

• 论 著 •

CFSE 标记结合流式细胞术检测单核细胞 Siglec-1 刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖^{*}

熊怡淞, 俞娟, 孙懿, 李畅, 仲人前[△]

(第二军医大学长征医院实验诊断科/全军医学免疫诊断中心/全军临床免疫重点实验室, 上海 200003)

摘要:目的 建立 CFSE 标记结合流式细胞术检测 T 淋巴细胞增殖的方法, 并探讨其在研究单核细胞唾液酸黏附素(Siglec-1)对 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖中的应用。**方法** 免疫磁珠分离冠状动脉综合征(ACS)患者和健康对照者外周血 CD14⁺ 单核细胞, 与经 CFSE 标记的第三方健康献血者 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞共培养 5 d, 流式细胞术检测 T 淋巴细胞增殖情况。**结果** ACS 患者 CD14⁺ 单核细胞具有比健康人单核细胞更强的刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力; 当用干扰素- α (INF- α)刺激增强正常单核细胞 Siglec-1 表达后, 其刺激 T 细胞增殖能力增强; 用单抗阻断单核细胞 Siglec-1 后, 其刺激 T 细胞增殖能力减弱。**结论** ACS 患者增强的 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力部分是由于激活的单核细胞高表达 Siglec-1 引起。

关键词:流式细胞术; 细胞增殖; Siglec-1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.15.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)15-1670-03

Combined application of CFSE labeling and flow cytometry on the detection of the proliferation of CD4⁺/CD8⁺ T cells simulated with monocytes Siglec-1^{*}

Xiong Yisong, Yu Juan, Sun Yi, Li Chang, Zhong Renqian[△]

(Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Abstract: **Objective** To establish a combined detection method of CFSE labeling and flow cytometry (FCM) for the measurement of the proliferation of T lymphocytes and to explore its role for the investigation of the effect of Siglec-1 in monocytes on the proliferation of CD4⁺/CD8⁺ T cells. **Methods** CD14⁺ monocytes in peripheral blood of patients with acute coronary syndrome (ACS) and healthy controls were isolated by magnetic-activated cell sorting (MACS). CD4⁺ and CD8⁺ T cells from healthy blood donors of third-party were also separated by MACS and labeled with CFSE. 5 days after the mixed culture of monocytes and lymphocytes, the proliferation of T lymphocyte was determined by FCM. **Results** CD14⁺ monocytes from patients with ACS had a more robust role in stimulating the proliferation of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte than those from healthy controls. However, when Siglec-1 on monocytes was blocked by anti-Siglec-1 antibody, the stimulating capacity was decreased to normal level. Furthermore, after being stimulated with INF- α , the expression of Siglec-1 on monocytes from healthy controls was elevated and the stimulating capacity of monocytes was enhanced. **Conclusion** The increased proliferation of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocyte in patients with ACS was partly due to the elevated expression of Siglec-1 on activated monocytes.

Key words: flow cytometry; cell proliferation; Siglec-1

近年来,动脉粥样硬化(AS)被认为是一种免疫炎症性疾病,由单核巨噬细胞介导的天然免疫反应和 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞介导的获得性免疫反应在 AS 发病中起重要作用^[1]。本课题组前期研究发现,冠心病患者外周血单核细胞上唾液酸黏附素(Siglec-1)表达明显升高,且血清中高浓度过氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)可刺激其表达增高,提示冠心病患者外周血单核细胞已部分激活^[2-3]。激活的单核细胞高表达 Siglec-1,是否可通过其淋巴细胞上的受体作用于淋巴细胞,引起淋巴细胞活化增殖而参与 AS 外周炎症反应过程,目前还不清楚。本实验拟通过分离冠心病患者和健康对照者外周血单核细胞,与第三方来源的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞共培养,通过羧基荧光素二醋酸酯琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记结合流式细胞术(FCM),检测 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖活性,并通过干扰素- α (INF- α)促进 Siglec-1 高表达或抗 Siglec-1 单抗阻断 Siglec-1 表达后,观

