

免疫磁珠法纯化小鼠 CD34⁺造血干细胞

林芸,孟凡义,杨芝(第一军医大学南方医院血液科,广东广州 510515)

摘要:目的 探讨免疫磁珠法(MiniMACS)能否用于纯化小鼠骨髓 CD34⁺造血干细胞。方法 应用免疫磁珠纯化小鼠骨髓 CD34⁺细胞,流式细胞仪(FACS)评估纯化效率,检测纯化后的细胞活力。结果 纯化后 CD34⁺细胞纯度 81.5%(范围 76.80%~85.38%),回收率 47.54%(范围 40.50%~54.31%),纯化前后细胞活力不受影响(P=0.169)。结论 应用 MiniMACS 纯化小鼠骨髓可获得高纯度 CD34⁺细胞,并不影响细胞活力。

关键词: CD34⁺细胞;免疫磁珠;纯化;骨髓

中图分类号:R392.4 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2001)12-0908-02

Purification of murine CD34⁺ hematopoietic stem cells using immunomagnetic beads

LIN Yun, MENG Fan-yi, YANG Yi

(Department of Hematology, Nangfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Objective To assess the efficiency of immunomagnetic beads in the purification of CD34⁺ cells from murine bone marrow. Methods CD34⁺ cells were isolated from murine bone marrow using immunomagnetic beads on MiniMACS device. Fluorescence activated cell sorter (FACS) was employed to determine the percentages of CD34⁺ cells before and after the purification procedures followed by calculation of the viable cell survival after the purification by means of trypan blue staining. Results The purity of CD34⁺ cells amounted to 81.5% (ranging from 76.80% to 85.38%) after the purification with a median recovery rate of 47.54% (ranging from 40.50% to 54.31%). The cell viability was not notably impaired (P=0.169). Conclusion Highly purified CD34⁺ cells can be obtained from murine bone marrow using MiniMACS which does not impair the viability of the derived cells.

Key words CD34⁺ cells; immunomagnetic bead; purification; bone marrow

异基因造血干细胞移植含有大量 T 淋巴细胞致使移植后发生急性、重度移植抗宿主病 (GVHD) 是影响异基因造血干细胞移植能否获长期生存的主要原因之一^[1]。清除或富集移植中特定的细胞是当前移植领域所关注的问题。临床采用免疫磁珠 (MACS 系统) 纯化人 CD34⁺造血干细胞能有效清除移植中的其他 T 细胞,减轻异基因移植 GVHD 的严重程度并降低其发生率。本实验主要探讨免疫磁珠法能否用于纯化小鼠 CD34⁺细胞,为下一步采用纯化 CD34⁺细胞移植模型研究防治 GVHD 提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 C57BL/6 小鼠雌雄不拘,7~8 周龄,体质量 20g (第一军医大学实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂及器械 RPMI1640 培养基 (Gibco 公司), FITC-RAMCD34 单抗 (晶美公司), Cy-RAMCD45 (晶美公司), 磁珠标记的 GARIgG (基因公司), MiniMACS 分离器 (基因公司), 磁性分离柱 (基因公

司), 一次性滤器 (基因公司), 眼科手术器械, 200 目金属网。

1.2 方法

1.2.1 骨髓细胞采集 颈椎脱臼法处死小鼠, 浸泡于 75% 酒精 15min, 在超净台内分离股骨和胫骨, 置于 200 目金属网上, 剪开骨两端, RPMI1640 培养液反复冲洗骨髓腔, 收集细胞悬液并计数。

1.2.2 流式细胞仪评估纯化前 CD34⁺细胞百分比 取 1×10⁶ 个细胞, 加入 FITC-CD34 单抗 2 μl, Cy-CD45 单抗 5 μl (设门, 门内为 CD45 阳性, 代表有核细胞), 室温下避光 25min, 加溶血剂室温下 15min, 离心, 弃上清, PBS 洗涤一次, 加固定液, 上机检测。

1.2.3 MiniMACS 纯化 CD34⁺细胞 调整骨髓细胞悬液为 500 μl, 过滤, 予 CD34 单抗 2 μl/1×10⁶ 个细胞, 室温下避光标记 25min, 缓冲液 (10~20 倍体积) 洗涤, 1000r/min, 10min, 弃上清。加 1.6 ml 缓冲液重悬。磁珠标记的二抗 20 μl/10⁷ 个细胞, 混匀, 10, 15min。加 1000 ml 缓冲液, 1000r/min, 10min, 弃上清。加 1000 ml 缓冲液重悬, 过滤。500 μl 缓冲液洗柱。悬液过柱。3×500 μl 缓冲液洗柱。移柱出磁场。1 ml 缓冲液洗柱, 用泵加压, 收集阳性洗液。

1.2.4 流式细胞仪评估纯化后 CD34⁺细胞百分比 取 1×10⁵ 细胞加入 FITC-CD34 单抗 2 μl, Cy-CD45 单抗

收稿日期: 2001-03-05

基金项目: 广东省自然科学基金 (98092)

