

技术方法

## 人脾脏巨噬细胞的分离与纯化

闫峰,李宗芳,张澍,杨建辉,李爱民,刘效恭

(西安交通大学第二医院普外科,陕西西安 710004)

**摘要:**目的 探索分离纯化大量人脾脏巨噬细胞(M $\phi$ )的方法。方法 选取10例手术切除的脾脏,机械研磨法获得脾脏组织细胞混悬液。采用贴壁培养的方法进行M $\phi$ 的分离与纯化,相差显微镜下动态观察,明确贴壁培养的合适时间,详细记录M $\phi$ 分离纯化过程各步骤所需时间。收获的M $\phi$ ,台盼蓝染色判定活力并计数,统计出平均每克脾脏组织收获的M $\phi$ 数及其纯度。相差显微镜、透射电镜观察分离纯化M $\phi$ 的形态特征。结果 分析贴壁培养各时间段的细胞纯度及活力,确定M $\phi$ 培养的合适时间为2~3h。贴壁培养纯化后,平均每克脾脏组织可收获(0.25 $\pm$ 0.03) $\times 10^8$ 个M $\phi$ ,纯度为(90 $\pm$ 5)%,细胞活力99%,细胞结构及各种细胞器结构均完整。结论 贴壁培养方法分离纯化人脾脏M $\phi$ 是成功可行的,收获的M $\phi$ 数量大、纯度高、活力好,为脾脏M $\phi$ 功能的深入研究奠定了基础。

**关键词:**脾脏;巨噬细胞;贴壁培养;分离方法

中图分类号:R318.1 文献标识码:A 文章编号:1671-8259(2004)05-0513-04

## Isolation and purification of macrophages from human spleen

Yan Feng, Li Zongfang, Zhang Shu, Yang Jianhui, Li Aimin, Liu Xiaogong

(Department of General Surgery, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

**ABSTRACT:** Objective To develop a novel method of isolating and purifying a great number of macrophages from human spleen. Methods Ten cases of excisional human spleen were selected. In order to obtain a spleen cell suspension, human spleens were cut into small pieces, mechanically ground in culture medium of RPMI-1640 and filtered. Macrophages were isolated and purified by anchoring cultivation, and were observed consecutively under phase-contrast microscope to identify the optimal time of cultivation. Meanwhile, the time needed during each procedure was recorded in detail. The viability of purified macrophages was assessed with trypan blue exclusion, and the average yield per gram of spleen and purity of macrophages were calculated. Morphological characteristics of isolated macrophages were detected by phase-contrast microscope and transmission electron microscope. Results The optimal time of anchoring cultivation was confirmed to be 2~3 hours. The average yield of macrophages isolated freshly was (0.25 $\pm$ 0.03) $\times 10^8$  per gram of spleen, purity was 90% $\pm$ 5%, and the viability was constantly 99%. Cell structure and organelle ultrastructure of macrophages were intact. Conclusion A great number of macrophages with high degree of purity and viability can be successfully isolated and purified from human spleen by anchoring cultivation. This novel method of isolation and purification will undoubtedly facilitate the functional investigation of macrophages in human spleen.

**KEY WORDS:** spleen; macrophage; anchoring cultivation; isolation method

巨噬细胞(macrophage, M $\phi$ )功能及其在疾病发生过程中的作用是目前研究的热点问题之一。脾脏是重要的M $\phi$ 储存器官, M $\phi$ 作为主要的抗原递呈细胞,在门脉高压症脾功能亢进等脾脏疾病中理应发挥着重要作用,本研究小组曾针对此问题作过初步探

讨<sup>1</sup>。但是,对于脾脏M $\phi$ 的功能及其分子调控机制,人们所知的信息甚少。这很大程度上是由于分离纯化脾脏M $\phi$ 的技术难度造成的。鉴于此,我们研究探索出一种分离纯化大量人脾脏M $\phi$ 的方法,现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验对象 自2003年6月至2004年2月,选取10例手术切除的脾脏进行M $\phi$ 的分离与纯化,

收稿日期:2004-02-26 修回日期:2004-04-16  
基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30170909);教育部“优秀青年教师资助计划”项目(2003).  
通讯作者:李宗芳, Tel: (029) 87678116; E-mail: lzf2568@vip.sina.com.  
作者简介:闫峰(1977-),男(汉族),博士研究生,研究方向:门脉高压症和恶性肿瘤的治疗。E-mail: yanyisheng-ricky@tom.com

