

论 著

流式鞘液流速对调节性 T 细胞和 CXCR4⁺ 细胞亚群检测结果的影响

朱红 王成宝

作者单位: 221009 江苏徐州, 徐州市中心医院检验科

通讯作者: 朱红, Email: feiyv1234@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.03.005

【摘要】 目的 观察不同的鞘液流速对检测调节性 T 细胞 (Treg) 和 CXCR4⁺ 细胞亚群细胞比例的结果是否有影响。**方法** 取 15 例体检人员的新鲜抗凝外周血, 分别用低速、中速和高速 3 种不同的鞘液流速来检测 Treg 和 CXCR4⁺ 细胞亚群的细胞比例, 采用配对比较来分析组间差异。**结果** 对于两种细胞亚群的细胞比例, 3 种鞘液流速检测出来的结果之间均没有显著性差异 [Treg (%): 低速: 2.28 ± 0.76 , 中速: 2.22 ± 0.74 , 高速: 2.43 ± 0.93 ; CXCR4⁺ (%): 低速: 90.04 ± 4.18 , 中速: 90.08 ± 4.19 , 高速: 90.15 ± 4.17 ; 均 $P > 0.05$]。**结论** 鞘液流速不会影响两种细胞亚群比例的结果。

【关键词】 流式细胞术; 调节性 T 细胞; CXCR4

Effects of the sheath fluid stream flow rate on the detection of regulatory T cells and CXCR4⁺ cell subsets

Zhu Hong, Wang Chengbao. Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, Jiangsu, China

Corresponding author: Zhu Hong, Email: feiyv1234@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different sheath flow rates on the detection of regulatory T cells and CXCR4⁺ cell subsets. **Methods** Fifteen cases of fresh blood coagulation of peripheral blood were taken from physical examination staff, the percentage of the regulatory T cells and the CXCR4⁺ subpopulations were detected by low-speed, medium-speed and high-speed in three different sheath fluid flow rates. Pairwise comparisons were used to analyze differences between groups. **Results** There was no significant difference between the results of the three sheath flow rates detected for the cell proportions of the two cell subsets [Treg (%): low-speed: 2.28 ± 0.76 , medium-speed: 2.22 ± 0.74 , high-speed: 2.43 ± 0.93 ; CXCR4⁺ (%): low-speed: 90.04 ± 4.18 , medium-speed: 90.08 ± 4.19 , high-speed: 90.15 ± 4.17 ; both $P > 0.05$]. **Conclusion** The flow rate of the sheath fluid does not affect the results of the two cell subsets.

【Key words】 Flow cytometry; Regulatory T lymphocyte; C-X-C chemokine receptor type 4

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是近代细胞生物学、分子生物学、分子免疫学、流体力学、激光技术、电子计算机技术等学科和技术结合和发展的结晶, 是一种在蛋白水平上对单细胞或其他细胞粒子、抗原物质进行快速检测分析和分选的技术。流式细胞仪 (fluorescence-activated cell sorter, FACS) 能够快速分析单个细胞或粒子的多种特性, 既可以定性, 也可以定量, 尤其适用于大量样品检测。

在流式细胞仪上, 细胞由鞘液带动流过管路的速度一般有低速档、中速档和高速档 3 档。在临床检测中, 由于临床样本数量大, 对检测效率要求高,

且对被检测样本特性熟悉, 一般使用高速档进行检测。不过, 在进行基础研究时, 由于对检测样本特性不熟悉, 一般建议采用低速档进行检测, 这样做的目的是提高准确性, 但同时也牺牲了效率。

调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是 CD4⁺T 细胞亚群, 通过抑制自身反应性淋巴细胞来保持机体的自身耐受状态。叉头框蛋白 P3 (forkhead box protein P3, Foxp3) 是其特异标志物^[1], 目前一般接受 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 细胞亚群是 Treg 细胞。CXC 趋化因子受体 4 型 (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4), 即 CD184, 是一种七次跨膜的 G 蛋白偶

联受体^[2-3],其在体内分布非常广泛。目前认为其在体内的唯一配体是趋化因子配体 12〔chemokine (C-X-C motif) ligand 12, CXCL12〕。CXCR4/CXCL12 轴参与多个与免疫相关的生物学活动,如 B 细胞的抗体分泌^[4]、整合蛋白的激活^[5]和对淋巴细胞的趋化^[6]。

为了大量检测样本中的 Treg 和 CXCR4⁺ 细胞,能否在保证数据准确性的前提下,采用流式细胞仪的高速档进行检测?为此,我们对不同的流速下的检测结果进行了比较。

1 对象与方法:

