doi:10.11659/jjssx.09E021098

·基础研究·

小鼠肠道3型固有淋巴样细胞检测与分析方法研究

余 利,蒋 玲,周 杰,候鹏飞,糜漫天,易 龙 (陆军军医大学军事预防医学系军队营养与食品卫生学教研室/重庆市医学营养研究中心/重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 建立小鼠肠道(包括小肠和结肠)黏膜固有层3型固有淋巴样细胞(ILC3)检测与分析的方法。**方法** 小鼠麻醉后分离小肠和结肠组织,利用不同的消化液分别获得小肠和结肠固有层淋巴细胞悬液,通过 $CD45^+CD3^-CD90.2^+ROR\gamma t^+$ 流式分析策略检测 ILC3 比例,通过 IL-23 刺激后用流式细胞术分析显示 ILC3 的 IL-22 表达水平。**结果** 小肠和结肠固有层淋巴细胞成功分离,流式细胞术检测显示 ILC3 细胞分群显著并明显表达 IL-22。在小肠和结肠中,ILC3 在淋巴细胞中的占比分别为(8.30±2.42)%和(1.43±0.34)%,$IL\text{-}22^+$ ILC3 在 $ROR\gamma t^+$ ILC3 中的占比分别为(38.98±8.76)%和(85.86±1.72)%。**结论** 本研究成功建立了小鼠小肠和结肠黏膜固有层 ILC3 的检测和分析方法,为相关研究奠定了技术基础。

[关键词] 3型固有淋巴样细胞;小肠;结肠;流式细胞术
[中图分类号] R-33;R329.2;R392-33 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-09-22

Detection and analysis method of group 3 innate lymphoid cells in mice intestine

YU Li, JIANG Ling, ZHOU Jie, HOU Peng-fei, MI Man-tian, YI Long (Department of Nutrition and Food Hygiene, Department of Military Preventive Medicine, Army Medical University/Chongqing Medical Nutrition Research Center/Chongqing Key Laboratory of Nutritionand Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method for the detection and analysis of group 3 innate lymphoid cells (ILC3) in the lamina propria of intestinal mucosa (including the small intestine and colon) in mice. **Methods** After the mice were anesthetized, the small intestine and colon tissues were separated, and the lymphocyte suspensions in the lamina propria of small intestine and colon were obtained from different digestive solutions. The proportion of ILC3 was detected through $CD45^+CD3^-CD90.2^+ROR\gamma t^+$ flow cytometry strategy. After stimulated with IL-23, the IL-22 expression level in ILC3 was detected by flow cytometry. **Results** The lymphocytes in the lamina propria of

[基金项目] 国家自然科学基金(81872625)
[通信作者] 易 龙,E-mail:longgyin8341@hotmail.com

[13] Mina T, Esmaeal T. Ventrolateral orbital cortex oxytocin attenuates neuropathic pain through periaqueductal gray opioid receptor[J]. Pharmacol Rep, 2018, 70(3): 577-583. doi: 10.1016/j.pharep.2017.12.010.

[14] 娄 超,王桂芝,于剑锋,等. 中脑导水管周围灰质腹外侧区 GABAAα3 及 GABAB 受体在调节急性疼痛中的作用[J]. 临床麻醉学,2017,33(5):488-491. doi:10.3969/j.issn.1004-5805.2017.05.018.

[15] Vijay KS, Louis SP, Carl LF. Neuropathic pain-induced enhancement of spontaneous and pain-evoked neuronal activity in the periaqueductal gray that is attenuated by gabapentin[J]. Pain, 2017, 158(7): 1241-1253. doi:10.1097/j.pain.0000000000000905.

[16] 秦 颖,李鹏涛,肖 智,等. 中脑导水管周围灰质腹外侧区 P2X7 受体在曲马多减轻大鼠神经病理性痛中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2018,38(10):1219-1223. doi:10.3760/cma.j.issn.0254-1416.2018.10.016.

[17] Jia M, Wu C, Gao F, et al. Activation of NLRP3 inflammasome in peripheral nerve contributes to paclitaxel-induced neuropathic pain[J]. Mol Pain, 2017, 13: 1744806917719804. doi: 10.1177/1744806917719804.

[18] Cordero MD, Curto RV, Kirschmann G, et al. Neuropathic pain phenotype does not involve the nlrp3 inflammasome and its end product interleukin-1β in the mice spared nerve injury model[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133707. doi: 10.1371/journal.pone.0133707.

