

• 论 著 •

破膜剂对流式细胞术检测小肠中 ILC3 频率的影响*

曹 敏, 张晓敏, 王培昌, 刘 静[△]

(首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053)

摘 要:目的 探讨不同破膜剂对于流式细胞术检测小肠中 3 型固有淋巴样细胞(ILC3)频率的影响。方法 取小鼠小肠组织,经胶原酶消化后获得 ILC3,比较 BD 公司破膜剂(BD 组)、eBioscience 公司破膜剂(EB 组)、联科生物公司破膜剂(MS 组)对小肠中 ILC3 检测频率的影响。结果 在其他条件相同情况下,EB 组和 BD 组检测到小肠内 ILC3 的频率高于 MS 组($P<0.05$),但小肠 ILC3 的检出频率在 BD 组和 EB 组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 不同类型破膜剂对小肠 ILC3 检出频率有影响,实验时应根据细胞类型选择合适的破膜剂。

关键词:流式细胞术; 破膜剂; 3 型固有淋巴样细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.005

中图法分类号:R392.9;R446.63

文章编号:1673-4130(2020)23-2835-04

文献标识码:A

The effects of fixation/permeabilization reagents on flow cytometry detection for ILC3 frequency in the intestine*

CAO Min, ZHANG Xiaomin, WANG Peichang, LIU Jing[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract: Objective To explore the effect of different fixation/permeabilization reagents on the detection of innate lymphoid cells 3(ILC3) frequency in the intestine by flow cytometry. **Methods** The intestine tissues of mice were obtained, and digested it with collagenase to get ILC3. The effects of different fixation/permeabilization reagents from Becton Dickinson and Company(BD group), eBioscience Company(EB group) and Multi Sciences(Lianke) Biotechnology Corporate Limited(MS group) on the detection results of small intestinal ILC3 were compared. **Results** Under the same other conditions, the frequency of ILC3 detection in small intestine in EB group and BD group was higher than that in MS group ($P<0.05$), but there was no significant difference between BD group and EB group ($P>0.05$). **Conclusion** Different fixation/permeabilization reagents may affect the detection frequency of ILC3 in the small intestine, and the appropriate fixation/permeabilization reagents should be selected according to the cell type during the experiment.

Key words: flow cytometry; fixation/permeabilization reagents; innate lymphoid cells 3

固有淋巴样细胞(ILCs)是最近发现的一种天然免疫细胞,ILCs 是由造血干细胞(HSC)分化而来,HSC 向 ILCs 分化的途径为:长期造血干细胞(LT-HSCs)→短期造血干细胞(ST-HSCs)→多能祖细胞(MPPs)→共同淋系祖细胞(CLP)→髓样淋巴祖细胞(CMP)→ILC 前体细胞(ILCP)→各类 ILCs^[1]。ILCs 主要分为 3 个亚群:ILC1 亚群(ILC1s)、ILC2 亚群(ILC2s)和 ILC3 亚群(ILC3s)^[2]。目前研究认为,ILC1s 存在于肠道和肝脏中,在病毒感染早期及肝脏损伤中发挥免疫作用^[3-4];ILC2s 主要存在与肠道、肺

部和血液中,与哮喘、过敏性皮炎有关^[5-6];ILC3s 主要存在于淋巴结和肠道中,在炎症性肠病及清除胞内寄生菌感染中发挥免疫作用^[7-8]。目前检测小肠组织中 ILC3 频率的方法主要依靠流式细胞术结合胞内染色,但是在染色过程中诸多因素会影响检测结果。由于小肠中 ILC3 含量较少且含有胞内抗原,需对其固定破膜后染色,固定破膜效果如何将成为影响小肠中 ILC3 检测水平的一项重要因素^[9]。本研究中,课题组比较不同厂家的破膜试剂(BD 公司破膜剂、eBioscience 公司破膜剂、联科生物公司破膜剂)对小肠中

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81472007);北京市医管局人才培养计划“登峰”项目(DFL20180803)。

作者简介:曹敏,女,在读硕士研究生,主要从事标志物筛选、衰老及相关疾病机制研究。 [△] 通信作者, E-mail: wslu.jing@163.com。

本文引用格式:曹敏,张晓敏,王培昌,等.破膜剂对流式细胞术检测小肠中 ILC3 频率的影响[J].国际检验医学杂志,2020,41(23):2835-

ILC3 检测效率的影响, 目的在于提高小肠组织中 ILC3 检出频率, 为后续实验奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物实验小鼠 均为无特定病原体(SPF)级雌性小鼠(月龄 3 个月), 体质量(20±5)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.1.2 仪器 Gallios 流式细胞仪(美国 Beckman 公司), 高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司), 1 mL 注射器、1.5 mL、50 mL 离心管(北京兰博利德商贸有限公司), 200 目尼龙纱网、流式细胞仪试管(美国 BD 公司)。

