Treg 细胞功能的流式检测

Functional Analysis of Mouse Tregs by Flow Cytometry Analysis

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 细胞功能的流式检测. *Bio-101* e1010305. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010305.

How to cite: Zhu X. P. and Zhou, X. Y. (2019). Functional Analysis of Mouse Tregs by Flow Cytometry Analysis. *Bio-101* e1010305. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010305. (in Chinese)

摘要: CD4⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞 (Treg) 在控制自身免疫耐受和炎症反应方面发挥相当关键的作用 (Sakaguchi, 2004)。研究表明, T 细胞受体 (TCR) 信号控制 Treg 细胞的活化、维持和免疫抑制功能, 并进而影响 Treg 细胞的基因表达、代谢、粘附和迁移以控制机体的免疫稳态和平衡 (Li 和 Rudensky, 2016)。因此, 研究 Treg 细胞的活化和免疫抑制功能具有重要的意义。在这里, 基于运用荧光染料 (如 CellTrace Violet、CFSE 等) 标记 T 细胞, 并在每个细胞分裂时在子细胞之间平均分配这一原理, 我们可以相对容易地通过流式细胞术来追踪 Treg 细胞的活化增殖及其体外免疫抑制活性。

关键词: 调节性 T 细胞, CellTrace Violet 标记, 活化与增殖, 体外免疫抑制功能

材料与试剂

一、小鼠淋巴结、脾脏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), 1.5 ml 离心管 (国产)
4. 200 目白色尼龙网 (达科为, catalog number: DKW33-N25)
5. 0.22 μ m 无菌滤膜 (Millipore, catalog number: SLGP033RB)
6. 6 至 8 周龄大小的 C57/BL6, Foxp3-GFP KI 品系小鼠
7. 75%酒精

8. 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)
9. 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、富集 CD4^+ T 细胞相关试剂与耗材

1. Easysep™ 磁铁 (Stem Cell, catalog number: 18000)
2. Anti- $\text{CD8}\alpha$ mAb (克隆号: 2.43, BioXcell, catalog number: BE0061)
3. BioMag goat anti-Rat IgG beads (Qiagen, catalog number: 310107)
4. BioMag goat anti-mouse IgG beads (Qiagen, catalog number: 310007)
5. 1x PBS 缓冲液 (见溶液配方)
 - 1) 氯化钠 (NaCl)
 - 2) 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)
 - 3) 磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)
 - 4) 氯化钾 (KCl)
6. 1x FACS 缓冲液 (见溶液配方)
 - 1) 牛血清白蛋白 (BSA)
 - 2) 叠氮钠 (NaN_3)

三、细胞分选相关试剂及耗材

1. 5 ml 流式管 (康宁, catalog number: 352054)
2. CD4-PercP-Cy5.5 (克隆号: RM-5, eBioscience, catalog number: 45-0042-82)
3. CD62L-APC (克隆号: MEL-14, Biolegend, catalog number: 104412)

四、Treg 细胞培养相关试剂及耗材

1. 96 孔 U 底细胞培养板 (康宁, catalog number: 3799)
2. Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation (Life Technology, catalog number: 11456D)
3. 重组人 IL-2 细胞因子 (简称 rIL-2, PeproTech, catalog number: AF-200-02)
4. ICOS-APC (克隆号: 7E.19G9, eBioscience, catalog number: 17-9942-82)
5. CellTrace Violet 增殖试剂盒 (Invitrogen, catalog number: C34557)
6. Anti-mouse CD3 (克隆号: 145-2C11, BioXcell, catalog number: BE0001-1)
7. 1640 RPMI 完全培养基 (见溶液配方)
 - 1) 1640 RPMI 培养基 (Invitrogen, catalog number: C22400500CP)
 - 2) 胎牛血清 (FBS) (Bioind, catalog number: 04-001-1ACS)
 - 3) 100x NEAA (Gibco, catalog number: 11140-050)
 - 4) 氨苄西林钠
 - 5) 硫酸链霉素
8. 流式荧光抗体 (见溶液配方)

