

单核细胞的原代分离方法优化及其炎症激活模型的构建

田 敏¹, 胡 俊², 杨国华², 谢明水³, 黄宏耀^{3*}

(1. 锦州医科大学 湖北医药学院研究生培养基地, 湖北 随州 441300;

2. 武汉大学 基础医学实验教学中心, 湖北 武汉 430000;

3. 湖北医药学院附属随州中心医院 检验科, 湖北 随州 441300)

摘要: 为了得到高纯度高得率的单核细胞(monocyte)并分析其在血栓发生中的作用,本研究利用10位健康人的血样分离出单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),并通过免疫磁珠分选来获得单核细胞,测定PBMC与单核细胞的得率。通过制备血浆中的高丰度蛋白 β_2 GPI,并与其抗体构成抗原抗体复合物来刺激细胞培养,通过荧光定量PCR检测细胞培养基中组织因子TF和TNF- α 的含量,构建单核细胞炎症激活模型。实验结果显示单核细胞的得率较高,纯度和活性较好,且 β_2 GPI纯化效果好。荧光定量PCR结果显示,与对照组相比,添加 β_2 GPI抗原抗体复合物的实验组TF与TNF- α mRNA表达量明显增多。本实验表明纯化的单核细胞被充分激活,在细胞水平上为研究机体炎症反应和血栓形成的分子机理提供了炎症模型。

关键词: 单核细胞; β_2 糖蛋白I;组织因子;肿瘤坏死因子- α ;单核细胞激活;炎症模型

中图分类号: R34

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2020)02-0221-07

Optimization of primary isolating monocytes method and establishing of monocytes inflammatory activation model

TIAN Min¹, HU Jun², YANG Guohua², XIE Mingshui³, HUANG Hongyao^{3*}

(1. Graduate Education Base of Hubei Medical College, Jinzhou Medical University, Suizhou 441300, Hubei, China;

2. Basic Medical Experimental Teaching Center, Wuhan University, Wuhan 430000, Hubei, China;

3. Department of Laboratory, Suizhou Central Hospital, Hubei Medical College, Suizhou 441300, Hubei, China)

Abstract: In order to obtain high-purity and high-yield monocytes and analyze their role in thrombosis, this study used 10 healthy human blood samples to isolate PBMC, to obtain monocytes by immunomagnetic bead sorting, and to determine the yield of PBMC and monocytes. By preparing a high abundant protein β_2 GPI from plasma, it was combined with its antibody to form an antigen-antibody complex to stimulate cells, and the content of tissue factor TF and TNF- α in cell culture medium were detected by real-time PCR to construct mononuclear cell inflammation activation model. The experimental results showed that the yield of monocytes was higher, and the purity and activity were better, and the purification effect of β_2 GPI was also improved. The results of real-time PCR showed that compared with the control group, the expression levels of mRNA of TF and TNF- α in the experimental group with the antigen-antibody complex significantly increased. This experiment demonstrates that purified monocytes are fully activated and provide an inflammatory model at the cellular level for studying the molecular mechanisms of inflammatory response to and thrombosis.

Key words: monocyte; β_2 GPI(β_2 glycoprotein I); TF(tissue factor); TNF- α (tumor necrosis factor- α); monocyte activation; inflammation model

收稿日期: 2019-11-11 修回日期: 2020-01-08 接受日期: 2020-03-16

作者简介: 田敏(1993-),女,研究生,主要从事生物化学与分子生物学的研究。E-mail:tm15753756167@163.com

* 通讯联系人: 黄宏耀(1973-),男,主任技师,硕士,主要从事生物化学与分子生物学的研究。E-mail:hhy731120hb@sina.com

基金项目: 湖北省卫生计生委面上项目(WJ2017M003)

引用格式: 田敏,胡俊,杨国华,等. 单核细胞的原代分离方法优化及其炎症激活模型的构建[J]. 生物资源, 2020, 42(2): 221-227.

Tian M, Hu J, Yang G H, *et al.* Optimization of primary isolating monocytes method and establishing of monocytes inflammatory activation model [J]. Biotic Resources, 2020, 42(2): 221-227.

