

• 论 著 •

# 利用流式监控高质量小鼠脾细胞的制备\*

李敏惠<sup>1</sup>, 刘 阳<sup>1</sup>, 杨 平<sup>2</sup>, 郑 静<sup>1</sup>, 杨淑霞<sup>1</sup>, 阳 泰<sup>1</sup>, 张 露<sup>1</sup>, 邹 强<sup>1</sup>, 李 华<sup>3△</sup>  
(成都医学院: 1. 科研中心; 2. 生化教研室 610083; 3. 成都军区总医院肿瘤科 610083)

**摘要:**目的 流式技术监控小鼠脾细胞裂解过程, 在确保脾淋巴细胞高活力的同时, 充分裂解其中的红细胞。方法 以流式细胞术监控 ACK 和 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 两种红细胞裂解液的裂解效果, 通过细胞融合率判断淋巴细胞活力。结果 结合 FSC 和 PI 荧光强度分析, 在确保淋巴细胞相对存活率大于或等于 90% 的前提下, ACK 处理 0.5~1 min 即可去除 90% 以上的红细胞, Tris-NH<sub>4</sub>Cl 处理 10 min 也可去除 82% 的红细胞, 获得的淋巴细胞的融合效率为 85%~90%。结论 流式细胞术能够实时监控 ACK 和 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 的裂解过程, 获得高质量的脾淋巴细胞以适用于杂交瘤细胞的制备。

**关键词:**流式细胞术; 细胞融合; 红细胞裂解液

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.02.004

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)02-0136-02

## Monitoring survival of splenocytes and lysis percent of red blood cells by flow cytometry\*

Li Minhui<sup>1</sup>, Liu Yang<sup>1</sup>, Yang Ping<sup>2</sup>, Zheng Jing<sup>1</sup>, Yang Shuxia<sup>1</sup>, Yang Tai<sup>1</sup>, Zhang Lu<sup>1</sup>, Zou Qiang<sup>1</sup>, Li Hua<sup>3△</sup>

(1. Center of Science and Research; 2. Department of biochemistry, Chengdu Medical College, Chengdu, 610083, China; 3. Cancer Center, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, 610083, China)

**Abstract:** **Objective** To development a technique of monitoring survival of splenocytes and lysis percent of red blood cells by flow cytometry. **Methods** Splenocytes were lysed by ACK or Tris-NH<sub>4</sub>Cl. The percentage of live lymphocytes and red cells in total splenocytes were detected by flow cytometry. Cell fusion assay was performed. **Results** The live lymphocytes and red cells could be classified by flow cytometry after dying by PI. If the 90 percent live lymphocytes were need to survived, splenocytes were treated with Tris-NH<sub>4</sub>Cl for 10 min to remove the 82 percent red cells or with ACK for 0.5 or 1 min to remove the 90 percent red cells. Using these lymphocytes hybridized with SP2/0-Ag14, the 85 to 90 percent efficiencies of fusion could be detected. **Conclusion** The progression of lysing splenocyte could be monitorred by flow cytometry to ensure the survival lymphocytes activity and clearance of red blood cells.

**Key words:** flow cytometry; cell fusion; red blood cell lysis buffer

在单抗制备技术中, 细胞融合效率的高低是获得阳性克隆的关键。脾细胞和骨髓瘤细胞的融合比例则是决定细胞融合效率的主要因素之一<sup>[1]</sup>。脾细胞中存在的大量红细胞与脾淋巴细胞在形态上差异不明显, 显微镜下易误判, 对脾细胞计数造成很大困扰。通常利用乙酸溶液裂解红细胞后再进行脾细胞计数; 但是, 乙酸处理后的脾细胞不能用台盼蓝染色法区分死细胞和活细胞。由此, 给后续的融合实验带来困难<sup>[2]</sup>。流式细胞术(FCM)是对单细胞定量分析和分选的新技术<sup>[3-4]</sup>, 不仅可以区分死、活细胞, 而且还能同时检测细胞形态与大小, 可实现同时监测死、活脾细胞与红细胞残留这两方面指标, 为后续细胞融合实验的成功奠定基础。本研究将流式细胞术引入 ACK 和 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 裂解红细胞的监控过程中, 结合 FSC 和 PI 荧光强度实时检测脾细胞中活细胞、死细胞、红细胞比例, 以不影响淋巴细胞存活为前提, 建立适用于细胞融合前脾细胞制备的红细胞裂解条件。

