

微环境中 MDSC 亚群流式检测

The Detection of Myeloid Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry

金静思[#], 杨超[#], 邓刘福^{*}

上海市免疫学研究所, 上海交通大学医学院, 上海

*通讯作者邮箱: dengliufu@shsmu.edu.cn

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 金静思, 杨超, 邓刘福. (2019). 肿瘤微环境中 MDSC 亚群流式检测. *Bio-101* e1010312. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010312.

How to cite: Jin, J. S., Yang, C. and Deng, L. F. (2019). The Detection of Myeloid Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010312. Doi:10.21769/BioProtoc.1010312. (in Chinese)

摘要: 在肿瘤免疫微环境中主要起着促肿瘤作用的髓系来源抑制细胞 (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) 可分为多形核髓系来源抑制细胞 (polymorphonuclear MDSCs, PMN-MDSCs) 和单核髓系来源抑制细胞 (monocytic MDSCs, M-MDSCs) (Engblom 等, 2016)。肿瘤中 MDSCs 的来源、分化及其功能正是一大研究热点, 由于肿瘤内浸润免疫细胞的多样性及复杂性, 流式技术成为分析 MDSCs 的主要手段 (Bronte 等, 2016)。该文旨在阐述运用流式技术分析肿瘤微环境中 MDSCs 的亚群, 此方法可为后续 MDSCs 分选及其功能检测实验奠定基础。

关键词: 髓系来源抑制细胞, 肿瘤微环境, 流式技术

材料与试剂

材料:

1. 眼科剪及眼科镊
2. 1 ml 移液枪及枪头
3. 6 孔细胞培养平底板 (NEST[®], catalog number: 032819AA01)
4. 96 孔细胞培养 U 底板 (NEST[®], catalog number: 112518AA03)
5. 15 ml 离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc[™], catalog number: 339650)

6. 50 ml 离心管 (Thermo Fisher Scientific, Nunc™, catalog number: 339652)
7. 无菌注射器 (上海康德莱企业发展有限公司, KDL®)
8. 70 μm 孔径滤网 (Corning, Falcon®, catalog number: 352350)
9. 5 ml 无菌圆底管 (带滤网) (Corning, Falcon®, catalog number: 352235)

试剂:

1. 胎牛血清 (Gemini, Foundation™, catalog number: 900-108)
2. Anti-FcR (CD16/CD32) 抗体 (BioXCel, catalog number: BE0307)
3. 胶原蛋白酶 I (Worthington Biochemical®, catalog number: LS004186, -20 °C 储存)
4. 脱氧核糖核酸酶 I, 来源于牛胰腺 (Sigma-Aldrich®, catalog number: DN25, -20 °C 储存)
5. DMEM 基础高糖培养液 (Hyclone™, catalog number: SH30243.01)
6. PBS (Hyclone™, catalog number: SH302560.31)
7. 乙醇
8. 5% DMEM 培养液 (见溶液配方)
9. FACS buffer (见溶液配方)
10. 肿瘤组织消化液 (见溶液配方)

抗体:

1. Anti-FcR (CD16/CD32) (BioXCell, BioXCell, catalog number: BE0307)
2. Fixable Viability Stain 780 (BD Bioscience, BD, catalog number: 565388)
3. Anti-mouse-CD45.2-BV785 (Biolegend, catalog number: 109839)
4. Anti-mouse-Ly6C-BV605 (Biolegend, catalog number: 128035)
5. Anti-mouse-Ly6G-BV711 (Biolegend, catalog number: 127643)
6. Anti-mouse-CD11b-PE/Cy7 (Biolegend, catalog number: 101216)

仪器设备

1. 37 °C 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher Scientific)
2. 电热恒温水槽 (上海一恒科学仪器有限公司, model: DK-8AXX)
3. 低温离心机 (Eppendorf®, model: 5810R)
4. 微型台式真空泵 GL-802B 型 (Kylin-bell®, model: GL-802B 型)

5. Flow Cytometer (BD, model: LSRfortessa, or equivalent)
6. 恒温细胞培养箱
7. 超净工作台

实验步骤

1. 前期准备工作

- 1.1 分组标记: 根据实验分组需求取若干六孔板, 标记荷瘤小鼠信息。六孔板中每孔加入 3 ml DMEM 高糖培养基, 将六孔板置于冰上待用。
- 1.2 配制肿瘤组织消化液: 将预先配制的 100× 消化液母液 (含 100 mg/ml 胶原酶 I 和 20 mg/ml DNA 酶 I) 用含 5% FBS 的 DMEM 高糖培养基稀释 100 倍, 即最终工作浓度为 1 mg/ml 胶原酶 I 和 200 μg/ml DNA 酶 I。将 1× 消化液置于 37 °C 水浴锅预热待用。
- 1.3 器械准备: 根据实验分组需求准备适量的剪刀镊子, 用双蒸水洗净后 75%乙醇消毒, 烘干备用。