作者简介: 林芸 (1973-), 女, 福建福州人, 1995 年毕业于福建医科大学, 本科, 住院医师, 电话 020-85141617

5 μl,室温下避光 25min,PBS 洗涤一次,加固定液,上机检测。

1.2.5 回收率 (%) 计算 回收率 (%) = 纯化后细胞总数 × 纯化后 CD34⁺细胞百分数 / 纯化前细胞总数 × 纯化前细胞总数。

1.2.6 细胞活性检测 纯化前后分别取 10 μl 细胞悬液与 10 μl 0.4% 锥虫蓝溶液混合后,滴片显微镜下观察不着色、发亮的为活细胞,着色胀大为死细胞,计算 200 个细胞中的活细胞数。

1.3 统计学分析

SPSS10.0 统计软件处理数据, 检验方法采用两

样本均数的 t 检验,分析纯化前后 CD34⁺细胞的纯度及细胞活力的差别。

2 结果

纯化前骨髓 CD34⁺细胞百分比平均为 2.94% (图 1), 纯化后 CD34⁺细胞百分比平均为 81.5% (P=0.000); 纯化前细胞活力平均为 99.11%, 纯化后平均为 98.89% (P=0.169), 显示应用 MiniMACS 纯化骨髓细胞可明显提高 CD34⁺细胞纯度而不影响细胞活力, 回收率平均为 47.54%。

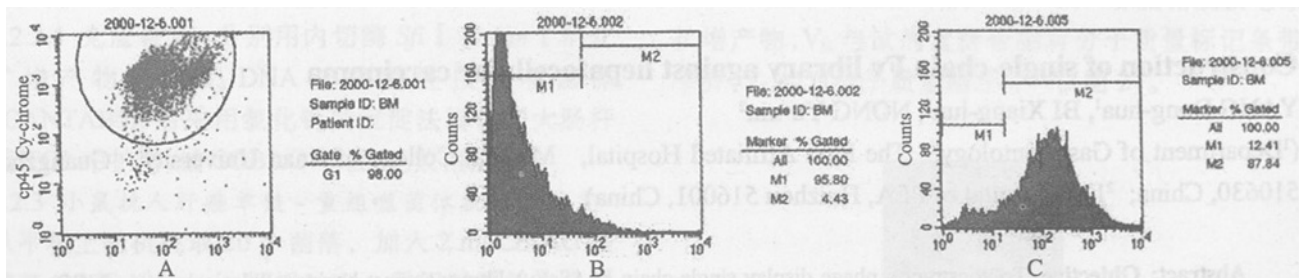


图 1 纯化前后小鼠骨髓 CD34⁺细胞占有核细胞百分比

Fig.1 Percentage of murine bone marrow CD34⁺ cell in nucleate cells

A: Gated with Cy-CD45, nucleate cell was CD45 positive; B: Percentage of CD34⁺ cells before purification in M2 gate; C: Percentage of CD34⁺ cells after purification in M2 gate; Abscissa indicates cell numbers

3 讨论

小鼠造血干细胞的表面标志有 CD34、Thy-1、C-kit 抗原及鼠类特有的 Sca-1、Sca-2 等表面抗原, 其中 CD34 抗原广泛存在于人、鼠、犬的造血干 / 祖细胞表面, 是目前临床衡量造血干 / 祖细胞质与量较好的标志。异基因移植中 GVHD 是导致移植失败乃至死亡的最大原因, 通过 CD34⁺干 / 祖细胞的纯化可以达到体外去除 T 细胞, 从而明显降低 GVHD 发生率的目的 [2]。目前应用最多的是生物素-亲和素免疫亲和柱层析系统 (Ceprate 系统) 和免疫磁珠分离系统 (MACS 系统或 Isolex 系统)。免疫磁珠法是将单个核细胞与 CD34 单抗孵育, 使 CD34⁺细胞被 CD34 单抗标记, 然后再与包被磁珠微粒来源于羊或兔的 IgG 二抗孵育, 通过磁场作用将 CD34⁺细胞分离。其中 Isolex 系统需要再用木瓜凝乳蛋白酶消化去除磁珠释放干细胞, 而 MACS 系统磁珠为超顺葡聚糖微粒, 直径仅 50nm, 在体内可以被代谢, 无毒性, 可直接输入体内。Kruger 等 [3] 比较了磁珠系统 (MiniMACS 及 Isolex-50) 和免疫层析法 (Ceprate-LC) 纯化人 CD34⁺

细胞的能力, 显示磁珠系统在净化肿瘤细胞、体外 T 细胞、提高产品 CD34⁺细胞纯度上优于免疫层析系统, MiniMACS 与 Ceprate-LC 回收率相似, 优于 Isolex-50。我们采用 MiniMACS 纯化小鼠 CD34⁺造血干 / 祖细胞是因为 MiniMACS 系统本身所具有的优点以及表达 CD34 分子的人、鼠的造血干 / 祖细胞功能相似, 结果显示可以获得高纯度 CD34⁺细胞, 细胞活力不受影响。

参考文献:

[1] Jonathan S, Susan EB, Angela PM, et al T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 is critical to the recruitment of CD8⁺ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease [J]. Blood, 2000, 96: 2973-80.

[2] Bohbot A, Lioure B, Faradji A, et al Positive selection of CD34⁺ cell from cryopreserved peripheral blood stem cells after thawing: technical aspects and clinical use [J]. Bone Marrow Transplant, 1996, 17: 259-64.

[3] Kruger W, Jgruber M, Hennings S, et al Purifying and haemopoietic progenitor cell selection by CD34⁺ cell separation [J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 21: 665-71.