

# 小鼠肠道固有层免疫细胞分离的方法 及高参数流式分析

张苗苗<sup>1</sup> 李华萍<sup>2</sup> 赵娅娅<sup>2</sup> 边玮<sup>1</sup> 俞珺璟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

<sup>2</sup>共生菌、发育与健康中心, 中国科学院上海巴斯德研究所, 上海 200031)

**摘要** 流式细胞术是一种基于散射光信号和荧光信号对单个细胞或颗粒进行多参数高通量快速检测的技术, 在生物医学领域有广泛的应用前景。在免疫学相关的基础科研工作中, 流式细胞术亦是免疫表型及功能分析的重要手段。其中, 高质量的单细胞悬液制备是流式检测的关键步骤, 直接影响流式检测的结果。该研究选用一种较难制备的原代组织样本——小鼠肠道固有层, 选择两种酶解消化方法, 从细胞得率、活性、免疫细胞标志物等多个指标进行比较, 结果表明以胶原酶 VIII 和 DNase I 为主的酶解方法更适用于小鼠肠道固有层免疫细胞的获取, 同时结合多参数配色方案, 实现了对肠道免疫细胞各主要类群的全面分析。该研究为揭示样品制备实验结果的影响提供了参考依据, 为准确分析小鼠肠道固有层免疫细胞类群提供了可靠的检测方法。

**关键词** 肠道固有层; 单细胞悬液制备; 多色流式检测

## Preparation of Immune Cells from Mouse Intestinal Lamina Propria and Establishment of Multi-Parameter Flow Cytometry Panel

ZHANG miaomiao<sup>1</sup>, LI huaping<sup>2</sup>, ZHAO yaya<sup>2</sup>, BIAN wei<sup>1</sup>, YU junjing<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, shanghai 200031, China; <sup>2</sup>The Center for Microbes, Development, and Health, Institut Pasteur of Shanghai, Chinese Academy of Sciences, shanghai 200031, China)

**Abstract** Flow cytometry is a multi-parameter, high-throughput and rapid detection technique for single cells or biological particles based on scattered light signal and fluorescence signal, which has a wide application prospect in biomedical field. Flow cytometry is an important method for immunophenotypic and functional analysis, especially in the basic research of immunology. Among them, the preparation of high quality single cell suspension is the key step of flow cytometry analysis, which directly affects the results. The intestinal lamina propria of immune cells in mice is one kind of difficult to preparation of the original tissue sample. This study uses two kinds of enzyme digestion conditions and compares the cell yield, cell viability and immune cell markers, the results show that the collagenase VIII and DNase I enzyme solution method is more suitable for intestinal lamina propria of immune cells in mice. The establishment of this single cell preparation method can be used to more accurately analyze and quantify the population of intestinal immune cells by flow cytometry. The study provided a reference basis for revealing the influence of the sample preparation for experimental results, and a reliable method for the ac-

收稿日期 2022-01-20 接受日期 2022-03-07

国家自然科学基金青年项目(批准号: 8200121538)和中国科学院关键技术人才项目资助的课题

\*通讯作者。Tel: 15811004731, E-mail: junjing.yu@sibcb.ac.cn

Received: January 20, 2022 Accepted: March 7, 2022

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.8200121538) and Chinese Academy of Sciences Key Technology Talent Program

\*Corresponding author. Tel: +86-15811004731, E-mail: junjing.yu@sibcb.ac.cn

curate analysis of immune cell populations in mouse intestinal lamina propria.

**Keywords** intestinal lamina propria; single cell preparation; multi-color flow cytometry analysis

肠道是人体内最大的黏膜免疫系统。它长期暴露于复杂的生理环境中, 识别有害和无害的抗原信息并及时作出适当的响应以维持肠道稳态。这种稳态的破坏往往会引起炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生, 如溃疡性结肠炎和克罗恩病, 常以肠道炎症和黏膜损伤为特征, 这往往会引发机体产生消瘦、腹泻和血尿等症状<sup>[1]</sup>。尽管对炎症性肠病发病机制仍知之甚少, 但是对肠道细菌的过度免疫反应, 可能是导致肠道免疫紊乱的病理之一<sup>[1-2]</sup>。为了对IBD的发病机制进行研究, 在过去的20多年里, 科学家已经建立了多种小鼠结肠炎的模型<sup>[3]</sup>。但是, 无论哪种模型的研究, 都离不开对小鼠结肠黏膜免疫系统的研究。小鼠肠黏膜免疫系统由三个重要部分组成: 肠道黏膜固有层(lamina propria, LP)、肠上皮层以及肠系淋巴结和派氏结<sup>[4]</sup>。其中肠道固有层含有丰富的淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞等, 它们在维持肠道稳态中发挥着重要的作用。因此对固有层细胞的研究, 可了解结肠固有层细胞及其产生的免疫应答, 对如何找到免疫调控的节点及药物治疗的靶点均具有重要意义。

流式细胞术是一种基于散射光信号和荧光信号对单个细胞或颗粒的多参数高通量快速的检测技术。随着流式细胞仪系统硬件和软件的发展以及各种荧光试剂的出现, 流式细胞术逐渐渗透到免疫学、病毒学、分子生物学、癌症生物学、传染病监测、食品和环境监控以及生物制药等多个研究领域应用中<sup>[5-7]</sup>。尤其是近年来多荧光参数流式检测技术在免疫学中的应用<sup>[8-9]</sup>, 使其在免疫学细胞表型分析及功能鉴定中发挥着越来越重要的作用。但无论是流式检测还是流式分选, 均以单个细胞为基础, 因此高质量的单细胞悬液制备至关重要。

相较于一些易于制备的样品(例如细胞系、淋巴结、脾脏等样本)而言, 肠道黏膜固有层免疫细胞(lamina propria lymphocytes, LPL)是一类消化制备复杂、易碎敏感的细胞。因此找到合适的LPL的分离方法, 获得足量的单细胞悬液, 同时结合多色流式分析或分选技术, 将有效促进肠道黏膜免疫的研究。本研究通过对两种酶解反应体系进行比较, 细胞得

