

应用双光子显微镜和流式细胞仪定性及定量确定 小鼠巨噬细胞的吞噬功能

刘光伟 马海霞 吴 优 沈 红 赵 勇*

(中国科学院动物研究所, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 移植生物学研究组, 北京 100080)

摘要 建立了流式细胞仪和双光子激光共聚焦荧光显微镜进行定性和定量检测小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞的方法, 并同传统光学显微镜细胞化学染色观察方法相比较, 探讨其检测巨噬细胞吞噬效应的优越性。常规方法获取小鼠腹腔和脾脏巨噬细胞, 制备巨噬细胞悬液。常规制备鸡红细胞, 计数并调整活细胞数, 用 5-二醋酸羧基荧光素琥珀酸单胞菌酯(5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)染色, 与巨噬细胞共温育一定时间后, 小鼠巨噬细胞特异性荧光抗体 F4/80 标记巨噬细胞。应用流式细胞仪检测巨噬细胞中 CFSE 阳性百分率来表示巨噬细胞吞噬率; 应用双光子显微镜观察被吞噬的 CFSE 阳性鸡红细胞动态分布情况。同时, 采用传统光学显微镜吉姆萨染色观察巨噬细胞吞噬百分率。结果显示, 流式细胞仪结合双光子显微镜检测巨噬细胞吞噬率与传统的显微镜计数法比较, 两者有明显的正相关性。双光子显微镜和流式细胞仪可以定性与定量检测巨噬细胞吞噬功能, 该方法具有灵敏、快捷、重复性好以及准确率高的特点, 是进行免疫学研究的可行方法。

关键词 双光子显微镜; 流式细胞仪; 吞噬效应; 巨噬细胞; 检测方法

巨噬细胞是固有免疫系统的重要成员, 具有吞噬、清除及呈递抗原异物的生物学功能, 是维持机体的正常生理状态所必需的; 其与许多重大疾病的发生和发展密切相关^[1]。以往人们主要应用光学显微镜观察吉姆萨染色巨噬细胞吞噬率。应用流式细胞仪及双光子荧光显微镜(flow cytometry method and two photon microscope, FCM+TPM)观察巨噬细胞对细菌、小颗粒的吞噬能力的方法学已有研究^[2,3], 但该技术在探讨非调理素依赖性吞噬异种鸡红细胞能力的方法尚未见报道。本文探讨了采用流式细胞仪进行定量并结合双光子荧光显微镜动态观察小鼠巨噬细胞非调理素依赖性吞噬鸡红细胞情况。该方法与传统光学显微镜免疫细胞化学染色方法检测巨噬细胞吞噬功能相比, 克服了单纯形态学检测的主观性, 可以全面、客观反映巨噬细胞的吞噬功能状态。该检测手段不但灵敏度高、精确度高和重复性好, 而且简便、快速, 可以数据分析和动态图像相结合, 从而更直观、科学地动态评价和观察巨噬细胞的吞噬能力和过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Balb/c 小鼠, 体质量(20±2) g, 雌雄兼用, 购自中国军事医学科学院实验动物中心。

1.2 小鼠腹腔和脾脏巨噬细胞悬液的制备

根据文献报道^[4,5], 采用 5 ml 注射器和冷 0.1 mol/L PBS 液反复冲洗小鼠腹腔, 将灌洗液收集于 50 ml 离心管中, 离心(1 500 r/min, 5 min)。弃上清液, 再用冷 PBS 液洗两次。用毛玻片研磨小鼠脾脏, 制备单细胞悬液, 经 0.83% Tris-NH₄Cl (Sigma)裂解, 去除红细胞。冷 PBS 洗两次。摇匀后用台盼蓝(北京中杉生物技术公司)染色和计数, 并调整活细胞数至 1×10⁶ 个/ml。将 1 ml 腹腔和脾细胞悬液加入预先用 2% 明胶(eBioscience)处理的 24 孔板(Costar)中在 5%CO₂ 细胞培养箱中 37 °C 培养 30 min 后, 将其上清液轻轻吸弃。收取其贴壁的巨噬细胞, 并调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/ml, 备用。常规染色(活细胞率>95%)和小鼠巨噬细胞标志 F4/80 抗体(BD Bioscience)染色(阳性率>95%)鉴定。

