

小鼠肠道固有层免疫细胞分离的方法及高参数流式分析

俞珺璟, 张苗苗, 边玮

(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: 在免疫学相关的基础科研工作中, 流式细胞术是免疫表型及功能分析的重要手段。其中, 高质量的单细胞悬液制备是流式检测的关键步骤, 直接影响流式检测的结果。该研究选取一种较难制备的原代组织样本——小鼠肠道, 从细胞得率、活性、免疫细胞标志物等多个指标比较两种酶解方法的结果。结果表明以胶原酶 VIII 和 DNase I 为主的消化方法更适用于小鼠肠道固有层免疫细胞的获取, 同时结合多参数配色方案, 实现了对肠道免疫细胞各主要类群的全面分析。该研究为揭示样品制备实验结果的影响提供了参考依据, 为准确分析小鼠肠道固有层免疫细胞类群提供了可靠的检测方法。

关键词: 肠道固有层; 单细胞悬液制备; 多色流式检测

Preparation of Immune Cells from Mouse Intestinal Lamina Propria and Establishment of Multi-Parameter Flow Cytometry Panel

Yu junjing, Zhang miaomiao, Bian Wei

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

Abstract: Flow cytometry is an important method for immunophenotypic and functional analysis. Among them, the preparation of higher quality single cell suspension is the key step of flow cytometry analysis, which directly affects the results. The intestinal lamina propria of immune cells in mice is one kind of difficult to preparation of the original tissue sample. In this study, we use two kinds of enzyme digestion conditions and compare the cell yield, cell viability and immune cell markers, the results show that the collagenase VIII and DNase I enzyme solution method is more suitable for intestinal lamina propria of immune cells in mice. The establishment of this single cell preparation method can be used to more accurately analyze and quantify the population of intestinal immune cells by flow cytometry. The study provided a reference basis for

revealing the influence of the sample preparation for experimental results, and a reliable method for the accurate analysis of immune cell populations in mouse intestinal lamina propria.

Keywords: intestinal lamina propria; single cell preparation; multi-color flow cytometry analysis

小鼠肠黏膜免疫系统由三个重要部分组成: 肠道黏膜固有层(lamina propria, LP)、肠上皮层以及肠系淋巴结和派氏结^[1-4]。其中肠道固有层含有丰富的淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞等, 它们在维持肠道稳态中发挥着重要的作用^[3, 11-23]。相较于一些易于制备的样品而言(例如细胞系、淋巴结、脾脏等), 肠道黏膜固有层免疫细胞(lamina propria lymphocytes, LPL)是一类消化制备复杂、易碎敏感的细胞^[4]。因此找到合适的 LPL 的分离方法, 获得足量的单细胞悬液, 同时结合多色流式分析或分选技术, 将有效促进肠道黏膜免疫的研究。本研究通过对两种酶解反应体系进行比较, 细胞得率、活性、免疫细胞标志物等多个指标表明以胶原酶 VIII 和 DNase I 为主的酶解方法更适用于小鼠肠道固有层免疫细胞的获取, 为后续多色流式检测或分选提供高质量的单细胞悬液, 同时我们以此为基础, 设计并实现了高参数肠道固有层免疫细胞流式分析, 以期为肠道黏膜免疫细胞的研究提供参考和指导。

1 材料与方法

取 8 周龄小鼠的结肠, 采用两种方法消化结肠, 实验流程见图 1: 消化方法①参照 Nature Protocols 上的处理方法^[4], 消化方法②借鉴 Bio-protocol 的消化方法^[10], 其中消化液①主要包括胶原酶 D、II 型分散酶和 DNase I, 消化液②主要包括胶原酶 VIII 和 DNase I。通过对细胞得率、细胞活性以及细胞表面抗原标记情况的评估, 确定适合参数检测的样品处理方法, 依托 SonyID7000 光谱流式检测仪, 设计多参数配色方案, 实现对肠道免疫细胞各主要类群的全面分析。

