



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：流式细胞术分选小鼠肿瘤髓源性抑制细胞的方案优化及鉴定
作者：杜佳，饶路路，侯昕，马旻
网络首发日期：2026-05-13
引用格式：杜佳，饶路路，侯昕，马旻. 流式细胞术分选小鼠肿瘤髓源性抑制细胞的方案优化及鉴定[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260513.1342.008>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

流式细胞术分选小鼠肿瘤髓源性抑制细胞的方案优化及鉴定

杜佳¹, 饶路路¹, 侯昕², 马旻¹

(¹安徽医科大学药学科学学院, 临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽抗炎免疫药物协同创新中心, 安徽医科大学类风湿关节炎研究中心, 合肥 230032; ²宁波大学医学院病原生物学与免疫学系, 宁波 315211)

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 82170603、81502123); 宁波市自然科学基金重点项目(编号: 2024J033)

作者简介: 杜佳, 女, 硕士研究生;

马旻, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: mayang@ahmu.edu.cn;

侯昕, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: houxin@nbu.edu.cn

摘要 目的 优化小鼠 Lewis 肺癌 (LLC) 皮下肿瘤组织中髓源性抑制细胞 (MDSC) 的流式分选流程, 提升单细胞制备效率和分选纯度, 为后续功能研究提供高质量细胞来源。**方法** 取 C57BL/6 小鼠皮下 LLC 肿瘤组织, 首先比较 2 种酶学消化体系对单细胞制备效果的影响。经死活染料 (Live/Dead) 及抗小鼠 CD45、CD11b、Gr-1 抗体标记后, 上样至 Beckman CytoFLEX 流式细胞分选仪。其次采用常规与优化两种设门策略, 优化策略以 CD45⁺细胞群为起始门直接圈定 MDSC 富集区域, 后续筛选 CD11b⁺Gr-1⁺细胞。最后通过流式细胞术检测纯度, 台盼蓝染色检测活率, 并以 RT-qPCR 分析 MDSC 特征基因 *Arg1*、*Nos2*、*IL-10*、*S100A8/A9* 的表达。**结果** 优化的消化体系显著提高单细胞数量及活率。优化圈门策略后, 分选阳性率显著提升。*Arg1*、*Nos2*、*IL-10* 及 *S100A8/A9* 基因在分选细胞中高表达, 提示分选后细胞保持 MDSC 特征性功能。**结论** 该研究通过优化“组织消化体系和流式设门策略”, 建立了高效分离肿瘤组织 MDSC 的流程。在保证抗原结构完整的同时提高了单细胞制备得率与纯度, 为后续 MDSC 功能与代谢研究提供可靠的方法学基础。

关键词 髓源性抑制细胞; 流式细胞术; 细胞分选; 方案优化; Lewis 肺癌; 肿瘤微环境

中图分类号 R382.5

Optimization and characterization of a protocol for sorting mouse tumor myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry

Du Jia¹, Rao Lulu¹, Hou Xin², Ma Yang¹

[¹*School of Pharmaceutical Sciences, Institute of Clinical Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine (Ministry of Education), Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines, Rheumatoid Arthritis Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032;*²*Department of Pathogen Biology and Immunology, School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211]*

Abstract Objective To optimize the flow cytometric sorting workflow for myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) from murine Lewis lung carcinoma (LLC) subcutaneous tumor tissues, improving single-cell suspension preparation efficiency and sorting purity, thereby providing high-quality cells for subsequent functional studies. **Methods** Subcutaneous LLC tumor tissues were harvested from C57BL/6 mice, and two enzymatic digestion protocols were first compared to evaluate their effects on single-cell suspension preparation. After staining with a viability dye (Live/Dead) and fluorochrome-conjugated anti-mouse antibodies against CD45, CD11b, and Gr-1, cells were loaded onto a Beckman CytoFLEX cell sorter. Next, conventional and optimized gating strategies were applied. In the optimized strategy, the CD45⁺ population was used as the initial gate to directly define an MDSC-enriched region, followed by selection of CD11b⁺Gr-1⁺ cells. Finally, purity was assessed by flow cytometry, viability was determined by trypan blue staining, and RT-qPCR was performed to measure the expression of MDSC signature genes, including *Arg1*, *Nos2*, *IL-10*, and *S100A8/A9*. **Results** The optimized enzymatic digestion protocol significantly increased the yield and viability of single cells. After optimization of the gating strategy, the post-sort positivity rate (purity) was markedly improved. *Arg1*, *Nos2*, *IL-10* and *S100A8/A9* were highly expressed in the sorted cells, indicating that the isolated cells retained characteristic MDSC features and functional signatures. **Conclusion** By optimizing both the tissue digestion protocol and the flow cytometric gating strategy, we establish an efficient workflow for isolating MDSCs from tumor tissues. This method improves the yield and purity of single-cell

preparations while preserving antigen integrity, providing a reliable methodological foundation for subsequent studies on MDSC function and metabolism.

