骨髓淋巴细胞的分离*

何仁忠[1,2] 朱黎明[1△] 符代炎[1] 霍琼芬[2] 黄 进[2] 李海银[2]

(1 湖南省老年医院 - 湖南省老年医学研究所呼吸疾病研究室 湖南 长沙 410016；2 南华大学研究生院 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的：探讨骨髓淋巴细胞的分离方法。**方法：**对 18 例疑似血液病患者，分别抽取骨髓 0.2ml，参照淋巴细胞分离步骤来分离骨髓淋巴细胞，并且对骨髓细胞进行活力检测，分别观察骨髓淋巴细胞的形态及计算骨髓淋巴细胞的活力。**结果：**骨髓淋巴细胞外形呈圆形或椭圆形、边缘整齐，胞浆量很少，似裸核，胞质如可见，呈淡蓝色，一般无颗粒；胞核圆形或有小切迹，染色质聚集成大块状，结构紧密，结块边缘不清楚，染紫红色；镜下观察发现骨髓淋巴细胞的活力 >95 %。**结论：**Ficoll 分离液可以对骨髓淋巴细胞进行分离，将为成熟淋巴细胞的研究以及其在炎症性疾病中的发病机制及治疗提供一个新的思路。

关键词：骨髓淋巴细胞；分离；炎症性疾病

中图分类号：R551.3 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)16-3037-03

Separation of Bone Marrow Lymphocytes*

HE Ren-zhong[1,2], ZHU Li-ming[1△], FU Dai-yan[1], HUO Qiong-fen[2], HUANG Jin[2], LI Hai-yin[2]

(1 Department of Respiratory Medicine, Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha, 410016, China; 2 Graduate School of University o f South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the method to isolate the bone marrow cell. Methods: 0.2 ml bone marrow was extracted from 18 cases of suspected blood diseases. Bone marrow cell was isolated according to the separation lymphocytes steps. Dynamic testing was done to observe the form of bone marrow cells and calculate the vitality of bone marrow lymphocytes. Results: Lymphocytes from bone marrow cells were round or oval shape, neat edge, with small amount of cytoplasm, like the bare nucleus, cytoplasm, such as visible, pale blue, usually without granules; Nucleus was round or with a small notch, staining chromatin aggregation into big blocky, compact structure, indistinct agglomeration edge, dyed by aubergine; the vitality of the bone marrow lymphocytes were above 95 % as observed by microscope. Conclusion: The bone marrow lymphocyte can be separated by Ficoll separation medium. This provides a new way for experimental study on mature Lymphocyte and the pathogenesis and treatment for inflammatory diseases.

Key words: Bone marrow lymphocytes; Separation; Inflammation disease

Chinese Library Classification (CLC): R551.3 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)16-3037-03

前言

淋巴细胞是一类重要的免疫调节细胞，约占白细胞总数的 25 %，在免疫反应过程中起重要作用。研究认为，淋巴细胞是炎性细胞中的主要细胞之一，其活化及调节细胞因子在慢性炎症状态得以持续的关键因素[1]。因此，淋巴细胞在其发病机制及治疗中起到非常重要的作用[2,3]。来源于骨髓的祖淋巴细胞转变成成熟淋巴细胞的过程被称作淋巴细胞的成熟；骨髓干来源的"造血干细胞"可以分化成"髓性造血干细胞"和"淋巴性造血干细胞"，"淋巴性造血干细胞"又通过一系列调控分化出"淋巴细胞系"。因此，淋巴细胞是骨髓干来源的淋巴性造血干细胞通过一系列分化、趋化等基因调控而得来的[4]。淋巴细胞在炎症性疾病的病理生理过程中起到重要作用；骨髓干细胞在炎症性疾病中亦起到重要作用，研究表明骨髓干细胞将成为多种炎症性疾病（COPD、支气管哮喘及肺纤维化等）治疗的一个新靶点[5,6]。外周血淋巴细胞的分离是通过在淋巴细胞分离液作用下而得的，然而骨髓淋巴性造血干细胞的分离是否可以参照上述试剂及相关条件而获取却未见报道。对于外周血淋巴细胞的分离及其相关研究有比较多的报道；骨髓淋巴细胞的分离及相关研究尚未见报道。本文就对骨髓淋巴细胞的分离做一研究，同时为后期相关研究提供一个新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

Ficoll 分离液购于 Ficoll 公司；细胞洗涤液和全血稀释液（二者可用 PBS 替代）均购于天津瀚阳生物有限公司；水平离心机（长沙湘麓离心机）；吉姆萨染液（A，B）上海工硕生物技术有限公司