率、活性、免疫细胞标志物等多个指标表明以胶原酶VIII(collagenase VIII)和脱氧核糖核酸酶I(DNase I)为主的酶解方法更适用于小鼠肠道固有层免疫细胞的获取, 为后续多色流式检测或分选提供高质量的单细胞悬液, 同时我们以此为基础, 设计并实现了高参数肠道固有层免疫细胞流式分析, 以期对肠道黏膜免疫细胞的研究提供参考和指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 8周龄C57BL/6小鼠购于中国北京维通利华实验动物中心。动物实验方案经过中国科学院上海巴斯德研究所实验动物福利与伦理委员会审批[批件号: IPS动伦审第(A2021-L007)号]。试剂: collagenase VIII、DNase I和二硫苏糖醇(DTT)购自Sigma-Aldrich; 胶原酶D(collagenase D)、脱氧核糖核酸酶I(DNase I)和II型分散酶(Dispase II)购自上海罗氏制药有限公司; 乙二胺四乙酸二钠二水( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )和2×磷酸缓冲液(2×PBS)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 10×磷酸缓冲液(10×PBS)和RPMI-1640细胞培养基均购自Gibco公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)购自Medbio公司; 氢氧化钠购自阿拉丁公司; 胎牛血清(FBS)购自BI公司; Percoll购自GE公司; 无菌眼用剪和镊子购自苏州双鹿医疗器械有限公司; FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit、CD45(30-F11) Alexa Fluor700、CD16/CD32(93)、CD4(RM4-5) Pacific Blue、NK1.1(PK136) APC-eFluor780、LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Fixable Blue staining kit以及UltraComp eBeads<sup>TM</sup> Compensation Beads均购自Invitrogen; CD3(17-A2) BV510、CD8a(53-6.7) BV421、CD103(2E7) PerCP-eFluor710、CD19(6D5) BV570、CD64(X54-5/7.1) PE-Cy7、Ly6C(HK1.4) BV605、Ly6G(1A8) PE-Dazzle594、1-A/I-E(MHCII)(M5/114.15.2) PerCP、Siglec-F(S17007L) PerCP-Cy5.5、CD11b(M1/70) BV711、CD11c(N418) PE-Cy5、F4/80(BM8) FITC以及CX3CR1(SA011F11) BV785均购自Biolegend。

1.1.2 主要仪器 台式恒温振荡摇床购自上海智域仪器制造有限公司; 冷冻离心机、CO<sub>2</sub>细胞培养

箱、Thermo Attune流式细胞仪均购自Thermo Fisher Scientific公司; ID7000光谱流式细胞仪购自日本SONY公司。

## 1.2 方法

1.2.1 大肠样品制备 CO<sub>2</sub>安乐死方法处理小鼠后,盲肠下端到肛门为止为结肠,剥离肠系膜及周围组织后,取出整个结肠。将结肠置于含适量预冷的1×PBS(后面用PBS表示)缓冲液的培养皿上,小心地用镊子剥离肠壁上的脂肪,沿肠系膜纵行剪开,PBS缓冲液洗去肠腔的内容物,洗3~4次。

1.2.2 结肠免疫细胞的获取 消化方法(1)处理结肠组织。①预消化。预消化液制备:50 mL PBS磷酸缓冲液里包含0.5 mL的EDTA(0.5 mol/L)、0.75 mL的HEPES(1 mol/L)、0.05 mL的DTT(1 mol/L)和2.5 mL的FBS。将结肠剪成大小适宜的小段(1.5~2 cm)放入含6~7 mL预消化液的15 mL离心管中,45°倾斜置于台式恒温振荡器摇床中,37 °C 100 r/min水平振荡20 min。取出离心管涡旋振荡20 s。预消化过程重复一次。②消化。消化液制备:10 mL含10% FBS的RPMI-1640培养基里添加0.005 g Collagenase D, 0.005 g DNase I, 0.03 g Dispase II以及0.15 mL HEPES(1 mol/L)。PBS冲洗预消化后的肠段,分别剪成1 mm<sup>2</sup>左右的小段后置于装有上述消化液的15 mL离心管中(每管加3~5 mL消化液),置于水平摇床,37 °C、220 r/min振荡消化45 min,消化期间轻轻涡旋振荡5 s。消化完成后,剧烈涡旋振荡30 s,用70 μm滤器将振荡下来的细胞过滤至50 mL离心管中,随后PBS定容至35 mL,1 000 ×g、4 °C离心10 min。细胞沉淀用8 mL 40%的Percoll重悬。

消化方法(2)处理结肠组织。①预消化。预消化液制备。预消化液1:每10 mL PBS里含0.01 mL DTT(1 mol/L)和0.1 mL HEPES(1 mol/L);预消化液2:每10 mL PBS中含有0.625 mL EDTA(0.5 mol/L)和0.1 mL HEPES(1 mol/L)。大小适宜的肠段(1.5~2 cm)先置于10 mL的预消化液1中,37 °C、220 r/min水平振荡10 min,再手动上下剧烈振荡1 min。随后,肠段置于10 mL预消化液2中,37 °C、220 r/min水平振荡10 min,再手动上下剧烈振荡1 min,此过程重复一次。②消化。消化液制备:含10% FBS的RPMI-1640中含有胶原酶VIII(0.2~0.4 units/mL)以及DNase I(0.15 mg/mL),混匀后使用,每个样本3~5 mL。PBS洗涤预消化后的肠段两次,并将肠段置于5 mL含10%血清的RPMI-

1640中,随后再将其转入含3~5 mL上述消化液的6孔板中,用无菌手术镊子和剪刀将肠段剪成<0.5 cm,放置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中静置消化90 min。消化完成后转入15 mL离心管,加7 mL PBS终止消化,手动剧烈振荡2 min,用70 μm滤膜将振荡下来的细胞过滤至50 mL离心管,用PBS定容至35 mL,1 000 ×g、4 °C离心10 min。细胞沉淀用8 mL 40%的Percoll重悬。

1.2.3 密度梯度离心获得固有层免疫细胞 将消化方法(1)和(2)获得的单细胞悬液用Percoll密度梯度离心的方法富集免疫细胞。8 mL 40% Percoll溶液重悬细胞沉淀后铺在4 mL 80% Percoll溶液上(加入时45°倾斜含80% Percoll的15 mL离心管,巴氏管吸取细胞悬液,沿管壁缓慢滴加使之平铺到80% Percoll上),800 ×g室温离心20 min(加减速调为0)。离心完成后先吸去上层的杂质,再用巴氏管小心地吸取中间层的细胞放入15 mL离心管中,PBS定容至14 mL,800×g、4 °C离心10 min。弃上清后,细胞沉淀用1 mL PBS重悬。

1.2.4 细胞计数 取100 μL细胞悬液,PBS稀释10倍,Thermo Attune流式细胞仪进行计数。Thermo Attune流式细胞仪能够实现细胞的绝对计数。它主要通过设定进样体积和记录体积,获得特定体积内的细胞数量,再根据这个数值换算出整个样品的绝对数量。主要计数流程包括,调整SSC、FSC电压,使前侧向信号最大比例地显示在界面上,设置进样体积120 μL、记录体积100 μL、设置记录All events数量以及流速25 μL/min,待进样时间稳定5 s后开始记录。

