

· 基础论著 ·

免疫磁珠分选两步法纯化原代小胶质细胞

孙珊珊 王蓓蓓 鞠莉莉 曾辉 徐群渊

【摘要】 目的 神经系统感染研究需获得纯度高、细胞生物学状态接近体内的小胶质细胞。既往分离纯化方法不能满足研究需要,需建立新的高效纯化方法。方法 获得小鼠全脑单细胞悬液后,应用磁珠分选阳选法,经过两步分选获得小胶质细胞。用流式细胞仪检测小胶质细胞的纯度,瑞氏-姬姆萨染色观察细胞形态,采用7-AAD染色鉴定分选后细胞的活性。结果 应用免疫磁珠分选一步法可以获得纯度达 $(59.98 \pm 13.61)\%$ 的小胶质细胞;两步法进一步将细胞纯度提高至 $(97.62 \pm 1.35)\%$ 。该方法所获得的小胶质细胞活性良好,形态正常。结论 免疫磁珠分选两步法能够稳定地获得高纯度的小胶质细胞,对小胶质细胞的活性和形态无显著影响,可用于后续中枢神经系统急性感染的体外研究。

【关键词】 小胶质细胞;磁珠分选

Purification of microglia by two-step magnetic activated cell sorting SUN Shan-shan, WANG Bei-bei, JU Li-li, ZENG Hui, XU Qun-yuan. Beijing Institute for Neumscience, Capital Medical University, Beijing Center of Neural Regeneration and Repairing, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of the Ministry of Education, Beijing 100069, China

Corresponding author: XU Qun-yuan, Email: xuqy@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective The study on nervous system infection requires us to obtain microglia with high purity and biological status. However, present methods for microglia purification can not meet these requirements. It is necessary to establish an efficient separation method. **Methods** After having prepared the whole mouse brain cell suspension, two-step magnetic activated cell positive sorting (MACS) technique was applied specifically for CD11b⁺ microglia sorting. The purity of the cells was detected by flow cytometry, the morphology of the cells was observed by Wright-Giemsa staining, and the viability of the cells were determined by 7-AAD staining. **Results** The study obtained mice microglia with purity of $(59.98 \pm 13.61)\%$ for Step 1 MACS and $(97.62 \pm 1.35)\%$ for Step 2 MACS, which could bear good viability and morphology. **Conclusions** The two-step magnetic cell sorting technique could obtain high purity microglia stably, with no significant effect on its activity and morphology. The method suits for studying the infection in CNS.

【Key words】 Microglia; Magnetic activated cell sorting

小胶质细胞是中枢神经系统中的免疫效应细胞。虽然仅占全脑神经胶质细胞总数的5%~20%^[1],但是,小胶质细胞参与中枢神经系统的众多生理活动,并与许多疾病的发生发展密切相关^[2],特别在中枢神经系统感染性疾病发展中发挥了重要作用^[3]。目前常用的小胶质细胞纯化方法,无法准确反映其在体时的生物学特性。为了更好地研究小胶质细胞的炎症反应与中枢神经系统生理和病理过程的关系,本研究利用免疫磁珠分选(magnetic

activated cell sorting, MACS)两步法,获得较高纯度并能够尽可能反映其在体情况的原代小胶质细胞。

材料与方法

一、材料

1. 实验用动物:出生48 h内的SPF级C57BL/6J乳鼠,购自中国协和医科大学实验动物研究所。

2. 主要试剂和仪器:磁珠分选用缓冲液(含2 mmol/L EDTA, 0.5% BSA的0.01 mol/L PBS缓冲液,以0.22 μm滤膜过滤,4℃贮存);CD11b(microglia)-磁珠(德国美天旎生物技术公司产品);抗小鼠CD11b-Percp/Cy5.5抗体和抗小鼠CD45-PE抗体(美国BD公司产品);7-AAD染料(美国eBioscience公司产品);瑞氏-姬姆萨染液(珠海贝索生物技术有限公司产品)。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.008

基金项目:2009年北京市科技新星计划(B类)(2009B05)

作者单位:100069 北京,首都医科大学北京神经科学研究所,北京市神经再生修复研究重点实验室,教育部神经变性病重点实验室(孙珊珊、鞠莉莉、徐群渊);首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(王蓓蓓、曾辉)

