肠道固有淋巴样细胞亚群细胞因子分泌检测

Cytokine Secretion Analysis of Mouse Intestinal Innate Lymphoid Cells (ILCs) by Flow Cytometry

章晶晶, 沈蕾*

¹上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: lshen@shsmu.edu.cn

引用格式: 章晶晶, 沈蕾. (2019). 肠道固有淋巴样细胞亚群细胞因子分泌检测. *Bio-101* e1010326. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010326.

How to cite: Zhang, J. J. and Shen, L. (2019). Cytokine Secretion Analysis of Mouse Intestinal Innate lymphoid Cells (ILCs) by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010326. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010326. (in Chinese)

摘要: 固有淋巴样细胞 (ILCs) 是近年来新发现的一群缺乏 T、B 细胞抗原特异性受体的天然免疫细胞亚群, 主要分布在器官和黏膜组织, 对维持组织稳态具有重要调节作用。ILCs 广泛参与抗感染、炎症反应、组织修复以及代谢调控等生物学过程, 主要通过其分泌的效应性细胞因子和其他细胞相互作用, 从而调节组织和器官的免疫微环境。因此, 检测固有淋巴样细胞分泌细胞因子的情况对阐明其免疫调节作用至关重要。本实验将结合现有的文献报道, 用流式细胞术检测目前已知的固有淋巴样细胞各亚群分泌的各类细胞因子, 从而揭示不同亚群发挥的免疫调节作用。

关键词: 固有淋巴样细胞, 细胞因子检测

材料与试剂

材料:

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
2. 5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: SCT-5ML-S)
3. 50 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430829)
4. 6 孔板 (Corning, catalog number: 3516)
5. 10 cm 培养皿 (上海雷布斯, catalog number: 350003)

6. 眼用手术剪 (苏州市施强医疗器械有限公司, catalog number: JYY1030)
7. 眼用镊 (苏州市施强医疗器械有限公司, catalog number: JYN1030)
8. 70 μ m 滤膜 (Corning, catalog number: 352350)
9. 0.22 μ m 过滤器
10. 1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
11. 10 ml 移液管 (Corning, catalog number: 4488)
12. 3 ml 圆头吸管 (Biologix, 30-0138A1)
13. 48 孔板 (Corning, catalog number: 351178)
14. BD Falcon 流式管 (Corning, catalog number: 352052)

试剂:

1. DNase I (Sigma-Aldrich, DN25-1G, 配成 150 mg/ml 的母液, -80 °C 保存)
2. Type VIII Collagenase (Sigma-Aldrich, C2139-1G, 配成 100 KU/ml 的母液-80 °C 保存)
3. Lonsera 乌拉圭 (南美) 特级胎牛血清 (Lonsera, catalog number: S711-001S)
4. 20× PBS 缓冲液 (生工, catalog number: B548117)
5. 无水酒精 (常熟市鸿盛精细化工有限公司, catalog number: 64-17-5)
6. 0.5 mol/L EDTA (生工, catalog number: B300599)
7. 二硫苏糖醇 DTT (Sigma-Aldrich, catalog number: D9779-1G)
8. RPMI 1640 培养基 (HyClone, catalog number: SH30809.01)
9. Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml) 双抗 (P/S, Gibco, catalog number: 15140-122)
10. Percoll (GE Healthcare, catalog number: 17-0891-09)
11. eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience™, catalog number: 00-5523-00)
12. Trypan Blue 0.4% solution in 0.85% NaCl (Lonza, catalog number: 17-942E)
13. PMA (Sigma-Aldrich, catalog number: P1585-1MG, 配成 1 mg/ml 母液, -80 °C 保存)
14. Ionomycin calciumsalt (ENZO, ALX-450-007-M001, 配成 1 mg/ml 母液, -80 °C 保存)

保存)

