肠道固有淋巴样细胞亚群分类及表型检测

Classification and Phenotype Analysis of Mouse Intestinal Innate Lymphoid Cells (ILCs)

章晶晶, 沈蕾*

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: lishen@shsmu.edu.cn

引用格式: 章晶晶, 沈蕾. (2019). 肠道固有淋巴样细胞亚群分类及表型检测. *Bio-101* e1010327. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010327.

How to cite: Zhang, J. J. and Shen, L. (2019). Classification and Phenotype Analysis of Mouse Intestinal Innate Lymphoid Cells (ILCs). *Bio-101* e1010327. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010327. (in Chinese)

摘要: 固有淋巴样细胞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, 对维持组织免疫稳态具有重要调节作用, 而其功能异常可导致组织炎症性疾病如炎症性肠病和哮喘等疾病的发生。目前关于这类细胞的发育调控、组织特异性、以及细胞命运的可塑性等方面还没有完全研究清楚, 因此本实验基于肠道富含各种固有淋巴样细胞亚群, 拟通过多色流式染色技术, 建立分析肠道固有层固有淋巴样细胞三个亚群组成及深度解析细胞表型的方法。

关键词: 固有淋巴样细胞, 表型检测, 多色流式染色分析技术

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 μm 滤膜 (Corning, catalog number: 352350)
9. 0.22 μm 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. 96 孔圆底板 (Corning, catalog number: 3360)
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 $\times$ 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 M EDTA (生工, catalog number: B300599)
7. 二硫苏糖醇 DTT (Sigma-Aldrich, catalog number: D9779-1G, 配成 1 M 母液, -80°C 保存)
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. 丙三醇
14. Permeabilization Buffer
15. Fixation/Permeabilization Concentrate

16. Fixation/Permeabilization Diluent
17. 1× PBS (见溶液配方)
18. 75%酒精 (见溶液配方)
19. 洗液 1 (见溶液配方)
20. 洗液 2 (见溶液配方)
21. 消化液 (见溶液配方)
22. 1640 完全培养基 (见溶液配方)
23. DNase I 母液 (见溶液配方)
24. Collagenase VIII 胶原酶母液 (见溶液配方)
25. 40% Percoll (见溶液配方)
26. 80% Percoll (见溶液配方)
27. 细胞活力染料溶液 (见溶液配方)
28. FACS buffer (见溶液配方)
29. Block 溶液 (见溶液配方)
30. 抗体混合物溶液 (见溶液配方)
31. Foxp3 Fixation/Permeabilization working solution (见溶液配方)
32. 1× Permeabilization Buffer (见溶液配方)

抗体:

1. TruStainfcX™ (anti-mouse CD16/32) (Biolegend, catalog number: 101320)
2. Fixable Viability Stain620 (PE-CF594) (BDBiosciences, catalog number: 564996)
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. MouseantimouseCD45.2-AlexFluor 700 (BDBiosciences, catalog number: 560693)

9. PE/Cy7 anti-mouse CD90.2 Antibody (Biolegend, catalog number: 105325)
10. Rat antimouseCD127-PE-Cy5 (eBioscience, catalog number: 15-1271-82)
11. APC anti-mouseCD25antibody (Biolegend, catalog number: 101909)
12. Rat antimouseST2-BV421 (BDBiosciences, catalog number: 566309)
13. Rat antimouseKLRG1-BB630 (BDBiosciences, catalog number: custom)
14. Rat antimouseMHC II-FITC (eBioscience, catalog number: 11-5321-82)
15. Rat antimouseCD69-BB780 (BDBiosciences, custom)
16. Rat antimouseIL17RB-BV605 (BDBiosciences, catalog number: 743817)
17. Mouse antimouseGATA3-BUV395 (BDBiosciences, catalog number: 565448),
18. Mouse antimouseROR γ t-BV786 (BDBiosciences, catalog number: 564723)
19. Mouse antimouseT-bet-PE (BDBiosciences, catalog number: 561268)

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. 分离肠道固有层淋巴细胞

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) 的 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, 用镊子取出肠道组织再转到含有 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 µg/ml DNase I 及 100 U/ml collagenase VIII 的 1640 完全培养基。消化一根大肠需要 5 ml 含有 150 µg/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，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 × *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 × *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 × *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. 流式细胞术检测固有淋巴样细胞亚群分类

1. 固有淋巴样细胞根据其表达转录因子和分泌细胞因子的特征主要分成三个亚群，ILC1、ILC2、ILC3。先配制细胞活力染料溶液（见溶液配方）、block 溶液（见溶液配方）和抗体混合物溶液（见溶液配方）。

