

本文引用: 刘圣, 王晨阳, 黄梦龄, 等. 从外周血分离单核细胞的不同方法及各自特点[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(9): 811-816. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2022.09.011.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-09-0811-06

· 文献综述 ·

从外周血分离单核细胞的不同方法及各自特点

刘圣¹, 王晨阳¹, 黄梦龄¹, 杨云潇², 张铭¹

(首都医科大学附属北京安贞医院 1. 冠心病中心, 2. 结构性心脏病外科中心, 北京市 100029)

[关键词] 单核细胞; 细胞分离; 外周血单个核细胞

[摘要] 单核细胞是机体重要的固有免疫细胞, 能吞噬并清除受伤和衰老的细胞及其碎片, 参与人体的免疫炎症反应。单核细胞能进一步分化为巨噬细胞和树突状细胞, 二者在建立有效的免疫应答中发挥着重要作用。单核细胞及巨噬细胞和树突状细胞被广泛应用在基础与临床医学的相关研究中。本文将介绍从外周血中分离单核细胞的几种不同方法, 并比较分析其优劣性, 帮助研究者选择合适的分离方法以高效地获得符合实验要求的单核细胞, 为后续研究奠定基础。

[中图分类号] R3;R5

[文献标识码] A

Different methods of isolating monocytes from peripheral blood and their characteristics

LIU Sheng¹, WANG Chenyang¹, HUANG Mengling¹, YANG Yunxiao², ZHANG Ming¹

(1. Center for Coronary Heart Disease, 2. Surgical Center of Structural Heart Disease, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] monocyte; cell isolation; peripheral blood mononuclear cell

[ABSTRACT] Monocytes are important innate immune cells of the body, which can phagocytose and remove injured and senescent cells and their fragments, and participate in the immune inflammatory response of the human body. Monocytes can further differentiate into macrophages and dendritic cells, both of which play an important role in establishing an effective immune response. Monocytes, macrophages and dendritic cells are widely used in related research in basic and clinical medicine. This article will introduce several different methods for isolating monocytes from peripheral blood, and compare and analyze their advantages and disadvantages, so as to help researchers choose a suitable separation method to efficiently obtain monocytes that meet the experimental requirements, and lay the foundation for subsequent research.

单核细胞是一种由骨髓髓样祖细胞分化而来的单个核吞噬细胞, 在骨髓中发育并释放到血液中, 停留 2~3 天后再次迁移到周围组织中^[1-2]。单核细胞是血液中最大的血细胞, 也是体积最大的白细胞, 占外周血白细胞数量的 3%~8%。单核细胞是机体固有免疫系统的一个重要组成部分, 能吞噬并清除受伤和衰老的细胞及其碎片, 参与人体的免疫炎症反应^[3]。此外单核细胞还可以继续分化为巨噬细胞和树突状细胞^[1]。单核细胞分化的巨噬细胞能够参与固有免疫反应、分泌细胞因子、清除多种病原体, 对建立有效的免疫应答具有重要作用

用^[4-5]。而单核细胞分化的树突状细胞具有强大的抗原提呈功能, 能够启动和调节适应性免疫应答, 是感染及肿瘤免疫领域的重要研究对象^[6-7]。单核细胞及其分化而来的巨噬细胞和树突状细胞广泛参与动脉粥样硬化等慢性炎症疾病以及多种肿瘤和免疫性疾病的形成过程^[8-9]。当前, 大量的基础与临床医学的相关研究(如对动脉粥样硬化、肿瘤免疫等的相关研究)都需要用到单核细胞^[10-11], 能快速高效地获得符合实验要求的单核细胞对这些研究十分重要。本文将介绍从外周血中分离单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)并

[收稿日期] 2021-12-03

[修回日期] 2022-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82170453)

[作者简介] 刘圣, 硕士研究生, 研究方向为固有免疫系统与动脉粥样硬化的形成机制, E-mail: jychmsn@live.com。通信作者张铭, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为冠心病的形成机制与治疗基础, E-mail: zhangming2279@hotmail.com。