1.2.5 流式细胞术比较两种制样方法的细胞存活率 Annexin-V FITC/PI检测细胞凋亡情况,检测原理参照凋亡检测试剂(FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit)说明书。离心后的细胞,弃上清,用100 μL结合缓冲液重悬,每管样本中加5 μL Annexin V FITC和1 μL 0.1 mg/mL PI。混匀后,室温避光孵育15 min。最后,加入400 μL结合缓冲液终止反应,轻柔混匀后,用Thermo Attune流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.6 建立荧光光谱库 利用补偿微球制备单个荧光标记的对照管。参照说明书,充分振荡补偿微球使之均匀分布,每个流式管分别滴加一滴混匀的微球,与0.3 μL的荧光抗体充分混合,4 °C孵育20 min,随后用1 mL染色缓冲液FACS buffer(PBS含1%血清和



表1 小鼠肠道固有层免疫细胞类群17色表面染色方案

Table 1 17-parameter flow cytometry panel for immunophenotyping of mouse colonic lamina propria immune cells using surface markers

抗原 Antigens	细胞类型 Cell types	抗体克隆号 Clone number	荧光 Fluorescence	稀释比例 Dilution ratio
CD45	Hematopoietic cell lineage	30F11	AF700	1:200
CD64	Monocytes/macrophages	X54-5/7.1	PE-Cy7	1:100
CD11b	Myeloid lineage	M1/70	BV711	1:200
F4/80	Macrophages and eosinophils	BM8	FITC	1:100
CX3CR1	Chemokine receptor	SA011F11	BV785	1:100
Ly6C	Monocytes/macrophages and neutrophils	HK1.4	BV605	1:200
CD11c	DCs and macrophages	N418	PE-Cy5	1:200
CD103	Common DC progenitors and pre-DCs derived DC subsets	2E7	PerCP-eFluro710	1:100
I-A/I-E (MHCII)	Activation, antigen presentation	M5/114.15.2	PerCP	1:100
Ly6G	Neutrophils lineage marker	1A8	PE-Dazzle 594	1:200
Siglec-F	Eosinophils	S17007L	PerCP-Cy5.5	1:100
CD3	T cell and NKT cell marker	17-A2	BV510	1:50
CD4	T helper cell marker	RM4-5	PacBlue	1:200
CD8a	CD8 T cell and NKT-like cell marker	53-6.7	BV421	1:400
NK1.1	NK and NKT cells	PK136	APC-eFluro780	1:100
CD19	B cell lineage	6D5	BV570	1:100
			LIVE/DEAD-Blue	1:1 000

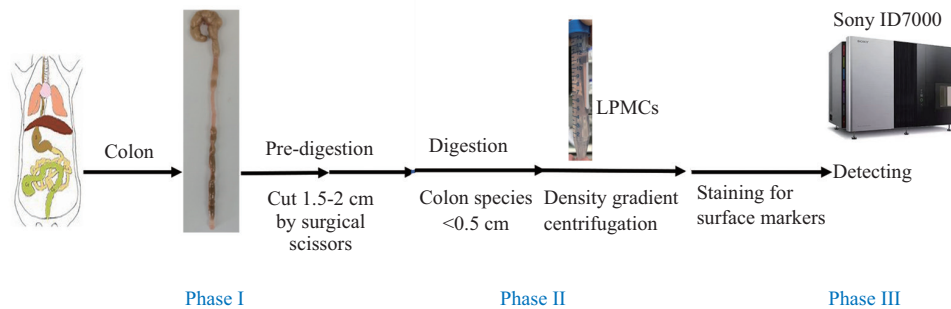


图1 固有层免疫细胞制备以及染色流程

Fig.1 A scheme for lamina propria immune cell preparation and staining

0.5% EDTA)重悬,  $650 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$  离心10 min洗去多余抗体。用 $70 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后, Sony ID7000流式细胞仪检测、读取并计算出每个单染管的SR值, 建立光谱数据库。

1.2.7 流式检测肠道固有层免疫细胞 将步骤1.2.6获得的细胞转入流式管中,  $500 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 离心10 min。细胞沉淀用0.1 mL死活染料溶液(1:1 000)重悬, 放置在冰上避光孵育30 min, 随后加入1 mL PBS,  $500 \times g$ 、 $4^\circ\text{C}$ 离心10 min洗去多余染料。50  $\mu\text{L}$  Fc block(1:100)重悬细胞沉淀, 室温避光封闭10 min, 随后加入50  $\mu\text{L}$ 表面抗体染色混合液(使用比例参照表1), 冰上染色30 min。1 mL FACS buffer重悬,  $500 \times g$   $4^\circ\text{C}$ 离心10 min洗去多余抗体。500  $\mu\text{L}$  FACS buffer

重悬细胞(空白管不染任何抗体, 但是操作流程与样品管一致), 最后用 Sony ID7000进行流式检测。

1.2.8 数据处理与分析 从每次实验的至少3个重复数据中选取具有代表性的实验结果进行展示。采用FlowJo\_V10软件和GraphPad Prism 7软件分析处理数据, 采用多因素方差分析、Student-*t*检验比较组间统计差异。 $P < 0.05$ 表示实验结果具有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 消化条件对获得细胞得率的影响

单细胞悬液制备是流式检测的关键。肠道组织消化一般分为三步(图1): 首先收集目的肠段进行预消化, 目的是解离组织, 便于下一步的消化液能充分

接触肠道固有层;其次,酶解、富集获得单细胞悬液;最后,细胞染色和流式检测。其中,酶解过程是影响细胞得率以及流式检测结果的重要因素。为了探究哪种消化方法的细胞得率更高,我们选用两种消化方法制备样品,消化方法(1)参照 Nature Protocols 上的处理方法<sup>[4]</sup>,消化方法(2)借鉴 Bio-protocol 的消化方法<sup>[10]</sup>,其中方法(1)中的消化液主要包括胶原酶D、Dispase II和DNase I,方法(2)中的消化液主要包括胶原酶VIII和DNase I。我们分别按照相应的步骤处理野生型C57BL/6小鼠的结肠,获得的单细胞悬液用PBS稀释10倍后利用流式细胞仪Thermo Attune进行细胞计数,最后统计两种方法获得的细胞数量。结果发现,采用方法(1)消化,每厘米结肠可获得的细胞数量约为 $3.7 \times 10^5$ 个,采用方法(2)消化,每厘米结肠可获得的细胞数约为 $8.2 \times 10^5$ 个,约为方法(1)的3倍,两者具有显著的差异(图2)。