2 实验结果

2.1 消化条件对获得细胞得率的影响

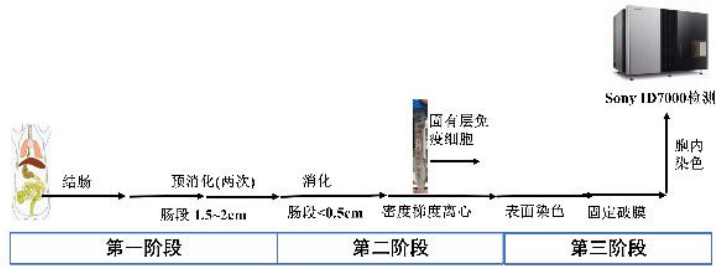


图1 固有层免疫细胞制备以及染色流程

我们分别按照相应的步骤处理野生型 C57BL/6 小鼠的结肠, 获得的单细胞悬液用 PBS 稀释 10 倍后利用流式细胞仪 Thermo Attune 进行细胞计数, 最后统计两种方法获得的细胞数量。结果发现, 采用方法①消化, 每厘米结肠可获得的细胞数量约为 3.7×10^5 , 采用方法②消化, 每厘米结肠可获得的细胞数约为 8.2×10^5 , 约为方法①的 3 倍, 二者具有显著性的差异(图 2)。

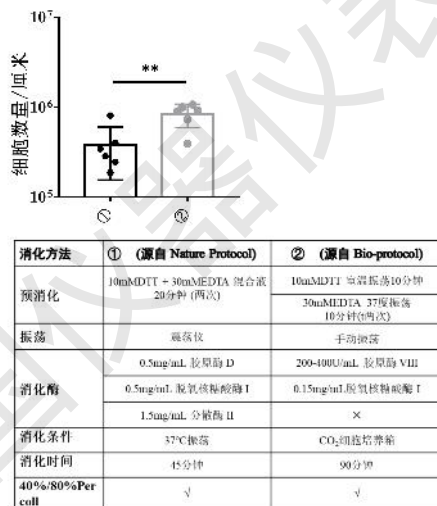


图2 两种消化方法的细胞得率

2.2 消化条件对细胞活性的影响

采用经典的 Annexin V/FITC 和 PI 双指数染色的方法检测所得细胞悬液中细胞的凋亡情况, 两种方法的代表性流式检测结果如图 3C 和 3D 所示。统计结果发现, 虽然两种制备方法都会对肠道固有层免疫细胞有损伤, 但是造成细胞死亡的方式不尽相同, 方法①倾向于早期凋亡, 而方法②更倾向于晚期凋亡。其中, 方法①平均细胞凋亡率为 28%(图 3F)、方法②平均细胞凋亡率为 27%(图 3F); 然而, 方法①获得细胞的晚期细胞凋亡率约为 4%(Annexin V 和 PI 双阳性细胞群)、早期凋亡率约为 24%(Annexin V 单阳性细胞群), 方法②的晚期凋亡

率约为 17%、早期凋亡率约为 9%，二者具有统计学意义上的差异(图 3E)。

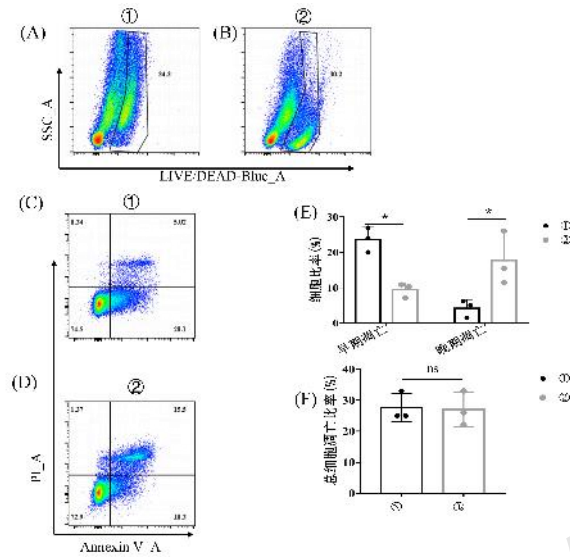


图 3 消化条件对细胞活性状态的影响

2.3 消化条件对细胞表面抗原的影响

结果显示,两种方法获得 CD45⁺白细胞的比例(图 4A)和 CD11b⁺细胞的比例(图 4B)没有显著的差异。虽然方法②获得的 CD45⁺白细胞(图 4C)和 CD11b⁺细胞(图 4D)的平均数量略高于方法①,但是二者没有显著性差异;关于 CD11c⁺细胞比例的统计结果,二者也没有显著性差异(图 4E),但是方法②获得的 CD11c⁺的细胞数量显著高于方法①(图 4G)。另外,虽然方法①获得 CD3⁺细胞的比例略高于方法②(图 4F),但是两种方法获得的 CD3⁺的 T 细胞数量没有明显的差异(图 4H)。这些结果说明,两种消化方法基本不影响 CD45、CD11b、CD11c 和 CD3 检测结果。

