

曾勤,梁莹,王新慧,等. 小鼠肠道固有层单细胞悬液制备的酶消化法比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 92-99.

Zeng Q, Liang Y, Wang XH, et al. A comparative study of enzymatic digestion methods for the preparation of single-cell suspensions from the lamina propria of the mouse intestine [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 92-99.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.011

# 小鼠肠道固有层单细胞悬液制备的酶消化法比较研究

曾勤,梁莹,王新慧,闫蕾,王湘鹏,杨嘉仪,余仁欢\*

(中国中医科学院西苑医院肾病科,北京 100091)

**【摘要】** 目的 探究小鼠小肠固有层单细胞悬液制备的最佳酶消化法。方法 采集10根长度一致的小鼠小肠,随机分为两组,每组分别采用以胶原酶A或胶原酶VIII为主的酶消化法制备固有层单细胞悬液,比较这两种酶消化法对单细胞悬液细胞获得率、细胞活性和细胞表面抗原的影响,然后对较优酶消化法制备的单细胞悬液进行流式检测。结果 与以胶原酶VIII为主的酶消化法相比,以胶原酶A为主的酶消化法可以获得更高的细胞产量( $9.48\pm 1.10$ ) $\times 10^9$  vs ( $4.18\pm 1.02$ ) $\times 10^9$ 、活细胞比例(86.36 $\pm$ 3.32)% vs (61.62 $\pm$ 10.93)%以及活性CD45<sup>+</sup>细胞比例(57.19 $\pm$ 5.11)% vs (26.01 $\pm$ 11.44)%、活性CD3<sup>+</sup>细胞比例(8.73 $\pm$ 2.89)% vs (4.52 $\pm$ 2.49)%、活性CD4<sup>+</sup>细胞比例(6.19 $\pm$ 2.09)% vs (3.22 $\pm$ 1.91)%和活性B220<sup>+</sup>细胞比例(15.06 $\pm$ 4.27)% vs (5.07 $\pm$ 2.20)%、为后续流式检测提供了高质量细胞。结论 以胶原酶A为主的酶消化法更适合于小鼠小肠固有层单细胞悬液的制备。

**【关键词】** 肠道固有层;单细胞悬液;酶消化法;流式细胞术

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 04-0092-08

## A comparative study of enzymatic digestion methods for the preparation of single-cell suspensions from the lamina propria of the mouse intestine

ZENG Qin, LIANG Ying, WANG Xinhui, YAN Lei, WANG Xiangpeng, YANG Jiayi, YU Renhuan\*

(Department of Nephrology, Xiyuan Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the optimal digestion method for the preparation of single-cell suspensions from mouse small intestinal lamina propria. **Methods** Ten mouse small intestines of uniform length were collected and randomly divided into two groups. Each group was used to prepare lamina propria single-cell suspensions by enzymatic digestion with collagenase A or collagenase VIII. We compared the effects of these two enzymatic digestion method on the cell yield, cell activity, and cell surface antigens of the single-cell suspensions. Single-cell suspensions prepared by the superior enzymatic digestion method were then subjected to flow cytometry assay. **Results** Compared to collagenase-VIII-based enzymatic digestion, collagenase-A-based digestion resulted in a higher cell yield ( $9.48\pm 1.10$ ) $\times 10^9$  vs ( $4.18\pm 1.02$ ) $\times 10^9$  and higher proportions of live cells (86.36 $\pm$ 3.32)% vs (61.62 $\pm$ 10.93)%, active CD45<sup>+</sup> cells (57.19 $\pm$ 5.11)% vs (26.01 $\pm$ 11.44)%, active CD3<sup>+</sup> cells (8.73 $\pm$ 2.89)% vs (4.52 $\pm$ 2.49)%, active CD4<sup>+</sup> cells (6.19 $\pm$ 2.09)% vs (3.22 $\pm$ 1.91)% and active B220<sup>+</sup> cells (15.06 $\pm$ 4.27)% vs (5.07 $\pm$ 2.20)%, providing high-quality cells for subsequent flow cytometry detection.

**【基金项目】**国家自然科学基金面上项目(82174362);中国中医科学院科技创新工程面上项目(CI2021A01208)。

**【作者简介】**曾勤(1994—),女,住院医师,博士研究生,研究方向:中医药防治肾病。E-mail:1098911249@qq.com

**【通信作者】**余仁欢(1964—),男,主任医师,博士,研究方向:中医药防治肾病。E-mail:tezhongyeu@vip.sina.com

5.11)% vs (26.01±11.44)%, active CD3<sup>+</sup> cells (8.73±2.89)% vs (4.52±2.49)%, active CD4<sup>+</sup> cells (6.19±2.09)% vs (3.22±1.91)%, and active B220<sup>+</sup> cells (15.06±4.27)% vs (5.07±2.20)%, providing high-quality cells for subsequent flow assays. **Conclusions** The collagenase A-based enzymatic digestion method is more suitable for the preparation of single-cell suspensions from the lamina propria of mouse small intestines.