0 引言

单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)是指只有一个细胞核的细胞,一般是指外周血中单个核的白细胞,主要包括淋巴细胞、单核细胞和树突状细胞。单核细胞(monocytes)是血液中体积最大的血细胞,也是最大的白细胞,是机体防御系统的一个重要组成部分。单核细胞来源于骨髓中的造血干细胞,并在骨髓中发育。它具有吞噬或清除受伤、衰老的细胞及其碎片的能力。单核细胞还参与免疫反应,在吞噬抗原后将所携带的抗原决定簇转交给淋巴细胞,诱导淋巴细胞进行特异性免疫反应。单核细胞还具有识别和杀伤病原微生物的能力^[1]。单核细胞还是参与体内炎症反应的主要功能细胞^[2],在机体发生炎症反应过程中起重要作用。

β_2 糖蛋白 I(β_2 glycoprotein I, β_2 GPI)又称载脂蛋白 H,是由 326 个氨基酸组成的相对分子质量约为 50×10^3 g/mol 的血浆单链糖蛋白, β_2 GPI 具有抗凝血功能,可以抑制血小板凝血酶原活性、抑制二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集过程及血管性血友病因子 vWF(Von Willebrand factor)依赖的血小板的黏附和聚集^[3]。研究表明其在单核细胞激活与血栓形成过程中扮演重要角色。 β_2 GPI 是抗磷脂抗体(Antiphospholipid antibodies, APL)的主要靶抗原,抗磷脂抗体通过中和 β_2 GPI 的抗凝作用引起血栓形成^[4]。 β_2 GPI 与其抗体(APL)形成抗原抗体复合物刺激单核细胞,使单核细胞被激活^[5]。激活的单核细胞会表达组织因子(tissue factor, TF)^[6-8]和促炎症细胞因子 TNF- α ^[9]。具有功能活性的 TF 是由 263 个氨基酸组成的贯穿于细胞膜的单链糖蛋白,是一种高亲和力的受体。它与因子 VIa 结合形成复合体因子 VIIa/TF,从而剪切因子 X 和 IX 形成因子 Xa 和 IXa,因子 Xa 再与因子 Va 形成复合体酶,将凝血素剪切加工成凝血酶,导致凝血^[10],从而引起血栓。

因此,高质量和高纯度单核细胞的获取及其炎症激活模型的构建对炎症反应及血栓形成的分子机制研究显得尤其重要。本研究对单核细胞分离及单核细胞炎症激活等实验进行了技术改良,为后期研究炎症反应及血栓形成的分子机制奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 样本来源

本研究样本来自武汉大学中南医院及武汉市中心血站获得的 10 名健康人血样,通过真空负压

静脉采血法采取血样。

1.2 PBMC 的分离

取 10 mL 全血分装到 50 mL 离心管中,常温下 1 000 r/min 离心 10 min,去上清,然后向离心管内加入 PBS 稀释至 35 mL,充分混匀。将 15 mL 淋巴细胞分离液(Ficoll,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)缓慢加入稀释后的全血中,1 800 r/min 离心 30 min,小心吸取含有 PBMC 的白膜层至新的离心管中,加 PBS 至 50 mL,1 400 r/min 离心 10 min。弃上清,用 20 mL 红细胞裂解液(C3702,碧云天)裂解红细胞,1 100 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 10 mL 重悬细胞沉淀,1 300 r/min 离心 10 min,弃上清;加 2 mL PBS 重悬 PBMC,取 20 μ L 细胞悬液用 Countess II 细胞计数仪(赛默飞世尔科技公司)进行细胞计数。

1.3 单核细胞的分离

将 PBMC 细胞悬液计数,离心,每 1.0×10^7 个细胞沉淀重悬至 50 μ L 缓冲液中,吹打均匀,再向 1.0×10^7 个细胞的悬液中加入 20 μ L CD14 免疫磁珠(130-050-201,德国美天旎生物公司),混匀后于 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。加 2 mL 缓冲液洗涤细胞,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清,用 500 μ L PBS 重悬细胞。将 MACS 分选柱(德国美天旎生物公司)置于 MiniMACS 分选器(德国美天旎生物公司)中,加入重悬细胞液穿流过柱子,然后加 3 次 3 mL(共 9 mL)缓冲液 PBS 继续穿流过柱子,流穿液即为单核细胞悬液;1 500 r/min 离心流穿液 10 min,收集细胞,PBS 重悬备用。

