

# 流式细胞术在神经细胞研究中的应用进展

权丽娟 张敏\*

(中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心, 上海 200031)

**摘要** 流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种对液流中排成单列的细胞或生物微粒逐个进行快速定量分析和分选的技术。近年来荧光驱动的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)广泛应用于神经细胞研究领域。该文将流式细胞分选与其他分选方法进行了对比,并评述了流式细胞术在神经细胞中的研究应用,总结了流式细胞术在神经细胞研究中的技术难点及解决途径,以期通过流式新技术更好地寻找针对神经系统发育相关性疾病的治疗思路和线索。

**关键词** 流式细胞术; 荧光驱动的细胞分选; 神经细胞; 抗体标记; 多色流式

## Advances in the Application of Flow Cytometry in Nerve Cells Research

QUAN Lijuan, ZHANG Min\*

(Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** FCM (flow cytometry) is a rapid quantitative analysis and sorting technology of cells or biological particles in a liquid stream. FACS (fluorescence-activated cell sorting) has been widely applied in the field of neuron cell research during the recent years. This paper compares FACS with other three sorting methods, and reviews the application of FCM in neuron cell research. At last, this article discusses the technical difficulties and solutions of FCM, expecting to look for the therapy clue of neuron system disease with new technology of flow cytometry.

**Keywords** flow cytometry; fluorescence activated cell sorting; neuron cell; antibody label; multi-color flow

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是利用流式细胞仪对处在快速直线流动状态中的细胞或生物颗粒同时进行多参数、快速定量分析和分选的技术,是一种重要的临床诊断技术,广泛应用于免疫学、肿瘤学和基础生物医学研究<sup>[1]</sup>。近些年流式细胞术在研究神经细胞分型、神经元和胶质细胞功能与神经性疾病机制中发挥着重要作用,同时,也为富集纯化特定神经细胞提供了有效的手段。本文根据流式细胞术在神经细胞的研究应用,评述了该技术在神经科学领域的应用进展。

### 1 流式细胞术的原理与技术发展

流式细胞术(flow cytometry)是20世纪60年代后期开始发展起来的利用流式细胞仪(flow cytometer)

快速定量分析细胞群的物理化学特征以及根据这些物理化学特征精确分选细胞的技术,它包括液流系统、光路系统和检测分析系统三部分<sup>[2]</sup>,分选型流式细胞仪在以上基础上还增加了分选系统。流式细胞仪采集的光信号包括散射光信号和荧光信号两种,液流中悬浮的细胞能够使激光束发生散射,散射光信号包括正对激光方向接收的前向角散射光(forward scatter, FSC)和与激光方向在同一水平面并于激光成90°角的侧向角散射光(side scatter, SSC)。散射光信号可反映细胞大小和颗粒度等物理特征;而细胞上结合的荧光素被激光激发后能够发射波长高于激发光的荧光,通过分析荧光信号来反映细胞表达抗原、合成细胞因子等化学特征<sup>[2]</sup>。FARROW等<sup>[3]</sup>学者应用流式细胞术分析了成年小鼠在不同的IPC(information processing capacity)条件下不同脑区神经元的大小及数量。一般来说在流式细胞检测中,FSC可以反映细胞的大小,FSC强则细胞大一些,反

收稿日期: 2022-04-20

接受日期: 2022-08-15

\*通讯作者: Tel: 13917503501, E-mail: zhangmin@ion.ac.cn

Received: April 20, 2022

Accepted: August 15, 2022

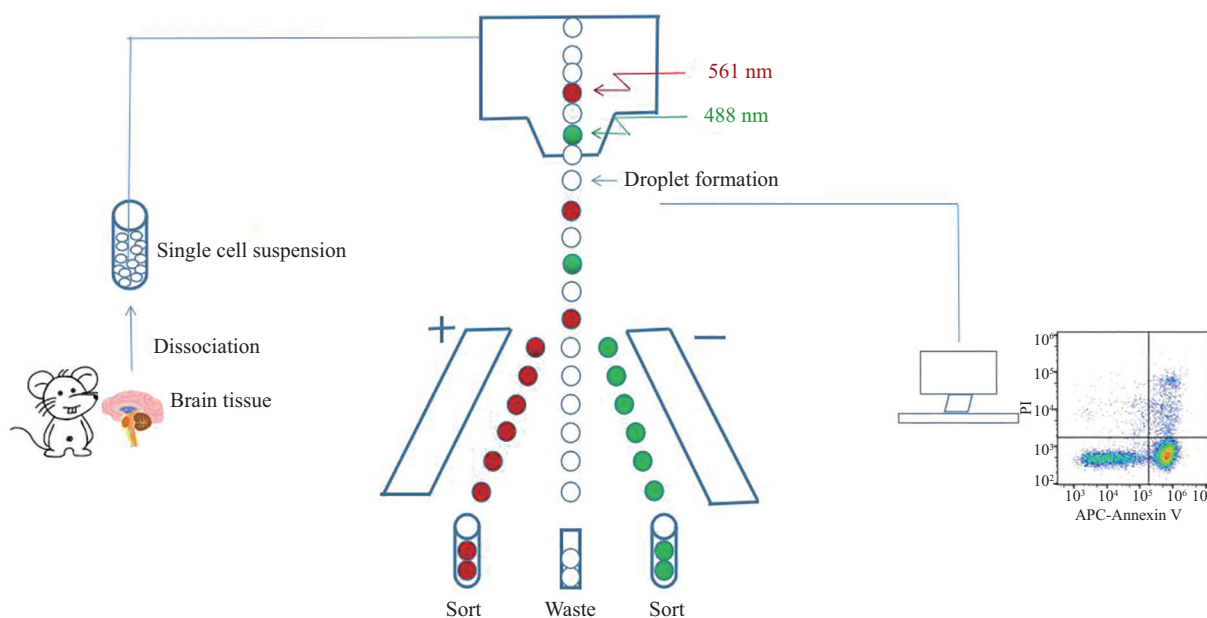
\*Corresponding author: Tel: +86-13917503501, E-mail: zhangmin@ion.ac.cn

