

人 PBMCs 中主要白细胞亚群的深入表征

Agilent NovoCyte Opteon 光谱流式细胞仪 45 色方案

作者

Ming Lei,
Laurissa Ouaguia,
Garret Guenther,
Peifang Ye,
Nancy Li
安捷伦科技有限公司

摘要

流式细胞术是一种强大的技术，可以深入分析免疫细胞的不同亚群，以对免疫系统进行全面评估。光谱流式因其支持更多的标记物、更大的灵活性和更好的分辨率，从而使我们的细胞分析能力更进一步。在本应用简报中，为 Agilent NovoCyte Opteon 光谱流式细胞仪设计了 45 色方案，用于分析外周血单个核细胞 (PBMC) 样品中免疫细胞的分布。

前言

异常复杂的细胞网络使免疫系统能够识别和清除死亡和缺陷细胞，同时也保护身体免受病原体的侵害。作为免疫系统的关键驱动因素，外周血细胞发生活化、增殖并分化为以一组特定标志物表达和功能为特征的各种亚群。由于采集的简易性和非侵入性，外周血已成为可广泛获得的外周血单个核细胞 (PBMCs) 来源，大量应用于基础研究、转化研究和临床应用^[1-3]。在健康供体中，PBMCs 代表由若干免疫细胞类型组成的异质细胞群，包括但不限于：淋巴细胞（包括 T 细胞、B 细胞、自然杀伤 (NK) 细胞、NKT 细胞、 $\gamma\delta$ T 细胞和固有淋巴细胞 (ILCs))、单核细胞、嗜碱性粒细胞和树突状细胞 (DC)^[1,3,4]。

外周血中的大多数淋巴细胞由表达 CD3+ 的 T 细胞 (45%–70% PBMCs) 组成。根据 $\alpha\beta$ TCR 或 $\gamma\delta$ TCR 的表达，可以区分两种类型的 T 细胞^[5]。表达 $\alpha\beta$ TCR 的 T 细胞可进一步细分为常规 CD4+ T 辅助细胞 (25%–60%) 和 CD8+ T 细胞毒性细胞 (5%–30%)。CD4+ T 细胞和 CD8+ T 细胞在健康供体 PBMCs 的比例约为 2:1^[3,6]。CD4+ T 辅助细胞是免疫稳态和炎症的必需介质。根据特定表面标志物/蛋白、细胞因子、趋化因子受体和特定转录因子的表达谱，CD4+ T 细胞可进一步分为 Th1、Th2、Th17、Th9、Th22、滤泡辅助 (Tfh) 细胞、胸腺新迁出细胞 (RTE) 和调节性 T 细胞 (Treg) 亚群^[7-10]。此外，抗原呈递细胞在向初始 T 细胞呈递抗原后 T 细胞被活化，并分化为效应 T 细胞和记忆细胞。效应细胞迁移到感染部位并消除病原体。这些效应细胞寿命较短，而形成的记忆亚群具有长期存活的潜力^[7,11]。常规 CD8+ T 细胞毒性细胞是对抗内感染和肿瘤细胞的适应性免疫系统的关键组成。与 CD4+ T 细胞类似，初始 CD8+ T 细胞的活化诱导了大量自主的增殖和分化程序，产生效应细胞和记忆细胞^[7]。记忆 T 细胞是免疫的重要驱动因素，因为免疫记忆对于长期免疫和预防感染至关重要^[7]。尽管 CD4–CD8 模式相互排斥，但一小部分 $\alpha\beta$ T 细胞由非常规 T 细胞组成。这些非常规 T 细

胞由双阴性 CD4-CD8- T 细胞^[5,12] 和双阳性 CD4+CD8+ T 细胞组成^[13]。非常规 T 细胞代表研究最少的 T 细胞亚群，已被确定为各种疾病的关键因素，这些因素显示细胞毒性功能（慢性病毒感染）或调节作用（恶性肿瘤）。与常规 T 细胞类似，非常规 T 细胞也表达活化标志物，并表现出记忆样特征^[13-15]。CD3+ T 细胞也包含 Treg 细胞，Treg 在健康供体的 PBMC 中占 CD4 T 的比例约为 3%–5%^[16]。Treg 已使用各种方法进行了鉴定，包括通过 CD3、CD4、CD25 和 CD127 标志物的相对表达。Treg 细胞可细分为胸腺中生成的自然性 Treg (nTreg) 或外周诱导性 Treg (iTreg)^[17,18]。Treg 细胞表现出许多活化和记忆特征，已知可抑制对自身抗原的免疫反应，并在维持外周耐受性中发挥作用^[7,18]。外周 CD3+ T 细胞的另一个亚群是 CD56+ NKT 细胞 (0.04%–1.3% 淋巴细胞)，能够影响固有和适应性免疫反应的状态^[19]。基于 CD16 和 CD56 标志物的表达水平，NKT 细胞可进一步分为不同亚群，并与 T 细胞类似，共刺激分子的结合影响 NKT 细胞活化和功能^[19,20]。

其他非常规 T 细胞包括 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞，它同时具有固有和适应性样特性，构建了固有和适应性免疫之间的桥梁^[21]。由于其独特的生物学特性，这些能力使 $\gamma\delta$ T 细胞成为过继细胞免疫治疗有前景的候选对象。根据特定因子和蛋白的表达水平， $\gamma\delta$ T 细胞可细分为不同的亚型^[22]。

外周淋巴细胞还包括 B 细胞、NK 细胞、ILCs 等非 T 细胞^[3,23]。B 细胞是表达 CD19+ 的细胞，该细胞可以分泌抗体。因此，它们是体液免疫的中心要素，作为适应性免疫系统的一部分，可预防几乎不限种类的病原体。B 细胞约占 PBMCs 的 15%，可成熟并分化为浆母细胞、浆细胞、过渡性 B 细胞、记忆 B 细胞、滤泡 B 细胞、边缘区 B 细胞、调节性 B 细胞和 B-1 细胞。可根据一组蛋白和因子（包括 CD27、IgM、IgG、IgD 和 CD38）的表达表征各 B 细胞亚群^[24]。PBMCs 中还包括细胞毒性自然杀伤细胞 (NK 细胞)，是先天免疫系统的关键组成部分，它们通过直接摧毁被病原体感染的细胞来发挥重要作用。根据 CD16 和 CD56 标志物的相对表达，NK 细胞可进一

