

# 神经系统小胶质细胞流式检测及分选

姜博文 陈玲玲\*

(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)

**摘要** 小胶质细胞是中枢神经系统中主要的免疫细胞, 数量上占大脑的5%~10%。作为中枢神经系统的巨噬细胞, 它们会不断清除中枢神经系统中的斑块、受损或不必要的神经元和突触以及感染因子。从中枢神经系统组织中分离小胶质细胞为研究基础细胞生物学和检测体内治疗对小胶质细胞免疫功能的影响提供了强有力的工具。该文描述了利用小胶质细胞特异性表面标志物, 通过流式细胞分选(FACS)纯化小胶质细胞的方法。

**关键词** 小胶质细胞; 流式细胞分选; 中枢神经系统

## Flow Cytometry Detection and Sorting of Microglia in the Nervous System

JIANG Bowen, CHEN Lingling\*

(Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Microglia are the main immune cells in CNS (central nervous system), representing 5%-10% of cells in the brain. As the macrophage, they constantly scavenge the CNS for plaques, damaged or unnecessary neurons and synapses, and infectious agents. Isolation of microglia from CNS tissue provides a powerful tool to study basic cell biology and examine the effects of *in vivo* treatments on microglia function. This article describes approaches for purification of microglia by FACS (fluorescence-activated cell sorting) using microglia-specific surface markers.

**Keywords** microglia; fluorescence-activated cell sorting; central nervous system

脑是中枢神经系统的主要部分, 起源于神经管的头段。小鼠大脑尽管表面上和人类大脑有很多差异, 尤其在大小和重量上, 但是负责构建、运行小鼠和人类大脑的基因有90%是相同的, 所以小鼠大脑可作为研究人类大脑疾病或精神障碍的强大动物模型。小鼠大脑由不同类型细胞构成, 主要包括神经元和胶质细胞。神经元即神经细胞, 由胞体和突起组成, 突起分为树突和轴突。神经元可以将信号远

程传递到特定的细胞, 这是它们和其他细胞最大的区别<sup>[1]</sup>。

在中枢神经系统中, 神经胶质细胞包括星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、管周膜细胞和脉络丛上皮细胞。长期以来, 人们对胶质细胞的认知存在很大的局限性, 认为它只是被动的支持成分。20世纪70年代, 对于星形胶质细胞和少突胶质细胞的功能有了很大的研究进展, 20世纪80年代

收稿日期: 2022-11-04

接受日期: 2023-05-08

\*通讯作者。Tel: 021-54921021, E-mail: linglingchen@sibcb.ac.cn

Received: November 4, 2022

Accepted: May 8, 2023

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921021, E-mail: linglingchen@sibcb.ac.cn

对小胶质细胞的研究开始涌现, 科研人员发现其除了可以作为中枢神经系统的巨噬细胞以外, 还可以作为脑的免疫系统发挥功能, 在正常脑发育、神经元调控和中枢再生等方面也可发挥重要作用。

胶质细胞功能异常与神经系统退行性疾病之间具有很强的相关性。例如, 帕金森病与激活的小胶质细胞和反应性星形胶质细胞有关<sup>[2]</sup>。小胶质细胞分泌胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor 1, IGF-1), 神经元对神经营养信号通路IGF-1R/IRS-2/PI3K的反应减弱, 因此在阿尔茨海默病中产生淀粉样变和血管发育不良<sup>[3]</sup>。胶质增生可能在各种形式的癫痫中无所不在<sup>[4]</sup>。神经胶质细胞还与肌萎缩侧索硬化、多发性硬化等多种疾病相关<sup>[5]</sup>。因此小胶质细胞分析方法的应用尤为重要。

流式细胞分选技术是通过特定细胞进行加电分选的技术, 是一种对任何组织样本中细胞进行定量和鉴定的重要方法, 包括含有小胶质细胞的脑组织样品<sup>[6-8]</sup>。在进行流式分析或分选前, 我们需要将组织样本制备成单细胞悬液。小鼠大脑组织单细胞悬液的制备方法包括机械研磨法和酶消化法。

机械研磨法首先将小鼠灌流并取出脑组织, 剪碎之后分别利用粗和细的组织研磨杵手动对剪碎的脑组织进行旋转研磨, 然后利用70  $\mu\text{m}$ 细胞过滤器去除组织碎片, 重复过滤从而进一步去除髓鞘碎片, 流式缓冲液重悬细胞进行后续抗体染色, 最后上机分析分选<sup>[9]</sup>。

酶消化法是将小鼠灌流、脑组织剪碎之后, 利用不同的消化酶将脑组织进行消化, 去除细胞间质使细胞解离分散。使用的酶通常包括: 胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、分散酶II和accutase细胞解离试剂等。胰蛋白酶是从胰脏中提取的丝氨酸蛋白水解酶、肽链内切酶, 它能把多肽链中赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断, 是特异性最强的蛋白酶。木瓜蛋白酶是木瓜中含有的一种低特异性巯基蛋白酶, 可降解大多数蛋白质底物, 与胰蛋白酶相比, 木瓜蛋白酶对神经组织中细胞的损伤更小, 所以在神经组织消化过程中大多使用木瓜蛋白酶。分散酶II即中性蛋白酶, 是一种非特异性金属蛋白酶, 能快速且温和消化不同组织中细胞外基质, 通常与胰蛋白酶组合使用, 用于韧性强、胶原丰富的组织消化。accutase细胞解离试剂是一种即用型, 包