Key words Myeloid-derived suppressor cells; Flow cytometry; Cell sorting; Protocol optimization; Lewis lung carcinoma; Tumor microenvironment

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 82170603, 81502123); Key Project of Natural Science Foundation of Ningbo(No. 2024J033)

Corresponding authors Ma Yang, E-mail: mayang@ahmu.edu.cn; Hou Xin, E-mail: houxin@nbu.edu.cn

髓源性抑制细胞（myeloid-derived suppressor cells, MDSC）源于骨髓未成熟髓系细胞的异质性群体，具有免疫抑制作用。在肿瘤微环境中，MDSC 通过分泌多种分子抑制 T 细胞活化与增殖，促进免疫逃逸和肿瘤发展^[1-4]。在小鼠中，MDSC 可分为粒细胞样和单核样 2 个亚群^[5]。研究^[6-8]表明，MDSC 除调控抗肿瘤免疫外，还通过影响代谢重编程、血管生成及免疫检查点分子表达促进肿瘤进展。因此获取高质量 MDSC 是开展后续机制研究的重要前提。

然而，从肿瘤获得高纯度 MDSC 仍具有挑战。免疫磁珠法虽广泛应用于细胞分选，但在肿瘤组织等高度异质样本中其纯度与活率有时难以满足高精度研究的需求^[9-10]。流式细胞分选（fluorescence-activated cell sorting, FACS）凭借多参数荧光标记可实现对目标细胞的高纯度分离，但其结果易受组织消化条件、碎片/死细胞背景及设门策略影响^[11-12]。该研究基于 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌（Lewis lung carcinoma, LLC）皮下移植模型，从“组织消化体系”和“流式设门策略”2 个方面优化 MDSC 分离流程，并通过多种方法验证，旨在建立高效、可重复的肿瘤组织 MDSC 分选方法，为后续功能研究提供高质量细胞来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 只 6~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限责任公司，生产许可证号：SCXK(苏)2023-0009，使用许可证号：SYXK(苏)2023-0036。小鼠饲养在宁波大学实

验动物中心 SPF 级动物房内。饲养温度维持在 18~22 °C，湿度保持在 40%~70%，确保明暗循环为 12 h/12 h，以模拟自然光照条件。小鼠的居住空间、垫料、食物及水源均经过严格的高温高压消毒，确保无菌状态。此外，小鼠还定期获得灭菌葵花籽作为营养补充。每天进入 SPF 房观察并记录小鼠生长状况，每周更换垫料 2 次，并持续供应新鲜饲料与饮用水。所有动物实验均经宁波大学动物实验中心伦理委员会批准（伦理批号：NBU20240307），并遵守相关伦理法规。

1.1.2 主要试剂

Zombie Aqua Fixable Viability Kit、PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD45 Antibody、Brilliant Violet 605 anti-mouse/human CD11b、FITC anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Antibody (货号：423101、103132、101257、108406) 购自美国 BioLegend 公司；Fetal Bovine Serum、Collagenase IV (货号：12103C、C4-BIOC) 购自美国 Sigma 公司；高糖 DMEM 培养基、PBS 缓冲液、青-链霉素混合液 (货号：G4511、G4202、G4003) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司；脱氧核糖核酸酶 I、红细胞裂解液 (货号：D8076、R1010) 购自北京索莱宝科技有限公司；胰蛋白酶消化液 (货号：C100C1) 购自苏州新赛美生物科技有限公司；Percoll 密度梯度离心介质 (货号：17089101) 购自美国 Cytiva 公司；Mouse FcR Blocking Reagent (货号：S0B0599-200T) 购自杭州斯达特生物科技有限公司；0.2% 台盼蓝染液 (货号：RE010112) 购自上海睿钰生物科技有限公司；PerfectStart Green qPCR SuperMix (+Universal Passive Reference Dye) 染料法荧光定量 PCR 预混液 (货号：AQ602-01) 购自北京全式金生物技术有限公司；SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (货号：12574018) 购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.3 主要仪器