通讯作者:徐群渊,Email:xuqy@ccmu.edu.cn

二、磁珠分选两步法纯化小胶质细胞

1. 乳鼠全脑单细胞悬液的制备:将出生 48 h 内的乳鼠冰冻麻醉,75% 乙醇消毒,断头,无菌条件下取出整脑,体视镜下于冰 PBS 缓冲液中轻柔剥除软脑膜及血管。PBS 冲洗后,用滴管轻柔吹打,经 400 目滤膜过滤,制备全脑单细胞悬液。

2. 免疫磁珠分选法(阳选法)纯化小胶质细胞:

(1) 免疫磁珠一步法:按每 10^7 细胞加入 90 μl 磁珠分选用缓冲液和 10 μl CD11b(microglia)-磁珠,混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min。加入孵育体系 10 倍体积的缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm 离心 10 min。根据细胞数量选择分选柱(MS 柱可容纳 2×10^8 细胞;LS 柱可容纳 2×10^9 细胞);采用 MACS 人工分选设备(德国美天旌生物技术公司),经润柱、上样、洗柱 3 步后,收集磁分选柱上阳性细胞成分,即 CD11b⁺ 小胶质细胞。(2) 免疫磁珠两步法:将经过一次免疫磁珠分选获得的阳性细胞,更换新分选柱后,再次过柱分选。

三、分离纯化后的小胶质细胞纯度、形态及活性的检测

1. 小胶质细胞纯度和活性检测:以缓冲液重悬待测的样品细胞,按每 10^6 细胞中加入抗-CD11b-Percep/Cy5.5 1 μl 及抗-CD45-PE 0.5 μl ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min;于 10 倍体积缓冲液中 1200 rpm 离心 5 min 后弃上清。以 100 μl PBS 重悬,加入 5 μl 7-AAD 染料染色 5 min。应用流式细胞仪检测小胶质细胞样品的纯度:使用 FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)和 CELLQuest 软件(美国 BD 公司),计算 7-AAD⁻ 细胞中 CD45⁺ CD11b⁺ 细胞的比例,即为小胶质细胞纯度指标。计算 CD45⁺ CD11b⁺ 的细胞中 7-AAD⁻ 细胞的百分率,即为小胶质细胞活性指标。

2. 瑞氏-姬姆萨染色观察小胶质细胞形态:将分选得到的细胞样品以 200 μl PBS 重悬后,于离心涂片机中以 750 rpm 离心 5 min 涂片。常规瑞氏-姬姆萨染色,油镜下观察细胞形态。

四、统计学处理

以 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析,行单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、免疫磁珠法分离获得小胶质细胞的纯度

采用流式细胞仪获取免疫磁珠分选前后的细胞样本,收集 7-AAD⁻ 细胞,即未凋亡的活细胞;计算活细胞中 CD45⁺ CD11b⁺ 细胞的比例,即小胶质细胞

的纯度。结果显示,经免疫磁珠一步法所获得的小胶质细胞比例($59.98\% \pm 13.61\%$)较未经分选的全脑匀浆中小胶质细胞的比例($4.16\% \pm 0.81\%$)显著提高;经免疫磁珠两步法分选后获得的小胶质细胞的纯度较一步法有显著提高($97.62\% \pm 1.35\%$ vs $59.98\% \pm 13.61\%$);组间比较差异具有统计学意义($n = 7, P < 0.01$)(图 1)。

二、免疫磁珠分选法所获得小胶质细胞的形态

将两步法分选获得的小胶质细胞,经离心涂片后,以瑞氏-姬姆萨染液染色,油镜下观察可见,细胞胞体呈类圆形,胞浆淡染呈浅蓝灰色、胞质较丰富,核深染呈紫红色、不规则形,多偏于细胞一侧(图 2)。该细胞形态与既往文献报道一致。

