Treg 细胞亚群的流式检测

Subset Analysis of Mouse Tregs by Flow Cytometry

朱雪平^{1, 2, #}, 周旭宇^{1, 2, 3, *}

¹ 中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学重点实验室, 北京; ² 中国科学院大学, 北京; ³ 中国科学院大学存济医学院, 北京

*通讯作者邮箱: zhouxy@im.ac.cn

引用格式: 朱雪平, 周旭宇. (2019). Treg 细胞亚群的流式检测. *Bio-101* e1010304. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010304.

How to cite: Zhu X. P. and Zhou, X. Y. (2019). Subset Analysis of Mouse Tregs by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010304. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010304. (in Chinese)

摘要: 调节性 T 细胞 (简称 Treg), 是一群具有免疫抑制功能的特殊 CD4⁺T 细胞, 对维持机体的免疫耐受及免疫稳态至关重要 (Sakaguchi, 2004)。虽然 Treg 细胞都特异性表达转录因子 Foxp3, 但 Treg 也不是均一的细胞亚群。依据分化场所和前体细胞的不同, Treg 细胞可以分为胸腺来源的 tTreg 的和外周诱导形成的 pTreg, 目前主要由 Nrp-1 和 Helios 这两个分子来区分 tTreg 和 pTreg (Josefowicz 和 Rudensky, 2009)。此外, 依据其活化状态, Treg 细胞可以分为 CD44^{lo}CD62L^{hi} 静息状态的 Treg 细胞 (简称“cTreg”) 以及 CD44^{hi}CD62L^{lo} 活化状态的效应 Treg 细胞 (简称“eTreg”); cTreg 高表达归巢受体 CD62L 以及趋化因子受体 CCR7, 主要存在于二级淋巴器官; 相反, eTreg 细胞会下调表达 CD62L 和 CCR7, 上调表达活化相关分子如 CD44、ICOS、KLRG1、CTLA4、CD69 等, 主要定居于非淋巴器官组织中 (Smigiel 等, 2014)。eTreg 细胞还可以进一步上调效应 T 细胞相关的转录因子如 T-bet、GATA3、RoRyt 以及 Bcl6 发育成特定的效应 Treg 细胞如 Th1-Treg、Th2-Treg、Th17-Treg 以及 TFR, 促使表达相应的趋化因子受体, 来更好的发挥特定的免疫抑制功能 (Josefowicz 等, 2012; Cretney 等, 2013)。

Treg 细胞的成熟及发育缺陷是造成自身免疫性疾病的重要原因, 因此分析其亚群分类对理解免疫稳态控制具有重要的意义 (Dominguez-Villar 和 Hafler, 2018)。在此, 依据 Treg 细胞表达表面及内部分子的差异, 主要讲述如何运用流式细胞仪分析 Treg 细胞主要亚群分类。

关键词: 调节性 T 细胞 (Treg), 亚群分类, 流式检测

材料与试剂

一、小鼠胸腺、淋巴结单细胞悬液制备相关耗材及试剂

1. 移液枪头
2. 6 cm 平皿 (NEST, catalog number: 110001)
3. 15 ml 聚丙烯离心管 (康宁, catalog number: 352096)
4. 1.5 ml 离心管 (国产)
5. 200 目白色尼龙网 (达科为, catalog number: DKW33-N25)
6. 5 ml 流式管 (圆底无盖未灭菌, 国产)
7. 0.22 μ m 无菌滤膜 (Millipore, catalog number: SLGP033RB)
8. 6 至 8 周龄大小的 Foxp3-GFP-hCre BAC 转基因小鼠
9. 75%酒精
10. 1x ACK 红细胞裂解缓冲液 (见溶液配方)
 - 1) 氯化铵 (NH_4Cl)
 - 2) 碳酸氢钾 (KHCO_3)
 - 3) 乙二胺四乙酸 (EDTA)
11. 单细胞悬液 (见溶液配方)
 - 1) DMEM 培养基 (Invitrogen, catalog number: C11965500CP)
 - 2) 胎牛血清 (FBS) (Bioind, catalog number: 04-001-1ACS)
 - 3) 氨苄西林钠
 - 4) 硫酸链霉素

二、流式检测试剂及抗体

1. 流式检测相关试剂
 - 1) 1 x PBS 缓冲液 (见溶液配方)

氯化钠 (NaCl)

磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)

磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)

氯化钾 (KCl)

2) 1x FACS 缓冲液 (见溶液配方)

牛血清白蛋白 (BSA)

叠氮钠 (NaN_3)