低温离心机 (型号：Centrifuge 5810R) 购自德国 Eppendorf 公司；恒温摇床 (型号：TQZ-312) 购自上海精宏实验设备有限公司；流式细胞仪、流式细胞分选仪 (型号：CytoFLEX SRT、BECKMAN CytoFlex S) 购自美国 Beckman Coulter 公司；细胞计数仪 (型号：Countstar Mira FL Pro) 购自上海睿钰生物科技有限公司；呼吸麻醉机 (型号：R500IE) 购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

LLC 细胞系购自国家实验细胞资源共享平台，使用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养基培养。定期进行支原体检测，确保实验所用细胞均为支原体阴性。

1.2.2 肿瘤模型构建

将 LLC 细胞 (1×10^6 个/只) 重悬于 0.1 mL PBS 中，接种于小鼠右后肢皮下。接种 7 d 后起，每隔 2~3 d 用游标卡尺测量肿瘤长短径，按公式 $V = (\text{长} \times \text{短}^2) / 2$ 计算肿瘤体积。实验终点处死小鼠，完整剥离肿瘤组织并称重。

1.2.3 肿瘤组织单细胞悬液制备

取荷瘤小鼠肿瘤组织，剪碎后将分别按以下 2 种条件消化：① 含 0.5 mg/mL 胶原酶 IV、20 $\mu\text{g/mL}$ DNase I (不含 FBS) 的 RPMI-1640 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 20 min。② 含 0.5 mg/mL 胶原酶 IV、20 $\mu\text{g/mL}$ DNase I 及 3% FBS 的 RPMI-1640 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 45 min。消化完成后，经 200 目筛网过滤收集细胞悬液，加入 20 mL 含 2% FBS 的 PBS 终止消化，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 1500 r/min 离心 5 min。弃上清液，用 7 mL 40% Percoll 重悬，2000 r/min，升速 6、降速 2 室温离心 20 min。弃上清液，再次过滤后加 2 mL 红细胞裂解液，4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 10 min。加入预冷 PBS (含 2% FBS) 至满管，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 1500 r/min 离心 5 min 后弃上清液，以 1 mL PBS 重悬细胞，台盼蓝染色计数并检测活率，用于后续实验。

1.2.4 流式补偿调节

使用阳性对照管调节电压，随后上样阴性对照管和单染管，手动调节补偿矩阵。最后上样阳性管确认细胞分群。全程保持空白管、单染管及样品管各通道电压一致。分析及分选时，以无标记抗体管圈门，单标抗体管调节补偿，随后开始采集数据。

1.2.5 流式抗体标记及流式细胞仪分选

取单细胞悬液，加入鼠 Fc 阻断抗体，冰上孵育 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、2000 r/min 离心 5 min，弃上清液，以 0.2 mL 含 2% FBS 的 PBS 重悬。每 1×10^6 个细胞加入如下抗体混合液：KO525-Zombie 0.5 μL 、CD45-PerCP 1 μL 、CD11b-BV605 1 μL 、Gr-1-FITC 1 μL 、Ly-6C-APC、Ly-6G-Pc-7。孵育结束后加入适量 PBS 洗涤细胞 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、2000 r/min 离心 5 min)，以去除未结合的抗体。最后用含 2% FBS 的 PBS 重悬细胞，并经 40 μm 滤膜过滤准备上机。MDSC

被定义为 L/D⁺CD45⁺CD11b⁺Gr-1⁺的细胞群体、M-MDSC 被定义为 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high}, PMN-MDSC 被定义为 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low}。

1.2.6 细胞计数及细胞活力检测

流式细胞分选后,将收集的细胞悬液在 4 °C 条件下 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,并用适量含 10% FBS 的 RPMI-1640 重悬。取细胞悬液 0.1 mL 于新的 1.5 mL 离心管中,并加入等量的 0.2% 台盼蓝染液,混匀,然后取 20 μL 加入细胞计数板,用细胞计数仪计数并读取细胞活力。

1.2.7 流式与实时荧光定量 PCR 验证分选效果

分选后取部分细胞,经流式细胞术检测分选纯度,台盼蓝染色法分析细胞活率。使用 TRIzol 提取总 RNA,按说明书以 SuperScript III 逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix,于 Light Cycler 480 系统进行。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,基因包括精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, Nos2)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、分子钙结合蛋白 A8(calcium-binding protein A8, S100A8)、钙结合蛋白 A9(calcium-binding protein A9, S100A9),详细序列见表 1。

表 1.引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence
<i>Arg1</i>	F: 5'-CATTGGCTTGCGAGACGTAGAC-3'
	R: 5'-GCTGAAGGTCTCTTCCATCACC-3'
<i>Nos2</i>	F: 5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'
	R: 5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
<i>IL-10</i>	F: 5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'
	R: 5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'