步分为不同的亚群^[3,20]。PBMCs 也由缺乏谱系标志物和抗原特异性受体表达的 ILCs 组成。尽管存在这些特征，但 ILCs 可生成细胞因子和分泌蛋白，导致感染情况下免疫反应的改善。事实证明，一些 ILCs 与 CD4+ T 细胞亚群有许多相似之处。因此，ILCs 可根据特异性标志物表达和细胞因子产生进一步分为特定亚群^[25,26]。

PBMCs 中还包含一部分的 DC 细胞 (1%-2%)，作为专职抗原呈递细胞发挥作用，具有诱导初始 CD4+ 和 CD8+ T 细胞启动和分化为辅助性 T 细胞、细胞毒性效应 T 细胞和记忆 T 细胞的独特特性。根据本体、定位、表面标志物表达、细胞因子产生、抗原处理和呈递能力，DC 可进一步分为髓性或常规树突状细胞 (CD11c/cDC2 和 CD141/cDC1) 和浆细胞样树突状细胞 (CD123/pDCs)^[27,28]。PBMCs 也由单核细胞 (10%-20%) 组成，代表一类高度可塑的固有免疫细胞，在外周表现出显著异质性。表面标志物相对表达的不同模式 (CD16、CD14) 已被接受为区分三个单核细胞亚群的基础：非经典、中间和经典单核细胞^[3,29]。根据 PBMCs 分离方法，PBMCs 也由一小部分被称为嗜碱性粒细胞 (< 1%) 的细胞组成。这些嗜碱性粒细胞可根据 HLA-DR 和 CD123 标志物的相对表达进行表征^[30]。

人们对破译每个血液免疫细胞亚群的复杂作用越来越感兴趣，以评估它们如何塑造免疫反应、影响癌症和疾病进展以及影响药物有效性。为了克服这一困难，迫切需要在单细胞水平和亚群水平对免疫系统进行高通量和深入分析的方法和仪器。我们开发的 45 色光谱流式免疫表型分析配色方案可定量健康人群 PBMCs 中主要固有免疫细胞类型和适应性免疫细胞类型上表达的外周免疫亚群占比、蛋白表达、活化标志物、耗竭标志物和分化标志物。使用各个群体表达的共有表面标志物确定群体占比，并使用与细胞活化和增殖 (CD69、HLA-DR、CD38)、细胞耗竭和衰老 (PD-1、CD223、CD57)、细胞分化 (CCR7、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD127) 和细胞趋化或迁移潜能 (CXCR3、CCR6、CCR5、CXCR5) 相关的标志物进一步评估各个群体的表征。Agilent NovoCyte Opteon 光谱流式细胞仪让这种深入分析成为可能。

传统的细胞计数法受限于只能从与检测器数量相同的荧光参数中获得发色团发射的峰值，与之相比，光谱流式细胞技术设置了许多检测器以捕获所有激光束对应的每个发色团的全荧光光谱。如此一来，光谱流式细胞技术允许在单个实验中获得每个荧光染料的更多参数^[1,31,32]。

实验部分

材料

表 1 描述了用于制备 45 色样品的材料。

表 1. 使用的试剂

试剂	货号	制造商
True-Stain Monocyte Blocker	426102	BioLegend
Brilliant Stain Buffer Plus	566385	BD
CellBlox Blocking Buffer	B001T02F01	Thermo Fisher Scientific
磷酸盐缓冲液 (PBS)	GNM-14190	Genom Biomedical Technology
胎牛血清 (FBS)	10091148	Thermo Fisher Scientific

染色流程

以下方案描述了样品处理过程。

PBMCs 的制备

- 在 37 °C 下预热 RPMI 1640 完全培养基至少 30 分钟
- 在 37 °C 水浴中解冻 PBMC 冻存管 (约 15×10^6 个细胞)，直至只剩下少许冰
- 将冻存管内的 PBMC 转移至 50 mL 锥形管中
- 向冻存管中加入 1 mL 预热的 RPMI 1640 完全培养基，并留至步骤 g 中使用
- 向已转移了 PBMC 的 50 mL 锥形管中逐滴加入 5 mL RPMI 1640 完全培养基。加入时，轻轻混合 50 mL 锥形管 (一只手握住移液器，另一只手握住 50 mL 锥形管，加入 RPMI 1640 完全培养基的同时轻轻混合锥形管)
- 在加入第一批 5 mL RPMI 1640 完全培养基后，接下来的 5 mL 加入速度应略快 (每次几滴)
- 加入 10 mL 后，将冻存管内残留的 PBMC 转移至 50 mL 锥形管中

- h. 向 50 mL 锥形管中加入补充 RPMI 1640 完全培养基到 20 mL
- i. 400 g, 离心 8 分钟
- j. 小心倒出上清液, 注意勿扰动细胞团块
- k. 将细胞团块轻轻悬浮于 2 mL 预热的 RPMI 1640 完全培养基中, 并定容至 20 mL
- l. 重复步骤 i 和 j
- m. 将细胞沉淀悬浮于一定体积的 RPMI 1640 完全培养基中, 若立即使用则用 PBS 悬浮

Live/Dead 染料和抗体混合物的制备

- a. 解冻 Zombie NIR Live/Dead 染料, 取 0.25 μ L 转移至较大的 Eppendorf 管中, 加入 1000 μ L 1x PBS (最终稀释度 1:4000), 避光保存待用
- b. 将四个 1.5 mL Eppendorf 管标记为: 抗体混合物 A、B、C 和 D。细胞需分四步染色, 以获得更好的染色效果
- c. 向各抗体混合物管中加入 10 μ L Brilliant Stain Buffer 和 5 μ L True-Stain Monocyte Blocker, 仅向抗体混合物管 A 中加入 5 μ L CellBlox Blocking Buffer
- d. 按抗体列表 (表 2) 制备抗体混合物, 将 A 组抗体加入标记为 A 的管中, 将 B 组抗体加入标记为 B 的管中, 以此类推
- e. 以 16000–18000 g 的转速离心 5 分钟。使用抗体时, 从液体顶部吸出混合物, 不要接触试管底部。抗体聚集体会留在底部

