doi:10.11659/jjssx.05E025022

·消化系统疾病·

小鼠小肠上皮间淋巴细胞分离与分析研究

李鹏飞[1,2],苟馨月[1],糜漫天[1],易 龙[1] (1.陆军军医大学军事预防医学系/军队营养与食品安全研究中心/重庆市营养与健康重点实验室/重庆市医学营养研究中心,重庆 400038;2.中国人民解放军第32106部队,内蒙古 东乌珠穆沁旗 026300)

[摘 要] **目的** 建立小鼠小肠上皮间淋巴细胞(IELs)分离及分析方法。**方法** 小鼠麻醉后分离小肠组织,利用不同浓度的Percoll分离液获得IELs悬液;通过不同荧光抗体标记(CD45、CD3、TCRαβ、TCRγδ、CD8αβ、CD8αα)及流式细胞术检测各细胞亚群,分析小肠IELs数量及其不同亚群比例。**结果** 通过上述方法,成功分离了小鼠IELs。流式细胞术检测结果显示,$CD45^+CD3^+$IELs占总淋巴细胞的(16.4±1.4)%;在小肠IELs中,$TCR\alpha\beta^+$IELs占(32.3±1.7)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs占(10.8±2.3)%、$TCR\gamma\delta^+$IELs占(64.0±2.3)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs占(13.4±1.9)%。**结论** 本研究成功建立了小鼠IELs的分离和分析方法,为后续相关研究奠定了技术基础。

[关键词] 肠上皮间淋巴细胞;小肠;流式细胞术
[中图分类号] R472.9+1;R-33 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-05-08

Isolation and analysis of small intestinal intraepithelial lymphocytes of mice

LI Peng-fei[1,2], GOU Xin-yue[1], MI Man-tian[1], YI Long[1] (1. Department of Military Preventive Medicine, Army Medical University/Research Center for Military Nutrition and Food Safety/Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health/Chongqing Medical Nutrition Research Center, Chongqing 400038, China; 2. the 32106th Force of the Chinese People's Liberation Army, East Ujimqin Banner Inner Mongolia 026300, China)

Abstract: Objective To establish the isolation and analysis methods of intestinal intraepithelial lymphocytes (IELs) in mice. **Methods** After the mice were anesthetized, the small intestinal tissues were isolated, and IELs suspensions were prepared using Percoll separation solutions of different concentrations. The cell subsets were detected by labeling with different fluorescent antibodies (CD45, CD3, TCRαβ, TCRγδ, CD8αβ, CD8αα) combined with flow cytometry, so as to determine the number of small intestinal IELs and the proportions of their different subsets. **Results** By the aforementioned method, IELs of mice were successfully isolated. Flow cytometry analysis revealed that $CD45^+CD3^+$IELs accounted for (16.4±1.4)% of the total lymphocytes. Among small intestinal IELs, the proportions of cell subsets were as follows: $TCR\alpha\beta^+$IELs (32.3±1.7)%, $TCR\gamma\delta^+$IELs (64.0±2.3)%, $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ IELs (10.8±2.3)%, and $TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs (13.4±1.9)%. **Conclusion** This study successfully establishes the isolation and analysis methods of mouse IELs, thereby laying a technical foundation for subsequent relevant research.

Keywords: intestinal intraepithelial lymphocytes; small intestine; flow cytometry

