

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.004

流式细胞仪分选人外周血 T 淋巴细胞的方法建立与评价 *

周翔 贺理宇 唐程远 周循 李玉珍 孙林

(中南大学肾脏病研究所,肾脏疾病与血液净化学湖南省重点实验室 湖南长沙 410011)

摘要 目的:利用流式细胞仪同时分离人外周血单个核细胞中 T 淋巴细胞并检测其分离纯度及存活率。**方法:**本文采用流式细胞仪同时分选人外周血 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞为例,推而广之,采用人外周血淋巴细胞分离液梯度离心法制备外周血单个核细胞,采用流式细胞仪同时分选 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞,分离细胞再通过流式细胞仪回测其分离纯度并通过台盼蓝染色检测分离细胞的存活率。**结果:**采用此方法能有效人外周血细胞 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞,分选前 CD4⁺淋巴细胞纯度为(50.5±11.5)%、CD8⁺T 淋巴细胞纯度为(15.4±7.1)%;分选后 CD4⁺T 淋巴细胞纯度为(94.3±1.3)%、CD8⁺T 淋巴细胞纯度为(93.6±1.6)%;分选后 CD4⁺T 淋巴细胞存活率为(95.3±1.8)%、CD8⁺T 淋巴细胞存活率为(94.8±1.5)%,细胞的形态完整。**结论:**采用人外周血淋巴细胞分离液梯度离心法制备外周血单个核细胞后利用流式细胞仪分选的方法能够高效、快速的分离人外周血 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞,且存活率高,为进一步研究其功能提供了保证。采用不同的荧光抗体标记其他淋巴细胞亚群,也能高效、快速的分离出细胞。

关键字:流式细胞仪;分选;CD4;CD8;淋巴细胞

中图分类号:R-331;R446.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)21-4016-03

Establishment and Evaluation of Flow Cytometry Method for Isolation of T Lymphocytes from Peripheral Blood Mononuclear Cells*

ZHOU Xiang, HE Li-yu, TANG Cheng-yuan, ZHOU Xun, LI Yu-zhen, SUN Lin

(Institute of Nephrology, Central South University; Key Laboratory of Kidney Disease & Blood Purification in Hunan Province, Changsha, Hunan, 410011, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for isolation of T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometry, and evaluate the isolation rate and survival rate. **Methods:** PBMCs were prepared using the human peripheral blood lymphocyte separation liquid based on gradient centrifugation. CD4⁺, CD8⁺T lymphocytes were sorting from PBMCs by flow cytometry, and the purity of these isolated cells was measured by flow cytometry and the survival rate of these cells was detected using trypan blue staining. **Results:** By this method, we effectively separated human peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes. Without sorting by flow cytometry, the purity of CD4⁺ lymphocytes is (50.5±11.5)%, and the purity of CD8⁺T lymphocytes is (15.4±7.1)%. Sorting by flow cytometry dramatically increased the purity of CD4⁺ and CD8⁺T to (94.3±1.3)%, and 93.6±1.6%, respectively. The survival rate was (95.3±1.8%) for the sorted CD4⁺T lymphocyte, and (94.8±1.5%) for the CD8⁺T lymphocyte. **Conclusion:** This study demonstrated that flow cytometry is highly efficient in the isolation of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes from PBMCs, providing a guarantee for further study using these cells. Other T lymphocytes subsets also can be highly efficient isolated from PBMCs when it were labeled with different fluorescent antibodies.

Key words: Flow cytometry; Sorting; CD4; CD8; Lymphocyte

Chinese Library Classification(CLC): R-331; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)21-4016-03

前言

T 淋巴细胞亚群是人体内主要的细胞免疫细胞,研究 T 淋巴细胞功能对免疫缺陷病、血液病、恶性肿瘤、变态反应性疾病等的发病机制,观察疗效及监测预后有非常重要的意义,而获得纯度高且存活率高的 T 淋巴细胞亚群细胞是其他研究工作的基础。如:CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞是淋巴细胞的主要两大亚群,在免疫应答中起非常重要的作用。CD4⁺T 淋巴细胞按其功能可分为辅助性 T 淋巴细胞和迟发型超敏性 T 淋巴细胞。前

