

在 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪上使用 16 色免疫表型分析 Panel 对激活后的 T 细胞状态进行全面分析

作者

Lauren Jachimowicz,
Ming Lei, Peifang Ye,
Yan Lu 和 Garret Guenther
安捷伦科技有限公司

摘要

T 细胞是免疫应答的重要组成部分，能够识别和清除外来病原体和肿瘤细胞。然而，为了防止产生自身免疫和免疫病理学问题，必须严格控制 T 细胞应答。我们开发了一款用于 Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪的 16 色免疫表型分析 panel，可同时分析 T 细胞的分化、活化、衰竭和通过脱颗粒及细胞因子的表达分析其功能。理论上，这种方法可以全面分析 T 细胞在免疫应答中的功能。

前言

免疫系统的作用是在限制自身免疫的同时对抗病原体。T 细胞是适应性免疫应答的重要组成部分，可以识别特定抗原并对抗感染。在正常的免疫应答中，T 细胞被活化后，迅速进行分裂并消除所有被感染或癌变的细胞。通过 T 细胞受体 (TCR) 和协同刺激受体实现的激活必须与抑制性受体 (如程序性细胞死亡蛋白 1 (PD-1)、淋巴细胞活化基因 3 (LAG-3) 和 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白域蛋白 3 (TIM-3)) 保持平衡。这是防止产生自身免疫和免疫病理学问题所必需的。

当 T 细胞受到持续性刺激时，抑制性受体的表达逐渐增加，T 细胞的效应功能和增殖能力下降 (T 细胞衰竭)。在慢性感染或癌症中可能出现这种情况。免疫检查点抑制剂能够通过阻断作用逆转抑制性受体的表达，恢复 T 细胞的功能，改善临床上的抗肿瘤免疫功能，因此抑制性受体成为了癌症免疫治疗研究的热点。T 细胞的衰竭程度与多种抑制性受体的共表达密切相关，因此联合治疗有良好的应用前景，因为这样能够靶向多种抑制性受体，提高抗肿瘤免疫功能。单独分析 T 细胞抑制性受体的表达并不能全面了解 T 细胞的状态。检测其他过程 (T 细胞分化、活化、既往抗原暴露、脱颗粒和细胞因子产生) 的标志物，可以提供更全面的信息。

许多研究已经确定了初始 T 细胞、效应 T 细胞和记忆 T 细胞亚群中抑制性受体表达的固有差异。16 色免疫表型分析 panel 设计用于 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪 (表 1)，用以检测 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞的分化和活化状态，并检测功能性 T 细胞应答。利用 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪的高通量可以进行多参数分析，这些数据全面展示了活化后 T 细胞亚群的动态变化和功能。

深入分析 TCR 激活后的 T 细胞状态

为了全面研究 T 细胞对 TCR 激活的反应，我们考察了 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞的分化、活化和抑制剂标志物，以及脱颗粒和产生的细胞因子 (表 1)。用 anti-CD3 抗体、anti-CD28 抗体和白细胞介素-2 (IL-2) 刺激分离的外周血单个核细胞 (PBMC)，诱导 T 细胞活化。在进行流式细胞分析的

前 6 小时，使用蛋白转运抑制剂阻断细胞因子的分泌。在刺激 2 天和 4 天后对样品进行初始检测，第 4 天再次刺激细胞，24 小时后分析 (第 5 天)。

图 1 展示了第 4 天样品检测的代表性设门策略。首先，使用死活染料排除死亡细胞，然后检测整个 CD3 T 细胞群中 CD4 T 细胞和 CD8 T 细胞的频率。接下来，根据 CD45RA 和 CCR7 的细胞膜表面表达确定 T 细胞亚群的相对频率，评估 T 细胞的分化。将 T 细胞分为初始样 T 细胞 $T_{naive-like}$ (CD45RA+/CCR7+)、中枢记忆 T 细胞 T_{CM} (CD45RA-/CCR7+)、效应记忆 T 细胞 T_{EM} (CD45RA-/CCR7-) 和 CD45RA+ 效应记忆 T 细胞 T_{EMRA} (CD45RA+/CCR7+)。通过记忆性干细胞样 T 细胞 (T_{SCM}) 上表达的 CD95，将 $T_{naive-like}$ 细胞分为真正的初始 T 细胞 (T_{naive}) 和 T_{SCM} 。