之则细胞小一些。该实验通过不同大小的微球得到不同的FSC强度, 解剖分离不同脑区组织, Neu-N特异性标记神经元, 通过流式数据分析得到了不同脑区神经元的大小和数量。由此可见, 通过流式细胞术可对神经元进行定性和定量分析。

流式细胞术主要应用于生命科学的基础研究, 尤其是免疫学、细胞生物学和分子生物学, 上世纪80年代后期开始应用于临床研究, 近代免疫组化技术的发展推动了流式荧光抗体标记技术的进步, 极大地提高了研究的靶向性。目前流式细胞术已被成熟地运用在科研及各种疾病诊疗过程中, 荧光驱动的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)最初于1972年被提出, 是基于荧光信号驱动的细胞分选技术, 可根据特定的荧光信号将目标细胞群分选纯化从而进行无菌细胞培养或后续的研究分析<sup>[4]</sup>。其分选原理是把液滴形成的信号加在压电晶体上使之产生机械振动, 流动室即随之振动, 使液柱断列成一连串均匀的液滴, 一部分液滴中包有细胞, 而细胞性质是在进入液滴以前已经被测定了的。如果其特征与被选定要进行分选的细胞特征相符, 则仪器在这个被选定的细胞刚形成液滴时给整个液

柱充以指定的电荷, 使被选定的细胞形成液滴时就带有特定的电荷, 而未被选定细胞形成的细胞液滴和不包含细胞的空白液滴不被充电。带有电荷的液滴向下落入偏转板的高压静电场时, 按照所带电荷符号向左或向右偏转, 落入指定的收集器内, 完成分类收集的目的, 对分选出的细胞可以进行无菌培养或其他后续实验, 做更深入的研究(图1)。

随着流式细胞术的快速发展, 多色流式进入了神经细胞的研究领域, 多色流式可以测量更多标记荧光参数, 光谱流式和质谱流式的出现极大地解决了多色流式细胞术的数据获取, 光谱流式细胞仪仍然用荧光染料标记抗体, 但用色散光学和测量全发射光谱的新型探测器取代了传统光学和探测器。光谱流式细胞术和传统的流式细胞术均保持了相当好的兼容性, 但光谱流式细胞术可以更好地消除混淆因素, 如光谱重叠, 以提高效率, 因此光谱流式细胞术有可能取代传统流式细胞术<sup>[5]</sup>。质谱流式细胞技术(mass cytometry)是利用质谱原理对单细胞进行多参数检测的流式技术。它继承了传统流式细胞仪高速分析的特点, 又具有质谱检测的高分辨能力, 可为神经细胞的深入研究提供多维度的精准数据, 是流



流式细胞仪的液流系统负责将样品从样品管转移到流动池。在流动池中经激光照射产生散射光信号和荧光信号, 通过流式软件分析样品理化性质并将其分选出来或移到废液中。

The flow system of the flow cytometer is responsible for transferring the sample from the sample tube to the flow cell. Scattered light signals and fluorescence signals of sample are generated by laser irradiation in the flow cell, and the physicochemical properties of the sample are analyzed by flow cytometry software and the samples are sorted out or moved to the waste liquid.