### 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂** DMEM 培养基购自 GIBCO 公司, PI、PEG4000、HAT 购自 Sigma 公司, Balb/c 小鼠购自四川省医学科学院实验动物研究所, SP2/0-Ag14 细胞购自 ATCC。ACK 红细胞裂解液: 0.15 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, 1 mmol/L KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, pH7.2。Tris-NH<sub>4</sub>Cl 红细胞裂解液:

0.02 mol/L Tris-HCl, 0.14 mol/L NH<sub>4</sub>Cl, pH7.2。

**1.2 主要仪器** BD FACS Calibur 流式细胞仪, Olympus IX71 倒置荧光显微镜。

### 1.3 方法

**1.3.1 制备小鼠脾细胞悬液** 小鼠处死: Balb/c 小鼠摘眼球放血, 脱颈处死; 无菌取脾脏: 撕开毛皮, 剪开腹膜, 取出脾脏; 研磨: 将脾脏置于培养皿中, 加 2~4 mL 的 DMEM 不完全培养液, 用注射器内芯研磨; 制备脾细胞悬液: 用吸管吹打数次, 用 70 μm 的晒网过滤除去碎片及筋膜, 得脾细胞悬液。

**1.3.2 制备小鼠淋巴细胞悬液** 收集脾细胞悬液, 1 100 r/min(200 g), 离心 10 min, 弃上清, 分为 9 个实验组, 一组为不裂解对照, 其余组均加入 5 mL 红细胞裂解液混匀, 室温放置。其中 3 组加入 Tris-NH<sub>4</sub>Cl 裂解液, 处理时间分别为 1、5 和 10 min; 另 5 组加入 ACK 裂解液, 处理时间分别为 0、0.5、1、5、10 min。20 mL DMEM 不完全培养液中中止裂解, 1 100 r/min 离心 10 min; 去掉上清, 用 10 mL 的 DMEM 再洗涤 1 次。离心, 弃上清, PBS 重悬, PI 染色, 流式计数。

**1.4 细胞融合** 将脾淋巴细胞与 SP2/0-Ag14 按照 5:1 的比例在 40 °C 的 50% PEG4000(pH8.0) 作用下融合, HAT 筛选, 计算融合率。

**1.5 统计学处理** 数据统计采用 SPSS14.0 统计软件。计量

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072455); 四川省青年科技基金资助项目(2010A08-443); 四川省教育厅科研基金资助项目(10ZC073); 成都医学院科研基金资助项目(CYZ09-020)。 △ 通讯作者, E-mail: huali99@gmail.com。

资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间数据的比较采用卡方检验,检验水准以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 红细胞裂解液(Tris-NH<sub>4</sub>Cl)裂解效果** PI染色后,活细胞为PI阴性。以FSC-Height为横坐标,PI荧光强度为纵坐标,见图1。由图1(A~D)可见,Tris-NH<sub>4</sub>Cl能够有效裂解脾细胞中的红细胞,随着时间的延长,裂解效率增加。Tris-NH<sub>4</sub>Cl处理10 min后,82%红细胞可有效去除,且淋巴细胞相对存活率为90%,见表1。

**2.2 红细胞裂解液(ACK)裂解效果** ACK能够有效裂解脾细胞中的红细胞。随着时间的延长,裂解效率增加,同时对淋巴细胞的损伤也在加大(图1, E~D)。监测结果表明,ACK处理0.5~1 min,可有效去除90%以上的红细胞,并获得相对存活率为大于90%的淋巴细胞(表1)。

表1 Tris-NH<sub>4</sub>Cl及ACK去红细胞效率及淋巴细胞相对存活率

组别	Tris-NH <sub>4</sub> Cl				ACK				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
处理时间(min)	—	1	5	10	0	0.5	1	5	10
红细胞残留率(%)	100	96	39	18	35	10	7	6	3.5
淋巴细胞相对存活率(%)	100	93	91	90	96	94	90	73	70