<i>SI00A8</i>	F: 5'-CCGTCTTCAAGACATCGTTTGA-3'
	R: 5'-GTAGAGGGCATGGTGATTCCT-3'
<i>SI00A9</i>	F: 5'-ATACTCTAGGAAGGAAGGACAC-3'
	R: 5'-TCCATGATGTCATTTATGAGGGC-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-ACTCCACTCACGGCAAATTC-3'
	R: 5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3'

1.3 统计学处理

统计分析与作图均在 GraphPad Prism 8.0.2 软件中完成。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织中 MDSC 及其亚群的鉴定

为验证 LLC 皮下移植模型中是否存在 MDSC 浸润，本研究对肿瘤组织单细胞悬液进行了流式细胞术分析。按照圈门逻辑对 MDSC 进行圈门（图 1A）。随后依据 Ly6G 与 Ly6C 的表达特征，进一步将 MDSC 划分为粒细胞样髓源性抑制细胞（granulocytic myeloid-derived suppressor cells, PMN-MDSC） $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$ 和单核细胞样髓源性抑制细胞

（monocytic myeloid-derived suppressor cells, M-MDSC） $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{high}$ 两个亚群（图 1A）。代表性流式图分别展示了总 MDSC 的表型特征（图 1B）及其亚群 PMN-MDSC 与 M-MDSC 的分布情况（图 1C）。统计结果显示，2 种亚群在肿瘤组织中均占有一定比例，其中 M-MDSC 的比例显著高于 PMN-MDSC（图 1D）。以上分析表明，LLC 皮下移植瘤模型中有 MDSC 的浸润且主要亚群为 M-MDSC。

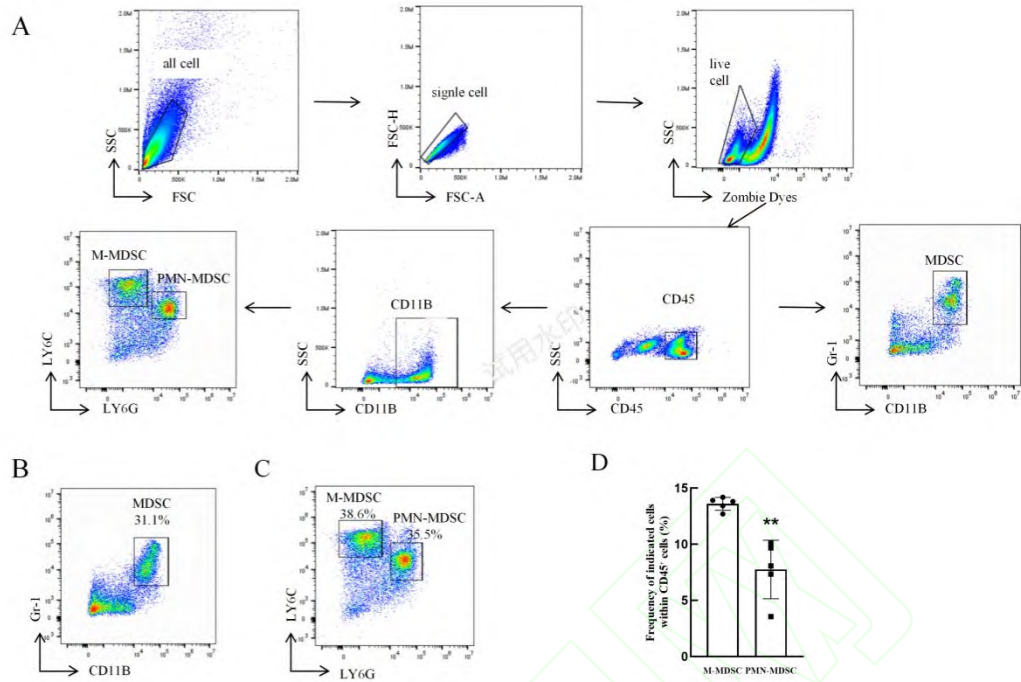


图 1 LLC 皮下移植瘤模型中 MDSC 及其亚群的流式鉴定

Fig.1 Flow cytometric identification of MDSCs and their subsets in the LLC subcutaneous transplantation model

注：A: Gating strategy of MDSC and its subsets PMN-MDSC, M-MDSC; B: Representative flow cytometry scatter plots illustrating the infiltration of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) with CD45 gate; C: Representative flow cytometry scatter plots of PMN-MDSC and M-MDSC within the CD11B gate; D: Statistical analysis of the proportions of PMN-MDSC and M-MDSC in tumor tissues; ** $P < 0.01$ vs M-MDSC.

