

• 论 著 •

分离外周血单个核细胞的条件优化*

蔡敏敏, 顾晓琼[△], 高 飞, 邱先桃, 陈小娟, 刘 非, 郑 浩
(广州市妇女儿童医疗中心检验科, 广东广州 510623)

摘 要:目的 比较不同抗凝剂、离心力及离心时间对葡聚糖—泛影葡胺(Ficoll)密度梯度离心法分离单个核细胞的影响, 优化实验方案。方法 取肝素、EDTA 及 2 种抗凝剂混合后的 3 种不同抗凝血, 采用 Ficoll 法进行分离, 用血细胞分析仪进行分类和计数, 计算回收率和纯度; 同时对 EDTA 抗凝血进行不同离心力及离心时间的处理, 优化分离效果。结果 EDTA 组获得 PBMC 回收率为 $(51.32 \pm 50.21)\%$, 纯度为 $(45.38 \pm 22.14)\%$; 肝素组获得 PBMC 回收率为 $(24.52 \pm 19.10)\%$, 纯度为 $(78.46 \pm 11.91)\%$; EDTA+肝素组获得 PBMC 回收率为 $(56.32 \pm 24.30)\%$, 纯度为 $(80.27 \pm 12.44)\%$ 。经单因素方差分析, PBMC 回收率方面, EDTA 组与肝素组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EDTA 组回收率较高, 而肝素+EDTA 组与 EDTA 组回收率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PBMC 纯度方面, EDTA 组与肝素组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 肝素组 PBMC 纯度较高, 而肝素+EDTA 组与肝素组比较, 纯度则差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PBMC 存活率方面, 肝素+EDTA 组与肝素组、EDTA 组比较, 均差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。对 EDTA 抗凝血进行单个核细胞分离实验表明, 在离心力为 $600 \times g$ ($1\ 800\ r/min$), 离心时间为 25 min 时分离效果最佳。结论 肝素+EDTA 组回收率、纯度与单种抗凝剂实验组相比, 结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 故在实验过程中可以混合两种抗凝全血进行细胞分离。EDTA 抗凝血在离心力为 $600\ g$ ($1\ 800\ r/min$)、离心时间为 25 min 时, 分离单个核细胞效果最佳。

关键词: 单个核细胞; Ficoll 连续密度梯度离心法; 抗凝剂; 分离效果

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)01-0001-03

Optimization of condition on peripheral blood mononuclear cells separation*

Cai Minmin, Gu Xiaoqiong[△], Gao Fei, Qiu Xiantao, Chen Xiaojuan, Liu Fei, Zheng Hao
(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Municipal Women and Children's
Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China)

Abstract: **Objective** To compare the influence of different anticoagulants, centrifugal force and the centrifugal time on separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by the Ficoll density gradient centrifugation method, and to optimize the experimental scheme. **Methods** Three different types of anticoagulation blood with heparin, EDTA and their mixture were separated by the Ficoll method. Then the sort and count were performed by using the blood cell analyzer. The recovery rate and purity were calculated; Meanwhile EDTA anticoagulation blood was treated by different centrifugal force and centrifugal time for optimizing the separation effect. **Results** The recovery rate and purity of PBMC in the EDTA group was $(51.32 \pm 50.21)\%$ and $(45.38 \pm 22.14)\%$; which in the heparin group were $(24.52 \pm 19.10)\%$ and $(78.46 \pm 11.91)\%$; which in the EDTA plus heparin group were $(56.32 \pm 24.30)\%$ and $(80.27 \pm 12.44)\%$ respectively. The single factor variance analysis showed that the recovery rate of PBMC had statistically significant difference between the EDTA group and the heparin group ($P < 0.05$), the EDTA group had higher recovery rate, but the recovery rate had no statistically significant difference between the heparin plus EDTA group and the heparin group ($P > 0.05$); in the aspect of the purity of PBMC, there was statistical difference between the EDTA group and heparin group ($P < 0.05$), the heparin group had higher PBMC purity, but the purity had no statistical difference between the heparin group and the heparin plus EDTA group ($P > 0.05$); in the aspect of the survival rate of PBMC, there was no statistically significant differences between the heparin group with the heparin plus EDTA group and the heparin group with the EDTA group ($P > 0.05$). The mononuclear cell separation experiments in the EDTA anticoagulation blood showed that in the centrifugal force $600 \times g$ ($1\ 800\ r/min$) and centrifugal time 25 min, the separation effect was optimal. **Conclusion** The recovery rate and purity of PBMC in the heparin plus EDTA group have no statistical differences compared with those in the single anticoagulant group ($P > 0.05$). Therefore, in the experiment process, the two kinds of anticoagulation blood could be mixed for conducting the cell separation. The effect of EDTA anticoagulation blood for separating mononuclear cells is optimal at the centrifugal force of $600 \times g$ ($1\ 800\ r/min$) and the centrifugal time of 25 min.

