

FACSAria III流式细胞仪分选小鼠肺脏 自然杀伤细胞方法的建立与评价

户乃丽,徐晓雪,邹林樾,田蜜

(首都医科大学中心实验室,北京 100069)

摘要:目的 利用流式细胞仪分选小鼠肺脏自然杀伤细胞(NK细胞)并检测分选后细胞纯度与存活率。方法 小鼠肺脏经胶原酶灌注法得到单细胞悬液,流式细胞仪分选悬液中FVS510⁻CD3⁻CD19⁻NK1.1⁺NKp46⁺细胞,分选后的细胞流式细胞仪回测阳性率,台盼蓝染色检测细胞活力。结果 第一滴液流断点位置 Drop1 为 345,Gap 为 9,液流开启 0.5 h 以上无晃动,无断点位置改变,稳定性良好,各种参数符合分选条件。分选前 NK 细胞占总细胞(4.40±1.20)% Total,分选后为(96.10±2.20)% Total,差异有统计学意义($P<0.05$)。经台盼蓝染色显示,分选后细胞存活率为(95.70±2.02)%,细胞形态良好。结论 利用流式细胞分选仪可快速高效分离小鼠肺脏 NK 细胞,分选后的细胞保持良好的活性,可为进一步研究 NK 细胞提供保证。

关键词:流式细胞;NK 细胞;细胞存活率

中图分类号:R-331

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.15.030

文章编号:1006-1959(2021)15-0115-04

Establishment and Evaluation of A Method for Sorting Mouse Lung Natural Killer Cells by FACSAria III Flow Cytometer

HU Nai-li,XU Xiao-xue,ZOU Lin-yue,TIAN Mi

(Central Laboratory,Capital Medical University,Beijing 100069,China)

Abstract:Objective To sort natural killer cells (NK cells) from mouse lungs by flow cytometry and to detect the purity and survival rate of the cells after sorting. Methods Mouse lungs were perfused with collagenase to obtain a single cell suspension, and FVS510⁻CD3⁻CD19⁻NK1.1⁺NKp46⁺ cells in the suspension were sorted by flow cytometry. After sorting, flow cytometry back-tested the positive rate of cells, and trypan blue staining to detect cell viability. Results The breakpoint position of the first drop flow was Drop1 was 345, Gap was 9, and the flow was turned on for more than 0.5 h without shaking, no breakpoint position change, good stability, and various parameters were in line with the sorting conditions. Before sorting, NK cells accounted for (4.4±1.2)% Total. After sorting, it was (96.10±2.20)% Total, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The trypan blue staining showed that the cell survival rate after sorting was (95.70±2.02)%, and the cell morphology was good. Conclusion The flow cytometer can quickly and efficiently isolate NK cells from mouse lungs, and the sorted cells maintain good viability, which can provide a guarantee for further research on NK cells.

Key words:Flow cytometry;NK cells;Cell survival rate

自然杀伤(natural killer, NK)细胞是机体天然免疫系统的重要组成部分,与抗病毒免疫、移植免疫、自身免疫疾病及肿瘤免疫密切相关^[1,2]。不同种属 NK 细胞的特征性表面标记有所不同,人 NK 细胞通常以 CD56⁺CD3⁻表型来进行鉴定,而在小鼠中 NK1.1⁺NKp46⁺和 CD49b(DX5)等往往被用作鉴定 NK 细胞的标志分子^[3,4]。NK 细胞在体内含量较低,获取高纯度高活性的 NK 细胞对于进一步研究具有重要意义。免疫磁珠分离是目前常用的纯化 NK 细胞的方法之一,利用磁珠分选脾脏、血液等组织可得到纯度 90% 以上的 NK 细胞。由于肺脏属于较韧的实质组织,含有大量的结缔组织,处理过程中需要胶原酶消化,过程中会产生一定的死细胞,磁珠分选后会有部分活性不佳的 NK 细胞残留,影响分选后细胞活性。本实验拟利用密度梯度离心结合流式细胞 4 色标记分选,加入识别细胞死活的染料,建立一种高速高效分离纯化小鼠肺脏 NK 细胞的方法,现报道如下。