1.1.3 试剂 eBioscience 公司 Transcription Factor Staining Buffer Set 破膜剂(货号: 00-5523-00), BD 公司 Cytotfix/Cytoperm 破膜剂(货号: 554714), 联科生物公司 Fix&Perm Kit 破膜剂(货号: 70-GAS003)。抗小鼠 Lin-405、抗小鼠 CD45-FITC、抗小鼠 CD127-PECy7、抗小鼠 RORγt-APC 购自 eBioscience 公司。3.5% 水合氯醛、10× 磷酸盐缓冲液(PBS)干粉、Hank's 平衡盐溶液(HBSS)、5 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES)、胶原酶、Dnase I 购自北京索莱宝科技有限公司, 胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司。

1.2 方法

1.2.1 小肠组织单细胞悬液制备 取月龄 3 个月的实验小鼠, 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉后断颈处死, 剪开腹部皮肤, 暴露腹腔脏器, 用手术剪在胃与十二指肠连接处、回盲肠连接处剪断, 分离全段小肠置于 1% 冷 PBS 中, 剥除肠系膜并用 1% 冷 PBS 冲洗小肠, 剪下小肠派尔集合淋巴结(PP 结), 将小肠置于 5~10 mL solution I (HBSS+5 mmol/L EDTA+10 mmol/L HEPES)中, 37℃ 100 r/min 摇床中消化 15~20 min, 重复 4~5 次, 直至小肠组织呈无色透明状, 弃上清液并收集小肠组织置于 solution II (HBSS+2%FBS+0.5 mg/mL 胶原酶 II +0.5 mg/

mL 胶原酶 III+0.5 mg/mL DNase I)中, 再次消化, 37℃ 100 r/min 摇床中消化 30 min, 重复 2~3 次, 将小肠组织消化液于 200 目尼龙纱网中过滤后, 将上清液收集于 50 mL 离心管中^[10]。

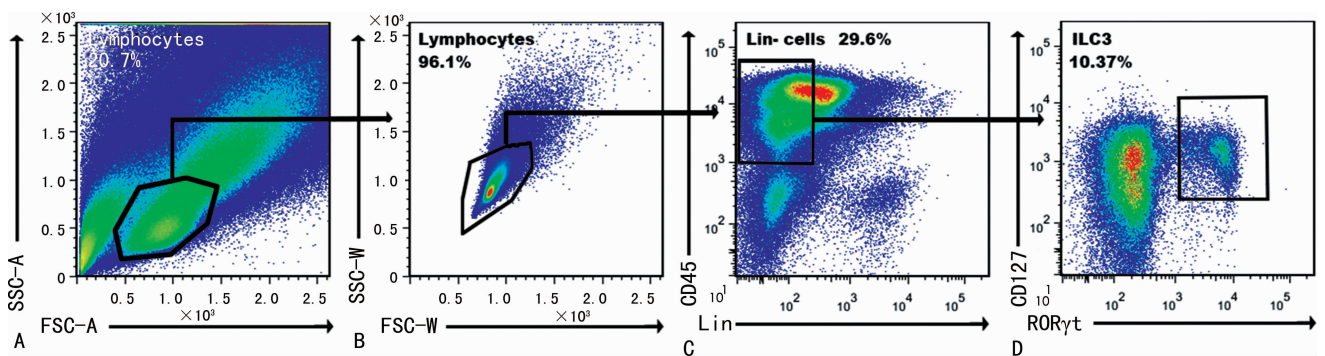
1.2.2 细胞染色 将收集的小肠组织单细胞悬液根据使用的破膜剂分为 3 组: eBioscience 组(EB 组)、BD 组、联科组(MS 组)。每份标本中分别加入 Lin-405、CD45-FITC、CD127-PECy7 进行表面染色, 冰上避光孵育 1 h, 3 000 r/min 离心 1 min, 3 组标本中分别加入不同公司的适量破膜剂, 温度 4℃, 分 10、20 及 60 min 3 种不同处理时间, 用配套的破膜洗液洗涤两遍后, 在小肠组织单细胞悬液标本中分别加入 RORγt-APC 抗体冰上避光染色 1 h, 染色结束后分别加入适量配套的破膜洗液洗涤两遍, 2 h 内上机检测。