Key words: mononuclear cell; ficoll continuous density gradient centrifugation method; anticoagulant; effect of separation

外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)包括淋巴细胞和单核细胞, PBMC 常用于细胞培养及 药物敏感试验等临床科研项目, 故对于实验室研究具有重要价值。随着单个核细胞在先天免疫激活、获得性免疫调节、人免

* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(S2013010012520); 广州市科技计划资助项目(201510010159)。 作者简介: 蔡敏敏, 女, 检验技师, 主要从事妊娠糖尿病研究。 [△] 通讯作者, E-mail: Guxiaoqiong@163.com。

疫缺陷病毒感染及自身免疫疾病等生理、病理过程中的作用被逐渐揭示,其生物学功能受到了越来越多的关注^[1]。目前分离 PBMC 的方法很多,各有利弊^[2-5],如分离的过程较繁琐、耗材较多、细胞分层效果及分离率欠理想等,但主要的分离方法是葡聚糖—泛影葡胺(Ficoll)密度梯度离心法,相对于分离效果更好的 Percoll 非连续密度梯度离心法,Ficoll 离心法由于价格实惠及操作简便的原因显得更为常用^[6]。笔者通过研究 EDTA 抗凝血在不同离心力及离心时间作用下单个细胞核的分离,旨在摸索外周血单个核细胞最佳分离条件。与此同时鉴于某些疾病的全血标本取材不便,临床标本的肝素全血量未能满足单个核细胞的分离,通过探讨其他抗凝全血单个核细胞的分离效果,以便扩展全血标本获取途径。

1 材料与方法

1.1 材料 随机抽取广州市妇女儿童医疗中心珠江新城院区全血标本 60 例,按肝素、EDTA、EDTA+肝素混合抗凝血标本分为 3 个实验组,每组 20 例,相互对照。时间要求为采血后 3 h 内,其性别、年龄、体质量等无特殊要求。

1.2 仪器与试剂 上海申力仪器公司 HF sabl200 生物安全柜,白洋离心机厂的 BFX5-320 型低速自动平衡离心机,美国 sysmex-5000 血细胞计数仪,以及 4% 台盼蓝染液、牛鲍计数板、人淋巴细胞分离液(天津灏洋 LTS1077)、Hanks 液和改良型 5% 小牛血清培养液。

1.3 方法

1.3.1 取 EDTA 抗凝、肝素抗凝、EDTA+肝素混合抗凝血各 20 例,共 60 例待测抗凝全血进行血常规检测,记录其单个核细胞总数。

1.3.2 取新鲜(肝素、EDTA、EDTA+肝素混合抗凝血)抗凝全血 2 mL,加入等量 hanks 液,充分混匀后,倾斜叠加于等量密度为 1.077±0.001 的 Ficoll 分离液,使两者形成一个清晰