1.2 研究对象

选取 18 例疑似血液病患者，骨髓穿刺快速涂片，参照血液病诊断标准[6]排除血液系统疾病的患者（如：骨髓增生综合征、再生障碍性贫血等），男 10 例，女 8 例，年龄 41-55 岁，来自我

* 基金项目：湖南省自然科学基金（09JJ5019）

作者简介：何仁忠（1984-），男，硕士，医师，主要研究方向：支气管哮喘的发病机制，电话：15274993865，E-mail: renzhong.he@163.com

△通讯作者：朱黎明，女，教授，主任医师，主要研究方向：支气管哮喘的发病机制，E-mail: zhuliming3298@sina.com

（收稿日期：2011-11-15 接受日期：2011-12-10）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

院 2011 年 4 月 -2011 年 7 月血液科住院患者。抽取 0.2 ml 骨髓作为骨髓淋巴细胞分离的标本。

1.3 骨髓淋巴细胞的分离提纯步骤

① 取髂骨部位,无菌操作抽取约 0.2 ml 的骨髓,肝素化抗凝管抗凝;② 分别给予 0.8 ml 全血稀释液稀释后混匀;③ 取 15 ml 的离心管,加入 2 ml 的 Ficoll 分离液静置 5 分钟;④ 待 Ficoll 分离液静置后,缓慢加入 1ml 的全血稀释液,分层清晰;⑤ 常温下,离心 1500 转 / 分,15 分钟;⑥ 吸取白颜色环状细胞膜层;⑦ 加入细胞洗涤液 2 倍体积,混匀、离心 2000 转 / 分,5 分钟;⑧ 重复上述操作 3 次;⑨ 可见离心管管底有白颜色层细胞,即为所得细胞;⑩ 将所获得的骨髓细胞给予吉姆萨染色。

1.4 骨髓淋巴细胞吉姆萨染色

取 50 l 骨髓分离所得细胞,涂片于玻片,待干燥后,滴 1 滴吉姆萨染色液 A 液,染色 1 分钟后,水冲洗 1 分钟,适当干燥。滴 1 滴吉姆萨染色液 B 液,染色 30 秒,自来水冲洗 1 分钟,干燥,中性树胶封片。

1.5 骨髓淋巴细胞台盼蓝染色

取细胞悬液与 0.4 %台盼蓝溶液以 9:1 混合混匀。计数:在三分钟内,分别计数活细胞和死细胞:镜下观察,死细胞被染成明显的蓝色,而活细胞拒染呈无色透明状:统计细胞活力:活细胞率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100。

2 结果

2.1 骨髓淋巴细胞形态学情况

细胞外形呈圆形或椭圆形、边缘整齐,胞浆量很少,似裸核,胞质如可见,呈淡蓝色,一般无颗粒:胞核圆形或有小切迹,染色质聚集成大块状,结构紧密,结块边缘不清楚,染紫红色 (图 1 A:吉姆萨× 200,B:吉姆萨× 400)。

骨髓细胞快速涂片,吉姆萨染色后,用油镜观察到骨髓淋巴细胞外形呈细胞外形呈圆形、边缘整齐,胞浆量很少,似裸核,胞质如可见,呈淡蓝色,一般无颗粒:胞核圆形或有小切迹,染色质聚集成大块状,结构紧密,结块边缘不清楚,染紫红色 (图 1 C:吉姆萨× 400 油镜)。

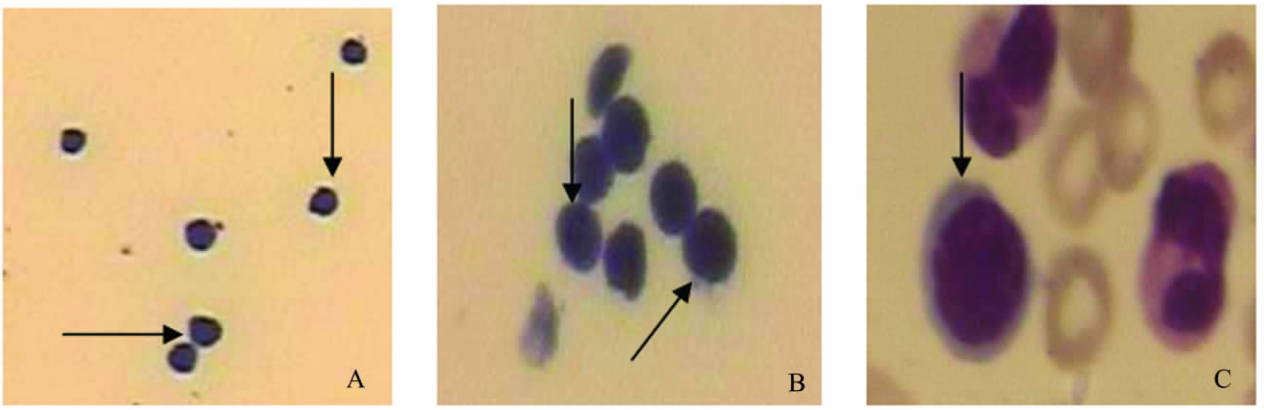

图 1 骨髓淋巴细胞形态学变化 (吉姆萨染色) (图 A.B.C)