**[Keywords]** intestinal lamina propria; single-cell suspensions; enzyme digestion; flow cytometry assay

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

肠道黏膜是当前研究热点之一,肠道黏膜屏障包括机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障四部分,肠相关淋巴组织和免疫细胞构成免疫屏障。肠道黏膜异常被认为与多种疾病密切相关,如炎症性肠病、IgA 肾病等<sup>[1-2]</sup>。近年来关于肠肾轴、脑肠轴、肝肠轴等的研究众多,这些研究都不约而同地聚焦了对肠道黏膜免疫屏障的探索<sup>[3-5]</sup>。肠道固有层分布有丰富的免疫细胞,他们在维持肠道免疫稳态方面十分重要,对他们的深入研究有助于探索疾病的发病机制、疾病治疗的作用靶点以及药物起效的作用机制等。

众所周知,肠道固有层免疫细胞的分离比较困难,制备肠道固有层单细胞悬液的流程繁琐,且存在诸多影响细胞状态的不稳定因素。通过文献检索,我们发现胶原酶 A 和胶原酶 VIII 是当前较被推荐的消化酶。张苗苗等<sup>[6]</sup>研究认为以胶原酶 VIII 和脱氧核糖核酸酶 I 为主的消化方法比以胶原酶 D 和脱氧核糖核酸酶 I 为主的消化方法更适合用于制备小鼠结肠固有层单细胞悬液。Ferrer-Font 等<sup>[7]</sup>研究认为采用胶原酶 A 制备的蠕虫感染小鼠小肠固有层单细胞悬液的细胞产量明显高于采用胶原酶 VIII、胶原酶 D、分散酶或 Liberase TM 酶的制备方法,并成功采用 23 色光谱流式细胞术组合表征了分离的各类免疫细胞。蠕虫感染小鼠的肠道黏膜会发生强烈的免疫反应如分泌大量粘液,这种情况下采用胶原酶 A 获得了更高的细胞产量,那么该方法是否适用于肠道黏膜正常的小鼠肠道固有层单细胞悬液制备,采用胶原酶 A 消化是否会影响细胞活性?因此,本研究通过比较胶原酶 A 和胶原酶 VIII 这两种酶消化法对肠道黏膜正常小鼠小肠固有层单细胞悬液的影响,为肠道固有层单细胞悬液的制备提供一种最佳的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,6~8 周,体重 18~22 g,10 只,来源于中国北京维通利华实验动物中心

[SCXK(京)2021-0006],饲养于中国中医科学院西苑医院动物中心[SYXK(京)2023-0053]。实验方案通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批(2023XLA035-2),所有动物实验操作均遵守中国中医科学院西苑医院实验动物伦理规范并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

胶原酶 A(批号:10103578001, Roche);胶原酶 VIII(批号:C2139, sigma);EDTA(批号:E1170, 索莱宝);脱氧核糖核酸酶 I(DNase I)(批号:D8071, 索莱宝);D-PBS 缓冲液(不含钙、镁和酚红)(批号:D1040, 索莱宝);PBS 缓冲液(批号:C0162-311, CellWorld);RPMI 1640 培养基(批号:11835030, Gibco);Hanks 缓冲液(不含酚红,不含钙、镁离子)(批号:KGM24021CS, 凯基);胎牛血清(FBS)(批号:04-001-1a, Biolnd);PE-CF594 抗小鼠 ROR $\gamma$ t(批号:562684, 克隆号:Q31-378, BD Biosciences);APC 抗小鼠 IgA(批号:17-4204-80, 克隆号:mA-6E1, Thermofisher)。以下试剂均来自 Biologend;细胞染色缓冲液(批号:420201);TruStain FcX<sup>TM</sup> PLUS(anti-mouse CD16/32)(批号:156603);Zombie Aqua<sup>TM</sup> Fixable Viability Kit(批号:423101);CytoFast<sup>TM</sup> Fix/Perm Buffer Set(批号:426803);FITC 抗小鼠 CD3 抗体(批号:100203, 克隆号:17A2);PerCP/Cyanine5.5 抗小鼠 CD4 抗体(批号:116011, 克隆号:RM4-4);APC/Cyanine7 抗小鼠 CD45 抗体(批号:103115, 克隆号:30-F11);PE/Cyanine7 抗小鼠 CD25 抗体(批号:102016, 克隆号:PC61);Brilliant Violet 421<sup>TM</sup> 抗小鼠 FOXP3 抗体(批号:126419, 克隆号:MF-14);PE 抗小鼠 T-bet 抗体(批号:644810, 克隆号:4B10);Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 抗小鼠 GATA3(批号:653810, 克隆号:16E10A23);PerCP/Cyanine5.5 抗小鼠 CD45 抗体(批号:103131, 克隆号:30-F11);APC/Cyanine7 抗小鼠 B220 抗体(批号:103223, 克隆号:RA3-6B2)。

离心机(湖南赫西仪器装备有限公司,型号:TDZ4-W5);恒温水浴箱(腾川仪器设备有限公司,

型号:SYX-150 L);涡旋混匀器(Scilogex,型号:MX-S/MX-F);NAVIOS 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,型号:10 COLORS/3 LASER);细胞计数器(日本 Nihon Kohden,型号:MEK6318K)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 小肠样品制备

采用颈椎脱位法处理小鼠后固定于手术台,于腹部喷洒 75%乙醇消毒,对皮肤和肌肉层进行中线切口,暴露肠道,并从盲肠端开始截取 10 cm 小肠,隔医用纱布放置于冰上,小心地用眼科手术剪和镊子去除小肠肠系膜和脂肪组织,并去除派氏结。纵向剖开小肠,PBS 缓冲液冲洗肠道内容物直至干净,最后放于装有 5 mL PBS 缓冲液的 15 mL 离心管。

#### 1.3.2 试剂配制

根据后续实验需要进行试剂配制,胶原酶 A 消化液(RPMI 1640 培养基,20% FBS,1 mg/mL 胶原酶 A 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I)和胶原酶 VIII 消化液(RPMI 1640 培养基,150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNase I 和 100 U/mL 胶原酶 VIII)、缓冲收集液(Hanks 缓冲液,2% FBS)、EDTA 洗液(Hanks 缓冲液,2 mmol/L EDTA)、FACS 缓冲液(PBS 缓冲液,2% FBS 和 2 mmol/L EDTA)等的具体配制根据需要消化的小肠数量决定,参考文献<sup>[7-8]</sup>。

