

嗜中性粒细胞在均匀浓度 fMLP 诱导极化过程中伪足长度的变化

武清宜¹ 蔡春青¹ 谢翠华² 袁春华¹ 孟晓静^{1*}

(¹南方医科大学公共卫生与热带医学学院职业卫生与职业医学系, 广州 510515;

²南方医院内分泌代谢科, 广州 510515)

摘要 采用重复密度梯度离心的方法分离中性粒细胞, 并对其在 10~100 nmol/L fMLP 不同浓度趋化诱导下产生极化的极化率和伪足长度变化趋势进行分析。结果表明在加入 fMLP 的短时间内, 细胞都表现出极化率明显上升的趋势, 以 100 nmol/L 为最快, 但在 3~4 min 内都会达到 90% 以上的极化水平。同时, 细胞伪足长度明显受到不同 fMLP 浓度刺激的影响, 表现为伸展和回缩相的交替, 从而组成一个振荡周期。组成振荡周期的伸展相和回缩相及振荡频率都明显受到不同 fMLP 浓度刺激的影响, 依据伪足变化率本文提出了细胞极性活跃程度的分类。由于伪足的变化与 F-actin 的聚合密切相关, 而 F-actin 的聚合又受到极性信号分子的调节, 因此对伪足变化的分析有助于了解中性粒细胞极性信号传导通路的调节机制。

关键词 中性粒细胞; 极性; 伪足; F-actin

嗜中性粒细胞(PMNs)通过极化和趋化作用迁移到炎症位置, 并在细菌和真菌感染中起着重要的抵御作用^[1-3]。细胞极性是指在趋化剂刺激下细胞结构出现的重构, 首先在细胞膜形成皱褶^[4], 同时在皱褶处伴随着聚合的肌动蛋白(F-actin)的 2~3 倍的短暂升高, 在前缘突起形成片足, 在后缘形成尾足, 片足和尾足统称为伪足^[5,6]。由此看来, 细胞极性是细胞移动启动的关键。探讨细胞极性过程中伪足伸展的变化, 可以提示胞内极性信号传导通路的激活特征和相互作用特点。基于此, 本实验观察和研究了均匀浓度下趋化肽 N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰苯丙氨酸(fMLP)诱导中性粒细胞伪足伸长和回缩的变化规律。

1 材料与方 法

1.1 试剂与设备

N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)购自 Sigma 公司; Percoll 分离液购自 Pharmacia 公司; 淋巴细胞分离液购自鼎国生物公司; 罗丹明标记的鬼笔环肽购自 Invitrogen 公司; 激光共聚焦显微镜 FV1000 为 Olympus 公司产品。

1.2 外周血中性粒细胞分离

采用重复梯度密度离心的方法分离中性粒细胞。从健康志愿者取外周静脉血 5 ml, EDTA-Na₂ 抗凝, 用 PBS 等倍稀释, 按 10:3 的比例加入淋巴细

胞分离液, 2 000 r/min 离心 20 min。吸取白膜层, 再加入等体积的红细胞裂解液混匀, 静置 20 min 后离心沉淀细胞。将粗提纯的中性粒细胞悬液小心置于 Percoll 分离液上, 以 75% 和 60% Percoll 液密度梯度离心收集中性粒细胞, 1 250 r/min 离心 15 min, 取 65% 与 75% Percoll 液界面之间的中性粒细胞, PBS 洗涤, 去除残余 Percoll 胶粒, 获得中性粒细胞。

1.3 fMLP 诱导的中性粒细胞极化

将中性粒细胞置于塑料培养皿中, 加入 PBS 液体, 4℃ 静置 10 min, 以减少细胞自发性极化率^[7], 然后通过 40 倍物镜记录细胞 2 min, 保持视野不变, 将 fMLP 储存液加到培养皿中并调节 fMLP 终浓度, 记录 PMNs 在均匀 fMLP 浓度刺激后的形状变化。

