

· 技术交流 ·

采用纤维连接蛋白结合法分离 人外周血单核细胞^①

侯凡凡^② 叶任高

(中山医科大学肾脏研究所, 广州, 510080)

提 要 利用人单核细胞表面有纤维连接蛋白受体的特点, 我们建立了一种分离、纯化人外周血单核细胞的方法。该法制备的细胞悬液单核细胞占 97% 以上, 纯度明显优于 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法。单核细胞获得率近 5 倍于传统粘附法, 且细胞活性保持在 97% 以上, 是一种分离人外周血单核细胞的简单而有效的方法。

关键词 单核细胞; 纤维连接蛋白; 分离技术

中图分类号 R446.8

医学科研和临床实验诊断时常需从人外周血中分离单核细胞。以往多根据单核细胞的功能特点(粘附)或物理性质(密度)进行分离, 而这些方法都存在一些共同缺点, 如单核细胞获得率偏低, 细胞活性易受影响以及常有其他细胞, 尤其是淋巴细胞的污染等^[1]。目前已证实, 单核细胞膜表面有纤维连接蛋白(FN)受体, 可以在有镁离子存在的条件下与 FN 可逆地结合^[2]。根据这一特点, 我们建立了一种有效的从人外周血中分离、纯化单核细胞的方法。

1 材料与方 法

1.1 FN 结合法分离人外周血单核细胞

1.1.1 单个核细胞悬液的制备 用肝素抗凝的新鲜全血, 取出血浆 10ml, 其余全血用 Hanks 液按 1:1 稀释。用 Ficoll-Hypaque($d=1.077$)密度梯度离心获得单个核细胞。将细胞重悬于含 20% 新生牛血清(NBS)的 RPMI 1 640(flow laboratories)中, 调整细胞

浓度至 $2 \times 10^6/\text{ml}$; 留取的血浆离心 $\times 200g$, 15min 以除去血小板, 备用。

1.1.2 FN 包被培养瓶的制备 将 2% 明胶(Fluka)溶液 10ml 置于容量为 25ml 的塑料培养瓶中, 37℃ 温育 2h, 吸去明胶溶液, 置 37℃ 干燥、贮存。包被用的 FN 来自两种途径: ①提纯的人 FN 由南京军区总医院免疫科提供。用前用 pH 7.4 PBS 稀释成 2.5mg/10ml。②以上述去血小板的自体血浆作为 FN 的来源, 将 FN 溶液或自体血浆 10ml 加入经明胶处理的培养瓶, 37℃ 温育 60min, 吸去瓶中液体, 用 pH 7.4 PBS 洗 1 次, 置 37℃ 备用。

1.1.3 单核细胞的分离 将上述单个核细胞悬液 15ml 加入 FN 包被的培养瓶中, 在 37℃、湿度饱和、5% CO₂ 温箱中孵育 60min, 弃去非粘附细胞, 用 37℃ 预温的 20% NBS-RPMI 1 640 轻轻洗 2 次, 加入 10ml EDTA 溶液(10mmol/L EDTA, 用 pH 7.4 不含钙、镁的 PBS 配制, 用前以 20% NBS-RPMI 1 640 按 1:1 稀释), 37℃ 放置 15min, 使粘

① 国家教委博士点基金资助课题;

② 第一作者, 41 岁, 女, 博士研究生, 现在第一军医大学南方医院肾病实验室(教授), 广州, 510515

附细胞脱落。收集细胞,用20%NBS-RPMI 1640洗2次,将细胞重悬于上述营养液中。

1.2 其他方法分离人外周血单核细胞

1.2.1 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法

同前述的单个核细胞悬液的制备。

1.2.2 单纯粘附法 将Ficoll-Hypaque 密度梯度离心分离的单个核细胞悬液15ml(2×10^6 细胞/ml)加入37℃预温的容量为25ml的塑料培养瓶中,37℃、湿度饱和、5% CO₂ 温箱中孵育60min,弃去非粘附细胞,用37℃预温的20%NBS-RPMI 1640洗2次,再加入上述EDTA溶液10ml,并用橡皮刷轻刮培养瓶底部,使粘附细胞脱落。洗涤细胞,重悬于20%NBS-1640中。

1.3 分离细胞的鉴定及分离效果的比较

取3例健康献血员的新鲜肝素抗凝全血,每例血样品分别按上述3种方法分离单

核细胞,获得的细胞分别计数,调整细胞浓度使均为 2×10^6 ml。按文献方法^[3]用非特异酯酶染色加氟化钠抑制试验确定单核细胞所占的百分比,从单个核细胞悬液中获取的单核细胞比例按下列公式计算:粘附细胞中酯酶阳性(E⁺)细胞数/单个核细胞中E⁺细胞数 $\times 100$ 。淋巴细胞所占的比例用抗人CD₃单克隆抗体(军事医学科学院)作APAAP法染色(药盒由军事医学科学院提供)确定。活性细胞比例用台盼蓝拒染试验测定。所有确定细胞比例均计数200个细胞/次,取2次计数的平均值表示。