进一步提取单核细胞的几种不同的方法,并进行比较,分析其各自的优缺点,帮助研究者选择合适的分离方法。

1 外周血中分离 PBMC

通常分离外周血单核细胞始于分离 PBMC,再进一步从 PBMC 中提取出单核细胞^[12]。PBMC 是指外周血中具有单个核的细胞,主要包括淋巴细胞和单核细胞^[13]。聚蔗糖-泛影葡胺(Ficoll-Hypaque)密度梯度离心法,因其价格相对低廉且操作简便,成为目前实验室中从外周血分离 PBMC 的主要方法^[14]。除了能从外周血中分离出 PBMC 外,该方法同样适用于从外周血浓缩白细胞以及外周血富集白细胞层(白膜)中分离 PBMC^[15-16]。PBMC 的密度与血液中的其他组分不同,因此可以利用一种密度介于 1.076 ~ 1.090 kg/L 之间、近于等渗的溶液(分层液)进行密度梯度离心,可使不同类别的血细胞按其相应密度分布,从而被分离^[17]。最常用的分层液为聚蔗糖和泛影葡胺混合而成的比重为(1.077 ± 0.001)kg/L 的溶液。用等体积的不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)或生理盐水稀释抗凝血后,将稀释过的抗凝血缓慢平铺到等体积的分层液上方,500 ~ 1 000 g 离心力离心 20 ~ 30 min(血液的体积越大,所需的离心力越大,离心时间越长;离心力最大不超过 1 200 g)。离心后将出现明显的分层:最上层是稀释的血浆层,中间是透明的分层液层,血浆与分离液之间的白膜层即为单个核细胞层,离心管底部是红细胞与粒细胞^[18]。吸取单个核细胞层,并用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 或生理盐水洗涤 3 次后,重悬于培养基中便可得到 PBMC 悬液。通过此方法,1 mL 外周血可分离约 1 × 10⁶ 个 PBMC,单个核细胞的纯度可达 90%,细胞得率达 80%,细胞活性达 95%^[19-20]。

2 PBMC 中分离单核细胞

通过 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离得到的 PBMC 悬液,主要包含淋巴细胞与单核细胞,且淋巴细胞占大多数^[21],此外还含有少量其他细胞(内皮祖细胞、干细胞等),想要得到高纯度的单核细胞,还需要进一步分离纯化。

2.1 贴壁法

贴壁法主要是利用单核细胞与其他细胞在体外培养时的贴壁差异来分离单核细胞。体外培养

时,单核细胞通常在 2 ~ 4 h 内贴壁,且贴壁较为牢固;内皮、内皮祖细胞、干细胞在 10 ~ 24 h 内贴壁;而淋巴细胞贴壁能力较差,通常不贴壁,呈悬浮生长^[22]。利用此特性可以粗略地从 PBMC 中分离出单核细胞。将分离出的 PBMC 以(1.5 × 10⁹) ~ (3 × 10⁹)个/L 置于含有 RPMI 1640 培养基的培养皿中,于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行贴壁培养 2 ~ 4 h,待单核细胞贴壁后,吸弃上层悬浮细胞,并用 PBS 轻轻洗涤 3 遍,便可得到贴壁的单核细胞^[23]。通过此法分离单核细胞,操作十分简便,对实验人员技术水平和实验设备要求较低,且具有耗时短、花费少及细胞活性高的优点,是十分常用的单核细胞分离方法。但是,通过此法获得的单核细胞纯度较低,往往还含有大量的淋巴细胞;有研究指出在对细胞进行 4 次洗涤后,剩下的细胞中仍然有 25% 是淋巴细胞^[24];同时,所得单核细胞的纯度波动范围也较大,这可能与 PBMC 中单核细胞的百分比、贴壁 PBMC 数量、洗涤次数、洗涤强度和贴壁时间有关^[25];此外,单核细胞的得率也较低,每获得 1 × 10⁶ 个单核细胞便需要约 2 × 10⁷ 个 PBMC,细胞利用率较低^[15]。

