

应用流式细胞术分析林麝外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞

曾晖^① 周磊^{②*} 王建明^② 程建国^② 郑程莉^②

① 四川大学华西第二医院实验动物中心, 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室 成都 610041;

② 四川养麝研究所 都江堰 611845

摘要: 通过对圈养林麝 (*Moschus berezovskii*) 外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群的检测, 探讨林麝细胞免疫功能状态, 并探索应用流式细胞仪分析其淋巴细胞亚群的方法, 为研究林麝重大疾病的病理机制及诊断方法提供科学依据。本研究选取健康林麝和患呼吸道疾病林麝各 5 头, 以双色流式细胞术检测其外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群的含量, 并进行比较。结果显示, 羊源 CD4⁺、CD8⁺ 的流式荧光抗体能够标记林麝细胞并有效检测; 患病林麝与健康林麝相比, 外周血 CD4⁺ 细胞含量无差异 ($P > 0.05$), CD8⁺ 细胞含量则显著降低 ($P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺ 比值显著增高 ($P < 0.01$)。结果表明, 患呼吸系统炎症疾病的林麝其外周血淋巴细胞 CD8⁺ 亚群变化显著, 检测淋巴细胞亚群对林麝疾病的诊断有重要意义。

关键词: 林麝; CD4⁺ T 淋巴细胞; CD8⁺ T 淋巴细胞; 流式细胞术

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 06-893-06

Analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes in Peripheral Blood of Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*) by Flow Cytometry

ZENG Hui^① ZHOU Lei^{②*} WANG Jian-Ming^② CHENG Jian-Guo^② ZHENG Cheng-Li^②

① Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education,

Laboratory Animal Center, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041;

② Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611845, China

Abstract: To investigate the immune functions of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subsets in peripheral blood of captive-breeding forest musk deer (*Moschus berezovskii*) and to explore the method for detecting lymphocyte subsets by flow cytometry will provide a scientific basis for studying the pathological mechanism and diagnostic methods of major diseases in this species. Five healthy musk deer and five musk deer with respiratory diseases were selected to compare CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subgroups their peripheral blood by double-color flow cytometry. Data were processed and analyzed by SPSS18.0 software, and statistically

基金项目 四川省应用基础研究项目 (No. 2017JY0295);

* 通讯作者, E-mail: zhoulei1001@126.com;

第一作者介绍 曾晖, 男, 实验师; 研究方向: 实验动物学; E-mail: 971059040@qq.com。

收稿日期: 2019-04-20, 修回日期: 2019-10-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201906016

described utilizing mean and standard deviation (Mean \pm SD). Differences between groups were analyzed by *T*-test, and *P*-value < 0.05 was considered significant. The test results showed that flow-cytometric fluorescent antibodies against sheep-derived CD4 and CD8 could label the cells of forest musk deer effectively (Table 1 and Fig. 1, 2). Compared with healthy forest musk deer, the content of CD4⁺ cells in peripheral blood of diseased forest musk deer increased slightly, but there was no statistical difference ($P > 0.05$) (Fig. 3), while the content of CD8⁺ cells decreased significantly ($P < 0.01$) (Fig. 3), and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ increased significantly ($P < 0.01$) (Fig. 3). The changes of CD8⁺ lymphocyte subsets in peripheral blood of forest musk deer with respiratory inflammatory diseases were significant. Detection of lymphocyte subsets is of great importance in the diagnosis of forest musk deer diseases.

