

网络出版时间: 2020-8-21 16:52 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200820.1450.026.html>

◇技术与方法◇

Cytomics FC500 与 ImageStream^X Mark II 检测大鼠脾脏 T、B 细胞亚群 TDO₂ 表达的比较

张冰洁, 李丝雨, 赵英杰, 常 艳, 魏 伟

摘要 用常规方法制备大鼠脾脏细胞悬液, 分别用 Cytomics FC500 流式细胞仪(FC500)和 ImageStream^X Mark II 成像流式细胞仪(Mark II)检测大鼠脾脏辅助性 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)、细胞毒性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)、B 细胞(CD45R⁺)色氨酸 2,3 双加氧酶(TDO₂)的表达水平, 并观察 2 种检测技术检测结果的相关性和一致性。结果显示, 2 种流式细胞仪测得的 CD3⁺CD4⁺ T 细胞、CD3⁺CD8⁺ T 细胞和 CD45R⁺ B 细胞表达 TDO₂ 的相关性较好(R^2 均 > 0.8)。Bland-Altman 法分析 2 种检测技术测得 CD3⁺CD4⁺ 细胞、CD3⁺CD8⁺ 细胞和 CD45R⁺ 细胞表达 TDO₂ 的偏倚较小, 分别为 -1.3%、-8.2%、7.4%。TDO₂ 在大鼠脾脏 T、B 细胞中均有表达。FC500 和 Mark II 检测结果的相关性和一致性较好。FC500 操作方便, 速度快。Mark II 将传统流式细胞术的高通量分析与细胞形态学分析相结合, 精确度高, 可获得细胞具体图片。

关键词 流式细胞术; T、B 细胞; TDO₂; 相关性; 一致性

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)09-1455-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.027

Cytomics FC500 型流式细胞仪作为经典的流式细胞检测技术, 可以从细胞分子水平上通过抗原-抗体特异性结合原理对单个细胞或其他生物粒子进行精准、快速的高通量定量分析^[1]。它可以在短时间内分析上万个细胞, 并能同时从一个细胞中测得多个指标, 具有速度快、精度高、准确性好的优点。

但它缺乏细胞形态学、细胞结构等直观观察细胞信号分布的相关信息, 获得细胞信息有限^[2-3]。ImageStream^X Mark II 成像流式细胞仪除了具有传统流式特点, 还可以获得单个细胞的图像, 可以对细胞形态、荧光探针的强度和定位进行检测, 包括细胞间相互作用、吞噬、凋亡、自噬、核易位和形态变化等^[4]。该文为比较 2 种流式检测技术, 以色氨酸 2,3 双加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO₂)在大鼠脾脏 T、B 细胞中的表达水平作为检测指标, 从结果的相关性和一致性评价 2 种检测技术的差异。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 3 只, 体质量(200 ± 20) g, 合格证号: [SCXK(京)2016-0006], 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。FITC-CD3(批号: 11-0030-81)、PE-CD4(批号: 12-0040-80)、PE-CD8a(批号: 25-0084-80)、PE-CD45R(批号: 12-0460-82)、Transcription Factor Staining Buffer Set 购于美国 eBioscience 公司; 抗 TDO₂ 一抗(1:100)(批号: 15880-I-AP)、CL594-Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:100)(批号: SA00013-4) 荧光二抗购于美国 Proteintech 公司; Lysing Buffer(10 × concentrate) 购于美国 BD 公司。

1.2 仪器 FC 500 流式细胞仪购自美国贝克曼公司; ImageStream^X Mark II 成像流式细胞仪购自美国 Amnis 公司; SIGMA 3-30 K 低温高速离心机购自上海纳腾仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠脾脏 T 淋巴细胞的分离 麻醉后处死大鼠, 无菌剥离脾脏, 研磨大鼠脾脏制备细胞悬液, 在细胞悬液中加入 5 ml 配制好的红细胞裂解液祛除红细胞, 用 PBS 调整细胞浓度至 3×10^6 个细胞/ml。

1.3.2 2 种流式细胞仪检测 T、B 细胞亚群 TDO₂ 表达 样本制备: 在 100 μ l 细胞悬液(3×10^6 个细胞/ml)中, 分别按所需表面标记加入 FITC 标记的

