

• 技术与方法 •

人肠道组织中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞分选方法的建立*

蒋就喜,康伟芳[△],王雪雯,孔衍琳,张 帅

(桂林医学院传染病教研室,广西桂林 541004)

摘 要:目的 建立一种准确且对细胞活性干扰少的分离人肠道组织中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的分选方法。方法 首先用消化酶分解人肠道组织,40 μm 细胞滤器过滤获得细胞悬液。Percoll 连续密度梯度离心法分离细胞悬液收集单个核细胞,然后通过流式细胞仪分选法(FACS)分选单个核细胞中的 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞。分选后的细胞采用细胞存活率、细胞纯度和形态观察对分选方法进行评价。结果 消化酶能够很好地分解人肠道组织获得细胞悬液,Percoll 连续密度梯度离心法收集的单个核细胞中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度为(43.9±7.3)%,FACS 分选后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度为(96.9±1.2)%,差异有统计学意义($P<0.01$)。分选后的细胞存活率为(97.8±1.6)%,细胞的形态保持完整。结论 Percoll 连续密度梯度离心法联合 FACS 收集人肠道组织的 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度高,且对细胞形态和存活率影响小并可在无菌条件下进行,分选后的细胞可继续用于其他功能的研究。

关键词:流式细胞术;细胞分选;肠道组织;T 淋巴细胞亚群

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)02-0206-02

Establishment of sorting method of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in human intestinal tissue*

Jiang Jiuxi, Kang Weifang[△], Wang Xuewen, Kong Yanlin, Zhang Shuai

(Teaching and Research Section of Infectious Diseases, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract:Objective To establish an accurate sorting method with less interference to the cell activity for isolating CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in human intestinal tissue. **Methods** Firstly the digestive enzymes were adopted to decompose the human intestinal tissue, and then the cell suspension was obtained by the filtration of 40 μm cell strainer. Mononuclear cells were collected by using continuous density Percoll gradient centrifugation technique, then the flow cytometry was adopted to sort CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in mononuclear cells. The survival rate, cell purity and morphological observation of the sorted cells were adopted to conduct the evaluation on the sorting method. **Results** The digestive enzymes well decomposed human intestinal tissue into cell suspension, the purity of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes by using continuous density Percoll gradient centrifugation was(43.9±7.3)%, while the purity of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes was(96.9±1.2)% after fluorescence-activated cell sorting, the difference between them was statistically significant($P<0.01$). The survival rate of sorted CD3⁺CD4⁺T lymphocytes was(97.8±1.6)% with intact cell shape. **Conclusion** The Percoll gradient centrifugation technique combined with the fluorescence-activated cell sorting not only collects highly pure human intestinal CD3⁺CD4⁺T lymphocytes with little influence on the cell activity and shape, but also may be carried out under sterile conditions, the sorted cells can continue to be used in the other functional researches.

Key words: flow cytometry; cell sorting; Intestinal tissue; T-lymphocyte subsets

CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞在人肠道组织免疫系统中非常重要。目前 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞可以分为 Th1、Th2、Th17、Tfh、Th9 和 Treg 六类^[1-2]。Th1、Th2 和 Treg 等是一种免疫调节性 T 淋巴细胞,在调节机体免疫反应及炎症中发挥重要作用。大量动物实验表明,给予调节性 T 细胞可治愈实验动物肠道炎症,这种治疗方法理论上对人炎症性肠病同样可行^[3]。在抗肠道肿瘤方面,CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞通过分泌 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IFN-γ 和 TNF 等细胞因子和直接杀伤肿瘤细胞起到抗肿瘤作用^[4-5]。此外,CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞在辅助 B 淋巴细胞免疫应答、自身免疫和超敏反应等方面发挥着重要作用^[6-8],因此获取高纯度和足够数量的肠道 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞是对其进一步研究的基础。本实验通过 Per-

coll 连续密度梯度离心法联合流式细胞仪分选法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)获得人肠道 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞,从而建立一种新的分选方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 人肠道组织取自 2012 年 9 月至 2013 年 1 月收住桂林医学院附属医院普外科结肠癌患者的距病变边缘 5 cm 的正常组织术中标本 15 例(年龄 45~83 岁,平均 63.2 岁),所有标本均在手术切除后迅速置于冷冻的磷酸盐缓冲液(PBS)中保存。全部病例术前均未行放、化疗。