2.2 冷聚集法

单核细胞在 4 °C 时会在试管中自发地快速聚集,可利用此特性对单核细胞进行分离,称为冷聚集^[26]。将单核细胞重悬于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,将悬液置于 4 °C 下孵育 30 min,并持续搅拌,低温下单核细胞便会自发地聚集、沉淀。收集沉淀下来的细胞,并再次重悬于培养基中,按同样的方法进行第 2 轮冷聚集。两轮冷聚集后,将沉降的细胞重悬于新的培养基中,便可以得到单核细胞悬液,供后续研究使用。此方法也是一种简单的分离方法,耗时短,成本低,对设备和技术要求较低,所得单核细胞活性高;但是,通过冷聚集分离出来的单核细胞纯度很低,有研究^[27]通过检测单核细胞表面标志 CD14 来评估此法分离单核细胞的效能,发现 CD14 阳性细胞仅占所获细胞的(16.1% ± 6.2%)。

2.3 Percoll 分层液法

Percoll 是经过聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒混悬液^[28],Percoll 不穿过生物膜,对细胞无毒害作用,广泛用于分离细胞、亚细胞成分、细菌及病毒,此外还可将受损细胞及其碎片与完好的活细胞分离^[29]。Percoll 混悬液的硅胶颗粒大小不一,经过高速离心后,可形成一个连续密度梯度,将比重不同的细胞分离纯化,且由于 Percoll 的扩散常数低,所形成的梯度十分稳定。通过配制特定密度的 Per-

coll 分层液可从 PBMC 中进一步分离出单核细胞^[30],单核细胞的最佳纯化是在高渗密度梯度上,密度界面在 1.066 ~ 1.074 g/mL 之间。分离单核细胞所用的 Percoll 分层液通常通过稀释 Percoll 原液 [密度(1.130±0.005) kg/L] 来配制,可按照相应的产品说明书采用不同的溶液来稀释配制,达到分离单核细胞所需密度即可。具体方法^[31]是在离心管中小心地将 3 mL 的 PBMC 悬浮液(含 $150 \times 10^6 \sim 200 \times 10^6$ 个细胞)铺在 10 mL 的 Percoll 分层液体上,以保持各层之间的界面。若实验时所用外周血量较少,分离的 PBMC 未达到 60×10^6 个时,可将 1 mL 的细胞悬液铺在 3 mL 的 Percoll 溶液上。随后将离心管以 580 g 离心力离心 15 min,并采用无制动停转(避免快速制动导致分层紊乱),单核细胞会富集在两层液面之间。收集界面上的细胞转移到新的离心管中,并加入 RPMI 1640 培养基重悬,然后以 350 g 离心力离心 7 min,去掉上清液后,将细胞重悬在 RPMI 1640 培养基中,便可得到富含单核细胞的混悬液。通过此方法分离的单核细胞,其纯度可达 75%^[31],在有的报道中,通过优化 Percoll 分层液密度、离心速度、离心时间、温度等参数,得到的单核细胞纯度甚至可达 90%^[25]。但是通过此方法提取单核细胞其纯度波动较大,有的研究采用此方法分离出的单核细胞其纯度仅为 60% 左右^[16],故最好由实验经验相对丰富的人员进行操作,并通过多次预实验不断优化参数,以提高所得单核细胞纯度。此外,此方法的细胞利用率相对较高,每得到 1×10^6 个单核细胞,消耗 PBMC 约 7×10^6 个,且细胞活性较好^[25],能维持正常的细胞功能,满足一般的实验要求,细胞利用率也相对较高。总体而言,此方法是一种实验流程较为简单、设备要求相对不高且能获得较高的单核细胞纯度和良好的细胞活性的单核细胞分离方法。

2.4 免疫磁珠分选法

免疫磁珠法分选细胞的原理是事先让偶联有超顺磁化微粒(磁珠)的特异性单克隆抗体与细胞表面的特异性抗原相结合,随后在外加磁场时,无该种表面抗原的细胞由于不能与偶联着磁珠的特异性单克隆抗体结合而不具有磁性,能顺利通过磁场,而具有该种表面抗原的细胞则能与之相结合并具有磁性,进而被吸附滞留在磁场中,从而使具有不同表面抗原的细胞得以分离^[32]。免疫磁珠分选细胞有两种方法^[33],一种是通过免疫磁珠标记所需细胞,直接得到目的细胞,称为阳性分选;另一种则是用免疫磁珠标记需要去除的细胞,间接地分离纯