含蛋白水解酶和胶原酶活性的一种中性酶细胞消化液, 是胰酶/EDTA消化液的替换产品, 与胰蛋白酶相比在细胞活性方面更胜一筹。在细胞悬液制备过程中, 蛋白酶会损伤部分细胞导致DNA释放引起细胞聚团并影响蛋白酶的消化率, 所以上述蛋白酶消化过程中可以与DNA酶联用, 消化DNA而不损伤完整细胞。

关于髓鞘去除, 有三种常见的方法: Percoll离心、髓鞘去除试剂盒和不去除(不去除即利用70  $\mu\text{m}$ 细胞过滤器过滤离心之后, 直接用流式细胞缓冲液重悬细胞沉淀进行后续的染色分析)。

小胶质细胞标记物有多种: TMEM119、CD11b和CD45、Iba1、CX3CR1、F4/80、CD68、CD40。TMEM119是一种细胞表面蛋白, 同时也是鼠源和人源小胶质细胞的特异性标记物。TMEM119的特点是其在巨噬细胞或其他免疫/神经细胞上表达, 这一点不同于其他小胶质细胞标记物<sup>[10]</sup>。CD11b与CD45组合标记可用于区分小胶质细胞与巨噬细胞。小胶质细胞表面标记物为CD11b<sup>+</sup>、CD45<sup>low</sup>, 而巨噬细胞为CD11b<sup>+</sup>、CD45<sup>high</sup><sup>[11]</sup>。离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1)是小胶质细胞和巨噬细胞特异性的钙结合蛋白, 参与激活的小胶质细胞的细胞膜皱褶形成和吞噬作用<sup>[12-13]</sup>。CX3CR1是一种趋化因子受体, 存在于中枢神经系统中小胶质细胞和巨噬细胞的表面, 可被神经元分泌的CX3CL1(一种趋化因子)激活。F4/80是一种位于巨噬细胞和静息小胶质细胞表面的糖蛋白, 分子量为160 kDa<sup>[14]</sup>。CD68是一种溶酶体蛋白, 在巨噬细胞和活化的小胶质细胞表面表达水平较高, 而在静息小胶质细胞表面表达水平低<sup>[15]</sup>。CD40是抗原呈递所必需的细胞表面分子, 在活化的小胶质细胞和巨噬细胞上表达<sup>[16]</sup>。

小胶质细胞是位于大脑和脊髓中的巨噬细胞, 负责中枢神经系统的免疫防御。由于小胶质细胞与巨噬细胞同源, 因此这两类细胞的许多标记物都相同。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验动物

成体野生型小鼠均来自上海灵畅生物科技有限公司。实验小鼠饲养地点为中国科学院分子细胞科学卓越创新中心的SPF级屏障设施。饲料为辐照

表1 主要试剂  
Table 1 Key reagents

试剂名称 Reagent	公司 Company	货号 Product code
PE anti-mouse/human CD11b	Biologend	101207
APC/Cyanine 7 anti-mouse CD45	Biologend	103115
FBS	Gibco	10099-141C
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Gibco	14175079
Papain suspension	Worthington	LS003126
DNase I	Sigma	DN25
Bovine serum albumin (BSA)	Genview	FA016
L-Cysteine	Sigma	30089
EDTA	Invitrogen	15575-038
CaCl <sub>2</sub>	Sigma	C5080
NaOH	Sigma	S8045
NaCl	ABCONE	S39168
KCl	SINOPHARM	10016318
MgSO <sub>4</sub>	Sigma	M2773
Hepes	Sigma	H3784
Glucose	Sigma	G5834
DMEM	Gibco	11965-092

除菌后的商品化无菌饲料(货号: 10100100), 由江苏协同医药生物工程有限责任公司提供。饮水为去离子水, 经高温高压除菌后备用。动物实验方案经过中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物管理委员会审批[批准号: SIBCB-(S338)-1612-039]。

## 1.2 主要试剂和仪器

主要试剂见表1。

剪刀、镊子、5 mL流式管(Falcon<sup>®</sup> Round Bottom Polystyrene Tubes)(货号: 352008)购自美国Life Sciences公司。低温离心机(Heraeus Labofuge 400/400 R)购自ThermoFisher公司; 流式细胞分选仪MA900购自Sony公司。

## 1.3 小鼠大脑单细胞悬液制备

小鼠麻醉后立即将其四肢用针头固定在泡沫板上, 一只手用镊子夹起胸部皮肤, 另一只手用剪刀从剑突处剪开胸腔的皮肤和肋骨, 暴露出心脏和肝脏。将注射针头插入小鼠左心室, 同时将小鼠右心耳减掉, 以使血液流出。灌注HBSS, 时间维持在5~10 min, 血液排出后肝脏会变白。将心脏针头拔出, 剪刀将头剪下, 从剪断处沿着脑中缝将小鼠头骨剪开, 之后镊子夹住头骨向两侧拨开, 取出小鼠大脑, 去掉嗅球、中脑、小脑以及内部核团, 保留小鼠大脑皮层和海马部分, 放在预冷的HBSS

