

• 基础实验研究论著 •

3 种获得中性粒细胞方法的比较及应用的探讨^{*}呼沛然,白苗娜,李萌璐,杨欢,姚智,高颖[△]

(天津医科大学基础医学院免疫学系/天津市细胞与分子免疫学重点实验室/国家教育部免疫微环境与疾病重点实验室,天津 300070)

摘要:目的 比较诱导髓系白血病细胞株分化法、外周血分离纯化法、诱导造血干细胞定向分化法 3 种获得中性粒细胞的方法。方法 用 1 $\mu\text{mol/L}$ 全反式维甲酸(ATRA)诱导 NB4 细胞分化;用红细胞裂解法结合免疫磁珠法分离纯化外周血中性粒细胞;用 Percoll 密度梯度离心法结合免疫磁珠法分离纯化外周血干细胞,然后用 GM-CSF 和 G-CSF 诱导粒细胞的产生。3 种方法获得的细胞通过 MGG 染色检测细胞形态及中性粒细胞纯度,利用免疫荧光技术检测 CD18 蛋白的表达及胞内分布特点。结果 诱导 NB4 细胞分化可获得约 40% 的中性粒细胞,从外周血分离纯化的中性粒细胞纯度约为 90%,通过诱导造血干细胞定向分化可获得 70% 以上的中性粒细胞。免疫荧光结果显示,3 种方法获得的中性粒细胞,CD18 蛋白的表达强度无明显不同,也都呈现点状分布。结论 红细胞裂解法结合免疫磁珠法分离纯化外周血中性粒细胞,纯度高、活性好,有利于快速检测新鲜血液样本中的中性粒细胞;诱导造血干细胞定向分化获得的中性粒细胞,活性高,可在体外维持长达几天之久,可应用于中性粒细胞长时间的体外试验。

关键词:中性粒细胞; 外周血干细胞; 诱导分化; 免疫磁珠法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2123-03

Comparison and discussion of the application of three methods for neutrophil preparation^{*}Hu Peiran, Bai Miaona, Li Menglu, Yang Huan, Yao Zhi, Gao Ying[△]

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University/Tianjin Key

Laboratory of Cellular and Molecular Immunology/Key Laboratory of Educational Ministry, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To make a comparison for the neutrophils prepared either by induction of differentiation of myeloid leukemia cell line, or by separation and purification of peripheral blood cells, or by induction of myeloid differentiation of peripheral blood stem cells. **Methods** NB4 cells were induced differentiation by 1 $\mu\text{mol/L}$ all-trans retinoic acid (ATRA) to mature granulocytes; neutrophils were separated and purified from peripheral blood by lysis of red blood cells followed by negative selection using magnetic bead-labeled antibodies; hematopoietic stem cells were separated and purified from peripheral blood by Percoll gradient centrifugation followed by negative selection using magnetic bead-labeled antibodies, and were induced to myeloid differentiation by GM-CSF and G-CSF. Morphology and purity of neutrophils prepared by these three methods were studied by means of MGG staining. CD18 protein expression and subcellular distribution were studied by means of immunofluorescence staining. **Results** Purity of neutrophil was above 40% by induction of differentiation of NB4 cells, and was about 90% if purified from peripheral blood, and was above 70% if induced by myeloid differentiation of peripheral blood stem cells. There was no obvious difference for CD18 expression in neutrophils prepared by these three methods, and staining of CD18 had a dotted pattern distributed in these cells. **Conclusion** Peripheral blood neutrophils prepared by lysis of red blood cells followed by negative selection using magnetic bead-labeled antibodies are with high purity and viability which is suitable for immediate test of neutrophils from fresh blood. Neutrophils prepared by myeloid differentiation of hematopoietic stem cell are with high viability and last for days, which can be used in long test for neutrophils.

