

免疫磁珠法及羟乙基淀粉法分离脐血单个核细胞的比较

李敏¹, 范淑英², 孙光辉¹, 徐佩茹¹, 阿尔孜古丽·吐尔逊³

(1. 新疆医科大学第一附属医院儿科; 2. 新疆维吾尔自治区人民医院检验科;
3. 新疆医科大学第一附属医院医学研究中心细胞室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

[摘要] 目的 该实验比较了CD133免疫磁珠法及羟乙基淀粉法分离脐血单个核细胞(MNCs)的特点,探讨一种相对较好的MNCs分离方法。方法 取2007年10月至2008年3月新疆医科大学第一附属医院足月妊娠健康产妇的脐血15份,每份脐血分别用羟乙基淀粉沉淀法、CD133免疫磁珠法处理。分离后计数并在倒置显微镜下观察原代细胞的生长情况及其形态特征,原代第30天通过流式细胞仪检测CD34阳性率。结果 羟乙基淀粉沉淀法、CD133免疫磁珠组得到的MNCs数量分别为 $(15.23 \pm 4.30) \times 10^6/\text{mL}$, $(0.066 \pm 0.027) \times 10^6/\text{mL}$ ($P < 0.05$)。羟乙基淀粉沉淀法所得细胞大多悬浮生长,传代后生长缓慢;CD133免疫磁珠法的细胞生长状态良好,其CD34阳性率分别为10.1%、0.5%。结论 羟乙基淀粉沉淀法是一种高效的脐血细胞分离方法,但细胞生长状态欠佳;而CD133免疫磁珠法所获细胞纯度较高,可根据不同要求选用相应分离法。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 757-760]

[关键词] 单个核细胞; 分离; 脐血

[中图分类号] R-331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)09-0757-04

Comparison of immunomagnetic beads and hespan precipitation for isolation of mononuclear cells from umbilical cord blood

LI Min, FAN Shu-Ying, SUN Guang-Hui, XU Pei-Ru, Aeziguli TURERXUN. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Xu P-R, Email: xupeiur126@126.com)

Abstract: Objective To compare the characteristics of immunomagnetic beads and hespan precipitation for isolation of mononuclear cells (MNCs) from umbilical cord blood and try to find a better isolation method for MNCs. **Methods** Fifteen umbilical cord blood samples from healthy parturiens were collected between December 2007 and March 2008. MNCs were isolated using hespan precipitation and CD133 immunomagnetic beads, respectively. MNCs were identified using the surface marker CD34 by flow cytometry on the 30th of primary culture. Growth conditions and morphologic changes of primary cells were observed by an inverted microscope. **Results** The number of MNCs from umbilical cord blood isolated by hespan precipitation ($15.23 \pm 4.30 \times 10^6/\text{mL}$) was significantly greater than that by CD133 immunomagnetic beads ($0.066 \pm 0.027 \times 10^6/\text{mL}$) ($P < 0.05$). The MNCs isolated by hespan precipitation suspended at the culture medium and their growth was slow after passage. The growth of MNCs isolated by CD133 immunomagnetic beads was kept in a good condition. The CD34 positive rate of MNCs isolated by hespan precipitation and immunomagnetic beads was 10.1% and 0.5%, respectively. **Conclusions** The hespan precipitation is an effective method for MNCs isolation from human umbilical cord blood, but with a cell growth condition below the mark. The MNCs isolated by CD133 immunomagnetic beads are in a high purity quotient. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(9): 757-760]

Key words: Mononuclear cell; Isolation; Umbilical cord blood

中枢神经系统疾病及后遗症始终是影响儿童生命健康和生存质量的顽疾之一,而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有向神经细胞等多种细胞分化及免疫调节特性^[1~3],在移植于动物模型后可改善其神经功能^[4,5]。因此,MSCs可作为某些神经系统疾病细胞移植替代治疗的种子细胞。MSCs来源较多,其中脐血具有来源充足、免疫原性

更弱等优点,预示其有广阔的应用前景。脐血中MSCs是从脐血中的单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)培养生成,由于原代培养时间较长,常规方法分离时混杂其他细胞成分较多,从而影响了MSCs的生长及纯化。目前较常用的分离方法包括:羟乙基淀粉、甲基纤维素等沉淀红细胞,然后再分离MNCs;FICOLL密度梯度离心法分离。本实