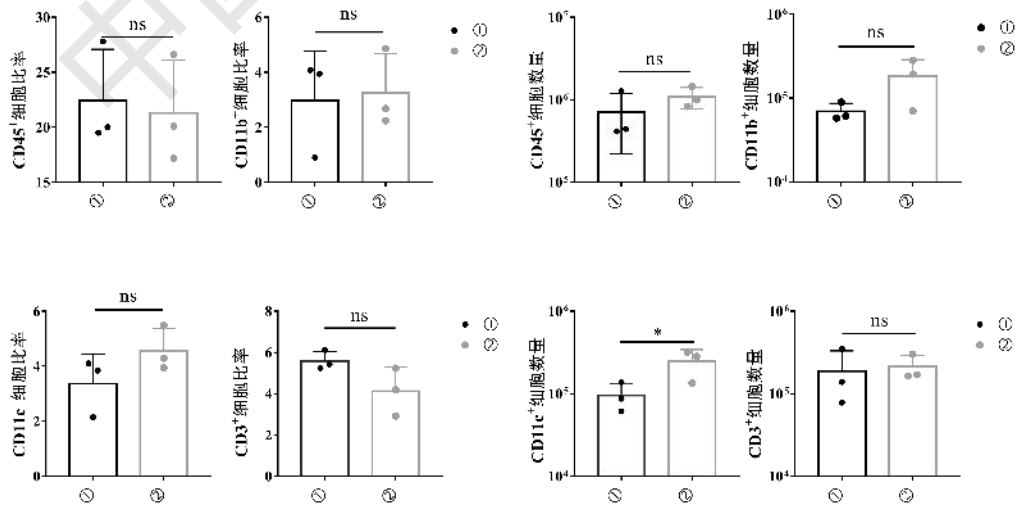


图 4 两种消化方法对非淋巴细胞表面抗原的影响

有文献报道淋巴细胞相关的一些表面抗原对消化条件非常敏感,会影响检测结果的准确性^[4, 24]。因此,我们统计了两种方法获得细胞的 CD19、CD4 和 CD8 的流式检测结果。分析发现,方法①处理后,检测到的 CD4⁺辅助性 T 细胞、CD8⁺细胞毒性 T 细胞以及 CD19⁺B 淋巴细胞的比例明显低于方法②,具有明显的差异,并且二者的绝对数量统计结果也具有明显的差异(图 5)。

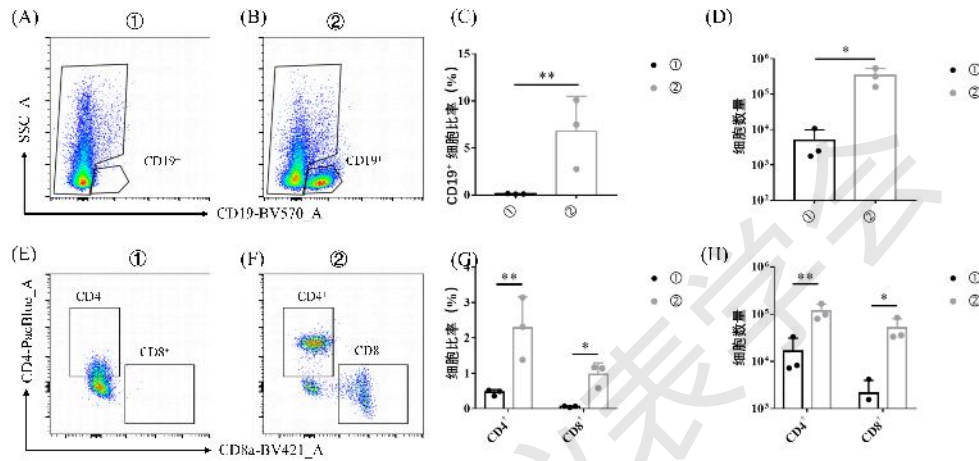


图 5 两种消化方法对淋巴细胞表面抗原的影响

2.4 多参数流式检测小鼠结肠固有层免疫细胞群体

表 1 小鼠结肠固有层免疫细胞类群 17 色染色方案

抗原	细胞类型	抗体克隆号	荧光	稀释倍数
CD45	白细胞系	30F11	AF700	1:200
CD64	单核细胞、巨噬细胞	X54-5/7.1	PE-Cy7	1:100
CD11b	骨髓来源细胞	M1/70	BV711	1:200
F4/80	巨噬细胞、嗜酸性细胞	BM8	FITC	1:100
CX3CR1	趋化因子受体	SA011F11	BV785	1:100
Ly6C	单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞	HK1.4	BV605	1:200
CD11c	树突状细胞、巨噬细胞	N418	PE-Cy5	1:200
CD103	共同树突状细胞和前体树突状细胞来源的	2E7	PerCP-eFluro710	1:100
MHCII	激活、抗原呈递相关	M5/114.15.2	PerCP	1:100