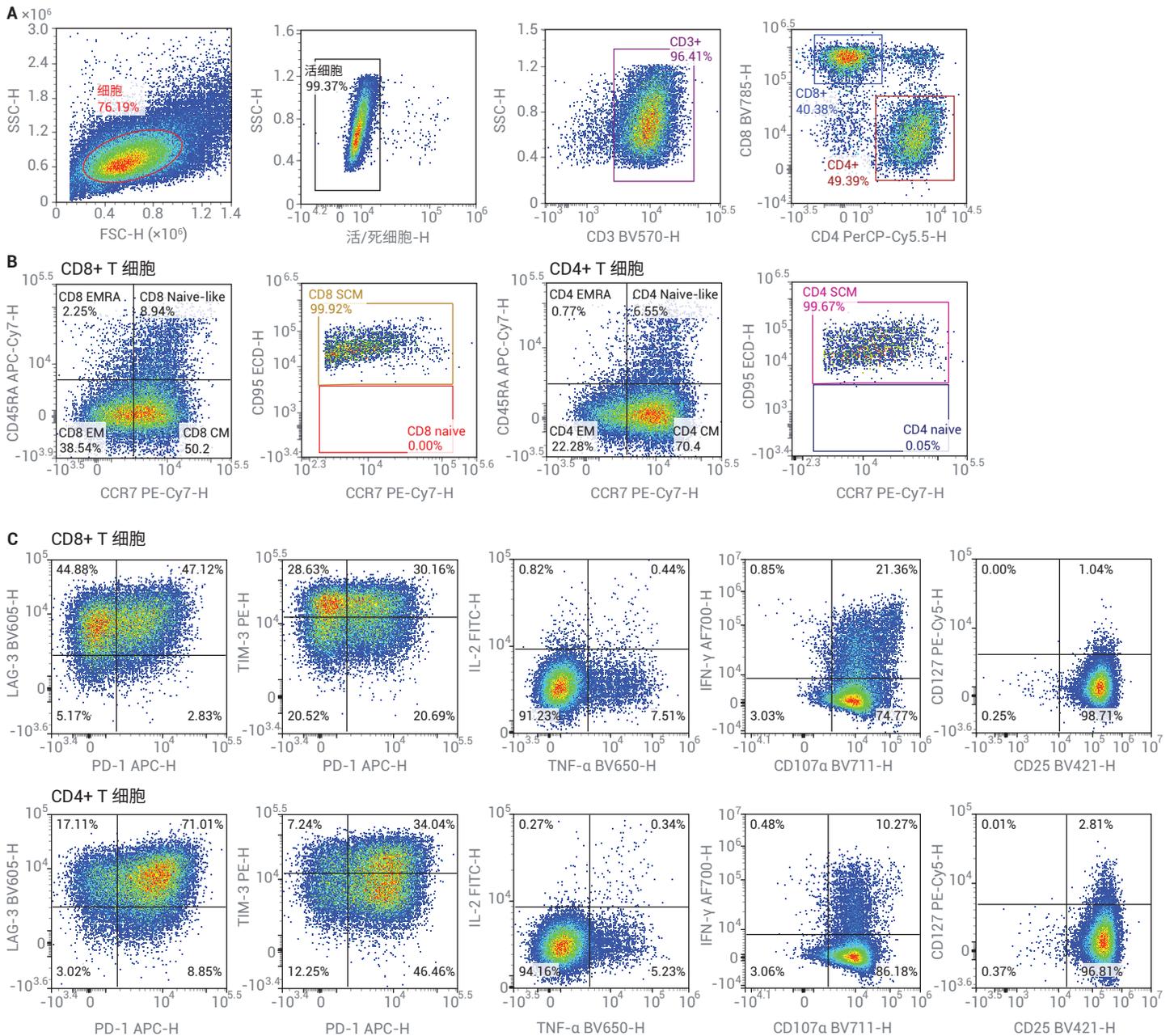
表 1. 用于 16 色免疫表型分析 panel 的荧光染料

标志物	荧光染料	克隆	用途
死活鉴定染料	AVID		活力
CD3	BV570	UCHT1	谱系
CD4	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	
CD8	BV785	SK1	
CD45RA	APC-Cy7	HI100	活化/分化
CCR7	PE-Cy7	G043H7	
CD25	BV421	M-A251	
CD127	PE-Cy5	A019D5	
CD95	PE-Dazzle594	DX2	
PD-1	APC	EH12.2H7	抑制性受体
TIM-3	PE	F38-2E2	
LAG-3	BV605	11C3C65	
IL-2	FITC	MQ1-17H12	细胞因子
IFN- γ	AF700	B27	
TNF- α	BV650	MAb11	
CD107a	BV711	H4A3	脱颗粒