[收稿日期] 2008-12-02; [修回日期] 2009-01-16
[作者简介] 李敏,女,博士研究生,主治医师。主攻方向:间充质干细胞的基础研究。
[通讯作者] 徐佩茹,女,教授,新疆医科大学第一附属医院儿科,邮编:830054。

验前期已对羟乙基淀粉及密度梯度离心法进行了比较,结果证实羟乙基淀粉沉淀法获得的有核细胞数量明显多于 FICOLL 密度梯度离心法^[6],但羟乙基淀粉沉淀法处理的原代细胞出现成纤维样形态改变的时间以及细胞达到 50% 融合的时间均较长。而且这两种细胞分离方法所得原代细胞形态多样,只有经过传代才能获得形态较一致的细胞。目前需要寻找一种相对高效分离、纯化细胞的方法,而免疫磁珠是一种较新的特异性高的分离方法,目前有关其分离脐血细胞的相关报道不多,本实验拟在前期实验基础上做进一步的探讨,改善脐血 MNCs 的分离条件。

1 资料与方法

1.1 标本来源

实验于 2007 年 10 月~2008 年 3 月在新疆医科大学第一附属医院细胞室完成。选择新疆医科大学第一附属医院产科足月妊娠健康产妇的脐血 15 份用于实验,产妇年龄 24~33 岁,无肝炎、梅毒、结核及其他妊娠并发症。

1.2 主要试剂

低糖 DMEM (GIBCO)、胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司)、淋巴细胞分离液(上海华精)、传统型血袋(生复)、免疫磁珠(德国美天妮公司,CD133 间接标记)。

1.3 实验方法

1.3.1 脐带血收集 按照脐带血标本采集标准,足月分娩,排除传染性疾病及各种家族遗传疾病,标本采集严格无菌操作。使用复方枸橼酸血液保护液抗凝。

1.3.2 MNCs 的分离 脐血平均容积为 50~100 mL,标本在采集后的 3 h 内进行分离。将收集到的脐血每份分成两份,随机采用羟乙基淀粉沉淀法、CD133 免疫磁珠法分离 MNCs,分离后计数并在倒置相差显微镜下每日观察原代细胞的生长情况及其形态特征,并用数码摄像头随机选取视野摄片,记录实验结果。

1.3.3 免疫磁珠法 用 PBS 稀释抗凝脐带血细胞,加在淋巴细胞分离液上,400 g 离心 35 min,吸取 MNCs 层。缓冲液 PBS 洗涤 1 次,300 g 离心 10 min,弃上清。反复洗涤 1 次。

每 10^8 总细胞在 350 μ L 缓冲液中重悬,加入 100 μ L FcR 阻断剂及 50 μ L CD133biotin 抗体标记细胞。混匀,4~8℃ 标记 10 min,300 g 离心,去除

上清。重复洗涤 1 次。每 10^8 总细胞加入 100 μ L 抗 biotin 微珠。混匀,4~8℃ 孵育 15 min。加入缓冲液洗涤细胞,300 g 离心力离心 10 min。完全去除上清。通过 MACs 磁性分离柱,获取 CD133⁺ 细胞。最后将分选出来的细胞以一定密度接种于 25 cm² 培养瓶,置于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度的细胞孵箱中培养。

1.3.4 羟乙基淀粉沉淀法 将脐血与 6% 的羟乙基淀粉按照 4:1 的比例混匀,4℃ 静置 1 h,吸取上清,400 g 离心 10 min,弃上清,Hank's 平衡盐溶液洗涤 2 次,以一定密度接种于 25 cm² 培养瓶,置于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度的细胞孵箱中培养。

1.3.5 脐血 MNCs 的 CD34 免疫表型检测 取培养至第 30 天的脐血原代细胞,加入 1:1 比例的 0.125% 胰酶和 0.104% 乙二胺四乙酸(EDTA)进行消化处理,显微镜下控制消化时间,离心后制成 1×10^6 /mL 悬液。加入荧光标记小鼠抗人抗体 CD34-FITC 20 uL,在室温下反应 30 min,PBS 洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,振荡混匀。最后经 EPICS-XL 流式细胞仪进行检测,cell-quest 软件分析结果。

