

适合膜片钳试验的一种外周血嗜酸性粒细胞分离法

周斌, 蔡绍曦, 赵海金, 胡国栋 (南方医科大学南方医院呼吸科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立一种从人群外周血中分离出适合膜片钳试验的外周血嗜酸性粒细胞(EOS)分离方法,并在分离的细胞上观察其 K^+-Ca^{2+} 通道特性。方法 采用改良的不连续密度梯度法分离 EOS,用膜片钳单通道记录法记录 K^+-Ca^{2+} 通道电流。结果 外周血 EOS 的回收率为 $(48.2\pm 6.9)\%$ 、存活率 $>99\%$ 、纯度为 $(90.5\pm 1.6)\%$ 。EOS 形态完整,可检测到其膜上的 K^+-Ca^{2+} 通道。结论 该法能短时间内从外周血中分离出高存活率、无细胞损伤的 EOS,是一种适于膜片钳试验中分离外周血 EOS 的方法。

关键词:嗜酸性粒细胞;percoll 不连续密度梯度法;膜片钳

中图分类号:R-33 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2005)07-0782-02

Method for human peripheral blood eosinophil isolation for patch-clamp study

ZHOU Bin, CAI Shao-xi, ZHAO Hai-jin, HU guo-dong

Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medicine University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish a rapid and economic method for isolating human peripheral blood eosinophils with high viability for patch-clamp studies and investigate the electrophysiological properties of Ca^{2+} -activated K^+ channel of the isolated cells. **Methods** Peripheral blood eosinophils were isolated by modified discontinuous Percoll density gradient centrifugation, and the electric currents in the single Ca^{2+} -activated K^+ channels of the cells were recorded using patch-clamp technique with cell-attached configuration. **Results** The purity of the eosinophils from healthy donors reached $(90.5\pm 1.6)\%$, with a viability rate over 99% and recovery rate of $(48.2\pm 6.9)\%$. The isolated cells were morphologically intact, from which Ca^{2+} -activated K^+ channel activity could be detected. **Conclusion** The peripheral blood eosinophils isolated using this rapid, simple and highly efficient method are characterized by high purity and viability without obvious cellular injuries, which are ideal for patch-clamp studies.

Key word: eosinophils; discontinuous Percoll density gradient centrifugation; patch-clamp

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 $(2\sim 5)\%$ 。

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 $100\ \mu\text{l}$ 微量加样枪。

1.3.2 配制等渗 Percoll 重液和轻液。1 ml $10\times\text{PBS}$ 加 9 ml Percoll 配成重液,1 ml 重液加 9 ml $1\times\text{PBS}$ 配成轻液。

1.3.3 用 $100\ \mu\text{l}$ 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 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 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 是需加重液量、 y 是所配梯度密度液量)。

收稿日期:2005-01-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30270593);广东省自然科学基金项目(04105757)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30270593) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (04105757)

作者简介:周斌(1974-),男,第一军医大学在读硕士研究生,主治医师,电话:020-61641575

通讯作者:蔡绍曦,电话:020-61641571,电话:020-61641571

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 °C 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 °C 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 μ l 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 μ mol/L 和 1 μ mol/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控制, 内灌电极液, 阻抗为 8~12 M Ω , 封接阻抗大于 5 G Ω 。电流经 CEZ-2400 型膜片钳放大器 (NIHONKOH DENO, 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 (Axon instrument, 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 \pm 1.6)%; 台盼蓝染色活率 >99%; EOS 形态改变 <3%; EOS 纯度为 (90.5 \pm 3.6)%; 中性粒细胞为 (3.9 \pm 0.9)%; 红细胞含量为 (5.3 \pm 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。

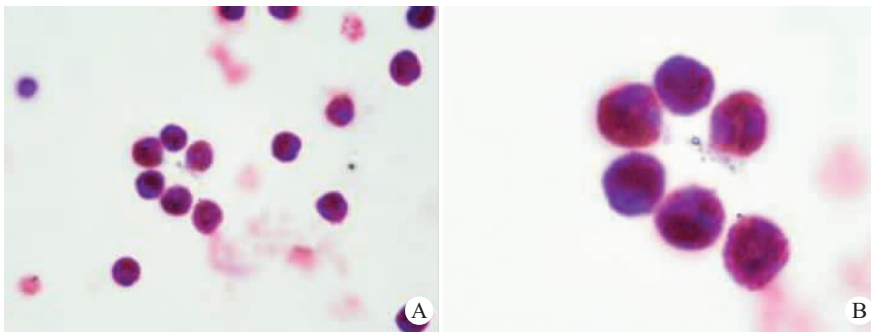


图 1 分离的外周血嗜酸性粒细胞 (瑞氏-姬姆萨染色)

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

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 μ 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 (浴液 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。浴液中加入钙离子载体 A-23187 1 μ mol/L 时, 能激活类似的电流, 证实为钙依赖性的钾离子电流 (图 2 B)。

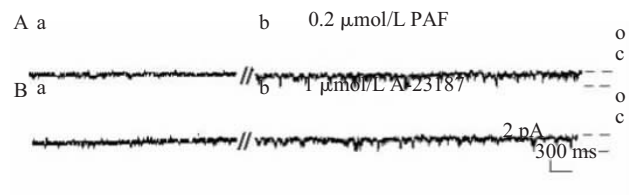


图 2 嗜酸性粒细胞在 PAF、A-23187 作用下 Kca 通道的开放电流

Fig.2 Ca²⁺-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 μ mol/L PAF perfusion at the 0 mV pipette potential from the same membrane patch. B: Current recorded before (a) and during (b) 1 μ 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.

(下接 798 页)

- [2] Hacia JG, Sun B, Hunt N, *et al.* Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays [J]. *Genome Res*, 1998, 8(12): 1245-58.
- [3] Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl): 42-7.
- [4] Milner N, Mir KU, Southern EM. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(6): 537-541.
- [5] Hyung-Lae Kim. Comparison of oligonucleotide-microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) in transcript profiling analysis of megakaryocytes derived from CD³⁴⁺ cells [J]. *Exp Mol Med*, 2003, 35(5): 460-6.
- [6] Li S, Ross DT, Kadin ME, *et al.* Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(4): 1231-7.
- [7] Zammateo N, Jeanmart L, Hamels S, *et al.* Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays [J]. *Anal Biochem*, 2000, 280:143-50.
- [8] Halliwell CM, Cass AE. A Factorial Analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotide on glass surfaces [J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 2476-83.
- [9] Strother T, Hamers RJ, Smith LM, *et al.* Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(18): 3535-41.
- [10] Véronique Le Berre, Emmanuelle Trévisiol, Adilia Dagkessamanskaia, *et al.* Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: e88.
- [11] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al.* Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:10614-9.
- [12] Anderson S, Roger YH, Huang ZI, *et al.* Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays [J]. *Anal Biochem*, 1999, 266: 23-30.
- [13] Afanassiev V, Hanemann V, Stefan W, *et al.* Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film [J]. *Nucl Acids Res*, 2000, 28 (12): 66e-66.
- [14] Wang HM, Ma WL, Huang H, *et al.* DNA microarray probes preparation by gel isolation nested PCR [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(3): 281-7.

(上接 783 页)

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 NH₄Cl 裂解红细胞而用 Dextran 沉淀红细胞,避免了 NH₄Cl 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.