

技术与方法

一种新的皮肤炎患者外周血Treg淋巴细胞亚群的多色分析方法的建立

黄莹莹¹ 姜宇² 邢月婷¹ 李艳伟¹ 郭春¹ 王佳佳¹ 徐琴^{3*}¹浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058; ²浙江大学基础医学院, 杭州 310058;³浙江大学医学院附属邵逸夫医院风湿免疫科, 杭州 310016)

摘要 为探索建立新的皮肤炎患者外周血Treg淋巴细胞亚群分析方法, 利用流式细胞仪设计并优化针对Treg细胞的15色流式染色方案。该文收集了皮肤炎患者和健康志愿者的外周血, 用密度梯度离心法分离获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。该研究分别对抗体浓度、染色时间、孵育温度、是否避光、荧光素放置时间及上机收样电压等进行优化, 最终完成单样品15色高通量流式检测, 并结合FlowJo软件对目标细胞Treg亚群进行高阶数据分析。结果表明, (1) BLANK十字架法结合染色指数法可确立方案(Panel)的最适电压值; (2) 抗体TIGIT BV421、HLA-DR PE、CD127 BV605、CD103 R718、CD25 PE-Cy7滴定后的最优标记量分别为1.25、1.25、3、2.5、5 $\mu\text{L}/\text{test}$ (100 μL 染色体积/test); (3) 多色流式抗体染色的最佳条件是4 $^{\circ}\text{C}$ 、避光条件下孵育30 min; (4) 样本制备后应尽快检测, 放置时间不超过24 h。该研究中建立的15色Panel可成功分析人PBMC样本Treg细胞亚群及相关活化分子的表达情况。此方法可应用于以皮肤炎为代表的伴有Treg细胞缺陷的外周血Treg淋巴细胞亚群的分析。

关键词 皮肤炎; Treg细胞亚群; 15色高通量流式分析; 活化

Establishment of a Novel Multi-Color Panel for Analyzing Treg Cell Subsets in Peripheral Blood of Patients with Dermatomyositis

HUANG Yingying¹, JIANG Yu², XING Yueting¹, LI Yanwei¹, GUO Chun¹, WANG Jiajia¹, XU Qin^{3*}¹Core Facilities, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;²School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ³Department of Rheumatology,

Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

Abstract To establish a new panel for Treg subsets in peripheral blood of patients with dermatomyositis, a 15-color multiparameter flow cytometric panel aimed to construct and optimize. Peripheral blood of dermatomyositis patients and healthy donors were collected and PBMCs were isolated by density gradient centrifugation. The antibody concentration, staining time, staining temperature, effect of light on antibody staining index, fluorescein exposure time and voltage were optimized for antibody staining and acquisition of PBMC cells

收稿日期: 2022-03-12 接受日期: 2022-05-19

浙江省科技厅基础公益研究计划(批准号: LGC21H100001)和浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y202043492)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0571-88981951, E-mail: sandyzju@163.com

Received: March 12, 2022 Accepted: May 19, 2022

This work was supported by the Project of Zhejiang Science and Technology Department (Grant No.LGC21H100001) and Zhejiang Provincial Education Department Fund (Grant No.Y202043492)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981951, E-mail: sandyzju@163.com

on flow cytometry. Finally, a high dimensional panel with 15 colors were successfully established and targeted Treg subsets were analyzed with advanced application in FlowJo. The results showed that (1) the optimal voltage value of the panel can be established by blank cross method combined with staining index method; (2) the optimal antibody concentration of TIGIT BV421, HLA-DR PE, CD127 BV605, CD103 R718, CD25 PE-Cy7 after titration were 1.25, 1.25, 3, 2.5, 5 $\mu\text{L}/\text{test}$ (100 μL staining volume/test) respectively; (3) with this multicolor flow cytometry panel, antibody staining should be incubated at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min in dark; (4) and the samples should be acquired within 24 h. The established 15-color flow cytometry panel can successfully analyze the portion of Treg cell subsets and activation related molecules in human PBMC samples. This method is feasible for the analysis of peripheral Treg subsets in patients with in dermatomyositis and other disorders featured with treg deficiency.

Keywords dermatomyositis; Treg cell subsets; 15-color flow cytometry panel; activated status

皮肤炎(dermatomyositis, DM)是一类较为常见的主要累及肌肉和(或)皮肤的自身免疫性疾病,表现为近端肌无力伴肌酸肌酶增高、特征性的皮损(包括Gottron症、向阳性皮疹、披肩症等)和血清特异性自身抗体阳性^[1]。但目前该病的发病机制尚不清楚。以往研究也多是针对皮肤炎肌肉组织局部病理状态的观察或者组织标本分子水平表达的现象描述,该病发病的具体分子机制仍较模糊,至今尚未有清晰的模式来解释^[2]。皮肤炎特别是无肌病型皮肤炎可能与恶性肿瘤的发生和发展具有强相关性。表达Foxp3的调节性(Treg) T细胞在维持机体免疫耐受和免疫稳态中起着关键的作用。近期研究发现,调节性Treg细胞比例和数量在DM/PM(多发性肌炎polymyositis, PM)病人中显著减少^[3-5],并且Treg细胞缺失程度与DM/PM疾病的活动度相关^[4]。DM/PM病人肌活检免疫组化分析也发现,Treg细胞在肌组织局部浸润不足,并与预后不佳有关^[6]。动物实验发现,Treg细胞可在炎症肌肉组织局部抑制炎症和损伤^[7]。上述发现提示,Treg细胞介导的免疫耐受失衡在DM/PM疾病发生发展中起着重要作用。我们通过对DM/PM的前期研究工作也发现了Treg稳态失调这一现象。Treg细胞数量减少或不伴有功能缺陷均可引起自身免疫病、过敏等免疫耐受失调的病症。Treg细胞在DM/PM以外的自身免疫性疾病(包括系统性红斑狼疮、系统性硬化症、类风湿关节炎等)中也有广泛的研究,因此剖析该群细胞特征表型具有重要的研究意义。

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一项新型的、发展迅速的生物学分析技术,它具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大等特点,越来越