化目的细胞,称为阴性分选。在采用免疫磁珠阳性分选单核细胞时^[34],先将抗 CD14 免疫磁珠加入 PBMC 中进行孵育,CD14 阳性的单核细胞会被免疫磁珠标记而具有磁性,然后将 PBMC 悬液加入到置于分选器上的分选柱中,未被磁珠标记的细胞会先行流出,而被免疫磁珠标记的 CD14 阳性单核细胞则会在分选器提供的磁场作用下吸附在分选柱上,随后再将分选柱从分选器上取下,冲洗出吸附在分选柱上的 CD14 阳性细胞。由于免疫磁珠分选可以较大限度地避免细胞活化,且不会影响细胞的光散射特性,所以无需解离磁珠,可以直接进行后续实验:如流式细胞仪分析、细胞培养、分子生物学研究等。采用免疫磁珠阴性分选单核细胞时^[27,35],则采用抗 CD2、抗 CD3、抗 CD19、抗 CD20 以及抗 CD56 的免疫磁珠标记 PBMC 悬液中所不需要的淋巴细胞及自然杀伤细胞,标记细胞会被吸附在分选柱上,而未被标记的单核细胞则能顺利通过分选柱,从而达到提纯单核细胞的目的。

采用免疫磁珠分选得到的单核细胞纯度极高,无论采用阳性分选还是阴性分选,所得单核细胞悬液中单核细胞纯度均能稳定在 90% 以上,而阳性分选纯度更高,在有的报道中采用阳性分选单核细胞纯度甚至能达到 99%^[36-37]。相较于阳性分选,采用免疫磁珠阴性分选得到单核细胞亚群更全面,而不只是 CD14 阳性单核细胞,并且可一定程度上降低单核细胞因与抗体结合而被活化的风险^[16]。但是,在分离得到的 PBMC 中单核细胞数量并不占优势,使用免疫磁珠阳性分选时仅需要标记占小部分的单核细胞即可,而采用免疫磁珠阴性分离时,则需要标记占大部分的淋巴细胞等,免疫磁珠用量增加,提高了实验成本。除了单核细胞纯度高以外,免疫磁珠分选单核细胞还有较为不错的细胞得率,每获得 1×10^6 个单核细胞仅需要约 9×10^6 个 PBMC。此外,免疫磁珠分选法还有操作简单、耗时短、细胞活性好等优点^[15],但是此方法需要购买免疫磁珠、分选柱以及分选器,实验成本相对较高。

2.5 流式细胞分选术

利用流式细胞术分离单核细胞时,可以通过异硫氰酸荧光素(FITC)-抗 CD14 特异性单克隆抗体标记 CD14 阳性单核细胞,然后将细胞通过流式细胞仪进行分选,根据 FITC-抗 CD14 抗体的荧光强度设置门控参数,收集 CD14 阳性单核细胞^[38]。通过此方法可以获得极高纯度的单核细胞,且细胞利用率较高,但是单核细胞也会在一定程度上因与抗体

结合而被激活,可能影响后续实验结果^[15]。除此之外,还可以通过流式细胞仪在不进行荧光抗体标记的情况下直接对单核细胞进行分选。由于单核细胞是体积最大的白细胞,其内容物的颗粒形状与淋巴细胞以及粒细胞等具有显著的差别,还可利用此特点直接对单核细胞进行流式分选,而无需抗体标记,从而简单快捷地获得纯度较高的单核细胞^[39]。陈媛等^[39]的研究显示,根据 PBMC 各个成分细胞的分群,确定单核细胞在流式细胞仪中的细胞大小以及细胞颗粒度等特征,以限定分选条件,随后根据所确定的分选条件通过流式细胞分群方式设置门控参数分离并获取单核细胞;该研究还通过单核细胞表面标志物 CD14 染色验证其效能,结果表明该方法分选出的单核细胞纯度能达到 85% 以上;同时,还对所分离出来的单核细胞进行了体外培养并诱导分化为巨噬细胞,证明了该方法分选得到的单核细胞能够正常培养与分化,可以用于进一步的实验研究。但通过该方法分选单核细胞需要昂贵的设备和专业技术人员的操作,实验步骤较为复杂,且耗时相对较长,实验成本相对较高^[16]。

