

两步和三步法分离样本资源库抗凝血单个核细胞和血浆效果比较^{*}

丛佳¹, 徐杰², 代艳超², 王子康², 孙坚萍²

(1. 首都医科大学附属北京同仁医院血液内科, 北京 100730; 2. 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069)

摘要:目的 比较两步和三步法分离外周血单个核细胞(PBMC)和血浆的效果。方法 对送至样本资源库的 16 例抗凝血标本分别采用两步法和三步法分离 PBMC 及血浆, 并对 2 种不同处理方法的分离效果进行比较。两步法为将抗凝血加入淋巴细胞分离液, 离心后分别分离 PBMC 和血浆; 三步法则先离心分离血浆后再加入淋巴细胞分离液, 离心后分离 PBMC。结果 2 种处理方法处理后检测的活细胞数、总细胞数及活细胞比例结果相近, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。两步法血浆中细胞因子水平平均低于三步法, 其中 25 种细胞因子比较, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 两步法省时, 操作少, 在分离 PBMC 方面效果与三步法类似; 但两步法在分离血浆方面会影响血浆细胞因子水平。

关键词:品种资源; 生物标本库; 单核细胞; 细胞因子; 血浆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.011 **中图法分类号:**R446.112

文章编号:1673-4130(2019)01-0040-04 **文献标识码:**A

Comparison between two step and three step method to separate the anticoagulant blood specimens of Biobank^{*}

CONG Jia¹, XU Jie², DAI Yanchao², WANG Zikang², SUN Jianping²

(1. Department of Hematology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China;

2. Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** The quality of the specimens affects the subsequent scientific research, and the different separate methods significantly influence the specimen quality. We compared the effects of two different separate methods on the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma. **Methods** 16 specimens of Biobank were separated respectively by two-step method and three-step method, and then compared the effect of the two different methods. Two-step method: add the anticoagulant blood specimen into the lymphocyte separation medium, then separate the peripheral blood mononuclear cells and plasma after centrifugation. Three-step method: first, separate plasma after centrifugation and dilute the rest specimen; then add the rest specimen into the lymphocyte separation medium; finally, separate PBMC by the second centrifugation. **Results** To separate PBMC: live cells, total cells and cell viability were similar between two-step method and three-step method, there were no statistical differences. To separate plasma: 27 plasma cytokines were analysed, the level of plasma cytokines with two-step method were lower than that of three-step method, 25 cytokines were statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with three-step method, two-step method has similar effect of separating PBMC with less time and less operation, but the two-step method could reduce the level of plasma cytokines.

Key words: variety resources; biological specimen banks; monocytes; cytokines; plasma

转化医学^[1-2]是目前医学研究中的重点和热点, 而样本库资源库则是转化医学研究的基石和重要组成部分。早在 2009 年北京市科委正式启动疾病资源库项目建设工作。北京佑安医院以肝炎、艾滋病等传染病人群为主体, 建立了肝炎/艾滋病传染病样本资源库^[3-6]。在样本资源库中外周血单个核细胞(PB-

MC)和血浆是样本资源库储存的重要样本。PBMC 包括 B 细胞、T 细胞、NK 细胞, 单核细胞等, 在评价免疫反应中至关重要^[7], 在疫苗研究^[8-9]和临床试验中也具有重要意义^[10-11]; 而血浆中各种细胞因子对评价机体炎性反应、肿瘤发生及转移等具有重要作用。在样本资源库中对送检标本如何处理会影响标本的质

^{*} 基金项目: 国家传染病重大专项(2017ZX10202102-003-003); 北京市重点实验室项目(BZ0373)。

作者简介: 丛佳, 男, 副主任医师, 主要从事恶性血液病诊治方向的研究。

本文引用格式: 丛佳, 徐杰, 代艳超, 等. 两步和三步法分离样本资源库抗凝血单个核细胞和血浆效果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40

量。为更好地对本标本进行质量控制,从而有利于后期科学研究,本研究比较了两步和三步法分离外周血 PBMC 和血浆的效果,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集首都医科大学附属北京佑安医院 2017 年 2 月至 2017 年 4 月送入样本资源库的标本,标本来源者均已签署知情同意书。均为当天采集的新鲜抗凝血,无手术期输血、输液等干扰分离效果的标本。