图1 流式细胞荧光分选技术(FACS)原理

Fig.1 The principle of fluorescence activated cell sorting

式细胞技术一个新的发展方向<sup>[6]</sup>。

## 2 流式分选与其他细胞分选方法对比

### 2.1 激光扫描细胞仪

激光扫描细胞仪(laser scanning cytometry, LSC)是一种基于显微镜的细胞荧光计<sup>[7]</sup>。激光聚焦光束通过检流计驱动的一组透镜来获得光束的直径,然后经过显微镜的长通滤片,从而在标本上形成2.5至10 nm直径的光束。激光激发置于载玻片上的荧光染色细胞,具有很高的灵敏度。LSC具有流式细胞术和图像流式细胞术的特性。大脑中的神经元即使在相同的形态或生理类型的细胞中,也有一系列的异质性<sup>[7]</sup>,LSC能够以多组参数分析细胞及形态。在20世纪90年代,LSC作为流式细胞术和荧光图像分析的补充仪器在许多实验室中应用于各种不同的研究场景<sup>[8]</sup>,缺点是检测样本需要固定,不能用于活细胞,同时由于自身荧光和使用抗体时的非特异性标记,背景水平高。另一种研究神经元异质性的现代技术是激光干涉测量法,它可以用来评估单个细胞和亚细胞细胞器的变化。激光干涉显微镜的方法有几个重要的优势:不染色分析活细胞,获得神经元的体积图像和亚细胞结构的分布,并获得有关细胞和组织结构的所有三维信息<sup>[9]</sup>。

### 2.2 激光捕获显微切割

激光捕获显微切割(laser capture microdissection technology, LCM)是在不破坏组织结构且保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下,直接从组织切片中获取目标细胞,通常用于从组织中精确地分离出一个单一的细胞。早在2010年,就有研究者应用LCM分离果蝇外周神经系统中树突状神经元,提取RNA进行下游基因表达图谱研究<sup>[10]</sup>。近期在脊髓肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)的研究中,学者应用激光捕获微解剖结合RNA测序(LCM-seq)研究离散神经元群体的动态转录状态<sup>[11]</sup>。他们发现,GDF15可以明显降低人类脊髓运动神经元退化程度,为未来旨在保护脆弱运动神经元的基因治疗研究提供了可能。LCM最显著的优点在于其迅速、准确和多用途的特性。结合组织结构特点以及所需的切割精确度,通过选择不同直径的激光束,以减小对细胞的伤害,从而可以迅速获取大量的目标细胞和不同类型细胞多维度的空间转录信息。与FACS相比,LCM需要通过图像获取人为识别细胞异

质性,尤其是一些不具有明显特殊形态的细胞,在选择目标细胞时可能会出现误差,而FACS可依据荧光信号同时分选多参数目标细胞,进行高通量精确分选。

### 2.3 免疫活化细胞分选

磁性活化细胞分选(magnetic activated cell sorting, MACS)也是目前比较常用的细胞富集技术。MACS可以通过结合特异性抗体的磁珠纯化细胞并已广泛应用于细胞分离<sup>[12]</sup>,因为它需要更少的时间和更便宜的设备要求。而FACS是基于荧光标记的生化抗体,细胞可以被分离在各种参数中。它能够处理数以百万计的细胞和分离多个、高纯度的亚群。然而,它也具有相对耗时较长的缺点:需要非常大的细胞数量和昂贵的机器。MARIKO等<sup>[13]</sup>用MACS分离出小鼠下丘脑小胶质细胞研究高脂肪饮食条件下脑区炎症的不同过程,通过基因表达分析得出PTP1B是能量代谢的重要调控因子。PAN等<sup>[14]</sup>比较了FACS和MACS对小胶质细胞和星形胶质细胞的分选效果,认为MACS和FACS处理均可获得高活力的小胶质细胞和星形胶质细胞。虽然FACS比MACS要花更长的时间来完成,但是经流式细胞分选后细胞纯度更高,更适合后续的单细胞测序研究。而且FACS可同时标记多个荧光抗体参数,并分选出多个荧光标记的神经细胞,获得更多的研究参数<sup>[14]</sup>。通过四种细胞分选方法的对比发现,FACS可同时实现高纯度、高通量、多参数的目标细胞的分选,广泛应用于各类神经细胞的分析分选研究中(表1)。

## 3 流式细胞术在神经细胞中的应用

### 3.1 神经细胞的流式分析及分选

神经细胞由多种细胞类型组成,神经元-小胶质细胞-星形胶质细胞“三联体”的正常功能是大脑功能组织的基础<sup>[15]</sup>。在神经细胞抗体标记技术应用之前,各种特定类型的神经细胞中表达报告基因的转基因动物是研究神经网络形成的有力工具<sup>[16]</sup>。2006年MARY等<sup>[17]</sup>首次应用FACS分离转基因小鼠*GENSAT BAC*中特异性表达增强的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的中棘神经元(medium spiny neuron, MSN)亚型,研究了成熟哺乳动物大脑中细胞类型特异性基因表达图谱。后续的研究表明,将转基因斑马鱼脑部制备成单细胞悬液,通过FACS有效分离斑马鱼幼鱼中枢神经系统荧



表1 四种不同分选方法的异同

**Table 1 The computation of four soring methods**

方法 Method	活细胞分选 Live cell sorting	抗体 Antibody	检测参数 Test parameters	高通量 High throughput	胞内染色 Intracellular staining	精确度 Precision
FACS	Yes	Fluorescence	Multi	Yes	Yes	High
LSC	No	Fluorescence	Multi	Yes	Yes	Medium
LCM	Yes	Fluorescence	Multi	Yes	Yes	High
MACS	Yes	Megnetic beads	Single	Yes	No	High