1.4 统计学方法

计量资料实验结果的数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两样本均数比较采用配对设计 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 CD133 免疫磁珠法、羟乙基淀粉法分离脐血 MNCs 数量的比较及形态学改变

羟乙基淀粉沉淀法及 CD133 免疫磁珠法获得的 MNCs 分别是 $(15.23 \pm 4.30) \times 10^6$ /mL 及 $(0.066 \pm 0.027) \times 10^6$ /mL,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

羟乙基淀粉沉淀法 15 份脐血中有 2 份标本可观察到小圆形细胞转变为成纤维样细胞,1 份标本的细胞最终成活,另 1 份细胞因污染死亡,13 份标本细胞悬浮,逐渐崩解死亡。细胞开始接种时可见到少量细胞贴壁,呈圆形;48 h 后贴壁细胞增多,少量贴壁细胞形态呈单极梭形突出;72 h 后可见典型的纺锤形细胞;5 d 后首次换液后可见纺锤形细胞贴壁增多,见图 1。随后镜下观察到细胞为卵圆形、圆形及梭形细胞的混合体,以后可见贴壁生长的梭形细胞增多。随着以后的换液,可观察到大多标本细胞原本贴壁的梭形细胞出现悬浮,重悬在培养液中。4~5 周后第一代传代细胞生长缓慢,部分细胞由梭形的成纤维状细胞变形为不规则形状的较大细