作者简介:户乃丽(1982.8-),女,北京人,硕士,主管技师,主要从事流式细胞检验工作

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 5 只雄性 C57BL/6 小鼠,SPF 级,体质量 28~30 g,5~6 周龄,购于首都医科大学实验动物部,饲养温度 20℃~25℃,湿度 40%~70%。单笼饲养,正常饮水进食。

1.2 试剂与仪器 RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;胶原酶 V、台盼蓝试剂购自 Sigma Aldrich 公司;FVS510、CD3-FITC、CD19-FITC、NKp46-PE、NK1.1-APC 抗体为 Biolegend 公司产品;红细胞裂解液、流式细胞仪质控 CST 微球、Accudrop beads 购自 BD 公司;实验所用仪器为 BD Aria III 型流式细胞分选仪,配有 488 nm、561 nm、633 nm、405 nm 四只激光器。

1.3 方法

1.3.1 肺单细胞悬液的制备 小鼠处死,开胸取出肺组织,PBS 反复清洗,剪除气管支气管,将肺组织轻柔剪成 1~2 mm 3 小块,将组织加入 37℃ 的新原酶 V 消化液中,置入 37℃ 的水浴箱中,每隔 5 min 轻轻振摇 1 次,约 60 min 时可见肺组织被全部消化;轻轻吹打分散细胞,收集消化液 200 目不锈钢网过

滤,离心去上清后加入 PBS 重悬细胞再次离心去上清;加入红细胞裂解液 5 ml,冰上孵育 10 min,离心去上清;加入 PBS 离心漂洗 1~2 次,去上清,得到小鼠脾单细胞悬液。

1.3.2 流式细胞染色 取分离的细胞细胞,计数并用 500 μ l PBS 定容悬浮,根据说明书配比加入 FVS510 染料孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次, Fc-R 阻断剂封闭后再依次加入 CD3-FITC、CD19-FITC、NKp46-PE、NK1.1-APC 避光孵育 1 h, PBS 洗涤 2 次,调整体积为 1 ml,待上机检测及分选。

1.3.3 分选液流参数和断点的调节 流式细胞仪鞘液桶和水桶用 75%酒精浸泡消毒 4 h 以上,用纯水冲洗干净,鞘液桶中加入无菌 PBS,运行开机程序,安装 85 μ m 喷嘴,分选电压 4500 V, Freq 设定为 47.4,调节液滴振幅 Ampl 值使液流处于稳定状态,而后选中主液流框的 sweet spot 键,仪器会自动维持液流稳态。上样 Accudrop beads 微球调节液滴延迟为 30.31,使得微球在 initial 或 fine tune 模式下都达到侧液流偏转以 99%以上。上样后通过空白和阴

性对照管调节仪器参数圈定阳性细胞,分 FVS510-CD3-CD19-NK1.1⁺NKp46⁺的 NK 细胞,接收管中预置 0.5 ml 培养基接收分选所得细胞。

1.3.4 分选后纯度检测 吸取 400 μ l 分选后的细胞上流式细胞仪,在原分选方案中检测分选后细胞的纯度。

1.3.5 分选后细胞存活率检测 吸取新提取的细胞悬液 90 μ l,加入 0.4%台盼兰溶液 10 μ l,充分混匀后,加入改良的牛鲍计数板,显微镜下观察细胞见未被染色细胞为活细胞。细胞存活率=染色阴性细胞数/细胞总数 \times 100%。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,进行单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪液流断点及液滴延迟 第一滴液流断点位置 Drop1 为 345, Gap 为 9,液流开启 0.5 h 以上无晃动,无断点位置改变,稳定性良好,各种参数符合分选条件,见图 1。