受到临床重视^[8]。利用多色流式细胞分析仪可以对上述皮肤炎病人样本中的Treg细胞活化相关分子进行研究,有利于探索该疾病的发病机制,为临床诊断和治疗提供强有力的参考依据,但目前国内相关研究还比较少。既往研究中,由于传统十色以下流式技术的局限,需要大量临床样本来进行T细胞多项功能检测,并且缺乏进一步细分亚群后的功能研究。因此,亟需探索多色的流式检测方法,以期在有限的样本内获得最大的信息量。本文旨在基于Treg细胞对皮肤炎发病机理的研究诉求,建立和优化一个新的15色的Treg细胞检测分析方法,在检测Treg细胞亚群的同时,一并分析Treg细胞活化功能相关分子,以全面地分析并探讨这些因素间关系,从而可更全面地了解皮肤炎发病过程中的外周Treg细胞的免疫表型,对皮肤炎病人伴发肿瘤予以早期识别、早治疗、早干预,为提高临床疗效提供有力的支持,也为新药创制奠定理论基础,提供实践指导,在临床转化应用方面具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 15色流式抗体(表1)、抗体染色缓冲液(Brilliant Stain Buffer)、固定破膜试剂盒(Fix/perm kit)及多色流式细胞分析仪BD Fortessa均购自美国BD公司。磷酸盐PBS缓冲液购自瑞典Medicago公司。淋巴细胞分离液(CL5020)购自CEDARLANE公司。小型低温离心机(型号HERAEUS FRESCO17)购自Thermo scientific公司。血细胞计数板购自上海求精生化试剂仪器有限公司。

1.1.2 临床样本信息 皮肤炎病例患者和健康志愿者由浙江大学附属邵逸夫医院风湿免疫科招募,

所有参与者均知情同意,且实验经邵逸夫医院医学伦理委员会批准(批准号:科研20200528-30)。每人抽取外周血20 mL用于后续实验。

1.2 方法

1.2.1 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分离和贮存 PBMC的分离和贮存参考文献方法[9]进行。采集参与者空腹外周全血20 mL至EDTA抗凝管,当日送至实验室进行分离。将抗凝全血以等量PBS稀释混匀,加入带有淋巴细胞分离液的离心管中,注意仔细加至淋巴细胞分离液上层,避免混匀。将离心管在室温下 $800 \times g$ 离心20 min,提取中间白膜层细胞,PBS洗涤细胞,计数,用10% DMSO的牛血清冻存至液氮。流式细胞检测当日复苏后进行染色和检测。

细胞复苏:(1) 37°C 水浴解冻;(2)加入2 mL RPMI 1640培养基[含10%(V/V)]胎牛血清FBS+10 mmol/L hepes+0.1 mg/mL Dnase I)混匀,再用上述RPMI 1640培养基补充体系至8 mL, $500 \times g$ 离心5 min;(3)弃上清,用300 μL 上述培养基重悬细胞沉淀,室温5 min,加入不含DNase I的RPMI 1640培养基2 mL,100目滤膜过滤, $500 \times g$ 离心5 min,弃上清,FACS缓冲液[1 \times PBS+0.5%(V/V) FBS+2 mmol/L EDTA]重悬后备用。

1.2.2 流式抗体标记 取上述复苏的PBMC细胞至新的离心管,加入PBS至15 mL。 $500 \times g$ 离心5 min,弃上清,用PBS重悬后计数。取PBMC细胞(2×10^6 个/test)进行表面标志物染色(100 μL 染色体系,抗体终浓度5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;死活染料FVS稀释比为1:300),室温避光30 min。FACS缓冲液洗两次, $500 \times g$ 、 4°C 离心5 min,弃上清。加入200 μL 固定破膜试剂,室温固定30 min;然后用200 μL 破膜缓冲液洗两次。加胞内和核内抗体染色(体系同上)。FACS缓冲液洗两次后,重悬,备用。

1.2.3 最适电压值的确定 据文献报道,目前确立仪器最适电压的比较好的方法是染色指数(stain index, SI)的计算,即最适电压是检测时以尽量小的电压值而获得最大的染色指数^[10]。因此,执行流式细胞仪开机和每日质控,选取未染色细胞为空白对照管,以BD Fortessa流式细胞仪Diva软件自带的BLANK十字架法先设立初始检测电压值。然后上样一管单染管,从初始电压值开始正负调节电压,以20 V为电压增减量。每个电压条件下记录5 000事件数(events),当阳性峰MFI(median fluorescence

intensity)超过所在通道的刻度值或检测器线性时,弃掉样本,电压滴定管命名示例如CD4 FITC_477 V、CD4 FITC_497 V、CD4 FITC_517 V等,分别计算其SI值, $SI = \text{MFI}(\text{positive}) - \text{MFI}(\text{negative}) / [2 \times \text{rSD}(\text{negative})]$ 。其他单染管以此类推。然后以电压为横坐标,SI为纵坐标作图。对每一个通道,选择SI刚到达平台时(不超出荧光强度刻度)对应的电压,此时的电压是获得最佳分辨率的最小电压。最后根据所有单染管的荧光溢漏情况进一步优化电压,最终确立最适电压值。

1.2.4 抗体滴定实验 在上述最佳电压条件下检测15色标记的样本,初步分析各指标分群情况,选取结果不理想的几个指标进行抗体滴定实验。取 1×10^6 个/test的细胞加入EP管中,加入待滴定抗体,抗体量以1.2.2方法中的量为基础,若阳性细胞群荧光偏强,则向低浓度设置2~3个梯度;若阳性细胞群荧光偏弱,则向高浓度设置2~3个梯度。分别测定SI值,确定最适抗体量。

1.2.5 测定染色时间及孵育温度对抗体染色效果的影响 将 1×10^6 个的细胞加入EP管中,调整体积为95 μL ,每管中加入5 μL FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)。将细胞涡旋混匀,分别于室温孵育15 min、30 min、45 min、60 min,每管中加入1 mL FACS缓冲液, $500 \times g$ 、 4°C 离心5 min,弃上清,加入300 μL FACS缓冲液重悬细胞,并转移到流式管中,待上机。PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)的处理步骤与上述一致,所用抗体量为2.5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 。

另一组考察抗体孵育温度对染色的影响,抗体标记流程同上,固定孵育时间为30 min,孵育温度分别设置冰上、 4°C 、室温3个条件,分别计算SI值。

1.2.6 避光与否对分析结果的影响研究 细胞分为两组,每个样本管取 1×10^6 个细胞,调整体积为95 μL ,每管中加入5 μL FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)。将细胞涡旋混匀,一组置于避光环境,另一组置于不避光环境,分别室温孵育30 min。后续标记流程同上。PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)的处理步骤与上述一致,所用抗体量为2.5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 。流式检测后,分别计算SI值。

1.2.7 荧光素放置时间对分析结果的影响研究 细胞分为两组,每个样本管加入 1×10^6 个的细胞,染色体系为100 μL 体系,一组中加入5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 的FITC

Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4), 另一组加入2.5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 的PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)。后续标记流程同上。染色后, 样本置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存, 分别于0 h、24 h、48 h、72 h进行流式检测。

1.2.8 应用已建立的15色Panel进行多色分析 利用优化后的Panel进行健康人对照样本的15色高通量流式检测, 建立相关多色流式分析的策略。探索应用15色Panel进行皮肤炎病人样本分析的可行性。