1.4 单核细胞的得率及纯度检测

取 20 μ L 单核细胞液,按不同颗粒直径用细胞计数仪分类计数,计算单核细胞得率。镜下观察细胞形态,流式细胞仪检测单核细胞的纯度。

1.5 β_2 GPI 的制备

1.5.1 β_2 GPI 的纯化

100 mL 血浆中加入 2.5 mL 2% NaN_3 和 2.5 mL 70% HClO_4 ,4 $^{\circ}$ C 环境下搅拌 30 min,然后在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 30 min,取上清;在上清液中加入饱和 Na_2CO_3 溶液调节 pH 至 8.0,然后将溶液转移至透析袋中,用平衡液(0.02 mol/L Tris-HCl,0.03 mol/L NaCl,pH 8.0)4 $^{\circ}$ C 透析过夜,以 2~3 mL/min 的流速将透析处理的溶液注入肝素预装柱(R005,近岸蛋白质科技有限公司)中,收集流穿液备用;使用 5~10 倍柱体积的平衡液洗涤柱子,然后使用洗脱液(0.02 mol/L Tris-HCl,0.15 mol/L NaCl,pH 8.0)洗脱蛋白,每 1 mL 单独收集,备用。

1.5.2 β_2 GPI纯化液的蛋白质浓度测定

用洗脱液稀释蛋白标准品,使用BCA蛋白质定量试剂盒(PA115,天根生化科技有限公司)测定各管 β_2 GPI蛋白液在570 nm处的吸光度,绘制标准曲线,X轴为蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$),Y轴为吸光值,计算各样品的蛋白质浓度。

1.5.3 β_2 GPI纯度的鉴定

取各管 β_2 GPI纯化液10 μL 进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色观察各样品所含条带情况。

取各管 β_2 GPI纯化液各约1 μg 蛋白进行Western Blot检测,1:1 000稀释的APOH Rabbit Polyclonal Antibody(A1220,Abclonal)室温孵育1 h,漂洗后加入1:10 000稀释的HRP Goat Anti-Rabbit IgG(AS014,Abclonal)室温孵育1 h,漂洗后显影,观察条带。

1.6 单核细胞激活模型的构建

将分离获得的单核细胞分为5组:组1为健康人单核细胞,加入PBS作为空白对照;组2是健康人单核细胞加入R-IgG和 β_2 GPI作为阴性对照组,组3是加入anti- β_2 GPI和BSA溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)作为阴性对照组;组4为健康人单核细胞加入anti- β_2 GPI和 β_2 GPI(10 $\mu\text{g/mL}$)构建APL激活单核细胞的模型;组5是加入LPS(10 $\mu\text{g/mL}$)激活单核细胞作为阳性对照组。各组单核细胞在处理前先用低浓度血清培养基(2% FBS)培养16 h,进行相应处理后继续培养2~6 h。荧光定量PCR测定各组样品中TF、TNF- α 的mRNA表达水平。

1.7 荧光定量PCR检测

3 000 r/min离心5 min收集细胞,加入1 mL TRIzol Reagent(15596026, Invitrogen),按常规方法提取RNA,20 μL DEPC(diethylpyrocarbonate)水溶解。使用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(RR047A,宝生物工程有限公司)合成cDNA,使用SYBR Green Realtime PCR Master Mix(QPK-201,东洋纺生物科技有限公司)进行QPCR。

2 结果与分析

2.1 单核细胞的原代分离纯化

2.1.1 PBMC的分离及含量

为了验证本研究使用的PBMC分离方法的稳定性,我们使用不同体积的全血进行PBMC分离,使用细胞计数仪分别计数分离获得的PBMC总量和每毫升血中PBMC含量,实验结果如表1所示。通常人全血中PBMC含量约为每毫升 1×10^6 个,本

实验结果显示,10个样本中PBMC的提取量多数约为每毫升 $0.6 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 个,说明本实验分离的PBMC的得率比较高,且具有很好的稳定性。