察单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖能力是否有所变化,以探讨 Siglec-1 在介导单核细胞激活 T 淋巴细胞参与 AS 发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 新鲜采集的健康献血者白细胞来自上海长海医院血库,用于分离 CD4⁺或 CD8⁺ T 细胞。18 例急性冠状动脉综合征(ACS)患者及 12 例健康对照者(NC)来自本院,抽取外周血用于分离 CD14⁺单核细胞。

1.2 仪器与试剂 人 CD4、CD8、CD14 磁珠(德国 Miltenyi 公司),Trizol 试剂、杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)、胎牛血清(FBS)、青链霉素双抗(美国 Gibco 公司),RPMI-1640 培养基(奥地利 PAA 公司),淋巴细胞分离液(天津灏洋生物),无菌 EDTA(美国 Ameresco 公司),CFSE 荧光染料(美国 Molecular Probes 公司),丝裂霉素 C(美国 Sigma 公司),抗 Siglec-1 单抗(美国

^{*} 基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2006AA02Z496);国家自然科学基金资助项目(81072479);上海市科学技术委员会优秀学科带头人基金资助项目(07XD14013)。 [△] 通讯作者, E-mail:rqzhong@yahoo.com。

Santa Cruz 公司), 细胞因子 INF- α (美国 R&D 公司), 荧光标记小鼠抗人 CD4、CD8、CD14 单抗及同型对照 (美国 eBioscience 公司), 24 孔、96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)。Coulter Cytomics FC 500 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)、磁珠分选器和 MS/LS 分选柱 (德国 Miltenyi 公司)、超净工作台 (苏州净化设备工程有限公司)、细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司)、KUBOTA 5420 台式高速离心机 (日本 KUBOTA 公司)。

1.3 方法

1.3.1 CD4⁺、CD8⁺、CD14⁺ 细胞的磁珠分选 分选缓冲液的配制: pH7.2 的 DPBS 含 5% FBS 及 2 mmol/L EDTA, 配好后放置在 4 °C 预冷。取新鲜分离的健康人外周血白细胞, 加入无菌生理盐水稀释后, 小心置于淋巴细胞分离液上, 2 500 r/min 离心 30 min, 取单核细胞层, 缓冲液洗 2 遍, 细胞计数后, 将每 10⁷ 个细胞重悬于 80 μ L 缓冲液中, 加入 20 μ L CD4、CD8 或 CD14 磁珠, 4 °C 孵育 15 min 后用缓冲液洗 1 遍再重悬, 上 MS/LS 分选柱进行阳性分选, 操作按说明书进行。

1.3.2 检测磁珠分选细胞纯度和得率 将 2 $\times$ 10⁵ 个分离得到的 CD4⁺、CD8⁺ 或 CD14⁺ 细胞重悬于 100 μ L 缓冲液中 (PBS+0.5% 牛血清蛋白+0.05% 叠氮钠), 加入 1 μ g 小鼠 IgG 室温孵育 15 min 进行 Fc 受体阻断, 然后分别用 1 μ g PE 标记的抗 CD4、FITC 标记的抗 CD8 或荧光素 PE 标记的抗 CD14 单抗 (IgG1, κ) 冰上孵育 30 min, 同时设定匹配的同型对照。孵育后, 用缓冲液洗涤细胞 2 遍并将细胞重悬于 500 μ L 含 1% 多聚甲醛的 PBS 中。用 FC500 流式细胞仪进行分析, 获取的数据用 CXP 软件进行处理。

1.3.3 CFSE 标记 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞 新鲜分离的 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞用 RPMI-1640 完全培养基调至 1 $\times$ 10⁷/mL, 加入终浓度为 5 μ M 的 CFSE 混匀, 置 37 °C 孵育 10 min 后加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基 1 000 r/min 离心 10 min 洗涤细胞, 重复洗涤 3 次后用 RPMI-1640 完全培养基悬浮细胞, 调整细胞数为 1 $\times$ 10⁶/mL 备用。洗涤离心及后续操作过程中注意避光。

