DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.020
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1845-04

论著

流式细胞术检测人和小鼠 Th 细胞亚群

刘 莉,张 军,方超平,杨佳荟,李闻捷,沈 茜 (第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433)

提 要:目的 建立人和小鼠 Th1 和 Th2 细胞的检测方法,探讨两者在流式细胞仪检测方面的不同。方法 采用 PMA 和离子霉素共同刺激外周血单个核细胞,观察在不同时间和不同剂量的 PMA 刺激下外周血 T 淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 表达的变化;采用多色荧光共同标记分析技术检测外周血单个核细胞 IL-4 和 IFN-γ 的表达。结果 在 PMA 和离子霉素共同刺激后 4 h,人外周血 T 淋巴细胞表面 CD4 表达迅速下降,而小鼠 T 淋巴细胞表面 CD4 表达仅轻度下降;采用多色分析技术可以有效的检测 Th1 细胞和 Th2 细胞;采用 CD3、CD8 设门分析可以有效的区分人 Th 细胞;采用 CD4 设门可以有效区分小鼠 Th 细胞。结论 人 Th 细胞检测宜采用 4 色染色分析技术,小鼠 Th 细胞检测采用 3 色染色技术即可。

关键词:流式细胞术;Th1/Th2;细胞因子
中图法分类号:R392.2;R446.113 文献标识码:A

Flow cytometric detection of human and murine Th1/Th2 cells

LIU Li, ZHANG Jun, FANG Chao-ping, YANG Jia-hui, LI Wen-jie, SHEN Qian (Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To establish the method for flow cytometric detection of human and murine Th1/Th2 cells. Methods Peripheral mononuclear cells (PMNCs) were stimulated with phorbolmyristateacetate (PMA) and ionomycin. The expressions of CD3, CD4, and CD8 were monitored after stimulation with different concentrations of PMA for different time. A multiple color staining of the cells was used to detect the intracelluar expressions of IL-4 and IFN-γ. Results Expression of CD4 in human PMNCs decreased dramatically at 4 h after stimulation with PMA and ionomycin and Th cells could be distinguished from other cells using CD3 and CD8 dot plot gating, but expression of CD4 in mice PMNCs decreased slightly after stimulation with PMA and ionomycin and Th cells could be distinguished from other cells using CD4 histogram gating. Conclusion Our results suggest human Th1/Th2 cells should be detected by four-color staining method and murine Th1/Th2 cells by three-color staining method.

Key words: flow cytometry; Th1/Th2 cytokine

早在 1986 年 Mosmann 等依据小鼠分泌的细胞因子谱的不同首次将 Th 细胞分为 Th1 和 Th2 两个功能不同的独立亚群。目前已发现许多感染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病以及移植排斥反应等都与 Th1/Th2 平衡有关。因此建立稳定有效的细胞内因子检测方法对于准确说明 Th1/Th2 细胞的作用非常重要。目前检测的主要方法有:酶联免疫法、ELISPOT 法、荧光定量法及原位杂交等方法。流式细胞术检测细胞内因子是一种相对快速、重复性好并能准确定量的方法。我们参照国内外的一些文献,对于人和小鼠 Th1 和 Th2 细胞的流式检测方法进行了探索,并比较了两者之间的不同。

由于未活化的淋巴细胞所分泌的细胞因子极少,因此在检测前需刺激活化。目前国内外推荐的刺激物主要为 PMA (佛波酯)和离子霉素(Ionomycin)。淋巴细胞在刺激物的作用下活化,分泌细胞因子到细胞外。由于流式细胞仪只能对细胞表面或内部的抗原进行检测,因此必须阻止细胞因子的分泌。抑制细胞因子分泌的试剂为 Brefedlin A 或莫能霉素(Monensin)。Th1/Th2 细胞属于 $CD4^+$ T 淋巴细胞,因此如何确定 $CD4^+$ T 淋巴细胞非常重要,我们主要围绕该问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

PMA(Sigma)

作者简介:刘 莉(1973-),女,重庆市人,技师,主要从事临床免疫检验方面研究。电话:(021)25070641

收稿日期:2004-07-13;修回日期:2004-09-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

贮存液:PMA 溶于 DMSO 浓度为 0.1 mg/ml,-20 ℃保存;工作液:贮存液 1∶100 稀释于 RPMI1640 培养基中,浓度为 1 μg/ml。

Ionomycin(Sigma)

贮存液:Ionomycin 溶于 DMSO 浓度为 1 mg/ml,-20 ℃保存;工作液:贮存液 1∶20 稀释于 RPMI1640 培养基中,浓度为 50 μg/ml。