15. Brefeldin A Solution (1,000×) (BFA, Biolegend, catalog number: 42060)
16. 丙三醇
17. 离子霉素
18. DMSO
19. Permeabilization Buffer
20. Fixation/Permeabilization Concentrate
21. Fixation/Permeabilization Diluent
22. 1× PBS (见溶液配方)
23. 75%酒精 (见溶液配方)
24. 洗液 1 (见溶液配方)
25. 洗液 2 (见溶液配方)
26. 消化液 (见溶液配方)
27. 1640 完全培养基 (见溶液配方)
28. DNase I 母液 (见溶液配方)
29. Collagenase VIII 胶原酶母液 (见溶液配方)
30. 40% Percoll (见溶液配方)
31. 80% Percoll (见溶液配方)
32. PMA 和离子霉素刺激剂 (见溶液配方)
33. 细胞活力染料溶液 (见溶液配方)
34. FACS buffer (见溶液配方)
35. PMA 母液 (见溶液配方)
36. 离子霉素母液 (见溶液配方)
37. CD16/32 block 染料抗体 (见溶液配方)
38. 抗体混合物溶液 (见溶液配方)
39. Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution (见溶液配方)
40. 1× Permeabilization Buffer (见溶液配方)

抗体:

1. Fixable Viability Stain 520 (FITC) (BD Biosciences, catalog number: 564407)
2. TruStainfcXTM (anti-mouse CD16/32) (Biolegend, catalog number: 101320)
3. Hamster anti-Mouse CD3-PE-CF594 (BD Biosciences, catalog number: 562286)
4. Rat anti-mouse B220-PE-CF594 (BD Biosciences, catalog number: 562290)
5. Rat anti-mouseGr1-PE-CF594 (BD Biosciences, catalog number: 562710)
6. Rat anti-mouseCD11b-PE-CF594 (BD Biosciences, catalog number: 562287)
7. Hamster anti-mouseCD11c-PE-CF594 (BD Biosciences, catalog number: 562454)
8. CD45.2-BB660 (BD Biosciences, custom)
9. CD127-PE-Cy7 (BD Biosciences, catalog number: 560733)
10. T-bet-BV711 (BD Biosciences, catalog number: 563320)
11. GATA3-BUV395 (BD Biosciences, catalog number: 565448)
12. RORγt-BV786 (BD Biosciences, catalog number: 564723)
13. IL-5-APC (BD Biosciences, catalog number: 554396)
14. IL-17A-AF700 (BD Biosciences, catalog number: 560820)
15. IFNγ-APC-Cy7 (BD Biosciences, catalog number: 561479)
16. IL-22-PE (Biolegend, catalog number: 516404)

仪器设备

1. 水平摇床 (其林贝尔, model: TS-100)
2. CO₂ 细胞培养箱 (Thermo Scientific™ Heracell™ 150i)
3. 实验室 2 级生物安全柜 (Thermo Scientific™ 1300 Series A2 Biological Safety Cabinet Packages)
4. 高速离心机 (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 40 离心机)
5. 倒置相差显微镜 (Olympus, model: CKX41)
6. 血细胞计数板 (Sigma-Aldrich, model: BR717805-1EA)
7. X30 流式细胞分析仪 (BD FACSymphony™ 系统)
8. 电动移液器 (Eppendorf, model: 4430000018)

实验步骤

一. 肠道固有淋巴样细胞的制备

1. 将颈椎脱臼处死后的小鼠固定在手术台上，用 **75%**酒精润湿并消毒小鼠腹部。剪开小鼠腹部皮肤后暴露腹腔。
2. 在小鼠胃与十二指肠连接处剪断，一边分离小肠周围脂肪组织和肠系膜，一边拉出小肠，之后在小肠和盲肠连接处剪断，从而分离出小肠，并将小肠放入装有 **10 ml 1× PBS** (配制方法见溶液配方，后文中若无特殊说明 **PBS** 均指代 **1× PBS**) **15 ml** 离心管中，置于冰上等待后续操作。从盲肠末端开始至肛门部分的结直肠用同样的方法分离出来，放入装有 **10 ml PBS** 的 **15 ml** 离心管中，置于冰上。
3. 取出步骤 **2** 中的小肠，连同 **PBS** 一起倒入 **10 cm** 培养皿中，用手托起小肠一端，用眼科剪剪去小肠表面的派氏结 (**Peyer's Patches, PPs**) 并用眼科镊小心去除表面所有的脂肪和肠系膜残余组织，再用剪刀纵向剪开小肠 (不必沿着肠系膜方向)，暴露出肠内容物，并在培养皿中涮洗干净。将小肠转移到已装有 **8 ml PBS** 的 **15 ml** 离心管中，并在转移过程中将小肠分成 **2 cm** 左右的小段，置于冰上。用相同的方法分离出干净的大肠 (图 1)。