[19] Gustin A, Kirchmeyer M, Koncina E, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and functional in mouse brain microglia but not in astrocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130624. doi: 10.1371/journal.pone.0130624.

[20] Chang Y, Zhu J, Wang D, et al. NLRP3 inflammasome-mediated microglial pyroptosis is critically involved in the development of post-cardiac arrest brain injury[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 219. doi: 10.1186/s12974-020-01879-1.

[21] Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2014, 1319(1): 82-95. doi: 10.1111/nyas.12458.

[22] 程祝强,章 洁,陈洁飞,等. 中脑导水管周围灰质中 P2X7R 调控慢性神经病理性疼痛的研究[J]. 临床麻醉学杂志,2016,32(3):284-287.

(编辑:贺绍梅)

small intestine and colon were successfully isolated, and flow cytometry showed that the ILC3 was significantly clustered and IL-22 was significantly expressed . In the small intestine and colon, the proportion of ILC3 in lymphocytes was (8.30 ± 2.42) % and (1.43 ± 0.34) %, and the proportion of IL-22$^+$ ILC3 in RORγt$^+$ ILC3 was (38.98 ± 8.76) % and (85.86 ± 1.72) %, respectively. **Conclusion** This study successfully established the detection and analysis method of ILC3 in the lamina propria of small intestine and colon mucosa in mice, which provides a technical foundation for the related research.

Keywords: group 3 innate lymphoid cells; small intestine; colon; flow cytometry

肠黏膜免疫组织是机体免疫系统的重要组成部分。肠腔中大量的食物抗原、代谢产物、微生物等给肠黏膜中的各种免疫细胞提供了非常特殊的微环境,免疫细胞与微生物相互共进化而达到平衡。当这种平衡被破坏时,往往会发生炎症或感染。肠黏膜上皮及固有层中有许多不同种类的免疫细胞,固有淋巴样细胞(innate lymphoid cells,ILCs)是一类新近定义的细胞家族,在快速启动早期免疫反应限制病原体入侵、促进组织修复以及调节抗原特异性免疫反应中发挥重要作用。ILCs 是一类异质性免疫细胞群,属淋巴细胞家族成员,由共同淋巴祖细胞(common lymphoid progenitor,CLP)分化而成,其既不属于传统的 T 细胞、B 细胞,也缺乏抗原特异性受体 TCR 和 BCR,但却能介导获得性免疫相关功能,因此成为了固有免疫与获得性免疫之间的“桥梁”。根据细胞表型、分泌细胞因子及其分化所依赖的不同转录因子,ILCs 可分为 1 型固有淋巴样细胞(group 1 innate lymphoid cells,ILC1)、2 型固有淋巴样细胞(group 2 innate lymphoid cells,ILC2)、3 型固有淋巴样细胞(group 3 innate lymphoid cells,ILC3)和调节型固有淋巴样细胞(regulatory innate lymphoid cells,ILCreg)四类。其中,ILC3 主要分布在肠黏膜固有层中,在维持肠道稳态、抵御外界病原体、维护肠道屏障功能方面具有重要作用[1-4],与 2 型糖尿病、非酒精性脂肪性肝病等慢性疾病及炎症性结肠炎等的发生密切相关[5-6],因此其成为了近年来免疫学领域研究的新热点。但是,肠黏膜固有层 ILC3 的检测和分析存在较多技术难点,本研究在借鉴国内外相关研究的基础上,针对小鼠小肠和结肠组织消化、固有层淋巴细胞多标记物共标和流式细胞术检测、ILC3 的 IL-22 表达分析等环节,建立了一套成熟可行的检测和分析方法,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠 10 只,体质量 20 ~ 25 g,购自陆军军医大学实验动物中心,普通饲料常规喂养,实验前 12 h 禁食。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、RPMI 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)购自中杉金桥公司;Hanks 和 D-Hanks 平衡盐溶液购自碧云天生物公司;小鼠重组 IL-23 蛋白购自 R&D Systems 公司;β-巯基乙醇购自 Sigma-Aldrich 公司;布雷非德菌素 A 和莫能霉素购自 BD Bioscience 公司;青霉素/链霉素(penicillin-streptomycin,P/S)混合溶液购自碧云天生物公司;乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)、二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(N-2- hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonicacid,HEPES)和 DNA 聚合酶Ⅰ(DNase Ⅰ)购自上海生工生物公司;Percoll 密度梯度离心分离液购自美国 GE Healthcare 公司;胶原酶 D 和分散酶购自瑞士 Roche 公司;固定/破膜试剂盒购自美国 BD Bioscience公司、foxp3/转录因子染色试剂盒购自美国 eBioscience 公司;大鼠抗小鼠 CD45 APC-CY7、CD3 FITC、CD90. 2 PE-CY7、RORγt PE 及 IL-22 PerCP eFluor710均购自美国 BD Bioscience 公司,以上抗体工作浓度均为 1∶100。