收稿日期: 2006-07-07 接受日期: 2006-11-29

国家自然科学基金重点项目(No.30630060)、国家自然科学基金(No.30600567)、国家杰出青年基金(No.30425026)、国家重点基础研究发展规划(973 计划)(No. 2003CB515501)和中国科学院引进海外杰出人才百人计划项目(No.2003-85)

* 通讯作者。Tel: 010-64807302, E-mail: zhaoy@ioz.ac.cn

1.3 鸡红细胞悬液的制备

根据文献报道^[6,7], 抽取鸡血于小烧杯中, 立即用毛刷搅拌出纤维蛋白, 慢慢倒入离心管中, 加入冷0.9%生理盐水(北京四环生物试剂公司)摇匀, 1 500 r/min, 离心 10 min, 反复洗涤 3 次, 按红细胞压积用无菌生理盐水配制 2% 鸡红细胞生理盐水悬液, 4 °C 冰箱保存备用。用前摇匀, 用台盼蓝常规染色和计数, 并调整活细胞数至 1×10^7 个/ml。

1.4 鸡红细胞标记及与巨噬细胞共温育

取鸡红细胞, 冷 PBS 洗 2 次, 并调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。将 5-二醋酸羧基荧光素琥珀酸单胞菌酯(5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE; Molecular Probes, Inc.)加入并调整终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$, 在 37 °C 温育 15 min。PBS 洗 1 次后, 调整鸡红细胞数与巨噬细胞(1×10^6 个/孔)比例为 10 : 1, 在预先用 1% 明胶预处理的 24 孔板中培养(5%CO₂, 37 °C)30~240 min。

1.5 流式细胞仪检测巨噬细胞吞噬百分率

将培养板中待检孔上清液吸弃, 用冷 PBS 收取巨噬细胞, 加入抗-鼠 Fc γ R 抗体(CD16/32, clone 2.4 G2; BD Bioscience)以阻断非特异染色后, 在各流式测定管中加入 1×10^6 个细胞与藻红蛋白荧光素(PE)-抗-鼠 F4/80 单克隆抗体(BD Bioscience), 4 °C 温育 30 min。冷 PBS 洗 2 次, 上机检测。在流式细胞仪(BD Biosciences)的散点图上根据前向角(forward scatter, FS)与侧向散射角(side scatter, SS)两个参数圈定巨噬细胞群并排除细胞碎片, FL1 通道检测绿色荧光 CFSE, FL2 通道检测红色荧光。应用红荧光和绿荧光双阳性细胞占总巨噬细胞(红荧光单阳性 + 红荧光和绿荧光双阳性)的百分数来计算其吞噬百分率。其中巨噬细胞未吞噬鸡红细胞组做为对照实验组, 而吞噬鸡红细胞组做为实验组。

1.6 双光子激光共聚焦荧光显微镜动态观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞

采用抗-鼠 Fc γ R 抗体阻断非特异染色并与 PE-抗-鼠 F4/80 抗体温育后, 加入 24 孔培养板中。将 CFSE 标记鸡红细胞加入各孔, 上机检测。双光子激光扫描共聚焦显微镜(LSM510, Zeiss)取图, 每个试样随机选择 30 个细胞测量细胞荧光强度。取图条件: (1)激发光波长: 567 nm; (2)扫描方式: XYZ; (3)物镜: 40 倍油镜(NA 为 0.75); (4)激光功率: (20 \pm 2) mW; (5)扫描强度: 50%; (6)光电倍增管的增益(PMT): 852; (7)探测针孔: 2.02; (8)扫描次数: 8。

显微镜利用经照明针孔形成点光源的激光扫描束, 对标本内焦平面上的每一点扫描, 标本上的被照射点在探测针孔处成像, 由探测针孔后的光电倍增管逐点或逐线接收, 迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像, 照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的。焦平面的点同时聚焦于照明针孔和探测针孔, 焦平面以外的点不会在探测针孔处成像, 这样得到的共聚焦图像是标本的光学横断面, 克服了普通荧光显微镜图像模糊的缺点。另外在显微镜的载物台上加一个微量步进马达, 可使载物台沿着 Z 轴上下移动, 将样品各个层面移到照明针孔和探测针孔的共焦面上, 样品的不同层面的图像都能清楚地显示, 成为连续的光切图像, 实现了“光学切片”的目的。另外, 在观察中可以实现图像静态采集和动态扫描相结合。在动态观察中某一时间点及时摄录进行图像三维重建, 获得更清晰的图像效果。在上述观察条件下, 镜下选择目标视野后, 动态观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞情况。同时, 采用分视野分通道观察并证实不同荧光染色情况和分布, 观察巨噬细胞动态吞噬过程并选择吞噬明显时间点进行拍照和三维重建立体图像。

