

文章编号 1006-8147(2014)06-0483-03

论 著

三种分离人外周血单核细胞方法的比较

陈 丹¹,王小东²,童静植²,丁 文²,孙 科²,何景华¹,强兆艳¹,李 光³,康 毅¹

(天津医科大学 1.基础医学院药理学教研室;2. 2009 级临床医学七年制;3.基础医学院生物学教研室,天津 300070)

摘要 目的:用3种方法从人外周血分离单核细胞,比较细胞纯度、得率、实验成本及所需时间,选择最适宜的分离方法。方法:用密度梯度离心法获得外周血的单个核细胞,分别用贴壁法、免疫磁珠法和流式细胞术法进一步分离单核细胞。经CD14抗体标记,用流式细胞术检测细胞纯度,计算细胞得率、实验成本及所需时间。结果:用贴壁法、免疫磁珠法和流式细胞术法分离单核细胞,细胞纯度分别为18.8%、80%和73.4%;细胞得率为5%、11%和7.5%;每获得 2×10^7 个单核细胞,实验成本约500元、1500元和2100元,实验耗时约6h、6h和10h。结论:免疫磁珠法是最适宜的分离人外周血单核细胞的方法,具有细胞纯度与得率较高,实验成本较低,耗时较短的优点。

关键词 单核细胞;贴壁法;免疫磁珠;流式细胞术

中图分类号 R446

文献标志码 A

Comparison of three methods of separating human peripheral blood mononuclear cells

CHEN Dan¹, WANG Xiao-dong², TONG Jing-zhi², DING Wen², SUN Ke², HE Jing-hua¹, QIANG Zhao-yan¹, LI Guang³, KANG Yi¹

(1. Department of Pharmacology; 2. Clinical Seven-years Students, Grade 2009; 3. Department of Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To separate monocyte from human peripheral blood based on cell purity, cell yield rate, experiment cost and the time required. **Methods:** Peripheral blood mononuclear cells were obtained via density gradient centrifugation method. Then the adherent method, immune magnetic beads method and flow cytometry method were used to separate monocyte from peripheral blood mononuclear cells. Cell purity was detected by flow cytometry after being marked with CD14 monoclonal antibody. Cell yield rate, experiment cost and the time required were calculated. **Results:** The cells purity was 18.8% by adherent method while cells purity was 80% and 73.4% respectively indicated by immune magnetic beads and flow cytometry methods. The cell yield rates were 5%, 11% and 7.5%, respectively. The experiment costs were about 500 yuan, 1500 yuan and 2100 yuan every 2×10^7 mononuclear cells while the time required for experiment were about 6 h, 6 h and 10 h, respectively. **Conclusion:** Immune magnetic beads method is the most appropriate method to separate monocyte, with the advantages of higher cell purity and yield rate, lower experiment cost and shorter time as compared with other methods.

Key words monocyte; adherent separation method; immune magnetic beads separation; flow cytometry separation

单核细胞可以分化为树突状细胞和巨噬细胞,是开展树突状细胞和巨噬细胞相关研究的重要前体细胞。单核细胞由多能造血干细胞分化而来,在骨髓中发育,并进入血液,停留2~3d后再迁移到周围组织中。因此,外周血可成为获取单核细胞的重要来源。通常情况下,单核细胞仅占外周血细胞的3%~8%,且独立的细胞株难以获得。目前常用的分离单核细胞的方法包括贴壁法、免疫磁珠法和流式法^[2-4]。因此,如何获得理想的单核细胞是开展相关实验研究的关键。本研究以人的外周血为来源,通

过比较细胞得率、细胞纯度、实验成本以及实验耗时,选择最适宜的分离单核细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂 人外周血浓缩白细胞(天津市血液中心提供),人CD14免疫磁珠试剂盒(Miltenyi Biotec,德国),CD14⁺-FITC单克隆抗体(Miltenyi Biotec,德国),RPMI-1640培养基(Hyclone,美国),人淋巴细胞分离液(北京达科为生物公司,中国),青链霉素混合液(北京索莱宝科技,中国),其它所用化学试剂均为分析纯。

1.2 分离单核细胞

1.2.1 分离单个核细胞 将浓缩白细胞与1640培养基1:1比例稀释,混匀。往15 mL离心管中加入5 mL人淋巴细胞分离液,将白细胞稀释液以2:1比例轻轻加到分离液表面,使分界线清晰。2 200 r/min在