的界面。500 r/min 离心 15 min 后,用吸管吸出中层白色云雾状细胞,加入含 4 mL hanks 液混匀 1 500 r/min 10 min,重复洗涤 2 次。去上清液,于沉淀细胞加入改良型 5% 小牛血清 PRMI-1640 培养基 2 mL,配成细胞悬液,混匀,吸取 100 μL 置于离心管中。

1.3.3 取离心管中细胞血液进行血常规检测,再次计数其单个核细胞总数,记录其纯度。

1.3.4 上机后于离心管中加入 100 μL 4% 台盼蓝染液,混匀,静置 3 min 后吸取 10 μL 加入牛鲍板上,于显微镜下计算 4 个大方格内活细胞率。死细胞可被染成深色,活细胞不着色。在显微镜下计数,得出活细胞的总数和死细胞的总数,计算出活细胞的比例:活细胞百分率=活细胞数/(活细胞数+死细胞数)×100%

1.3.5 取 EDTA 抗凝血每组 10 例按照 2.2、2.3 步骤分离单个核细胞,但在离心时间固定 20 min,将离心力调到 1 000 r/min,计算各血型的活细胞比例。依次类推,将离心力分别调到 1 400、1 800、2 000、2 300 和 2 500 r/min 重做上述实验,同样计算出活细胞比例。

1.3.6 取 EDTA 抗凝血每组 10 例按照 2.2、2.3 步骤分离单个核细胞,但在离心力固定 1 800 r/min,将离心时间调为 10 min,计算各血型的活细胞比例。依次类推,将离心时间分别调为 15、20、25、30 和 40 min,重做上述实验,同样计算出活细胞比例。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件。测定结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同抗凝剂分离单个核细胞回收率、纯度、细胞存活率,见表 1。

表 1 不同抗凝剂分离单个核细胞回收率、纯度

组别	分离前(×10 ⁹ /L)	分离前(×10 ⁹ /L)	回收率(%)	纯度(%)	细胞存活率(%)
肝素组	4.48±1.97	1.00±0.83	24.52±19.10	78.46±11.91	93.83±2.32
EDTA 组	3.08±1.63	1.66±1.55	51.32±20.2	45.38±22.14	91.25±2.11
EDTA+肝素组	3.78±0.85	2.13±1.20	56.32±24.30	80.27±12.44	94.60±1.23

由表 1 可见,回收率方面:EDTA 组与肝素组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),EDTA 组回收率较高,而肝素+EDTA 组与 EDTA 组回收率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);纯度方面:EDTA 组与肝素组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),肝素组 PBMC 纯度较高,而肝素+EDTA 组与肝素组比较,纯度则差异无统计学意义($P > 0.05$);细胞存活率方面:EDTA+肝素组与肝素组、EDTA 组比较,细胞存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 不同离心力外周血单个核细胞分离结果 在相同离心时间下(20 min),不同离心力外周血单个核细胞分离后结果显示,离心力为 1 800 r/min 时,EDTA 抗凝血单个核细胞活细胞比率最高。

2.3 不同离心时间外周血单个核细胞分离结果 在最佳离心力 1 800 r/min 下,不同离心时间外周血单个核细胞分离后结果显示,离心时间为 25 min 时,EDTA 抗凝血单个核细胞活细胞比率最高。综上结果表明,EDTA 抗凝血中,在离心力为 1 800 r/min,离心时间为 25 min 时,分离单个核细胞效果最佳。

3 讨论

分离 PBMC 是临床科研的常规工作,Ficoll 作为传统分离单个核细胞的方法,通过不同颗粒之间存在沉降系数差,在一定离心力作用下,颗粒各自以一定速度沉降,在密度梯度不同区域上形成区带,从而获取目的细胞^[7-8]。理想状态下,Ficoll 离心法获取单个核细胞的得率为 80%~90%,细胞纯度 90% 以上。但实际操作中,由于实验室设备、环境因素及实验操作人员的原因,分离效果往往未能达到理想标准。同时,部分实验室由于未能得到充足的血液样品而导致实验进展缓慢甚至停滞不前。