1.2 主要仪器

流式细胞仪(BD FCSverse,BD Biosciences 公司,美国)、高速低温离心机(Beckman Coulter,德国)、台式低速水平离心机(L530,Cence 湘仪离心机仪器有限公司,中国)、THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂,中国)、电子天平(METTLER TOLEDO,瑞士)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂配制 小肠预消化液:D-Hanks 平衡盐溶液中加入 1 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTA、10 mmol/L HEPES、5% FBS,充分混匀,以 0.22 μm 过滤器过滤后置于 37 ℃孵箱中备用,每只小鼠需要约 20 mL。小肠消化液:Hanks 平衡盐溶液中加入 0.5 mg/mL Ⅱ型胶原酶、100 μg/mL DNase Ⅰ、10% FBS,充分混匀,以 0.22 μm过滤器过滤后置于 37 ℃孵箱中备用,每只小鼠需要约 10 mL。小肠密度梯度离心液:首先配制含 2% FBS 的 RPMI 1640 培养基,用该溶液和 Percoll 密度梯度离心分离液混合制成 30% Percoll 工作液,置于室温备用,每只小鼠需要约 10 mL。结肠预消化液:

D-Hanks平衡盐溶液中分别加入10 mmol/L HEPES和5 mmol/L EDTA,充分混匀,每只小鼠需要约10 mL。结肠消化液:Hanks平衡盐溶液中分别加入500 μg/mL胶原酶D、500 μg/mL DNase Ⅰ、0.5 U/mL分散酶和2% FBS,充分混匀,每只小鼠需要约15 mL。Percoll工作液:首先用10×PBS与Percoll密度梯度离心分离液按照1∶9的体积比混合,制备100% Percoll,再与1×PBS按不同的体积比混合可得到不同浓度的Percoll工作液。IL-22检测细胞刺激培养液:在RPMI 1640培养基中分别加入50 ng/mL IL-23、55 nmol/L β-巯基乙醇、20% FBS、2%青霉素—链霉素溶液、布雷非德菌素A(1∶1 000)和莫能霉素(1∶1 500),充分混匀。

1.3.2 小肠及结肠组织分离和前处理 肠组织分离:小鼠用5%水合氯醛麻醉后固定在手术板上,用75%乙醇消毒腹部,“工”形打开腹膜,剪开小肠与胃结合部,用镊子游离小鼠肠道组织,从回盲部完全分离小肠,切除盲肠后,在近直肠处完全分离结肠组织。肠组织前处理:将小肠和结肠组织分别置于4 ℃预冷的PBS中,去除肠系膜、脂肪组织和小肠Peyer's淋巴结(可通过其不透明的颜色和节点结构来识别),沿肠道长轴剪开肠组织,在预冷的PBS中洗涤2次,除去粪便和黏液。

1.3.3 小肠和结肠固有层淋巴细胞分离 小肠固有层淋巴细胞分离:将小肠转入50 mL无菌EP管中,每管加入20 mL小肠预消化液,37 ℃、210 r/min震荡20 min,连续消化2次,涡旋后弃上清。用Hanks平衡盐溶液漂洗组织2次,加入10 mL小肠消化液,37 ℃、210 r/min震荡30 min,连续消化3次,收集每次的消化液,用70 μm细胞筛过滤到50 mL无菌EP管中,4 ℃、2 000 r/min离心10 min,重悬并合并细胞沉淀。每个样本用10 mL 30% Percoll工作液,2 000 r/min离心10 min,弃上清,保留细胞沉淀,1×PBS洗涤1次,用含20% FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞。结肠固有层淋巴细胞分离:将结肠转入50 mL无菌EP管中,每管加入5 mL结肠预消化液,37 ℃、180 r/min震荡20 min,重复2次,涡旋后弃上清。立即将结肠转移到预冷的PBS中清洗,随后置于纸巾上轻拍,再用剪刀将结肠剪碎成约4 mm×4 mm的小块,然后转移到装有5 mL结肠消化液的50 mL无菌EP管中,37 ℃、210 r/min震荡20 min,重复消化3次,收集每次的消化液,用70 μm的细胞筛过滤到50 mL无菌EP管中,加入5 mL含2% FBS的RPMI 1640培养基,混匀后4 ℃、800×g离心10 min。每个样本用7 mL含2% FBS的RPMI 1640培养基重悬沉淀,加入3 mL的100% Percoll工作液,涡旋15 s,充分混匀,1 300×g离心20 min,1×PBS洗涤1次,用含20% FBS的RPMI 1640培养基重悬细胞。

