

四种常用的人中性粒细胞分离方法的比较

李金凤, 刘文礼, 史小娟, 刘伟, 汉建忠, 万静, 罗自强

(中南大学湘雅医学院生理学教研室, 长沙 410078)

[摘要] 目的:比较 Percoll 非连续密度梯度离心法、Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法、裂解红细胞法和 Dextran 作用下红细胞自然沉降法四种常用的人中性粒细胞分离方法。方法:取健康人外周静脉血,分别采用以上四种方法进行中性粒细胞分离,对其细胞纯度、回收率、存活率进行比较。结果:Percoll 非连续密度梯度离心法与 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离得到的细胞纯度均大于 90%,两者间比较无统计学差异($P > 0.05$);裂解红细胞法和 Dextran 作用下红细胞自然沉降法分离得到的细胞纯度略低于 Percoll 非连续密度梯度离心法($P < 0.01$)与 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法($P < 0.05$)。Dextran 作用下红细胞自然沉降法的回收率低于 Percoll 非连续密度梯度离心法($P < 0.01$)、Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法($P < 0.01$)和裂解红细胞法($P < 0.05$);Percoll 非连续密度梯度离心法回收的中性粒细胞存活率明显高于 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法($P < 0.05$),裂解红细胞法($P < 0.01$)和 Dextran 作用下红细胞自然沉降法($P < 0.01$)。结论:Percoll 非连续密度梯度离心法分离中性粒细胞,纯化程度好,回收率高,是一种简单、高效的中性粒细胞分离方法,适于临床和科研中广泛应用。

[关键词] 中性粒细胞; Percoll 非连续密度梯度离心法; Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法; 裂解红细胞法; Dextran 红细胞沉降法

[中图分类号] R331.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-2588(2008)04-0277-05

Comparison of 4 popular methods for neutrophil isolation from human peripheral blood

LI Jin-feng, LIU Wen-li, SHI Xiao-juan, LIU wei, HAN Jian-zhong, WAN Jing, LUO Zi-qiang

(Department of Physiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

[Abstract] **Objective** Percoll density gradient centrifugation, Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, red blood cells cracking and natural erythrocyte sedimentation method with Dextran, which are 4 frequently used methods for neutrophil separation from human peripheral blood, were compared. **Methods** Respectively using the 4 methods to separate neutrophil from same healthy human peripheral blood, the purity, recovery rate, and cell survival rate were compared. **Results** Among the 4 separation methods, the neutrophil purity from Percoll density gradient centrifugation and Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation were more than 90%, but there was no significant difference between them ($P > 0.05$); the cell purity from red blood cells cracking and the natural erythrocyte sedimentation method with Dextran was lower than the Percoll density gradient centrifugation ($P < 0.01$), Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation ($P < 0.05$); the neutrophil recovery rate from Percoll density gradient centrifugation, Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and red blood cells cracking were significantly higher than that from the natural erythrocyte sedimentation method with Dextran ($P < 0.01$, $P < 0.01$, and

收稿日期:2008-04-15 修回日期:2008-05-29

作者简介:李金凤(1978-),女,河南商丘人,硕士,主要从事急性肺损伤的机制研究。

通讯作者:罗自强, E-mail:luozq1962@163.com

基金项目:国家自然科学基金(30400190,30670770);湖南省重点学科建设资助项目 This work was supported by the National Science Foundation of China (30400190,30670770) and the Construct Program of the Key Discipline in Hunan Province.

$P < 0.05$, respectively); Cell survival rate from Percoll density gradient centrifugation was significantly higher than Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation ($P < 0.05$), red blood cells cracking ($P < 0.01$), and the natural erythrocyte sedimentation method with Dextran ($P < 0.01$). **Conclusion** Percoll density gradient centrifugation provides the most simple and efficient approach for isolation of human blood neutrophil with the high purity and viability, which is suitable to utilize in the clinical work and scientific research.

