

适合膜片钳试验的一种外周血嗜酸性粒细胞分离法

外周血嗜酸性粒细胞(EOS)是变态反应疾病如支气管哮喘、过敏性鼻炎中的一种关键效应细胞[1],目前国内已开始用膜片钳技术来研究EOS离子通道与其功能的关系,分离高活力而又没有细胞损伤的EOS显得尤为重要,但是免疫磁珠分离法价格昂贵,而用fMLP孵育增加中性粒细胞和EOS密度差的Percoll不连续密度梯度法在红细胞裂解过程中对EOS膜会产生影响,fMLP本身对EOS功能有影响,分离时间过长,不适宜膜片钳研究细胞膜离子通道[2][3]。现介绍一种改良后的percoll不连续密度梯度简易分离方法,分离时间短,对细胞膜影响小,适宜于膜片钳试验中采用,并用细胞贴附式膜片钳技术证实了Kca通道开放。

1 材料和方法

1.1 材料

Percoll原液为sigma公司产品,Dextran T500为AMRESCO公司产品,低温离心机为Sigma公司3-18K型。

1.2 血液来源

20例健康献血者,男12例、女8例,平均年龄(25±3.5)岁,无哮喘过敏性疾病史,EOS在外周血白细胞含量占(2~5)%。

1.3 EOS分离

1.3.1 以双蒸水密度(1 g/ml)为标准,通过分析天平,采用称量法校正100 μl微量加样枪。

1.3.2 配制等渗Percoll重液和轻液。1 ml 10×PBS加9 ml Percoll配成重液,1 ml重液加9 ml 1×PBS配成轻液。

1.3.3 用100 μl微量加样枪采用称量法求出重液及轻液的密度。然后按公式 $dHx+dL(y-x)=dAy$ 分别配制密度为1.100, 1.090, 1.085的Percoll密度液,并于4℃密封保存备用(式中dH是重液的密度、dL是轻液的密度、dA是所配梯度密度液的密度,x是需加重液的量,y是所配梯度密度液的量)。

1.3.4 用1×PBS液配置4.5% Dextran T 500溶液。

1.3.5 分离过程 采血20 ml(肝素抗凝),加入20 ml 4.5% Dextran T500中,37℃摄氏度 30 min沉淀红细胞,取含白细胞血浆层,200 g离心10 min,去除血小板,PBS液漂洗两次(400 g, 7 min),用含5%小牛血清的D-Hank's液制成2 ml白细胞悬液,在37℃孵育30 min,加入已加好1.100, 1.090, 1.085等渗Percoll密度液各2 ml的离心管,1000 g离心30 min,取1.100, 1.090处细胞。D-Hank's液漂洗两次后,将所获EOS稀释至2 ml后,取样作台盼蓝和瑞氏-姬姆萨染色。另取100 μl稀释10倍后在普通光镜下计数求EOS回收率。

1.4 膜片钳记录

1.4.1 溶液配置 细胞浴液为(mmol/L): NaCl 140, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, HEPES 5, PH用NaOH调整至7.4。电极内液为(mmol/L): KCl 145, HEPES 10, pH用KOH调整至7.4。PAF、A-23187使用前溶解于浴液中,终浓度为0.2 μmol/L和1 μmol/L。

1.4.2 膜片钳通道记录 待细胞沉降贴壁后，在室温22~25 °C下用标准膜片钳细胞贴附式记录Kca通道电流。记录用玻璃微电极电极分两步拉制，内灌电极液，阻抗为8~12 MΩ，封接阻抗大于5 GΩ。电流经CEZ-2400型膜片钳放大器(NIHONKOHDEN0, Janpen)放大，经125 kHz Labmaster DMA数据采样系统后直接输入计算机，低通滤波为10 kHz，采样水准5 kHz，用8.0版PCLAMP电信号处理软件(Axoninstrument, USA)中的FETCHAN测量通道电流幅度与时程，以某一记录电压下单位电流值的50%作为标准判断通道的开放与关闭的转换，对数据进行采样、分析和测量，利用SPSS10.0进行统计学处理，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 EOS分离结果

用上述方法分离20例外周血样本，结果表明：EOS的回收率为(48.2±1.6)%；台盼蓝染色活率>99%；EOS形态改变<3%；EOS纯度为(90.5±3.6)%；中性粒细胞为(3.9±0.9)%；红细胞含量为(5.3±1.1)%；单核细胞血小板未见到。EOS形态完整，膜片钳试验时膜弹性韧性较好，封接成功率在70%以上。

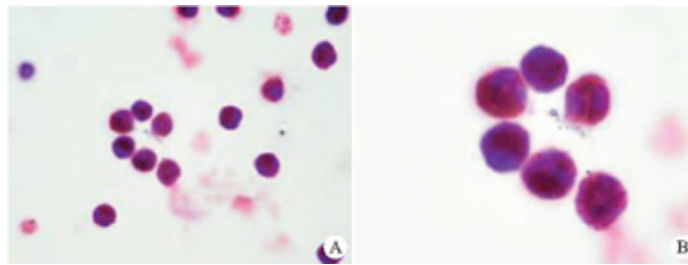


图1 分离的外周血嗜酸性粒细胞(瑞氏-姬姆萨染色)

Fig.1 Eosinophils isolated from human peripheral blood (Wright-Giemsa staining, A: original magnification: $\times 400$; B: original magnification: $\times 1000$)

