

技术与方法——流式细胞术专题

小鼠多种组织调节性T细胞的流式细胞技术分析

江雪 刘鑫男 李斌*

(上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要 流式细胞技术(flow cytometry, FCM)是一种用于表征单细胞悬液中不同细胞类群的细胞和分子表型的前沿技术,是目前在免疫学研究中运用十分广泛的强大工具。流式细胞技术具有的高通量和多参数优点,使其在分析免疫细胞表型中发挥了至关重要的作用。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是一类抑制免疫反应、维持免疫稳态的T细胞亚群,特异性表达Foxp3转录因子。Foxp3⁺ Treg具有组织特异性,在机体不同组织中具有独特的生物学功能。该文旨在运用流式细胞技术对小鼠不同组织中的T细胞亚群进行分析,分离小鼠脾脏、肝、肺、结肠、淋巴结等组织中的Treg,并利用流式细胞术分析了解不同组织中Treg占比和增殖情况,为深入了解组织特异性Treg的功能提供参考。

关键词 流式细胞技术; 调节性T细胞; 组织特异Treg

Flow Cytometric Analysis of Regulatory T Cells from Various Mouse Tissues

JIANG Xue, LIU Xinnan, LI Bin*

(Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract FCM (flow cytometry) is a cutting-edge methodology used to characterize the cellular and molecular phenotypes of different cell groups in single-cell suspension. It is a powerful tool that is currently widely used in immunological research. With the advantages of high throughput and multi-parameters, FCM plays a vital role in the analysis of immune cell phenotypes. Treg (regulatory T cell), whose specific transcription factor is Foxp3, is a type of T cell subsets that suppresses immune response and maintains immune homeostasis. Many of tissue-specific Foxp3⁺ Treg groups have unique biological functions in different tissues. This article aims to use FCM to identify and analyze the T cell subpopulations in various tissues of mice, isolate Treg from spleen, liver, lung, colon, lymph nodes and other tissues of mice, and analyze the proportion and proliferation of Treg, so as to provide a reference for in-depth understanding of the function of tissue-specific Treg.

Keywords flow cytometry; regulatory T cells; tissue-specific Treg

流式细胞技术(flow cytometry, FCM)是现代进行免疫学研究的有力工具,可以在单细胞水平上进行多参数的定性或定量检测,具有高通量、速度快、灵敏度高、采集数据多的优点。流式细胞技术目前已经成为分析免疫细胞分型中最常用的技术,利

用其优势特点可以有效分析混合细胞群(如血液)中的多个免疫细胞亚群。除了对细胞表面表达的蛋白进行检测外,流式细胞技术还可以在单细胞水平上对细胞内甚至核内的标记物进行定性或定量的检测。流式细胞技术的不断更新和发展,使其能够在

收稿日期: 2023-03-09

接受日期: 2023-05-11

*通讯作者。Tel: 021-63846590-776783, E-mail: binli@shsmu.edu.cn

Received: March 9, 2023

Accepted: May 11, 2023

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-776783, E-mail: binli@shsmu.edu.cn

单细胞水平上实现生理或病理情况下免疫表型的鉴定,分析特定免疫细胞亚群的生理活动变化,对于免疫学研究和临床检测有着无可比拟的重要作用。

流式细胞技术的应用中,细胞被抗体标记并通过流式细胞仪激发而产生的荧光信号是研究的重要参数。根据免疫表型的区别,对不同细胞因子标记不同的荧光抗体可以有效鉴定不同的免疫细胞亚群^[1-2]。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是重要的免疫调节细胞。在机体免疫稳态的维持中,Treg通过抑制过度的免疫应答来发挥重要作用,对包括过敏、自身免疫疾病以及肿瘤等多种反应有重要的调节作用^[3-4]。Treg负责机体中复杂的免疫调节机制,维持外周耐受性,防止自身过度免疫以及由病原体或环境受损而引起的过度炎症。然而,Treg的免疫调节作用也会影响正常的免疫应答,可能通过抑制抗病原体免疫和限制抗肿瘤免疫来限制有益的免疫反应。Treg在机体中的两面性使得人们对确定其作用机制有着强烈的兴趣,研究Treg的各种生理活动有助于深入了解其免疫作用机制。Treg的发育和功能与重要的转录因子叉头蛋白3(forkhead box protein 3, Foxp3)有关,Treg是由Foxp3的组成型表达而定义的,Foxp3参与了Treg细胞表型的建立和维持,有功能的Foxp3对于Treg发挥其免疫抑制作用起着至关重要的作用。

T细胞的发育过程从骨髓中淋巴细胞形成表达CD2、CD5、CD7和CD3的祖细胞开始^[5-6],这些祖细胞进入胸腺后开始T细胞的发育阶段。T细胞在胸腺中发育成熟后进入外周血,其主要亚群通过CD4和CD8的表达进行定义^[7]。成熟的CD4⁺T细胞可以通过检测其细胞外标记、细胞因子和转录因子,包括Th1、Th2、Th17、Th22和Treg^[8-13],进一步区分不同亚群。CD4⁺单阳性细胞在胸腺的发育过程中,当其受到TCR刺激后,IL-2R、CD25以及TNFR超家族成员OX40、GITR上调,从而产生CD4⁺CD25⁺T细胞^[14-17]。胸腺Treg上CD45的表达是Treg成熟分化的标志,意味着Treg的分化阶段即将完成^[18],并进一步依赖转录因子Foxp3的上调转变为成熟的Treg。因此,组织中分离的Treg可以通过抗体标记CD4、CD25和Foxp3来表征,利用流式细胞技术分析器官组织中的Foxp3⁺Treg数量及功能。Treg分泌抗炎因子,表达共抑制分子,从而破坏免疫效应细胞的应