1.3.4 单核细胞和淋巴细胞共培养 分选得到的 CD14⁺ 细胞用含 100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养, 经丝裂霉素 C 50 μ g/mL 于 37 °C 处理 30 min 后, 离心洗涤并调整细胞密度为 2 $\times$ 10⁵/mL。实验分 5 组: (1) 健康人 CD14; (2) 健康人 CD14+INF- α 5 ng/mL; (3) 健康人 CD14+INF- α 5 ng/mL+抗 Siglec-1 2 μ g/mL; (4) ACS CD14; (5) ACS CD14+抗 Siglec-1 2 μ g/mL, 每组 3 复孔。每孔于 INF- α 或抗 Siglec-1 处理后 24 h 再加入 CD4⁺ 或 CD8⁺ T 淋巴细胞 (单核: 淋巴=1: 5), 接种 96 孔板, 每孔 200 μ L。共培养 5 d 后收集悬浮细胞用流式细胞仪检测淋巴细胞增殖情况。

1.3.5 流式细胞仪检测淋巴细胞增殖 收集共培养 5 d 后的悬浮细胞, 离心洗涤并将细胞重悬于 500 μ L 含 1% 多聚甲醛的 PBS 中, 用 FC500 流式细胞仪将每个样品分析 20 000 个细胞, 通过 FL1 检测通道 (525 nm) 进行 CFSE 荧光收集, CXP 软件分析数据, 得出每组分裂细胞占总细胞的百分数。

1.4 统计学处理 采用 SigmaStat 3.5 统计软件, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组资料之间比较用方差分析, 多组之间两两比较采用 LSD 检验, 非正态分布资料之间比较采用非参数秩和检验,

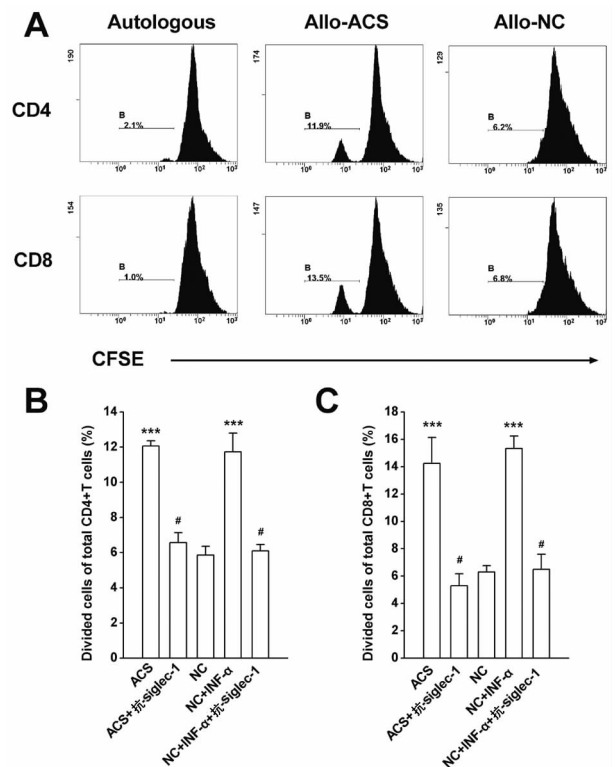
以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD4、CD8、CD14 磁珠分选纯度和得率 CD4、CD8 常规分选纯度可达 97% 以上, CD14 常规分选纯度可达 95% 以上, 可用于下游实验。

2.2 CFSE 标记浓度对增殖检测的影响 采用不同浓度的 CFSE (1、2、5、10 μ mol/L) 标记 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞, 测定了标记后阳性细胞百分率和荧光强度, 并测定 5 d 后细胞增殖水平。确定了 5 μ mol/L 这一最佳浓度, 在此浓度时具有较高的标记效率和荧光强度, 对细胞活力及后续增殖也无明显影响。