中性粒细胞在 fMLP 刺激下的极化率表现为明显的 fMLP 浓度和时间差异, 3~4 min 后细胞 90% 以上出现极化。根据形状将细胞分成四类: ①球形; ②存在单个突起的球形细胞; ③极化细胞; ④表面有皱褶但没有极性表现的细胞。将①和④类判

收稿日期: 2010-04-27 接受日期: 2010-07-14

国家自然科学基金(No.30971193, No.30800438, No.30672353)资助项目

武清宜和蔡春青有相同贡献, 排名不分先后, 同为第一作者

*通讯作者。Tel: 020-62789125, E-mail: zhumeng@fimmu.com

断为非极化细胞, ②和③类判断为极化细胞, 根据各个视野下极化细胞的百分比就可以得出细胞的极化率。

文献^[1,8]报道, 细胞在极化变化过程中表现为伪足长度的振荡, 这种振荡包括片足的伸展和尾足的回缩, 一次伸展和回缩形成一个完整的伪足振荡周期, 细胞移动就是通过不断地伪足振荡来完成的。在一个细胞极性的振荡周期内, 伪足的伸长和收缩的时间不同, 因此可以采用伪足的伸长率、回缩率以及综合这两个指标的变化率等几个指标来分别评价细胞的极化状态。设细胞伸长 ΔL 用的平均时间为 t_1 , 缩短同样的长度用的平均时间为 t_2 , 其伸长率 R_E (extension rate)、回缩率 R_C (contraction rate) 分别为:

$$R_E = \Delta L/t_1$$

$$R_C = \Delta L/t_2$$

在一个极性周期里, 细胞伪足的总变化率 R_T 为:

$$R_T = 2\Delta L/(t_1+t_2) = 2/(1/R_E + 1/R_C)$$

1.4 细胞极化形成前后细胞骨架蛋白 F-actin 的荧光染色和观察

参照 F-actin 荧光染色试剂盒说明, 悬浮的 PMNs 在包含有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 HBSS 液中孵育 10 min, 然后加入终浓度为 100 nmol/L 的 fMLP 进行刺激, 分别对处理后的细胞进行 4% 的多聚甲醛固定、0.2% Triton X-100 穿透、罗丹明标记的鬼笔环肽避光染色, 最后 DAPI 复染细胞核, 在激光共聚焦显微镜下观察。采集罗丹明-环鬼笔肽使用的激发波长和发射波长为 543 nm/560 nm。

1.5 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据经 SPSS10.0 软件包处理分析, 统计方法除指明外均采用 ANOVA 法, $P < 0.05$ 为存在显著性差异。

2 结果

2.1 fMLP 诱导中性粒细胞的极化率

fMLP 在 10~100 nmol/L 之间细胞极化率存在显著的不同^[9], 图 1A 显示的是在 10 nmol/L 和 100 nmol/L fMLP 均匀浓度作用 30 s、60 s 和 120 s 时的细胞形态变化; 对三次独立实验中的每次实验分别计算 6 个视野下细胞的极化率(图 1B), 可以看出在加入 fMLP 的短时间内, 细胞都表现出极化率明显上升的趋势, 以 100 nmol/L 为最快, 但在 3~4 min 内都会达到 90% 以上的极化水平, 比较三种 fMLP 浓度下的 50% 极化率所用的时间, 10 nmol/L 为 51 ± 6.4 s,