注：所有的流式抗体都需要避光操作，以防止荧光淬灭从而降低流式抗体的使用寿命；抗体开盖之前需要离心从而防止管壁上的抗体飞溅引起浪费；抗体不宜长时间在室温放置，建议置于冰上使用。

2. 取 2×10^6 个需要检测的肠道固有层淋巴细胞于 96 孔板（圆底）或 1.5 ml EP 管中，用 100 μ l 活力染料溶液重悬，4 °C 冰上孵育半小时。
3. 加入 150 μ l FACS buffer（见溶液配方）（针对 96 孔板）或 500 μ l FACS buffer（针对 1.5 ml EP 管）清洗细胞， $400 \times g$ 、4 °C 离心 5 min，去除上清后得到细胞沉淀。
4. 加入 50 μ l 的 block 溶液充分重悬细胞，4 °C 避光孵育 10 min。
5. 在每个反应的细胞悬液中直接加入 50 μ l 表面流式抗体混合溶液，充分混匀细胞后，4 °C 避光孵育 30 min，染色反应过程中建议适当吹打细胞悬液，以防止细胞聚集沉淀造成染色不充分。
6. 结束表面染色后，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 反应 buffer, 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), 每个反应加入 150 μ l buffer (针对 96 孔板) 或 500 μ l buffer (针对 1.5 ml EP 管), 400 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 去除上清后得到细胞沉淀。
9. 制备转录因子流式抗体混合溶液, 按照 1:200 的稀释比例, 用 1 $\times$ Permeabilization Buffer 配制本实验中所用的的转录因子流式抗体 (T-bet、GATA3、ROR γ t), 充分混匀后, 在每个反应中加入 100 μ l, 充分重悬细胞, 避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。
10. 结束孵育后, 重复步骤 3, 最后用 200~300 μ l FACS buffer 重悬细胞沉淀, 再使用 70 μ m 滤膜过滤到流式管中。
11. 流式细胞分析仪检测相关细胞参数。

结果与分析

图 4. 小鼠大肠固有层固有淋巴样细胞亚群分布。根据 FSC、SSC 即细胞的大小和所含内容物多少可圈出淋巴细胞, 根据 FSC-A 和 FSC-H 可圈出单细胞群。Lineage $^{-}$ CD45.2 $^{+}$ CD127 $^{+}$ CD90.2 $^{+}$ 可定义出总固有淋巴样细胞, 其中 T-bet $^{+}$ 是 ILC1, ROR γ t $^{+}$ 是 ILC3, GATA3 $^{+}$ 是 ILC2。ILC1 占 lineage $^{-}$ 固有淋巴样细胞 17.7%, ILC2 占 lineage $^{-}$ 固有淋巴样细胞 44.4%, ILC3 占 lineage $^{-}$ 固有淋巴样细胞 32.1%, 还存在 5.8%未知淋巴细胞。

图 5. 小鼠小肠固有层固有淋巴样细胞亚群分布. 小肠中固有淋巴样细胞的亚群分布与大肠略有不同, 其中 ILC1 占 lineage⁻固有淋巴样细胞 12.1%, ILC2 占 lineage⁻固有淋巴样细胞 15.8%, ILC3 占 lineage⁻固有淋巴样细胞 68.2%, 还存在 3.9%未知淋巴细胞。

分离得到肠道固有层淋巴细胞后, 可以在显微镜下观察计数, 通过细胞的形状和台盼蓝染色判断制备细胞的状态。细胞活力高、状态好, 方可进行后续的流式染色分析。固有淋巴样细胞主要居住在粘膜组织中, 其中肠道固有层存在大量的 ILC1、ILC2、ILC3。依据其不同亚群的分类标准, 此次实验中, 我们圈出 lineage⁻ (即 CD3-B220-CD11b-CD11c-Gr-1⁻) CD45.2⁺CD90.2⁺CD127⁺的淋巴细胞单细胞群, 其中, T-bet⁺为 ILC1, RORyt⁺为 ILC3, GATA3⁺为 ILC2。已知 ILC3 具有较高的异质性, 部分 ILC3 由于外界共生菌和 Ahr 信号的刺激, 会上调 T-bet 的表达, 并拥有产生 IFN γ 的能力 (Zook 和 Kee, 2016)。因此可以发现, 在图 4 中, 我们定义的 RORyt⁺ILC3 亚群可分为 T-bet⁺和 T-bet⁻两群。另外, ILC2 表面高表达 IL-2 受体 CD25、IL-33 受体 ST2、IL-25 受体 IL-17RB 等, 在常见的哮喘、过敏等二型免疫反应中, ILC2 会接受上游 IL-33、IL-25、TSLP 等信号的刺激后活化, 大量分泌二型细胞因子 IL-5、IL-13 等参与下游反应发挥功能 (Sonnenberg 和 Artis, 2015)。因此在图 4 中, 我们还观察了 ILC2 表面 CD25 的表达情况, 发现肠道 ILC2 均高表达 CD25。图 4 和图 5 分别展示了大小肠中固有淋巴样细胞的亚群分布, 比较两图可知, 大肠中的固有淋巴样细胞以 ILC2 为主, 而小肠中的固有淋巴样细胞以 ILC3 为主。如果条件允许, 实验者还可以加入各种感兴趣的细胞标记