2.6 以抗原结合片段为基础的无痕亲和细胞分选技术

以抗原结合片段(fragment of antigen binding, Fab)为基础的无痕亲和细胞分选技术(traceless affinity cell selection, Fab-TACS),是由 Strep-tag[®] / Strep-Tactin[®] 蛋白纯化技术^[40]发展而来的,运用免疫亲和和层析的原理,通过细胞表面特异抗原分子与 Fab 片段的特异性结合来捕捉和释放目标细胞。通过使用能与细胞可逆结合的低亲和力的 Fab 片段取代具有高亲和力的完整抗体,从而对样本进行温和的标准化分选,得到不含标记且未被活化的目标细胞。在分离单核细胞时,使用含有 Strep-tag[®] 的 Fab 片段标记单核细胞表面的 CD14 分子,并加入 Fab-TACS 重力柱内,重力柱中含有经 Strep-Tactin[®] 涂布的琼脂糖珠, Strep-tag[®] 能与琼脂糖珠表面的 Strep-Tactin[®] 结合,从而将 CD14 阳性单核细胞捕捉在琼脂糖珠表面,非目的细胞则会从重力柱中流出,再通过缓冲液清洗进一步洗去重力柱中的非目的细胞。最后,通过向重力柱中加入生物素中断 Strep-tag[®] 和 Strep-Tactin[®] 的结合。同时,低亲和力的 Fab 也会从目标细胞上解离,从而可以获得未被激活和不含有人为标记的单核细胞。此方法操作简单且耗时少,分离的单核细胞纯度甚至能达到 99%,并具有极高的细胞活性^[36],最重要的是 Fab-TACS 技术相较于其他的正向选择技术(如免疫磁

珠阳性分选、CD14 荧光标记流式细胞分选)而言,避免了完整抗体与受体相结合所导致的不必要的刺激和细胞活化,得到的单核细胞也不含有磁珠和荧光标记,有利于后续的对单核细胞质量要求极高的实验。但是目前此方法所用到的相关试剂和材料售价昂贵,实验成本极高,不适合对大量血液样本进行分离。

2.7 组合法

从 PBMC 中分离单核细胞并不局限于采用单一方法,有时可以根据需要,结合不同方法各自的优点,联合多种方法对单核细胞进行分离,从而满足实验需求。最常见的便是在采用 Percoll 分层液对单核细胞进行分离后再增加一个贴壁法纯化的步骤,将通过 Percoll 分层液法得到的单核细胞悬液加入培养皿中进行孵育,待单核细胞贴壁黏附后,吸去上清中的悬浮细胞,并用 PBS 进行洗涤,可以达到进一步纯化的目的,提高单核细胞纯度^[41]。这种组合方法操作十分简单,且基本不增加实验成本,十分实用。此外,还有学者将 Percoll 分层液法和免疫磁珠阴性分选相结合,在采用 Percoll 分层液法得到单核细胞悬液后,再通过免疫磁珠阴性分选去除残留的非目的细胞,最后得到的单核细胞纯度在 93% 左右^[16]。这种方法相较于单纯使用 Percoll 分层液法,极大的提高了单核细胞的纯度;而相较于单纯采用免疫磁珠阴性分选,由于已经经过一次 Percoll 分层液分选,非目的细胞已经只占小部分,标记非目的细胞只需要使用少量免疫磁珠即可,大幅减少了试剂用量,极大地降低了实验成本。

3 总 结

分离单核细胞有多种方法,且各具优劣,在实验时应根据对单核细胞要求进行选择。当对单核细胞纯度要求不高,比如进行一些预实验时,可以采用贴壁法、冷聚集法,操作简单且节约成本;当需要分离大量的具有一定纯度的单核细胞,且实验预算有限的情况下,可以采用 Percoll 分层液法结合贴壁法,所得的单核细胞能满足大多数的实验要求;如对单核细胞纯度有更高的要求,则可以选择流式细胞分选或者免疫磁珠分选;若是需要少量的极高纯度且具有极高功能活性的单核细胞,并且实验经费充足,Fab-TACS 正向分选是极佳的选择。总之,应根据具体实验中对单核细胞的需求,结合研究预算、实验设备等客观条件进行合理选择。

[参考文献]