1.7 光学显微镜观察吉姆萨染色巨噬细胞吞噬率

巨噬细胞与鸡红细胞共温育一定时间后, PBS 洗涤, 涂片以瑞氏-吉姆萨液染色, 用光学显微镜观察 200 个细胞, 计算其吞噬率^[8]。

1.8 统计学分析

实验数据均用均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.0 统计软件包进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 双光子荧光显微镜动态观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞情况

将 PE-F4/80 抗体标记 Balb/c 小鼠腹腔巨噬细胞或脾脏巨噬细胞与 CFSE 标记鸡红细胞共温育后, 动态观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞的情况。在双光子荧光显微镜下动态观察可见, F4/80 红色荧光标记巨噬细胞内不断出现被吞噬的 CFSE 绿色荧光的鸡红细胞黏附、巨噬细胞内陷及形成吞噬复合体的不同状态过程。选择明显吞噬时间点进行图像拍照, 在重叠图像(Overlays)中可见在 F4/80 红色荧光标记的巨噬细胞内有较多 CFSE 绿色标记的鸡红细胞。同时, 可见蓝色 DAPI 染核情况, 一个较大典型的“马蹄形”的巨噬细胞核周围有较多小的鸡红细胞核。另外, 分视野分通道染色可证实 CFSE 染色的鸡红细胞、

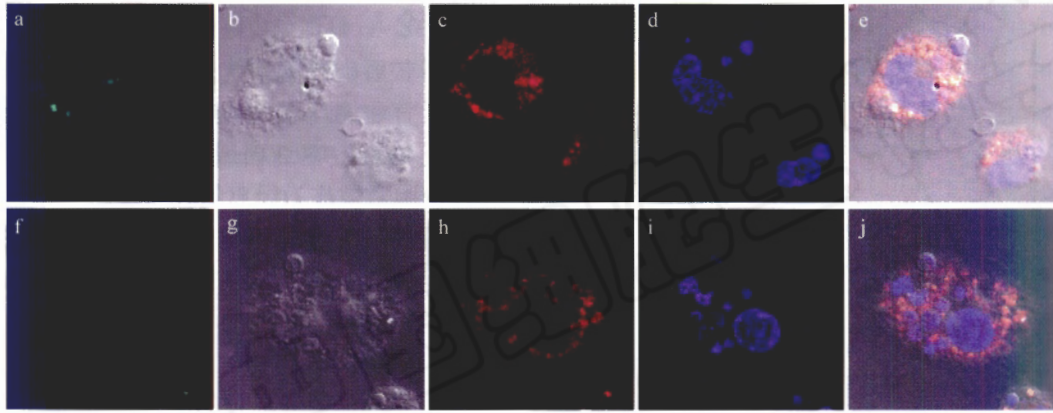


图1 双光子荧光显微镜检测小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞(630 ×)

PE-F4/80 抗体标记巨噬细胞与 CFSE 标记鸡红细胞共温育 30 min 拍片, 观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞情况。a~e: 腹腔巨噬细胞; f~j: 脾巨噬细胞。a 和 f: CFSE 标记鸡红细胞; b 和 g: 明场; c 和 h: F4/80 标记巨噬细胞; d 和 i: DAPI 染细胞核; e 和 j: 重叠图像。