其中8例来自西安交通大学第二医院普外科门脉高压症脾亢患者,2例来自西安交通大学第二医院急诊外科外伤脾破裂患者。患者年龄33~64岁,平均39.6岁;男性6例,女性4例。

**1.1.2 主要仪器** 二氧化碳培养箱(Heraeus-BB16型,德国);相差显微镜(XSZ-D型,重庆);超净工作台(SW-CT-IC型,苏州);低速离心机(LD5-2A型,北京);电子天平(AB104-N型,上海);透射电镜(HITACHI-H-600型,日本)。

**1.1.3 主要试剂** PBS液(平衡盐溶液),用干粉剂(GIBCO,美国)自行配制,高压蒸气灭菌;RPMI1640(培养基),用干粉剂(SIGMA,美国)自行配制,其中加入青霉素 $10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,链霉素 $10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,胰岛素 $24 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,抽滤(双层滤膜,孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 和 $0.45 \mu\text{m}$ )除菌;胎牛血清(FBS),使用前将 $-20^\circ\text{C}$ 冻存的FBS(四季青,杭州)置于 $4^\circ\text{C}$ 冰箱内解冻,然后于 $56^\circ\text{C}$ 水浴中灭活30 min,按 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 比例加入RPMI1640中。

## 1.2 方法

**1.2.1 脾脏组织的获取与转运** 手术室取手术切除的脾脏标本组织,立即剪碎成体积小约 $1 \text{ mm}^3$ 的小组织块,移入装有预冷 $4^\circ\text{C}$  PBS的无菌密封瓶内,迅速转运至细胞培养室内,组织称重。

**1.2.2 脾脏组织细胞混悬液的制备** 将脾脏组织块移至无菌操作台,PBS洗涤3次,RPMI1640洗涤2次,以清除组织内的血液并保证组织的无菌。机械研磨脾脏组织,这时便有大量的组织细胞混于RPMI1640液中。用200目不锈钢滤网过滤混有组织细胞的RPMI1640液,滤液为脾脏组织细胞混悬液(主要含红细胞、淋巴细胞、M等)。

**1.2.3 脾脏组织细胞混悬液中红细胞的裂解** 脾脏组织细胞混悬液用RPMI1640液洗涤离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,3 min),以去除细胞碎屑。加入Tris-NHCl<sub>4</sub>作用5 min,裂解红细胞。迅速离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,3 min),去除上清液内的裂解红细胞碎片。PBS洗涤离心3次,RPMI1640洗涤离心1次,以清除混悬液中残存的Tris-NHCl<sub>4</sub>,避免其影响细胞的存活。此时,混悬液中主要含脾脏组织M和淋巴细胞。

**1.2.4 脾脏组织M的贴壁培养** 将前述混悬液作为培养细胞原液,台盼蓝染色判定活力并计数,用RPMI1640液调整细胞浓度为 $(3 \sim 5) \times 10^6 \cdot \text{L}^{-1}$ 。将调整好浓度的细胞悬液接种于玻璃培养瓶内,培养条件为 $37^\circ\text{C}$ , $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CO}_2$ ,100%湿度。分别培养2、4、6、12、24 h,相差显微镜下形态学观察并照相。

**1.2.5 贴壁脾脏组织M的消化** 吸去培养上清

液,M贴壁,PBS反复吹打、消化,所得细胞悬液洗涤离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,3 min),得到分离纯化的M。

**1.2.6 分离纯化M活力和纯度的判定** 台盼蓝染色法判定M存活与否(活细胞拒染),计数100个M细胞,活M所占比例为M活力。光镜下M体积较大,胞浆内颗粒物质丰富,与淋巴细胞区别明显,计数100个细胞,M所占比例为M纯度。结合脾脏组织质量,计算出每克脾脏组织收获的M数。

**1.2.7 透射电镜检测分离纯化的脾脏组织M贴壁培养的M经消化后得到细胞悬液,取样移入离心管内,离心( $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,3 min)后去除上清液,加入 $4^\circ\text{C}$ 预冷的 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊二醛4 mL,固定2 h,再用 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 四氧化锇固定30 min,置入系列丙酮内在室温下逐级脱水。树脂包埋,超薄切片机切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,在透射电镜下观察M超微结构。**