表 2. 抗体混合物组, CD45RO SBUV445 抗体除外

	标记物	荧光染料	用量 (μ L)
抗体混合物 A			
1	CCR6	BV711	2.5
2	CCR5	BUV563	2.5
3	TCR γ δ	PerCP-eFluor 710	0.63
4	CXCR5	BV750	0.63
5	IgG	BV605	0.63
6	CXCR3	PE-Cy7	1.25
7	CD223(LAG-3)	NovaFluor Blue 660/120S	1.25
8	CD69	StarBright Blue 765	1.25
9	CCR7	BV421	2.5
抗体混合物 B			
1	CD20	Spark YG 593	1.25
2	CD1c	Alexa Fluor 647	2.5
3	CD28	BV650	5
4	PD-1	BV785	5
5	CD159c	PE	10
抗体混合物 C			
1	CD127	Spark Red 718	1.25
2	CD2	PerCP-Cy5.5	2.5
3	CD337	PE-Dazzle 594	2.5
4	CD3	BV510	2.5
5	CD27	APC-H7	2.5
6	CD25	PE-Alexa Fluor 700	5
7	CD11c	eFluor 450	5
抗体混合物 D			
1	CD45RA	BUV395	0.32
2	IgD	BV480	0.32
3	CD4	CF594	0.32
4	CD14	Spark Blue 550	0.32
5	HLA-DR	PE-Fire 810	0.32
6	CD33	StarBright Blue 580	0.32
7	CD16	BUV496	0.63
8	CD57	FITC	0.63
9	CD24	PE-Alexa Fluor 610	0.63
10	CD95	PE-Cy5	0.63
11	CD38	APC-Fire 810	0.63
12	CD31	StarBright Blue 810	0.63
13	CD141	BB515	1.25
14	CD19	Spark NIR 685	1.25
15	CD8	BUV805	1.25
16	CD159a	APC	2
17	CD314	BUV615	2.5
18	CD56	BUV737	2.5
19	CD45	PerCP	2.5
20	IgM	BV570	2.5
21	CD39	BUV661	2.5
22	CD123	Super Bright 436	2.5

染色

- a. 将 FACS 管标记为：未染对照管、单染管和多色管
- b. 向各多色管中加入 100 μL 细胞悬液（约 3×10^6 个细胞），同时向各未染色对照管和单染色管中加入 100 μL 细胞悬液（约 3×10^5 个细胞）
- c. 用 PBS 清洗多色管和 Live/Dead 单染管，同时用清洗缓冲液 (PBS + 2% FBS) 清洗其他单染管和未染对照管，每管 3 mL
- d. 500 g 离心 5 分钟，小心倒出上清液
- e. 向多色管和 Live/Dead 单染管中加入 100 μL Zombie NIR 稀释液，涡旋混匀，避光置于冰上 30 分钟
- f. 同时，用表 2 所示的最佳抗体水平对其他单管进行染色，并避光置于冰上 30 分钟。向抗 CD223 NovaFluor Blue 660/120S 单染管加入 CellBlox Blocking Buffer
- g. 孵育 30 分钟后，用 3 mL 清洗缓冲液清洗多色管、Live/Dead 单染管和其他单管
- h. 重复步骤 d
- i. 向 Live/Dead 单染管、未染对照管和其他单染管中加入 200 μL 清洗缓冲液，涡旋混匀，置于冰上保存
- j. 向所有多色管中加入 2.5 μL 抗 CD45RO SBUV445，涡旋，避光置于冰上 30 分钟
- k. 不洗涤，向所有多色管中加入抗体混合物 A，涡旋，避光置于冰上 30 分钟，然后在室温 (RT) 下放置 20 分钟（这将使 CCR 和 CXCR 标志物的染色更好）
- l. 用 3 mL 清洗缓冲液清洗所有多色管一次
- m. 重复步骤 d

- n. 向所有多色管中加入抗体混合物 B，涡旋混合，并避光置于冰上 40 分钟
- o. 用 3 mL 清洗缓冲液清洗所有多色管一次
- p. 重复步骤 d
- q. 向多色管中加入抗体混合物 C，涡旋混合，并避光置于冰上 40 分钟
- r. 用 3 mL 清洗缓冲液清洗所有多色管一次
- s. 重复步骤 d
- t. 向多色管中加入抗体混合物 D，涡旋混合，并避光置于冰上 40 分钟
- u. 用 3 mL 清洗缓冲液清洗所有多色管两次
- v. 重复步骤 d
- w. 向多色管中加入 300 μL 清洗缓冲液，涡旋，置于冰上保存

结果与讨论

抗体滴定

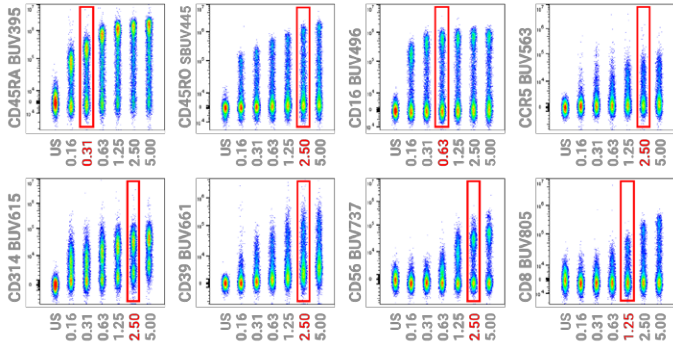
在本应用简报中，通过抗体滴定分析评估了该 45 色配色方案中拟定的所有标志物和荧光染料组合（见表 3）。图 1 所示各抗体所需的体积根据染色指数确定，计算如下： $(\text{MFI}(\text{阳性}) - \text{MFI}(\text{阴性})) / (2 * \text{SD}(\text{阴性}))$ ，其中 MFI 为平均荧光强度。选择最佳滴定作为具有最大或接近最大染色指数或较低扩散误差的抗体最低浓度。

该配色方案设计的主要目的是扩展已发表的 40 个标志物的配色方案 OMIP-069。除 OMIP-069 配色方案，我们还加入了 5 种其他标志物：CD45RO、CD33、CD233 (LAG-3)、CD69 和 CD31。整个抗体和荧光染料配色方案如表 3 所示。由于空间位阻会使这么大的检测方案相当复杂，所以最终确定分成 4 个抗体混合物组并以逐步染色的方式来优化抗体-抗原的结合（表 2）。