1.2.3 样品检测与分析 开启 Gallios 流式细胞仪在前向角散射光(FSC)/侧向角散射光(SSC)散点图中显示细胞群, 圈出淋巴细胞群, 利用 ISO 管、单阳管调节电压、补偿等参数。在淋巴细胞群中, 圈出 Lin-CD45⁺CD127⁺RORγt⁺的 ILC3^[11], 利用 FlowJo (version 7.6) 软件分析细胞群比例。

1.3 统计学处理 正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 所用统计学方法均使用 Graph Pad Prism (version 7.0) 软件进行分析, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠小肠 ILC3 圈门策略 如图 1 所示, 可见明显 ILC3 细胞群。相同破膜时间不同组别中小肠 ILC3 典型图如图 2 所示。将相同破膜时间不同破膜剂处理的 ILC3 检出频率进行比较, 发现 EB 组 [(19.66±0.33)%] 和 BD 组 [(20.73±0.49)%] Lin-CD45⁺CD127⁺RORγt⁺的 ILC3 检出率高于 MS 组 [(10.79±0.25)%], 差异有统计学意义(*P* < 0.05), 但 BD 组和 EB 组小肠组织中 ILC3 的检出频率差异无统计学意义(*P* > 0.05), 如图 3 所示。

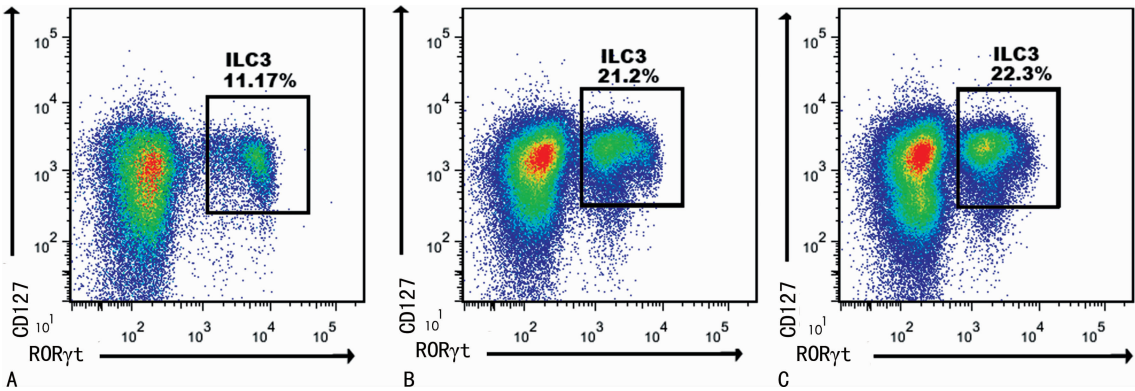


注: A 为小肠中淋巴细胞群分布; B 为淋巴细胞群; C 为 Lin-细胞群; D 为 CD127⁺RORγt⁺的 ILC3。

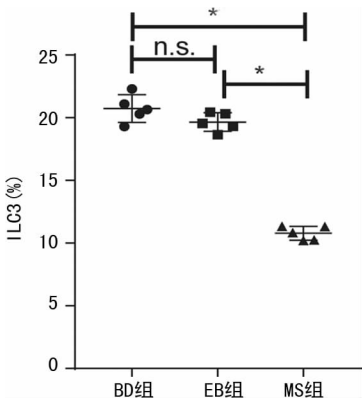
图 1 小肠 ILC3 圈门策略

2.2 破膜时间对检测小肠中 ILC3 频率的影响 3 种破膜剂分别对小肠 ILC3 处理不同时间, 结果表明,

对细胞处理 10 min,破膜效果较差,然而破膜 60 min,破膜过度,小肠 ILC3 检出频率低,细胞形态受破坏。当细胞处理 20 min 时,破膜效果最佳,小肠中 ILC3 检出频率最高。见表 1。



注:A 为 MS 组小肠 ILC3 频率;B 为 EB 组小肠 ILC3 频率;C 为 BD 组小肠 ILC3 频率。
图 2 不同破膜剂破膜后小肠 ILC3 的典型图