GolgiStop(内含 Monensin,BD Pharmingen)

Cytofix/Cytoperm 液、Perm/Wash 液和 FACS Lysing Solution,均购自 BD Pharmingen。抗体细胞表面标记抗体:抗人 CD3-APC、CD8-PercP、CD8-CYC、CD4-CYC;抗小鼠 CD4-CYC、CD8PE;细胞内因子抗体:抗人 IL-4-PE、IFN-γ-FITC。抗鼠 IL-4-PE、IFN-γ-FITC。

以上抗体均购自 BD Pharmingen。

1.2 仪器

FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)

1.3 实验方法

1.3.1 外周血单个核细胞的分离 取肝素抗凝正常人或者 BALB/c 小鼠外周血 1.5 ml。在试管内加入淋巴细胞分离液 3 ml。将外周血以等体积 Hanks 液稀释后,轻轻加入淋巴细胞分离液。2 000 r/min 离心 20 min。取出试管后,轻轻吸取液相交界的单个核细胞,加入 Hanks 液 3 ml,混匀后,1 500 r/min 离心 5 min。弃去上清,细胞加入 0.5 ml RPMI1640 培养基(含 10% 小牛血清,50 μg/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素)重悬,血细胞计数仪计数,调整细胞浓度。

1.3.2 不同浓度的 PMA 刺激后人 T 淋巴细胞 CD4、CD8 和 CD3 的表达 24 孔细胞培养板中,每孔加入约 5×10^5 个细胞,加入 RPMI1640 培养基至总体积 1 ml。加入不同浓度的 PMA(10、20 ng 和 50 ng 终浓度)和 500 ng/ml Ionomycin 共同刺激人外周血单个核细胞,同时加入 0.7 μl Golgistop,37 ℃ CO_2 孵箱刺激 4 h。收集单个核细胞,分为三部分,分别加入 CD8-CYC、CD4-CYC、CD3-APC 单抗各 10 μl,室温避光孵育 30 min。加入红细胞裂解液(FACS Lysing Solution)1 ml 裂解残余红细胞,2 ml PBS 洗涤细胞 1 次。流式细胞仪(FACSCalibur,Becton Dickinson)检测细胞,Cellquest 软件获取分析细胞,每个检测获取 10 000 个细胞。采用前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光散点图设门区分淋巴细胞,以直方图分别表示 CD3、CD8 和 CD4 阳性淋巴细胞。

1.3.3 不同时间 PMA 和离子霉素刺激后小鼠 T 淋巴细胞 CD4 和 CD8 的表达 24 孔细胞培养板中,每孔加入约 5×10^5 个细胞,加入 RPMI1640 培养基至总体积 1 ml。加入 PMA 和 Ionomycin 使终浓度分别为 100 ng/ml 和 1 μg/ml,同时加入 0.7 μl Golgistop。37 ℃ CO_2 孵箱刺激 8、12 h 分别收集细胞。采用抗小鼠 CD4-CYC、CD8PE 抗体标记 T 淋巴细胞,流式细胞仪检测 CD4 和 CD8 的表达。

1.3.4 流式细胞术检测人外周血 Th1 和 Th2 细胞 分离外周血单个核细胞,加入 20 ng/ml PMA 和 500 ng/ml 离子霉素刺激 4 h 后,收集细胞。将细胞分为两份,称为对照管和实验管,分别加入 CD3-APC,CD8-PercP10 μl,混匀,室温放置 20 min,加入红细胞裂解液 1 ml,混匀,室温放置 10 min,1 000× g 离心 5 min,弃上清。加入 Cytofix/Cytoperm 液 200 μl,4 ℃放置 20 min,使细胞固定穿孔。加入 Perm/Wash 液 1 ml,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清。实验管加入 IFN-γ-FITC、IL-4-PE 各 5 μl,对照管加入同型对照抗体,4 ℃避光孵育 30 min。加入 Perm/Wash 液 500 μl 洗涤 2 次。最后以 300 μl 洗涤液重悬细胞。采用 FACScom 软件及 CD3-APC、CD8-PercP、IFN-γ-FITC、IL-4-PE 抗体单双标记的淋巴细胞调节仪器的补偿,采用 Cellquest 软件获取分析细胞。以前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光散点图设门区分淋巴细胞,以 CD3 和 CD8 散点图设门区分 Th 细胞($CD3^+CD8^-$)。最终以 IFN-γ 和 IL-4 的散点图表示 Th1 细胞和 Th2 细胞。