Key words: Forest musk deer, *Moschus berezovskii*; CD4⁺ T lymphocyte; CD8⁺ T lymphocyte; Flow cytometry

林麝 (*Moschus berezovskii*) 属偶蹄目 (Artiodactyla) 麝科 (Moschidae) 麝属, 现为国家 I 级重点保护野生动物。麝类的疾病一直是长期困扰我国人工养麝业发展的重大问题, 特别是脏器化脓性疾病、肺炎等临床难以控制的炎性疾病严重威胁圈养麝群的健康和生命。

健康动物体中各 T 淋巴细胞亚群相互作用, 维持着机体的正常免疫功能。当不同淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时, 可导致机体免疫紊乱并发生一系列的病理变化。检测 T 淋巴细胞亚群可以了解患病动物的免疫功能是否处于平衡状态, 对控制相关疾病的发生、发展、了解疾病的机制、指导临床治疗都有极其重要的意义, 已成为临床研究的一种重要手段 (吴永坚 2014)。李媛媛等 (2015) 通过检测社区获得性肺炎、脓毒症、慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者的外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群变化, 发现这些感染性疾病患者 T 淋巴细胞亚群存在异常, 并认为监测其 T 淋巴细胞亚群的变化对治疗及预后有指导意义。田建良等 (2013) 在应用流式细胞术研究呼吸系统性疾病患者体内淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群功能变化时发现, T 淋巴细胞亚群参与了肺结核、肺炎和肺癌等的病理过程, 其在呼吸系统性疾病的发生、发展中起着十分重要的作用。有关微生物感染致机体免疫功能改变的研究结果显示, 胞外菌和需氧菌感染可引起 CD4⁺ 细

胞相对升高和 CD4⁺/CD8⁺ 比值升高, 胞内菌、厌氧菌及真菌感染则引起患者 CD8⁺ 细胞相对升高和 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降; 革兰阴性杆菌感染较革兰阳性球菌感染引起的淋巴细胞亚群变化激烈, 全身性感染较局部感染引起的淋巴细胞亚群改变更为明显 (朱冰等 2011)。流式细胞术是一种自动而迅速地进行细胞及免疫分析的标准方法, 临床应用广泛。本研究尝试使用流式细胞术分析林麝外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞, 探索应用流式细胞术检测林麝免疫细胞亚型的方法, 分析林麝血液 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞组成状况。

1 研究方法

选取 10 只 1.5 至 2.5 岁龄的雄性青年林麝 (四川养麝研究所, 都江堰), 用 2 ml EDTA-K₂ 一次性真空采血管自后肢小隐静脉采集 1 ml 血液备检, 其中 1~5 号标本为健康组, 6~10 号标本为未知原因引起呼吸系统出现临床症状的患病组。从 10 份林麝血液样本中各取 200 μ l 全血分别加入 EP 管中, 每管分别加入浓度 0.1 g/L 鼠抗羊 CD4 α -FITC 抗体 (克隆号 44.38, 货号 MA1-80901, eBioscience 公司) 10 μ l、浓度 0.1 g/L 鼠抗羊 CD8-PE 抗体 (克隆号 38.65, 货号 MA5-28420, eBioscience 公司) 10 μ l, 混匀后避光孵育 20 min; 另从 10 份血样中随机抽选 1 份, 分别取 200 μ l 加入 3 个 EP 管中,

其中 2 管分别加同浓度鼠抗羊 CD4 α -FITC 抗体、鼠抗羊 CD8-PE 抗体作为补偿对照, 1 管不加抗体作为空白对照。每管加入红细胞裂解液 (Solarbio 公司) 1 ml 混匀, 静置 15 min 后 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 向沉淀加入 1 ml PBS (pH 7.2~7.4) 缓冲液并混匀, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清后再加 500 μ l PBS 重悬, 以备上流式细胞仪 (BD 公司 FACS Aria II) 检测。