[**Key words**] neutrophil; Percoll; Ficoll-Hypaque; cells cracking; Dextran

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(4):0277-05]

中性粒细胞(neutrophil)在机体非特异性免疫防御反应中起着十分重要的作用,是机体抵御微生物病原体,特别是化脓性细菌入侵的重要吞噬细胞。外周血白细胞以中性粒细胞为主,正常情况下中性粒细胞占人外周血白细胞的50%~70%。急性感染或炎症、广泛的组织损伤或坏死、急性溶血和失血、急性中毒以及恶性肿瘤等情况时,外周血中性粒细胞的数量增高^[1]。随着对全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)研究的不断深入^[2],对中性粒细胞在炎症过程中的作用又有了新的认识,对其数量、功能及在组织中的转归进行研究成为临床和科研的重要内容。从血液中分离中性粒细胞是在细胞水平研究其生物学特性及功能的第一步。

目前国内外已经报道多种分离人和动物中性粒细胞的方法,其中Percoll非连续密度梯度离心法、Ficoll-Hypaque密度梯度离心法、Dextran作用下红细胞自然沉降法和裂解红细胞法是最常应用的中性粒细胞分离方法。但目前尚未见到同时比较这四种方法分离效果的报道。本文通过采用四种不同方法对同一血样的中性粒细胞进行分离,比较各方法收获细胞的纯度、回收率、存活率,旨在寻找一种简单、高效的中性粒细胞的分离方法。

1 材料与方法

1.1 材料 人中性粒细胞分离液和淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司, Percoll原液和Dextran T-500购自Pharmacia公司,红细胞裂解液购自BD公司,小牛血清(BSA)购自

北京鼎国生物技术有限公司, PBS磷酸盐缓冲液(0.15 mol/L, pH 7.4)。人外周静脉血液由健康成年志愿者提供。

1.2 方法

1.2.1 Percoll非连续密度梯度离心法^[3-4]

中性粒细胞分离液的配制^[4]:将Percoll原液与8.77 g/L的氯化钠溶液以9:1(V/V)的比例混合,定为100%的Percoll,再用灭菌生理盐水配制60%及75%的Percoll分离液(V/V),其中60% Percoll密度为1.079,75% Percoll密度为1.090。

操作方法:取EDTA抗凝血2 mL, 1 500 r/min水平离心15 min。先吸取上层血浆,离心获得无血小板血浆(PPP)用以重悬粗提的白细胞。再吸取富含白细胞的“云雾细胞层”,用PBS液2 mL稀释。在另一离心管中,依次加入2 mL的75%与2 mL的60% Percoll液和1 mL的PPP重悬液,将稀释的细胞小心缓慢地加于此离心管中,注意保持液体界面的完整性,2 000 r/min离心20 min。吸取60%与75% Percoll液的界面层中中性粒细胞,用PBS充分洗脱Percoll胶粒。然后加入含有10%小牛血清的RPMI 1640 200 μ L待用。

1.2.2 Ficoll-Hypaque密度梯度离心法^[5] EDTA抗凝全血2 mL,以PBS液作1:1稀释后,按1:1的体积比轻轻叠加在中性粒细胞分离液上,使两者形成一个清晰的界面,2 000 r/min水平离心20 min,离心管中由上至下细胞分4层:第1层是稀释的血浆,第2层是环状乳白色的单个核细胞层(包括单核细胞和淋巴细胞),第3层是分离液与中性粒细胞混合层,第4层是红细胞层。用毛细吸管吸取第2层和第3层细胞至另一试管内,加入足量的PBS,充

分混匀,1 000 r/min 离心 10 min。吸去上清液,用含 1% BSA 的 PBS 液重新混悬沉淀的细胞,将得到的细胞悬液置于比重为 1.077 g/mL 的淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min,沉于离心管底的即为中性粒细胞,沉淀经 PBS 溶液反复洗两次,加入含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 200 μ L 待用。

1.2.3 裂解红细胞法分离中性粒细胞^[6] 取 EDTA 抗凝血 2 mL,于无菌条件下加入 1:3 (V/V) 的红细胞裂解液,混匀后室温静置 15 min。1 000 r/min 水平离心 5 min。吸去上清,重复裂解红细胞 1 次,留管底白细胞,加入含 1% BSA 的 PBS 液 2 mL,充分混匀后加于预置 4 mL 60% 的 Percoll 离心管的液面上,2 000 r/min 离心 20 min。留管底中性粒细胞,用含有 1% BSA 的 PBS 洗 2 次,将所获中性粒细胞稀释至 200 μ L 后待用。