1.3.5 流式细胞术检测小鼠外周血 Th1 和 Th2 细胞 分离外周血单个核细胞,加入 100 ng/ml PMA 和 1 μg/ml 离子霉素刺激 5 h 后,收集细胞。将细胞分为两份,称为对照管和实验管,加入 CD4-CYC 10 μl,混匀,其余步骤同人的检测。调节仪器的补偿,采用 Cellquest 软件获取分析细胞。以前向角(FSC)和侧向角(SSC)散射光散点图设门区分淋巴细胞,以 CD4 直方图设门区分 Th 细胞($CD4^+$),以 IFN-γ 和 IL-4 的散点图表示 Th1 细胞和 Th2 细胞。

2 结果

2.1 不同浓度的 PMA 对人外周血 T 淋巴细胞抗原表达的影响

10、20、50 ng 的 PMA 刺激后 4 h,CD4 的表达明显下降,已经不能区分出 CD4 阳性 T 淋巴细胞,而 CD8 和 CD3 的表达未受明显影响,可以有效的区分阴性和阳性细胞。重复 5 次检测,典型的检测结果见图 1。

2.2 不同时间的 PMA 刺激对小鼠外周血 T 淋巴细胞抗原表达的影响

PMA 刺激 8 h 后 CD4 阳性 T 淋巴细胞的表达没有明显下降,见图 2。刺激 12 h 后,CD4 阳性 T 淋巴细胞的表达明显改变。而 CD8 表达在 8 h 和 12 h 均没有明显改变。重复检测 5 次。

2.3 正常人外周血 Th1 细胞和 Th2 细胞

采用 $CD3^+CD8^-$ 的 T 淋巴细胞为 Th 细胞,设门分析 Th1 细胞($IFN\text{-}\gamma^+$)和 Th2 细胞($IL\text{-}4^+$)的百分比。结果见表 1。

2.4 正常 BALB/c 小鼠外周血 Th1 细胞和 Th2 细胞

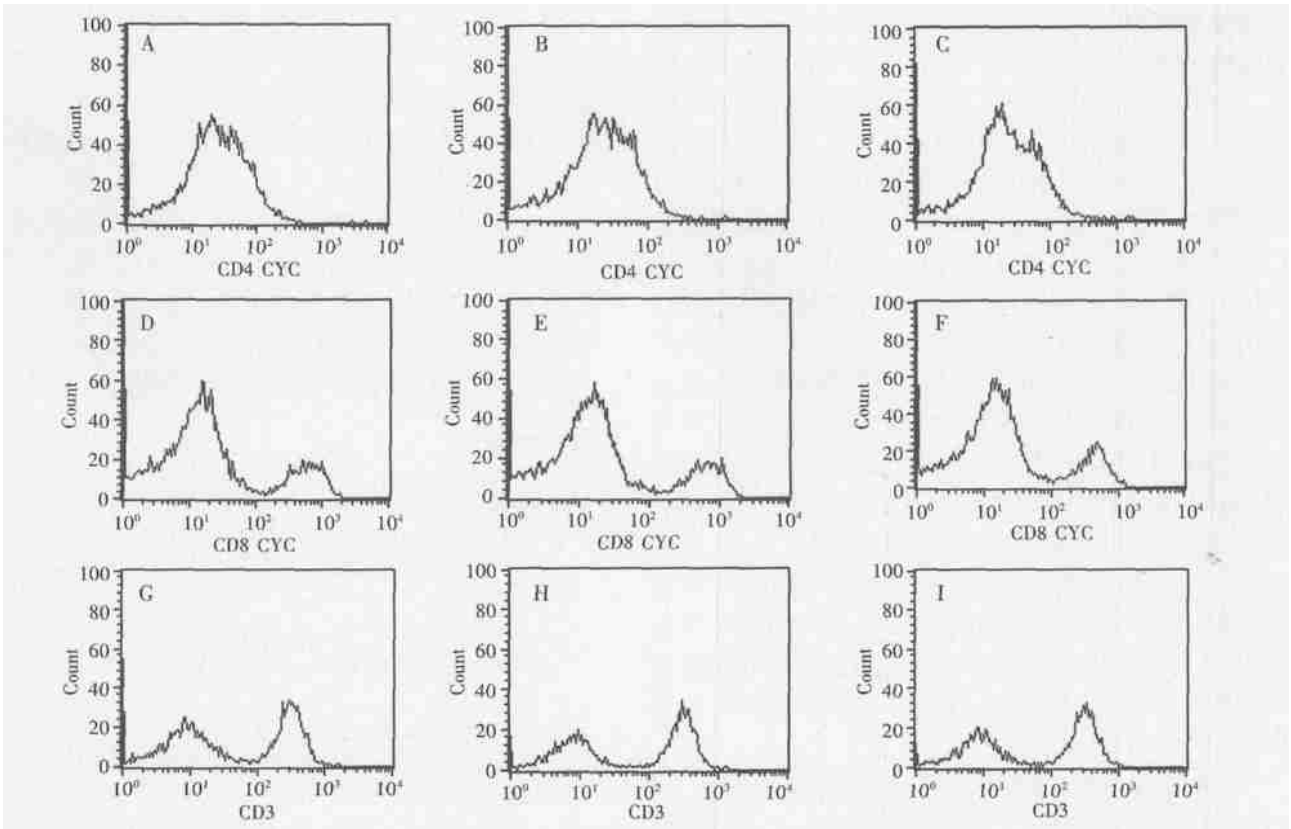
采用 $CD4^+$ 淋巴细胞为 Th 细胞,设门分析 Th1 细胞($IFN\text{-}\gamma^+$)和 Th2 细胞的百分比($IL\text{-}4^+$)。结果见表 1。