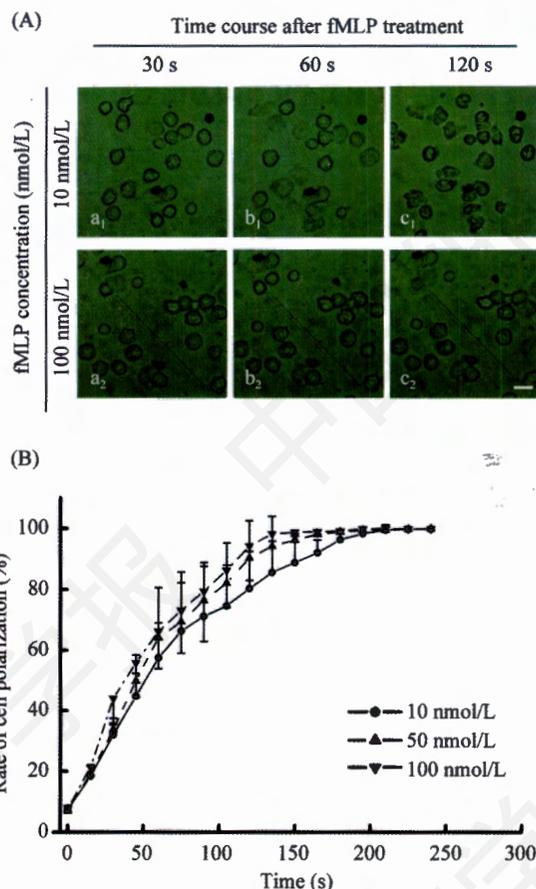


Fig.1 The concentration and time course of fMLP treatment

A: neutrophil polarization changes induced by fMLP. Scale bar=20 μ m;

B: neutrophil polarization rate induced by fMLP .

100 nmol/L 为 45.6 ± 8.2 s, 10 nmol/L 为 37.2 ± 10.5 s。

2.2 fMLP 诱导中性粒细胞片足长度的变化

加入 fMLP 后, 细胞开始生成片足, 并很快进行伸展。当达到最大值后, 尾足出现回缩, 回缩到一定范围后, 又开始伸展或有新的片足生成。片足的生成和伸展与 F-actin 的聚合有关, 采用共聚焦显微镜观察 fMLP 诱导 F-actin 的变化, 可以发现 F-actin 主要聚集在片足前缘(图 2A), 这表明片足的伸展有赖于 F-actin 单体 G-actin 的聚合。进一步对片足伸展的长度进行研究, 发现最长可达到细胞长度的 4~5 倍(60 μ m), 而超过 60% 的细胞发生极化时的片足伸展长度约为细胞直径的 10%。对 10 nmol/L、50 nmol/L 和 100 nmol/L 三种浓度 fMLP 作用 60 s 的细胞极化长度进行比较, 选取三个视野下各 10 个具有最长片足的细胞(该实验重复三次), 进行平均极化长度分析(图 2B), 可以发现三者存在明显的统计学差异, 表明细胞片足长度同样受趋化物浓度的影响。

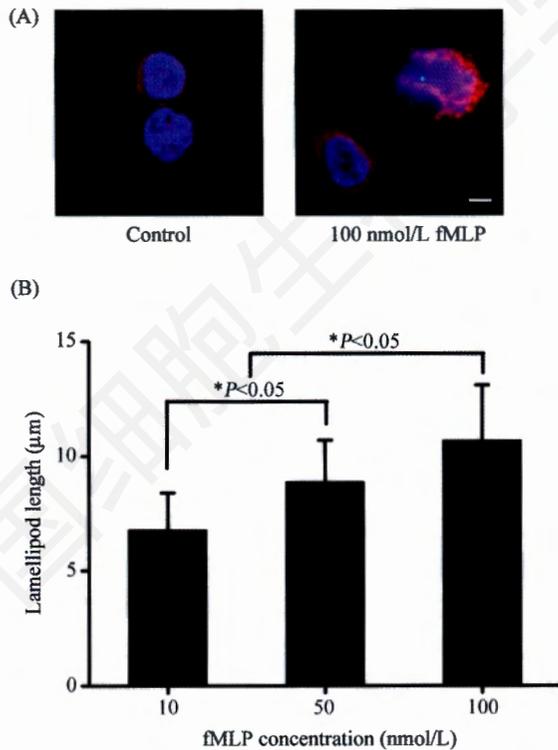


Fig.2 The pseudopod length of neutrophil after treated with fMLP

A: F-actin polymerization in the neutrophils induced by 100 nmol/L fMLP. F-actin (red), nuclei (blue). Scale bar=10 μm; B: the lamellipod length of neutrophil after treated with different concentration of fMLP.