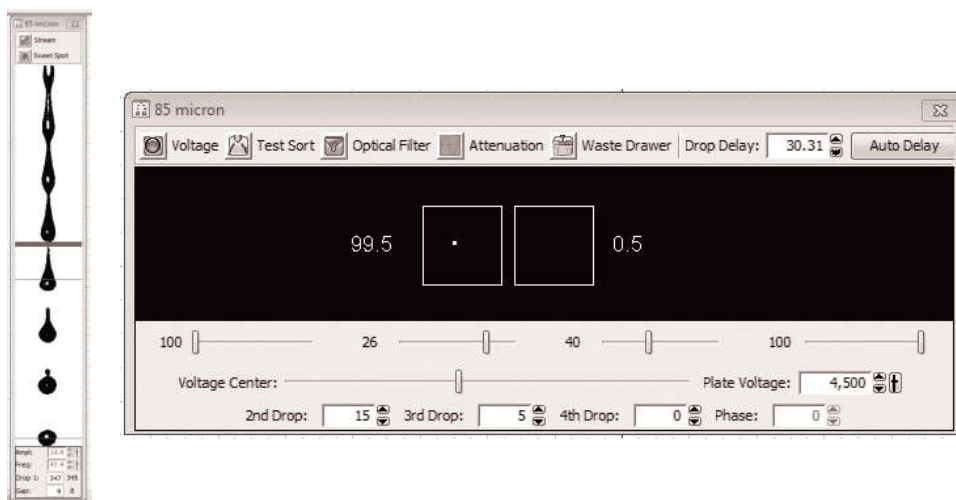


图1 调节后稳定的液流断点状态和液滴延迟调节结果

2.2 流式细胞仪检测并分选 NK 细胞 分选前 NK 细胞占总细胞(4.40 ± 1.20)% Total,分选后为(96.10 ± 2.20)% Total,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

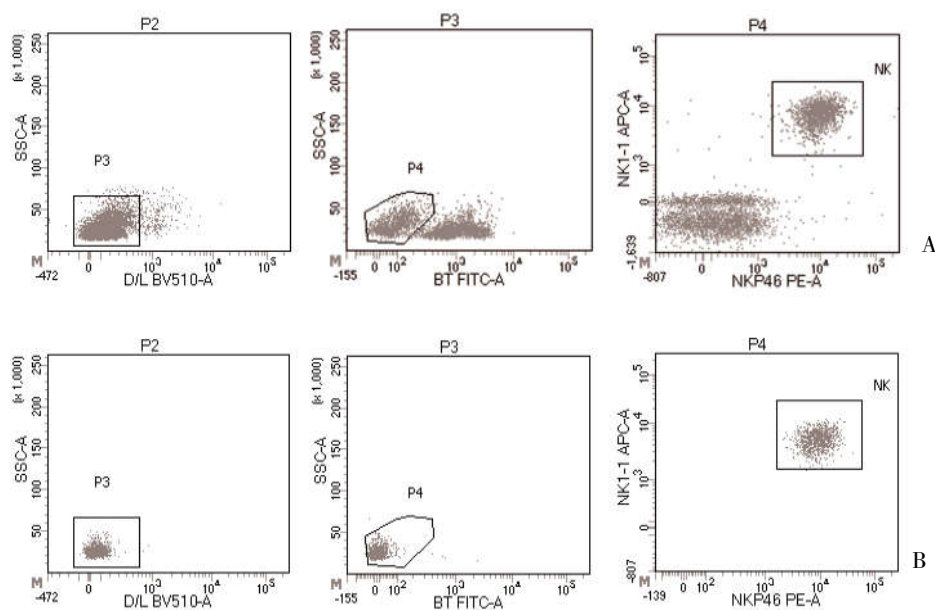
2.3 分选后 NK 细胞存活率 经台盼蓝染色显示分选后细胞存活率为(95.70 ± 2.02)%,细胞形态良好,见图 3。

3 讨论

NK 细胞是先天免疫系统的重要组成部分^[5-7],是一类独特的淋巴细胞亚群,NK 细胞不同于 T 细胞、B 细胞,是一类无需预先致敏就能非特异性杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞的淋巴细胞,占外周血淋巴细胞总数的 10%~15%。NK 细胞在小鼠脾脏含量仅次于脾脏,得到高纯度高活性的 NK 细胞对于