## 2.2 消化条件对细胞活性状态的影响

细胞活性状态是影响流式检测结果的重要因素。在流式细胞检测时,往往会加入死活染料区别细胞的活性状态。经过流式检测发现,两种消化方法均会影响细胞活性,产生大约30%的死细胞(图3A和图3B)。为了弄清楚两种消化方法对细胞活性的影响,我们采用经典的Annexin V/FITC和PI双指数染色的方法检测所得细胞悬液中细胞的凋亡情况,两种方法的代表性流式检测结果如图3C和图3D所示。早期凋亡时,细胞膜上磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻可与Annexin V结合;晚期凋亡时细胞膜具有通透性且仍保留外翻特性,碘化丙啶(propidium iodide, PI)可以进入核内与脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)结合;而细胞坏死或者成为碎片时,细胞核裸露,只有PI与DNA结合。统计结果发现,两种消化方式总的细胞凋亡率较为接近(图3F),其中方法(1)平均细胞凋亡率为28%(图3F)、方法(2)平均细胞凋亡率为27%(图3F);然而,方法(1)获得细胞的晚期细胞凋亡率约为4%(Annexin V和PI双阳性细胞群)、早期凋亡率约为24%(Annexin V单阳性细胞群),方法(2)的晚期凋亡率约为17%、早期凋亡率约为9%,两者具有统计学意义上的差异(图3E)。以上结果表明,虽然两种制备方法都会对肠道固有层免疫细胞有损伤,但是造成细胞死亡的方式不尽相同,方法(1)倾向于早期凋亡,而方法(2)更倾向于晚期凋亡。

## 2.3 消化条件对细胞表面抗原的影响

流式检测的关键是荧光标记的抗体与细胞表面或胞内的抗原分子特异性结合。为了探究两种消化方法是否影响抗体与抗原分子特异性结合,我们将两种消化方法收集到的单细胞悬液与主要免疫细胞群相关表面标记物的荧光抗体孵育,随后用光谱型流式细胞仪Sony ID7000收集数据并进行数据分析。结果显示,两种方法获得CD45<sup>+</sup>白细胞的比例(图4A)和CD11b<sup>+</sup>细胞的比例(图4B)没有显著的差异。虽然方法(2)获得的CD45<sup>+</sup>白细胞(图4C)和CD11b<sup>+</sup>细胞(图4D)的平均数量略高于方法(1),但是两者没有显著性差异;关于CD11c<sup>+</sup>细胞比例的统计结果,两者也没有显著性差异(图4E),但是方法(2)获得的CD11c<sup>+</sup>的细胞数量显著高于方法(1)(图4G)。另外,虽然方法(1)获得CD3<sup>+</sup>细胞的比例略高于方法(2)(图4F),但是两种方法获得的CD3<sup>+</sup>的T细胞数量没有明显的差异(图4H)。这些结果说明,两种消化方法基本不影响CD45、CD11b、CD11c和CD3检测结果。

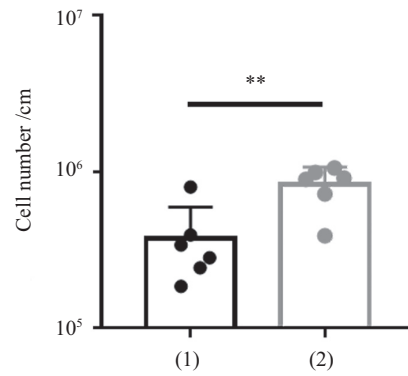
有文献报道,淋巴细胞相关的一些表面抗原对消化条件非常敏感,会影响检测结果的准确性<sup>[4]</sup>。因此,我们统计了两种方法获得细胞的CD19、CD4和CD8的流式检测结果。分析发现,方法(1)处理后,检测到的CD4<sup>+</sup>辅助性T细胞、CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞以及CD19<sup>+</sup>B淋巴细胞的比例明显低于方法(2),具有明显的差异,并且两者的绝对数量统计结果也具有明显的差异(图5)。

## 2.4 多参数流式检测小鼠结肠固有层免疫细胞群体

通过比较方法(1)和方法(2)这两种酶解小鼠结肠获取固有层免疫细胞的方法,我们发现方法(2)更加适合后期的多参数流式检测。因此,我们利用该方法,采用17色荧光检测方案(表1)指征了野生型小鼠结肠固有层8种主要免疫细胞类群及18种免疫细胞亚群(图5)。根据相关文献报道<sup>[11-17]</sup>,设定如图6所示的圈门策略。

首先从活的单细胞里圈出CD45<sup>+</sup>的白细胞群,这是免疫细胞共有的分子标记。B细胞是肠道分泌IgA抗体的重要细胞,在肠道免疫中行使重要功能<sup>[18-19]</sup>,我们利用SSC和CD19从CD45<sup>+</sup>的白细胞中圈出CD19<sup>+</sup>SSC<sup>low</sup>B细胞群。

天然免疫淋巴细胞包括NK(natural killer)细胞和ILCs(innate lymphoid cells),它们不仅为机体抵御病原体的侵袭和感染,还参与器官形成、组织修复