**1.2.8 统计学处理** 采用SPSS10.0统计软件进行数据分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较用t检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 M贴壁培养的合适时间** 倒置显微镜下动态观察显示,培养2~3 h,贴壁M较多且较牢固,细胞活力好;培养4 h,贴壁M较多且较牢固,细胞活力好,但少数淋巴细胞也贴壁;培养6 h,贴壁M较多且较牢固,细胞活力好,但大部分淋巴细胞也贴壁;培养12、24 h,贴壁M多数已脱落,活力明显下降。因此,确定M贴壁培养的合适时间为2~3 h。

**2.2 M分离纯化过程各步骤所需时间** 在进行细胞贴壁培养前的一系列步骤中,脾脏组织的机械研磨和脾脏组织细胞混悬液中红细胞的裂解是两个主要的限速步骤。而这两个步骤所需时间都取决于脾脏组织的质量。以10 g脾脏组织为标准,各步骤所需时间见表1。

**2.3 M分离纯化过程各阶段收获的细胞量** 机械研磨获得的脾脏组织细胞混悬液、裂解红细胞后的细胞混悬液以及贴壁培养纯化后的消化液,其各自所含的细胞种类不同,细胞数量也有明显差异( $P < 0.01$ ,表2)。

**2.4 分离纯化后M的纯度及产量** 贴壁培养纯化后,平均从每克脾脏组织可收获 $(0.25 \pm 0.03) \times 10^8$ 个M,纯度为 $(90 \pm 5)\%$ ,细胞活力99%。

表 1 分离纯化过程各步骤所需时间

Table 1 The time needed during each procedure of isolation and purification

Procedure	Time needed/ min
Obtaining and transport of splenic tissue	10
Weighing of splenic tissue	5
Washing of splenic tissue	5
Mechanical grinding of splenic tissue	45
Disruption of erythrocytes	30
Vitality assessment and concentration adjustment of inoculated cells	10
Anchoring cultivation of cells	120 ~ 180
Digestion of adherent cells	20

表 2 分离纯化过程各阶段收获的细胞数量

Table 2 The total cell yield per gram of spleen during each procedure of isolation and purification

Procedure	Main kind of cell	Cell population ( $n = 10$ , $10^8 \cdot g^{-1}$ splenic tissue)
Cell suspension of splenic tissue	Erythrocyte, lymphocyte, M	$3.22 \pm 0.38^*$
Cell suspension after disruption of erythrocytes	Lymphocyte, M	$1.81 \pm 0.12^*$
Cell suspension after digestion of adherent and purified cells	M and a small percentage of lymphocyte	$0.28 \pm 0.02^*$

\*  $P < 0.01$ 

## 2.5 分离纯化 M 的形态特征

**2.5.1 相差显微镜观察 M 的形态特征** 相差显微镜下可见贴壁培养的 M 多为圆形或椭圆形,少数呈梭形或多边形。细胞体积较大,细胞膜完整,细胞核清晰可见,胞浆内容物丰富(图 1)。

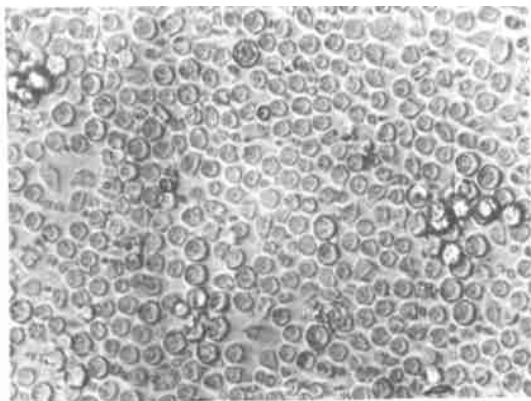


图 1 贴壁培养的 M

Fig. 1 Phase-contrast microscopic micrograph of anchoring cultured macrophages  $\times 400$ 

**2.5.2 透射电镜观察 M 的超微结构** 透射电镜下 M 多为圆形或椭圆形,细胞表面有少量的微绒毛样突起,细胞核位于中央,其形态不规则,核内常染色质分布均匀,异染色质在核膜下聚集,核仁可见。细胞质内可见到圆形或椭圆形线粒体、少量管状的粗

