

• 检验技术与方法 •

流式细胞术检测人外周血 Th17 细胞频率^{*}

肖 平, 吴祖常, 林蔚

(广东省佛山市第一人民医院临床医学研究所, 广东佛山 528000)

摘要: 目的 该研究通过探讨不同的刺激培养条件和检测方法对 Th17 细胞频率的影响, 建立和优化流式细胞术检测人外周血 Th17 细胞频率实验方案。方法 采用不同浓度的佛波酯(PMA, 终浓度 50、100、150、200、250、300 ng/mL)与离子霉素(Ionomycin) 1 μ g/mL 对健康人外周血进行刺激培养, 分别于刺激后 4、6、8、10 和 12 h 用流式细胞术分析 Th17 细胞频率, 并检测 PMA 刺激前后细胞表面与胞膜内 CD4 平均荧光强度(MFI)和 CD4 阳性 T 细胞比例。结果 PMA 150 ng/mL + Ionomycin 1 μ g/mL 刺激全血 6 h 后, Th17 细胞频率高, 刺激的效果较好($P < 0.05$)。刺激后检测细胞膜内 CD4 MFI 低于先标记膜表面 CD4 后刺激组($P < 0.05$), Th17 细胞频率和 CD4 阳性 T 细胞比例均高于后者, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 采用终浓度为 PMA 150 ng/mL + Ionomycin 1 μ g/mL 刺激培养全血 6 h 后, 测定胞浆内 CD4 和 IL-17 水平是检测人 Th17 细胞频率简便有效的方法。

关键词: 流式细胞术; Th17 细胞; 体外活化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.044

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)15-2069-03

Determination of frequencies of Th17 cells in human peripheral blood by flow cytometry^{*}

Xiao Ping, Wu Zuchang, Lin Wei

(Research Institute of Clinical Medical Research, Foshan Municipal First People's Hospital, Foshan, Guangdong 528000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of different stimulating culture conditions and detecting methods on the frequency of Th17 cells and to set up and optimize the experimental method for detecting the frequencies of human Th17 cells in peripheral blood by flow cytometry (FCM). Methods The peripheral blood in the healthy people was performed the stimulating culture by phorbol myristate acetate (PMA) at different final concentrations (50, 100, 150, 200, 250, 300 ng/mL) and ionomycin 1 μ g/mL. The frequencies of Th17 cells were assessed by FCM after different stimulating time points (4, 6, 8, 10, 12 h). The mean fluorescence intensity (MFI) and percentage of the ratio of CD4 positive cells on the cellular surface and inside cell membrane were measured before and after PMA stimulation. Results The frequency of Th17 cells was highest with the good stimulation effect under the condition of PMA 150 ng/mL and ionomycin 1 μ g/mL stimulation for 6 h ($P < 0.05$). MFI of CD4 inside cellular membrane after stimulation was lower than that in the cells with stimulation after labeling membrane surface CD4 ($P < 0.05$), and the Th17 cell frequencies and the ratio of CD4 positive cells were higher than those in the latter, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). Conclusion After stimulating whole blood with the final concentration of PMA 150 ng/mL and ionomycin 1 μ g/mL for 6 h, measuring intracytoplasm CD4 and IL-17 levels is the simple and effective method for detecting the frequency of human Th17 cells.

Key words: flow cytometry; Th17 cells; activation, in vitro

Th17 细胞是近年来发现的一类 CD4 阳性 Th 细胞, 以分泌 IL-17 为特征, 在防御胞外病原微生物感染、介导慢性炎症反应、自身免疫病以及肿瘤等方面发挥重要作用, 但在人体内含量很少^[1-5]。目前检测 Th17 细胞的方法主要是体外刺激活化细胞后, 利用流式细胞术检测分泌细胞因子 IL-17 的 CD4 阳性细胞, 即 Th17 细胞, 由于实验步骤比较复杂, 影响检测结果的因素较多, 至今未有标准化的实验方案。国内外研究大都采用检测其他细胞因子如 IL-4、IFN- γ 的实验方法, 导致检测效率低, 实验结果差异很大^[1-7]。本研究在参考现有实验方法的基础上, 对刺激剂 PMA 的浓度、刺激时间、CD4 抗原的检测等方面进行优化, 提高 Th17 细胞检测效率, 为建立 Th17 标准化检测方案的提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取佛山市第一人民医院健康体检者 30 例, 年龄 21~38 岁, 男 18 例, 女 12 例, 无感染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病, 无肿瘤等疾病, 肝肾功能正常。近 3 个月无使用免疫抑制剂或免疫调节剂治疗史。受试者均签署知情同意书后, 各采集肝素钠抗凝外周静脉血 10 mL。