注:与 MS 组比较,* $P < 0.05$;"n. s."表示差异无统计学意义($P > 0.05$)。

图 3 不同破膜剂组小肠 ILC3 检出频率比较

表 1	破膜时间对 3 组破膜剂检测 ILC3 细胞频率的影响		
破膜时间	BD 组 (%)	EB 组 (%)	MS 组 (%)
10 min	19.52	18.56	10.24
20 min	21.73	19.20	11.20
60 min	20.14	18.32	10.65

2.3 实验的可重复性 在相同实验条件下,同一份标本由不同操作者进行,结果差异无统计学意义($P > 0.05$),同一份标本由同一操作者重复 2 遍,CV 值均小于 5%。

3 讨 论

随着流式细胞技术的不断发展,流式细胞术广泛应用于各大实验室,特别是随着激光管的不断增加,荧光素的不断开发,多色流式细胞仪的应用能够更加快速准确地灵敏地检测多个指标,例如在检测自然杀伤(NK)细胞和 ILC1 时,NK 细胞与 ILC1 均属于第一类 ILC 细胞,且由于 ILCs 发现较晚,ILC1 常与 NK 细胞相混淆,但由于多色流式细胞技术的发展,研究人员发现在 $CD3^+NKp46^+NK1.1^+$ 的基础上, $CD49a^+CD49b^-$ 的细胞是 ILC1,而 $CD49a^-CD49b^+$ 的细胞是 NK 细胞^[12]。

在原有基础上,增加两种荧光素,能够准确区分两种不同细胞,为后续实验奠定了基础。

利用流式细胞术检测细胞时,对于胞内抗原染色,细胞的固定与破膜是否恰当将严重影响染色效果,目前常用的破膜剂主要是 BD Cytfix/Cytoperm 试剂盒、Beckman Coulter 试剂盒、eBioscience Fix & Perm 试剂盒等,选择合适的破膜剂,能够更好地保持细胞的大小和完整性,增加细胞膜的通透性。本实验发现应用 EB 公司的破膜剂和 BD 公司破膜剂能够更好的检测出小肠中 ILC3,在多次实验中发现,使用配套的破膜洗液洗涤细胞后,能够有效地减少非特异性结合,并提高染色效率。但延长破膜时间并没有提高破膜效率,反而由于破膜时间过长,细胞肿胀,可能会导致细胞死亡。对于低水平表达的抗原,在做配色时,应选择强荧光集团,并适当增加染色时间,以提高染色效率,同时当流式标本制作完成后,应尽快进行上机检测,减少细胞死亡,使实验结果更加准确。

本实验所研究的 ILC3 属于第三类 ILCs,ILC3 分为 $NKp46^+$ 的 ILC3 和 $NKp46^-$ 的淋巴样组织诱导细胞(LTi)^[13],ILC3 主要存在于肠道、皮肤黏膜中,受到 TCF1、Notch 和 RUNX1 等转录因子的调控^[14]。ILC3 主要存在于小肠固有层,产生 IL-22 和 IL-17 等细胞因子,对维持肠道免疫功能发挥重要作用^[14]。在利用流式细胞仪检测小肠中 ILC3 时,由于 ROR γ t 属于胞内抗原,且抗原表达水平较低,本实验室选择了荧光素较强的 APC 做配色^[15],同时选用合适的破膜剂,能够更好的检测小肠内 ILC3。流式细胞术作为一项被广泛应用的实验技术,在开始正式实验前,应仔细考虑本实验的配色方案是否合理,并利用少量标本进行预实验,根据预实验结果,调整实验方法,最终获得理想的实验结果。

4 结 论

本研究通过比较不同公司破膜剂对检测小鼠小

肠中 ILC3 频率的影响,发现 EB 公司破膜剂和 BD 公司破膜剂能提高流式细胞仪检测频率,同时验证了增加破膜时间并不能提高破膜效率。本研究比较了 3 种不同公司的破膜剂对检测小鼠小肠中 ILC3 的影响,为后续实验奠定了基础。

参考文献

[1] CEDAR H, BERGMAN Y. Epigenetics of haematopoietic cell development[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(7): 478-488.

[2] SERAFINI N, VOSSHENRICH C A J, DI SANTO J P. Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(7): 415-428.

[3] WEIZMAN O E, ADAMS N M, SCHUSTER I S, et al. ILC1 confer early host protection at initial sites of viral infection[J]. Cell, 2017, 171(4): 795-808.

[4] NABEKURA T, RIGGAN L, HILDRETH A D, et al. Type 1 innate lymphoid cells protect mice from acute liver injury via interferon-gamma secretion for upregulating bcl-xl expression in hepatocytes[J]. Immunity, 2020, 52(1): 96-108.