答。

Foxp3⁺Treg主要在淋巴组织中维持免疫稳态,调节免疫系统平衡。也有研究发现,Treg在非淋巴组织中呈现出组织特异性功能^[3]。Treg在不同器官组织中呈现出异质性,不同的Treg亚群还有着独特的功能。例如存在于骨骼肌的Treg在肌肉损伤后积累,并产生生长因子双调蛋白作用于肌肉卫星细胞改善肌肉修复^[19-20]。内脏脂肪组织(visceral adipose tissue, VAT)是免疫系统和代谢系统之间发生广泛的细胞和分子串扰的场所,富含Treg。驻留在VAT中的Treg表现出独特的细胞转录程序和代谢特征,使Treg能够适应独特的VAT环境以维持其稳态和功能^[21-23]。有研究发现,在糖尿病模型中Treg增强了皮下脂肪组织(subcutaneous adipose tissue, SAT)中脂肪细胞的产热基因的表达能力,并影响了小鼠对胰岛素的敏感性^[24]。

本文将介绍在小鼠不同组织中分离Treg的方法,利用流式细胞技术检测分析CD4⁺Foxp3⁺Treg的数量及增殖活性,为不同组织Treg亚群的深入分析研究提供帮助。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物

健康C57BL/6小鼠饲养于上海交通大学医学院动物中心。健康小鼠经过处死和解剖,取不同组织分离淋巴细胞。共四只健康小鼠用于组织浸润淋巴细胞的分离和提取。本实验已经通过上海交通大学医学院伦理委员会批准(批准号:A-2022-031)。

1.2 主要试剂和仪器

主要试剂:胎牛血清(fetal bovine serum)(Gibco公司,cat#10-082-147)、1×磷酸缓冲液(1×PBS)、RPMI 1640培养液(Sigma公司,cat#M7522)、胶原酶D(Roche公司,cat#11088882001)、脱氧核糖核酸酶I(DNase I)(Roche公司,cat#10104159001)、Percoll(GE公司,cat#17-0891-01)、流式Foxp3/转录因子染色缓冲液套件(cat#00-5523-00)。流式抗体如表2所示。实验所用仪器流式细胞分析仪(LSRFortessa X20)购自BD公司。

1.3 小鼠组织浸润淋巴细胞的分离

断颈处死小鼠,打开小鼠腹腔或胸腔,用手术器械取出其肺、皮下脂肪、内脏脂肪、肝、结肠、脾脏、和淋巴结组织,使用对应的消化方法分离淋巴细胞。

1.3.1 肺(lung)、皮下脂肪(SAT)与内脏脂肪(VAT) 配制肺消化液: 使用含有10% FBS的RPMI 1640完全培养基稀释胶原酶D至终浓度为2 mg/mL, 并加入150 μ g/mL DNase I。每份肺组织使用3 mL消化液。

配制SAT与VAT消化液: 使用含10% FBS的RPMI 1640 CM稀释胶原酶D至终浓度为1 mg/mL, 并加入150 μ g/mL DNase I。每份SAT与VAT组织使用6 mL消化液。

将肺、SAT和VAT剪碎后转移至对应的消化液中。将离心管平放于37 $^{\circ}$ C摇床220 r/min消化。VAT消化30 min, 肺与SAT消化90 min。消化结束后, 加满FACS buffer(1 \times PBS, 5% FBS), 用两层150 μ m滤网过滤组织消化液, 400 \times g、4 $^{\circ}$ C离心10 min, 弃上清。再次使用适量FACS buffer重悬细胞, 用两层48 μ m滤网过滤细胞样品。400 \times g、4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清。用FACS buffer重悬细胞, 准备染色。

1.3.2 肝(liver) 配制肝消化液: 使用含10% FBS的RPMI 1640 CM稀释胶原酶D至终浓度为1 mg/mL, 并加入150 μ g/mL DNase I。每份肝组织使用6 mL消化液。

剪碎肝组织, 转移至消化液中。将离心管平放于37 $^{\circ}$ C摇床上, 180~220 r/min消化90 min。消化结束后, 加满FACS buffer, 用两层150 μ m滤网过滤组织消化液, 400 \times g、4 $^{\circ}$ C离心10 min, 弃上清。

配制100%、80%与40%的Percoll液, 如表1。

将离心后的肝组织消化样品, 使用6 mL 40% Percoll重悬, 用48 μ m滤网过滤至新的15 mL离心管。过滤结束后, 涡旋混匀。使用巴氏吸管吸取3 mL 80% Percoll, 小心在40% Percoll肝细胞重悬液底部, 缓慢加入80% Percoll, 注意避免对分层面的搅动。4 $^{\circ}$ C、1 260 \times g离心(升速6级, 降速2级) 30 min。离心结束后, 将中间白色细胞层转移至新的15 mL离心管中, 加满FACS buffer。再次4 $^{\circ}$ C、1 260 \times g离心10 min, 弃上清。用FACS buffer重悬细胞, 准备染色。

1.3.3 结肠(colon) 取出小鼠结肠后, 将肠道纵切并去除粪便, 洗净。将肠道剪切后用PBS洗净。

准备工作液A(含1 mmol/L DTT的1 \times PBS), 每份样品用10 mL工作液A 37 $^{\circ}$ C、200 r/min振荡10 min。

准备工作液B(10 mmol/L HEPES, 30 mmol/L EDTA, 1 \times PBS)。工作液A振荡结束后将组织转移至10 mL工作液B中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min振荡10 min。

