

小鼠肺组织单细胞悬液制备的酶消化法比较研究

董心怡 谢楠希 徐玉东 王宇 杨永清* 陈艳焦*

(上海中医药大学岳阳中西医结合医院上海市针灸经络研究所, 上海 200030)

摘要 该研究比较两种胶原酶及配合使用Percoll细胞分离液对小鼠肺组织单细胞悬液中淋巴细胞得率、活性和数量的影响, 为单细胞测序前处理提供技术参考。将12只C57BL/6小鼠随机分为四组, 分别是I型胶原酶消化组(G1)、I型胶原酶消化+Percoll细胞分离组(G2)、IV型胶原酶消化组(G3)和IV型胶原酶消化+Percoll细胞分离组(G4)。四组方法所提取的肺组织单细胞悬液, 于显微镜下进行形态学观察, 拍照并计数, 后采用流式细胞术检测单个核细胞、活细胞和淋巴细胞的得率和数量, 以及不同免疫细胞亚群的比例和数量。结果显示, 两种胶原酶对小鼠肺组织细胞解离效果无明显差异, G1组制备的肺单细胞数量显著高于G3组($P<0.05$)。相同数量的细胞中, G2和G4组获得单个核细胞、活性细胞、CD45⁺细胞、CD3⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、NK细胞个数均显著高于G1和G3组($P<0.05$), 但在CD4⁺ T细胞、CD11c⁺细胞、NKT细胞个数上没有显著优势。应用I型胶原酶消化可以获得更多的细胞总数, 但应用IV型胶原酶消化可以获得更多的淋巴细胞。经过Percoll细胞分离液处理的G2和G4组可以分离获得更高活性的单个核细胞、CD45⁺细胞、CD3⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和NK细胞, 该研究为今后进行肺组织单细胞测序前处理提供了重要的技术参考。

关键词 小鼠; 肺组织单细胞悬液; 单细胞测序; 酶消化法

Comparative Investigation of Enzymatic Digestion Techniques for the Preparation of Single Cell Suspensions from Murine Lung Tissue

DONG Xinyi, XIE Nanxi, XU Yudong, WANG Yu, YANG Yongqing*, CHEN Yanjiao*

(Shanghai Research Institute of Acupuncture and Meridian, Yueyang Hospital,
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200030, China)

Abstract The present study compares the impact of two types of collagenase enzymes and the combined use of Percoll cell isolation solution on the proportion, cell activity, and quantity of lymphocytes in single cell suspensions derived from mouse lung tissue. These findings provide valuable technical insights for pretreatment in single cell sequencing. Twelve C57BL/6 mice were randomly assigned to four groups, namely the type I collagenase digestion group (G1), type I collagenase digestion+Percoll cell isolation group (G2), type IV collagenase digestion group (G3), and type IV collagenase digestion+Percoll cell isolation group (G4). The cell suspension of lung tissue obtained using these methods was morphologically observed under a microscope, photographed, and quantified.

收稿日期: 2024-10-31 接受日期: 2024-11-28

国家自然科学基金(批准号: 82105013、82374583)、上海市自然科学基金(批准号: 23ZR1459900)、扬帆计划(批准号: 20YF1445300)和上海市中医药三年行动计划[批准号: ZY(2021-2023)-0208]资助的课题

*通信作者。Tel: 13641882837, E-mail: dryqyang@163.com; Tel: 13162507559, E-mail: cyjb1018@163.com

Received: October 31, 2024

Accepted: November 28, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82105013, 82374583), the Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.23ZR1459900), the Shanghai Sailing Program (Grant No.20YF1445300) and the Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning [Grant No.ZY(2021-2023)-0208]

*Corresponding authors. Tel: +86-13641882837, E-mail: dryqyang@163.com; Tel: +86-13162507559, E-mail: cyjb1018@163.com

Subsequently, flow cytometry was employed to determine the percentage and number of single cells, viable cells, lymphocytes, as well as the proportion and number of different immune cell subsets. The results showed that no statistically significant difference was found between the two types of collagenase regarding cell dissociation efficiency in mouse lung tissue. However, the G1 group showed a significantly greater abundance of total lung cells than that observed in the G3 group ($P < 0.05$). Moreover, when adjusting for an equivalent cell count across groups, both the G2 and G4 groups exhibited notably higher yields of single cells, viable cells, CD45⁺, CD3⁺ T, CD8⁺ T and NK cells compared to those seen in either the G1 or G3 groups ($P < 0.05$). Nonetheless, no substantial advantage was noted concerning counts for CD4⁺ T, CD11c⁺, and NKT cells. A higher total cell count was achieved through type I collagenase digestion, while type IV collagenase yielded a greater proportion of lymphocytes. Treatment with Percoll cell separation solution in G2 and G4 groups enables isolation and acquisition of more living single cells, CD45⁺ cells, CD3⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells. These findings provide valuable technical insights for future pretreatment of lung tissue for single cell sequencing.

Keywords murine model; lung tissue single cell suspension; single cell sequencing methodology; enzymatic digestion method

近年来,单细胞转录组测序技术的发展和应用的革新了我们对生物体内每个细胞独特性的理解。自2009年首次被报道以来,单细胞转录组测序技术使得研究人员可以研究单个细胞内的基因表达情况,同时解决了用组织样本测序无法解决的细胞异质性难题,让解析单个细胞的行为、机制及其与机体的关系成为了现实^[1-2]。这对于理解复杂疾病机制至关重要。

肺部疾病,如哮喘、肺纤维化、慢性阻塞性肺病等,这些疾病都具有高度的异质性^[3],不同生物体之间可能存在不同的病理生理机制和治疗反应,这使得研究和治疗变得复杂。肺组织单细胞转录组测序技术为深入理解肺组织的生物学、疾病的发生发展机制,以及开发新的治疗方法提供了新的视角和研究手段^[4]。

