

· 技术与方法 ·

脐静脉内皮细胞诱导脐血单个核细胞向树突状细胞的分化

齐莹莹¹, 杜英^{2△}, 李倩如², 陈惠萍³, 徐虹⁴, 周云⁵, 董子明²

(1. 郑州市人民医院检验科 450000; 2. 郑州大学基础医学院微生物学与免疫学教研室 450001;

3. 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 450001; 4. 河南省肿瘤研究所, 郑州 450000;

5. 河南省人民医院肿瘤科, 郑州 450000)

摘要:目的 探讨人脐静脉内皮细胞对人脐血单个核细胞(UBMCs)向树突状细胞(DC)分化的影响,建立更便捷、更经济体外培养 DC 的方法。**方法** 胶原酶消化分离出脐静脉内皮细胞(HUVEC),经鉴定和体外培养扩增后,使其平铺生长于 Transwell 板上室底部,将 UBMCs 接种到 Transwell 小室内,同时加入 EC9706 细胞冻融形成的蛋白质抗原,与 HUVEC 共培养,使 UBMCs 与 HUVEC 紧密接触并从 Transwell 板上室迁移到下室,收集 Transwell 板下室细胞,流式细胞术检测下室细胞 DC 相关表面标志 CD80、CD40、CD83、CD1a 和 MHC 分子;通过 MTT 法检测肿瘤负载的 UBDC 诱导 CTL 对靶细胞的特异性杀伤作用。**结果** 经 HUVEC 诱导并负载了肿瘤细胞抗原的 DC CD80、CD40、CD83、CD1a 和 MHC-II 类分子表达增加,产生的细胞毒性 T 细胞(CTL)可特异性杀伤食管癌细胞 EC9706;与细胞因子诱导 DC 活化的 CTL 对 EC9706 的杀伤率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 利用 Transwell 小室以人原代脐静脉内皮细胞诱导脐血单个核细胞分化的 DC 是可行的一种实验方法。

关键词:树突状细胞;脐静脉内皮细胞;脐血单个核细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0355-02

Human umbilical blood mononuclear cells differentiated into dendritic cells by induction of umbilical vein endothelial cells

Qi Yingying¹, Du Ying^{2△}, Li Qianru², Chen Hui ping³, Xu Hong⁴, Zhou Yun⁵, Dong Ziming²

(1. Department of Microbiology and Immunology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. Department of Laboratory, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China;

3. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China;

4. Henan Cancer Research Institute, Zhengzhou, Henan 450000, China; 5. Department of Oncology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) on the differentiation of umbilical blood mononuclear cells(UBMCs) to dendritic cells(DCs) for establishing the more convenient, faster and more economic in vitro culture method of DCs. **Methods** HUVEC was digested and isolated by collagenase. After identification and in vitro culture and amplification, HUVEC were tiled and grown in the bottom of Transwell plate. UBMCs were inoculated to Transwell small indoor, and at the same time protein antigen formed by EC9706 cell freezing and thawing was added and cocultured with HUVEC. UBMCs were closely contacted with HUVEC and migrated from Transwell upper chamber to the below chamber. The chamber cells were collected under Transwell plate. The dendritic cells related surface marker CD83, CD80, CD40, CD1a and MHC molecules were detected by the flow cytometry. The MTT assay was adopted to detect the specific target cell killing effect of cytotoxic T lymphocyte(CTL) induced by tumor-oated UBDC. **Results** After induction of HUVEC and loading the tumor cell antigen, DC CD80, CD40, CD83, CD1a and MHC-II molecules expression were increased, generated CTL could specifically kill esophageal cancer cells EC9706, its killing rate to EC9706 had no statistical difference compared with that of CTL activated by cytokine-induced DC ($P > 0.05$). **Conclusion** Using Transwell chamber primary HUVEC for inducing the differentiation of UBMC to DCs is a feasible experimental method.