表1 人外周血单个核细胞得率

Table 1 Rate of PBMC recovery from human peripheral blood

编号	血液采集量/mL	总PBMC收获量/个	每毫升PBMC得率/个
1	10	5.90×10^6	0.59×10^6
2	60	27.05×10^6	0.46×10^6
3	180	120.36×10^6	0.67×10^6
4	150	86.15×10^6	0.57×10^6
5	10	7.75×10^6	0.78×10^6
6	180	165.34×10^6	0.92×10^6
7	120	102.56×10^6	0.85×10^6
8	120	47.29×10^6	0.40×10^6
9	150	143.08×10^6	0.95×10^6
10	120	119.18×10^6	0.99×10^6

2.1.2 单核细胞的得率分析

利用细胞计数仪检测免疫磁珠分选后的单核细胞总含量与每毫升外周血中单核细胞含量,其结果如表2所示。PBMC包括淋巴细胞(T、B、NK)、单核细胞与树突状细胞,在人体中这些细胞所占的比例因人而异。在多数研究当中,淋巴细胞约占PBMC的70%~90%,单核细胞约占10%~30%,树突状细胞非常少,约占1%~2%^[11]。表2的结果显示,使用本研究的分离方法,分离出的单核细胞数量约为每毫升 0.2×10^6 个左右,monocytes在PBMC中所占比例为12%~39%,且大多数都接近30%。说明使用本研究改进的提取方法提取单核细胞的得率非常高。

2.1.3 单核细胞的纯度检测

本实验对提取的PBMC细胞按照颗粒直径大小进行计数,对直径在6~10 μm 、7~10 μm 和8~10 μm 的细胞分别计数。因为淋巴细胞的直径在6.2~7.8 μm ,而单核细胞的直径在7.7~10 μm ,所以直径6~10 μm 的细胞总数代表了全部PBMC的总量,而直径8~10 μm 的细胞总数则基本代表了单核细胞的总量。PBMC群体中测得的二者的比值就代表了单核细胞的含量;而单核细胞群体中测得的二者的比值就代表了单核细胞的纯度。

由实验推算,二者的比值就是单核细胞的大约纯度。经过流式细胞仪检测,每个样品所提取的单核细胞纯度与根据上面方法推算出来的细胞纯度基本一致,说明本方法是合理可行的(表3)。

表2 人外周血单核细胞得率
Table 2 Rate of monocyte recovery from human peripheral blood

编号	血液采集量/mL	单核细胞总收获量/个	每毫升单核细胞得率/个	单核细胞与PBMC比值/%
1	10	1.7×10^6	0.17×10^6	29
2	60	8.12×10^6	0.14×10^6	30
3	180	33.21×10^6	0.18×10^6	28
4	150	18.07×10^6	0.12×10^6	21
5	10	0.92×10^6	0.09×10^6	12
6	180	40.26×10^6	0.22×10^6	24
7	120	16.23×10^6	0.14×10^6	16
8	120	13.86×10^6	0.12×10^6	29
9	150	33.4×10^6	0.22×10^6	23
10	120	46.4×10^6	0.39×10^6	39

使用倒置显微镜对分离的单核细胞进行观察,如图1所示,在400倍、100倍和50倍的放大倍数下,细胞的背景很干净,说明细胞的纯度比较高,而且细胞很亮,生存状态好,说明其活性很好。上述结果表

明,通过从全血中分离PBMC,再用免疫磁珠法从PBMC中分选出单核细胞,我们得到了高纯度和高得率的单核细胞。

2.2 β_2 GPI制备结果分析

使用BCA蛋白质定量法对经肝素亲和柱亲和纯化的20份 β_2 GPI蛋白洗脱液的总蛋白浓度进行测定,根据标准品的吸光度绘制标准曲线,然后根据标准曲线计算出各样品的浓度,得出的各管样品蛋白浓度如表4。结果显示前10管样品的总蛋白质浓度较高,浓度均超过100 $\mu\text{g/mL}$,而后10管样品的浓度均较低,原因是肝素亲和柱亲和吸附的 β_2 GPI的量是固定的,而随着逐步洗脱,浓度依次减低。前10管样本中 β_2 GPI的量足以满足本实验对 β_2 GPI的需求。