Fig. 1 Morphological changes of bone marrow lymphocytes (Giemsa staining) (picture A.B.C)

(吉姆萨染色× 200 吉姆萨染色× 400 吉姆萨染色× 400(油镜)

A:Giemsa× 200 B: Giemsa× 400 C: Giemsa× 400(Oil immersion)

2.2 骨髓淋巴细胞台盼蓝活力检测结果

选取一个镜下视野,数 100 个已经混悬好的骨髓淋巴细胞,进行活细胞计数。活细胞率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) × 100 即为:95-98/(100)× 100=95-98 %。

3 讨论

淋巴细胞是在免疫系统中起关键作用的一类白细胞,起源于淋巴性造血干细胞,随血循环在一系列调控作用下成熟,再随血循环到周围淋巴器官,在各自既定的区域定居、繁殖。受抗原激活即分化增殖,产生效应细胞,行使其免疫功能,成为机体免疫应答功能的重要细胞成分[7]。淋巴细胞是关键性的调节细胞在慢性炎症性疾病中,使多种的白细胞自血液募集至炎症部位,并引起嗜酸粒细胞、肥大细胞和淋巴细胞的炎症介质释放以及结构细胞的改变:亦有研究表明通过活化因子等促进炎症发生及免疫平衡紊乱[8,9]。因此,淋巴细胞在炎症性疾病的发生发展过程中起到非常重要的作用。

外周血淋巴细胞参与炎症,其具体调节机制尚不完全清楚。同时也有研究表明通过调节骨髓干来源的造血干细胞能更好的研究其发病机制及治疗将成为研究的一个新靶点[10]。如能有效的对骨髓细胞进行相关研究,将为炎症性疾病的发病机制及其治疗提供新的理论依据。对于外周血淋巴细胞的分离及其研究亦有很大程度的报道[11,12],但对于骨髓淋巴细胞的分离目前尚未报道。

本研究参照外周血淋巴细胞的分离步骤[13],亦对骨髓淋巴造血干细胞进行分离,发现使用淋巴细胞分离液能够分离出骨髓淋巴细胞,采用吉姆萨染色液染色后观察其细胞外形呈圆形或椭圆形、边缘整齐,胞浆量很少,似裸核,胞质如可见,呈淡蓝色,一般无颗粒:胞核圆形或有小切迹,染色质聚集成大块状,结构紧密,结块边缘不清楚,染紫红色 (图 A:吉姆萨× 200,B:吉姆萨× 400)。本研究同时对获取的骨髓细胞进行快速涂片,吉姆萨染色后采用油镜观察发现骨髓淋巴细胞形态学呈圆形、边缘整齐,胞浆量很少,似裸核,胞质如可见,呈淡蓝色,一般无

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

颗粒；胞核圆形或有小切迹，染色质聚集成大块状，结构紧密，结块边缘不清楚，染紫红色（图 C：吉姆萨× 400 油镜）。因此，根据骨髓淋巴细胞的形态，可以认为采用上述实验方法所分离的细胞为骨髓淋巴细胞。

按照 Ficoll 分离液说明书的实验操作步骤，本研究使用 Ficoll 分离液分离淋巴细胞，其离心时间约为 25 分左右，约离心 30 分钟；然而考虑骨髓淋巴细胞和外周血淋巴细胞有体积大小的变化，本实验通过改变转数及时间来分离骨髓淋巴细胞，即离心时间和转数如上述。将所分离的骨髓淋巴细胞进行染色后观察发现其形态与骨髓穿刺快速涂片结果一致，我们认为使用 Ficoll 分离液进行适当的转数和离心时间改变可以对骨髓淋巴细胞进行有效的分离。

本实验研究了骨髓淋巴细胞的活力，参照台盼蓝试剂盒说明书，取骨髓淋巴细胞悬液与台盼蓝液体混悬，镜下观察发现骨髓淋巴细胞的活力 >95 %，说明使用上述实验方法可以有效地分离有活力的骨髓淋巴细胞。有活力的骨髓淋巴细胞能够进行培养，将为其研究提供很好的基础。马刚等[14]研究发现通过对兔骨髓细胞制作单细胞悬液进行培养，发现骨髓细胞可以进行传代培养。由于外周血悬浮细胞（如淋巴细胞、中性粒细胞等）寿命比较短，不能传代，可能对研究有一定影响，如细胞转染等；因此通过分离的骨髓淋巴细胞进行传代培养，将为终末期悬浮细胞实验所不能达到要求的实验进一步完善。