Key words: dendritic cell; umbilical vein endothelial cells; umbilical blood mononuclear cells

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前已知体内最强大的专职抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC), DC 能有效的活化 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞(CTL),产生体内外的抗肿瘤效应,在肿瘤细胞免疫和体液免疫中均发挥重要作用,以肿瘤抗原负载的 DC 疫苗已应用于不少肿瘤特别是黑色素瘤等的临床或临床前期研究中^[1-3]。DC 前体在体内分布广泛,如血液以及肝、脾、淋巴结、肺、肾等组织间质中,但含量甚低,约占外周血单个核细胞总数的 0.5%~1.0%^[4]。DC 前体体外培养需要多种细胞因子的联合作用,造价较为昂贵,寻找更有效的 DC 体外培养、扩增、诱导方法,是发展基于 DC 肿瘤生物治疗的技术关键之一^[5]。本研究在 Transwell 小室上以人脐静脉内皮细胞为介导诱导人脐血单个核细胞(UBMCs)的培养 DC 的方法,从而提供一种更为便捷和经济的体外培养 DC 的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脐带与脐血来源 脐带与脐血采自健康足月分娩的产妇,并经本人知情同意和医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂与仪器 血管内皮细胞生长因子(VEGF)购自美国 PeproTech 公司,胰蛋白酶购自北京鼎国生物技术有限公司,免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司,鼠抗人 MHC-II、CD40、CD80、CD83、和 CD11a 的 mAb、FITC-羊抗鼠 IgG 购自美国 Ancell 公司,食管癌细胞 EC9706 由郑州大学医学院病理生理学教研室提供, FACSscan 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 UBMCs 的分离 将脐血用等量磷酸盐缓冲液(PBS)

稀释,缓慢加至淋巴细胞分层液(比重 1.077)上,2 500 r/min 离心 25 min,取中间白色的单个核细胞层,裂解红细胞后用 PBS 1 500 r/min 15 min 洗 3 次。胎蓝拒染法计数活细胞。

1.2.2 HUVEC 分离、培养和鉴定 无菌条件下取脐带 15 cm 左右,用 0.1% 胶原酶 II 充盈后,37 °C 孵育消化 13 min,1640 培养液冲洗静脉,收集消化液和冲洗液,1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞加入 1640 培养液,按 1×10^6 个细胞接种于 25 m^2 细胞培养瓶中,置于细胞培养箱中(5% CO_2 , 37 °C),24 h 更换培养液以去除未贴壁细胞,以后每隔 2 d 换液 1 次至细胞铺满瓶底。用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,取第 3 代细胞用于实验。原代脐静脉内皮细胞免疫组化鉴定。

1.2.3 HUVEC 诱导 UBDCs 将生长良好的 HUVEC 接种到 Transwell 培养板上层小室内,5% CO_2 37 °C 静置培养 24 h。将 UBDCs 接种到 Transwell 上层小室内,使 UBDCs 与 HUVEC 充分接触并穿过 HUVEC 向下层移行。取下室细胞进行鉴定和功能分析。

1.2.4 食管癌 EC9706 细胞冻融蛋白抗原的制备和 UBDCs 抗原负载 取常规传代生长良好的 10^8 个 EC9706 细胞,在 1 mL PBS 液中经 -196 °C 液氮和 37 °C 反复冻融使细胞裂解,10 000 r/min 离心 20 min,取上清作为肿瘤抗原。每毫升 UBDCs 细胞培养液中加入肿瘤抗原 100 μ L,继续培养 2 d,作为抗原负载 UBDCs 组,收集细胞照相、检测。同时设不加肿瘤抗原的对照组。

1.2.5 流式细胞术检测 UBDCs 相关表面标志 收集 Transwell 小室下层的细胞分别加入鼠抗人 MHC-II、CD40、CD80、CD83、和 CD11a 的 mAb,室温孵育 30 min,PBS 洗 2 次,弃上清加入 FITC-羊抗小鼠 IgG 工作液室温避光孵育 30 min PBS 洗两次,再加入 1 mL PBS,以同型荧光染色 Ig 作为对照调节电压,PBS 做阴性对照,FCM 进行检测。