2 结果

用FN结合法分离单核细胞的效果及与其它两种分离方法的比较见附表。

附表 3种方法分离人外周血单核细胞的效果比较¹⁾

	FN结合法		Ficoll-Hypaque	粘附法
	自体血浆包被	纯化FN包被	离心法	
单核细胞获得率				
50ml全血中获得的单核细胞数($\times 10^6$)	9.0 \pm 0.1 ²⁾	9.6 \pm 0.1 ²⁾		1.9 \pm 0.1
从单个核细胞中获得的单核细胞%	71.0 \pm 2.0 ³⁾	75.0 \pm 2.0 ³⁾		16.0 \pm 4.0
单核细胞纯度				
单核细胞%	97.0 \pm 1.0 ⁴⁾	99.0 \pm 1.0 ⁴⁾	26.0 \pm 3.0	96.0 \pm 2.0
淋巴细胞%	0	0	65.0	2.0
单核细胞活性%	98.0	97.0	98.0	80.0

1)数据为 $\bar{x} \pm s$, $n=3$, 检验方法用成组比较 t 检验; 2)与粘附法相比, $P < 0.01$; 3)与粘附法相比, $P < 0.05$; 4)与离心法相比, $P < 0.05$

用FN结合法制备的细胞悬液97%以上酯酶阳性,且能被氟化钠完全抑制,表明其为单核细胞。该细胞悬液基本不含淋巴细胞,纯度明显优于Ficoll-Hypaque离心法。用FN结合法分离单核细胞,每50ml全血能获得 9.0×10^6 以上的细胞,单个核细胞悬液中70%以上的单核细胞能被收集。其单核细胞的获得率近5倍于单纯粘附法,且对细胞活

性无明显影响。用自体血浆作为FN的来源与用纯化的FN相比,在单核细胞获得率和纯度上无明显差异($P > 0.05$),但用自体血浆包被的培养瓶分离细胞时,血小板的污染比单纯粘附法减少2/3,而用纯化FN包被的培养瓶分离时,细胞制备物中基本看不到血小板。

3 讨 论

目前常用的分离外周血单核细胞的方法主要为 Ficoll-Hypaque 离心法和单纯粘附法。用前一种方法制备的细胞悬液单核细胞的比例不高,据本文资料,仅 26% 具有单核细胞的特征;后一种方法最大的问题是粘附的单核细胞不易从塑料表面脱落,用橡皮刷刮离不仅细胞获得率低,且细胞活性也受影响。单核细胞通过膜表面的 FN 受体与 FN 包被表面结合具有特异性,这一过程依赖于镁离子的存在,故在 EDTA 溶液中,单核细胞很容易自 FN 包被表面脱落。因此用 FN 结合法分离单核细胞,既有理想的纯度,又明显提高了细胞活性和获得率,分离效果优于传统方法。

用自体血浆作为 FN 的来源或用纯化的人 FN 包被分离的单核细胞,细胞获得率、细胞纯度和细胞活性均相近。前者来源方便,无需购买或制备特殊试剂,但在某些情况下,如需分离慢性肾衰、癌肿等患者的单核细胞时,由于这些病人自体血浆中所含的 FN 明显减少^[4,5],此时,选用纯化的人 FN 包被可能更为适宜。此外,用纯化的人 FN 包被时血小板

的污染更为减少。

FN 结合法方法简单,在 2h 内便可制备大量 FN 包被培养瓶。明胶处理的培养瓶在 37℃ 可以贮存 1 个月左右。因此我们认为,本方法是一种分离人外周血单核细胞的简便而有效的技术。

参 考 文 献

- 1 Ackerman SK, Douglas SD. Purification of human monocytes on microexudate-coated surfaces. *J Immunol*, 1978, 120 : 1372
- 2 Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, et al. Receptors for cold insoluble globulin (plasm fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med*, 1981, 153 : 42
- 3 Mampaso FM. Characterization of inflammatory cells in auto-immune tubulointerstitial nephritis in rats. *Kidney Int*, 1983, 23 : 448
- 4 侯凡凡,张训,张真,等.慢性肾衰和透析病人的纤维连接蛋白. *中华内科杂志*, 1988, 27 : 348
- 5 Choate JJ, Mosher DF. Fibronectin concentration in plasm with breast cancer, colon cancer, and acute leukaemia. *Cancer*, 1985, 51 : 1142

(1993-09-10 收稿 1994-04-01 修回)

USE OF FIBRONECTIN BINDING METHOD FOR ISOLATING HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES

Hou Fanfan Ye Rengao

(Renal Research Institute, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

A simple and efficient method of monocyte separation was developed based on the fact that fibronectin receptors are present on the membrane of human monocytes. The percent of monocytes was beyond 97% in cells obtained by this method, it was significantly high than that obtained by Ficoll-Hypaque centrifugation. The yield of monocytes was 5 times more than that with classical adherence method, and the cell viability was always excellent (> 97%). We concluded that this method is a simple and useful technique in separating human peripheral blood monocytes.

Key words monocyte; fibronectin; separating technique