1.2 主要试剂和材料 脱氧核糖核酸酶 I(美国 Sigma 公司),中性蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司),胶原蛋白水解酶 IV(美国 Sigma 公司),台盼蓝染料(美国 Sigma 公司),Pecoll

* 基金项目:广西本级技术与开发项目(桂财教[2010]124 号,桂财教[2012]98 号);广西医疗卫生重点科研课题(重 2010055);桂林市科学研究与技术开发项目(市科[2010]37 号)。

作者简介:蒋就喜(1955—),教授,硕士,主要从事重大传染病分子生物学和流行病学的研究。

[△] 通讯作者, Tel:13799149077; E-mail:2523944719@qq.com。

分层液(美国 GE 公司),PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),40 μm 细胞滤器(美国 BD 公司)。流式细胞荧光标记抗体:鼠抗人 CD3-FITC、鼠抗人 CD4-PerCP、鼠抗人 CD3-FITC 同型对照为鼠抗人 IgG3-FITC、鼠抗人 CD4-PerCP 同型对照鼠抗人 IgG1-PerCP(美国 BD 公司)。

1.3 主要仪器 净化工作台(苏州净化 SW-CJ-2FD 型),恒温振荡器(太仓市科教器材厂 HZ-9211K 型),流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS Aria III 型),显微镜(日本 Olympus 公司 BX60 型),台式高速冷冻水平离心机(美国 Thermo 公司 Legend RT-Plus 型)。

1.4 方法

1.4.1 人肠道单个核细胞制备 (1)术中取得的人肠道组织去除肠系膜脂肪组织,纵向切开肠道,并用 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 缓冲液冲洗人肠道组织后切成 1 mm^2 的小块;(2)组织块放入盛有 5 mL PBS(内含有 4% 的胎牛血清、0.5 mg/mL 胶原蛋白水解酶 IV、0.5 mg/mL 脱氧核糖核酸酶 I 和 50 U/mL 中性蛋白酶)的培养皿中,将培养皿置于恒温摇床上 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,然后用 40 μm 的细胞滤器过滤。此过程重复 3 次;(3)3 次消化的细胞悬液沿管壁缓慢加入加入盛有 60% Percoll 分层液(比重 1.077 g/mL)的离心管中,形成清晰的界面。用台式高速冷冻水平离心机 2 000 r/min 离心 20 min 后,小心吸取 Percoll 分层液界面上环状乳白色层,用 2 mL PBS 重悬^[9]。6 h 内流式细胞仪检测。

1.4.2 流式细胞仪检测和分选 配制两管浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 的单个核细胞,一管加入抗 IgG3-FITC 和抗 IgG1-PerCP 流式细胞荧光标记抗体各 20 μL ,另一管加入抗 CD3-FITC 和抗 CD4-PerCP 流式细胞荧光标记抗体各 20 μL 。混匀后置 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,PBS 洗涤两次,用 400 μL 的 PBS 悬浮上机。将流式细胞仪调整至最佳工作状态,以 CD3⁺ 的细胞设门收集细胞,检测细胞免疫表型为 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞百分比并分选。

1.4.3 分选后细胞存活率与细胞纯度的鉴定 将 FACS 分选后的细胞悬液与 0.4% 的台盼蓝染液按 9:1 体积比混匀,3 min 内加入改良牛鲍计数板置于显微镜下观察细胞存活率。细胞存活率计算公式如下:细胞存活率=染色阴性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$;细胞纯度的鉴定使用流式细胞仪对分选后的 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞进行回测。

1.4.4 细胞形态的观察 用 Giemsa 染色法对 Percoll 连续密度梯度离心法收集的单个核细胞和 FACS 分选后的细胞进行染色并观察。

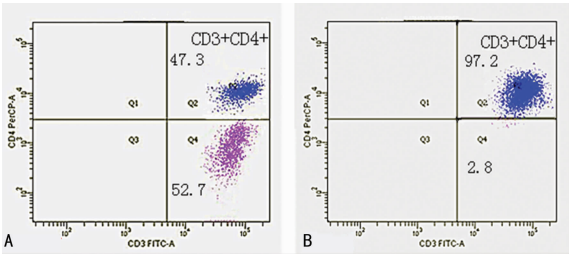
1.5 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较 t 检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度 Percoll 连续密度梯度离心法收集的单个核细胞中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度为 $(43.9 \pm 7.3)\%$,FACS 分选后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度为 $(96.9 \pm 1.2)\%$,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$);图 1 为其中一次分选前后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度对比的流式细胞仪检测结果。