配制结肠消化液。用RPMI 1640 CM稀释胶原酶VIII至终浓度为1.6 mg/mL, 并加入150 μ g/mL DNase I。每份结肠组织用3 mL消化液。

将结肠组织从工作液B中取出, 剪碎, 在结肠消化液中消化处理1 h, 并置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中。消化处理结束后, 组织基本散开在消化液中。用48 μ m滤网过滤, 1 800 r/min离心5 min, 弃上清。

配制100%、80%与40%的Percoll液。用4 mL 40% Percoll重悬细胞沉淀, 用48 μ m滤网过滤。用巴氏吸管由底部缓慢加入2.5 mL 80% Percoll液, 同时避免对分层面的搅动。2 500 r/min(升速1级, 降速1级)离心25 min。离心结束后, 将中间白色细胞层转移至新的15 mL离心管中, 加满FACS buffer。再次4 $^{\circ}$ C、800 \times g离心10 min, 弃上清。用FACS buffer重悬细胞, 准备染色。

1.3.4 脾脏(spleen)和淋巴结(pelvic lymph node, PLN) 取出小鼠脾脏和腹股沟淋巴结至于1 \times PBS中, 研磨脾脏和淋巴结, 使细胞散于组织液中。用74 μ m滤网过滤, 400 \times g离心5 min, 弃上清。每份组织用500 μ L红细胞裂解液裂解红细胞, 5 min。裂解反应结束后, 加满FACS buffer, 400 \times g、4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清。再次使用适量FACS buffer重悬细胞, 用两层48 μ m滤网过滤细胞样品。400 \times g、4 $^{\circ}$ C离心5 min, 弃上清。用FACS buffer重悬细胞, 准备染色。

1.4 Treg流式抗体染色

按照下表配制流式抗体混合液(用FACS buffer配制)。

表1 不同比例的Percoll配制表
Table 1 Different proportions of Percoll

样本(n=4) Sample (n=4)	Percoll	10 \times PBS	1 \times PBS	RPMI 1640 CM	总体积 Total volume
100% Percoll	27.0 mL	3.0 mL	/	/	30.0 mL
80% Percoll	12.8 mL (100%)	/	3.2 mL	/	16.0 mL
40% Percoll	12.0 mL (100%)	/	/	18.0 mL	30.0 mL

表2 流式抗体配制表
Table 2 Flow cytometry antibody

流式抗体 Antibody	荧光通道 Fluorophores	稀释比例 Dilutions
Fixable viability stain	APC-Cy7	1 000×
Anti-mouse-CD45	PerCP-Cy5.5	200×
Anti-mouse-CD4	BV510	200×
Anti-mouse-CD8	BV421	200×
Anti-mouse-Foxp3	FITC	200×
Anti-mouse-Ki67	PE-Cy7	200×

细胞内的转录因子,包括Foxp3和Ki67的流式染色,需要细胞固定破膜后才可进行染色。稳定细胞膜、保持细胞膜表面抗体与抗原结合的作用同时破膜使细胞膜产生小孔以利于抗体进入细胞。首先配制除胞内流式抗体外的其他抗体混合液,4 °C避光染色30 min。染色结束后用FACS buffer洗涤,用固定破膜剂于4 °C下进行固定破膜处理过夜。洗涤后用胞内抗体稀释液于4 °C下避光孵育染色30 min。每个荧光通道需要单独做单标管样品,作为流式上样时的补偿调节。

流式抗体染色结束后,用FACS buffer洗涤,再次用48 μm滤网过滤细胞悬液,避免结团的细胞影响流式上样,最后再使用流式细胞仪上机分析。首先利用单标样品管调节补偿,然后对实验样品管进行数据采集和分析。

2 小鼠不同组织Treg流式结果分析

分离提取了四只健康小鼠的上述不同组织的淋巴细胞后,分别进行流式染色以及上机分析。由于实验中SAT和VAT的组织浸润淋巴细胞数量较少,进行SAT和VAT Treg流式分析时是将四只小鼠中所分离提取的细胞合为一起再进行下一步操作的。

Treg在淋巴细胞的流式细胞分析中被定义为CD4⁺Foxp3⁺ T细胞。在流式细胞分析策略中,首先通过细胞在流式细胞仪上反映的固有参数——前向散射光(forward scatter, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC),来反映细胞体积大小和内部颗粒度,将淋巴细胞群圈出。包含T细胞、B细胞和NK细胞的淋巴细胞群,细胞体积较小,在FSC-SSC图中可以根据细胞体积和内部颗粒度圈出淋巴细胞群体以及单细胞群体,防止黏连细胞团对结果产生影响。通过利用Fixable Viability抗体的染色将死细胞排除,进

行下一步分析。接下来通过细胞表面因子CD45⁺、CD8⁺、CD4⁺的特异表达设门分离CD4⁺和CD8⁺ T细胞群体,在CD4⁺ T细胞群中进一步分选出Foxp3⁺ T细胞。通过分析Foxp3⁺细胞的占比来研究Treg在淋巴细胞的比例。图1~图7显示了在小鼠不同组织中利用流式细胞技术圈选Treg细胞群的设门策略。不同组织的Treg细胞群比例不同,占CD4⁺ T细胞的比例从6.49%到19.00%不等。在本实验中,相同性别和年龄的健康小鼠的不同个体的Treg细胞群比例略有不同,但不同小鼠个体间同一组织的Treg细胞群比例没有明显差异。