者为调节性 T 淋巴细胞,后者为效应性 T 淋巴细胞。能合成分泌 IL-2、INF- γ 、TNF- α 等多种细胞因子,能增强吞噬细胞介导的抗感染机制,促进炎症反应,介导迟发型超敏反应,分泌细胞因子促进 B 细胞的增殖和抗体的生成。CD8⁺T 淋巴细胞主要识别存在于靶细胞表面上的 MHC-I 类分子与抗原结合的复合物,与抗原病毒免疫、抗肿瘤免疫以及对移植物的移植排斥反应有关。能高纯度、高得率的分离出各 T 淋巴细胞亚群提取 DNA、RNA、蛋白等,是后续其他研究的基础。随着流式细胞仪技术的发展,越来越广泛的应用于细胞分选,但往往因为仪器或其他

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81300566, 81400721)

作者简介:周翔(1988-),本科,技师,研究方向:实验技术及管理,E-mail:z-xiang2011@139.com

(收稿日期:2016-12-23 接受日期:2017-01-17)

技术操作不规范等问题,而无法有效分离出纯度高、存活率高的 T 淋巴细胞。本文旨在建立一种实用、有效的方法,能高效分离出 T 淋巴细胞亚群。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取中南大学湘雅二医院健康体检中心 2016 年 1 月至 2016 年 6 月健康体检志愿者 5 例,年龄(45 ± 12.7)岁,其中男 3 例,女 2 例。

1.2 主要仪器

流式细胞仪为美国 BD FACSJazz 分选型流式细胞仪,购置于 2014 年。离心机为德国 Eppendorf 5810r 台式高速冷冻离心机,购置于 2012 年。显微镜为德国徕卡 DMI3000B 型倒置荧光显微镜,购置于 2014 年。

1.3 主要试剂

鼠抗人 CD4-PerCy7 及同型对照、鼠抗人 CD8-FITC 及同型对照为鼠抗人为美国 BD 公司生产。台盼蓝染料为美国 Sigma 公司生产。人外周血淋巴细胞分离液为北京索来宝公司生产。

1.4 方法

1.4.1 单个核细胞(PBMC)制备 采集志愿者肝素抗凝全血 10 mL,与生理盐水 1:1 混匀后,小心缓慢加至 10 mL 60%人外周血淋巴细胞分离液液面上,以转速 1800 r/min 水平离心 20 min。平稳取出离心管,吸取分离液第二层环状乳白色淋巴细胞层。置于含有 10 mL 生理盐水的离心管中,充分混匀,以转速 1800 r/min 水平离心 20 min。取离心后沉淀重复洗涤两次。用 5 mL PBS 缓冲液重悬,并用细胞计数板计数,通过 PBS 缓冲液调节浓度为 5×10^6 /mL。

1.4.2 流式细胞仪调试、检测和分选 通过 Rainbow 试剂校

正流式细胞仪液流及荧光,通过 Accordrop 试剂调节液滴延迟。取 100 μ L 重悬液分别设置阴性对照管、CD4 同型对照管、CD8 同型对照管、CD4 单染管、CD8 单染管;剩余设置为分选管。按每 100 μ L 重悬液加入 20 μ L 相应的荧光标记抗体。混匀,置 25 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,再用 4 $^{\circ}$ C、转速 2000 r/min 离心 10 min。弃上清液,再加入 1 mL PBS 缓冲液重悬并离心,重复 2 次。① 通过阴性对照管和同型对照管调节仪器参数,记录分析结果并分选。② 用 500 μ L PBS 缓冲液重悬上机,检测细胞免疫表型为 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞百分比并进行分选。

1.4.3 分选后细胞存活率与纯度的测定 分选后细胞悬液与 0.4% 的台盼蓝染液按 9:1 体积比混匀,加入改良牛鲍计数板在显微镜下观察,计数及计算存活率。采用流式细胞仪对分选后的细胞进行回测分析纯度。

1.5 统计学处理

所有数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 18.0 软件系统处理数据,用 t 检验方法比较各组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 淋巴细胞含量

CD4 $^{+}$ 分选数量(6.85 ± 2.12) $\times 10^6$,CD8 $^{+}$ 分选数量(3.71 ± 1.18) $\times 10^6$ 。分选前 CD4 $^{+}$ 淋巴细胞纯度为 (50.5 ± 11.5)%, CD8 $^{+}$ 淋巴细胞纯度为 (15.4 ± 7.1)%;分选后 CD4 $^{+}$ 淋巴细胞纯度为 (94.3 ± 1.3)%,CD8 $^{+}$ 淋巴细胞纯度为 (93.6 ± 1.6)%。

对比分选前后,CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 淋巴细胞纯度得到很大的提高,两者比较差异有统计学意义($t = -25.87, P < 0.01$)。