然后检测抑制性受体 PD-1、TIM-3、LAG-3 的表达以及活化标志物 CD25 和 CD127。这些标志物能够提供更多有关 T 细胞活化状态的信息。最后，检测产生的细胞因子 IL-2、肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和干扰素 γ (IFN γ)，以及通过 CD107 α 的表达检测脱颗粒，分辨细胞毒性 T 细胞。使用荧光减一 (fluorescence minus one,

FMO) 对照确定所有的门 (图 1D)。刺激 4 天后，大多数 T 细胞被活化，CD4 和 CD8 T 细胞群中不再含有 T_{naive} 细胞。在 T 细胞中，CD25 表达大幅上调，CD127 表达下调，与高度活化的 T 细胞一致。CD4 和 CD8 T 细胞的抑制性受体表达均上调，但并非所有细胞都呈现阳性表达。研究结果表明产生了细胞因子 TNF α 和

IFN γ ，但观察到只产生少量 IL-2。大多数 T 细胞也呈现 CD107 α 阳性，表明它们已经具备细胞杀伤潜力。在 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪上使用该多参数染色 panel 可以对刺激后的 T 细胞进行全面分析。接下来，检测 TCR 激活后 T 细胞参数的动态变化。



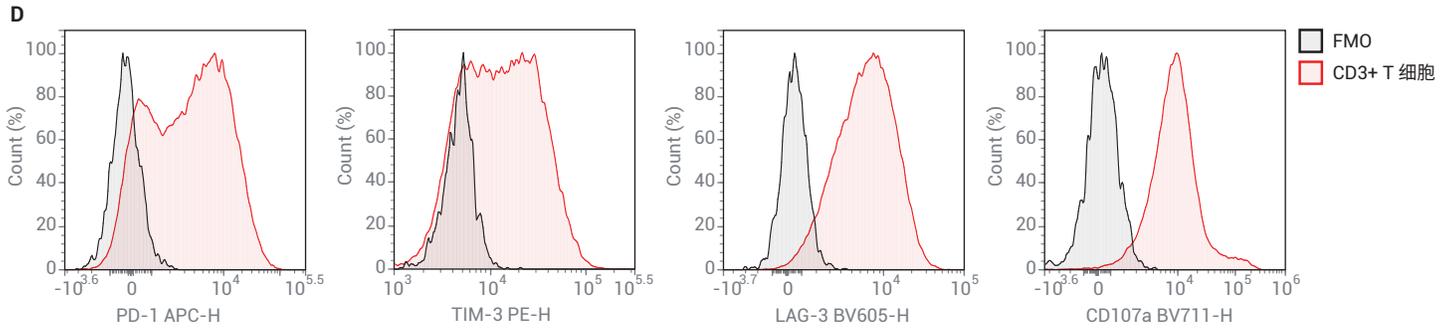


图 1. 使用 16 色流式细胞分析 panel 检测刺激后的 PBMC 的免疫表型。使用 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3 抗体、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD28 抗体和 100 ng/mL IL-2 刺激从供体血液分离的 PBMC。第 4 天用 16 色免疫表型分析 panel (表 1) 对刺激后的 PBMC 染色。在分析前 6 个小时将蛋白转运抑制剂混合物 (2 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 和 anti-CD107a BV711 抗体 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 直接添加到孔内。(A) 设门策略。使用 FSC-H 和 SSC-H 从碎片中识别靶细胞；使用死活细胞染料排除死细胞。使用 CD3 鉴定 T 细胞。随后对 CD3+ 细胞设门，识别 CD4+ 和 CD8+ T 细胞。对 CD4+ 或 CD8+ 细胞设门后，根据 CD45RA 和 CCR7 的差异表达，对 T_{CM} 、 T_{EM} 和 T_{EMRA} 细胞进行鉴定。从 CD45RA+CCR7+ 亚群中，进一步检测到 CD95+ T_{SCM} 和 CD95- 初始 T 细胞 (B)。还检测了 CD4+ 和 CD8+ T 细胞亚群中 CD25 和 CD127 的表达水平，PD-1、LAG-3 和 TIM-3 的耗竭水平，IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 细胞因子分泌水平以及 CD107a 脱颗粒水平。此处展示的数据来自于第 4 天采集的样品。(B) FMO 对照。使用 FMO 对照确定门。PD-1、TIM-3、LAG-3 和 CD107a 的 FMO 对照如上所示。在 Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪上获得样品结果，使用 NovoExpress 软件进行分析