基金项目 国家高技术研究发展计划(863计划)第八课题组子课题(2012AA021003)

作者简介 陈丹(1980-),女,副教授,博士,研究方向:中药药理学;
通信作者:李光, E-mail: lig@tjmu.edu.cn, 康毅, E-mail: 13902075982@163.com。

4℃离心20 min(湘仪L420,湘潭湘仪仪器有限公司,中国)。吸出血清和分离液之间的白膜层,用1640培养基洗涤3~4次,充分吹打成单细胞悬液,40 μm细胞筛过滤,收集滤液。1 000 r/min再离心5 min,1640培养基重悬,即获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)^[5]。

1.2.2 贴壁法 将PBMC置于含有RPMI-1640培养基的培养皿中,于37℃,含5% CO₂的细胞培养箱(Thermo electro corporation CLASS 100,美国)中孵育2 h。待单核细胞贴壁后,吸弃上层悬浮细胞,PBS缓冲液轻轻洗涤3遍,加入少量RPMI-1640培养基,用细胞刮刀刮下贴壁细胞。1 000 r/min离心5 min,弃上清。

1.2.3 免疫磁珠法

1.2.3.1 磁珠与特异性靶细胞-单核细胞结合^[6]:每1×10⁸个PBMC加入200 μL偶联CD14抗体的磁珠和800 μL缓冲液(含有10%的牛血清白蛋白2.5 mL和2 mol/L EDTA 0.5 mL,4℃冰箱预冷),在15 mL离心管中充分混匀,4℃孵育15 min,中间可轻微振荡1次。15 min后取出离心管,每1×10⁷个细胞加入1~2 mL预冷缓冲液,1 000 r/min,离心8 min,弃上清,加入0.5 mL缓冲液并吹打成单细胞悬液。

1.2.3.2 收集磁珠标记的单核细胞:将细胞分离柱置于MACS磁力架上,加入1 mL缓冲液平衡细胞分离柱,待无液体滴下,立即将上述细胞悬液加入细胞分离柱中,用0.5 mL缓冲液冲洗细胞分离柱3次。待冲洗完毕后,加入1 mL缓冲液,从磁力架中移出细胞分离柱,用针柱快速推动,冲出在分离柱中与CD14抗体-磁珠相结合的细胞,即为CD14⁺的细胞。

1.2.4 流式细胞术法

1.2.4.1 CD14标记^[7]:取PBMC,用缓冲液(含有

10%的牛血清白蛋白2.5 mL和2 mol/L EDTA 0.5 mL)调整细胞密度为1×10⁸/mL。在每毫升细胞悬液中加入CD14⁺-FITC抗体100 μL,4℃避光标记18 min,再向离心管中加入1 mL流式缓冲液以终止染色,PBS洗涤3次,用含2%青链霉素的PBS调整细胞密度为2×10⁷/mL。

1.2.4.2 流式细胞仪分选:将制备的细胞在流式细胞仪(BD FACS Aria II,美国)上分选。根据CD14抗体的荧光强度、细胞的相对大小以及细胞的相对颗粒性和内部结构的复杂性,收集CD14⁺的细胞^[8]。