1.1 研究对象 收集 15 例体检人员新鲜肝素锂抗凝外周血。

1.2 实验方法 采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。

1.2.1 Treg 淋巴细胞的流式检测 按照 Treg(美国 eBioscience 公司,货号:88-8999-40)说明书的步骤操作。过程简述如下:取新鲜抗凝全血 100 μ L,再加入稀释后的红细胞裂解液(美国 BD 公司)2 mL Vortex 旋涡混匀器混匀,室温避光孵育 10 min,300 $\times g$ 离心力室温离心 5 min,去上清,试管内保留约 50 μ L 残留液;向管中加 20 μ L CD4/CD25 混合染液,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;用 2 mL 冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤;离心,弃上清;加 1 mL Foxp 3 固定/透化缓冲液,混匀;在 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30~60 min;加

入 2 mL 透化缓冲液,离心,弃上清;用染色缓冲液(staining buffer)重悬浮细胞至 500 μ L,混匀,4 $^{\circ}$ C 避光放置至上机检测。

1.2.2 CXCR4⁺ 细胞亚群的流式检测 取新鲜抗凝全血 200 μ L,加入人 CD184(即 CXCR4⁺,德国 Miltenyi Biotec 公司)荧光抗体 10 μ L,将样本用 Vortex 旋涡混匀器混匀,室温避光孵育 15 min,加稀释后的红细胞裂解液 2 mL,混匀,避光孵育 10 min,300 $\times g$ 离心力离心 5 min 后,弃上清,用 2 mL PBS 洗涤 1 次,混匀,离心,弃上清,加入 500 μ L PBS 重悬浮, Vortex 旋涡混匀器混匀,4 $^{\circ}$ C 避光放置至上机检测。

1.3 统计学分析 用 FlowJo 7.6 软件分析流式数据,采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。3 组间比较采用重复测量的方差分析, $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检测速度对 Treg 细胞占 CD4⁺ 淋巴细胞比例的影响 我们将 15 例样本分别采用低速、中速和高速 3 种流速分析表型为 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 的 Treg 细胞占 CD4⁺ 淋巴细胞的比例,每个样本每种流速分别检测 3 次,再取平均值。实验结果表明,低速、中速和高速 3 种不同的流速下,检测到的 Treg 细胞占 CD4⁺ 淋巴细胞的比例之间没有统计学差异($P>0.05$)。图 1~2。

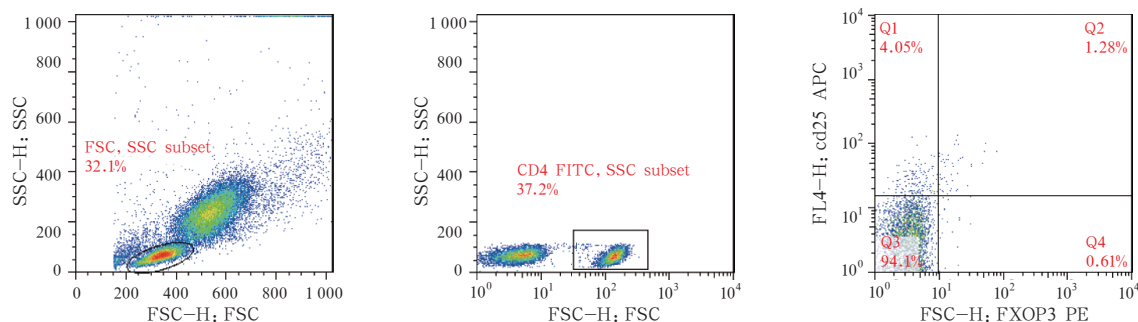


图 1 全血中的淋巴细胞亚群(左椭圆形门内)和亚群中的 CD4⁺ 细胞亚群(中方形门内),以及 CD4⁺ 细胞亚群中的 Treg(右 Q2,右上象限)

