

基于无监督自动降维分析与手动圈门联用的骨骼肌髓系细胞多色流式分析方法

曹奇, 张嘉宝, 王培

Multicolor flow cytometric analysis method for skeletal muscle myeloid cells based on unsupervised automatic dimensionality reduction combined with manual gating

CAO Qi, ZHANG JiaBao, WANG Pei

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202404077>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

丹参*FBXL* 基因家族的鉴定和表达模式分析

Identification and expression pattern analysis of *FBXL* gene family in *Salvia miltiorrhiza*

药学实践与服务. 2024, 42(11): 461-470 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202407034

基于联合库存的公立医院多院区药品采购模式分析

Analysis of drug procurement model of multiple areas based on joint inventory in public hospitals

药学实践与服务. 2024, 42(7): 315-318 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202401002

二氢吡啶类钙离子拮抗药物手性分析及其立体选择性药动力学研究进展

Advances in chiral analysis and stereoselective pharmacokinetics of dihydropyridine calcium antagonists

药学实践与服务. 2024, 42(8): 319-324 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202308062

雀梅藤石油醚提取物诱导三阴性乳腺癌细胞凋亡的实验研究

Induction of apoptosis in triple-negative breast cancer cells by petroleum ether extract of *Sageretia thea*

药学实践与服务. 2024, 42(6): 253-259 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202311055

侧流免疫层析定量检测方法的研究进展

Research progress on quantitative detection methods of lateral flow immunochromatography assay

药学实践与服务. 2024, 42(7): 273-277, 284 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202307037

巴戟天丸组方对A β 损伤成骨细胞的作用及基于网络药理学的机制研究

The roles of Bajitianwan formula on A β -injured osteoblasts and the mechanism based on network pharmacology

药学实践与服务. 2024, 42(7): 285-290, 296 DOI: 10.12206/j.issn.2097-2024.202305011



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于无监督自动降维分析与手动圈门联用的骨骼肌髓系细胞多色流式分析方法

曹 奇, 张嘉宝, 王 培 (海军军医大学药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 探讨结合多色流式细胞术和生物信息学技术对小鼠肌肉损伤后腓肠肌中髓系细胞的分析方法, 为肌肉损伤修复机制的研究提供实验基础。**方法** 实验采用多色流式细胞术收集小鼠腓肠肌单细胞悬液中的免疫细胞, 并运用 t-随机邻近嵌入(tSNE)算法辅以手动圈门技术进行数据分析。tSNE 算法在多色流式细胞术中用于指引手动圈门的设置, 以优化细胞群的识别和分类。**结果** 与假手术组相比, 模型组肌肉损伤部位树突状细胞、粒细胞、巨噬细胞与单核细胞比例显著增加, 其中, 单核细胞比例增加尤为明显。**结论** tSNE 算法结合手动圈门方法在多色流式细胞术中的应用结果表明, 该方法能有效地指导手动圈门的设置, 增强分辨免疫细胞亚型的效率。通过这种组合技术, 可以更准确地分析和解释小鼠腓肠肌中髓系细胞的功能和亚型。

[关键词] 肌肉损伤修复; 多色流式; 生物信息学; 髓系细胞

[文章编号] 2097-2024(2025)07-0325-04 **[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202404077

Multicolor flow cytometric analysis method for skeletal muscle myeloid cells based on unsupervised automatic dimensionality reduction combined with manual gating