1.3.4 ILC3染色和流式细胞术检测 取分离后的肠黏膜固有层淋巴细胞,加入PBS(1 mL/1.5 mL EP管),混匀洗涤1次后,500×g离心5 min。弃上清,余约100 μL液体,涡旋细胞。加入流式检测表面抗体CD45 APC-CY7、CD3 FITC和CD90.2 PE-CY7各1 μL,4 ℃避光孵育30 min。加入1 mL PBS,混匀洗涤1次,500×g离心5 min,弃上清。加入1 mL转录因子1×固定/破膜工作液,涡旋细胞,室温避光孵育30 min。700×g离心5 min,再加入1 mL的1×固定/破膜缓冲液,洗涤1次。以700×g离心5 min,余约100 μL液体,加入1 μL RORγt PE抗体,混匀,室温避光孵育30 min。加入PBS(1 mL/1.5 mL EP管),混匀洗涤,700×g离心5 min。弃上清,用300 μL PBS重悬细胞,随后上机检测,利用FlowJo(10.0版本)软件分析。

1.3.5 ILC3表达IL-22的检测 取分离后的肠黏膜固有层淋巴细胞,用新鲜配制的IL-22检测细胞刺激培养液重悬后,加入到24孔细胞培养板中,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中刺激和孵育4 h,随后收集细胞进行染色,细胞固定/破膜后同时加入IL-22 PerCP eFluor710抗体,其余步骤同1.3.4,随后上机检测,利用FlowJo(10.0版本)软件分析。