经刺激后 T 细胞分化状态持续变化

TCR 激活引起 T 细胞分化的快速变化。通过鉴别每个亚群 (T_{naive} 、 T_{SCM} 、 T_{CM} 、 T_{EM} 和 T_{EMRA}) 来考察分化状态，如前一节所述。之前的研究已经确定了 T 细胞亚群之间的功能差异： T_{naive} 和 T_{CM} 具有强增殖能力，但缺乏快速的效应功能，而 T_{EM} 和 T_{EMRA} 的增殖能力较弱，但效应功能范围较广。 T_{SCM} 经历了抗原刺激，

但仍与 T_{naive} 细胞一样保持了类似干细胞的自我更新特性。为了了解刺激后 T 细胞分化的变化，检测了未刺激的 PBMC 和刺激 2 天和 4 天后 PBMC 中所有 T 细胞亚群的相对频率，并在第 4 天再次刺激 PBMC，24 小时后 (第 5 天) 进行检测 (图 2)。与预期一样，TCR 刺激 2 天后 T_{naive} 细胞的频率显著降低；大多数 CD45RA+ CCR7+ 细胞是 T_{SCM} ，因为

它们也表达 CD95 (图 2B)。这是使用 anti-CD3/anti-CD28 抗体进行体外活化的典型现象，因为它应该激活所有存在的 T 细胞。刺激后， T_{CM} 比例随时间稳定增加，而再次刺激后， T_{CM} 比例下降 (第 5 天的样品)。这表明再次刺激诱导 T 细胞向效应表型转变。总的来说，体外刺激 PBMC 可诱导 T 细胞迅速分化为多个效应细胞和记忆细胞亚群。