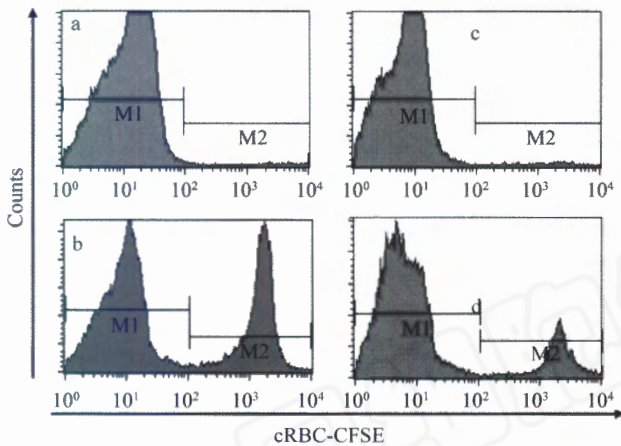


图2 流式细胞仪定量检测小鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞

检测抗鼠 PE-F4/80 抗体标记巨噬细胞中吞噬 CFSE 标记鸡红细胞的百分率。a: 腹腔巨噬细胞未吞噬鸡红细胞组; b: 吞噬鸡红细胞组; c: 脾巨噬细胞未吞噬鸡红细胞组; d: 吞噬鸡红细胞组。M1: CFSE 染色阴性; M2: CFSE 染色阳性。

F4/80 染色的巨噬细胞的染色分布及明场时吞噬鸡红细胞的巨噬细胞形态变化情况(图 1)。

2.2 流式细胞仪检测巨噬细胞吞噬鸡红细胞的吞噬率

将 Balb/c 小鼠腹腔巨噬细胞或脾脏巨噬细胞与 CFSE 标记鸡红细胞共温育 30 min 后, 应用 PE-F4/80 抗体标记巨噬细胞。用流式细胞仪定量检测腹腔或脾脏检测巨噬细胞吞噬鸡红细胞的情况。对照组检测巨噬细胞未吞噬鸡红细胞情况(图 2a 和图 2c)。实验组检测巨噬细胞吞噬鸡红细胞后情况(图 2b 和图 2d)。如图 2 所示, 腹腔和脾脏部分巨噬细胞吞噬鸡红细胞后其阳性百分率明显增加。

2.3 流式细胞仪结合双光子显微镜检测同传统光

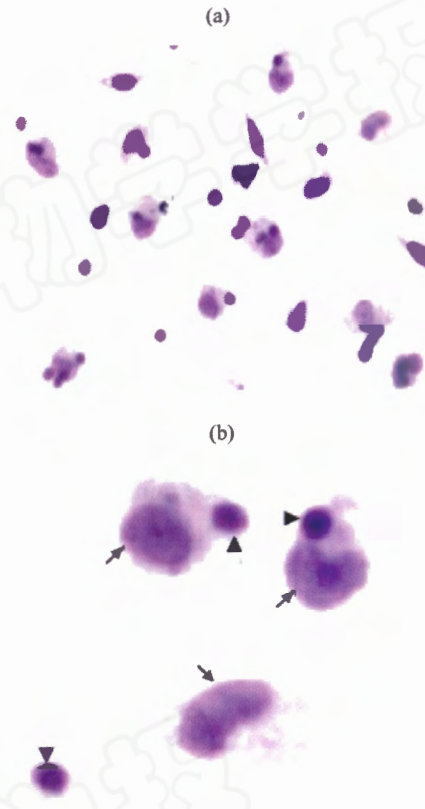


图3 传统吉姆萨染色法观察小鼠腹腔巨噬细胞对鸡红细胞吞噬效应

被吞噬的鸡红细胞(三角形); 巨噬细胞(箭头)。a: 200 × 镜下观察巨噬细胞内见被吞噬的鸡红细胞核; b: 400 × 镜下观察吞噬鸡红细胞的巨噬细胞形态变化。