2.2 不同组织消化条件对细胞制备效率的影响

为探究不同消化方法对于从 C57BL/6 小鼠皮下 LLC 瘤组织中获得单细胞效率的影响，本研究分别采用 2 种酶学消化体系处理：优化前体系 (Met-1) 及优化后体系 (Met-2)。将最终获得的纯净单细胞悬液通过台盼蓝染色法检测细胞数量和细胞活率 (图 2A、2B)。结果显示，优化后体系得到的细胞总数显著提高 (图 2C)。同时，优化体系下的细胞活率也提升 (图 2D)。为评估消化过程对细胞表面抗原的影响，本研究对制备的细胞进行了流式复检。结果显示 2 种体系下 $CD11b^+Gr-1^+$ MDSC 群体均界限清晰 (图 2E、2F)，且 2 种消化体系 $CD11b^+Gr-1^+$ MDSC 比例无显著差异 (图 2G)。综上，优化后的消化体系在保证抗原

结构完整的前提下，提升了肿瘤组织单细胞的细胞总数和细胞活率，为后续高质量 MDSC 的分选及功能研究奠定了基础。

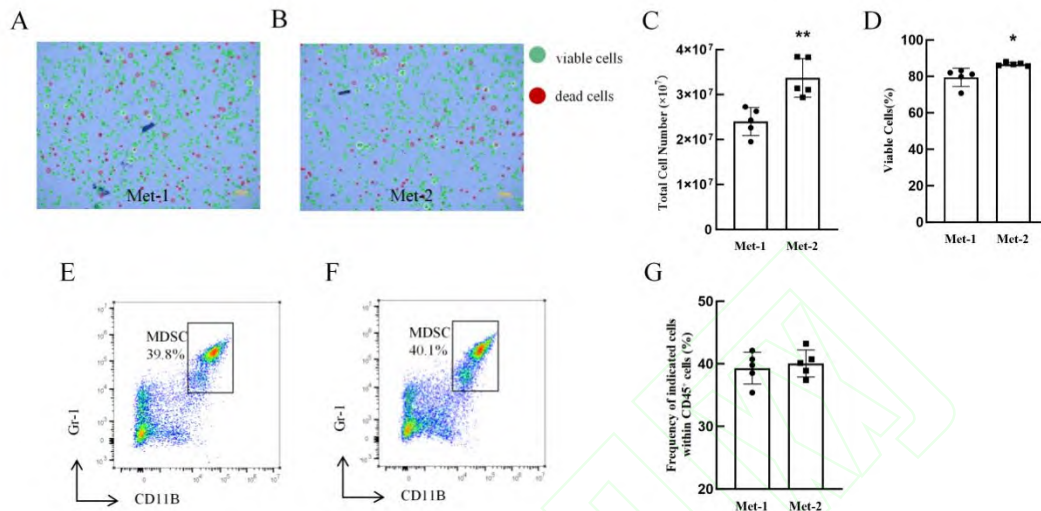


图 2 不同消化条件对小鼠 LLC 肿瘤组织单细胞悬液制备效率及细胞状态的影响

Fig.2 The effects of different digestion conditions on the preparation efficiency and cell status of single-cell suspensions from mouse LLC tumor tissues

注：A-B: Trypan blue staining images of tumor tissues processed with the pre-optimized protocol A and the optimized protocol B $\times 8$. Green indicates viable cells, and red indicates dead cells; C: Comparison of total single-cell yield between the two digestion systems; D: Comparison of cell viability between the two digestion systems; E,F: Flow cytometric re-analysis of cells prepared with the pre-optimized (E) and optimized (F) systems. The clear boundary of the CD11b⁺Gr-1⁺ population indicates the integrity of major surface antigens; G: Statistical analysis of flow cytometry re-analysis results of cells prepared by the pre-optimized and optimized systems; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Met-1.

