

技术与方法

小鼠肺组织单个核细胞三种分离方法的比较研究

余倩¹ 李寅时¹ 郑旭然¹ 阿比旦·艾尼瓦尔¹ 刘览² 李静¹ 张传山^{1,2} 王慧^{1,2*}

(¹新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830017; ²新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院,
省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

摘要 该文综合比较了三种不同方法分离小鼠肺组织单个核细胞的效果, 并提供了一种能够有效分离小鼠肺脏全免疫细胞亚群的方法。将15只6~8周龄雌性C57BL/6小鼠随机分为三组($n=5$ 只/组), 分别为研磨+淋巴细胞分离液梯度离心分离组(M1组)、胶原酶IV消化+淋巴细胞分离液梯度离心分离组(M2组)和胶原酶IV消化分离组(M3组)。采用颈椎脱臼处死法处死小鼠, 摘取肺脏, 再分别采用上述三种方法制备小鼠肺脏单个核细胞悬液, 于显微镜下拍照并计数, 流式细胞术检测单个核细胞悬液中不同免疫细胞亚群的比例和数量, 采用SPSS 26.0软件进行统计分析。结果显示, M3组制备的肺单个核细胞数量显著高于M1和M2组($F=44.49, P<0.001$); M2组制备的肺单个核细胞中NK($F=16.68, P<0.001$)、 $CD4^+$ T($F=12.28, P<0.01$)和B细胞($F=4.49, P<0.05$)比例均显著高于M1和M3组; M3组制备的肺 $CD3^+$ T、MDSC、中性粒细胞和间质巨噬细胞的比例显著高于M1和M2组; M3组制备的肺NK、 $CD3^+$ T、 $CD4^+$ T、 $CD8^+$ T、B细胞以及髓系细胞(MDSC、中性粒细胞、DC、肺泡巨噬细胞和间质巨噬细胞)的数量均显著高于M1和M2组。应用胶原酶IV消化直接分离法制备的小鼠肺组织单个核细胞得率最高, 可有效分离到小鼠肺脏NK、T、B等淋巴细胞以及髓系来源免疫细胞亚群, 且操作过程简便。该研究为肺部相关疾病的免疫学发病机制研究提供实验基础。

关键词 小鼠; 肺脏; 单个核细胞; 分离; 免疫细胞亚群

Comparative Study on Three Methods for Isolating Mononuclear Cells from Mouse Lung Tissue

YU Qian¹, LI Yinshi¹, ZHENG Xuran¹, AINIWAER·Abidan¹, LIU Lan², LI Jing¹, ZHANG Chuanshan^{1,2}, WANG Hui^{1,2*}

(¹Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; ²Clinical Medicine Institute, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in Central Asia, Urumqi 830054, China)

Abstract This study comprehensively compared the effects of three different methods for isolating mononuclear cells from mouse lung tissue, and provided an effective method for isolating the subpopulations of

收稿日期: 2023-09-12

接受日期: 2023-11-29

国家重点研发计划(批准号: 2021YFC2300800、2021YFC2300802)、新疆维吾尔自治区天山创新团队计划(批准号: 2023D14009)、国家自然科学基金(批准号: 82160397)和省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题(批准号: SKL-HIDCA-2022-BC1)资助的课题

*通信作者。Tel: 18690272966, E-mail: wangh0923@126.com

Received: September 12, 2023

Accepted: November 29, 2023

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2021YFC2300800, 2021YFC2300802), the Xinjiang Uygur Autonomous Region Tianshan Innovation Team Program (Grant No.2023D14009), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82160397), and the State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention and Treatment of Central Asia High Incidence Diseases Fund (Grant No.SKL-HIDCA-2022-BC1)

*Corresponding author. Tel: +86-18690272966, E-mail: wangh0923@126.com

mouse lung immune cells. Fifteen female C57BL/6 mice (6-8 weeks old) were randomly divided into three groups ($n=5/\text{group}$), including the grinding with lymphocyte separation solution gradient centrifugation group (M1 group), collagenase IV digestion with lymphocyte separation solution gradient centrifugation group (M2 group), and collagenase IV digestion group (M3 group). The mice were sacrificed by cervical dislocation, and their lungs were extracted. The suspension of lung mononuclear cells was prepared by the above three methods, and photographed and counted under the microscope. The proportion and number of different immune cell subsets in lung tissues were detected by flow cytometry. Statistical analysis was conducted using SPSS 26.0 software. The results showed that the number of lung mononuclear cells in the M3 group was significantly higher than that in the M1 and M2 groups ($F=44.49, P<0.001$). the proportion of NK ($F=16.68, P<0.001$), $CD4^+$ T ($F=12.28, P<0.01$) and B cells ($F=4.49, P<0.05$) in lung mononuclear cells in M2 group were higher than that in the M1 and M3 groups, and the proportion of $CD3^+$ T, MDSC, neutrophils and lung interstitial macrophages prepared in M3 group was significantly higher than that in the M1 and M2 groups; the number of NK cells, $CD3^+$ T, $CD4^+$ T, $CD8^+$ T, B cells, and myeloid cells (MDSC, neutrophils, DC and macrophages) prepared in M3 group were higher than that in the M1 and M2 groups. M3 group obtained the highest yield of lung mononuclear cells in mouse, and this method could effectively separate the lung NK, T, B lymphocytes and subpopulations of myeloid derived immune cells. This study provides an experimental basis for the immunological pathogenesis of lung related diseases.