图 1. 去除小鼠小肠派氏结操作流程. A. 去除表面脂肪和肠系膜等组织的小肠，红色箭头指示派氏结；B. 剪去派氏结的操作示意图；C. 去除派氏结后的小肠，红框是所有剪下来的派氏结。

4. 将所有装有肠道组织的离心管剧烈手动振荡 2 min (视频 1)。

视频 1. 手动震荡组织的方法

5. 现配现用含 1 mM DTT 的 PBS 洗液 1 (见溶液配方), 含 30 mM EDTA 的 PBS 洗液 2 (见溶液配方)。
6. 使用镊子直接将步骤 4 中的肠道组织取出并分别转移到装有 10 ml 洗液 1 的 50 ml 离心管中, 220 rpm、37 °C 水平摇床剧烈摇晃 10 min。
注: 离心管垂直放置。
7. 取出离心管剧烈手动振荡 2 min 后, 将肠道组织分别转到含有 10 ml PBS 的 15 ml 离心管中, 再次手动振荡 2 min。
8. 用镊子取出 PBS 清洗过的肠组织再分别转到装有 10 ml 洗液 2 的 50 ml 离心管中, 220 rpm、37 °C 水平摇床剧烈摇晃 10 min。
注: 离心管垂直放置。
9. 取出离心管剧烈手动振荡 2 min 后, 重复步骤 8。
10. 从水平摇床中取出离心管, 手动剧烈振荡 2 min 后用镊子将肠组织取出并将肠组织转移到含有 5 ml 1640 完全培养基 (见溶液配方) 的 7 ml 离心管中, 上下颠倒半分钟以清洗残留的洗液 2。

11. 根据处理的组织数量现用现配消化液：消化一根小肠需要 5 ml 含有 150 $\mu\text{g/ml}$ DNase I 及 100 U/ml collagenaseVIII 的 1640 完全培养基。消化一根大肠需要 5 ml 含有 150 $\mu\text{g/ml}$ DNase I 和 200 U/ml collagenase VIII 的 1640 完全培养基。
12. 用镊子取出步骤 10 中清洗过的肠道组织，置于装有消化液的六孔板中（每孔加 5 ml 消化液），再分别剪成 0.5 cm 左右的小段，置于装有消化液的六孔板中，在 37 °C，5% CO₂ 浓度的 CO₂ 培养箱中静置消化 90 min。
13. 消化结束后，将每孔培养基和肠道组织转移到干净的 15 ml 离心管中，剧烈振荡 3-5 min，待组织摇碎后，消化液及摇碎的组织经 70 μm 滤膜过滤，此外还可以用 5~8 ml PBS 清洗装过培养基的离心管并过滤收集，可以和前面经过过滤的组织液混合（图 2）。

图 2. 肠道组织经消化振荡后得到的细胞悬液示意图

14. 收集含有细胞的滤液， $400 \times g$ 室温离心 5 min 得到细胞沉淀。
15. 现用现配 40% percoll 和 80% percoll 用于密度梯度离心。用 4 ml 40% percoll 重悬细胞沉淀并转移到 15 ml 离心管，用 3 ml 吸管吸取 2.5 ml 80% percoll 后深入 15 ml 离心管底部，缓慢加入 percoll，形成密度梯度。800 $\times g$ 室温离心 20 min，升速 (ACC) 1，降速 (DEC) 0。
16. 离心结束后，吸取中间层淋巴细胞至 10 ml PBS 中，上下颠倒混匀，并用 800 $\times g$ 的速度室温离心 10 min，去除上清后得到细胞沉淀 (图 3，视频 2)。