中, 将组织剪切成2~3 mm的小块, 用于后续消化。

将消化液用注射器和0.22 μm针头过滤器过滤到一个15 mL无菌的离心管中, 加上皮层和海马组织。旋紧瓶塞, 置于37 °C培养箱中消化18 min。消化完成以后, 去除管中多余的消化液, 然后加10 mL 10% FBS-DMEM培养基于组织中作用1~2 min, 终止消化。吸去终止液后, 加1 mL含10% FBS-DMEM培养基, 用1 mL的枪轻轻吹打15~20次。然后沉淀1~2 min, 这样单个细胞在上清中, 沉淀为组织块, 将上清转移到一新的离心管, 原来的管中再加1 mL 10% FBS-DMEM培养基继续吹打。再沉淀, 再转移。弃去没有消化完全的组织。将上清置于离心机中1 000 r/min离心5 min。离心后, 吸除上清中的细胞碎片, 将沉淀用FACS缓冲液重悬, 1 000 r/min离心10 min(图1)。

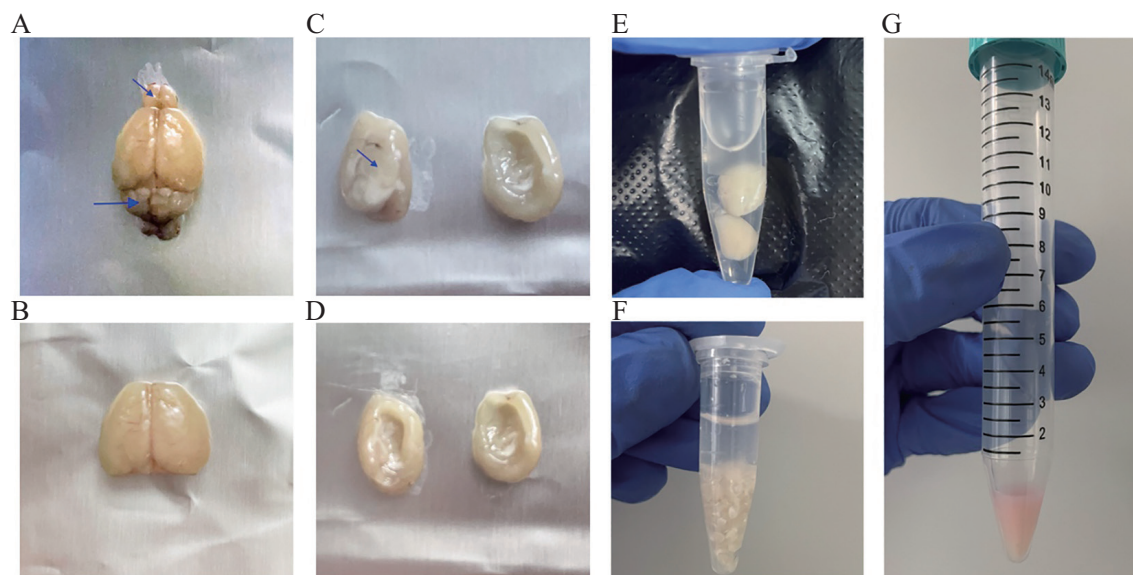
## 1.4 溶液配制

FACS缓冲液: 0.5% BSA、1 mmol/L EDTA溶于1×PBS中。

消化液: 10 mL解剖液、2 mg L-Cysteine、100 μL EDTA(50 mmol/L, pH8.0)、100 μL CaCl<sub>2</sub>(100 mmol/L)、30 μL NaOH(1 mol/L)、100 μL DNA酶I(DNase I)、90 μL木瓜蛋白酶(Papain)。

解剖液: 18.8 g NaCl、0.74 g KCl、0.26 g





A: 小鼠心脏灌流后取出整个鼠脑, 去掉箭头所指的前端嗅球和后端小脑和脑干部分。B: 去掉嗅球和小脑后得到端脑。C: 去掉箭头所指的区域, 只保留皮层。D: 获取两侧大脑皮层。E: 将取好的皮层组织放入预冷的HBSS中。F: 用剪刀将组织剪切成2~3 mm的小块。G: 终止消化后, 离心得到细胞沉淀, 可进行后续抗体染色。

A: the entire mouse brain was taken out after heart perfusion and the anterior olfactory bulb, cerebellum, and brainstem indicated by the arrow were removed. B: the forebrain was obtained after removing the olfactory bulb and cerebellum. C: the area indicated by the arrow was removed, only leaving the cortex. D: both hemispheres of the cerebral cortex were obtained. E: the obtained cortical tissue was placed in pre-cooled HBSS. F: the tissue was cut into small pieces of 2-3 mm with scissors. G: after digestion was stopped, the cell pellet was obtained by centrifugation, and subsequent antibody staining could be performed.

图1 小鼠大脑单细胞悬液制备流程

Fig.1 Workflow for preparation of single-cell suspension from mouse brain

MgSO<sub>4</sub>、0.86 g CaCl<sub>2</sub>、2.4 g HEPES、2.0 g Glucose, 配制好以后定容到2 L, 将pH值调到7.4, 用0.22 μm的过滤器过滤除菌, 置于4 °C冰箱保存。

### 1.5 抗体染色

弃上清, 沉淀用包含抗体(CD11b-PE, CD45-APC)的500 μL FACS缓冲液冰上避光孵育30 min。同时需要准备未经抗体染色的样品以及每个通道对应抗体的单染管用于调节补偿。之后用10 mL预冷FACS缓冲液重新洗涤, 1 000 r/min离心5 min, 500 μL FACS缓冲液重悬过流式滤网至5 mL流式管中。