单细胞转录组测序技术通常分为两大类:单细胞RNA测序(scRNA-seq)和单细胞核RNA测序(snRNA-seq),其中最成熟和最广泛应用的技术是scRNA-seq技术^[5]。scRNA-seq是在单细胞水平对全转录组进行扩增与测序的一项技术,能够获得每个细胞的mRNA表达信息,发现不同的细胞亚群以及相关信息,揭示细胞间基因表达的异质性并鉴定稀有细胞类型。然而,scRNA-seq通常需要活的或新鲜固定的细胞,以便进行细胞裂解和RNA提取。单细胞制备是scRNA-seq的第一步,直接影响后续的建库、转录组测序和数据分析。

针对肺组织的单细胞制备,目前存在三大难点,

其一,肺组织的构成细胞种类较多,获取不同细胞所使用的消化酶种类有所不同;其二,肺组织样本分离后,部分细胞群体死亡率过高^[6];其三,针对组织样本中某些含量较少细胞的分选,通常选用流式细胞术分选法,由于流式分选仪分选价格昂贵,且单位时间内能分选的细胞数有限,如何提高单位机时内能分选的微量细胞数,仍然存在挑战。

针对以上存在的问题,结合文献研究,本研究选择最常使用的两种肺组织消化酶I型胶原酶^[7]和IV型胶原酶^[8-9],以淋巴细胞得率、活性和数量,以及CD3⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、NK细胞、NKT细胞和CD11c⁺细胞为研究对象,通过比较I型胶原酶、IV型胶原酶、I型胶原酶联合使用Percoll细胞分离液和IV型胶原酶联合使用Percoll细胞分离液这四种单细胞悬液获取方法,分析以上四种方法对获得细胞的得率、活性和数量的影响,为肺组织单细胞悬液的制备和单细胞测序前处理提供技术参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

雄性、8周龄SPF级C57BL/6小鼠,体质量为18~20 g,共12只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号:SCXK(沪)2022-0004],饲养于上海中医药大学动物实验中心[许可证号:SYXK(沪)2020-0009],饲养温度20~24℃,饲养相对湿度50%~60%,12 h光照12 h黑暗循环交替。本研究经

上海中医药大学动物伦理委员会审核同意(伦理号: 2023 PZSHUTCM2310250002)。

将12只C57BL/6小鼠随机分为四组, 每组3只。第一组(G1)只单独采用I型胶原酶细胞分离液, 第二组(G2)采用I型胶原酶细胞分离液+Percoll分离液梯度离心, 第三组(G3)只单独采用IV型胶原酶细胞分离液, 第二组(G4)采用IV型胶原酶细胞分离液+Percoll分离液梯度离心(图1)。

1.2 主要试剂和仪器

异氟烷(货号R510-22-10)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; I型胶原酶(货号V900891)、DNase I(货号10104159001)、Percoll(货号GE17-0891-09)、红细胞裂解液(ACK lysis buffer)(NH_4Cl , 0.15 mol/L; KHCO_3 , 10 mmol/L; EDTA-Na_2 , 0.1 mmol/L)购自SIGMA-ALDRICH公司; IV型胶原酶(货号17104019)购自美国Gibco公司; RPMI 1640(货号MA0215)、HBSS(货号PWL053)、胎牛血清(货号PWL001)购自大连美仑生物技术有限公司; PE-Cyanine7 CD11c抗体(货号117318)、APC CD3抗体(货号100312)、PE CD45抗体(货号103106)、FITC NK1.1抗体(货号108705)购自BIOLEGEND公司; TruStain FcX™(anti-mouse CD16/32)抗体(Invitrogen, 25-0114-82)、Fixable

Viability Dye eFluor™ 780(货号65-0865-14)购自ThermoFisher Scientific公司。光学显微镜(货号XDS-2)购自广州粤显光学仪器有限责任公司; 离心机(货号Sorvall ST8)、流式细胞仪(Life Attune® NxT)购自ThermoFisher Scientific公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肺脏的制备 小鼠经异氟烷气体麻醉后, 采用颈椎脱臼法处死。固定小鼠, 打开胸腔, 充分暴露肺, 迅速摘取完整的左肺组织至于培养盘中置于冰上, 去除多余的软组织, 用提前配制的含2% FBS的PBS缓冲液(简称PF)清洗后, 备用。

1.3.2 肺脏单细胞悬液的制备 将取好的肺组织分别放在平皿上, 用解剖剪将肺组织剪成 0.1 mm^3 大小。将剪好的肺组织分别加入到3 mL I型胶原酶细胞分离液(含5% FBS+10% I型胶原酶+0.1% DNase I的RPMI 1640溶液)和3 mL IV型胶原酶消化液(含5% FBS+10% IV型胶原酶+0.1% DNase I的RPMI 1640溶液)中, 置于 37°C 摇床中, 200 r/min消化30 min。消化结束后, 立即加入10 mL PF液终止消化。充分混匀后, 1 500 r/min、 4°C 离心5 min, 弃上清。用500 μL 配制好的ACK裂解液进行重悬, 室温条件下孵育2 min, 加入10 mL的PF液终止裂红, 1 500 r/min、 4°C 离心5 min, 弃上清。加入1 mL的PF缓冲液进行重悬, 备

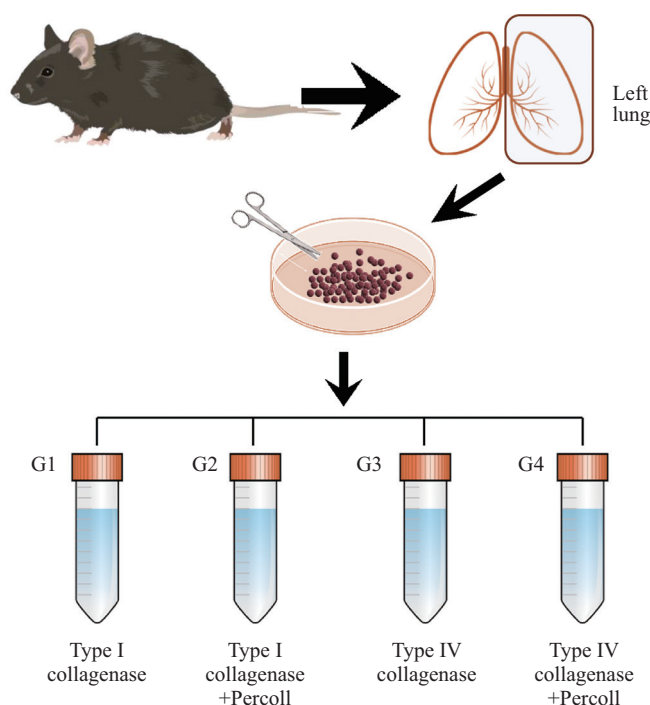


图1 提取小鼠肺组织单细胞悬液分组流程图

Fig.1 Flow chart illustrating the process of grouping single cell suspension obtained from mouse lung tissue