1.2.4 Dextran 作用下红细胞自然沉降法^[6] 取 EDTA 抗凝血 2 mL,加入 400 μ L 的 60 g/L Dextran,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中静置 45 min,使红细胞沉淀。将上层白细胞加于预置的 4 mL 60% Percoll 的试管中(保持界面清晰),2 000 r/min 水平离心 20 min,底层为中性粒细胞和少量红细胞。弃去上清,加入红细胞裂解液 3 mL 充分混匀后室温静置 15 min,再加入 PBS 5 mL 混匀,1 000 r/min 离心 5 min,用含有 1% BSA 的 PBS 洗 2 次,将所获中性粒细胞稀释至 200 μ L 后待用。

1.2.5 中性粒细胞的纯度、回收率和存活率的测定^[5-8] 从分离得到的中性粒细胞混悬液中取出 50 μ L,用血细胞计数板于显微镜下计数分离后中性粒细胞数;并推片后进行瑞-吉染色,显微镜下计数 100 个细胞,计算分离得到的中性粒细胞的纯度;再取 10 μ L 中性粒细胞悬液进行台盼蓝染色后镜下观察,根据正常细胞胞体完整,透明不着色,死细胞着蓝色的原理随机计数 200 个细胞后,计算出细胞存活率。中性粒细胞回收率根据公式计算:中性粒细胞回收率 = (分离后细胞数/分离前细胞数) \times 100%。其中,分离之前中性粒细胞总数在静脉采血之后进行血常规检查得到。

1.3 统计学处理 实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 四种方法分离得到的中性粒细胞纯度的比较 分离得到的中性粒细胞经过瑞-吉染色后显微镜下可见,分离纯化的中性粒细胞形态较好,细胞核多为两叶或三叶,少数为杆状核或四、五叶核,经过染色后呈紫红色,镜下未见到红细胞,可以看到散在的少数的淋巴细胞(图 1)。细胞计数统计后发现,Percoll 非连续密度梯度离心法与 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离得到的细胞纯度均大于 90%,两者间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。裂解红细胞法和 Dextran 作用下红细胞自然沉降法所得细胞纯度略低于 Percoll 非连续密度梯度离心法 ($P < 0.01$) 和 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法 ($P < 0.05$) (表 1)。此外,Percoll 非连续密度梯度离心法在分离中性粒细胞的过程中可以同时得到纯度较高的淋巴细胞(图 2)。

2.2 四种方法分离纯化的中性粒细胞回收率的比较 Percoll 非连续密度梯度离心法与 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离得到的细胞回收率均大于 90%,两者间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。四种分离方法中,Dextran 作用下红细胞自然沉降法所得的细胞的回收率最低,均低于 Percoll 非连续密度梯度离心法 ($P < 0.01$)、Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法 ($P < 0.01$) 和裂解红细胞法 ($P < 0.05$)。裂解红细胞法的回收率低于 Percoll 非连续密度梯度离心法 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 四种方法分离所得中性粒细胞存活率的比较 四种分离方法所得中性粒细胞存活率均大于 90%,其中 Percoll 非连续密度梯度离心法分离纯化所得的中性粒细胞活性最高,明显高于裂解红细胞法 ($P < 0.01$)、Dextran 作用下红细胞自然沉降法 ($P < 0.01$) 和 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法 ($P < 0.05$) (表 1)。

表1 4种分离方法分离中性粒细胞回收率、细胞活性、纯度的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab.1 Comparison of the purity, recovery rate, and cell survival rate of neutrophils of 4 kind of separation methods ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分离方法	细胞纯度(%)	细胞回收率(%)	细胞存活率(%)
Percoll 非连续密度梯度离心法	92.33 ± 1.53	92.28 ± 3.02	97.17 ± 1.04
Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法	91.33 ± 1.15	90.42 ± 2.43	93.83 ± 1.04*
裂解红细胞法	87.33 ± 2.52**#	88.06 ± 1.50*	92.83 ± 0.29**
Dextran 作用下红细胞自然沉降法	86.67 ± 1.53***#	83.60 ± 0.81***#▲	92.50 ± 0.50**