Keywords mice; lung; mononuclear cell; isolation; immune cell subpopulation

肺脏是机体维持生命活动重要的呼吸器官。据统计, 每年约有700万人死于肺部疾病, 约占全球死亡病例的六分之一^[1]。肺脏的主要功能是呼吸, 它是气体交换的场所, 同时也具有免疫防御和代谢功能, 在抵御有害物质的入侵中发挥重要作用^[2-4]。肺脏主要由上皮细胞、基底细胞、内皮细胞和各类免疫细胞等组成^[3-5], 肺脏中的免疫细胞可以感知外界环境带来的各种变化, 以保证肺部免疫系统的稳定。一旦肺部免疫细胞功能发生失调, 则会导致多种肺部疾病的发生。因此, 研究机体肺脏免疫细胞亚群的功能变化, 对阐明肺部相关疾病的发病机制, 探索有效的防治策略具有重要意义。

小鼠遗传背景清晰, 其生理生化和发育过程与人类相似, 基因组和人类98%同源, 已成为研究人类基因功能和肺部等疾病发病机制最为理想的实验动物^[6]。因而, 建立一种高效分离小鼠肺脏全免疫细胞的方法, 是开展小鼠肺部疾病免疫学研究的前提。本研究结合以往小鼠肝脏、脾脏等实质器官淋巴细胞的分离经验, 分别采用研磨+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心、胶原酶IV消化+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心和胶原酶IV消化三种不同分离方法, 制备小鼠肺组织的单个核细胞悬液, 通过流式细胞术检测并分析小鼠肺脏中不同免疫细胞亚群的比例和数

量, 综合比较三种方法的分离效果, 旨在提供一种高效制备小鼠肺脏全免疫细胞亚群的方法, 为研究肺部相关疾病的免疫学发病机制提供实验平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 15只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)的6~8周龄雌性C57BL/6小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号: SCXK(京)2021-0006], 饲养于新疆医科大学实验动物中心。本文中所有涉及小鼠的实验方案均经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准, 批准编号为K202206-27。

1.1.2 主要试剂及仪器 实验试剂主要包括: 胶原酶IV(collagenase IV)、脱氧核糖核酸酶I(deoxyribonuclease I, DNase I)和牛血清白蛋白(BSA)均购自美国Sigma-Aldrich公司; RPMI 1640培养基购自美国BI公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 小鼠脏器组织淋巴细胞分离液试剂盒(lymphocyte separation solution, LSM)购自北京索莱宝科技有限公司; $10\times$ 红细胞裂解液($10\times$ RBC lysis buffer)和抗小鼠(anti-mouse) CD16/32、各类流式细胞检测抗体均购自美国Biole-

gend公司; 1× PBS购自美国Hyclone公司。实验仪器主要包括: 流式细胞仪(BD, BD LSRFortessa™ Cell Analyzer 649225B5)购自美国BD公司; 恒温摇床(ZWY-240)购自上海智城分析仪器制造有限公司; 低速冷冻离心机(Centrifuge 5424 R)购自德国Eppendorf公司; 细胞培养皿(60 mm×75 mm)和离心管(15 mL)购自无锡耐思生命科技股份有限公司。

1.1.3 试剂配制 参照文献[7]的方法, 配制胶原酶IV消化液, 此消化液包含胶原酶IV、DNase I、RPMI 1640培养基、胎牛血清, 详见表1。使用灭菌水将10× 红细胞裂解液(10× RBC lysis buffer)配制为1× RBC备用。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠肺脏组织的采集 采用眼球取血法放血后进行颈椎脱臼处死小鼠, 打开胸腔, 迅速摘取完整的肺脏组织置于平皿中, 用无菌PBS缓冲液清洗残留血液并去除多余软组织, 备用。

1.2.2 研磨+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心分离组(method 1, M1) 将摘取的5只小鼠肺脏组织分别放入74 μm钢网中, 加入适量含0.2% BSA(bovine serum albumin)的PBS, 剪碎(1 mm×1 mm×1 mm), 用5 mL注射器活塞研磨获得肺脏细胞悬液, 过滤至15 mL离心管, 25 °C、2 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用5 mL RPMI 1640培养基重悬, 并缓缓转移至预先装有5 mL LSM的15 mL离心管中, 保持液面分界清晰^[8], 25 °C、800 ×g, 升6降2, 梯度离心30 min; 离心后液体由上至下分四层, 小心吸取第二层环状乳白色淋巴细胞至新的15 mL离心管中, 加入含0.2% BSA的PBS至10 mL, 25 °C、250 ×g离心10 min, 弃上清; 加入1 mL红细胞裂解液重悬细胞, 冰上孵育12 min后加入10 mL PBS终止, 25 °C、2 000 r/min离心5 min, 弃上清; 最后加入1 mL PBS重悬备用。

1.2.3 胶原酶IV消化+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心分离组(method 2, M2) 按照表1^[7]配制消

化液, 提前预热至室温; 将摘取的5只小鼠肺脏组织分别浸入含500 μL消化液的细胞培养皿中, 剪碎(1 mm×1 mm×1 mm), 再加入2 mL消化液, 于37 °C振荡消化(120 r/min离心30 min), 结束后用注射器活塞在钢网上研磨粗大组织块, 并将细胞悬液过滤至离心管中, 25 °C、2 000 r/min离心5 min, 弃上清; 后续使用小鼠淋巴细胞分离液分离, 方法与1.2.2相同。

1.2.4 胶原酶IV消化直接分离组(method 3, M3) 按照1.2.3的方法将摘取的5只小鼠肺脏组织分别剪碎, 加入3.5 mL消化液, 于37 °C振荡消化(200 r/min离心60 min, 每15 min混匀1次), 消化结束后按照1.2.3收集细胞悬液, 离心弃上清, 直接加入2 mL红细胞裂解液重悬细胞, 冰上孵育12 min后加入10 mL PBS缓冲液终止, 25 °C、2 000 r/min离心5 min, 弃上清; 最后加入1 mL PBS重悬备用。

三种方法提取小鼠肺脏单个核细胞的流程见图1。

1.2.5 小鼠肺单个核细胞的形态学观察 于光学显微镜下观察肺单个核细胞的形态, 并吸取10 μL细胞悬液与10 μL锥虫蓝溶液混合, 取10 μL混悬液加入细胞计数板中, 于镜下计数。