综上所述，从本研究发现，参照淋巴细胞分离液的步骤能够有效的分离出骨髓淋巴细胞。骨髓淋巴细胞的分离将为成熟淋巴细胞的研究提供一个新的思路；同时，亦为炎症性疾病的发病机制及其治疗提供新的靶点。

参 考 文 献（References）

[1] Ziegler SF. Regulatory T cells and inflammation: better late than never [J]. Immunity, 2008, 29(1):114-126

[2] 施举红,李太生,林耀广. Th1/Th2 在支气管哮喘大鼠气道炎症过程中的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 25(8): 519-523
Shi Ju-hong, Li Tai-sheng, Lin Yao-guang. The evolvement of Th1/Th2 imbalance in the process of airway inflammation in a rat asthmatic model[J]. Chin J Tuberc Respir Dis,2004,25(8):519-523

[3] 刘占举,郭惠学,胡军. IL-12 对炎症性肠病患者外周血和肠黏膜固有层淋巴细胞激活和炎症介质分泌的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2006,41(5):818-820
Liu Zhan-ju, Guo Hui-xue, Hu Jun. Effect of IL-12 on peripheral blood and lamina propria lymphocyte activation and proinflammatory cytokine secretion in patients with inflammatory bowel disease [J]. Journal of zhengzhou university medical college, 2006, 41(5): 818-820

[4] J ones CP, Rankin SM. Bone marrow-derived stem cells and respiratory disease[J]. J Chest, 2011, 140(1): 205-211

[5] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis [J]. Respir Res, 2010,11: 16-20

[6] Bonnet D. Biology of human bone marrow stem cells[J]. Clin Exp Med, 2003, 3(3): 140-149

[7] 张延清, 董家蔷, 王京华. 骨髓活检病理学检测在血液病诊断和鉴别诊断的价值[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2010, 44(4): 396-398
Zhang Yan-qing, Dong Jia-qiang, Wang Jing-hua. Clinic value of bone marrow histopathology in diagnosis and differential diagnosis of hematonosis [J]. Journal of Harbin medical university, 2010, 44 (4): 396-398

[8] Selleri S, Brigida I, Casiraghi M. In vivo T-cell dynamics during immune reconstitution after hematopoietic stem cell gene therapy in adenosine deaminase severe combined immune deficiency[J]. Allergy Clin Immunol, 2011, 127(6): 1368-1375

[9] Sakaguchi S. Regulatory T cells:key controllers of immunologic self-tolerance[J]. Cell, 2000, 101(5): 80856 -80859

[10] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm [J]. Cell, 1994, 76(2):90337-90339

[11] Lee SH, Jang AS, Kwon JH, et al. Mesenchymal Stem Cell Transfer Suppresses Airway Remodeling in a Toluene Diisocyanate-Induced Murine Asthma Model[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2011, 3(3): 205-211

[12] 张毅,赖百糖,李世业,等.肺癌浸润淋巴细胞的分离及增殖研究[J]. 中国肺癌杂志,2000,3(6):441-445
Zhang Yi, Lai Bai-tang, Li Shi-ye, et al. Rearch of isolation and proliferation from infiltrating lymphocytes of in lung cancer [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2000, 3(6): 441-445

[13] 郑雪莲,李园,徐定远,等. AEP 大鼠外周血淋巴细胞的分离及其影响因素的探讨[J]. 四川医学, 2007, 28(11): 1195-1196
Zheng Xue-lian, Li Yuan, Xu Ding-yuan, et al. AEP in rat peripheral blood lymphocytes separation and its affecting factors [J]. Journal of Sichuan Medical, 2007, 28(11): 1195-1196

[14] 陈肃标,谢素和,曾庆馀.提高外周血淋巴细胞梯度离心分离率[J]. 汕头大学医学院学报, 2001, 14(2): 135-137
Chen Xiao-biao,Xie Su-he, Zeng Qing-chu. Increase in peripheral blood lymphocytes of gradient centrifugation separation rate[J]. Journal of Shantou university medical college, 2001,14(2): 135-137

[15] 马刚,王者玲. 骨髓细胞的培养[J]. 北京口腔医学, 1996, 3: 111-113
Ma Gang, Wang Zhe-ling. Bone marrow cell culture [J]. Journal of beijing oral medicine, 1996, 3: 111-113

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net