2020-05-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81573443、81673444); 安徽省自然科学基金杰出青年基金(编号: 170808J10); 2016 年高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016043)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 张冰洁, 女, 硕士研究生;

常 艳, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏 伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwwei@ahmu.edu.cn

CD3 抗体、PE 标记的 CD4 抗体、PE 标记的 CD8 抗体和 PE 标记的 CD45R 抗体,同时设置空白对照管和阴性对照管。4℃ 避光孵育 30 min。使用含 2% 胎牛血清的 PBS 洗涤 1 遍后加入 100 μ l 固定液,混匀 4℃ 避光固定 30 min。PBS 洗涤后加入 100 μ l 破膜液重悬,室温破膜 10 min。每管加入 2 μ l 血清封闭 20 min。加入 TDO₂ 一抗,孵育 1 h。加入二抗前按照上述步骤加入 PBS 洗涤离心弃上清液。二抗按照(1:100) μ l 配制,直接每管加入 100 μ l 混匀,避光孵育 30 min。上机前用 PBS 洗涤后,再加入 PBS 重悬后上机检测。每个检测指标设 3 个复管,重复 3 次。

1.4 统计学处理 相关性分析采用线性回归和多配对标本的非参数检验(Friedman 检验),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。一致性评价采用 Bland-Altman 法,绘制 Bland-Altman 图的横坐标(Average)为 $(FC500 + \text{Mark II}) / 2$,纵坐标为 $(FC500 - \text{Mark II}) / [(FC500 + \text{Mark II}) / 2]$ 。

2 结果

2.1 Cytomics FC500 与 ImageStream^X Mark II 检测的相关性和一致性 2 种检测技术测得大鼠脾脏 CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞和 CD45R⁺B 细胞表达 TDO₂ 结果的判定系数 R^2 均 > 0.8 ,斜率在 0.32 ~ 1.047,截距在 6.409 ~ 33.381 之间, $P < 0.05$,相关性良好。Bland-Altman 分析显示,2 种检测技术测得 CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞

和 CD45R⁺B 细胞表达 TDO₂ 的偏倚值分别为 -1.3%、-8.2%、7.4%,一致性界限范围较窄(见表 1、图 1)。

2.2 Cytomics FC500 与 ImageStream^X Mark II 检测大鼠脾脏 T、B 细胞亚群表达 TDO₂ 的表达情况

2.2.1 CD3⁺CD4⁺T 细胞表达 TDO₂ 的情况 如图 2A(FC500)和 2B(Mark II)结果显示,TDO₂ 在 CD3⁺CD4⁺T 细胞内有表达。

2.2.2 CD3⁺CD8⁺T 细胞表达 TDO₂ 的情况 如图 3A(FC500)和 3B(Mark II)结果显示,TDO₂ 在 CD3⁺CD8⁺T 细胞内有表达。

2.2.3 CD45R⁺B 细胞表达 TDO₂ 的情况 如图 4A(FC500)和 4B(Mark II)结果显示,TDO₂ 在 CD45R⁺B 细胞内有表达。

2.2.4 ImageStream^X Mark II 成像流式细胞仪检测的荧光图片 如图 2C、3C、4C,01、09 表示明场,02 表示 CD3⁻ FITC 通道,03 表示 CD4-PE、CD8-PE、CD45R-PE 通道,11 表示 APC-TDO₂ 通道,结果显示 TDO₂ 主要表达 CD3⁺CD4⁺T 细胞、CD3⁺CD8⁺T 细胞和 CD45R⁺B 细胞的细胞质。

3 讨论

色氨酸(tryptophan, Trp)耗竭导致犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)及其下游产物增多,抑制 T 细胞的增殖甚至凋亡,进而参与自身免疫病、癌症等疾病的发生发展过程^[5-8]。肿瘤细胞通过利用 TDO₂ 介导 T 细胞免疫调节作用抑制抗肿瘤免疫反应,促进

表 1 FC500 和 Mark II 流式细胞术检测技术的相关性分析($n=3$)