1.2 仪器与试剂 FITC 标记的鼠抗人 IL-17A 单克隆抗体 (FITC anti-human IL-17A mAb) 及匹配的同型对照 mAb 抗体购自美国 eBioscience 公司, PC5 标记的鼠抗人 CD4 单克隆抗体 (PC5 anti-human CD4 mAb) 购自美国 Beckman Coulter 公司, 溶血素 (BD FACS Lysing Solution) 购自美国 Becton Dickinson 公司, 固定剂、破膜剂购自美国 Invitrogen 公司, 佛波酯 (PMA)、离子霉素 (ionomycin)、布雷杆氏菌素 A (BFA)、莫能菌素 (monensin) 购自美国 Sigma 公司。FACS Calibur 型流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 不同浓度 PMA 对外周血的刺激培养 取 11 例外周血标本各 3 mL, 分为 6 管, 每管 500 μ L, 加入 PMA 的终浓度分别为 50、100、150、200、250、300 ng/mL, 以及离子霉素 1 μ g/mL 进行刺激, 同时加入终浓度为 10 μ g/mL 的 BFA 和 1 μ g/mL Monensin 阻断, 置于 37°C 5% CO₂ 细胞箱培养 6 h。

1.3.2 不同刺激时间对外周血的刺激培养 取外周血标本 1 mL, 用 PMA 150 ng/mL + 离子霉素 1 μ g/mL 刺激培养 12 h, 其余方法同上。分别在刺激后 4、6、8、10 和 12 h 检测 Th17 细

* 基金项目: 佛山市医学类科技攻关项目(201208027)。 作者简介: 肖平, 女, 副主任技师, 主要从事临床与基础免疫学研究。

胞比值。

1.3.3 刺激后胞浆内 CD4 和 IL-17 的检测 刺激培养后的细胞,加入溶血素 2 mL 裂解红细胞,10 min 后离心去上清,加固定液 100 μ L, 放置室温中 10 min, 加入 2 mL PBS, 混匀后, 离心去上清, 加入 100 μ L 破膜液, 分为两份, 分别加入 CD4-PC5、IL-17-FITC 或相应同型对照抗体, 轻轻振荡混匀后, 室温避光反应 30 min 后, 加入 2 mL PBS 离心去上清, 每管加入 0.5 mL 1% 多聚甲醛固定, 4 $^{\circ}$ C 保存待上机检测。

1.3.4 刺激后细胞膜表面 CD4 和胞浆内 IL-17 的检测 取 200 μ L 刺激培养后的细胞, 加入 2 mL PBS 离心去上清, 洗涤两次后分为两管, 分别加入 CD4-PC5 及其同型对照抗体, 室温避光反应 20 min, 加入溶血素 2 mL 裂解红细胞, 室温避光放置 10 min 后离心去上清, 固定和破膜后, 检测胞浆内 IL-17, 方法同前。

1.3.5 刺激前细胞膜表面 CD4 和刺激后胞浆内 IL-17 的检测

取未经刺激的 500 μ L 全血, 加入 CD4-PC5 抗体, 室温避光反应 20 min 后, 加入 PMA 150 ng/mL + 离子霉素 1 μ g/mL, 刺激培养 6 h。胞浆内 IL-17 的检测方法同前。

1.3.6 流式细胞仪数据采集与分析 用标准微球校正仪器后, 打开 CellQuest 软件, 采集 CD4⁺ T 淋巴细胞 5 000 个, 计算 CD4 抗原表达的平均荧光强度 (MFI), 利用 CD4/侧向角散射光 (SSC) 设门, 以 CD4⁺ IL-17⁺ 为 Th17 细胞, 计算 CD4⁺ 细胞中表达细胞因子 IL-17 的百分率。用 CellQuest 软件分析结果。

1.4 统计学处理 所有资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 12.0 软件进行数据分析, 作方差齐性检验, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PMA 浓度对 Th17 细胞检出频率的影响 随着 PMA 浓度的增大, Th17 细胞的频率逐渐升高, 在 150 ng/mL 时达到最高, 随后逐渐降低 ($P < 0.05$)。见图 1。