Ki67蛋白是细胞周期相关的一种核蛋白,在细胞分裂的所有活跃阶段都有表达,但在静止细胞和DNA修复期间则没有表达^[25]。对核蛋白Ki67的细胞内表达的测量可以有效地评估特定T细胞在体外的增殖。通过Ki67流式抗体染色,结果显示出了在不同小鼠组织中Treg的增殖情况。图1~图7显示了Treg细胞中处于活跃增殖期的细胞占比为22.7%~53.3%。这不仅与不同组织的Treg群体异质性有关,还可能与分离和处理淋巴细胞悬液时的条件相关,实验操作不当可能影响Treg细胞的活性状态。

3 讨论

Treg在维持全身免疫稳态中具有至关重要的作用,在不同的组织器官中都扮演着关键的角色,然而Treg在机体不同组织中与不同的免疫细胞相互协调,共同维护免疫稳态,因此不同组织中的Treg细胞亚群的比例并不相同。目前研究表明,Treg在维持肺部的免疫平衡方面具有关键功能,急性感染情况下,Treg有助于IgE的产生,同时肥大细胞产生的IL-2也会促进Treg的扩增^[26-27]。而在肺癌的相关研究中,Th17细胞,一种CD4⁺ T辅助细胞,能阻止恶性肿瘤细