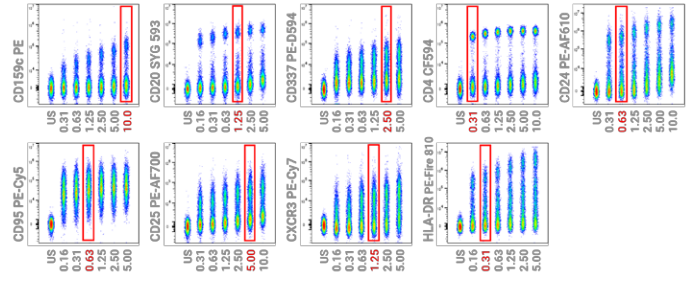
表 3. 抗体信息

	标志物	荧光染料	克隆	制造商	部件号
1	CD45RA	BUV395	5H9	BD Biosciences	740315
2	CD45RO	StarBright UltraViolet 445	UCHL1	Bio-RAD	MCA461SBUV445
3	CD16	BUV496	3G8	BD Biosciences	612945
4	CCR5 (CD195)	BUV563	2D7/CCR5	BD Biosciences	741401
5	CD314 (NKG2D)	BUV615	1D11	BD Biosciences	751232
6	CD39	BUV661	TU66	BD Biosciences	749967
7	CD56	BUV737	NCAM16.2	BD Biosciences	612766
8	CD8	BUV805	SK1	BD Biosciences	612889
9	CCR7 (CD197)	BV421	G043H7	BioLegend	353208
10	CD123	Super Bright 436	6H6	Thermo Fisher Scientific	62-1239-42
11	CD11c	eFluor 450	3.9	Thermo Fisher Scientific	48-0116-42
12	IgD	BV480	IA6-2	BD Biosciences	566187
13	CD3	BV510	SK7	BioLegend	344827
14	IgM	BV570	MHM-88	BioLegend	314517
15	IgG	BV605	G18-145	BD Biosciences	563246
16	CD28	BV650	CD28.2	BioLegend	302945
17	CCR6 (CD196)	BV711	G034E3	BioLegend	353435
18	CXCR5 (CD185)	BV750	RF8B2	BD Biosciences	747111
19	PD-1 (CD279)	BV785	EH12.2H7	BioLegend	329929
20	CD141	BB515	1A4	BD Biosciences	565084
21	CD57	FITC	NK-1	BD Biosciences	555619
22	CD14	Spark Blue 550	63D3	BioLegend	367148
23	CD33	StarBright Blue 580	WM53	Bio-RAD	MCA1271SBB580
24	CD223 (LAG-3)	NovaFluor Blue 660/120S	3DS223H	Thermo Fisher Scientific	H048T02B08
25	CD45	PerCP	HI30	Agilent Technologies	8931017
26	CD2	PerCP-Cy5.5	TS1/8	BioLegend	309225
27	TCR $\gamma\delta$	PerCP-eFluor 710	B1.1	Thermo Fisher Scientific	46-9959-41
28	CD69	StarBright Blue 765	FN50	Bio-RAD	MCA2806SBB765
29	CD31	StarBright Blue 810	WM59	Bio-RAD	MCA1738SBB810
30	CD159c (NKG2C)	PE	134591	R&D Systems	FAB138P-100
31	CD20	Spark YG 593	2H7	BioLegend	302367
32	CD337 (Nkp30)	PE-Dazzle 594	P30-15	BioLegend	325231
33	CD4	CF594	C4/206	Biotium	#BNC940206-500
34	CD24	PE-Alexa Fluor 610	SN3	Thermo Fisher Scientific	MHCD2422
35	CD95 (FAS)	PE-Cy5	DX2	BioLegend	305610
36	CD25	PE-Alexa Fluor 700	CD25-3G10	Thermo Fisher Scientific	MHCD2524
37	CXCR3 (CD183)	PE-Cy7	G025H7	BioLegend	353720
38	HLA-DR	PE-Fire 810	L243	BioLegend	307683
39	CD159a (NKG2A)	APC	REA110	Miltenyi	130-113-563
40	CD1c	Alexa Fluor 647	L161	BioLegend	331510
41	CD19	Spark NIR 685	H1B19	BioLegend	302269
42	CD127	Spark Red 718	A019D5	BioLegend	351376
43	Viability	Zombie NIR	N/A	BioLegend	423105
44	CD27	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560223
45	CD38	APC-Fire 810	HB-7	BioLegend	356643

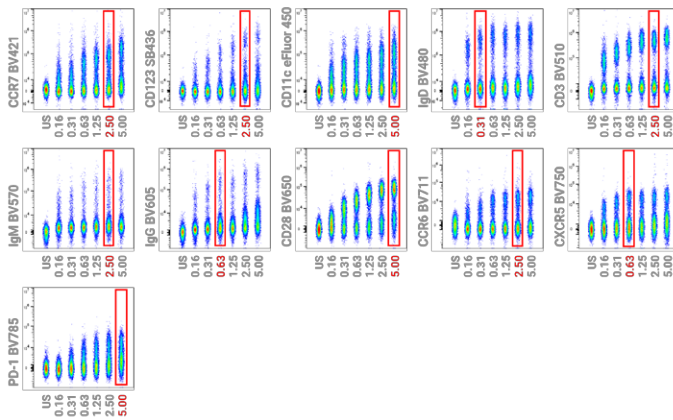
A. UV 激光 (349 nm)



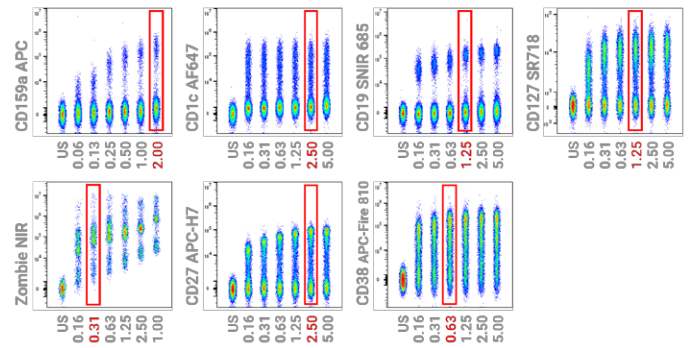
D. 黄色激光 (561 nm)



