肿瘤微环境中 DC 细胞亚型和成熟流式检测方法

The Detection of Dendritic Cell Subsets and Maturation in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry

杨超[#], 金静思[#], 邓刘福^{*}

上海市免疫学研究所, 上海交通大学医学院, 上海

*通讯作者邮箱: dengliufu@shsmu.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 杨超, 金静思, 邓刘福. (2019). 肿瘤微环境中 DC 细胞亚型和成熟流式检测方法. *Bio-101* e1010310. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010310.

How to cite: Yang, C., Jin, J. S. and Deng, L. F. (2019). The Detection of Dendritic Cell Subsets and Maturation in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010310. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010310. (in Chinese)

摘要: 树突状细胞是一群功能强大的抗原提呈细胞, 是联系固有免疫和特异性免疫的中坚力量。cDC 表达 CD11c 和 MHCII, 可分为 cDC1 和 cDC2 两个不同的亚群 (Guilliams 等, 2014)。cDC1s 分化依赖于转录因子 BATF3, IRF8 和 ID2, 表达趋化因子受体 XCR1; 在小鼠肿瘤模型中, 一般加用整合素 αE 分子 (CD103) 来标记 (Salmon 等, 2016)。而 cDC2s 的分化依赖于转录因子 RELB, IRF4 和 ZEB2, 表面表达 CD11b 和 CD172a 分子可使其与 cDC1s 亚群区分开。cDC1s 主要执行交叉提呈肿瘤抗原, 激发 CD8⁺ T 细胞杀伤效应, 已被广泛研究证实是肿瘤排异反应及肿瘤免疫治疗的关键亚群 (Bottcher 等, 2018)。本文阐述如何运用流式技术检测肿瘤微环境中 DC 亚群及其成熟标志, 为相关研究作铺垫。

关键词: 树突状细胞, 肿瘤微环境, 流式技术

材料与试剂

材料:

1. 眼科剪及眼科镊
2. 1 ml 移液枪及枪头
3. 6 孔细胞培养平底板 (NEST[®], catalog number: 032819AA01)

4. 96 孔细胞培养 U 底板 (NEST[®], catalog number: 112518AA03)
5. 15 ml 离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc[™], catalog number: 339650)
6. 50 ml 离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc[™], catalog number: 339652)
7. 无菌注射器 (上海康德莱企业发展有限公司, KDL[®])
8. 70 μ m 孔径滤网 (Corning, Falcon[®], catalog number: 352350)
9. 5 ml 无菌圆底管 (带滤网) (Corning, Falcon[®], catalog number: 352235)

试剂:

1. 胎牛血清 (Gemini, Foundation[™], catalog number: 900-108)
2. Anti-FcR (CD16/CD32) 抗体 (BioXCell, catalog number: BE0307)
3. 胶原蛋白酶 I (Worthington Biochemical[®], catalog number: LS004186, -20 °C 储存)
4. 脱氧核糖核酸酶 I, 来源于牛胰腺 (Sigma-Aldrich[®], catalog number: DN25, -20 °C 储存)
5. DMEM 基础高糖培养液 (Hyclone[™], catalog number: SH30243.01)
6. PBS (Hyclone[™], catalog number: SH302560.31)
7. 乙醇
8. 5% DMEM 培养液 (见溶液配方)
9. FACS buffer (见溶液配方)
10. 肿瘤组织消化液 (见溶液配方)

抗体:

1. Anti-FcR (CD16/CD32) (BioXCell, BioXCell, catalog number: BE0307)
2. Fixable Viability Stain 780 (BD Bioscience, BD, catalog number: 565388)
3. Anti-mouse-CD45.2-BV785 (Biolegend, catalog number: 109839)
4. Anti-mouse-Ly6C-BV605 (Biolegend, catalog number: 128035)
5. Anti-mouse-Ly6G-BV711 (Biolegend, catalog number: 127643)
6. Anti-mouse-CD11b-PE/Cy7 (Biolegend, catalog number: 101216)
7. Anti-mouse-CD11c-APC (Biolegend, catalog number: 117310)
8. Anti-mouse-CD103-APC/Cy7 (Biolegend, catalog number: 121432)
9. Anti-mouse-F4/80-BV421 (Biolegend, catalog number: 123137)
10. Anti-mouse-CD86-FITC (Biolegend, catalog number: 105005)