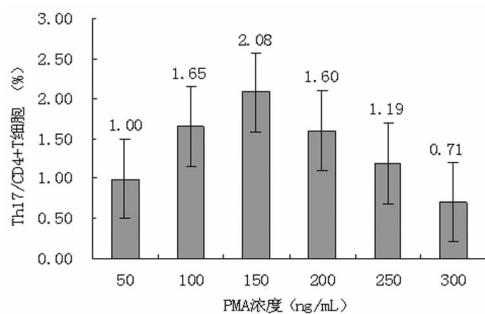


图 1 PMA 浓度对 Th17 细胞检出频率的影响

2.2 刺激时间对 Th17 频率的影响 由图 2 可见, Th17 频率在刺激 4 h 后逐渐升高, 至 8 h 达最高, 然后逐渐下降。刺激 6、8 和 10 h 后均显著高于 4 h ($P < 0.05$); 刺激 6 h 和 10 h 比 8 h 略低, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。12 h 时 Th17 频率进一步减低, 但仍高于 4 h ($P < 0.05$)。刺激时间对 Th17 频率的影响, 刺激 4、6 和 8 h 后 Th17 频率代表性流式图见图 3 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”。

2.3 不同 CD4 抗原的检测方案对 Th17 细胞频率的影响 设定先标记膜表面 CD4 后刺激组为第 1 组, 刺激后标记膜内 CD4 为第 2 组, 刺激后标记膜表面 CD4 组为第 3 组。第 2 组 Th17 检出率略高于第 1 组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这两组均显著高于第 3 组 ($P < 0.05$); CD4 平均荧光强度 (MFI) 在第 1 组最高, 次之为第 2 组, 最低为第 3 组, 差异有统计学意

义 ($P < 0.05$); 而 CD4⁺ 细胞占淋巴细胞的比值在第 2 组显著高于第 3 组 ($P < 0.05$), 略高于第 1 组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

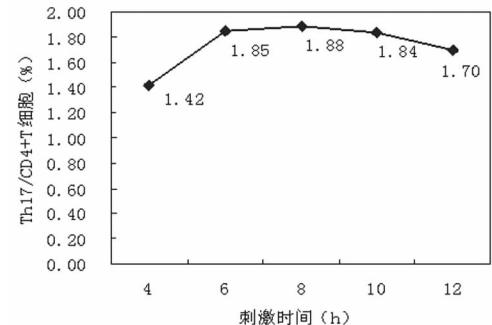


图 2 不同刺激时间对 Th17 频率的影响

表 1 不同检测方案对 CD4⁺ T 细胞比率、MFI 及 Th17 细胞频率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺ T 细胞/有核细胞 (%)	CD4 ⁺ T 细胞 MFI	Th17/CD4 ⁺ T 细胞 (%)
第 1 组	11.36 \pm 4.87	540.57 \pm 188.21 [*]	1.19 \pm 0.78
第 2 组	13.95 \pm 14.91 [△]	235.37 \pm 114.89	1.22 \pm 0.77
第 3 组	8.91 \pm 2.28	19.02 \pm 11.32	0.14 \pm 0.08

*: $P < 0.05$, 与另外两组比较; [△]: $P < 0.05$, 与第 3 组比较。

3 讨 论

Th17 细胞在体内数量少, 难以检测, 需要利用刺激剂对其进行活化培养。PMA 是最常用的刺激剂。文献 [6-10] 报道绝大部分刺激浓度为 25~50 ng/mL, 与检测其他细胞因子如 IL-4、IFN- γ 时相同, PMA 浓度影响 Th17 频率的报道目前很少, 黄昂等 [11] 通过分析 PMA 浓度与 Th17 细胞检出频数的关系, 认为 300 ng/mL 是最佳浓度, 本研究结果显示 PMA 150 ng/mL 时刺激效果最好, 由于采用的 PMA 生产厂家均为 Sigma 公司, 因此试剂因素对实验结果的影响很小, 那么这种差异更可能由于培养基质的组分不同导致, 黄等采用全血加 3 倍体积 RPMI1640, 且证实此方案优于外周血单个核细胞 (PBMC) 加 RPMI1640 培养, 认为全血中非淋巴细胞可能有助于 Th17 表达 IL-17, 而本文仅用全血, 未加 RPMI1640 稀释, 可能更有利于 Th17 细胞对刺激剂的反应, 较低的 PMA 浓度即可诱导高水平的活化。