三、免疫磁珠两步法对小胶质细胞活性的影响

利用流式细胞仪检测小胶质细胞样本的细胞活性。计算经 7-AAD 染色的样本中 7-AAD⁻ 细胞占 CD11b⁺ 细胞的比例,即全部小胶质细胞中活细胞的比例。7-AAD 标记凋亡细胞的结果显示,全脑匀浆中小胶质细胞 7-AAD⁻ 活细胞比例为($96.45 \pm 1.15\%$);经免疫磁珠一步法分选获得的小胶质细胞中,活细胞比例为($97.60 \pm 0.88\%$);免疫磁珠两步法获得的样本中活细胞比例为($96.47 \pm 2.94\%$)。经统计学分析,与全脑匀浆的样本相比,无论是一步法还是两步法获得的小胶质细胞,其活性均无统计学意义($n = 7, P > 0.05$)(图 3)。

讨 论

小胶质细胞作为中枢神经系统内的免疫效应细胞,通常按照其功能状态被划分“静息态”和“激活态”两种。目前研究认为“静息态”和“激活态”的小胶质细胞行使不同的功能;处于静息态的小胶质细胞具有监视脑内环境的作用,使小胶质细胞能够对脑内环境的任何轻微改变作出反应,即被“激活”;而进入活化状态的小胶质细胞则进一步发挥其免疫学效应,通过获得吞噬功能和上调炎症因子的表达等方式参与脑内的炎症反应,产生不同的病理效应^[4]。小胶质细胞参与中枢神经系统炎症反应,是多种急性感染性疾病和慢性退行性疾病中不可忽视的因素^[5]。小胶质细胞为应对 CNS 的包括微生物感染在内的多种损伤所作出反应时,其免疫学效应不仅参与受感染脑组织的防御反应,也可能带来潜在的损伤;感染发生时,小胶质细胞不仅能通过炎症因子等直接损伤或诱导神经元的凋亡,也可通过吸引活化的 T 细胞、单核细胞和粒细胞进入 CNS 来间接损伤神经元^[3]。如果能够限制小胶质细胞炎症反应的损伤效应、减少对神经组织的损伤,同时最大限

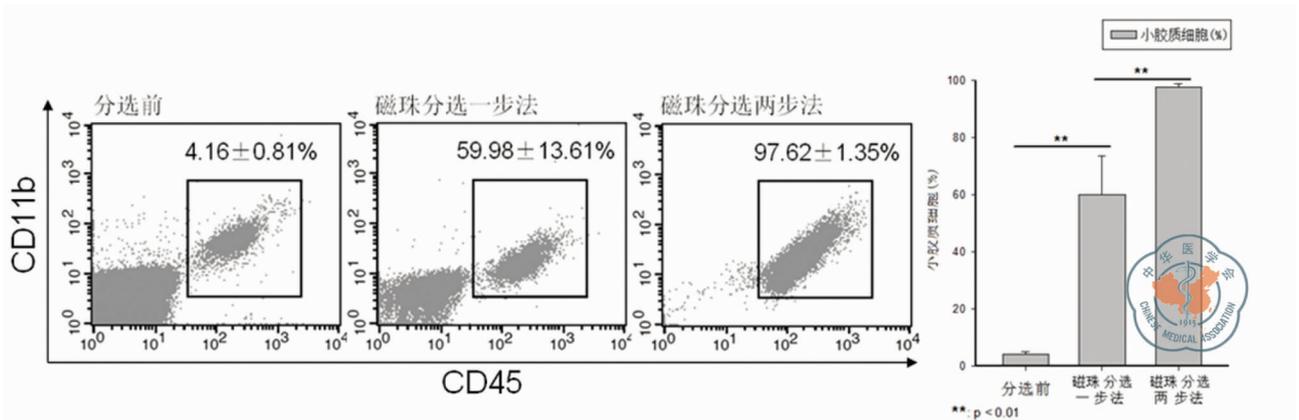


图1 小胶质细胞的纯度检测

注:小胶质细胞纯度的流式细胞学检测。计算分选前(A),一步法磁珠分选后(B)和两步法磁珠分选后(C)小胶质细胞的比例,以 CD45⁺CD11b⁺ 细胞占 7-AAD-活细胞的百分率计算。(D)SPSS 16.0 统计学软件单因素方差分析结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 7, * P < 0.01$