1.2.6 流式细胞术检测小鼠肺脏免疫细胞亚群 细胞计数后, 分别取 1×10^6 的小鼠肺单个核细胞至1.5 mL离心管中, 4 °C、6 000 r/min离心2 min, 弃上清, 加入30 μL Anti-CD16/32(1:100), 4 °C封闭30 min, 加入预先配制好的流式检测抗体, 4 °C避光放置30 min, 加500 μL PBS, 4 °C、6 000 r/min离心2 min, 弃上清, 加300 μL PBS重悬细胞, 使用74 μm尼龙网过滤后上流式细胞仪进行检测, 使用FlowJo-10应用软件进行分析。小鼠肺脏免疫细胞流式检测抗体见表2。

1.2.7 统计学分析 实验数据采用GraphPad Prism 8.0软件进行作图, 采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因

表1 小鼠肺组织消化液组分表(根据参考文献[7]修改)

Table 1 The components of digestive fluid for mouse lung tissue (modified from reference [7])

试剂 Reagent	每1 mL中的含量 Content per 1 mL
RPMI 1640	775 μL
Collagenase IV (10 mg/mL)	100 μL
DNase I (2 000 U/mL)	25 μL
Fetal bovine serum	100 μL

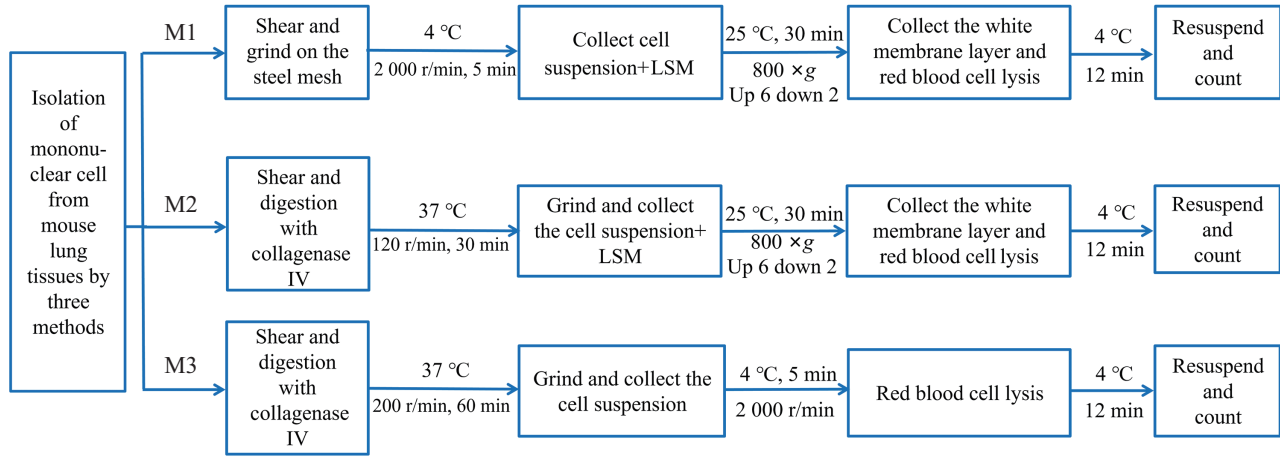


图1 三种方法提取小鼠肺脏单个核细胞流程图

Fig.1 Flow chart of three methods for extracting mouse lung mononuclear cells

表2 小鼠肺脏免疫细胞流式检测抗体

Table 2 Antibodies for detecting mouse lung mononuclear cells

荧光抗体名称 Fluorescent antibody name	克隆号 Clone No.	厂家 Manufacturer
FITC anti-mouse/human CD11b antibody	M1/70	Biologend
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse Ly6G/Ly6C (Gr-1) antibody	RB6-8C5	Biologend
PE/Dazzla™ 594 anti-mouse I-A/I-E antibody	M5/114.15.2	Biologend
APC anti-mouse CD11c antibody	N418	Biologend
PE/Cyanine7 anti-mouse CD19 antibody	6D5	Biologend
PE/Cyanine7 anti-mouse NK1.1 antibody	PK136	Biologend
FITC anti-mouse CD3 antibody	17A2	Biologend
Brilliant Violet 605™ anti-mouse CD4 antibody	GK1.5	Biologend
APC/Cyanine7 anti-mouse CD8a antibody	53-6.7	Biologend
APC/Cyanine7 anti-mouse Ly6G antibody	1A8	Biologend

素方差分析 (One-Way ANOVA), 两组之间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

2 结果

2.1 小鼠肺脏组织单个核细胞的形态学观察和计数

光镜下显示上述三种分离方法制备的小鼠肺组织单个核细胞的形态完整多样、大小不一, 其中 M3 组细胞密度最高 (图 2A)。计数结果显示 M1、M2 和 M3 三种方法制备的小鼠肺脏单个核细胞数量分别为 $(0.40 \pm 0.26) \times 10^6$ 、 $(0.92 \pm 0.65) \times 10^6$ 和 $(2.96 \pm 0.49) \times 10^6$, M3 组获得的肺脏单个核细胞数量显著高于 M1 组和 M2 组 ($F = 44.49$, $P < 0.001$) (图 2B)。锥虫蓝染色结果显示三组小鼠肺组织单个核细胞活性较好, 无明显差

异。

2.2 流式细胞术检测小鼠肺脏免疫细胞亚群代表性分析策略

使用流式细胞术对上述三种分离方法制备的小鼠肺脏单个核细胞进行检测, 分析小鼠肺脏各类免疫细胞亚群特征, 包括: NK 细胞 ($NK1.1^+CD3^-$)、T 细胞 ($NK1.1^-CD3^+$)、 $CD4^+$ T 细胞 ($NK1.1^-CD3^+CD4^+CD8^-$)、 $CD8^+$ T 细胞 ($NK1.1^-CD3^+CD4^-CD8^+$)、B 细胞 ($CD19^+$) 和骨髓来源的抑制性细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs, $CD11b^+Gr-1^+$)、中性粒细胞 (neutrophils, NEs, $CD11b^+Ly6G^+$)、树突状细胞 (dendritic cells, DCs, $CD11c^+F4/80^-$)、肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AMs, $F4/80^+CD11c^+$) 和间质巨噬细胞 (interstitial macrophages, IMs, $F4/80^+CD11c^-$) 等髓系来源免疫细胞亚群^[9-11]的代表性设门策略 (图 3)。