由于细胞因子的分泌有时效性, 不同的刺激时间对 Th17 细胞频率的也产生影响, 以往研究所选刺激时间也在 4~48 h 不等 [2-9]。本研究检测了 5 个时间点, 显示 Th17 频率在刺激至 8 h 达最高 [(1.88 \pm 0.79) %], 刺激 6 h [(1.85 \pm 0.78) %] 和 10 h [(1.84 \pm 0.57) %] 比 8 h 略低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。考虑到实际应用的可行性, 选择培养时间 6 h 较合适。

CD4 阳性 T 淋巴细胞是测定 Th17 的关键因子, 研究显示 [7] PMA 刺激后能使人细胞膜表面 CD4 分子大量内翻, 密度下降, MFI 降低, 与本研究结果一致, 为解决这一问题, 文献报道中有的采用先标记膜表面 CD4 后再进行刺激诱导 [12], 也有采用刺激后的细胞经破膜后标记膜内 CD4 [5]。本研究结果显示, 采用刺激后的细胞标记膜内 CD4, Th17 检出率、CD4⁺ T 细胞占有核细胞的比率均高于先标记膜表面 CD4 后刺激组, 且 CD4 阳性细胞群仍然能很清晰地与阴性群区分, 因此直接检测胞浆内 CD4 抗原, 阳性细胞比例和荧光强度都很好, 而且可同时检测胞浆内细胞因子, 简化了操作步骤。(下转第 2072 页)

3 讨 论

近年来随着血栓性疾病及相关疾病研究的不断深入,临床与实验室紧密配合相互促进,全自动血凝仪在血栓性疾病及相关疾病的诊治中发挥越来越重要的作用。我国在这些方面的研究的学术水平亦提高到新阶段,血栓与止血的研究已远远超出以往出血性疾病的范畴,涉及到临床各个科室^[4],性能优异的全自动血凝仪的使用成为必然。目前我国全自动血凝仪的应用已相当普遍,其检测 APTT、PT、Fg 的原理是模仿手工法,各厂家采用不同的方法自动判读纤维蛋白形成的时间点,比手工法的准确度有了很大提高,这就把操作者的工作重点从繁复的操作转移到仪器的质量控制上来。

美国临床实验室修正法规(CLIA'88)对常用检验项目的室内质量评估规定了质量指标,现已成为包括我国在内的许多地区和国家临床检验最低质量指标。检验科发出的报告没有特殊情况下都是一次测定的结果,这样就要有严格的室内质量控制和多实验室间的质量评价,以确保报告结果的准确无误。为了对法国 Stago R Evolution 全自动血凝分析仪的性能进行更进一步的评估,在 CLIA'88 的基础上引进 6 西格玛(σ)概念,每个测定值的总误差大于允许误差的概率通过 σ 值可进行估算^[5-7],即达到 2σ 时为百分之 4.5 的测量值大于允许误差, 3σ 时为百分之 0.27, 4σ 时为百万分之 63, 5σ 时为百万分之 0.57, 6σ 时为百万分之 0.002。同时应用方法性能决定图,将偏倚和不精密度以图像形式表达出来,方法性能决定图与 σ 值的统计表相比更加直观清晰,从左至右依次将结果分为优秀性能区、良好性能区、临界性能区及不符要求区 4 个区。偏倚和不精密度的具体数据参考去年全年的室内质评及室内的质控结果,通过对血凝分析仪检测系统的 3 个项目 6 个指标的统计分析,可以直接观察到各质控总误差的情况,6 个质控指标有两个处于临界性能,处于图的右下方,误差主要由于不精密度造成^[8]。对于具有相同 TEa 的指标(PT 和 APTT)可以将统计结果绘制在同一方法性能决定图上,使得结果查询更加便捷。所收集的数据与近年来关于全自动血凝仪评估报道的数据相近^[9-13]。可以根据 σ 值选择适当的质控规则。

全自动血凝仪的分析过程是比较复杂的,受温度、试剂、质控品浓度、酶活性、纤维蛋白形成的判断终点等多种因素的影

响,在实际工作中,远没达到 6σ 水平,经常会失控,这就需要检验工作者根据质控图和质控规则,认真仔细查找发现失控原因,不能简单地重做或更换质控品,这样不但造成浪费,还不能及时发现真正的问题所在。总之,应用方法性能决定图不仅质控结果清晰直观,同时在质控规则的选择上亦有很大的帮助。