1.3 统计分析

使用SPSS 16.0软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 为差异有统计学意义。流式数据使用FlowJo V10软件分析。利用GraphPad Prism 7.0对实验数据进行作图。

2 结果

2.1 15色流式分析方法(Panel)的设计、初步建立

本研究根据已报道的疾病相关蛋白表达情况^[11-13], 结合现有T细胞相关免疫学知识建立了一套新的15色T细胞相关流式检测方案(表1), 其不仅包括一系列免疫细胞亚群分群的表型分子(CD3、CD4等), 还包括与T细胞分化相关的分子(CD45RA、CD127、CD25、CD28等); 还有对受持续抗原暴露刺激下的T细胞活化起调节作用的抑制性(checkpoint)分子, 如TIGIT(T cell immunoreceptor with Ig and ITIM

domains, TIGIT)等。在功能方面, 包含趋化因子受体分子, 如CCR家族的CCR7; 激活相关分子(CD38、HLA-DR); 增殖相关分子KI67及细胞成熟与归巢受体分子CD103^[14], 抗体信息及适配检测通道见表1。

2.2 最佳电压值的确立

本研究利用染色指数法确立最适电压值。如表2所示, 先以BD Fortessa流式细胞仪Diva软件自带的BLANK十字架法设立初始检测电压值, 然后以单染管进行电压滴定实验, 各个梯度电压下的细胞阴性群与阳性群分离结果如图1A所示, SI指数达平台期或SI指数尚未达平台期但阳性细胞群已临近检测限时对应的电压为获得最佳分辨率的最小电压^[15], 即该通道的最佳滴定电压(表2和图1B)。最后再结合荧光溢漏情况优化电压值, 得到最终的Panel最适电压值(表2最后一列)。

2.3 最佳抗体浓度的测定

为了确定抗体浓度对细胞染色效果的影响, 在细胞数量(1×10^6 个/test)、染色时间(30 min)固定的情况下, 对几个在2.2电压滴定时分群不理想的抗体进行了不同染色浓度的标记效果分析, 结果如图2A、图2B所示, 对于TIGIT BV421抗体, 试剂盒推荐量是5 $\mu\text{L}/\text{test}$, 因此本研究考察了小于5的两个浓度及大于5的一个浓度, 发现当抗体染色浓度在1.25 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时, 阴性群与阳性群分离效果较好, 染色指数较高, 抗体浓度继续增大时, 染色指数下降, 当抗体浓度达到说明

表1 15色流式分析方法(panel)
Table 1 15-color panel for flow cytometry

标志物 Markers	反应种属 Reactive species	荧光素 Fluorochrome	用途 Purpose	Fortessa激光器 Fortessa laser	Fortessa滤光片 Fortessa filter	克隆号 Clone No.
LIVE/DEAD	Human	FVS510	Live/dead	405	525/50	—
CD3	Human	PerCP-Cy5.5	T-cell	488	710/50	HIT3a
CD4	Human	FITC	T-cell	488	530/30	RPA-T4
Foxp3	Human	Alexa Fluor647	Treg gating	640	670/14	259D/C7
CD25	Human	PE-Cy7	Treg marker	561	780/60	BC96
CD127	Human	BV605	Treg gating	405	610/20	A019D5
CD45RA	Human	APC-Cy7	Naïve marker	640	780/60	HI100
CCR7	Human	BV711	Differentiation	405	710/50	G043H7
KI67	Human	BV650	Proliferation	405	670/30	B56
CD39	Human	BV785	Treg suppression	405	780/60	A1
TIGIT	Human	BV421	Co-inhibitory	405	450/50	741182
CD103	Human	R718	Tissue residency marker	640	730/45	Ber-ACT8
HLA-DR	Human	PE	Activation	561	585/15	1.243
CD38	Human	BUV395	Activation	355	450/50	HB7
CD28	Human	BUV737	Co-stimulation molecule	355	740/35	CD28.2

表2 电压优化结果

Table 2 The results of voltage optimization

标志物 Markers	BLANK十字架法确立的初始电压/V Initial voltage established by blank cross method /V	滴定后的电压/V Voltage after titration /V	溢漏优化后的最适电压/V Optimal voltage after leakage optimization /V
FVS510	426	406	406
CD3 PerCP-Cy5.5	731	711	710
CD4 FITC	537	557	557
Foxp3 Alexa Fluor647	693	673	673
CD25 PE-Cy7	742	682	682
CD127 BV605	641	621	621
CD45RA APC-Cy7	654	634	654
CCR7 BV711	586	586	586
KI67 BV650	647	647	647
CD39 BV785	698	638	638
TIGIT BV421	438	398	398
CD103 R718	750	730	730
HLA-DR PE	652	492	492
CD38 BUV395	583	583	583
CD28 BUV737	719	739	739

书推荐的5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时, 染色指数比1.25 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时低且其阳性群已接近检测限。HLA-DR PE抗体在其浓度为1.25 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时的染色指数最高, 此时阴性群与阳性群分离效果也较好, 当抗体浓度增加到说明书推荐的5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时, 其染色指数明显下降。CD127 BV605抗体表达量不高, 因此本研究考察了说明书推荐量及大于推荐量的两个浓度, 发现在染色浓度3 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时, 染色指数较高, 抗体浓度增加, 其染色指数反而下降, 阴性群与阳性群分离效果也没有变化。CD103 R718抗体在浓度为2.5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时染色效果最佳。CD25 PE-Cy7抗体在浓度为5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 时染色指数较高且分群较好, 这与说明书推荐量一致。可见TIGIT BV421、HLA-DR PE、CD127 BV605、CD103 R718、CD25 PE-Cy7滴定后的抗体最优标记量分别为1.25、1.25、3、2.5、5 $\mu\text{L}/\text{test}$ 。

2.4 染色时间及孵育温度对抗体染色效果的影响

研究了染色时间对流式结果的影响, 结果表明对于非串联染料抗体FITC Mouse anti-Human CD4, 随着染色时间延长, 染色指数(SI)越高, 30 min时的SI值显著高于15 min的SI值($P < 0.01$), 但30 min时的SI值和45 min、60 min的SI值差异不显著, 45 min时的SI值比30 min的略低一些, 因此, FITC的最佳染色时间为30 min(图3A)。而对于串联染料抗体PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4, 其SI值随时间延长而降低(图3B)。综合多色