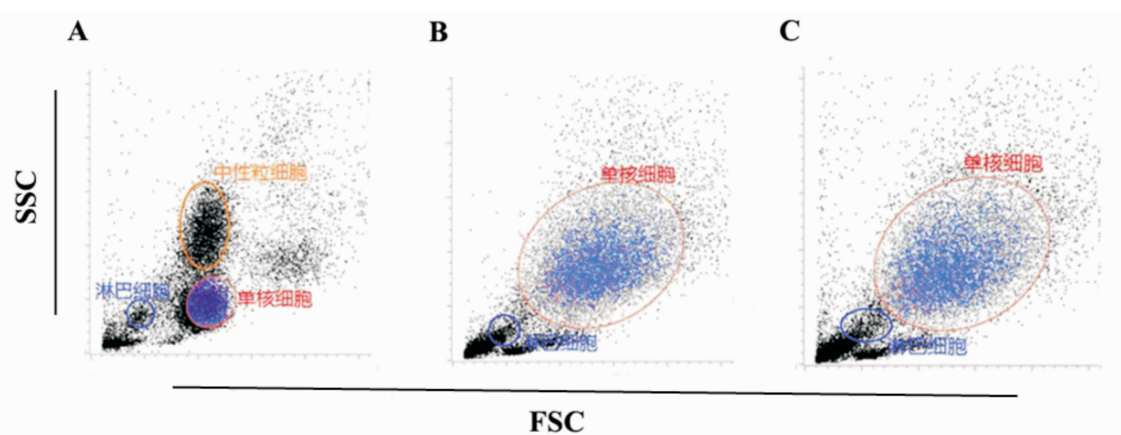
1.3 单核细胞纯度 分别收集贴壁法、免疫磁珠法和流式细胞术法获得的细胞,调整细胞密度为1×10⁷/mL。在100 μL的细胞悬液中加入CD14⁺-FITC抗体10 μL,4℃避光标记10 min,再加入1~2 mL PBS缓冲液以终止染色,PBS洗涤3次,上流式细胞仪,在488 nm处激发荧光,计算阳性细胞的百分率^[9-10]。

2 结果

2.1 细胞纯度比较 在贴壁法获得的细胞中,单核细胞含量较少,为18.8%,其余的细胞主要是淋巴细胞和中性粒细胞。而通过免疫磁珠法和流式细胞术法分离得到单核细胞纯度高,分别为80%、73.4%,另外还有淋巴细胞以及少量的单核细胞(图1)。

2.2 细胞得率比较 每获得2×10⁷个单核细胞,贴壁法需要4×10⁸个PBMC,得率约5%;免疫磁珠法需要1.8×10⁸个PBMC,得率在11%左右;流式分选法需要2.6×10⁸个PBMC,得率在7.5%左右。

2.3 实验成本比较 在采用贴壁法、免疫磁珠法和流式细胞术法分离单核细胞的过程中,使用的试剂、耗材与仪器主要有浓缩白细胞悬液、1640培养基、淋巴细胞分离液、细胞筛、离心管、培养皿、低温离心机。此外,贴壁法还需要使用细胞刀,总计实验



SSC:侧向散射光信号,FSC:前向散射光信号

图1 3种方法获得的单核细胞纯度比较

Fig 1 Comparison of cell purities of monocyte obtained from the three methods

成本约 500 元;免疫磁珠法还需要使用 CD14⁺免疫磁珠试剂盒,总计成本约 1 500 元。流式细胞术法还需要使用 CD14 抗体、流式细胞分选仪以及专业技术人员进行实验操作,总计成本约 2 100 元。

2.4 耗费时间比较 获得 PBMC 需要经过密度梯度离心,3~4 次洗涤充分细胞并制备成单细胞悬液,大约需要 4 h。然后从 PBMC 中进一步分离出单核细胞,贴壁法还需经过贴壁孵育,用细胞刀刮下贴壁细胞,细胞过滤这些过程,总计需要大约 6 h;免疫磁珠法还需要将 PBMC 过滤,充分吹打成单细胞悬液,再上磁柱分离,总计需要约 6 h;流式细胞术分选还需要将 PBMC 过滤,充分吹打成单细胞悬液,标记 CD14 抗体和上流式细胞仪分选,总计需要约 10 h。

3 讨论

研究发现,通过贴壁法分离单核细胞,虽然耗时短、成本低,但是细胞的纯度和得率均比较低。因此,贴壁法可应用于实验研究的预试阶段。当实验对所需细胞的纯度要求高,且需要的细胞量较大时,则应该选择免疫磁珠法和流式细胞术法。但和免疫磁珠法相比较,流式细胞术分离法有一些不足之处:(1)耗费时间较长,每小时仅能分选 $(3\sim4)\times 10^7$ 个单个核细胞;(2)细胞得率较低;(3)实验成本较高,需要细胞分选仪器和专业技术人员操作。因此,当开展对细胞纯度要求高的实验研究时,可选择细

胞纯度和得率较高、操作相对简单且耗时和成本较低的免疫磁珠法来分离单核细胞。

参考文献:

