

# Effect of Airway Smooth Muscle Progenitor Cells in Different Peripheral Blood Preparation by Flow Cytometry

Meiyan Lv<sup>1</sup>, Yanfeng Ying<sup>2</sup>, Juan Du<sup>1\*</sup>, Rongrong Hu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The First People's Hospital of Yongkang, Yongkang Zhejiang

<sup>2</sup>Jinhua Polytechnic College, Jinhua Zhejiang

<sup>3</sup>Yongkang Xicheng Street Community Health Service Center, Yongkang Zhejiang

Email: lv8198739@126.com, \*ykdujuan@126.com

Received: Aug. 14<sup>th</sup>, 2017; accepted: Aug. 29<sup>th</sup>, 2017; published: Sep. 6<sup>th</sup>, 2017

## Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of flow cytometry in lysis of whole blood and isolation of mononuclear cell method on the detection of peripheral blood airway smooth muscle progenitor cells. **Methods:** Peripheral blood samples were synchronously collected from 30 healthy children, 16 males and 14 females with an average age of  $3.1 \pm 1.1$  years. They were divided into two groups: Lysis of whole blood and isolation of mononuclear cell method, which 1 - 2 ml peripheral blood were collected in lysis of whole blood and 5 ml in isolation of mononuclear cell method. The results of flow cytometry were used to determine the content of CD14 and CD105 double positive cells in peripheral blood (airway smooth muscle progenitor cells, SPCs). **Results:** CD14 and CD105 double positive cells were  $12.76\% \pm 4.77\%$  in lysis of whole blood by flow cytometry and  $14.33\% \pm 6.45\%$  in isolation of mononuclear cell method. There was no significant difference. **Conclusion:** Lysis of whole blood for direct determination of peripheral blood CD14 and CD105 double positive cells can be recommended for clinical use. Because it is simpler and less quantity of samples, and the results were not significantly different from isolation of mononuclear cell method.

## Keywords

Smooth Muscle Progenitor Cells, Airway Remodeling, Flow Cytometry

# 外周血不同制备法对流式细胞仪测定气道平滑肌祖细胞的影响

吕美艳<sup>1</sup>, 应延凤<sup>2</sup>, 杜娟<sup>1\*</sup>, 胡融融<sup>3</sup>

\*通讯作者。

<sup>1</sup>永康市第一人民医院, 浙江 永康

<sup>2</sup>金华职业技术学院, 浙江 金华

<sup>3</sup>永康市西城街道社区卫生服务中心, 浙江 永康

Email: lv8198739@126.com, ykdujuan@126.com

收稿日期: 2017年8月14日; 录用日期: 2017年8月29日; 发布日期: 2017年9月6日

## 摘要

**目的:** 探讨流式细胞术中的裂解全血法和分离单个核细胞法对检测外周血气道平滑肌祖细胞实验结果的影响。**方法:** 同步采集30例正常健康儿童外周血, 男16例, 女14例, 平均年龄 $3.1 \pm 1.1$ 岁, 分为裂解全血法和分离单个核细胞法二组进行制备, 其中裂解全血法取血1~2 ml和分离单个核细胞法取血5 ml, 评价其用流式细胞术测定血中CD14和CD105双阳性细胞即气道平滑肌祖细胞(smooth muscle progenitor cells, SPCs)的含量结果。**结果:** 裂解全血法和分离单个核细胞法经流式细胞仪分析CD14和CD105双阳性细胞含量结果分别为 $12.76\% \pm 4.77\%$ 和 $14.33\% \pm 6.45\%$ , 经统计学处理无显著性差异( $P > 0.01$ )。**结论:** 裂解全血法直接测定外周血CD14和CD105双阳性细胞含量简单易行, 且样本量少, 而结果与分离单个核细胞法相比并无显著差异, 可推荐临床使用。

## 关键词

平滑肌祖细胞, 气道重塑, 流式细胞术

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

在血管重构领域研究中发现外周血平滑肌祖细胞是能在体内分化为平滑肌细胞的前体细胞。而临床研究表明在婴幼儿哮喘早期有气道重塑现象, 与哮喘内气道平滑肌细胞增多和肥大有重要关联, 而这些增多的细胞可能来源于外周血中干细胞迁移植入[1]。本次实验中的方法学探讨旨在为后续研究婴幼儿哮喘患者外周血中平滑肌祖细胞(CD14, CD105 双阳性细胞)含量与正常婴幼儿间的差异选择最简便快速易行的实验方法。现将实验内容汇报如下。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