Panel考虑, 抗体染色时间30 min为宜。

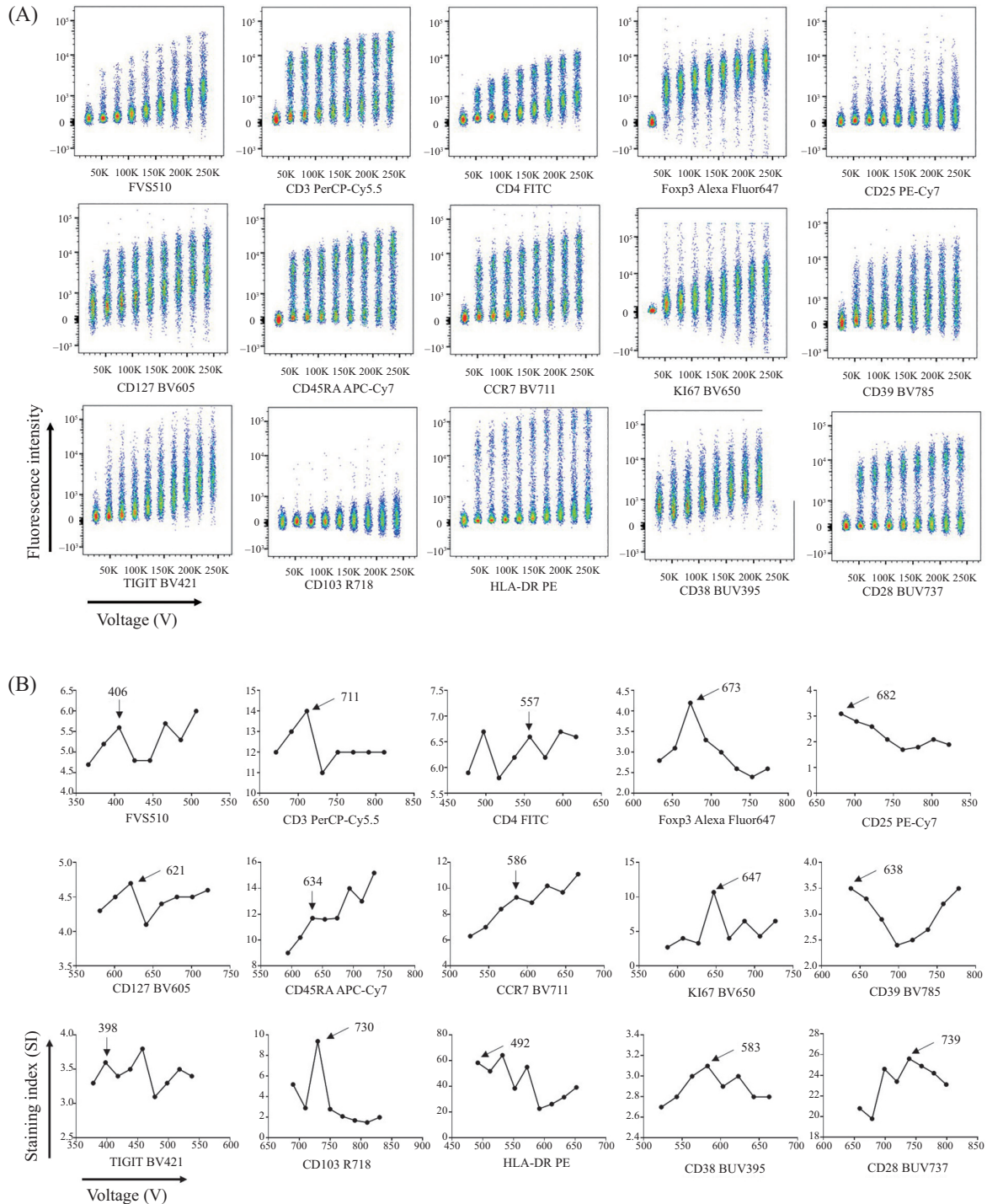
考察了室温、冰上和4 $^{\circ}\text{C}$ 三种抗体孵育温度, 结果如图3C和图3D所示, 对于非串联染料抗体FITC Mouse anti-Human CD4, 室温和4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后染色指数SI值均显著高于冰上孵育的; 而对于串联染料抗体PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4, 其SI值在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育时是最佳的。因此, 综合多色Panel考虑, 抗体孵育温度以4 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

2.5 避光与否对分析结果的影响

对同一份PBMC样本, 进行平行标记, 一份避光孵育, 一份于可见光下孵育, 结果表明, 对于非串联染料抗体FITC Mouse anti-Human CD4, 避光与否对其染色指数无显著影响(图4A), 但在避光条件下, 其细胞阴性群与阳性群分离效果较好, 阴性峰与阳性峰中间无连续分布的细胞, 而可见光条件下阴性峰与阳性峰之间有连续分布的细胞, 即分群不理想(图4C)。对于串联染料抗体PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4, 避光条件下的SI值显著高于可见光条件下的($P < 0.01$)(图4B), 避光条件下, 其细胞阴性群与阳性群也是能清楚地分离(图4D)。因此, 无论FITC还是PerCP-Cy5.5, 均是在避光条件下孵育较好。

2.6 荧光素放置时间对分析结果的影响

本研究分别考察了非串联染料抗体FITC Mouse anti-Human CD4和串联染料抗体PerCP-Cy5.5 Mouse



A: 15个单染管的各个梯度电压下的细胞阴性群与阳性群分离结果。B: 根据图1A中的平均荧光强度计算的染色指数。

A: the separation results of cell negative population and positive population under each gradient voltage of 15 single-stained samples. B: the staining index (SI) have been calculated from the median fluorescence intensity (MFI) of Fig.1A.

图1 电压滴定结果

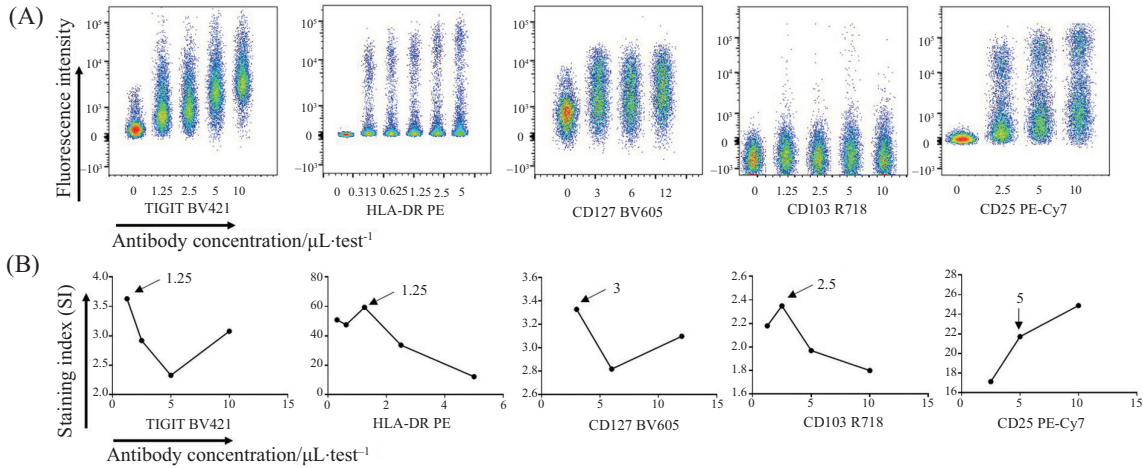
Fig.1 The results of voltage titration experiment

anti-Human CD4染色后放置时间对染色效果的影响, 结果表明, 染色24 h后, FITC的SI值显著低于0 h的 ($P < 0.01$) (图5A), PerCP-Cy5.5在24 h内变化不显著, 但在48 h时, 其SI显著低于24 h的 ($P < 0.05$) (图5B)。