肠道是人体重要的消化器官,不仅承担着营养物质的消化与吸收功能,更是机体与外界环境进行信息和物质交互的核心。肠道内定植着超过100万亿的微生物,包括细菌、真菌、病毒等,构成了复杂多样的肠道微生态系统[1]。在漫长的进化过程中,肠道形成了独特的区域免疫特性,肠黏膜层、固有层中具有多种免疫细胞,能够分泌不同的细胞因子,可维持对共生菌的免疫耐受和对病原体的快速清除之间的平衡,同时调节肠黏膜屏障功能。肠上皮间淋巴细胞(intestinal intraepithelial lymphocytes,IELs)是位于肠黏膜的一类独特T细胞群,是肠黏膜区域免疫系统的重要组成[2]。IELs与肠上皮细胞间紧密接触,且存在密切的相互作用,在人体肠道中每100个肠上皮细胞中有10~20个IELs定植,二者相互调节,共同维持肠黏膜稳态[3]。研究发现,IELs与2型糖尿病等慢性代谢性疾病的发生密切相关[4]。本研究团队前期的研究发现,天然植物化合物氢杨梅素可抑制IELs表达CD26/DPP-IV,减少肠道L细胞分泌的胰高血糖素样肽-1降解,进而缓解胰岛素抵抗[5]。肠道IELs扮演着第一响应者的关键角色,可根据TCRαβ、CD8αβ、CD8αα等细胞表面受体分为不同细胞亚群,而不同亚群在2型糖尿病等多种疾病的发生中具有不同作用[6-7]。

鉴于IELs在多种疾病中的重要性日益凸显,其分离与分析方法对于IELs的研究十分重要。传统的肠上皮剥离方法可用于肠上皮细胞的分离[8],但在常规

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82173505)
[通信作者] 易 龙,E-mail:amu_yilong@tmmu.edu.cn

消化过程中易破坏肠道免疫细胞表面的特定抗原表位;同时IELs与肠上皮细胞碎片、固有层淋巴细胞的物理性质相近,常规密度梯度离心难以实现高纯度分离。基于此,本课题组在既往研究方法的基础上对IELs的分离方法进行了优化,建立了一套新的IELs分离方法,并采用多色流式及多种不同抗体组合实现了IELs不同亚群细胞的准确分析,为进一步研究IELs与多种疾病的关系奠定了重要基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

流式细胞仪(美国BD FCSverse),高速低温离心机(美国Beckman Coulter),台式低速水平离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),THZ-C恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂),电子天平(瑞士METTLER TOLEDO)。

1.2 主要试剂

胎牛血清、RPMI-1640培养基购自美国Hyclone公司;PBS购自北京中杉金桥生物公司;Percoll密度梯度离心液购自美国GE Healthcare公司;D-Hanks购自上海碧云天生物技术有限公司;乙二胺四乙酸、硫苏糖醇、羟乙基哌嗪乙硫磺酸均购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 实验动物

7周龄SPF级C57BL/6雄性小鼠10只,体质量18~20 g,购自重庆莱彼特生物科技有限公司,饲养于陆军军医大学实验动物中心(SPF级),12 h/12 h明暗周期交替,自由饮水进食,普通饲料常规喂养,实验前12 h禁食。本研究所有操作经陆军军医大学学术研究伦理审查委员会批准(批准号:AMUWEC20211008),且符合其实验小鼠饲养与使用指导原则。

1.4 溶液配制

小肠消化液:配制含有5%胎牛血清、1 mmol/L硫苏糖醇、5 mmol/L乙二胺四乙酸、10 mmol/L羟乙基哌嗪乙硫磺酸的D-Hanks溶液。按照每只小鼠20 mL计,置于37 ℃培养箱中备用。

密度梯度离心液:先配制10×PBS,并与Percoll原液按照1∶9的比例制成100% Percoll离心液。使用100% Percoll离心液与RPMI-1640培养基按照2∶3的比例配制成40% Percoll离心液;配制1×PBS,使用100% Percoll离心液与1×PBS按照7∶3的比例配制成70% Percoll离心液。每只小鼠需配制40% Percoll离心液9 mL、70% Percoll离心液5 mL。

1.5 小肠组织的分离和前处理

小鼠麻醉后,脱颈处死,并在手术板上固定。75%酒精腹部消毒,眼科剪纵向剪开小鼠腹膜,暴露小鼠腹腔。使用镊子小心提起小鼠肠道组织,用眼科剪切断胃与十二指肠结合部,用镊子小心分离肠道组织上附着的肠系膜,游离肠道脂肪组织,在回盲部完全分离肠道组织,使用眼科剪切断结肠与小肠连接处。将游离出的小肠组织置于4 ℃预冷的1×PBS中清洗,去除肠系膜、脂肪组织和小肠Peyer's淋巴结,并纵向切开小肠,PBS清洗2次,充分去除肠内容物(图1)。