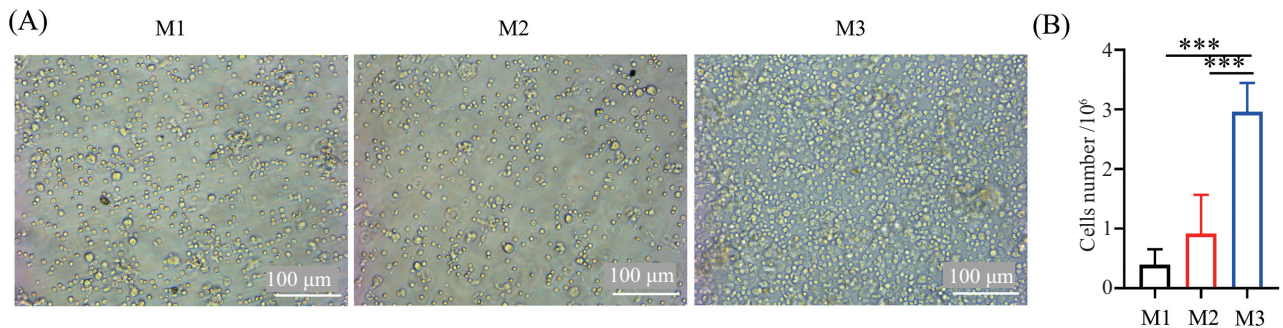
2.3 小鼠肺脏组织单个核细胞中NK和T细胞亚群分析

流式细胞术分析结果显示, M2组制备的肺单个核细胞中NK细胞的比例显著高于M1组 [M1 vs M2 vs M3: $(4.20 \pm 1.42)\%$ vs $(22.66 \pm 9.33)\%$ vs $(8.62 \pm 1.85)\%$, $F=16.68$, $P<0.001$], M3组制备的肺单个核细胞中NK细胞的数量显著高于M1和M2组 [M1 vs M2 vs M3: $(0.51 \pm 0.59) \times 10^4$ vs $(3.41 \pm 2.72) \times 10^4$ vs $(10.28 \pm 3.77) \times 10^4$, $F=16.21$, $P<0.001$] (图4A和图4B)。M3组制备的肺 $CD3^+$ T的比例 [M1 vs M2 vs M3: $(3.33 \pm 1.09)\%$ vs $(15.88 \pm 3.49)\%$ vs $(27.48 \pm 4.70)\%$, $F=54.19$, $P<0.001$]和数量 [M1 vs

M2 vs M3: $(0.04 \pm 0.05) \times 10^5$ vs $(0.28 \pm 0.23) \times 10^5$ vs $(3.32 \pm 1.14) \times 10^5$, $F=31.34$, $P<0.001$]均显著高于M1和M2组(图4A和图4D)。进一步对T细胞亚群分析显示, M2组制备的肺 $CD4^+$ T细胞比例高于M1和M3组 ($F=12.28$, $P<0.01$), M1组、M3组制备的肺 $CD8^+$ T细胞比例高于M2组 ($F=17.78$, $P<0.001$), 而M3组制备的肺 $CD4^+$ T和 $CD8^+$ T细胞数量均显著高于M1和M2组 ($CD4^+$ T: $F=34.00$, $P<0.001$; $CD8^+$ T: $F=20.47$, $P<0.001$) (图4C、图4E和图4F)。

2.4 小鼠肺脏组织单个核细胞中B细胞亚群分析

流式细胞术分析结果显示, M2组制备的肺单个核细胞中B细胞的比例显著高于M1组 [M1 vs M2 vs



A: 肺脏单个核细胞形态学观察; B: 肺脏单个核细胞计数。*** $P<0.001$ 。

A: morphological observation of lung mononuclear cells; B: lung mononuclear cell count. *** $P<0.001$ 。

图2 三种方法提取小鼠肺脏单个核细胞形态学观察和计数结果

Fig.2 Morphological observation and cell counting results of three methods for extracting mouse lung mononuclear cells