由此可见, 综合多色panel, 样本染色后应即刻检测, 放置时间不宜超过24 h。

2.7 15色流式新方法检测人外周血样本策略

利用2.1获得的最适检测电压, 依次运行每管单

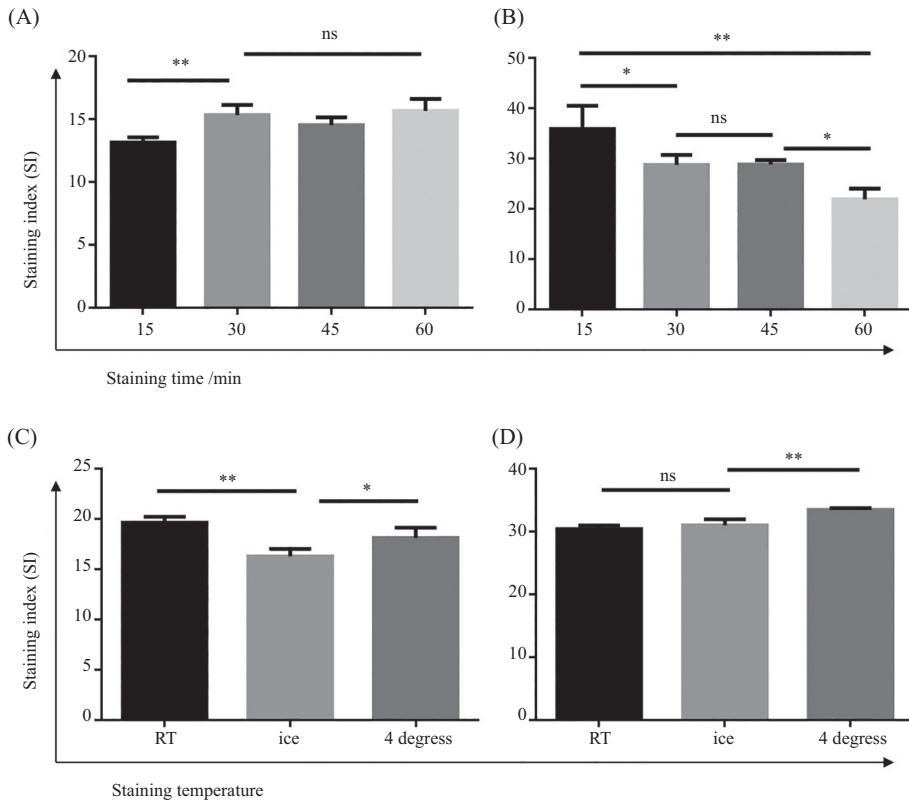


A: 固定细胞数与染色时间, TIGIT BV421、HLA-DR PE、CD127 BV605、CD103 R718、CD25 PE-Cy7抗体标记人PBMC细胞后的细胞阴性群与阳性群分离结果。B: 根据A中的平均荧光强度计算的染色指数。

A: the cell number and staining time are fixed, then the separation results of cell negative population and positive population are detected after human PBMC separately labeled by antibody TIGIT BV421, HLA-DR PE, CD127 BV605, CD103 R718, CD25 PE-Cy7. B: the staining index (SI) have been calculated from the median fluorescence intensity (MFI) of Fig.2A.

图2 抗体浓度对抗体染色指数的影响

Fig.2 Effect of antibody concentration on staining index

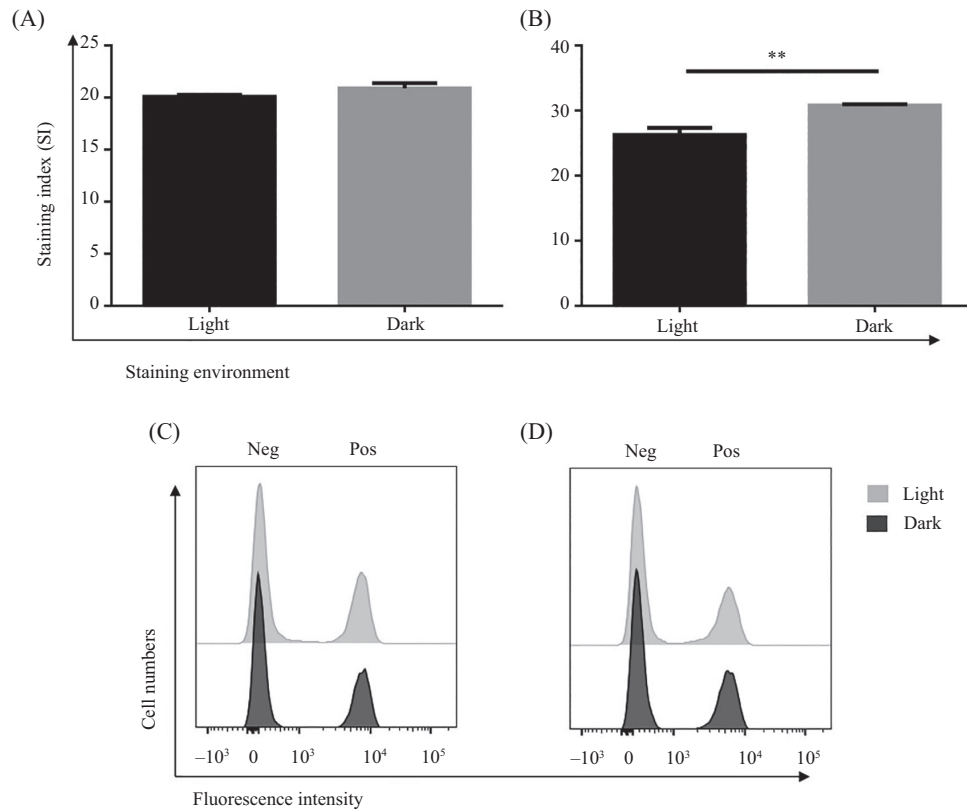


A: 染色时间对FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。B: 染色时间对PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。C: 孵育温度对FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。D: 孵育温度对PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。ns: 差异不显著。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