吴鹏等^[5]的研究表明采用 Hanks 液作为沉淀细胞的稀释液,离心结束后能在离心液体的上部形成一个界面清晰的细胞层露,因而使得分离效果明显增强,故本研究采用的稀释液为 Hanks 液。与此同时,本研究采用顾晓琼等提出的 Ficoll 一步法分离获得 PMBC,回收率及纯度方面较 Ficoll 两步法分离效果显著。关于 PMBC 回收率及纯度方面,本实验对肝素组、EDTA 组以及两者混合后的 3 组不同抗凝剂进(下转第 5 页)

平明显高于健康对照组, HBV 高载量组感染者血清 IL-15 和 IL-16 水平明显高于健康对照组和低载量组。本研究结果显示, 在 CHB 组随着 IL-15 和 IL-16 水平的增高, HBV DNA 载量也逐渐增高, 在 HBV DNA 高载量组达最大值。这一研究结果提示血清 IL-15 和 IL-16 水平变化与乙肝病毒的复制水平有关, 可能参与了机体清除 HBV 的过程, 这和 HBV 持续存在和复制水平有关。相反, 在 HBV 携带者(ASC)组 HBV DNA 低载量组血清 IL-15 和 IL-16 水平达最大值。随着血清 IL-15 和 IL-16 水平的增高, HBV DNA 载量逐渐降低, 提示 IL-15 和 IL-16 与 HBV 的清除有关, 它可激活肝细胞自身抗病毒机制, 抑制 HBV DNA 复制^[9]。HBV DNA 高载量组患者血清 IFN- γ 和 TGF- β 水平均高于中载量组和低载量组。我们的研究结果显示随着 IFN- γ 水平的增高, HBV DNA 载量逐渐升高, 提示 IFN- γ 与 HBV 的清除有关, 它可激活肝细胞自身抗病毒机制, 抑制 HBV DNA 复制。同时 HBV DNA 的持续存在, 导致肝实质细胞受损, TGF- β 的表达被启动且表达增加。

综上所述, 慢性 HBV 感染是一个由多种免疫细胞和细胞因子参与的复杂过程, 各种免疫细胞和细胞因子间相互影响、调节和制约^[10]。本研究结果表明, 在慢性乙型肝炎的发生和发展过程中细胞因子 IL-15、IL-16、IFN- γ 、TGF- β 水平可能起重要作用, 联合检测这 4 种细胞因子可作为评估慢性乙型肝炎病情严重程度的重要指标, 并有望成为慢性肝病治疗的新靶点。

参考文献

[1] 余昶, 熊永炎. 肝细胞性肝癌中 MIF、CD147、MMP-9 蛋白的表达

(上接第 2 页)

行了比较。由于肝素组标本为离心后标本, 离心过程中细胞会有破裂, 再经过多次的洗涤和分离后, 细胞损失的较多, 导致回收率不如 EDTA 组未离心的标本结果理想, 但单个核细胞的纯度比 EDTA 组高。而细胞存活率方面, 3 组单个核细胞的存活率无明显差异, 与传统方法获得的细胞存活率水平相当, 均在 90% 以上。故肝素+EDTA 混合组单个核细胞则无论从回收率、纯度以及细胞存活率方面, 都与单种抗凝剂结果无差异, 故可将两种不同抗凝剂的血互相混合, 从而增加了分离单个核细胞的原始血量, 提高了单个核细胞的产出, 为下一步实验提供了充分的准备, 特别是对于婴幼儿采血困难以及采血量不足具有现实意义。同时, 分离过程简单化、有利缩短工作时间、提高工作效率, 也减少了耗材, 降低了试验成本。