Ly6G	中性粒细胞	1A8	PE-Dazzle 594	1:200
Siglec-F	嗜酸性粒细胞	S17007L	PerCP-Cy5.5	1:100
CD3	T 细胞以及 NKT 细胞	17-A2	BV510	1:50
CD4	T 辅助细胞	RM4-5	PacBlue	1:200
CD8a	细胞毒性 T 细胞	53-6.7	BV421	1:400
NK1.1	NK、NKT 细胞	PK136	APC-eFluro780	1:100
CD19	B 细胞	6D5	BV570	1:100
细胞死活染料			LIVE/DEAD-Blue	1:1000

通过比较方法①和方法②这两种酶解小鼠结肠获取固有层免疫细胞的方法,我们发现方法②更加适合后期的多参数流式检测。因此,我们利用该方法,采用 17 色荧光检测方案(表 1) 指征了野生型小鼠结肠固有层 8 种主要免疫细胞类群及 18 种免疫细胞亚群(图 5)。根据相关文献报道^[5-17], 设定如图 6 所示的圈门策略。

首先从活的单细胞里圈出 CD45⁺的白细胞群,这是免疫细胞共有的分子标记。B 细胞是肠道分泌 IgA 抗体的重要细胞,在肠道免疫中行使重要功能^[18-19],我们利用 SSC 和 CD19 从 CD45⁺的白细胞中圈出 CD19⁺SSC^{low}B 细胞群。

天然免疫淋巴细胞包括 NK 细胞和 ILCs,它们不仅为机体抵御病原体的侵袭和感染,还参与器官形成、组织修复和黏膜稳态^[20]。我们从 CD19⁺的细胞群圈出 NK1.1⁺的 NK 细胞,再利用 CD3 划分出 CD3⁺NK1.1⁺的 NKT 细胞群和 CD3⁻NK1.1⁺的 NK 细胞群,因为 CD3 是 T 细胞受体的重要组成部分,NKT 细胞表面同样表达 TCR^[20-21];肠道免疫系统中存在多种 T 细胞,包括辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞,我们从 NK1.1⁻细胞群圈出 CD3⁺T 细胞,再利用 CD4 和 CD8 圈出 CD4⁺的辅助性 T 细胞和 CD8⁺的细胞毒性 T 细胞。

粒细胞的大量浸润肠道是 DSS 诱导小鼠肠炎发生的重要特征,因此粒细胞是表征肠道炎症的重要免疫细胞群。从 CD3⁻的细胞利用 SSC 和 Siglec-F 可以获得 Siglec-F⁺的嗜酸性粒细胞^[22]。中性粒细胞则为 CD11b 和 Ly6G 双阳性的细胞群,这里我们先排除了 DCs(CD11c^{hi}MHCII⁺),从非 DC 细胞群中圈出 CD11b⁺Ly6G⁺的中性粒细胞。

树突状细胞是肠道中重要的抗原呈递细胞,肠道树突状细胞包括单核来源的 CD11b⁺CD103⁻(DC1)、CD11b⁺CD103⁺(DC2)以及共同树突状细胞和前体树突状细胞来源的 CD11b⁻CD103⁺(DC3)^[12,16-17]。这里我们从 SiglecF-细胞群中利用 CD11c 和 MHCII 圈出

CD11c^{hi}MHCII⁺的树突状细胞(DCs), 这群细胞进一步可利用 CD11b 和 CD103 划分出 DC1 (CD11b⁺CD103⁻)、DC2 (CD11b⁺CD103⁺) 和 DC3 (CD11b⁻CD103⁺)。