Key words: neutrophil; peripheral blood stem cell; myeloid differentiation; immunomagnetic beads

中性粒细胞是体内重要的免疫细胞,中性粒细胞参与、促进炎症反应,有利于机体的免疫防御,但是炎症反应也会对机体组织产生损伤^[1],因为炎症部位大量中性粒细胞释放的溶酶体颗粒不但可杀灭病原微生物,同时对自身组织细胞也有很强的细胞毒作用^[2]。因此可见,中性粒细胞的凋亡有利于炎症反应的及时中止,减少机体组织的过度损伤。要研究中性粒细胞,获得高纯度高活性的细胞是重要的一步。由于目前还没有中性粒细胞的细胞系,中性粒细胞离体后存活时间又短,在体外最多存活几个小时,因而目前在研究中性粒细胞凋亡的论著

中多采用两种方法获得中性粒细胞:一种方法是通过诱导白血病细胞系例如 HL-60、U937、NB4 细胞定向分化获得较成熟的粒细胞^[3-4];一种方法是通过诱导造血干细胞定向分化获得中性粒细胞^[5-6]。当然获得中性粒细胞最快捷的方法是直接从外周血分离纯化^[7-8]。本文同时采用这 3 种方法获得中性粒细胞,通过细胞形态、功能蛋白的表达比较这 3 种方法,探讨它们在研究中性粒细胞中的应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

健康人静脉血,均得到健康志愿者的知情

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31071217)。 作者简介:呼沛然,女,硕士在读,主要从事中性粒细胞凋亡与溶酶体蛋白的关系研究。 [△] 通讯作者, E-mail: gaoying@tjmu.edu.cn。

同意。

1.2 仪器与试剂 人干祖细胞富集试剂盒和人中性粒细胞富集试剂盒购自 StemCell 公司,人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,生长因子 hSCF、hTPO、hFlt3-Ligand、hGM-CSF 和 hG-CSF 购自 PeproTech 公司,小鼠抗人 CD18 单克隆抗体购自 Abcam 公司,Alexa Fluor 488 标记的羊抗小鼠 IgG 荧光抗体购自 Invitrogen 公司,Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司。正置荧光显微镜和照相系统购自 Nikon 公司,流式细胞仪购自 BD 公司。

1.3 中性粒细胞的获得

1.3.1 定向诱导人急性早幼粒白血病细胞株细胞获得中性粒细胞 人急性早幼粒白血病细胞株 NB-4 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基在 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养,用 1 μmol/L ATRA 诱导 NB-4 细胞定向分化,在分化的不同时间收集细胞进行后续检测。

1.3.2 从健康人外周血分离中性粒细胞 在得到健康志愿者知情同意后,用采血管收集外周血,将外周血先用红细胞裂解液适度裂解,立即通过离心的方法收集未被裂解的细胞,用人中性粒细胞富集试剂盒分离纯化,即先用 PBS 缓冲液将待分离细胞浓度调至 5 × 10⁷ cell/mL,加入混合第一抗体 (50 μL/mL 细胞),混匀、静置 10 min,然后加入磁珠标记的第二抗体 (100 μL/mL 细胞),混匀、静置 10 min,之后将细胞悬液放入磁场中静置 5 min,收集未被标记的细胞即为中性粒细胞,因为本方法去除了 CD2⁺、CD3⁺、CD9⁺、CD19⁺、CD36⁺、CD56⁺、或血型糖蛋白 A⁺ 的细胞。

1.3.3 定向诱导分化健康人外周血干细胞获得中性粒细胞 在得到健康志愿者知情同意后,用采血管收集外周血,然后用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离细胞,收集含有外周血干细胞 (PBSC) 的白膜,白膜细胞用缓冲液 PBS 洗 2 次后,用人干祖细胞富集试剂盒分离纯化,即利用免疫磁珠法去除 CD2⁺、CD3⁺、CD11b⁺、CD11c⁺、CD14⁺、CD16⁺、CD19⁺、CD24⁺、CD41⁺、CD56⁺、CD66b⁺、或血型糖蛋白 A⁺ 的细胞,获得造血干祖细胞。分离纯化后的干祖细胞用含 100 ng/mL hSCF、100 ng/mL hTPO 和 100 ng/mL hFlt3-Ligand 的培养液 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养 48 h,然后用含 20 ng/mL 的 hGM-CSF 和 20 ng/mL 的 hG-CSF 的培养液 37℃、5% CO₂、饱和湿度下继续培养,在分化的不同时间收集细胞进行后续检测。