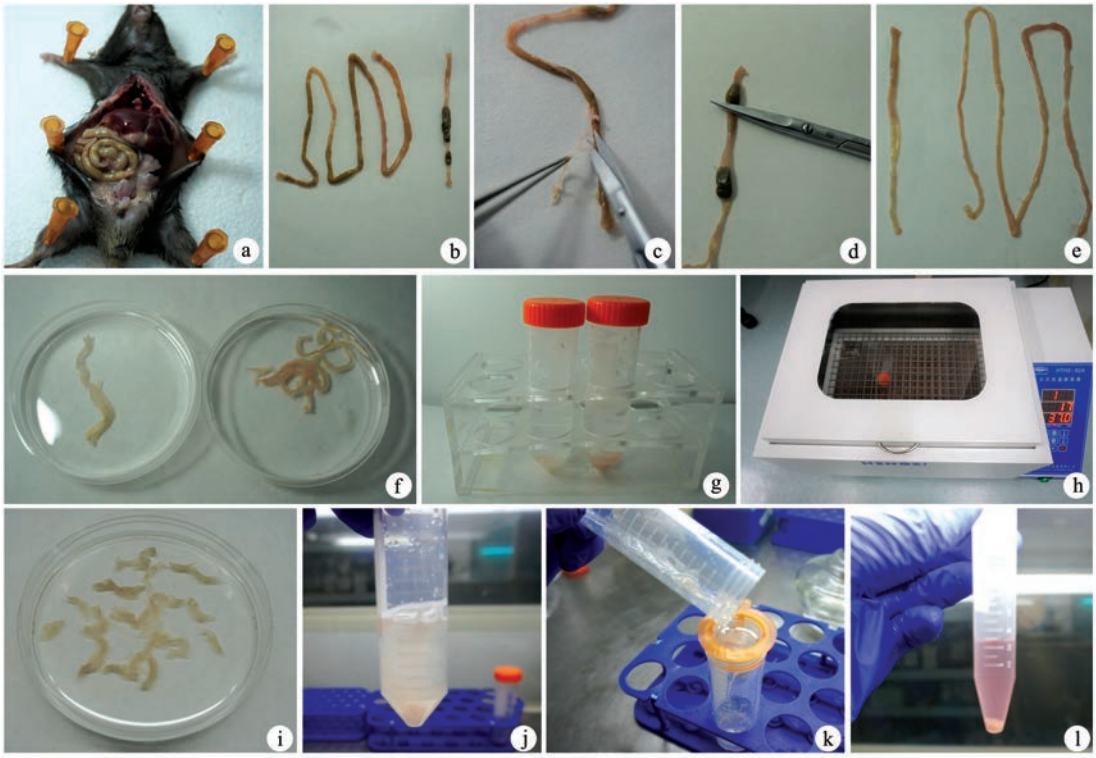
2 结果

2.1 小鼠小肠和结肠固有层淋巴细胞分离

小肠和结肠ILC3的检测首先要获取小肠和结肠固有层淋巴细胞单细胞悬液,分离步骤见图1,总分离时间约3 h。

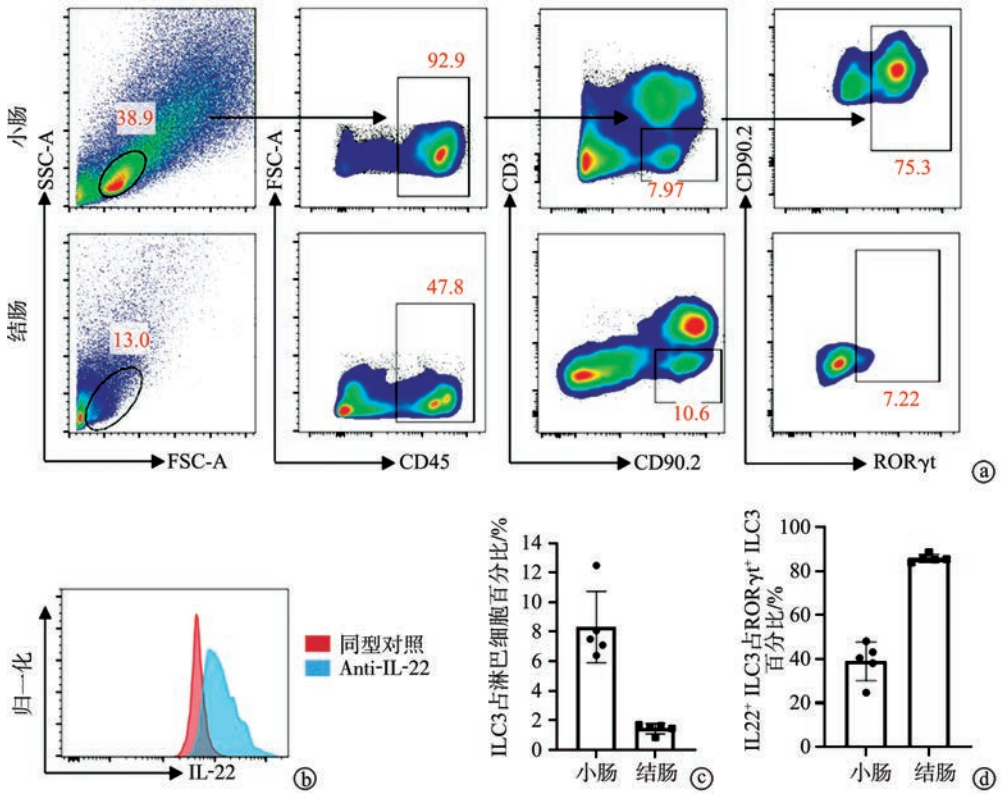
2.2 小鼠小肠和结肠固有层ILC3及IL-22表达检测

本研究采用$CD45^+CD3^-CD90.2^+ROR\gamma t^+$多标记物共标的流式分析策略检测小肠和结肠ILC3(图2a),同时固有层淋巴细胞分离后体外刺激4 h,利用胞内流式细胞术进一步检测ILC3表达IL-22的水平(图2b),结果显示,在小肠和结肠中,ILC3在淋巴细胞中的占比分别为(8.30±2.42)%和(1.43±0.34)%,$IL\text{-}22^+$ ILC3在$ROR\gamma t^+$ ILC3中的占比分别为(38.98±8.76)%和(85.86±1.72)%,见图2c、d。



a:打开小鼠腹腔;b:分离小肠和结肠组织;c:去除肠系膜和脂肪组织;d:去除小肠和结肠内容物;e:待消化的小肠和结肠;f:将分离干净的小肠和结肠组织置于预冷的 PBS 中;g:分别加入小肠和结肠预消化液;h:于 37 ℃摇床中消化;i、j:将组织用 Hanks 平衡盐溶液洗涤后加入消化液;k:过滤消化液;l:Percoll 工作液纯化细胞