肠道巨噬细胞在肠道稳态中起重要作用。它有两种来源: 一种是来源于胚胎的巨噬细胞 (CD4⁺Tim4⁺), 另一种来源于单核细胞, 在成年小鼠中, 大部分的巨噬细胞是单核细胞来源的 [12]。这里检测了单核来源的巨噬细胞 [14]。先从非中性粒的细胞群里圈出 CD11b⁺细胞, 从中利用 F4/80 和 CX3CR1 进一步圈出 F4/80⁺CX3CR1⁺ 以及 F4/80⁺CX3CR1^{-/int} 两种巨噬细胞群 [11-12]。F4/80⁺CX3CR1⁺ 的细胞可利用 Ly6C 和 MHCII 圈出 P1 (Ly6C⁺monocytes)、P2 (Ly6C^{high to low} MHCII⁺) 和 P3/P4 (Ly6C⁻MHCII⁺)。同样, 从 F4/80⁺CX3CR1^{-/int} 也可利用 Ly6C 和 MHCII 圈出 P1 (Ly6C⁺monocytes)、P2 (Ly6C^{high to low} MHCII⁺) 和 P3/P4 (Ly6C⁻MHCII⁺)。CD11c 和 CD64 同样是巨噬细胞的标志物。研究表明, CD11c⁺巨噬细胞可能是血液单核细胞和组织驻留的 CD11c⁻巨噬细胞之间的中间产物 [12]。因此利用 CD64 和 CD11c 可以确定 Ly6C⁻MHCII⁺CD64⁺CD11c⁺(P4) 的成熟巨噬细胞以及 Ly6C⁻MHCII⁺CD64⁺CD11c⁻(P3) 的中间态巨噬细胞。

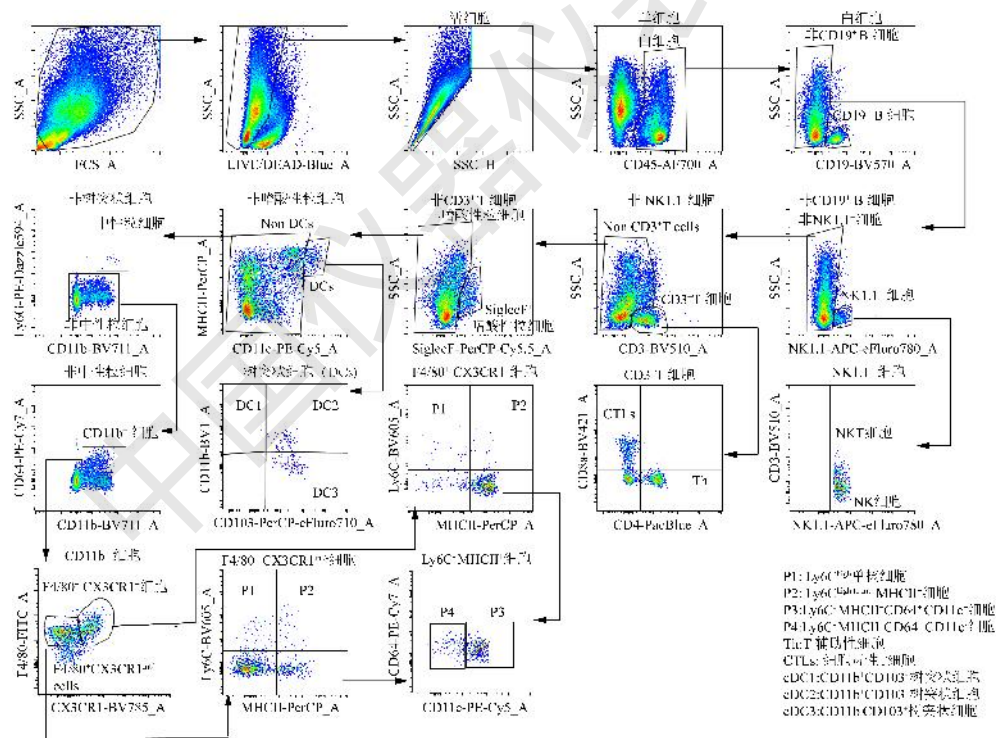


图6 多色检测圈门策略

综上所述, 针对结肠固有层样本单细胞悬液的制备, 采用消化液中含有胶原酶 D、Dispase II 和 DNase I 的方法①的优点在于消化时间较短, 缺点是细胞总量低, 有一些细胞表面抗原会受到酶的影响较大, 但是如果只是粗略地检测大类的细胞分群, 如 CD45、CD3、