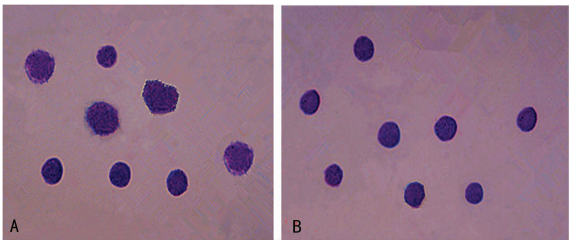
2.2 细胞形态的观察 通过 Giemsa 染色法观察到分选前收集的单个核细胞中可见单核细胞和淋巴细胞,但在经 FACS 分

选后就只剩下形态一致的淋巴细胞。见图 2。



A:分选前;B:分选后。

图 1 分选前、后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度对比



A:分选前;B:分选后。

图 2 分选前、后细胞形态的观察(Giemsa 染色法 $\times 1\ 000$)

2.3 分选后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞存活率检测 台盼蓝染色显示分选后细胞存活率为 $(97.8 \pm 1.6)\%$ 。

3 讨 论

目前用于 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞分选的主要方法有免疫磁珠分离法和 FACS。本实验通过被越来越广泛应用的 FACS 建立分选人肠道组织中 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞的方法。作者首先用消化酶分解人肠道组织获得细胞悬液,通过 Percoll 分层液提取出单个核细胞。Percoll 分层液是一种包裹了多聚吡咯烷酮的硅胶颗粒混悬液,对细胞无毒性 and 刺激性,相对便宜且容易获得的经典分离试剂,利用其物理性质可用于比重不同的细胞的分离^[10]。但由于 Percoll 分层液分离的细胞纯度不高,收集的单个核细胞中含有较多的单核细胞、极少量的中性粒细胞和肠道上皮细胞,而 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞细胞纯度仅为 $(43.9 \pm 7.3)\%$ 。

然后采用 FACS 对收集的单个核细胞进行分选。FACS 是利用流式细胞仪检测各类细胞的特性信息并存储在计算机中,当细胞的特性与要分选的细胞相同时,流式细胞仪对含有此类细胞的液滴充以特定的电荷,而不符合分选条件的细胞液滴不被充以电荷。当带有电荷的细胞液滴落入静电场时,因带有特定的电荷发生偏转落入指定的收集器内,从而分选出目的细胞^[10-12]。对分选前后的细胞经 Giemsa 染色后进行观察形态,作者发现分选前收集的单个核细胞中的单核细胞、中性粒细胞和肠道上皮细胞已被筛除,只留下形态一致的淋巴细胞。经过流式细胞仪测定分选后的细胞,被确定为 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞。通过与分选前 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度 $(43.9 \pm 7.3)\%$ 相比,分选后 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞纯度 $(96.9 \pm 1.2)\%$,明显提高。进一步对细胞存活率检测显示分选后的细胞为具有活力,性质一致且纯度极高的人肠道 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞。

因此,Percoll 连续密度梯度离心法联合 FACS 分离人肠道组织的 CD3⁺CD4⁺T 淋巴细胞方法切实可行,且可以在无菌的条件下分选。分选后的细胞有极高的纯(下转第 210 页)

实反对吸烟的比例相对较低^[14]。本次研究也看出对待大学生吸烟的态度对该校女大学生吸烟有很大的影响。

3.5 周围朋友吸烟情况 有研究表明,青少年周围环境的榜样示范(吸烟行为)和强化作用是影响其吸烟的主要因素,同伴和父母与青少年接触最多,影响也最大^[15]。周围人吸烟往往是大学生初吸的带动因素且是他们吸烟的主要引发者和主要参与者。本次调查也显示处于不同香烟环境的该校女大学生吸烟率和尝试吸烟率不同,经统计检验差异有统计学意义($P < 0.05$)。

从本次研究可以看出,该校女大学生香烟接触率较高,针对医学院校女大学生开展控烟干预工作是非常必要的。本次调查显示生源地、对待吸烟态度、周围朋友吸烟是该校女大学生吸烟的重要危险因素,而专业、年级的影响较小。

参考文献:

- [1] 张小鹏,张俊青,孙业桓.公共场所从业女性吸烟现状及影响因素分析[J].中国公共卫生,2012,28(1):100-102.
- [2] 杨功焕,马杰民,刘娜,等.中国人群 2002 年吸烟和被动吸烟的现状调查[J].中华流行病学杂志,2005,26(2):77-83.
- [3] 潘维平,张伟,赵贺春,等.儿童青少年吸烟现状与影响因素调查分析[J].中国妇幼保健,2004,19(24):84-85.
- [4] 陈青山,王声湧,池桂波,等.广东省高校大学生吸烟行为调查[J].中国公共卫生,2006,22(6):657-658.
- [5] 吴述银,梅翠竹,丰静,等.女医学生吸烟状况及认知调查分析[J].蚌埠医学院学报,2010,35(4):409-411.