1.6 小鼠IELs分离方法

参照既往同类细胞分离方法[8],本研究对分离过程中相关实验参数进行改良,建立新的IELs分离方法,并绘制分离的技术路线图(图1)。

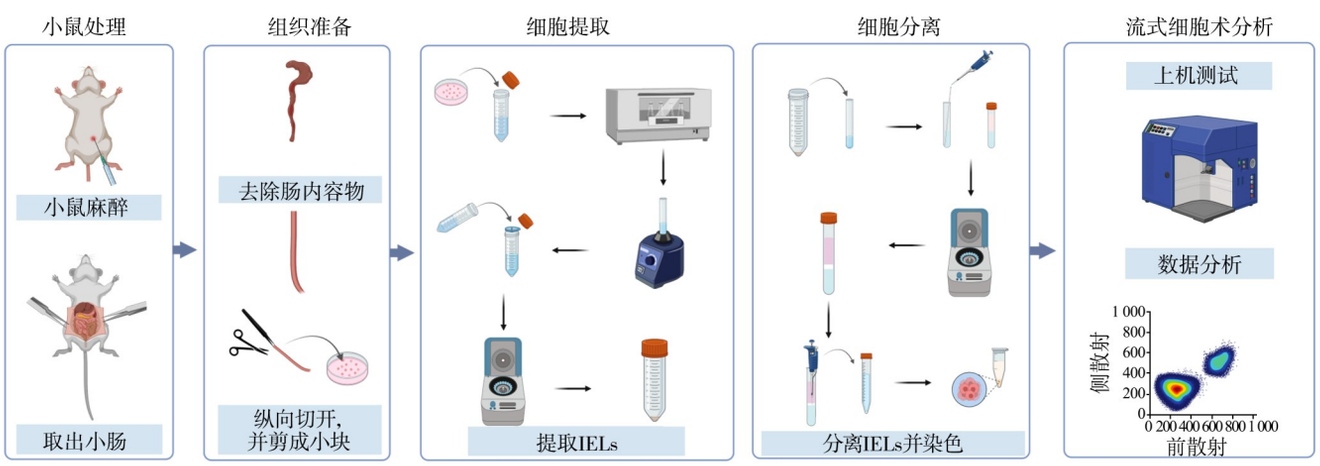


图1 小鼠小肠和IELs分离技术路线图

肠道淋巴细胞分离:使用眼科剪将小肠组织剪成4 mm×4 mm的小块,并转入50 mL无菌EP管,每管加入20 mL小肠消化液,37 ℃下以210 r/min震荡20 min,涡旋机涡旋20 s后使用70 μm滤网过滤收集至新的50 mL无菌EP管中,再次重复以上步骤,最终收集到40 mL含有IELs的滤液。将滤液转移至离心机,4 ℃下

以2 000 r/min离心5 min,弃去上清液保留细胞沉淀。

密度梯度离心:每个样品用9 mL 40% Percoll离心液重悬,并转移至15 mL无菌圆底EP管中,使用毛细玻璃管将5 mL 70% Percoll离心液小心加入到EP管底部。移至离心机中并在20 ℃下以2 320 r/min速度水平密度梯度离心20 min,离心机加减速度设为0。离心结束后,小心吸取40% Percoll与70% Percoll水平离心液之间的白膜层4 mL,并移至新的15 mL无菌尖底EP管中,用含有5%胎牛血清的1×PBS清洗,再使用离心机以2 000 r/min的速度离心5 min,收集细胞沉淀。