仪器设备

1. 血球计数板以及盖玻片 (国产)
2. 玻璃组织研磨片、金属筛网、研磨棒 (均为国产)
3. 30~300 μ l 移液枪 (BRAND)
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. 立式压力蒸汽灭菌锅 (博讯)
7. BD LSRFortessa 流式细胞分析仪 (5 激光) (BD Bioscience, model: LSRFortessa)
8. BD FACSAria III 流式细胞分选仪 (BD Biosciences, FACSAria III)
9. 旋转孵育器 (Kylin-Bell lab, model: QB-128)
10. 二氧化碳细胞培养箱 (New Brunswick Scientific, model: Galaxy 170S)
11. 生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限责任公司, model: B204LED)

实验步骤

一、小鼠淋巴结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%酒精喷洒体表消毒，剪开腹部以及四肢皮肤和腹膜。
2. 分别取出小鼠四肢、腋下以及头颈部淋巴结、脾脏器官置于含有 2% FBS 的 DMEM 培养基中。
3. 使用磨砂面玻璃片研磨淋巴结以释放出淋巴细胞，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. 将淋巴结、脾脏细胞研磨液以 $840 \times g$ 在 4°C 离心 2 分钟，离心后弃上清。
6. 加入 1 ml ACK 红细胞裂解缓冲液 (提前放置于室温环境)重悬脾脏细胞沉淀，轻轻吹打混匀，室温裂解 1~2 分钟， $840 \times g$ ， 4°C 离心 2 分钟，用含 2% FBS 的 DMEM 重悬细胞。
7. 将淋巴结研磨液以及裂解过红细胞的脾脏细胞以 4°C ， $840 \times g$ 离心 2 分钟。
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他组织。
9. 计数，确定每个样本总的淋巴细胞数以便于后期的富集、分选、培养、染色。

二、CD4⁺ T 细胞的富集

1. 按照上述实验步骤一所示方法首先获取外周淋巴结、脾脏组织中单细胞悬液，计数，并将细胞浓度稀释至 $3 \times 10^7/\text{ml}$ 。
2. 按照每 3×10^7 个淋巴细胞加入 $1 \mu\text{g}$ anti-CD8 α mAb， 4°C 于旋转孵育器旋转孵育 30 分钟至 1 小时。
3. 补一定量的 2% FBS DMEM 培养基至 15 ml， 4°C $2,000 \times g$ 离心 2 分钟去除上清，以洗去未结合的抗体。
4. 重复步骤 3。
5. 按照每 3×10^7 个淋巴细胞各加入 1 ml Goat Anti-Mouse IgG 和 Goat Anti-Rat IgG 磁珠，根据细胞数量加入所需这两种抗体磁珠的量。然后与细胞混合均匀， 4°C 于旋转孵育器旋转孵育 30 分钟至 1 小时。

注：实验所用的抗体磁珠需要预先用 **Qiagen beads** 清洗缓冲液洗两次（借助于 **Easysep™** 磁铁），并用缓冲液重悬磁珠。

6. 使用 **Easysep™** 磁铁吸附上述孵育抗体磁珠的单细胞悬液，吸附~2 分钟后（抗体磁珠可以吸附 **CD8⁺** T 细胞和 B 细胞，上清液中~90%淋巴细胞为 **CD4⁺** T 细胞），吸取吸附后的淋巴细胞悬液至新的 15 ml 离心管中，计数并根据实验需求进行后续操作如流式分选或直接培养。

注：所有操作过程都要在无菌环境下进行，并且整个实验过程中所使用的相关试剂、耗材都要保证无菌。

三、分选 Treg 细胞

按照上述步骤二方法所示，富集得到 **CD4⁺** T 细胞，**CD4⁺** T 细胞的纯度大约为 90%，混合外周淋巴结和脾脏细胞每只 6~8 周龄大小的小鼠大约可以富集得到 2×10^7 个 **CD4⁺** T 细胞，如果要得到 Treg 细胞需要进一步进行流式分选。

1. 取富集得到的 **CD4⁺** T 细胞，4 °C，840 x g 离心 2 分钟，去掉上清。
2. 按照每只小鼠用 300 µl 含有一定比例表面荧光抗体 **CD4-Percp-Cy5.5**, **CD62L-APC**, 于 4 °C 避光孵育 30 分钟以上（为了让细胞更好的接触抗体，染色期间注意弹管壁混合）。
3. 加入 5 ml 无菌 **FACS** 缓冲液以终止染色反应，随后用大约共 1 ml 等比例的 **FACS** 缓冲液和 **Qiagen beads** 清洗缓冲液重悬细胞，用无菌 200 目白色尼龙网（剪成合适的大小高压灭菌即可）过滤至无菌的流式分选管中。
4. 运用 **BD FACS Aria III** 流式细胞分选仪分选 **CD4⁺GFP⁺CD62L^{hi}** 的细胞至含有 20% **FBS** 的 1x **PBS** 缓冲液中即为静息状态的 Treg 细胞。