采集本院健康体检婴幼儿外周静脉血, 男 16 例, 女 14 例, 年龄 1~5 岁, 共 30 例, 平均年龄  $3.1 \pm 1.1$  岁。分别用肝素抗凝管取血 5 ml 和 EDTA-K2 抗凝管取血 1~2 ml, 肝素抗凝管组为分离单个核细胞法组, 和 EDTA-K2 抗凝管组为裂解全血法组。取血前征得家属同意。

### 2.2. 主要试剂和仪器

人外周血淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司), FITC-CD14 抗体、PE-CD105 抗

体(均为美国 BD 公司产品), FACS CantoII 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 分离单个核细胞法组

单个核细胞的提取: 肝素抗凝管取外周静脉血 5 ml, 加 PBS 5 ml 进行稀释, 按 1:1 的体积比缓慢叠加于外周血淋巴细胞分离液上, 保持界面清晰, 室温水平离心 400 g, 30 min 后, 吸取分离液与上层交界部位呈云雾状的灰白色层, 即为单个核细胞层, 吸取单个核细胞层加入 PBS 中制成悬液待用。制成的单细胞悬液分别加入荧光标记的单克隆抗体 PE-CD105、FITC-CD14、PE-CD105 和 FITC-CD14 管中。

### 2.3.2. 裂解全血法组

采集 1 ml 外周静脉血于 EDTA-K2 抗凝管中, 充分混匀, 全血分别加入荧光标记的单克隆抗体 PE-CD105、FITC-CD14、PE-CD105 和 FITC-CD14 管中。后续操作各平行管一致, 即: 将各管避光放置 30 min 后, 各管中加入 2 ml 溶血剂(1:10 稀释), 混匀, 避光放置 6~10 min; 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清; 各管加入 2 ml 鞘液洗涤, 混匀; 1500 rpm 离心 5 min, 弃上清; 加入 500 ul 鞘液后流式细胞仪检测分析。

## 3. 结果

### 3.1. 流式细胞仪测定结果

分离后测定组和直接测定组结果如图 1, 图 2。

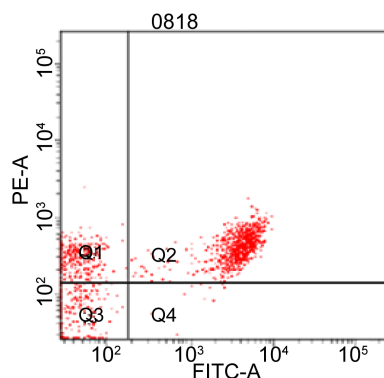


Figure 1. Isolation of mononuclear cell method

图 1. 分离后测定组结果

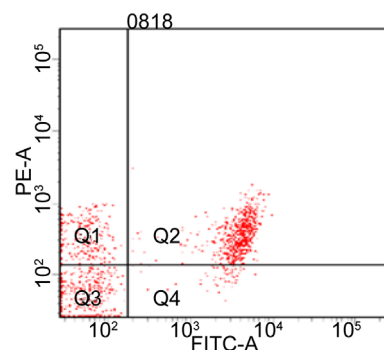


Figure 2. Lysis of whole blood

图 2. 直接测定组结果图

### 3.2. 30 例健康婴幼儿两组测定结果

如下表：分离单个核细胞法组与裂解全血法组结果比较

	例	年龄(Y)	CD14 + CD105 + (%)
分离单个核细胞法组	30	3.1 ± 1.1	14.33 ± 6.45*
裂解全血法组	30	3.1 ± 1.1	12.76 ± 4.77

t 检验, \* $P < 0.01$ , 两组间比较 t test, \* $P < 0.01$ , compared between two groups

## 4. 讨论

2002 年 Simper 等[2]在对人外周血单个核细胞培养过程中首次发现, 利用血小板源性生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)能促进其分化为表达平滑肌细胞特异性  $\alpha$ -肌动蛋白、调宁蛋白及平滑肌肌球蛋白重链阳性的平滑肌细胞, 提示人外周血单个核细胞存在能分化为平滑肌细胞的前体细胞。Sugiyama 等[3]在后续研究中对此类前体细胞进行筛选分析, 发现其主要为一群表达 CD14, CD105 双阳性的细胞, 即平滑肌祖细胞。而周学凯等[4]对成人外周血平滑肌祖细胞的体外培养研究中发现实验中培养到第 12 天的贴壁细胞 CD14 和 CD105 双阳性表达率达到(71.8 ± 7.2)%, 即大部分贴壁细胞为平滑肌祖细胞。