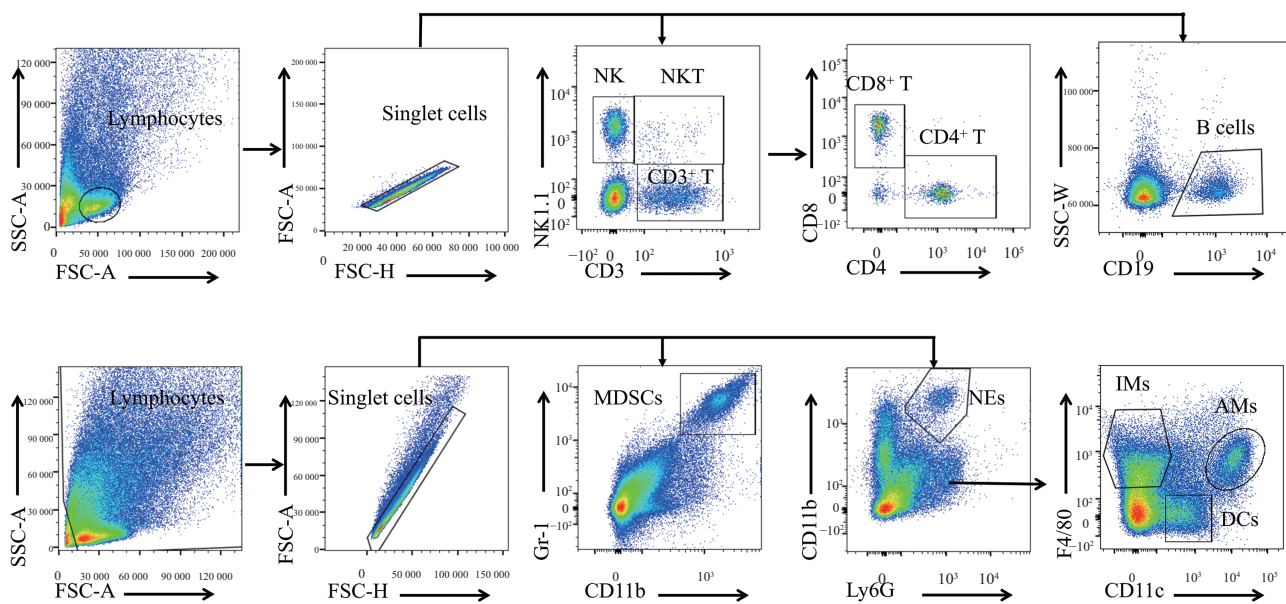
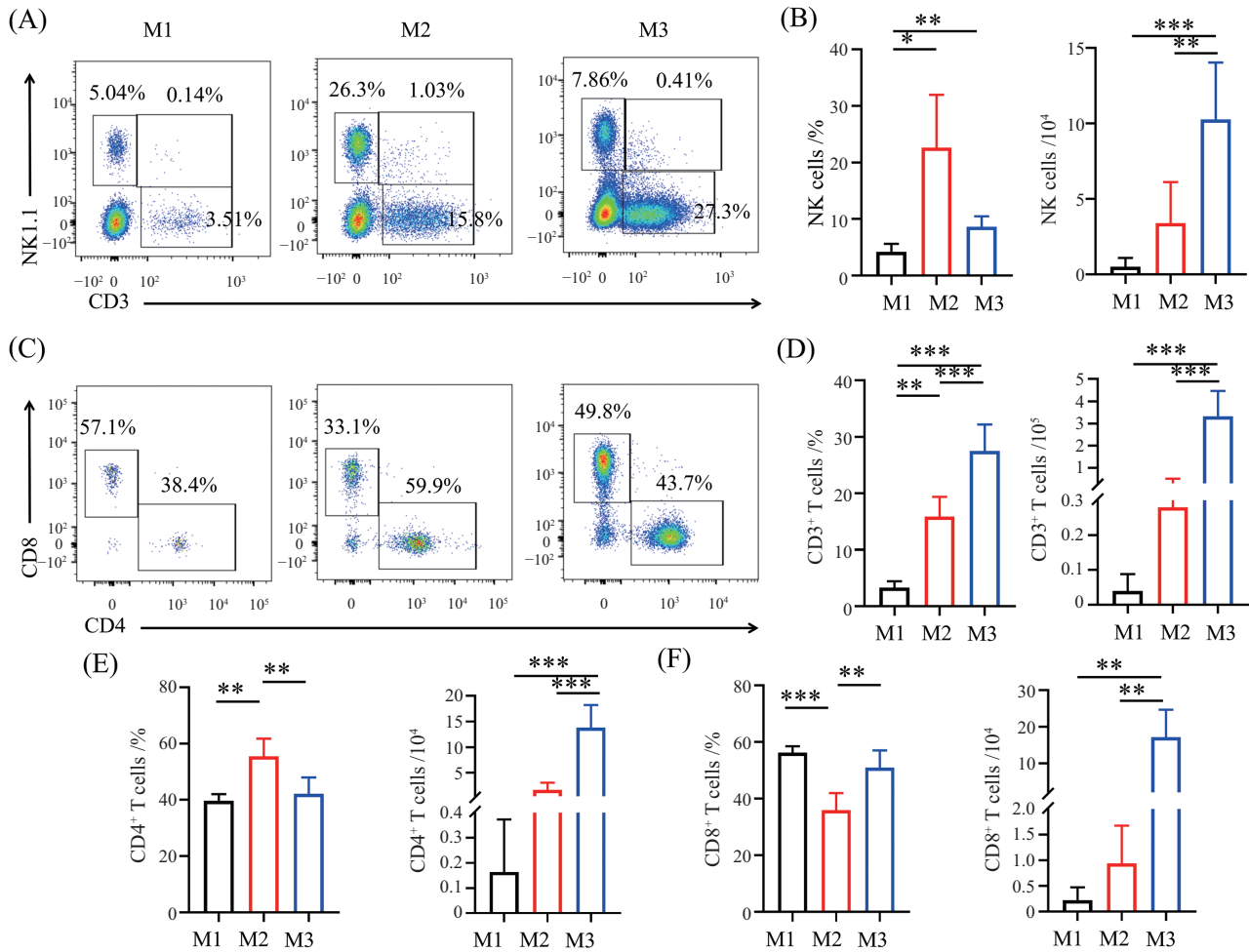


图3 小鼠肺脏不同免疫亚群代表性设门策略图

Fig.3 Representative gating strategies for different immune subpopulations in mouse lungs



A: NK和CD3⁺ T细胞流式细胞检测代表图; B: NK细胞比例及数量; C: CD4⁺ T和CD8⁺ T细胞流式细胞检测代表图; D: CD3⁺ T细胞比例及数量; E、F: CD4⁺ T和CD8⁺ T细胞比例及数量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: representative flow cytometry plots of NK and CD3⁺ T cells; B: the proportion and number of NK cells; C: representative flow cytometry plots of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells; D: the proportion and number of CD3⁺ T cells; E, F: the proportion and number of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图4 三种方法提取小鼠肺脏中NK、T细胞亚群分析

Fig.4 Analysis of NK and T cell subpopulations extracted from mouse lung tissues using three methods

M3: (8.20±3.23)% vs (14.90±4.74)% vs (12.08±2.22)%, $F=4.49$, $P < 0.05$]; M3组制备的B细胞的数量显著高于M1和M2组[M1 vs M2 vs M3: (1.09±1.10)×10⁴ vs (3.72±2.40)×10⁴ vs (15.27±4.50)×10⁴, $F=29.16$, $P < 0.001$](图5A和图5B)。