B. 紫色激光 (405 nm)



E. 红色激光 (637 nm)



C. 蓝色激光 (488 nm)

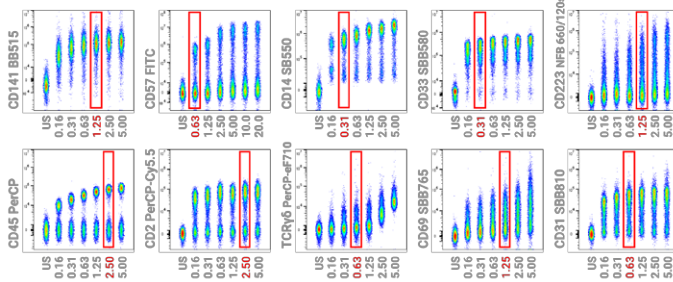
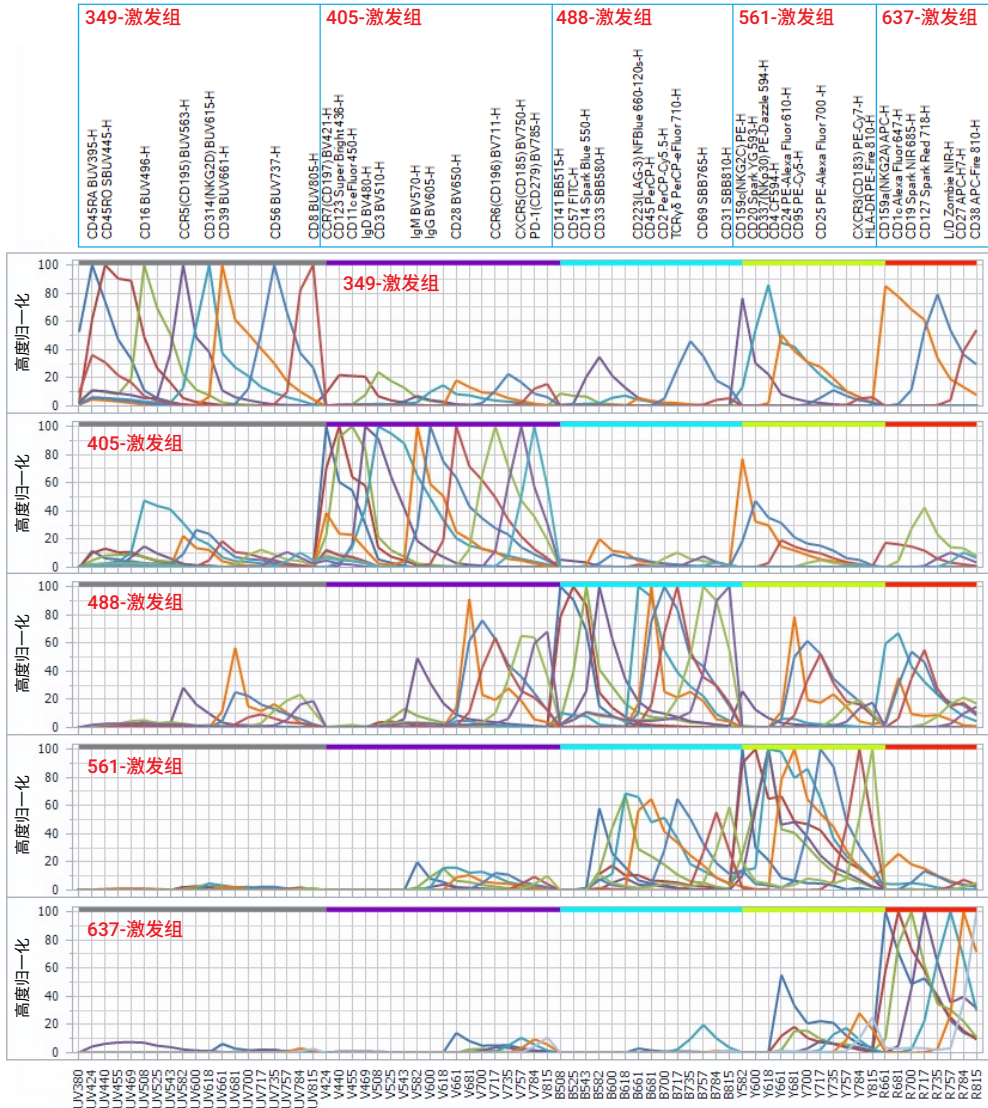


图 1. 45 色配色方案的抗体滴定。使用从健康个体采集的白细胞分离的冻存 PBMCs，对所有抗体进行 6 个梯度，起始浓度范围为 1–20 $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ 染色体积。6 个梯度显示在同一张图中，X 轴为对应的梯度。红色方块突出显示最终选择用于配色方案的梯度。根据染色指数选择最佳梯度（具有最大或接近最大染色指数或较低扩散误差的抗体最低浓度），并用红框表示。通过 Agilent NovoExpress 2.0.0 版软件解析所有滴定数据；排除碎片和粘连体，并使用 FlowJo 10.10.0 合并文件。 (A) 349 nm 激光激发的荧光染料，(B) 405 nm 激光激发的荧光染料，(C) 488 nm 激光激发的荧光染料，(D) 561 nm 激光激发的荧光染料，(E) 637 nm 激光激发的荧光染料。染色指数计算如下： $(\text{MFI}(\text{阳性}) - \text{MFI}(\text{阴性})) / (2 * \text{SD}(\text{阴性}))$ ，其中 MFI 为平均荧光强度

每种染料均收集了参考对照光谱，包括两个细胞群的自发荧光，如图 2 所示。

A. 45 种荧光染料的光谱特征



B. 2 种自发荧光的光谱特征

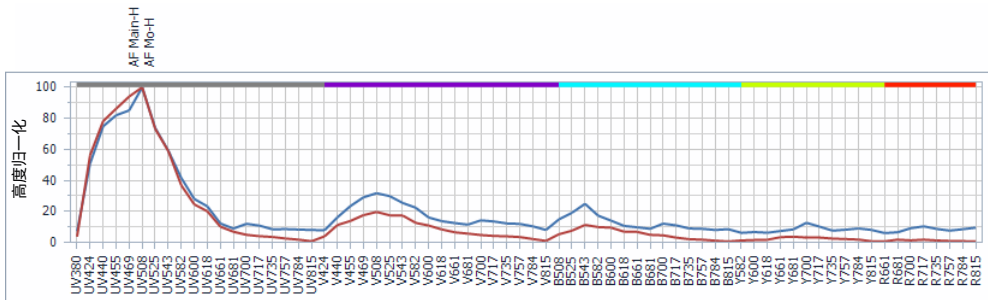


图 2. 用于解析 45 色数据的光谱特征 (45 + 2 AF)。在 Agilent NovoCyte Opteon 光谱流式细胞仪上以默认增益采集单染对照。荧光染料光谱特征 (归一化发射光谱) 显示为按第一激发光和自发荧光分组的光谱图。(A) 45 种荧光染料特征; (B) 2 个自发荧光特征