2.3 流式圈门及分选效率按照

使用流式抗体对细胞进行表面标记，标记完成后上样至 Beckman CytoFLEX 流式细胞分选仪进行分析与分选。首先采用常规设门策略 (Met-1) 对 MDSC 细胞进行分选 (图 3A)。流式复检结果显示，该策略下所得细胞阳性率约为 80% (图 3B)。为进一步提高分选纯度，本研究对设门流程进行了优化。由于肿瘤单细胞悬液中，细胞碎片、核碎片及死细胞残留较

多,其在 FSC/SSC 散点图中的分布与髓系细胞群存在明显重叠,单纯依赖 FSC/SSC 的“all cell 门”难以充分去除上述干扰事件;而这些事件可产生非特异性荧光信号或散点拖尾,进而影响后续基于 CD45、CD11b 和 Gr-1 的表面标记门控精度。基于此,在优化设门策略 (Met-2) 中,将初始设门设置为 CD45⁺白细胞群 (图 3B)。并按照经验圈定 MDSC 细胞富集区域,后续圈门策略与常规圈门策略一致。优化后分选阳性率提升至约 90%,细胞纯度明显改善 (图 3D)。两种设门策略分选所得阳性细胞比例经统计对比显示,优化方案显著优于常规设门 (图 3E)。

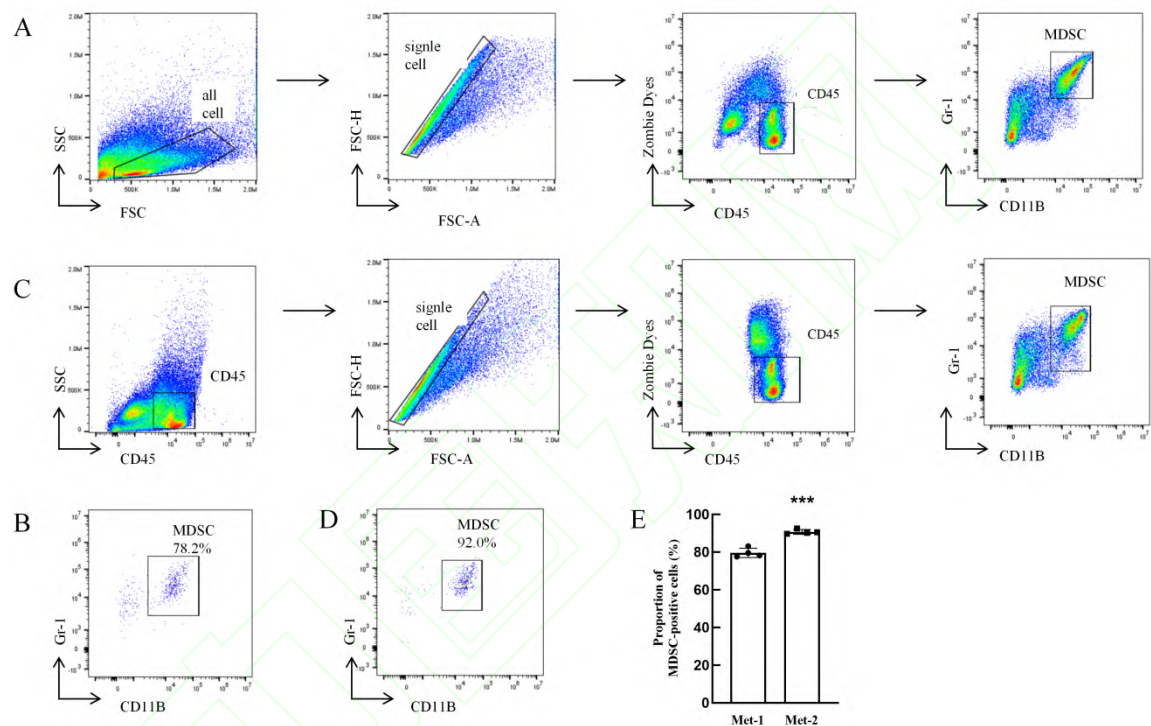


图 3 小鼠 LLC 肿瘤中 MDSC 的流式圈门及分选效率优化

Fig.3 Gating strategy optimization and sorting efficiency evaluation of MDSCs from mouse LLC tumors

注: A: Gating strategy of conventional gating strategy Met-1;B:Representative schematic diagram for purity analysis by flow cytometric re-analysis with the Gating strategy of Met-1;C:Gating strategy of optimized gating strategy Met-2;D:Representative schematic diagram for purity analysis by flow cytometric re-analysis with the optimized Gating Strategy Met-2;E:Comparison of the percentage of sorted positive cells between the two gating strategies;*** $P < 0.001$ vs Met-1.