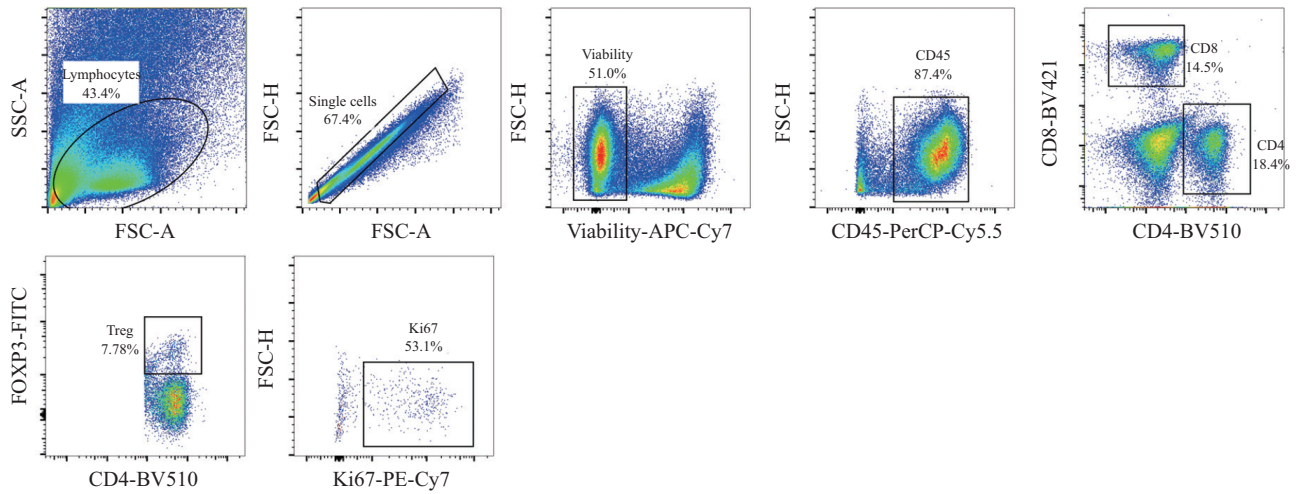


图1 小鼠肺Treg流式分析圈选策略

Fig.1 Flow cytometry gating strategy for mice lung Treg

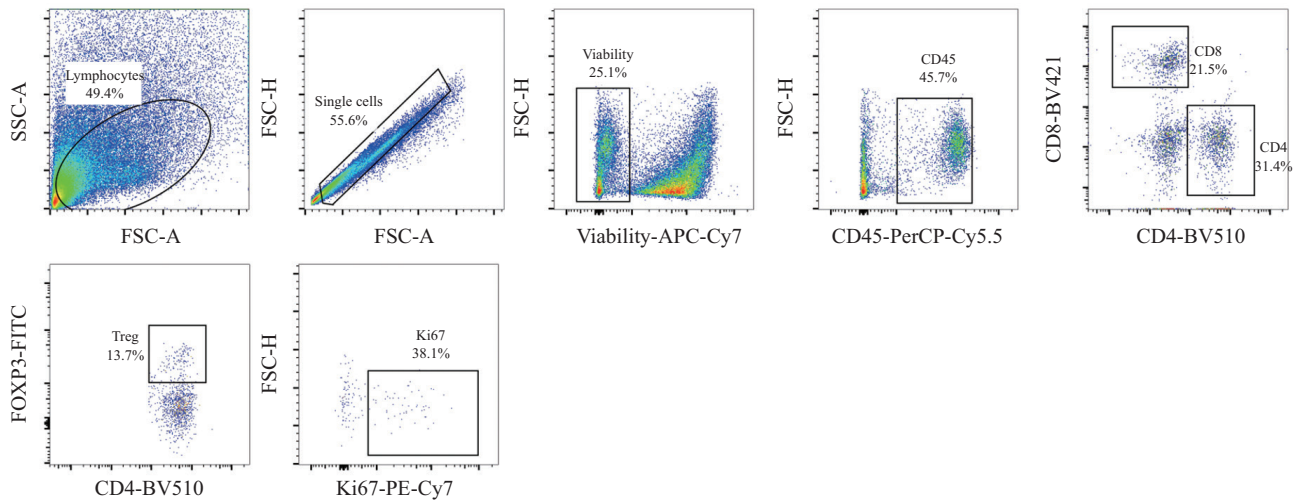


图2 小鼠SAT Treg流式分析圈选策略

Fig.2 Flow cytometry gating strategy for mice SAT Treg

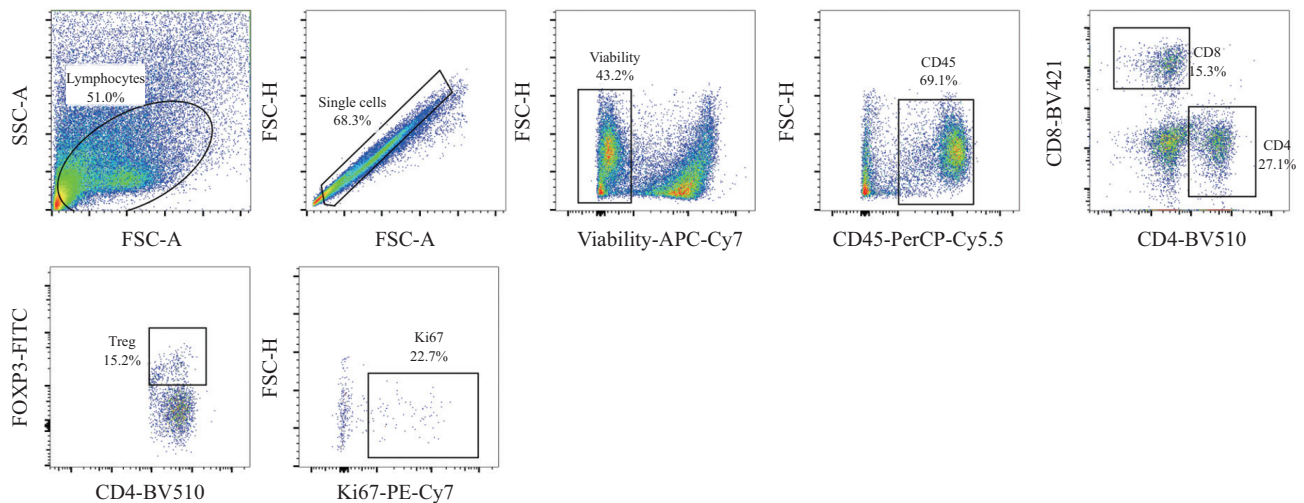


图3 小鼠VAT Treg流式分析圈选策略

Fig.3 Flow cytometry gating strategy for mice VAT Treg

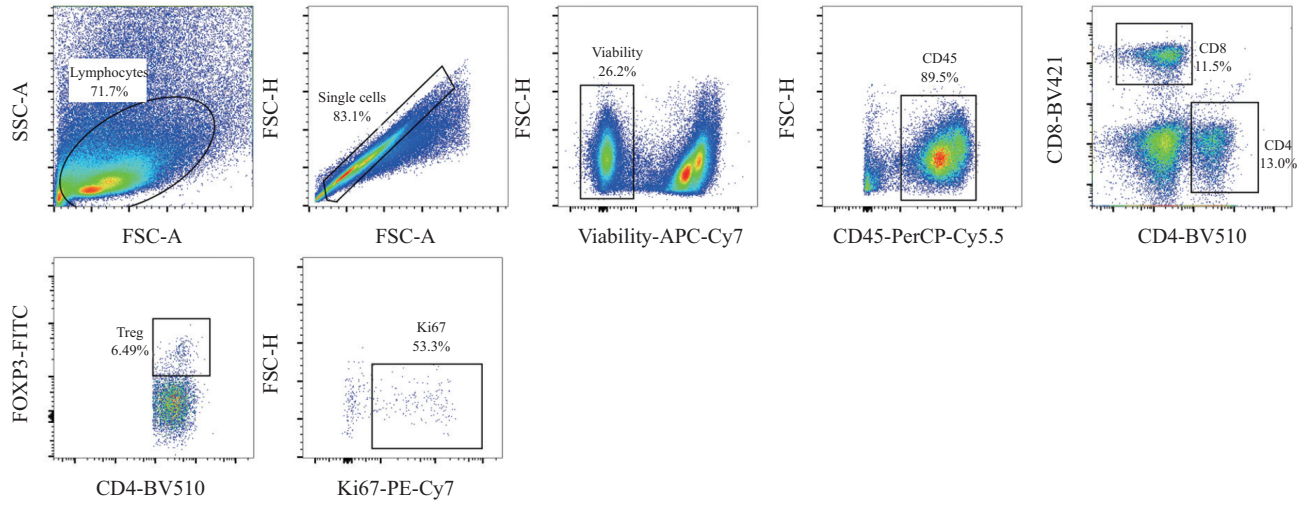


图4 小鼠肝Treg流式分析圈选策略

Fig.4 Flow cytometry gating strategy for mice liver Treg

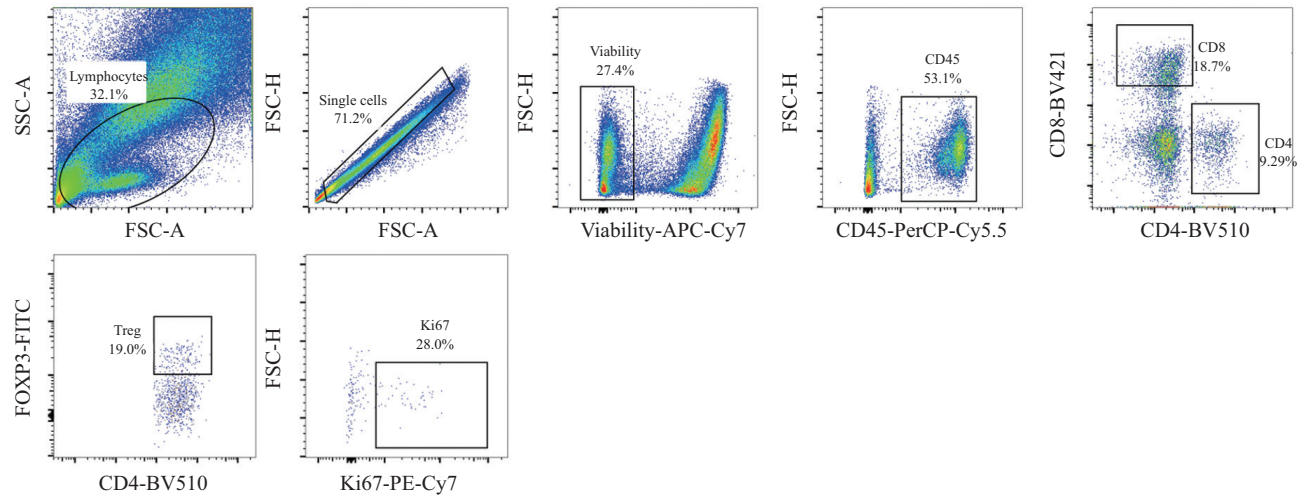


图5 小鼠结肠Treg流式分析圈选策略

Fig.5 Flow cytometry gating strategy for mice colon Treg

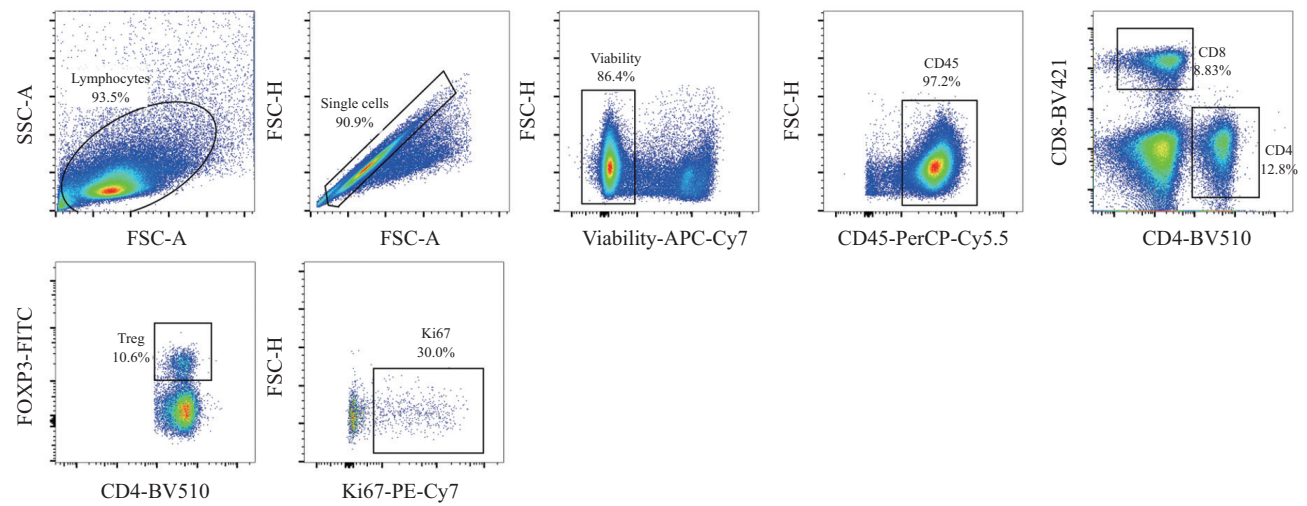


图6 小鼠脾脏Treg流式分析圈选策略

Fig.6 Flow cytometry gating strategy for mice spleen Treg

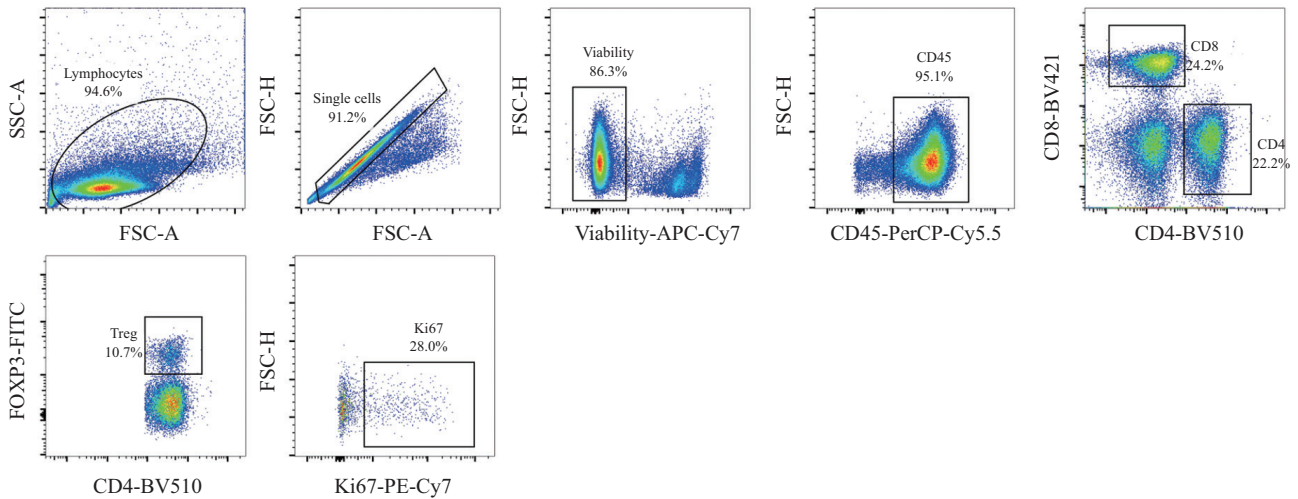


图7 小鼠腹股沟淋巴结Treg流式分析圈选策略

Fig.7 Flow cytometry gating strategy for mice pelvic lymph nodes Treg