面内质网及游离核糖体,高尔基复合体发达,另有数量不等的溶酶体、残体,细胞内还可见到被吞噬的细胞碎片,细胞膜附近可见到少量的吞饮小泡(图 2)。

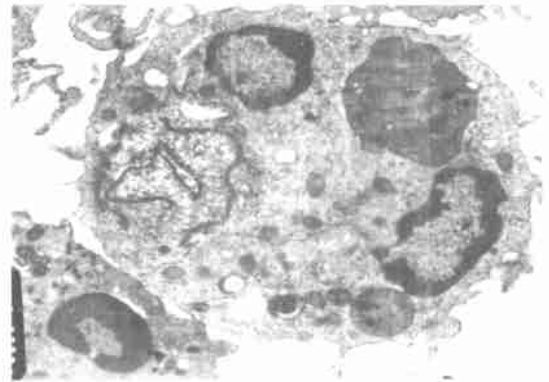


图 2 分离纯化 M 胞浆内吞噬的细胞碎片

Fig. 2 TEM micrograph of the phagocytosis of cell fragment in cytoplasm of isolated and purified macrophages  $\times 8\ 000$ 

Cell membrane and structure of mitochondrion were intact; rough endoplasmic reticulum and lysosome had a clear appearance; the nucleus was intact; and Golgi complex was prosperous. Phagocytosis of cell fragment in cytoplasm of macrophage could be seen obviously.

## 3 讨 论

由于对 M 功能及其在疾病发生过程中作用的重视,有关分离纯化 M 的研究日渐增多。但组织内 M 数量相对较少,且往往与其他细胞(如淋巴细胞等)相混合,因而相对于肝细胞<sup>2</sup>等实质细胞的分离而言,M 的分离纯化是相当困难的。研究人员尝试从不同种类的动物体内分离纯化 M,主要包括人类、大鼠、兔<sup>3</sup>等,其中最常见的研究对象为大鼠。此外,由于研究目的不同,分离纯化 M 的组织或器官也不尽相同,主要包括血液、腹膜腔液、肺泡<sup>4</sup>、肝脏<sup>5</sup>、脾脏<sup>6</sup>、腹膜组织<sup>7</sup>、小肠黏膜<sup>8</sup>等。对于人类而言,由于活体组织取材的难易程度不同、组织内的细胞种类不同以及所含 M 数量不同等原因,报道最多的是自血液和腹膜腔液分离 M,其他组织(包括脾脏)的相关报道则很少。

迄今为止,研究报道的 M 分离方法主要包括贴壁法、密度梯度离心法、酶消化法、流式细胞仪法等。它们各自有不同的优缺点以及适应的器官或组织类型。密度梯度离心法主要适用于外周血液中 M 的分离,Timo 等<sup>6</sup>曾尝试应用此方法从大鼠脾脏分离纯化 M,结果显示获得的 M 纯度及产量均很低。Phillip 等<sup>8</sup>应用中性蛋白酶消化法从小肠黏膜分离纯化 M,但此种方法显然不适合于含有较多胶原纤维的脾脏组织,且此方法耗费的蛋白酶多,成本较高。应用流式细胞仪分离似乎是较为理想的

分离纯化细胞的方法,但需要大量价格昂贵的用以识别细胞表面抗原的单克隆抗体<sup>9</sup>,此外,对于人脾脏M<sub>1</sub>而言,要探索出其适合的单克隆抗体同样也是一项极其困难的工作。贴壁法较前述几种方法而言,是较为经典的一种细胞纯化方法,缺点是相对费时费力,但结果可靠,对细胞损害较小,成本低廉。基于以上认识,我们从实际出发选择贴壁法来分离纯化人脾脏M<sub>1</sub>。

倒置显微镜下动态观察贴壁培养的M<sub>1</sub>,培养2~3 h,贴壁M<sub>1</sub>较多且较牢固,细胞活力好;随着培养时间的延长,淋巴细胞也开始贴壁,这就使得最终收获M<sub>1</sub>的纯度降低;而培养24 h后,M<sub>1</sub>多数已脱落,活力明显下降。这些结果说明,M<sub>1</sub>贴壁培养合适时间为2~3 h。众所周知,自细胞(细胞株除外)离体至接种入培养瓶进行培养箱内培养的这段时间极为关键。这段时间越短,细胞的缺氧时间较短,受到的损伤较小,受污染的可能性也大大降低,从而后继培养细胞的活力就越高。分析M<sub>1</sub>分离纯化过程各步骤所需时间,M<sub>1</sub>贴壁培养合适时间(2~3 h)是确定的,在进行细胞贴壁培养前的一系列步骤中,机械研磨和红细胞裂解是两个主要的限速步骤,而这两个步骤所需时间又都取决于脾脏组织的质量。因而能否设计制造出一种自动化仪器,取代人力来进行前述两项关键步骤,是我们进一步研究的努力方向之一。