用。

1.3.3 Percoll分离淋巴细胞 本研究所使用的是38%的Percoll分离液,具体配制方法如下:①首先按照使用说明书配制好Percoll工作液,将Percoll母液与10× PBS按照体积比9:1进行配制;②利用1× PBS将Percoll工作液稀释成体积比为38%的Percoll分离液。G2和G4组获取肺脏单细胞悬液后,经200目滤膜过滤,1 500 r/min、4 °C离心5 min,弃上清,加入3 mL浓度为38 %的Percoll分离液重悬,轻柔吹打混匀,室温2 000 r/min,升速3降速1,离心20 min,弃上清。加入1 mL的PFS缓冲液进行重悬,备用。

1.3.4 细胞计数及形态学观察 取各组消化完成后的肺组织单细胞悬液1 μ L,稀释100倍,后取10 μ L加到细胞计数板上,在倒置显微镜下计数4个大方格内的细胞数,各组单细胞总数目=(4个大方格细胞数之和/4) $\times 10^4 \times$ 稀释倍数;细胞成团率=大方格成团细胞总数/大方格细胞总数。观察组织消化后所得细胞混悬液状态,比较组织消化完全度、细胞成团情况和细胞状态,比较各组细胞计数差异性。

1.3.5 流式细胞术检测 细胞计数后,各组分别取1 $\times 10^6$ 肺组织单细胞悬液进行流式抗体孵育染色。1 500 r/min、4 °C离心5 min,弃上清,加入100 μ L流式染色缓冲液重悬。随后加入Anti-CD16/32(1:200),4 °C孵育30 min后,加入预先配制好的流式抗体混合液(抗体添加均按照1:400),4 °C避光孵育30 min,加入1 mL流式染色缓冲液,1 500 r/min、4 °C离心5 min,弃上清,加入300 μ L流式染色缓冲液重悬,经过200目的尼龙网过滤后上流式细胞仪进行检测,每个样品收集总细胞数1 $\times 10^5$ 个,结果采用FlowJo-10软件分析。

1.4 统计学方法

实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件分析。计量资料用均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示,多组之间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多重比较的两两比较采用的是Tukey检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 两种酶消化法对小鼠肺组织细胞解离效果及细胞数的影响

在光学显微镜下观察两种酶消化后小鼠肺组

织细胞的形态,结果显示两种分离方法制备的小鼠肺组织单个核细胞的形态完整,边界清楚,但均有团块(图2A)。细胞计数板进行细胞成团率计算,G1组成团率结果为12.5 %,G3组成团率结果为13.34 %,两组成团率无明显差异(图2B)。

利用细胞计数板对四组分离得到的肺组织单细胞悬液进行细胞计数,比较小鼠左肺通过四种分离方法最终分离得到的细胞量,结果显示G1和G3两种方法制备的小鼠肺组织单个核细胞数量分别为 $(3.9 \pm 0.61) \times 10^6$ 和 $(2.67 \pm 0.43) \times 10^6$,G1组获得的肺组织单个核细胞数量显著高于G3,但统计学上无显著差异,由此,I型胶原酶消化比IV型胶原酶可以获得更多的细胞数。基于两种消化酶消化后的肺组织单细胞悬液进一步经过Percoll分离液处理后,G2组细胞数量为 $(1.47 \pm 0.2) \times 10^6$,G4组细胞数量为 $(2.16 \pm 0.15) \times 10^6$,G4组获得的肺组织单个核细胞数量显著高于G2,但统计学上无显著差异(图2C)。

I型胶原酶消化获得的细胞总数较多,但经过Percoll分离液处理后细胞数显著下降,提示I型胶原酶消化法获取的细胞中可能非免疫细胞的类型较多。而IV型胶原酶消化后的细胞,经过Percoll分离液处理后,细胞数量并没有发生显著减少,提示IV型胶原酶消化后的细胞总免疫细胞的类型较多。

2.2 四种方法对小鼠肺组织单个核细胞得率和活性的影响

使用流式细胞术对上述四种分离方法制备的小鼠肺组织单细胞的得率和活性进行检测,每个样本上样细胞数均为1 $\times 10^5$ 个。四种方法分离获得的细胞单个核细胞百分比均在75%上下浮动,四组无明显差异(图3A)。但经过Percoll分离液处理后的单个核细胞个数均较不经处理的多(图3C),提示G2组和G4组可以获得更多可用的单个核细胞。