蛋白抗体，从而探索不同固有淋巴样细胞亚群的蛋白表达谱。

图 6. 肠道二型固有淋巴样细胞表型分析。所有流式图的细胞来自 lineage⁻CD45.2⁺CD90.2⁺CD127⁺淋巴细胞单细胞群。

以二型固有淋巴样细胞为例，在图 6 中，我们观察了 ILC2 表面包括 ST2、IL-17RB、CD25、KLRG1、CD69、MHC II 等在内的不同蛋白的表达情况。之所以选择观察这些蛋白，主要是因为它们与 ILC2 的功能和状态相关：ST2、IL-17RB 和 CD25 分别为 ILC2 感受上游信号 IL-33，IL-25 和 IL-22 的受体，CD69、KLRG1 蛋白可判断细胞处于激活还是抑制状态，MHC II 则与适应性免疫应答息息相关。其中 ST2、CD25、KLRG1、CD69 等均在 ILC2 表面高表达，与已有的文献报道一致；部分 ILC2 高表达 MHC II，提示 ILC2 可作为抗原递呈细胞与辅助 T 细胞相互作用。除此以外，根据已有的研究发现，ILC2 还表达 OX40、PD-1 等蛋白，参与适应性免疫调控等多种生理过程，本文不再一一描述，实验者可根据实验目的自行调整染色方案，检测固有淋巴样细胞的表型。

失败经验

1. 制备肠道固有层淋巴细胞失败

初学者在制备细胞的过程中往往无法得到大量的细胞，主要原因在于消化不充分。为了避免这个问题，需要注意以下几点：1)在最初剥离肠道组织时，需要彻底清除肠壁周围的脂肪组织、肠系膜，它们的存在会严重影响后续的消化 (图 7)；2)前三步洗涤过程的手动剧烈振荡一定不能省略，摇晃越剧烈越容易去除肠上皮，从而暴露固有层；3)消化组织使用的胶原酶和 DNase I 不能反复冻融，否则会大大降低酶

活性，导致消化不足；4)如果在规定的消化时间内发现消化不彻底，可以适当延长消化时间或者提高酶浓度，如果发现消化过度、死细胞特别多，则需要减少消化时间或降低酶浓度。不同处理的小鼠其肠道组织环境差异巨大，需要摸索更优化的消化条件。

图 7. 肠道组织去除肠系膜和脂肪的前后对比图

2. 已知某亚群表达某一蛋白，但无法检测到
无法检测到阳性信号主要有以下几个方面的原因，需要逐一排查：1)样品制备问题导致样品中缺乏阳性细胞，建议实验人员设计阳性对照以确定是否是实验组样品制备的问题；2)流式抗体问题，如果抗体本身由于克隆号或者过期等原因导致抗体失效，则建议更换抗体；3)流式染色和上机分析问题，建议对比其他表型检测有无问题，如果其他抗体检测正常则可排除流式操作的问题。

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 1× 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 10× 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. 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 620 (PE-CF594)，1:1,000 稀释，现用现配，注意避光

13. 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

14. 1 $\times$ Permeabilization Buffer

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

15. Block 溶液

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

16. 抗体混合物溶液

染色反应总体积为 100 μ l，包括 50 μ l block 溶液和 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 (加入 14 种抗体共 7 μ l)，1:200 稀释，现用现配，注意避光

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. Sonnenberg, G. F. and Artis, D. (2015). [Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation](#). *Nat Med* 21(7):698-708.
2. Zook, E. C. and Kee, B. L. (2016). [Development of innate lymphoid cells](#). *Nat Immunol* 17(7): 775-782.