- [1] JAKUBZICK C V, RANDOLPH G J, HENSON P M. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(6): 349-362.
- [2] 彭雪英, 武怀珠, 王敏杰, 等. 高脂血症、单核细胞亚型与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(9): 815-822.
- PENG X Y, WU H Z, WANG M J, et al. Hyperlipidemia, monocyte subtypes and atherosclerosis [J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(9): 815-822.
- [3] KRATOFIL R M, KUBES P, DENISET J F. Monocyte conversion during inflammation and injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(1): 35-42.
- [4] VAN DEN BOSSCHE J, O'NEILL L A, MENON D. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(6): 395-406.
- [5] 叶晓妙, 杭燕雯, 胡伟. 巨噬细胞在心肌梗死后的作用研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(10): 917-920.
- YE X M, HANG Y W, HU W. Research progress on the role of macrophages after myocardial infarction [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(10): 917-920.
- [6] WORBS T, HAMMERSCHMIDT S I, FÖRSTER R. Dendritic cell migration in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(1): 30-48.
- [7] 李倩, 李帆, 章超凡, 等. ox-LDL 促进树突状细胞 LOX-1 表达及炎症因子分泌 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 217-223.
- LI Q, LI F, ZHANG Y F, et al. Ox-LDL promotes the expression of LOX-1 and inflammatory cytokines secretion in dendritic cells [J]. *Chin J Arterioscler*, 2017, 25(3): 217-223.
- [8] XU H L, JIANG J X, CHEN W Z, et al. Vascular macrophages in atherosclerosis [J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 4354786.
- [9] LAVIRON M, BOISSONNAS A. Ontogeny of tumor-associated macrophages [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1799.
- [10] GROH L, KEATING S T, JOOSTEN L A B, et al. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(2): 203-214.
- [11] OLINGY C E, DINH H Q, HEDRICK C C. Monocyte heterogeneity and functions in cancer [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(2): 309-322.
- [12] NIELSEN M C, ANDERSEN M N, MØLLER H J. Monocyte isolation techniques significantly impact the phenotype of both isolated monocytes and derived macrophages *in vitro* [J]. *Immunology*, 2020, 159(1): 63-74.
- [13] BEER L, MILDNER M, GYÖNGYÖSI M, et al. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1336-1353.
- [14] 张伟, 李建斌, 赵林娜, 等. 两种离心方法对单个核细胞回收率的影响 [J]. *中国输血杂志*, 2005, 18(4): 321-322.
- ZHANG W, LI J B, ZHAO L N, et al. Effects of two centrifugation methods on mononuclear cell recovery [J]. *Chin J Blood Transfusion*, 2005, 18(4): 321-322.
- [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]. *J Tianjin Med Univ*, 2014, 20(6): 483-485.
- [16] 肖剑梅, 何韦韦, 王昊亮, 等. Percoll 离心结合免疫磁珠分选的方法从外周血分离单核细胞 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(5): 454-460.
- XIAO J M, HE W W, WANG H L, et al. Isolation of human peripheral blood monocytes using Percoll and immunomagnetic separation [J]. *Immunol J*, 2021, 37(5): 454-460.
- [17] FUSS I J, KANOF M E, SMITH P D, et al. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2009, DOI: 10.1002/0471142735.im0701s85.
- [18] GRIEVINK H W, LUISMAN T, KLUFT C, et al. Comparison of three isolation techniques for human peripheral blood mononuclear cells: cell recovery and viability, population composition, and cell functionality [J]. *Biopreserv Biobank*, 2016, 14(5): 410-415.
- [19] 蔡敏敏, 顾晓琼, 高飞, 等. 分离外周血单个核细胞的条件优化 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(1): 1-2.
- CAI M M, GU X Q, GAO F, et al. Optimization of conditions for isolation of peripheral blood mononuclear cells [J]. *Int J Lab Med*, 2016, 37(1): 1-2.
- [20] 李飞, 潘妍, 张建平. 人外周血单个核细胞分离优化 [J]. *生物化工*, 2019, 5(5): 68-70.
- LI F, PAN Y, ZHANG J P. Study on optimization of human peripheral blood mononuclear cell isolation [J]. *Biol Chem Eng*, 2019, 5(5): 68-70.
- [21] ZHANG M, HUANG B. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(6): 48.
- [22] BØYUM A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages [J]. *Scand J Immunol*, 1976, Suppl 5: 9-15.
- [23] 吴鹏, 刘映峰, 梁东辉, 等. 提高人外周血单核细胞分离率的方法探讨 [J]. *实用医学杂志*, 2008, 24(5): 707-708.