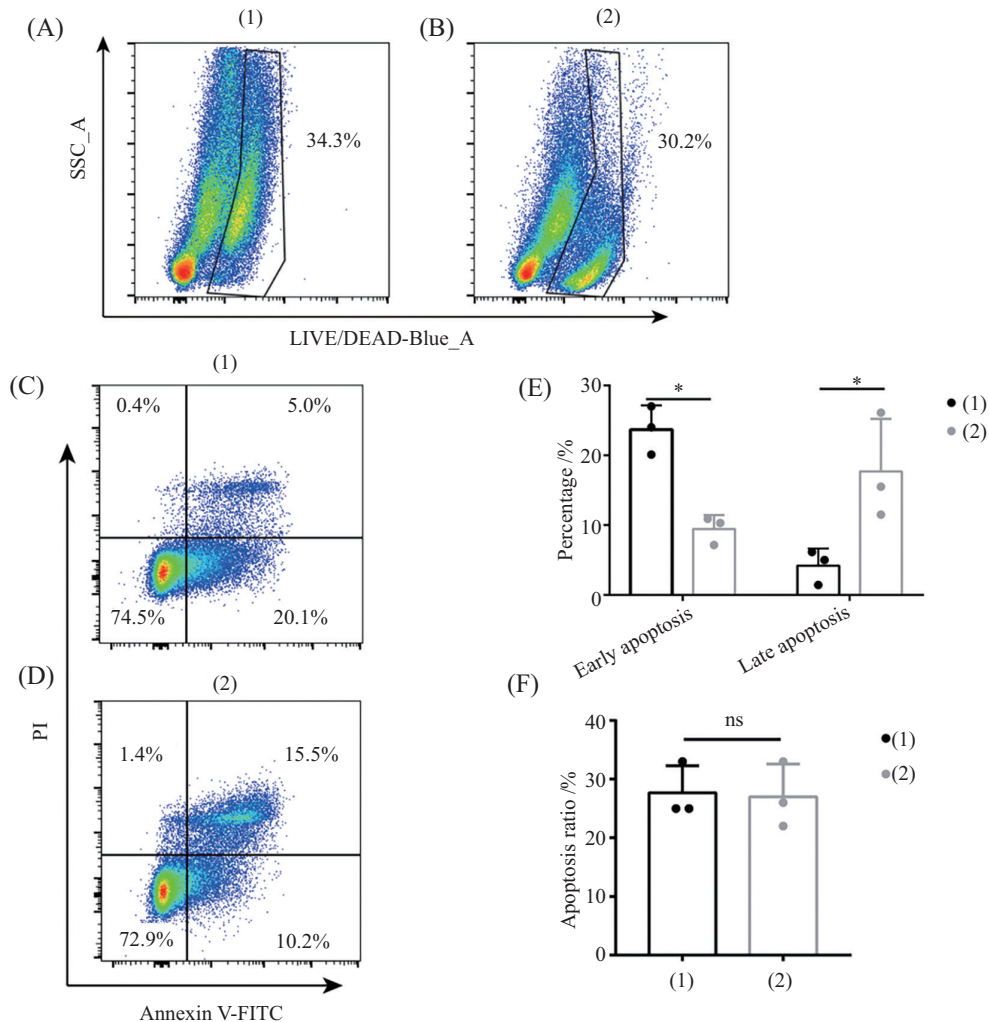


两种消化方法处理后, 统计每厘米结肠可获得的细胞数量。\*\* $P < 0.01$ , 每个点代表一只鼠。

Cell number acquired per centimeter colon was counted after treatment with both digestion methods. \*\* $P < 0.01$ , each dot represents a mouse.

图2 比较两种消化方法获得的细胞数

Fig.2 Total cells obtained by both digestion methods

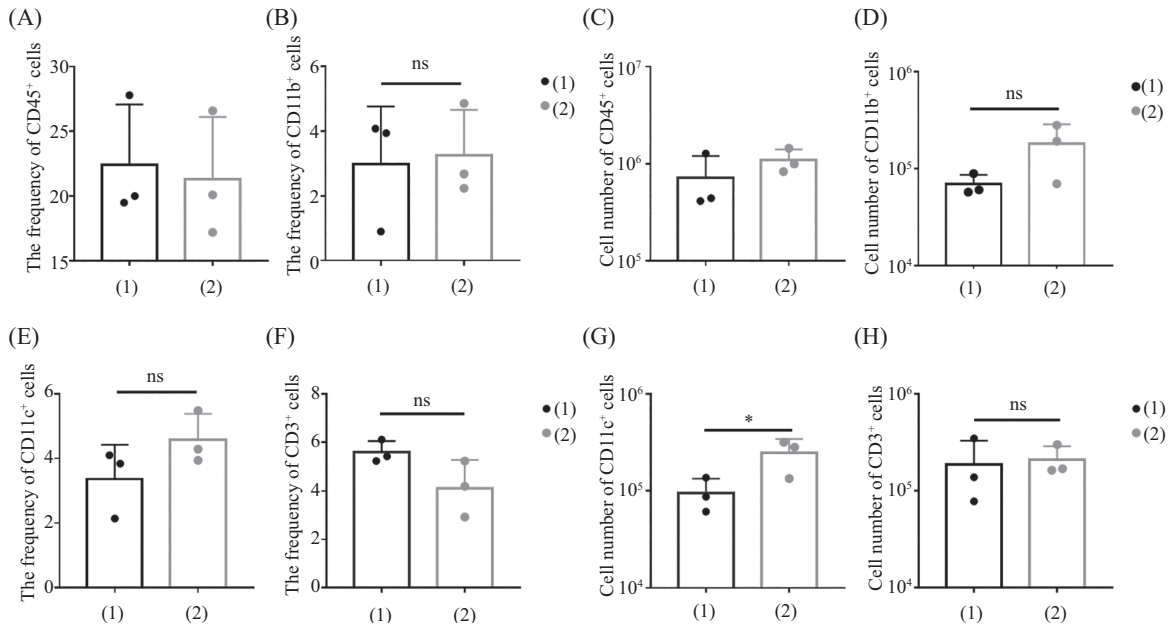


A、B: 流式分析检测消化方法(1)(左图)和(2)(右图)的细胞活性状态; C、D: 流式分析检测消化方法(1)(上图)和(2)(下图)获得细胞的凋亡结果; E: 细胞的早期凋亡和晚期凋亡统计分析图; F: 细胞总凋亡率统计分析图。<sup>ns</sup> $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , 每个点代表一只鼠。

A,B: flow cytometry was used to detect the cell viability of digestion methods (1) (left) and (2) (right); C,D: flow cytometry was used to detect the apoptosis of cells obtained by digestion method (1) (above) and (2) (bottom); E: statistical analysis of early apoptosis and late apoptosis of cells; F: statistical analysis of total apoptosis ratio. <sup>ns</sup> $P > 0.05$ , \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , each dot represented a mouse.