2.3 fMLP 诱导中性粒细胞极化周期的变化

当 fMLP 浓度高于 100 nmol/L 时, 伪足的伸展率将不依赖于趋化物的浓度^[10], 为此本文比较了 10 nmol/L、50 nmol/L 和 100 nmol/L 三种浓度下的伪足变化率(图 3), 实验中可以观察到在 fMLP 刺激下细胞出现细胞形状伸长和收缩的振荡, 不同细胞之间的振荡周期不同步, 振荡波幅和振荡频率存在较大的差别。选取具有相对较高振荡波幅的细胞, 观察不同浓度的 fMLP 刺激细胞后的振荡周期的变化(图 3), 以振荡波幅即细胞纵轴长度作为纵轴, 时间作为横轴, 可以看出这种振荡具有明显的周期性。振荡周期, 主要包含两个时相: 片足的伸长相部分和尾足的回缩相部分, 从图中可以看出两个时相的时间并不相等, 回缩相的时间要更长一些, 细胞表现为回缩到一定长度的时候, 就开始新一轮的极化周期, 回缩的终末状态已明显不同于开始刺激前的球形形状, McKay 等^[9]也有类似报道。我们的实验观察到在一个极化周期里, 10 nmol/L fMLP 引起片足的伸长时间约占整

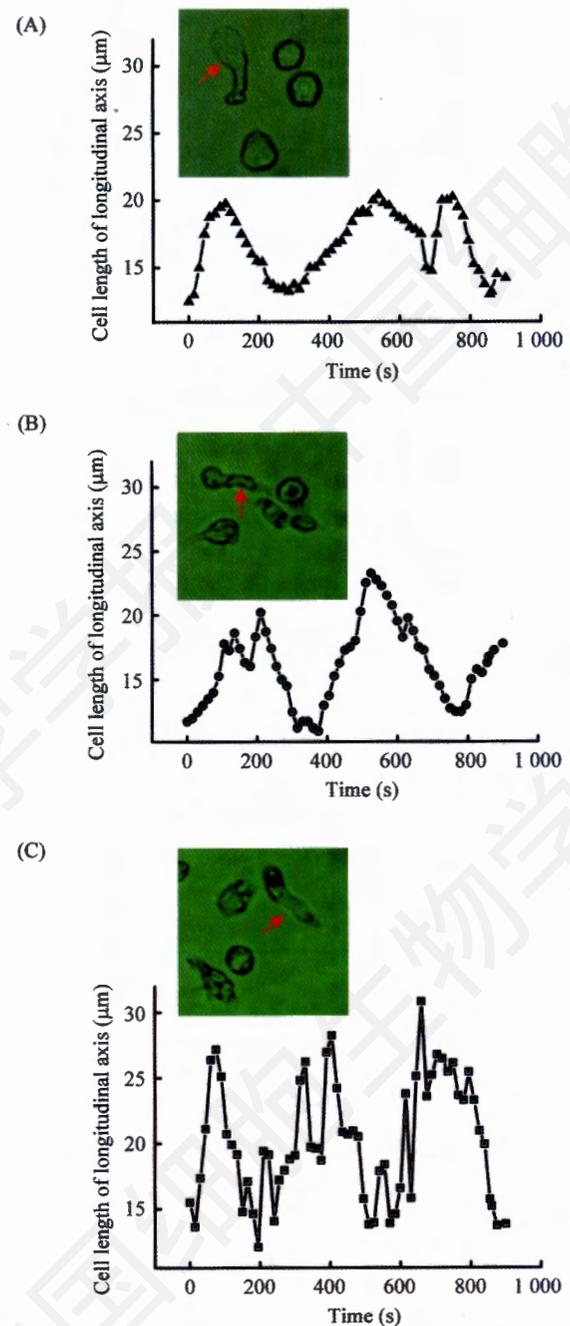


Fig.3 The oscillatory frequency of neutrophil upon stimulation with 10 nmol/L(A), 50 nmol/L(B) and 100 nmol/L (C) fMLP