1.2 分离外周血 PBMC 和血浆的方法 用乙二胺四乙酸抗凝管(货号 367525,BD 公司)采集外周血 6~8 mL,将送检标本混匀后平均分为 2 份。一份标本直接加入到 Ficoll 淋巴细胞分离液(货号 AS1114546, Axis-Shield 公司)中,2 200 r/min 离心 20 min 后进行分离 PBMC 和血浆提取,即两步法。见图 1A。一份标本 2 200 r/min 离心 7 min 后先提取血浆,再加入预温的 1640 培养基(货号 SH30809.01B, Hyclone 公司)稀释到原来体积,加入到淋巴细胞分离液中 2 200 r/min 离心 20 min 后分离 PBMC,即三步法。见图 1B。分离的 PBMC 加入适量 RPIM-1640 混合均匀洗涤后进行细胞计数,而血浆放置于-80 ℃冰箱备用。

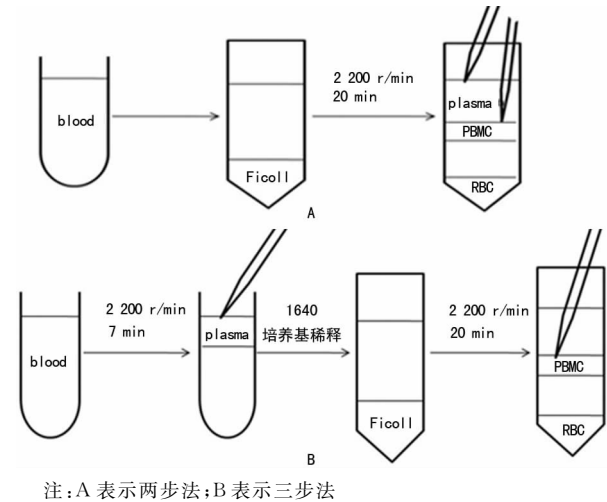


图 1 不同处理方法示意图

1.3 细胞计数 采用吖啶橙(AO)/碘化丙啶(PI)染

液(货号 CS2-0106-5ml, Nexcelom 公司)对细胞进行计数,AO 为浸润性染料(膜通透性),可侵入活细胞与双链 DNA 结合发出绿色荧光、与单链 DNA(变性 DNA)结合发出红色荧光;PI 为排斥性染料(膜不透性),不能进入活细胞,与死亡或正在死亡(膜通透性改变)的细胞核酸结合,发出红色荧光。AO/PI 双染色可区分活细胞与死亡细胞。具体操作:取 PBMC 悬液 20 μL,与 AO/PI 染料按 1:1 比例混匀;取 20 μL 混匀液加入到细胞计数板(货号 SD100, Nexcelom 公司)中,然后插入到自动细胞计数仪(cellcounter, Nexcelom 公司)中,自动计数活细胞数、总细胞数和细胞活性。

1.4 检测血浆中细胞因子水平 将冻存的血浆解冻后选取能评价炎症、免疫状态、肿瘤发生的 27 种血浆细胞因子,见表 2。利用美国 Biorad 公司试剂盒进行检测。根据试剂盒操作说明书采用 Luminex 高通量技术进行检测,检测仪器为美国 Luminex 200 液相悬浮芯片系统。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同方法分离 PBMC 效果比较 2 种方法分离的活细胞数、总细胞数及活细胞比例结果相近,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同方法分离 PBMC 效果比较($\bar{x} \pm s$)

项目	两步法	三步法	<i>t</i>	<i>P</i>
PBMC 活细胞($\times 10^5$)	3.47 $\pm$ 1.70	3.27 $\pm$ 1.79	0.517	0.613
PBMC 总细胞($\times 10^5$)	3.56 $\pm$ 1.69	3.50 $\pm$ 1.87	0.145	0.887
活细胞比例(%)	96.63 $\pm$ 4.07	93.56 $\pm$ 9.50	1.355	0.196