1.7 流式细胞术检测

流式细胞术检测IELs的主要亚群。使用1 mL的1×PBS重悬细胞沉淀,将细胞悬液转移至1.5 mL无菌EP管中,混匀后清洗1次,4 ℃下以2 360 r/min的速度离心5 min。弃去上清液,留下100 μL液体涡旋细胞。加入流式细胞术检测表面抗体CD45 ACP-cy7、CD3 percp-cy5.5、CD4 PB、CD8αα FITC、CD8αβ APC、TCRαβ PE-cy7、TCRγδ PE各1 μL,4 ℃下避光孵育30 min。加入1 mL 1×PBS清洗1次,以2 360 r/min的速度离心5 min,弃去上清液。再用300 μL 1×PBS重悬细胞,随后上机检测,并在FlowJo(version10.0)软件中分析$CD45^+CD3^+$IELs占总淋巴细胞的百分比,以及$TCR\alpha\beta^+$IELs、$TCR\gamma\delta^+$IELs、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs在IELs中的占比。

2 结果

通过上述方法,本研究成功分离了小鼠IELs。流式细胞术检测结果显示,$CD45^+CD3^+$IELs占总淋巴细胞的(16.4±1.4)%;在IELs中,$TCR\alpha\beta^+$IELs占(32.3±1.7)%、$TCR\gamma\delta^+$IELs占(64.0±2.3)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs占(13.4±1.9)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs占(10.8±2.3)%,见图2。