图3 消化条件对细胞活性状态的影响

Fig.3 Effects of digestion conditions on cell viability

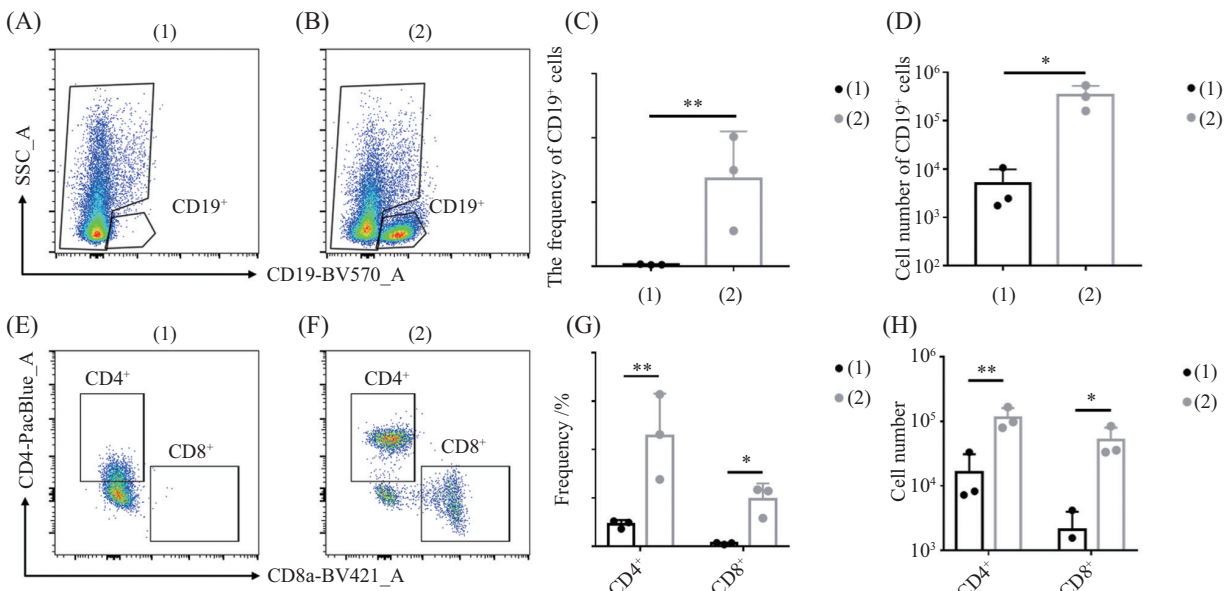


A: CD45<sup>+</sup>细胞比例统计分析图; B: CD11b<sup>+</sup>细胞比例统计分析图; C: CD45<sup>+</sup>细胞数量统计分析图; D: CD11b<sup>+</sup>细胞数量统计分析图; E: CD11c<sup>+</sup>细胞比例统计分析图; F: CD3<sup>+</sup>细胞比例统计分析图; G: CD11c<sup>+</sup>细胞数量统计分析图; H: CD3<sup>+</sup>细胞数量统计分析图。<sup>ns</sup>*P*>0.05, \**P*<0.05, 每个点代表一只鼠。

A: CD45<sup>+</sup> cell proportion statistical analysis diagram; B: CD11b<sup>+</sup> cell proportion statistical analysis diagram; C: CD45<sup>+</sup> cell number statistical analysis diagram; D: CD11b<sup>+</sup> cell number statistical analysis diagram; E: CD11c<sup>+</sup> cell proportion statistical analysis diagram; F: CD3<sup>+</sup> cell proportion statistical analysis diagram; G: CD11c<sup>+</sup> cell number statistical analysis diagram; H: CD3<sup>+</sup> cell number statistical analysis diagram. <sup>ns</sup>*P*>0.05, \**P*<0.05, each dot represented a mouse.

图4 两种消化方法对非淋巴细胞表面抗原的影响

Fig.4 Effects of two digestion methods on non-lymphocyte surface antigens



A, E: 方法(1)处理后, CD19、CD4、CD8流式检测图; B, F: 方法(2)处理后, CD19、CD4、CD8流式检测图; C: CD19<sup>+</sup>细胞占总细胞数的比例; D: CD19<sup>+</sup>细胞的绝对数量统计分析图; G: CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞分别占总细胞数的比例; H: CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞的绝对数量统计分析图。\*\**P*<0.01, \**P*<0.05, <sup>ns</sup>*P*>0.05, 每个点代表一只鼠。

A,E: after method (1) treatment, CD19, CD4 and CD8 were detected by flow cytometry; B,F: after method (2) treatment, CD19, CD4 and CD8 were detected by flow cytometry, respectively; C: the proportion of CD19<sup>+</sup> cells in total cell number; D: absolute number of CD19<sup>+</sup> cells; D: absolute number of CD19<sup>+</sup> cells statistical analysis diagram; G: the proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in total cell number, respectively; H: absolute number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells statistical analysis diagram, respectively. \*\**P*<0.01, \**P*<0.05, <sup>ns</sup>*P*>0.05, each dot represented a mouse.

图5 两种消化方法对淋巴细胞表面抗原的影响

Fig.5 Effects of two digestion methods on lymphocyte surface antigens



和黏膜稳态<sup>[20]</sup>。我们从CD19<sup>-</sup>的细胞群圈出NK1.1<sup>+</sup>的NK细胞,再利用CD3划分出CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>的NKT细胞群和CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>的NK细胞群,因为CD3是T细胞受体(T cell receptor, TCR)的重要组成部分,NKT细胞表面同样表达TCR<sup>[20-21]</sup>;肠道免疫系统中存在多种T细胞,包括辅助性T细胞和细胞毒性T细胞,我们从NK1.1<sup>-</sup>细胞群圈出CD3<sup>+</sup>T细胞,再利用CD4和CD8圈出CD4<sup>+</sup>的辅助性T细胞(T helper cells)和CD8<sup>+</sup>的细胞毒性T细胞(cytotoxic T cells)。

粒细胞的大量浸润肠道是DSS诱导小鼠肠炎发生的重要特征,因此粒细胞是表征肠道炎症的重要免疫细胞群。从CD3<sup>-</sup>的细胞利用SSC和Siglec-F可以获得Siglec-F<sup>+</sup>的嗜酸性粒细胞<sup>[22]</sup>,中性粒细胞则为CD11b和Ly6G双阳性的细胞群,这里我们先排除了DCs(CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>+</sup>),从非DC细胞群中圈出CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>的中性粒细胞。

树突状细胞是肠道中重要的抗原呈递细胞,肠道树突状细胞包括单核来源的CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>(DC1)、

CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>(DC2)以及共同树突状细胞(common dendritic cells)和前体树突状细胞(pre-dendritic cells)来源的CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>(DC3)<sup>[12,16-17]</sup>。这里我们从SiglecF<sup>-</sup>细胞群中利用CD11c和MHCII圈出CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>+</sup>的树突状细胞(DCs),这群细胞进一步可利用CD11b和CD103划分出DC1(CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>)、DC2(CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>)和DC3(CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>)。

肠道巨噬细胞在肠道稳态中起重要作用。它有两种来源:一种是来源于胚胎的巨噬细胞(CD4<sup>+</sup>Tim4<sup>+</sup>),另一种来源于单核细胞,在成年小鼠中,大部分的巨噬细胞是单核细胞来源的<sup>[12]</sup>。这里检测了单核来源的巨噬细胞<sup>[14]</sup>。先从非中性粒的细胞群里圈出CD11b<sup>+</sup>细胞,从中利用F4/80和CX3CR1进一步圈出F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>以及F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-int</sup>两种巨噬细胞群<sup>[11-12]</sup>。F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup>的细胞可利用Ly6C和MHCII圈出P1(Ly6C<sup>+</sup>monocytes)、P2(Ly6C<sup>high to low</sup>MHCII<sup>+</sup>)和P3/P4(Ly6C<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>)。同样,F4/80<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-int</sup>也可利用Ly6C和MHCII圈出

