc J, 2008, 10(4): 266-272.
- [4] 沈飒, 左静南, 蒋更如, 等. 糖尿病多形核白细胞吞噬功能的改变 [J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(5): 414-416.
- [5] 赵修春, 姚春艳, 李柏青, 等. 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探讨 [J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(5): 388-390.

续表 2 不同血清标记物模式的 HBV-DNA 含量测定结果[n(%)]

组别	n	HBV-DNA(copy/mL)						阳性	
		<5×10 ²	5×(10 ² ~10 ³)	>5×(10 ³ ~10 ⁴)	>5×(10 ⁴ ~10 ⁵)	>5×(10 ⁵ ~10 ⁶)	>5×(10 ⁶ ~10 ⁷)		>5×(10 ⁷)
B组	91	10(11.0)	8(8.8)	21(23.1)	11(12.1)	2(2.1)	38(41.8)	1(1.1)	73(80.2)
C组	13	—	—	—	—	—	13(100.0)	—	13(100.0)
D组	167	70(42.0)	42(25.1)	16(9.5)	29(17.3)	7(4.2)	3(1.8)	—	55(32.9)

注：—表示无数据。

3 讨 论

HBV 是目前我国病毒性肝炎的主要病原。一般认为,在 HBV 感染过程中,宿主的免疫应答决定其病程的进展及转归。当机体免疫功能低下时病毒持续复制并分泌 HBeAg,而随病情的好转病毒复制停止,出现 HBeAg 阳性、抗-HBe 阳性^[2]。多年来,临床对乙肝的诊断多依靠 HBV-M 的检测结果,将 HBeAg 阳性向抗-HBe 阴性转变视为病情好转的标准。近年来,随着 PCR 技术的发展,运用 FQ-PCR 直接检测乙肝患者血清的 HBV-DNA 载体量,是反映 HBV 感染、复制最直接可靠的依据。

本研究显示,在 HBV-M 几种常见模式中,大三阳和 HBsAg(+),HBeAg(+)组 HBV-DNA 检测阳性率最高,分别为 90.7%、100.0%,且含量较高 HBV-DNA 大于 5×10⁶ copy/mL 为 51.8%、100.0%,明显高于其他模式组,说明 HBeAg 与 HBV-DNA 定量确实具有良好的一致性,这从基因水平上证实了 HBeAg 确实是反映 HBV 复制活跃及具有强传染性的可靠指标。但这并不意味着 HBeAg 转阴病毒复制就停止^[3-4]。本实验显示,小三阳 HBV-DNA 定量仍有 80.2% 阳性率,HBV-DNA 大于 5×10⁶ copy/mL 为 42.9%。1989 年 Carman 发现 HBV 前 C 区变异株,从而开始了人类对 HBV 变异株的探讨^[5]。造成 HBeAg(+)的原因,一般认为 HBV 从前 C 区起始密码开始编码合成 HBeAg,变异后导致前 C 区基因翻译中断,前 C 区基因和 C 区基因则不能编码 HBeAg^[3-7],故血清学检测表现为 HBeAg(-),而病毒复制仍可持续进行。有研究表明,血清 HBV-DNA 大于 5×10⁵ copy/mL 提示 HBV 活动性复制小于 5×10⁵ copy/mL 为低度感染,HBV 持续复制是慢性乙肝迁延难愈的主要原因^[6]。对于“小三阳”临床应引起足够重视,要了解病毒复制情况需进行 HBV-DNA 定量检测。

长期以来,临床习惯依赖血清标记物检测诊断乙肝患者的

病情。实际上血清学方法检测的是 HBV 的表达产物,反映机体对 HBV 的免疫反应状态,是免疫学指标,但是这种单一的诊断方法,并不能全面反映乙肝患者体内 HBV 的感染状况。而 FQ-PCR 检测的是 HBV 本身,直接反映 HBV 本身的状况,包括感染、复制、传染性和恢复等情况,为乙肝病情的诊断提供了直接的依据。二者联合检测对临床 HBV 感染的诊断、治疗、疗效观察、传染性和复制情况的判断及预后具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] 张卓然. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
- [2] 张悦, 王惠萱, 朱与琨, 等. HBV-DNA-pre-C 区(nt1896) 变异的临床调查与分析[J]. 现代检验医学杂志, 2004, 19(2): 45-46.
- [3] 耿春浩, 付艳丽, 唐喜玲, 等. HBeAg、HBV-DNA、前 S1 抗原相关性分析及其临床意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2002, 18(4): 217-218.
- [4] 崔红花, 王晶莹, 谢凤. HBV Pre_S1 抗原和 HBV-DNA 的监测及临床评价[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(4): 482-485.
- [5] 申子瑜, 李全明. 临床基因扩增检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 145-146.
- [6] 李训友, 马建林. 乙型肝炎病毒变异株感染的临床意义[J]. 滨州医学院报, 2000, 23(3): 310-311.
- [7] 陈素玲, 胡国龄, 谭德明, 等. 381 例 HBV 感染者 HBV-DNA 前 C 区基因突变的研究[J]. 中国现代医药杂志, 2001, 1(8): 48-50.

(收稿日期: 2012-05-18)

(上接第 2961 页)

- [6] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 581-586.
- [7] Rigby KM, Deleo FR. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections[J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(2): 237-259.
- [8] 葛才保, 陈六生, 张力. 细胞外三磷酸腺苷在细胞膜物质转运中的作用机制与 2 型糖尿病和肿瘤的病因研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 75-76.
- [9] Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, et al. Regulation of the autophagic machinery in human Neutrophils[J]. Eur J

Immunol, 2010, 40: 1461-1472.

- [10] Hodrea J, Majai G, Doró Z, et al. The glucocorticoid dexamethasone programs human dendritic cells for enhanced phagocytosis of apoptotic neutrophils and inflammatory response[J]. J Leukoc Biol, 2011, 96(6): 112-114.
- [11] Paino IM, Miranda JC, Marzocchi-Machado CM, et al. Phagocytosis and nitric oxide levels in rheumatic inflammatory states in elderly women[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(1): 47-51.

(收稿日期: 2012-06-19)