2.2 分选后 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ 存活率

分选后 CD4 $^{+}$ 淋巴细胞存活率为 (95.3 ± 1.8)%,CD8 $^{+}$ 淋巴细胞存活率为 (94.8 ± 1.5)%,细胞的形态完整。

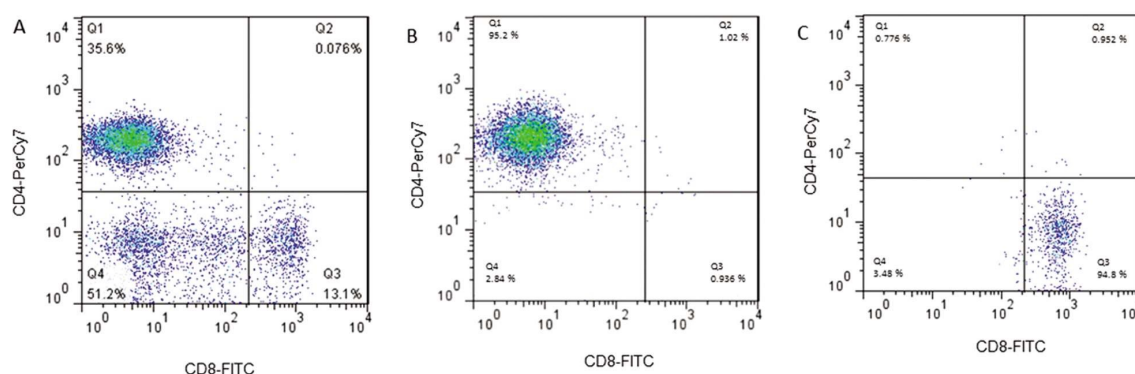


图 1 分选前后 CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T 淋巴细胞纯度对比

A:分选前;B、C:分选后

Fig.1 The purity of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ lymphocytes before and after sorting

A: Before sorting, B and C: After sorting

3 讨论

细胞免疫最重要的是 T 淋巴细胞,而 T 淋巴细胞通过功能各不相同的亚群来发挥免疫调控作用。近年来越来越多的研究证实,如肿瘤、肝炎、HIV 病毒感染等越来越多疾病伴随外周血 T 淋巴细胞的变化。能准确、高效分离出 T 淋巴细胞各亚群细

胞,保持其细胞活性,对后续各种研究有着极其关键的作用。

通过流式细胞仪分选出 CD4 $^{+}$ 淋巴细胞数量为 (6.85 ± 2.12) $\times 10^6$,CD8 $^{+}$ 淋巴细胞数量为 (3.71 ± 1.18) $\times 10^6$,且收集管中鞘液较少,能有效提取 DNA、RNA,且纯度高,能满足后续各种实验研究要求。推而广之,采用此方法,也能同时分离出其他亚群的细胞。

利用人外周血淋巴细胞分离液提取 PBMC 是经典的分离外周血各成分的方法,但由于试剂、仪器及操作方面的原因,效率较低,淋巴细胞纯度仅为(50.5± 11.5)%。

流式细胞仪分选法是将包裹细胞鞘液流通过震动频率的改变而使液流断裂成均匀的小液滴,含有目的细胞的液滴通过电极时充以电荷,当带有电荷的细胞液滴落入偏转电场时,因带电荷而发生偏转落入收集管内,从而达到细胞分选收集的目的。因此,分选过程中,细胞要经过高压、高速、强电场的环境,理论上将对细胞活力产生影响,但利用美国 BD FACS Jazz 分选型流式细胞仪分离出 T 淋巴细胞亚群细胞,再将分离收集的细胞重新通过流式细胞仪测定分选,分选后 CD4⁺T 淋巴细胞纯度为(94.3± 1.3)%,CD8⁺T 淋巴细胞纯度为(93.6± 1.6)%。分选后 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞纯度得到明显的提高,进一步对细胞存活率检测显示分选后的细胞存活率一致。后续开展的 DNA 和 RNA 提取并用于测序的相关研究,都有良好的效果。并没有对细胞活力产生严重影响,能应用后续各种研究。

目前常用的 T 淋巴细胞亚群分离方法还有免疫磁珠分选,此方法能高效、快速分离细胞,对细胞活力和功能干扰较小,但只能分离出一种阳性细胞或去除一种阳性细胞,无法准确对细胞数目定量,无法同时分选出多种细胞或特定细胞,故局限性很大。但在实验中,往往将免疫磁珠分选和流式细胞仪分选结合起来,先用免疫磁珠分选纯化细胞,在运用流式细胞仪精确分离细胞。在缩短分离时间的同时,能提高分选效率。