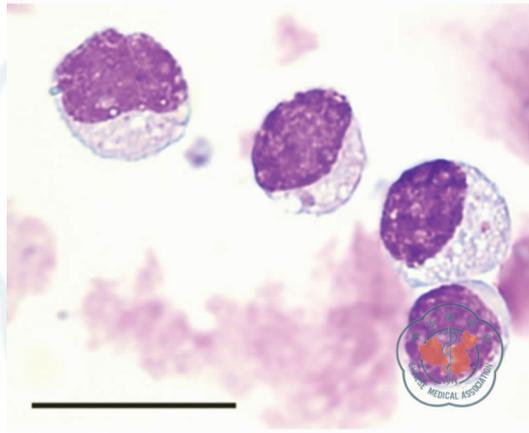


图2 纯化小胶质细胞的瑞氏-姬姆萨染色(×100)

注:纯化小胶质细胞的形态检测。磁珠分选两步法获得的小胶质细胞,经离心涂片后,以瑞氏-姬姆萨染液染色。油镜下观察可见,细胞胞体呈类圆形,胞浆淡染呈浅蓝灰色、胞质较丰富,核深染呈紫红色、不规则形,多偏于细胞一侧。比例尺 = 10 μm

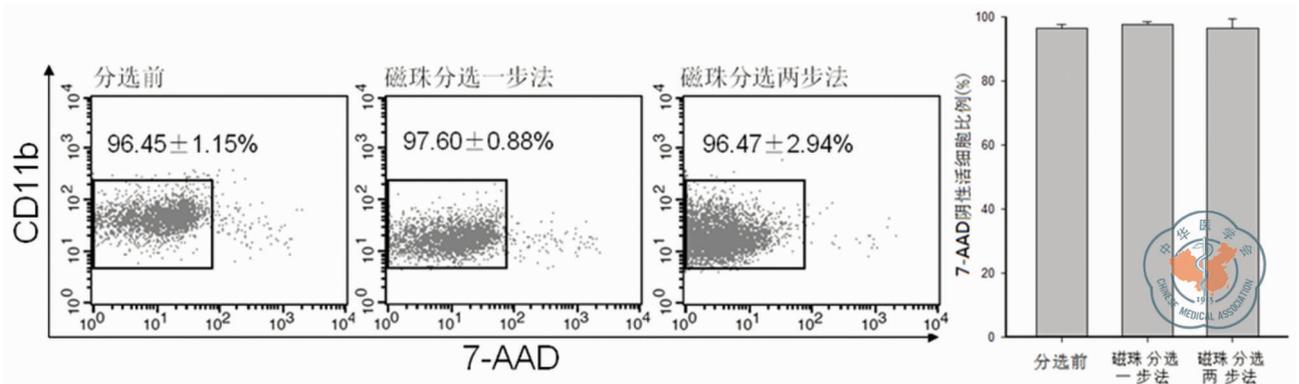


图3 小胶质细胞的活性检测

注:小胶质细胞活性的流式细胞仪检测。计算分选前(A),磁珠分选一步法(B)和两步法(C)后小胶质细胞中活细胞的比例,以 CD11b⁺ 的小胶质细胞中 7-AAD - 细胞的百分率计算。(D)SPSS 16.0 统计学软件单因素方差分析结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 7, * P < 0.05$

度地利用其防御和保护功能,对于临床上治疗 CNS 感染疾病具有重要意义。因此,在 CNS 感染免疫的研究中,小胶质细胞成为关注的重点之一。

对小胶质细胞进行体外研究时,方法之一是使用小胶质细胞系,但是考虑到“永生代”对细胞生物学特性的影响,国外有专家已不建议使用^[2]。人们尝试使用多种方法来获取小胶质细胞,以便在体外进行更深入的研究。但由于小胶质细胞很容易受到外界环境的刺激而改变其原有的状态,在获得原代小胶质细胞的同时,需要尽量降低对其生物学特性的影响。