2. 肿瘤组织的分离

采用颈椎脱臼法将荷瘤小鼠处死, 喷洒 75%乙醇消毒。左手持弯镊, 右手持剪刀在肿瘤右侧 1 cm 处沿肿瘤边缘剪开一长约 2 cm 口子。左手捏住剪开处的皮肤向外翻折, 可清晰见到肿瘤附着于皮下。用剪刀沿肿瘤边缘轻轻剪开, 将肿瘤剥离, 注意肿瘤若有溃烂, 则避开溃烂之处。将剥离下来的肿瘤组织放入预先准备好的六孔板内。

3. 肿瘤组织的剪碎

待全部肿瘤剥离完毕, 用移液枪吸出预留 DMEM 高糖培养基, 余大约 0.1 ml, 以免在剪碎过程中肿瘤组织干燥。手持剪刀小幅度高频率剪碎肿瘤组织, 将肿瘤组织剪成泥浆状, 肉眼无法看见清晰组织块。注意以上步骤均在冰上操作。

4. 肿瘤组织的消化

将肿瘤组织剪成泥浆状后, 每孔加入 2 ml 1× 消化液, 用 1 ml 枪头将肿瘤组织碎末打散, 置于 37 °C 恒温细胞培养箱消化 30 min, 每隔 10 min 将六孔板取出晃动混匀一次。注意严格按照时间消化, 以免影响免疫细胞活性; 可根据肿瘤大小调整 1× 消化液的用量。

5. 制备肿瘤细胞悬液

消化完毕后，将六孔板取出放于冰板上，每孔加入 4 ml DMEM 高糖培养基 (含 5% FBS) 终止消化。用巴氏吸管吸取肿瘤组织悬液至 70 μm 细胞滤网过滤，同时用 1 ml 注射器后部研磨遗留在滤网上的组织块 (注意研磨时切勿用力，易将脂肪等带入细胞悬液中)，用 DMEM 高糖基础培养基冲洗滤网上的组织块，所得肿瘤悬液 4 °C，850 × g，离心 5 min。

6. 染色前封闭

由于髓系细胞表面表达较多 Fc 受体，容易对流式抗体有非特异性结合，故采用预先阻断 Fc 受体封闭。离心后弃上清，根据沉淀多少加入适量 FACS 缓冲液混匀，取 10 μl 细胞悬液计数，将悬液细胞密度调至 2 × 10⁷ 个/ml。取 100 μl 细胞悬液于 U 底 96 孔内，按 100:3 比例加入抗 Fc 受体抗体 (即每 100 μl 细胞悬液加入 3 μl 抗 Fc 受体抗体)，4 °C 孵育 30 min。

7. 配制流式染色抗体

按照表 1 配制流式抗体混合液 (用 FACS 缓冲液配制)，每孔加入 70 μl 流式抗体混合液，根据需要计算每个流式抗体所需体积。

表 1. 肿瘤微环境内 MDSCs 流式染色配色

流式抗体	荧光通道	稀释比例
Fixable Viability Stain 780	APC/Cy7	1000×
Anti-mouse-CD45.2	BV785	200×
Anti-mouse-Ly6C	BV605	200×
Anti-mouse-Ly6G	BV711	200×
Anti-mouse-CD11b	PE/Cy7	200×

注：流式抗体使用配色可自行调整，注意不要使用补偿过大的荧光通道。

8. 流式染色

封闭结束后，4 °C，850 × g，离心 5 min。弃上清，每孔加入 70 μl 流式抗体混合液，轻柔吹打混匀，注意不要有气泡。将 96 孔板置于 4 °C 避光，染色 30 min。

9. 洗涤、上机

染色结束后每孔加入 200 μ l FACS 缓冲液，4 $^{\circ}$ C，850 \times g，离心 5min。弃上清后再加入 200 μ l FACS 缓冲液洗涤一次，4 $^{\circ}$ C，850 \times g，离心 5min。弃上清，加入 300 μ l FACS 缓冲液重悬细胞，将细胞悬液转移至带滤网的流式管中 (同时过滤细胞悬液)。制备好的流式染色样品用 BD Fortessa 进行分析，数据处理软件采用 FlowJo Version 10.0。