### 1.6 流式补偿调节

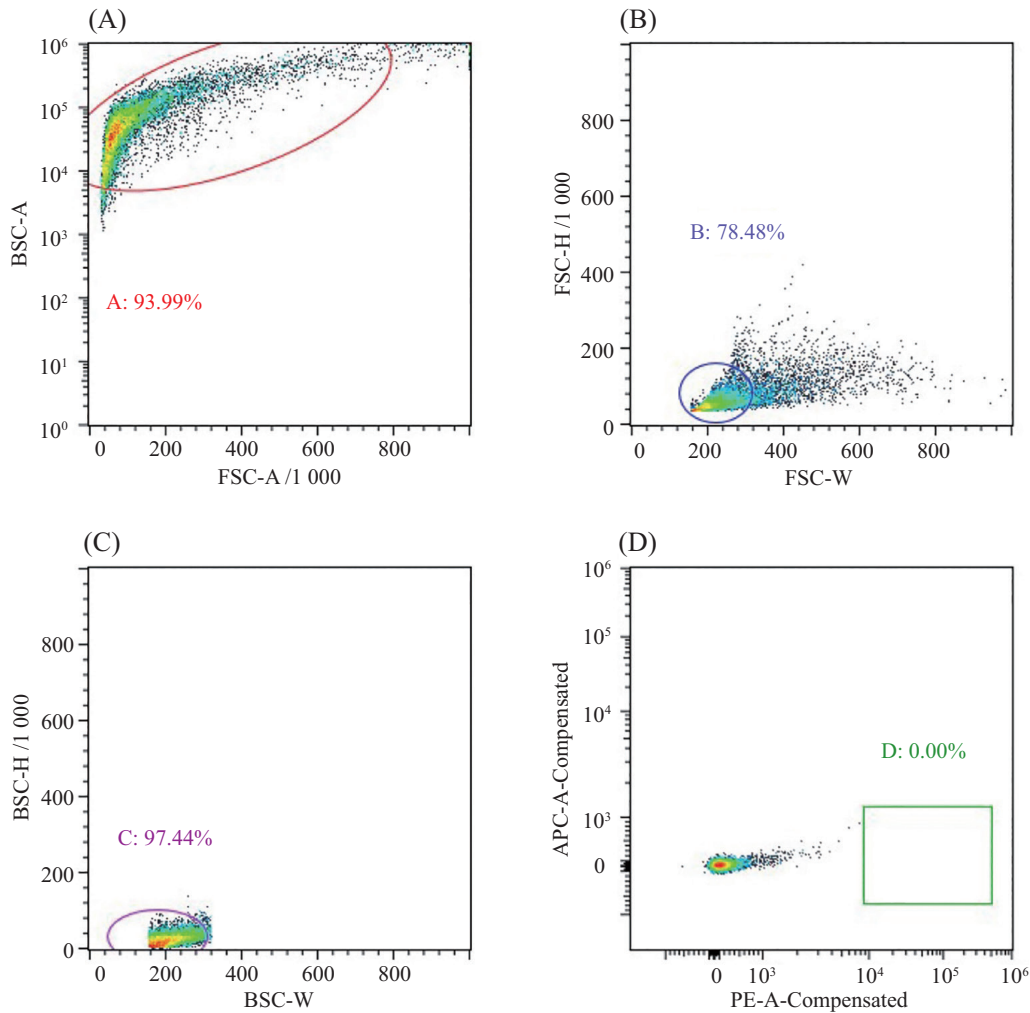
首先调节阳性对照管, 通过阳性对照管调节电压, 电压确定后上阴性对照管和单染管, 通过流式细胞分选仪(Sony MA900)自动补偿调节获取合适的补偿矩阵。最后上阳性管确定阳性细胞分群。在此过程中, 保证空白管和单染管以及最后的样品管的每个通道电压值一致。最后进行流式分析及分选, 利用无标记抗体管进行圈门, 单标抗体管调节补偿, 开始收集数据。

### 1.7 RNA测序验证分选效果

流式分选过程中, 收集管中放入1 mL Trizol, 分选的小胶质细胞直接收集在Trizol里, 后续利用Trizol法提取RNA, 进行RNA测序分析细胞中小鼠大脑中不同细胞分子标记物的表达以验证小胶质细胞的分选效果。

## 2 结果

首先根据前向侧向参数排除细胞碎片及细胞粘连, 之后根据无标记抗体管及单染管圈定阴性细胞群体(图2)。CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>为小鼠大脑中的小胶质细胞类群(图3)。可以利用这种方法比较不同模型小鼠或者药物处理后的小鼠大脑小胶质细胞比例的变化, 从而反映药物处理对大脑中炎症状态的影响。将分选得到的细胞进行RNA测序之后, 根据已经鉴定的小鼠大脑中细胞类群的分子标志物<sup>[17]</sup>分析其在分选细胞中的表达情况, 结果显示分选得到的细胞特异性高表达*Tmem119*(引言中提到的小胶质细胞的另一种分子标记物), 而几乎不表达小鼠大脑中其他细胞类群的分子标记物(图4), 提示我们流式分选



A~C: 进一步通过散点图的宽度和高度去除细胞粘连体。D: 根据空白管圈定阴性群体位置。

A-C: cell clumps were further removed by the width and height of the scatter plot. D: the negative population was defined according to the control tube gating.