3) 4% PFA (多聚甲醛) 固定液 (工作浓度为 1%) (见溶液配方)

氢氧化钠 (NaOH)

多聚甲醛粉末

2. 细胞表面分子流式检测抗体 (见溶液配方)

1) CD4-PercP-Cy5.5 (克隆号: RM-5, eBioscience, catalog number: 45-0042-82)

2) CD8 α -AF700 (克隆号: 53-6.7, Biolegend, catalog number: 100730)

3) Neuropilin-1-Biotin (R&D, catalog number: BAF566)

4) Streptavidin-APC (Biolegend, catalog number: 405207)

5) CD44-APC (克隆号: IM7, eBioscience, catalog number: 17-0441-83)

6) CD62L-PE (克隆号: MEL-14, Biolegend, catalog number: 104408)

7) ICOS-APC (克隆号: 7E.17G9, eBioscience, catalog number: 17-9942-82)

8) KLRG1-APC (克隆号: 2F1, eBioscience, catalog number: 17-5893-82)

9) CCR7-PE (克隆号: 4B12, eBioscience, catalog number: 12-1971-82)

10) CD25-PE (克隆号: PC61.5, eBioscience, catalog number: 12-0251-82)

11) CXCR3-APC (克隆号: CXCR3-173, eBioscience, catalog number: 17-1831-82)

12) CXCR5-APC (克隆号: 2G8, BD Bioscience, catalog number: 560615)

3. 细胞内部分子流式检测抗体

1) Foxp3-BV421 (克隆号: FJK-16s, eBioscience, catalog number: 48-5773-82)

2) Helios-PE (克隆号: 22F6, Biolegend, catalog number: 137216)

3) CTLA4-PE (克隆号: UC10-4B9, eBioscience, catalog number: 14-1522-82)

4) Ki67-eF660 (克隆号: SolA15, eBioscience, catalog number: 50-5698-82)

5) Bcl2-AF647 (克隆号: BCL/10C4, Biolegend, catalog number: 633510)

6) T-bet-PE (克隆号: eBio4B10, eBioscience, catalog number: 12-5825-82)

- 7) GATA3-PE (克隆号: TWAJ, eBioscience, catalog number: 12-9966-42)
- 8) IRF4-eF660 (克隆号: 3E4, eBioscience, catalog number: 50-9858-82)
- 9) RoRyt-APC (克隆号: B2D, eBioscience, catalog number: 17-6981-82)
- 10) Bcl6-PE (克隆号: GI191E, eBioscience, catalog number: 12-9887-80)
4. Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 00-5523-00)
该试剂盒所包含的试剂:
 - 1) 固定/透化浓缩液 (Fixation/Permeabilization Concentrate)
 - 2) 固定/透化稀释液 (Fixation/Permeabilization Diluent)
 - 3) 透化缓冲液 (10x Permeabilization Buffer, 简称 10x Perm, 使用浓度为 1x, 用超纯水稀释即可)
5. 转录因子 T-bet 染色相关试剂
 - 1) 固定/透化缓冲液即 BD Cytofix/Cytoperm buffer (BD Bioscience, catalog number: 554722), 1x Cytofix/Cytoperm 缓冲液直接使用即可
 - 2) 透化/清洗缓冲液即 BD Perm/Wash buffer (BD Bioscience, catalog number: 554723), 10x BD Perm/Wash 缓冲液用 ddH₂O 稀释至 1x 即可使用

仪器设备

1. 组织剪
2. 手持移液枪
3. 玻璃组织研磨片、金属筛网、研磨棒 (均为国产)
4. 台式小型高速离心机 (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 75002430)
5. 大型柜式离心机 (Kubota, catalog number: 5930)
6. BD LSRFortessa 流式细胞仪 (5 激光) (BD Bioscience, LSRFortessa)