CAO Qi, ZHANG JiaBao, WANG Pei (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore the analytical methods combining multicolor flow cytometry with bioinformatics techniques for analyzing myeloid cells in the gastrocnemius of mice after muscle injury, and provide an experimental foundation for the study of muscle regeneration mechanisms. **Methods** Immune cells were collected from single-cell suspensions of mouse gastrocnemius using multicolor flow cytometry, and data were analyzed by the t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) algorithm supplemented by manual gating techniques. The tSNE algorithm was used in multicolor flow cytometry to guide the setting of manual gates, optimize the identification and classification of cell populations. **Results** Compared to the sham surgery group, the proportions of dendritic cells, granulocytes, macrophages, and monocytes at the site of muscle injury in the model group significantly increased, with the increasing in monocytes being particularly notable. **Conclusion** The application of the tSNE algorithm combined with manual gating techniques in multicolor flow cytometry demonstrated that this method could effectively guide the setting of manual gates and enhance the efficiency of distinguishing immune cell types. Through this combined technology, the function and subtypes of myeloid cells in the mouse gastrocnemius could be analyzed more accurately.

[Key words] muscle regeneration; multicolor flow cytometer; bioinformatics; myeloid cells

骨骼肌约占人体重的 35%, 是人体内最大的器官系统之一, 为人体提供运动必须的产能, 储能以及帮助调节体温^[1]。骨骼肌具有强大的再生能力,

这对肌肉损伤后修复及其他导致肌病具有重要意义^[2]。已经有许多研究报道非肌源性细胞在再生过程中起到关键作用, 比如以髓系为代表的免疫细胞被募集到损伤部位对肌肉修复发生产生影响^[3]。最近的文献进一步揭示髓系细胞中单核细胞及巨噬细胞在骨骼肌再生反应中起到关键作用^[4]。

随着流式分析仪器和试剂的进步, 多色流式实验目前已被广泛应用^[5]。多色流式细胞术的优势在于能够同时使用多个标记物进行单个细胞层面研

[基金项目] 国家自然科学基金(82274030); 上海市科学技术委员会(21XD1424900); 上海市曙光计划(19SG32)

[作者简介] 曹 奇, 硕士研究生, 研究方向: 免疫与代谢药理学, Email: caoq@smmu.edu.cn

[通信作者] 王 培, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管代谢药理学, Email: pwang@smmu.edu.cn

究,分析组织中不同细胞群之间的关联性,同时也可以减少样本用量,提高样本检测通量,提高实验效率^[6]。特别是在免疫细胞的研究方面,多色流式可以最大程度的同时检测样本中的不同免疫细胞表面蛋白表达程度,并直观的以降维分析方式展现出来,具有广阔的应用前景^[7]。

本研究采用流式细胞仪对小鼠损伤腓肠肌的单细胞悬液进行数据采集。同时应用 t-分部邻域嵌入算法(t-SNE)^[8]和手动圈门分析所得结果,为流式数据分析和结果展示提供一种新的方法和思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J(B6)同系小鼠用于小鼠骨骼肌流式分析实验。实验小鼠来自中国同济大学实验动物中心。所有动物实验遵守动物伦理指南,已获海军军医大学药物实验伦理委员会批准。

1.2 实验试剂

流式抗体为 FITC 标记的 CD11b、APC-A700 标记的 F4/80、APC-A750 标记的 MHC II、PB450 标记的 Ly6G、BV610 标记的 CD45、BV650 标记的 CD11c、PE 标记的 Ly6C,抗体均购自美国 Biolegend 公司。II 型胶原酶购自瑞士 Roche,心脏毒素购自美国 MCE。

1.3 仪器与设配

流式细胞仪(Beckman CytoFLEX S, 美国),离心机(湘仪,中国)。

2 方法

2.1 小鼠肌肉损伤模型

使用 1%的戊巴比妥钠麻醉小鼠,假手术组对小鼠腓肠肌注射 50 μ l 生理盐水,模型组对小鼠腓肠肌注射 50 μ l 10 μ mol/L 的心脏毒素,均在损伤 7 d 后处死小鼠。