#### 1.3.3 小肠固有层单细胞悬液制备

每个样品准备 40 mL Hanks 缓冲液和 30 mL

EDTA 洗液,分别置于 50 mL 离心管并加热至 37  $^{\circ}\text{C}$ 。为每个样品准备含 10 mL 缓冲收集液的 50 mL 离心管,置于冰上。如图 1 所示,在平皿中用 PBS 缓冲液清洗肠段并用眼科手术剪剪成小块(约 5 mm 长)。将小肠小块收集在含有 10 mL 缓冲收集液的 50 mL 离心管(该离心管后续可重复使用),充分摇匀并置于冰上。为每个样品制备新鲜酶消化液,并升温至 37  $^{\circ}\text{C}$ 。利用医用纱布过滤每个样品,丢弃流出物(同一纱布可以在每个洗涤步骤中重复使用)。用眼科镊收集样品于 50 mL 离心管,用温热的 Hanks 缓冲液清洗样品 2 次,每次 10 mL,丢弃流出物。将每个样品收集在含有 10 mL EDTA 洗液的 50 mL 离心管中。在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴箱中孵育样品 10 min。每次孵育后,以 2500 r/min 脉冲涡旋样品 3 次,持续 3 s。重复 EDTA 洗液洗涤步骤两次,总共 3 个 10 min 的洗涤步骤。EDTA 洗液悬浮液应该随着每个洗涤步骤变得不那么混浊(如果在最后一次洗涤后仍观察到大量碎屑,可添加第 4 次洗涤步骤)。在最后的 EDTA 洗液洗涤步骤后,通过医用纱布过滤每个样品,并用 10 mL 温热的 Hanks 缓冲液洗涤 2 次。将医用纱布上的每个样品收集在含有酶消化液的 50 mL 离心管中。在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴箱孵育样品 30 min,每 5 min 剧烈摇动样品 1 次。向每个样品中加入 10 mL FACS 缓冲液并保持在冰上以停止消化。将每个样品通过 100  $\mu\text{m}$  和 40  $\mu\text{m}$  细胞

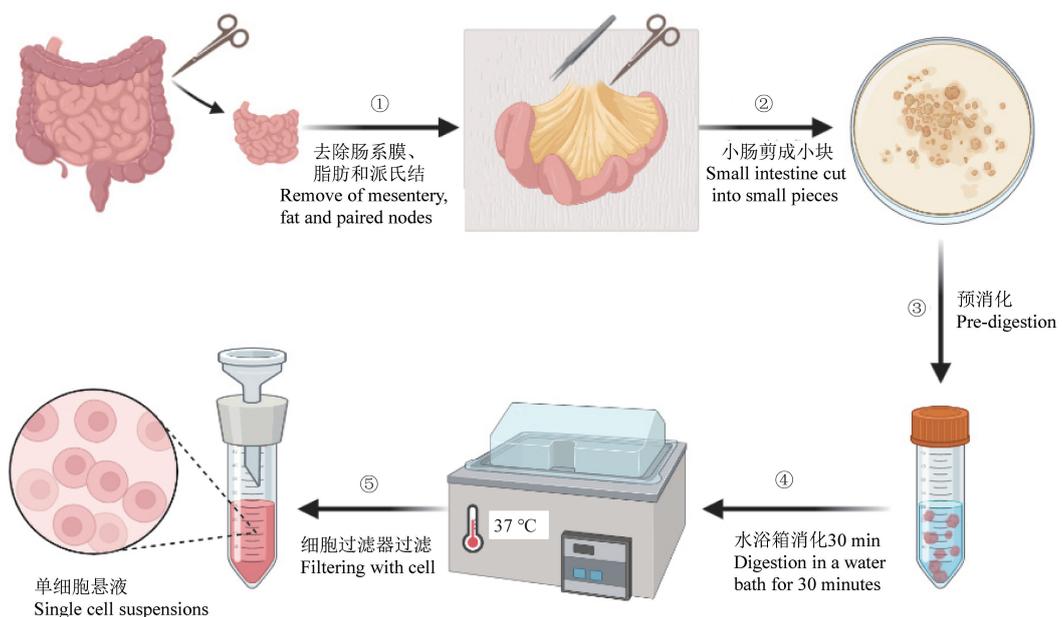


图 1 小肠固有层单细胞悬液制备流程

Figure 1 Preparation of single cell suspension from the lamina propria of the small intestine

过滤器过滤到新的 50 mL 离心管中。4 °C 下以 2500 r/min 离心单细胞悬液 6 min。弃去上清液并重悬于 1 mL 的 FACS 缓冲液中,至此完成小肠固有层单细胞悬液的制备。该流程可以在 6 h 左右完成(大致流程见图 1)。

### 1.3.4 细胞计数

采用自动细胞计数器计白细胞个数以粗略评估单细胞悬液中的细胞数量。

### 1.3.5 流式细胞术检测单细胞悬液的细胞存活率

采用 Biolegend Zombie Aqua™ 检测细胞存活情况,具体检测原理参照 Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit 说明书。将 Zombie Aqua™ 用 PBS 缓冲液以 1 : 1000 溶解,再将单细胞悬液离心后重悬于 100 μL 稀释后的 Zombie Aqua™,室温下避光孵育 30 min,结束后使用 2 mL 细胞染色缓冲液洗涤 2 次。最后将细胞重悬于 200 μL 细胞染色缓冲液中,并平均分配到两个 12 mm×75 mm 流式管中以备后续免疫细胞抗原染色。