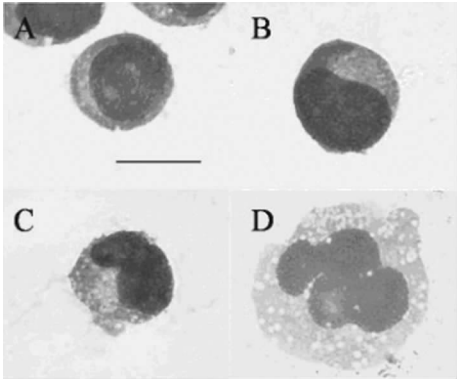
1.4 细胞早期凋亡检测 与通过培养获得中性粒细胞不同,健康人外周血被采集后,其中的中性粒细胞通常凋亡很快。因而,对从健康人外周血分离中性粒细胞进行凋亡检测,细胞用 PBS 洗后,用 Annexin V 标记磷脂酰丝氨酸作为早期凋亡的标记,同时用 PI 标记坏死的细胞,孵育后用流式细胞仪检测。

1.5 免疫荧光技术检测中性粒细胞 CD18 的表达 待测细胞用 PBS 洗 2 次后多聚甲醛固定,用 0.05% Triton X-100 孵育从而使细胞膜表面通透,用间接免疫荧光法进行标记,所用第一抗体为小鼠抗人 CD18 抗体,第二抗体为 Alexa Fluor 488 标记的羊抗小鼠 IgG 荧光抗体,荧光显微镜观察并照相记录。

2 结 果

2.1 NB-4 细胞定向分化过程中的形态变化 人急性早幼粒白血病细胞株细胞 NB-4 在 1 μmol/L ATRA 诱导下分化,分别在分化前及分化第 2、4、6 天收集细胞、涂片、染色、光学显微镜下观察、拍照。结果如图 1 及表 1 所示,分化第 2 天的 NB4 细胞仍处于早幼粒细胞阶段,但核-浆比稍有减少 (图 1B);第 4 天 NB4 细胞分化明显,出现 36%~42% 的中幼粒细胞和晚幼

粒细胞 (图 1C),并出现少量分叶核、杆状核粒细胞;第 6 天 NB4 细胞进一步分化,成熟粒细胞比例进一步升高 (>40%),但同时细胞总数明显下降,可见较多凋亡和死亡细胞,并且成熟粒细胞中大部分细胞 (约 60%) 出现体积膨大 (图 1D),提示这些细胞可能已进入早期凋亡阶段。因此,NB4 细胞被 1 μmol/L ATRA 诱导分化后第 4、5 天是收集细胞进行中性粒细胞研究的理想时间。



A:未分化;B:分化第2天;C:分化第4天;D:分化第6天;标尺:10 μm。

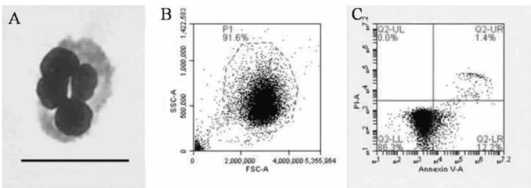
图 1 NB4 细胞分化前后的细胞形态 (1 000 ×)

表 1 NB4 细胞分化前后细胞成分的变化 (x ± s, %)