流式细胞仪能通过个体细胞荧光标记后快速定量分析, 荧光标记在一定波长的光下被激发, 发射出荧光脉冲信号, 细胞的数量与信号的强度成正比, 探测器收集仪器中的荧光信号, 通过计算机进行分析。所以样本中待测定细胞的含量是一个值得考虑的重要因素, 流式细胞仪测定的细胞阈值大约为  $1 \times 10^4$  细胞数/ml [5] [6], 在本研究中已发现全血 CD14 和 CD105 双阳性细胞表达率高于此水平, 而且表明分离单个核细胞法测定组为 14.33% ± 6.45%, 而裂解全血法测定也可以达到 12.76% ± 4.77%, 二组间并无显著性差异, 说明实际操作中可能可以简略分离单个核细胞步骤。同时许多文献表明, 用流式细胞仪测定 CD 分子对是否进行单个核细胞分离, 其结果并无显著性差异[7] [8] [9], 这可能与 CD 分子的表达主要与体外细胞培养后成熟有关, 所以本测定结果低于其它进行培养后测定结果。细胞培养要求较高, 耗时较长, 而裂解全血法测定可简化测定步骤, 减少样本量, 避免分离过程中产生的误差, 同时更接近体内实况, 临床更为实用。

我们的实验证明提取外周血单个核细胞后再进行测定 CD14 和 CD105 双阳性细胞的表达率和直接测定外周全血中双阳性细胞表达率无显著性差异。临床应用中, 利用裂解全血法测定可减少样本血量, 但应避免溶血和及时送检。用外周血裂解全血法测定有方便、快速、样本量小等优点, 而结果与分离单个核细胞法相比并无显著差异, 在临床中可推广应用。

## 参考文献 (References)

- [1] 赵智丽, 覃冬云. 支气管哮喘气道重塑平滑肌增生机制[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(20): 1553-1556.
- [2] Simper, D., Stalboerger, P.G., Panetta, C.J., et al. (2002) Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood. *Circulation*, **106**, 1199-1204. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000031525.61826.A8>
- [3] Sugiyama, S., Kugiyama, K., Nakamura, S., et al. (2006) Characterization of Smooth Muscle-Like Cells in Circulating Human Peripheral Blood. *Atherosclerosis*, **187**, 351-362. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.09.014>
- [4] 周学凯, 倪旭东, 李飞, 等. 成人外周血平滑肌祖细胞的体外培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(14): 2587-2591.
- [5] Craig, F.E. and Foon, K.A. (2008) Flow Cytometric Immunophenotyping for Hematologic Neoplasms. *Blood*, **111**, 3941-3967. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-120535>
- [6] Yu, H.K., Lee, H.J., Choi, H.N., et al. (2013) Characterization of CD45-/CD31+/CD105+ Circulating Cells in the Pe-

ripheral Blood of Patients with Gynecologic Malignancies. *Clinical Cancer Research*, **19**, 5340-5350.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3685>

- [7] 陶娟, 涂亚庭, 陈兴平, 等. 外周血不同制备法对检测两种性病者淋巴细胞免疫表型的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(5): 356-358.
- [8] 邓洪, 韩晓燕, 陈幼明, 等. 全血染色法和分离外周血单个核细胞染色的五聚体技术检测抗原特异性 CTL 的比较[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(5):4 77-479.
- [9] 周丽娜, 丁媛, 李黎, 等. 全血淋巴细胞流式细胞术精细免疫分型方法的建立[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(6): 523-552.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2330-1589, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>  
期刊邮箱: [jps@hanspub.org](mailto:jps@hanspub.org)