[5] YU Q N, GUO Y B, LI X, et al. ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma[J]. Allergy, 2018, 73(9): 1860-1870.

[6] LEYVA-CASTILLO J M, GALAND C, MASHIKO S, et al. ILC2 activation by keratinocyte-derived IL-25 drives IL-13 production at sites of allergic skin inflammation

[J]. J Allergy Clin Immunol, 2020, 145(6): 1606-1614.

[7] EBBO M, CRINIER A, VÉLY F, et al. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(11): 665-678.

[8] YIN S X, YU J J, HU B, et al. Runx3 Mediates resistance to intracellular bacterial infection by promoting IL12 signaling in group 1 ILC and NCR+ILC3[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2101.

[9] 苏小惠, 沈蕾. III 型固有淋巴细胞中 SIRT6 在小鼠结肠炎中作用的初探[J]. 现代免疫学, 2019, 39(5): 370-377.

[10] EBIHARA T, SONG C, RYU S H, et al. Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells[J]. Nat Immunol, 2015, 16(11): 1124-1133.

[11] XIA, P Y, LIU J, WANG S, et al. WASH maintains NKp46(+) ILC3 cells by promoting AHR expression [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15685.

[12] ROMERO-SUAREZ S, DEL RIO SERRATO A, BUEÑO R J, et al. The central nervous system contains ILC1s that differ from NK cells in the response to inflammation [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2337.

[13] 马若愚, 郭婧, 汪溯. 固有淋巴细胞的发育与功能[J]. 生命科学, 2015, 27(4): 417-424.

[14] ROBINETTE M L, BANDO J K, SONG W, et al. IL-15 sustains IL-7R-independent ILC2 and ILC3 development [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14601.

[15] 谷焕鹏, 胡升芳. 流式细胞分析中荧光素选择问题探析 [J]. 中国保健营养旬刊, 2012, 22(1): 121-122.

(收稿日期: 2020-02-22 修回日期: 2020-06-26)

(上接第 2834 页)

LLAN K J, et al. Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis[J]. Int J Cancer, 2006, 118(5): 1325-1329.

[8] 吕訥男, 韩超, 徐晓红, 等. 卵巢上皮性癌组织及外周血中 septin-9 的表达情况[J]. 北京医学, 2015, 37(7): 662-666.

[9] AHMED D, DANIELSEN S A, AAGESSEN T H, et al. A tissue-based comparative effectiveness analysis of biomarkers for early detection of colorectal tumors [J]. Clin Transl Gastroenterol, 2012, 3(12): e27.

[10] SCHRÖCK A, LEISSE A, VOS L D, et al. Free-circulating methylated DNA in blood for diagnosis, staging, prognosis, and monitoring of head and neck squamous cell carcinoma patients: an observational prospective cohort study[J]. Clin Chem, 2017, 63(7): 1288-1296.

[11] 褚文慧, 吴开春. 外周血 SEPT9 DNA 甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用[J]. 胃肠病学, 2015, 20(10): 622-624.

[12] SONG L L, YU H T, JIA J, et al. A systematic review of the performance of the SEPT9 gene methylation assay in colorectal cancer screening, monitoring, diagnosis and

prognosis[J]. Cancer Biomark, 2017, 18(4): 425-432.

[13] 蔡克银, 徐梅华, 王晓. 粪便 DNA 中联合 SFRP1 及 SEPT9 基因甲基化检测对老年性结直肠癌早期诊断的临床研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(1): 25-29.

[14] 夏常青, 徐忠法. 血浆 Septin9 基因甲基化在结直肠癌治疗中的监测作用[J]. 中国肛肠病杂志, 2019, 39(3): 6-8.

[15] 梁扩寰, 李绍白. 肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 213.

[16] 刘存芬. 232 例肝胆疾病患者血清肝酶谱分析[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(21): 1309-1310.

[17] 郁玲. 常用肿瘤标志物及临床检测应用[J]. 医学信息, 2011, 24(6): 3494-3495.

[18] 庾少梅, 林珠, 连炬飞, 等. 联合检测 CHE、AFU 及 AFP 与原发肝癌的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13): 1821-1822.

[19] 吴黎黎, 邵璇璇, 张曼, 等. 血清肿瘤标志物的联合检测在原发肝癌中的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(6): 172-173.

(收稿日期: 2020-01-20 修回日期: 2020-06-19)