开机调试仪器的精密度达到最佳状态, 启用 FACSDiva 软件用标准微球调试流式细胞仪的光电倍增管电压、荧光补偿、灵敏度测试等, 激光器用 488 nm 激发光, FITC 受激发后的发射光为 520 nm 的信号, 被接收波长范围为 530/30 的荧光通道 1 (FL1) 接收, PE 受激发后的发射光为 575 nm 的信号, 被接收波长范围为 575/26 的荧光通道 2 (FL2) 接收。上样空白对照样本管, 调节前向散射角 (FSC) 和侧向散射角 (SSC) 电压, 设定 FSC 阈值排除碎片和其他信号噪点, 并在 FSC/SSC 散点图中圈出目标细胞群; 调节 FL1、FL2 通道电压, 使细胞群均位于阴性区域内的合适位置; 再分别上样 CD4 α -FITC、CD8-PE 补偿对照样本管, 调节 FL1、FL2 通道的荧光补偿。最后用流式细胞仪测定 10 个林麝外周血样本中 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 的百分比, 上机收集 10 000 个 T 淋巴细胞, 以 FSC/SSC 二维散射光确定淋巴细胞群, 统一进行标准化设门后, 获取 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比。数据采用 SPSS18.0 软件进行处理分析, 计量数据以平均值和标准差 (Mean \pm SD) 进行统计描述, 组间差异采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计图表采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘制。

2 结果与分析

2.1 林麝外周血 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞亚群的流式细胞术检测结果

林麝外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群的

流式细胞术检测结果见表 1。图 1 和图 2 分别为流式细胞仪检测健康组 5 头林麝和患病组 5 头林麝外周血淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群的四象限散点图。

表 1 林麝外周血淋巴细胞亚群含量及 CD4⁺/CD8⁺ 比值

Table 1 Peripheral blood lymphocyte subsets and CD4⁺/CD8⁺ ratio in musk deer

组别 Group	标本编号 Sample number	CD4 ⁺ 细胞 百分含量 Percentage of CD4 ⁺ cells (%)	CD8 ⁺ 细胞 百分含量 Percentage of CD8 ⁺ cells (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值 CD4 ⁺ / CD8 ⁺ ratio
健康组 Normal	1	48.41	16.51	2.93
	2	53.03	16.35	3.24
	3	52.16	17.54	2.97
	4	45.88	12.92	3.55
	5	51.29	20.83	2.46
患病组 Disease	6	58.44	11.33	5.16
	7	50.94	13.45	3.79
	8	49.45	12.57	3.93
	9	56.97	8.98	6.34
	10	58.60	7.34	7.98

2.2 结果分析

采用箱式图描述两组林麝外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群含量分布, 并比较两组林麝 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群构成百分比 (图 3)。CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分含量以及 CD4⁺ 与 CD8⁺ 细胞数比值, 健康组外周血分别为 50.15% \pm 2.64%、16.83% \pm 2.53% 和 3.03 \pm 0.36, 患病组数据则较健康组离散分布度更大, 分别为 54.88% \pm 3.89%、10.73% \pm 2.27% 和 5.44 \pm 1.57。以健康组测定值均值的 90% 置信区间 (90% confidence interval, 90%CI) 分析正常参考范围, CD4⁺、CD8⁺ 细胞百分含量以及 CD4⁺ 与 CD8⁺ 细胞数比值分别为 47.64%~52.67%、14.42%~19.24% 和 2.69~3.37。组间的统计比较显示, 健康组与患病组 T 淋巴细胞表达的 CD4⁺ 变化不显著 ($P > 0.05$); 患病组与健康组相比, T 淋巴细胞表达的 CD8⁺ 百分比极显著下降 ($P < 0.01$), CD4⁺/CD8⁺ 比值升高极显著 ($P < 0.01$)。