1.2.6 UBDCs 诱导 T 细胞增殖和 CTL 活性分析 T 细胞与 UBDCs 来自同一份脐血,将分离出的脐血单个核细胞经尼龙毛柱法分选出 T 细胞。在 96 孔细胞培养板中将 UBDCs 与 T 细胞以 1:10 的比例加入抗原负载组 DC 或对照组 DC,在 T 细胞培养液中 5% CO_2 37 °C 孵育 44 h,每孔加入 MTT(5 mg/mL)10 μ L,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入二甲亚砷溶解细胞内颗粒,在酶标检测仪上于波长 570 nm 处测定吸光度(A)值,根据各孔吸光度值计算刺激指数(SI)。SI=实验组的 A 值/对照组的 A 值。以食管癌细胞 EC9706 作为靶细胞,按效靶比为 20:1 加入效应细胞(UBDCs 诱导的 CTL),并设效应细胞对照组和靶细胞对照组用酶标仪与波长 570 nm 检测测定 A 值。T 细胞的杀伤活性=[靶细胞对照组的 A 值-(实验组的 A 值-效应细胞对照组的 A 值)]/(靶细胞对照组的 A 值) \times 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验进行比较,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 HUBEV 的形态与鉴定 从人脐静脉分离的 HUBEV 呈扁平贴壁生长,经免疫组化染色 VIII 因子阳性,证实为血管内皮细胞,见封 3 图 1。

2.2 HUVEC 在 Transwell 板上室底部生长及 UBDCs 的诱导 从封 3 图 2 可见 HUVEC 均匀平铺于 Transwell 板上室底部,底部有孔径 5 μ m 的膜,UBDCs 与 HUVEC 紧密接触缓慢穿过 5 μ m 小孔进入下室,封 3 图 3 显示下室中细胞形态,呈现出多形性,可见毛刺样突起,并可见细胞增殖形成的细胞团。

2.3 UBDCs 的膜标志 分别将 HUVEC 诱导前后、及负载肿

瘤抗原前后的 UBDCs 进行膜标志的流式细胞术分析,结果见表 1。

表 1 HUVEC 诱导前后、负载抗原前后 UBDCs 的膜标志($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

指标	诱导前	诱导后(负载抗原前)	负载抗原后
HLA-DR	8.10 \pm 2.25	35.55 \pm 5.79	48.69 \pm 9.33
CD40	6.23 \pm 3.01	29.72 \pm 10.02	41.77 \pm 11.52
CD80	2.17 \pm 0.92	23.93 \pm 7.86	50.30 \pm 15.09
CD83	1.06 \pm 0.66	15.56 \pm 3.73	47.21 \pm 6.32
CD11a	4.76 \pm 1.25	19.26 \pm 5.18	33.04 \pm 9.56

注:各项指标诱导后比诱导前、负载抗原后比负载抗原前均提高($P < 0.01$)。

2.4 UBDCs 促进 T 细胞活化增殖和 CTL 效应 在 UBDCs 与 T 细胞按 1:10 比例共孵育,48 h 后 MTT 法检测 T 细胞增殖,结果显示负载抗原前、后的 UBDCs 均能刺激 T 细胞增殖,两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。但负载抗原后的 UBDCs 对 EC9706 细胞的杀伤率显著高于未负载抗原的 UBDCs,见表 2。

表 2 UBDCs 刺激 T 细胞增殖和 CTL 对 EC9706 的杀伤活性($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

项目	负载抗原前	负载抗原后
T 细胞增殖	1.05 \pm 0.12	1.13 \pm 0.09
CTL 对靶细胞杀伤	11.67 \pm 3.27	41.25 \pm 10.63*

*: $P < 0.01$,与负载抗原前比较。

3 讨 论

肿瘤生物治疗是目前肿瘤治疗的重要辅助手段,DC 因具有强大的抗原提呈能力和活化 T 细胞能力,已应用于多种肿瘤的治疗^[6]。但 DC 的来源和体外扩增的数量一直是影响 DC 疫苗疗效的因素之一。寻找更丰富的 DC 来源、探寻新的 DC 诱导、培养、扩增方法也成为肿瘤生物治疗的重要课题。