光标记细胞, 可用于特定细胞群的基因表达谱分析<sup>[18]</sup>。虽然转基因模型为研究可提供稳定的研究对象, 但神经系统是一个很复杂的网络系统, 而且转基因模型的构建需要通过分子克隆, 显微注射和荧光显微检测过程, 其构建时间较长。

近代免疫组化技术的发展推动了流式荧光抗体标记技术, 极大地提高了神经系统研究的靶向性。三十年前, 流式细胞术首次被用于分离大鼠下丘脑视上核(supraoptic nucleus, SON)和室旁核(paraventricular hypothalamic nucleus, PVN)含后叶激素运载蛋白(neurophysin)的大细胞神经元<sup>[19]</sup>, 这类特异性细胞只占SON和PVN分离组织中所有细胞的不到2%。用细胞内抗体荧光标记和荧光素偶联第二抗体标记后, 通过FACS分离出一个含有80%~85%神经元的高度富集群体。然而, 自该研究报道以来, 流式细胞术在神经科学领域的应用发展较为缓慢。这可能是由于很难从脑组织中获得单细胞悬液或标记抗体的限制。随着近些年流式细胞仪的发展和流式细胞术的广泛应用, 已有的研究表明应用神经细胞抗体标记技术应用后, 研究人员通过FACS技术得到高纯度、高活性的荧光标记的神经细胞, 这对下游单细胞组学研究起到了至关重要的作用。研究人员可将转基因模型和抗体标记技术结合起来提高神经细胞研究的特异性和靶向性。有报道称利用泛神经元*Baf53b-Cre19*小鼠与*R26R-Tomato*报告小鼠交配, 分别用HUC/D和SOX2/10特异性标记肠内神经元和小胶质细胞<sup>[20]</sup>。他们通过流式细胞术对神经细胞进行分类研究, 预测了不同肠神经元类别定向分化的关键调控因子, 同时也为治疗肠道疾病提供了理论支撑。最新研究表明, 通过FACS技术分析哺乳动物新皮层和海马体结构的转录组细胞类型, 科研人员建立新皮层和海马体的分子结构, 并阐明分子结构与大脑结构的发育、进化、连通性和功能的潜在关系<sup>[21]</sup>。

### 3.2 神经细胞的流式单细胞组学应用

近些年随着单细胞组学越来越广泛的应用, 高灵敏度的超低起始量和单细胞RNA测序(RNA-seq)法使研究人员能够探索复杂组织中胞单个细胞的不同生物学特性, 了解细胞亚群的异质性。2016年研究人员首次应用流式细胞术分选出了Neu-N标记的单个神经元细胞。他们通过转录组测序对分布在脑皮质中6个不同Brodman区域的3 200多个神经元细胞进行了分析, 从而确定了16种神经元亚型。这位“绘制”人脑神经元细胞基因表达图谱奠定了基础, 使人们能够更好地理解人脑正常功能及疾病异常<sup>[22]</sup>。

在单细胞组学中, 微流控技术也被应用到小鼠或斑马鱼神经元单个细胞的获取和培养<sup>[23]</sup>。在微流控芯片中, 结合流体动力学设计的微筛结构与单细胞操控单元, 可以实现接近100%的单细胞捕获率, 并最大程度地减少细胞的损失, 这种方法比较适合于细胞数量有限的生物样品的分析<sup>[24]</sup>。GOKCE等<sup>[25]</sup>在纹状体细胞亚群的研究中使用微流控单细胞RNA测序(mic-scRNA-seq)和流式分选单细胞测序(FACS-scRNA-seq)检测了分别来自D1-tdTomato(tdTom)/D2-GFP和Aldh111-GFP小鼠的1 208个单侧纹状体细胞的转录组。这1 208个单细胞中, 既有随机捕获的单细胞, 也有特异性富集的中棘神经元和星形胶质细胞, 通过tSNE聚类分析和已知神经细胞标记鉴定出主要的纹状体细胞类型, 流式细胞技术富集的Aldh111-GFP小鼠的细胞大多是星形胶质细胞, *Drd1-tdtom/Drd2-GFP*细胞主要是神经元细胞。

scRNA-seq对于单细胞悬液的细胞活性和细胞数目有着较高的要求, 一些细胞类型更容易受到组织解离过程和流式分选过程影响。比如在成人的新大脑皮层中, 非神经元细胞在解离中比神经元耐受性更好, 在单细胞悬浮液中大量存在, 神经元的活性和数量在解离过程中会大量下降, 在近期的研究