图 3. 密度梯度离心后得到的产物示意图

视频 2. 吸取密度梯度离心后中间层细胞的过程

17. 用 5 ml PBS 重悬细胞沉淀， $400 \times g$ 、5 min 室温离心后去除上清，得到肠道固有层淋巴细胞，活细胞计数后，可用于后续实验操作。

二. 体外刺激细胞

1. 取 2×10^6 个肠道固有层淋巴细胞，用 300 μ l 1640 完全培养基重悬后转移到 48 孔板中。
2. 给 48 孔板的样品细胞悬液中每孔加入 3 μ l PMA 和离子霉素刺激剂 (见溶液配方)，相当于再次 100 倍稀释。吹打混匀后将 48 孔板放入 CO_2 培养箱， 37°C 孵育 2 小时。
3. 2 小时后取出培养板，在每孔细胞悬液中加入 0.3 μ l BFA 高尔基体阻断剂 (母液为 1,000 $\times$)。也可以选择更精确的稀释方法，先用 1640 完全培养基进行 10 倍稀释，再加入细胞悬液进行 100 倍稀释。吹打混匀后将培养板放入 CO_2 培养箱， 37°C 再孵育 2 小时。
4. 用 1.5 ml EP 管收集细胞悬液，300 μ l PBS 清洗培养板后加入对应 EP 管。 $500 \times g$ 、5 min、 4°C 离心，去上清后得到细胞沉淀，可用于后续操作。

三. 流式细胞术检测固有淋巴样细胞分泌细胞因子的情况

1. 配制细胞流式染色抗体混合物：细胞活力染料抗体、CD16/32 block 染料抗体、表面流式抗体混合物。按照 100 μ l 的反应体系进行配制。细胞活力染料 Fixable Viability Stain 520 (FITC) 用 PBS 配制，1:1,000 稀释。CD16/32 block 染料抗体和表面流式抗体混合物用 FACS buffer (见溶液配方) 配制，其中先用 50 μ l 的体系 1:100 配制 block 溶液，即每个反应 50 μ l，每 50 μ l 加入 0.5 μ l CD16/32 antibody。再用 50 μ l 的体积配制表面抗体混合物，补齐 100 μ l 的总反应体系，按照抗体使用说明，每种表面抗体按照 1:200 的比例稀释。吹打混匀。
2. 用 100 μ l 细胞活力染料抗体重悬上述细胞沉淀，4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。
3. 加入 500 μ l FACS buffer 清洗细胞，500 $\times$ g、5 min、4 $^{\circ}$ C 离心去上清。
4. 每个细胞沉淀中加入 50 μ l block 溶液，重悬细胞后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min。
5. 直接加入 50 μ l 表面抗体混合物，吹打混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。
6. 反应结束后，重复步骤 3。
7. 现用现配 Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution (见溶液配方)，每个反应加入 100 μ l working solution，充分重悬细胞后，避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h (固定破膜时间最多不超过 18 h)。
8. 用双蒸水现用现配 1 $\times$ Permeabilization Buffer (见溶液配方)，并用此溶液配制胞内流式染色抗体混合物 (包括转录因子和相关细胞因子抗体)。反应体系为 100 μ l，抗体按照 1:200 稀释，充分混匀后待用。
9. 给步骤 7 中固定破核的细胞悬液加入 500 μ l 1 $\times$ permeabilization buffer，500 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min，去除上清后得到细胞沉淀。
10. 用 100 μ l 的抗体混合物重悬细胞，充分混匀后置于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 40 min。
11. 反应结束后重复步骤 3。
12. 最后用 200~300 μ l FACS buffer 重悬细胞，再使用 70 μ m 滤膜过滤到流式管中，在流式细胞仪上检测相关细胞因子的分泌情况。