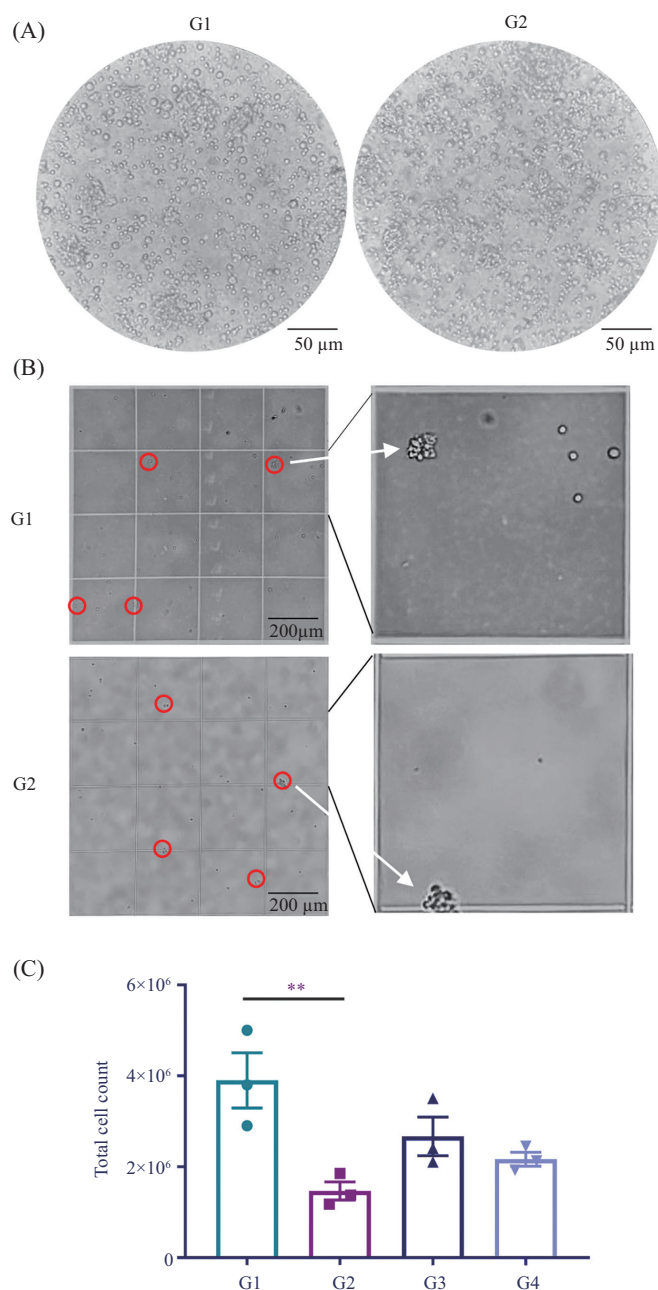
此外,死活染料Fixable Viability Dye标记后流式分析结果显示,各组获得单个核细胞中活细胞百分比,G2组和G4组均在88%左右(图3B),且获得保留活性细胞个数超过5 $\times 10^4$ 个。而G1组和G3组获得活细胞个数在2.5 $\times 10^4$ 个左右(图3D)。这提示,在特定细胞总数的前提下,采用G2和G4两种方法可获得的活细胞总数较多。

2.3 四种方法对小鼠肺组织单个核细胞淋巴细胞比例和数量的影响

使用流式细胞术对上述四种分离方法制备的

小鼠肺脏单个核细胞进行检测, 分析小鼠肺脏各类免疫细胞亚群特征, 包括: $CD45^+$ 细胞、 $CD3^+$ 细胞、 $CD4^+$ T 细胞 ($CD3^+ CD4^+ CD8^-$)、 $CD8^+$ T 细胞 ($CD3^+ CD4^- CD8^+$)、NK 细胞 ($NK1.1^+ CD3^-$)、NKT 细胞 ($NK1.1^+ CD3^+$)、T 细胞 ($NK1.1^- CD3^+$) 免疫细胞亚群的代表性设门策略(图4)。

使用流式细胞术分析四种分离方法制备的小鼠肺组织单细胞悬液中 $CD45^+$ 细胞的比例和数量, 结果显示, 在总细胞为 1×10^5 个细胞的条件下, 经过 Percoll 以后的肺组织单细胞含 $CD45^+$ 细胞百分比均超过 90%, 对应获得 $CD45^+$ 细胞数分别为 $(4.97 \pm 0.23) \times 10^4$ 和 $(4.71 \pm 0.22) \times 10^4$, 而未经