免疫细胞类型和亚型的分布根据其标志物表达确定，并使用层次设门指定每种类型和亚型，如图 5 所示。

用不同细胞类型分类的解析数据如图 6 所示，突显了我们能够在该配色方案中表征许多亚型的复杂性和深度。

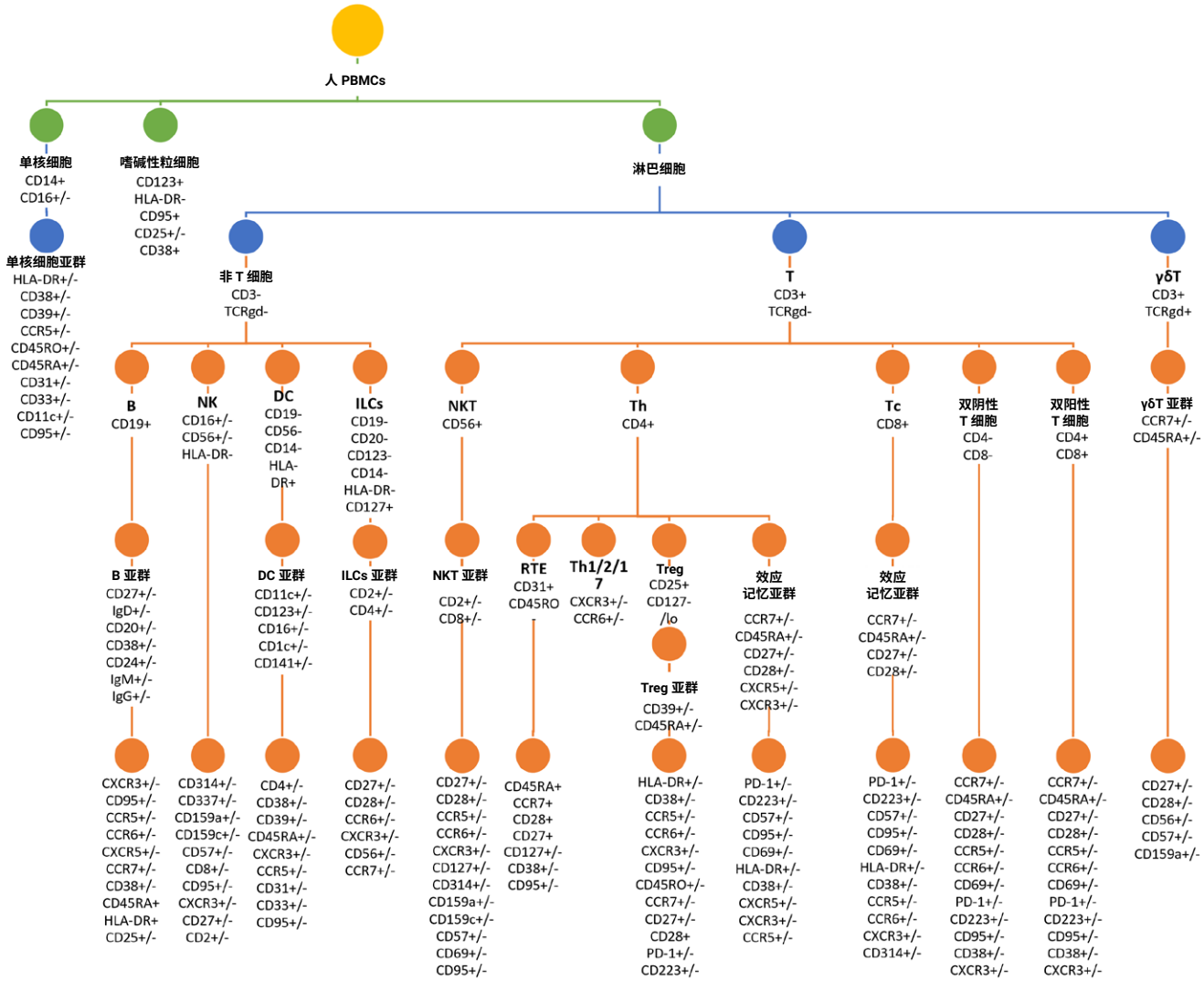


图 5. 所有已鉴定细胞亚群的示意图

用于鉴定主要免疫细胞亚群的手动设门策略

按照方案描述的染色流程处理 PBMCs。如图 6 所示，排除血小板、碎片、粘连体和死细胞后，在活 CD45+ 群中，嗜碱性粒细胞 (1) 被描述为 CD45+CD123+HLA-DR-。根据 FSC-H/BSSC-H 特性圈出淋巴细胞和单核细胞 (2)。然后通过 CD14 和 CD16 表达将单核细胞 (3) 分为非典型 (CD14-CD16+)、中间型 (CD14+CD16+/- 低) 和经典 (CD14+CD16-)。根据淋巴细胞门 (2)，鉴定了以下细胞群：CD3-TCR $\gamma\delta$ -、CD3+TCR $\gamma\delta$ +、CD3+TCR $\gamma\delta$ - (4)。根据 CD45RA 和 CCR7 表达表征了 CD3+TCR $\gamma\delta$ + 细胞群 (5)。CD3+TCR $\gamma\delta$ - 细胞群分为 CD3+CD56+ (NKT 样) 和 CD3+CD56- 亚群 (6)。纳入 CD2 和 CD8 能够进一步分类 NKT 样细胞，CD69 和 CD57 用于检测 NKT 样细胞的早期活化和细胞毒性 (7)。根据 CD3+CD56- 门鉴定了 CD4+、CD8+、CD4+CD8+ 和 CD4-CD8- T 细胞 (8)。根据 CD127 和 CD25 表达 (CD127 低 /-CD25 高)，从 CD4+ 细胞群中鉴定了 Treg 细胞，并利用 CD39 和 CD45RA 进一步对这些细胞进行分类 (9)。CCR7、CD45RA、CD27 和 CD28 允许进一步分类记忆 / 效应 CD4 和 CD8 T 细胞亚群，CXCR3 和 CCR6 允许进一步分类 Th 细胞群，CD45RO 和 CD31 用于检测 CD4 T 细胞内的 RTE 细胞，PD-1 和 CD223 用于检测 CD4 和 CD8 T 细胞的耗竭状态 (10、11)。