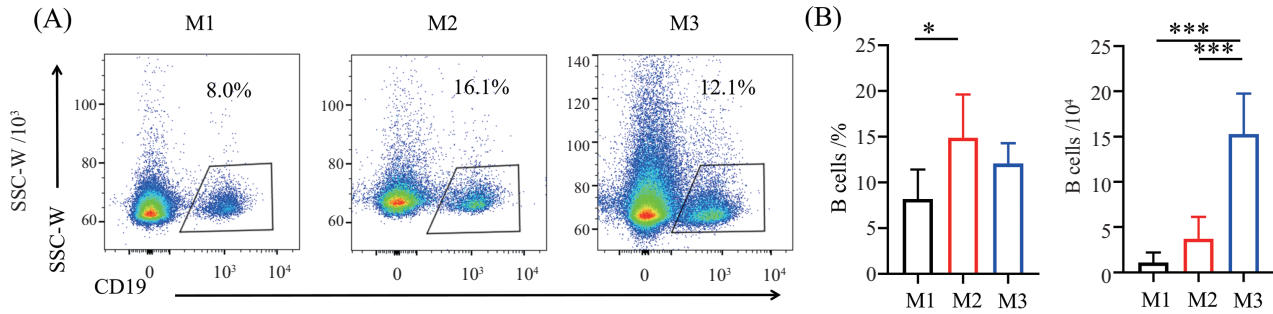
2.5 小鼠肺脏组织单个核细胞中髓系来源细胞亚群分析

流式细胞术分析结果显示, M3组制备的肺MDSC的比例[M1 vs M2 vs M3=(0.17±0.06)% vs (3.12±1.06)% vs (6.00±1.36)%, $F=37.38$, $P < 0.001$]和数量[M1 vs M2 vs M3: (0.06±0.05)×10⁴ vs (1.93±1.41)×10⁴ vs (15.37±5.49)×10⁴, $F=27.86$, $P < 0.001$]均显著高于M1和M2组(图6A和图6B)。M3组制备的肺中性粒细胞

的比例及数量均高于M1和M2组($F=41.03$ 和 29.01 , $P < 0.001$)(图6C和图6D)。M2和M3组制备的肺AMs细胞亚群比例显著高于M1组($F=8.86$, $P < 0.01$), M3组AMs细胞亚群数量显著高于M1和M2组($F=25.40$, $P < 0.001$); M3组制备的肺IMs细胞亚群比例和数量显著高于M1和M2组($F=87.03$ 和 98.35 , $P < 0.001$)(图6E~图6G)。M1、M2和M3组制备的肺DC细胞亚群比例差异无统计学意义, M3组制备的肺DC细胞数量显著高于M1组($F=10.33$, $P < 0.01$)(图6H)。

3 讨论

肺是机体与外界环境进行气体交换获取氧气的场所, 由于肺部经常暴露在外界环境中, 同时也是



A: B细胞流式细胞检测代表图; B: B细胞比例及数量。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: representative flow cytometry plots of B cells; B: the proportion and number of B cells. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

图5 三种方法提取小鼠肺脏中B细胞分析

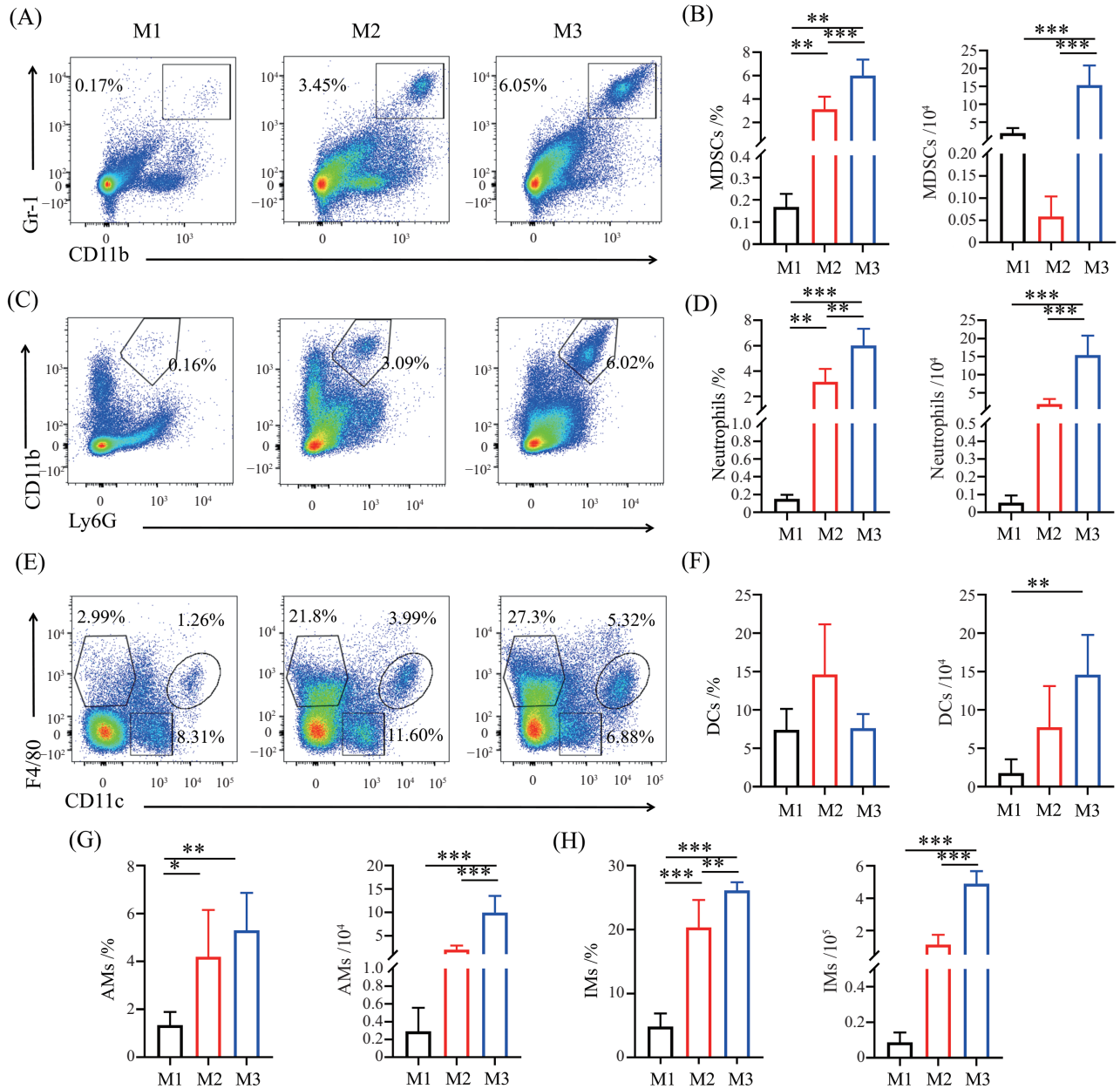
Fig.5 Analysis of B cells extracted from mouse lung tissues using three methods