获得原代小胶质细胞的方法,基本是以 McCarthy 等创立的胶质细胞混合培养为基础,结合 Giulian 等的振摇法、Hao 等的营养耗竭法和 Saura 等建立的“温和消化法”,经过不同程度的综合改良而成^[6-7]。但这些经典的纯化原代小胶质细胞的方法都保留了前期胶质细胞混合培养的步骤,使所获得的小胶质细胞在体外经过了 48 h 至 14 d 以上的培养。因此,通过慢性分离得到的小胶质细胞已无法准确地反应小胶质细胞在体时的情况,这一类方法并不适用于正常和炎症状态下小胶质细胞生物学活性的研究,需要建立快速分离手段。Schwartz 等^[8]对这种由体外获得小胶质细胞上得出的研究结果是否能够反应其在体情况提出质疑;国内李锐等^[9]通过研究指出,振摇法获得小胶质细胞更接近于活化状态,而温和消化法获得的小胶质细胞更接近于静息状态,可见振摇法和温和消化法获得的小胶质细胞其生物学特性已发生较大改变。

为尽可能地保持细胞在体时的状态,目前常采用密度梯度离心法、免疫磁珠分选法和流式细胞分选技术进行急性分离。密度梯度离心法曾是分离纯化小胶质细胞较常用的方法^[10]。但是,该法获得的细胞纯度低、对免疫细胞功能的影响较大^[11]。流式细胞分选技术对设备要求较高,由于小胶质细胞在全脑细胞总数中比例过低(4%~5%),若直接分选耗时过长,不利于小胶质细胞活性的保持。

由于单一的分选纯化方法在技术上和纯化率上的局限性,国内外已有研究尝试联合应用包括磁珠分选法在内的多种方法纯化免疫细胞^[12-13]。免疫磁珠法分离操作简单,对设备要求低,全程均可实现无菌操作,对细胞活性影响轻微。但是,由于脑组织在处理过程中有大量神经细胞死亡,导致单次分选小胶质细胞纯度较低,通常只有 50% 左右。残存的死细胞不仅影响了细胞纯度,而且可能影响后续实验中小胶质细胞的激活。通过两步分选法可将乳鼠全脑单细

胞悬液中获得的小胶质细胞的纯度提高到 97% 以上。而第二步分选无需其他处理,整体实验时间仅延长 10 min 左右,较全脑匀浆中的小胶质细胞和一步法分选获得的细胞,其存活率均无统计学差异。

现有小胶质细胞纯化方法的局限性,限制了对脑内急慢性感染发生时小胶质细胞功能变化的研究。本研究提出的方法,能够在取材完毕后 2 h 内得到所需的样品细胞,且对细胞的活性和生物学特性无显著影响,所获得的小胶质细胞能够较好地反映其在感染发生发展过程中即刻的在体状态,更适于研究小胶质细胞在炎症反应不同阶段的生物学特性。用该方法所获得的小胶质细胞,也可以根据实验需要,进一步用流式细胞术等方法进行表型分析等后续研究,甚至进行特定细胞亚型的分选。

参 考 文 献

- 1 Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, 2005, 81(3):302-313.
- 2 Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1):89-105.
- 3 Rock RB, Gekker G, Hu SX, et al. Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4):942-964.
- 4 Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11):1387-1394.
- 5 Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, 2004, 1:14.
- 6 张敏,魏桂荣,董继华,等. 3 种小胶质细胞培养方法的比较. *脑与神经疾病杂志*, 2005, 13(2):97-99.
- 7 项正兵,吴晓牧,丁伟荣,等. 一种新的小胶质细胞分离纯化方法. *江西医学院学报*, 2007, 47(2):13-14.
- 8 Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, et al. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci*, 2006, 29(2):68-74.
- 9 李锐,郭民侠,李晓青,等. 不同分离纯化法原代培养小胶质细胞的生物学差异. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(4):366-368.
- 10 de Haas AH, Boddeke HW, Biber K. Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, 2008, 56(8):888-894.
- 11 Zahler S, Kowalski C, Brosig A, et al. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods*, 1997, 200(1-2):173-179.
- 12 Stanciu LA, Shute J, Holgate ST, et al. Production of IL-8 and IL-4 by positively and negatively selected CD4⁺ and CD8⁺ human T cells following a four-step cell separation method including magnetic cell sorting (MACS). *J Immunol Methods*, 1996, 189(1):107-115.
- 13 缪旭,骆丹,吉玺,等. 联用密度梯度离心与免疫磁珠法分离纯化人表皮朗格汉斯细胞. *临床皮肤科杂志*, 2005, 34(5):276-278.

(收稿日期:2011-12-28)

(本文编辑:孙荣华)