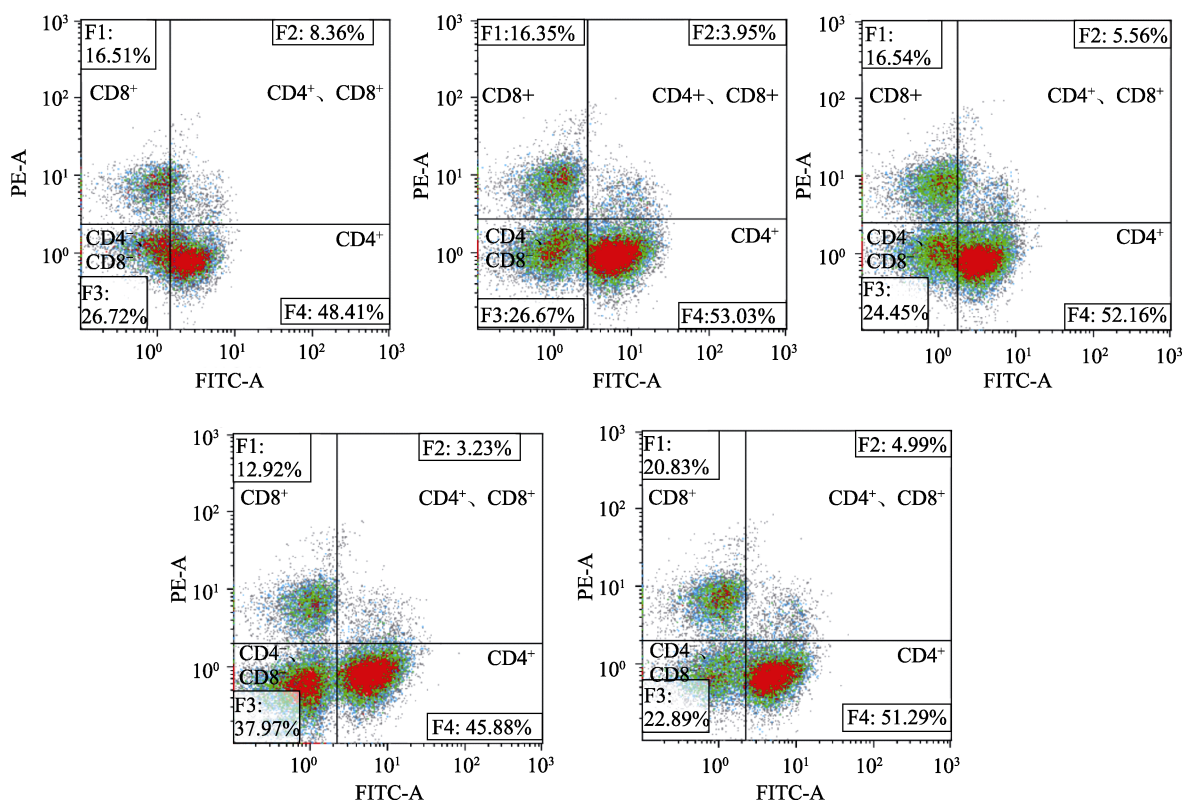


图 1 健康组 5 只林麝淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺亚群散点图

Fig. 1 Dot plots of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subpopulations in the healthy group (5 ind)

横轴 FITC-A 表示接收荧光染料 FITC 激发光的信号通道 1 (FL1); 纵轴 PE-A 表示接收荧光染料 PE 激发光的信号通道 2 (FL2); F1 象限表示被 PE 标记的 CD8⁺T 淋巴细胞比率; F2 象限表示被 FITC 和 PE 双标记的 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞比率; F3 象限表示未被 FITC 和 PE 标记的 CD4⁻、CD8⁻T 淋巴细胞比率; F4 象限表示被 FITC 标记的 CD4⁺T 淋巴细胞比率; 各象限内的有色点表示细胞密度, 由蓝、绿色到红色显示密度增大。

Horizontal-axis FITC-A for fluorescence 1(FL1), vertical-axis PE-A for fluorescence 2(FL2); The F1 quadrant indicates the ratio of CD8⁺ T lymphocyte labeled by fluorescence of PE; the F2 quadrant indicates the ratio of CD4 and CD8⁺ T lymphocytes labeled by fluorescence of FITC and PE; the F3 quadrant indicates the ratio of CD4⁻ and CD8⁻ T lymphocytes not labeled by fluorescence of FITC and PE; the F4 quadrant indicates the ratio of CD4⁺ T lymphocyte labeled by fluorescence of FITC; The colored dot in each quadrant indicate cell density, which increases from blue, green to red.