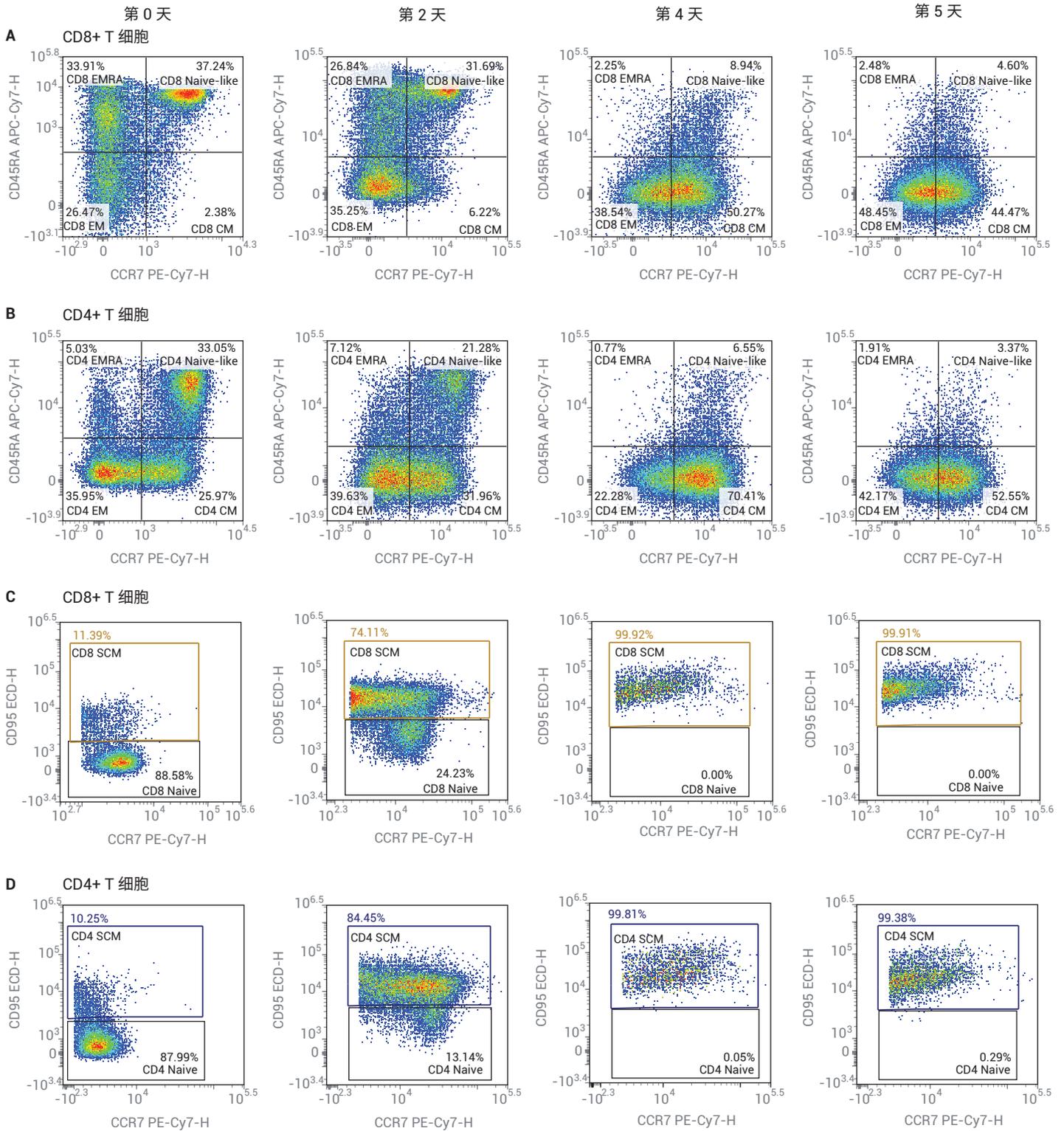


图 2. T 细胞亚群的动态变化是连续性的。使用 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3 抗体、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD28 抗体、100 ng/mL IL-2 刺激从供体血液中分离的 PBMC。分别于第 0 天、第 2 天、第 4 天用 16 色免疫表型分析 panel (表 1) 对刺激后的 PBMC 染色。第 4 天再次刺激细胞，24 小时后分析 (第 5 天)。在各时间点分析 CD8 T 细胞 (A) 和 CD4 T 细胞 (B) 中 CCR7 和 CD45RA 的表达，以确定 T 细胞亚群 (初始样、中枢记忆 (CM)、效应记忆 (EM)、CD45RA+ 效应记忆 (EMRA) T 细胞) 的相对变化。进一步分析 CD8 和 CD4 初始样 T 细胞中 CD95 的表达，以区分记忆性干细胞样 T 细胞和真正的初始 T 细胞。CD4+T 细胞、CD8+T 细胞与 T_{SCM} 、 T_{CM} 、 T_{EM} 、 T_{EMRA} 、 T_{naive} 细胞的比例随时间而变化

TCR 刺激后抑制性受体的表达逐渐上调

持续的刺激使抑制性受体表达增加，这是 T 细胞衰竭的关键指标。抑制性受体的有效负调控有助于抑制过度的免疫应答。然而，抑制性受体也会阻碍清除病原体和肿瘤的有效免疫应答。确定抑制性受体在急性和持续性 T 细胞刺激时如何上调，对于这些通路开发更安全、更有效的治疗干预方案至关重要。

分别在第 0 天、第 2 天、第 4 天和再刺激后第 5 天检测活化标志物 (CD25 和 CD127) 和抑制性受体 (PD-1、LAG-3 和 TIM-3) (图 3)。在 CD8 T 细胞和 CD4 T 细胞中，CD25 快速上调，CD127 下调，表明 T 细胞快速活化。刺激 2 天后，抑制性受体的表达没有立即发生变化。然而，刺激 4 天后，CD4 和 CD8 T 细胞群中的 PD-1、LAG-3 和 TIM-3 均上调。使用 anti-CD3/CD28 再刺激，第 5 天时所

有抑制性受体均下调。与此同时，再刺激后 CCR7 表达下降，T_{CM} 细胞百分比下降。随着 T 细胞向效应表型转变，减少抑制性受体表达是有益的。这与之前的研究相关联，之前的研究表明，T 细胞衰竭发生在细胞向记忆表型转化的过程中，尽管抗原持续存在。在各种 T 细胞表型和功能背景下检测抑制性受体的表达，可以了解 T 细胞在免疫应答时是如何变化的。