- [1] Sanchez-Torres C, Garcia-Romo G S, Comejo-Cortes M A, et al. CD16⁺ CD16⁻ human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD14⁺ T cells [J]. *Int Immunol*, 2001, 13(12): 1571
- [2] 马斌,曲萍,张秀敏.连续贴壁法分离培养人外周血来源树突状细胞及其超微结构的观察[J]. *现代肿瘤医学*, 2007, 15(3): 0301
- [3] 吴鹏,刘映峰,梁东辉,等.提高人外周血单核细胞分离率的方法讨论[J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(5): 707
- [4] 陈媛,巩伟丽,湛小燕,等.应用流式细胞分选技术分离人外周血原代单核细胞[J]. *科学技术与工程*, 2012, 12(24): 5985
- [5] 韩亚萍,刘源,章莉莉,等.外周血单核细胞的分离方法探讨[J]. *中华现代临床医学杂志*, 2003, 1(9): 780
- [6] 刘剑雯,曾志勇,陈君敏.人外周血耐受性树突状细胞的诱导培养及其 DC-STAMP 的表达研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, (5): 474
- [7] 徐勇,霍梅.免疫磁珠分离及流式细胞仪分选纯化外周血 CD34⁺/CD90⁺干细胞[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(4): 246
- [8] 郭陈智,史桂英.流式分选仪 FACS Aria II 分选 GFP 阳性乳腺癌 MCF-7 细胞株的条件优化研究[J]. *上海交通大学学报*, 2013, 33(1): 127
- [9] 张玮玮.流式细胞术的发展、原理及临床应用[J]. *当代医学*, 2008, (2): 25
- [10] 张锦英,束永前.流式细胞术的工作原理及临床应用[J]. *中国生化药物杂志*, 2003, 24(6): 308

(2014-05-16 收稿)

(上接第 468 页)

主动脉内平均增强 CT 值小于 A、B 两组,主动脉血管与周围组织的对比度欠佳,但其 CT 值仍然能达到 200 HU 以上,完全可以重建出边缘非常光滑、锐利的三维图像,使血管疾病的诊断一目了然,不影响疾病的治疗,更有利的是 C 组的吸收剂量较 A、B 两组下降了约 50%。

总之,应用 64 排 CT 进行主动脉血管检查时,使用 50 mL 对比剂以及 80 kV 管电压仍然能够满足诊断需要,从而降低患者注药风险和辐射吸收剂量,对临床检查有一定的指导意义,建议采用。

参考文献:

- [1] Bae K T, Heiken J P, Brink J A. Aortic and hepatic contrast medium enhancement at CT. Part II. Effect of reduced cardiac output in a porcine model[J]. *Radiology*, 1998, 207(3): 657
- [2] Hittmair K, Fleischmann D. Accuracy of predicting and controlling time-dependent aortic enhancement from a test bolus injection[J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2001, 25(2): 287
- [3] Szucs-Farkas Z, Schibler F, Cullmann J, et al. Diagnostic accuracy of pulmonary CT angiography at low tube voltage: intraindividual

comparison of a normal-dose protocol at 120 kVp and a low-dose protocol at 80 kVp using reduced amount of contrast medium in a simulation study[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2011, 197(5): W852

- [4] Szucs-Farkas Z, Schaller C, Bensler S, et al. Detection of pulmonary emboli with CT angiography at reduced radiation exposure and contrast material volume: comparison of 80 kVp and 120 kVp protocols in a matched cohort[J]. *Invest Radiol*, 2009, 44(12): 793
- [5] Huda W, Ogden K M, Khorasani M R. Converting dose-length product to effective dose at CT[J]. *Radiology*, 2008, 248(3): 995
- [6] Sahani D V, Kalva S P, Hahn P F, et al. 16-MDCT angiography in living kidney donors at various tube potentials: impact on image quality and radiation dose[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2007, 188(1): 115
- [7] Kalva S P, Sahani D V, Hahn P F, et al. Using the K-edge to improve contrast conspicuity and to lower radiation dose with a 16-MDCT: a phantom and human study[J]. *J Comput Assist Tomogr*, 2006, 30(3): 391
- [8] Szucs-Farkas Z, Kurmann L, Strautz T, et al. Patient exposure and image quality of low-dose pulmonary computed tomography angiography: comparison of 100- and 80-kVp protocols[J]. *Invest Radiol*, 2008, 43(12): 871

(2014-03-13 收稿)