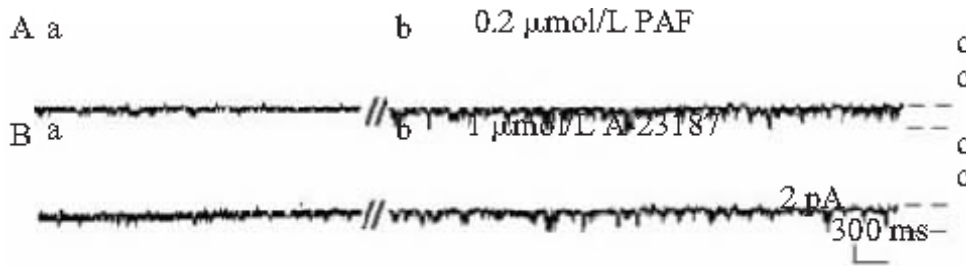


图2 嗜酸性粒细胞在PAF、 A-23187作用下KCa通道的开放电流

Fig.2 Ca^{2+} -activated K^{+} channel currents recorded from the isolated eosinophils activated by treatments with PAF and A-23187

A: Current recorded before (a) and during (b) 0.2 $\mu\text{mol/L}$ PAF perfusion at the 0 mV pipette potential from the same membrane patch. B: Current recorded before (a) and during (b) 1 $\mu\text{mol/L}$ A-23187 perfusion at the 0 mV pipette potential from the same membrane patch. c and o denote the closed and open states of the channels, respectively.

2.2 Kca通道电流

在细胞贴附式条件下，钳制电压为0时细胞没有电流活动。当溶液中加入PAF 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时，出现有两种水平的内向电流活动(图1 A)。记录该通道钳制电压分别为-40、-20、0、20、40 mV电流曲线，推算出电导分别为10pS和22pS，与文献报道[4]PAF激活EOS KCa通道相近。反转电位为-85 mV，与 K^{+} 反转电位接近(溶液 K^{+} 浓度为5.4 mmol/L时 K^{+} 根据Nernst方程反转电位为-80 mV)。改变管液，用NaCl代替KCl时加入PAF或者A-23187均无电流出现，而改为天门氨酸钾代替KCl时，可以出现类似电流。溶液中加入钙离子载体A-

3 讨论

随着膜片钳技术的发展, 研究发现EOS膜上离子通道与EOS脱颗粒、EOS呼吸爆发、EOS凋亡等都密切相关。随着对EOS离子通道与其功能的关系研究越来越多, 探索一种简单高效而对其功能影响小的适合膜片钳试验的EOS分离方法显得越来越重要。本分离方法不采用 NH_4Cl 裂解红细胞而用Dextran沉淀红细胞, 避免了 NH_4Cl 裂解红细胞过程中对EOS的影响, 而Dextran T500主要促进红细胞聚集, 对EOS无毒无细胞膜损伤。虽然沉淀法残留有红细胞, 红细胞和EOS密度有重叠, 所以分离的EOS中含有5%左右红细胞, 但在光学显微镜下未染色的EOS和红细胞形态特征区别明显, 不影响膜片钳试验。fMLP可以增加EOS和中性粒细胞的密度差[2], 但 Blom M[3]在实验中发现fMLP孵育后STZ (serum-treated zymosan) 刺激合成的血小板活化因子(PAF)降低, 证实对EOS功能有影响。所以本实验没有加入fMLP而单用小牛血清孵育, 仍然达到了较好的分离效果。

密度液配置准确是percoll不连续密度梯度分离法成功的关键, 采用微量加样枪和分析天平称量校正, 同时保持每次使用微量加样枪相同力度及松开控制按钮缓慢, 密度液能准确到要求的 ± 0.005 。

膜片钳实验时, 未染色的EOS和红细胞及中性粒细胞在显微镜下观察形态特征区别明显, 红细胞呈透明圆盘状, 无核, 胞质无颗粒, 而中性粒细胞较EOS小, 核多为3到4叶, 胞质无颗粒, 而EOS核多为两分叶, 胞质内充满均匀细小颗粒。所以分离纯度稍低时注意区分, 不影响膜片钳试验。

本分离方法分离时间短, 对细胞膜及细胞功能影响小, 分离纯度较高, 经济实用, 适宜于膜片钳试验中分离采用。

参考文献:

[1]徐劲松, 蔡绍曦, 邹飞, 等. 应用抑制消减杂交克隆支气管哮喘病人嗜酸细胞差异表达基因[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(5): 509-13.

XU JS, CAI SX, ZOU F, et al. Cloning of differentially expressed genes of eosinophils from asthmatic patients by suppression subtractive hybridization[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(5): 509-13.

[2]Laviolette M, Bosse M, Rocheleau H, et al. Comparison of two modified techniques for purifying blood eosinophils[J]. J Immunol Methods, 1993, 165(2): 253-61.

[3]Blom M, Tool AT, Mul FP, et al. Eosinophils isolated with two different methods show different characteristics of activation[J]. J Immunol Methods, 1995, 178(2): 183-93.

[4]Saito M, Sato R, Munoz NM, et al. Association of granular exocytosis with Ca^{2+} -activated K^+ channels in human eosinophils[J]. Am J Physiol, 1997, 273(1 Pt 1): L16-21.