目前,体外培养诱导 DC 多以单核细胞在外源性生长因子粒细胞集落刺激生物因子(GM-CSF)和白细胞介素 4(IL-4)共同作用下诱导分化为不成熟 DC,并在某些外来因素刺激下进一步分化为成熟 DC^[7]。但细胞因子诱导的 DC 因不能复制体内外周循环血的生理环境,与体内形成的 DC 特性有较大差异。本文根据美国 Brian 等^[8]报道的体外诱导 DC 的方法,在本室建立了利用 Transwell 培养板贴附的人 HUVEC 诱导 UBDCs 分化为 DC 的方法,在培养板上模拟了外周血单核细胞在体内穿越血管壁进入组织的模式。脐血来源方便、供方无痛苦,组织相容性好,并且脐血中含有大量的干细胞和祖细胞,特别 DC 的前体细胞 CD34⁺ 细胞。有研究显示,脐血来源的 DC 自身就能杀灭肿瘤细胞,经过肿瘤细胞抗原负载后更具杀伤活性。另外,在 Randolph 等^[9]实验中首先构建了这样的模型结构,在内皮细胞下铺胶原蛋白或明胶为基质,单个核细胞穿过内皮细胞完成 DC 和巨噬细胞的分化后,DC 会逆向移行穿过至内皮细胞回到培养基中,而巨噬细胞则被留在基质下,完成两种细胞的分离。在本实验中,用到 Transwell 装置更容易把两种细胞收集在下室,并且很容易把两种细胞分开,比起利用基质更方便。本结果和他们的也相似,所得到的细胞通过鉴定具有典型 DC 的特征。在整个诱导过程中不需要添加外源性细胞因子,诱导形成的 DC 更接近生理环境下的 DC 特性。研究发现内皮细胞和单核细胞的相互作用可以促进肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 等的分泌增加。除了 TNF- α 和 IL-1 β ,两种细胞相互作用还有巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的表达,但是单独培养单核细胞和内皮细胞的上(下转第 359 页)

实际年龄转换为设置的年龄组以进行年龄特征描述。

5.3 数据调查补充 数据调查补充主要针对伤害特征属性数据,当前 HIS 中相关信息只在出院诊断、损伤与中毒原因诊断中有所体现,但满足不了伤害流行病学分析的需要。因此,本研究尝试通过对照 HIS 中的诊断信息、电子病历记录的方法,参考《伤害监测指南》和我国“医院伤害监测报告卡”的相关分类内容,逐个提炼并标准化病例的伤害性质、伤害部位信息。如出院诊断是“股骨干骨折”,提炼标准化后的伤害性质是“骨折”,伤害部位为“下肢”。

6 讨 论

该研究旨在提供一种挖掘现有业务历史资料对伤害类病例进行深入分析的方法。之前,国家和军队也开展了许多相关的研究^[9-10],其方法主要是通过进行现场问卷调查、医院急诊监测和住院病历信息整理再处理等方法,信息采集耗费人力、物力。HIS 业务数据库中信息的电子化存储方式便于加工整理、易于获得,且涵盖了医疗费用、住院时间等医疗资源消耗方面的信息,为开展伤害研究提供了一个新的思路。然而,由于当前的 HIS 设计初始没有考虑伤害监测功能,加之各单位 HIS 的应用情况不尽相同,致使信息有选择性偏移,这需要通过系统的改造与重建来完善。

本研究运用数据挖掘的有关思想和技术,立足于“军卫一号”医院信息系统,通过体系框架设计、表结构设计、多维数据模型设计和数据抽取集成等过程构建了伤害住院病例流行病学分析主题数据库。将主题数据库的应用引入到伤害住院病例监测工作中有其积极意义,既扩展了 HIS 业务数据的应用模式,也提高了伤害监测工作的效率。目前,国内已有解放军总医院、重庆医科大学等多家单位对数据挖掘技术在医院信息利用方面做了积极探索与实践^[11-13],但未发现利用数据挖掘技术对“伤害住院病例流行病学分析”进行研究的相关文献。本研究通过相关业务诊疗信息提取伤害特征信息的做法,为伤害特征研究提供了又一个思路,但其科学性需要进一步论证。通过利用本研究的方法对某综合性医院 HIS 数据库构建伤害住院病例流行病学分析主题数据库的实例分析,发现构造基于业务主题的星形模式多维模型,可以对业务数据进行多层次多