学显微镜检测法比较

图 3 显示了采用传统光学显微镜吉姆萨染色(light microscope, LM)观察腹腔和脾脏巨噬细胞吞噬鸡红细胞情况。我们比较了流式细胞仪和传统光学

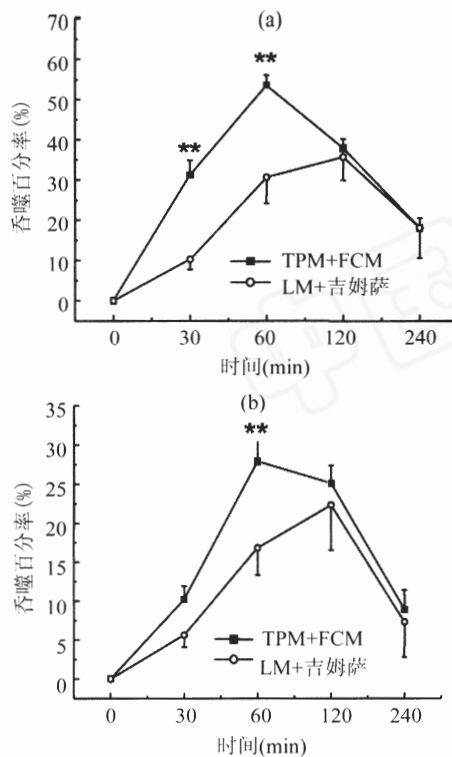


图4 两种方法测定小鼠腹腔和脾巨噬细胞对鸡红细胞吞噬时程效应

a: 腹腔巨噬细胞; b: 脾巨噬细胞。流式细胞仪定量方法与常规染色光学显微镜检测方法比较, ** $P < 0.01$ 。

显微镜法检测腹腔和脾脏巨噬细胞同鸡红细胞培养不同时间的吞噬率变化情况(图4)。采用传统方法检测其吞噬百分率,在培养60 min开始升高,120 min达到高峰,随之下降;而采用流式细胞仪检测其吞噬率变化,在培养30 min即明显升高(同传统方法相比, $P < 0.01$),60 min就达到高峰(同传统方法相比较, $P < 0.01$),随后迅速下降。两种方法比较,具有相似的变化趋势。

3 讨论

单核吞噬细胞系统是机体的主要防御系统之一,它们具有非调理素依赖的和抗体及补体等调理素依赖的异物或吞噬细菌或异物的吞噬清除功能^[9-11]。鸡红细胞常被作为经典的吞噬检测物,通过检查巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬能力和速率来检测该系统的功能。传统采用光学显微镜吉姆萨染色观察、检测巨噬细胞对鸡红细胞的吞噬率来评价单核巨噬细胞系统的吞噬清除异物的能力^[9,12]。

应用预先荧光标记的鸡红细胞,流式细胞仪和双光子激光共聚焦荧光显微镜方法可以检测巨噬细胞吞噬能力大小和比较不同亚群巨噬细胞吞噬效应,用来评价机体单核吞噬细胞系统的功能。采用双光子显微镜观察巨噬细胞吞噬鸡红细胞,同传统光学显微镜相比,可以动态观察其吞噬过程,形象且生动,给研究者以全面和客观的动态结果。同时,双光子激光共聚焦荧光显微镜可以通过荧光通道分别观察和断层扫描,明显更准确确定并定位鸡红细胞被吞噬和吞噬的部位、数量及其吞噬小体形成情况。对其样本再经过流式细胞仪检测,可以快速和精确定量巨噬细胞吞噬鸡红细胞百分率,具有明显精确、客观和重复性好等优点。进一步,将两种检测方法相结合,就可以迅速、精确和生动的定性及定量巨噬细胞吞噬过程和吞噬能力的变化,具有明显的科学性和直观性特征。

同时采用两种方法观察腹腔和脾脏巨噬细胞吞噬鸡红细胞的时程效应。流式细胞仪检测和传统方法相比具有相似的变化趋势。这说明,两种方法都可用于巨噬细胞吞噬功能检测。但相比较,前者检测数值明显高于后者;而且前者阳性百分率在培养30 min即开始升高,60 min即达到高峰,而后者在30 min

表1 比较两种方法检测巨噬情况

	TPM+FCM	吉姆萨染色法
形态学	分通道、分视野和不同层面清晰显示巨噬细胞吞噬情况、巨噬细胞形态和被吞细胞的状态	较清晰显示巨噬细胞形态和被吞噬细胞状态
吞噬百分率		
(1)检测适宜时间	30~120 min	60~240 min
(2)吞噬百分率数值	高	低
(3)不同亚群吞噬能力比较	简便	较难
(4)检测敏感性	高	低
(5)客观程度	强	差
适用范围	花费较高,适用巨噬细胞吞噬过程的全面客观分析	花费低,适用范围广
综合评价	客观定量和形态学动态、分视野及分层面观察相结合可以较全面反应巨噬细胞吞噬情况	可以粗略反应客观情况,主观性较强