2.2 小鼠腓肠肌单细胞悬液制备

颈椎脱臼法处死小鼠,使用酒精棉球擦拭消毒小鼠腿部表面后解剖小鼠,从两条腿上分离出腓肠肌。将其放入 20 mm 培养皿中,加入 5 ml 提前预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)。使用锋利的剪刀将腓肠肌剪碎,加入浓度为 5 mg/ml 的 II 型胶原酶 5 ml,置于 37 $^{\circ}$ C 孵箱孵育 60 min。孵育后将细胞悬液通过 40 μ m 尼龙筛网过滤,转移至新的 15 ml 离心管中。4 $^{\circ}$ C, 800 \times g 离心 5 min,弃掉上清液,将所得沉淀转移至 5 ml 流式管中,加入 100 μ l PBS 重悬,即为腓肠肌单细胞悬液。

2.3 流式细胞染色及上机检测

用 PBS 将细胞浓度调节至每 100 μ l 约 1×10^7 个细胞。每 100 μ l 液体中 0.5 μ l 流式抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育 45 min。孵育后 4 $^{\circ}$ C, 800 \times g 离心 5 min。弃掉上清液,用 200 μ l PBS 重悬细胞,上机检测。

2.4 分析及统计方法

流式数据应用 FlowJoTM v10.8.1 流式分析软件(购自美国 BD 公司)对小鼠腓肠肌细胞进行数据分析。数据分析与图形呈现通过 GraphPad Prism 软件执行。实验数据主要以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SEM)形式展示,两个独立样本之间采用 *t* 检验(*t*-test)进行两组样本的比较。 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 小鼠腓肠肌流式细胞分析结果

使用流式细胞术检测小鼠腓肠肌单细胞悬液中单核细胞圈门策略如图 1 所示。首先通过 FSC-H 和 SSC-H 圈出主要细胞群,根据 FSC-H 与 FSC-W 去除粘连细胞,通过 LIVE/DEAD 圈出活细胞。CD45 用于圈选出白细胞群,结合 CD11c、MHC II、CD11b、F4/80、Ly6C 和 Ly6G 圈选出 CD11c 阳性与 MHC II 阳性树突状细胞、CD11b 阳性与 Ly6G 阳性粒细胞、CD11b 阳性与 F4/80 阳性巨噬细胞、Ly6C 阳性单核细胞。各散点图中细胞分群界限清晰,流式圈门设置合理,为后续进一步的 t-SNE 分析与手动圈门分析提供良好的数据基础。

3.2 小鼠腓肠肌细胞 t-SNE 分析

将经流式细胞仪采集的小鼠腓肠肌免疫细胞(CD45 阳性)数据进行降维分析。如图 2 所示,每一个点对应一个细胞,图 2B 中根据荧光通道表达强弱进行着色,分别表征 CD11b、CD11c、Ly6G 和 Ly6C 的表达水平。t-SNE 降维分析将高维的细胞数据以二维平面的方式直观呈现出来,这种形式不同于以往流式分析中的逐级圈门方式,能将各群细胞的抗原表达情况更加准确、全面、直观地展现出来^[8]。通过图 2A 可以看出假手术组与模型组的腓肠肌中免疫细胞构成发生了明显变化,假手术组主要以黑色圆圈 1 标志的细胞群为主,而在模型组中,主要以红色圈 2、3、4、5 标志的细胞群为主。结合图 2B 中 CD11b、CD11c、Ly6C 和 Ly6G 表达水平图,可以发现红色圆圈 3、4、5 细胞群高表达 Ly6C,揭示造模后的免疫细胞浸润主要以高表达 Ly6C 的阳性细胞为主,同时模型组中的 CD11b、CD11c、Ly6G 表达水平明显高于假手术组,提示模