图2 利用无标记抗体组圈门(根据前向和侧向散射面积去除细胞粘连体及碎片)

Fig.2 Using the unlabeled antibody group to gate (cell clumps and debris were removed based on forward and side scatter area)

得到的细胞为小胶质细胞, 详细细胞分群见图4的图注。

### 3 讨论

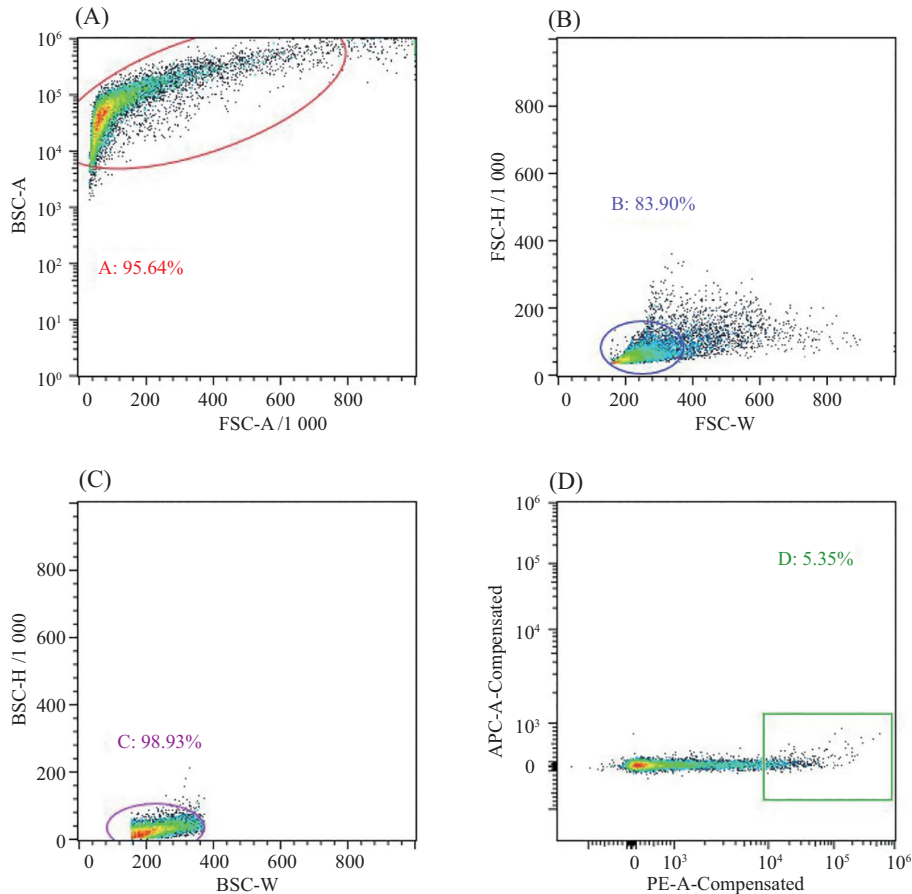
#### 3.1 单细胞悬液的制备

大脑不同于小鼠其他组织, 大脑分左右两个半球, 两半球间有横行的神经纤维相联系, 大脑半球表层为皮层, 皮层的深部由髓质或白质构成, 髓质中又含神经纤维和基底核(灰质团块), 主要由神经元的胞体和神经胶质细胞构成, 神经元通过相互之间形成的突触彼此连接, 形成复杂的神经网络和通路, 大量紧密交织的神经元突起和神经胶质细胞突起组成神经纤维网, 包围在神经元胞体周围。

用于流式分选的小鼠大脑组织单细胞悬液的

制备, 通常有机械研磨法和酶消化法。但是我们在操作过程中发现这种机械研磨法非常不好掌握力度, 导致产生了大量的细胞碎片、上机后分选出小胶质细胞比例明显降低(图5和表2)。因此, 消化大脑过程中, 我们使用木瓜蛋白酶和DNA酶I, 已证明木瓜蛋白酶比其他蛋白酶更有效且破坏性更低。DNA酶I用于消化游离的DNA, 防止细胞聚团, 同时不损伤细胞<sup>[18-19]</sup>。总体来说, 酶消化方法比机械研磨方法更加温和, 可得到更多完整的细胞。整个取材制备单细胞的过程不要持续太长时间, 通常不超过2个小时, 以保证细胞活力。所有的操作过程及试剂均应在冰上或者保证低温状态, 以保证细胞活性。

关于分选小胶质细胞髓鞘去除的方法通常有三种: Percoll、蔗糖和不去除。我们使用Percoll离心后

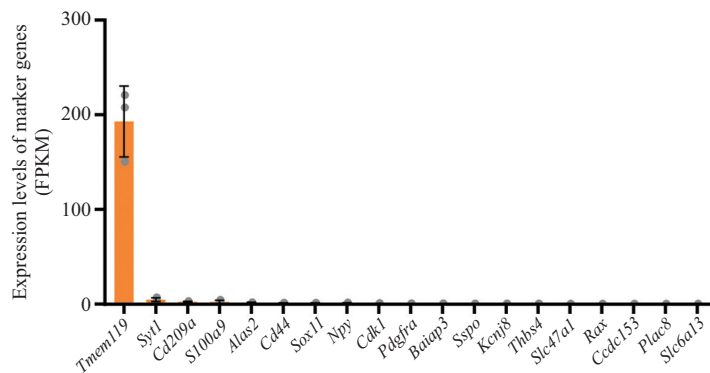


A~D: 去除细胞粘连体和细胞碎片之后根据空白管圈定的阴性细胞群来确定CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>类群即小胶质细胞。

A~D: after removing cell clumps and debris, the CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> population, i.e., microglia, was identified according to the negative cell population defined by the control tube gating.