细菌、病毒等有害抗原进入机体的主要入口,因此很容易受到损害,从而导致感染、损伤和疾病的发生。肺脏包含T细胞、NK细胞、B细胞、MDSC、DC和巨噬细胞等多种免疫细胞^[12-13],各免疫细胞亚群的功能状态对抵御外界有害病原体的入侵和抑制肺部疾病的发生发展至关重要。流式细胞术是近年来发展起来的一项广泛应用于生命科学和医学研究领域的强大技术,能够进行细胞分群鉴定,细胞功能分子、细胞周期和凋亡检测等^[14-15]。流式细胞术检测分析均以有效获得单个细胞为基础,细胞数量不足、细胞死亡黏连成块、样品中含杂质碎片过多等,都会影响到检测的准确性或导致失败^[16]。因而,制备适宜的单细胞悬液是确保其准确检测和分析的关键环节。

目前,小鼠肺组织单细胞悬液的制备主要采用传统的研磨法^[17]或酶消化法^[18-20],再通过细胞密度梯度离心获得小鼠肺组织单细胞悬液。本研究结合小鼠肝脏、脾脏等实质器官淋巴细胞的分离经验,分别采用研磨+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心(M1)、胶原酶IV消化+小鼠淋巴细胞分离液梯度离心(M2)和胶原酶IV消化+红细胞裂解液直接裂解分离(M3)三种方法进行小鼠肺组织的单个核细胞悬液的制备。由于肺脏免疫微环境在小鼠发育不同时期有所不同,胚胎晚期的肺主要由特殊的增殖性巨噬细胞组成;出生时肺免疫细胞的异质性显著增加,从未成熟的、增殖的巨噬细胞为主的胚胎环境转变为由多种类型的巨噬细胞、树突状细胞、粒细胞和淋巴细胞组成的复杂环境;出生1周,肺泡巨噬细胞和间质巨噬细胞群出现,出生3周淋巴细胞的丰度从出生前的几乎为零增加到占肺免疫细胞的一半以上,以

CD4⁺和CD8⁺T细胞为主^[21]。本研究选取6~8周龄小鼠进行研究,结果显示M3组分离到的单个核细胞得率最高,M1组分离到的单个核细胞得率最低,其原因可能是由于肺固有层中含有胶原纤维、弹性纤维和网状纤维、纤维细胞等^[22],使用研磨法不能够彻底分离肺组织、含有较多的组织块,且对组织的损伤较大,易引起细胞损伤和丢失,因而分离到的细胞数量偏少;而使用胶原酶能够降解肺组织中的天然胶原和网状纤维,有效水解结缔组织和上皮组织细胞外基质内的其他蛋白、多糖和脂质,使得肺组织分离较彻底,因而分离到的细胞数量相对较多^[23]。本研究采用含有较低胰酶活性的胶原酶IV对肺组织进行消化,不仅可以获得更多的单个核细胞,还可有效限制对膜蛋白和受体的损伤,以下几个环节较为关键:(1) 37 °C消化肺组织可提高分离效果,其余步骤保持在4 °C有助于提高细胞存活率;(2) 消化液需新鲜配制且恢复室温后使用,否则将直接影响分离效果;(3) 严格控制消化时间,防止解离过度或解离不足导致单个核细胞数量减少。对三种分离方法获得的小鼠肺组织的单个核细胞悬液进行流式细胞术分析显示,M1组获得的肺脏NK、T、B和其他髓系来源细胞的比例和数量均显著低于M2或M3组;M2组获得的肺NK细胞亚群比例最高,适用于对NK细胞介导的肺部疾病的研究;而M3组获得的肺T、B细胞以及髓系来源免疫细胞亚群(MDSC、中性粒细胞和巨噬细胞)的比例均显著高于M1和M2组,能够有效分离到小鼠肺脏全免疫细胞亚群。

综上,本研究通过比较以上三种分离方法制备的小鼠肺组织单个核细胞的数量和免疫细胞亚群构成,筛选出使用M3组,即胶原酶IV消化获得



A: MDSC细胞流式细胞检测代表图; B: MDSC细胞比例及数量; C: 中性粒细胞流式细胞检测代表图; D: 中性粒细胞比例及数量; E: 小鼠肺巨噬细胞和DC细胞亚群流式细胞检测代表图; F: AMs和IMs细胞比例; G: AMs和IMs细胞数量; H: DC细胞比例及数量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: representative flow cytometry plots of MDSC cells; B: the proportion and number of MDSC cells; C: representative flow cytometry plots of neutrophils; D: the proportion and number of neutrophils; E: representative flow cytometry plots of mouse pulmonary macrophages and DC cells; F: the proportion of AMs and IMs; G: the number of AMs and IMs; H: the proportion and number of DC cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图6 三种方法提取小鼠肺脏中髓系来源细胞亚群分析

Fig.6 Analysis of myeloid derived cell subpopulations extracted from mouse lung tissues using three methods

细胞悬液, 再使用红细胞裂解液直接裂解制备的小鼠肺组织单个核细胞得率最高, 且能够有效分离到小鼠肺脏NK、T、B等淋巴细胞以及MDSC、巨噬细胞等髓系来源的免疫细胞亚群。此分离方法操作过程简便, 为肺部相关疾病的免疫学发病机制研究提供了实验基础, 更好地推动了肺部疾

病的研究进展。

参考文献 (References)

- [1] SCHILLER H B, MONTORO D T, SIMON L M, et al. The human lung cell atlas: a high-resolution reference map of the human lung in health and disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(1): 31-41.