A: effect of staining time on antibody staining index of FITC Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). B: effect of staining time on antibody staining index of PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). C: effect of staining temperature on antibody staining index of FITC Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). D: effect of staining temperature on antibody staining index of PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). ns: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

图3 染色时间及孵育温度对抗体染色指数的影响

Fig.3 Effect of staining time and staining temperature on antibody staining index

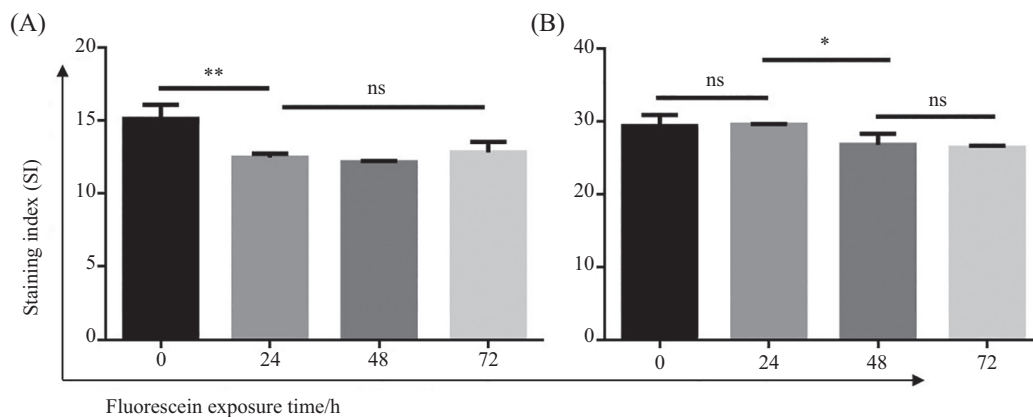


A、B: 分别为可见光对FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)和PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。C、D: 分别为见光和避光条件下, FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)和PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)标记人PBMC细胞后的细胞阴性群与阳性群分离结果。neg: 阴性细胞群。pos: 阳性细胞群。 ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

A,B: effect of light on antibody staining index of FITC Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4) and PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). C,D: the separation results of cell negative population and positive population, which are detected after human PBMC separately labeled by antibody FITC Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4) and PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4) under light or dark environment. neg: negative population. pos: positive population. ** $P < 0.01$, $n = 3$.

图4 可见光对抗体染色指数的影响

Fig.4 Effect of light on antibody staining index



A: 荧光素放置时间对FITC Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。B: 荧光素放置时间对PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4抗体(克隆号RPA-T4)染色指数的影响。 ns: 差异不显著。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

A: effect of fluorescein exposure time on antibody staining index of FITC Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). B: effect of fluorescein exposure time on antibody staining index of PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4 (clone: RPA-T4). ns: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$.

图5 荧光素放置时间对抗体染色指数的影响

Fig.5 Effect of fluorescein exposure time on antibody staining index

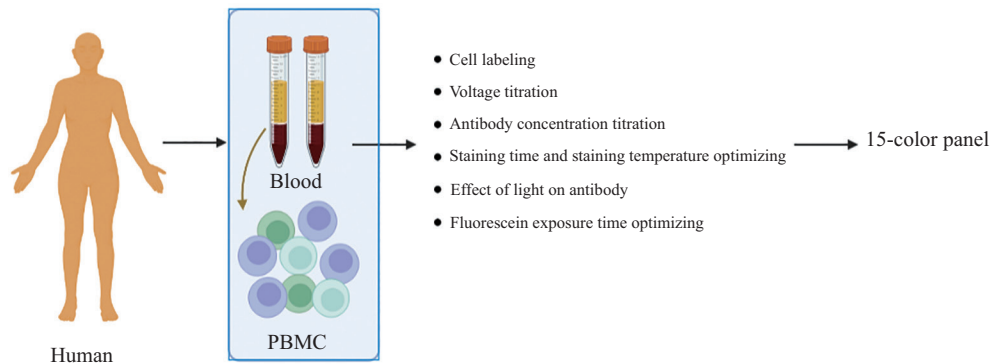


图6 15色panel分析PBMC免疫细胞亚群的流程

Fig.6 Schematic overview for analysis of difference of immune cell subsets in PBMC by the 15-color panel

染的样本, 计算各荧光在每个检测通道的补偿值, 确立最适荧光补偿值。样本制备条件采用上述2.2~2.6优化后的方法, 具体流程如图6所示。应用已建立的15色Panel, 可成功分析人PBMC样本Treg细胞亚群及活化相关分子的表达情况(图7A), 获得数据后, 经过FlowJo软件进行流式数据降维等一系列高阶分析, 并输出可视化结果。从图7B可知, 该多色方案可成功分析PBMC亚群分布。此方法可进一步应用于皮肤炎患者外周血Treg淋巴细胞亚群的深入分析。