图3 野生型小鼠大脑皮层中小胶质细胞表达情况(通过木瓜蛋白酶、DNA酶I消化并且不加Percoll离心制备单细胞悬液)

Fig.3 Expression of microglia in the cortex of the wild type mice (single-cell suspension was prepared by papain, DNase I digestion and without Percoll centrifugation)

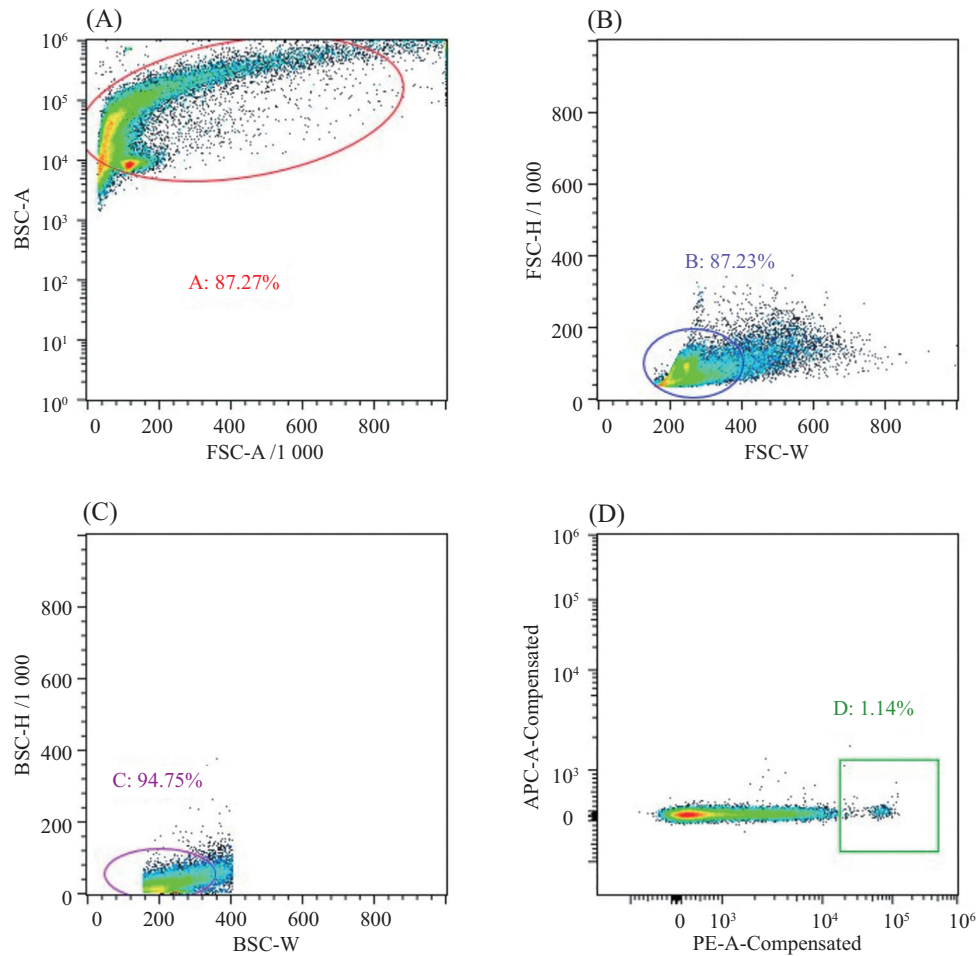


分子标记物及细胞类群对应关系如下: *Syt1*, 成熟神经元; *Cd209a*, 树突状细胞; *S100a9*, 中性粒细胞; *Alas2*, 表达血红蛋白的输精管细胞; *Cd44*, 星形胶质细胞前体细胞; *Sox11*, 未成熟神经元; *Npy*, 嗅鞘胶质细胞; *Cdk1*, 神经元前体细胞; *Pdgfra*, 少突胶质细胞前体细胞; *Baiap3*, 神经内分泌细胞; *Sspo*, 下膜室管膜细胞; *Kcnj8*, 周细胞; *Thbs4*, 神经干细胞; *Slc47a1*, 蛛网膜屏障细胞; *Rax*, 伸展细胞; *Ccdc153*, 室管膜细胞; *Plac8*, 单核细胞; *Slc6a13* 血管和软脑膜细胞。

The molecular markers and cell populations correspond as follows: *Syt1*, mature neurons; *Cd209a*, dendritic cells; *S100a9*, neutrophils; *Alas2*, epididymal cells expressing hemoglobin; *Cd44*, precursor cells of astrocytes; *Sox11*, immature neurons; *Npy*, olfactory ensheathing glial cells; *Cdk1*, precursor cells of neurons; *Pdgfra*, precursor cells of oligodendrocytes; *Baiap3*, neuroendocrine cells; *Sspo*, ependymal cells; *Kcnj8*, pericytes; *Thbs4*, neural stem cells; *Slc47a1*, blood-brain barrier cells; *Rax*, radial glia-like cells; *Ccdc153*, ependymal cells; *Plac8*, monocytes; *Slc6a13*, vascular and pia mater cells.