取1~7号洗脱液样品进行SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色,结果显示流穿样品比上样样品在目的条带处少了一条(图2A),这是目标蛋白 β_2 GPI被肝素亲和柱亲和吸附后产生的效果,说明肝素亲和柱的亲合效果较好;1~7号 β_2 GPI洗脱液中目标

表3 单核细胞的纯度检测
Table 3 Purity test of monocyte

编号	起始血量/mL	PBMC/ $\times 10^6$ 个				单核细胞/ $\times 10^6$ 个				计算纯度/%	流式纯度/%
		PBMC总量	细胞直径6~10 μm	细胞直径7~10 μm	细胞直径8~10 μm	单核细胞总量	细胞直径6~10 μm	细胞直径7~10 μm	细胞直径8~10 μm		
1	10	5.90	0.59	0.50	0.29	1.70	0.24	0.22	0.20	83	88
2	60	27.05	2.71	2.20	1.00	8.12	1.03	0.94	0.81	78	70
3	180	120.36	6.02	5.03	2.35	33.21	4.33	3.8	3.32	77	81
4	150	86.15	8.62	7.45	3.72	18.07	2.11	1.96	1.81	86	80
5	10	7.75	0.66	0.52	0.22	0.92	0.11	0.09	0.09	83	86
6	180	165.35	8.27	7.24	3.89	40.26	4.42	4.31	4.03	91	88
7	120	102.56	5.13	4.14	1.94	16.23	2.23	1.86	1.62	73	82
8	120	47.29	2.06	1.67	1.06	13.86	1.66	1.50	1.39	83	76
9	150	143.08	7.15	6.30	3.30	33.40	4.34	3.79	3.34	77	81
10	120	119.19	5.96	5.53	3.47	46.40	5.16	4.97	4.64	90	84

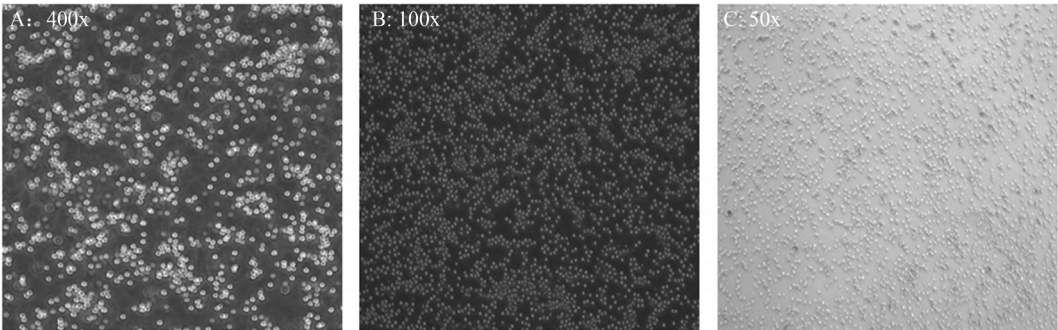


图1 单核细胞原代分离照片
Fig. 1 Photographs of primary isolation of monocytes

表4 亲和纯化的各β₂GPI蛋白样品浓度
Table 4 Concentration of each affinity-purified β₂GPI protein

编号		浓度	编号		浓度	编号		浓度	编号		浓度
		μg/mL			μg/mL			μg/mL			μg/mL
1	107		6	140		11	47		16	7	
2	155		7	137		12	24		17	5	
3	164		8	96		13	31		18	3	
4	163		9	113		14	25		19	11	
5	174		10	110		15	4		20	12	

蛋白条带染色深且其他非特异性条带很弱,说明β₂GPI蛋白得到了很好的富集,且洗脱液中其他蛋白含量较少,β₂GPI的纯度较高。图2B显示,以β₂GPI标准品为对照,使用β₂GPI抗体进行wb检测,在各样品上样总蛋白为1 μg的情况下,1~7号洗脱液样品条带比β₂GPI标准品略有减弱,说明1~7号洗脱液样品中β₂GPI的纯度较高。