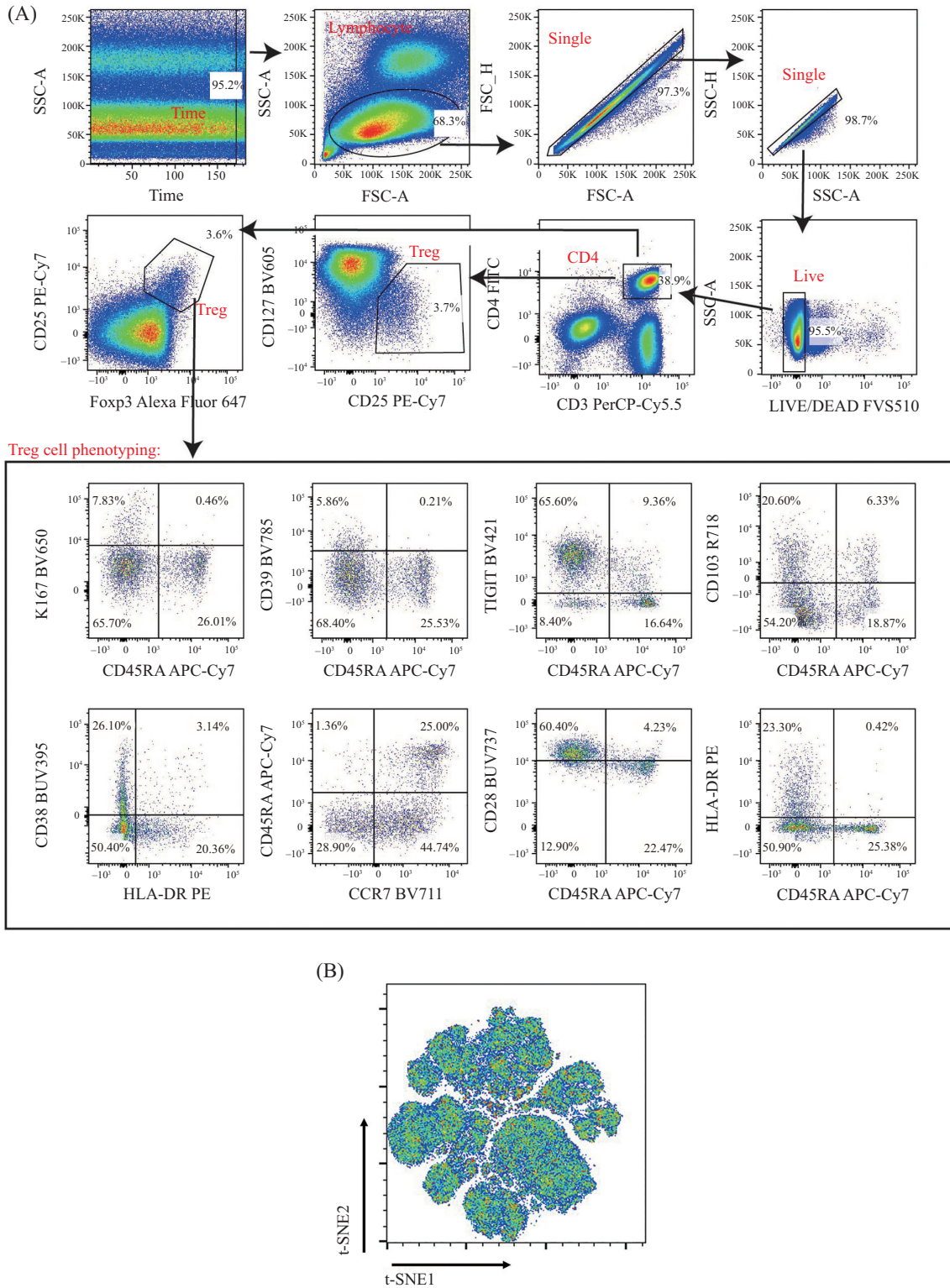
3 讨论

多色流式分析结果受多种因素的影响, 比如仪器条件设置(电压、补偿等)、抗体染色浓度、时间、孵育温度、孵育环境、荧光素放置时间等^[16-17]。因此, 本研究首先以最大利用为原则, 充分考虑实验室常用流式细胞分析仪通道, 初步建立了15色的检测Panel, 然后对每一个检测通道分别进行了电压滴定实验。但是, 滴定后电压并不是都是最优电压, 检测时还需要根据具体荧光补偿情况进一步优化电压, 单染管在自身通道电压应大于溢漏通道电压, 这样补偿值会小一些。而对于一些背景荧光较强的样本, 不建议通过降低电压的方式将细胞拉回左下象限, 而是尽量寻找降低背景的方法, 比如做抗体滴定, 增加洗涤次数或使用Fc阻滞剂减少非特异性结合。

实验室目前常用的抗体主要分两大类, 串联染料抗体和非串联染料抗体。非串联染料荧光染料稳定性好, 串联染料容易降解^[16]。因此, 本研究选取代表性的两种抗体, 非串联染料抗体FITC Mouse anti-Human CD4和串联染料抗体PerCP-Cy5.5 Mouse anti-Human CD4, 研究各种染色条件对结果的影响,

结果发现对于两种抗体, 染色时间对其染色效果影响不同。非串联染料抗体FITC会随着染色时间延长, 染色指数(SI)升高, 而串联染料抗体PerCP-Cy5.5, 其SI值随时间延长而降低(图3B), 可能随着染色时间延长, 串联染料抗体的非特异性结合增加较多, 延长染色时间并不会提高其阳性群和阴性群的分离效果, 这与前人研究结果略有不同; 张晓茹等^[16]认为对于串联荧光染料标记的抗体APC-eFlour780 Rat Anti-Mouse CD11b随着染色时间的延长, 其染色指数不断升高, 这可能是抗体来源不同导致结果差异。综合多色Panel考虑, 抗体染色时间30 min为宜, 染色环境最好是4 °C。另外, 本研究亦考察了可见光对抗体染色指数的影响, 虽然避光与否对FITC染色指数无显著影响(图4A), 但避不避光, 其细胞阴性群与阳性群分离效果不同(图4C)。而对于串联染料抗体PerCP-Cy5.5, 避光条件下的SI值和细胞分群情况均明显优于可见光条件下的(图4B和图4D), 因此, 无论FITC还是PerCP-Cy5.5, 均是在避光条件下孵育较好。同时, 该结果也揭示了多色流式分析时, 不仅要取高SI值的条件, 同时也要注意细胞阴性群和阳性群的实际分群情况。张雪等^[18]研究发现, 一般流式抗体的荧光寿命都相对较短, 建议现做现检测, 以减少荧光曝光的时间, 保证结果准确无偏差。本研究探索了荧光素放置时间对染色指数的影响, 结果表明非串联染料抗体染色24 h后, 其SI值显著降低, 串联染料抗体在48 h时, 其SI显著降低。由此推测, 多色Panel的样本染色后应即刻检测, 放置时间不宜超过24 h, 这与前人结果基本一致。

随着流式检测技术的不断发展, 流式细胞标记技术已经可以实现同时标记数十种细胞标志物(胞外、



A: Treg淋巴细胞亚群的圈门策略。先圈选除碎片或死细胞以外的淋巴细胞亚群，然后圈定单个细胞排除黏连，再圈出活细胞群。然后分析CD3⁺细胞中CD4⁺ T细胞亚群的情况。利用CD25^{hi}/CD127^{low} and CD25^{hi}/Foxp3⁺确定出Treg淋巴细胞亚群，再分析Treg淋巴细胞各表型分子表达情况。B: 利用Opt-SNE降维算法，根据流式抗体表达情况分析CD3⁺ T淋巴细胞亚群。

A: proposed gating strategy of Treg cell subsets. Aggregate gates are used to exclude cell and/or dye aggregates prior to identification of lymphocytes. Following identification of singlets, viable cells are differentiated from nonviable cells. Afterward, CD3⁺/CD4⁺ T cell subsets are identified. Determination of Treg cell subsets within CD25^{hi}/CD127^{low} and CD25^{hi}/Foxp3⁺ subsets. Then Treg cell phenotyping are analysed by related markers. B: Opt-SNE plot showing the separation of CD3⁺ T cell subsets based on flow cytometry marker expression level.