表 1 正常人和 BALB/c 小鼠外周血 Th1 和 Th2 细胞检测结果($n=10$,%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Th1 and Th2 cells detected in the peripheral blood of normal human and BALB/c mice ($n=10$, %, $\bar{x}\pm s$)

Group	Th1	Th2
Normal human	21.73±2.64	2.37±0.54
BALB/c mice	4.56±0.62	1.69±0.43

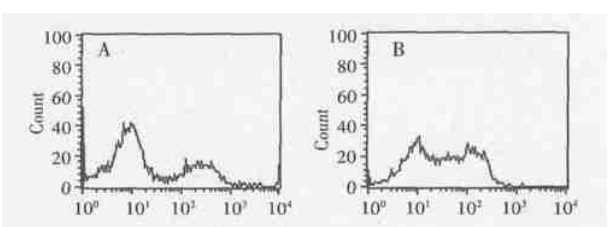
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A, B, and C represent the results of CD4 expressions in normal blood after stimulation with PMA at the doses of 10, 20, and 50 ng, respectively; D, E, and F represent the results of CD8 expressions in normal blood after stimulation with PMA at the doses of 10, 20, and 50 ng, respectively; G, H, and I represent the results of CD3 expressions in normal blood after stimulation with PMA at the doses of 10, 20, and 50 ng, respectively

图 1　10、20、50 ng PMA 和 500 ng/ml Ionomycin 共同刺激 4 h 后人外周血 T 淋巴细胞 CD4、CD8 和 CD3 的表达

Fig 1　Expressions of CD3, CD4, and CD8 in normal human peripheral blood after stimulation with PMA at the doses of 10, 20, 50 ng and ionomycin at the dose of 500 ng/ml for 4 h



A: Expression of CD4 on T lymphocytes decreased slightly at 8 h after stimulation; B: Expression of CD4 on T lymphocytes decreased significantly at 12 h after stimulation

图 2　不同时间的 PMA 刺激对小鼠外周血 T 淋巴细胞 CD4 抗原表达的影响

Fig 2　Effects of PMA stimulation on the expressions of CD4 in the peripheral blood of mice

3　讨论

从 Rostaing 等[1] 发表流式细胞术检细胞内细胞因子的方法后, 陆续有人研究了流式细胞术检测细胞内因子方法的可行性及重复性等问题。活化 T 淋巴细胞有各种各样的方法, 如: PMA、PHA、Con A、CD3、CD2 和 CD28 等。目前公认的较好的方法是 PMA 和钙离子载体的联合刺激。研究表明在 PMA 的刺激后 4 h, IFN-γ 和 IL-4 的表达就达到一个较高的水平, 因而适合进行流式检测。我们的研究结果发现, 人的外周血 T 淋巴细胞表面的 CD4 表达受 PMA 的影响非常大, 在刺激后 2 h 即明显下降, 4 h 已经难于区分 CD4 阳性 T 淋巴细胞, 因此这就难于确定 Th 细胞。虽然国内部分学者认为在 PMA 的刺激下, CD4 仍可以维持一定的表达[2,3], 但是我们的结果和国内部分[4] 及国外的大多数[1,5] 研究结果表明, 在 PMA 的刺激下, CD4 表达迅速下调, 此时采用 CD4 来标记 Th 细胞已经不能准确的检测 Th 细胞, 因而不能准确的反应 Th1 和 Th2 细胞的比率。而 CD3 和 CD8 的表达受 PMA 等刺激因子的影响很小, 因此, 目前, 国外推荐的方法是采用 CD3 和 CD8 设门, 区分 CD4 阳性 T 淋巴细胞。由于多色荧光标记流式检测技术的发展, 笔者认为采用 4 色标记技术检测人 Th 细胞是目前最好的方法。这种方法可以实现一个检测