贴壁培养纯化后,平均每克脾脏组织可收获 $(0.25 \pm 0.03) \times 10^8$ 个M<sub>1</sub>,纯度较高,细胞活力好,明显优于采用密度梯度离心法从大鼠脾脏分离纯化M<sub>1</sub>的结果<sup>6</sup>。此外,结合M<sub>1</sub>分离纯化过程各阶段收获的细胞量,认为M<sub>1</sub>约占人脾脏组织细胞总量的7%~8%。相差显微镜观察M<sub>1</sub>的形态特征,可见M<sub>1</sub>体积较大,细胞膜完整,细胞核清晰可见,胞浆内容物丰富;透射电镜观察分离纯化M<sub>1</sub>的超微结构,显示各种细胞器结构完整,特征性的溶酶体清晰可见。说明分离纯化M<sub>1</sub>的培养环境接近于体内状况,从而保证了M<sub>1</sub>功能的正常发挥,为后继的

M<sub>1</sub>功能研究奠定了基础。

综合以上结果,证实我们分离纯化人脾脏M<sub>1</sub>的方法是成功可行的。该方法具有:节省经费;不需要特殊的消化酶或单克隆抗体;收获的M<sub>1</sub>数量大、纯度高、活力好等优点。该方法必将有力促进脾脏M<sub>1</sub>功能的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Wang YX, Li ZF, Li GW, et al. Effect of splenomegaly and splenic macrophage activity in hypersplenism due to cirrhosis J. *Am J Med*, 2002, 113(5): 428 - 431.
- [2] Yan F, Zhao J, Ma J C, et al. Metabolic effects of a novel bioartificial liver on serum from severe hepatitis patients: an in vitro study J. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(10): 1471 - 1474.
- [3] Porras J C, Zambrano C, Echeverri D, et al. Isolation and characterization of macrophages-foam cells from aorta of hypercholesterolemic rabbit J. *Biomedica*, 2003, 23(4): 476 - 485.
- [4] Klimes J, Dohnalová M, Sedláček J. Microcolumn high-performance liquid chromatographic assay for doxycycline in isolated alveolar macrophages J. *J Chromatogr A*, 1999, 846: 181 - 184.
- [5] Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, et al. Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures J. *Cell Biol Int*, 2003, 27(1): 67 - 73.
- [6] ten Hagen T L M, van Vianen W, Bakker-woudenberg I A J M. Isolation and characterization of murine Kupffer cells and splenic macrophages J. *J Immunol Methods*, 1996, 193: 81 - 91.
- [7] Krist L F G, Kerremans M, Koenen H, et al. Novel isolation and purification method permitting functional cytotoxicity studies of macrophages from milky spots in the greater omentum J. *J Immunol Methods*, 1995, 184: 253 - 261.
- [8] Smith P D, Janoff E N, Mosteller-Barnum M, et al. Isolation and purification of CD-negative mucosal macrophages from normal human small intestine J. *J Immunol Methods*, 1997, 202: 1 - 11.
- [9] Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations J. *Cytometry*, 2000, 42(6): 371 - 378.

(编辑 邱芬)

(上接第469)

#### 参考文献:

- [1] Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma J. *Cancer*, 1977, 40(4): 1621 - 1628.
- [2] Niklinski J, Furman M, Laudanski J, et al. Prognostic value of pretreatment CEA, SCC-Ag and CA199 level in sera of patients with non-small cell lung cancer J. *Eur J Cancer Prev*, 1992, 1(6): 401 - 406.

- [3] 王贇, 陈小东, 张静, 等. 肿瘤标记物CEA、CA153、SCC、CY211联合检测肺癌 J. *中国临床医学*, 2002, 9(3): 240 - 242.
- [4] 罗耀凌, 欧国萍, 邱瑞芬, 等. SCC-Ag、CA199、CEA联合测定对肺癌临床诊断的价值 J. *实用癌症杂志*, 2001, 16(2): 168 - 170.
- [5] 许志成, 胡华成. 肿瘤标志物在肺癌预后中的意义 J. *国外医学内科学分册*, 1998, 25(3): 115.
- [6] 李坚, 赵夕武, 束国荣, 等. 四项肿瘤标志物测定对肺癌诊断和病情评估的临床价值 J. *肿瘤防治研究*, 1999, 26(4): 277 - 279.
- [7] 王国洪, 万文徽, 刘波, 等. 四种肿瘤标志物检测非小细胞肺癌的临床应用研究 J. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(8): 491 - 494.

(编辑 邱芬)