本研究还探讨了不同离心时间和离心力下单个核细胞的分离效果, 发现单个核细胞的分离效果并不是单纯随着转数增加, 离心时间延长而分离效果越好。分离细胞时离心转数过低或者离心时间太短, 表现在中间层下的分层液中出现红细胞所形成的红色区, 称为红细胞污染, 导致分离效果不佳。而离心时间过长, 单个核细胞又会损失过多, 故分离时的转速与时间要做出合理的调整。从实验结果来看, 笔者认为在离心力为 1 800 r/min, 离心时间为 25 min 时的离心条件, 分层效果最好, 细胞计数中细胞活力最好。

综上所述, 在获取 PBMC 的回收率和纯度时应根据实际工作和实验室的条件来不断摸索, 选择最佳分离方法。临床大部分科研分离 PBMC 通常只采用肝素抗凝全血, 而本实验通过观察不同抗凝剂的全血标本混合后采用 Ficoll 离心法进行

及意义[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2009, 30(3): 358-361.

- [2] 张政, 王福生. 慢性乙型肝炎免疫致病机制和免疫治疗现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(11): 801-804.
- [3] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 乙型肝炎防治指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(1): 88-89.
- [4] 杨春艳, 苏先狮, 李曼妮, 等. 白细胞介素-15 重组体对 HBsAg 核酸疫苗的免疫佐剂作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(1): 60-61.
- [5] Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor[J]. Science, 1994, 264(9): 965-968.
- [6] 刘宁, 徐杰, 刘金花, 等. 慢性乙型肝炎、乙型肝炎肝硬化、乙型肝炎患者 Th1/Th2 型细胞因子水平变化研究[J]. 肠胃病学和肝病杂志, 2014, 23(2): 158-161.
- [7] 陈捷, 王兰兰, 付阳, 等. IL-17、IL-23、TGF- β 和 IL-10 在乙型肝炎病毒感染中的表达分析[J]. 免疫学杂志, 2012, 28(2): 231-236.
- [8] 唐先梅. 慢性乙型肝炎患者血清中 IL-15、IL-16 水平检测及意义[D]. 新疆: 石河子大学, 2007: 21-23.
- [9] Thakur S, Singla A, Chawla Y, et al. Expansion of peripheral and intratumoral regulatory T-cells in hepatocellular carcinoma: a case control study[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2011, 54(3): 448-453.
- [10] 邹同. 不同 HBV-DNA 载量慢性乙肝患者血清 MIF 和 IL-17 的表达意义[J]. 中国实用医药, 2013, 8(1): 7-8.

(收稿日期: 2015-08-10)

单个核细胞的分离, 达到增加分离 PBMC 时的血样来源的目的, 是具有现实意义的。

参考文献

- [1] Serbina NV, Jia T, Hohl TM, et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens[J]. Annu Rev Immunol, 2008, 26(4): 421-452.
- [1] 李金凤, 刘文礼, 史小娟, 等. 四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(4): 277-281.
- [2] 邹常春. 全血中性粒细胞分离方法的改进研究[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(4): 337-338.
- [3] 吕金星, 汪健, 张锡庆, 等. Percoll 非连续密度梯度沉降法分离人外周血中性粒细胞[J]. 现代免疫学, 2000, 20(2): 122.
- [4] 樊卫平, 宋玉靖, 郝颜琴, 等. 简易外周血单个核细胞分离方法的探索[J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(3): 274-276.
- [5] 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探讨[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(5): 707-708.
- [6] 张伟, 李建斌, 赵林娜, 等. 两种离心方法对单个核细胞回收率的影响[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(4): 321.
- [7] Yang H, Loutfy MR, Mayerhofer S, et al. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation[J]. Transfusion, 2011, 51(2): 284-292.
- [8] 周文玲, 郝一文, 等. 三种不同型号的血细胞分离机在采集外周血单个核细胞中的应用分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(10): 1103-1108.

(收稿日期: 2015-07-25)