胞的扩张,并调节抗肿瘤免疫反应,因此Treg与Th17细胞比例与肺癌的扩增或抑制联系在一起^[28-29]。在脂肪组织中,Treg与糖尿病的关系更为紧密,SAT和VAT的Treg具有保护性的作用^[30]。肝脏具有复杂的免疫功能,肝脏内具有丰富多样的免疫细胞亚群,除Treg外,DCs、CD8⁺T细胞、CD4⁺T_{RM}(tissue-resident memory T cell)也在肝脏微环境中发挥作用,CD69⁺CD4⁺T_{RM}的数量与肝脏慢性病毒感染密切相关^[31-32]。科学研究表明,Foxp3⁺Treg对结肠炎具有抑制作用,肠道健康与Treg/Th17细胞比例的平衡有着紧密的关系,Treg的免疫抑制功能也影响结肠癌的发生发展^[33-34]。脾脏和外周淋巴结是机体重要的免疫器官,包括先天性免疫和适应性免疫反应,含有多种淋巴细胞发挥不同的免疫效应功能,外周淋巴结也为其他组织器官提供免疫细胞的储存库,Treg维持着免疫与耐受的平衡,对于淋巴结免疫稳态是十分重要的。

应用流式细胞技术检测一系列参数并定义样品中的不同细胞亚群是其最主要的用途之一。采用门控策略划分具有共同参数的一类细胞群体,常用的门控策略是利用FSC和SSC去除细胞碎片、死细胞和黏连细胞,圈出活的单细胞进行后续细胞参数的分析。在实验中常用手动门控策略划分不同细胞群体,但相较于传统的手动门控,自动门控方法可以分析大规模、复杂的临床流式数据,并具有更高精度,十几个及以上的参数数据需要计算机软件辅助进行自动门控分析^[35-36]。

流式细胞技术现在已经发展为多色荧光标记,

即在使用多个荧光染料的情况下,存在光谱重叠的现象。目前使用的荧光染料具有宽发射谱特性,虽然各自的发射光峰值不同,但发射谱可能存在一定的重叠,因而少量荧光信号会被另一通道检测到,从而对实验结果造成影响^[37-38]。通常在实际操作中利用计算机软件程序设置将串入邻近通道的荧光信号去除,这一过程被称为荧光补偿。