图4 RNA测序显示分选细胞表达大脑不同细胞分子标记物的情况

Fig.4 RNA sequencing shows the expression of different cell molecular markers in the brain by sorting cells



A~D: 去除细胞粘连体和细胞碎片之后根据空白管圈定的阴性细胞群来确定CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>类群即小胶质细胞。

A-D: after removing cell clumps and debris, the CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> population, i.e., microglia, was identified according to the negative cell population defined by the control tube gating.

图5 野生型小鼠大脑皮层中小胶质细胞表达情况(通过机械研磨法并且不加Percoll离心制备单细胞悬液)

Fig.5 Expression of microglia in the cortex of the wild type mice (single-cell suspension was prepared by mechanical grinding and without Percoll centrifugation)

表2 机械研磨法得到的总细胞数及最终小胶质细胞所占比例

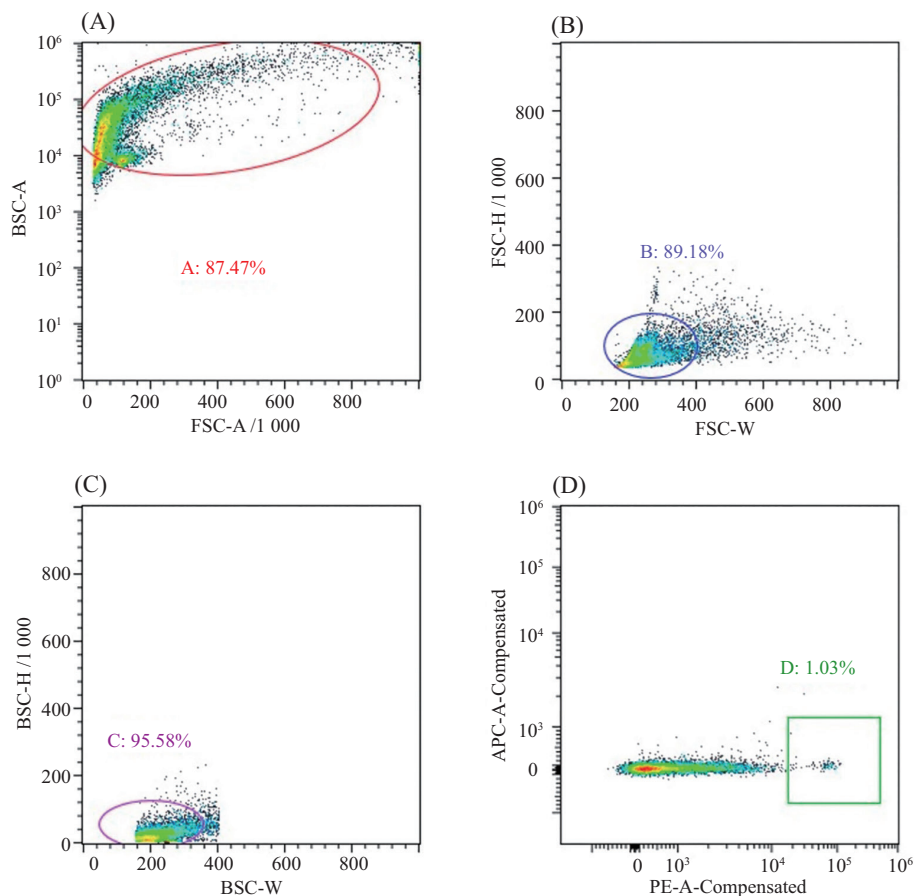
Table 2 Total cell number and the percentage of microglia obtained by mechanical grinding

名称 Name	数量 Number	占分离比/% Percentage of the parent /%	占总数比/% Percentage of the total /%
All cells	29 222	0	100.00
Cells of A gate	26 113	87.27	87.27
Cells of B gate	22 779	87.23	76.13
Cells of C gate	21 583	94.75	72.13
Cells of D gate (CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> )	246	1.14	0.82

细胞沉淀进行后续重悬、抗体染色和流式上机过程发现细胞得率非常低(图6和表3)。Percoll是一种密度梯度离心法中常用的梯度介质,用于分离不同密度的细胞或亚细胞结构。在脑组织单细胞悬液制备过程中使用Percoll进行离心分离时,细胞得率低可能由以下几个因素导致:细胞溶解或破裂,在制备过程

中,离心速度、离心时间或其他操作参数可能导致细胞的溶解或破裂,使细胞无法完整地分离和收集;细胞聚集,某些细胞类型具有亲水性,容易在悬液中发生聚集,形成团块,这些聚集体可能无法在离心过程中有效地被分离,并导致细胞得率降低;细胞黏附,部分细胞在Percoll介质中可能会黏附在管壁或





A~D: 去除细胞粘连体和细胞碎片之后根据空白管圈定的阴性细胞群来确定CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>类群即小胶质细胞。

A~D: After removing cell clumps and debris, the CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> population, i.e., microglia, was identified according to the negative cell population defined by the control tube gating.