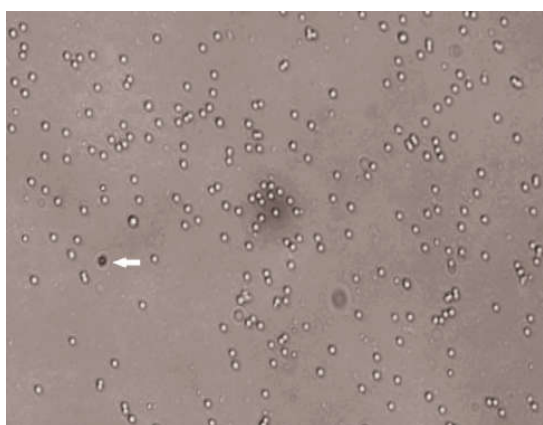
研究其功能具有重要意义。目前常用的细胞纯化方法主要有磁珠分选法和流式分选法^[8,9],磁珠分选多用于脾,血液等易于获取单细胞的组织,经过阴性选择和阳性选择两步可得到纯化率约 90%的 NK 细胞^[10,11]。而流式分选法对于稀有细胞和成份混杂的组织样品的分选具有更大的优势。

在小鼠中,NK 细胞通常被定义为 CD3-NK1.1⁺或者 CD3-NKp46⁺,NK 细胞的亚群划分主要依据 CD11b、CD27、KLRG1 和 CD226 等分子的表达^[12-14],由于 NK 细胞存在于非 T、B 淋巴细胞群,因此选取 CD3-CD19-NKp46⁺NK1.1⁺细胞群为目的细胞进行分选,而在抗体选择上,标记 T、B 细胞的 CD3、CD19,选择同样荧光素标记的抗体,可简化实验的配色方



注:A:分选前;B:分选后

图 2 分选前后 NK 细胞纯度比较



注:箭头所示为死细胞

图 3 台盼蓝染色分选后 NK 细胞($\times 100$)

案。由于分选样品来源于组织,经过消化和离心过程会产生死细胞,死细胞的存在会增加非特异着色,同时也会影响分选后细胞的纯度和活性,因此,在进行染色结果分析时,需加入识别细胞死活的染料。目前流式多用的细胞死活染料分为两大类,核酸染料和氨基反应性染料^[15],核酸染料以 7-AAD 为主,主要适用于非固定细胞的表面标记物的染色。7-AAD 的优点在于染色快捷,样品上机前加入,无需洗涤,缺点是 7-AAD 的激发和发射光谱范围较宽,且与 Percp, PE-CY5 等荧光染料存在较大光谱重叠,检测时应注意调节补偿或避免共同使用。氨基反应性染料适用于活细胞和破膜固定的细胞的死活染色,染色后需要洗涤,根据仪器激光配置和配色方案有多种光谱的染料可供选择。本实验中选择的细胞死活染料为 FVS510,与 FITC 存在一定漏光,样品检测时需设立单阳样品或荧光补偿微球调节

FVS510 与 FITC 之间的补偿值。

对于 FACS Aria III 型流式细胞仪,选择 $85\ \mu\text{m}$ 喷嘴,控制上样速度为 $8000\sim 10000\ \text{evts/s}$,是较适宜的分选条件,得到的 NK 细胞数量和活力俱佳。上样速度过高会使得分选回收率下降,造成部分阳性细胞被丢弃,分选速度过低会延长分选时间,不利于维持细胞活性^[16]。在流式细胞仪分选设置上,首先要注意调节稳定的液流参数,液流的稳定是保证分选准确进行的基础,分选过程中开启液流“sweet spot”模式,一旦液流不稳定时分选能够自动停止,防止液滴飞溅污染影响收集管中细胞的阳性率。此外,液滴延迟的调节是十分重要,可自动结合手动重复调节确定正确的 Drop delay 数值,一旦液流参数发生变化,需要重新校准 Drop delay,这些是保证分选进行的基本条件。通过上述手段,可将含量为 $(4.40\pm 1.20)\%$ Total 的 NK 细胞富集到 $(96.10\pm 2.20)\%$ Total,且活细胞数量达到 95% 以上,细胞形态良好,可用于后续的实验研究。