2.2 不同方法对血浆细胞因子水平的影响比较 两步法血浆细胞因子水平均低于三步法,除 GM-CSF 和 IP-10 外,其余 25 种细胞因子比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同方法对血浆细胞因子水平的影响比较

细胞因子	两步法 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	三步法 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	两步法/三步法 [% , 均数(范围)]
重组人巨噬细胞炎症蛋白-1β	3.84 $\pm$ 1.88	4.65 $\pm$ 2.28	4.633	0.000 1	85(66~101)
白细胞介素-6(IL-6)	2.03 $\pm$ 1.10	3.61 $\pm$ 1.16	9.303	0.000 1	49(32~92)
γ 干扰素	15.45 $\pm$ 7.62	25.94 $\pm$ 7.14	9.185	0.000 1	54(37~97)
白细胞介素 1 受体拮抗剂	49.45 $\pm$ 55.44	67.09 $\pm$ 53.52	9.133	0.000 1	66(53~98)
IL-5	5.49 $\pm$ 1.77	8.18 $\pm$ 1.96	9.065	0.000 1	62(45~90)
粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子	72.47 $\pm$ 23.09	76.86 $\pm$ 20.48	0.904	0.140 0	94(48~119)
肿瘤坏死因子-α	7.48 $\pm$ 2.62	12.19 $\pm$ 2.33	9.972	0.000 1	57(38~90)

续表 2 不同方法对血浆细胞因子水平的影响比较

细胞因子	两步法 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	三步法 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)	<i>t</i>	<i>P</i>	两步法/三步法 [% , 均数(范围)]
调节活化正常 T 细胞表达和分泌因子	947.98±609.57	2923.43±912.39	9.303	0.000 1	32(14~89)
IL-2	6.05±1.22	8.22±1.08	12.300	0.000 1	72(60~94)
IL-1β	1.03±0.54	1.74±0.50	8.984	0.000 1	53(34~94)
嗜酸性粒细胞趋化因子	24.40±8.76	28.36±6.51	5.395	0.000 1	80(57~104)
成纤维细胞生长因子	64.89±13.90	83.77±12.88	9.520	0.000 1	75(62~97)
血管内皮生长因子	12.48±4.72	18.49±4.46	8.157	0.000 1	63(42~103)
血小板衍生生长因子-BB	31.14±35.49	82.11±43.75	5.616	0.000 1	33(8~98)
干扰素诱导蛋白 10	270.53±297.43	275.65±282.70	0.289	0.540 0	96(70~124)
IL-13	8.58±2.25	13.02±4.10	8.406	0.000 1	62(40~91)
IL-4	1.53±0.64	2.50±0.59	8.151	0.000 1	56(36~103)
单核细胞趋化蛋白-1	7.22±1.92	9.77±1.47	9.832	0.000 1	69(53~94)
IL-8	4.92±2.48	7.87±2.29	9.557	0.000 1	56(41~101)
巨噬细胞炎性蛋白-1α	17.03±7.71	27.60±7.63	9.908	0.000 1	57(40~90)
IL-10	1.37±0.58	2.07±0.75	10.740	0.000 1	62(48~93)
粒细胞集落刺激因子	6.46±2.16	9.52±1.59	6.052	0.000 1	66(43~113)
IL-15	2.03±0.41	2.47±0.36	7.346	0.000 1	78(66~100)
IL-7	11.95±0.91	15.65±5.36	4.588	0.002 0	53(47~59)
IL-12p70	5.11±2.33	8.60±2.93	9.116	0.000 1	55(36~91)
IL-17A	13.07±12.88	23.51±10.84	4.998	0.000 1	35(2~105)
IL-9	40.42±14.84	71.07±17.57	7.939	0.000 1	54(35~88)

3 讨 论

由于样本资源库中的临床样本是不可再生的宝贵资源,而高质量临床样本对科学研究具有极其重要的意义^[12]。如何科学、高效、标准化地采集、处理、储存高质量样本资源,建立高质量资源库,使之更好地为转化医学服务至关重要^[13]。样本资源库中标本分离方法对标本质量影响较大,本研究比较了两步和三步法对 PBMC 分离和血浆细胞因子水平的影响。