胞,生长状态欠佳。

CD133 免疫磁珠组 15 份脐血标本中有 2 份可观察到细胞接种后呈现以小圆细胞为主,聚集成团

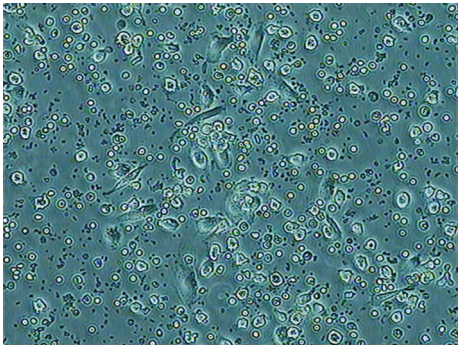


图1 羟乙基淀粉沉淀法分离脐血细胞接种后 5 d (×100) 贴壁细胞增多,可见纺锤形细胞出现。

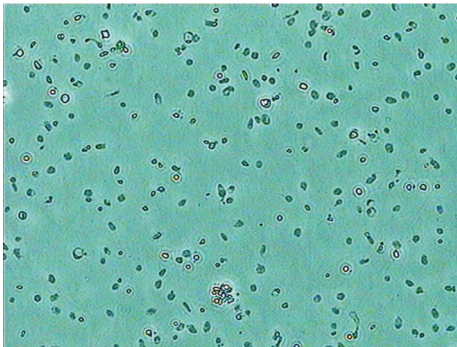


图2 CD133 免疫磁珠分选细胞接种后 5 d (×100) 细胞接种后以小圆细胞为主,聚集成团分布。

2.2 脐血 MNCs 的 CD34 免疫表型检测

羟乙基淀粉法的 CD34 阳性率为 10.1% , CD133 免疫磁珠组的 CD34 阳性率为 0.5% ,见图 3。

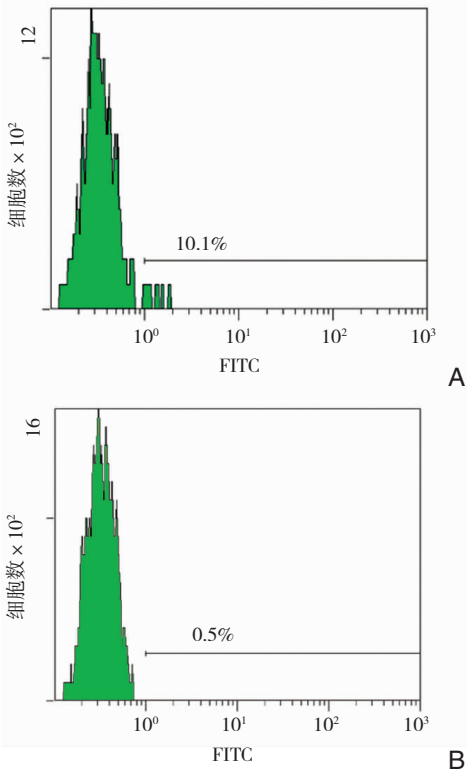


图3 脐血 MNCs 的 CD34 免疫表型检测 A:羟乙基淀粉法 此法分离培养的原代细胞 CD34 阳性率较高,为 10.1% ; B:CD133免疫磁珠法 此法分离培养的原代细胞 CD34 阳性率较低,仅为 0.5% 。

3 讨论

人脐血 MSCs 是从 MNCs 中培养生成。目前用于脐血 MSCs 分离的方法有:贴壁筛选法、密度梯度离心法、免疫磁珠法等。其中最常用的是用密度梯度离心法结合贴壁筛选法分离。此法虽然简单有效,对细胞损伤小,但得到的是异质细胞群,成分复杂。CD133 免疫磁珠是选定特定的细胞表面免疫表型,利用包备有特异抗体的磁珠与细胞表面抗原特异结合,通过一定强度磁场时被滞留而来分选 MSCs,可获得较为纯化的细胞,但实验条件要求较高,因此,相关实验报道较少。国内不少学者采用羟乙基淀粉、明胶、甲基纤维素等沉淀红细胞,然后再进行离心分离 MNCs,取得较好结果^[5,7,8]。本实验前期也证实了羟乙基淀粉法可获得较多的脐血 MNCs,但由于此种方法获得的原代细胞形态多样,培养时间较长。鉴于免疫磁珠自身的特异性,理论上可以较好地纯化分离,因此进一步对羟乙基淀粉法与 CD133 免疫磁珠分离脐血细胞的情况进行了研究,为脐血分离提供实验室数据。

由于两种分离方法的特性,羟乙基淀粉沉淀法获取的 MNCs 数量明显多于 CD133 免疫磁珠法,但两种方法获取的细胞纯度存在差异。由于目前尚未发现 MSCs 具有高度特异性的表面标记,大多都是通过检测一系列相关标记来进行间接鉴定细胞。MSC 不表达 CD45、CD34、CD11、CD14 等造血干/祖细胞标记^[9~12]。最近的研究发现,可从脐血 CD133 阳性细胞中培养出 MSCs。CD133 是一种 5 次跨膜

的糖基化多肽^[13], Tondreau 等^[14]用 CD133 免疫磁珠阳性分选法从脐血中成功分选出 MSCs, 而且证实了由此分选出的 MSCs 具有更强的增殖潜能。此外, 他们还检测出 MSCs 不仅表达间质表面标记的特征性类型, 还表达转录因子 4 的八聚体 Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), 而 Oct4 被发现是干细胞多能性的一个标记^[15]。单从脐血中获取 MNCs 而言, 羟乙基淀粉法无论是实验时间、实验处理步骤难易程度等, 均明显优于 CD133 免疫磁珠法, 但所获细胞的纯度不高, 夹杂较多的异质细胞, 而且细胞的生长状态也不佳。羟乙基淀粉主要作用是使红细胞沉积, 而其他主要成分(包括 MNCs 数)损失较少。经过这样的处理后, 标本中去除了红细胞以外夹杂的其他细胞较多, 推测正是混杂的其他细胞影响了脐血中原本就稀少的 MSCs 的生长, 从而造成了细胞生长状态不佳。国内的一些实验室^[16,17]在分离脐血 MNCs 时先将红细胞沉淀后, 再用 FICOLL 密度梯度离心脐血细胞也取得很好效果。可能就是因为红细胞沉淀后经过密度梯度离心得到的细胞相对纯度较高有关。免疫磁珠法的操作时间相对较长, 操作步骤较繁杂, 但细胞纯度较高。