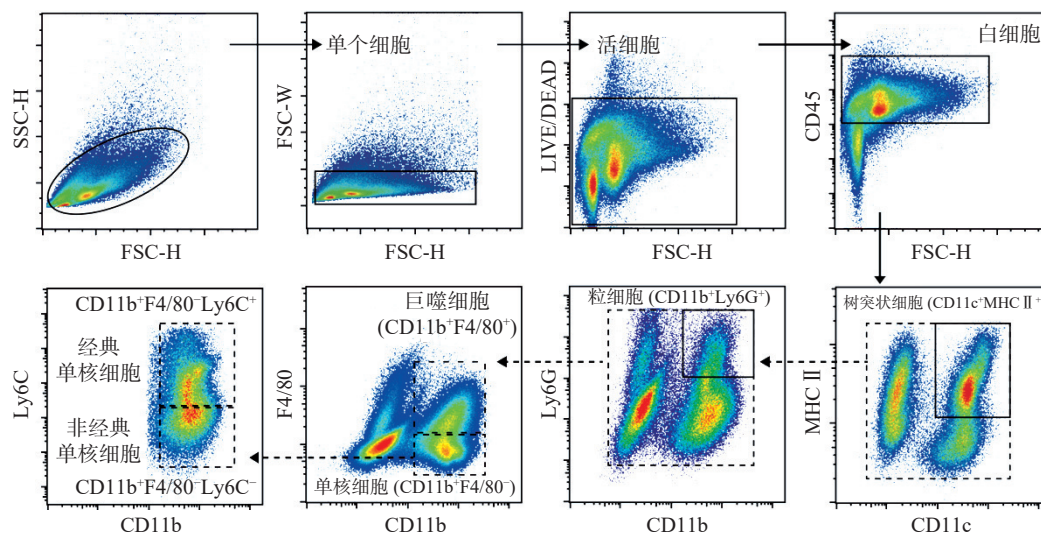


图 1 小鼠脾肠肌单细胞悬液系细胞圈门策略图

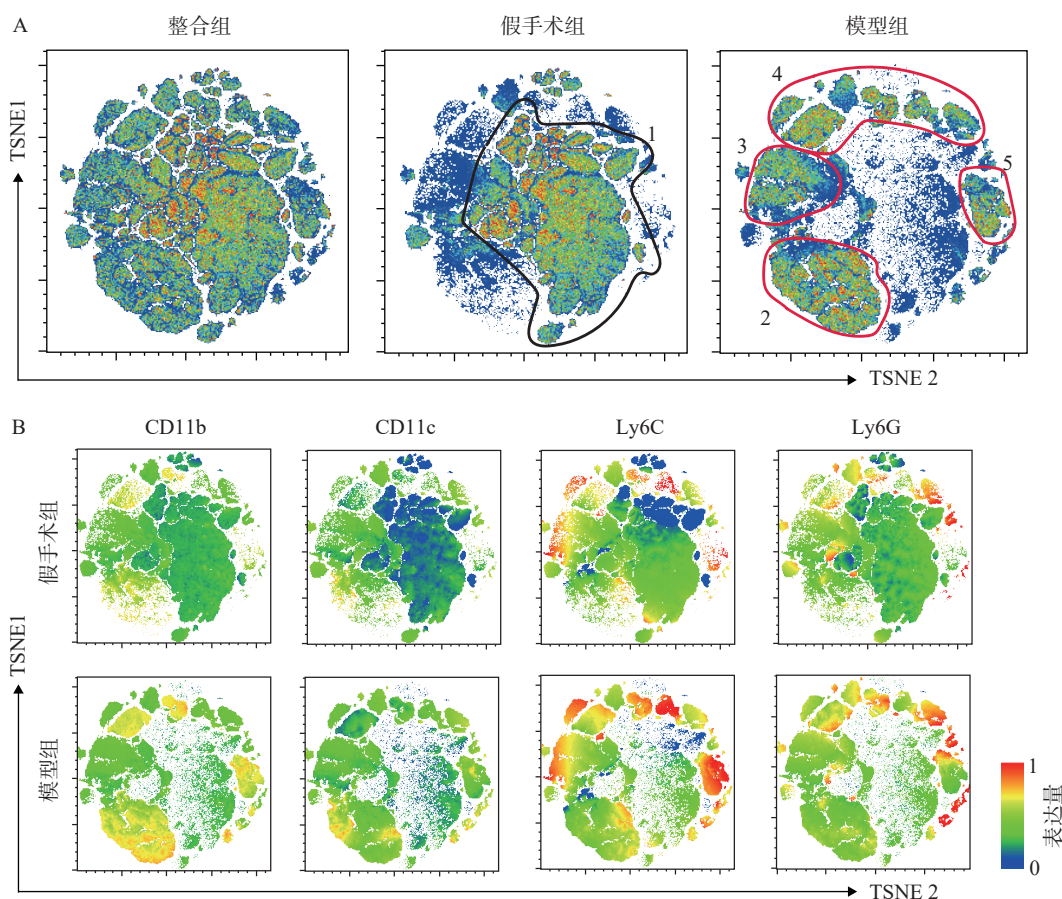


图 2 小鼠脾肠肌单细胞悬液单核细胞降维图

A. 整合组(假手术组+模型组)、假手术组、模型组 t-SNE 降维结果; B. 假手术组与模型组 CD11b、CD11c、Ly6C 和 Ly6G 表达水平

型组炎症水平高于假手术组。总体来看, t-SNE 分析结果直观明了地反映了细胞群体之间的相互关系和整体情况, 为下一步手动圈门分析提供了指引方向。

3.3 小鼠脾肠肌细胞手动圈门分析

对小鼠 CD45 阳性免疫细胞进行进一步手动

圈门分析, 得到各细胞类型具体占比。如图 3 所示, 从 CD11c 阳性细胞群中手动圈门发现模型组中 MHC II 阳性树突状细胞比例显著高于假手术组 (图 3A); 与假手术组相比, 模型组中 Ly6G 阳性粒细胞占 CD11b 阳性细胞比例显著增加 (图 3B); F4/80 阳性巨噬细胞占 CD11b 阳性细胞在模型组

中显著增加,与前期的 tSNE 结果一致。值得注意的是,与假手术组相比,在 CD11b 阳性 F4/80 阴性细胞群中手动圈出的 Ly6C 阳性单核细胞群与树突状细胞、粒细胞和巨噬细胞相比,在模型组中增

加比例最为明显。以上结果表明在肌肉损伤模型 7 d 后的模型中以树突状细胞、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞为代表的髓系细胞免疫细胞浸润依然明显,并且在这之中单核细胞增加比例最多。