### 1.3.6 流式细胞术检测小肠固有层免疫细胞

在步骤 1.3.3 获得的两管流式管中加入 0.5 μL TruStain FcX™ PLUS (Fc 受体阻断剂),涡旋混匀,在冰上预孵育 10 min。按抗体说明书加入适量表面抗体,涡旋混匀,并在冰上避光孵育 20 min。孵育结束后加入 2 mL 的细胞染色缓冲液洗涤,涡旋并在 2000 r/min 下离心 5 min,弃上清液。重复上一步洗涤步骤。在 500 μL 的细胞染色缓冲液中重悬细胞,上机检测。

## 1.4 统计学方法

采用 FlowJo V10、GraphPad Prism 7 和 SPSS 25.0 进行数据分析和绘图,所有数据采用平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。数据均进行正态性和方差齐性检验,两组独立数据比较采用独立 *t* 检验或 Mann-Whitney U 检验。检验以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

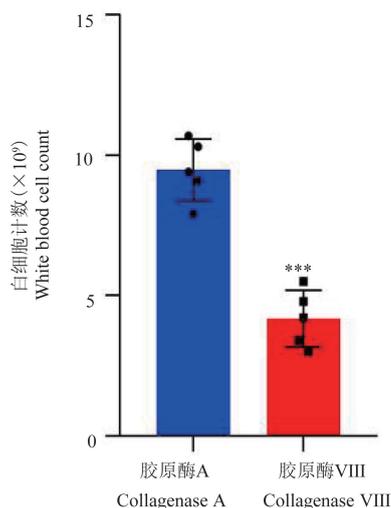
### 2.1 两种酶消化法对细胞获得率的影响

分离位于小肠固有层中的免疫细胞的标准程序主要包括 3 个步骤:第一,样品制备。收集小肠,去除派氏结,纵向打开以去除管腔内容物,洗涤并切成小块;第二,预消化。用含有 EDTA 的洗涤缓冲液对这些小块进行几次洗涤,以达到去除上皮层的目的;第三,消化。用胶原酶消化组织,过滤后即获

得单细胞悬液。以上这 3 个步骤都至关重要,缺一不可,其中消化步骤又是影响细胞获得率、细胞活性和流式检测结果的重中之重。因此,我们在保持前两个标准步骤一致的情况下,比较了胶原酶 A 和胶原酶 VIII 这两种胶原酶消化液的单细胞悬液制备效果。按照制备流程获得单细胞悬液后,采用自动细胞计数器计数白细胞个数以粗略评估单细胞悬液中的细胞数量,遗憾的是该方法不能准确检测淋巴细胞的数量,因此只能粗略地比较这两种胶原酶消化液对细胞获得率的影响。通过统计两种酶消化法获得的白细胞数量,结果发现,采用胶原酶 A 消化液制备可获得的白细胞数量为  $(9.48\pm 1.10)\times 10^9$ ,采用胶原酶 VIII 消化液制备可获得的白细胞数量为  $(4.18\pm 1.02)\times 10^9$ ,两种酶消化法具有显著差异( $P<0.0001$ ,图 2)。

### 2.2 两种酶消化法对细胞活性的影响

细胞活性会影响流式检测的结果,通常在细胞表面抗体染色之前,加入死活染料以评估细胞活性状态。通过统计两种酶消化法获得的活细胞比例,发现两种消化液均会影响细胞活性,采用胶原酶 A 消化液制备的活细胞比例为  $(86.36\pm 3.32)\%$ ,采用胶原酶 VIII 消化液制备的活细胞比例为  $(61.62\pm 10.93)\%$ ,两种酶消化法具有显著差异(图 3),且采用胶原酶 A 消化液制备的单细胞悬液的活细胞比例更加稳定,均在 80% 以上。

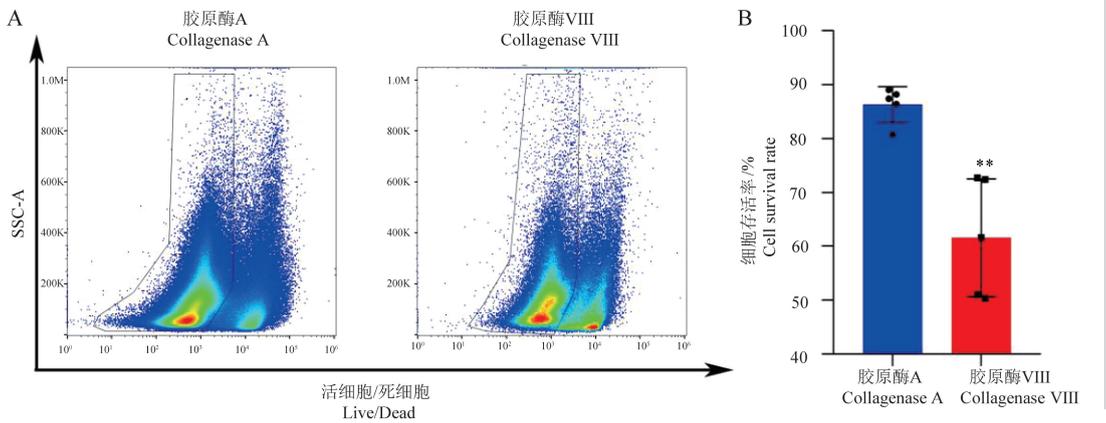


注:与胶原酶 A 组相比,\*\*\*  $P<0.001$ 。

图 2 两种酶消化法对单细胞悬液白细胞数量的影响

Note. Compared with Collagenase A group, \*\*\*  $P<0.001$ .