- [2] BRANCHETT W J, LLOYD C M. Regulatory cytokine function in the respiratory tract [J]. *Mucosal Immunol*, 2019, 12(3): 589-600.
- [3] 孟小高, 彭广敦. 单细胞测序技术在肺发育中的研究进展[J]. *生命科学*(MENG X G, PENG G D. Study progress of scRNA-seq in the lung development [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2022, 34(1): 99-106.
- [4] 朱子晗, 李晴晴, 熊心雨, 等. 肺部微生态在肺免疫炎症活动中的作用及研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*(ZHU Z H, LI Q Q, XIONG X Y, et al. The role and study progress of pulmonary microecology in pulmonary immune inflammatory activity [J]. *Journal of Mudanjiang Medical University*), 2022, 43(5): 152-4,47.
- [5] INVERNIZZI R, LLOYD C M, MOLYNEAUX P L. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs [J]. *Immunology*, 2020, 160(2): 171-82.
- [6] MATUTE-BELLO G, FREVERT C W, MARTIN T R. Animal models of acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3): L379-99.
- [7] 鲍春彤. 胸膜肺炎放线杆菌诱导的肺脏细胞因子应答特征和IL-21作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [8] 张喆. 阿胶、黄明胶对COPD模型小鼠及肺纤维化模型小鼠的干预作用及作用机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- [9] BLOMBERG O S, SPAGNUOLO L, GARNER H, et al. IL-5-producing CD4⁺ T cells and eosinophils cooperate to enhance response to immune checkpoint blockade in breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2023, 41(1): 106-23, e110.
- [10] BEDORET D, WALLEMACQ H, MARICHAL T, et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3723-38.
- [11] 丛靖婧. 肺癌微环境NK细胞的功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- [12] CARBONE D P, GANDARA D R, ANTONIA S J, et al. Non-small-cell lung cancer: role of the immune system and potential for immunotherapy [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(7): 974-84.
- [13] STANKOVIC B, BJORHOVDE H A K, SKARSHAUG R, et al. Immune cell composition in human non-small cell lung cancer [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 3101.
- [14] 张英, 李莉, 任林柱, 等. 开设“流式细胞术”实验课提高研究生实践能力[J]. *实验室研究与探索*(ZHANG Y, LI L, REN L Z, et al. Setting flow cytometry experiment lesson to raise graduates' practice ability [J]. *Research and Exploration in Laboratory*), 2015, 34(5): 182-5.
- [15] 黄莹莹, 邢月婷, 阿依西布·萨吾提, 等. “小鼠脾脏单细胞悬液不同制备方法及其流式细胞术检测”综合实验的建立与探索[J]. *中国细胞生物学报*(HUANG Y Y, XING Y T, SAWUTI A, et al. Establishment and preliminary study of comprehensive experiment of “different preparation methods and flow cytometry detection of mouse spleen single cell suspension” [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2023, 45(4): 680-7.
- [16] 张远圆, 张杉杉, 常旭, 等. 机械法与机械-酶消化法制备大鼠膈肌组织单细胞悬液比较[J]. *中国组织工程研究*(ZHANG Y Y, ZHANG S S, CHANG X, et al. Preparing single cell suspension of rat diaphragm tissues: mechanical grinding versus mechanical-enzymatic digestion [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*), 2020, 24(8): 1213-7.
- [17] 任兴昌, 方黎, 陈洪勋. 实体组织单细胞悬液制备方法[J]. *临床与实验病理学杂志*(REN X C, FANG L, CHEN H X. Preparation method of solid tissue single cell suspension [J]. *J Clin Exp Pathol*), 2007(4): 490-1.
- [18] 刘军, 张朋书, 于晴, 等. 一种高效的小鼠肺单细胞悬液制备方法的研究[J]. *东南大学学报(医学版)*(LIU J, ZHANG P S, YU Q, et al. A method for isolation of single-cell suspensions from lung in mice [J]. *Journal of Southeast University, Medical Edition*), 2012, 31(2): 143-6.
- [19] 田翠, 王霞, 李因, 等. 流式细胞术检测小鼠心脏组织中炎症细胞浸润的方法探讨[J]. *中国分子心脏病学杂志*(TIAN C, WANG X, LI N, et al. The method study of detecting inflammatory cells infiltration in mice heart by flow cytometry [J]. *Molecular Cardiology of China*), 2016, 16(3): 1737-9.
- [20] 黄昕, 徐祥文, 高雅姝, 等. 改良联合酶消化法制备人瘢痕疙瘩组织单细胞悬液的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*(HUANG X, XU X W, GAO Y S, et al. Preparation of single-cell suspensions from human keloid tissue by modified combined enzyme digestion [J]. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*), 2019, 15(6): 398-402.
- [21] DOMINGO-GONZALEZ R, ZANINI F, CHE X, et al. Diverse homeostatic and immunomodulatory roles of immune cells in the developing mouse lung at single cell resolution [J]. *eLife*, 2020, 9: e56890.
- [22] 罗克. 哺乳动物肺的结构与功能[J]. *中国兽医杂志*(LUO K. The structure and function of mammalian lungs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*), 1979(10): 19-27.
- [23] 谭庆丰, 陈道达. 酶消化法提取肿瘤浸润淋巴细胞方法的比较[J]. *恩施医学学报*(TAN Q F, CHEN D D. Comparison of enzymatic digestion methods for extracting tumor infiltrating lymphocytes [J]. *Journal of Enshi Medical College*), 1996(1): 50-1.