参考文献(References)

- [1] Dimeloe S, Burgener AV, Graehlert J, et al. T-cell metabolism governing activation, proliferation and differentiation; a modular view[J]. Immunology, 2016 [Epub ahead of print]
- [2] Zhong W, Jiang ZY, Zhong SB, et al. Phenotypic characteristics of LAP(+) CD4(+) T lymphocytes in colorectal cancer tissues[J]. Chinese Journal of Oncology, 2016, 38(8): 596-601
- [3] Mokhtari M, Shakeri A, Mirminachi B, et al. Important Factors Influencing Severity of Common Variable Immunodeficiency[J]. Arch Iran Med, 2016, 19(8): 544-550
- [4] DeMaster LK, Liu X, VanBelzen DJ, et al. A Subset of CD4/CD8 Double-Negative T Cells Expresses HIV Proteins in Patients on Antiretroviral Therapy[J]. J Virol, 2015, 90(5): 2165-2179
- [5] Nemecek A, Zimmermann H, Rübenthaler J, et al. Flow cytometric analysis of T cell/monocyte ratio in clinically isolated syndrome identifies patients at risk of rapid disease progression[J]. Mult Scler, 2016, 22(4): 483-493
- [6] Beliakova-Bethell N, Massanella M, White C, et al. The effect of cell subset isolation method on gene expression in leukocytes[J]. Cytometry A, 2014, 85(1): 94-104
- [7] Porichis F, Hart MG, Zupkosky J, et al. In vitro assay to evaluate the impact of immunoregulatory pathways on HIV-specific CD4 T cell effector function[J]. J Vis Exp, 2013, (80): e50821
- [8] Kent DG, Dykstra BJ, Eaves CJ. Isolation and Assessment of Single Long-Term Reconstituting Hematopoietic Stem Cells from Adult Mouse Bone Marrow [J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2016, 38: 2A.4.1-2A.4.24
- [9] Biswas AA, Goldhamer DJ. FACS Fractionation and Differentiation of Skeletal-Muscle Resident Multipotent Tie2⁺ Progenitors[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1460: 255-267
- [10] Koscsó B, Bogunovic M. Analysis and Purification of Mouse Intestinal Dendritic Cell and Macrophage Subsets by Flow Cytometry[J]. Curr Protoc Immunol, 2016, 114: 14.39.1-14.39.14
- [11] Hindle P, Khan N, Biant L, et al. The Infrapatellar Fat Pad as a Source of Perivascular Stem Cells With Increased Chondrogenic Potential for Regenerative Medicine [J]. Stem Cells Transl Med, 2016 [Epub ahead of print]
- [12] Ahrari I, Attar A, Zarandi NM, et al. CD271 enrichment does not help isolating mesenchymal stromal cells from[J]. Mol Biol (Mosk), 2013, 47(5): 787-795
- [13] Indumathi S, Mishra R, Harikrishnan R, et al. Lineage depletion of stromal vascular fractions isolated from human adipose tissue: a novel approach towards cell enrichment technology [J]. Cytotechnology, 2014, 66(2): 219-228
- [14] Alhamad EH, Shakoor Z, Al-Kassimi FA, et al. Rapid detection of circulating fibrocytes by flowcytometry in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Ann Thorac Med, 2015, 10(4): 279-283
- [15] Vrāna J, Čápal P, Číhalíková J, et al. Flow Sorting Plant Chromosomes[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1429: 119-134
- [16] Sester DP, Zamoshnikova A, Thygesen SJ, et al. Assessment of Inflammasome Formation by Flow Cytometry[J]. Curr Protoc Immunol, 2016, 114: 14.40.1-14.40.29
- [17] Esain V, Cortes M, North TE. Enumerating Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in Zebrafish Embryos [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1451: 191-206
- [18] Murphy NM, Burton M, Powell DR, et al. Haplotyping the human leukocyte antigen system from single chromosomes[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30381
- [19] Cleal L, Chau YY. Isolation and Fluorescence-Activated Cell Sorting of Murine WT1-Expressing Adipocyte Precursor Cells [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1467: 81-91
- [20] Joo S, Kim KH, Kim HC, et al. A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(6): 1509-1515
- [21] Chan C, Feng F, Ottinger J, et al. Statistical mixture modeling for cell subtype identification in flow cytometry [J]. Cytometry A, 2008, 73(8): 693-701