2.3 Siglec-1 对共培养淋巴细胞增殖的影响 单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖的结果见图 1。ACS 组单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖作用强于 NC 组; 当正常单核细胞用 INF- α 处理促进 Siglec-1 表达后, 刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖作用也随之增强; 当用特异性单抗阻断 Siglec-1 后, ACS 组及 INF- α 处理的 NC 组单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖作用回到正常水平。



A: CFSE 检测淋巴细胞增殖示意图; Autologous: 自体单核细胞与淋巴细胞共培养; Allo-ACS: ACS 患者单核细胞与异体淋巴细胞共培养; Allo-NC: BC 组单核细胞与异体淋巴细胞共培养; B、C: 发生增殖分裂的 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞在各组中百分比统计值; *: $P<0.01$, #: $P>0.05$ 。

图 1 Siglec-1 对 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞增殖的影响

3 讨 论

体外检测细胞增殖最常用的方法是 MTT 比色法、³H TdR 掺入法和 BrdU 标记法等, 虽然这些方法能够提示细胞群体的分裂水平, 却不能反映单个细胞的分裂状况, 还存在毒性和放射性危害等局限性。随着流式细胞术的发展, 多种荧光染料应用于细胞增殖的检测中, 其中以 CFSE 的应用最为广泛^[4]。CFSE 是一种活体染料, 可自由穿透细胞膜, 与细胞内

蛋白的赖氨酸残基或其他氨基发生反应,形成稳定的不可逆结合。当细胞分裂时,其标记物可平均分配到 2 个子代细胞中,使荧光强度呈对半递减,可提供多达 8 代的细胞分裂信息。此外,传统的细胞增殖测定法只能对活细胞进行检测,而无法与某些已经分裂又发生死亡的细胞区别。而使用 CFSE 标记,死亡的细胞在几天内可保持荧光强度基本不变,并可使用其他染料将其与活细胞区分开来,为增殖分析提供了更加全面的资料^[5]。不仅如此,CFSE 还可稳定地存在于细胞内长达数月之久,并且不会使临近细胞染色,不会影响细胞功能。因此已经被广泛应用于体内和体外细胞的示踪实验。

Siglec-1(CD169)特异性表达于特定组织巨噬细胞上,而健康人外周血单核细胞上并不表达^[6-7]。当巨噬细胞受到炎症反应刺激时,Siglec-1 表达迅速上调,在巨噬细胞促炎反应中起重要作用。在多种炎症反应和自身免疫性疾病中均发现 Siglec-1 在外周血及病变组织表达增高,并参与炎症反应及 T 淋巴细胞激活等过程。而 Siglec-1 在冠心病中的具体作用尚未见报道。

本课题组以前的研究发现,Siglec-1 在 AS 患者外周血单核细胞表达增高^[3],血清中高浓度的 ox-LDL 可能是 Siglec-1 表达增高的原因之一^[2],但 Siglec-1 在 AS 中的确切作用尚未阐明。为探讨 Siglec-1 在单核细胞促淋巴细胞增殖和活化中的作用,进行了单核细胞-淋巴细胞混合培养实验,并分别用抗 Siglec-1 单抗阻断的方法抑制单核细胞 Siglec-1 发挥作用,用 INF- α 刺激促进单核细胞高表达 Siglec-1^[8-10],以探讨 Siglec-1 表达增强或抑制后对单核细胞刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力的变化。实验发现,ACS 患者 CD14⁺ 单核细胞具有比健康人单核细胞更强的刺激 T 细胞增殖的作用。当用 INF- α 上调健康人单核细胞 Siglec-1 表达后,单核细胞刺激 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞增殖能力增强,并且这种作用可通过抗 Siglec-1 单抗靶向阻断而减弱。同样的,当用抗 Siglec-1 单抗靶向阻断 Siglec-1 后,ACS 患者单核细胞刺激 T 细胞增殖能力也有所减弱。因此,可以得出结论,ACS 患者增强的 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖能力部分是由于激活的单核/巨噬细胞高表达 Siglec-1 引起。Siglec-1 可通过外周血单核细胞-淋巴细胞或斑块局部巨噬细胞-淋巴细胞相互作用介导 AS 全身或局部炎症反应。