中,有学者指出可通过化学固定的方法,使用甲醇固定来稳定和保存离体细胞数周,进而应用Drop-seq进行单细胞分型分析<sup>[26]</sup>,研究发现固定后的单细胞RNA测序数据与固定前的有很好的一致性,为单细胞分析提供了多角度多参数的样本来源,从而获得更多的生物信息。后续研究发现细胞核对机械处理更有抵抗力,可以从冷冻组织中分选出来<sup>[27]</sup>。单个细胞核已被证明可以提供足够的基因表达信息来定义不同脑区的神经细胞类别。由于单细胞核RNA测序技术(snRNA-seq)的研究对象为细胞解离后得到的细胞核,所以对细胞活性要求不高,该技术更适合一些稀少细胞类型和冰冻样本的细胞分析<sup>[28]</sup>。最新的研究表明应用FACS技术可以精确分选小鼠Neu-N标记的神经元细胞核,再通过ATAC-seq研究了大脑神经元发育过程中染色质调控机制,并提出了FACS结合ATAC-seq技术可获得特异性神经细胞的染色质信息,为大脑神经细胞转录组研究提供了更全面的神经元基因调控信息<sup>[21]</sup>。

### 3.3 神经细胞的流式多色研究

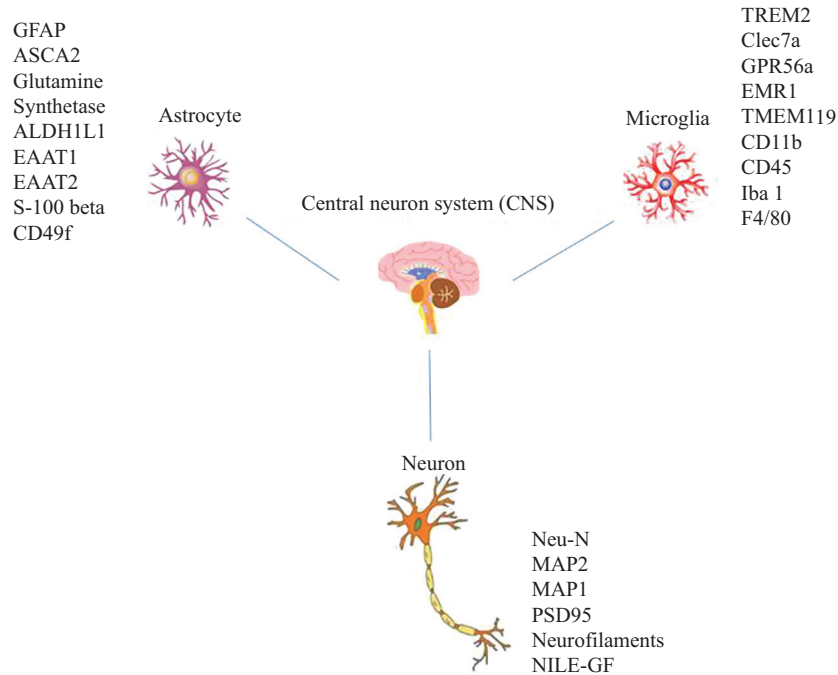
质谱流式和光谱流式的广泛应用,为研究神经细胞作用机制提供了更深入的研究和多维度的数据分析。质谱流式细胞技术和传统流式细胞术相比,主要有两点不同:第一,标签系统的不同,前者则使用各种金属元素作为标签,后者主要使用各种荧光基团作为抗体的标签;第二,检测系统的不同,前者使用ICP质谱技术作为检测手段。而后者使用激光器和光电倍增管作为检测手段,质谱流式通过ICP质谱检测手段弥补了传统流式多个荧光检测通道的补偿问题,增加了流式检测的精确性<sup>[29]</sup>,但是由于金属氧化、抗原丰度敏感性、金属杂质和同位素污染等因素影响,质谱流式细胞术仍然会有信号溢出等问题。为了得到准确的信号值,研究人员针对质谱流式细胞术的信号溢出问题提出了信号值线性补偿方法和非线性补偿方法,这极大地提高了数据的准确性<sup>[30]</sup>。BEN等<sup>[31]</sup>研究人员应用质谱流式细胞术联合单细胞测序通过多参数分析大脑神经细胞中免疫分子作用,初步绘制了大脑免疫系统图谱,为形成大脑不同病理条件和正常情况下的免疫分子表达图谱提供了大量的信息。目前上市的质谱流式的抗体标记有400余种,但是由于特殊的金属离子标记方法使得人源性小胶质细胞的常用标记如TMEM119、Clec7a、TREM2、EMR1和GPR56a并没有应用在质