才缓慢升高, 120 min 达高峰。这表明, 流式细胞仪定量检测巨噬细胞吞噬率比传统方法更敏感。同时, 结合双光子荧光显微镜, 可以动态观察鸡红细胞黏附、巨噬细胞内陷和鸡红细胞吞噬复合体形成等动态变化全过程。两者结合可以客观和全面反应巨噬细胞吞噬功能变化情况。应用流式细胞仪和双光子显微镜分析巨噬细胞吞噬能力与传统的分析方法相比(表 1), 前者灵敏度与精确度较高, 可以将数据分析和动态图像观察相结合。

流式细胞仪和双光子显微镜属于高精度仪器, 价格昂贵, 可能一定程度地限制了该方法的广泛应用, 但对于基础科学研究和重要病理过程巨噬细胞功能评价将大有帮助。将多染色流式细胞仪技术进一步应用于此项检测, 可以同时进行巨噬细胞多个亚群吞噬能力的测定与功能比较, 其优越性将进一步提高。应用双光子显微镜进行巨噬细胞吞噬过程的动态观

察明显具有其独特的优势。

感谢王靖、刘亚宾和刘晓秋老师在流式细胞仪和双光子显微镜检测技术方面给予的支持和彭建霞老师给予的实验技术帮助。

参考文献 (References)

- [1] Shao X *et al.* *J Immunol*, 2005, **175**: 3244
- [2] Rooms F *et al.* *J Microsc*, 2005, **218**: 22
- [3] Keane M *et al.* *Inhal Toxicol*, 2005, **17**: 287
- [4] Fonseca ES *et al.* *Neuroendocrinology*, 2005, **81**: 322
- [5] Mesel-Lemoine M *et al.* *Blood*, 2006, **107**: 381
- [6] 李志峰等. *中华医学杂志*, 2004, **84**: 1088
- [7] Ali RA *et al.* *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1994, **16**: 611
- [8] Uberti JP *et al.* *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, **11**: 680
- [9] Shibuya-Fujiwara N *et al.* *Life Sci*, 2001, **70**: 291
- [10] Moehrlen U *et al.* *Surg Endosc*, 2005, **19**: 958
- [11] Plowden J *et al.* *Aging Cell*, 2004, **3**: 161
- [12] Mobberley-Schuman PS *et al.* *Infect Immun*, 2005, **73**: 7317

The Phagocytosis Ability of Mouse Macrophages Determined by Flow Cytometry and Two Photon Microscope

Guang-Wei Liu, Hai-Xia Ma, You Wu, Hong Shen, Yong Zhao*

(Transplantation Biology Research Division, State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The objective of this study is to establish an approach to determine the chicken red blood cell phagocytosis ability and process of mouse macrophages by a flow cytometry (FCM) and a two photon microscope (TPM), as well as to investigate the advantages of the new method over the traditional cytochemical staining and light microscope method. Mouse peritoneal lavage and splenic macrophage samples were prepared. Chicken red blood cells were labeled with 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). The macrophages were incubated with the chicken red blood cells for proposed time. Macrophages were stained with PE-anti-F4/80 monoclonal antibody. The phagocytosis rates of CFSE-positive cells were determined by FCM and the phagocytized chicken red blood cell distribution in macrophages were observed by TPM. Meanwhile, macrophage phagocytosis was observed by traditional Giemsa staining and light microscope method. The macrophage phagocytosis measured by FCM and TPM or the traditional method showed similar results. In addition, the measurement of the phagocytosis activity of macrophages by FCM and TPM is sensitive, quick, accurate and of good reproducibility. The present approach would be helpful for us to perform macrophage immunology research.

Key words two photon microscope; flow cytometer; macrophages; phagocytosis

Received: July 7, 2006 Accepted: November 29, 2006

This work was supported by the Key Programs of National Natural Science Foundation of China (No.30630060), the National Natural Science Foundation of China (No.30600567), the Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.30425026), the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2003CB515501), 100 Quality Vocational Colleagues of the Chinese Academy of Sciences (No.2003-85)

*Corresponding author. Tel: 86-10-64807302, E-mail: zhaoy@ioz.ac.cn