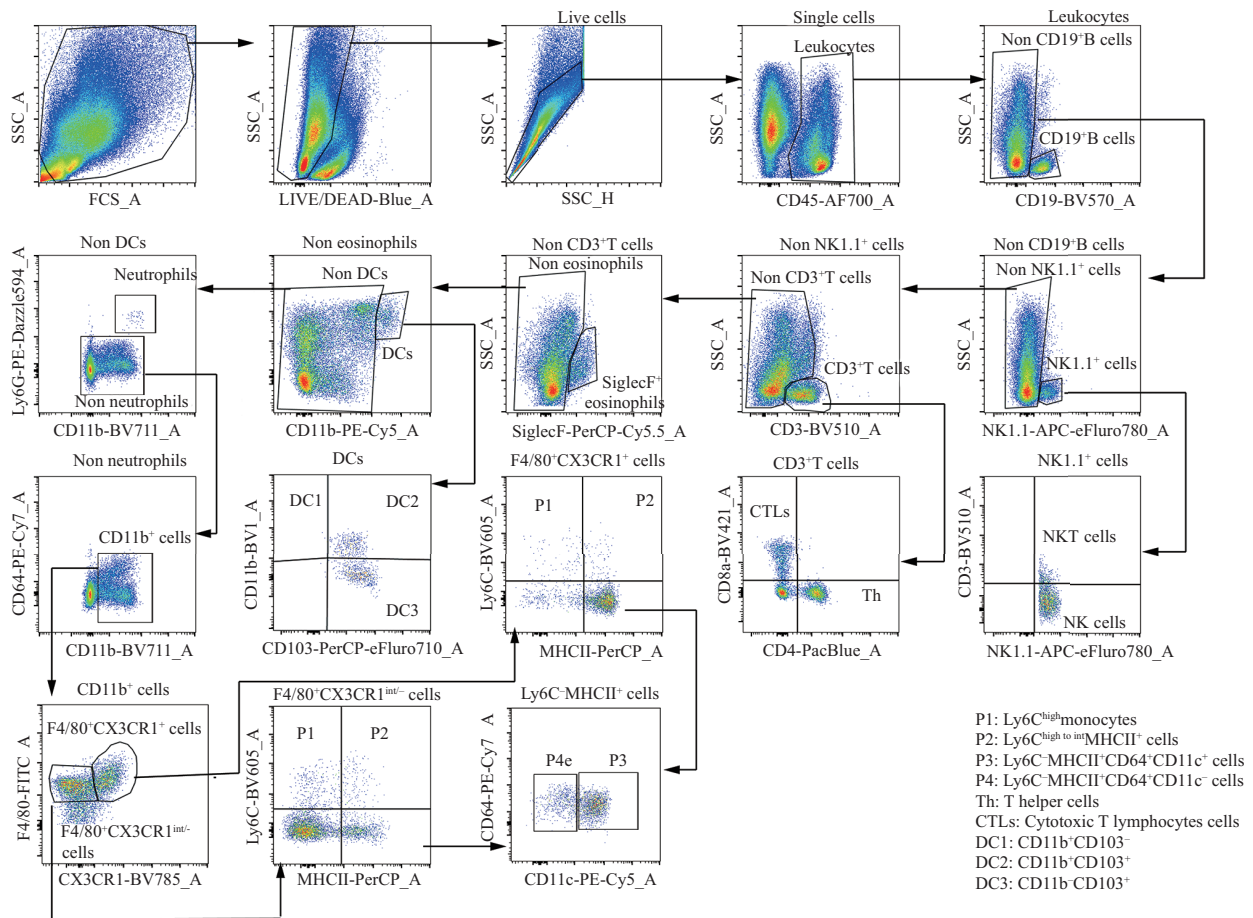


图6 多色检测圈门策略

Fig6. Gate strategy for multicolor detecting



P1(Ly6C<sup>+</sup>monocytes)、P2(Ly6C<sup>high to low</sup>MHCII<sup>+</sup>)和P3/P4(Ly6C<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>)。CD11c和CD64同样是巨噬细胞的标志物。研究表明,CD11c<sup>+</sup>巨噬细胞可能是血液单核细胞和组织驻留的CD11c<sup>-</sup>巨噬细胞之间的中间产物<sup>[12]</sup>。因此利用CD64和CD11c可以确定Ly6C<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>(P4)的成熟巨噬细胞以及Ly6C<sup>-</sup>MHCII<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>(P3)的中间态巨噬细胞。

### 3 讨论

肠道系统是体内最大的黏膜系统,它所处的环境造就了其复杂多变的免疫功能,除了肠炎等病理模型外,近年来的研究表明肠道菌、肠病毒等在肠道免疫中也有重要的作用<sup>[14,23]</sup>。此外,随着研究的深入,各类免疫细胞包括T细胞、B细胞、巨噬细胞、单核细胞、天然淋巴细胞等均在肠道免疫及稳态维持过程中发挥着重要的作用。因此如何获得高质量的肠道单细胞悬液是进行相关流式免疫细胞类群及功能研究的重要前提。

本文选取难处理但免疫细胞存量丰富的肠道组织作为代表,通过比较两种不同酶解消化方式,设计并讨论了这两种消化方式对所获得单细胞悬液的得率、活性、细胞表面抗原的影响,最后选用了更符合肠道组织样本全景免疫细胞展示的方法进行了17色流式荧光检测,实现T细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、DC细胞及其亚群、巨噬细胞及其亚群合计26种细胞类群的分析方案。

本研究首先探讨了两种酶解消化方式对肠道结肠组织样本所获得细胞得率的影响。两种方法中均含有DTT、胶原酶和DNase I,DTT主要用于解离肠道上皮细胞层,胶原酶可以有效地将肠道黏膜固有层解离,并形成单细胞悬液,DNase I可以降解组织解离过程中从死细胞中暴露的DNA,防止细胞黏连。在方法(1)中加入了中性分散酶Dispase II,它是一种非特异性的金属蛋白酶,主要用于原代细胞的解离。本研究发现两种方法所获得平均细胞数量存在显著差异,方法(2)获得平均细胞数量更多,约为方法(1)的3倍。我们比较了两种方法的过程,方法(2)的解离方式相较于(1)更为温和,但是所需时间更长,固有层消化过程需用时90 min,而方法(1)的解离方式较为剧烈,固有层消化过程中伴随有持续振荡过