谱流式中<sup>[32]</sup>,我们期待通过流式新技术更好地寻找针对神经系统发育相关性疾病的治疗思路和线索。

## 4 总结与展望

在神经细胞的流式技术研究中如何正确选择相应的流式抗体作为标记来发现神经元细胞功能的研究具有非常重要的意义<sup>[33]</sup>。目前大部分神经细胞抗体来源于神经元的胞质蛋白和细胞骨架蛋白。另外,神经元具有高度区域化的结构,这使得它们有别于神经系统中的其他细胞类型(图2)。研究表明,人们可以运用神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)和非神经元特异性烯醇化酶(non-neuronal enolase, NNE)分别为神经元和神经胶质细胞进行特异标记<sup>[34]</sup>。另外一些糖蛋白如神经核(Neu-N)也可作为神经元标记物<sup>[35]</sup>,近期有研究人员对大脑中的内嗅皮层神经元标记作了系统的总结,为人们对神经元的深入研究提供了详实的参考数据<sup>[36]</sup>。小胶质细胞的特异性标记物为整合素 $\alpha$ M(ITGAM/CD11b)、表面糖蛋白F4/80、CD45、Iba1和TMEM119<sup>[37]</sup>。星形胶质细胞的最具特异性的标记物是GFAP和S100 $\beta$ <sup>[37]</sup>。研究人员使用细胞内标记物(Tuj-1或GFAP)的特异性抗体,通过流式细胞术区分神经元和星形胶质细胞<sup>[38]</sup>。他们通过荧光显微镜和流式细胞术并没有发现原代培养的神经元和胶质细胞中Tuj-1和GFAP阳性细胞的数量有任何显著差异。随着抗体技术的发展,后续研究发现ACSA2可作为星形胶质细胞标记物,用于分离出生后和成人大脑中的星形胶质细胞。该方法更适用于新生儿星形胶质细胞的纯化,通过流式细胞术可以获得纯度较高的星形胶质细胞,有助于深入测序等相关研究<sup>[32]</sup>。LILIANNE等<sup>[39]</sup>近期发现,CD49f是一种新的人类星形胶质细胞标记物,表达于健康和患病个体的胎儿和成人大脑中。通过FACS可得到纯化的标记CD49f<sup>+</sup>星形胶质细胞。

另外,获取有意义的信息的一个主要挑战是使用高质量的单细胞悬液,它适当地反映了每个细胞在其自然或实验预期环境中的转录状态。因此制备单细胞悬液是流式细胞术实验的关键步骤<sup>[40]</sup>。细胞和细胞外基质包含各种蛋白质和其他结构,在设计组织消化方案时必须考虑这些结构,以在消化基质成分和切割细胞-细胞连接时保存细胞的活力和相关抗原的存在。许多分离细胞的方法已经被成功应用于神经组织的研究中,这些方法包括机械法、酶法消化



免疫组化仍是研究神经细胞类型的主要方法。目前已有大量的免疫组化标记物来帮助区分神经细胞类型和状态。

Immunohistochemistry is still the main method to study nerve cell types. A large number of immunohistochemistry markers have been developed to distinguish nerve cell types and states.

图2 神经细胞常用抗体标记

Fig.2 Commonly used antibody marker of nerve cells

(如木瓜蛋白酶<sup>[41]</sup>、胰蛋白酶<sup>[42]</sup>、胶原酶<sup>[43]</sup>)。非酶切的缺点是杀死大量细胞, 留下未解离的组织, 而粗酶切制剂可以切割重要的表面抗原。这阻碍了抗体滴定和流式细胞仪分析数据的重复性。研究表明, 酶制剂都能产生高效的单细胞解离和活力, 酶解效果较好的为木瓜蛋白酶(papain)、释放酶(liberase-1)、非动物源性重组酶(tryple)和细胞消化液(accutase)<sup>[40]</sup>。有学者就脑组织使用机械法和酶法解离过程是否影响基因表达作了相关研究, 研究结果表明在酶法消化过程由于生物因素可能会引起细胞特异性基因和蛋白的表达, 应该正确分析酶法消化组织后基因表达的数据, 尽量减少生物酶对细胞的影响<sup>[44]</sup>。与此同时, 减少细胞碎片对于流式细胞术结果来说也是至关重要的。Percoll作为常用的细胞分离液, 经脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理流式分选后得到的小胶质细胞和星形胶质细胞, 能够产生较高的细胞数量<sup>[45-46]</sup>。这表明, Percoll可以有效去除组织样中的大量碎片从而提高细胞纯度, DANIELLE等<sup>[47]</sup>应用percoll去除成年大鼠脑组织中大量的碎片和细胞团, 通过流式细胞分选出高质量的Neu-N标记的神经元。

再者, 神经细胞属于脆弱细胞, 由于流式细胞

分选是在高压电场中进行的。细胞在分选前会进行加电选择, 分选后的细胞活力会受到一定程度的影响, 所以如何提高脆弱细胞分选后细胞的活性是流式细胞亟待解决的问题<sup>[48]</sup>。已有的研究表明, 随着小鼠年龄的增加, 小鼠神经元的活性和数量有明显的下降趋势<sup>[47]</sup>, 所以成年小鼠的脑组织神经元活细胞的流式分选对仪器的分选设置条件更为严格。在仪器质控的基础上通过对液流系统的监测, 确保液流在整个实验过程中保持良好的稳定性。在分选过程中, 使上样区和收样区全程保持低温状态, 降低样品上样速度以确保神经元维持较高的活性<sup>[1]</sup>。此外由于神经组织解离为单细胞悬液的过程中, 消化酶的生物因素和解离中形成的髓鞘细胞和死细胞, 在结合荧光抗体时会形成非特异性的自发荧光<sup>[49]</sup>, 如何区分目标细胞的荧光信号和非特异性自发荧光信号, 在分选设门时可通过设置空白荧光通道排除自发荧光的干扰, 提高荧光信号数据获取的精确度。