个时间的 45%, 而尾足回缩时间约占 55%; 当 fMLP 浓度升高到 100 nmol/L 时, 回缩时间会明显缩短, 伸长时间升至 48%, 回缩时间降至 52%。在极性振荡周期的频率方面, 通过研究三次不同实验选取三个视野下伪足活动最活跃的 5 个细胞, 结果表明三种浓度下的振荡周期平均为 287.5 ± 65.2 s ($n=5$)、 234.6 ± 52.9 s ($n=5$) 和 216.2 ± 49.9 s ($n=5$), 方差分析表明三者存在统计学差异 ($P>0.05$)。100 nmol/L fMLP 表现为小的

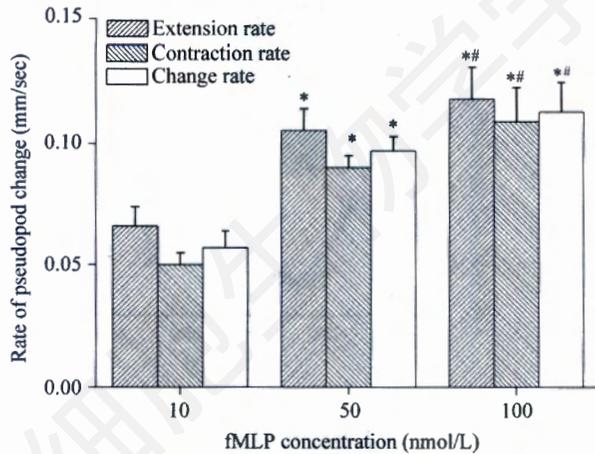


Fig.4 The extension rate, contraction rate and change rate of neutrophil pseudopods upon stimulation with different concentration of fMLP

* $P < 0.05$, compared with 10 nmol/L fMLP treatment; ** $P < 0.05$, compared with 50 nmol/L fMLP treatment.

Table 1 The change rate of neutrophil pseudopods upon stimulation with different concentrations of fMLP

Change rate ($\mu\text{m/s}$)	10 nmol/L ($n=100$)	50 nmol/L ($n=100$)	100 nmol/L ($n=100$)
Active (≥ 0.15)	2.4%	6.4%	20%
General (0.04~0.15)	51.4%	68.2%	60%
Inactive (< 0.04)	46.2%	25.4%	20%

振荡周期较多。图 4 比较了三种浓度下细胞的伸展率、回缩率和伪足长度的变化率,三者具有明显的统计学差异($P < 0.05$)。以 100 nmol/L 浓度为标准参照,片足变化率最大的 20% 的细胞设定为“活跃”,最小的 20% 的细胞设定为“不活跃”,其他的细胞设定为“一般”;10 nmol/L 和 50 nmol/L 浓度以此为参照,可以按照细胞极性的活跃程度对细胞进行分类,分为活跃、一般和不活跃三类细胞,将三种浓度下细胞极性变化进行比较,具体如表 1。由表中可知,不同浓度的 fMLP 可以明显影响三类细胞的比例,因此在 10~100 nmol/L 的 fMLP 趋化物浓度范围内, fMLP 浓度增高导致了细胞群在不同活跃程度之间变化。

3 讨论

本文结果为研究 fMLP 诱导中性粒细胞产生极性的信号机制提供了重要的线索, fMLP 通过和中性粒细胞膜上的 G 蛋白偶联受体结合,从而导致细胞

激活,进而产生极性、趋化移动、自由氧的产生和释放蛋白水解酶类^[11]。本文重点观察了均匀浓度下细胞极性过程中包括极性化率和伪足伸展和回缩特性的变化,并试图根据这些特性将细胞的极性特性进行分类。