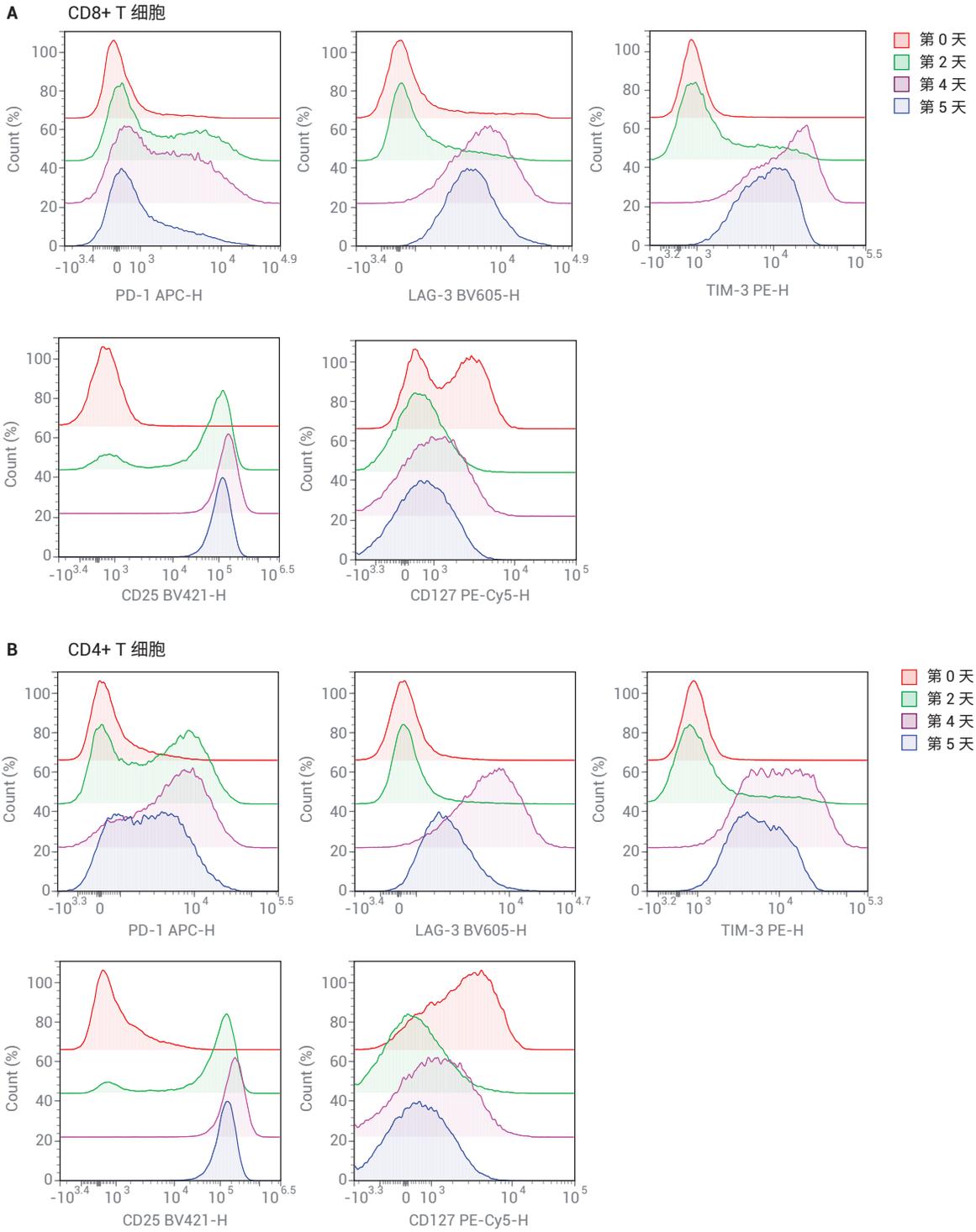


图 3. 刺激后抑制性受体和激活受体表达水平的变化。使用 5 $\mu\text{g/mL}$ anti-CD3 抗体、2 $\mu\text{g/mL}$ anti-CD28 抗体、100 ng/mL IL-2 刺激从供体血液中分离的 PBMC。分别于第 0 天、第 2 天、第 4 天用 16 色免疫表型分析 panel (表 1) 对刺激后的 PBMC 染色。第 4 天再次刺激细胞，24 小时后分析 (第 5 天)。分析了抑制性受体 PD-1、LAG-3、TIM-3 及活化标志物 CD25、CD127 随时间的变化

结论

通过同时考察 T 细胞分化、活化、细胞因子的产生和脱颗粒等过程对 T 细胞进行深入分析, 进一步了解 T 细胞应答, 从而实现了对 T 细胞更全面的了解。在 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪上使用 16 色免疫表型分析 panel 可以帮助进一步阐明 T 细胞在持续感染和肿瘤免疫环境中的应答。

参考文献

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889009/>
2. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0177405>
3. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201343751>
4. <https://www.jimmunol.org/content/188/7/2957>
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4481276/>
6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01215/full>
7. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.a.22938>

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。