图 1 小鼠小肠和结肠固有层淋巴细胞分离步骤



a:小肠和结肠固有层 ILC3 检测;b:胞内流式细胞术检测 ILC3 表达 IL-22 的水平;c、d:小肠和结肠固有层 ILC3 比例及 IL-22 表达水平

图 2 小肠和结肠固有层 ILC3 及 IL-22 流式检测分析

3 讨论

免疫学的发展让我们逐渐认识到,疾病高发组织器官(如肝、肠、肺、脑等)由于具有独特的结构、功能和组织微环境,形成了独特的区域免疫特性,一些重要免疫细胞群、免疫分子在疾病的发生发展中起着关键作用[7-8]。肠道既是机体吸收营养的主要器官,也是机体最大的黏膜免疫器官,是抵御病原体入侵的重要防线,肠道屏障对维持肠道局部及机体的稳态有着重要作用。ILCs 是机体固有免疫的重要组成部分,在启动早期反应清除病原体入侵和感染、黏膜稳态维持、组织修复中发挥重要作用。ILCs 的四个亚型 ILC1、ILC2、ILC3 和 ILCreg[9]分别与辅助性 T 细胞 1(Th1)、辅助性 T 细胞 2(Th2)、辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg)互为"镜像细胞"。其中,ILC3 几乎全部分布于胃肠黏膜固有层中,是维持肠黏膜固有免疫及屏障功能的关键效应细胞。

肠道稳态是肠黏膜屏障、肠道菌群、营养代谢物质等相互作用形成的动态平衡状态[10]。作为在生理状态下肠黏膜组织中分布较广泛的 ILCs 亚群,ILC3 主要通过分泌 IL-22、IL-17、GM-CSF 等细胞因子对抗致病菌,诱导机体对共生菌群及食物抗原的免疫耐受,并促进肠黏膜损伤修复,从而维持肠道稳态。IL-22 是 ILC3 分泌的主要效应细胞因子,属于 IL-10 家族,主要由 NCR^+ ILC3 分泌,在稳态下可被黏附于肠上皮的共生菌群诱导产生,是维持肠道稳态的重要细胞因子。ILC3 能够产生 IL-22 作用于肠上皮细胞的异二聚体受体 IL-22R1、IL-22R2,激活信号转导与转录激活因子 3 和核苷酸结合寡聚化结构域 2 信号通路,使其分泌 Muc1、Muc3、Muc10 和 Muc13 等黏蛋白及 RegⅢβ、RegⅢγ 等抗菌肽以对抗致病菌,限制共生菌与上皮细胞的接触,避免产生肠道炎症[11]。此外,ILC3 还可以通过分泌 IL-17 发挥促炎作用,诱导炎症性肠病的发生[12]。因此,ILC3 与肠道屏障功能、多种肠道相关疾病的发生密切相关。ILC3 以表达转录因子 RORγt 为特征,RORγt 与 ILC3 的存活、分化和免疫功能密切相关,能够通过 ROR 反应元件介导 IL-22 表达。

原代分离肠 ILCs 及检测 ILC3 的数量和功能对于开展实验研究十分重要,但是肠 ILCs 的分离和 ILC3 的检测存在一些技术难点,且国内外不同实验室在方法上亦不统一。首先,小鼠肠黏膜固有层存在大量胶原纤维,且小肠和结肠组织中胶原纤维种类差异较大,因此选择合适的胶原酶进行消化是关键;其次,分离时间的长短与细胞活力密切相关,因此探索最优化的分离方法,缩短分离时间尤为关键;此外,由于 ILC3 的检测需采用多个标记物共标并通过多色流式细胞术进行,但既往 ILC3 细胞表面标志物和分析策略在国际上尚未完全统一,因此探索公认且便捷的表面标志物至关重要。