Figure 2 Effect of two enzymatic digestion methods on the number of leucocytes in single cell suspensions



注:A 流式细胞术检测两种酶消化法下的细胞活性状态;B 细胞存活率。与胶原酶 A 组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 两种酶消化法对细胞活性状态的影响

Note. A, Flow cytometry assay for cell activity status under both enzymatic digestion methods. B, Cell survival rate. Compared with Collagenase A group, \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 3 Effect of two enzymatic digestion methods on cell activity status

### 2.3 两种酶消化法对细胞表面抗原的影响

流式细胞术的工作原理是带有荧光标记的抗体与细胞表面抗原或胞内/核内抗原进行特异性结合。酶消化步骤可能会影响细胞表面抗原和抗体特异性结合,从而影响流式检测结果。因此,我们对几种常检测的细胞表面抗原包括 CD3、CD4、CD45 和 B220 进行检测,结果发现两种消化液对 CD45<sup>+</sup> 细胞占活细胞比例、活性 CD45<sup>+</sup> 细胞比例有明显影响,而 CD3 和 B220 在 CD45<sup>+</sup> 细胞中的比例、CD4 在 CD3<sup>+</sup> 细胞中的比例没有影响,即两种消化液对淋巴细胞表面抗原影响不大,但因为 CD45<sup>+</sup> 细胞占活细胞的比例和活性,CD45<sup>+</sup> 细胞比例存在显著差异,加之细胞获得率的显著差异,导致胶原酶 VIII 获得的有活性的各类细胞数量显著少于胶原酶 A 所获得的(图 4)。综上所述,采用胶原酶 A 制备单细胞悬液更有利于获得更多数量的活性淋巴细胞,这对分离淋巴细胞进行后期细胞实验有重要意义。

### 2.4 小鼠小肠固有层 IgA<sup>+</sup> 浆细胞和辅助 T 细胞的流式检测

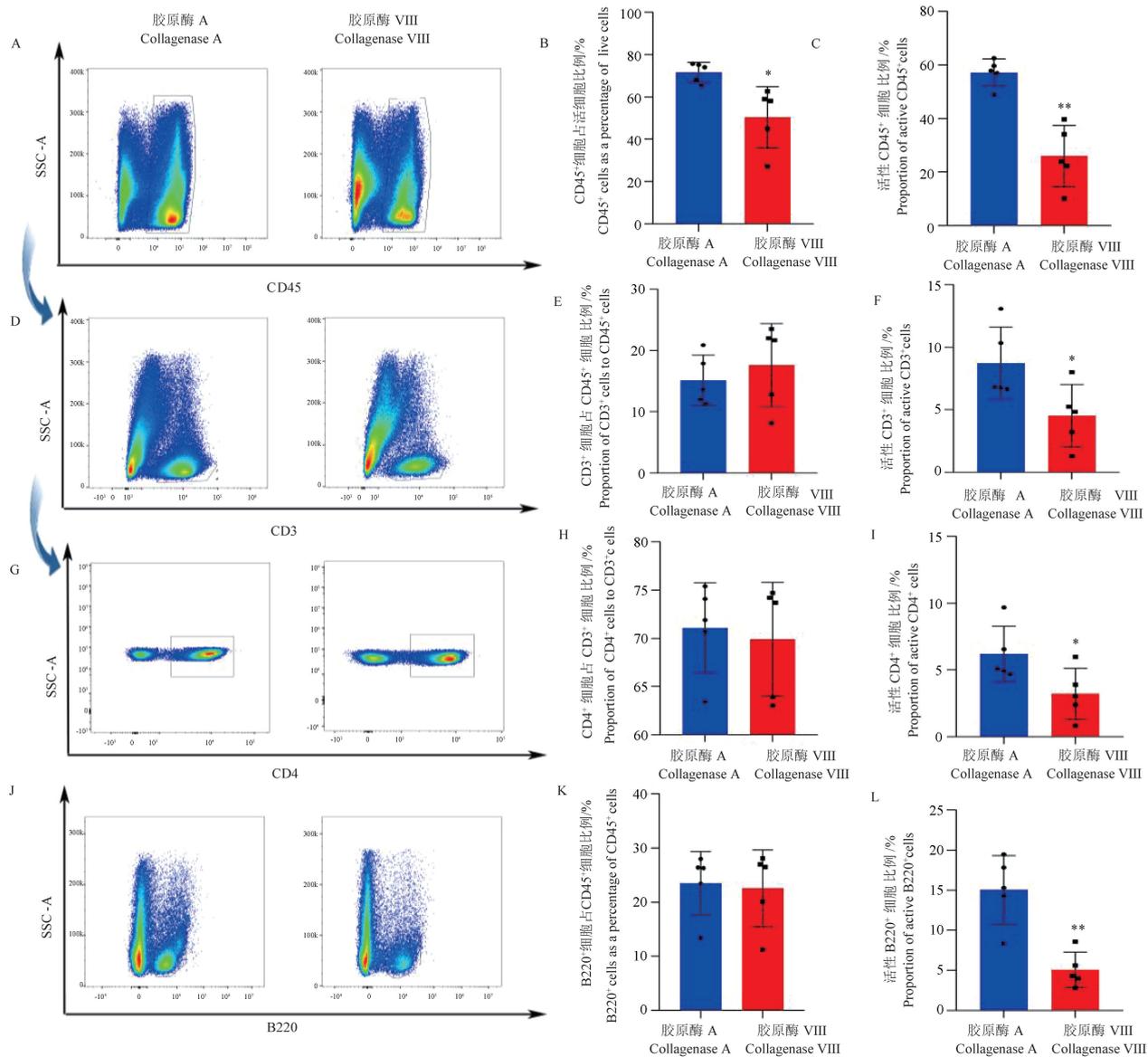
通过比较这两种酶消化法制备的单细胞悬液细胞获得率、细胞活性状态以及细胞表面抗原的情况,发现胶原酶 A 比胶原酶 VIII 更适合用于制备小肠固有层单细胞悬液。为了验证胶原酶 A 消化液制备获得的细胞能够准确表示肠道免疫反应,我们对该方法制备的单细胞悬液进行了胞内/核内抗原染色。IgA<sup>+</sup> 浆细胞和辅助 T 细胞在肠道免疫中发挥重要作用,其数量异常或比例失衡参与了多种自身