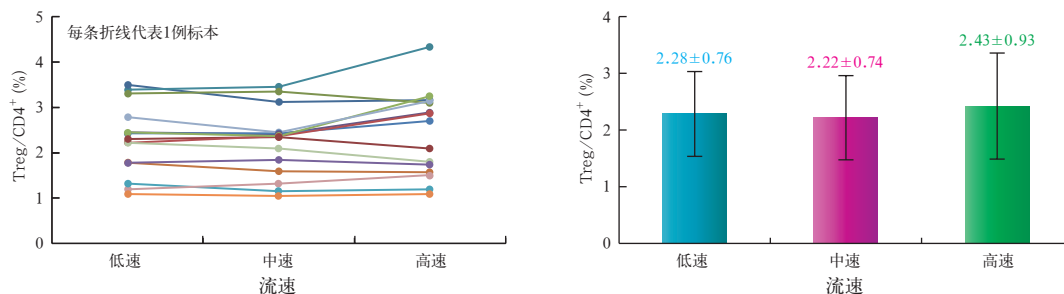


图 2 在不同检测速度时,标本中 Treg 占 CD4⁺ 细胞亚群比例的变化(左)及均值(右)比较

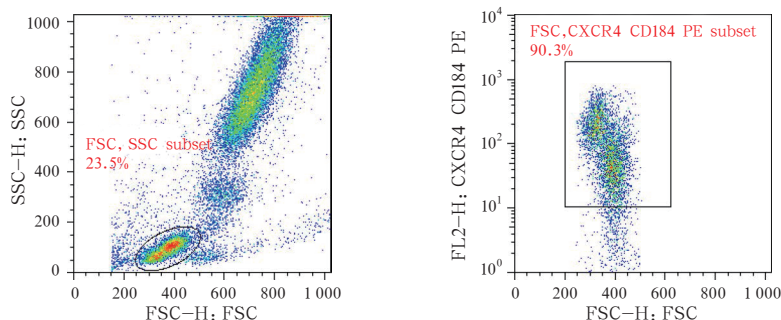


图3 全血中的淋巴细胞亚群(左,椭圆形门内)及亚群中的 CXCR4⁺ 细胞亚群(右,方形门内)

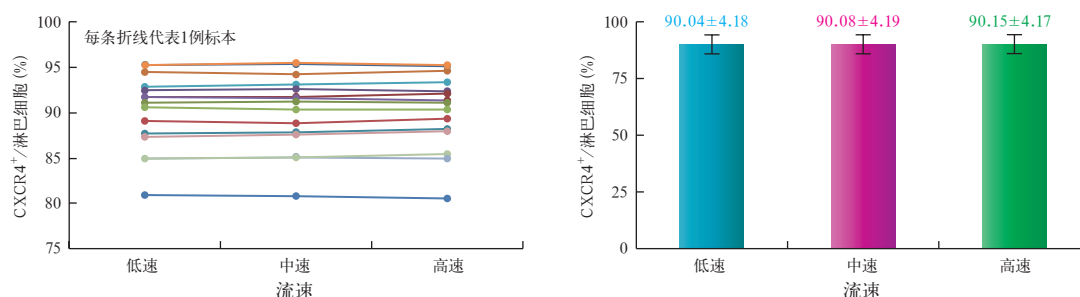


图4 在不同检测速度时,标本中 CXCR4⁺ 细胞占淋巴细胞亚群比例的变化(左)及均值(右)比较

2.2 不同检测速度对 CXCR4⁺ 阳性细胞占淋巴细胞比例的影响 我们将 15 例样本分别采用低速,中速和高速 3 种流速分别检测 CXCR4⁺(即 CD184⁺)细胞占淋巴细胞的比例,每个样本每种流速分别检测 3 次,再取平均值。实验结果表明,低速,中速和高速 3 种不同的流速下,检测到的 CXCR4⁺ 细胞占淋巴细胞的比例之间没有统计学差异($P>0.05$)。见图 3~4。

3 讨论

流式细胞术具有测量速度快、灵敏度高、分辨率高、操作简便等特点^[7]。目前流式细胞术在临床上主要用于检测淋巴细胞亚群、HLA-B27 抗原、肿瘤标志物、进行白血病免疫分型、微生物检测等。另外,流式细胞术也应用到外周血细胞分析和尿沉渣分析中。而在基础医学的研究中,流式细胞术的应用则更加广泛。

由于基础医学研究的样本不像临床研究样本数量大,样本的特点也很陌生,所以,在使用流式细胞仪进行基础研究时,常常要对仪器进行重新调试和校准,对实验条件进行摸索才能找到稳定的检测条件。本研究就是因为研究指标并不是经常检测的临床指标,所以,需要考察不同流速对检测结果的影响。从上述两个指标的检测结果可以看出,低速、中速和高速 3 种不同的进样速度,不会对我们的结

果产生差异。所以,我们在后面的研究中,放心地采用了高速档进行检测,这样在保证实验结果准确性的同时提高了检测的效率。

参考文献

- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells [J]. Nat Immunol, 2003, 4(4): 330-336.
- Lefrançois M, Lefebvre MR, Saint-Onge G, et al. Agonists for the chemokine receptor CXCR4 [J]. ACS Med Chem Lett, 2011, 2(8): 597-602.
- Zhan W, Liang Z, Zhu A, et al. Discovery of small molecule CXCR4 antagonists [J]. J Med Chem, 2007, 50(23): 5655-5664.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1 [J]. Nature, 1996, 382(6592): 635-638.
- Peled A, Kollet O, Ponomarev T, et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34⁺ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice [J]. Blood, 2000, 95(11): 3289-3296.
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, et al. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) [J]. J Exp Med, 1996, 184(3): 1101-1109.
- 胡小倩,王素霞,曹明善. 肺癌患者外周血 DNT 细胞和 T 淋巴细胞亚群检测的临床意义 [J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7(3): 157, 180-181.

(收稿日期: 2017-06-17)

(本文编辑: 杨程伍 李银平)