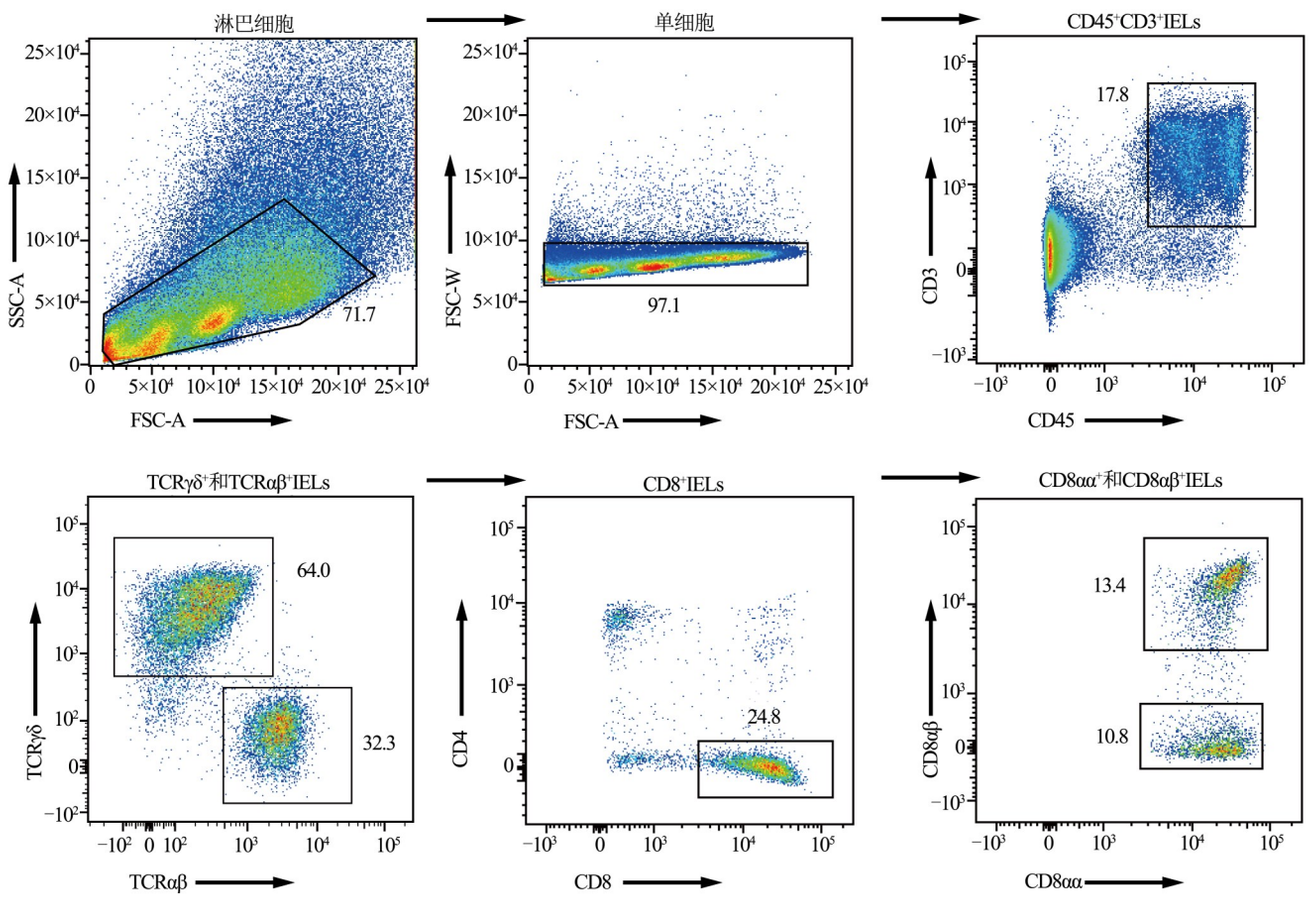


图2 IELs流式细胞术检测结果

3 讨论

肠道内有大量微生物,其中以厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门为主[9-10]。肠道菌群通过代谢膳食纤维生成短链脂肪酸、次级胆汁酸等功能性分子,直接参与宿主的能量代谢、免疫调节及炎症反应[11-13]。然而,庞大的微生物群落中亦潜藏着条件致病菌和外来病原体。肠道黏膜层中有大量区域免疫细胞,起到识别、清除致病微生物及调节肠道黏膜通透性的作用[8],

是人体重要的区域免疫器官[14]。从解剖结构来看,肠黏膜屏障由内向外依次为黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层。其中黏膜层是免疫防御的核心战场,由单层上皮细胞紧密排列构成物理屏障,其间还散布着各类功能特化的细胞:杯状细胞分泌黏蛋白,潘氏细胞释放抗菌肽,微褶皱细胞(M细胞)则负责抗原递呈。黏膜层下方富含派尔集合淋巴结、孤立淋巴滤泡等肠道相关淋巴组织,共同构成黏膜免疫应答的"传感器"和"效应器"[14-15]。近年来,许多研究聚焦肠道区域免疫特性与疾病发生,揭示了多种肠道区域免疫细胞在肠道功能维护和疾病进展中的重要作用。研究发现,肠道区域免疫特性与非酒精性脂肪肝[16]、2型糖尿病[17-18]、肥胖[1]等多种疾病的发生发展密切相关,组织器官内定植的一些特殊的免疫细胞或免疫分子在代谢调节、炎症反应、氧化应激过程中发挥关键作用。

IELs是肠黏膜免疫屏障的重要组成,根据免疫表型和起源可将IELs分为诱导型和天然型,诱导型包括$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs,天然型包括$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs和$TCR\gamma\delta^+$IELs,不同细胞亚型功能各异,在多种代谢性疾病发生中具有重要作用[4,6]。本研究不同亚群细胞分析结果显示,$CD45^+CD3^+$IELs占总淋巴细胞的(16.4±1.4)%;在IELs中,$TCR\alpha\beta^+$IELs占(32.3±1.7)%、$TCR\gamma\delta^+$IELs占(64.0±2.3)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\beta^+$IELs占(13.4±1.9)%、$TCR\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$IELs占(10.8±2.3)%,与国外研究[19-21]结果基本一致。有研究报道,整合素$\beta7^+$IELs参与胰岛素抵抗的发生,使$\beta7^{-/-}$小鼠的肠L细胞显著增加,胰高血糖素样肽-1水平升高,糖耐量明显改善,说明$\beta7^{-/-}$小鼠对肥胖、糖尿病等具有显著抗性[4]。由于肠道区域免疫细胞种类繁多,建立IELs的分离和分析方法对于研究IELs在多种疾病发生中的作用具有重要意义。