免疫性疾病的发病机制,例如 IgA 肾病。目前认为来源于肠道黏膜的 Gd-IgA1 是诱发 IgA 肾病的关键始动环节,而 Gd-IgA1 的形成与 TB 淋巴细胞亚群又密切相关<sup>[9-10]</sup>。因此,对 TB 淋巴细胞亚群数量或比例的检测、对探究 IgA 肾病的发病机制和药物治疗 IgA 肾病的起效机制等方面十分重要。

圈门策略如图 5,首先在活细胞里圈出 CD45 阳性细胞群,CD45 是免疫细胞均表达的 surface 抗原。IgA 有血清型和分泌型,由 IgA<sup>+</sup> 浆细胞(B220<sup>-</sup> IgA<sup>+</sup>) 产生(胞内 IgA 分子染色流程参考 Biolegend CytoFast™ Fix/Perm Buffer Set 说明书)。分泌型 IgA (SIgA) 是机体黏膜防御系统的主要成分,它可覆盖在肠黏膜表面,对某些病毒、细菌和一般抗原具有抗体活性,是防止病原体入侵机体的重要屏障。当肠道病原体入侵时,肠道局部免疫系统激活,IgA<sup>+</sup> 浆细胞会分泌更多 SIgA 来抵御病原体,若肠道黏膜免疫持续激活,会造成因免疫过度而引起自身免疫性疾病。CD4<sup>+</sup> 辅助性 T 细胞包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg 等细胞亚群,各细胞亚群均产生或表达一组特定的细胞因子、转录因子、表面趋化因子等,这些因子对各细胞亚群的分化、增殖、迁移和功能等至关重要<sup>[11]</sup>。我们以表面抗原结合相应核内转录因子来标记各细胞亚群,同样在活细胞里圈出 CD45<sup>+</sup> 细胞,然后圈出 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞,最后结合不同转录因子圈定 Th1 (T-bet<sup>+</sup>)、Th2 (GATA3<sup>+</sup>)、Th17 (RoRγt<sup>+</sup>) 和 Treg (CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) 细胞亚群(核内转录因子染色流程参考 Biolegend

True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set 说明书)。在自身免疫性疾病中,CD4<sup>+</sup>辅助性 T 细胞亚