目前,关于肠 ILCs 的分离和 ILC3 的检测,国内外多个实验室先后建立了一些初步方法,但不同实验方法都存在一定局限性,且不同实验室之间的方法也存在一定差异。本实验室结合国内外相关研究,进一步探索和优化了 ILCs 分离和 ILC3 检测的实验条件,取得了较好的效果。本研究主要的技术特点和创新包括以下三个方面:①建立了有效去除肠系膜淋巴组织、Peyer's 淋巴结及肠上皮间淋巴细胞的方法,可避免其对固有层淋巴细胞的干扰。先机械分离肠系膜和脂肪组织,再识别小肠组织的 Peyer's 淋巴结并予以去除,最后利用 EDTA-DTT 法将上皮层与固有层充分分离,实验结果提示,该方法基本排除了肠道其他淋巴细胞的影响,保证了固有层淋巴细胞的纯度。②建立了分别针对小肠和结肠胶原纤维的消化方法。对于小肠组织,本研究利用 0.5 mg/mL Ⅱ型胶原酶消化 3 次的方法。由于Ⅱ型胶原酶含有更高的梭菌蛋白酶活性,有利于水解小肠固有层组织中具有三股超螺旋结构的天然胶原纤维,可充分分离小肠固有层淋巴细胞,同时加入 100 μg/mL DNase I,可防止细胞死亡后释放大量的 DNA 导致细胞粘连,从而有效地分离出固有层单细胞悬液。对于结肠组织,本研究采用 500 μg/mL 胶原酶 D 和 0.5 U/mL 分散酶进行消化。胶原酶 D 有较低的胶原酶活性和极低的胰蛋白酶活性,能在水解胶原纤维的同时最大程度地保护细胞蛋白的完整性。分散酶也称中性蛋白酶,是一种非特异性的金属蛋白酶,可以有效水解Ⅳ型胶原纤维和纤连蛋白,适合结肠组织固有层淋巴细胞的消化分离,加入适量的 DNase I 后同样也可防止细胞粘连,从而有效地分离出固有层淋巴细胞单细胞悬液。但是,针对不同研究目的、实验动物和干预因素,不同实验中所采用的消化酶存在很大差异,如 Wang 等[13]在分离肠道固有层 ILCs 时选用的是Ⅱ型和Ⅲ型胶原酶,Chun 等[14]则是采用胶原酶 D 消化分离结肠固有层 ILCs,而在 Dutton 等[15]、Melo-Gonzalez 等[16]和 Zhou 等[17]的研究中均采用Ⅷ型胶原酶进行小肠 ILCs 的消化分离。本研究所建立的方法适用于 24 周(6 月龄)的 C57BL/6 小鼠,该年龄的小鼠肠道结缔组织较多,消化较困难。因此,根据不同情

况选择合适的胶原酶以及消化时间,能够有效分离更多数量和有活性的 ILCs。③建立了基于多种标志物的 ILC3 流式细胞术检测方法。ILC3 自发现以来,其检测标志物随着认识的不断深入和免疫学技术的发展而不断变化,如 $CD45^+ Lin^- CD127^+ ROR\gamma t^+$、$CD45^+ Lineage^- Thy1^+ ROR\gamma t^+$、$CD45^+ Lin^- CD127^+ CD90^+ ROR\gamma t^+ Tbet^{+/-}$等[18]。由于 RORγt 为核内转录因子,无法实现活细胞染色。近年来随着研究发展,为了实现 ILC3 的分选,$CD45^{low} Thy1.2^{high}$、$CD45^+ Lin^- CD90.2^+ NK1.1^- NKp46^{+/-} KLRG1^-$等分选策略也相继被公认,其中固有淋巴细胞为辅助性 T 细胞的镜像细胞,因此也常用 $CD3^-$代替 $Lineage^-$的标志物对 ILC3 进行标记[19]。本研究采用流式分析策略检测小肠和结肠 ILC3,结果显示,此方法可成功分离小肠和结肠中的 ILC3 细胞,且小肠中 ILC3 细胞数比结肠中多,与国外同类研究基本一致[20-22]。

综上,本研究建立了一种小肠和结肠固有层 ILC3 检测和分析的方法,应用不同消化液分别消化小肠和结肠固有层淋巴细胞,进而通过多色流式细胞术检测 ILC3 及 IL-22 的表达,方法稳定可靠,重复性较好,为研究小肠和结肠 ILC3 打下了良好的基础。此外,由于肠黏膜固有层中还存在大量其他淋巴细胞亚群,本研究所建立的肠黏膜固有层淋巴细胞分离和 ILC3 的检测方法,也可为肠黏膜其他淋巴细胞如肠上皮间淋巴细胞、固有层 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等的检测分析提供借鉴和参考。

[参考文献]

[1] Diefenbach A, Colonna M, Koyasu S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells[J]. Immunity, 2014, 41(3): 354 - 365. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.005.

[2] Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis[J]. Nat Immunol, 2016, 17(7): 765 - 774. doi: 10.1038/ni.3489.

[3] Giacomin PR, Moy RH, Noti M, et al. Epithelial-intrinsic IKKα expression regulates group 3 innate lymphoid cell responses and antibacterial immunity[J]. J Exp Med, 2015, 212(10): 1513 - 1528. doi: 10.1084/jem.20141831.