11. Anti-mouse-MHC class II (I-A/I-E)-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, catalog number: 107625)

仪器设备

1. 37 °C 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific)
2. 电热恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司, model: DK-8AXX)
3. 低温离心机 (Eppendorf®, model: 5810R)
4. 微型台式真空泵 GL-802B 型 (Kylin-bell®, model: GL-802B 型)
5. Flow Cytometer (BD, model: LSRfortessa, or equivalent)
6. 恒温细胞培养箱
7. 超净工作台

实验步骤

1. 前期准备工作
 - 1.1 分组标记: 根据实验分组需求取若干六孔板, 标记荷瘤小鼠信息。六孔板中每孔加入 3 ml DMEM 高糖培养基, 将六孔板置于冰上待用。
 - 1.2 配制肿瘤组织消化液: 将预先配制的 100× 消化液母液 (含 100 mg/ml 胶原酶 I 和 20 mg/ml DNA 酶 I) 用含 5% FBS 的 DMEM 高糖培养基稀释 100 倍, 即最终工作浓度为 1 mg/ml 胶原酶 I 和 200 µg/ml DNA 酶 I。将 1× 消化液置于 37 °C 水浴锅预热待用。
 - 1.3 器械准备: 根据实验分组需求准备适量的剪刀镊子, 用双蒸水洗净后 75%乙醇消毒, 烘干备用。
2. 肿瘤组织的分离

采用颈椎脱臼法将荷瘤小鼠处死, 喷洒 75%乙醇消毒。左手持弯镊, 右手持剪刀在肿瘤右侧 1 cm 处沿肿瘤边缘剪开一长约 2 cm 口子。左手捏住剪开处的皮肤向外翻折, 可清晰见到肿瘤附着于皮下。用剪刀沿肿瘤边缘轻轻剪开, 将肿瘤剥离, 注意肿瘤若有溃烂, 则避开溃烂之处。将剥离下来的肿瘤组织放入预先准备好的六孔板内。
3. 肿瘤组织的剪碎

待全部肿瘤剥离完毕，用移液枪吸出预留 **DMEM** 高糖培养基，余大约 0.1 ml，以免在剪碎过程中肿瘤组织干燥。手持剪刀小幅度高频率剪碎肿瘤组织，将肿瘤组织剪成泥浆状，肉眼无法看见清晰组织块。注意以上步骤均在冰上操作。

4. 肿瘤组织的消化

将肿瘤组织剪成泥浆状后，每孔加入 2 ml 1× 消化液，用 1 ml 枪头将肿瘤组织碎末打散，置于 37 °C 恒温细胞培养箱消化 30 min，每隔 10 min 将六孔板取出晃动混匀一次。注意严格按照时间消化，以免影响免疫细胞活性。可根据肿瘤大小调整 1× 消化液的用量。

5. 制备肿瘤细胞悬液

消化完毕后，将六孔板取出放于冰板上，每孔加入 4 ml **DMEM** 高糖培养基 (含 5% **FBS**) 终止消化。用巴氏吸管吸取肿瘤组织悬液至 70 μm 细胞滤网过滤，同时用 1 ml 注射器后部研磨遗留在滤网上的组织块 (注意研磨时切勿用力，易将脂肪等带入细胞悬液中)，用 **DMEM** 高糖基础培养基冲洗滤网上的组织块，所得肿瘤悬液 4 °C，850 × g，离心 5 min。

6. 染色前封闭

由于髓系细胞表面表达较多 **Fc** 受体，容易对流式抗体有非特异性结合，故采用预先阻断 **Fc** 受体封闭。离心后弃上清，根据沉淀多少加入适量 **FACS** 缓冲液混匀，取 10 μl 细胞悬液计数，将悬液细胞密度调至 2×10^7 个/ml。取 100 μl 细胞悬液于 U 底 96 孔内，按 100:3 比例加入抗 **Fc** 受体抗体 (即每 100 μl 细胞悬液加入 3 μl 抗 **Fc** 受体抗体)，4 °C 孵育 30 min。