结果与分析

图 4. 大肠固有淋巴样细胞分泌细胞因子的能力检测。所有细胞来自于大肠 lineage (CD3, B220, CD11b, CD11c, Gr-1)⁻CD45.2⁺CD127⁺活的淋巴细胞群。其中 ILC1 为 lineage⁻CD45.2⁺CD127⁺T-bet⁺，主要分泌细胞因子 IFN γ ；ILC2 为 lineage⁻CD45.2⁺CD127⁺GATA3⁺，主要分泌细胞因子 IL-5 和 IL-13；ILC3 为 lineage⁻CD45.2⁺CD127⁺ROR γ t⁺，主要分泌细胞因子 IL-22 和 IL-17A。

图 5. 小肠固有淋巴样细胞分泌细胞因子的能力检测。所有细胞来自于小肠 lineage (CD3, B220, CD11b, CD11c, Gr-1)⁻CD45.2⁺CD127⁺活的淋巴细胞群。

固有淋巴样细胞是一群类似于 T 细胞的固有免疫淋巴细胞群。根据其转录因子的表达情况和细胞因子的分泌能力，可以将固有淋巴样细胞分为 ILC1、ILC2、ILC3 三群。其中，ILC1 与 Th1 细胞相似，高表达转录因子 T-bet 且分泌细胞因子 IFN γ ，可用于杀伤细胞内细菌和抵抗病毒感染。2008~2009 年左右发现的 ILC2 与 Th2 细胞类似，高表达转录因子 GATA3，并能分泌二型细胞因子 IL-5、IL-13、IL-4 等，参与过敏反应和蠕虫感染的清除 (Sonnenberg 和 Artis, 2015)。此外，中科院邱菊老师实验室和我们实验室共同合作发现 ILC2 尤其是肺中的 ILC2 在哮喘或过敏疾病下大量分泌 IL-17A，进而加重二型炎症反应 (Cai 等, 2019)。ILC3 则与 Th17 细胞类似，高表达转录因子 ROR γ t，分泌大量 IL-22 和 IL-17A，进而维持肠道稳态、清除胞外细菌和真菌感染。在图 4 和图 5 的结果中，我们分别观察了大小肠中这三类固有淋巴样细胞分泌其代表性细胞因子的能力，其中，大肠所有 ILC3 中约有 46.8% 的 ILC3 可分泌 IL-22、16.4% 的 ILC3 可分泌 IL-17A；大约有 14.2% 的 ILC1 能够大量分泌 IFN γ ；而分泌 IL-5 的 ILC2 占总 ILC2 的 16.2%，表达 IL-17 A 的 ILC2 占了 ILC2 的 19.6%。小肠所有 ILC1 中约有 12% 的细胞能分泌细胞因子 IFN γ ，ILC2 中约有 23.7% 的细胞能分泌细胞因子 IL-5，ILC3 中约有 39.3% 的细胞能分泌细胞因子 IL-22、约有 10.8% 的 ILC3 能够分泌 IL-17A。

失败经验

无法检测到细胞因子，最重要的原因可能是此次刺激实验无效，可能的原因有：1)刺激剂失效了，需要更换刺激剂，建议染色时加入一个阳性对照的细胞因子作为是否刺激成功的参照；2)细胞状态差，可通过细胞活力以及目的细胞群的细胞数判断此次样本状态好坏，如果取得的总细胞太少或者细胞活率很低，说明此次样本制备失败；3)加入抗体的实验操作有问题。以上问题需要逐步设计实验一一排除。