2.3 单核细胞激活模型 TF 与 TNF-α 含量测定分析

荧光定量PCR结果如图3所示,anti-β₂GPI/β₂GPI处理组TF和TNF-α的mRNA表达量比其他对照组表达量要高,并具有统计学意义。可以看出在被anti-β₂GPI/β₂GPI复合物激活情况下,单核细胞的TF和TNF-α的表达量明显升高。有研究指出Anti-β₂GPI单克隆抗体起源于APS病人的外周血B细胞,它以一种β₂GPI依赖的方式提高了单核细胞TF的活性和TF表达水平^[12]。Sorice等^[13]通过分离单核细胞质膜的脂筏发现,Anti-β₂GPI/β₂GPI复合体与A2和TLR4在脂筏中相互作用,然后启动IRAK磷酸化与NF-κB入核,导致炎症因子TNF-α和TF的表达和释放。所以β₂GPI通过与其抗体形成复合物刺激单核细胞激活,促使单核细胞高表达组织因子TF和促炎细胞因子TNF-α,引起凝血和多种病理损伤,从而介导创伤后细胞炎症反应,参与炎症发生^[14]。

3 讨 论

目前从人体外周血分离单核细胞的方法有很多,如加速红细胞沉降法、细胞分离液不连续密度梯度分离法、贴壁法、流式分选法、免疫磁珠法、基于Fab的无痕亲和细胞选择(TACS®)技术、Colotta法、FicollHypaque密度分离法和密度梯度离心法等,各方法都有其优缺点。如在Ficoll-Hypaque密度分离法中,首先是以1~5倍不等体积的Hank's液或PBS液将肝素抗凝血稀释,然后将其叠加于

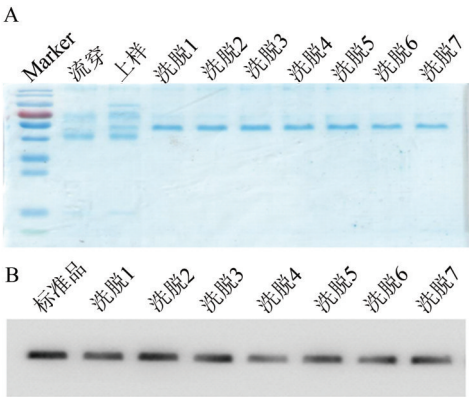


图2 β₂GPI蛋白的纯度检测
Fig. 2 Purity test of β₂GPI

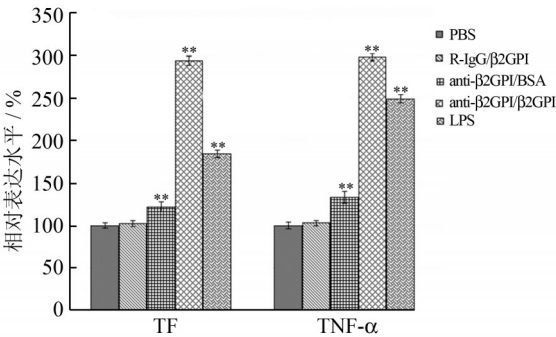


图3 TF与TNF-α mRNA表达水平
Fig. 3 Expression levels of TF and TNF-α mRNA

LTS1077 分层液上($V_{\text{稀释血液}}:V_{\text{血液}}$ 为1:1~4:1),离心后获得单个核细胞PBMC,再通过洗涤、贴壁6~12 h后得到单核细胞,该法所需稀释液及分层液较多,离心液体量较大,且分离出的细胞层次也不太理想^[11,12]。贴壁法获得的单核细胞虽耗时间短,成本低,但其单核细胞的纯度和得率较低,因此其可应用于实验研究的预试阶段^[15]。开展对细胞纯度要求较高的实验时,可以选用免疫磁珠法或流式分选法,但流式分选法获得的细胞得率较低,耗费时间长,成本高,并且需要专门的技术人员操作,过程复杂^[15]。基于Fab的无痕亲和细胞选择(TACS®)技术是一种相对较新的阳性选择技术,它使用基于CD特异性低亲和力Fab片段的免疫亲和层析来可逆地捕获和释放靶细胞,虽也可以获得高纯度高得率的单核细胞,但其更适合于研究功能参数,其在准备单核细胞和进行单核细胞衍生的DC功能分析方面起着重要作用^[16]。