本研究通过优化Percoll梯度离心参数(40%与70%分层)结合机械震荡消化,建立了一种新的IELs分离和分析方法,应用消化液、分离液及细胞表面抗体对IELs进行分离染色,再利用流式细胞术检测IELs不同细胞亚型。相较于传统方法,本方案具有以下优势:①采用两步乙二胺四乙酸-硫苏糖醇震荡消化,显著提高了上皮层细胞解离效率;②通过优化离心速度与梯度液密度配比,可有效去除IELs悬液的上皮碎片及死细胞;③多色流式抗体组合(CD45/CD3/CD4/CD8αα/CD8αβ/TCRαβ/TCRγδ)的系统性标记策略,可实现天然型与诱导型IELs亚群的精准分型。本研究的分离方法应注意以下问题:①消化步骤中乙二胺四乙酸浓度(5 mmol/L)及震荡时间(20 min)需严格把控,过度消化可能导致固有层淋巴细胞混杂;②Percoll梯度离心对操作者技术要求较高,离心参数偏差易造成细胞层界面模糊。

综上,本研究建立了小肠IELs分离和分析的新方法,且具有良好的可重复性,方法安全可靠,为IELs的研究奠定了良好的基础。随着代谢组学、蛋白质芯片等新技术的发展,未来可基于本研究建立的IELs分离和分析技术,结合单细胞转录组测序及空间转录组技术,解析IELs亚群在肠绒毛-隐窝轴线的功能异质性;还可构建肠道类器官-IELs共培养系统,动态观察IELs与肠上皮细胞间的免疫代谢对话机制。

[参考文献]

[1] Puljiz Z, Kumric M, Vrdoljak J, et al. Obesity, gut microbiota, and metabolome: from pathophysiology to nutritional interventions [J]. Nutrients, 2023, 15(10): 2236. doi: 10.3390/nu15102236.

[2] Mayassi T, Jabri B. Human intraepithelial lymphocytes [J]. Mucosal Immunol, 2018, 11(5): 1281-1289. doi: 10.1038/s41385-018-0016-5.

[3] Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(7): 445-456. doi: 10.1038/nri3007.

[4] He S, Kahles F, Rattik S, et al. Gut intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease [J]. Nature, 2019, 566(7742): 115-119. doi: 10.1038/s41586-018-0849-9.

[5] Li P, Zhang Y, Lang H, et al. Dihydromyricetin promotes glucagon-like peptide-1 secretion and improves insulin resistance by modulation of the gut microbiota-CDCA pathway [J]. Mol Nutr Food Res, 2025, 69(8): e202400491. doi: 10.1002/mnfr.202400491.

[6] Lockhart A, Mucida D, Bilate AM. Intraepithelial lymphocytes of the intestine [J]. Annu Rev Immunol, 2024, 42(1): 289-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-090222-100246.

[7] Zhou C, Qiu Y, Yang H. CD4CD8αα IELs: they have something to say [J]. Front Immunol, 2019, 10: 2269. doi: 10.3389/fimmu.2019.02269.

[8] 孙秀梅,程 帆,刘 维,等.4种小鼠肠上皮细胞分离培养方法的比较[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(5):25-31. doi:10.13207/j.cnki.jnwafu.2013.05.001.

[9] Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 625913. doi: 10.3389/fcimb.2021.625913.

[10] Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases [J]. J Microbiol Biotechnol, 2019, 29(9): 1335-1340. doi: 10.4014/jmb.1906.06064.

[11] Hosseinkhani F, Heinken A, Thiele I, et al. The contribution of gut bacterial metabolites in the human immune signaling pathway of non-communicable diseases [J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1-22. doi: 10.1080/19490976.2021.1882927.

[12] Xiao W, Su J, Gao X, et al. The microbiota-gut-brain axis participates in chronic cerebral hypoperfusion by disrupting the metabolism of short-chain fatty acids [J]. Microbiome, 2022, 10(1): 62. doi: 10.1186/s40168-022-01255-6.