结果与分析

设门方式 (图 1):

PMN-MDSC: Single cell, live, CD45+Ly6CintLy6G+CD11b+

M-MDSC: Single cell, live, CD45+Ly6ChiLy6G-CD11b+

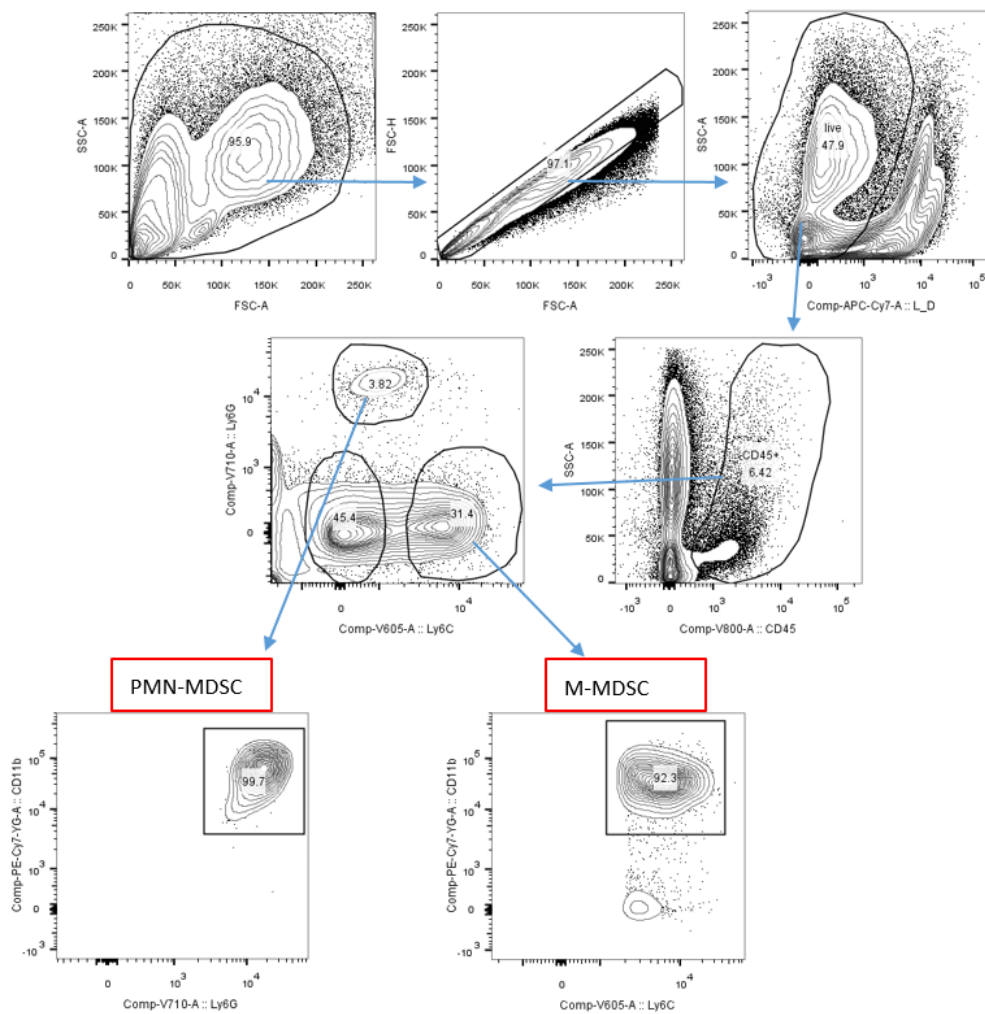


图 1. 肿瘤内 MDSC 的设门方式

溶液配方

注：以下溶液均在超净台内配制。

1. 5% DMEM 培养液

DMEM 基础高糖培养液 + 5%胎牛血清

4 °C 冷藏，1 个月内使用

2. FACS buffer

PBS + 2%胎牛血清

4 °C 冷藏，1 周内使用

3. 肿瘤组织消化液

5% DMEM 培养液 + 胶原蛋白酶 I (工作浓度：1 mg/ml) + 脱氧核糖核酸酶 I

(工作浓度：200 µg/ml)

参考文献

1. Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H. and Gabrilovich, D. I. (2016). [Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards.](#) *Nat Commun* 7: 12150.
2. Engblom, C., Pfirschke, C. and Pittet, M. J. (2016). [The role of myeloid cells in cancer therapies.](#) *Nat Rev Cancer* 16(7): 447-462.