本研究成功建立了 CFSE 标记结合流式细胞术检测外周血 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖的实验方法,该方法简单、实用、灵敏度高,结果稳定可靠,可以取代 3HTdR 掺入法或 MTT 法用于不同免疫刺激情况下淋巴细胞增殖的检测。并结合单核细胞 Siglec-1 高表达或低表达后刺激 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞对其增殖反应进行了检测,验证了该方法的可靠性。

总之,笔者认为在高浓度的 ox-LDL 刺激下,ACS 患者外

周血单核细胞被激活,Siglec-1 表达增高,单核细胞摄取 ox-LDL 后转变成泡沫细胞,将脂质抗原提呈给 CD4⁺/CD8⁺ T 细胞^[11],并刺激 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞增殖,最终影响 AS 的炎性反应过程。通过 Siglec-1 特异性抗体靶向阻断其功能可减轻淋巴细胞增殖反应。因此,对外周血单核细胞或粥样斑块巨噬细胞上 Siglec-1 的调节治疗有望成为一种治疗 AS 的新方法。

参考文献

[1] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med,2005,352(16):1685-1695.

[2] 熊怡淞,朱烨,陆慧琦,等.氧化型低密度脂蛋白对 RAW264.7 细胞 Siglec-1 表达及分泌细胞因子的影响[J]. 中华微生物和免疫学杂志,2010,30(1):51-55.

[3] Xiong YS,Zhou YH,Rong GH,et al. Siglec-1 on monocytes is a potential risk marker for monitoring disease severity in coronary artery disease[J]. Clin Biochem,2009,42(10/11):1057-1063.

[4] Lyons AB,Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry[J]. J Immunol Methods,1994,171(1):131-137.

[5] Thompson BS,Mitchell TC. Measurement of daughter cell accumulation during lymphocyte proliferation in vivo[J]. J Immunol Methods,2004,295(1/2):79-87.

[6] Crocker PR,Paulson JC,Varki A. Siglecs and their roles in the immune system[J]. Nat Rev Immunol,2007,7(4):255-266.

[7] Hartnell A,Steel J,Turley H,et al. Characterization of human sialoadhesin,a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations [J]. Blood,2001,97(1):288-296.

[8] Rempel H,Calosing C,Sun B,et al. Sialoadhesin expressed on IFN-induced monocytes binds HIV-1 and enhances infectivity[J]. PLoS One,2008,3(4):e1967.

[9] Delputte PL, Van Breedam W,Barbe F,et al. IFN-alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes via upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin[J]. J Interferon Cytokine Res,2007,27(9):757-766.

[10] York MR,Nagai T,Mangini AJ,et al. A macrophage marker, Siglec-1,is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists[J]. Arthritis Rheum,2007,56(3):1010-1020.

[11] Barral P,Polzella P,Bruckbauer A,et al. CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes[J]. Nat Immunol,2010,11(4):303-312.

(收稿日期:2011-06-10)

(上接第 1669 页)

[J]. Life Sci,2007,80(21):1957-1965.

[10] Moseley TA,Haudenschild DR,Rose L,et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2003,14(2):155-174.

[11] Lee J,Ho WH,Maruoka M,et al. IL-17 E,a novel proinflamma-

tory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1[J]. J Biol Chem,2001,276(2):1660-1664.

[12] Aggarwal S,Gumey AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family[J]. J Leukoc Biol,2002,71(1):1-8.

(收稿日期:2011-06-10)