图6 野生型小鼠大脑皮层中小胶质细胞表达情况(通过木瓜蛋白酶、DNA酶I消化法, Percoll离心制备单细胞悬液)

Fig.6 Expression of microglia in the cortex of the wild type mice (single-cell suspension was prepared by papain, DNase I digestion and with Percoll centrifugation)

表3 酶消化法(Percoll过滤)制备单细胞悬液的流式分选效率

Table 3 Flow separation efficiency of single-cell suspension prepared by enzyme digestion with Percoll centrifugation

名称 Name	数量 Number	占分离比/% Percentage of the parent /%	占总数比/% Percentage of the total /%
All cells	10 944	0	100.00
Cells of A gate c	9 573	87.47	87.47
Cells of B gate	8 537	89.18	78.01
Cells of C gate	8 160	95.58	74.56
Cells of C gate (CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> )	84	1.03	0.77

其他杂质上, 而无法顺利被分离和收集, 这会导致细胞得率降低。所以采取了不加Percoll离心, 只利用细胞过滤器过滤的方式, 结果显示细胞得率和小胶质细胞比例效果较好可以保证细胞得率(图3)。因此, 最后采用酶消化的方法和不利用Percoll离心的实验方案进行流式分析分选。

### 3.2 抗体孵育

在进行抗体孵育时, 设置空白对照(未染色细胞)和单阳对照。

### 3.3 流式分选后样品收集

由于流式分选样品收集是随着液滴喷在收集管中, 所以会有细胞喷在收集管壁上, 为了更好地收



集细胞, 可以利用平转离心机离心, 将细胞收集到管底。如果后续的细胞是用于提取RNA, 也可直接将细胞收集在Trizol中。

#### 4 结论

制备小鼠大脑单细胞悬液用于后续流式分选小胶质细胞是一项关键的实验步骤, 主要包括: 组织采集和分离, 确保在操作过程中保持组织的完整性和细胞的活力; 细胞过滤和洗涤; 细胞计数和调整浓度, 根据流式细胞仪的要求和实验设计, 通常需要在一定的细胞浓度范围内进行分选; 细胞标记, 根据实验需求, 可以选择使用单克隆抗体或多克隆抗体对特定表面标记物进行染色, 确保选择的抗体能够产生明确的信号; 流式细胞分选, 设置合适的仪器参数和门控策略来选择和收集目标小胶质细胞。需要注意的是, 流式分选小胶质细胞的成功与多个因素包括单细胞悬液的制备、细胞染色的效果、抗体的选择和特异性, 以及流式细胞仪的性能等有关。在进行实验前, 建议对单细胞悬液制备和分选技术进行充分优化和验证, 以确保准确性和可靠性。

#### ——致谢

非常感谢中国科学院上海营养与健康研究所的翟思楠关于RNA测序结果的分析。

#### 参考文献 (References)

- [1] KANDEL E R, JESSELL T M, KANDEL E R, et al. Principles of neural science, sixth edition [M]. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, McGraw Hill, 2000.
- [2] TEISMANN P, TIEU K, COHEN O, et al. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2003, 18(2): 121-9.
- [3] BANDYOPADHYAY S. Role of neuron and glia in Alzheimer's disease and associated vascular dysfunction [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 653334.
- [4] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia [J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-7.
- [5] YABLUCHANSKIY A, SAWLE P, HOMER-VANNIASINKAM S, et al. Relationship between leukocyte kinetics and behavioral tests changes in the inflammatory process of hemorrhagic stroke recovery [J]. *Int J Neurosci*, 2010, 120(12): 765-73.
- [6] BOHLEN C J, BENNETT F C, BENNETT M L. Isolation and culture of microglia [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2019, 125(1): e70.
- [7] BRIOSCHI S, D'ERRICO P, AMANN L S, et al. Detection of synaptic proteins in microglia by flow cytometry [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 149.
- [8] CALVO B, RUBIO F, FERNANDEZ M, 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.
- [9] HAMMOND T R, DUFORT C, DISSING-OLESEN L, et al. Single-cell RNA sequencing of microglia throughout the mouse lifespan and in the injured brain reveals complex cell-state changes [J]. *Immunity*, 2019, 50(1): 253-71, e6.
- [10] BENNETT M L, BENNETT F C, LIDDELOW S A, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(12): E1738-46.
- [11] BECHER B, ANTEL J P. Comparison of phenotypic and functional properties of immediately *ex vivo* and cultured human adult microglia [J]. *Glia*, 1996, 18(1): 1-10.
- [12] IMAI Y, IBATA I, ITO D, et al. A novel gene *Iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(3): 855-62.
- [13] ITO D, TANAKA K, SUZUKI S, et al. Enhanced expression of *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain [J]. *Stroke*, 2001, 32(5): 1208-15.
- [14] BHASIN M, WU M, TSIRKA S E. Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *BMC Immunol*, 2007, 8: 10.
- [15] PATEL A R, RITZEL R, MCCULLOUGH L D, et al. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2013, 5(2): 73-90.
- [16] PONOMAREV E D, SHRIVER L P, DITTEL B N. CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation [J]. *J Immunol*, 2006, 176(3): 1402-10.
- [17] XIMERAKIS M, LIPNICK S L, INNES B T, et al. Single-cell transcriptomic profiling of the aging mouse brain [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(10): 1696-708.
- [18] WANG B, JIANG B, LI G W, et al. Somatosensory neurons express specific sets of lincRNAs, and lincRNA CLAP promotes itch sensation in mice [J]. *EMBO Rep*, 2022: e54313.
- [19] WEI M, HUANG J, LI G W, et al. Axon-enriched lincRNA ALAE is required for axon elongation via regulation of local mRNA translation [J]. *Cell Rep*, 2021, 35(5): 109053.