- [6] 王泉海.豫北地区大学生吸烟行为现状[J].中国学校卫生,2007,28(5):408-409.
- [7] 王中华,马宁.我国大学生吸烟调查的文献分析[J].中国公共卫生管理,2012,28(1):90-92.
- [8] 印爱平,贺尚荣,王博恺.男性大学生吸烟行为影响因素访谈结果及分析[J].中国社会医学杂志,2008,25(6):345-347.
- [9] 何瑞芳,杨艳旭,张利彬,等.新乡 2 所高校大学生吸烟现状及相关知识调查[J].中国学校卫生,2007,28(7):596-597,600.
- [10] 黄丽雯,龚思红,张雪宝,等.珠海大学生吸烟状况与健康需求调查分析[J].现代预防医学,2008,35(9):1679-1680,1683.
- [11] 周国宏,袁杰,胡富忠,等.某医学院学生吸烟状况与相关因素研究[J].中国学校卫生,2002,23(1):15-17.
- [12] 吴荣先,Julia AL,章红.中国大学生吸烟行为和吸烟态度研究[J].医学理论与实践,2002,15(5):532-534.
- [13] Mayhew KP, Flay BR, Mott JA. Stages in the development of adolescent smoking[J]. Drug Alcohol Depend, 2000,59 Suppl 1:S61-81.
- [14] 加拿大滑铁卢大学.国际烟草控制政策评估项目(ITC)中国项目报告[M].北京:中国时代经济出版社,2012:2-4.
- [15] 陈磊,叶小华,许雅,等.广州市高中和大学女生吸烟现状[J].中国学校卫生,2013,34(6):651-654.

(收稿日期:2013-09-18 修回日期:2013-11-10)

(上接第 207 页)

度和活性,可用于研究其抗肠道肿瘤的机制、输注 $CD3^+CD4^+$ T 淋巴细胞治疗炎症性肠病的作用、HIV 感染与肠道免疫系统关系^[13]和其分泌细胞因子在肠道炎症反应的作用等生物学功能。

参考文献:

- [1] Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but Independent of T helper 1,2,or 17 cell lineages[J]. Immunity,2008,29(1):138-149.
- [2] Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset[J]. Nat Immunol,2008,9(12):1341-1346.
- [3] 周成会,刘纯伦.炎症性肠病的发病机制研究进展[J].重庆医学,2009,38(7):861-864.
- [4] Kennedy R, Celis E. Multiple roles for $CD4^+$ T cells in anti-tumor immune responses [J]. Immunol Rev, 2008, 222:129-144.
- [5] Gerloni M, Zanetti M. $CD4^+$ T cells in tumor immunity [J]. Springer Semin Immunopathol,2005,27(1):37-48.
- [6] Zhu J, Paul WE. $CD4^+$ T cells: fates, functions, and faults [J]. Blood,2008,112(5):1557-1569.

- [7] Swain SL, McKinsty KK, Strutt TM. Expanding roles for $CD4^+$ T cells in immunity to viruses[J]. Nat Rev Immunol,2012,12(2):136-148.
- [8] 钟国成,李小红,朱波. microRNA 和 T 细胞发育研究进展[J].重庆医学,2012,41(6):612-614.
- [9] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells[J]. Cell,2006, 126(6):1121-1133.
- [10] Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll[J]. J Biochem Biophys Methods,2000,44(1/2):1-30.
- [11] Ferrari BC, Oregaard G, Srensen SJ. Recovery of GFP-labeled bacteria for culturing and molecular analysis after cell sorting using a benchtop flow cytometer[J]. Microb Ecol,2004,48(2):239-245.
- [12] Bergquist PL, Hardiman EM, Ferrari BC, et al. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology[J]. Extremophiles, 2009, 13(3):389-401.
- [13] 康伟芳. HIV 感染与肠道免疫系统关系的研究进展[J].实用医学杂志,2013,29(6):1007-1009.

(收稿日期:2013-09-06 修回日期:2013-10-10)