从操作方面看,两步法处理时间短,操作少于三步法。但在 PBMC 分离效果方面,在活细胞数、总细胞数及活细胞比例方面,两步法与三步法的结果基本一致,差异均无统计学意义($P>0.05$),提示在分离 PBMC 时可采取两步法,这样操作少且省时。也有研究对不同 PBMC 分离技术方法进行了比较,为利用 PBMC 而进行的下游应用研究提供了基础,从而可选择最佳 PBMC 分离方法^[15]。

本研究比较了 2 种方法分离后的血浆细胞因子水平,结果显示,两步法分离血浆中的细胞因子水平均低于三步法,其中 25 种细胞因子比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),从表 2 可见,采取两步法分离的血浆大部分细胞因子水平仅为三步法的 2/3,甚至更低,这种差异会对后期研究造成极大影响。究其原因,可能在于两步法分离的血浆,因为在分离血浆前就加入了淋巴细胞分离液,从而影响了血浆细胞因子水平,具体机制尚不清楚,有待于进一步的验证研究;

而本研究中无论是两步法还是三步法,均采用了先进的 Luminex 高通量技术,其差异应该与检测技术无关;而检测的 27 种细胞因子则涵盖了能反映炎症、肿瘤发生及转移等的各种白细胞介素、细胞集落刺激因子、干扰素、血管生长因子等,则 2 种方法之间的差异也应该不是细胞因子的选择差异所致。提示如后期研究涉及血浆细胞因子水平,那么样本库标本的血浆分离应采用三步法进行处理。

有研究观察了不同处理时间、不同处理温度等条件对血浆收集的影响,结果显示,代谢产物与时间相关,随时间延长,代谢产物会增多,故建议分离血浆应在 3 h 内进行,在该时间段内代谢产物数据很稳定^[14]。由此可见,在不同实验条件下分离的血浆质量会有很大差异。

4 结 论

本研究结果显示,两步法与三步法比较,在分离和收集 PBMC 方面效果类似,且步骤简单,可节省时间;但两步法分离的血浆细胞因子受到很大影响,不能真实地反映血浆细胞因子水平。

参考文献

[1] GERAGHTY J. Adenomatous polyposis coli and translational medicine[J]. Lancet,1996,348(9025):422.
[2] BUTLER D. Translational research:crossing the valley of death[J]. Nature,2008,453(7197):840-842.
[3] 李海燕,张雷,张雪娇,等. 北京重大疾病(下转第 47 页)

- [15] LAX A, SANCHEZ-MAS J, ASENSIO-LOPEZ M C, et al. Mineralocorticoid receptor antagonists modulate galectin-3 and interleukin-33/ST2 signaling in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction[J]. JACC Heart Fail, 2015, 3(1): 50-58.
- [16] BANDARA G, BEAVEN M A, OLIVERA A, et al. Activated mast cells synthesize and release soluble ST2-a decoy receptor for IL-33[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(11): 3034-3044.
- [17] VEERAVEEDU P T, SANADA S, OKUDA K, et al. Ablation of IL-33 gene exacerbate myocardial remodeling in mice with heart failure induced by mechanical stress[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 138(2): 73-80.
- [18] YANCY C W, JESSUP M, BOZKURT B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines [J]. Circulation, 2013, 128(16): 1810-1852.
- [19] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 98-122.
- [20] BAYES-GENIS A, ZAMORA E, DE ANTONIO M, et al. Soluble ST2 serum concentration and renal function in heart failure[J]. J Card Fail, 2013, 19(11): 768-775.
- [21] IMMANUEL S, MANDEY N M, MAKMUN L H. ST2 levels before and after treatment of NYHA III and IV heart failure [J]. Acta Med Indones, 2015, 47(4): 304-310.
- [22] LICHTENAUER M, JIRAK P, WERNLY B, et al. A comparative analysis of novel cardiovascular biomarkers in patients with chronic heart failure[J]. Eur J Intern Med, 2017, 44(2): 31-38.
- [23] FRIÕES F, LOURENÇO P, LASZCZYNSKA O, et al. Prognostic value of sST2 added to BNP in acute heart failure with preserved or reduced ejection fraction[J]. Clin Res Cardiol, 2015, 104(6): 491-499.
- [24] XANTHAKIS V, LARSON M G, WOLLERT K C, et al. Association of novel biomarkers of cardiovascular stress with left ventricular hypertrophy and dysfunction: implications for screening[J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2(6): e000399.
- [25] DZUDIE A, DZEKEM B S, KENGNE A P. NT-pro BNP and plasma-soluble ST2 as promising biomarkers for hypertension, hypertensive heart disease and heart failure in sub-Saharan Africa[J]. Cardiovasc J Afr, 2017, 28(6): 406-407.
- [26] RUSON D, LEPOUTRE T, AHN S A, et al. Increased soluble ST2 is a stronger predictor of long-term cardiovascular death than natriuretic peptides in heart failure patients with reduced ejection fraction[J]. Int J Cardiol, 2014, 172(1): 250-252.
- [27] POULEUR A C. Which biomarkers do clinicians need for diagnosis and management of heart failure with reduced ejection fraction? [J]. Clin Chim Acta, 2015, 443(4): 9-16.