与 Percoll 法比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Ficoll-Hypaque 法比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与裂解红细胞法比较, ▲ $P < 0.05$

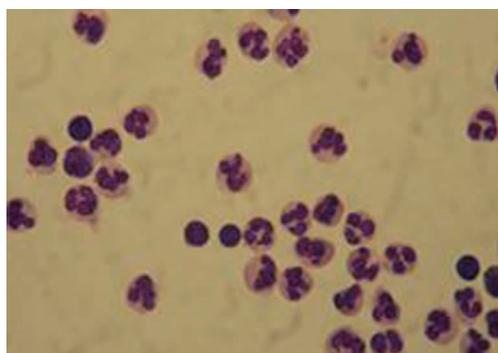


图1 Percoll 非连续密度梯度离心法纯化后的中性粒细胞

Fig.1 Neutrophils after purification with Percoll density gradient centrifugation

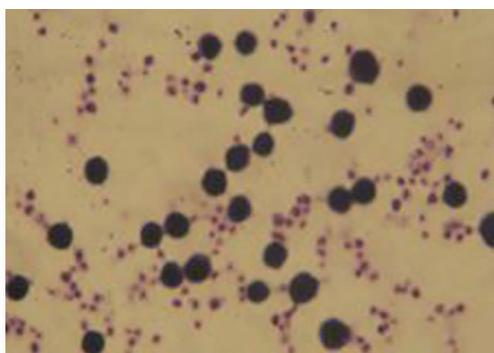


图2 Percoll 非连续密度梯度离心分离过程中得到的淋巴细胞

Fig.2 Lymph cell obtained from Percoll density gradient centrifugation

3 讨论

目前国内外文献资料显示,所报道的分离人和动物中性粒细胞的方法众多,除了本文用到的密度梯度离心法、Dextran 作用下红细胞自然沉降法和裂解红细胞法外,还有流式细胞仪^[9-10]、免疫磁珠等方法。但密度梯度离心法、Dextran 作用下红细胞自然沉降法和裂解红细胞法是最常使用的方法。

密度梯度离心法是根据细胞本身比重的差别来分离各种细胞。人中性粒细胞的漂浮密度为 1.080 ~ 1.085 g/mL;嗜酸性粒细胞为 1.09 ~ 1.095 g/mL;单核细胞为 1.050 ~ 1.066 g/mL;淋巴细胞为 1.052 ~ 1.077 g/mL;红细胞和多核白细胞密度较大为 1.09 ~ 1.11 g/mL;血小板 1.030 ~ 1.060 g/mL^[11]。利用一种密度介于 1.075 ~ 1.090 而近于

等渗的溶液做密度梯度离心,使一定密度的细胞按相应密度梯度分布,从而将各种血细胞加以分离^[12]。Ficoll-Hypaque 和 Percoll 是目前市售的两种主要细胞分离液。本研究结果发现, Percoll 和 Ficoll-Hypaque 法分离到的中性粒细胞纯度和回收率并无差异,但 Percoll 法分离得到的中性粒细胞的存活率明显高于 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法。分析原因可能是 Ficoll 结构中的长链烃组成具有 LPS 样作用,导致分离过程对中性粒细胞的激活,从而对中性粒细胞本身有影响^[13]。而 Percoll 的主要成份是硅石胶,对中性粒细胞的化学成份基本无影响^[6]。

红细胞沉降现象与红细胞的聚集性密切相关,高分子的葡聚糖通过增强红细胞聚集性而加速其沉降。Dextran 作用下红细胞自然沉降法先用葡聚糖促进红细胞沉降,然后用 60% 的 Percoll 进行密度梯度

离心。由于中性粒细胞的密度与红细胞相近,所以此方法克服了密度梯度离心法难将中性粒细胞与红细胞完全分开的缺点。但是研究发现,细胞分离之前应用葡聚糖,葡聚糖也可使部分白细胞随红细胞一起沉降,这可能是 Dextran 作用下红细胞自然沉降法的中性粒细胞回收率最低的原因。