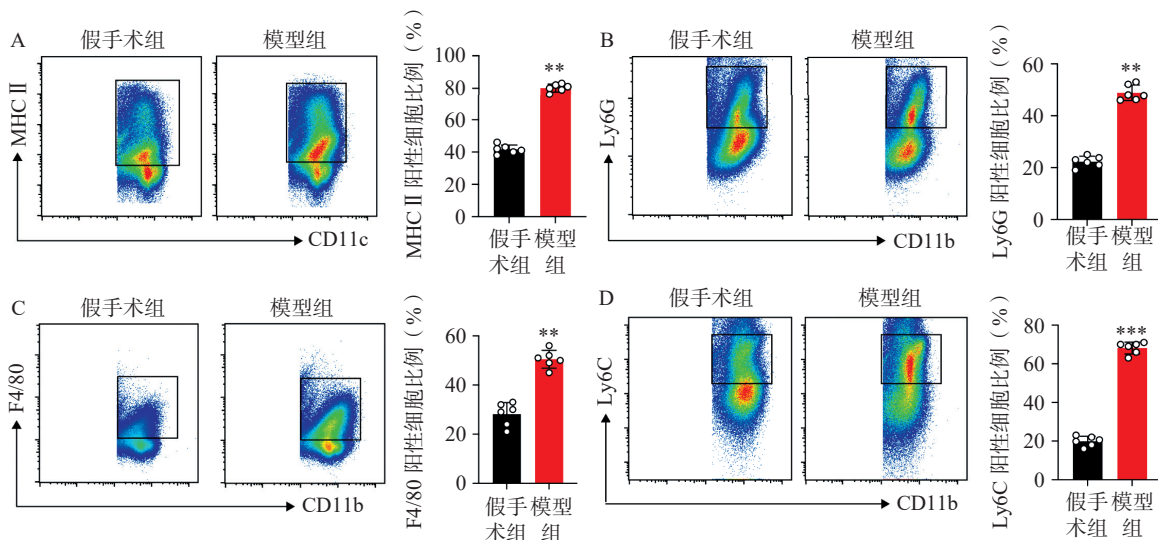


图 3 小鼠腓肠肌单细胞悬液髓系细胞手动圈门图 ($n=6$)

A. 假手术组与模型组中树突状细胞比例; B. 假手术组与模型组中粒细胞比例;
C. 假手术组与模型组中巨噬细胞比例; D. 假手术组与模型组中单核细胞比例

** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与假手术组比较。

4 讨论

骨骼肌对很多生理病理造成的损伤有强大的修复能力^[1],肌肉损伤修复是一个需要多类细胞协同合作的复杂过程^[9-12],其中非肌源性细胞,特别是免疫细胞对损伤过程修复的干预有着十分重要的意义^[10]。本文主要用流式细胞仪对小鼠骨骼肌部分髓系细胞进行分析,为后续的流式分选及单细胞测序实验指引了方向。

随着流式分析试剂和仪器的进步,多色流式实验已经广泛应用于各项研究,同传统 2~3 色的流式实验相比,多色流式能够同时使用多个标记物对单个细胞进行研究,分析多个细胞群之间的关联性,更全面地展示整体免疫微环境的变化。流式细胞数据分析常见软件包括 Flowjo、FACS Diva、CytoBank 等,可以为诸如细胞表型、荧光蛋白、细胞周期、细胞凋亡、细胞增殖、磷酸化蛋白检测、活性氧检测等提供便捷专业的分析。其中,FlowJo 是较早为流式分析设计的软件,有多类插件可供选择,能将数据以 csv 文件导出,给后续的生物信息学分析提供了极大的便利。降维分析相较于传统的逐级圈门方法,减少了人为圈门引入的误差,通过整体分析也更有助于发现新的细胞群体和获得

更为直观的整体表达情况。目前随着流式细胞术的不断深入发展,流式数据分析方法也不断更新,结合降维分析的方法为多色实验和单细胞测序实验都奠定了一定的基础。然而,降维方法本身并不能确认结果的正确与否,同时引入手动圈门也可能引入更大的人为误差。t-SNE 虽然能够将高维数据以二维形式展示,但在降维过程中不可避免地会丢失部分信息,可能导致某些细胞群体的特征被忽略。除此之外,降维结果十分依赖于参数的设置,不同参数设置往往会导致结果差异巨大。因此,在使用这些方法时一定要根据数据本身的特性进行合适的参数选择,确保保留并尽可能多地提取到数据中有效信息。操作过程中,研究人员应通过多次实验和参数调优来找到最佳设置,以便最大限度地减少信息丢失和偏差。同时,结合其他分析方法,如统一流形逼近与投影法(UMAP)或主成分分析(PCA)等,通过对比不同降维方法的结果,进一步提高数据的可靠性和全面性。这不仅能提高对相关生物过程的理解,还能为未来的研究提供更为坚实的基础。

t-SNE 能够将高维数据有效地降维成二维展示,使得复杂的细胞群体关系变得更加直观和易于

(下转第 366 页)

Adherence to therapy in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review[M]. *Adv Exp Med Biol*, 2020,1271:37-47.