—:无数据。

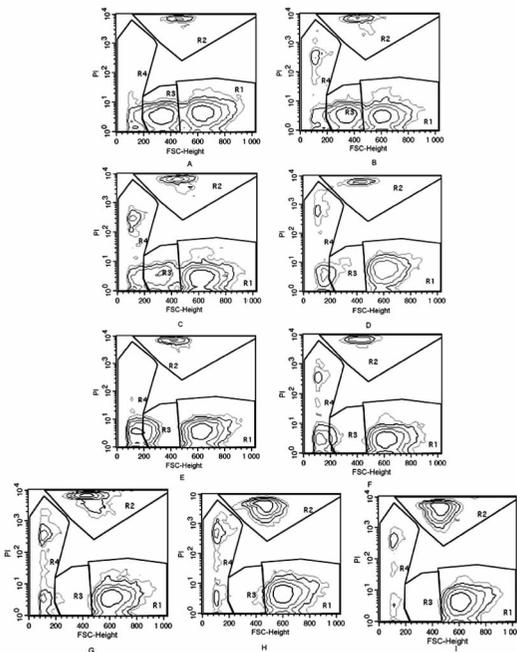


图1 脾细胞裂解效果图

**2.3 红细胞裂解液作用下活的淋巴细胞和红细胞所占总细胞比例的统计学分析** 未经裂解的脾细胞中,红细胞占总细胞数的45%。经Tris-NH<sub>4</sub>Cl处理5、10 min后,其红细胞比例分别降为19%和9.8%,去除率达61%和82%,差异有统计学意义,见图2。经ACK处理的脾细胞,红细胞去除效果更为明显,30 s的裂解时间即可清除65%的红细胞;裂解1 min后,红细胞去除率达90%。但在裂解过程中,淋巴细胞活力也受到一定的损伤。经流式监测发现,Tris-NH<sub>4</sub>Cl处理1~10 min或ACK处理0.5~1 min,可确保大于90%的活淋巴细胞不受

裂解液影响。

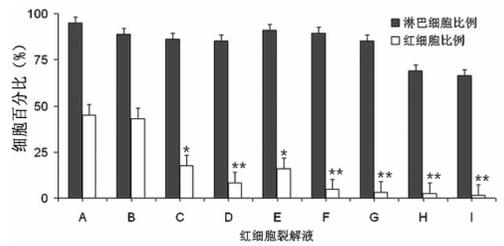


图2 不同红细胞裂解液作用下活淋巴细胞存活率和红细胞比例

**2.4 细胞融合率** 裂解液对淋巴细胞的损伤仅仅从细胞形态来判断是不够的,细胞融合率是判定裂解液对淋巴细胞中B细胞活力影响的最佳选择。将脾淋巴细胞与SP2/0细胞以5:1比例融合,见图3,裂解后的脾淋巴细胞相对存活率大于或等于90%且红细胞残留率小于20%(表1中D、F、G)时,其融合率皆为85%~90%;未裂解或裂解后相对存活率小于90%及红细胞残留率大于20%的脾细胞(表1),融合效率皆小于85%(图3中A、H和I)。说明裂解后脾淋巴细胞相对存活率是决定细胞融合率的关键因素;而且大量红细胞残留对细胞融合率有影响,并且,残留的红细胞对脾细胞计数带来困扰,影响精确计算融合比例。综合考虑融合率、淋巴细胞存活率、红细胞去除率三大因素,作者认为判定脾细胞裂解的最佳条件是红细胞去除率大于或等于80%和脾淋巴细胞相对存活率大于或等于90%,即以Tris-NH<sub>4</sub>Cl处理10 min或ACK处理0.5~1 min的条件为最佳,所获得的淋巴细胞可适用于高效率杂交瘤细胞的制备。