本实验采用PBMC分离结合免疫磁珠分选获得高纯度、高得率的单核细胞,并通过得到的单核细胞构建单核细胞炎症激活模型。通过多次离心洗涤与Ficoll、RBC裂解液共同作用下,能去除绝大多数血小板、红细胞等成分,得到纯度非常高的单个核细

胞 PBMC, 为后面单核细胞的分离打下了良好的基础。

在单核细胞纯度鉴定方面, 本研究按照不同颗粒尺寸大小对细胞进行分类计数, 进而通过单核细胞群体中测得的 $8\sim 10\ \mu\text{m}$ 和 $6\sim 10\ \mu\text{m}$ 数值的比值计算单核细胞的纯度。其结果与流式细胞仪检测的结果相近, 这大大地减少了单核细胞原代分离纯化的步骤, 节约了时间和实验周期。

利用与磁珠偶联的抗体去标记细胞, 然后放入磁场中过柱子进行分选获得单核细胞。图 1 可以明显看出图中背景清晰干净, 表明分离过程中去除了绝大多数淋巴细胞、红细胞、血小板等物质, 单核细胞的纯度非常高, 且在背景中细胞非常亮, 也说明了此法分离获得的单核细胞活性好, 此方法对细胞的刺激比较小。

表 2 中分离出的单核细胞数目基本上在每毫升 0.2×10^6 个左右, 在 PBMC 中的含量也接近 30%, 得率非常高。目前在研究中免疫磁珠和流式分选算得上比较好的两种单核细胞分离方法, 准确来说流式分选的纯度更高一些, 但流式一般都是电荷式分选。首先要经过几十微米的喷嘴, 然后被充电, 还要经过几千伏的电场, 最后几十米每秒的速度落到收集管里, 这种情况下有些原代细胞的活性大大受损, 而且分选免疫细胞也要考虑细胞活化的影响。而免疫磁珠只需通过磁场过柱子就行, 对细胞的刺激很小, 相对来说更好一点。流式分选对成本和操作员的要求也比较高, 相对来说免疫磁珠更适合大众。因此, 免疫磁珠法是最理想的分离方法。

有研究发现, 患者体内抗磷脂抗体持续阳性, 其中最主要的致病性抗体是针对 $\beta_2\text{GPI}$ 的抗体^[17], 该抗体或与其与抗原结合的免疫复合体能介导单核细胞表达 TF, 而 $\text{TNF-}\alpha$ 介导 anti- $\beta_2\text{GPI}$ 诱导组织因子产生的过程, 这说明 TF 和 $\text{TNF-}\alpha$ 在 APS 发病机制中具有重要作用^[18]。本研究通过原代分离单核细胞, 血浆纯化 $\beta_2\text{GPI}$, 考马斯亮蓝染色和 Western Blot 鉴定, 酶标仪定量检测来获得定量的纯化 $\beta_2\text{GPI}$, 以此来构建单核细胞炎症激活模型。图 3 中在有 anti- $\beta_2\text{GPI}/\beta_2\text{GPI}$ 复合物处理的情况下 TF 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的 mRNA 表达量为对照组的近 3 倍, 表明在被 anti- $\beta_2\text{GPI}/\beta_2\text{GPI}$ 复合物激活情况下, 单核细胞的 TF 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达量明显升高。许多研究表明 TF 和 $\text{TNF-}\alpha$ 在炎症反应中具有重要作用, 说明单核细胞激活模型构建成功。这一模型的构建为抗磷脂综合征 (antiphospholipid syndrome, APS) 的研究在细胞水平提供了疾病模型, 为阐明