3 讨论

T 淋巴细胞及其亚群的检测是评价动物机体细胞免疫功能的重要指标, 且对某些疾病的辅助诊断、分析发病机制、观察疗效及监测预后具有重要意义(屈雪琪等 2011)。CD4⁺、CD8⁺ 细胞是 T 细胞的两个重要细胞亚群, 在抗感染过程中, CD4⁺细胞协助 B 淋巴细胞产生抗体, CD8⁺细胞直接杀伤感染病原体的靶细胞, 并且

CD8⁺和 CD4⁺还通过清除病毒感染细胞的细胞毒性功能或分泌具有抗病毒特性的细胞因子而产生保护性免疫(王訔等 2014)。特别的, CD4⁺/CD8⁺的比值可直接反映机体 T 细胞亚群的紊乱状态, 在一定程度上可间接了解动物体细胞免疫功能的情况, 进而提示疾病的病程, 所以准确地测定外周血中 CD4⁺、CD8⁺细胞数量就显得尤其重要(Woodland 2003)。本研究探讨应用流式细胞仪检测林麝外周血 CD4⁺、

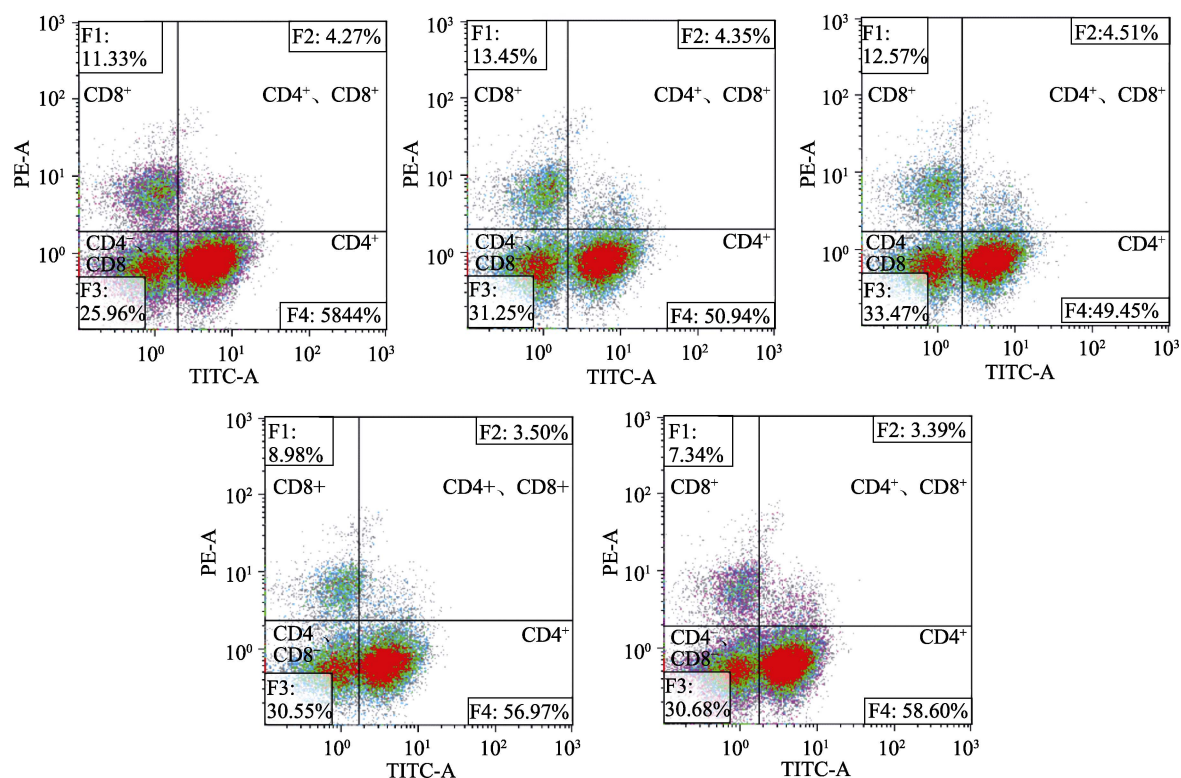


图 2 患病组 5 只林麝淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺ 亚群散点图

Fig. 2 Dot plots of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subpopulations in the diseased group (5 ind)

横轴 FITC-A 表示接收荧光染料 FITC 激发光的信号通道 1 (FL1); 纵轴 PE-A 表示接收荧光染料 PE 激发光的信号通道 2 (FL2); F1 象限表示被 PE 标记的 CD8⁺T 淋巴细胞比率; F2 象限表示被 FITC 和 PE 双标记的 CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞比率; F3 象限表示未被 FITC 和 PE 标记的 CD4⁻、CD8⁻T 淋巴细胞比率; F4 象限表示被 FITC 标记的 CD4⁺T 淋巴细胞比率; 各象限内的有色点表示细胞密度, 由蓝、绿色到红色显示密度增大。

Horizontal-axis FITC-A for fluorescence 1(FL1), vertical-axis PE-A for fluorescence 2(FL2); The F1 quadrant indicates the ratio of CD8⁺ T lymphocyte labeled by fluorescence of PE; the F2 quadrant indicates the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes labeled by fluorescence of FITC and PE; the F3 quadrant indicates the ratio of CD4⁻ and CD8⁻ T lymphocytes not labeled by fluorescence of FITC and PE; the F4 quadrant indicates the ratio of CD4⁺ T lymphocyte labeled by fluorescence of FITC; The colored dot in each quadrant indicate cell density, which increases from blue, green to red.

CD8⁺ T 淋巴细胞的方法, 有诸多问题需要探索, 首先需要解决抗体标记的问题, 林麝基因组测序分析的结果显示, 林麝和牛羊等牛科动物归为一个姊妹群, 有较近的亲缘关系 (Fan et al. 2018)。因此, 在没有林麝特异性抗体的情况下, 我们选取了 eBioscience 公司羊源 CD4、CD8 的流式荧光抗体进行标记, 结果表明, 羊源 CD4/CD8 抗体与林麝有交叉性, 能够标记林麝外周血中的 CD4⁺、CD8⁺ 细胞。上机血样

的采集、抗凝、送检时间等条件的不同都会对检测结果产生明显影响 (黄健等 1998), 林麝生性胆小, 捕捉时极易因应激造成溶血, 并且林麝血液理化性质与人及家畜也有较大差异, 为了保证充分抗凝, 我们采用人用商品化 2 ml 真空采血管, 每管采集 1 ml 林麝外周血, 并即刻送检。

机体免疫功能紊乱在林麝化脓性疾病的进展中可能发挥重要作用 (Sun et al. 2018)。感染

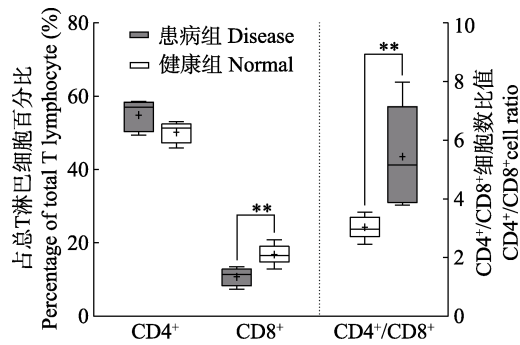


图3 两组林麝外周血 T 淋巴细胞 CD4⁺、CD8⁺亚群分布 (箱式图)

Fig. 3 Box and whisker plots of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations in peripheral blood of musk deer

与健康对照组相比, **表示差异极显著 $P < 0.01$; 箱式图内“+”代表该组数据平均值。

** $P < 0.01$, indicate statistically significant differences from the normal group; Show mean as “+” in the box diagram.