参考文献

- 1] 冯仁丰. 临床检验质量管理基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2007: 220-225.
- [2] 马学斌, 马骢, 杨明. 应用 CLSI 系列文件对 ACL TOP 700 全自动血凝分析仪进行性能验证及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 10(20): 2742.
- [3] 王治国. 临床检验方法确认与性能验证[M]. 北京: 人民卫生出版社 2004: 187.
- [4] 丛玉隆. 积极开展血栓与止血实验及质量控制[J]. 中华医学检验杂志, 1998, 21(5): 261.
- [5] 王治国. 6σ 质量标准在临床实验室质量控制的应用[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 189.
- [6] 蒋玲丽, 肖艳群, 王庆忠. 不同允许总误差在特定蛋白检测性能评价与质量控制规则选择中的应用[J]. 检验医学, 2012, 24(4): 261-163.
- [7] 张莉, 张健, 陆银华. 不同允许总误差在肿瘤标志物检测性能评价与质量控制规则选择中的应用[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 328-329.
- [8] 张惊雷. 方法评价决定图表工具在血液分析仪性能评估中的应用[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2013, 12(5): 101-102.
- [9] 简正伟, 胡意, 张世锟. CA-7000 全自动血凝仪性能评价的探讨[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(6): 548-554.
- [10] 陈渊博, 郑文婷, 尹志军. CA-7000 全自动凝血仪性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 209-211.
- [11] 郑加永, 夏淑琦, 魏国忠. Destiny Max 全自动血凝分析仪的性能评价[J]. 检验医学, 2013, 28(12): 1116-1117.
- [12] 陈化禹, 耿洁, 焦连亭. 不同溯源的两台血凝仪测定纤维蛋白原方法学比较[J]. 检验医学, 2009, 24(4): 278.
- [13] 彭明婷, 谷小林. Sysmex CA-50 型血凝仪的性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(5): 315-317.

(收稿日期: 2014-03-01)

(上接第 2070 页)

节约了时间,减轻对细胞的损伤,提高了检测效果。

综上所述,通过分析不同的刺激培养条件和检测方案对 Th17 细胞频率的影响,筛选优化实验条件,建立了一套简便有效的检测人外周血 Th17 细胞频率的实验方案,为标准化以后研究 Th17 细胞在不同疾病状态时的功能和作用打下基础。

参考文献

- [1] Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, et al. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies[J]. Am J Pathol, 2012, 181(1): 8-18.
- [2] Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, et al. Increased levels of Th17 cells are associated with non-neuronal acetylcholine in COPD patients[J]. J Neuroimmunol, 2014, 268(1/2): 95-98.
- [3] 秦卫兵, 杨宁, 崔蓉, 等. 原因不明复发性流产患者外周血 Th17 和 Treg 细胞频率及其细胞因子水平变化[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(14): 2513-2515.
- [4] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H) 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis[J]. Nature, 2007, 445(7128): 648-651.
- [5] De Simone V, Pallone F, Monteleone G, et al. Role of TH17 cytokines in the control of colorectal cancer[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(12): e26617.
- [6] 段晓娟, 杨林花, 张丽. Th17 细胞及白介素 17 在原发性免疫性血小板减少症中的表达和临床意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(5): 1154-1157.
- [7] Kemp K, Bruunsgaard H. Identification of IFN- γ -Producing CD4 $^{+}$ T cells following PMA stimulation[J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(7): 503-506.
- [8] 周茂华, 张敏, 欧阳维富, 等. 正常人外周血 Th17 细胞的频率、表型及其功能特征[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(9): 1385-1387.
- [9] 曹江, 李秀芹, 陈翀, 等. 免疫性血小板减少症患者外周血 Th17/Treg 细胞比率失衡的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 19(3): 730-733.
- [10] Kryczek I, Wu K, Zhao E, et al. IL-17+Regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer[J]. J Immunol, 2011, 186(7): 4388-4395.
- [11] 黄昂, 张纪元, 张政等. 体外检测人 Th17 细胞频率的方法[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(1): 50-52.
- [12] 吴丽娟. 临床流式细胞学检验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 104-106.

(收稿日期: 2014-02-28)