本试验利用 CD133 免疫磁珠法获取的细胞形态与常规方法不同, 细胞形态较均一, 接种后呈现聚集成团状的细胞分散分布为主, 提示细胞成分较一致。此外, 通过流式细胞仪检测脐血原代细胞的 CD34 阳性率结果, 也间接证实了脐血中由免疫磁珠法获取的 MSCs 纯度更高。当细胞培养到 30 d 时, 通过流式细胞仪检测细胞表面标记, 提示由 CD133 免疫磁珠法获取的细胞 CD34 阳性率为 0.5%, 远低于羟乙基淀粉沉淀法的 CD34 阳性率 10.1%。提示在脐血的原代培养中, 除含有 MSCs 外, 同时伴有造血干细胞等其他干/祖细胞, 而通过免疫磁珠法获取的细胞中造血干细胞所占比例相对较少。王屹等^[18]检测新鲜分离的 MNCS 中存在大约为 $(1.44 \pm 0.21)\%$ CD34 阳性细胞。本实验的脐血原代培养第 30 天检测出的 CD34 阳性率与此不同, 可能与脐血个体差异、培养条件不同有关。

总之, 从本试验及许多实验结果可看出, 脐血原代细胞中成分并不单纯, 含有造血干细胞、MSCs、破骨细胞等。只有在反复换液、传代后, 脐血中的 MSCs 才能得到纯化, 这可从细胞的形态、检测细胞表面表型得到证实。羟乙基淀粉沉淀法是一种高效的脐血分离方法, 但其所得细胞的纯度不高; 而 CD133 免疫磁珠法可从脐血中获取纯度较高的细胞。因此, 可根据不同的实验要求选用相应分离方法。

[参 考 文 献]

- [1] Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke[J]. *Stroke*, 2007, 38(2 Suppl 1):817-826.
- [2] Kang JH, Lee CK, Kim JR, Yu SJ, Jo JH, Do BR, et al. Estrogen stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (CD34⁺)[J]. *Neuroreport*, 2007, 18(1):35-38.
- [3] William T, Kevin DB, Mary JL. Umbilical cord blood transplantation: an alternative for adult patients[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2006, 11(1):37-45.
- [4] Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuhoﬀ S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells[J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(2):244-249.
- [5] 迟作华, 张涓, 何冬梅, 陆琰. 脐血间充质干细胞培养条件的优化[J]. *中国实用内科杂志*, 2006, 26(5):372-375.
- [6] 李敏, 张季红, 徐佩茹. 脐血单个核细胞分离方法的比较及形态学改变[J]. *新疆医科大学学报*, 2008, 31(3):316-318.
- [7] 毛平, 彭盘俐, 许力. 人脐血单个核细胞体外扩增后植入 NOD/SCID 小鼠重建多系造血[J]. *中华器官移植杂志*, 2006, 27(4):231-234.
- [8] 孙海梅, 季凤清, 李荣平, 王屹, 曾晓蓓, 张立新. 不同培养条件下人脐血间充质干细胞的差异[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(45):51-53.
- [9] Atsma DE, Fibbe WE, Rabelink TJ. Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair[J]. *Current Opinion in Lipidol*, 2007, 18(6):645-649.
- [10] Ouyang HW, Cao T, Zou XH, Heng BC, Wang LL, Song XH, et al. Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects[J]. *Transplantation*, 2006, 82(2):170-174.
- [11] Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy[J]. *Current Opinion Oncol*, 2007, 19(6):650-655.
- [12] Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Virender SS, Geeta KV. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye[J]. *Mol Vis*, 2008, 14(4):431-442.
- [13] Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Graca AP, Makio O, Anne GL, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. *Blood*, 1997, 90(12):5002-5012.
- [14] Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Marielle D, Rita L, Martine M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8):1105-1112.
- [15] Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ. Serum deprivation of human stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes[J]. *Blood*, 2004, 103(5):1647-1652.
- [16] 向静, 江德鹏, 王昌铭, 王景周. 脐血单个核细胞体外培养和诱导后神经干细胞标志物 mRNA 的表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(3):352-355.
- [17] 孙海梅, 季凤清, 李荣平, 王屹, 曾晓蓓, 张立新. 不同培养条件下人脐血间充质干细胞的差异[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(45):51-53.
- [18] 王屹, 季凤清, 孙海梅, 赵春礼, 曾晓蓓, 杨慧. 人脐血非造血干细胞的基本特性[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(29):50-52.

(本文编辑:徐福兰)