DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.028

文章编号:1000-5404(1999)10-0763-02

正常人外周血嗜酸性粒细胞的分离与培养方法的改进*

技术方法

Isolation and culture of eosinophilic granulocytes from peripheral blood with an improved method

赖克方** 郭晓明 王长征 郭先健 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 **目的**:探讨外周血嗜酸性粒细胞(Eos)纯化、分离与培养的方法。**方法**:采用Percoll密度梯度(1.082~1.100)分离外周血Eos,离心前细胞悬液预先与fMLP 37℃孵育10 min。纯化的Eos分别在加入或不加入细胞因子(IL-3、IL-5和GM-CSF)的条件下培养,观察细胞活力的变化。**结果**:传统Percoll密度梯度分离Eos的纯度和回收率分别为(15.8±5.3)%和(64.3±6.4)%。预先用fMLP孵育Eos使分离Eos纯度(96.5±1.8%)显著增高($P<0.01$),回收率(68.4±7.1)%无明显变化($P>0.05$)。Eos体外培养存活2~3 d,加入细胞因子可使Eos存活时间延长6 d以上。**结论**:fMLP可有效增加Percoll密度梯度分离Eos的纯度。分离的Eos可用于体外培养。

嗜酸性粒细胞(Eosinophil,Eos)是支气管哮喘和过敏性疾病的关键效应细胞。分离培养Eos是研究上述疾病发病机制的重要手段。采用Percoll密度梯度离心是分离Eos的常用方法。由于Eos与中性粒细胞密度部分重叠,传统方法分离Eos的纯度和回收率均不理想。本文采用一种改进的方法分离外周血Eos,获得高纯度和回收率的Eos,国内尚未见报道,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

Percoll分离液(Pharmacia),人重组(rh)IL-3、IL-5、GM-CSF由美国Genetics Institute(GI) MegO'Donell教授惠赠,PRMI1640(Gibcol公司),淋巴细胞分离液(上海生化),fMLP(Sigma),氯化铵溶液(155 mmol/L NH_4Cl,10 mmol/L $KHCO_3$,0.1 mmol/L EDTA)。CO_2恒温培养箱(TC1815型,Sandon)。

1.2 血液来源

分离Eos的外周静脉血来源于19例健康献血者,其中男12例,女7例,平均年龄(29.8±5)岁,无哮喘等过敏性疾病病史。白细胞分类Eos占2%~5%。

1.3 Eos分离方法

枸橼酸钠(130 mmol/L,pH 7.4)抗凝,5% FCS/Hank's平衡盐液稀释,将稀释血液缓慢加在淋巴细胞分离液上面(比重1.077),室温离心1 000×g 20 min。离心后去掉上层单核细胞,取下层粒细胞和红细胞,加入5倍体积的氯化铵溶液冰浴15 min,400×g 7 min。沉淀细胞用Hank's液漂洗1~2次,悬浮于2 ml 5%小牛血清/Hanks液中30 min,37℃。将10 mmol/L fMLP与细胞悬浮孵育10 min,37℃。将1 ml细胞悬浮液缓慢加于不同Percoll梯度分离液上面,Percoll密度梯度由2层组成,上层Percoll(3 ml)比重分别为1.078、1.082或1.086(g/ml),下层(1 ml)比重为1.100(g/ml),1 000×g 15 min。收集界面细胞,PBS漂洗,取少许悬液用于细胞总计数、分类计数和活力测定(台盼蓝拒染法)。分类计数采用HE染色,Eos所占百分比即为分离Eos的纯度。为计算Eos的回收率,分别收集和计数梯度顶部细胞、界面细胞和底部细胞沉淀所含的Eos数量,Eos回收率(%)等于界面Eos的数量除以整个梯度收集的Eos总量的百分比。不用fMLP孵育细胞悬液作为对照。

1.4 培养方法

新鲜纯化的Eos悬浮于10% FCS/RPMI1640培养基,置于96孔平底培养板,每孔细胞数2.0×10^5,总体积200 μl。5% CO_2,37℃条件下培养。分别加入不同浓度的细胞因子IL-5、IL-3、GM-CSF(10 U/ml),以不加入细胞因子作为对照,动态观察Eos活力的变化。Eos活力检测方法采用台盼蓝拒染法,计算存活细胞或死亡细胞百分率。

1.5 统计与分析

各组结果以$\bar{x}\pm s$表示,采用非配对资料t检验,$P<0.05$为相差显著。

2 结果

2.1 分离Eos的纯度和回收率

单纯Percoll密度梯度(1.082~1.100)分离所得Eos的纯度仅为(15.8±5.3)%,回收率为(64.3±6.4)%。在fMLP预孵育的前提下,采用不同Percoll密度梯度分离Eos,结果如表1所示,综合考虑纯度和回收率2个因素,Percoll密度梯度为1.082~1.100 g/ml时分离效果最好。先用fMLP孵育Eos时,

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670337

** 赖克方,男,35岁,主治医师,博士,现在广州呼吸疾病研究所 广州,510120

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Percoll 密度梯度(1.082～1.100)分离 Eos 的纯度达到(96.5±1.8)%，显著高于单纯 Percoll 密度梯度分离法($P<0.01$)。两者回收率类似($P>0.05$)。