群的比例可能比其绝对数量更重要。如 IgA 肾病,研究认为 Th1/Th2 和 Th17/Treg 细胞失衡与疾病严

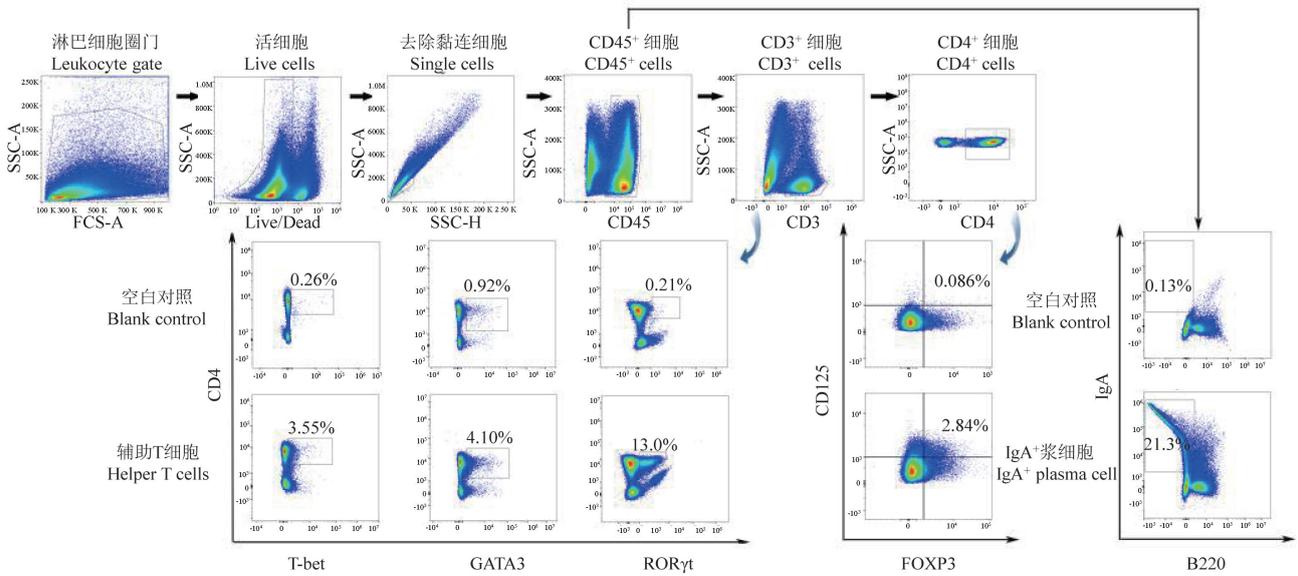


注:ADGJ 流式细胞术检测两种酶消化法下获得的细胞表面抗原。A:在活细胞上圈门;B:CD45<sup>+</sup>细胞占活细胞的比例图;C:活性 CD45<sup>+</sup>细胞的比例图;D:在 CD45<sup>+</sup>细胞上再圈门;E:CD3<sup>+</sup>细胞占 CD45<sup>+</sup>细胞的比例图;F:活性 CD3<sup>+</sup>细胞的比例图;G:在 CD3<sup>+</sup>细胞上再圈门;H:CD4<sup>+</sup>细胞占 CD3<sup>+</sup>细胞的比例图;I:活性 CD4<sup>+</sup>细胞的比例图;J:在 CD45<sup>+</sup>细胞上再圈门;K:B 细胞占 CD45<sup>+</sup>细胞的比例图;L:活性 B 细胞的比例图。与胶原酶 A 组相比, \* P<0.05, \*\* P<0.01。

图 4 两种酶消化法对细胞表面抗原的影响

Note. ADGJ flow cytometry detection of cell surface antigens obtained under two enzymatic digestion methods. A, circled gate on live cells, D is a re-circled gate on CD45<sup>+</sup> cells, G is a re-circled gate on CD3<sup>+</sup> cells and J is also a re-circled gate on CD45<sup>+</sup> cells. B, Graph of the proportion of CD45<sup>+</sup> cells to live cells. C, Graph of the proportion of active CD45<sup>+</sup> cells. E, Graph of the proportion of CD3<sup>+</sup> cells to CD45<sup>+</sup> cells. F, Graph of the proportion of active CD3<sup>+</sup> cells. H, Graph of the proportion of CD4<sup>+</sup> cells to CD3<sup>+</sup> cells plot. I, Proportion of active CD4<sup>+</sup> cells. K, Proportion of B cells to CD45<sup>+</sup> cells plot. L, Proportion of active B cells plot. Compared with Collagenase A group, \* P<0.05, \*\* P<0.01.

Figure 4 Effect of two enzymatic digestion methods on cell surface antigens



注:空白对照为没有加能够特异性结合胞内/核内抗原的抗体。

图5 小肠固有层 IgA<sup>+</sup>浆细胞和辅助 T 细胞的圈门策略

Note. Blank controls are those without the addition of antibodies capable of specifically binding intracellular/inuclear antigens.

Figure 5 Circle gating strategy for IgA<sup>+</sup> plasma cells and helper T cells in the lamina propria of the small intestine

重程度密切相关<sup>[12]</sup>。

### 3 讨论

肠道黏膜免疫系统是人体最大的免疫系统,它与外界直接接触,与肠道菌群存在错综复杂的关系。制备肠道单细胞悬液是我们了解肠道黏膜免疫系统的必要手段,对单细胞悬液进行流式检测或单细胞测序等,可以评估肠道黏膜免疫反应状态;也可对单细胞悬液进行目标细胞的分选,从而进一步开展细胞实验。因此,制备高质量的肠道单细胞悬液对以探究肠道微生态和肠道黏膜状态为目标的基础实验十分重要。

本研究主要采用胶原酶消化肠道固有层,在这之前首先需要暴露固有层。本研究参考 Ferrer-Font 等<sup>[7]</sup>的实验方案,经过多次的 Hanks 洗液和 EDTA 洗液洗涤和剧烈涡旋振荡,可以顺利将肠道上皮层去除,暴露固有层,这一步可以明显缩短胶原酶消化时长,从而减少胶原酶对细胞活性的影响。本研究还参考了 Zhang 等<sup>[8]</sup>的实验方案,按其流程制备了胶原酶 VIII 消化液,然后在样品制备和预消化流程一致的情况下,比较了胶原酶 A 和胶原酶 VIII 这两种酶消化液对单细胞悬液细胞获得率、细胞活性和细胞表面抗原的影响,最终确定了以胶原酶 A 为主的消化方法为最佳消化方案。该方案能得到更高的细胞产量,且不影响细胞表面抗原的表达,细

胞活性约为 86%,显著高于胶原酶 VIII 消化方案(细胞活性约为 61%),与 Ferrer-Font 等<sup>[7]</sup>研究结果一致。张苗苗等的研究完全参照 Zhang 等<sup>[8]</sup>的实验方案,即以胶原酶 VIII 为主的消化方案,其细胞活性约为 70%,也明显低于本研究胶原酶 A 消化方案,但高于本研究的胶原酶 VIII 消化方案,可能是本研究采用了剧烈涡旋振荡去除肠道上皮层;其次,与张苗苗等研究结果一致的是,胶原酶 VIII 和胶原酶 A 均不会导致淋巴细胞表面抗原丢失;再次,在张苗苗等<sup>[6]</sup>的研究结果里,胶原酶 VIII 消化方案获得的结肠单细胞悬液中 CD45<sup>+</sup>细胞比例不超过 25%,本研究胶原酶 VIII 消化方案获得的小肠单细胞悬液中 CD45<sup>+</sup>细胞比例约为 50%,胶原酶 A 消化方案的 CD45<sup>+</sup>细胞比例约为 70%,可见胶原酶 A 能够获得更高的 CD45<sup>+</sup>细胞比例;最后,本研究两种消化方案的消化时长均为 30 min,明显少于 Zhang 等<sup>[8]</sup>的研究方案消化时长(90 min),也短于 Nature Protocols 中胶原酶 D 和分散酶的消化时长(45 min)<sup>[13]</sup>,这可能是胶原酶 A 消化方案细胞活性更高的主要原因。