- [4] NGUYEN T S, NGUYEN T L H, van PHAM T T, et al. Impact of pharmaceutical care in the improvement of medication adherence and quality of life for COPD patients in Vietnam[J]. *Respir Med*, 2019, 153: 31-37.
- [5] 吴秀凤, 张玮, 陈芳芳, 等. 吸入给药七步法的改进及其效果[J]. *药学与临床研究*, 2020, 28(4): 286-288.
- [6] 王玉, 苏丹, 林莹. 慢性阻塞性肺疾病患者使用吸入制剂的依从性分析与评价[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(1): 114-117.
- [7] 李材忠. 慢性阻塞性肺疾病稳定期患者院外使用吸入制剂的依从性分析[J]. *临床肺科杂志*, 2018, 23(8): 1455-1459.
- [8] 都勇, 刘姜红, 王爱平. 慢性气道疾病患者吸入治疗依从性的

现状及影响因素研究[J]. *中国实用护理杂志*, 2021, 37(5): 326-335.

- [9] FANG L W, GAO P, BAO H L, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: a nationwide prevalence study[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(6): 421-430.
- [10] 张海洲, 顾宝晨, 秦琼, 等. 哮喘/慢性阻塞性肺病病人吸入装置使用依从性及其影响因素分析[J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(3): 187-190.
- [11] 向邱, 张春瑾, 徐素琴, 等. 多元化健康管理提高慢性阻塞性肺疾病患者吸入剂用药依从性的研究[J]. *护理管理杂志*, 2020, 20(9): 625-628,633.

[收稿日期] 2022-04-22 [修回日期] 2023-09-19

[本文编辑] 费永和

(上接第 328 页)

理解。这种方法特别适用于大规模细胞数据的分析,如免疫细胞群体的分类和功能研究。

在目前的总的来说,自动降维分析可以将高维数据转换为低维空间,从而直观地对细胞进行聚类 and 分群。与此同时,手动圈门分析提供了对特定细胞群的精细控制和确认,可以根据已知的生物学标志物或功能特性对细胞进行分类和验证。这种方法的灵活性和直观性有助于深入理解细胞群的特征和功能。通过结合这两种分析方法,我们不仅可以获得全局性的细胞分布和关系图景,还能在具体的细胞群层面上进行精细化分析,能够提高数据解读的准确性和深度,从而更好地揭示生物学研究中的复杂现象,具有深远的科研意义。

【参考文献】

- [1] HARGREAVES M, SPRIET L L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise[J]. *Nat Metab*, 2020, 2(9): 817-828.
- [2] TEDESCO F S, DELLAVALLE A, DIAZ-MANERA J, et al. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 11-19.
- [3] TIDBALL J G. Inflammatory processes in muscle injury and repair[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(2): R345-R353.

- [4] SHANG M, CAPPELLESO F, AMORIM R, et al. Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration[J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 626-631.
- [5] MCKINNON K M. Flow cytometry: an overview[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2018, 120: 5.1. 1-5.1. 11.
- [6] GE Y C, SEALFON S C. flowPeaks: a fast unsupervised clustering for flow cytometry data via K-means and density peak finding[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(15): 2052-2058.
- [7] COSSARIZZA A, CHANG H D, RADBRUCH A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies[J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(10): 1584-1797.
- [8] CIESLAK M C, CASTELFRANCO A M, RONCALLI V, et al. T-distributed stochastic neighbor embedding(t-SNE): a tool for eco-physiological transcriptomic analysis[J]. *Mar Genomics*, 2020, 51: 100723.
- [9] GIORDANI L, HE G J, NEGRONI E, et al. High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(3): 609-621. e6.
- [10] HSU Y C, LI L S, FUCHS E. Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration[J]. *Cell*, 2014, 157(4): 935-949.
- [11] KUANG S H, GILLESPIE M A, RUDNICKI M A. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 22-31.
- [12] KUANG S H, KURODA K, LE GRAND F, et al. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle[J]. *Cell*, 2007, 129(5): 999-1010.

[收稿日期] 2024-04-21 [修回日期] 2024-07-15

[本文编辑] 崔俐俊