- WU P, LIU Y F, LIANG D H, et al. Discussion on the methods of improving the separation rate of human peripheral blood mononuclear cells[J]. J Pract Med, 2008, 24(5): 707-708.
- [24] BENNETT S, POR S B, STANLEY E R, et al. Monocyte proliferation in a cytokine-free, serum-free system[J]. J Immunol Methods, 1992, 153(1-2): 201-212.
- [25] DE ALMEIDA M C, SILVA A C, BARRAL A, et al. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2000, 95(2): 221-223.
- [26] SANTOS D O, SANTOS S L, ESQUENAZI D, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy[J]. Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi, 2001, 70(1): 15-24.
- [27] CHOMETON T Q, SIQUEIRA M D S, SANT ANNA J C, et al. A protocol for rapid monocyte isolation and generation of singular human monocyte-derived dendritic cells [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e231132.
- [28] HORNER R, GASSNER J G M V, KLUGE M, et al. Impact of Percoll purification on isolation of primary human hepatocytes[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 6542.
- [29] LÉGER J L, JOUGLEUX J, SAVADOGO F, et al. Rapid isolation and purification of functional platelet mitochondria using a discontinuous Percoll gradient [J]. Platelets, 2020, 31(2): 258-264.
- [30] MEITAL L T, COWARD A S, WINDSOR M T, et al. A simple and effective method for the isolation and culture of human monocytes from small volumes of peripheral blood [J]. J Immunol Methods, 2019, 472: 75-78.
- [31] REPNIK U, KNEZEVIC M, JERAS M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats[J]. J Immunol Methods, 2003, 278(1-2): 283-292.
- [32] BOHLEN C J, BENNETT F C, BENNETT M L. Isolation and culture of microglia[J]. Curr Protoc Immunol, 2019, 125(1): e70.
- [33] 闻一鸣, 徐金亭, 向军俭. 免疫磁珠富集技术进展[J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(1): 88-92.
- WEN Y M, XU J T, XIANG J J. Advances in immunomagnetic bead enrichment technology [J]. Chin J Immunol, 2013, 29(1): 88-92.
- [34] TRIPATHI H, PENG H, DONAHUE R, et al. Isolation methods for human CD34 subsets using fluorescent and magnetic activated cell sorting: an *in vivo* comparative study[J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 16(2): 413-423.
- [35] PLAISANCE-BONSTAFF K, FAIA C, WYCZECZOWSKA D, et al. Isolation, transfection, and culture of primary human monocytes[J]. J Vis Exp, 2019, (154): 10.3791/59967. DOI: 10.3791/59967.
- [36] WEISS R, GERDES W, LEONHARDT F, et al. A comparative study of two separation methods to isolate monocytes[J]. Cytometry A, 2019, 95(2): 234-241.
- [37] KAWAI K, TSUNO N H, KITAYAMA J, et al. Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(1): 186-191.
- [38] JAYASINGHE S N. Reimagining flow cytometric cell sorting[J]. Adv Biosyst, 2020, 4(8): e2000019.
- [39] 陈媛, 巩伟丽, 湛小燕, 等. 应用流式细胞分选技术分离人外周血原代单核细胞[J]. 科学技术与工程, 2012, 12(24): 5985-5988.
- CHEN Y, GONG W L, ZHAN X Y, et al. Purifying primary monocytes from human peripheral blood by fluorescence-activated cell sorting[J]. Sci Tech Engrg, 2012, 12(24): 5985-5988.
- [40] SCHMIDT T G, SKERRA A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins[J]. Nat Protoc, 2007, 2(6): 1528-1535.
- [41] BEKKERING S, BLOK B A, JOOSTEN L A B, et al. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes [J]. Clin Vaccine Immunol, 2016, 23(12): 926-933.

(此文编辑 曾学清)