分化情况	早幼粒细胞	中、晚幼粒细胞	杆状核、分叶核粒细胞	凋亡或死亡细胞
未分化	99 ± 1	—	—	—
第 2 天	99 ± 1	—	—	—
第 4 天	55 ± 3	39 ± 3	6 ± 1	—
第 6 天	5 ± 1	17 ± 1	47 ± 3 *	31 ± 2

*:其中约有 60% 粒细胞体积膨大;—:无数据。

2.2 从健康人外周血分离纯化的中性粒细胞的形态与活性 收集的抗凝外周血,经红细胞裂解液适度裂解后用免疫磁珠法分离纯化,得到的细胞立即进行细胞涂片和染色,同时用流式细胞术检测中性粒细胞的活性。中性粒细胞的形态如图 2A 所示,显微镜下计数,中性粒细胞纯度大于 90%;通过 Annexin-V 标记及流式细胞术检测,如图 2B 和图 2C 所示,中性粒细胞存活率大于 85%。

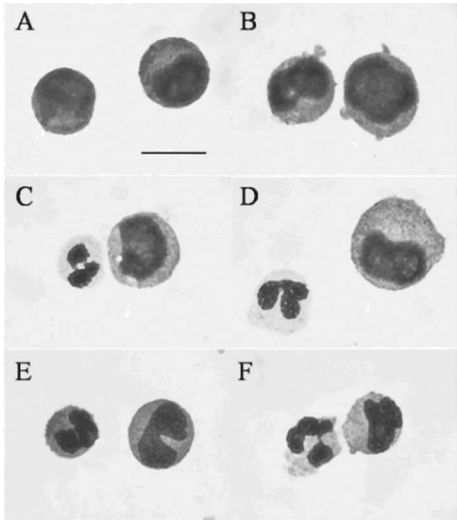


A:分叶核粒细胞的形态;B:中性粒细胞的大小分布;C:中性粒细胞的活性;标尺:10 μm。

图 2 从健康人外周血分离纯化的中性粒细胞的形态 (1 000 ×) 与活性

2.3 外周血干细胞定向分化过程中的形态变化 外周血干细胞在造血生长因子的刺激下迅速增殖,并逐渐向粒细胞分化,如图 3 和表 2 所示,分化第 8 天以原始粒细胞为主要细胞;第 12 天以早幼粒细胞为主要细胞;第 16 天仍然以早幼粒细胞为主要细胞,但是也出现约 28% 的中幼粒细胞和晚幼粒细胞;随着细胞不断增殖分化,第 20 天杆状核粒细胞和分叶核粒细胞

成为主要细胞,同时有大约 37%的中、晚幼粒细胞;第 22 天杆状核粒细胞和分叶核粒细胞的比例继续上升,同时少见早幼粒细胞及更原始的粒细胞;随后是晚幼粒细胞的减少,细胞增殖速度减慢,培养体系基本是分叶核细胞,伴随粒细胞的终末分化,中性粒细胞开始凋亡。



A:第 8 天;B:第 12 天;C:第 16 天;D:第 20 天;E:第 22 天;F:第 24 天;标尺:10 μm。

图 3 外周血干细胞定向分化过程中的形态(1 000×)

2.4 免疫荧光技术检测中性粒细胞 CD18 的表达 分别收集分化第 5 天的 NB4 细胞、外周血中性粒细胞、外周血干细胞定向分化后产生的中性粒细胞,利用免疫荧光技术标记 CD18 分子。见图 4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),CD18 在 3 种方法获得的中性粒细胞内均是点状分布,这与 CD18 是粒细胞的溶酶体蛋白一致,所不同的是,外周血中性粒细胞的 CD18 的点状分布在细胞内呈现较均匀地分布(图 4B),而外周血干细胞定向分化后产生的中性粒细胞和分化后的 NB4 细胞的 CD18 的点状分布在细胞内呈现极性(图 4A 和图 4C),这可能与培养的细胞存在细胞-细胞间的接触或细胞-基质间的接触有关。