在均匀浓度下,有研究显示中性粒细胞极性形状的变化以 10~100 nmol/L fMLP 诱导变化最为明显,此时 fMLP 和膜上受体有效结合浓度最大^[10]。细胞在加入 fMLP 后,在最初的 0~15 s 内都表现为细胞表面出现皱褶,细胞直径增大,这个阶段主要是不属于细胞骨架的 F-肌纤蛋白进行聚合(a period for polymerization of noncytoskeleton, PNCF)。接触到趋化物这个时相即启动,在激活 10 s 内达到高峰。接着极性化细胞进入细胞骨架 F-肌纤蛋白聚合期,在这个阶段,由于 F-肌纤蛋白的聚集而形成细胞片足,这也是造成片足伸展的主要原因。细胞的极性变化主要表现为两个阶段,首先是片足前伸阶段(a period for pseudopod extension, PE),最初的 30 s 内,片足呈现为较快的前伸速率,然后逐渐达到最大的长度;在达到这个长度后,尾足回缩,细胞纵轴长度逐渐缩短。伪足长度在伸展 30 s 后呈现为一定程度的振荡,这可能是由于第二个阶段即尾足回缩阶段(a period for pseudopod in oscillatory fashion, POF)的启动造成的。表明这两个阶段的时相有一定程度的重叠。细胞的极性化率本质上反映的是处于 PE 和 POF 阶段的细胞与处于 PNCF 和静息期细胞的比值,因此实质上反映的也是 F-肌纤蛋白聚合的速率。本文结果提示高浓度的趋化物有可能通过加速 F-肌纤蛋白的聚合速率而加速细胞的极性化速率,至于这种加快聚合速率的信号分子的调节是通过何种方式来进行的,有必要通过进一步研究伪足变化的机制来揭示。

趋化物通过启动胞内信号支配着细胞骨架的重新组合^[12],中性粒细胞片足的伸长和尾足的收缩受到胞内不同信号分子的调节^[13],通过这些调节,细胞完成一个完整的极性化周期,在趋化性上表现为向前移动一定的距离。本文通过对细胞极性化周期进行分析,提示细胞的纵轴长度呈现为一定范围的振荡,表现为交替性的伸长和收缩(图 3),细胞形成片足的长度和周期主要决定于肌动蛋白的聚合和解聚^[4],通过研究细胞纵轴长度的变化也可以间接地反映细胞内部肌动蛋白的动态变化。中性粒细胞极性依靠 fMLP 激活 G 蛋白三聚体的不同亚基,在细胞前缘和后缘激活不同的信号通路,从而产生片足的伸长和随

后尾足的收缩,细胞极性由此而产生^[14]。fMLP 通过激活 G_i 引致 PIP_3 产物在前缘的集聚,这种集聚是通过 PI3K 的定位机制引起的;另一方面通过 G_{pr} 的激活按照 Rho 依赖的方式将 Rho 激酶磷酸化并可能通过影响 PTEN 构型、膜交联和活性将其定位于后缘并激活^[15];同时通过多种负反馈信号的作用在前缘和后缘之间形成多种联系。本文通过对细胞纵轴长度变化的观察,发现片足的伸长和尾足的回缩组成伪足的振荡周期,而且在伪足伸长和收缩之间并不存在间歇期,表明细胞极性的调节是建立在精密的信号机制基础上的。而细胞片足的伸长率和伪足的收缩率的不同也表明可能是不同的两种信号系统,这两种信号系统在调节肌球蛋白的聚合和解聚的速率方面存在一定的差异,聚合速率相对更快一些。

文献^[1,10]通常以片足的伸长率来研究伪足的变化,这种研究在针对梯度浓度方面是足够的,但在研究均匀浓度 fMLP 对中性粒细胞极性方面不全面,本文的观察指标包括了尾足的回缩率,在亚有效浓度的范围内,提高 fMLP 浓度,可以缩短回缩率和伸长率之间的速率差异。这表明不同浓度的 fMLP 对细胞前缘和后缘信号的影响存在一定差异。为此我们提出了伪足的变化率这一指标,并根据伪足的变化率对细胞的极性强度进行分类。对中性粒细胞的极性强度进行分类有两方面的意义,一方面有利于对细胞极性机制的研究,另一方面对细胞极性功能可进行量化比较。采用伪足变化率既避免了极性率不能动态研究细胞极性变化的缺陷,又兼顾到了作用于细胞前缘和后缘不同信号通路的作用。本文比较了三种亚有效浓度 fMLP 对中性粒细胞极性强度的影响,并采用伪足变化率来评价细胞的极性变化,提出细胞极性活跃程度分类,为进一步探讨中性粒细胞极性信号转导通路的调节机制奠定了基础。

参考文献(References)

1 Zhelev DV, Alteraifi AM, Chodniewicz D. Controlled pseudopod extension of human neutrophils stimulated with different

chemoattractants. *Biophys J* 2004; 87: 688-95.