角度的分析,但数据挖掘方法和展现方式需要科学化、多样化。

参考文献:

- [1] Inmon WH. 数据仓库[M]. 王志海 译. 北京:机械工业出版社,2001.
- [2] 周炎涛,谢东,吴正国. 主题数据库技术的亲合性分析方法研究[J]. 计算机工程与应用,2005(12):168-170.
- [3] 张国庆,曹顺良,方焯,等. 基于构件的生命科学主题数据库构建方法[J]. 计算机应用研究,2007,24(6):12-14.
- [4] 刘丽华,曹秀堂,郝璐. 住院患者主题数据集统计集成与应用设计[J]. 中国医院,2007,11(12):8-12.
- [5] 刘玉,陈金雄. 病种分析主题数据仓库的建立[J]. 医学信息,2008,21(12):2141-2145.
- [6] Wong ST, Hoo KS Jr, Knowlton RC, et al. Design and applications of a multimodality image data warehouse framework[J]. J Am Med Inform Assoc,2002,9(3):239-254.
- [7] Han JW, Kamber M. 数据挖掘概念与技术[M]. 范明,孟小峰 译. 北京:机械工业出版社,2008:70-81.
- [8] 蒋伟进,唐代喜,刘青宝. 面向主题的关系——多维数据模型建立与数据集市[J]. 微机发展,2003,13(6):74-76.
- [9] 李恣,李雨萍. 3 622 例道路交通伤害住院患者的疗效和转归分析[J]. 疾病控制杂志,2007,11(4):383-385.
- [10] 沈敏,刘筱娟. 1 444 例女性伤害患者住院时间的影响因素分析[J]. 中国医院统计,2005,12(2):115-117.
- [11] 曹秀堂,郝璐,刘丽华. ODS 统计信息资源库的功能与应用[J]. 中国医院,2008,12(12):12-14.
- [12] 刘丽华,李昕,胡凯. 统计信息集成与管理决策支持系统概述[J]. 中国医院,2008,12(12):8-11.
- [13] 易静,苏新良,王润华. 决策树在乳腺癌高位淋巴结转移判别诊断中的应用[J]. 重庆医科大学学报,2009,34(8):606-609.

(收稿日期:2011-01-18 修回日期:2011-07-20)

(上接第 356 页)

清中却几乎没有 TNF- α 、IL-1 β 、M-CSF 的表达,故得出结论,单核细胞和内皮细胞之间的相互作用并非单纯的物理性接触,但其具体的刺激机制还需进一步验证。TNF- α 是维持和促进 DC 发育的最基本因子,并且可以阻止粒系细胞的分化,在诱导 DC 分化的过程也发挥举足轻重的作用。DC 的迁移能力是发挥其免疫功能的基础,在 DC 的趋化过程中发挥主要作用的是 CC 型趋化因子。DC 分化的不同阶段表达不同的趋化因子受体。成熟 DC 通过 CCR7 与 MIP-3 β (CCL19),淋巴组织趋化因子(SLC^[CCL21])等的结合调节自身运动^[10]。人脐静脉内皮表面有单核细胞趋化因子(MCP-1)表达,它与 DC 上的趋化因子受体 CCR2 结合,参与细胞的伸展与移出,介导了单核细胞穿过人脐静脉内皮细胞的运动。

本实验结果显示,用人原代脐静脉内皮细胞诱导脐血单核细胞,可以分化为具有典型 DC 形态、表型和功能的 DC,诱导后细胞表型标志 CD83、CD40、CD80、HLA-DR、CD1a 表达均显著增高,负载肿瘤细胞冻融抗原负载后,DC 各项表面标志表达进一步增加,且对肿瘤细胞的特异性杀伤活性比负载抗原前增加更为明显,说明负载肿瘤抗原后的成熟 DC 活化 T 细胞能力更强,是治疗肿瘤的主要 DC 来源。