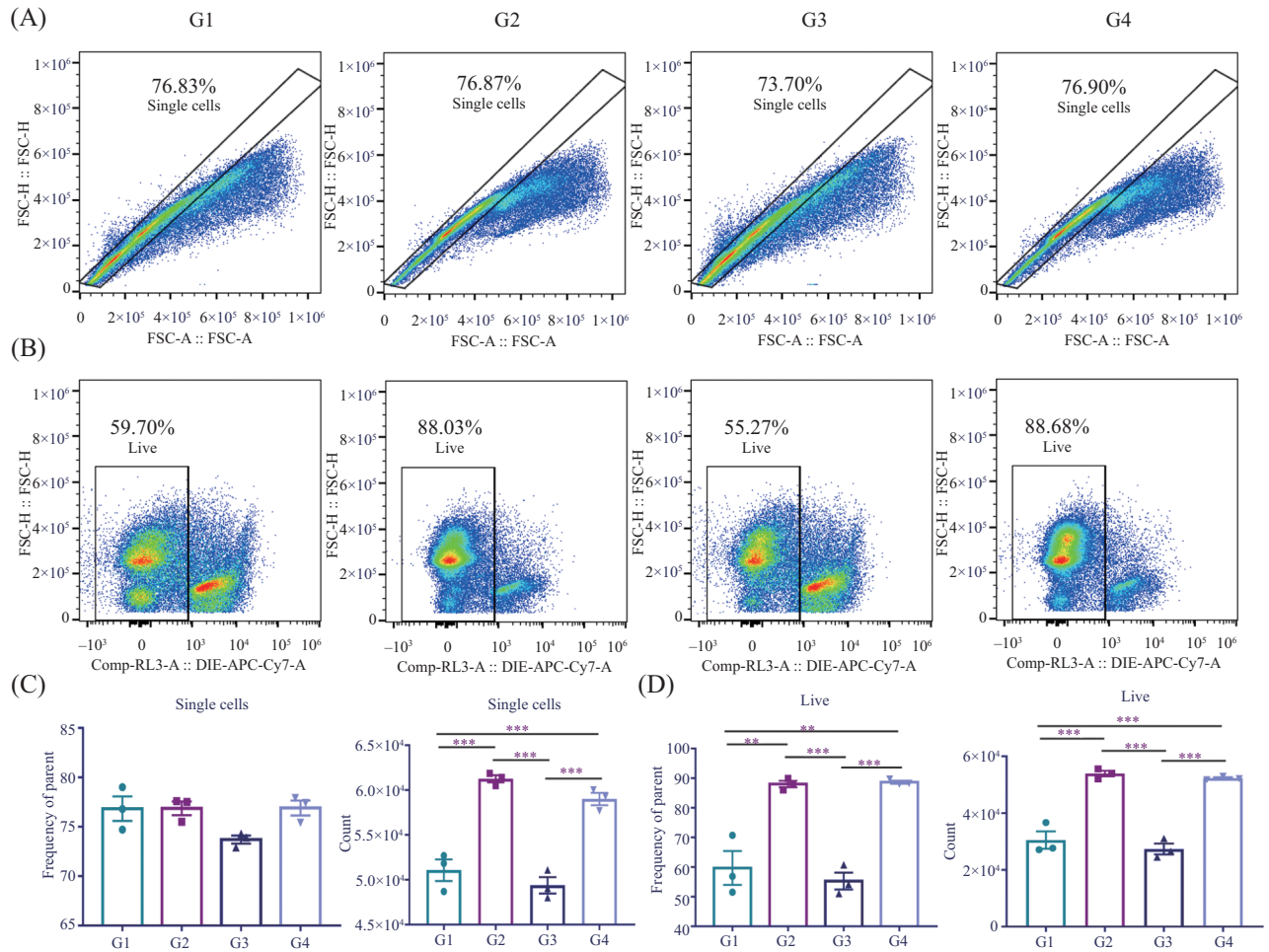


A: 两种消化酶法获取小鼠肺组织单个核细胞形态学观察图; B: 两种消化酶消化成团率观察图, 红色圆圈内为成团细胞, 白色箭头指向放大后的成团细胞; C: 四种分离方法获取肺组织总细胞数的比较, $**P < 0.01$ 。

A: morphological observation of cells in mouse lung tissue obtained using two enzymatic methods; B: observation of digestion rate using two enzymatic methods, with clustered cells highlighted within the red circle, white arrows point to clumped cells after magnification; C: comparative analysis of total cells count in lung tissue obtained through four isolation methods, $**P < 0.01$.

图2 细胞形态学观察及计数结果

Fig.2 The observation of cellular morphology and quantification



A: 各组单个核细胞分析代表图; B: 各组活细胞分析代表图; C: 各组单个核细胞的比例和数量, *** $P < 0.001$; D: 各组活细胞的比例和数量, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: representative map illustrating the analysis of single cells in each group; B: representative map illustrating the analysis of viable cells in each group; C: the proportion and quantity of single cells in each group, *** $P < 0.001$; D: the proportion and quantity of viable cells in each group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 四种方法获取小鼠肺组织单个核细胞得率和活性结果

Fig.3 Cell proportion and activity in mouse lung tissue obtained by four methods

Percoll处理的细胞CD45⁺细胞百分比在80%以下, 对应获得CD45⁺细胞数分别为 $(2.13 \pm 0.14) \times 10^4$ 和 $(2.17 \pm 0.42) \times 10^4$ 。结果显示, 不管哪一种消化酶获取的肺组织单细胞悬液经过Percoll处理后, CD45⁺细胞数将显著提高, 提高数量均超过2倍, 且具有统计学意义($P < 0.05$, 图5A和图5D)。

进一步在CD45阳性圈门下, 分析各组获得的CD3⁺ T细胞百分比和数量。结果显示, 在总细胞为 1×10^5 个细胞的条件下, G1组获得CD3⁺ T细胞百分比 $(23.07 \pm 1.9)\%$ 最高, 但对应获得CD3⁺细胞数并不是最高, 只有 $(4.90 \pm 0.42) \times 10^3$ 个。经过Percoll分离液处理的G2和G4组, 获得的CD3⁺ T细胞数分别是 $(8.15 \pm 0.91) \times 10^3$ 个和 $(8.02 \pm 0.53) \times 10^3$ 个, 均较G1和G3

组高, 且具有统计学差异($P < 0.05$, 图5B和图5E)。

在CD3阳性圈门下, 进一步分析CD4⁺ T和CD8⁺ T细胞的百分比和数量。CD4⁺ T细胞百分比结果显示, G3组获得CD4⁺ T细胞的百分比 $(34.07 \pm 3.6)\%$ 最高, 与G1组无差别, 但与Percoll处理后获得的CD4⁺ T细胞百分比有显著差异。经过Percoll处理后的CD4⁺ T细胞数量高于G1和G3组, 但四组在获得CD4⁺ T细胞数量上无统计学差异(图5C和图5F)。CD8⁺ T细胞百分比结果显示, G2和G4组经过Percoll处理后, CD8⁺ T细胞的百分比高于未经处理的G1和G3组, 对应的CD8⁺ T细胞数, 显示出同样的趋势, 且G2组获得的CD8⁺ T细胞数为 $(4.90 \pm 0.72) \times 10^3$ 个, 是G1组的1.8倍; G4组获得的CD8⁺ T细胞数为 $(4.80 \pm 0.50) \times 10^3$