从 CD3-TCR $\gamma\delta$ - 细胞群中排除 CD19+ 和 / 或 CD20+ 细胞 (B 细胞) (12)。CD19+CD20+/- 细胞进一步设门为 IgD+CD27-、IgD+CD27+ 或 IgD-CD27+/-；根据 CD20 表达将 IgD-CD27+/- 亚群分为浆母细胞或 IgD- 记忆 B 细胞，在 IgD- 记忆 B 细胞内评估 IgG 和 IgM 表达；将 IgD+CD27- 细胞群进一步分为过渡性 B 细胞；将 IgD+CD27+ 细胞群进一步分为 MZ B 细胞和仅 IgD- 记忆 B 细胞 (13)。NK 细胞定义为 CD3-TCR $\gamma\delta$ -HLA-DR-，分为早期 NK (CD56+CD16-)、成熟 NK (CD56+CD16+) 和终末 NK (CD56-CD16+) 细胞 (14)。首先通过在 CD3-CD19-CD56-CD14-HLA-DR+ 上设门鉴定树突状细胞 (DCs, 15)，并从中鉴定出 CD123+ (pDCs) 和 CD11c+ DCs。CD11c+ DCs 进一步分为 CD11c+CD16- 和 CD11c+CD16+ DCs 进行分类。最后，固有淋巴细胞 (ILCs, 16) 被鉴定为 CD3-CD19-CD20-CD14-CD123-CD127+，并根据 CD2 和 CD4 表达进一步分类。展示的所有数据均来自一名健康供体的冷冻 PBMCs。

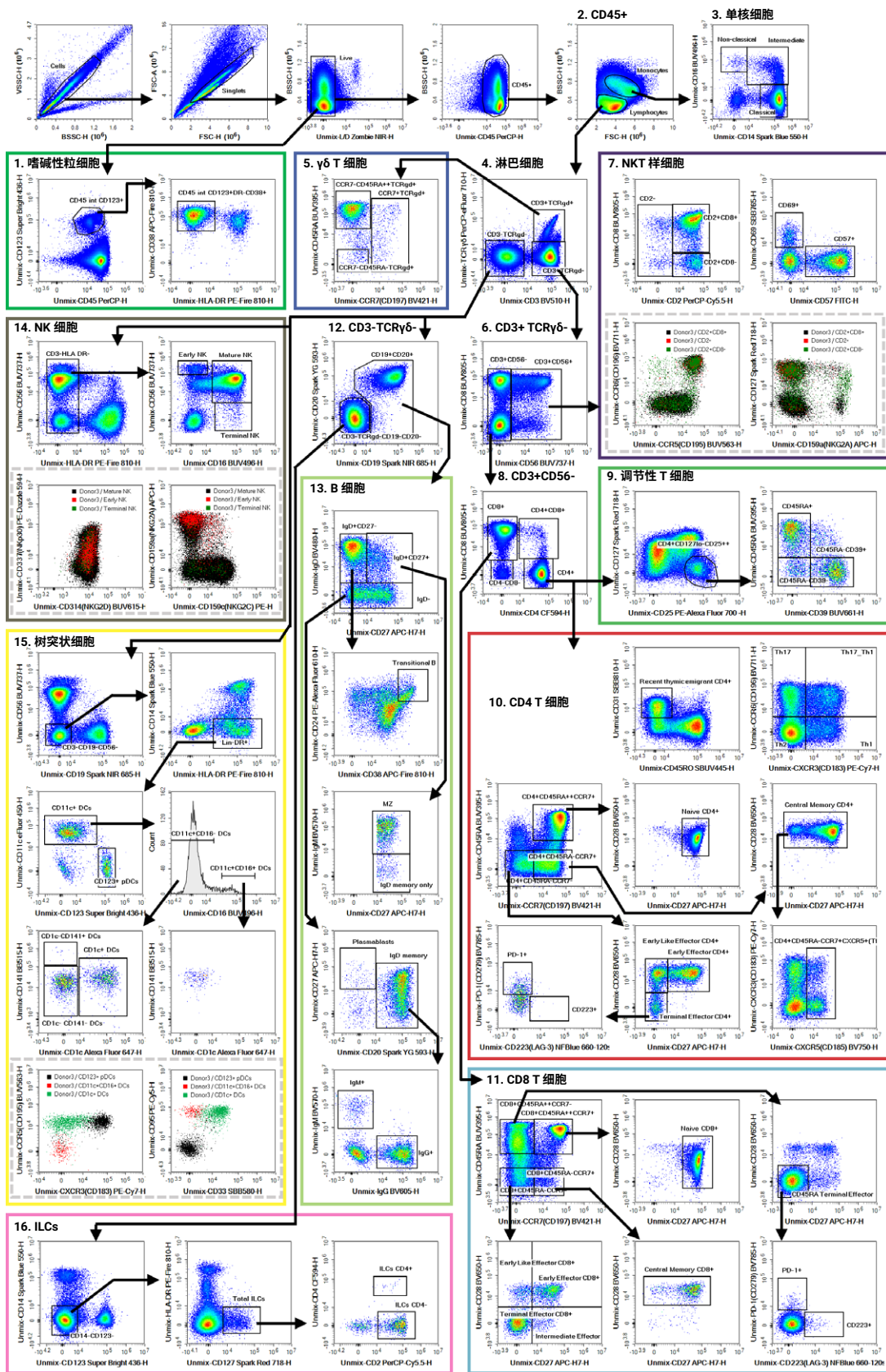


图 6. 去除血小板、碎片、粘连体和死细胞后，正常人 PBMC 样本中表征出的细胞类型如下：单核细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、固有淋巴细胞、B 样、T 样、NKT 样、Treg 和 TCRγδ 淋巴细胞。纳入其他标志物以评估分化、耗竭或活化状态

结论

光谱流式细胞技术提供了同时分析更多标志物的能力，提高了数据分辨率和配色方案设计灵活性。本研究使用 Agilent NovoCyte Opteon 和简单易用的 Agilent NovoExpress 数据采集和分析软件展示了这些优势。通过 5 种激光器（紫外、紫、蓝、黄、红）和共 73 个光电检测器，NovoCyte Opteon 能够满足日益复杂的实验配色方案的要求，并能够实现高效的工作流程，以发现使用传统流式细胞术可能无法获取的答案。