脐静脉内皮细胞之所以能诱导 DC 形成,其机制可能与 HUVEC 膜表面表达的多种膜受体和分泌多种细胞因子有关,这种诱导 DC 形成的方法为 DC 的产生途径提供了新思路,怎样更充分的发挥其临床应用价值,尚需进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 祝和成,吴尚辉,黄柏英. 人 DC 与黑色素瘤细胞融合疫苗体外诱导特异性抗肿瘤 CTL[J]. 中南大学学报,2008,33(11):1672-7347.
- [2] 欧阳清,魏玉英,金伯泉. 肿瘤疫苗的作用机制及研究进展[J]. 第四军医大学学报,2008,29(19):1821-1824.
- [3] 袁婷婷,刘艳荣. 树突状细胞生物学研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(4):1074-1078.
- [4] 羨鲜,王永祥,孙树汗. 以树突状细胞为基础的肿瘤疫苗设计策略的研究进展[J]. 临床荟萃,2010,25(2):179-182.
- [5] 朱传东,郑勤,张金安. 树突状细胞在肿瘤免疫治疗中的应用与进展[J]. 实用癌症杂志,2011,26(1):108-110.
- [6] Wu YG, Wang L, Zhang YY. Dendritic cells as vectors for immunotherapy of tumor and application (下转第 361 页)

高浓度定值血清,在日立 7060 全自动生化分析仪上测定 5 次,取均值为靶值),每份样本以本法同时在酶标仪上测定 5 次,取均值与靶值比较,计算相对偏差率分别为 2.04%、0.68% 及 -1.88%,平均为 0.28%,在允许误差($\pm 5\%$)范围内。

2.3 精密度测定

2.3.1 批内精密度 取低、中、高值葡萄糖标准液,同时测定 15 次,计算 \bar{x} 、 s 和变异系数(CV),其均值分别为 2.10、4.97 和 15.23 mmol/L; s 分别为 0.05、0.08 和 0.13 mmol/L,CV 分别为 2.15%、1.64% 和 0.88%。

2.3.2 日间精密度 将上述 3 种标准液每天测定 1 次,同时测定 2 遍,共测定 8 d,计算 \bar{x} 、 s 和 CV,葡萄糖浓度均值分别为 2.07、4.88 和 15.31 mmol/L; s 分别为 0.08、0.10 和 0.16 mmol/L;CV 分别为 3.74%、2.10% 和 1.05%。

2.4 干扰性实验^[6] 参考 Fujita 等^[7] 用血清建立对照组和加入至少 3 个浓度的三酰甘油、血红蛋白、胆红素干扰物分别作为脂血、溶血、黄疸标本实验组,每组样品同时测定 3 次,计算干扰率,以可疑干扰物最大浓度的干扰率在 $\pm 3\%$ 内,未见明显干扰。由结果计算,当胆红素在 175.60 $\mu\text{mol/L}$ 时,干扰率为 2.52%;当三酰甘油浓度为 11.20 mmol/L 时,干扰率为 2.44%;当血红蛋白浓度为 7.34 g/L 时,干扰率为 2.69%,血清中加入上述物质及浓度均未见明显干扰。

2.5 体检筛查中的初步应用 运用本法及日立 7060 全自动生化分析仪检测 120 名体检者的血糖浓度,测定结果($\bar{x}\pm s$)如下:本法(5.47 \pm 2.37)mmol/L,全自动分析仪(5.41 \pm 2.31)mmol/L,回归方程:

$$Y=0.9619X+0.1503, r=0.9875, P>0.05.$$

结果显示,本方法与日立 7060 全自动生化分析仪测定结果差异无统计学意义,具有较好的一致性。

3 讨论

目前,多由临床大型生化仪器进行血糖检测,而多数基层和社区中小医院等卫生单位由于受经济、维修、试剂等种种条件的限制,至今尚未能普遍推广应用^[8];较为普及的半自动生化仪虽价格适中、体积微小,但在工作量较大时,不便于人群的筛查应用。

本方法使用实验室常用的微板、酶标仪^[9-10],通过对血糖测定试剂及方法进行改进,建立了能适应较大样本单项检测的微板干试剂葡萄糖氧化酶法,使微孔板中每孔均相当于一个待检标本反应池,可同时多标本检测,保证了试剂孵育时间和检测反应时间的基本一致,同时该法将试剂预先干燥好,测定时即拆即用,省去了添加液体试剂的繁琐,使操作步骤更为简单,小型医疗机构均可配备和使用。在本法研究中,作者将液体试剂加入 0.5% TBHBA 及 10 g/L 清蛋白,分别作为色原和赋形剂,直接冻干于 96 孔微板中,保持了试剂原本反应性能,也具有较好的复溶性。按照试剂与待检血清的反应比例 200:1 进行标本预