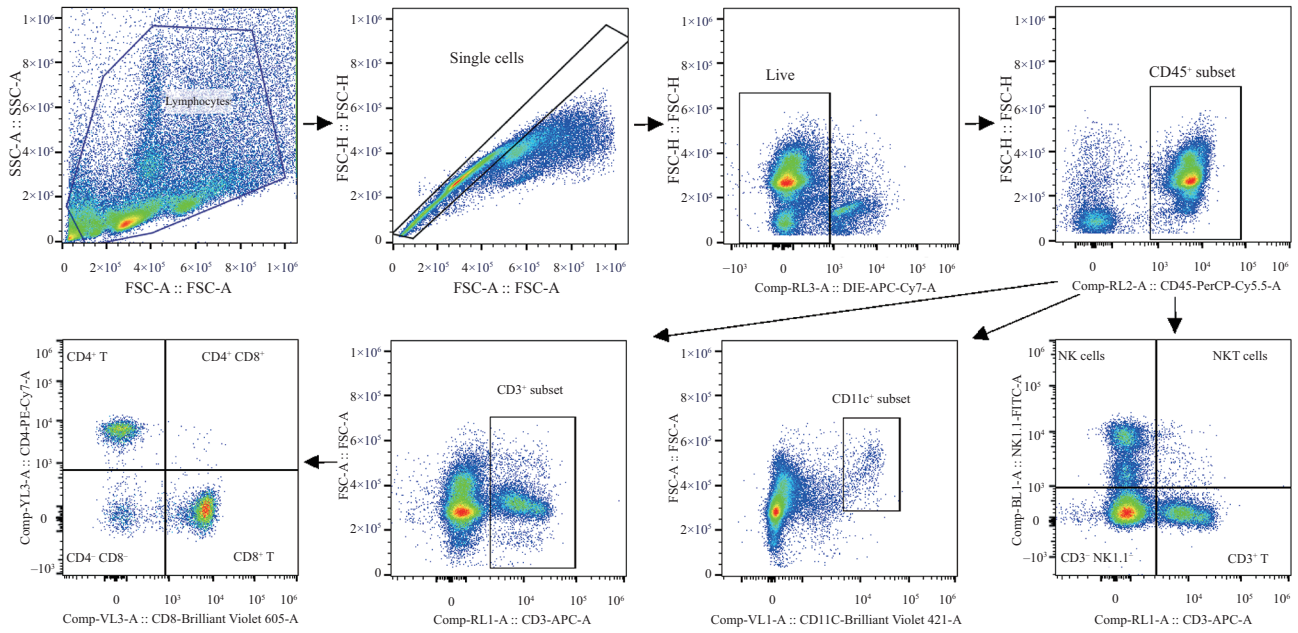


图4 小鼠肺脏不同免疫亚群代表性设门策略图

Fig.4 Gating strategy of distinct immune subsets in the murine lung

个,是G3组的2倍(图5C和图5G)。

2.4 四种方法对小鼠肺组织单个核细胞各细胞亚群比例和数量的影响

使用流式细胞术分析,四种分离方法制备的小鼠肺组织单细胞悬液中NK1.1⁺细胞的比例和数量,结果显示,在总细胞为 1×10^5 个细胞的条件下,四种分离方法获得NK细胞百分比无明显差异。但不管哪一种消化酶获取的肺组织单细胞悬液经过Percoll处理后,NK细胞数获取量均显著提高,提高数量均超过1.5倍,且具有统计学意义($P < 0.05$),G2组获取的NK细胞最高,达到 $(8.52 \pm 0.45) \times 10^3$ 个(图6A和图6C)。

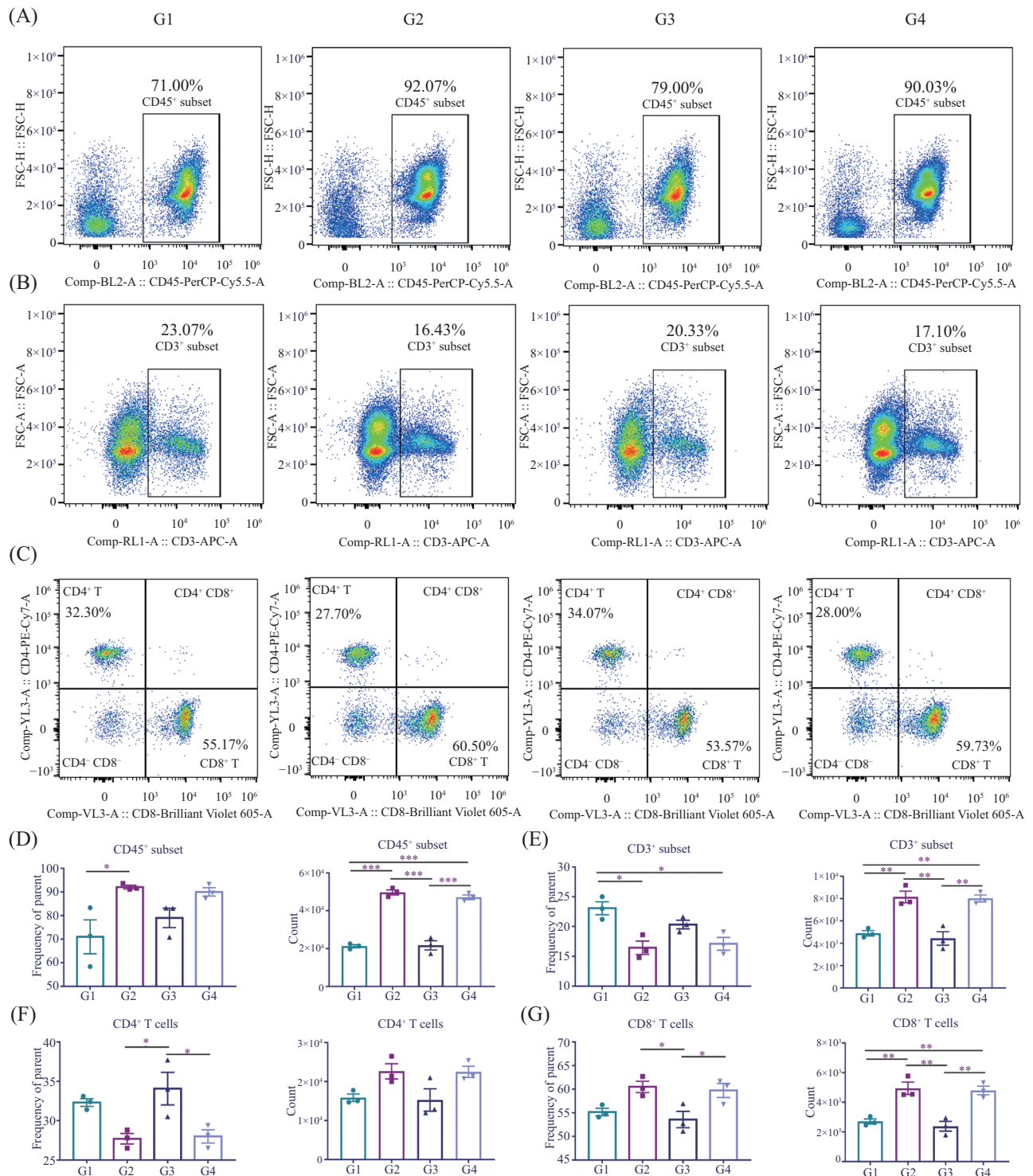
此外,四种分离方法中,G3组在NKT细胞和CD11c⁺细胞的百分比中,表现出比经过Percoll处理后的G2和G4组的NKT细胞和CD11c⁺细胞的百分比高,但四组在NKT细胞数和CD11c⁺细胞数,无明显统计学差异(图6A~图6D)。这提示四种方法在获取NKT细胞和CD11c⁺细胞数,并无明显差异,选择任何一种均可。