表 2 外周血干细胞定向分化过程中细胞成分的变化(̄x±s,%)

分化时间	原始粒细胞	早幼粒细胞	中、晚幼粒细胞	杆状核、分叶核粒细胞	凋亡或死亡细胞
第 8 天	51±3	36±2	12±1	1±1	—
第 12 天	30±2	56±4	11±1	3±1	—
第 16 天	1±1	63±4	28±3	8±2	—
第 20 天	—	15±2	37±3	48±4	—
第 22 天	—	—	32±2	68±2	—
第 24 天	—	—	17±2	73±3	10±1

—:无数据。

3 讨 论

通过体外实验研究中性粒细胞最方便的是用细胞系,虽然目前还没有中性粒细胞系,但是一些髓系白血病细胞系例如

HL60、NB4 细胞,可以在全反式维甲酸的作用下,激活一些蛋白的转录和翻译,这些新合成的蛋白促使细胞向成熟粒细胞发育^[3-4];造血干细胞在造血生长因子的刺激下可以首先分化成髓系的共同祖细胞,在 GM-CSF、G-CSF 的持续作用下,进一步分化成为早幼粒细胞、中幼粒细胞、晚幼粒细胞,最终可分化为中性粒细胞^[5-6]。

本文结果显示,用全反式维甲酸诱导 NB4 细胞分化可获得 40%以上的中性粒细胞,虽然纯度不高,但是该方法是体外研究中性粒细胞最方便、最经济的方法。本文结果还显示,造血干细胞在向粒细胞分化的过程中,各阶段粒细胞的是依次出现的,20 d 以后,以中性粒细胞为主,并且成熟粒细胞比例不断上升,至 70%以上。用这种方法获得中性粒细胞,纯度较高,细胞活性在 95%以上,中性粒细胞能维持 4~5 d,非常方便进行各种体外试验,缺点是周期长、费用高。从外周血分离纯化中性粒细胞是最快捷的方法,本文结果显示,红细胞裂解后免疫磁珠负选,可得到纯度 90%以上、活性 85%以上的中性粒细胞,可用于快速检测新鲜血液样本中的中性粒细胞。

另外,免疫荧光结果显示,分化后的 NB4 细胞、外周血中性粒细胞、造血干细胞分化后获得中性粒细胞,CD18 蛋白的表达强度无明显差异,也均呈现点状分布,不同的是,外周血中性粒细胞 CD18 蛋白胞内分布无极性,而造血干细胞分化后获得中性粒细胞和分化后的 NB4 细胞的 CD18 蛋白胞内分布具有一定极性。3 个结果互为印证和补充。因此,对于采用何种方式获得中性粒细胞,应根据研究项目的具体特点进行选择。

参考文献

[1] Garlichs CD, Eskafi S, Cicha I, et al. Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(1): 828-835.

[2] Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(8): 622-632.

[3] Newburger PE, Speier C, Borregaard N, et al. Development of the superoxide-generating system during differentiation of the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line[J]. J Biol Chem, 1984, 259(1): 3771-3776.

[4] Khannagupta A, Kolibaba K, Zibello TA, et al. NB4 cells show bi-lineage potential and an aberrant pattern of neutrophil secondary granule protein gene expression[J]. Blood, 1994, 84(1): 294-302.

[5] Barbosa CM, Leon CM, Nogueira-Pedro A, et al. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines[J]. Cell Death Dis, 2011, 2(6): e165.

[6] Gao Y, Tapper H, Calafat J, et al. Granule Targeting of soluble tumor necrosis factor(TNF) receptor expressed during granulopoietic maturation in murine bone marrow cells[J]. Eur Cytokine Netw, 2006, 17(2): 98-108.

[7] 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.

[8] 郑小莉, 罗波, 梅志强, 等. Percoll 分离法结合免疫磁珠法提纯人外周血中性粒细胞方法的建立[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(18): 2723-2724.

(收稿日期: 2014-02-10)