CD11b、CD11c 等, 结果影响不大且实验时间大大缩短; 采用消化液中含有胶原酶 VIII 和 DNase I 的方法②, 消化时间较长, 但是细胞总量高, 对细胞表面抗原影响较小, 更适用于对较多细胞亚群及功能分析流式样本的制备方案。最后, 本研究选用方法②作为前期样本的处理方式, 结合光谱流式技术, 采用 17 色的高参数配色方案, 实现 26 类肠道固有层免疫细胞群分析。本研究结论为流式前期样本处理提供了的指导作用, 优化后的配色方案也将为多参数的流式分析及分选提供模板, 为免疫细胞亚群分析及后续功能实验提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] ABRAHAM C, CHO J H. Inflammatory bowel disease [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(21): 2066-78.
- [2] ANDERSON C A, BOUCHER G, LEES C W, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47 [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(3): 246-52.
- [3] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHAPPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15 25 1-15 25 14.
- [4] WEIGMANN B, TUBBE I, SEIDEL D, et al. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(10): 2307-11.
- [5] PERFETTO S P, CHATTOPADHYAY P K, ROEDERER M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(8): 648-55.
- [6] MCKINNON K M. Flow Cytometry: An Overview [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 120: 5 1 -5 1 11.
- [7] VORONIN D V, KOZLOVA A A, VERKHOVSKII R A, et al. Detection of Rare Objects by Flow Cytometry: Imaging, Cell Sorting, and Deep Learning Approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7).
- [8] LIECHTI T, ROEDERER M. OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells [J]. *Cytometry A*, 2019, 95(11): 1129-34.
- [9] WANG S R, ZHONG N, ZHANG X M, et al. OMIP 071: A 31-Parameter Flow Cytometry Panel for In-Depth Immunophenotyping of Human T-Cell Subsets Using Surface Markers [J]. *Cytometry A*, 2021, 99(3): 273-7.

- [10] WEN Z L, SU X H, CHEN D C, et al. Flow Cytometry of Intestinal Mononuclear Phagocytic Subsets and Functions [J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(22): e1010324.
- [11] ZIGMOND E, VAROL C, FARACHE J, et al. Ly6C^{hi} monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells [J]. *Immunity*, 2012, 37(6): 1076-90.
- [12] CORBIN A L, GOMEZ-VAZQUEZ M, BERTHOLD D L, et al. IRF5 guides monocytes toward an inflammatory CD11c(+) macrophage phenotype and promotes intestinal inflammation [J]. *Science immunology*, 2020, 5(47).
- [13] TAMOUTOUNOUR S, HENRI S, LELOUARD H, et al. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis [J]. *European journal of immunology*, 2012, 42(12): 3150-66.
- [14] DALLARI S, HEANEY T, ROSAS-VILLEGAS A, et al. Enteric viruses evoke broad host immune responses resembling those elicited by the bacterial microbiome [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(6): 1014-29 e8.
- [15] DENNING T L, WANG Y C, PATEL S R, et al. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses [J]. *Nature immunology*, 2007, 8(10): 1086-94.
- [16] BOGUNOVIC M, GINHOUX F, HELFT J, et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network [J]. *Immunity*, 2009, 31(3): 513-25.
- [17] MUZAKI A R B M, TETLAK P, SHENG J, et al. Intestinal CD103⁺CD11b⁻ dendritic cells restrain colitis via IFN- γ -induced anti-inflammatory response in epithelial cells [J]. *Mucosal Immunology*, 2016, 9(2): 336-51.
- [18] KIRKLAND D, BENSON A, MIRPURI J, et al. B cell-intrinsic MyD88 signaling prevents the lethal dissemination of commensal bacteria during colonic damage [J]. *Immunity*, 2012, 36(2): 228-38.
- [19] WANG L, RAY A, JIANG X, et al. T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(6): 1297-312.
- [20] LUO W, TIAN L, TAN B, et al. Update: Innate Lymphoid Cells in Inflammatory Bowel Disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(1): 56-66.

- [21] HALL L J, MURPHY C T, QUINLAN A, et al. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(5): 1016-26.
- [22] WADDELL A, AHRENS R, STEINBRECHER K, et al. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6C(high) CCR2(+) inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11 [J]. *J Immunol*, 2011, 186(10): 5993-6003.
- [23] SCHMIDT F, DAHLKE K, BATRA A, et al. Microbial Colonization in Adulthood Shapes the Intestinal Macrophage Compartment [J]. *J Crohns Colitis*, 2019, 13(9): 1173-85.
- [24] AUTENGRUBER A, GEREKE M, HANSEN G, et al. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function [J]. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2012, 2(2): 112-20.