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

管同时观察Th1和Th2细胞；可以检测$CD8^+$细胞的细胞内因子的表达；还可以观察IL-4和IFN-γ双阳性细胞。一个检测管同时染色，节约了抗体和劳动量等检测成本。但是由于多色染色技术对流式的操作者有较高的要求，实施过程要注意补偿调节等具体问题，我们曾经采用CYC标记的CD8和APC标记的CD3联合设门区分Th细胞，由于CYC和APC在BD公司的流式细胞仪上，仪器的补偿调节非常困难，最终放弃该方法，改用PerCP标记的CD8才解决这一问题。目前，国内一些流式细胞仪型号相对落后，不能进行4色染色标记技术，笔者认为可以采用双管标记检测法，即采用CD3、CD8和IFN-γ 3色标记一管用于检测Th1细胞；采用CD3、CD8和IL-4 3色标记一管用于检测Th2细胞。采用这种方法的缺陷是每个样品检测管数增加，造成检测成本增高，而且不能同时观察IL-4和IFN-γ双阳性细胞。国外有报道采用IFN-γ、IL-4和CD3进行3色标记[6]，这种方法只能观察T淋巴细胞表达的细胞因子的变化，不能区分$CD4^+$和$CD8^+$细胞，笔者认为是一种不完善的方法。

我们在BALB/c小鼠实验发现在PMA的刺激下，CD4表达虽然下调，但是其表达持续时间比人的持续时间明显增长，在刺激8 h后，仍然能维持一个较高的水平，因而能够有效的区分Th细胞。因此，在BALB/c小鼠采用CD4和IFN-γ、IL-4进行3色标记技术就能有效的检测Th细胞亚群。当然由于CD3和CD8的表达受PMA的影响很小，采用CD3、CD8和IFN-γ、IL-4进行4色标记技术也非常有效。另外，由于CD4不仅在T细胞上表达，还在单核细胞上表达，单独用CD4设门容易受单核细胞的干扰，解决这个问题的一个办法就是采用FSC和SSC散点图来设门区分单核细胞和淋巴细胞，采用CD4直方图区分CD4阴性和阳性细胞，最后采用既位于淋巴细胞区，又位于$CD4^+$区的细胞来定义为Th细胞，这样可以有效的避免单核细胞的干扰。当然采用4色标记也是一种非常有效的避免单核细胞干扰的方法。

由于T淋巴细胞表达的因子非常多，检测其它细胞因子可以参照检测IL-4和IFN-γ的方法进行。凡是采用PMA等作为刺激剂的检测方法均应考虑到PMA等刺激剂对于细胞表面抗原表达的影响，从而选择最佳的荧光抗体标记，这是进行准确的检测的基础。

参考文献：

[1] Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, *et al*. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following *in vitro* activation of peripheral blood mononuclear cells[J]. Cytometry, 1999, 35(4): 318－328.

[2] 王晓栋，黎 莉，沈 南，等. 顾越英Th1/Th2失衡在初发系统性红斑狼疮患者中的研究[J]. 中华风湿病学杂志，2002，6(5)：316－319.

[3] 唐志琴，黄繁嫱，韩 锋，等. 系统性红斑狼疮患者表达IFN-γ和IL-4的CD4＋和CD8＋细胞的变化[J]. 上海医学检验杂志，2003，18(1)：24－25.

[4] 叶志中，李富荣，庄俊汉，等. 系统性红斑狼疮患者Th1/Th2淋巴细胞类型与疾病活动指数的相关性[J]. 中华风湿病学杂志，2001，5(4)：216－219.

[5] O'Neil-Andersen N J, Lawrence D A. Differential modulation of surface and intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(2): 243－250.

[6] Nagy G, Pallinger E, Antal-Szalmas P, *et al*. Measurement of intracellular interferon-gamma and interleukin-4 in whole blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus[J]. Immunol Lett, 2000, 74(3): 207－210.

（编辑 王 红）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1 公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日 14时30分。

表示年份要写全称，1995年不能写成95年或'95年；1953－1958年不能写成1953－58年。年月日可以写成1995-06-08。时刻用“：”分隔的形式。如：13时45分8秒可以写成13：45：08。

2 计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号 4位和4位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如2 431改为2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如3 579 000可写成357.9万但不能写成3百57万千或357万9千。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net