[4] Aparicio-Domingo P, Romera-Hernandez M, Karrich JJ, et al. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage[J]. J Exp Med, 2015, 212(11): 1783 - 1791. doi: 10.1084/jem.20150318.

[5] Tripathi D, Radhakrishnan RK, Sivangala Thandi R, et al. IL-22 produced by type 3 innate lymphoid cells (ILC3s) reduces the mortality of type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice infected with Mycobacterium tuberculosis[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(12): e1008140. doi: 10.1371/journal.ppat.1008140.

[6] Hamaguchi M, Okamura T, Fukuda T, et al. Group 3 innate lymphoid cells protect steatohepatitis from high-fat diet induced toxicity[J]. Front Immunol, 2021, 12: 648754. doi: 10.3389/fimmu.2021.648754.

[7] 吕群燕,田志刚,董尔丹,等. 组织器官的区域免疫特性与疾病机理研究[J]. 科学通报, 2012, 57(36): 3450 - 3458. doi: 10.1360/972012 - 1602.

[8] 白 丽,王 佳,田志刚,等. 我国在组织器官区域免疫特性与疾病领域的研究进展[J]. 中国科学:生命科学, 2019, 49(3): 220 - 227. doi: 10.1360/N052018 - 00289.

[9] Li S, Bostick JW, Zhou L. Regulation of innate lymphoid cells by aryl hydrocarbon receptor[J]. Front Immunol, 2018, 8: 1909. doi: 10.3389/fimmu.2017.01909.

[10] 李 青,周天慧,莫瑞东,等. 3 型固有淋巴细胞在药物性肝损伤及自身免疫性肝炎患者中的表达具有潜在鉴别价值[J]. 肝脏, 2020, 25(8): 840 - 844. doi: 10.3969/j.issn.1008 - 1704.2020.08.022.

[11] Guo X, Qiu J, Tu T, et al. Induction of innate lymphoid cell-derived interleukin-22 by the transcription factor STAT3 mediates protection against intestinal infection [J]. Immunity, 2014, 40(1): 25 - 39. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.021.

[12] Zeng B, Shi S, Ashworth G, et al. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 315. doi: 10.1038/s41419 - 019 - 1540 - 2.

[13] Wang S, Xia P, Chen Y, et al. Regulatory innate lymphoid cells control innate intestinal inflammation[J]. Cell, 2017, 171(1): 201 - 216. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.027.

[14] Chun E, Lavoie S, Fonseca-Pereira D, et al. Metabolite-sensing receptor Ffar2 regulates colonic group 3 innate lymphoid cells and gut immunity [J]. Immunity, 2019, 51(5): 871 - 884. e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.014.

[15] Dutton EE, Withers DR. Identification of murine innate lymphoid cell subsets in barrier tissues and their draining lymph nodes using flow cytometry[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2121: 23 - 36. doi: 10.1007/978 - 1 - 0716 - 0338 - 3_3.

[16] Melo-Gonzalez F, Hepworth MR. Identification and functional characterization of murine group 3 innate lymphoid cell (ILC3) subsets in the intestinal tract and associated lymphoid tissues[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2121: 37 - 49. doi: 10.1007/978 - 1 - 0716 - 0338 - 3_4.

[17] Zhou L, Chu C, Teng F, et al. Innate lymphoid cells support regulatory T cells in the intestine through interleukin-2 [J]. Nature, 2019, 568(7752): 405 - 409. doi: 10.1038/s41586 - 019 - 1082 - x.

[18] Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate lymphoid cells: 10 years on [J]. Cell, 2018, 174(5): 1054 - 1066. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.017.

[19] Qiu Z, Sheridan BS. Isolating lymphocytes from the mouse small intestinal immune system[J]. J Vis Exp, 2018(132): 57281. doi: 10.3791/57281.

[20] Halim TYF, Takei F. Isolation and characterization of mouse innate lymphoid cells[J]. Curr Protoc Immunol, 2014, 106: 3.25.1 - 3.25.13. doi: 10.1002/0471142735.im0325s106.

[21] Gronke K, Kofoed-Nielsen M, Diefenb Ac HA. Isolation and flow cytometry analysis of innate lymphoid cells from the intestinal lamina propria[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1559: 255 - 265. doi: 10.1007/978 - 1 - 4939 - 6786 - 5_17.

[22] Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells[J]. Nature, 2015, 517(7534): 293 - 301. doi: 10.1038/nature14189.

(编辑:杨 颖)