APS 的发病机制和药物的研发提供可能, 从而指导临床用药。

目前许多研究揭示 $\beta_2\text{GPI}$ 及其抗体复合物激活单核细胞, 在炎症反应中发挥作用, 然而, $\beta_2\text{GPI}$ 及其抗体是通过何种通路引发这些因子的表达尚未有明确统一的定论。本文对单核细胞分离及单核细胞炎症激活等实验进行了技术改良, 为后期研究炎症反应及血栓形成的分子机制奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 丛林, 廖勇, 杨蓉娅, 等. 重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对人 THP-1 单核细胞抗阿萨希毛孢子菌活性增强作用的研究[J]. 实用皮肤病学杂志, 2017, 10(4): 205-208, 211.
Cong L, Liao Y, Yang R Y, *et al.* Effects of GM-CSF on the activities of human monocyte-like THP-1 cells against *T. asahii* infection [J]. J Pract Dermatol, 2017, 10(4): 205-208, 211.
- [2] 陈柄全, 彭漪, 肖轶, 等. 间充质干细胞调控单核细胞/巨噬细胞介导炎症反应的研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(1): 6-11.
Chen B Q, Peng Y, Xiao Y, *et al.* Research progress in regulation of monocytes/macrophages mediated inflammatory response by mesenchymal stem cells [J]. Med Recapitul, 2019, 25(1): 6-11.
- [3] Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, *et al.* Involvement of beta2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages [J]. Clin Exp Immunol, 1997, 107(3): 569-573.
- [4] Kajiwarra T, Yasuda T, Matsuura E. Intracellular trafficking of beta2-glycoprotein I complexes with lipid vesicles in macrophages: implications on the development of antiphospholipid syndrome [J]. J Autoimmun, 2007, 29(2/3): 164-173.
- [5] Cines D B, Pollak E S, Buck C A, *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. Blood, 1998, 91(10): 3527-3561.
- [6] Cuadrado M J, López-Pedrerá C, Khamashta M A, *et al.* Thrombosis in primary antiphospholipid syndrome: a pivotal role for monocyte tissue factor expression [J]. Arthritis Rheum, 1997, 40(5): 834-841.
- [7] Dobado-Berrios P M, López-Pedrerá C, Velasco F, *et al.* Increased levels of tissue factor mRNA in mononuclear blood cells of patients with primary antiphospholipid syndrome [J]. Thromb Haemost, 1999, 82(6): 1578-1582.
- [8] Dobado-Berrios P M, López-Pedrerá C, Velasco F, *et*

- al.* The role of tissue factor in the antiphospholipid syndrome [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(11): 2467-2476.
- [9] Giannakopoulos B, Passam F, Rahgozar S, *et al.* Current concepts on the pathogenesis of the antiphospholipid syndrome [J]. *Blood*, 2007, 109(2): 422-430.
- [10] Wolberg A S, Roubey R A. Mechanisms of autoantibody - induced monocyte tissue factor expression [J]. *Thromb Res*, 2004, 114(5/6): 391-396.
- [11] Katagiri K, Itami S, Hatano Y, *et al.* Increased levels of IL-13 mRNA, but not IL-4 mRNA, are found *in vivo* in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with atopic dermatitis (AD) [J]. *Clin Exp Immunol*, 1997, 108(2): 289-294.
- [12] Amengual O, Atsumi T, Khamashta M A, *et al.* The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 1998, 79(2): 276-281.
- [13] Sorice M, Longo A, Capozzi A, *et al.* Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(8): 2687-2697.
- [14] 田中秋, 邓立普. TNF- α 、IL-6在全身炎症反应综合征表达的研究进展[J]. *蛇志*, 2008, 20(4): 275-278.
- Tian Z Q, Deng L P. Investigated progress of Expression of tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-6(IL-6) in systemic inflammatory response syndrome (SIRS) [J]. *Snake*, 2008, 20(4): 275-278.
- [15] 陈丹, 王小东, 童静植, 等. 三种分离人外周血单核细胞方法的比较[J]. *天津医科大学学报*, 2014, 20(6): 483-485.
- Chen D, Wang X D, Tong J Z, *et al.* Comparison of three methods of separating human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Journal of Tianjin Medical University*, 2014, 20(6): 483-485.
- [16] Ronald W, Wilhelm G, Franziska L, *et al.* A comparative study of two separation methods to isolate monocytes [J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(2): 234-241.
- [17] De Groot P G, Urbanus R T. The significance of autoantibodies against β_2 -glycoprotein I [J]. *Blood*, 2012, 120(2): 266-274.
- [18] Hollerbach A, Müller-Calleja N, Canisius A, *et al.* Induction of tissue factor expression by anti- β_2 -glycoprotein I is mediated by tumor necrosis factor α [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2020, 49(2): 228-234.

□

(编辑:张丽红)