综上所述, 脑神经元包括多种细胞类型和复杂的功能网络。随着流式细胞术的发展, 特别是新型的全光谱流式和质谱流式的应用, 可更深层次研究不同病理生理条件下中枢神经系统的功能及信号传



导途径。应用流式细胞术对靶细胞进行标记或其他参数分析,进行下游神经元功能、健康与疾病间基因多样性表达、基因组学和空间转录组的单细胞捕获等研究为人们理解中枢神经系统在脑功能中的作用提供了重要而新颖的方法和观点。

### 参考文献 (References)

- [1] ZHANG W H, ZHU L Q, ZHANG F, et al. Evaluating the liquid path stability of a flow cytometer [J]. *Cytometry Part A*, 2016, 89(10): 941-8.
- [2] 陈朱波, 曹雪涛. 流式细胞术: 原理, 操作及应用, 2版[M]. 北京: 科学出版社, 2014, 1.
- [3] FARROWA L F, ANDRONIXOS B N M, MCDONALDA P G, et al. Quantitative determination of neuronal size and density using flow cytometry [J]. *J Neurosci Methods*, 2013, 140(18): 3927-31.
- [4] SYLVIE J, MICHAEL S, LARA M, et al. FACS-mediated isolation of neuronal cell populations from virus-infected human embryonic stem cell-derived cerebral organoid cultures [J]. *Curr Protoc Stem Cell*, 2019, 48(1): 1-15.
- [5] NOLAN J P, CONDELLO D. Spectral flow cytometry [J]. *Curr Protoc Cytom*, 2013, 1: 1-27.
- [6] PALAK S, MINIAM Y K, GREGORY K B, et al. Unlabeled competitor antibody to reduce nonlinear signal spillover in mass cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(8): 898-909.
- [7] MEJIAS J F, LONGTIN A. Differential effects of excitatory and inhibitory heterogeneity on the gain and asynchronous state of sparse cortical network [J]. *Front Comput Neurosci*, 2014, doi: 10.3389/fncom.2014.00107.
- [8] ZBOGMOES D, ELABIETA B, XUM L, et al. Laser-scanning cytometry: a new instrumentation with many application [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 25: 1-12.
- [9] BRAZHE A R, BRAZHE N A, MAKSIMOV G V, et al. Phase-modulation laser interference microscopy: an advance in cell imaging and dynamics study [J]. *J Biomed*, 2008, 13(3): 34-42.
- [10] ESWAR P R, DANIEL N C. Laser capture microdissection of *Drosophila* peripheral neurons [J]. *J Vis Exp*, 2010, doi: 10.3791/2016.
- [11] SUSANNE N, JIK N, HELENA S, et al. LCM-seq reveals unique transcriptional adaptation mechanisms of resistant neurons and identifies protective pathways in spinal muscular atrophy [J]. *Genome Res*, 2020, 30(8): 1083-96.
- [12] GUNEYKAYA D, ANDRANIK I, DANIEL P H, et al. Transcriptional and translational differences of microglia from male and female brains [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(10): 2773-83.
- [13] MARIKO S, RYOICHI B, HIROSHI Y, et al. Hypothalamic glial cells isolated by MACS reveal that microglia and astrocytes induce hypothalamic inflammation via different processes under high-fat diet conditions [J]. *Neurochem Intl*, 2020, doi: 10.1016/j.neuint.2020.104733.
- [14] PAN J, WAN J. Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain [J]. *J Immunol Methods*, 2020, 486: 1-7.
- [15] ALLEN N J, BARRES B A. Neuroscience: glia-more than just brain glue [J]. *Nature*, 2009, 457: 675-7.
- [16] CHIE S, YUKIKO K, HIROMI H, et al. Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(3): 443-52.
- [17] MARY K L, STANISVA L K, MICHELLE G, et al. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9: 443-52.
- [18] RUTHERFORD H A, CLARKE A, CHAMBERS E V, et al. A zebrafish reporter line reveals immune and neuronal expression of endogenous retrovirus [J]. *Dis Model Mech*, 2022, 15(4): 1-18.
- [19] PADEN C M, BERGLUND D L, HAPNER S J, et al. A flow cytometric method for intracellular labeling and purification of rare neuronal populations: isolation of fixed neurophysin neurons [J]. *Brain Res*, 1986, 376(2): 310-9.
- [20] MORARACH K, MIKHAILOVA A, KNOFLACH V, et al. Diversification of molecularly defined myenteric neuron classes revealed by single-cell RNA sequencing [J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(1): 34-46.
- [21] ZIZHEN Y, CINDY T J, THUC N N, et al. A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation [J]. *Cell*, 2021, 10(12): 3222-41.
- [22] LAKE BB, AI R, KAESER G E, et al. Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain [J]. *Science*, 2016, 352: 1586-90.
- [23] PALLAVI G, ASHWINI S, KAVITHA I, et al. Microfluidic platforms for single neuron analysis [J]. *Materials Today Bio*, 2022, 13: 1-17.
- [24] AREZOO K, POUYA R, BRIEF F, et al. Microfluidic devices for embryonic and larval zebrafish studies [J]. *Genomics*, 2019, 18(6): 419-32.
- [25] OZGUN G, GEOFFREY M S, BARBARA T, et al. Cellular taxonomy of the mouse striatum as revealed by single-cell RNA-Seq [J]. *Cell Rep*, 2016, 26(16): 1126-37.
- [26] JONATHAN A, NIKOS K, SAMANTHA D, et al. Cell fixation and preservation for droplet-based single-cell transcriptomics [J]. *BMC Biol*, 2017, doi: 10.1186/s12915-017-0383-5.
- [27] EKATERINA E, ANASTASIA G, DANIEL S, et al. FACS-based isolation of fixed mouse neuronal nuclei for ATAC-seq and Hi-C [J]. *STAR Protocols*, 2021, doi: 10.1016/j.xpro.2021.100643.
- [28] DEVIN R, IVANA J, LYDIA T, et al. Cell type-specific chromatin accessibility analysis in the mouse and human brain [J]. *Epigenetics*, 2021, 29: 1-18.
- [29] STEPHANE C, HELENA L C, VITO R T Z, et al. Compensation of signal spillover in suspension and imaging mass cytometry [J]. *Cell Syst*, 2018, 6(5): 612-20.
- [30] PALAK S, MIRIAM Y K, GREGORY K B, et al. Unlabeled competitor antibody to reduce nonlinear signal spillover in mass cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(8): 898-909.
- [31] BEN K, TANIA D, ASYA R. Mass cytometry analysis of immune cells in the brain [J]. *Nat Protocols*, 2018, 13(2): 377-91.
- [32] FERNANDEZ-ZAPATA C, LEMAN J H, PRILLER J, et al. The use and limitations of single-cell mass cytometry for studying human microglia function [J]. *Brain Pathol*, 2020, 30(6): 1178-91.
- [33] HAYASHI K, MOTOI M, NOSE S, et al. An immunohistochemical study on the distribution of glial fibrillary acidic protein, S-100 protein, neuron-specific enolase, and neurofilament in medulloblastomas [J]. *Acta Pathol Jpn*, 1987, 37: 85-96.
- [34] JOH T, SHIKIMI T, PICKEL V, et al. Brain tryptophan hydroxy-