裂解红细胞法是利用红细胞裂解液快速裂解红细胞,然后进行密度梯度离心分离中性粒细胞^[14],此方法的优点同 Dextran 作用下红细胞自然沉降法一样,克服了密度梯度离心法难将中性粒细胞与红细胞完全分开的缺点。由于红细胞裂解液对一些老化的中性粒细胞具有一定的破坏作用,因此,裂解红细胞法的回收率略低于 Percoll 非连续密度梯度离心法^[6]。虽然裂解红细胞法分离的中性粒细胞的纯度略低于 Percoll 和 Ficoll-Hypaque 法,但它操作简便,分离时间短。作者在采用流式细胞术检测中性粒细胞表面黏附分子 CD11b 改变时,以裂解红细胞法快速分离的中性粒细胞,并在流式细胞仪上辅以画门的方式确定所需的细胞群,同样获得了理想的测定效果(待发表资料)。综合比较以上四种分离方法, Percoll 非连续密度梯度离心法分离纯化中性粒细胞,细胞回收率高,纯化程度好,操作过程简单,分离时间较短,可以同时得到中性粒细胞和淋巴细胞,1 mL 到数百毫升大小的样本均适用,适于在临床和科研中广泛应用,但是根据不同的实验目的,实验者还应根据实际情况进行分离方法的选择。

参 考 文 献

- [1] 陈文彬. 诊断学[M]. 5版. 北京:人民卫生出版社,2001:244. CHEN Wen-bin. Diagnosis[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House,2001:244.
- [2] Koch T. Origin and mediators involved in sepsis and the systemic inflammatory response syndrome [J]. *Kidney Int*, 1998, 64: S66-69.
- [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]. *上海免疫学杂志*,2000,20(2):122. LÜ Jin-xing, WANG Jian, ZHANG Xi-qing, et al. Separate neutrophil from peripheral blood using Non-consecutive Percoll density gradient[J]. *Shanghai Journal of Immunology*, 2000, 20(2):122.
- [4] 刘辉. 免疫学与免疫学检验[M]. 北京:人民军医出版社,2006:56. LIU Hui. Immunology and immunological test[M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2006:56.
- [5] 刘文超,刘智广. 外周血中性粒细胞的分离方法[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,1996,12(4):64-66. LIU Wen-chao, LIU Zhi-guang. Separation method of neutrophils in the peripheral blood[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 1996, 12(4):64-66.
- [6] 李英俊,臧丽,张乃生,等. 奶牛外周血中性粒细胞分离方法的优化[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(7):57-60. LI Ying-jun, ZANG Li, ZHANG Nai-sheng, et al. The optimizing of separated method about PMN from dairy cattle peripheral blood [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, 26(7):57-60.
- [7] Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability[J]. *Neuroimmunol*, 2007, 184(1-2):136-148.
- [8] Rocourt DV, Mehta VB, Wu D, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor decreases neutrophil-endothelial cell interactions[J]. *J Surg Res*, 2007, 141(2):262-266.
- [9] Lyons PA, Koukoulaki M, Hatton A, et al. Microarray analysis of human leucocyte subsets: the advantages of positive selection and rapid purification[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8:64.
- [10] Cowland JB, Borregaard N. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis[J]. *Immunol Methods*, 1999, 232(1-2):191-200.
- [11] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002:66. JIN Bo-quan. Cellular and molecular immunology laboratory technicians[M]. Xi'an: Fourth Military Medical University Press, 2002:66.
- [12] 金宗骧. 血浆的临床应用[M]//王培华. 输血技术学. 北京:人民卫生出版社, 2002:38-39. JIN Zong-xiang. The clinical application of plasma[M]//WANG Pei-hua. Blood Transfusion Technology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:38-39.
- [13] Monlardini E, Paape MJ, Wang Y, et al. Evaluation of L-selectin expression and assessment of protein tyrosine phosphorylation in bovine polymorphonuclear neutrophil leukocytes around parturition [J]. *Vet Res*, 2002, 33(3):271-281.
- [14] 汪志文,周学武. 介绍一种适用于流式细胞术的简便的红细胞裂解法[J]. *中国检验医学与临床*, 2001, 2(2):42-46. WANG Zhi-wen, ZHOU Xue-wu. A simple method of erythrocyte fragmentation for flow cytometer examination[J]. *Chinese Medicine and Clinical Examination*, 2001, 2(2):42-46.