注：所有操作过程都要在无菌环境下进行，并且整个实验过程中所使用的相关试剂、耗材都要保证无菌。

四、Treg 细胞的体外增殖培养

1. 向分选得到的 Treg 细胞悬液中加入 5 ml 1x **PBS** 缓冲液，4 °C，300 x g，离心 8 分钟，小心缓慢的弃掉上清，并用 1x **PBS** 缓冲液重悬细胞，计数备用。

2. 用 CellTrace Violet 试剂盒按照相关操作步骤对细胞进行标记，随后用 1640 RPMI 完全培养基重悬细胞，计数，并将细胞浓度调整至 0.5×10^6 个/ml，随后加入 rhIL2 至最终浓度为 2,000 U/ml。
3. 根据细胞数目取出适当量的混合均匀后的 Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28 for T cell Expansion and Activation 试剂至上述细胞浓度为 0.5×10^6 个/ml 细胞悬液中。按照每 1×10^6 个 Treg 细胞需要 50 μ l Dynabeads (Treg 细胞与 Dynabeads 的数目比例为 1:2) 的量加入相应的 DynaBeads 体积至 1640 RPMI 完全培养基中。
注：Dynabeads 需要提前使用上述步骤中所提及的 Qiagen beads 清洗缓冲液清洗两次，然后再与细胞混合。
4. 取 200 μ l 上述 Treg 细胞至 96 孔 U 底细胞培养板中 (培养细胞浓度为 1×10^5 个/孔，rhIL2 终浓度为 2,000 U/ml)。
注：如果培养 Treg 细胞使用 96 孔平底细胞培养板，需要保证培养细胞浓度为 2×10^5 个/孔，如果细胞浓度太低会阻碍 Treg 细胞与 Dynabeads 的聚拢，会致使 Treg 细胞活化与增殖受到阻碍。
5. 37 °C，5% CO₂ 条件下培养 5~6 天。每天观察，大概 24~48 小时可以在显微镜下观察到 Treg 细胞与 Dynabeads 聚集到 96 孔 U 形底培养板的底部，3~6 天可以看出明显的 Treg 细胞的活化与增殖，期间如果培养基变黄，则需要吸走一部分培养基然后补加含有 rhIL2 (2,000 U/ml) 的新鲜 1640 RPMI 培养基。
6. 根据实验需要，体外培养 3~6 天，收集 Treg 进行流式检测其增殖活化情况。

五、Treg 细胞体外抑制试验

1. 从 6~8 周龄大小的 C57/BL6 野生型小鼠中取出四肢、头颈部外周淋巴结，得到单细胞悬液，用 CellTrace Violet 试剂盒按照相关操作步骤对该淋巴细胞进行标记，随后用 1640 RPMI 完全培养基重悬细胞，计数，并将细胞浓度调整至 1×10^6 个/ml。
2. 从 Foxp3-GFP KI 小鼠中分选得到 Treg 细胞，计数，用 1640 RPMI 完全培养基重悬细胞，并调整 Treg 细胞浓度至 1×10^6 个/ml。

3. 用排枪向 96 孔 U 形底培养板的第 1~11 列孔中分别加入 50 μ l RPMI 1640 完全培养基。
 4. 用排枪向 96 孔 U 形底培养板的第 12 列孔中加入 100 μ l 浓度为 1×10^6 个/ml 的 Treg 细胞。
 5. 用排枪从 96 孔 U 形底培养板的第 12 列孔中吸取 50 μ l Treg 细胞至第 11 列孔中，相对于第 12 列孔 Treg 细胞的浓度而言，此操作使得 Treg 细胞浓度稀释 2 倍。
 6. 按照上述步骤 5，用排枪依次从 96U 形底培养板的第 11 列孔将 Treg 细胞依次进行稀释至第 7 列孔的 32 倍之后，在第 6 列孔留下不含 Treg 细胞的孔。
 7. 用排枪向每个孔 (第 12 列至第 6 列) 中加入 50 μ l 步骤 1 中用 CellTrace Violet 标记的外周淋巴结细胞。
 9. 用排枪向每个孔 (第 12 列至第 6 列) 加入 100 μ l 含有 anti-mouse CD3 (2 μ g/ml) 的 1640 RPMI 完全培养基。
 10. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 72 小时，收取细胞并进行流式检测。
- 具体操作实验流程见图 1。