2.4 分选后 MDSC 的功能验证

为验证经优化流程分选所得 MDSC 的活性及功能状态，本研究采用台盼蓝染色和 qPCR 进行检测。所用细胞均来源于经“胶原酶 IV + DNase I 消化 45 min”及“优化圈门策略”流程获得的分选群体。台盼蓝染色结果显示（图 4A），分选后 MDSC 的平均活率为(70±5)%，表明细胞在经过分选操作后仍保持较好的活性，可用于后续功能学实验。进一步采用 qPCR 技术对分选后 MDSC 的功能基因表达进行检测分析。其中，检测样本包括分选前的肿瘤细胞 (pre) 以及分选后所获得的 MDSC 细胞(post)，结果显示免疫抑制相关基因 *Arg-1*、*Nos2* 及 *IL-10* 的表达水平均较分选前上调 ($P<0.05$)（图 4B - 4D）。同时，MDSC 特征性炎症信号分子钙结合蛋白 *S100A8* 与 *S100A9* 的表达亦显著升高 ($P<0.05$)（图 4E、4F）。提示，通过优化单细胞制备及流式分选策略获得的 MDSC，在保持细胞存活率的同时，保留了 MDSC 的典型功能特征，为后续体外功能实验及机制研究提供所需细胞来源。

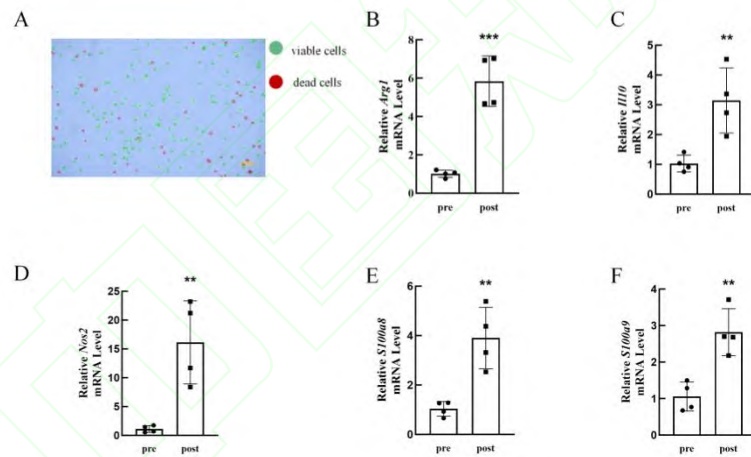


图 4 MDSC 的活性与功能基因表达分析

Fig.4 Viability and functional gene expression analysis of sorted MDSCs

注：A:Trypan blue staining of MDSCs after fluorescence-activated cell sorting ×8;B–F:qPCR analysis of the indicated functional genes in post-sorted MDSCs compared with the pre-sort tumor cell fraction; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs pre.

3 讨论

MDSC 是肿瘤微环境中最重要的免疫抑制性髓系细胞之一，其扩增和活化通常提示肿瘤处于持续的免疫抑制状态[1-7]。现有研究表明，MDSC 不仅能够通过 Arg-1、Nos2、活性氧及 IL-10 等途径抑制 T 细胞和 NK 细胞的抗肿瘤反应，还可影响肿瘤相关炎症、血管生成、转移及对免疫治疗的应答[2-4,6,7,13]。在 LLC 模型中，MDSC 是肿瘤组织中较为典型的免疫抑制细胞成分，其富集与肿瘤进展密切相关。因此，围绕 LLC 肿瘤组织建立稳定、可重复的 MDSC 分离流程，具有明确的方法学和应用价值。与外周血或脾脏来源细胞相比，实体瘤组织成分更加复杂，常伴有较多的细胞碎片、坏死物质和细胞外基质，给目标细胞的制备和高纯度分选带来较大困难，因此针对肿瘤样本建立更适宜的分选流程具有现实意义

本研究围绕肿瘤组织 MDSC 分选过程中的 2 个关键环节进行了优化，即单细胞悬液制备和流式设门策略调整。优化后的消化条件提高了细胞获得效率这对于后续分选及功能实验尤为重要。除样本制备外，通过优化设门策略进一步减少了碎片等因素的影响，提高了目的细胞分选的阳性。对于需要开展 qPCR、共培养、代谢检测等后续实验的研究而言，较高的分选纯度关系到实验结果的稳定性与可靠性。因此，本研究建立的优化流程具有较好的实用价值，可为实体瘤浸润 MDSC 的后续研究提供较稳定的技术支持。