实验步骤

一、小鼠胸腺、淋巴结以及脾脏中淋巴细胞的获取

1. 用颈椎脱臼法迅速处死小鼠, 用 75% 酒精喷洒小鼠体表消毒, 剪开腹部以及四肢皮肤和腹膜。

2. 分别取出小鼠胸腺、淋巴结、脾脏器官置于含有 2% FBS 的 DMEM 培养基中。
3. 使用玻璃片的磨砂面研磨胸腺和淋巴结，以释放出淋巴细胞，随后将研磨液移至 15 ml 离心管中。
4. 使用研磨棒和金属筛网研磨脾脏，释放出脾脏组织中细胞，随后将研磨液移至 15 ml 离心管中。
5. 将胸腺、淋巴结、脾脏细胞研磨液以 840 x g 在 4 °C 离心 2 分钟，离心后弃上清。
6. 加入 1 ml 1x ACK 红细胞裂解缓冲液（提前放置于室温环境）重悬细胞脾脏沉淀，轻轻吹打混匀，室温裂解 1~2 min，840 x g，4 °C 离心 2 min，用含 2% FBS 的 DMEM 重悬细胞。
7. 将胸腺、淋巴结研磨液以及裂解过红细胞的脾脏细胞悬液在 4 °C，840 x g 离心 2 min。
8. 用 2 ml 含 2% FBS 的 DMEM 重悬细胞，用 200 目尼龙膜过滤，除去细胞碎片以及其它组织碎片。
9. 计数，确定每个样本总的细胞数目以便于后期的染色或培养。

二、细胞流式染色 (涉及荧光蛋白 GFP 与 Foxp3 同时染色方法)

1. 取 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个淋巴细胞置于 1.5 ml 离心管中。
2. 加 500 μ l 1x FACS 洗涤细胞，4 °C，840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
注：管底残余的 1x FACS 缓冲液可以通过 17,000 x g 高速离心 5 秒钟去掉。
3. 加入 20 μ l 用 1x FACS 缓冲液稀释后的表面染色荧光抗体 CD4-PercP-Cy5.5，CD8 α -AF700 以及其它细胞表面抗体，例如 CD44、CD62L、ICOS、CXCR5 等混合液，轻轻吹打混合均匀，4 °C 避光染色 30 min。
4. 加入 500 μ l 1x FACS 缓冲液终止染色反应，洗掉残余的抗体。
注：
 - 1) 如果表面染色抗体中含有 *Biotin* 抗体，则需要进行细胞表面第二步染色，加入相应 *Streptavidin* 抗体 (同步骤 2~4)。
 - 2) 由于 *Foxp3* 本身的染色会造成荧光蛋白如 *GFP* 的猝灭，在这里我们采取预固定的方式来保留 *GFP* 荧光蛋白。见以下预固定步骤 5~8。
5. 加入 500 μ l 1x FACS 缓冲液终止染色反应，洗去残余的抗体。

6. 加入 200 μ l 1x PBS 缓冲液 (室温) 重悬细胞, 随后加入 200 μ l 室温避光放置的 2% PFA (提前用 1x PBS 缓冲液将 4% PFA 稀释至 2%) 缓冲液, 混合均匀后, 室温避光固定 8~10 min。
7. 加入 500 μ l 1x FACS 缓冲液终止固定反应, 4 $^{\circ}$ C, 840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
8. 加入 500 μ l 1x FACS 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
9. 加入 100 μ l Foxp3 染色专用固定液 (Fixation/Permeabilization Concentrate 和 Fixation/Permeabilization Diluent 体积比为 3:1) 重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 避光固定至少 30 min。
10. 加入 500 μ l Foxp3 染色专用 1x Perm (用 ddH₂O 将 10x Perm 稀释至 1x 即可) 重悬细胞; 4 $^{\circ}$ C, 840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
11. 重复步骤 10。
12. 加入 20 μ l 用 1x Perm 缓冲液稀释的 Foxp3 以及其它细胞内荧光标记抗体如 CTLA4、Ki-67、Bcl-2 以及转录因子相关抗体如 GATA3、IRF4、RoRyt、Bcl6 等混合液, 4 $^{\circ}$ C, 避光染色 1-2 h。
注: 由于预固定会对 Foxp3 的染色造成一定的影响, 所以此处染色时间会比较长。此外, 染色过程中应每隔 15 min 左右用拇指弹一下管底, 使得细胞更充分的接触抗体。
13. 加入 500 μ l Foxp3 染色专用 1x Perm 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 840 x g 离心 2 min 弃掉上清, 以洗掉残余抗体。
14. 加入 300 μ l 1x Perm 缓冲液重悬细胞, 用 200 目白色尼龙网过滤细胞至流式管中。
15. 流式细胞术检测细胞荧光表达情况。

注:

- 1) 流式上机检测之前一定要使用 200 目白色尼龙网过滤细胞以除去死细胞以及细胞碎片, 否则容易堵塞流式细胞仪管道。
- 2) 该方法除适用于 Foxp3 抗体的染色, 还适用于常见的细胞因子如 IL-10、IFN- γ 等与 Foxp3 的同时染色。注意: 一旦涉及转录因子 Foxp3 的染色就必须使用 Foxp3/转录因子染色缓冲液试剂盒中相关的固定液和 Perm 缓冲液进行固定和破膜。此外, 如果涉及到其它荧光蛋白与 Foxp3 的一同染色试验, 要根据荧光强度和实验需求来摸索预固定的时间与条件, 以更好的获取实验结果。