(收稿日期: 2018-08-20 修回日期: 2018-10-26)

(上接第 42 页)

- 临床数据和样本资源库建设成果初探[J]. 中华医学管理杂志, 2013, 29(11): 863-865.
- [4] 李海燕, 张雪娇, 邵雪梅, 等. 疾病资源库建设的重要性及现状分析[J]. 中华医院管理杂志, 2010, 26(11): 801-804.
- [5] 孙焕芹, 刘梦佳, 戴北宸, 等. 用转化医学理念指导样本资源库建设[J]. 北京医学, 2012, 34(6): 495-496.
- [6] 孙坚萍, 孙焕芹, 刘宁, 等. 传染病样本资源库质量控制体系建设经验[J]. 中华医院管理杂志, 2016, 32(9): 698-699.
- [7] BOLEN C R, UDUMAN M, KLEINSTEIN S H. Cell subset prediction for blood genomic studies[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(6): 258.
- [8] WIECZOREK L, KREBS S J, KALYANARAMAN V, et al. Comparable antigenicity and immunogenicity of oligomeric forms of a novel, acute HIV-1 subtype C gp145 envelope for use in preclinical and clinical vaccine research [J]. J Virol, 2015, 89(15): 7478-7493.
- [9] WETZEL K S, YI Y, ELLIOTT S T, et al. CXCR6-Mediated simian immunodeficiency virus SIVagmSab entry into sabaeus African green monkey lymphocytes implicates widespread use of Non-CCR5 pathways in natural host infections[J]. J Virol, 2017, 91(4): 91.
- [10] DONAHUE R N, LEPONE L M, GRENGA I, et al. Analyses of the peripheral immunome following multiple administrations of avelumab, a human IgG1 anti-PD-L1 monoclonal antibody[J]. J Immunother Cancer, 2017, 5(1): 20.
- [11] CHÉRET A, NEMBOT G, MÉLARD A, et al. Intensive five-drug antiretroviral therapy regimen versus standard triple-drug therapy during primary HIV-1 infection (OPTIPRIM-ANRS 147): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(4): 387-396.
- [12] SIMEON-DUBACH D, PERREN A. Better provenance for biobank samples[J]. Nature, 2011, 475(7357): 454-455.
- [13] 邵恒骏. 中国生物样本库向标准化迈进[J]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5(6): 453.
- [14] MALM L, TYBRING G, MORITZ T, et al. Metabolomic quality assessment of EDTA plasma and serum samples [J]. Biopreserv Biobank, 2016, 14(5): 416-423.
- [15] GRIEVINK H W, LUISMAN T, KLUFT C, et al. Comparison of three isolation techniques for human peripheral blood mononuclear cells: cell recovery and viability, population composition, and cell functionality[J]. Biopreserv Biobank, 2016, 14(5): 410-415.

(收稿日期: 2018-08-22 修回日期: 2018-10-28)