在分选后细胞鉴定方面，本研究检测了 *Arg-1*、*Nos2*、*IL-10*、*S100A8* 和 *S100A9* 等与 MDSC 表型及功能相关的分子。*Arg1*、*Nos2* 及 *S100A8/A9* 可作为髓源性抑制细胞(MDSCs)的关键指标。其中，*S100A8/A9* 是调控 MDSC 活化、迁移和促炎信号的重要分子，其高表达提示分选所得细胞保持了典型的免疫抑制与炎症趋化特征^[13]。另有研究表明，*S100A8/A9* 在肿瘤中发挥促进转移作用^[14]。qPCR 结果显示，分选细胞中 *Arg1*、*Nos2* 及 *S100A8/A9* 等关键功能基因上调，这进一步提示该方法所得 MDSC 群体保持了典型的免疫抑制及炎症信号特征。

当然，本研究仍存在一定局限：如部分亚群（M-MDSC 与 PMN-MDSC）未进一步分离分析；此外，本实验仅从基因表达层面对功能进行了初步验证，尚需结合代谢组学或免疫抑制功能实验进一步确认。未来可在优化分选参数的同时结合单细胞测序、代谢通量分析等技术，更全面地解析不同 MDSC 亚群的代谢特征与免疫调控机制。综上，本研究建立的基于流式细胞术的 MDSC 分选方法兼顾纯度、活率与表型完整性，为深入研究 MDSC 在肿瘤免疫代谢中的作用提供了可靠技术基础和方法学参考。

参考文献

- [1] Jou E, Chaudhury N, Nasim F. Novel therapeutic strategies targeting myeloid-derived suppressor cell immunosuppressive mechanisms for cancer treatment[J]. *Explor Target Antitumor Ther*, 2024, 5(1): 187-207. doi:10.37349/etat.2024.00212.
- [2] Huang J, Zhao Y, Zhao K, et al. Function of reactive oxygen species in myeloid-derived suppressor cells[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1226443. doi:10.3389/fimmu.2023.1226443.
- [3] Raskov H, Orhan A, Gaggar S, et al. Neutrophils and polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells: an emerging battleground in cancer therapy[J]. *Oncogenesis*, 2022, 11(1): 22. doi:10.1038/s41389-022-00398-3.
- [4] Lu J, Luo Y, Rao D, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: therapeutic targets to overcome tumor immune evasion[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2024, 13(1): 39. doi:10.1186/s40164-024-00505-7.
- [5] García-Arévalo F, Leija-Montoya A G, González-Ramírez J, et al. Modulation of myeloid-derived suppressor cell functions by oral inflammatory diseases and important oral pathogens [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1349067. doi:10.3389/fimmu.2024.1349067.
- [6] Goldmann O, Medina E. Metabolic pathways fueling the suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1461455. doi:10.3389/fimmu.2024.1461455.
- [7] Hu T, Zhai J, Yang Z, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanistic insights and targeted therapeutic innovations[J]. *MedComm*, 2025, 6(6): e70231. doi:10.1002/mco2.70231.

- [8] Liu H, Zeng X, Ren X, et al. Targeting tumour-intrinsic N⁷-methylguanosine tRNA modification inhibits MDSC recruitment and improves anti-PD-1 efficacy[J]. *Gut*, 2023, 72(8): 1555-67. doi:10.1136/gutjnl-2022-327230.
- [9] Choi J E, MacDonald C R, Gandhi N, et al. Isolation of human and mouse myeloid-derived suppressor cells for metabolic analysis[J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(2): 101389. doi:10.1016/j.xpro.2022.101389.
- [10] Piqueras-Nebot M, Benet M, Estors M, et al. A novel method for isolation of tumor infiltrating myeloid-derived suppressor cells from human lung tumor tissue[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1): 15175. doi:10.1038/s41598-025-99877-x.
- [11] Brioschi S, D'Errico P, Amann L S, et al. Detection of synaptic proteins in microglia by flow cytometry[J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 149. doi:10.3389/fnmol.2020.00149.
- [12] Calvo B, Rubio F, Fernández M, et al. Dissociation of neonatal and adult mice brain for simultaneous analysis of microglia, astrocytes and infiltrating lymphocytes by flow cytometry[J]. *IBRO Rep*, 2020, 8: 36-47. doi:10.1016/j.ibror.2019.12.004.
- [13] Wu Y, Yi M, Niu M, et al. Myeloid-derived suppressor cells: an emerging target for anticancer immunotherapy[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 184. doi:10.1186/s12943-022-01657-y.
- [14] 蒋 岑, 马 洪, 胡 赟, 等. S100A8/A9 通过 Wnt/ β -catenin 促进口腔鳞癌的侵袭迁移[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(12): 1971-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.021.
- Jiang C, Ma H, Hu (B /Y), et al. S100 A8/A9 promote the invasion and migration of oral squamous cell carcinoma through Wnt/ β -catenin[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(12): 1971-8. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.021. .