综上所述,利用流式细胞分选仪可快速高效分离小鼠肺脏 NK 细胞,分选后的细胞保持良好的活性,为进一步研究 NK 细胞提供了保证。

参考文献:

- [1] Calabrese DR, Aminian E, Mallavia B, et al. Natural killer cells activated through NKG2D mediate lung ischemia-reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2020, 12(8): 137047.
- [2] Parihar R, Rivas C, Huynh M, et al. NK Cells Expressing a Chimeric Activating Receptor Eliminate MDSCs and Rescue Impaired CAR-T Cell Activity against Solid Tumors[J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(3): 363-375.

- [3]Stokic-Trtica V,Diefenbach A,Klose CSN.NK Cell Development in Times of Innate Lymphoid Cell Diversity [J].Front Immunol,2020(11):813.
- [4]Tu Y,Pan M,Song S,et al.CD3⁺ CD56⁺ natural killer T cell infiltration is increased in cervical cancer and negatively correlated with tumour progression [J].Biotechnology & Biotechnological Equipment,2019,33(1):1380-1391.
- [5]Becker PS,Suck G,Nowakowska P,et al.Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy[J].Cancer Immunol Immunother,2016,65(4):477-484.
- [6]Kloß S,Oberschmidt O,Morgan M,et al.Optimization of Human NK Cell Manufacturing: Fully Automated Separation, Improved Ex Vivo Expansion Using IL-21 with Autologous Feeder Cells, and Generation of Anti-CD123-CAR-Expressing Effector Cells[J].Hum Gene Ther,2017,28(10):897-913.
- [7]Guillerey C.NK Cells in the Tumor Microenvironment [J].Adv Exp Med Biol,2020(1273):69-90.
- [8]Wang G,Yu G,Wang D,et al.Comparison of the purity and vitality of natural killer cells with different isolation kits [J].Exp Ther Med,2017,13(5):1875-1883.
- [9]Alvarez M,Ochoa MC,Minute L,et al.Rapid isolation and enrichment of mouse NK cells for experimental purposes [J].Methods Enzymol,2020(631):257-275.
- [10]卢铨,陈浩,沙卫红,等.从健康人外周血单个核细胞中分离出高纯度的 CD3⁺CD56⁺CD16⁺NK 细胞对肝癌细胞的杀伤作用分析[J].胃肠病学和肝病学杂志,2019,28(9):978-982.
- [11]Holicek P,Truxova I,Kasikova L,et al.Assessment of NK cell-mediated cytotoxicity by flow cytometry after rapid, high-yield isolation from peripheral blood [J].Methods Enzymol,2020(631):277-287.
- [12]程明,孙汭,田志刚,等.人类肝脏 NK 细胞与肝脏疾病[J].中国免疫学杂志,2020,36(11):1281-1290.
- [13]Montaldo E,Del Zotto G,Della Chiesa M,et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function[J].Cytometry A,2013,83(8):702-713.
- [14]杨梅.CD11b 与 CD27 定义的人类 NK 细胞亚群在 HIV 疾病进展中的变化及相关机制的研究 [D]. 中国医科大学,2017.
- [15]Yudhistira T,Mulay SV,Kim Y,et al.Imaging of Hypochlorous Acid by Fluorescence and Applications in Biological Systems [J].Chem Asian J,2019,14(18):3048-3084.
- [16]Dunker S.Hidden Secrets Behind Dots: Improved Phytoplankton Taxonomic Resolution Using High-Throughput Imaging Flow Cytometry[J].Cytometry A,2019,95(8):854-868.

收稿日期:2021-01-27;修回日期:2021-02-07

编辑/杜帆