每个荧光染料标记的单染色对照是荧光补偿的重要手段。此外,样品中存在的自发荧光或背景荧光也可被流式细胞仪检测到,可能造成假阳性结果,因此设置未染色的空白对照对排除细胞自发荧光十分重要,特别是对于在体外进行处理或细胞内含有大量颗粒(例如巨噬细胞、树突细胞)的样品细胞。

在认识和了解组织Treg不同亚群的生理学功能的研究中,流式细胞技术发挥了不可置否的重要作用。利用流式细胞技术能够区分鉴别组织特异性Treg的不同亚群,通过识别Treg特异表达的细胞因子以及检测细胞因子表达量的高低,可以有效鉴定不同的细胞亚群。更好地利用流式细胞技术有助于我们对组织Treg细胞亚群的深入理解。从不同Treg亚群的识别和鉴定,再到它们在组织中生理状态和独特的生物学功能的研究,都离不开流式细胞技术的有效使用。深入了解不同组织中异质性Treg对于相关的疾病治疗研究也有一定的帮助。最近有研究表明,某些特定器官组织的肿瘤对免疫疗法表现出独特的反应,其中Treg发挥着重要的作用,但目前仍未能将组织特异性Treg的功能与它们在肿瘤免疫疗法中的作用相协调。利用流式细胞技术深入探究

Tregs的组织特异性功能将有助于我们对肿瘤免疫治疗的研究,使免疫疗法的目标更加精确,对广大癌症患者具有深远的意义。

作为免疫学研究中的重要研究手段,流式细胞技术的不断发展为免疫细胞表型分析和研究疾病的发生发展过程提供了有力支持。利用流式细胞技术进行细胞表面抗原、细胞内/核内蛋白、细胞生理状态的多参数检测,有效区分细胞类群。各类淋巴细胞特征的免疫表型的研究在不断发展,对于不同细胞亚群的定义同样不断变化和完善,流式细胞技术的多参数检测提高了研究免疫细胞分群的精度。随着流式细胞仪设备的进步和各种荧光抗体的开发,流式细胞技术的应用越来越广泛,并且其精度和测量通量也得到了提高,该方法不仅在免疫学研究中发挥着重要作用,也越来越多地被应用于临床疾病诊断和评估中,是人类疾病与健康研究中不可或缺的重要研究手段。

参考文献 (References)