处理,由加样排枪从上述处理液中吸取 300 μL 加入微孔板内进行试剂复溶,并在水浴箱中孵育 10 min,结合临床常用酶标仪进行测定并计算输出结果。由实验结果表明,该干试剂在 1~24 mmol/L 范围内线性良好,在方法学评价中其准确性在允许偏差 $\pm 5\%$ 内,重复性 $CV<5\%$,干扰实验等均能满足检测的要求。同时作者用微板干试剂葡萄糖氧化酶法检测了 120 名体检者的血糖结果,与日立 7060 全自动生化分析仪测定结果具有较好的一致性($r=0.9875$),能够满足临床测定的基本要求。以上均说明该法能有效应用于临床的普查及初步诊断检测。

微板干试剂测定血糖方法虽然在检测的预处理以及试剂反应时间一致性的控制上可能会造成一些不可避免的误差,但基于基层医疗机构检验人员少、经济条件不好的情况下,本法试剂用量少、成本低,在经济实用的同时提高了小批量单项血糖检查工作的效率。在大力发展基层、社区医疗的今天,随着酶标仪广泛普及应用,该方法具有推广应用的价值。

参考文献:

- [1] Frenchik MD, McFaul SJ. A microplate assay for the determination of hemoglobin concentration[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1/2):199-201.
- [2] 王翰林. 干试剂在血糖血脂微量快速检测上的应用研究[J]. 四川医学, 2009, 30(9):1465-1467.
- [3] 刘琳琳, 王华忠, 吴杰红, 等. 以 TBHBA 为色原的唾液葡萄糖全自动分析法的建立及应用[J]. 重庆医学, 2006, 35(17):1552-1553.
- [4] Marion G, Hanns-Christian A, Klaus M. Freeze drying of human serum albumin (HSA) nanoparticles with different excipients[J]. Int J Pharm, 2008, 363(1/2):162-169.
- [5] 孙艳艳, 谢杰红. 便携式血糖仪的临床应用价值评估[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(10):1461-1462.
- [6] 李桂云. 标本溶血对 15 项生化检验结果的影响及分析[J]. 检验医学与临床, 2006, 3(4):164-165.
- [7] Fujita T, Kawakami Y, Kohda S, et al. Assay of magnesium in serum and urine with use of only one enzyme, isocitrate dehydrogenase (NADP+) [J]. Clin Chem, 1995, 41(9):1302-1305.
- [8] 潘德刚. 基层部队半自动生化分析仪使用现状及建议[J]. 医疗卫生装备, 2006, 27(1):76.
- [9] 张鹏. 微孔板速率法在丙氨酸氨基转移酶检测中的应用[J]. 现代检验医学, 2007, 22(6):60-61.
- [10] 桑胜云, 胡荣芬. 酶标仪微量酸碱法测定献血员血红蛋白[J]. 临床输血与检验, 2009, 2(3):49-50.

(收稿日期:2011-01-20 修回日期:2011-07-20)

(上接第 359 页)

for gastric cancer[J]. Cells Mol Immunol, 2004, 11(5):351-356.

[7] 刘婷, 华川. 树突状细胞抗肿瘤免疫的研究进展[J]. 重庆医学, 2009, 38(16):2090-2092.

[8] Brian CS, Donald R, Drake III. A novel approach for the generation of human dendritic cells from blood monocytes in the absence of exogenous factors[J]. J Immunol Methods, 2008, 335(1/2):53-64

[9] 张明顺, 张江全, 王慧娟. 内皮细胞穿越模型中系统性红

斑狼疮患者树突状细胞分化及功能状态的初步研究[J]. 中华风湿病学杂志, 2006, 10(1):18-21.

[10] Jung ID, Lee JS, Kim YJ, et al. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Immunology, 2007, 121(4):533-544.

(收稿日期:2011-03-10 修回日期:2011-08-30)