图7 健康人外周血中Treg淋巴细胞亚群分析策略图

Fig.7 Analysis strategy of Treg lymphocytes subsets in PBMCs of healthy controls

胞内或核内)并在一次实验完成全部检测,这对于临床较少的样本量下获得更多的信息非常重要^[14]。近年来,文献陆续报道利用多色流式细胞技术分析人外周免疫系统中的大多数免疫亚群^[19-21]。本研究建立的15色T细胞相关流式检测方案,相对于一些高参数(大于20色)的Panel,检测通道较少,更适用于一般的流式细胞分析仪(如BD Fortessa标配是5激光18通道,Beckman CytoFLEX LX标配是5激光19通道),具有实验室广谱适用性,在高灵敏度地检测特异指标的同时具有操作简便性,更易于推广使用,且该15色Panel不仅包括一系列免疫细胞亚群分群的表型分子,还包括与T细胞分化相关的分子,对受持续抗原暴露刺激下的T细胞活化起调节作用的抑制性分子,趋化因子受体分子,激活相关分子,增殖相关分子及细胞成熟与归巢受体分子等,可全面分析皮肤炎患者外周血Treg淋巴细胞免疫亚群分布情况,为临床诊治提供可行性参考。本研究数据经过FlowJo软件进行降维等一系列高阶分析,可以可视化地显示样本中T细胞亚群的不同分布情况(图7B)。由此推测,该Panel可应用于探索皮肤炎可能的发病机制,从而有助于制定更个性化的治疗方法。这也是本文后续继续研究的方向。

参考文献 (References)

- [1] GONO T, KUWANA M. Current understanding and recent advances in myositis-specific and-associated autoantibodies detected in patients with dermatomyositis [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2020, 16(1): 79-89.
- [2] CARTRON A M, OSLER M, CHUNG C, et al. Nuclear matrix protein 2 antibody-positive adult dermatomyositis: a case report and review of the literature [J]. *Dermatol Online J*, 2020, 26(3): 13030/qt9n50x88m.
- [3] FENG M, GUO H, ZHANG C, et al. Absolute reduction of regulatory T cells and regulatory effect of short-term and low-dose IL-2 in polymyositis or dermatomyositis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 77: 105912.
- [4] ZHANG S X, WANG J, SUN H H, et al. Circulating regulatory T cells were absolutely decreased in dermatomyositis/polymyositis patients and restored by low-dose IL-2 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2021, 80: e130.
- [5] HAUFE S, HAUG M, SCHEPP C, et al. Impaired suppression of synovial fluid CD4⁺CD25⁻ T cells from patients with juvenile idiopathic arthritis by CD4⁺CD25⁺ Treg cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(10): 3153-62.
- [6] PANDYA J M, LOELL I, HOSSAIN M S, et al. Effects of conventional immunosuppressive treatment on CD244⁺ (CD28null) and FOXP3⁺ T cells in the inflamed muscle of patients with polymyositis and dermatomyositis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18: 80.
- [7] VILLALTA S A, ROSENTHAL W, MARTINEZ L, et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(258): 258ra142.
- [8] 班玉梅, 霍伟, 赵萌, 等. 一种新的淋巴细胞亚群流式细胞检测方法的建立[J]. *标记免疫分析与临床(BAN Y M, HUO W, ZHAO M, et al. A novel method of applying flow cytometry to detect lymphocyte subsets [J]. Labeled Immunoassays & Clin Med)*, 2021, 28(7): 1235-42.
- [9] 阳莉, 陈晓燕, 蔡惠宁, 等. 标本保存时间对健康人外周血淋巴细胞亚群分析的影响[J]. *中国免疫学杂志(YANG L, CHEN X Y, CAI H N, et al. Effect of storage time of samples on analysis of healthy peoples' peripheral blood lymphocyte subsets [J]. Chinese Journal of Immunology)*, 2021, 37: 1744-6.
- [10] ZOFIA M, CHATTOPADHYAY P K, JAIN P. Basic multicolor flow cytometry [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2017, doi: 10.1002/cpim.26.
- [11] DONALDSON M M, KAO S F, FOULDS K E. An 18-color panel for measuring Th1, Th2, Th17, and Tfh responses in rhesus macaques [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(3): 261-3.
- [12] HEALY Z R, MURDOCH D M. Co-inhibitory receptor (immune checkpoint) expression analysis in human T cell subsets [J]. *Cytometry A*, 2016, 89(10): 889-92.
- [13] NOWATZKY J, STAGNAR C, MANCHES O. Identification, classification, and isolation of major FoxP3 expressing human CD4⁺ Treg subsets [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(3): 264-7.
- [14] 李捷, 赵志斌, 王崧榕, 等. 28色流式对中轴型脊柱关节炎患者外周血中T细胞亚群差异的鉴定[J]. *中国免疫学杂志(LI J, ZHAO Z B, WANG S R, et al. A 28-color flow cytometry panel for identification of T cell subsets in peripheral blood of patients with axial spondyloarthritis [J]. Chinese Journal of Immunology)*, 2020, 36(13): 1615-8,1624.
- [15] MAIR F, TYZNIK A J. High-dimensional immunophenotyping with fluorescence-based cytometry: a practical guidebook [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2032: 1-29.
- [16] 张晓茹, 张明英, 刘怡宁, 等. 抗体滴定在血液细胞流式细胞术中的应用[J]. *生物技术进展(ZHANG X R, ZHANG M Y, LIU Y N, et al. Application of antibody titration in flow cytometry of hematopoietic cells [J]. Current Biotechnology)*, 2020, 10(3): 284-91.
- [17] 任方刚, 张娜, 徐智芳, 等. 温度、时间及抗凝剂对流式细胞术检测T淋巴细胞亚群的影响[J]. *国际检验医学杂志(REN F G, ZHANG N, XU Z F, et al. Effects of temperature, time and anticoagulant on the detection of T lymphocyte subsets by flow cytometry [J]. International Journal of Laboratory Medicine)*, 2019, 40: 181-3.
- [18] 张雪, 刘涛, 杨宁, 等. 流式细胞术多色方案的方法学探讨[J]. *新疆医科大学学报(ZHANG X, LIU T, YANG N, et al. A methodological approach to the multi-color scheme of flow cytometry [J]. Journal of Xinjiang Medical University)*, 2017, 40(3): 308-10.
- [19] NOGIMORI T, MORIISHI E, IKEDA M, et al. A 22-color panel for the measurement of antigen-specific T-cell responses in human and nonhuman primates [J]. *Cytometry A*, 2021, 99(9): 884-7.
- [20] SAHIR F, MATEO J M, STEINHOFF M, et al. Development of a 43 color panel for the characterization of conventional and unconventional T-cell subsets, B cells, NK cells, monocytes, dendritic cells, and innate lymphoid cells using spectral flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2020, doi: 10.1002/cyto.a.24288.
- [21] VANIKOVA S, KOLADIYA A, MUSIL J. 29-color flow cytometry panel for comprehensive evaluation of NK and T cells reconstitution after hematopoietic stem cells transplantation [J]. *Cytometry A*, 2022, 101(1): 21-6.