- lase: purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat mid-brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, 72: 3575-9.
- [35] BORIT A, BROOKS T, ORDONEZ N, et al. Central neural antigens: detection and diagnostic application [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1986, 23: 219-43.
- [36] KOBRO-FLATMOEN A, WITTER M P. Neuronal chemo-architecture of the entorhinal cortex: a comparative review [J]. *Eur J Neurosci*, 2019, 50(10): 3627-62.
- [37] KAMPHUIS W, MAMBER C, MOETON M, et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2012, doi 10.1371/journal.pone.0042823.
- [38] SOLENE S T, CARINE C, ISABELLE N, et al. Fluorescent activated cell sorting (FACS): a rapid and reliable method to estimate the number of neurons in a mixed population [J]. *J Neurosci Methods*, 2003, 19: 73-9.
- [39] LILIANNE B, TANYA J, MATTHEW Z, et al. CD49f is a novel marker of functional and reactive human ipsc-derived astrocytes [J]. *Neuron*, 2020, 107(3): 436-53.
- [40] ANDREW R, KEWAL A. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(2): 219-26.
- [41] HUETTNER J E, BAUGHMAN R W. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats [J]. *J Neurosci*, 1986, 6: 3044-60.
- [42] SAWAMOTO K, YAMAMOTO A, KAWAGUCHI A, et al. Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 65: 220-7.
- [43] RAO M S, LANDIS S C. Characterization of a target-derived neuronal cholinergic differentiation factor [J]. *Neuron*, 1990, 5: 899-910.
- [44] MATTEI D, IVANOV A, OOSTRUM M, et al. Enzymatic dissociation induces transcriptional and proteotype bias in brain cell populations [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 7944.
- [45] PANCHISION D M, CHEN H L, PISTOLLATO F, et al. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24 [J]. *Stem Cells*, 2007, 25: 1560-70.
- [46] BELEN C, FELIPE R, MIRIAM F, et al. Dissociation of neonatal and adult mice brain for simultaneous analysis of microglia, astrocytes and infiltrating lymphocytes by flow cytometry [J]. *IBRO Rep*, 2020, 8: 36-47.
- [47] DANIELLE G B, SANYA F, BRANDON K H, et al. FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain [J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 203: 10-8.
- [48] ALEKSANDRA B, DAVID R, JOANNA G, et al. Flow cytometry has a significant impact on the cellular metabolome [J]. *Proteome Res*, 2019, 18: 169-81.
- [49] JEREMY C B, RICHARD M R, MICHAEL M. Isolation of microglia and analysis of protein expression by flow cytometry: avoiding the pitfall of microglia background autofluorescence [J]. *Bio Protocol*, 2021, doi 10.21769/BioProtoc.4091.