3 讨论

本研究比较了I型胶原酶和IV型胶原酶分别消化肺组织,获得的单细胞悬液细胞的解离效果和细胞数,结果显示两种胶原酶在相同孵育时间内,获得的细胞具有相似的形态和成团率,这与前期其他研

究者的研究结果一致^[10]。但本研究结果显示,I型胶原酶比IV型胶原酶在相同条件下消化获取了更多的细胞数,结合Percoll细胞分离液的结果分析发现,尽管I型胶原酶获得的总细胞数更多,但是IV型胶原酶消化后的细胞中免疫细胞的数量较多。这从两种胶原酶的成分上,可以得到解释。I型胶原酶含有比较均匀的各种酶活力,包括胶原酶、酪蛋白酶、梭菌蛋白酶、胰蛋白酶等成分,分解胶原蛋白方面表现出高效率,能够快速降解胶原纤维,可以用于多种组织,故本研究中分离出的细胞总数较多,且除淋巴细胞以外的其他细胞也较多;而IV型胶原酶含有更高比例的非胶原蛋白酶,如胰蛋白酶和其他中性蛋白酶,可能在分离非胶原的其他细胞中显示出了更多的优势,故本研究中分离出的免疫细胞数量较多。但本研究中未考虑两种消化酶的分离效率问题,I型胶原酶效率更高^[11],而IV型胶原酶更温和,可能需要更多的反应时间,这在今后的研究中需要考虑。

scRNA-seq对细胞悬液的活性要求很高,活性高的细胞对于获得高质量的测序数据至关重要。因为死亡或破损的细胞中的RNA释放出来,这种RNA会导致数据结果中背景噪声升高,影响单细胞数据的质量^[12-13]。在实际scRNA-seq中,通常会对肺组织中某一群细胞进行检测,而采用高通量单细胞分选方法,最常用的就是流式细胞法分选,对目的细胞进