- [1] MANOHAR S M, SHAH P, NAIR A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances [J]. *Bioanalysis*, 2021, 13(3): 181-98.
- [2] KALINA T. Reproducibility of flow cytometry through standardization: opportunities and challenges [J]. *Cytometry A*, 2020, 97(2): 137-47.
- [3] WING J B, TANAKA A, SAKAGUCHI S. Human FOXP3⁺ regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer [J]. *Immunity*, 2019, 50(2): 302-16.
- [4] VIGNALI D A, COLLISON L W, WORKMAN C J. How regulatory T cells work [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(7): 523-32.
- [5] SAXENA A, DAGUR P K, BIANCOTTO A. Multiparametric flow cytometry analysis of naïve, memory, and effector T cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2032: 129-40.
- [6] HOSOKAWA H, ROTHENBERG E V. How transcription factors drive choice of the T cell fate [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(3): 162-76.
- [7] OVERGAARD N H, JUNG J W, STEPTOE R J, et al. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage [J]? *J Leukoc Biol*, 2015, 97(1): 31-8.
- [8] FLYNN J, GORRY P. Flow cytometry analysis to identify human CD4⁺ T cell subsets [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 2048: 15-25.
- [9] YANG W, CHEN X, HU H. CD4⁺ T-cell differentiation *in vitro* [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2111: 91-9.
- [10] MOUSSET C M, HOBO W, WOESTENENK R, et al. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(6): 647-54.
- [11] CHEN Z, LIN F, GAO Y, et al. FOXP3 and RORγt: transcriptional regulation of Treg and Th17 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(5): 536-42.
- [12] BILATE A M, LONDON M, CASTRO T B R, et al. T cell receptor is required for differentiation, but not maintenance, of intestinal CD4⁺ intraepithelial lymphocytes [J]. *Immunity*, 2020, 53(5): 1001-14, e20.
- [13] ZHANG W, LIU X, ZHU Y, et al. Transcriptional and posttranslational regulation of Th17/Treg balance in health and disease [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(9): 2137-50.
- [14] BURCHILL M A, YANG J, VANG K B, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire [J]. *Immunity*, 2008, 28(1): 112-21.
- [15] TAI X, INDART A, ROJANO M, et al. How autoreactive thymocytes differentiate into regulatory versus effector CD4⁺ T cells after avoiding clonal deletion [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(4): 637-51.
- [16] MATSON C A, CHOI S, LIVAK F, et al. CD5 dynamically calibrates basal NF-κB signaling in T cells during thymic development and peripheral activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(25): 14342-53.
- [17] ONO M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes [J]. *Immunology*, 2020, 160(1): 24-37.
- [18] MORGANA F, OPSTELTEN R, SLOT M C, et al. Single-cell transcriptomics reveals discrete steps in regulatory T cell development in the human thymus [J]. *J Immunol*, 2022, 208(2): 384-95.
- [19] BURZYN D, KUSWANTO W, KOLODIN D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair [J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1282-95.
- [20] SCHIAFFINO S, PEREIRA M G, CICILLOT S, et al. Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration [J]. *FEBS J*, 2017, 284(4): 517-24.
- [21] CIPOLLETTA D, FEUERER M, LI A, et al. PPAR-γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells [J]. *Nature*, 2012, 486(7404): 549-53.
- [22] LI Y, LU Y, LIN S H, et al. Insulin signaling establishes a developmental trajectory of adipose regulatory T cells [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(9): 1175-85.
- [23] LI C, WANG G, SIVASAMI P, et al. Interferon-α-producing plasmacytoid dendritic cells drive the loss of adipose tissue regulatory T cells during obesity [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(8): 1610-23, e5.
- [24] FANG W, DENG Z, BENADJAOUD F, et al. Regulatory T cells promote adipocyte beiging in subcutaneous adipose tissue [J]. *FASEB J*, 2020, 34(7): 9755-70.
- [25] DI ROSA F, COSSARIZZA A, HAYDAY A C. To Ki or Not to Ki: re-evaluating the use and potentials of Ki-67 for T cell analysis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 653974.
- [26] MORITA H, ARAE K, UNNO H, et al. An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers [J]. *Immunity*, 2015, 43(1): 175-86.
- [27] CAMPBELL C, RUDENSKY A. Roles of regulatory T cells in tissue pathophysiology and metabolism [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(1): 18-25.
- [28] LI S, LI Y, QU X, et al. Detection and significance of TregFoxP3⁺ and Th17 cells in peripheral blood of non-small cell lung cancer patients [J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(2): 232-9.
- [29] DUAN M C, ZHONG X N, LIU G N, et al. The Treg/Th17 para-

- digm in lung cancer [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 730380.
- [30] DELANEY K Z, SANTOSA S. Sex differences in regional adipose tissue depots pose different threats for the development of type 2 diabetes in males and females [J]. *Obes Rev*, 2022, 23(3): e13393.
- [31] WIGGINS B G, PALLETT L J, LI X, et al. The human liver microenvironment shapes the homing and function of CD4⁺ T-cell populations [J]. *Gut*, 2022, 71(7): 1399-411.
- [32] HUPPERT L A, GREEN M D, KIM L, et al. Tissue-specific Tregs in cancer metastasis: opportunities for precision immunotherapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(1): 33-45.
- [33] LIU Y J, TANG B, WANG F C, et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner [J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5225-41.
- [34] NING T, LI J, HE Y, et al. Exosomal miR-208b related with oxaliplatin resistance promotes Treg expansion in colorectal cancer [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(9): 2723-36.
- [35] SCHMIT T, KLOMP M, KHAN M N. An overview of flow cytometry: its principles and applications in allergic disease research [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2223: 169-82.
- [36] LEE H, SUN Y, PATTI-DIAZ L, et al. High-throughput analysis of clinical flow cytometry data by automated gating [J]. *Bioinform Biol Insights*, 2019, 13: 1177932219838851.
- [37] KHARRAZ Y, LUKESOVA V, SERRANO A L, et al. Full spectrum cytometry improves the resolution of highly autofluorescent biological samples: identification of myeloid cells in regenerating skeletal muscles [J]. *Cytometry A*, 2022, 101(10): 862-76.
- [38] SANTINON F, YOUNG Y K, DEL RINCÓN S V, et al. Analyzing the tumor-immune microenvironment by flow cytometry [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2614: 17-36.