表 1 不同 Percoll 密度梯度分离嗜酸性粒细胞结果的比较($n=6$)

	Percoll 密度梯度(g/ml)		
	1.078～1.100	1.082～1.100	1.086～1.100
纯度(%)	90.3±2.6	96.5±1.8	97.2±1.5
回收率(%)	84.9±5.7	68.4±7.1	41.2±5.3

2.2 IL-3/IL-5/GM-CSF 对 Eos 存活的作用

在缺乏细胞因子的条件下，体外培养的 Eos 活力迅速降低，至第 3 天已接近 100%死亡。加入细胞因子 IL-3、IL-5 或 GM-CSF(10 U/ml)与 Eos 共同培养时，可显著抑制 Eos 活力的下降，培养至第 10 天仍有相当部份 Eos 存活，其中 IL-5 可使 50%的 Eos 存活 10 d 以上，结果见表 2。

表 2 IL-3、IL-5、GM-CSF 对嗜酸性粒细胞存活率的影响(%，$n=6$)

	1 d	2 d	3 d	4 d	6 d	10 d
对照组	80±8	23±11	6±4	0	——	——
IL-3	87±6	83±7	65±14	48±9	32±6	0
IL-5	92±3	86±5	73±9	65±13	61±12	50±11
GM-CSF	91±5	91±5	90±11	61±9	47±8	31±4

3 讨论

Eos 体外培养对研究 Eos 的功能及其在哮喘发病中的作用，药物对 Eos 的作用机制均有重要作用。Eos 系终末分化细胞，体外培养的前提是获得足够数量和纯度的 Eos。正常情况下，外周血 Eos 所占的比例很低，即使是支气管哮喘患者，外周血 Eos 增高者亦不多见[1]。Eos 在所有白细胞中密度最大，分离 Eos 常用的方法是采用 Percoll 密度梯度离心法，Percoll 由聚烯丙酮包被的胶样硅粒组成，具有低渗性和低粘性的特点，从而容易获得等渗密度梯度，对所分离的细胞功能活性没有影响。Percoll 密度梯度为 1.086～1.100 时，分离获得的 Eos 纯度可达 86%以上，但回收率仅为 38%～56%，显然相当部分密度低于 1.086 的 Eos 被丢失[2]。将上层 Percoll 密度调至 1.086 以下，虽可增高 Eos 的回收率，但 Eos 的纯度也将明显降低，这是由于部分 Eos 与中性粒细胞密度重叠所致。fMLP 是一种趋化肽，研究发现低浓度的 fMLP 具有激活中性粒细胞，同时降低中性粒细胞密度的作用，而对 Eos 功能没有影响[3,4]。本研究利用这一特性，将待分离的粒细胞悬液预先与 fMLP 孵育，从而降低中性粒细胞密度，拉开中性粒细胞与 Eos 之间的距离。结果表明 fMLP 显著增加了 Eos 分离的纯度。采用比重为 1.082～1.100 的 Percoll 密度梯度可使分离的 Eos 纯度达到 96%以上，同时使大部分 Eos 得以回收。

为证实 fMLP 是否影响 Eos 的存活活性，本研究对 fMLP 分离的 Eos 进行了体外培养和活力观察。体外培养 Eos 存活时间，细胞因子对 Eos 存活的作用，均与文献[5]报道一致，表明 fMLP 对 Eos 的存活功能没有影响，通过 fMLP 分离的 Eos 完全能用于体外培养观察研究。

由于普通 Percoll 密度梯度分离 Eos 回收率低，为获得足够数量的 Eos，既往研究多选用 Eos 明显增高的外周血，来自疾病状态下的 Eos 必然影响实验结果的准确性。免疫磁珠法虽可有效分离正常人外周血的 Eos，但此法价格昂贵[6]。本研究采用 fMLP 法能够分离 Eos 仅占 2%的正常人外周血，纯度与回收率接近于免疫磁珠法，20 ml 以上的血液即可进行分离，经济实用，为开展 Eos 的研究提供了有力的条件。

关键词 嗜酸性粒细胞；分离；培养；细胞因子

中图法分类号 Q813.1+1 **文献标识码**：B

参考文献

1 Krogel C, Warner J R, Virchow Jr J C, *et al*. Pulmonary immune cells in health and disease: The eosinophil leukocyte (Part I). Eur Respir J, 1994, 7(1): 519

2 Garnter L. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylyrrolidone-caated silica gel (Percoll). Immunology, 1980, 40(1): 133

3 Laviolette M, Bosse M, Lavigne S, *et al*. Comparison of two modified techniques for purifying blood eosinophils. J Immunol Methods, 1993, 165(2): 253

4 Blom M, Tool A T J, Mul F P J, *et al*. Eosinophils isolated with two different methods show different claracteristics of activation. J Immunol Methods, 1995, 178(2): 183

5 Sedgwick J B, Quan S F, Calhoun W J, *et al*. Effect of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on in vitro eosinophil function: Comparison with airway eosinophils. J Allergy Clin Immunol, 1995, 96(2): 375

6 Hansel T T, Vries J M D, Iff T, *et al*. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. J Immunol Methods, 1991, 145(1): 105

(收稿：1999-03-29；修回：1999-07-22)

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net