检测指标	样本量	中位数(P_{25}, P_{75})		P	线性回归		
		FC500(%)	Mark II(%)		R^2	斜率	截距
CD3 ⁺ CD4 ⁺ TDO ₂ ⁺	9	45.4(41.2, 51.6)	48.38(45.93, 50.2)	< 0.05	0.868	0.320	33.381
CD3 ⁺ CD8 ⁺ TDO ₂ ⁺	9	38.7(36, 41.6)	48.25(43.79, 49.63)	< 0.05	0.943	1.047	6.409
CD45R ⁺ TDO ₂ ⁺	9	48.3(45.9, 49.1)	40.27(38.77, 41.77)	< 0.05	0.939	0.679	7.989

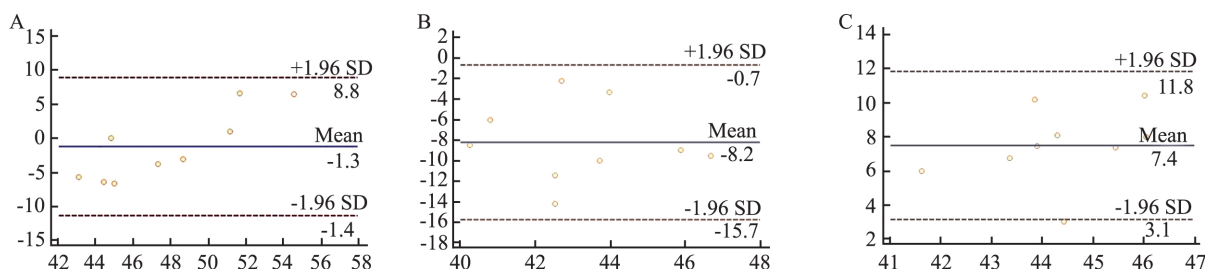
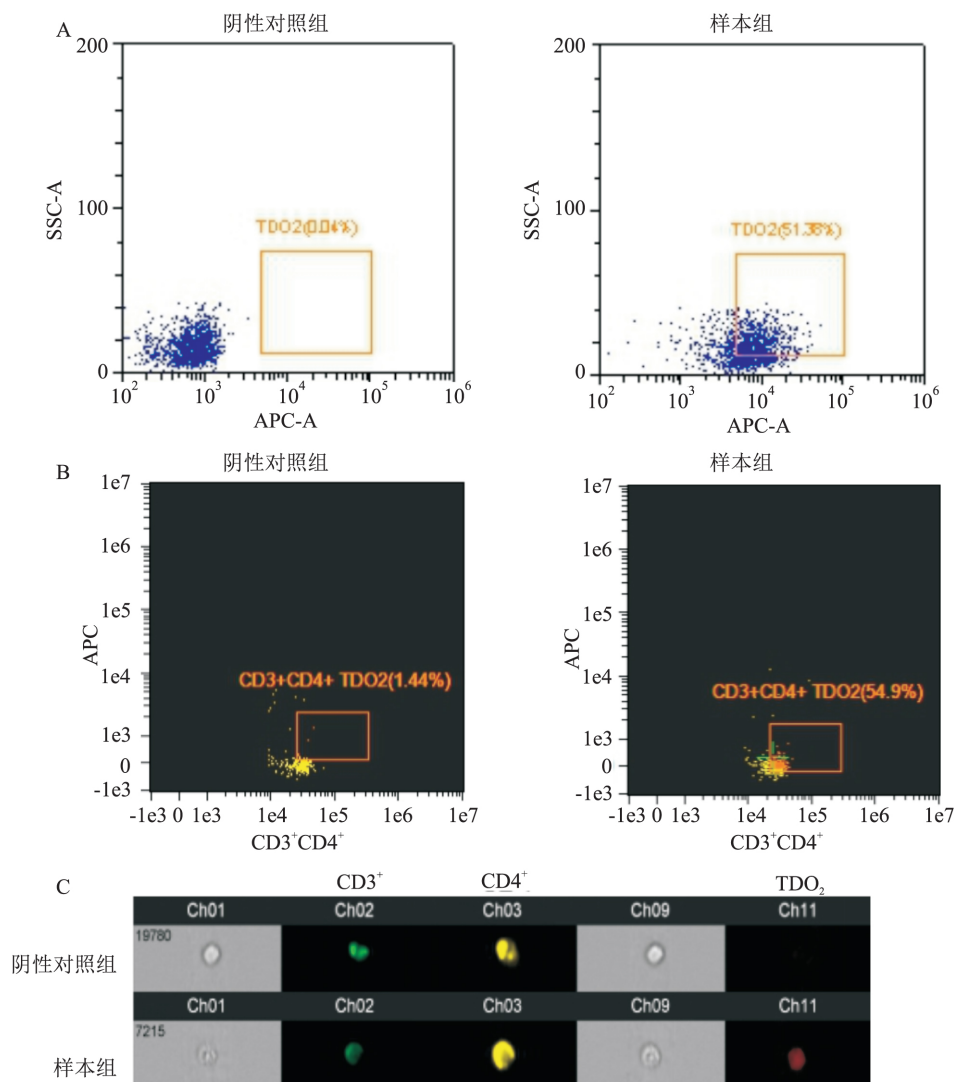