引起机体免疫功能下降或紊乱, 可使脏器防御功能下降或损伤, 导致感染的发生率增加, 引起炎症, 而炎症疾病的发展又将影响患病动物的免疫功能, 两者相互作用, 互为因果 (王訔等 2014)。本研究检测结果显示, 健康林麝外周血 CD4⁺ T 细胞百分含量均值为 51.15% (90%CI 参考范围 47.64% ~ 52.67%), CD8⁺ T 细胞百分含量均值为 16.83% (90%CI 参考范围 14.42% ~ 19.24%), CD4⁺/CD8⁺细胞比的均值为 3.03 (90%CI 参考范围 2.69 ~ 3.37)。但受样本数量和方法尚处于探索阶段的限制, 这些数据还不足以准确可靠反映圈养林麝淋巴细胞亚群的实际情况。组间比较表明, 患病林麝外周血 CD4⁺ T 细胞百分含量较健康麝有所增高, CD8⁺ T 细胞百分含量则显著降低, CD4⁺/CD8⁺细胞比值显著升高, 提示林麝呼吸系统疾病的发展可能与免疫紊乱有关, 机体细胞免疫功能受到抑制, 不能有效清除被病原体感染的细胞, 特别 CD4⁺/CD8⁺细胞比升高, 常反映机体对抗

胞外菌和需氧菌感染的过程 (朱冰等 2011)。这些结果表明, 分析淋巴细胞亚群可能对诊断林麝疾病有重要意义。

本次研究初步探讨了应用流式细胞术分析林麝外周血淋巴细胞亚群的方法, 大致比较分析了健康林麝和患病林麝细胞免疫功能状态, 所获取的林麝外周血 T 淋巴细胞亚群的基础数据对疾病诊断有一定参考意义, 但受限于条件, 研究存在很多不足之处, 结果的准确性、严谨性尚需进一步验证。

参 考 文 献

Fan Z, Li W, Jin J, et al. 2018. The draft genome sequence of forest musk deer (*Moschus berezovskii*). *GigaScience*, 7(4): 1–6.

Sun X, Cai R, Jin X, et al. 2018. Blood transcriptomics of captive forest musk deer (*Moschus berezovskii*) and possible associations with the immune response to abscesses. *Scientific Reports*, 599(8): 1–9.

Woodland D L. 2003. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. *Current Opinion in Immunology*, 15(4): 430–435.

黄健, 沈永生. 1998. 流式细胞仪检测淋巴细胞亚型中若干问题探讨. *临床检验杂志*, 16(4): 227–229.

李媛媛, 张舒, 曹波, 等. 2015. 几种感染性疾病中外周血 T 淋巴细胞亚群变化的检测及其临床意义研究. *诊断学理论与实践*, 14(4): 363–366.

屈雪琪, 赵建增, 梁智选, 等. 2011. 流式细胞术检测不同试验条件对猪 T 淋巴细胞亚群的影响. *中国畜牧兽医*, 38(4): 101–104.

田建良, 王敏. 2013. T 淋巴细胞亚群检测在呼吸系統性疾病的诊断价值. *放射免疫学杂志*, 26(6): 816–817.

王訔, 曹炬, 张莉萍. 2014. 多种炎症性疾病患者外周血 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞的检测与临床意义分析. *检验医学与临床*, 11(21): 2953–2957.

吴永坚. 2014. 流式细胞术在固有免疫研究中的应用. *中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版*, 35(1): 40–44.

朱冰, 吴丽娟, 陈雪芹, 等. 2011. 微生物感染致机体免疫功能改变的回顾性分析. *国际检验医学杂志*, 32(15): 1679–1681.