7. 配制流式染色抗体

按照表 1 配制流式抗体混合液 (用 **FACS** 缓冲液配制)，每孔加入 70 μl 流式抗体混合液，根据需要计算每个流式抗体所需体积。

注：由于 F4/80、MHCII、CD11c、CD86 染色均显示漂移，没有明显分群，需要额外增加空白对照 (不加相应的流式抗体) 和荧光扣除对照 (加入与相应流式抗体一样的只带荧光的流式抗体)。以 anti-mouse-CD11c-APC 为例，空白对照即不加 CD11c-APC 这支流式抗体，而荧光扣除对照则是添加 anti-rat-IgG-APC。

表 1. 肿瘤微环境内 MDSCs 流式染色配色

流式抗体	荧光通道	稀释比例
Fixable Viability Stain 780	APC/Cy7	1000×
Anti-mouse-CD45.2	BV785	200×
Anti-mouse-Ly6C	BV605	200×
Anti-mouse-Ly6G	BV711	200×
Anti-mouse-CD11b	PE/Cy7	200×
Anti-mouse F4/80	BV421	200×
Anti-mouse CD11c	APC	200×
Anti-mouse MHCII	PerCP/Cy5.5	200×
Anti-mouse CD86	FITC	200×

注：流式抗体使用配色可自行调整，注意不要使用补偿过大的荧光通道。另外，M C38 皮下瘤模型中 DC 基本为 DC2，未见 CD103+DC1。

8. 流式染色

封闭结束后，4 °C 850 × g 离心 5 min。弃上清，每孔加入 70 μl 流式抗体混合液，轻柔吹打混匀，注意不要有气泡。将 96 孔板置于 4 °C 避光，染色 30 min。

9. 洗涤、上机

染色结束后每孔加入 200 μl FACS 缓冲液，4 °C 850 × g 离心 5 min。弃上清后再次加入 200 μl FACS 缓冲液洗涤一次，4 °C 850 × g 离心 5 min。弃上清，加入 300 μl FACS 缓冲液重悬细胞，将细胞悬液转移至带滤网的流式管中（同时过滤细胞悬液）。制备好的流式染色样品用 BD Fortessa 进行分析，数据处理软件采用 FlowJo Version 10.0。

结果与分析

设门方式 (图 1):

DC2: Single cell, live, CD45+Ly6C-Ly6G-CD11c+MHCII+F4/80-CD11b+
成熟标志: CD80, CD86

图 1. 肿瘤内 DC 的设门方式

溶液配方

注：以下溶液均在超净台内配制。

1. 5% DMEM 培养液

DMEM 基础高糖培养液 + 5%胎牛血清

4 °C 冷藏，1 个月内使用

2. FACS buffer

PBS + 2%胎牛血清

4 °C 冷藏，1 周内使用

3. 肿瘤组织消化液

5%DMEM 培养液 + 胶原蛋白酶 I (工作浓度：1 mg/ml) + 脱氧核糖核酸酶 I (工作浓度：200 μg/ml)

参考文献

1. Bottcher, J. P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerizo, M., Sammicheli, S., Rogers, N. C., Sahai, E., Zelenay, S. and Reis e Sousa, C. (2018). [NK cells stimulate recruitment of cDC1 into the tumor microenvironment promoting cancer immune control.](#) *Cell* 172(5): 1022-1037 e1014.
2. Guillems, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R. and Yona, S. (2014). [Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny.](#) *Nat Rev Immunol* 14(8): 571-578.
3. Salmon, H., Idoyaga, J., Rahman, A., Leboeuf, M., Remark, R., Jordan, S., Casanova-Acebes, M., Khudoynazarova, M., Agudo, J., Tung, N., Chakarov, S., Rivera, C., Hogstad, B., Bosenberg, M., Hashimoto, D., Gnjatic, S., Bhardwaj, N., Palucka, A. K., Brown, B. D., Brody, J., Ginhoux, F. and Merad, M. (2016). [Expansion and activation of CD103⁺ dendritic cell progenitors at the tumor site enhances tumor responses to therapeutic PD-L1 and BRAF inhibition.](#) *Immunity* 44(4): 924-938.