程,但消化时间较短,只需45 min。因此,剧烈振荡可能是细胞总量损失的原因之一。此外,方法(1)所包含的消化液相较于方法(2),对样本消化的不够彻底,消化结束后仍有组织团块的残留,这是细胞总量损失的主要原因。

其次,本研究探讨了两种酶解消化方式对肠道结肠组织样本所获得细胞活性的影响。细胞活性状态是影响流式检测结果的重要因素,因为死细胞容易产生非特异性染色,导致检测结果不正确。在用死活染料进行染色后,实验结果显示两种处理方法均对结肠组织样本造成了损伤,约有30%的细胞死亡。随后,本研究对细胞死亡的状态进行了研究,使用经典的Annexin V/FITC和PI双指数染色方案。研究结果显示,两种处理方式导致细胞死亡的方式不同,使用方法(1)处理的细胞样本中早期凋亡的细胞更多,而方法(2)处理的细胞样本中晚期凋亡的细胞更多。无论是哪种方式处理,在进行实验时,加入死活染料,选择死活染料阴性的细胞进行后续实验,都将不影响检测结果的正确采集。

流式技术对细胞类群和功能分析主要依赖于细胞表面或内部分子抗原抗体的结合。如果细胞表面的抗原分子丢失或者抗体抗原产生非特异性结合就会影响流式检测结果的正确性。所以本研究又探讨了两种样本处理方法对细胞表面抗原分子的影响。研究发现,对CD45、CD3、CD11b、CD11c这样的细胞表面抗原,两种方式均没有显著性差异,但是对淋巴细胞表面标志物CD19以及T细胞表面标志物CD4和CD8来说,用方法(1)的处理方式,比例以及数量大大降低,这将对后续细胞亚群的分析造成严重的影响。而方法(2)处理后的样品,仍具备完整的CD19、CD4和CD8的表达。造成这种差异的原因在于方法(1)中含有二型中性分散酶(Dispase II)。消化液中含有Dispase II破坏CD4、CD8、CD19等细胞表面抗原的空间结构,致使荧光标记抗体不能与抗原分子有效结合<sup>[24]</sup>。

综上所述,针对结肠固有层样本单细胞悬液的制备,采用消化液中含有胶原酶D、Dispase II和DNase I的方法(1)的优点在于消化时间较短,缺点是细胞总量低,有一些细胞表面抗原会受到酶的影响较大,但是如果只是粗略地检测大类的细胞分群,如CD45、CD3、CD11b、CD11c等,结果影响不大且实验时间大大缩短;采用消化液中含有胶原酶VIII和DNase I的方法(2),消化时间较长,但是细胞总量

高,对细胞表面抗原影响较小,更适用于对较多细胞亚群及功能分析流式样本的制备方案。最后,本研究选用方法(2)作为前期样本的处理方式,结合光谱流式技术,采用17色的高参数配色方案,实现26类肠道固有层免疫细胞群分析。本研究结论为流式前期样本处理提供了指导作用,优化后的配色方案也将为多参数的流式分析及分选提供模板,为免疫细胞亚群分析及后续功能实验提供有力的技术支撑。

### 参考文献 (References)

- [1] ABRAHAM C, CHO J H. Inflammatory bowel disease [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21): 2066-78.
- [2] ANDERSON C A, BOUCHER G, LEES C W, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47 [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(3): 246-52.
- [3] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, doi: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- [4] WEIGMANN B, TUBBE I, SEIDEL D, et al. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(10): 2307-11.
- [5] PERFETTO S P, CHATTOPADHYAY P K, ROEDERER M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(8): 648-55.
- [6] MCKINNON K M. Flow cytometry: an overview [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [7] VORONIN D V, KOZLOVA A A, VERKHOVSKII R A, et al. Detection of rare objects by flow cytometry: imaging, cell sorting, and deep learning approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2323.
- [8] LIECHTI T, ROEDERER M. OMIP-060: 30-parameter flow cytometry panel to assess T cell effector functions and regulatory T cells [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(11): 1129-34.
- [9] WANG S R, ZHONG N, ZHANG X M, et al. OMIP 071: A 31-parameter flow cytometry panel for in-depth immunophenotyping of human T-Cell subsets using surface markers [J]. *Cytometry A*, 2021, 99(3): 273-7.
- [10] WEN Z L, SU X H, CHEN D C, et al. Flow cytometry of intestinal mononuclear phagocytic subsets and functions [J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(22): e1010324.
- [11] ZIGMOND E, VAROL C, FARACHE J, et al. Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells [J]. *Immunity*, 2012, 37(6): 1076-90.
- [12] CORBIN A L, GOMEZ-VAZQUEZ M, BERTHOLD D L, et al. IRF5 guides monocytes toward an inflammatory CD11c<sup>+</sup> macrophage phenotype and promotes intestinal inflammation [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(47): eaax6085.
- [13] TAMOUTOUNOUR S, HENRI S, LELOUARD H, et al. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(12): 3150-66.
- [14] DALLARI S, HEANEY T, ROSAS-VILLEGAS A, et al. Enteric viruses evoke broad host immune responses resembling those elicited by the bacterial microbiome [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(6): 1014-29, e8.
- [15] DENNING T L, WANG Y C, PATEL S R, et al. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(10): 1086-94.
- [16] BOGUNOVIC M, GINHOUX F, HELFT J, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network [J]. *Immunity*, 2009, 31(3): 513-25.
- [17] MUZAKI A R B M, TETLAK P, SHENG J, et al. Intestinal CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> dendritic cells restrain colitis via IFN- $\gamma$ -induced anti-inflammatory response in epithelial cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(2): 336-51.
- [18] KIRKLAND D, BENSON A, MIRPURI J, et al. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage [J]. *Immunity*, 2012, 36(2): 228-38.
- [19] WANG L, RAY A, JIANG X, et al. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(6): 1297-312.
- [20] LUO W, TIAN L, TAN B, et al. Update: innate lymphoid cells in inflammatory bowel disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(1): 56-66.
- [21] HALL L J, MURPHY C T, QUINLAN A, et al. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(5): 1016-26.
- [22] WADDELL A, AHRENS R, STEINBRECHER K, et al. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6C(high) CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11 [J]. *J Immunol*, 2011, 186(10): 5993-6003.
- [23] SCHMIDT F, DAHLKE K, BATRA A, et al. Microbial colonization in adulthood shapes the intestinal macrophage compartment [J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(9): 1173-85.
- [24] AUTENGRUBER A, GEREKE M, HANSEN G, et al. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function [J]. *Eur J Microbiol Immunol*, 2012, 2(2): 112-20.