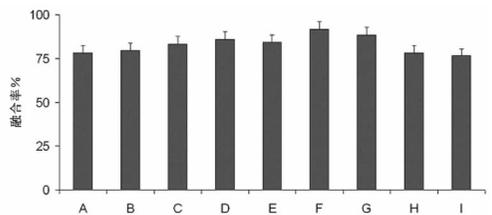


图3 不同红细胞裂解液作用下活淋巴细胞的融合率

## 3 讨论

脾细胞制备淋巴细胞时,通常判定红细胞去除率和淋巴细胞损伤的方法是,用台盼蓝染色法区分细胞的死活,乙酸溶液裂解法判定脾淋巴细胞得率。但该方法存在诸多不足:红细胞与淋巴细胞的大小相近,在显微镜下判定界限不明确,很容易误判;台盼蓝染色法计数需要在2~5 min内完成才能保证数据准确性;台盼蓝染色和乙酸裂解需单独进行,不能在一个实验内完成;计数时,制备样品、稀释样品、计数板冲板等操作都会存在人为误差<sup>[5]</sup>。利用流式技术则能很好地解决上述问题,PI染色后,根据PI荧光强度判定死、活细胞比例,FSC则能有效区分红细胞和脾淋巴细胞。

裂解红细胞的方法很多。但是,无论哪种裂解液,在裂解红细胞的同时也损伤淋巴细胞的活力<sup>[6]</sup>。因此,最佳裂解方案应依据具体实验材料而确定。Tris-NH<sub>4</sub>Cl和ACK的主要成分为氯化铵,氯化铵利用红细胞渗透脆性及细胞内外盐离子浓度差裂解红细胞。本研究显示,氯化铵的缓冲液成分对脾红细胞的去除率和淋巴细胞损伤率存在差异。ACK以KHCO<sub>3</sub>和Na<sub>2</sub>-EDTA为缓冲体系;相对于Tris-HCl(下转第140页)

究的 121 例 AS 患者中有 11 例是 HLA-B27<sup>-</sup>, 同样的, 88 例健康对照中也有 8 例为 HLA-B27<sup>+</sup>, 所以 B27 的检测不能代替 X 线下所见作为确诊 AS 的证据, 它只能作为 AS 基因易感性的标志物, 其结果必须结合临床症状及配合其他检查作出分析。

HLA-B27 抗原检测目前常规使用流式细胞法, 陈志坚和李山<sup>[6]</sup>报道, 其敏感性和特异性都远远高于传统的微量淋巴细胞毒法, 本文也对流式细胞法检测 HLA-B27 的 FPP 及 MF 进行了方法学评价, 发现 FPP 和 MF 的对诊断 AS 的灵敏度和特异度都很高, 尤其是 FPP 检测的特异度达到 89.8%, MF 检测的灵敏度达到 90.9%, 而联合检测 FPP 和 MF 可以大幅提高检测的灵敏度、阴性预测值, 大幅降低漏诊率, 且对特异度影响不大, 能对灵敏度和特异度进行综合分析的 Youden 指数为 82.0, 是最理想的检测方式, 可以为临床提供更准确的提示, 协助 AS 的早期确诊。并且国外经过长期的方法质量验证证明<sup>[7]</sup>, 流式细胞法检测 HLA-B27 标准化程度高, 可同时测定细胞多个参数, 准确、敏感、特异、重复性好, 且操作简便快捷, 所需标本量少, 无需分离单个淋巴细胞, 是目前最优的检测方法。

但流式细胞法所用的单克隆抗体在检测 HLA-B27 时会与多种其他 HLA 抗原(特别是 HLA-B7)发生交叉反应, 对检测结果造成影响。Ulrich<sup>[8]</sup>使用 HLA-B7/B27 双色标记来排除这种干扰, 而 Darke 和 Coates<sup>[9]</sup>则用 HLA-B27 及其亚型 B-2708 双抗体检测来减少交叉反应。目前, 国内常用的 Beckman-Coulter 有商品化 HLA-B27-FITC/HLA-B7-PE 双标单克隆抗体试剂, 本研究使用这种方法对 HLA-B27/B7 进行分析, 发现在非 AS 的两组 HLA-B27<sup>+</sup>/HLA-B7<sup>+</sup> 模式 FPP 和 MF 都显著高于 HLA-B27<sup>+</sup>/HLA-B7<sup>-</sup> 模式, 而 AS 组则与之相反, 证明了 HLA-B7<sup>-</sup> 交叉反应可能会引起的 HLA-B27<sup>+</sup> 假阳性。还有一些 AS 患者为 HLA-B27<sup>-</sup>, 其中有部分为 HLA-B7<sup>+</sup>, Sampaio-Barros 等<sup>[10]</sup>也有过类似报道, 这可能是 AS 的易感性有多个基因操控, 除了 HLA-B27 这个主基因, 还有包