- 3) 涉及 *GATA3*、*RoRyt*、*Bcl6* 等转录因子染色时，最好使用 *Foxp3* 染色相关试剂，效果更佳。

三、转录因子 T-bet 染色方法

1. 取 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个淋巴细胞置于 1.5 ml 离心管中。
2. 加 500 μ l 1x FACS 洗涤细胞，4 °C，840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
注：管底残余的 1x FACS 缓冲液可以通过 17,000 x g 高速离心 5 秒钟去掉。
3. 加入 20 μ l 用 1x FACS 缓冲液稀释后的表面染色荧光抗体 CD4-PercP-Cy5.5，CD8 α -AF700，CXCR3-APC 混合液，轻轻吹打混合均匀，4 °C 避光染色 30 min。
4. 加入 500 μ l 1x FACS 缓冲液终止染色反应，洗掉残余的抗体。
5. 加入 200 μ l BD Cytofix/Cytoperm 缓冲液重悬细胞，4 °C，避光固定 30 min。
6. 加入 500 μ l 1x BD Perm/Wash 缓冲液用 (将 1x BD Perm/Wash 缓冲液用 ddH₂O 稀释至 1x 即可)，4 °C，840 x g 离心 2 min 弃掉上清。
7. 重复步骤 6。
8. 加入 20 μ l 用 1x BD Perm/Wash 缓冲液稀释的 T-bet 以及其它细胞内荧光标记抗体如 CTLA4、Ki-67、Bcl-2 等混合液，重悬细胞，室温避光染色 1~2 h。
注：染色过程中应每隔 15 min 左右用拇指弹一下管底，使得细胞更充分的接触抗体。
9. 加入 500 μ l 1x BD Perm/Wash 缓冲液，4 °C，840 x g 离心 2 min 弃掉上清，以洗掉残余抗体。
10. 加入 300 μ l 1x BD Perm/Wash 缓冲液重悬细胞，用 200 目白色尼龙网过滤细胞至流式管中。
11. 流式细胞术检测细胞荧光表达情况。
注：流式上机检测之前一定要使用 200 目白色尼龙网过滤细胞以除去死细胞以及细胞碎片，否则容易堵塞流式细胞仪管道。

结果与分析

1. Treg 细胞的亚群分类 (依据来源分类)
 - 1) 胸腺来源的 tTreg: CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺GFP⁺Nrp-1⁺Helios⁺

- 2) 外周诱导形成的 pTreg: $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+Nrp-1^-Helios^-$
2. Treg 细胞的亚群分类 (依据活化状态分类)
 - 1) 静息状态的 Treg (cTreg): $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+CD44^{lo}CD62L^{hi}CCR7^{hi}CD25^{hi}Bcl-2^{hi}ICOS^{lo}KLRG^{lo}CTLA4^{lo}Ki-67^{lo}$
 - 2) 活化状态的 Treg (eTreg): $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+CD44^{hi}CD62L^{lo}CCR7^{lo}CD25^{lo}Bcl-2^{lo}ICOS^{hi}KLRG^{hi}CTLA4^{hi}Ki-67^{hi}$
3. 特化 Treg 细胞亚群 (依据转录因子表达的不同)
 - 1) Th1-Treg: $CD4^+CD8^-GFP^+(Foxp3^+)CXCR3^+T-bet^+$
 - 2) Th2-Treg: $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+GATA3^+$
 - 3) Th17-Treg: $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+RoRyt^+$
 - 4) TFR: $CD4^+CD8^-Foxp3^+GFP^+CXCR5^+Bcl6^+$

溶液配方

1. 1x ACK 红细胞裂解缓冲液
 - 15.5 mM 氯化铵 (NH_4Cl)
 - 1 mM 碳酸氢钾 ($KHCO_3$)
 - 0.01 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)
 - pH = 7.2~7.4
 - 0.22 μm 无菌滤膜过滤
 - 4 °C 保存
2. 1x PBS 缓冲液
 - 136 mM 氯化钠 ($NaCl$)
 - 8.2 mM 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)
 - 1.5 mM 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)
 - 2.7 mM 氯化钾 (KCl)
 - pH = 7.2~7.4
 - 4°C 保存
3. 1x FACS 缓冲液
 - 1x PBS 缓冲液中加入
 - 0.2%牛血清白蛋白 (BSA)

