肿瘤微环境中巨噬细胞极化的流式检测方法

The Detection of Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry

金静思[#], 杨超[#], 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: denglifufu@shsmu.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 金静思, 杨超, 邓刘福. (2019). 肿瘤微环境中巨噬细胞极化的流式检测方法. *Bio-101* e1010311. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010311.

How to cite: Jin, J. S., Yang, C. and Deng, L. F. (2019). The Detection of Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010311. Doi:10.21769/BioProtoc.1010311. (in Chinese)

摘要: 肿瘤的发生进展及治疗预后, 与其赖以生存的肿瘤微环境息息相关。免疫细胞作为机体重要的监视防御力量, 在肿瘤内部可能扮演着截然不同的角色。M2 极化型的巨噬细胞呈现出免疫抑制状态, 能够促进肿瘤发生, 血管再生及转移 (Noy 和 Pollard, 2014); 而 M1 极化型巨噬细胞对抗肿瘤免疫效应有着关键作用 (Mantovani 等, 2017)。明晰肿瘤微环境中 M1/M2 巨噬细胞细胞的极化状态, 对于研究肿瘤免疫治疗及预测临床预后有着重要的指导意义。本文旨在运用流式手段检测肿瘤微环境中巨噬细胞的极化状态, 这是探究肿瘤相关巨噬细胞功能的重要内容之一。

关键词: 肿瘤相关巨噬细胞, 巨噬细胞极化, 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 μm 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. 胶原蛋白酶 I (Worthington Biochemical®, catalog number: LS004186, -20°C 储存)
3. 脱氧核糖核酸酶 I, 来源于牛胰腺 (Sigma-Aldrich®, catalog number: DN25, -20 °C 储存)
4. DMEM 基础高糖培养液 (Hyclone™, catalog number: SH30243.01)
5. PBS (Hyclone™, catalog number: SH302560.31)
6. 乙醇
7. 5% DMEM 培养液 (见溶液配方)
8. FACS buffer (见溶液配方)
9. 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-F4/80-BV421 (Biolegend, catalog number: 123137)
8. Anti-mouse-CD86-FITC (Biolegend, catalog number: 105005)
9. Anti-mouse-MHC class II (I-A/I-E)-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, catalog number: 107625)
10. Anti-mouse-CD206-PE (Biolegend, catalog number: 141706)

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 100 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、CD86、CD206 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-CD206-PE 为例，空白对照即不加 CD206-PE 这支流式抗体，而荧光扣除对照则是添加 anti-rat-IgG-PE。

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 MHCII	PerCP/Cy5.5	200×
Anti-mouse CD206	PE	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。

8. 流式染色

封闭结束后，4 °C，850 × g 离心 5min。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 5min。弃上清后再次加入 200 μl FACS 缓冲液洗涤一次，4 °C，850 × g 离心 5min。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):

肿瘤相关巨噬细胞: Single cell, live, CD45+Ly6C-Ly6G-CD11b+F4/80+

M1 巨噬细胞表面标志: MHCII, CD86

M2 巨噬细胞表面标志: CD206

图 1. 肿瘤相关巨噬细胞的设门方式

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. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L. and Allavena, P. (2017). [Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology.](#) *Nat Rev Clin Oncol* 14(7): 399-416.
2. Noy, R. and Pollard, J. W. (2014). [Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy.](#) *Immunity* 41(1): 49-61.