括 HLA-B7 在内的许多微效基因与之相关, HLA-B7 不仅是 HLA-B27 检测的干扰因子, 它也是 AS 的易感因子。但是由于本研究较局限, 对这一假说仍需进一步的研究证明。

## 参考文献

- [1] Breweton DA, Hart FD. Ankylosing spondylitis and HLA-B27 [J]. *Lancet*, 1973, 1(13): 904-907.
- [2] Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, et al. High association of HLA antigen, W27 with ankylosing spondylitis [J]. *New Eng J Med*, 1973, 288(14): 704-706.
- [3] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 79-82.
- [4] 陈国敏, 王东辰. 人白细胞抗原-B27 在强直性脊椎炎中的意义 [J]. *检验医学与临床*, 2007, 4(10): 931-933.
- [5] Brown MA. Human leucocyte antigen-B27 and ankylosing spondylitis [J]. *Intern Med*, 2007, 37(11): 739-740.
- [6] 陈志坚, 李山. 强直性脊柱炎患者 HLA-B27 的检测 [J]. *华中医学杂志*, 2004, 28(1): 13-14.
- [7] Macardle PJ, McEvoy R, Jovanovich S. HLA-B27 expression by flow cytometry: an analysis of 7 years quality assurance data [J]. *J Immunological Methods*, 2000, 5(243): 51.
- [8] Ulrich G. Use of flow cytometry for HLA B27 phenotyping: study of a HLA B7/HLA B27 double marker technique [J]. *Allerg Immunol (Paris)*, 1997, 29(1): 11-14.
- [9] Darke C, Coates E. One-tube HLA-B27/B2708 typing by flow cytometry using two "Anti-HLA-B27" monoclonal antibody reagents [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(1): 21-30.
- [10] Sampaio-Barros PD, Conde RA, Donadi EA, et al. Undifferentiated spondyloarthropathies in Brazilians: importance of HLA-B27 and the B7-CREG alleles in characterization and disease progression [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(12): 2632-2637.

(收稿日期: 2011-08-11)

(上接第 137 页)

冲体系, 它能更有效地去除红细胞且作用时间更短; 在确保淋巴细胞损伤小于 10% 的情况下, ACK 可去除 90% 以上的红细胞, 而 Tris-HCl 则能去除 82% 的红细胞。说明缓冲体系具有缓冲和调控红细胞裂解过程, 避免溶血过度, 保护白细胞的形态和活性。可见, 通过控制裂解条件和采用合适的缓冲体系可以将氯化铵在完全裂解红细胞的同时对淋巴细胞的损害降到最小, 且对细胞生物活性无影响<sup>[7-8]</sup>。

## 参考文献

- [1] 徐志凯. 实用单克隆技术 [M]. 西安: 陕西科学出版社, 1992: 31-39, 65-68.
- [2] Zhou XL, Zhao H, Gao XD. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against a polysaccharide from flammulina velutipes mycelium [J]. *Hybridoma*, 2008, 27(6): 439-440.
- [3] 王建中, 王淑娟. 当前临床流式细胞分析仪的发展趋势 [J]. *中华*

检验医学杂志, 2002, 25(1): 5-6.

- [4] 沈二霞. 流式细胞仪的原理和临床应用 [J]. *现代医学仪器与应用*, 2008, 20(1): 49-53.
- [5] 喻晶, 聂李平, 桂耀庭, 等. 流式细胞仪全血红细胞裂解液研究 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(7): 74-77.
- [6] Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 740: 7-12.
- [7] Yang T, Zhong P, Qu L, et al. Preparation and identification of anti-2, 4-dinitrophenyl monoclonal antibodies [J]. *Immunol Methods*, 2006, 313(1-2): 20-28.
- [8] Tucker KG, Chalder S, al-Rubeai M, et al. Measurement of hybridoma cell number, viability, and morphology using fully automated image analysis [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(1): 29-35.

(收稿日期: 2011-08-11)