图 1. Treg 细胞体外抑制实验流程图

结果与分析

1. Treg 细胞体外增殖活化分析，见图 2。

图 2. 体外 Treg 细胞的增殖与活化结果分析

图 2A 显示的是根据细胞大小和相对复杂程度圈出需要分析的细胞。图 2B 显示的是根据 CD4 和 GFP 的表达情况，圈出 Treg 细胞 (CD4⁺GFP⁺) 进行后续 C 和 D 的分析。图 2C 中是分析 Treg 细胞 (CD4⁺GFP⁺) 体外培养条件下其细胞增殖和活化相关分子 ICOS 表达的情况。图 2D 是分析 Treg 细胞 (CD4⁺GFP⁺) 的增殖情况。以上结果显示了在体外活化条件下培养使用 CellTrace Violet 标记的 Treg 细胞的增殖与活化情况。从以上结果可以看出体外培养条件下 Treg 细胞会增殖并上调活化相关分子 ICOS 的表达。

注：实验人员可以根据自己的实验目的与需求决定 Treg 细胞的培养时间。

2. Treg 细胞体外抑制试验分析，见图 3。

图 3. Treg 细胞体外抑制功能结果分析

以上结果显示，Treg 细胞与 T responder 不同细胞浓度比例条件下，Treg 细胞对 CD4⁺ T 细胞增殖能力的抑制情况。另外以上结果显示随着 Treg 细胞相对于 T

responder 细胞浓度的降低, 对 CD4⁺ T 细胞的抑制能力明显降低 (即 CD4⁺ T 细胞的增殖能力更强)。

失败经验

1. 本实验设计 Treg 细胞的分选, 请注意分选速度, 若分选速度过快, 容易造成细胞状态损伤以及细胞死亡。另一方面还要保证 Treg 细胞的分选纯度, 否则在培养的后期会发现有很多其他细胞亚群的增殖, 进而影响 Treg 细胞的增殖以及结果分析的可信度。
2. Treg 细胞培养密度, 根据实验过程中所使用的 96 孔的板底来决定培养细胞的浓度, 96 孔 U 型底培养板 (1×10^5 个/孔), 96 孔平底培养板 (2×10^5 个/孔)。
3. Treg 细胞体外抑制试验中, 要注意 T responder 细胞的来源, 否则不能检测出 Treg 细胞对 T 细胞的增殖抑制的能力。

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. 单细胞悬液 (500 ml 为例)

500 ml DMEM

10 ml 胎牛血清 (FBS)

250 μl 氨苄西林钠 (0.25 g/ml)

250 μl 硫酸链霉素 (0.25 g/ml)

5. 1640 RPMI 完全培养基 (500 ml 为例)

500 ml 1640 RPMI

50 ml 胎牛血清 (FBS)

250 μl 氨苄西林钠 (0.25 g/ml)

250 μl 硫酸链霉素 (0.25 g/ml)

5 ml 100x NEAA

250 μl β -巯基乙醇 (预先用 1x PBS 缓冲液将 β -巯基乙醇原液稀释 250 倍)

6. 流式荧光抗体

每 100 μl 体系应该加入抗体的量

0.5 μl CD4-PercP-Cy5.5 (0.2 mg/ml)

0.5 μl CD62L-APC (0.2 mg/ml)

0.5 μl ICOS-APC (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; Wei 等, 2017; Zhang 等, 2017; Zhu 等, 2019)。在此致谢魏训东博士、张伟博士、张忠美博士对本实验方案的贡献。感谢张福萍研究员提供 Foxp3-GFP-KI 小鼠。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. Li, M. O. and Rudensky, A. Y. (2016). [T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function.](#) *Nat Rev Immunol* 16(4): 220-233.
2. 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.
3. Wei, X., Zhang, J., Gu, Q., Huang, M., Zhang, W., Guo, J. and Zhou, X. (2017). [Reciprocal expression of IL-35 and IL-10 defines two distinct effector Treg subsets that are required for maintenance of immune tolerance.](#) *Cell Rep* 21(7): 1853-1869.
4. 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.
5. 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.
6. 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.