图 1 FC500 和 ImageStream^X Mark II 流式细胞术检测脾脏 T 细胞亚群、B 细胞偏倚值图

A: CD3⁺CD4⁺T 细胞 TDO₂ 偏倚值; B: CD3⁺CD8⁺T 细胞 TDO₂ 的偏倚值; C: CD45R⁺B 细胞 TDO₂ 的偏倚值

图2 TDO₂ 在大鼠脾脏辅助型 T 细胞中的表达

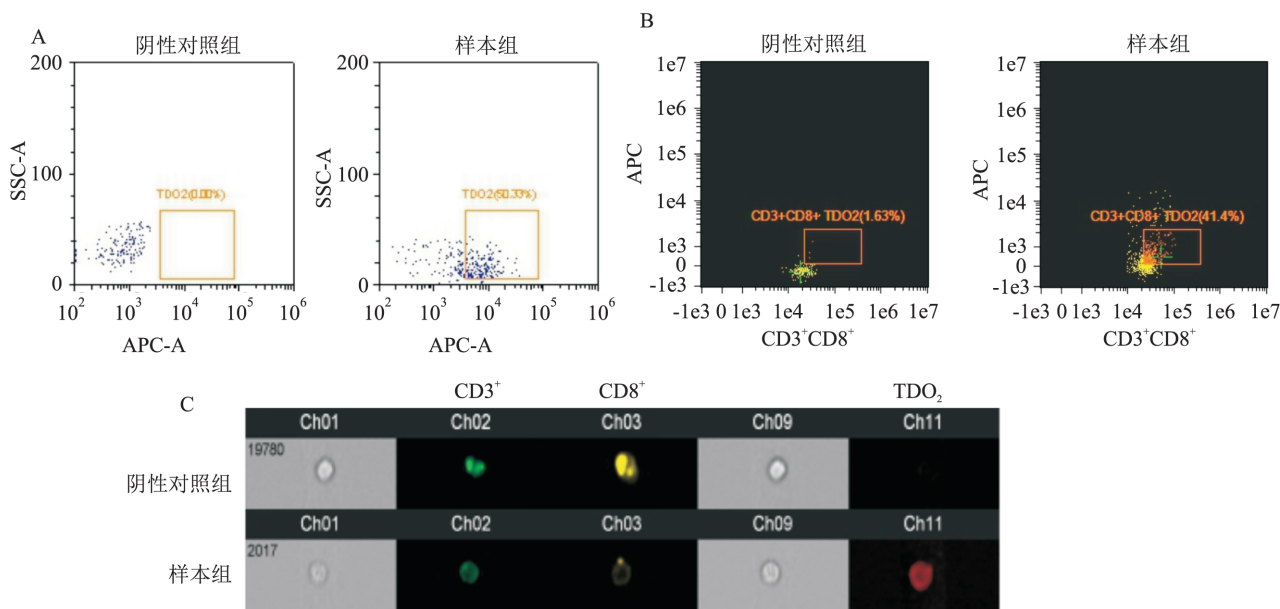
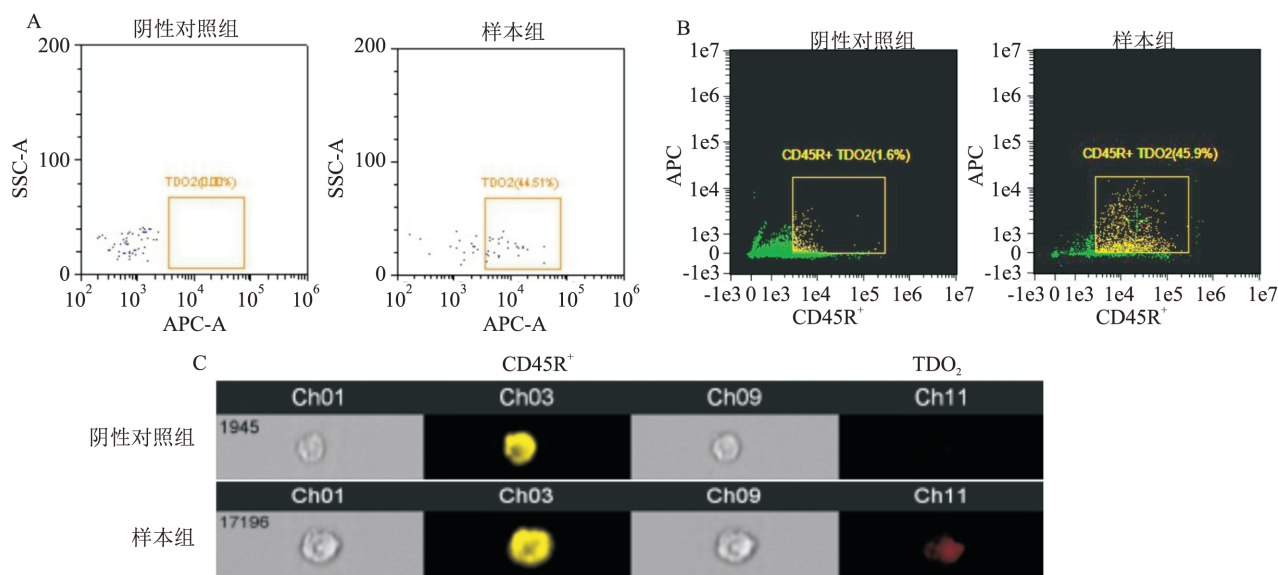
A: Cytoomics FC500 检测结果; B: ImageStream^X Mark II 检测结果; C: ImageStream^X Mark II 得到的细胞图片。