溶液配方

1. 1× PBS

用双蒸水稀释 20× PBS 得到
室温保存

2. 75%酒精

取 75 ml 无水乙醇，用双蒸水定容至 100 ml，配成 75%酒精

3. 洗液 1

在 1× PBS 中加入终浓度为 1 mM 的 DTT，即将 1 M DTT 进行 1,000 倍稀释，现配现用

4. 洗液 2

在 1× PBS 中加入终浓度为 30 mM 的 EDTA，即每 10 ml PBS 中加入 0.6 ml 0.5 M EDTA 母液，现配现用

5. 1640 完全培养基

在 RPMI 1640 培养基中加入终浓度为 10% 的 FBS 和 1% 的 P/S

6. DNase I 母液

取 1 ml 丙三醇溶于 9 ml 1x PBS，溶解后 0.22 μm 过滤

取 6.67 ml 过滤后的溶液溶解 1 g DNase，常温溶解且尽量不要搅动

200 μl 每管进行分装，可以反复冻融两到三次但不能太多次

7. Collagenase VIII 胶原酶母液

用无血清的 RPMI1640 培养基室温溶解胶原酶，配成 100,000 Units/ml 的母液需要分装，不能反复冻融

8. 消化液

在 1640 完全培养基加入终浓度为 150 μg/ml DNase I 和 100 U/ml (小肠) 或者 200 U/ml (大肠) collagenase VIII，即将 150 mg/ml DNase I 母液 1,000 倍稀释，100 KU/ml collagenase VIII 母液 1,000 倍或 500 倍稀释，现配现用

9. 40% percoll

配 4.4 ml 40% percoll 需要 0.18 ml 10x PBS、1.58 ml percoll、2.64 ml 1640 完全培养基，现配现用

10. 80% percoll

配 2.75 ml 80% percoll 需要 0.22 ml 10× PBS、1.98 ml percoll、0.55 ml 1640 完全培养基，现配现用

11. FACS buffer

在 1× PBS 中加入终浓度为 1% 的 FBS 和 2 mM 的 EDTA

4 °C 保存

12. PMA 和离子霉素刺激剂

PMA 母液浓度为 20,000x，离子霉素母液浓度为 2,000x

在 1.5 ml 离心管中加入 94.5 μ l 1640 完全培养基，再加入 0.5 μ l PMA 母液和 5 μ l 离子霉素母液，充分混匀

注：操作这两种刺激剂需要避光，且避免反复冻融。

13. PMA 母液

将 1 mg PMA 室温溶解于 1 ml DMSO 中，得到 20,000x 的母液

14. 离子霉素母液

将 1 mg 离子霉素室温溶解于 1 ml DMSO 中，得到 2,000x 的母液

15. 细胞活力染料溶液

一个样品需要 100 μ l，取 100 μ l 1 $\times$ PBS 加入 0.1 μ l 细胞活力染料 Fixable Viability Stain 520 (FITC)，1:1,000 稀释，现用现配，注意避光

16. CD16/32 block 染料抗体

一个样品需要 50 μ l，取 50 μ l FACS buffer 加入 0.5 μ l TruStainfcXTM (anti-mouse CD16/32) 配成 block 溶液，1:100 稀释，现用现配，注意避光

17. 抗体混合物溶液

染色反应总体积为 100 μ l，包括 50 μ l CD16/32 block 染料抗体和 50 μ l 抗体混合物溶液。因此，取 43 μ l FACS buffer 各加入 0.5 μ l 前文出现的所有表面抗体配成抗体混合物溶液 (包括 5 种 lineage 抗体和 CD45.2、CD127 等 7 种抗体共 3.5 μ l)，1:200 稀释，现用现配，注意避光

18. Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution

将 1 份 Fixation/Permeabilization Concentrate 和 3 份 Fixation/Permeabilization Diluent 充分混匀，现配现用

19. 1 $\times$ Permeabilization Buffer

用双蒸水稀释，10 倍稀释 10 $\times$ Permeabilization Buffer，现配现用

致谢

感谢沈蕾实验室和中科院邱菊实验室各位研究生同学对本实验方法的帮助和改进。本实验得到国家自然科学基金项目 (81571533) 的资助。

参考文献

1. Cai, T., Qiu, J., Ji, Y., Li, W., Ding, Z., Suo, C., Chang, J., Wang, J., He, R., Qian, Y., Guo, X., Zhou, L., Sheng, H., Shen, L. and Qiu, J. (2019). [IL-17-producing ST2⁺ group 2 innate lymphoid cells play a pathogenic role in lung inflammation.](#) *J Allergy Clin Immunol* 143(1): 229-244 e229.
2. Sonnenberg, G. F. and Artis, D. (2015). [Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation.](#) *Nat Med* 21(7): 698-708.