0.01%叠氮钠 (NaN_3)

4 °C 保存

4. 4% PFA (多聚甲醛) 固定液

400 ml ddH₂O + 250 μ l 1 M 氢氧化钠 (NaOH)

加入 20 g 多聚甲醛粉末

加热至 65 °C~70 °C, 搅拌溶解

冷却至室温

加入 50 ml 10x PBS 缓冲液

用 ddH₂O 定容至 500 ml

用盐酸 (HCl) 调 PH 至 7.3

0.22 μ m 无菌滤膜过滤

4 °C 避光保存

5. 单细胞悬液

500 ml DMEM

10 ml 胎牛血清 (FBS)

250 μ l 氨苄西林钠 (0.25 g/ml)

250 μ l 硫酸链霉素 (0.25 g/ml)

6. 抗体溶液

每 100 μ l 体系应该加入抗体的量

0.5 μ l CD4-PercP-Cy5.5 (0.2 mg/ml)

0.5 μ l CD8 α -AF700 (0.2 mg/ml)

0.5 μ l Neuropilin-1-Biotin (0.2 mg/ml)

2 μ l Streptavidin-APC (0.2 mg/ml)

0.5 μ l CD44-APC (0.2 mg/ml)

0.5 μ l CD62L-PE (0.2 mg/ml)

1 μ l ICOS-APC (0.2 mg/ml)

1 μ l KLRG1-APC (0.2 mg/ml)

2 μ l CCR7-PE (0.2 mg/ml)

1 μ l CD25-PE (0.2 mg/ml)

1 μ l CXCR5-APC (0.2 mg/ml)

2 µl Foxp3-BV421 (0.2 mg/ml)
 2 µl Helios-PE (1.5 µg/ml)
 2 µl CTLA4-PE (0.2 mg/ml)
 1 µl Ki67-eF660 (0.2 mg/ml)
 0.5 µl Bcl2-AF647 (5 mg/ml)
 3 µl T-bet-PE (0.2 mg/ml)
 3 µl GATA3-PE (0.2 mg/ml)
 4 µl IRF4-eF660 (0.2 mg/ml)
 3 µl RoRyt-APC (0.2 mg/ml)
 1 µl Bcl6-PE (0.2 mg/ml)

致谢

此实验方案主要基于周旭宇研究员之前的研究工作以及其实验室最近发表的文章 (Zhou 等, 2009; Zhang 等, 2017; Zhu 等, 2019)。在此致谢张伟博士、张忠美博士对本实验方案的贡献。本项工作得到了国家自然科学基金项目 (项目编号: 31470882, 31870911)和国家科技重大专项的资助 (项目编号: 2016ZX10004222-007)。

参考文献

1. Cretney, E., Kallies, A. and Nutt, S. L. (2013). [Differentiation and function of Foxp3\(+\) effector regulatory T cells](#). *Trends Immunol* 34(2): 74-80.
2. Dominguez-Villar, M. and Hafler, D. A. (2018). [Regulatory T cells in autoimmune disease](#). *Nat Immunol* 19(7): 665-673.
3. Josefowicz, S. Z. and Rudensky, A. (2009). [Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance](#). *Immunity* 30(5): 616-625.
4. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. and Rudensky, A. Y. (2012). [Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function](#). *Annu Rev Immunol* 30: 531-564.
5. Sakaguchi, S. (2004). [Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses](#). *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
6. Smigiel, K. S., Richards, E., Srivastava, S., Thomas, K. R., Dudda, J. C., Klonowski, K. D. and Campbell, D. J. (2014). [CCR7 provides localized access to](#)

- [IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets.](#) *J Exp Med* 211(1): 121-136.
7. Zhang, Z., Zhang, W., Guo, J., Gu, Q., Zhu, X. and Zhou, X. (2017). [Activation and Functional Specialization of Regulatory T Cells Lead to the Generation of Foxp3 Instability.](#) *J Immunol* 198(7): 2612-2625.
 8. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W. and Bluestone, J. A. (2009). [Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo.](#) *Nat Immunol* 10(9): 1000-1007.
 9. Zhu, X., Zhang, W., Guo, J., Zhang, X., Li, L., Wang, T., Yan, J., Zhang, F., Hou, B., Gao, N., Gao, G. F. and Zhou, X. (2019). [Noc4L-mediated ribosome biogenesis controls activation of regulatory and conventional T cells.](#) *Cell Rep* 27(4): 1205-1220 e1204.