肿瘤生长^[9-10]。脾脏是机体成熟淋巴细胞分布的主要部位,脾脏中 T、B 淋巴细胞介导的细胞、体液免疫对维持机体免疫调节的稳定发挥着重要作用^[11]。本实验利用 2 种不同流式细胞技术检测大鼠脾脏辅助性 T 细胞(CD3⁺CD4⁺)、细胞毒性 T 细胞(CD3⁺CD8⁺)、B 细胞(CD45R⁺)中 TDO₂ 表达情况,同时获取细胞图像,为进一步研究 TDO₂ 参与机体免疫调控以及更好地选择实验方法提供依据。

本实验为比较 2 种流式细胞术检测方法的差异,由同一人在同样操作下上机检测,实验过程中,注意细胞数量分配均匀、适合的样本抗体配比、正确的圈门设计和适当的电压补偿调节等操作因素,两台仪器测得结果的差异可以控制在较小范围内。

Cytoomics FC500 型流式细胞仪因其具有:① 速

度快,平均每管上机时间为 1 min;② 操作简便;③ 适用多种标本的检测等优点,应用广泛。然而,这种流式细胞术检测到的结果无法获得具体的细胞图像,因此局限于不要求细胞结构的分析,并且细胞圈门以及荧光强度的调节需要专业人员调试后方可使用,其结果受到人员影响较大。成像流式细胞分析仪因其操作简便,获取信息多,是近年来快速发展的新型流式细胞技术,它将传统流式细胞术的高通量分析与细胞形态学分析相结合,不仅可提供基于普通流式的阳性百分比分析统计数据,还可获得细胞形态、表达部位等多个直观图片^[12]。虽然上样速度相对较 FC500 慢,平均每管耗时 3 min,并且选用的洗液为不含钙、镁离子的 PBS,成本较 FC500 高,但成像流式细胞分析仪还具有以下几个优点:① 样本

图3 TDO₂在大鼠脾脏细胞毒性T细胞中的表达A: Cytomics FC500 检测结果; B: ImageStream^X Mark II 检测结果; C: ImageStream^X Mark II 得到的细胞图片图4 TDO₂在大鼠脾脏B细胞中的表达A: Cytomics FC500 的检测结果; B: ImageStream^X Mark II 的检测结果; C: ImageStream^X Mark II 得到的细胞图片