- 2 Luster AD. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-45.
- 3 Zhang XW, Liu Q, Wang Y, Thorlacius H. Cxc chemokines, mip-2 and kc, induce p-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 413-21.
- 4 Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: Importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1619-38.
- 5 Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: From receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 220-8.
- 6 Stephens L, Ellson C, Hawkins P. Roles of pi3ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 203-13.
- 7 Zhao D, Meng X, Cai C, Yuan C, Zou F. Temperature pretreatment alters the polarization response of human neutrophils to the chemoattractant n-formyl-met-leu-phe. *Inflammation* 2009; 32: 47-56.
- 8 Calvello R, Saccia M, Maffione AB, Panaro MA, Mitolo V. Power spectral analysis of the shape of fmlp-stimulated granulocytes. A tool for the study of cytoskeletal organization under normal and pathological conditions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002; 24: 139-63.
- 9 McKay DA, Kusel JR, Wilkinson PC. Studies of chemotactic factor-induced polarity in human neutrophils. Lipid mobility, receptor distribution and the time-sequence of polarization. *J Cell Sci* 1991; 100(Pt 3): 473-9.
- 10 Chodniewicz D, Zhelev DV. Chemoattractant receptor-stimulated f-actin polymerization in the human neutrophil is signaled by 2 distinct pathways. *Blood* 2003; 101: 1181-4.
- 11 Panaro MA, Acquafredda A, Sisto M, Lisi S, Maffione AB, Mitolo V. Biological role of the n-formyl peptide receptors. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 103-27.
- 12 Francis SA, Shen X, Young JB, Kaul P, Lerner DJ. Rho gef lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils. *Blood* 2006; 107: 1627-35.
- 13 Meili R, Firtel RA. Two poles and a compass. *Cell* 2003; 114: 153-6.
- 14 Xu J, Wang F, Van Keymeulen A, Herzmark P, Straight A, Kelly K, *et al*. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell* 2003; 114: 201-14.
- 15 Affolter M, Weijer CJ. Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev Cell* 2005; 9: 19-34.

Pseudopod Extension and Retraction of Human Neutrophils in Response to Uniform Concentration of fMLP

Qing-Yi Wu¹, Chun-Qing Cai¹, Cui-Hua Xie², Chun-Hua Yuan¹, Xiao-Jing Meng^{1*}

(¹Department of Occupational Health and Occupational Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China)

Abstract To analyze the polarization rate and the changes of pseudopod length in neutrophil, Percoll density gradient centrifugation upon the stimulation of 10^{-7} ~ 10^{-8} mol/L N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) was used. The polarization rate of neutrophil was significantly increased after treated by 10 nmol/L, 50 nmol/L and 100 nmol/L fMLP separately in 4min, and reached 90% from 3 min to 4 min in all three groups. There was fastest increase of the polarization rate in the group of 100 nmol/L fMLP treatment. The pseudopod length of neutrophil was affected markedly by stimulation of the different concentrations of fMLP, which showed an oscillatory phenomenon of the pseudopod extension and retraction and an oscillatory cycle was formed. The oscillatory frequency and the oscillatory cycles were significantly affected by stimulation of the different concentration of fMLP. The neutrophils were classified by their activity of polarization in this study according to the change rate of pseudopod. The change of pseudopod was represented by F-actin polymerization which was modulated by polarization signaling molecule. The analysis of the pseudopod change could contribute to the knowledge of the signaling mechanism in neutrophil polarization.

Key words neutrophil; polarization; pseudopod; F-actin

Received: April 27, 2010 Accepted: July 14, 2010

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.30971193, No.30800438, No.30672353)

Wu qingyi and Cai chungqing contributed equally to this paper.

*Corresponding author. Tel: 86-20-62789125, E-mail: zhumenteng@fimmu.com