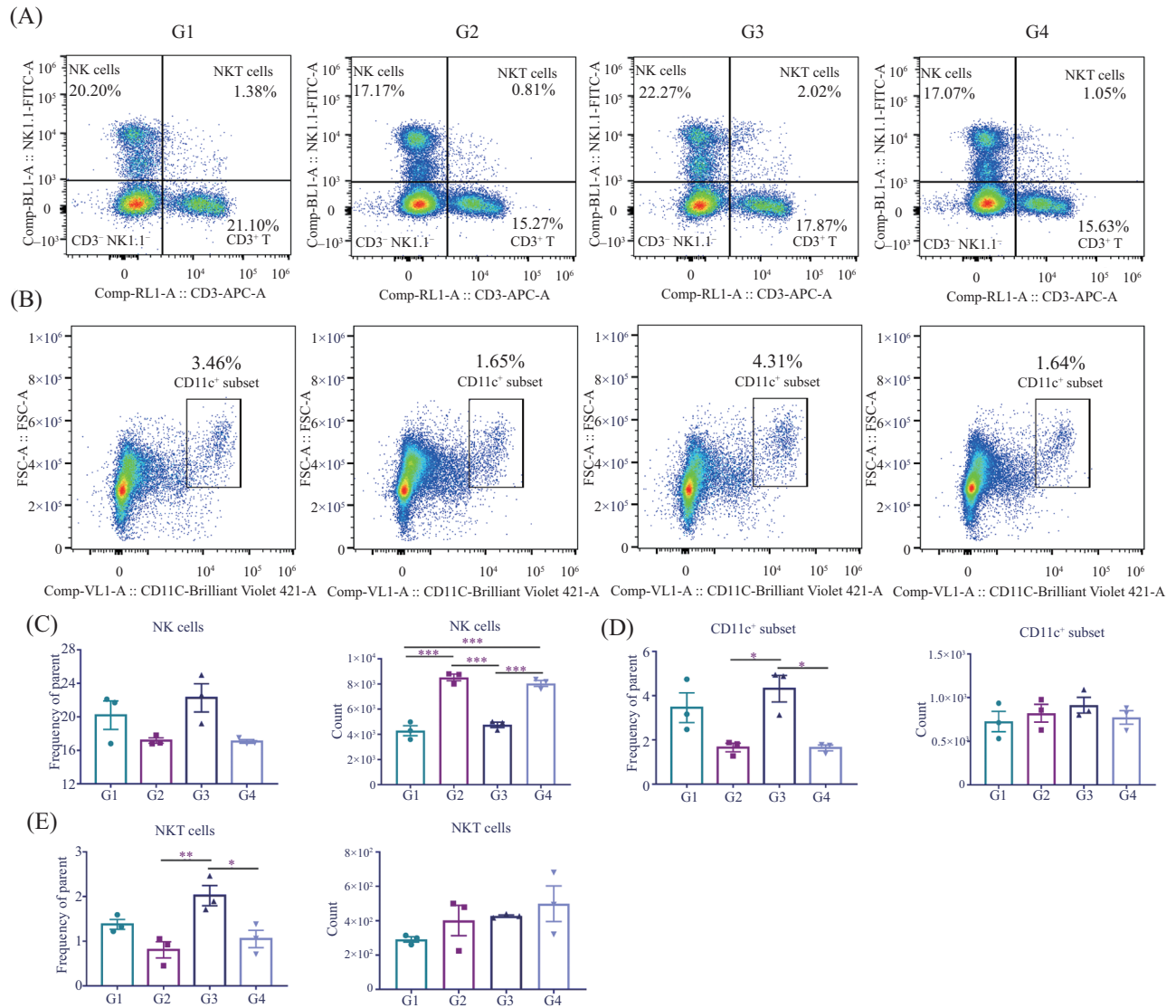


A: 各组CD45⁺细胞分析代表图; B: 各组CD3⁺细胞分析代表图; C: 各组CD4⁺和CD8⁺细胞分析代表图; D: 各组CD45⁺细胞的比例和数量; E: 各组CD3⁺细胞的比例和数量; F: 各组CD4⁺细胞的比例和数量; G: 各组CD8⁺细胞的比例和数量。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: representative map illustrating the analysis of CD45⁺ cells in each group; B: representative map illustrating the analysis of CD3⁺ cells in each group; C: representative map illustrating the analysis of CD4⁺ and CD8⁺ cells in each group; D: the proportion and quantity of CD45⁺ cells in each group; E: the proportion and quantity of CD3⁺ cells in each group; F: the proportion and quantity of CD4⁺ cells in each group; G: the proportion and quantity of CD8⁺ cells in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 四种方法获取肺组织单个核细胞淋巴细胞比例和数量结果

Fig.5 Immune cell proportion and quantity in mouse lung tissue obtained by four methods



A: 各组NK和NKT细胞分析代表图; B: 各组CD11c⁺细胞分析代表图; C: 各组NK细胞的比例和数量, *** $P < 0.001$; D: 各组CD11c⁺细胞的比例和数量, * $P < 0.05$; E: 各组NKT细胞的比例和数量, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: representative map illustrating the analysis of NK and NKT cells in each group; B: representative map illustrating the analysis of CD11c⁺ cells in each group; C: the proportion and quantity of NK cells in each group, *** $P < 0.001$; D: the proportion and quantity of CD11c⁺ cells in each group, * $P < 0.05$; E: the proportion and quantity of NKT cells in each group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图6 四种方法获取肺组织单个核细胞各细胞亚群比例和数量结果

Fig.6 The proportion and quantity of cell subsets in mouse lung tissue obtained by four methods

行荧光标记, 利用流式细胞仪分选单个活细胞, 该技术通量高、特异性强。但该方法单位机时内能分选的细胞数有限, 细胞密度需要控制在一定的水平, 如果上机细胞活性较低、细胞纯度不够, 相应的分选时间将大大延长。因此, 如果在上机之前已经将细胞活性和细胞纯度提高到一定程度, 将大大缩减分选机时、抗体用量等。本研究采用结合Percoll细胞分离液, 将消化后的细胞及产生的碎片去除, 进一步提高了分离细胞的活性, 且显著提高了CD45⁺细胞、CD3⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和NK细胞的数量, 为今后

进行以上几种细胞分选和肺组织scRNA-seq前处理提供了重要的技术参考。

本研究针对肺组织的单细胞制备目前存在的问题, 以及scRNA-seq前处理对肺组织单细胞制备的质量要求, 通过四种分离方法进行比较, 认为应用I型胶原酶消化可以获得更多的细胞总数, 但应用IV型胶原酶消化可以获得更多的淋巴细胞。经过Percoll细胞分离液处理的G2和G4组可以分离获得更高活性的单个核细胞、CD45⁺细胞、CD3⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和NK细胞, 为今后进行肺组织单细胞测

序前处理提供了重要的技术参考。

参考文献 (References)

- [1] WEN L, TANG F. Recent advances in single-cell sequencing technologies [J]. *Precis Clin Med*, 2022, 5(1): pbac002.
- [2] NISHIDE M, SHIMAGAMI H, KUMANOGOH A. Single-cell analysis in rheumatic and allergic diseases: insights for clinical practice [J]. *Nat Rev Immunol*, 2024, 24(11): 781-97.
- [3] PIJNENBURG M W. Long-term respiratory consequences of prematurity [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2024, doi: 10.1002/ppul.27304.
- [4] WANG Y, TANG N. The diversity of adult lung epithelial stem cells and their niche in homeostasis and regeneration [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(12): 2045-59.
- [5] 朱玉茹晨, 李宇, 王越. 单细胞转录组测序技术及其在免疫学研究中的应用[J]. *海军军医大学学报(ZHU Y R C, LI Y, WANG Y. Single-cell transcriptome sequencing technology and its application in immunological research [J]. Journal of Naval Medical University)*, 2024, 45(2): 145-54.
- [6] 魏颖, 吾尼且木·吐拉克, 滕方舟, 等. 单细胞转录组测序在哮喘研究中应用的研究进展[J]. *复旦学报(医学版)(WEI Y, WU-NIQIEMU T, TENG F Z, et al. Research progress of single-cell transcriptome sequencing in asthma research [J]. Fudan Journal, Medical Edition)*, 2021, 48(3): 404-9.
- [7] COLLINS J J, M BIUS M A, TH BAUD B. Isolation of CD146⁺ Resident lung mesenchymal stromal cells from rat lungs [J]. *J Vis Exp*, 2016(112): 53782.
- [8] ARDEN M G, SPEARMAN M A, ADAMSON I Y. Degradation of type IV collagen during the development of fetal rat lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 9(1): 99-105.
- [9] SAND J M B, GENOVESE F, KARSDAL M A. Chapter 4-type IV collagen [M]. *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*. Academic Press, 2016: 31-41.
- [10] BERARDO C, FERRIGNO A, SICILIANO V, et al. Isolation of rat hepatocytes for pharmacological studies on metabotropic glutamate receptor (mGluR) subtype 5: a comparison between collagenase I versus collagenase IV [J]. *Eur J Histochem*, 2020, 64(2): 3123.
- [11] VAN DAMME L, COX N, CALLENS C, et al. Protein truncating variants of colA in clostridium perfringens type G strains [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 645248.
- [12] JANSSEN P, KLIESMETE Z, VIETH B, et al. The effect of background noise and its removal on the analysis of single-cell expression data [J]. *Genome Biol*, 2023, 24(1): 140.
- [13] NASSIRI I, FAIRFAX B, LEE A, et al. scQCEA: a framework for annotation and quality control report of single-cell RNA-sequencing data [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 381.