利用率高,上样体积在20~200 μ l左右,适用于珍贵样本的流式检测。② 细胞回收率高,上机过后的细胞仍可以用于提蛋白或者提RNA,继而开展其他实验。③ 可用1.5 ml离心管直接上机,不需耗费专用流式管。④ 应用方便,仪器可自动调节荧光强度。综上,ImageStream^X Mark II 成像流式细胞仪可在同等操作下获得更多实验结果,但实验仪器的选择还要根据具体的实验条件、实验目的、检测指标等要

求,综合权衡和选择。

参考文献

- [1] Stelmazczyk-Emmel A, Kopatys A, Górska E, et al. The usefulness of flow cytometric analysis of cytokines in peripheral blood and bone marrow plasma [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2013, 67: 879-86.
- [2] Moore M J, Sebastian J A. Determination of cell nucleus-to-cytoplasmic ratio using imaging flow cytometry and a combined ultra-

- sound and photoacoustic technique: a comparison study [J]. *J Biomed Opt*, 2019,24(10):1–10.
- [5] Wood B L. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016,90(1):47–53.
- [6] Dan M, Vorobjev I, Rees P, et al. Diagnostic Potential of Imaging Flow Cytometry [J]. *Trends Biotechnol*, 2018,36(7):649–52.
- [7] Coccaro E F, Lee R, Fanning J R, et al. Tryptophan, kynurenine, and kynurenine metabolites: Relationship to lifetime aggression and inflammatory markers in human subjects [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2016,71:189–96.
- [8] Feng X, Shen P, Wang Y, et al. Synthesis and *in vivo* antitumor evaluation of an orally active potent phosphoramidate derivative targeting IDO1/IDO2/TDO [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019,168:214–23.
- [9] Ye Z, Yue L, Shi J, et al. Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications [J]. *J Cancer*, 2019,10(12):2771–82.
- [10] Pham Q T, Oue N, Sekino Y, et al. TDO₂ overexpression is associated with cancer stem cells and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncology*, 2018,95(5):297–308.
- [11] Li H, Sang L, Xia X, et al. Therapeutic duration and extent affect the effect of moxibustion on depression-like behaviour in rats via regulating the brain tryptophan transport and metabolism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019,2019:7592124.
- [12] 常 艳, 魏 伟. Trp-IDO1, 2/TDO₂-Kyn 代谢通路介导类风湿关节炎的研究进展 [J]. *药理学报*, 2019,54(9):1547–53.
- [13] Bronte V, Pittet M J. The spleen in local and systemic regulation of immunity [J]. *Immunity*, 2013,39(5):806–18.
- [14] Haridas V, Ranjbar S, Vorobjev I A, et al. Imaging flow cytometry analysis of intracellular pathogens [J]. *Methods*, 2017,112:91–104.

Comparison of TDO₂ expression in T and B cell subsets of spleen detected by Cytomics FC500 and ImageStream^X Mark II in rats

Zhang Bingjie, Li Siyu, Zhao Yingjie, et al

(*Institute of clinical pharmacology, Anhui Medical University, Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract Rat spleen cell suspension was prepared by common method. The expression levels of helper T cells (CD3⁺CD4⁺), cytotoxic T cells (CD3⁺CD8⁺), and B cells (CD45R⁺) subsets tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO₂) in rat spleen were detected by Cytomics FC500 (FC500) and ImageStream^X Mark II (Mark II) flow cytometry. The correlation and consistency of the results were observed respectively. The expression of TDO₂ in CD3⁺CD4⁺ T cells, CD3⁺CD8⁺ T cells and CD45R⁺ B cells were measured by two kinds of flow cytometry, and the correlation were well ($R^2 > 0.8$). Bland-Altman method was used to analyze TDO₂ expression in CD3⁺CD4⁺ T cells, CD3⁺CD8⁺ T cells and CD45R⁺ B cells. The bias were -1.3%, -8.2% and 7.4%, respectively. TDO₂ were expressed in T and B cells of rat spleen. These two flow cytometries had good correlation and consistency in testing results. FC500 is easy and fast to operate. Mark-II combines the high-throughput analysis of traditional flow cytometry with cell morphology analysis, which is highly accurate and can obtain specific cell pictures.

Key words flow cytometry; T, B lymphocyte; TDO₂; correlation; consistency