本研究最后采用流式细胞术检测了多种自身免疫性疾病尤其 IgA 肾病会密切关注的肠道免疫细胞,验证了以胶原酶 A 为主的消化方法制备的单细胞悬液可以准确反应肠道免疫情况,如我们发现相比于其他辅助性 T 细胞亚群, Th17 细胞在肠道分布

广泛,与肠道黏膜免疫密切相关,这和之前诸多研究结果一致<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,在样品制备和预消化这两个步骤一致的情况下,采用胶原酶 A 消化液获得的小鼠小肠固有层单细胞悬液在细胞获得率、细胞活性状态和活性 TB 淋巴细胞数量方面都明显优于胶原酶 VIII 消化液。因此,本研究认为当细胞产量、细胞活力和细胞功能很重要时,优先推荐使用胶原酶 A 制备小鼠固有层单细胞悬液。但本研究也存在一定局限性,通过自动细胞计数器检测白细胞数量来粗略的评估细胞获得率存在一定误差,没有采用更精确的检测方法以实现淋巴细胞的绝对计数,导致不能很准确的比较两种酶消化法的淋巴细胞获得率。另外,流式检测 IgA<sup>+</sup>浆细胞和辅助 T 细胞采用空白对照来辅助圈门设置,没有同型对照准确。未来应在本研究基础上,设计更完整精确的实验方案来比较各种胶原酶制备肠道固有层单细胞悬液的优劣,从而探索出一种更优的肠道固有层消化方法。

#### 参考文献:

- [ 1 ] ZHANG Y Z, LI Y Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(1): 91-99.
- [ 2 ] FLOEGE J, BARBOUR S J, CATTRAN D C, et al. Management and treatment of glomerular diseases ( part 1 ): conclusions from a Kidney Disease: improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference [J]. Kidney Int, 2019, 95(2): 268-280.
- [ 3 ] KHOURY T, TZUKERT K, ABEL R, et al. The gut-kidney axis in chronic renal failure: a new potential target for therapy [J]. Hemodial Int, 2017, 21(3): 323-334.
- [ 4 ] 郑薇薇, 赵耀, 刘兴山. 火龙灸联合久泻方治疗脾肾阳虚型腹泻型肠易激综合征疗效及对肠黏膜屏障、炎症因子、脑肠轴的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2022, 31(16): 2191-2196, 2204.
- ZHENG W W, ZHAO Y, LIU X S. Efficacy of fire dragon moxibustion combined with Jiuxie Decoction on irritable bowel syndrome with diarrhea of spleen-kidney Yang deficiency and its effect on intestinal mucosal barrier, inflammatory factors and brain-gut axis [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2022, 31(16): 2191-2196, 2204.
- [ 5 ] 陈丽. 肝肠轴和 DNA 甲基化在自身免疫性疾病中的调控机

制研究 [D]. 上海: 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2022.

CHEN L. Regulatory mechanism studies of liver-gut axis and DNA methylation in autoimmune diseases [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 2022.

- [ 6 ] 张苗苗, 李华萍, 赵娅娅, 等. 小鼠肠道固有层免疫细胞分离的方法及高参数流式分析 [J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(6): 1077-1086.
- ZHANG M M, LI H P, ZHAO Y Y, et al. Preparation of immune cells from mouse intestinal *Lamina propria* and establishment of multi-parameter flow cytometry panel [J]. Chin J Cell Biol, 2022, 44(6): 1077-1086.
- [ 7 ] FERRER-FONT L, MEHTA P, HARMOS P, et al. High-dimensional analysis of intestinal immune cells during helminth infection [J]. Elife, 2020, 9: e51678.
- [ 8 ] ZHANG J J, SHEN L. Classification and phenotype analysis of mouse intestinal innate lymphoid cells [J]. Bio-Protoc, 2019, Bio-101: e1010327.
- [ 9 ] HE J W, ZHOU X J, LV J C, et al. Perspectives on how mucosal immune responses, infections and gut microbiome shape IgA nephropathy and future therapies [J]. Theranostics, 2020, 10(25): 11462-11478.
- [ 10 ] PERŠE M, VEČERICĀ-HALER Ź. The role of IgA in the pathogenesis of IgA nephropathy [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24): 6199.
- [ 11 ] LOO T T, GAO Y, LAZAREVIC V. Transcriptional regulation of CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub> cells that mediate tissue inflammation [J]. J Leukoc Biol, 2018, 104(6): 1069-1085.
- [ 12 ] LIANG Y, ZENG Q, WANG X H, et al. Mechanism of Yiqi Yangying heluo formula in the treatment of IgA nephropathy by affecting Gd-IgA1 based on BAFF molecular level and T lymphocyte immunity [J]. Biomed Res Int, 2023, 2023: 5124034.
- [ 13 ] WEIGMANN B, TUBBE I, SEIDEL D, et al. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue [J]. Nat Protoc, 2007, 2(10): 2307-2311.
- [ 14 ] DUBIN P J, KOLLS J K. Th17 cytokines and mucosal immunity [J]. Immunol Rev, 2008, 226: 160-171.
- [ 15 ] CIOFANI M, MADAR A, GALAN C, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification [J]. Cell, 2012, 151(2): 289-303.

[收稿日期]2023-06-06