参考文献

1. Sen, P.; Kemppainen, E.; Oresic, M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Mol Biosci* **2017**, *4*:96.
2. Corkum, C.P.; Ings, D.P.; Burgess, C.; Karwowska, S.; Kroll, W.; Michalak, T.I. Immune Cell Subsets and Their Gene Expression Profiles From Human PBMC Isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and Standard Density Gradient. *BMC Immunol* **2015**, *16*:48.
3. Kleiveland, C.R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 161–167.
4. Lozano-Ojalvo, D.; Lopez-Fandino, R.; Lopez-Exposito, I. PBMC-Derived T Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 169–180.
5. Morath, A.; Schamel, W.W. Alphabeta and Gammadelta T Cell Receptors: Similar but Different. *J Leukoc Biol* **2020**, *107*(6):1045–1055.
6. McBride, J.A.; Striker, R. Imbalance in the Game of T Cells: What Can the CD4/CD8 T-Cell Ratio Tell Us About HIV and Health? *PLoS Pathog* **2017**, *13*(11):e1006624.
7. Golubovskaya, V.; Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*(3).
8. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **2008**, *133*(5):775–787.
9. Raphael, I.; Nalawade, S.; Eagar, T.N.; Forsthuber, T.G. T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Cytokine* **2015**, *74*(1):5-17.
10. Pido-Lopez, J.; Imami, N.; Aspinall, R. Both Age and Gender Affect Thymic Output: More Recent Thymic Migrants in Females Than Males as They Age. *Clin Exp Immunol* **2001**, *125*(3):409–413.
11. Gatinoni, L.; Speiser, D.E.; Lichterfeld, M.; Bonini, C. T Memory Stem Cells in Health and Disease. *Nat Med* **2017**, *23*(1):18–27.
12. Li, H.; Tsokos, G.C. Double-Negative T Cells in Autoimmune Diseases. *Curr Opin Rheumatol* **2021**, *33*(2):163–172.
13. Desfrancois, J.; Moreau-Aubry, A.; Vignard, V.; Godet, Y.; Khammari, A.; Dreno, B.; Jotereau, F.; Gervois, N. Double Positive CD4CD8 Alphabeta T Cells: A New Tumor-Reactive Population in Human Melanomas. *PLoS One* **2010**, *5*(1):e8437.
14. Gonzalez-Mancera, M.S.; Bolanos, N.I.; Salamanca, M.; Orjuela, G.A.; Rodriguez, A.N.; Gonzalez, J.M. Percentages of CD4+CD8+ Double-Positive T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Adults from a Blood Bank in Bogota, Colombia. *Turk J Haematol* **2020**, *37*(1):36–41.
15. Kitchen, S.G.; Whitmire, J.K.; Jones, N.R.; Galic, Z.; Kitchen, C.M.; Ahmed, R.; Zack, J.A. The CD4 Molecule on CD8+ T Lymphocytes Directly Enhances the Immune Response to Viral and Cellular Antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*(10):3794–3799.
16. Santegoets, S.J.; Dijkgraaf, E.M.; Bataglia, A.; Beckhove, P.; Briten, C.M.; Gallimore, A.; Godkin, A.; Goutefangeas, C.; de Gruijl, T.D.; Koenen, H.J.; et al Monitoring Regulatory T Cells in Clinical Samples: Consensus on an Essential Marker Set and Gating Strategy for Regulatory T Cell Analysis by Flow Cytometry. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64*(10):1271–1286.
17. Ouaguia, L.; Morales, O.; Mrizak, D.; Ghazal, K.; Boleslawski, E.; Auriault, C.; Pancre, V.; De Launoit, Y.; Conti, F.; Delhem, N. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatol* **2013**, 2013:928485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890904/>
18. Ouaguia, L.; Mrizak, D.; Renaud, S.; Morales, O.; Delhem, N. Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers. *Mediators Inflamm* **2014**, 2014:564296.
19. Khan, M.A.; Khan, A. Role of NKT Cells during Viral Infection and the Development of NKT Cell-Based Nanovaccines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*(9).

20. Poli, A.; Michel, T.; Theresine, M.; Andres, E.; Hentges, F.; Zimmer, J. CD56 Bright Natural Killer (NK) Cells: an Important NK Cell Subset. *Immunology* **2009**, *126*(4):458–465.
21. Melandri, D.; Zlatareva, I.; Chaleil, R.A.G.; Dart, R.J.; Chancellor, A.; Nussbaumer, O.; Polyakova, O.; Roberts, N.A.; Wesch, D.; Kabelitz, D.; et al. The $\gamma\delta$ TCR Combines Innate Immunity with Adaptive Immunity by Utilizing Spatially Distinct Regions for Agonist Selection and Antigen Responsiveness. *Nat Immunol* **2018**, *19*(12):1352–1365. <https://www.nature.com/articles/s41590-018-0253-5>
22. Yazdanifar, M.; Barbarito, G.; Bertaina, A.; Airoidi, I. Gammadelta T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells* **2020**, *9*(5).
23. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2011**, *27*:441–464.
24. Pieper, K.; Grimbacher, B.; Eibel, H. B-Cell Biology and Development. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *131*(4): 959–971.
25. Jacquelot, N.; Seillet, C.; Vivier, E.; Belz, G.T. Innate Lymphoid Cells and Cancer. *Nat Immunol* **2022**, *23*(3):371–379.
26. Chung, D.C.; Jacquelot, N.; Ghaedi, M.; Warner, K.; Ohashi, P.S. Innate Lymphoid Cells: Role in Immune Regulation and Cancer. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*(9).
27. Sosa Cuevas, E.; Ouaguia, L.; Mouret, S.; Charles, J.; De Fraipont, F.; Manches, O.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspord, C. BDCA1(+) cDC2s, BDCA2(+) pDCs and BDCA3(+) cDC1s Reveal Distinct Pathophysiologic Features and Impact on Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Clin Transl Immunology* **2020**, *9*(11):e1190.
28. Ouaguia, L.; Leroy, V.; Dufeu-Duchesne, T.; Durantel, D.; Decaens, T.; Hubert, M.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspord, C. Circulating and Hepatic BDCA1+, BDCA2+, and BDCA3+ Dendritic Cells Are Differentially Subverted in Patients With Chronic HBV Infection. *Front Immunol* **2019**, *10*:112.
29. Cormican, S.; Griffin, M.D. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol* **2020**, *11*:1070.
30. Voskamp, A.L.; Prickett, S.R.; Mackay, F.; Rolland, J.M.; O'Hehir, R.E. MHC Class II Expression in Human Basophils: Induction and Lack of Functional Significance. *PLoS One* **2013**, *8*(12):e81777.
31. Park, L.M.; Lannigan, J.; Jaimes, M.C. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry A* **2020**, *97*(10):1044-1051.
32. Shevchenko, Y.; Lurje, I.; Tacke, F.; Hammerich, L. Fluorochrome-Dependent Specific Changes in Spectral Profiles Using Different Compensation Beads or Primary Cells in Full Spectrum Cytometry. *Cytometry A* **2024**.

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/lifesciences/cellanalysis

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA45406.3860069444

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2024

2024年5月30日，中国出版

5994-7397ZHCN

